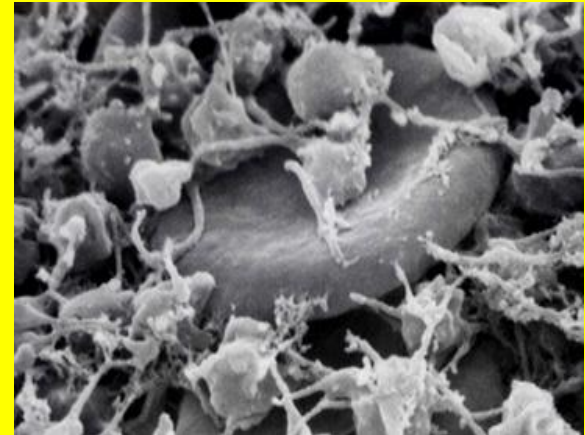
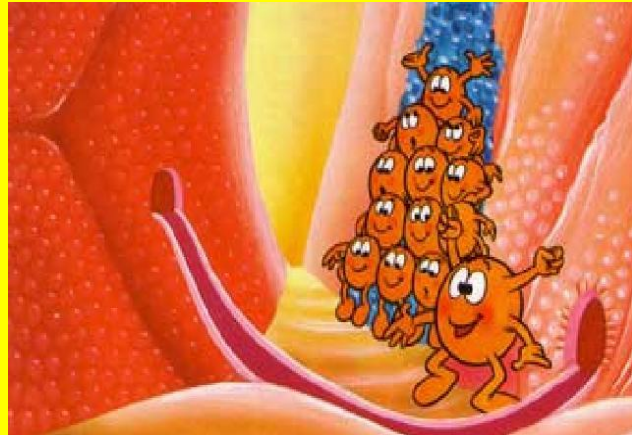
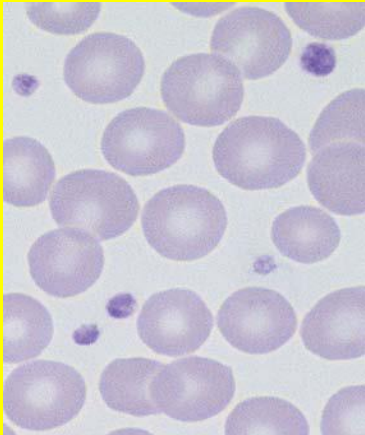


Základy Hematologie KBB / ZHEMP

Lekce 4 - Fyziologie a Patologie Trombocytů

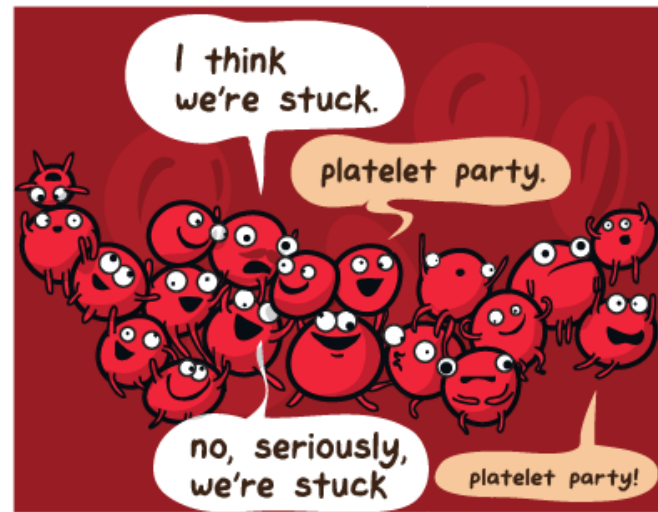


Radim Vrzal

radim.vrzal@upol.cz

Katedra buněčné biologie a genetiky, budova 51

Začínáme....

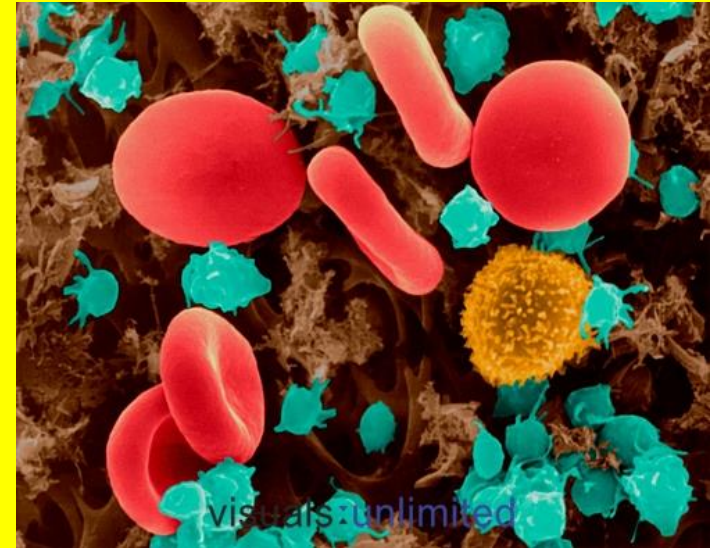


....hromadná párty !!!

Základní charakteristiky

Krevní destičky (trombocyty):

- ochrana před ztrátou krve
- hemostáza = zástava krvácení
- bezjaderné
- hladké nepravidelné disky
- 150-300 x 10⁹ / 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

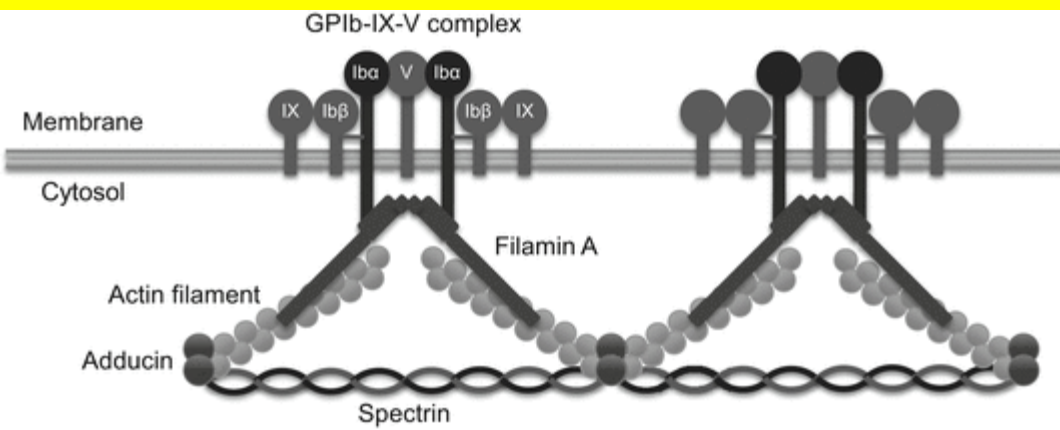
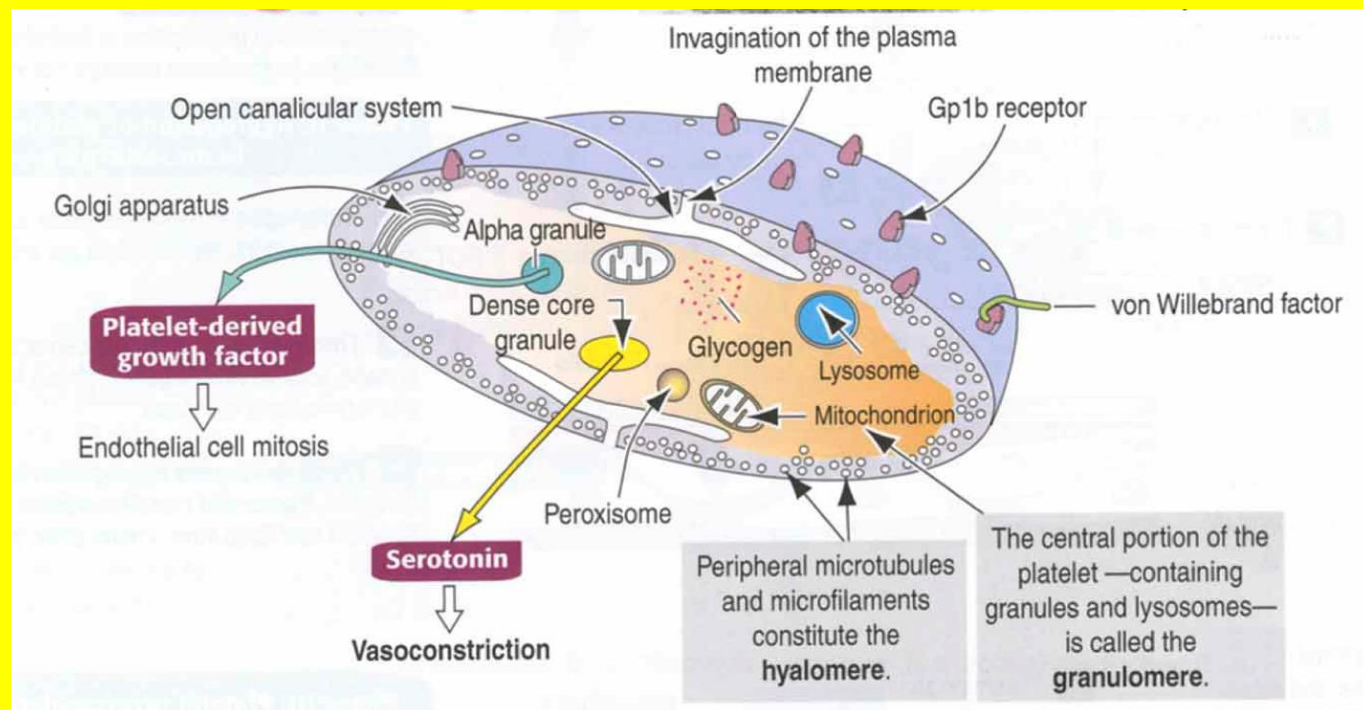


