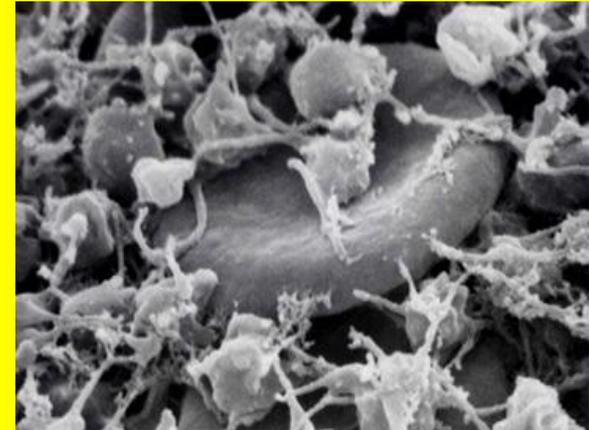
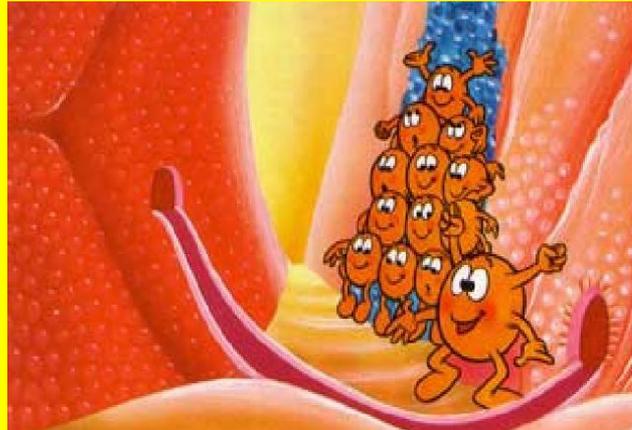
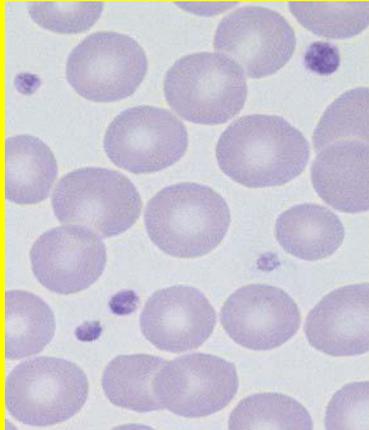


Základy Hematologie KBB / ZHEMP

Lekce 4 - Fyziologie a Patologie Trombocytů

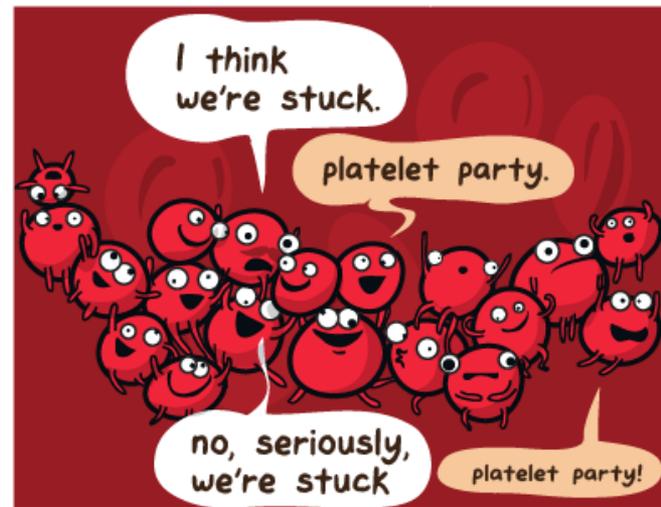
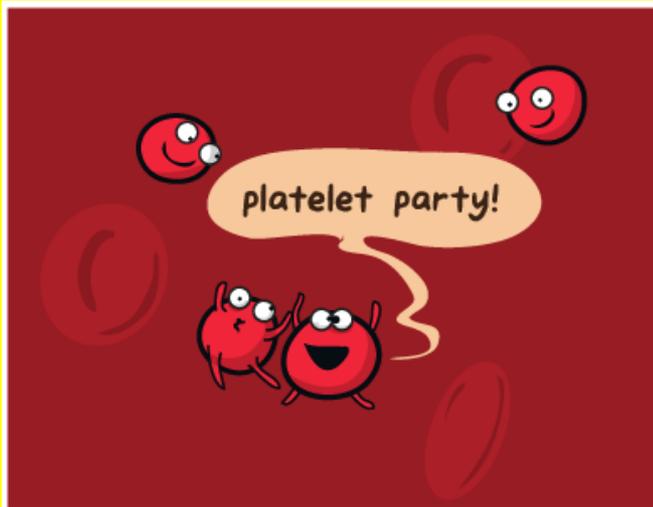


Radim Vrzal

radim.vrzal@upol.cz

Katedra buněčné biologie a genetiky, budova 51

Začínáme....

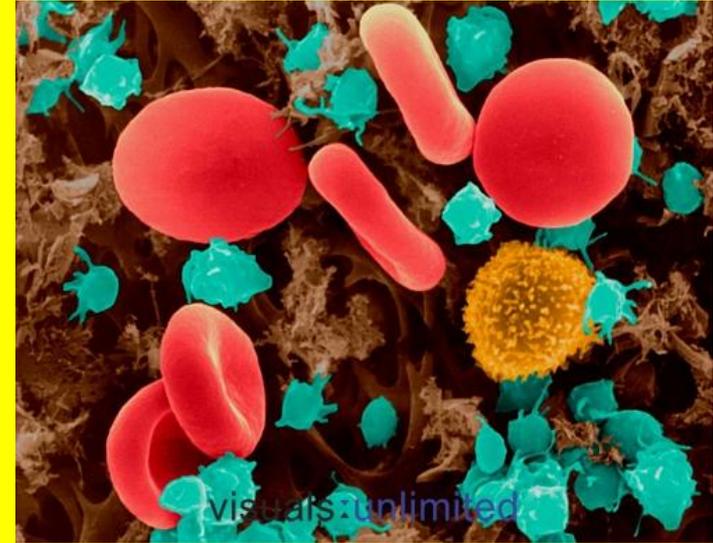


....hromadná párty !!!

Základní charakteristiky

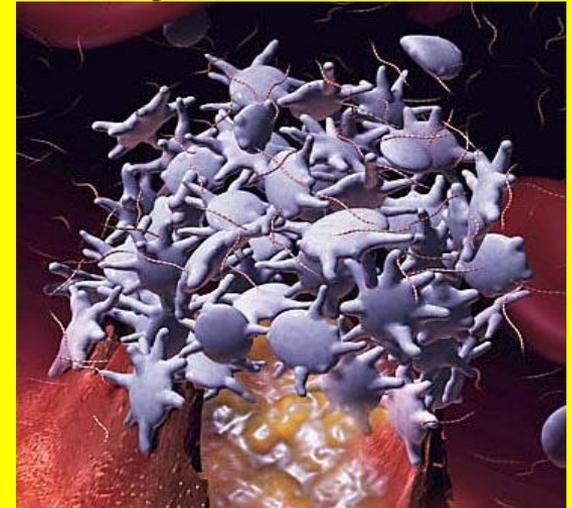
Krevní destičky (trombocyty):

- 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

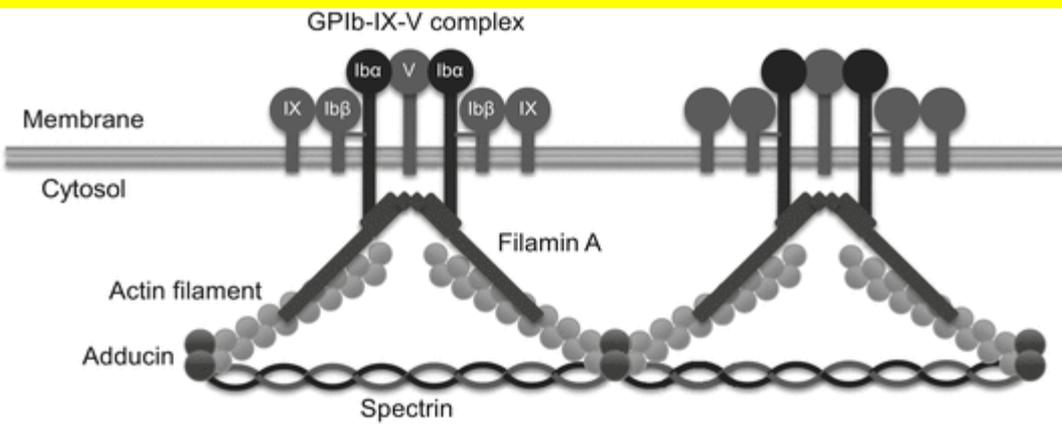
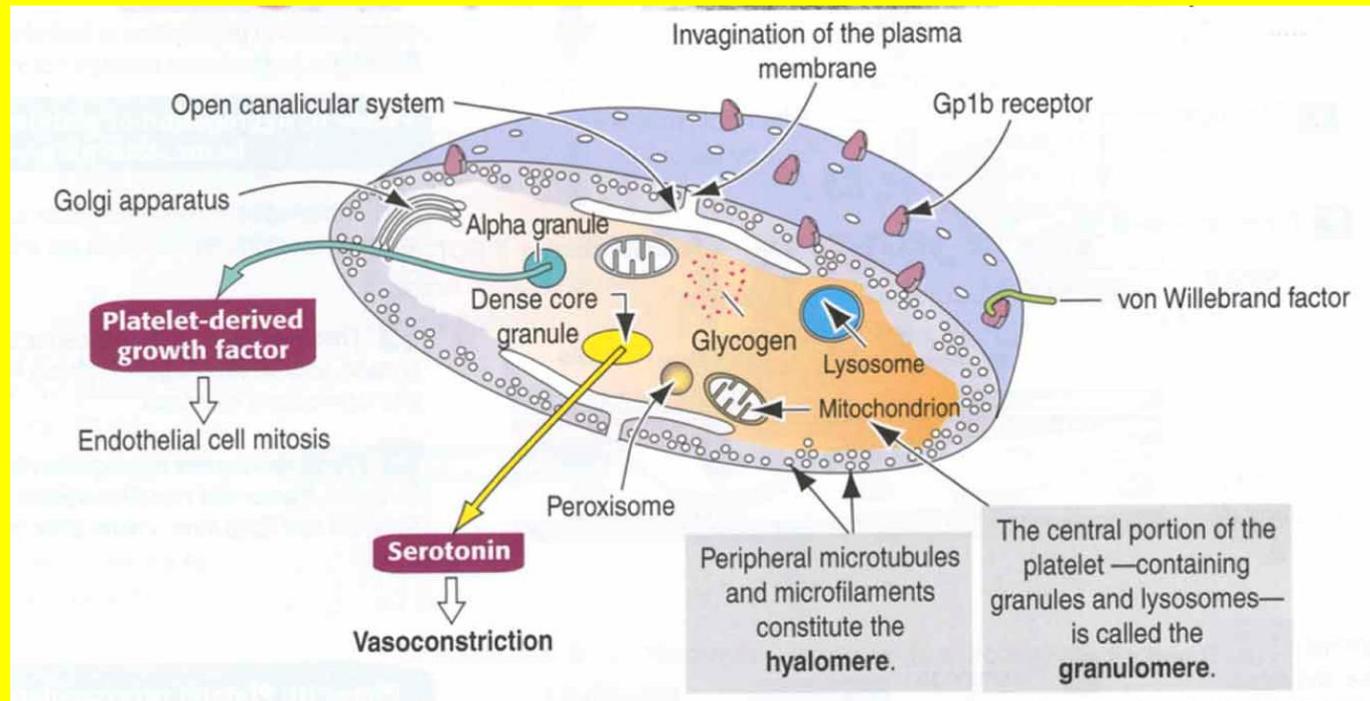


