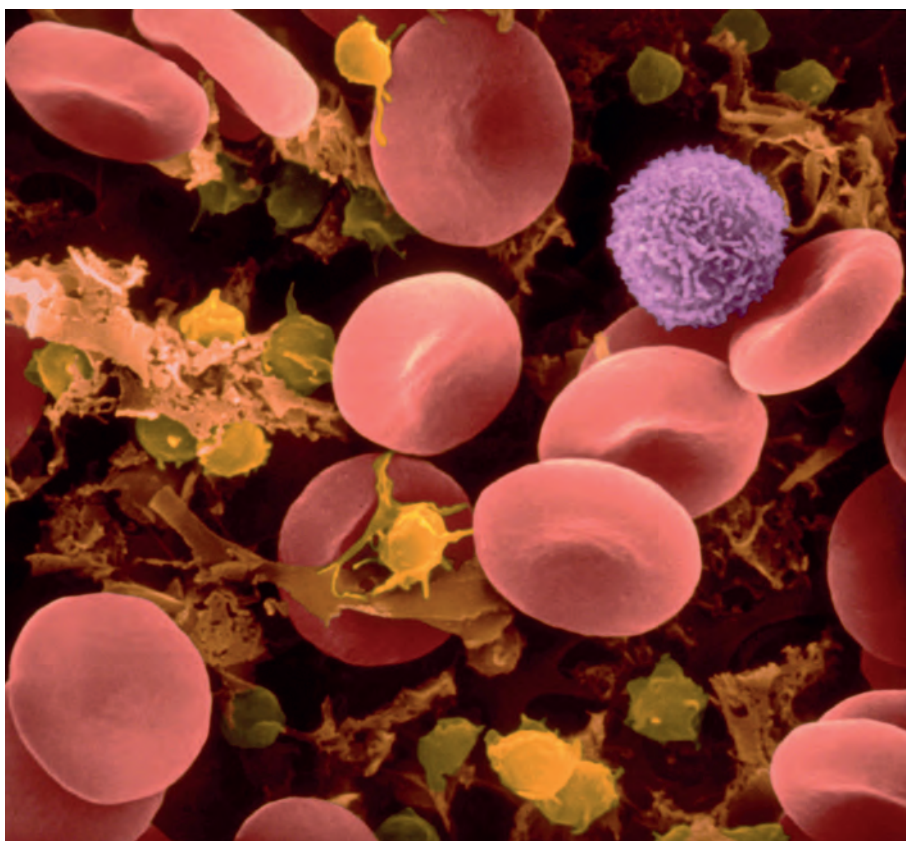


Miroslav Penka, Eva Tesařová a kolektiv

Hematologie a transfuzní lékařství I

Hematologie



Miroslav Penka, Eva Tesařová a kolektiv

Hematologie a transfuzní lékařství I

Hematologie

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být re-produkována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude trestně stíháno.

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., MUDr. Eva Tesařová a kolektiv

HEMATOLOGIE A TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ I

HEMATOLOGIE

Vedoucí autorského kolektivu:

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

Autorský kolektiv:

MUDr. Jan Blatný, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno*

RNDr. Ludmila Bourková, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Alena Buliková, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Mgr. Zbyněk Čech, oddělení klinické hematologie FN Brno

Mgr. Magdaléna Jelínková, oddělení klinické hematologie FN Brno*

MUDr. Jarmila Kisořová, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Zdeněk Kořístka, Ph.D., Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno

Mgr. Lucie Kovářová, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc., Ústav experimentální biologie PřF MU

MUDr. Miloslava Matýšková, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Jan Novotný, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc., oddělení klinické hematologie FN Brno

Doc. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Centrum molekulární biologie a genové terapie,

Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno

Bc. Markéta Slánská, oddělení klinické hematologie FN Brno*

MUDr. Petr Smejkal, Ph.D., oddělení klinické hematologie FN Brno

Bc. Irena Trnavská, oddělení klinické hematologie FN Brno

MUDr. Ondřej Zapletal, oddělení klinické hematologie FN Brno*

RNDr. Jiřina Závěřilová, oddělení klinické hematologie FN Brno

* nyní oddělení dětské hematologie FN Brno

Recenze:

Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.

Prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.

Vydání odborné knihy schválila Vědecká redakce nakladatelství Grada Publishing, a.s.

© Grada Publishing, a.s., 2011

Obrázky dodali autoři.

Cover Photo © fotobanka allphoto, 2011

Vydala Grada Publishing, a.s., U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 4577. publikaci

Odpovědná redaktorka PhDr. Alena Palčová

Sazba a zlom Jana Řeháková, DiS.

Počet stran 424 + 64 stran barevných příloh

1. vydání, Praha 2011

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a. s.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

ISBN 978-80-247-3459-0 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-7192-2 (elektronická verze ve formátu PDF)

ISBN 978-80-247-7193-9 (elektronická verze ve formátu EPUB)

Obsah

Předmluva	13
Poděkování	14
1 Fyziologie krvetvorby	15
1.1 Vznik a vývoj krvetvorby (<i>J. Novotný</i>)	15
1.2 Vývoj krevních buněk (<i>J. Novotný</i>)	15
1.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (erytropoéza) (<i>J. Novotný, M. Jelínková</i>)	17
1.4 Hemoglobin (<i>J. Novotný</i>)	20
1.5 Tvorba a vývoj bílých krvinek (<i>J. Novotný</i>)	21
1.6 Tvorba a vývoj trombocytů (<i>J. Novotný, M. Penka</i>)	27
1.7 Hodnocení (<i>J. Novotný</i>)	29
1.8 Klinický význam (<i>J. Novotný</i>)	29
2 Fyziologie krevního srážení	31
2.1 Cévy, cévní systém (<i>J. Novotný</i>)	31
2.1.1 Cévní stěna	31
2.1.2 Endotel	32
2.2 Primární hemostáza (<i>M. Penka</i>)	33
2.3 Systém plazmatických faktorů (<i>M. Matýšková, J. Zavřelová</i>)	36
2.3.1 Systém koagulačních faktorů	38
2.3.1.1 Koagulační faktory	38
2.3.1.2 Vlastní proces koagulace	43
2.3.2 Systém přirozených inhibitorů (<i>M. Matýšková, J. Zavřelová</i>)	45
2.3.2.1 Serpiny	46
2.3.2.2 Systém proteinu C	49
2.3.2.3 Kuniny	50
2.3.2.4 Metaloproteinázy	50
2.3.2.5 Nespecifické inhibitory	50
2.3.3 Fibrinolytický systém (<i>J. Novotný, M. Matýšková</i>)	51
2.3.3.1 Plazminogen, plazmin	52
2.3.3.2 Aktivátory plazminogenu	52
2.3.3.3 Inhibitory v systému fibrinolýzy	52
2.3.3.4 Průběh fibrinolýzy	54
2.3.3.5 Funkce fibrinolytického systému	55
3 Laboratorní diagnostika v hematologii	61
3.1 Morfologická vyšetření (<i>L. Bourková, M. Jelínková, I. Trnavská, M. Slánská</i>)	61
3.1.1 Hematologické analyzátory	61
3.1.1.1 Princip impedanční analýzy	61
3.1.1.2 Princip optické analýzy	61
3.1.1.3 Jiné analytické metody	62
3.1.2 Vyšetření na hematologických analyzátoch	62