Struktura trombocytů

- **Diskoidní tvar**
- šachtové otvory **otevřeného kanalikulárního systému (OCS)**

- **OCS = 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,

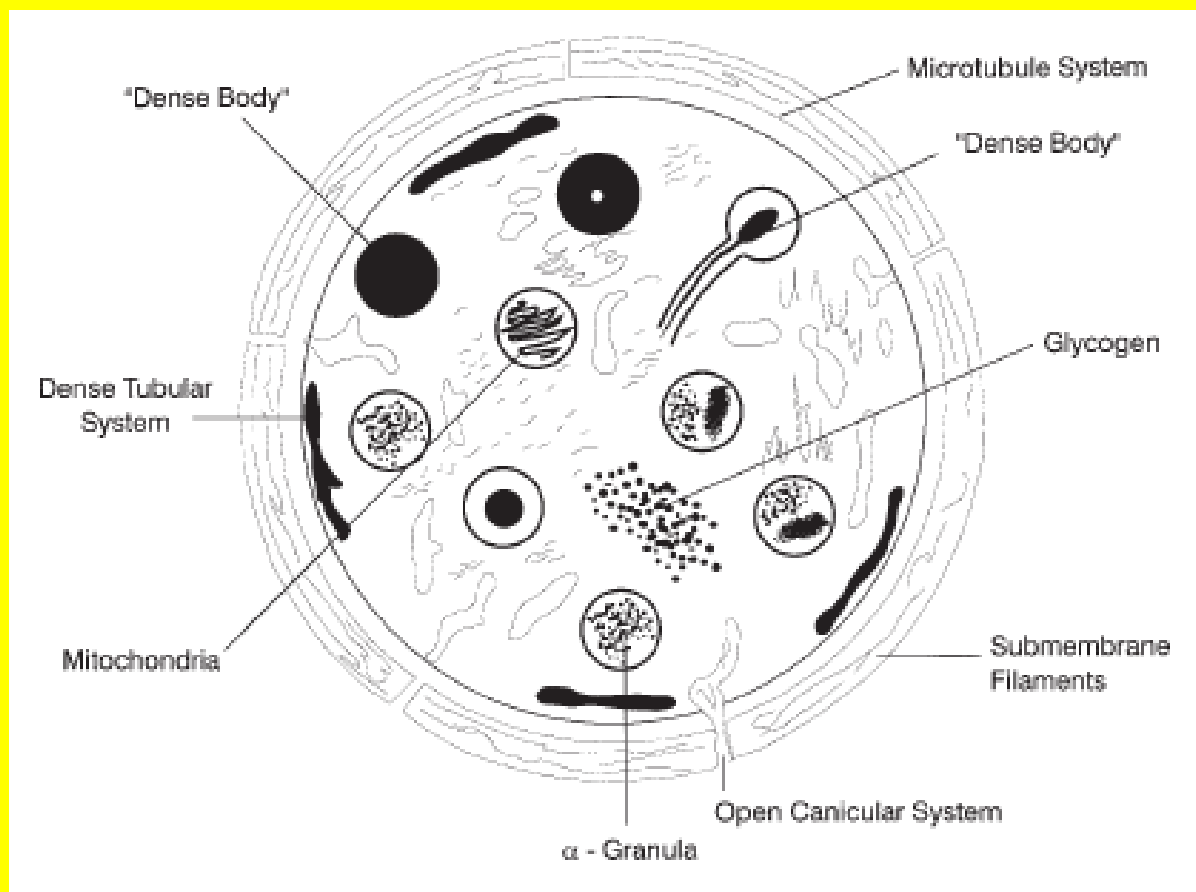
Ca²⁺, enzymy syntézy kyseliny arachidonové, serotonin (vychytáván z plasmy)

ADP 653 mM

ATP 436 mM

Calcium 2181 mM

Serotonin 65 mM



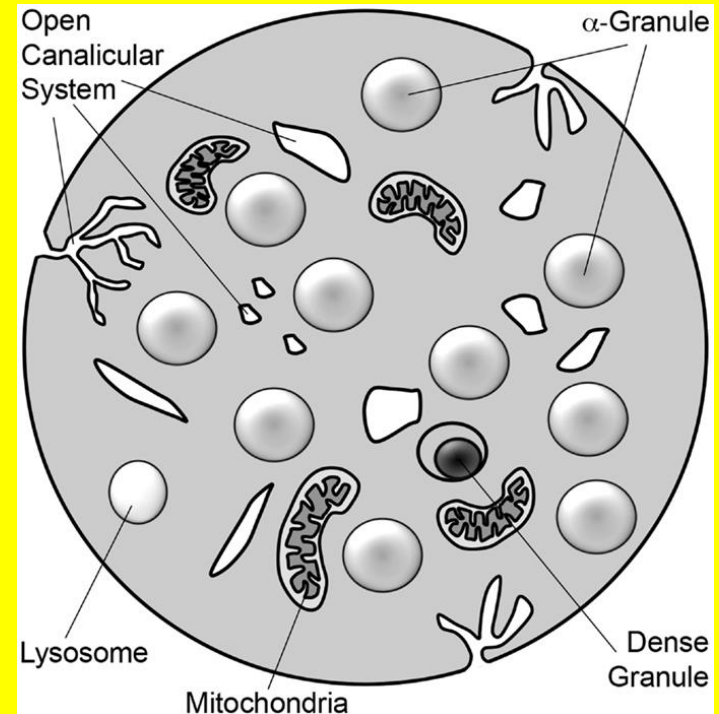
Struktura trombocytů III.

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

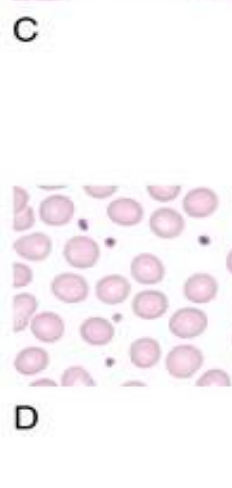
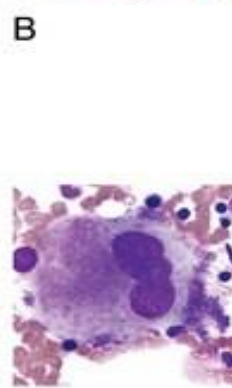
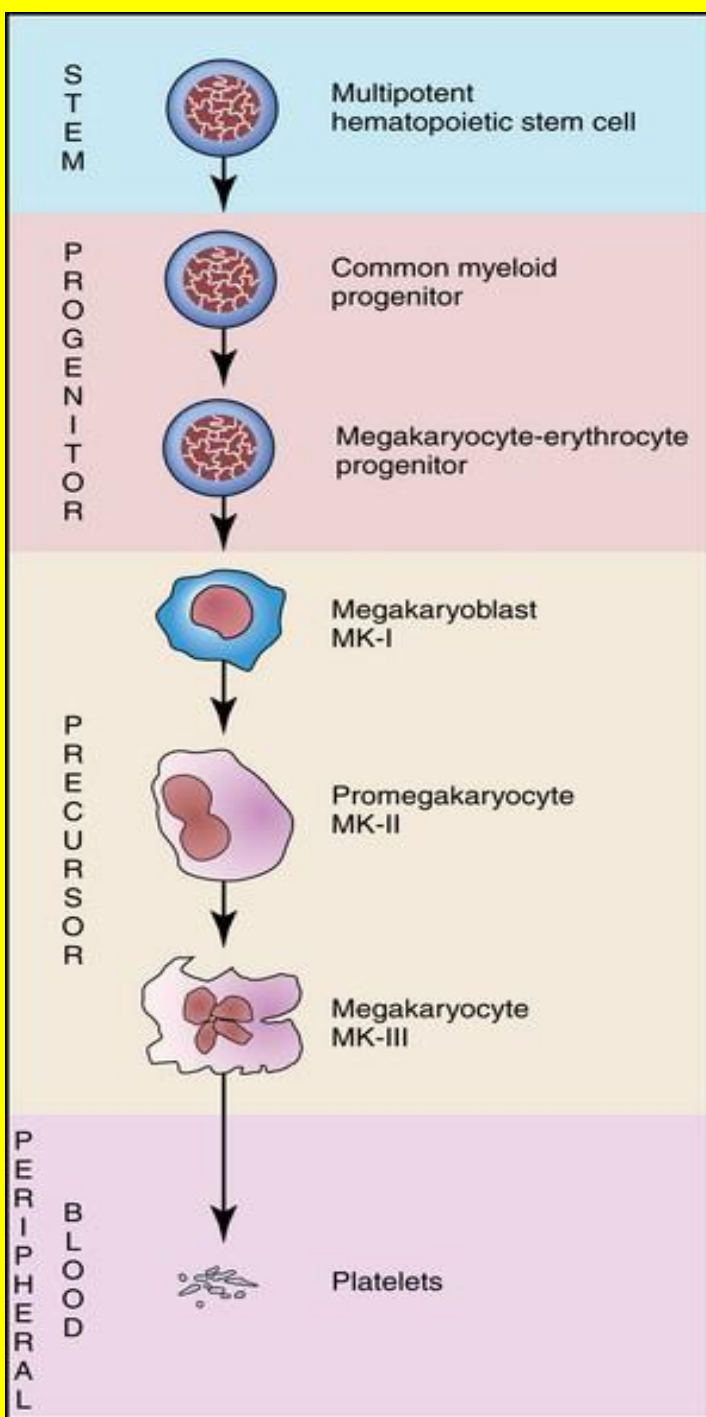
- směs proteinů - destičkový faktor 4 (antagonista heparinu)
 - PDGF (proliferace hladké svaloviny cév, fibroblastů, chemokin, indukce fagocytosy)
 - **fibrinogen, vWF** (von Willebrandův faktor), **faktor V**

lyzosomy

- proteasy (elastasa, kolagenasa, katepsiny, β -glukuronidasa)



Trombopoese I.