Struktura trombocytů

- **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**

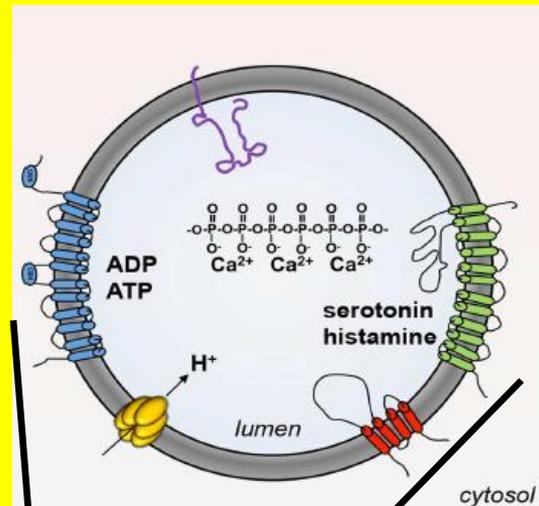


- **Aktin je napojen přes Filamin-A s membránovým GPIb α**

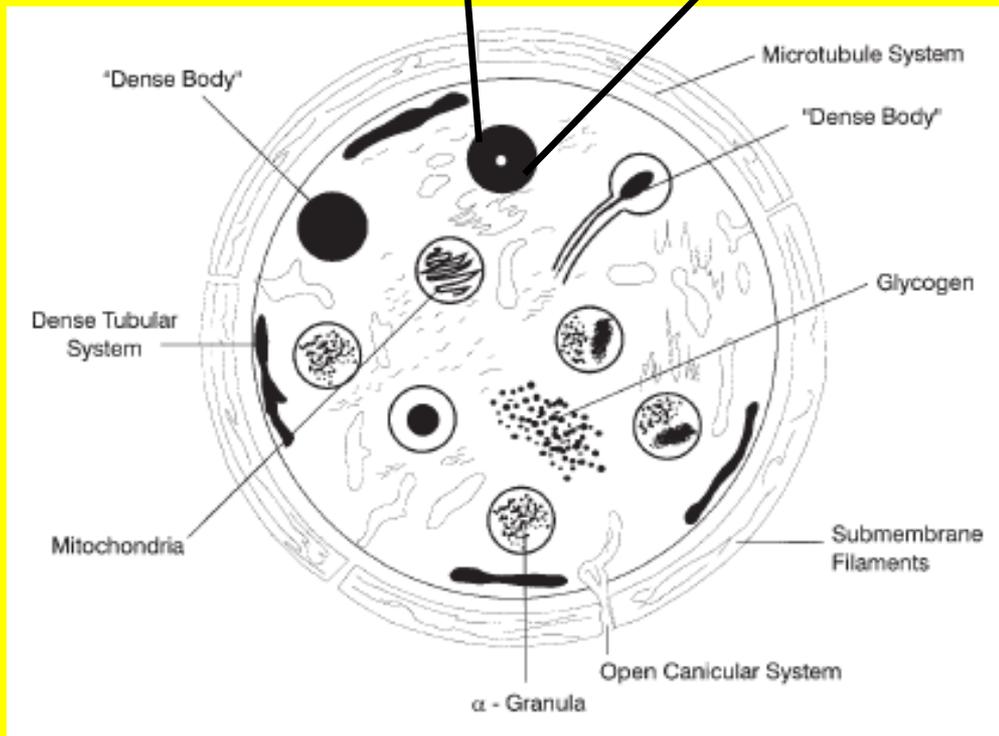
Struktura trombocytů II.

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



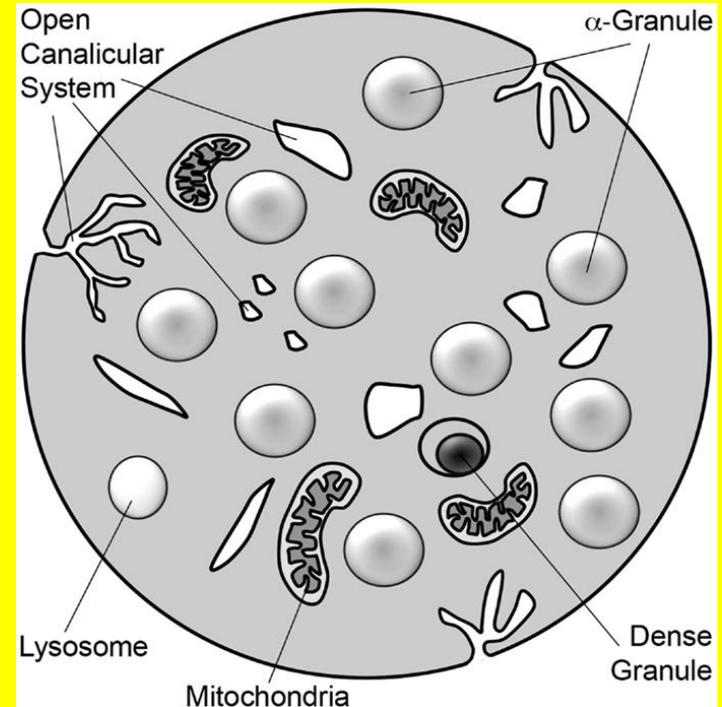
Struktura trombocytů III.

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

- směs proteinů - destičkový faktor 4 (antagonista heparinu)
 - PDGF (proliferace hladké svaloviny cév, fibroblastů, chemokinů, indukce fagocytózy)
 - **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

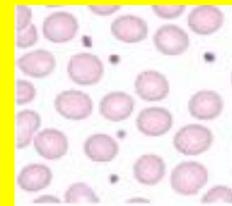
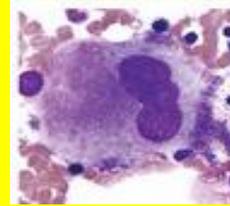
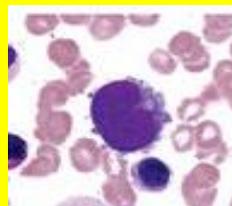
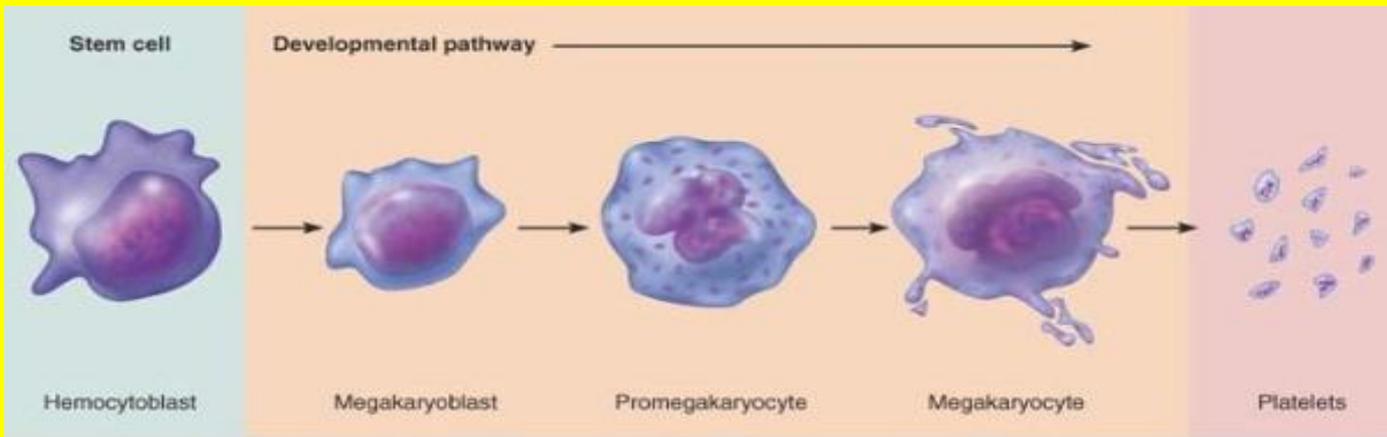
Promegakaryocyt