3.1.2.1	Parametry krevního obrazu	62
3.1.2.2	Hodnocení krevního obrazu	62
3.1.2.3	Kontroly krevního obrazu	65
3.1.2.4	Stanovení počtu retikulocytů	66
3.1.3	Morfologická charakteristika hematopoetických buněk.....	67
3.1.3.1	Erytrocytární vývojová řada	67
3.1.3.2	Leukocytní vývojová řada	68
3.1.3.3	Megakaryocytární vývojová řada	71
3.1.4	Nátěry periferní krve a kostní dřeně	72
3.1.4.1	Zhotovení nátěrů	72
3.1.4.2	Barvení nátěrů	72
3.1.4.3	Hodnocení nátěrů periferní krve	72
3.1.4.4	Hodnocení nátěrů kostní dřeně	81
3.1.4.5	Kontrola kvality barvení nátěrů	81
3.2	Základní vyšetření pro hemolytické anémie (<i>L. Bourková, M. Jelínková</i>) ...	81
3.2.1	Obecné testy	81
3.2.1.1	Osmotická rezistence erytrocytů.....	81
3.2.1.2	Hemosiderin v moči	82
3.2.1.3	Volný hemoglobin v plazmě/séru	82
3.2.1.4	Test autohemolýzy	82
3.2.2	Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů	83
3.2.2.1	Stanovení fetálního hemoglobinu (HbF)	83
3.2.2.2	Stanovení hemoglobinu A ₂	83
3.2.2.3	Elektroforéza hemoglobinu	84
3.2.3	Testy na průkaz nedostatku enzymů	84
3.2.3.1	Barvení Heinzových tělísek	84
3.2.3.2	Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza	85
3.2.3.3	Pyruvátkináza	85
3.3	Cytochemická vyšetření (<i>L. Bourková, M. Jelínková, I. Trnavská, M. Slánská</i>).....	85
3.3.1	Barvení zásobního železa	86
3.3.2	Barvení neutrofilní alkalické fosfatázy	86
3.3.3	Barvení peroxidázy	87
3.3.4	Barvení sudanovou černí B.....	88
3.3.5	Barvení chloracetátesterázy	88
3.3.6	Barvení nespecifických esteráz (s blokadou fluoridem).....	88
3.3.7	PAS (periodic acid – Schiff)	89
3.3.8	Barvení kyselé fosfatázy (s rezistencí na kyselinu L vinnou).....	90
3.4	Vyšetření metodou klonálních kultivací (<i>L. Bourková</i>).....	90
3.5	Hemokoagulační laboratorní vyšetření (<i>J. Zavřelová, M. Jelínková, M. Matýšková</i>).....	91
3.5.1	„Bed-side“ testy	93
3.5.1.1	Doba srážlivosti plné krve (Lee White)	93
3.5.1.2	Trombelastograf.....	93
3.5.2	Primární hemostáza	95
3.5.2.1	Počet a morfologie trombocytů	95
3.5.2.2	Doba krvácení	95

3.5.2.3	Rezistence kapilár (Rumpelův-Leedův test)	96
3.5.2.4	Test konzumpce protrombinu	96
3.5.2.5	Vyšetření PFA-100	96
3.5.2.6	Agregace trombocytů	96
3.5.2.7	Vyšetření retrakce	97
3.5.2.8	Mikropartikule	97
3.5.3	Systém plazmatických koagulačních faktorů	98
3.5.3.1	Test konzumpce protrombinu	98
3.5.3.2	Protrombinový test (PT) – tromboplastinový test podle Quicka	98
3.5.3.3	Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)	99
3.5.3.4	Trombinový test (TČ, TT)	99
3.5.3.5	Reptilázový test (ReT)	100
3.5.3.6	Korekční testy	100
3.5.3.7	Trombin generační test (TGT, TGA)	100
3.5.3.8	Stanovení koncentrace fibrinogenu	100
3.5.3.9	Stanovení solubilních komplexů fibrinových monomerů (SFM)	101
3.5.3.10	Stanovení koagulačních faktorů	101
3.5.3.11	Stanovení faktoru XIII	102
3.5.4	Přirozené inhibitory	103
3.5.4.1	Vyšetření antitrombinu (AT)	103
3.5.4.2	ProC® Global	103
3.5.4.3	Vyšetření APC rezistence (APC-R)	104
3.5.4.4	Vyšetření proteinu C	105
3.5.4.5	Vyšetření proteinu S	105
3.5.5	Testy fibrinolytického systému	105
3.5.5.1	Euglobulinová fibrinolýza	105
3.5.5.2	Stanovení koncentrace fibrinogenu	106
3.5.5.3	Vyšetření FDP	106
3.5.5.4	Vyšetření D-dimerů	106
3.5.5.5	Stanovení solubilních komplexů fibrinových monomerů (SFM)	107
3.5.5.6	Stanovení α_2 -antiplasminu	107
3.5.5.7	Stanovení plazminogenu	107
3.5.5.8	Stanovení PAI-1	107
3.5.5.9	Stanovení tPA	107
3.5.5.10	Venookluzivní testy	108
3.5.6	Identifikace získaného inhibitoru	108
3.5.6.1	Korekční testy	108
3.5.6.2	Cirkulující antikoagulans	108
3.5.6.3	Kvantitativní průkaz specifického inhibitoru	108
3.5.6.4	Identifikace lupus antikoagulans	109
3.5.7	Molekulární markery	111
3.5.7.1	Markery aktivace endotelu	111
3.5.7.2	Markery aktivace trombocytů	111
3.5.7.3	Markery aktivace koagulace	111