Megakaryoblast

- 20 μm , jádro kulaté/ledvinovité s více jádérky, cytoplazma neobsahuje granula

Promegakaryocyt

- 30 μm , rozčlenění jádra na více laloků, bazofilní cytoplazma, neobsahuje granula

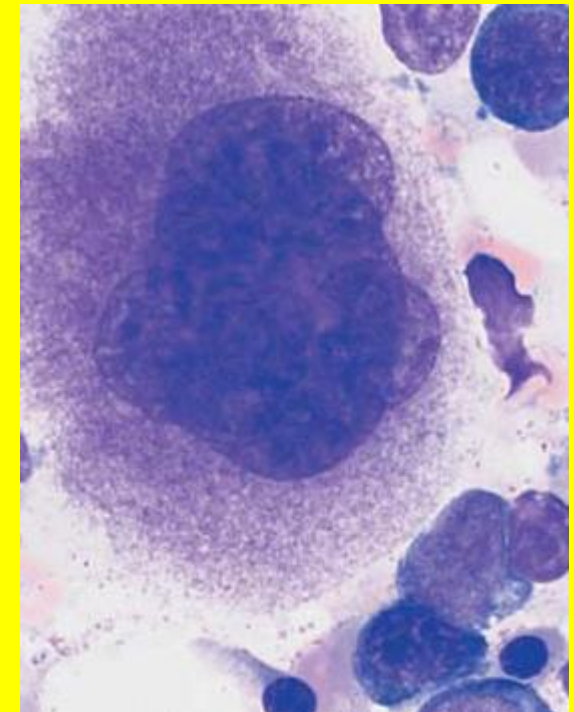
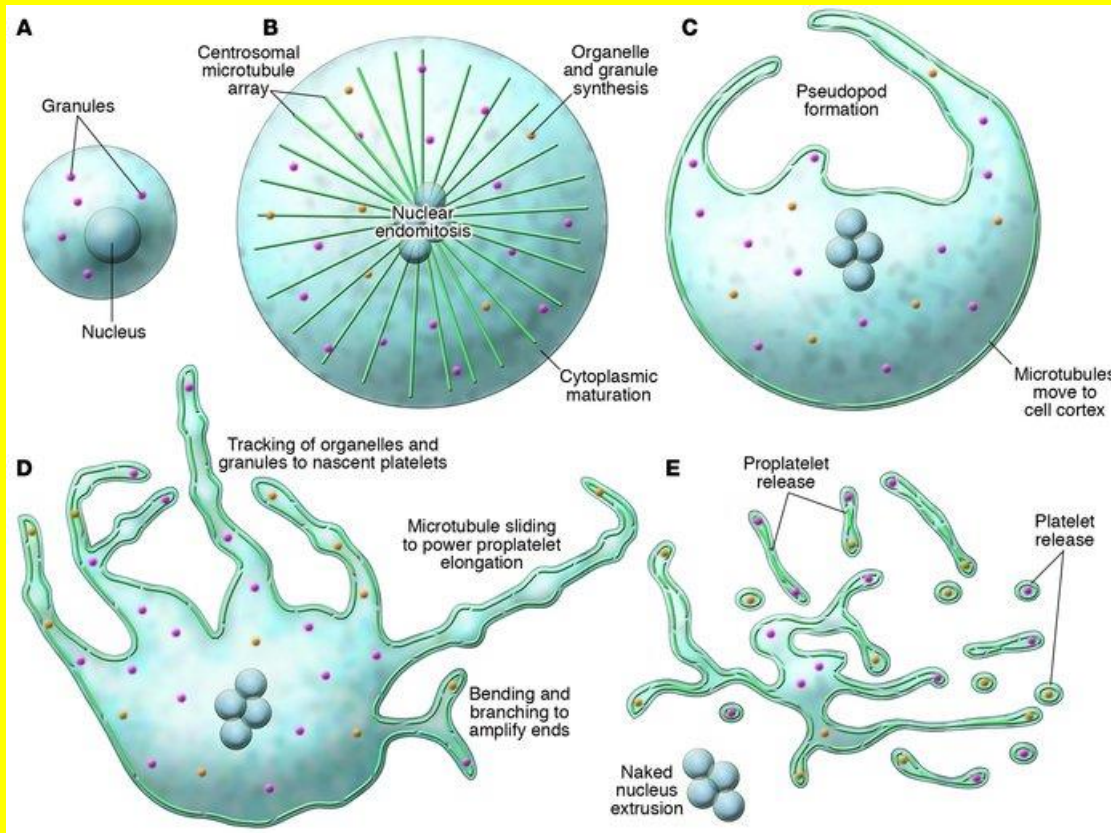
Megakaryocyt

- 40-70 μm a víc, vícelaločnaté jádro (polyploidie až 64 sad), růžová cytoplazma, na okrajích zvrásněná

Krevní destička (Trombocyt)

Trombopoese II.

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



Megakaryocyt v nátěru z kostní dřeně

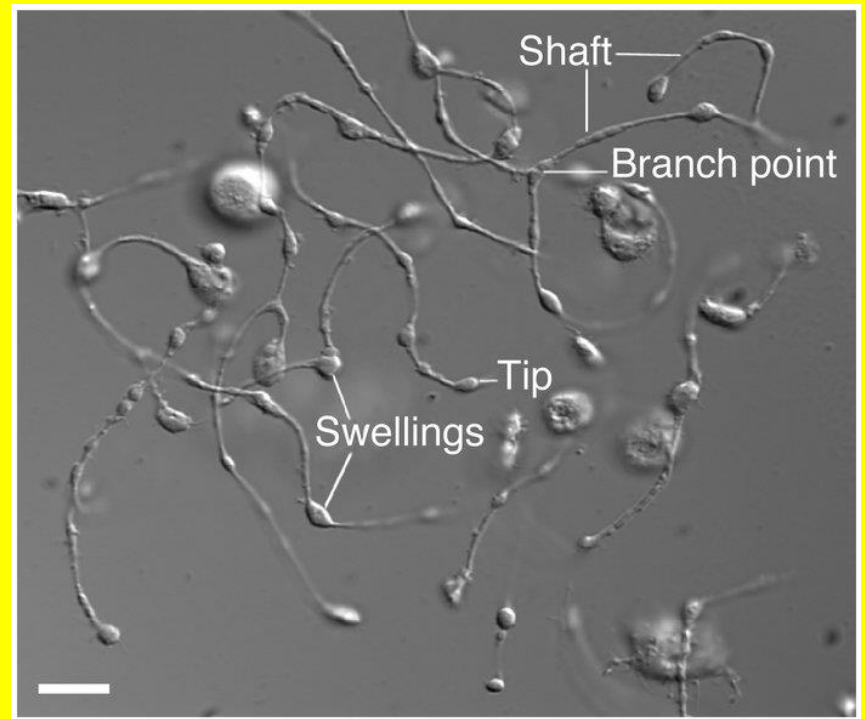
Vývoj od stádia I (B, megakaryoblast) uskutečňován endomitozou !
(bez rozpuštění jaderné membrány) → polyploidní buňka

Trombopoesa III.