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

Megakaryocyt

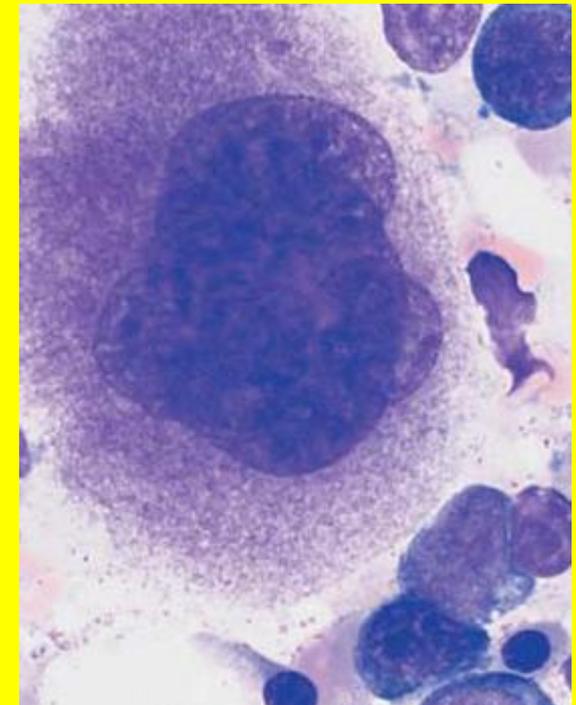
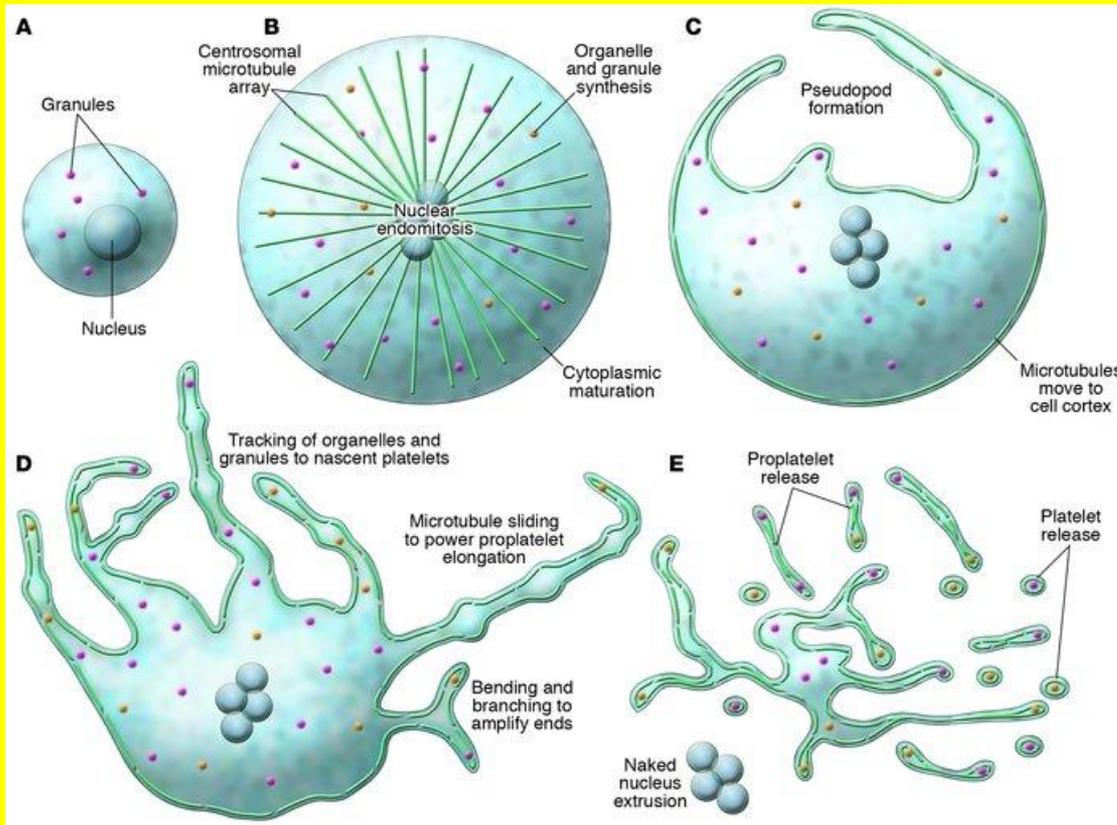
- 40-70 μm a víc, vícelaločnaté jádro (polyploidie až 64 sad), růžová cytoplazma, na okrajích zvrásněná

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

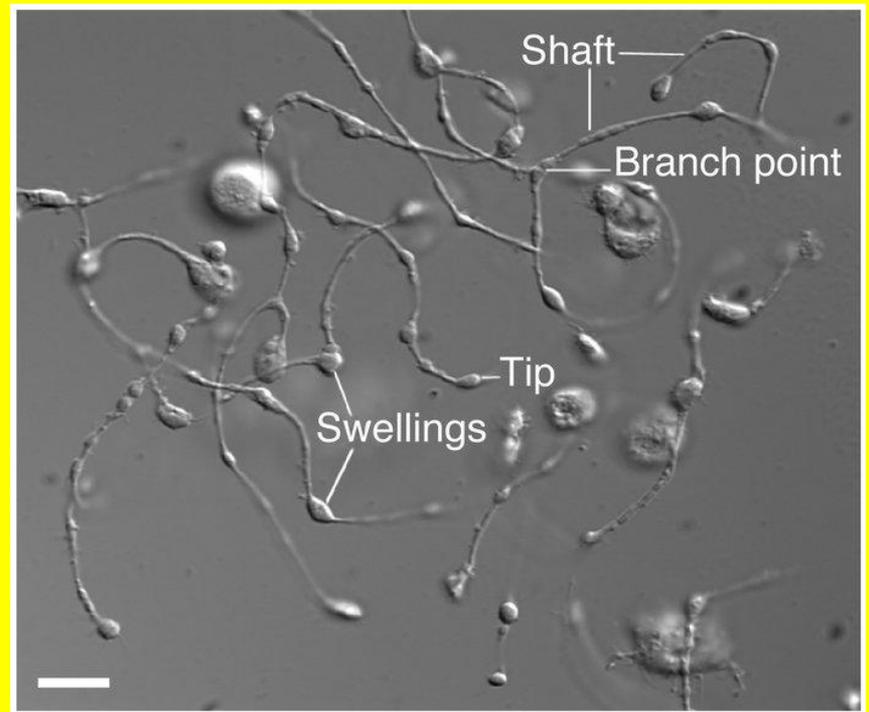
Vývoj od stádia I (B, megakaryoblast) uskutečňován endomitozou !
(bez rozpuštění jaderné membrány) → polyploidní buňka

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

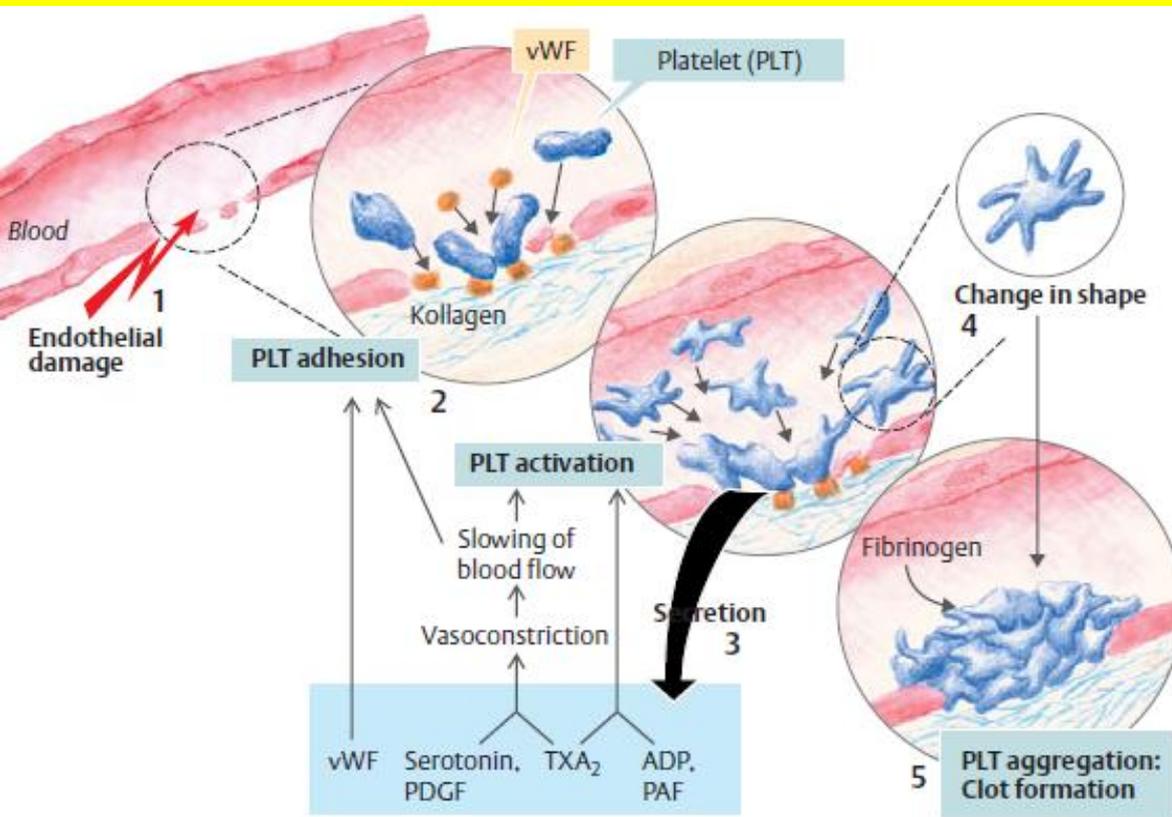
- **tvorba fibrinového síta** = kovalentní provázání fibrinu → fibrinová sraženina / trombus

