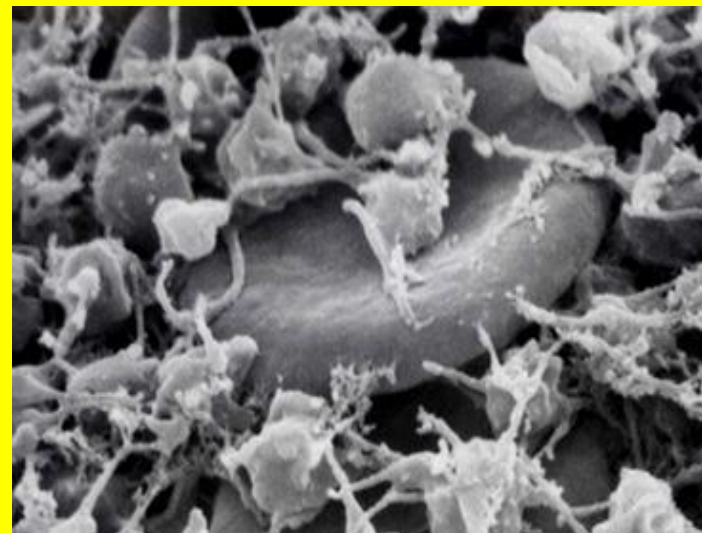
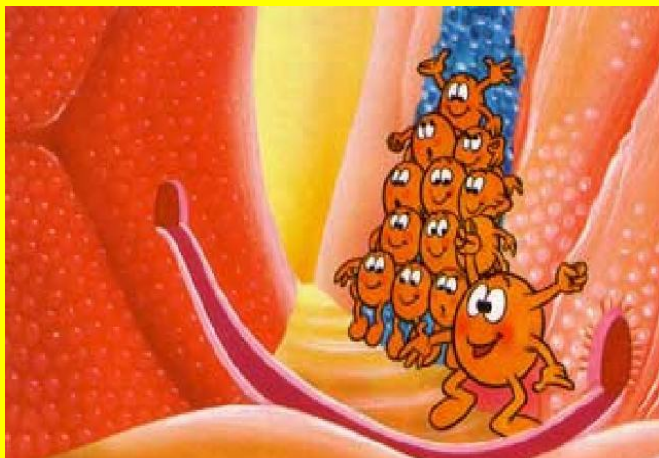
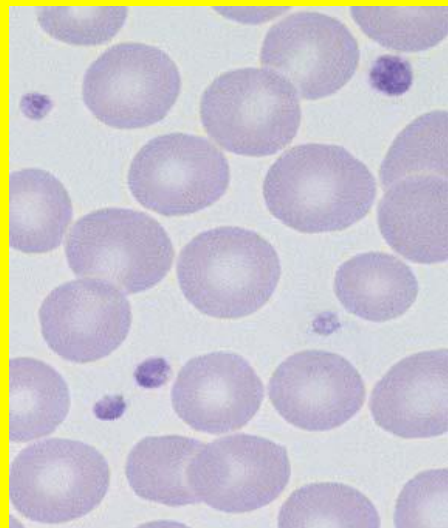


Základy Hematologie / ZHEM

Fyziologie a Patologie Trombocytů

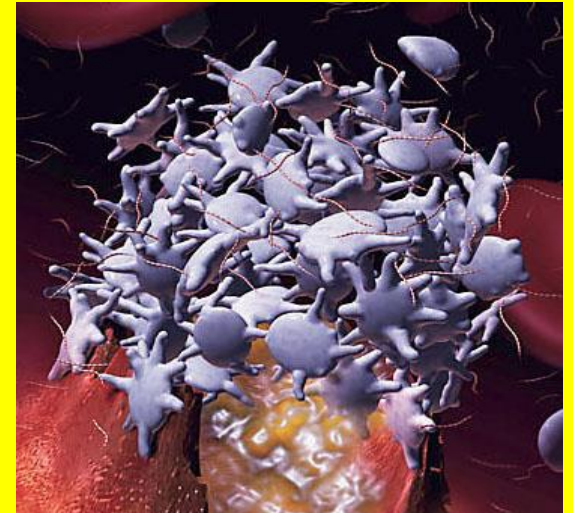
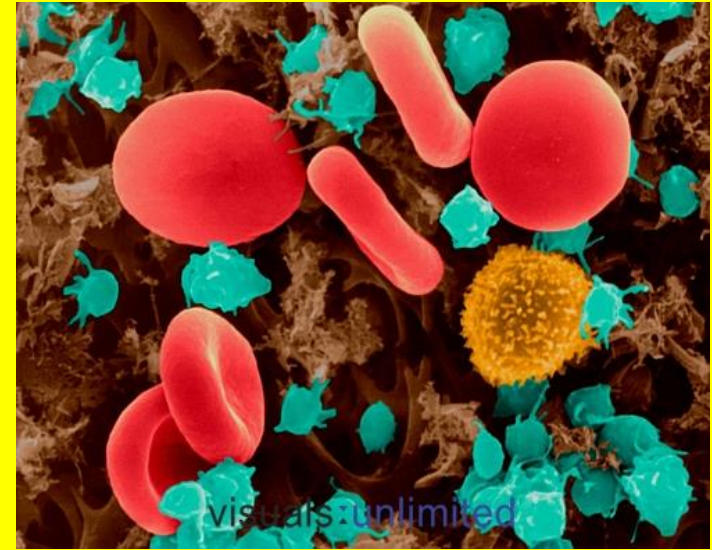


Radim Vrzal

Základní charakteristiky

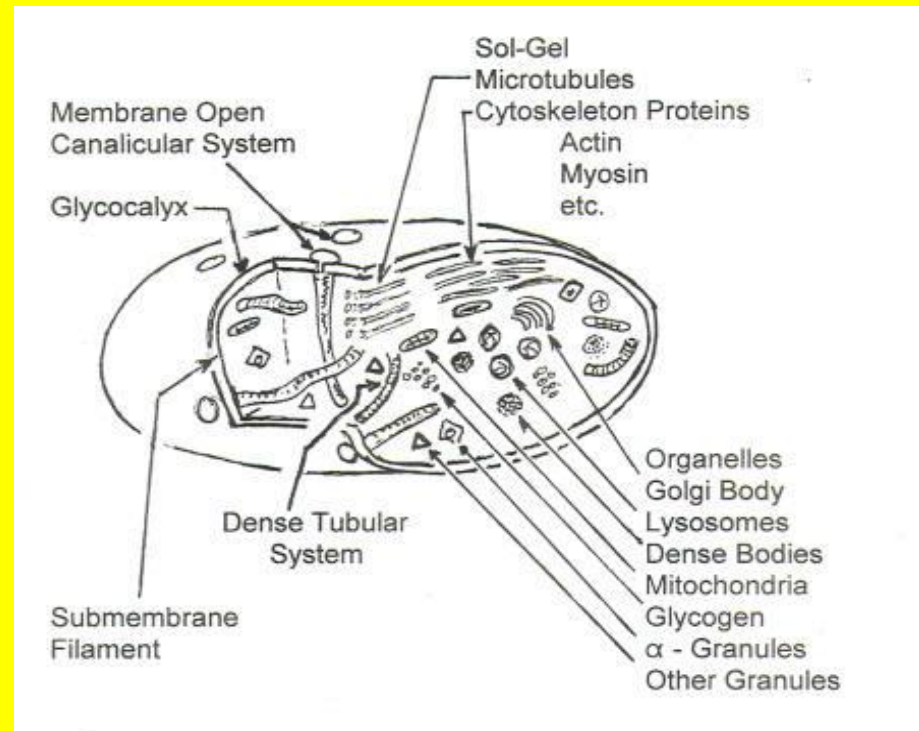
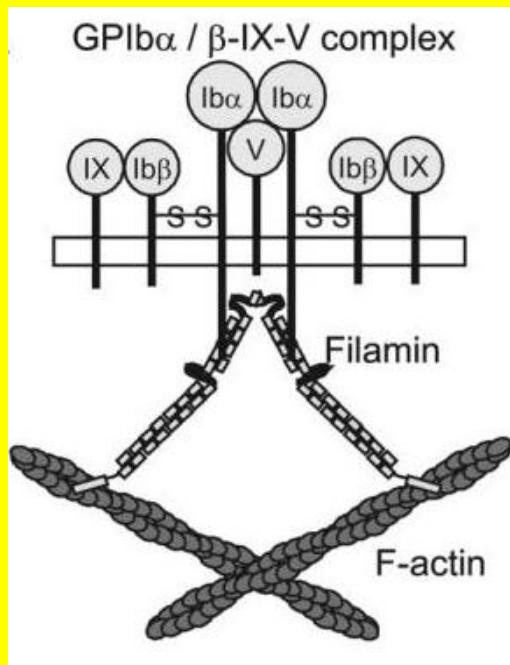
Krevní destičky (trombocyty):

- ochrana před ztrátou krve
 - **hemostáza** = zástava krvácení
 - bezjaderné
 - hladké nepravidelné disky
 - $150-300 \times 10^9$ / l krve
 - tvorba stimulována – trombopoetinem (TPO)
-
- zdroj energie – glukosa, značná enzymatická výbava z doby „minulého“ života (nepatrná schopnost proteosyntézy)
 - 2-4 μm v průměru
 - 2/3 v cirkulaci, zbytek ve slezině
 - doba života **9-12** dní
 - výrazné výkyvy v počtu – menstruace, tělesná námaha



Struktura trombocytů

- Diskoidní, monotónní tvar s šachtovými otvory **otevřeného kanalikulárního systému** (OCS)
- OCS = vnitřní systém vedení mezi částmi membrány – uvolnění obsahu granul (sekreční funkce)
- Tenká síť tetramerního spektrinu spojená s konci aktinových filament = skelet destičky
- Aktin je napojen přes Filamin-A s membránovým **GPIb α**



Struktura trombocytů II.