- **Stádium 1** – nutná přítomnost thrombopoetinu (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 (thrombopoetin)

- objeven 1986
- gen kóduje 36 kDa protein, který je značně post-translačně modifikován na velikost 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** - trombocyty, srážecí faktory, stěna cévy

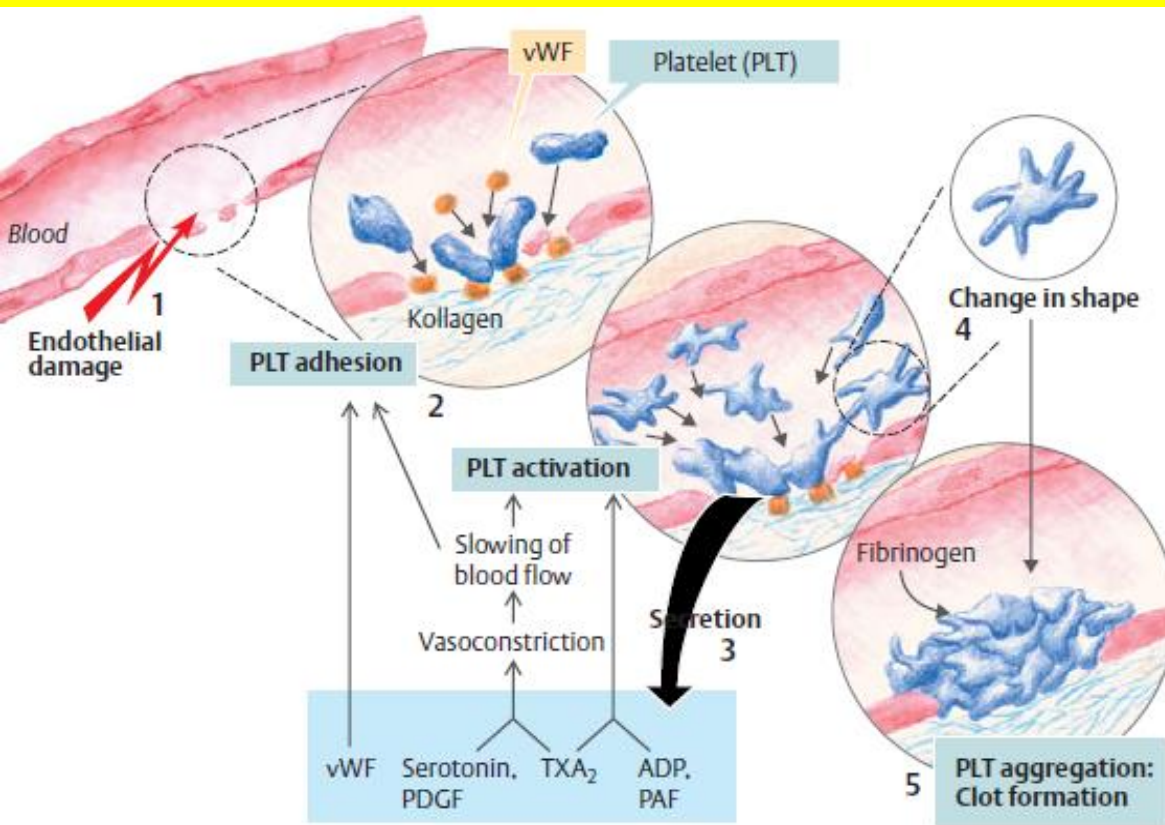
- **tvorba fibrinového síta** = kovalentní provázání fibrinu → fibrinová sraženina / trombus

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

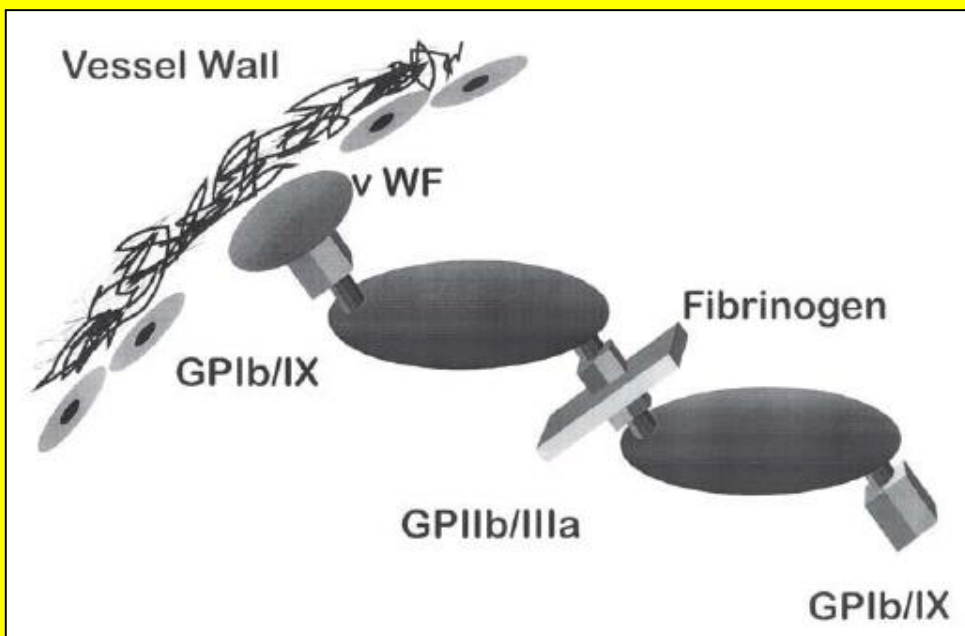
2) Aktivace destiček
3) Uvolnění látek (vWF – podpora adheze; **serotonin, TXA₂** – podpora vazokonstrikce) → **zpomalení toku krve**

4) Změna tvaru destiček (pseudopodia) - pozitivní zpětná vazba

5) Agregace destiček je zvýšena trombinem a stabilizována **GP IIb/IIIa** (protein exprimován na povrchu destiček) = váže fibrinogen



Hemostáza II.



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

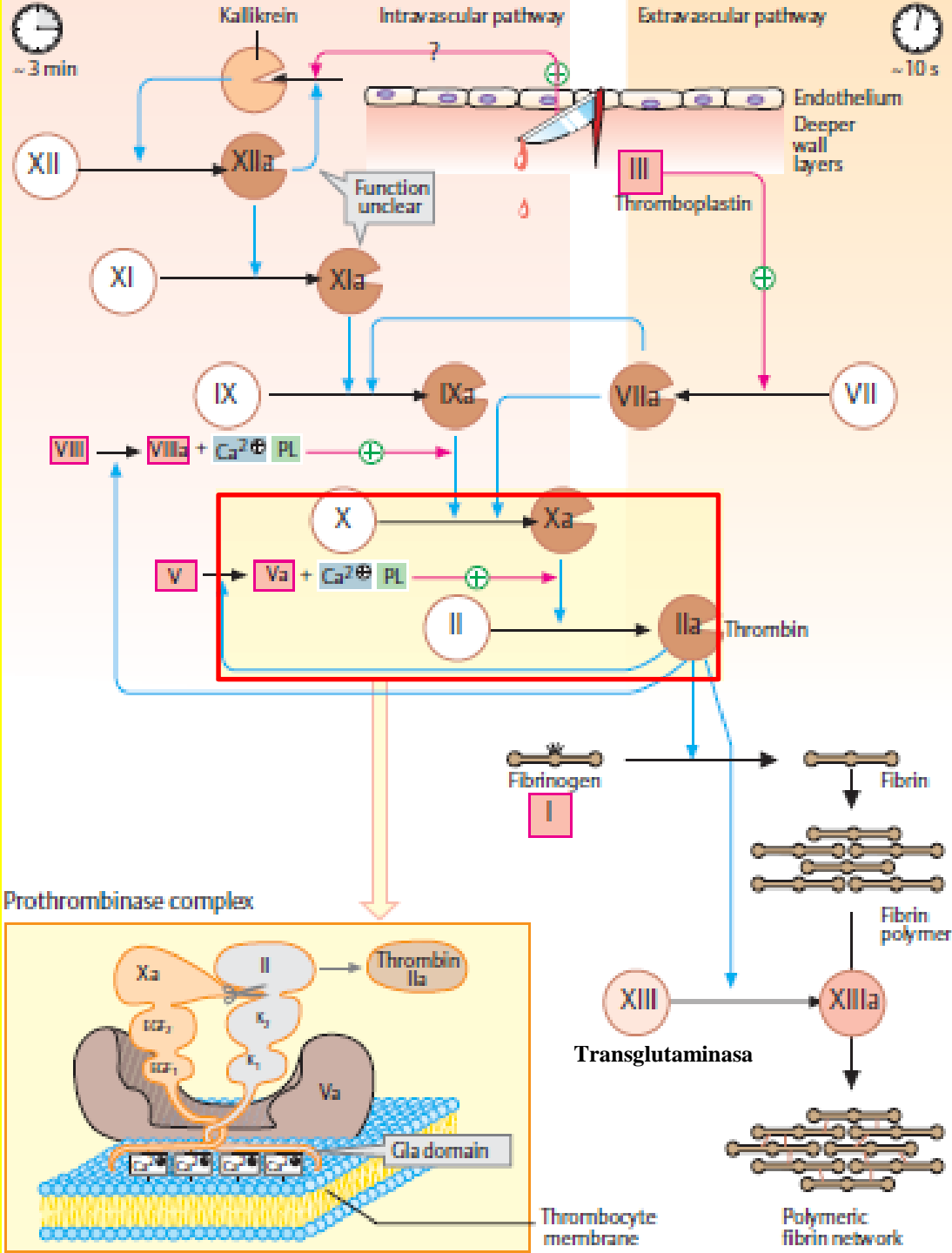
vWF – produkován endoteliálními buňkami a megakaryocyty, vazba na GP Ib/IX → **most mezi destičkami a poškozenou cévní stěnou**; na začátku monomer, pak poskládán na multimer, nosič **faktoru VIII** nekovalentními vazbami (kopurifikování spolu)