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

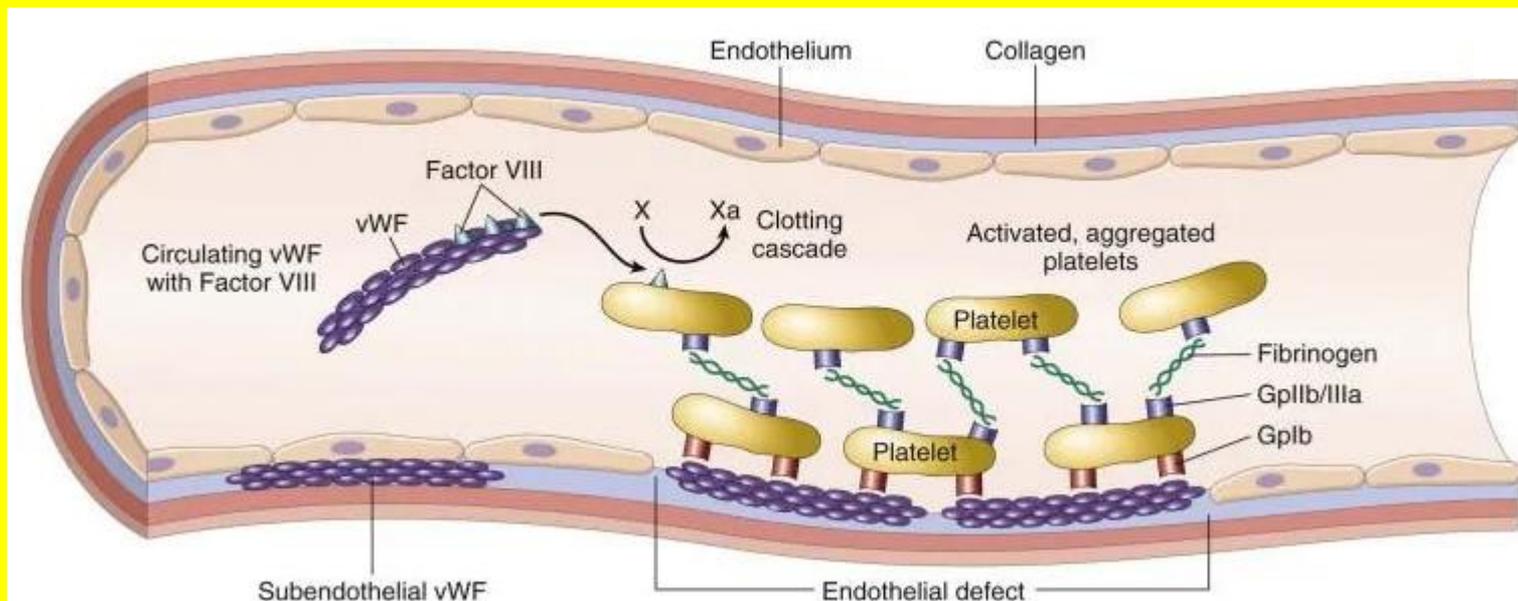
2) Aktivace destiček
3) Uvolnění látek (vWF – podpora adheze; **serotonin, TXA₂** – podpora vasokonstrikce) → **zpomalení toku krve**

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.



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)

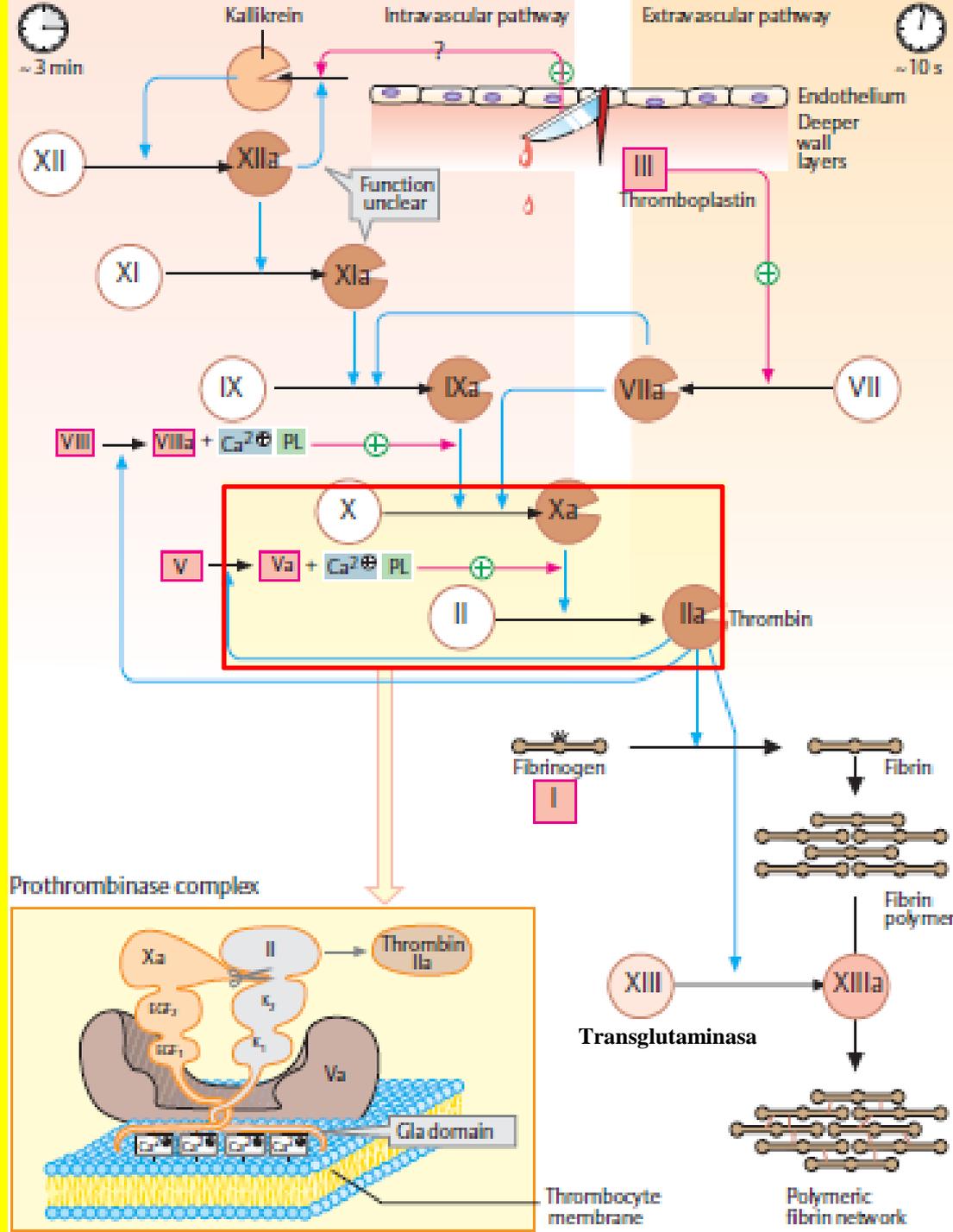
GP Ib/IX (kolagenový receptor) – glykoproteinový transmembránový receptor, široce rozšířen na různých buňkách

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

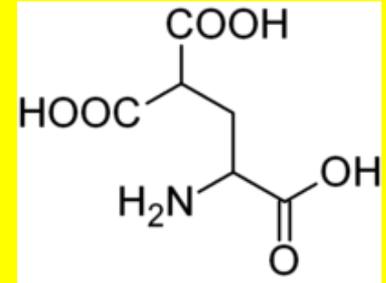
I	Fibrinogen	Half-life (h):	96
II ^K	Prothrombin		72
III	Tissue thromboplastin		
IV	Ionized calcium (Ca ²⁺)		
V	Proaccelerin		20
VII ^K	Proconvertin		5
VIII	Antihemophilic factor A		12
IX ^K	Antihemophilic factor B; plasma thromboplastin component (PTC); Christmas factor		24
X ^K	Stuart–Prower factor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



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

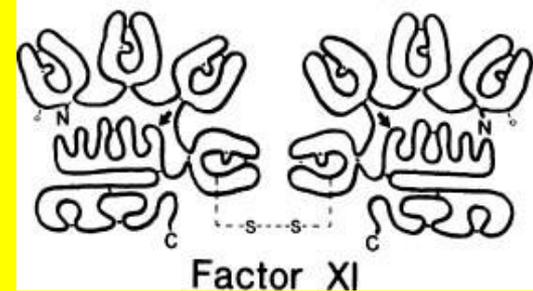
X – Stuart-Prowerův faktor – dvouřetězcový, spojen S-S vazbou, 11 Gla zbytků, 59 kDa

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 (APC) = 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