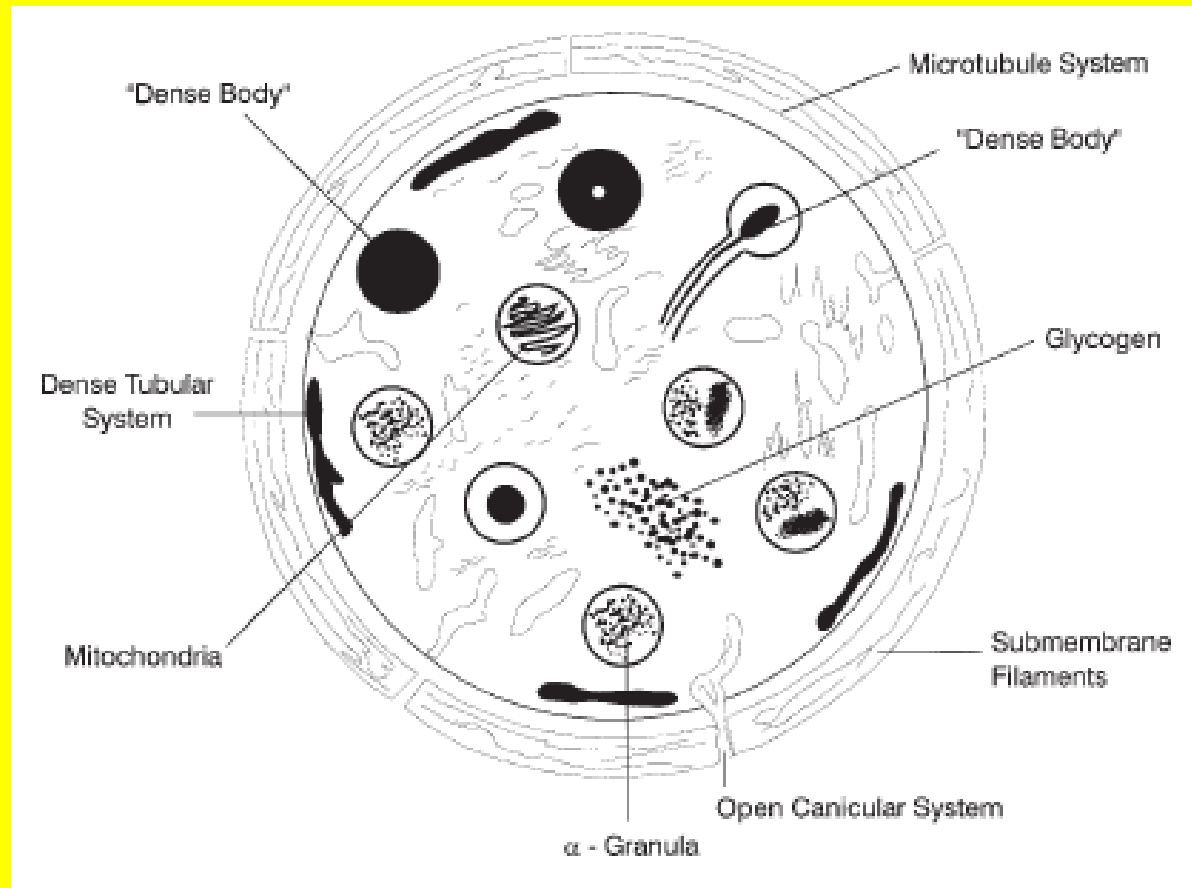
3 typy granul:

- denzní (malá, hustá, okrouhlá) (3-8 na destičku)

- ADP (agonista destiček) : ATP (agonista jiných buněk krve) = 3:2,

Ca²⁺, enzymy syntézy kyseliny arachidonové, serotonin (vychytáván z plasmy)

ADP	653 mM
ATP	436 mM
Calcium	2181 mM
Serotonin	65 mM



Struktura trombocytů III.

α -granula (početnější, světlejší, oválná) (50-80 na destičku)

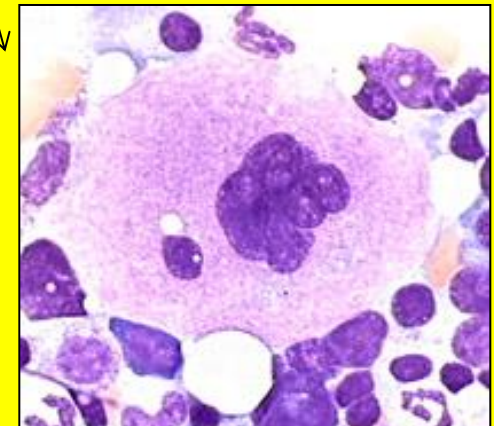
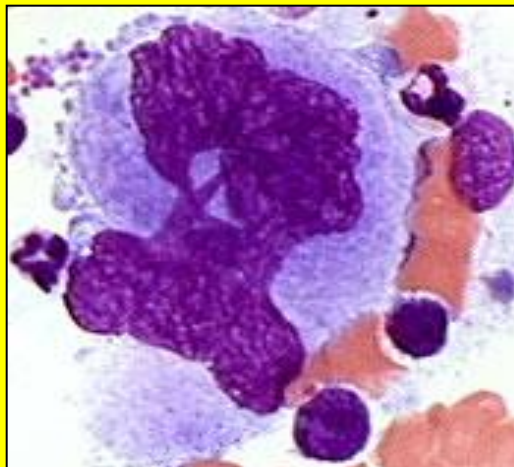
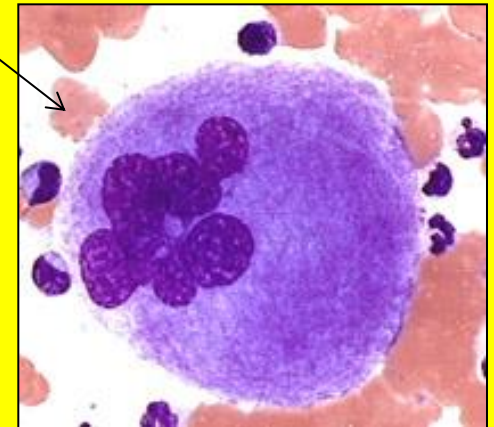
- směs proteinů - destičkový faktor 4 (antagonista heparinu)
 - PDGF (proliferace hladké svaloviny cév, fibroblastů, chemokin, indukce fagocytosy)
 - **fibrinogen**, **vWF** (von Wildebrandův faktor), **faktor V**

lyzosomy

- proteasy (elastasa, kolagenasa, katepsiny, b-glukuronidasa)
- destičkový faktor 3 (fosfolipidy membrány) – katalytický podklad s $\ominus$ nábojem na povrchu destiček

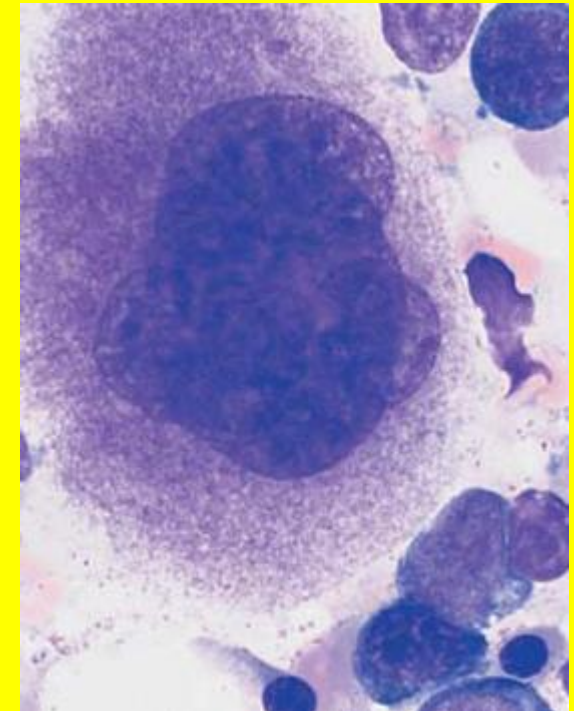
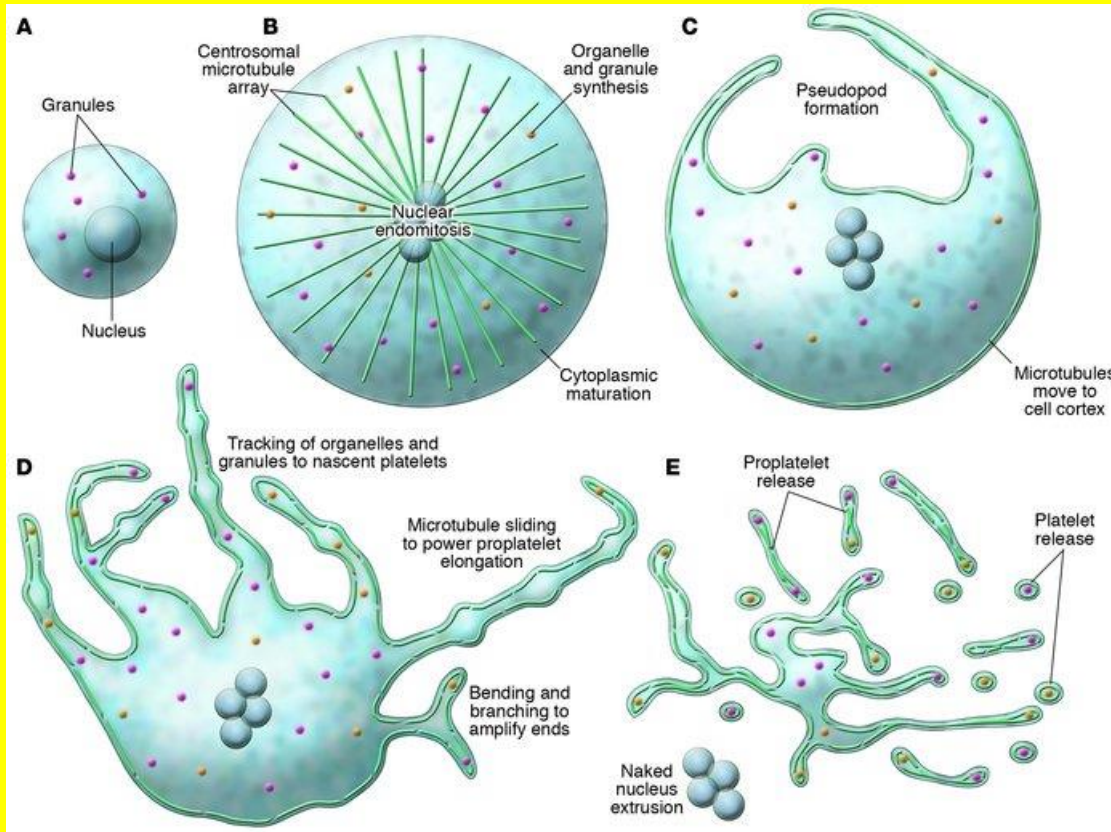
Trombopoese I.