GP IIb/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

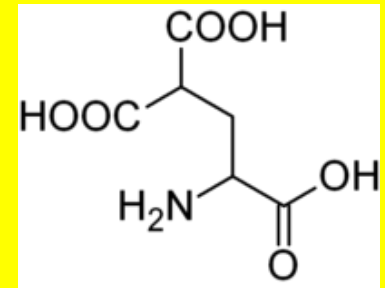
I	Fibrinogen	Half-life (h):	96
II ^K	Prothrombin		72
III	Tissue thromboplastin		
IV	Ionized calcium (Ca ²⁺)		
V	Proaccelerin		20
VII ^K	Proconvertin		5
VIII	Antihemophilic factor A		12
IX ^K	Antihemophilic factor B; plasma thromboplastin component (PTC); Christmas factor		24
X ^K	Stuart-Prower factor		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 = **protrombin (faktor II)**
faktory VII, IX, X
protein C



- prekursorů serinových proteáz
- obsahují N-terminální γ - karboxyglutamovou (Gla) doménu s 9-12 Gla residui
- **syntéza v játrech**

II – Protrombin – jednořetězcový, 72 kDa, 10 Gla zbytků, **trombin (36 kDa)**

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

IX – Antihemolitický faktor B – jednořetězcový, 57 kDa, 12 Gla zbytků, účinně se váže na kolagen IV, **gen lokalizován na dlouhém raménku X chromozomu**

X – Stuar-Prowerův faktor – dvouřetězcový, spojen S-S vazbou, 11 Gla zbytků, 59 kDa

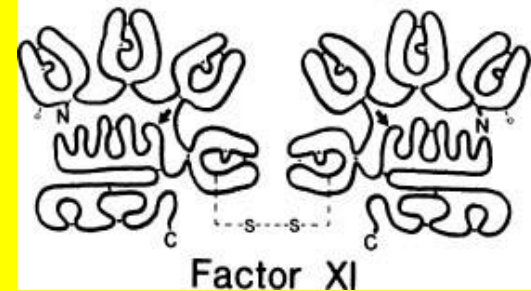
Protein C – inhibice koagulační kaskády, dvouřetězcový S-S spojený zymogen, 59kDa, 9 Gla zbytků, aktivován trombinem (IIa), **inaktivace faktorů Va, VIIIa spolu s proteinem S = jednořetězcový glykoprotein, 11 Gla zbytků – není proteáza (S)**

Faktory V, VIII – V – proakcelerin – glykoprotein ~330kDa, asi 20% v α -granulích

VIII – Antihemolitický faktor A – cirkuluje nekovalentně vázán na vWF, **gen na chromosomu X**

Faktory koagulační kaskády II.

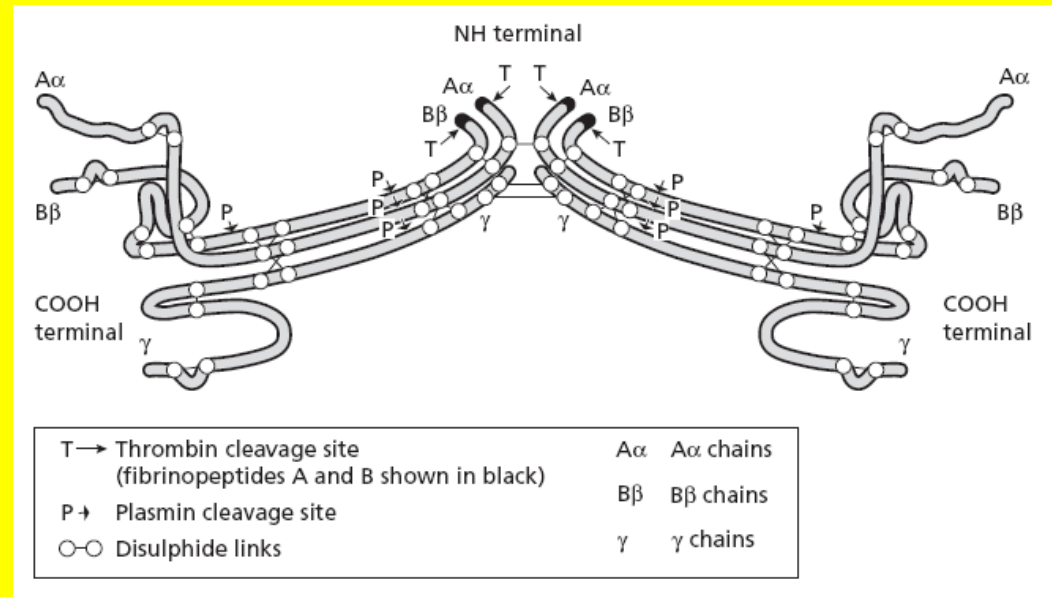
XI – Plasma Thromboplastin Antecedent (kontaktní faktor) – zymogen serinové proteázy, monomer, cirkuluje jako dimer spojen S-S vazbami, 4 strukturní domény („jablečné domény“)



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**

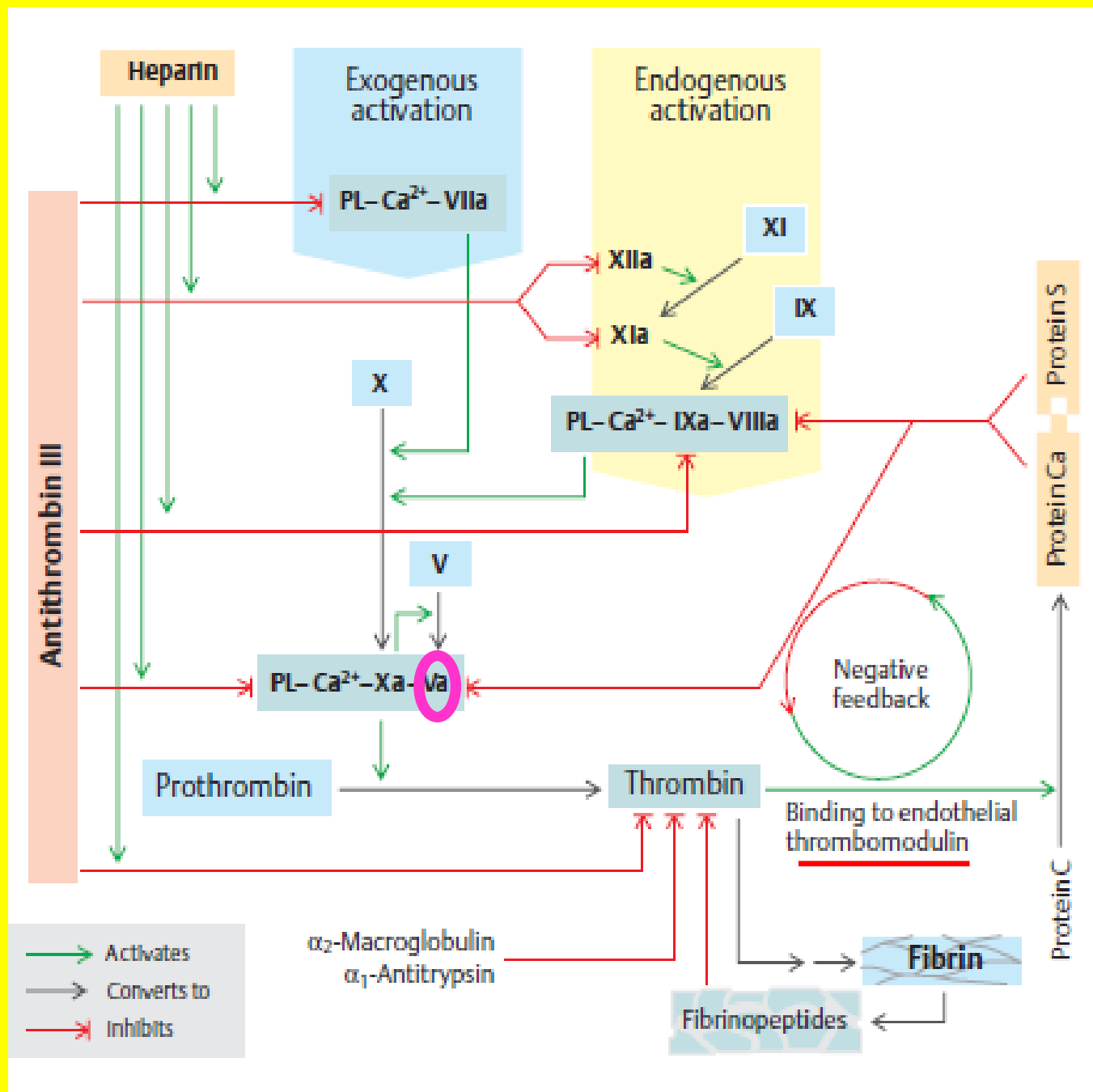
I – Fibrinogen – dimerický glykoprotein, ~340 kDa, lokalizace - plazma, α -granula, každá ze dvou podjednotek obsahuje S-S vázané polypeptidy ($A\alpha$, $B\beta$, γ), peptidy A + B odštěpeny thrombinem

XIII – Fibrin stabilizující faktor (transglutaminasa) – glykoprotein, ~320kDa, výskyt – plazma, destičky, monocyty, makrofágy
-dimer A a B v plazmě
- cirkulace s fibrinogenem,
- **funkce** = cross-link řetězců α - a γ -fibrinu