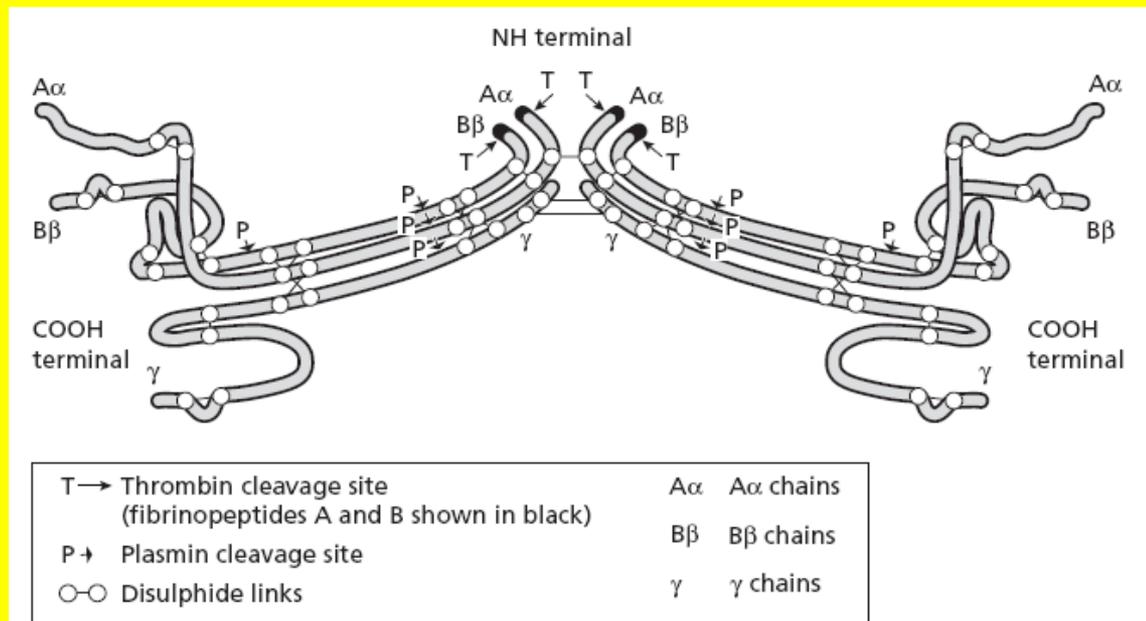
XIII – Fibrin stabilizující faktor (transglutaminasa) –

glykoprotein, ~320kDa, výskyt – plazma, destičky, monocyty, makrofágy

-dimer A a B v plazmě

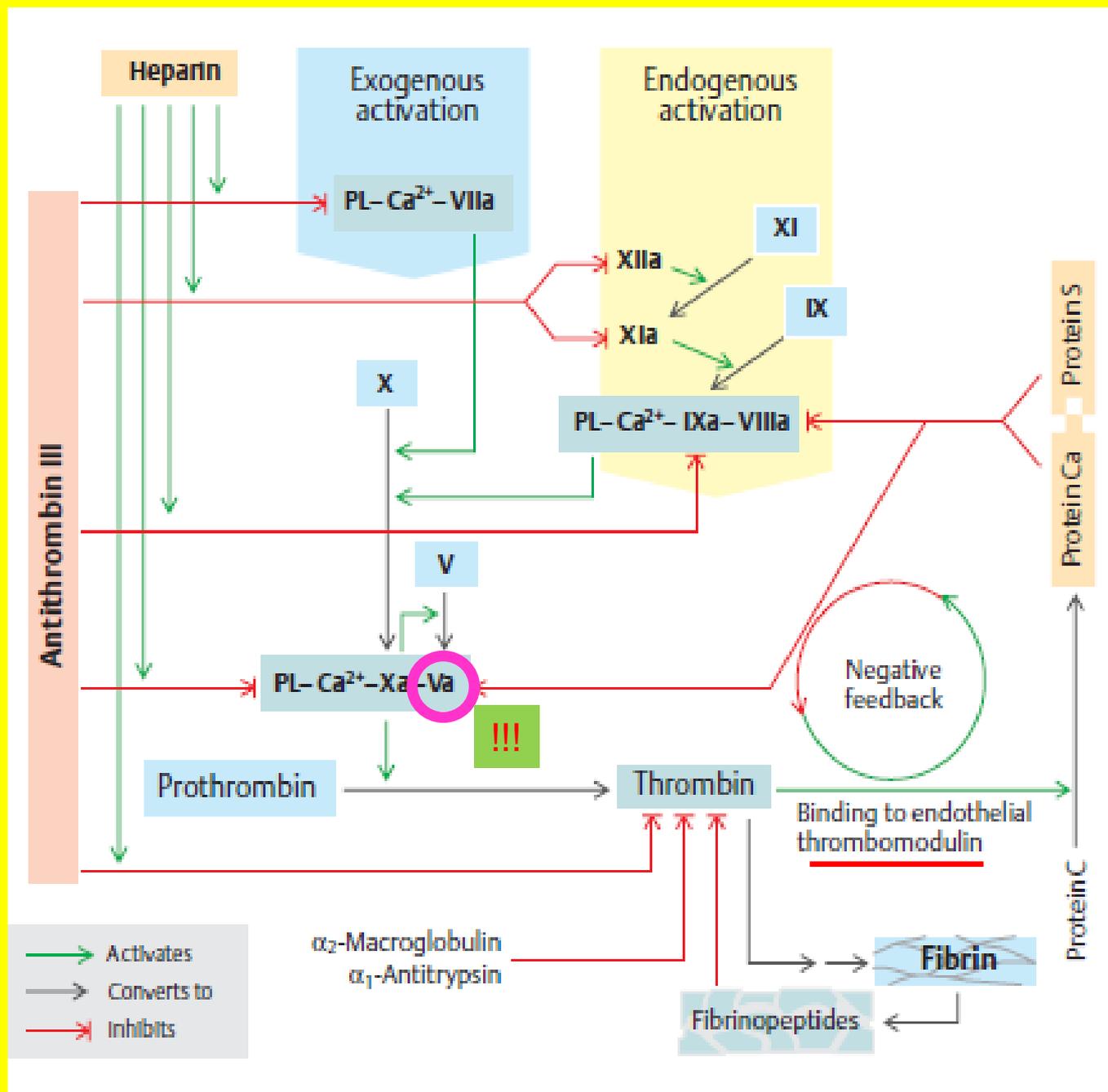
- cirkulace s fibrinogenem,

- **funkce** = cross-link řetězců α - a γ - fibrinu



Regulace koagulační kaskády

- Přítomnost antikoagulantů / inhibitory proteas



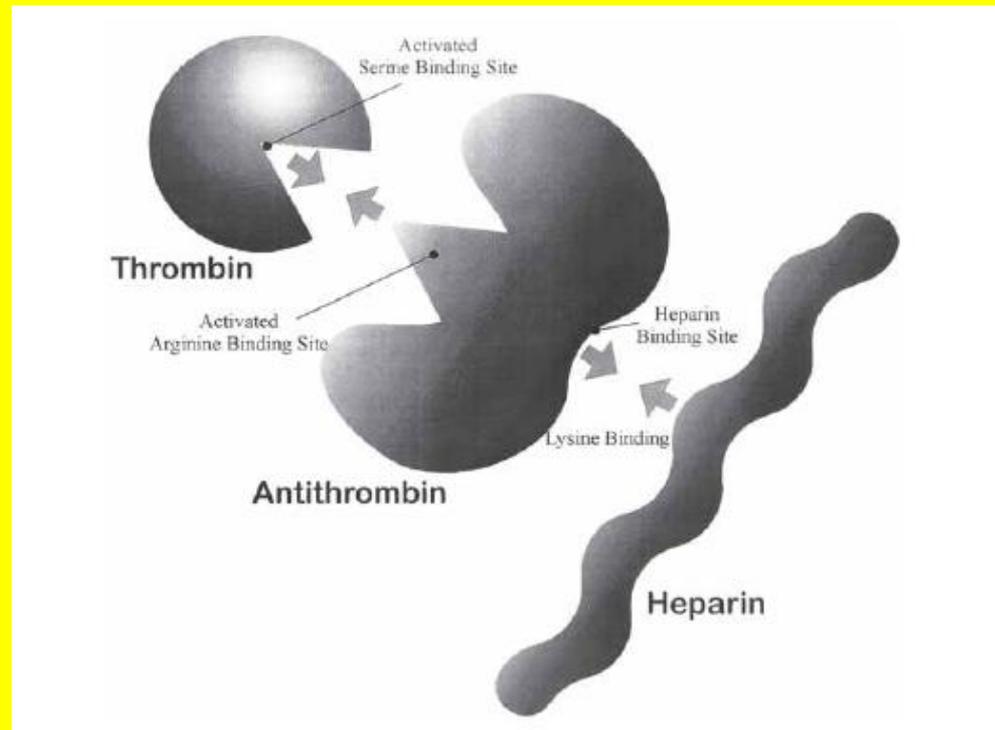
Inhibitory koagulační kaskády I.

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

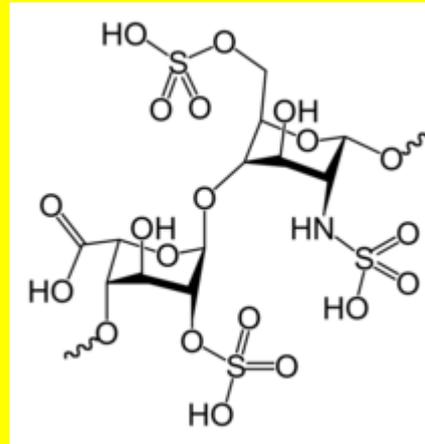
Protein C - 56 kDa, zymogen, Deaktivace Va, VIIIa

Protein S - 69 kDa, kofaktor aktivovaného C



Inhibitory koagulační kaskády II.