Označení	Velikost (μm)	Morfologie
Megakaryoblast (stage I)	21-50	Laločnaté jádro, basofilní cytoplasma
Basophilic megakaryocyt (stage II)	20 -80	Jádro rozporcované, basofilní cytoplasma, azurofilní granula kolem centrosomu
Granulární megakaryocyt (stage III)	35–160	Velká mnoholaločnatá jádra, acidofilní cytoplasma, početná azurofilní granula
Vyžrálý megakaryocyt (stage IV)	35–160	Nepravidelné, fragmentované jádro, skupiny 10–12 azurofilních granul



Trombopoese II.

- 10^{11} destiček denně, hladina se může zvětšit 10 – 20x
- Tvorba fragmentací megakaryocyty – vznik 1000-3000 destiček než dojde k pohlcení jaderného materiálu makrofágy



Megakaryocytes v nátěru z kostní dřeně

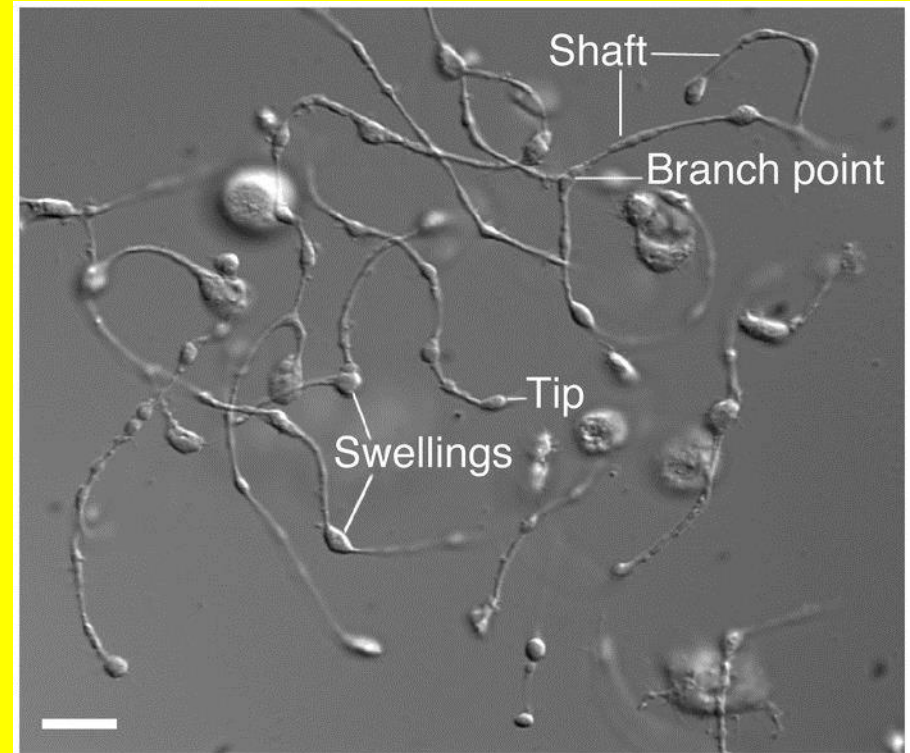
Vývoj od stádia I (B) uskutečňován endomitozou ! (bez rozpuštění jaderné membrány) → polyploidní buňka

Trombopoesa III.

- **Stádium 1** – nutná přítomnost thrombopoietinu (TPO), IL-3, SCF
(TPO esenciální, TPO knock-out myši → 10% cirkulujících destiček)
- **Stádium 2** – akumulace proteinů, tvorba sítě mikrofilament a mikrotubul
- začíná formace α -granul
- **Stádium 3/4** – změny ve složení lipidové membrány, 4x více fosfolipidů a cholesterolu než v nevyzrálých buňkách

TPO (thrombopoietin)

- objeven 1986
- gen kóduje 36 kDa protein, který je značně post-translačně modifikován na 50 - 70 kDa
- markantní homologie s EPO (sdílí prvních 153 AA)
- syntéza v **játrech** a **dřeni**



Prodestičky vznikající z myšího megakaryocyty v kultuře

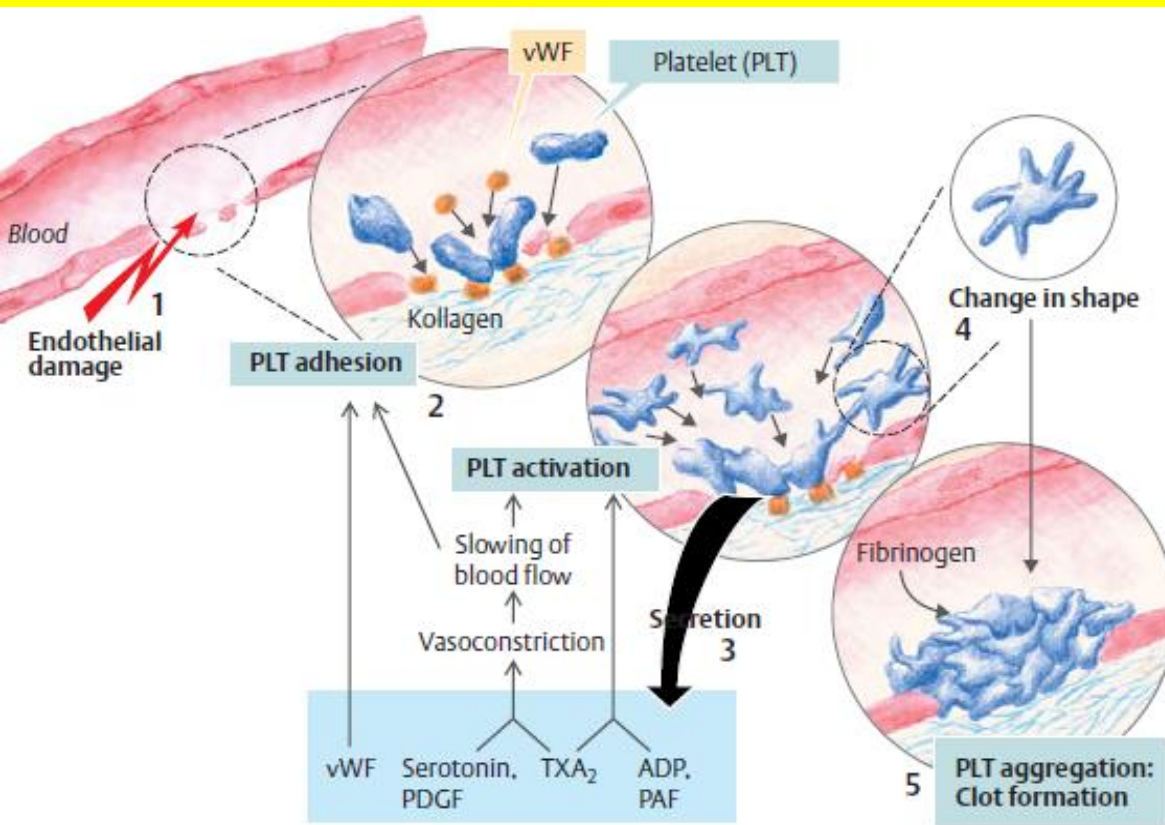
Hemostáza I.