3.5.7.4	Markery aktivace fibrinolýzy	111
3.5.8	Diagnostika von Willebrandovy choroby	111
3.5.8.1	Vyšetření koncentrace VWF (VWF:Ag)	112
3.5.8.2	Vyšetření funkční aktivity VWF	112
3.5.8.3	Diskriminační testy	112
3.5.8.4	Molekulární diagnostika	113
3.5.9	Diagnostika HIT	113
3.5.9.1	Funkční testy	113
3.5.9.2	Imunologické testy	113
3.5.10	Sledování léčby	114
3.5.10.1	Heparin	114
3.5.10.2	Pentasacharidy	114
3.5.10.3	Deriváty dikumarinu	114
3.5.10.4	Antitrombocytní léčba	114
3.5.10.5	Trombolýza	115
3.5.10.6	Substituční léčba	115
3.6	Flowcytometrické vyšetření (<i>L. Kovářová</i>)	115
3.6.1	Princip metody	115
3.6.2	Hodnocení	116
3.6.3	Imunofenotypizace	116
3.6.4	Příklady uplatnění v hematologii	117
3.6.4.1	Neonkologické indikace	117
3.6.4.2	Hematoonkologické indikace	117
3.7	Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření (<i>Š. Pospíšilová, Z. Čech, P. Kuglík, L. Kovářová</i>)	118
3.7.1	Genetická informace buňky	118
3.7.2	Změny genetické informace	120
3.7.3	Cytogenetické vyšetření	121
3.7.3.1	Metody klasické cytogenetiky: G pruhování	121
3.7.3.2	Metody molekulární cytogenetiky	122
3.7.4	Molekulárně biologické metody	124
3.7.4.1	Separace buněk, izolace nukleových kyselin	124
3.7.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	126
3.7.4.3	Metody detekce mutací	142
3.7.4.4	Metody analýzy proteinů	146
3.7.4.5	Genomika a proteomika	148
4	Fyziologické hodnoty krevního obrazu a koagulačních testů	159
4.1	Referenční meze krevního obrazu, diferenciálního počtu leukocytů a koagulačních testů u dospělých (<i>J. Kissová</i>)	159
4.2	Referenční meze krevního obrazu a koagulačních testů u dětí (<i>J. Blatný</i>) ...	160
5	Neonkologická hematologie	163
5.1	Anémie (chudokrevnost) (<i>A. Buliková, pediatrický dodatek S. Köhlerová</i>)	163
5.1.1	Anémie z poruchy tvorby erytrocytů	164
5.1.1.1	Anémie z poruchy syntézy hemoglobinu	164

5.1.1.2.	Anémie z poruchy syntézy DNA – megaloblastové anémie	175
5.1.1.3	Anémie ze selhání hemopoetických buněk – aplastické anémie	179
5.1.1.4	Anémie spojené s poruchou vyzrávání krvetvorby – dysplastické (dyserytropoetické) anémie.....	183
5.1.2	Anémie ze zvýšené ztráty erytrocytů	185
5.1.2.1	Korpuskulární hemolytické anémie	187
5.1.2.2	Extrakorpuskulární hemolytické anémie	203
5.1.3	Akutní posthemoragická anémie	207
5.2	Poruchy leukocytárního systému (<i>M. Penka</i>)	208
5.2.1	Kvantitativní poruchy leukocytárního systému	208
5.2.1.1	Změny počtu jednotlivých typů bílých krvinek	208
5.2.1.2	Choroby monocytárního makrofágového systému	214
5.2.2	Kvalitativní poruchy leukocytárního systému	219
5.2.2.1	Morfologické změny leukocytů	219
5.2.2.2	Funkční změny leukocytů	220
5.3	Poruchy primární hemostázy – poruchy krevního srážení z destičkových příčin (<i>M. Penka, M. Matýšková</i>)	222
5.3.1	Kvantitativní poruchy primární hemostázy	224
5.3.1.1	Trombocytopenie	224
5.3.1.2	Trombocytoza	232
5.3.2	Kvalitativní poruchy primární hemostázy – trombocytopatie	233
5.3.2.1	Vrozené trombocytopatie	234
5.3.2.2	Získané trombocytopatie	236
5.3.3	Substituční léčba krevními destičkami	239
5.3.4	Medikamentózní hemostyptická léčba	239
5.4	Vrozené krvácivé stavy (<i>P. Smejkal</i>)	241
5.4.1	Von Willebrandova choroba	241
5.4.2	Hemofilie	244
5.4.3	Vrozené defekty ostatních koagulačních faktorů	248
5.4.4	Kombinované defekty	250
5.4.5	Pediatrický dodatek (<i>J. Blatný</i>)	250
5.5	Trombofilie (<i>M. Matýšková</i>)	251
5.5.1	Pediatrický dodatek (<i>J. Blatný</i>)	255
5.6	Získané poruchy krevního srážení (<i>M. Matýšková, A. Buliková</i>)	256
5.6.1	Získané poruchy krevního srážení bez přítomnosti inhibitoru	257
5.6.1.1	Nedostatek vitamínu K	257
5.6.1.2	Jaterní postižení	258
5.6.1.3	Metabolický syndrom	258
5.6.1.4	Uremie	258
5.6.1.5	Nádorová onemocnění	259
5.6.1.6	Paraproteinemie	259
5.6.1.7	Trauma	260
5.6.1.8	Sepse	260
5.6.1.9	Virové infekce.....	261
5.6.1.10	Syndrom diseminované intravaskulární koagulace (DIC)	262
5.6.1.11	Biologické látky, např. hadí jedy	266