Regulace koagulační kaskády

- Přítomnost antikoagulancií / inhibitory proteas



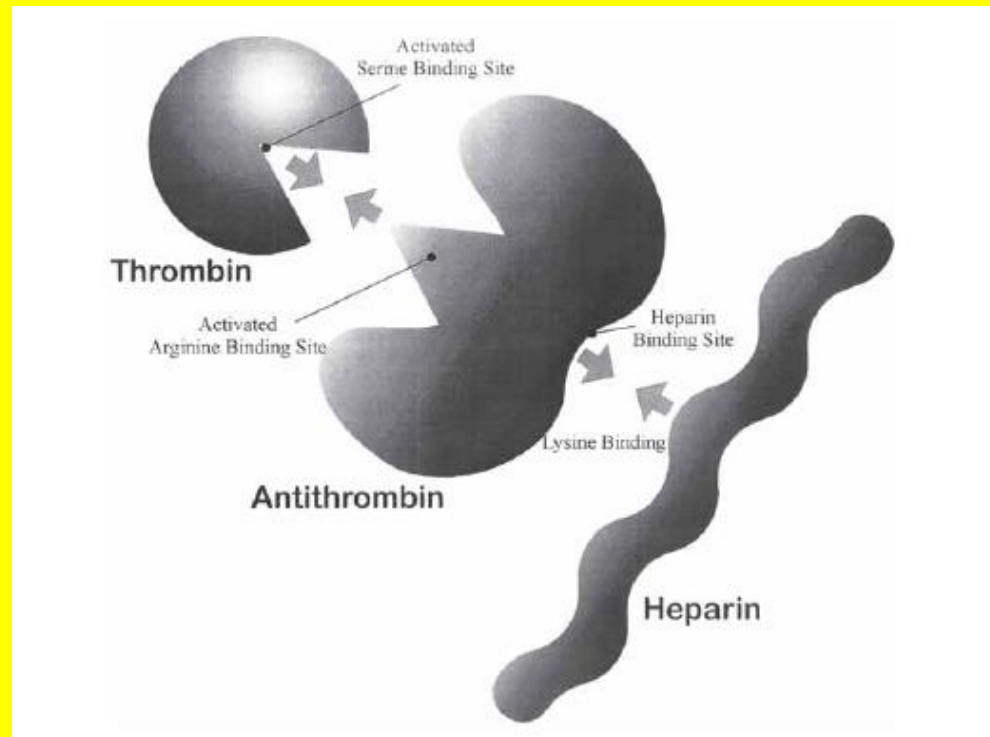
Inhibitory koagulační kaskády I.

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

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

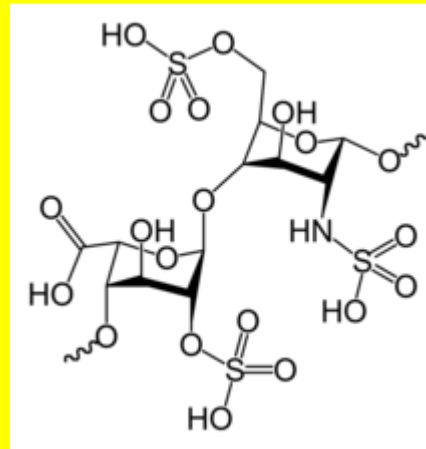
Protein C - 56 kDa, zymogen, Deaktivace Va, VIIIa

Protein S - 69 kDa, kofaktor aktivovaného C



Inhibitory koagulační kaskády II.

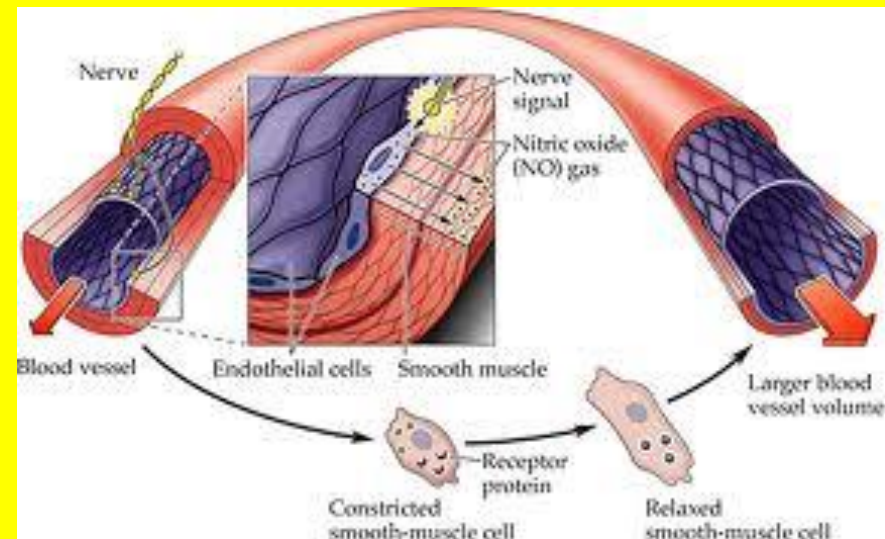
Heparin – sulfatovaný glykosaminoglykan, produkovaný žírnými buňkami (tkáňová forma basofilů)



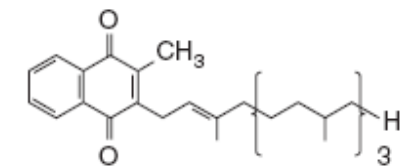
- NO**
- všudypřítomný radikál, syntetizován z Arg NOS,
 - poločas života 5-10s, vasodilatátor (1998 Nobelova cena)
 - inhibitor agregace destiček, cytotoxicita makrofágů
 - vazba na hemovou skupinu guanylyl cyklasy

Antagonisté vitamínu K - deriváty kumarinu (warfarin, acenokumarol)

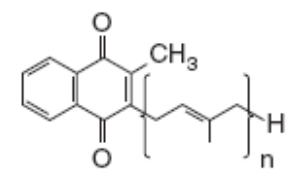
Inhibitory COX – aspirin blokuje TXA₂ syntézu



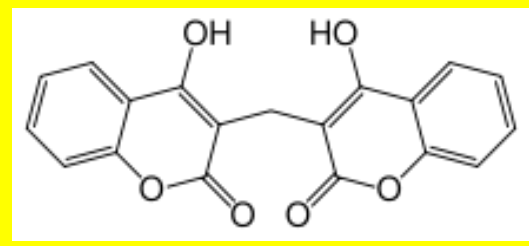
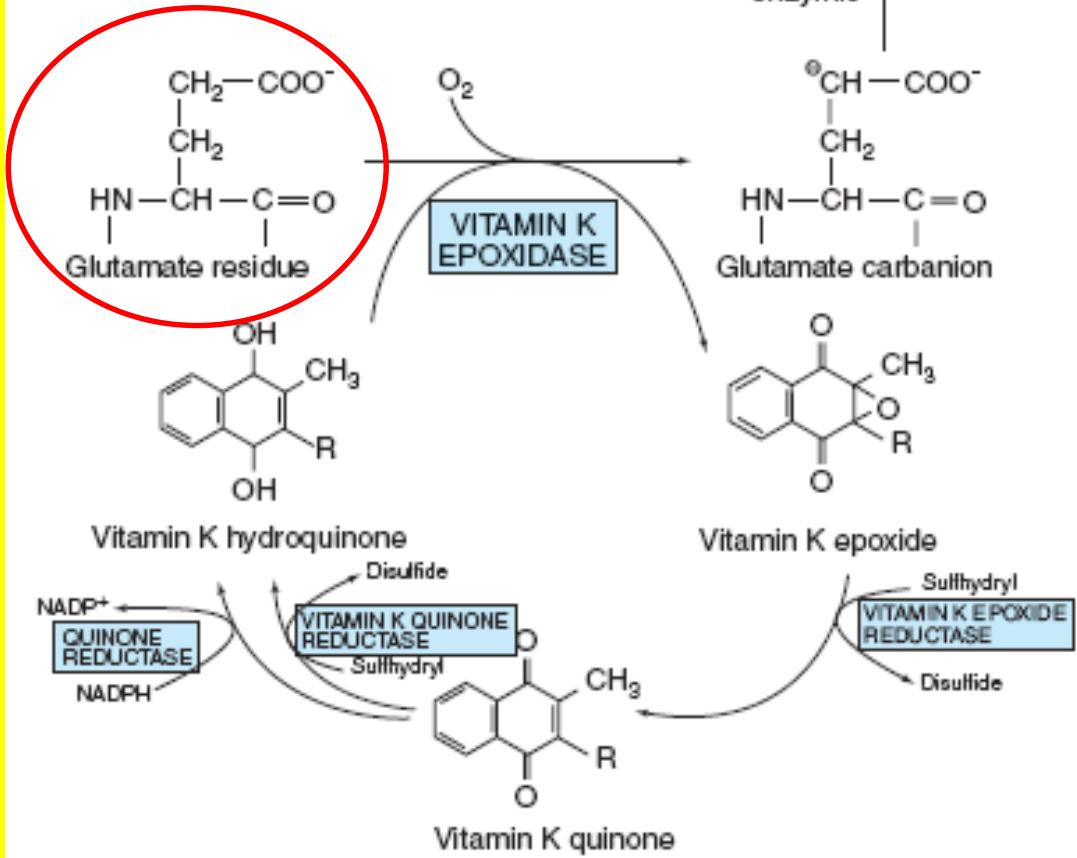
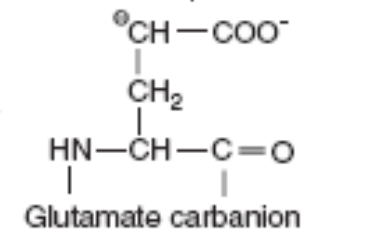
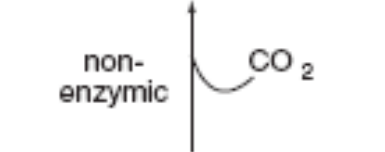
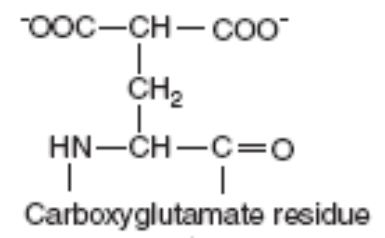
Inhibitory koagulační kaskády III.