= Zastavení krvácení - thrombocyty, srážecí faktory, stěna cévy

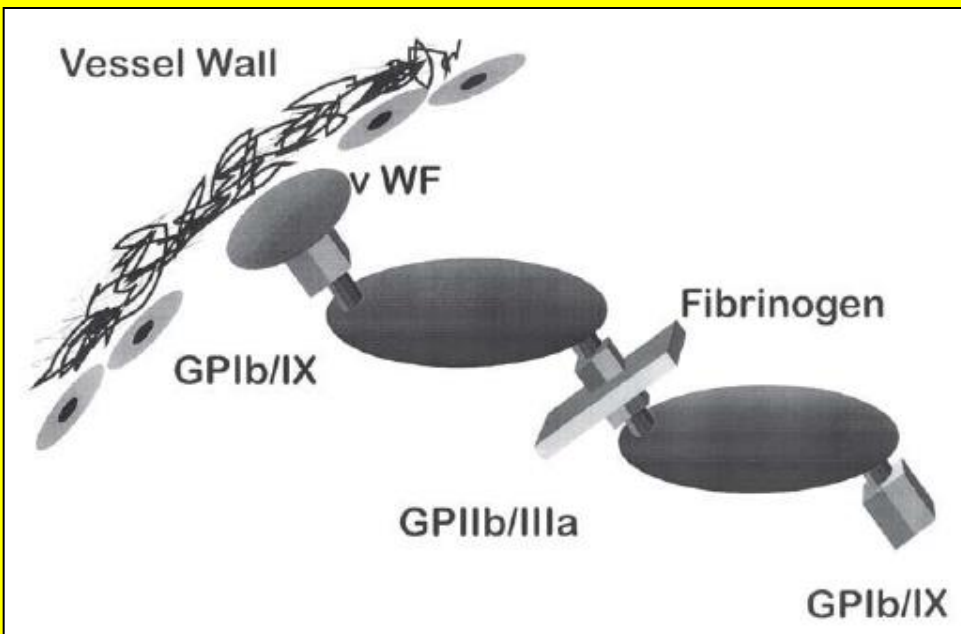
-**tvorba fibrinového síta** = kovalentní provázání fibrinu → fibrinová sraženina / trombus

1) Adheze destiček na **endoteliální vrstvu** kolagenových vláken přes **vWF** (v plasmě s faktorem VIII, tvořen endotheliemi)

- 2) Aktivace destiček
- 3) Uvolnění látek (vWF – podpora adheze; **serotonin, TXA₂** – podpora vazokonstrikce) → **zpomalení toku krve**
- 4) Změna tvaru destiček (pseudopodia) - pozitivní zpětná vazba
- 5) Agregace destiček je zvýšena trombinem a stabilizována **GP IIb/IIIa** (protein exprimován na povrchu destiček)



Hemostáza II.



GPIb/IX (kolagenový receptor) – glykoproteinový transmembránový receptor, široce rozšířen na různých buňkách

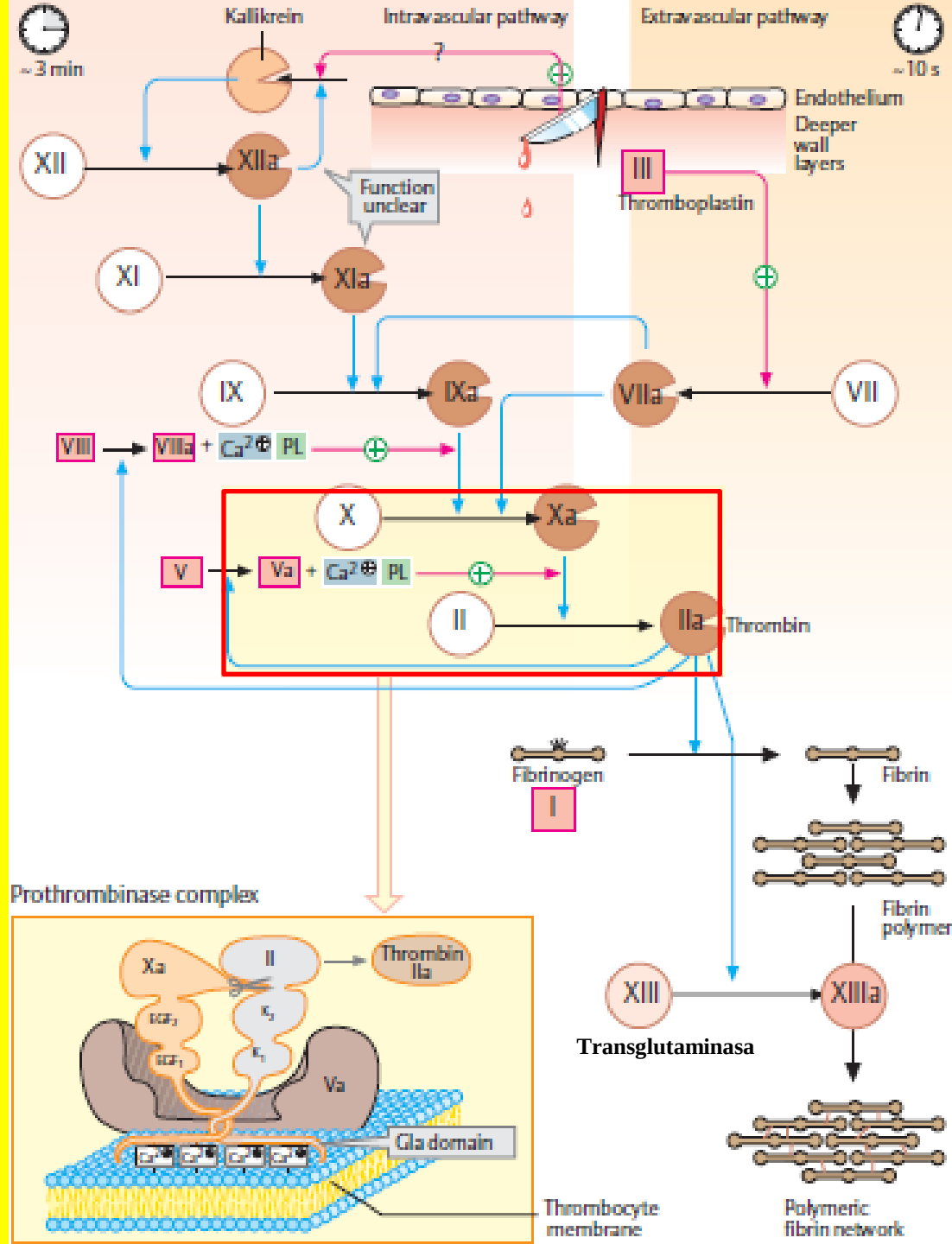
vWF – produkován endoteliálními buňkami a megakaryocyty, vazba na GP Ib/IX → most mezi destičkami a poškozenou cévní stěnou; na začátku monomer, pak poskládán na multimer, nosič **faktoru VIII** nekovalentními vazbami → kopurifikování spolu

GPIIb/IIIa (fibrinogenový receptor) – glykoproteinový transmembránový receptor, 80-100 000 na povrchu destiček, 20-40 000 uvnitř destiček, v klidovém stavu – nízká afinita k fibrinogenu, váže i vWF

Srážecí faktory – koagulační kaskáda

I	Fibrinogen	Half-life (h):	96
II ^K	Prothrombin		72
III	Tissue thromboplastin		
IV	Ionized calcium (Ca^{2+})		
V	Proaccelerin		20
VII ^K	Proconvertin		5
VIII	Antihemophilic factor A		12
IX ^K	Antihemophilic factor B; plasma thromboplastin component (PTC); Christmas factor		24
X ^K	Stuart-Prower factor		30
XI	Plasma thromboplastin antecedent (PTA)		48
XII	Hageman factor		50
XIII	Fibrin-stabilizing factor (FSF)		250
-	Prekallikrein (PKK); Fletcher factor		
-	High-molecular-weight kininogen (HMK); Fitzgerald factor		

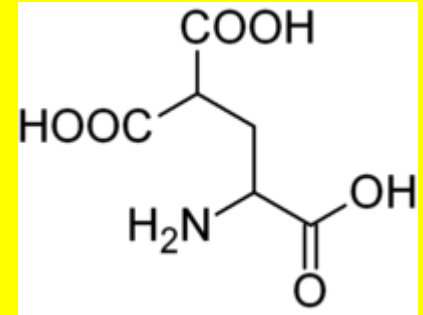
κ – proenzym; PL – fosfolipid; Gla =
 γ – karboxy glutamát



Faktory koagulační kaskády I.

Vitamin K – závislé zymogeny = **prothrombin (faktor II), faktory VII, IX, X, protein C**

- Prekursory serinových proteáz, obsahují N-terminální γ -carboxy glutamovou (Gla) doménu s 9-12 Gla residui, **syntetizovány v játrech**



- II – Prothrombin – jednořetězcový, 72 kDa, 10 Gla zbytků, štěpen za Arg271 a Arg 320, trombin (36 kDa)

- VII - Prokonvertin – jednořetězcový, 50 kDa, 10 Gla zbytků, nejkratší poločas v plasmě (**3-6h**), štěpen za Arg152

- IX – Antihemolitický faktor B – jednořetězcový, 57 kDa, 12 Gla zbytků, účinně se váže na kolagen IV, **gen lokalizován na dlouhem raménku X chromozomu**, aktivace štěpením vazeb za Arg 145 a Arg180

Faktory koagulační kaskády II.