5.6.2	Získané poruchy krevního srážení z poruchy plazmatických faktorů vznikající na imunitním podkladě	266
5.6.2.1	Choroby provázené přítomností specifických autoprotilátek/inhibitorů	267
5.6.2.2	Nespecificky působící antikoagulantia	271
5.7	Sledování antitrombotické léčby (<i>M. Penka, J. Zavřelová</i>)	275
5.7.1	Antikoagulační léčba	275
5.7.2	Antitrombotická léčba heparinem	276
5.7.3	Antikoagulační léčba perorálními preparáty	277
5.7.4	Antiagregační léčba	277
5.7.5	Trombolytická léčba	278
5.7.6	Substituční léčba	278
6	Onkologická hematologie	289
6.1	Akutní leukemie (<i>A. Bulíková</i>)	291
6.1.1	Akutní myeloidní leukemie (AML)	293
6.1.1.1	Akutní myeloidní leukemie s rekurentní genetickou abnormitou (nejčastěji s balancovanou translokací či inverzí) ...	296
6.1.1.2	Akutní myeloidní leukemie spojená s dysplastickými změnami	301
6.1.1.3	Myeloidní neoplazie spojené s léčbou	302
6.1.1.4	Akutní myeloidní leukemie jinak neurčené	304
6.1.1.5	Myeloidní sarkomy	308
6.1.1.6	Myeloidní proliferace spojené s Downovým syndromem	308
6.1.1.7	Blastické neoplazie z plazmatických dendritických buněk	308
6.1.2	Akutní leukemie nejasného původu	310
6.1.3	Akutní lymfoblastické leukemie, respektive prekurzorové lymfoblastické neoplazie	311
6.1.3.1	B lymfoblastické leukemie/lymfomy jinak nespecifikované (B-ALL/LBL)	311
6.1.3.2	B lymfoblastické leukemie/lymfomy s rekurentní genetickou abnormitou	312
6.1.3.3	T lymfoblastické leukemie/lymfomy (T-ALL/LBL)	313
6.2	Myelodysplastický syndrom (MDS) (<i>J. Kissová</i>)	314
6.2.1	Refrakterní cytopenie s unilineární dysplazií (RCUD)	319
6.2.2	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	320
6.2.3	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD)	321
6.2.4	Refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)	321
6.2.5	Myelodysplastický syndrom s izolovanou delecí 5q	322
6.2.6	Myelodysplastický syndrom, neklasifikovatelný (MDS-U)	323
6.3	Myeloproliferativní neoplazie a myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie (<i>J. Kissová, M. Penka</i>)	323
6.3.1	Myeloproliferativní neoplazie (MPN)	323
6.3.1.1	Chronická myelogenní leukemie, BCR-ABL1 pozitivní (CML) ...	324
6.3.1.2	Chronická neutrofilní leukemie (CNL)	326
6.3.1.3	Pravá polycytemie (PV)	327
6.3.1.4	Primární myelofibróza (PMF)	329

6.3.1.5	Esenciální trombocytemie (ET)	331
6.3.1.6	Chronická eozinofilní leukemie blíže nespecifikovaná (CEL, NOS)	332
6.3.1.7	Mastocytóza	333
6.3.1.8	Myeloproliferativní neoplazie neklasifikovatelné (MPS-U)	333
6.3.2	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s eozinofilií a abnormalitami PDGFRA (platelet derived growth factor receptor α), PDGFRB (platelet derived growth factor receptor β) nebo FGFR1 (fibroblast growth factor receptor-1)	334
6.3.2.1	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s přestavbou genu PDGFRA ...	334
6.3.2.2	Myeloidní neoplazie s přestavbou genu PDGFRB	335
6.3.2.3	Myeloidní a lymfoidní neoplazie s abnormalitami FGFR1	335
6.3.3	Myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie (MDS/MPN)	336
6.3.3.1	Chronická myelomonocytární leukemie (CMML)	336
6.3.3.2	Atypická chronická myeloidní leukemie, BCR-ABL1 negativní (aCML)	338
6.3.3.3	Juvenilní myelomonocytární leukemie (JMML)	338
6.3.3.4	Myelodysplasticko/myeloproliferativní neoplazie neklasifikovatelné (MDS/MPN-U)	339
6.3.3.5	Provizorní jednotka WHO 2008: refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty a trombocytózou (RARS-T)	340
6.4	Lymfoproliferativní onemocnění (<i>A. Buliková</i>)	340
6.4.1	Neoplazie ze zralých B buněk	341
6.4.1.1	Chronická lymfatická leukemie/lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)	342
6.4.1.2	B prolymfocytární leukemie (B PLL)	344
6.4.1.3	Splenický lyfom z B buněk marginální zóny (SMZL)	344
6.4.1.4	Leukemie s vlasatými buňkami (HCL)	345
6.4.1.5	Lymfoplazmocytní lyfom/Waldenströmova makroglobulinemie	345
6.4.1.6	Malignity z plazmatických buněk	346
6.4.1.7	Folikulární lyfom (FL)	348
6.4.1.8	Lyfom z plášťových buněk (MCL)	349
6.4.1.9	Difuzní velkobuněčný B lyfom (DLBCL)	349
6.4.1.10	Burkittův lyfom (BL)	350
6.4.1.11	Ostatní lymfoproliferace ze zralých B lymfocytů	350
6.4.2	Malignity ze zralých T a NK buněk	351
6.4.2.1	Leukemie z velkých granulovaných lymfocytů (LGL-L)	352
6.4.2.2	Agresivní leukemie z NK buněk	352
6.4.2.3	T prolymfocytární leukemie (T-PLL)	353
6.4.2.4	Leukemie/lyfom z T buněk dospělých (HTLV pozitivní) (ATLL)	353
6.4.2.5	Mycosis fungoides (MF) a Sézaryho syndrom (SS)	354
6.4.2.6	Anaplastický velkobuněčný lyfom	354
6.4.2.7	Další zralé T/NK buněčné lymfoproliferace	355
6.4.3	Hodgkinovy lymfomy (HL)	355
6.4.3.1	Klasický Hodgkinův lyfom	356

6.4.3.2	Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů ...	356
6.5	Hematologické malignity u dětí (<i>O. Zapletal</i>).....	357
6.5.1	Leukemie	358
6.5.2	Lymfomy.....	361
6.6	Onkologická hematologie: transplantace hematopoetických buněk (<i>Z. Kořístek</i>)	361
6.6.1	Principy a indikace transplantací krvetvorby	363
6.6.2	Vyhledání dárce	365
6.6.3	Odběr krvetvorných buněk	366
6.6.4	Podání krvetvorných buněk	368
6.6.5	Časné potransplantační období	369
6.6.6	Období po obnově krvetvorby	370
Zkratky		375
Věcný rejstřík		387
Souhrn		419
Summary		421

Předmluva

Publikace „Hematologie a transfuzní lékařství“ je knihou, která je specificky zaměřená na hematologickou a v hematologii používanou laboratorní diagnostiku. Je účelově zpracována především pro obec zdravotních laborantů. Publikace však může mít pochopitelně širší využití u všech odborníků, laiků, kteří mohou z textů čerpat nové nebo upřesňující poznatky potřebné pro svoji specializaci.