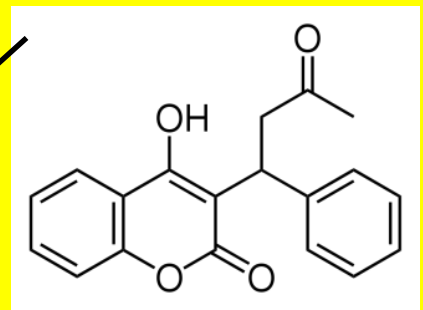
Phylloquinone
(zelenina)



Menaquinone
(syntetizován bakteriemi)

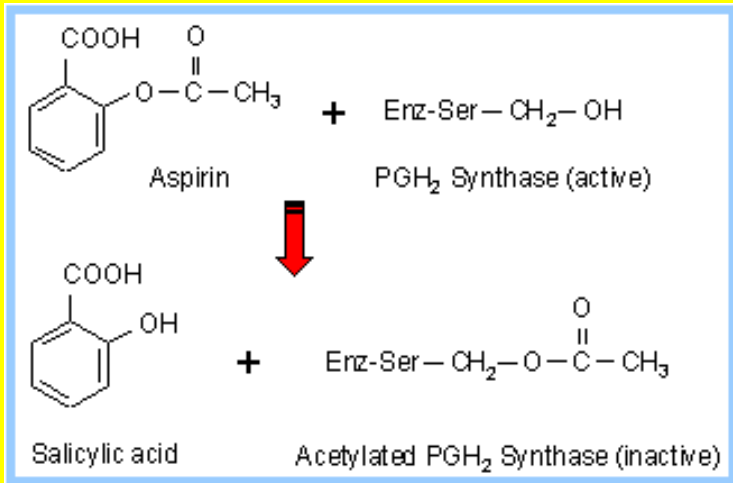


dicumarol



Warfarin (Lawarin, Waran)

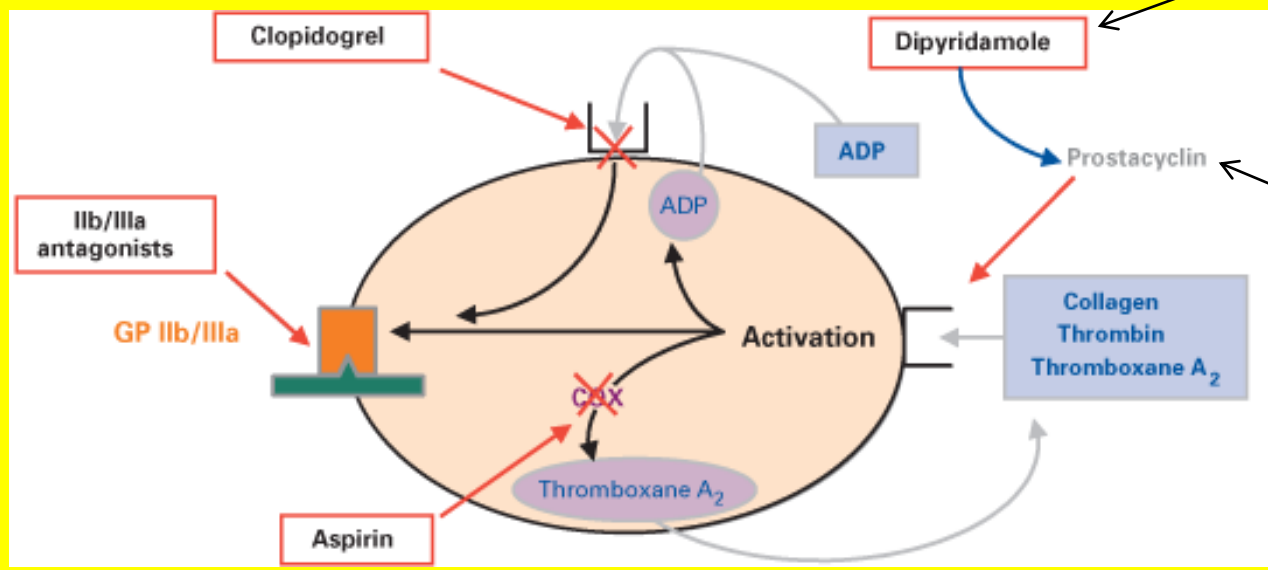
Inhibitory koagulační kaskády IV.



Prostaglandin H₂ synthasa (PGH₂) (COX, cyklooxygenasa) – Inhibice ireversibilní, 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; jednořetězcový glykoprotein, zymogen, 90 kDa

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

Urokinasa –
monocyty,
makrofágy,
fibroblasty

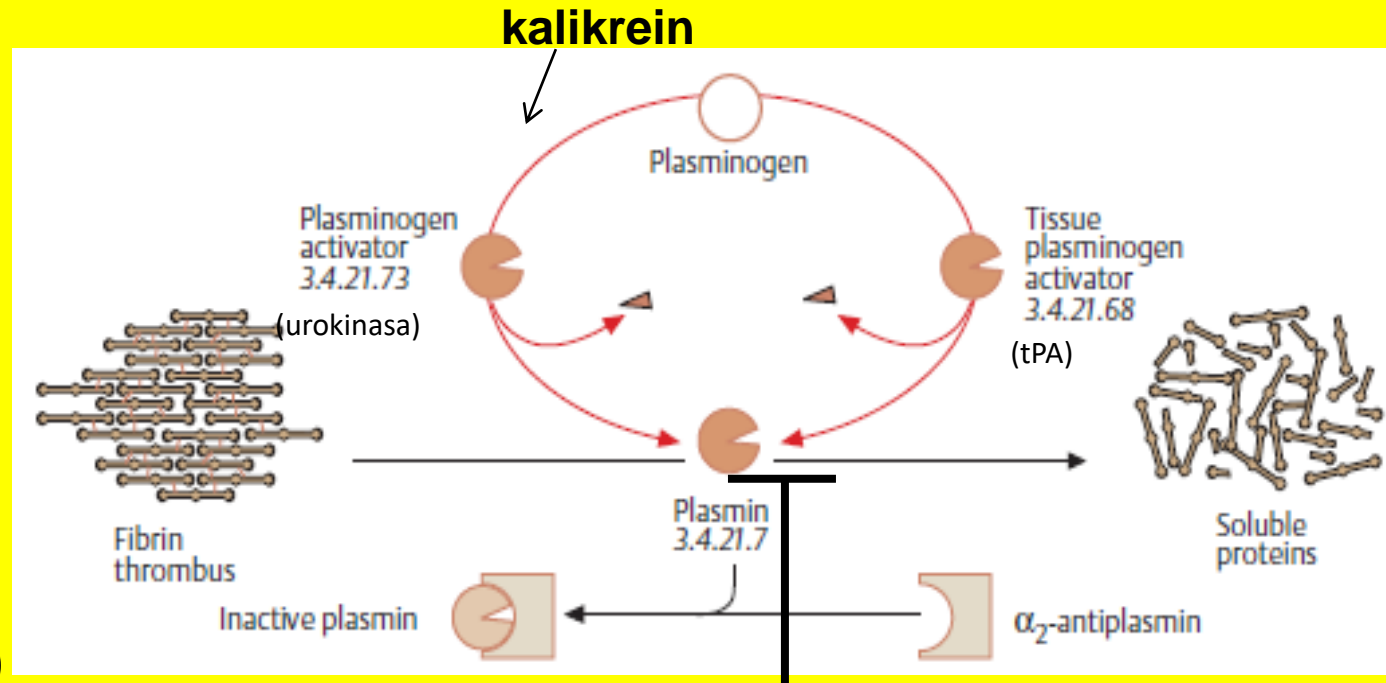
Urokinasa – ledviny

tPA – vaskulární
endotel

Streptokinasa



Po infarktu (v klinice)
→ rozpuštění trombu



Inhibice plasminu – Aprotinin, tranexamová kyselina (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 či funkce vWF**
- krvácení z měkkých tkání, z nosu – vyvarovat se aspirinu a NSAIDs (nesteroidní antiinflatamtorika)
- 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

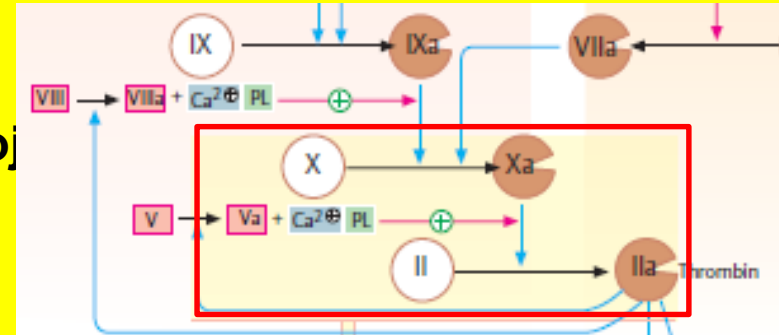
(c) 2007, Michael A. Kahn, DDS



Hemostatické poruchy / Koagulopatie II.