- X – Stuar-Provertův faktor – dvou řetězcový, spojen S-S vazbou, 11 Gla zbytků, 59 kDa, aktivace štěpením za Arg194 těžkého řetězce

- Protein C – inhibice koagulační kaskády, dvouřetězcový S-S spojený zymogen, 59kDa, 9 Gla zbytků, aktivován trombinem (IIa), Arg169, **inaktivace faktorů Va, VIIIa** spolu s proteinem S = jednořetězcový glykoprotein, 11 Gla zbytků, neobsahuje serinovou doménu – **není proteasa**

Faktory V, VIII – homologní ve struktuře

V – proakcelerin – glykoprotein ~330kDa, sulfatace na Tyr - zvyšuje aktivaci thrombinem a maximalizuje aktivaci Xa, asi 20% v α -granulích

VIII – Antihemolitický faktor A – cirkuluje nekovalentně vázán na vWF, sulfatován na Tyr, **gen na chromosomu X**, štěpen thrombinem za Arg residui

- XI – Plasma Thromboplastin Antecedent (kontaktní faktor) – zymogen serinové proteázy, monomer, cirkuluje jako dimer spojen S-S vazbami, štěpen za Arg369, 4 strukturní domény („jablečné domény“)



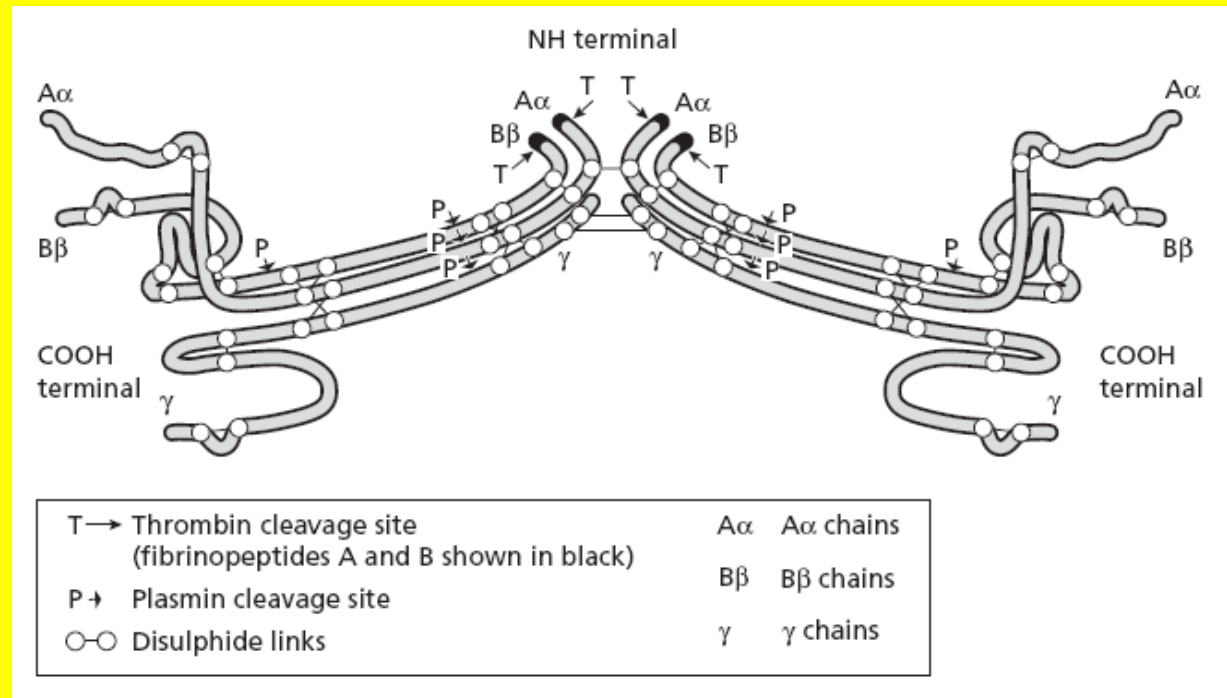
Faktory koagulační kaskády III.

XII – Hagemanův faktor, prekalikrein (PK), HK (high molecular weight kininogen) – zymogeny (XII, PK), HK - neenzymatický kofaktor cirkulující s XI a PK, **odpovědné za kontaktní aktivaci** = interakce protein-protein a protein-buněčná stěna → aktivace XII → aktivace XI ..etc.

I – Fibrinogen – dimerický glykoprotein, ~340 kDa, lokalizace - plasma, α -granula, každá ze dvou podjednotek obsahuje S-S vázané polypeptidy ($A\alpha$, $B\beta$, γ), peptidy A + B odštěpeny thrombinem

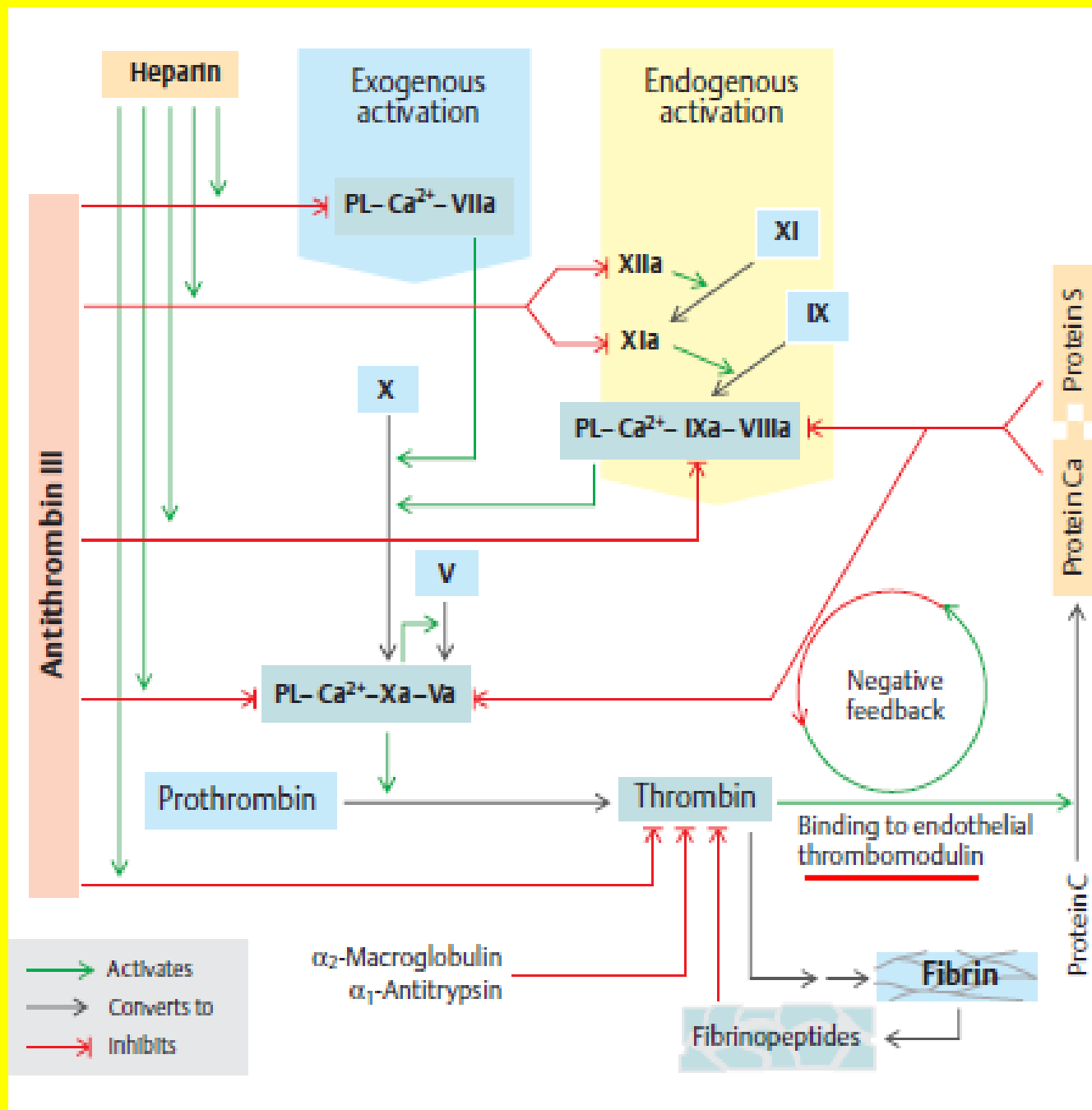
XIII – Fibrin stabilizující faktor

(transglutaminasa) – glykoprotein, ~320kDa, výskyt – plasma, destičky, monocyty, makrofágy
-dimer A a B v plasmě
- cirkulace s fibrinogenem,
-Funkce = cross-link řetězců α - a γ - fibrinu



Regulace koagulační kaskády

- Přítomnost antikoagulantů / inhibitory proteas



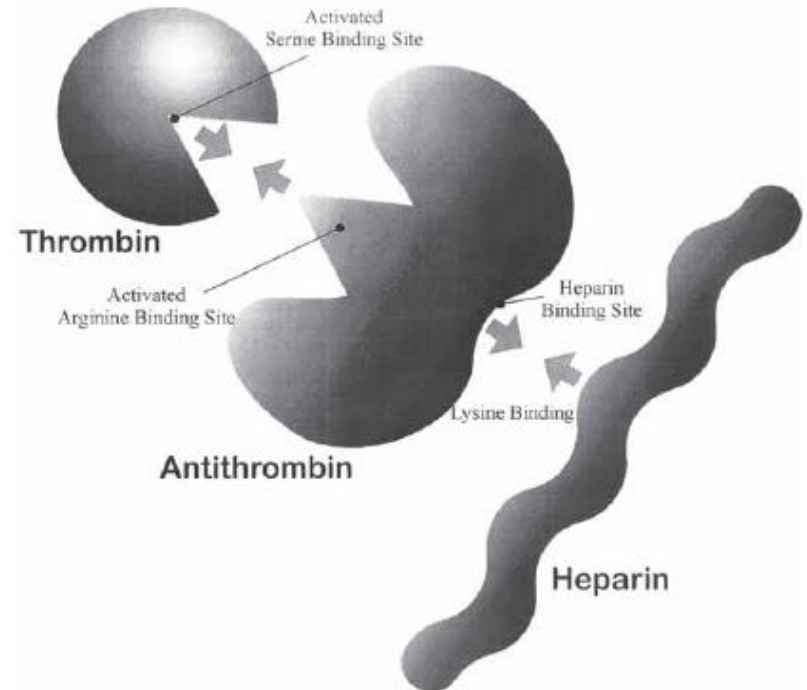
Inhibitory koagulační kaskády I.