Původně mělo dílo zahrnovat čistě hematologickou problematiku, velmi rychle se ale rozrostlo o příbuzný (a vlastně společný atestační) obor transfuzního lékařství a následně i o problematiku, která s hematologií v laboratorní diagnostice souvisí nebo ji významně doplňuje (molekulární biologie, imunocytologie apod.).

Autorský kolektiv byl sestaven z odborníků vlastního hematologického pracoviště ve FN Brno, kteří se jednotlivými segmenty hematologického zaměření zabývají, a z důvodu co nejširšího pojetí zahrnuje lékaře, ale i další specialisty především z laboratorních oborů, včetně zdravotních laborantů.

Publikace je sestavena ze dvou dílů – samostatné hematologické a samostatné transfuziologické části, každá z nich se svou obrazovou přílohou, ale s jednotným uspořádáním, aby mohly vytvořit dvoudílný kompaktní celek.

Úvodem jsou v hematologické části zpracovány kapitoly se spíše teoretickým a obecným zaměřením, pak následují kapitoly speciální problematiky zaměřené na problémové okruhy jednotlivých systémů, jak bývají v hematologii běžně členěny, včetně tabulek normálních hodnot. Samostatnou přílohu tvoří obrázky významnějších nebo instruktivních nálezů, jejich seznam, seznam zkratk a rejstřík.

I když si jsme vědomi, že ve věku elektronického zpracování textů nemá již knižní podoba publikací svoje dominantní místo, zůstává stále pohodovým zdrojem informací. Je stále dost v oblibě u řady čtenářů, proto jsme se rozhodli ji napsat. Věříme, že své čtenáře nezklameme a přineseme jim to, co hledají a očekávají. Jsme si zároveň vědomi nutnosti inovace ve vcelku časovém horizontu a pokusíme se tento požadavek takového zpracování rovněž naplnit.

Čtenářům přejeme, aby jim naše práce – ať již jakkoliv – prospěla, a svým spoluautorům děkují za úsilí a snahu přispět čtenářům ke zmíněnému prospěchu.

Miroslav Penka

Poděkování

Za pomoc při zpracování obrazové dokumentace děkujeme zdravotním laborantkám OKH FN Brno – paní Jaroslavě Hoblové, Monice Antošové, Libuši Antošové.

Autoři kapitoly 3.7 děkují Mgr. Petru Dobešovi z centra molekulární biologie a genové terapie Interní hematoonkologické kliniky FN Brno za pomoc při technické realizaci obrázků 3.39, 3.40, 3.41, 3.42, 3.43, 3.44, 3.50, 3.51, 3.58, 3.62, 3.63, 3.64, 3.65.

Naše poděkování patří i recenzentům prof. MUDr. Ladislavu Chrobákovi, CSc., a doc. RNDr. Miroslavu Peckovi, CSc., za jejich pečlivou a precizní práci, kterou s prostudováním naší publikace měli, a za jejich kritickou shovívavost při zpracování recenze.

Poděkování patří také sponzorům, bez jejichž příspěvní a pomoci by publikace možná sice vznikla, ale byla by neprodejná.

Poděkování patří i všem spoluautorům, kteří se na publikaci podíleli.

1 Fyziologie krvetvorby

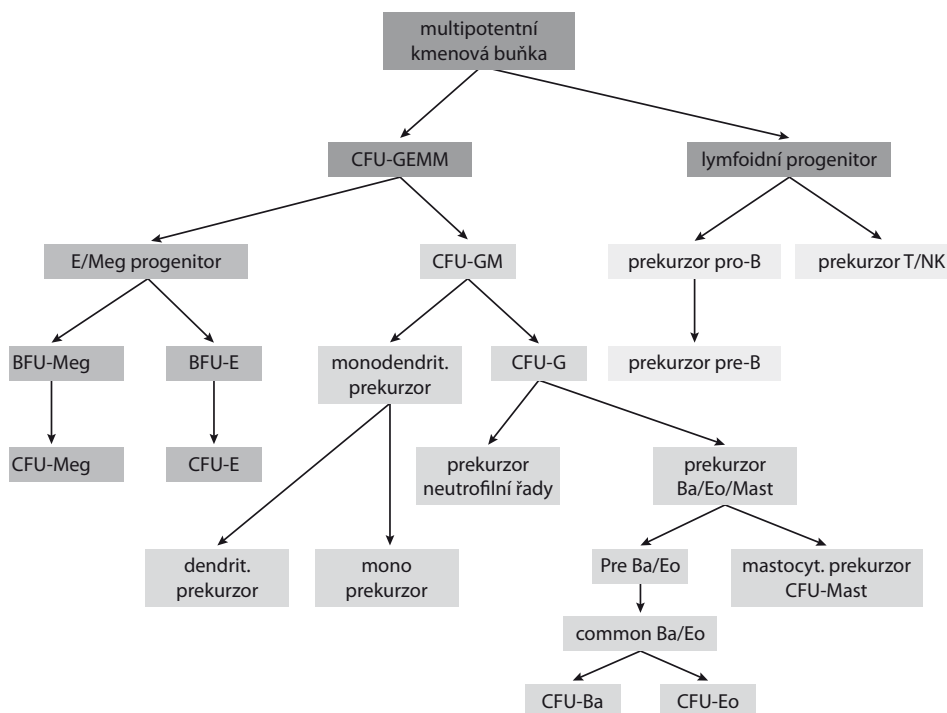
1.1 Vznik a vývoj krvetvorby

Krvetvorba (hemopoéza nebo hematopoéza) je v období **embryonálního vývoje** lokalizována nejprve do oblasti žloutkového vaku, posléze tento úkol přejímají játra a slezina a konečně pak kostní dřev. Za patologických stavů (hemolýzy, myeloproliferativní onemocnění apod.) může dojít k opětovné aktivaci hemopoézy v játrech a slezině a dokonce i v mízních uzlinách byla popsána nelymfoidní hemopoetická aktivita (zvláště u myeloproliferací). Hemopoéza vznikající v oblasti žloutkového vaku z embryonálních kmenových buněk diferencujících se v kmenové buňky krvetvorby představuje mezoblastové období, začínající asi 14.–20. den embryonálního vývoje. Vytvářejí se ostrůvky primitivních hemopoetických buněk, lemovaných endoteliemi (area vasculosa). Asi ve 4. týdnu života se primitivní cévy žloutkového vaku propojí s cévním systémem embrya. Mezoblastové období trvá asi do 10. týdne nitroděložního života, zároveň se po 6. týdnu vývoje objevuje krvetvorba v mezenchymu mezi hepatocyty a posléze i ve slezině (hepatolienální období). Od 20. týdne nitroděložního vývoje se krvetvorba přesunuje do kostní dřev. Hlavním **hemopoetickým orgánem je kostní dřev**, je zde přítomen „pool“ (anglicky zásoba, termín se v odborném tisku o kmenových buňkách běžně používá) **hemopoetických kmenových buněk** – pluripotentní kmenová buňka pro všechny řady nelymfoidní i lymfoidní, kmenová buňka pro lymfoidní řadu, multipotentní kmenová buňka pro všechny nelymfoidní řady CFU-GEMM (colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, monocytes/macrophages, megakaryocytes), zralější kmenové buňky v podobě společných prekurzorů pro erytroidní a megakaryocytární linii a pro granulocytární/monocytární linii. Primitivní i vyzrálší kmenové buňky podléhají tzv. **asymetrickému dělení**, kdy jedna z dceřiných buněk je identická s mateřskou kmenovou buňkou (self renewal – samoobnovování kmenových buněk) a druhá se dále diferencuje.