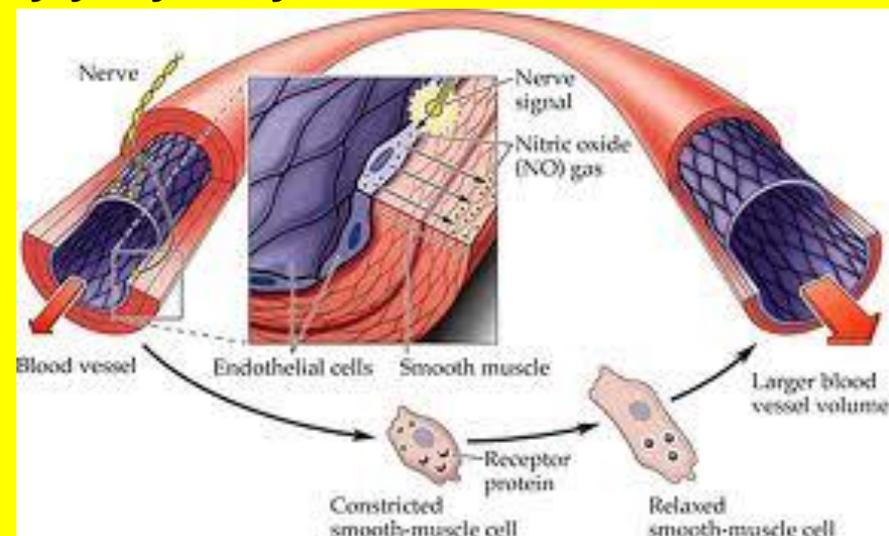
Heparin – sulfatovaný glykosaminoglykan, produkovaný žírnými buňkami (tkáňová forma basofilů)



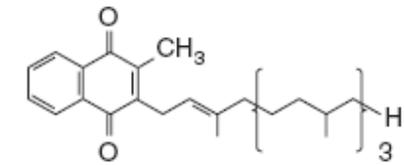
- NO**
- všudypřítomný radikál, syntetizován z Arg NOS,
 - poločas života 5-10s, vasodilatátor (1998 Nobelova cena)
 - inhibitor agregace destiček, cytotoxicita makrofágů
 - vazba na hemovou skupinu guanylyl cyklasy

Antagonisté vitamínu K - deriváty kumarinu (warfarin, acenokumarol)

Inhibitory COX – aspirin blokuje TXA₂ syntézu

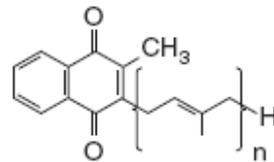


Inhibitory koagulační kaskády III.



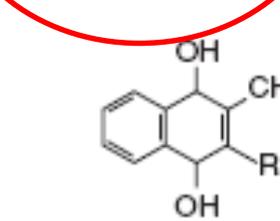
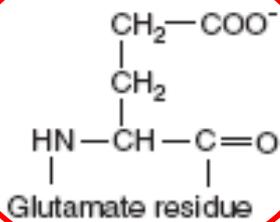
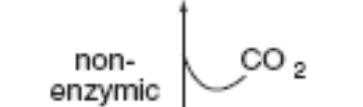
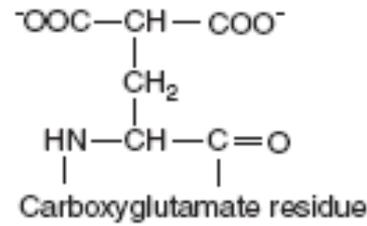
Phylloquinone

(zelenina)

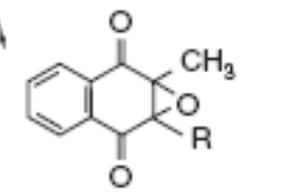


Menaquinone

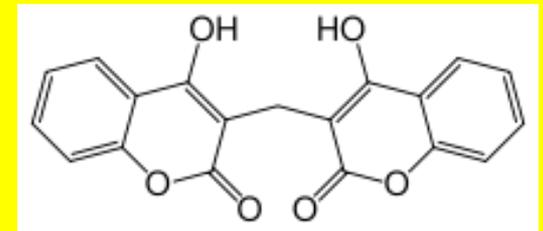
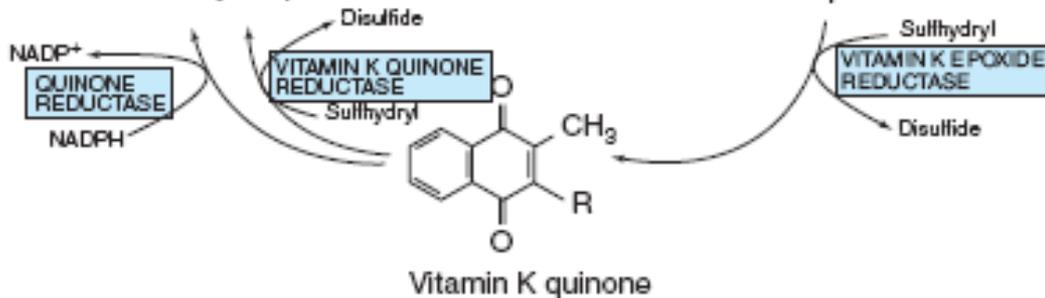
(syntetizován bakteriemi)



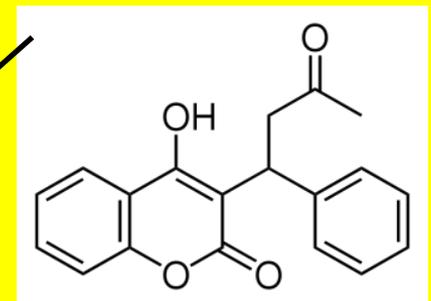
Vitamin K hydroquinone



Vitamin K epoxide

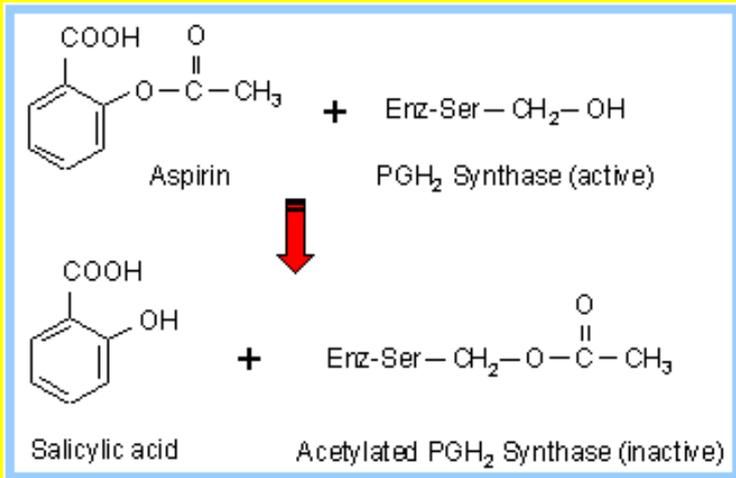


dicumarol



Warfarin (Lawarin, Waran)

Inhibitory koagulační kaskády IV.

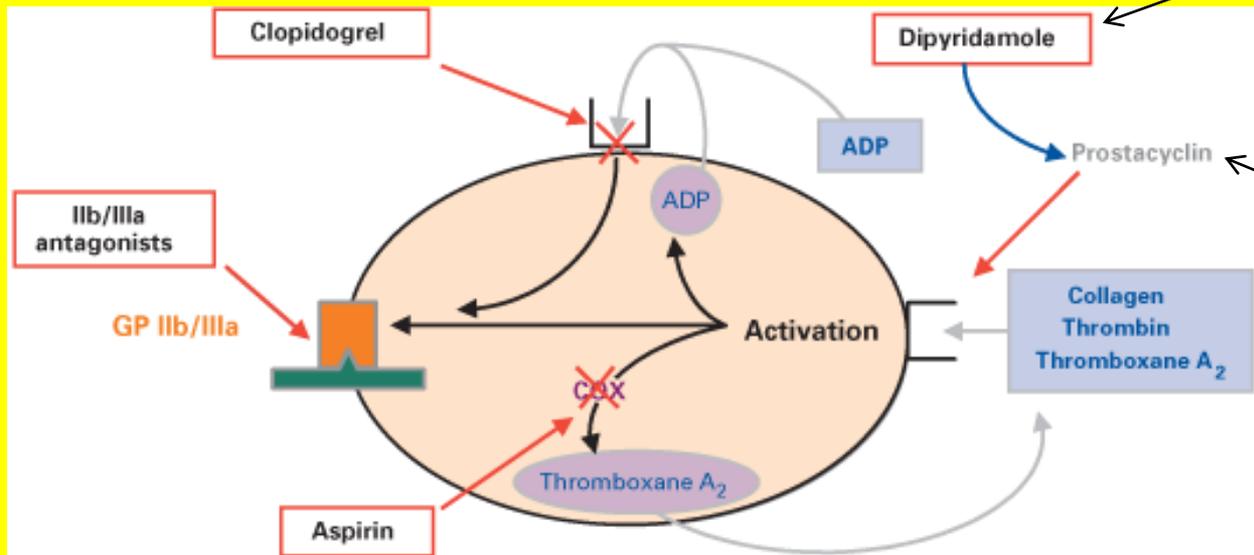


Prostaglandin H₂ synthasa (PGH₂) (COX, cyklooxygenasa) – Inhibice ireversibilní, nutná nová syntéza novými thrombocyty



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; zymogen, jednořetězcový glykoprotein, 90 kDa



Streptokinasa

Po infarktu (v klinice)
→ rozpuštění trombu

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) –

inhibitor serinových proteáz (SERPIN), uvolňován endotelem a destičkami (α -granula), polymorfismus 4G/5G, 4G = zvýšená hladina → rizikový faktor trombózy, aterosklerózy