Antithrombin – 65 kDa, **původ játra**, glykoprotein, migruje s α_2 -globuliny, 1 peptidový řetězec, 18-30mg/dl, inhibice i jiných proteas (IXa, Xa, XIa, XIIa, VIIa, plasmin), **účinek zvýšen přítomností heparinu**

Thrombomodulin – vazba thrombinu (lokalizuje na povrch endotelií) → vypnutí prokoagulační aktivity → aktivace Proteinu C; transmembránový protein na povrchu endotelií, 78kDa, gen 1 exonový na chromosomu 20

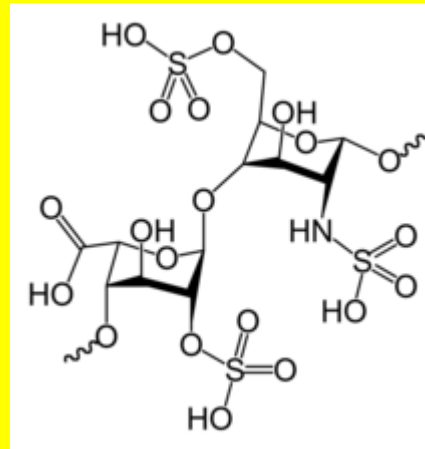
Protein C - 56 kDa, 0.4 mg/dl, zymogen

Protein S - 69 kDa, 2.5 mg/dl, kofaktor aktivovaného C



Inhibitory koagulační kaskády II.

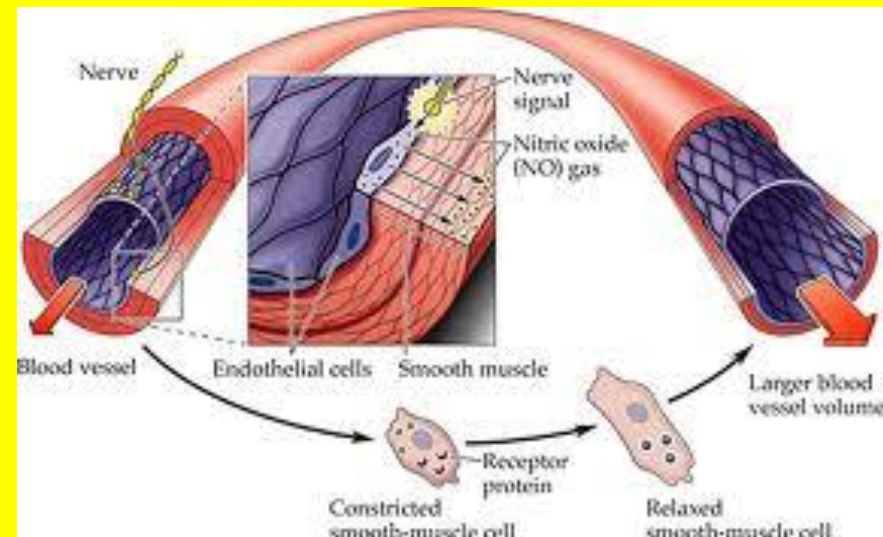
Heparin – sulfatovaný glykosaminoglykan, produkováný žírnými buňkami (tkáňová forma basofilů)



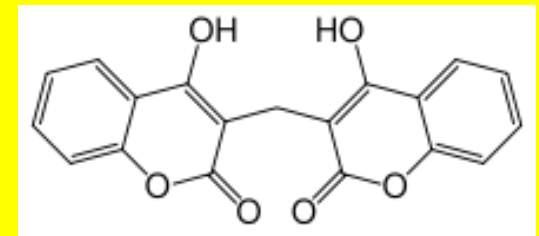
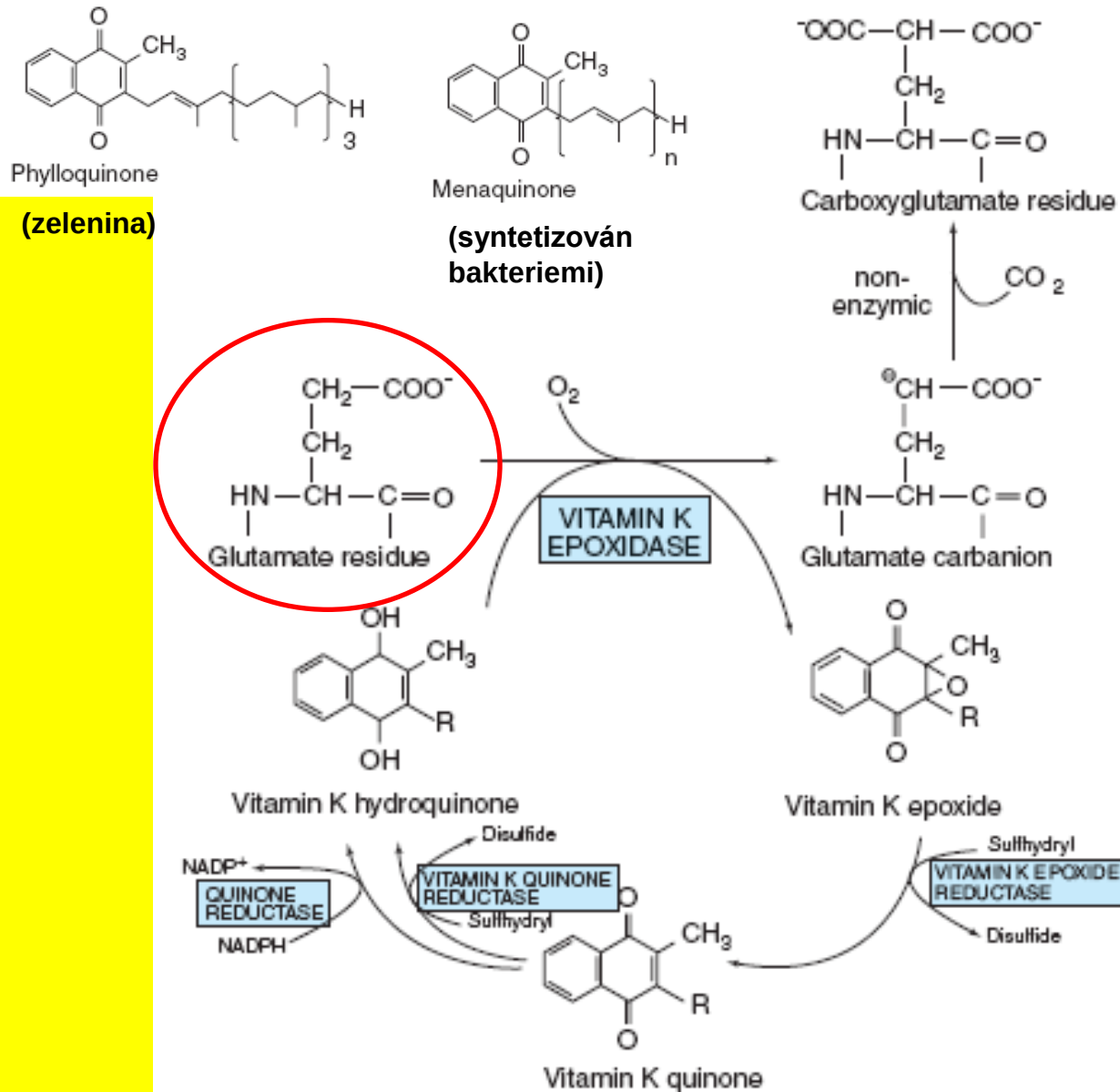
- NO
- všudypřítomný radikál, syntetizován z Arg NOS,
 - poločas života 5-10s, vasodilatátor (1998 Nobelova cena)
 - inhibitor agregace destiček, cytotoxicita makrofágů
 - vazba na hemovou skupinu guanylyl cyklasy

Antagonisté vitamínu K - deriváty kumarinu (warfarin, acenokumarol)

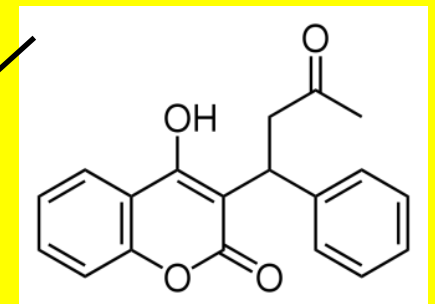
Inhibitory COX – aspirin blokuje TXA₂ syntézu



Inhibitory koagulační kaskády III.