1.2 Vývoj krevních buněk

Multipotentní (totipotentní) kmenová buňka jednak v kostní dřevě udržuje relativně stálý počet těchto prekurzorů (self renewal) a na druhé straně dává vzniknout zralším kmenovým buňkám, tzv. **committed cells**. Každá krvetvorná řada pak vychází z kmenových buněk pro jednotlivé linie. Eozinofilní a bazofilní řada a navíc i vývoj tkáňových bazofilů vychází ze specifických CFU (CFU-Eo, CFU-Ba a CFU-mast). Lymfoidní řada pak vychází ze společné kmenové buňky pro B a T řadu a NK cells (natural killer). Vývoj krvetvorby v časných fázích (nezralé kmenové buňky) zachycuje obrázek 1.1. Hemopoéza je pod kontrolu řady interleukinů (IL), CSF (colony-stimulating factors) a navíc zde hrají roli interakce kmenových buněk se stromatem hemopoetických orgánů – jde o tzv. hemopoetické induktivní mikroprostředí (HIM). Buněčné elementy HIM tvoří monocyty/makrofágy, endotelie, retikulární buňky aj. umístěné v extracelulární matrix. Teprve souhrou všech těchto faktorů

je umožněna normální hemopoéza. Poruchy na úrovni kmenových buněk a/nebo HIM mohou vyústit v nejrůznější patologické stavy (dřeňové útlumy, myelofibrózy, myelodysplazie, akutní hemoblastózy apod.). Výzkum v oblasti kmenových buněk (a nejen hemopoetických) velmi pokročil a dotýká se jak otázek maligního bujení, tak možnosti náhrady tkání (v našem případě hematopoézy) vhodně manipulovanými kmenovými prekurzory.



Obr. 1.1 Časný vývoj krvetvorby

Na obrázku je znázorněna časná hematopoéza. Jednotlivé prekurzorové buňky nejsou identifikovatelné světelnou mikroskopií. Ze znázorněných prekurzorů se pak diferencují zralejší elementy v podobě proerytroblastů, promegakaryoblastů, myeloblastů a elementů T, B nebo nulových lymfocytů. Rovněž jsou znázorněna časná stadia diferenciace mastocytární a dendritické linie. Kmenové buňky se dělí asymetricky – v jednu identickou kmenovou buňku (self renewal) a v committed cell (buňku s další diferenciací). Tak je udržována zásoba (pool) kmenových buněk i diferenciace hematopoézy.

CFU – colony forming unit, BFU – burst forming unit, GEMM – granulocytární, erytroidní/megakaryocytární, monocytární, GM – granulocytární a monocytární, T/NK – T a NK lymfocyty, Meg – megakaryocytární

Kmenové buňky hematopoézy lze studovat řadou metod, nejpřínosnějšími jsou různé kultivační metody in vitro, kdy se využívá jednak různě komponovaných kultivačních médií, a pak i sledování odpovědi na nejrůznější růstové faktory a/nebo jejich kombinace. Každý růstový faktor se váže na specifické receptory, exprimované na povrchu různých hematopoetických prekurzorů, a tím je dána specifčnost jeho působení. Mezi **růstové faktory hemopoézy** patří interleukiny (IL) – IL-2, 3, 4, 5, 6,

7, 9, 11, 12, 15, dále erythropoetin (EPO), trombopoetin (TPO), GM-CSF (granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor), G-CSF (granulocytární kolonie stimulující faktor) c-kit ligand neboli stem cell factor (SCF) a řada dalších. Některé z růstových faktorů se již vyrábějí rekombinantní technologií (vnesením genů kódujících tyto faktory, do vhodných buněk v tkáňových kulturách) a jsou užívány léčebně (např. EPO, TPO a jeho analoga, G-CSF).

Kmenové buňky, kultivované ve vhodných médiích, se mohou dále zkoumat na ultramikroskopické úrovni, průtokovou cytometrií s eventuálním cell-sortingem (přístrojovým sběrem zvolených elementů), transfekcí do vhodných linií pokusných zvířat, sledováním aktivace různých genů detekcí specifických mRNA (messenger ribonukleových kyselin), multi-array analýzou (sledováním aktivace mnoha genů najednou) apod. Jisté struktury na povrchu (v buněčné membráně) jednotlivých řád nám mohou pomoci v detekci diferenciaci těchto elementů. Jsou to nejčastěji tzv. **CD znaky** (clusters of differentiation). Například CD2 je znakem T lymfocytů, CD19 B lymfocytů, CD14 monocytů, CD15 granulocytů, CD16 NK buněk a glykoforin A erytroidní řady (CD235a). Pro kmenové buňky je charakteristickým znakem CD34. Více jak 99 % dřevných elementů je CD34 negativních, avšak jen určitá část CD34 pozitivních buněk představuje nezralé kmenové buňky. O CD znacích blíže viz kapitola o flow cytometrii.

Mechanismy vedoucí jednak k nutnému samoobnovování poolu multipotentních buněk a na druhé straně vedoucí k diferenciaci v „committed cells“ jsou jen částečně známy a jejich přesnějším poznáním by mohlo dojít k pokroku v diagnostice i léčbě např. v oblasti hemoblastóz nebo dřevných útluhů.

V současnosti zaznamenáváme výrazný posun v poznacích o hierarchii krvetvorby, např. se zdá, že kmenové buňky pro makrofágy a dendritické buňky lze detekovat v časných fázích lymfoidního (nemyeloidního) vývoje.