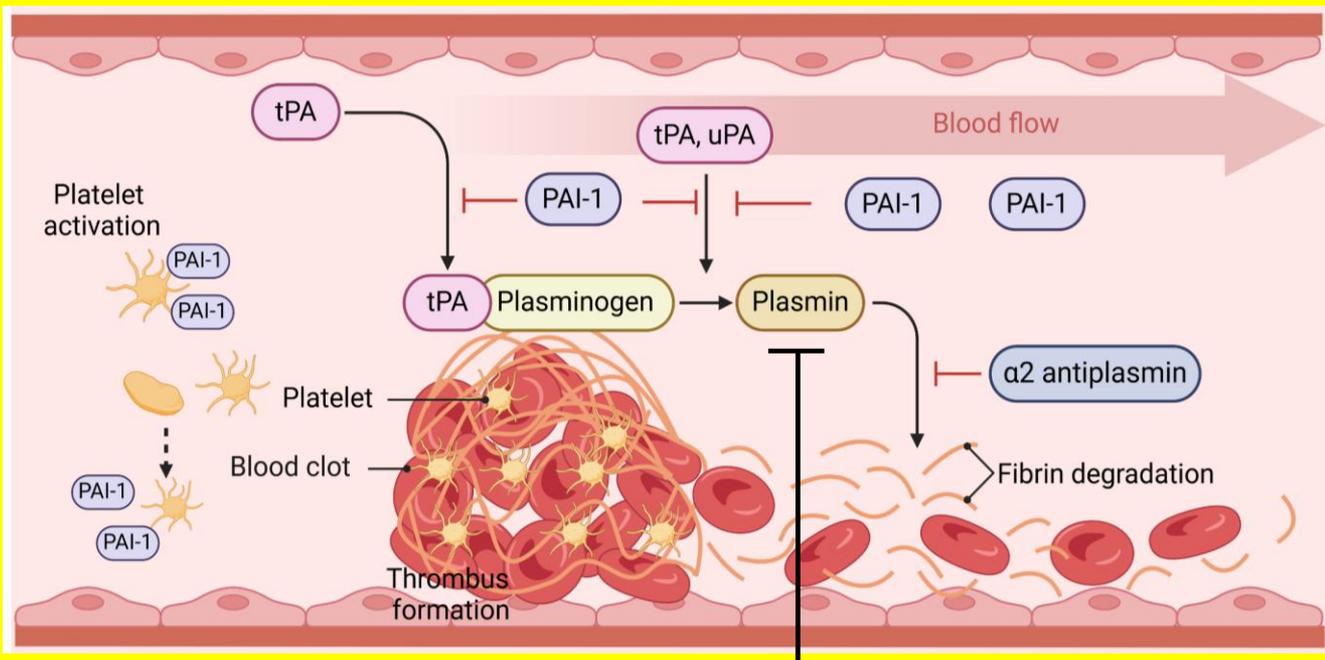


Tissue plasminogen activator (tPA) –

serinová proteáza, uvolňován cévním endotelem po poranění, neaktivní až do vazby na fibrin

Urokinasa (uPA) –

monocyty, makrofágy, fibroblasty



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

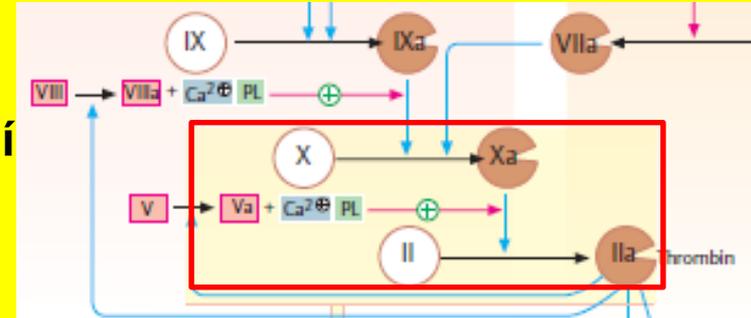
(c) 2007, Michael A. Kahn, DDS



Hemostatické poruchy / Koagulopatie II.

- **Hemofilie A** – rozpoznána již v 2. st. n.l. rabíny - chlapci 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, hematurie**) - 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

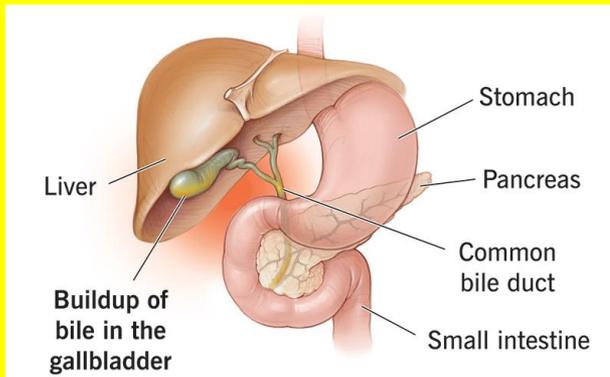


- **Hemofilie B** - defekt faktoru IX, gonosomálně recesivní, 1:60 000 v ČR, klinicky neodlišitelná od A, léčba jako u A

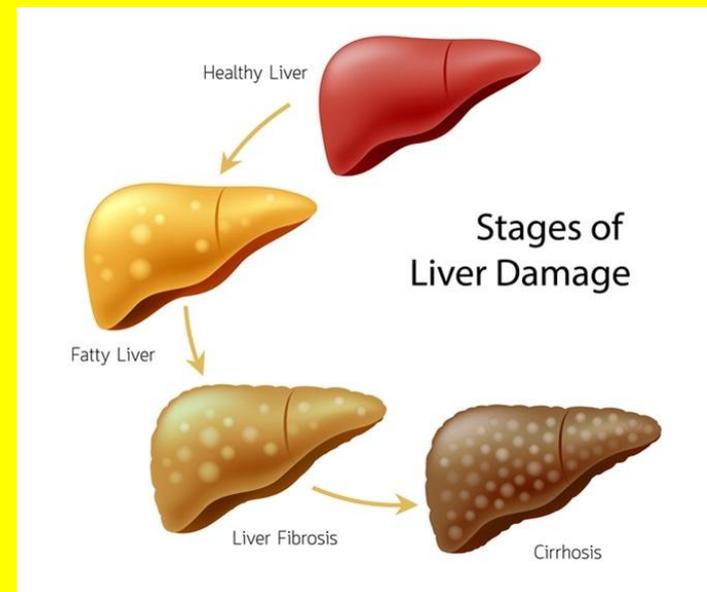
Hemostatické poruchy / Koagulopatie III.

- Nedostatek vitamínu K

- malabsorbce (celiakie)
- cholestaza (extra- / intrahepatální)
- léčba dávkami vitamínu K a nebo transfuzí plasmy



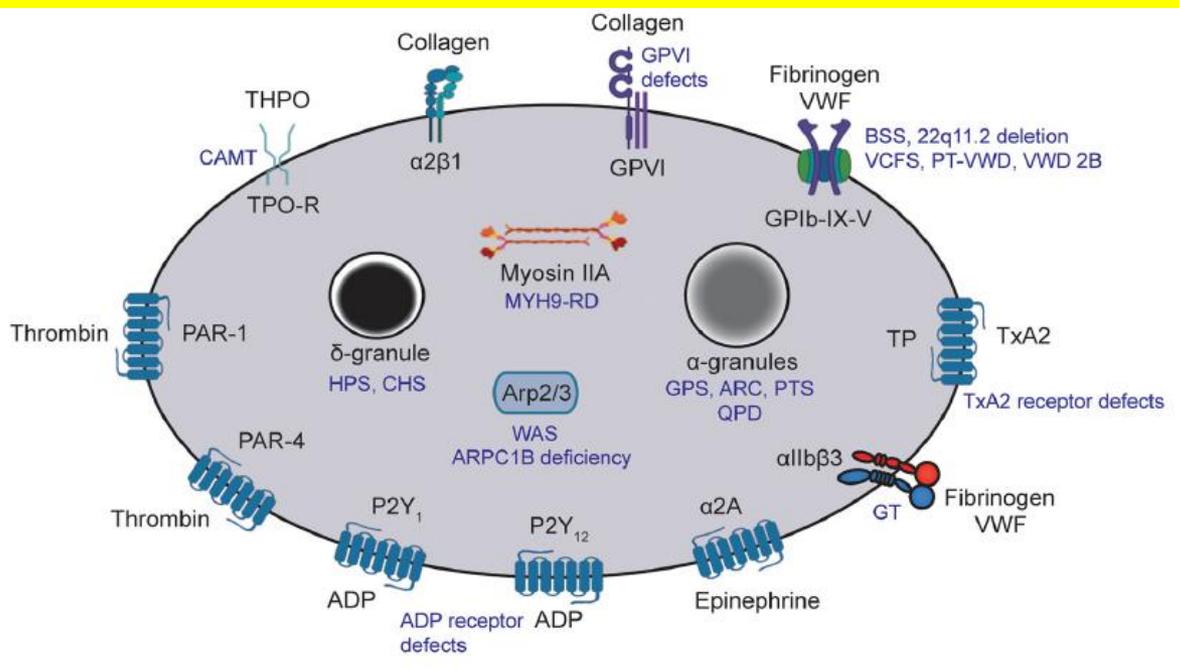
- Nemoci jater – většina pacientů abnormální koagulační profil ale může být asymptomatická



Hemostatické poruchy / Koagulopatie IV.

- **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

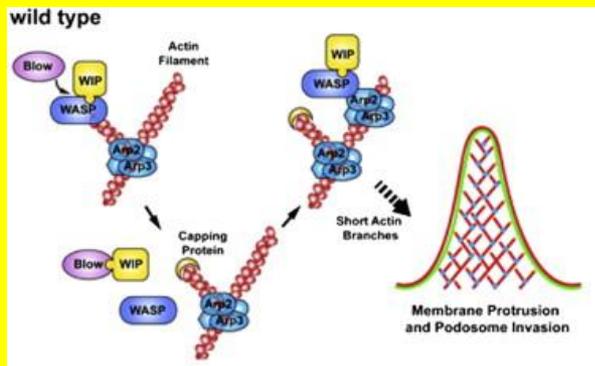
- Snížená produkce destiček dření

- poškození kostní dřeně – aplastická anemie, leukemie, cytotoxická léčiva (chloramphenicol)
- nutriční nedostatek – megaloblastická anemie
- zděděné příčiny:

Wiskott-Aldrichův syndrom (WAS)