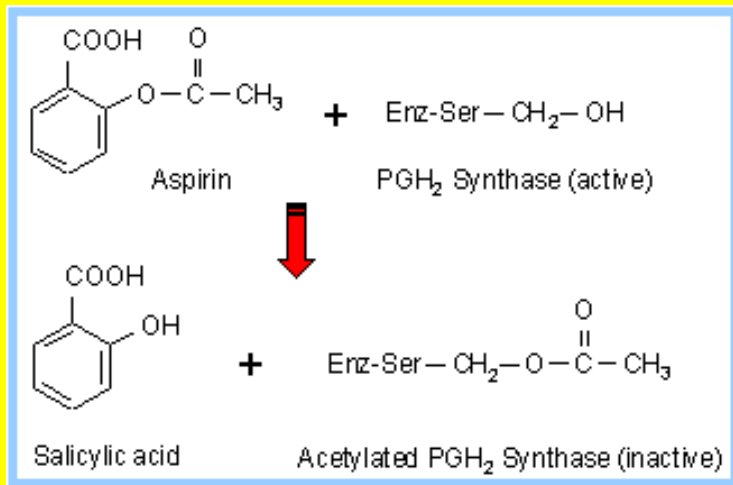


dicumarol



Warfarin (Lawarin, Waran)

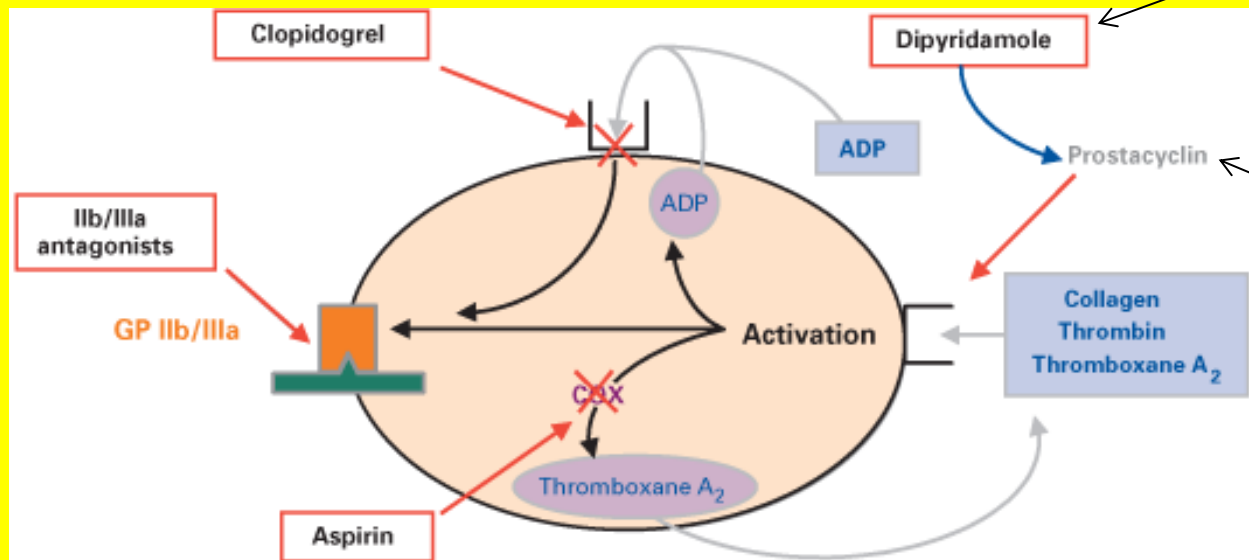
Inhibitory koagulační kaskády IV.



Prostaglandin H₂ synthasa (PGH₂) (COX, cyklooxygenasa) – Inhibice irreversibilní, nutná nová syntéza novými thrombocyty



Clopilet, Plavix, Ceruvin – k léčbě koronárních arteriálních chorob (konečné stadium akumulace aterosklerotických plátů)



Persantine – spolu s aspirinem k prevenci mrtvic

Prostacyclin – inhibitor agregace destiček

Fibrinolýza

-zábrana proti nadměrnému srážení krve (trombóza) či pohybu sraženiny (embolii)

Plasmin – substráty jsou vWF, fibrin, GP IIb/IIIa, Ib;

Tissue plasminogen activator (tPA) –
serinová proteasa, uvolňován cévním
endotelem po poranění, neaktivní až do
vazby na fibrin

Urokinasa –
monocyty,
makrofágy,
fibroblasty

Urokinasa – ledviny

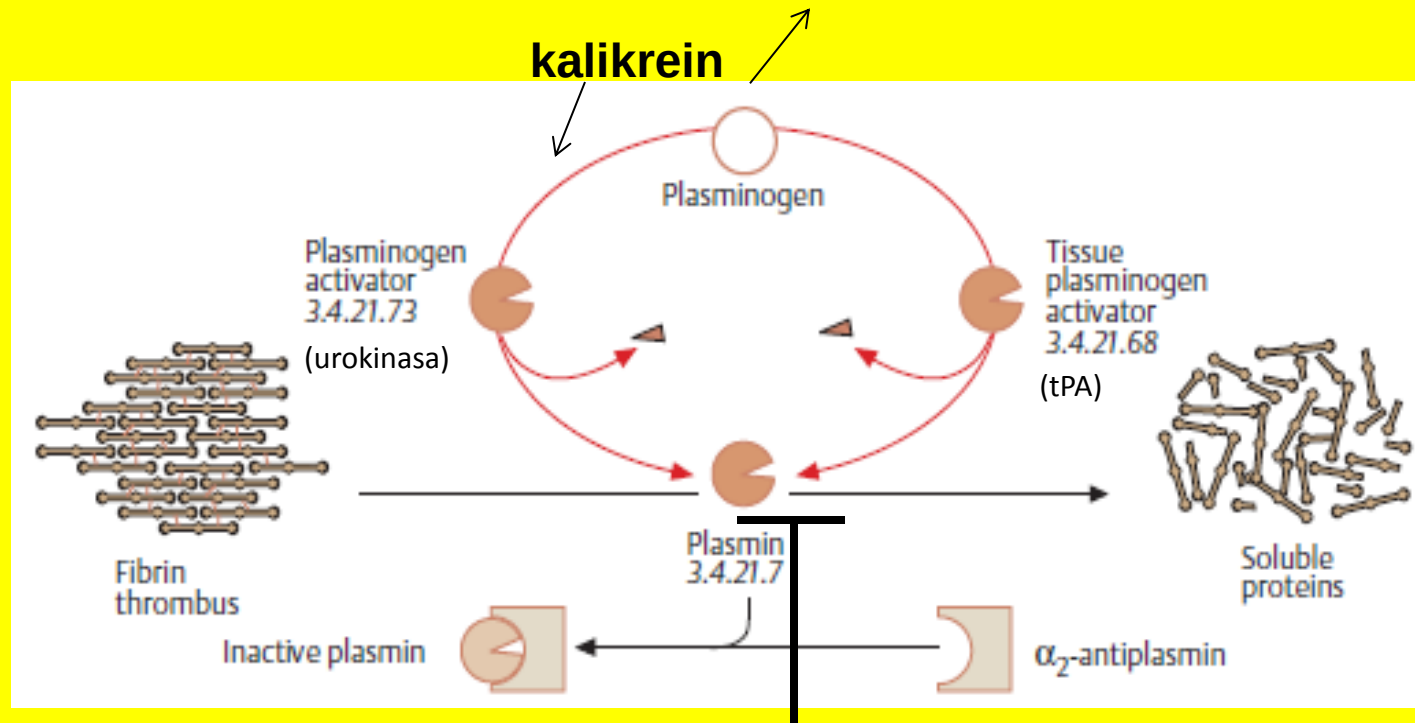
tPA – vaskulární
endotel

Streptokinasa



Po infarktu (v
klinice) →
rozpuštění trombu

- Jednořetězcový
glykoprotein, 90 kDa, štěpí
se mezi Arg560 – Val561



Inhibice plasminu – Aprotinin, tranexamic acid
(cyklokapron) – reversibilní vazba

Hemostatické poruchy/ Koagulopatie

Dědičné - von Willebrandova choroba

- hemofilie A, B
- poruchy destiček

Získané - nedostatek vitamínu K

- nemoci jater

- von Willebrandova choroba

- autosomálně dominantní
- snížená produkce vWF nebo snížená funkce,
- krvácení z měkkých tkání, z nosu – vyvarovat se aspirinu a NSAIDs (nesteroidní antiinflammatorika)
- léčba – desmopressin (Stimate, u mírné choroby), tranexamové kyseliny (TXA; EXACYL)



Von Willebrand Disease



Source: TUSDM

Increased bleeding time; normal platelets; vWF gene is on chromosome #12

100

(c) 2007, Michael A. Kahn, DDS



Hemostatické poruchy/Koagulopatie II.

- Hemofilie A – rozpoznána již v 2. st. n.l. rabíny - chlapci podstupující obřízku mají riziko krvácení
 - defekt produkce **faktoru VIII** – snížená produkce/produkce nefunkčního proteinu či obojí
 - VIIIa (hem A) + IXa (hem B) tvoří X-aktivující komplex na povrchu destiček
 - A+B = podobná klinická manifestace (spontánní krvácení do svalů, kloubů, paží, nohou, hematuria) - tvorba zátky je opožděna v důsledku pomalé tvorby thrombinu, kompletní rodinná anamnéze je důležitá pro zachycení přenašeče; gonosomálně recesivní, 1:10 000 mužů v UK
 - léčba – TXA (antifibrinolytikum), desmopressin (podporuje uvolnění vWF), rekombinantním proteinem



- Hemofilie B - defekt faktoru IX, gonosomálně recesivní, 1:30 000, klinicky neodlišitelná od A, léčba jako u A

Hemostatické poruchy/Koagulopatie III.