1.3 Tvorba a vývoj červených krvinek (erytropoéza)

Erytropoéza vychází ze společné linie (kmenové buňky) s megakaryopoézou a dále samostatně postupuje od BFU-E (burst forming unit-erythropoiesis) přes CFU-E k již morfologicky diferencovatelným proerytroblastům. Další maturace pak probíhá přes bazofilní, polychromatofilní a oxyfilní erytroblasty k bezjaderným retikulytům, které jsou vyplavovány z kostní dřevě do periferní krve. Jaderné erytroblasty se v periferní krvi objevují pouze za patologických stavů (vystupňovaná hemolýza, velké ztráty krve, akutní i chronické hemoblastózy, metastázy do kostní dřevě apod.). Celkově jsou erytropoéza a zralé erytrocyty označovány pojmem **erytron**. V erytronu je udržována dynamická rovnováha mezi zánikem a tvorbou červených krvinek. Hlavním regulačním proteinem erytronu je v ledvinách produkovaný **erythropoetin (EPO)**. Za patologických okolností může nerovnováha v tomto systému vést k anémii nebo erytrocytóze. Nejčasnější identifikovanou buňkou erytronu je tzv. **BFU-E (burst forming unit-erythroid)**. Tyto erytroidní prekursory při kultivaci in vitro vytvářejí velké kolonie (proto burst = výbuch) dobře hemoglobinizovaných erytroblastů. Zpočátku je tento růst nezávislý na erythropoetinu, ale je zcela závislý na IL-3, později směsi cytokinů EPO, TPO, GM-CSF a stem cell faktoru. Detaily regulace proliferace a diferenciaci BFU-E nejsou přesně známy. Morfologicky

se jedná o velmi nezralé blasty, mnohdy s pseudopodickými výběžky, vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem a výraznými nukleoly. BFU-E se postupně diferencují v **CFU-E (colony forming unit-erythroid)**. Jsou to poněkud zralejší blasty, jejichž proliferace je plně závislá na EPO, a nesou na svém povrchu četné receptory pro EPO. Při pokusech na zvířatech vedla anemizace k expanzi počtu CFU-E a naopak polytransfúze k výrazné redukci CFU-E paralelně s koncentrací EPO v krvi. **Proerythroblast** je první identifikovatelnou buňkou pomocí světelné mikroskopie. Proerythroblast má asi 14–20 µm v průměru, jádro s relativně hrubším chromatinem (oproti myeloblastům a lymfoblastům), v cytoplazmně jsou ultramikroskopicky prokazovány známky počínající syntézy hemoglobinu, četné ribozomy a počínající struktury Golgiho komplexu. V buňkách je přítomen **ferritin** jak difúzně, tak i v podobě organel, nazývaných **siderozomy**. Cytoplazma proerythroblastu je sytě bazofilní, někdy vytváří pseudopodie, někdy s projasněním u jádra (Golgiho komplex) a jádro tvoří více než 80 % plochy buňky. **Bazofilní erythroblast** je poněkud menší než proerythroblast (cca 12–17 µm), vykazuje zmenšující se nukleo/cytoplazmatický poměr a hrubší strukturu jádra většinou bez nukleolů. Cytoplazma zůstává sytě bazofilní, i když tato bazofilie může již být méně nápadná. S pokračující diferenciací dochází k progresivnímu zmenšování a pyknotizaci jader erythroblastů a postupné změně barvy cytoplazmy od bazofilní (sytě modrá) přes polychromatofilní (špinavě šedivá) až po růžovou při barvení podle Maye-Gruenwalda-Giemsy. Změna barvy cytoplazmy souvisí s nárůstem hemoglobinu a redukcí ribozomálních komplexů ve zrajících erythroblastech. **Polychromatofilní erythroblasty** jsou posledním vývojovým stupněm erytropoézy schopným dělení. Jádro je již výrazně kondenzováno a cytoplazma špinavě šedá. Velikost této buňky se pohybuje v rozmezí 12–15 µm. **Ortochromní (také oxyfilní) erythroblasty** již nejsou schopny dělení, jádro je silně pyknotické, malé a již v něm neprobíhá syntéza deoxyribonukleových kyselin (DNA). Oxyfilní (ortochromní) erythroblasty jsou nejmenšími elementy erytropoézy (8–12 µm), jejich velikost se téměř blíží zralým erytrocytům. Ortochromní erythroblasty však nejsou plně hemoglobinizovány, a proto jejich oxyfilie nedosahuje intenzity, jakou vidíme u zralých erytrocytů. Extruzí jádra, což je aktivní proces za účasti aktinových filament, se oxyfilní erythroblast dále vyvíjí v retikulocyty. **Retikulocyty** jsou poněkud větší než normální erytrocyty (normocyty) a mají nepravidelný tvar, což je zvláště dobře detekovatelné ultramikroskopicky. Retikulocyty mají zachovanou jistou možnost aktivního pohybu, což se považuje za důležité při přechodu těchto buněk přes endoteliální póry dřeňových sinusoid do periferní krve. V retikulocytech ještě probíhá syntéza hemoglobinu a některé další metabolické pochody, které nejsou prokazatelné ve zralých erytrocytech zvaných normocyty. Některými supravitálními barveními (např. brilliant kresylovou modří – blíže viz příslušná kapitola) lze ve světelné mikroskopii zobrazit v retikulocyty přítomnou ribozomální RNA jako tzv. „substantia reticulofilamentosa“. V retikulocyty však postupně dochází k degradaci RNA ribonukleázami a jinými enzymy, které jsou například blokovány při otravě olovem. RNA bloky jsou pak viditelné při normálním barvení jako bazofilní tečkování (můžeme je však vidět i u řady jiných závažných poruch krve-tvorby). Normální retikulocyty vykazují asi o 20 % větší objem než normocyty. **Normocyty** jsou bikonkávní bezjaderné buňky, nemající vlastní proteosyntézu. Měří asi 7 µm v průměru a vykazují vysoký poměr povrch/objem, což je výhodné pro jejich hlavní funkci – přenášet do tkání kyslík. Pro normální erytropoézu jsou nezbytnou

nutností **aminokyselin, železo, vitaminy B₁₂, B₆ a kyselina listová** a některé další stopové prvky. Při těžké podvýživě (hladovění, mentální anorexie, kachexie) tak rezultuje anémie z kombinovaného deficitu uvedených látek.