- **Hemofilie A** – rozpoznána již v 2. st. n.l. rabíny - chlápci podstupující obřizku mají riziko krvácení

- defekt **faktoru VIII** – snížená produkce / produkce nefunkčního proteinu či obojí
- **VIIIa + IXa** tvoří X-aktivující komplex (Xasa) 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 obyvatel v ČR (hem A)

- léčba:

TXA (antifibrinolytikum),
desmopressin (podporuje
uvolnění vWF),
rekombinantní protein



- **Hemofilie B** - defekt faktoru IX, gonosomálně recesivní, 1:60 000 v ČR, klinicky neodlišitelná od A, léčba jako u A

Hemostatické poruchy / Koagulopatie III.

- Nedostatek vitamínu K

- malabsorbce (celiakie)
- cholestaza (extra- / intrahepatální)
- léčba dávkami vitamínu 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 **Glyko**Proteinech, 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 TXA₂), 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

- systemové 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

Trombocytopenie – 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

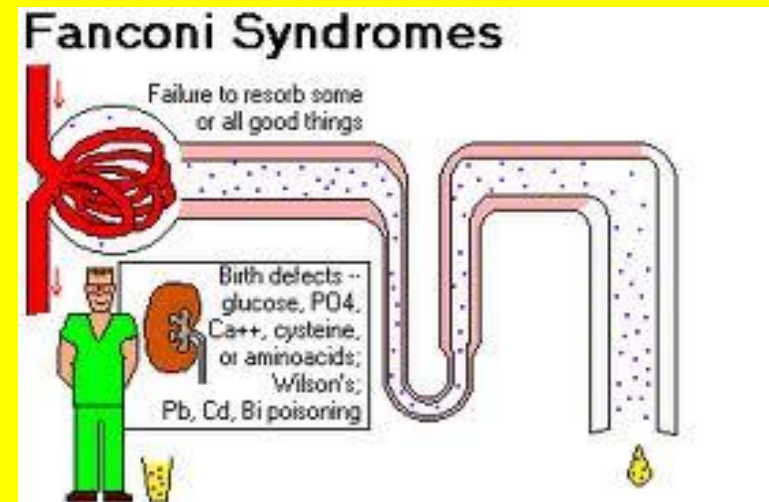
- Zvýšená destrukce destiček

- 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 (WAS) – gonosomálně podmíněná imunodeficience
 - **mikrotrombocytopenie**, ekzém, vracejíci se infekce, nedostatek T buněk, zvýšené riziko autoimunitních a lymfoproliferativních nemocí.
 - **Mutace WAS genu** - WASp 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

Trombocytosa – počet destiček $> 450 \cdot 10^9/l$ – zvýšené riziko trombóz

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



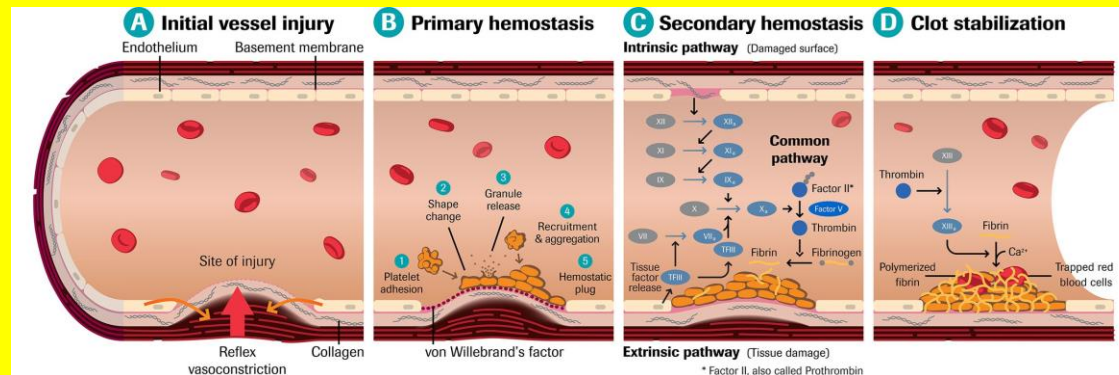
Trombofilie



- **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**



Rizikové faktory

Arteriální thrombóza

- kouření, hypertenze, aterosklerosa, hyperlipidemie, DM

Venosní trombóza

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

Dědičný defekt – antitrombin, protein C, S, vysoká hladina faktoru VIII, mutace v genu protrombinu

Trombofilie II.

APC resistance – nejfrekventovanější trombofilie, 1/5000 z homozygotů, **mutace faktoru V (Leidenská mutace)** (glu→arg506) - APC inaktivuje proteolyticky faktor Va;

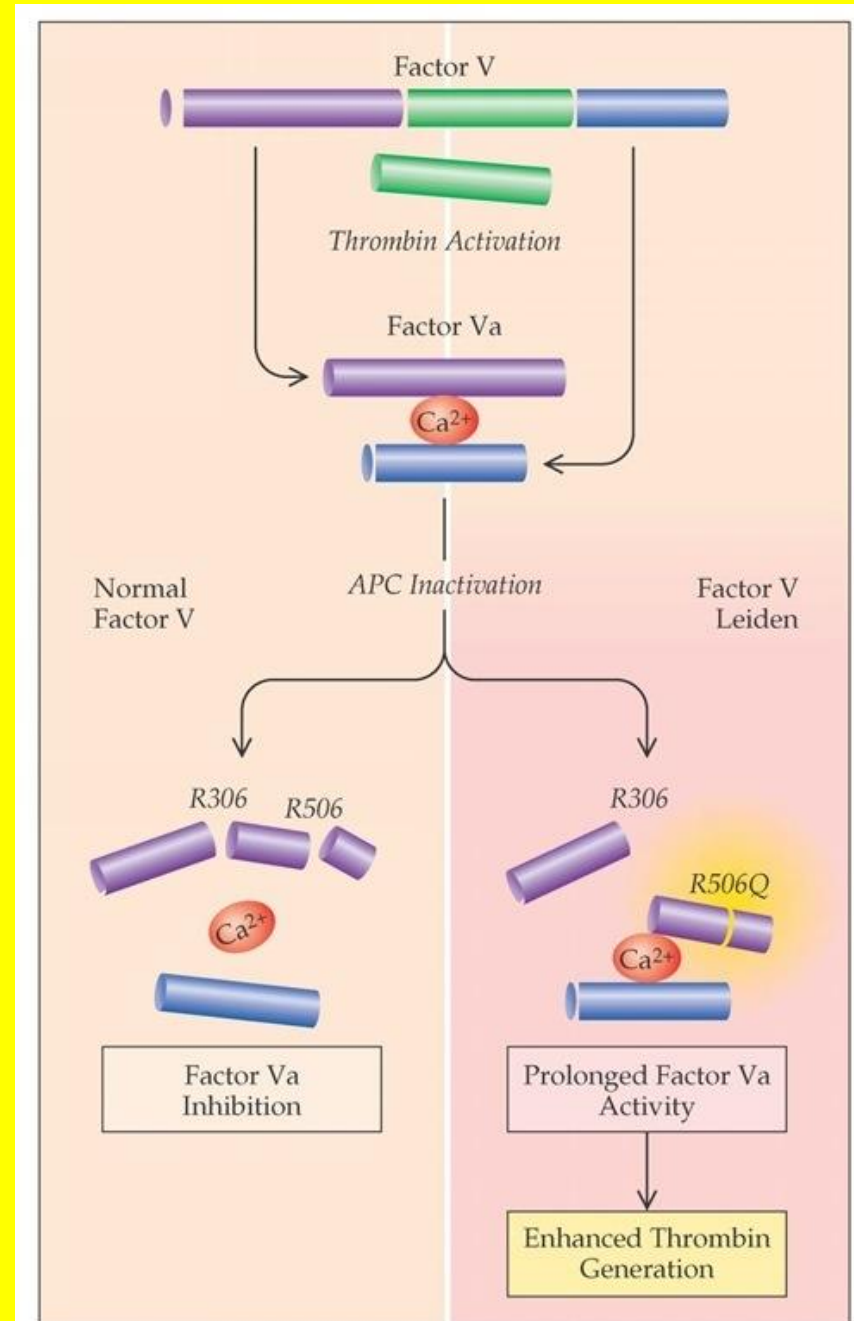
- pravděpodobnost **venosní embolie** zvýšena 2-6x (hetero-) a 50-100x (homozygoti)

- rizikové faktory - trauma, operace, těhotenství

Nedostatek antithrombinu III – homozygoti nekompatibilní se životem, riziko trombózy převážně v těhotenství

- Léčba – heparin / warfarin, koncentráty antithrombinu či proteinu C

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



Slovo závěrem...



Chce to opakovat, a opakovat, a opakovat, a..