- Nedostatek vitaminu K
 - malabsorbce (celiakie)
 - cholestaza (extra- /intrahepatální)
 - léčba dávkami vitaminu K a nebo transfuzí plasmy
- Nemoci jater – většina pacientů abnormální koagulační profil ale může být asymptomatická
- Dědičné poruchy destiček – vzácné, defektní membránové glykoproteiny nebo abnormality granul, krvácení do měkkých tkání (kůže, nos, střevo) s pozitivní rodinnou historií,
 - defekt v membránových **GlykoP**roteinech , abnormality v granulech destiček, všechny autosomálně recesivní
 - léčba - TXA, transfuze destiček, DDAVP (desamino D-arginyl vasopressin, desmopressin)



Hemostatické poruchy

Získané poruchy funkce destiček

- léky indukované

- aspirin – ireversibilní acetylace COX (tvorba TXA_2), účinek se projeví v čase krvácení 2 h po požití 75mg, snadné podlitiny, hematomy

- NSAIDs – reversibilní inhibice COX, účinek daný dobou přítomnosti léčiva

- β -laktamová antibiotika (penicilin) – ovlivňují funkce destiček „přilepením“ na membránu destiček

- heparin, dextran, β -blokátory

- rybí olej – dieta bohatá na rybí olej prodlužuje dobu krvácení

- systémové poruchy - renální – u pacientů s urémií

- jaterní selhání – chronické jaterní choroby jsou asociovány s poruchou funkce destiček v důsledku abnormalit membránových glykoproteinů, pokles koagulačních faktorů

- vyčerpávající poruchy – kardiopulmonární bypass

- hematologické poruchy s produkcí abnormálních destiček – myelodysplasie (nedostatečná produkce normálních krevních buněk), leukemie

Numerické abnormality trombocytů

Thrombocytopenie – stav s počtem trombocytů $< 150 \cdot 10^9$ na litr

Klasifikace:

- Snížená produkce destiček dření

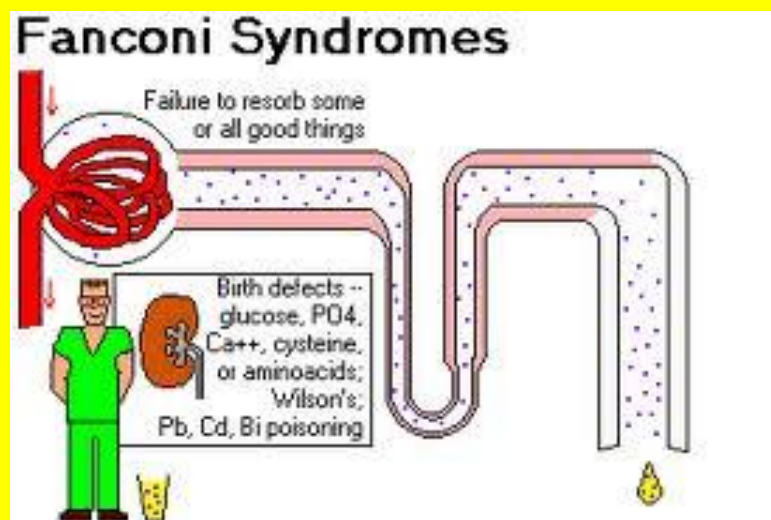
- poškození kostní dřeně – aplastická anemie, leukemie, cytotoxická léčiva (chloramphenicol)
- nutriční nedostatek – megaloblastická anemie
- zděděné příčiny – Fanconiho syndrom, Wiskott-Aldrich syndrome

- Zvýšená destrukce destiček

- imunitní (Idiopatická thrombocytopenie purpura, lymfom, léčivy indukovaná – zlato, penicilin, heparin; infekční – HIV, malárie; posttransfuzní purpura, novorozenecká purpura)
- neimunitní (kardiopulmonární bypass, hypersplenismus, hemolytický uremický syndrom)

Snížená produkce destiček

- Wiskott-Aldrichův syndrom – gonosomálně podmíněná imunodeficience, mikrothrombocytopenia, ekzém, vracející se infekce, nedostatek T buněk, zvýšené riziko autoimunitních a lymfoproliferativních nemocí. Mutace WASP genu - WAS protein reguluje polymerizaci aktinu a koordinuje reorganizace aktinového cytoskeletu; léčba – podpůrná – antibiotika, GCs, transfuze destiček, transplantace HSC
- Fankoniho syndrom – autosomálně recesivní, defekt v genech modulujících DNA stabilitu (BRCA2), overexprese $TNF\alpha$ a $TNF\gamma$, anemie, slabost, dyspnoe při námaze, purpura, neodpovídají na cyklosporin, pacienti se zlepšují s androgenovými přípravky



Numerické abnormality trombocytů

Zvýšená produkce destiček

Imunní trombocytopenie – IgG, IgM interagují s proteiny na povrchu destiček

- ITP (idiopatická trombocytopenie **purpura**) – krvácení, epistaxe (krvácení z nosu), purpura (červené skvrny), historie nemoci virálního původu, léčba – prednisolone, intravenosně Ab (anti idiotyp), splenektomie, imunosupresiva
- posttransfuzní purpura – asi týden po transfuzi krvácení, převážně u žen, přítomnost Ab proti destičkovému antigenu HPA-1a,
- léky indukovaná – zlato, penicilin, heparin, diazepam, kyselina valproová, rifampicin, léčba – transfúze destiček

Thrombocytosa – počet destiček $> 450 \cdot 10^9/\text{ml}$

- příčiny
 - krvácení
 - chirurgický zákrok
 - nedostatek Fe
 - infekce



Thrombofilie

- **Porucha hemostatických mechanismů vedoucích k trombózám (krevním sraženinám)**
- **Arteriální trombóza – (infarkt myokardu či mrtvice) – zřídka vliv koagulačních faktorů**
- **Venosní trombóza – celková roční úmrtnost 1/1000, městnání krve a zvyšující se věk jsou hlavní etiologické faktory**

Arteriální thrombóza

- kouření, hypertenze, aterosklerosa, hyperlipidemie, DM

Venosní trombóza

- Operace nebo trauma, těhotenství, orální kontraceptiva, chronické zánětlivé onemocnění střeva

Dědičný defekt – antithrombin, protein C, S, vysoká hladina faktoru VIII, mutace v genu prothrombinu

Thrombofilie II.

APC resistance – nejfrekventovanější thrombofilie, 1/5000 z homozygotů, mutace faktoru V (glu za arg v 506), (APC inaktivuje faktor Va proteolýzou)

Nedostatek antithrombinu III – první popsáný rodinný defekt (1965), homozygoti nekompatibilní se životem, riziko trombóz převážně v těhotenství

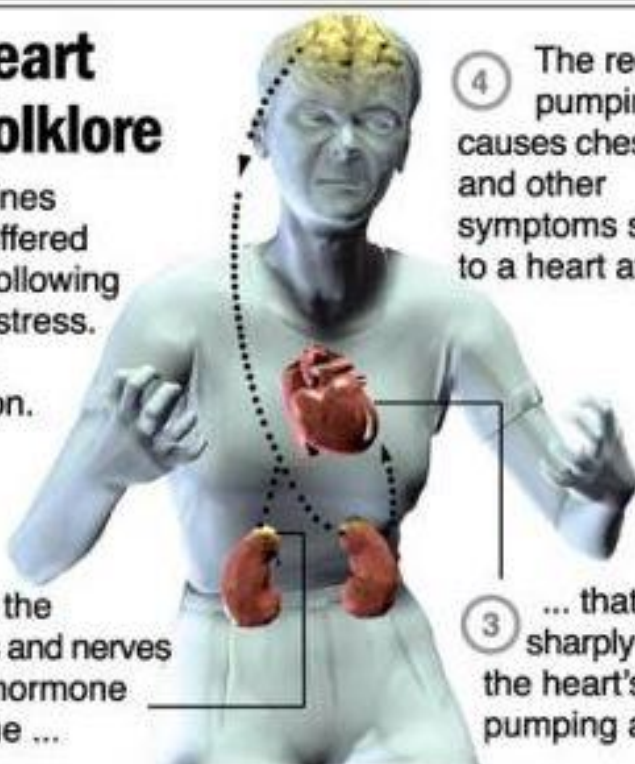
Léčba – heparin/warfarin, koncentráty antithrombinu či proteinu C

Získaná thrombofilie - lupus anticoagulants – nejběžnější koagulační abnormalita, přítomnost antifosfolipidových protilátek

Slovo závěrem...

A broken heart is not just folklore

A new study examines 19 patients who suffered cardiac problems following sudden emotional stress. The study offers a possible explanation.



- ① Grief or fear is experienced ...
- ② ... stimulating the adrenal glands and nerves to produce stress hormone including adrenaline ...
- ③ ... that can sharply lower the heart's pumping ability
- ④ The reduced pumping causes chest pain and other symptoms similar to a heart attack

SOURCE: New England Journal of Medicine AP



Pozor, vykrvácet se dá i neviditelně....