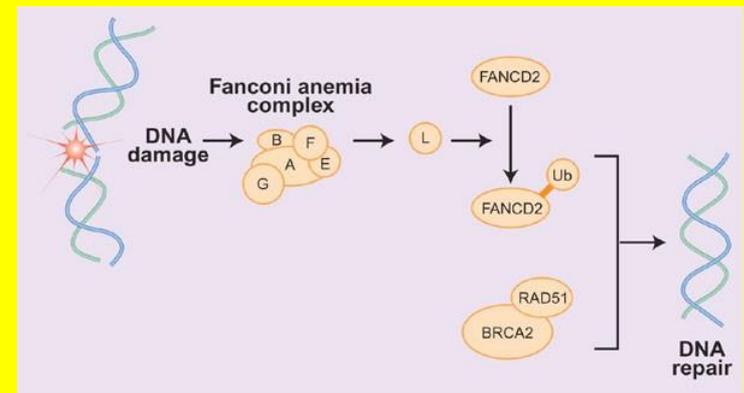
X-vázaná imunodeficience

- **Mikrotrombocytopenie** (ekzém, infekce)
- **Mutace WAS genu** - regulace polymerizaci aktinu
- **léčba** – podpurná – antibiotika, GCs, transfuze destiček, transplantace HSC



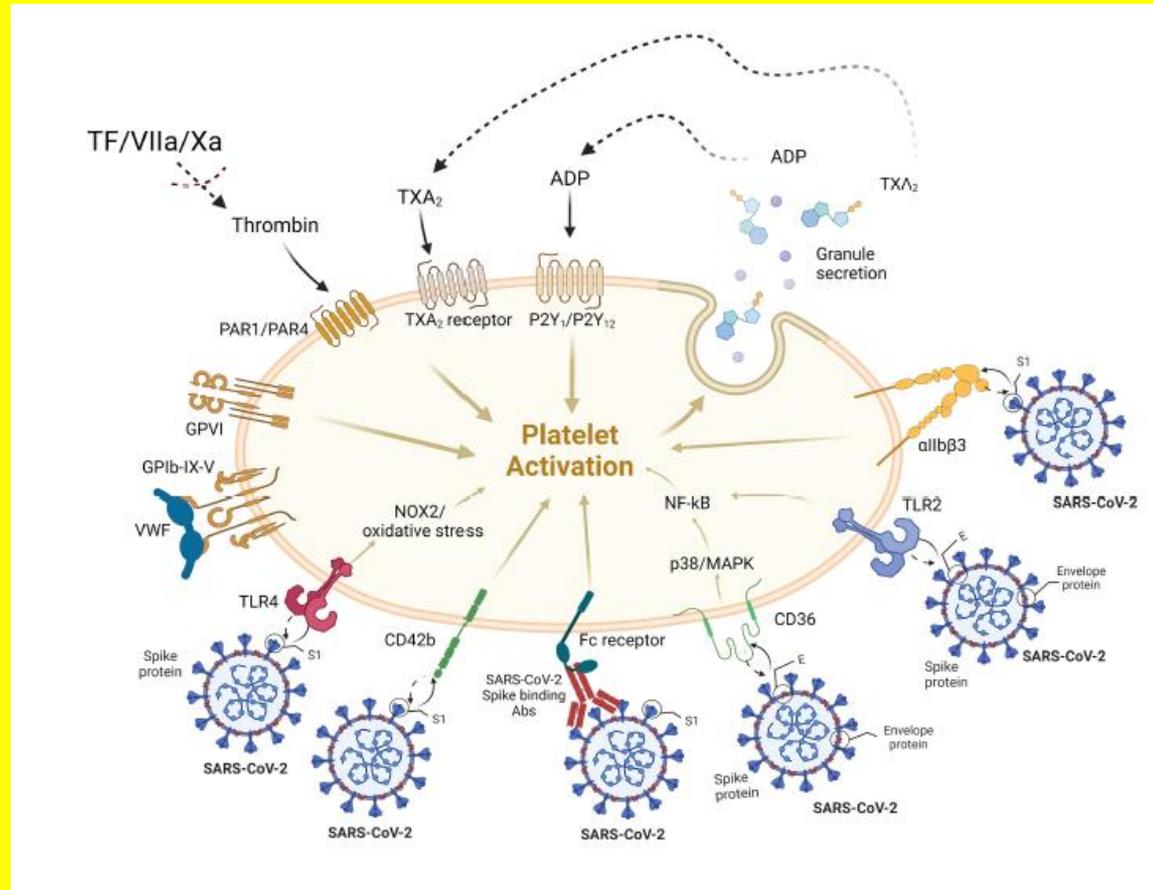
Fankoniho syndrom – autosomálně recesivní

- **Mutace v mnoha genech** (např. BRCA2)
→ defekt ve stabilitě DNA
- anemie, slabost, dyspnoe při námaze, purpura



Zvýšená destrukce destiček

- imunitní (Idiopatická thrombocytopenie purpura, lymfom, léčivy indukovaná – zlato, penicilin, heparin; infekční – HIV, malárie, COVID-19; posttransfuzní purpura, novorozenecká purpura)
- neimunitní (kardiopulmonární bypass, hypersplenismus, hemolytický uremický syndrom)



Numerické abnormality trombocytů

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

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

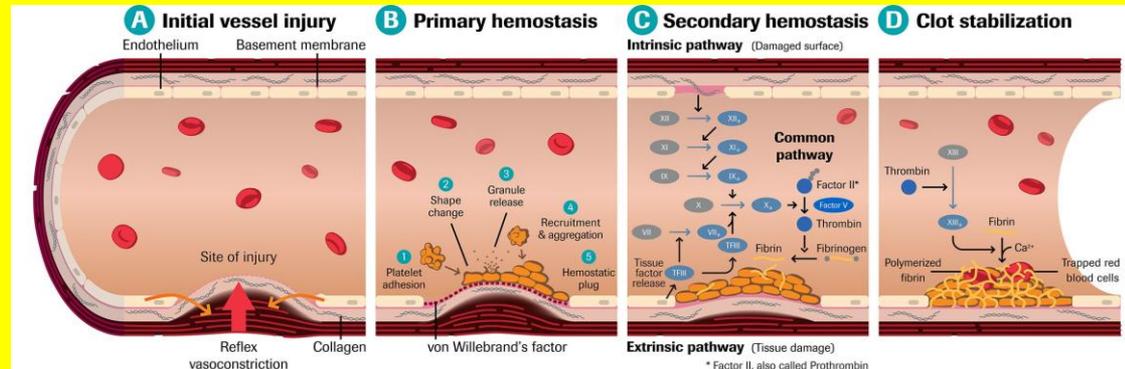


Trombofilie

= 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;

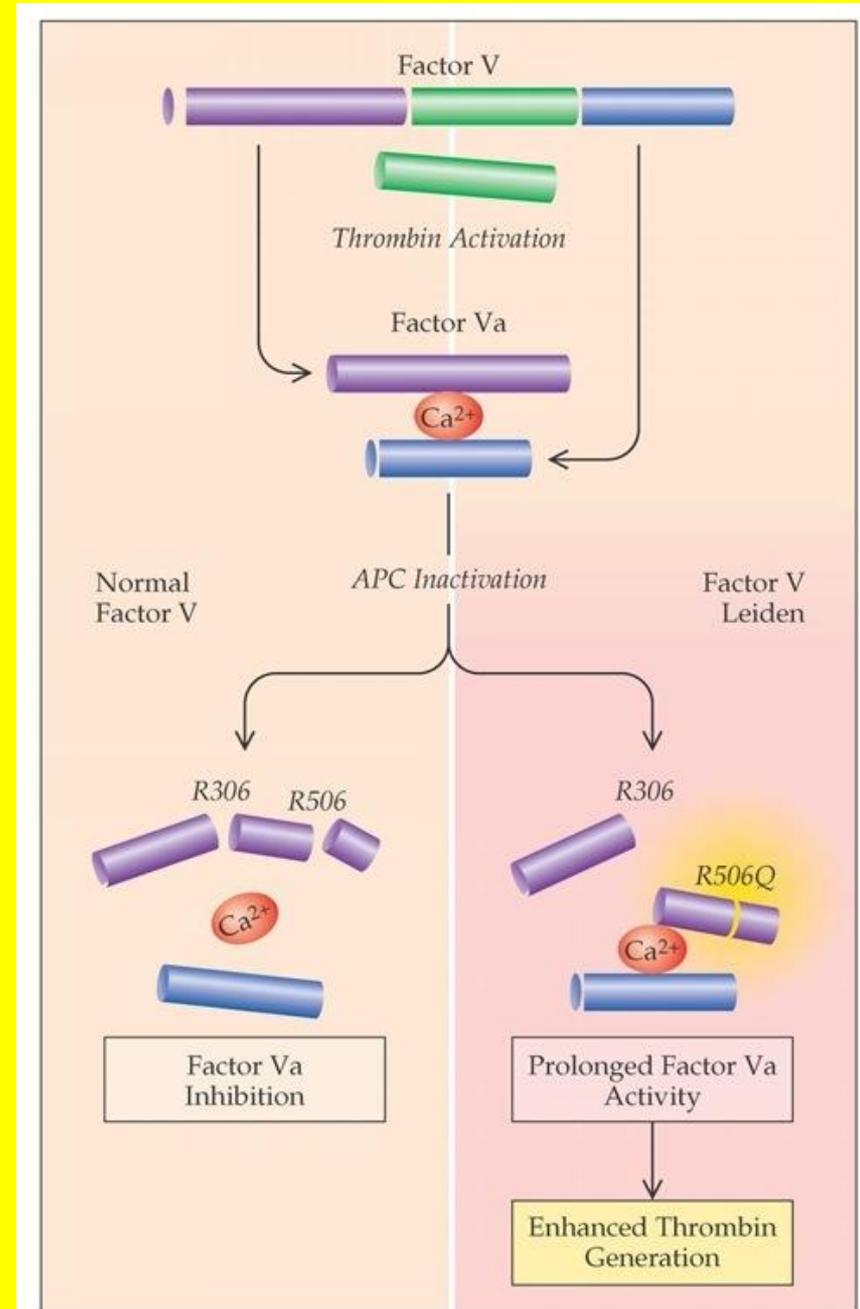
- pravděpodobnost **venosní embolie** zvýšena 2-6x (hetero-) a 50-100x (homozygoti)

- 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..