Železo je biogenní prvek, který se vyskytuje prakticky ve všech živých organizmech. Najdeme je v jednobuněčných organizmech (kvasinky, bakterie), v buňkách rostlin a v tělech bezobratlých i obratlovců až po savce. Je tomu tak proto, že atom železa je schopen velmi snadno vázat i uvolňovat elektron, a tak měnit své mocenství z dvojmocné feroformy na trojmocnou feriformu a naopak. Železo se ze všech biogenních kovů vyskytuje v organismu v nejvyšším množství, což obnáší asi 35 mg/kg u žen a 45 mg/kg u mužů. Největší podíl celkového množství železa v organismu je obsažen v hemoglobinu (60–70 %), asi 10 % je součástí myoglobinu, cytochromů a jiných enzymů, asi 20–30 % tvoří zásobní pool v podobě vazby na feritiny, méně než 1 % je obsaženo v cirkulujícím poolu v krvi. Vedle své nejznámější funkce transportu kyslíku plní železo i řadu dalších vitálních funkcí – je nutné pro syntézu nukleových kyselin (DNA i RNA), syntézu řady proteinů, účastní se řízení buněčné proliferace a diferenciace a apoptózy, je nutné pro syntézu myelinu a formování dendritů neuronů, což se odráží v ovlivňování pochodů učení a paměti. Pozornost řady vědeckých týmů je upřena na úlohu železa v procesech stárnutí tkání, neurodegenerace, maligního bujení, aterosklerózy a role železa v imunitním systému. Železo je v krevním proudě vázáno na bílkoviny. Z největší části jde o transportní protein **transferin**. Molekula transferinu váže dva atomy trojmocného železa Fe⁺⁺⁺. Denně dochází k obrotu asi 25 mg železa v krvi. Za normálních okolností je transferin saturován pouze asi ze třetiny své vazebné kapacity. Při nedostatku železa saturace transferinu klesá, naopak při přetížení organismu železem stoupá. Při rozvoji anémií chronických onemocnění dochází nejčastěji k poklesu koncentrace sérového železa i transferinu (transferin je negativní reaktant akutní fáze), takže saturace transferinu může být normální nebo mírně snížená (záleží na vzájemném poměru poklesu železa i transferinu). Molekula transferinu obsahující železo má vysokou afinitu ke specializovaným receptorům, lokalizovaným na buněčných membránách s nejhustší expresí na buňkách hemopoézy. Byly již popsány 2 typy **transferinových receptorů (TfR) – TfR a TfR2**.

Zásobní železo je v buňkách uloženo ve formě **feritinu**. U většiny obratlovců je feritin tvořen dvěma typy podjednotek, označovaných jako L (light, liver) a H (heavy, heart) feritin. Tyto podjednotky se organizují do schránek, z nichž každá je složena ze čtyřadvaceti molekul L nebo H feritinu. Feritinové schránky jsou schopné každá pojmout několik tisíc atomů Fe⁺⁺⁺. Jednotlivé feritiny se od sebe liší zastoupením L a H podjednotek a jsou označovány jako **izoferitiny**. H feritin je feroxidáza a jeho aktivita usnadňuje rychlou inkorporaci atomu Fe do feritinových komplexů a na druhé straně je toto železo rychleji z feritinu uvolňováno. Izoferitiny, bohaté na L podjednotky, přijímají Fe pomaleji a déle jej skladují. Jednotlivé tkáně a orgány se liší zastoupením exprese a translace mRNA pro L a H podjednotky feritinu. **TfR a feritin představují dva hlavní proteiny regulace buněčné homeostázy železa**. Při **negativní bilanci železa** (poruchy vstřebávání, chronické krevní ztráty, gravidita apod.) se postupně rozvíjí karence tohoto prvku. Nejprve dochází k depleci železa v zásobách monocyto-makrofágového systému (MMS), pak klesá saturace transferinu pod 15 % jeho celkové vazebné kapacity a současně stoupá i koncentrace transferinu v krvi. Po vyčerpání zásob železa v MMS i snížení jeho obsahu

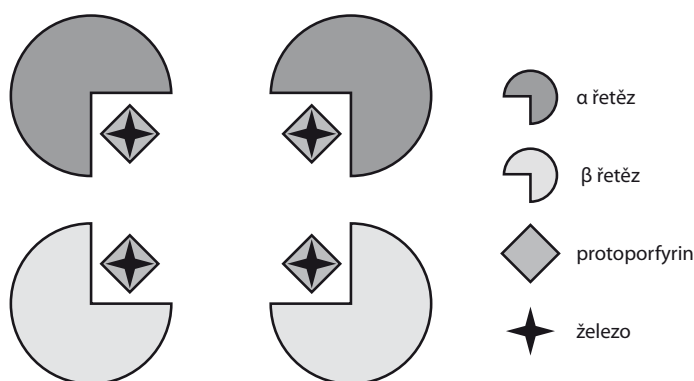
v krvi se rozvíjí hypochromní mikrocytární anémie, kterou je však nutno odlišit hlavně od anémií chronických onemocnění, hemoglobinopatií a myelodysplastických syndromů, což nebývá ve většině případu příliš obtížné, ale občas bývá diferenciální diagnostika svízelná. Při nedostatku pyridoxinu dochází k poruše syntézy hemu s obrazem mírné hypochromní anémie. Rovněž vzácný nedostatek mědi má také za následek vadnou syntézu hemu s hypochromií. Při nedostatku vitamínu B₁₂ a/nebo kyseliny listové vidáváme obraz makrocytární až megaloblastické anémie, v diferenciální diagnostice těchto stavů nutno především odlišit myelodysplastické syndromy. Makrocytární anémie u chronických onemocnění jater nemívá většinou patrnou výraznější ovalocytózu, která naopak přichází u MDS a perniciózní anémie (vše podrobněji v kapitole zabývající se chudokrevností).

1.4 Hemoglobin

Krevní barvivo hemoglobin tvoří více než 90 % váhy normocyty a aktivace globinových genů je pozorována již na úrovni časné BFU-E. Hemoglobin je utvářen dvěma páry globinových řetězců (tetramer), čtyřmi tetrapyrolovými prstenci v podobě protoporfyrinu IX a čtyřmi centrálně uloženými atomy dvojmocného železa. Atom železa je vázán ve středu každého tetrapyrolového kruhu (obr. 1.2). Protoporfyrin s centrálně umístěným atomem železa nazýváme hem. Globin je tvořen dvěma páry řetězců – asi 97 % představuje tetrametr $\alpha_2\beta_2$ (HbA₁), maximálně 3,2 % představuje tetrametr $\alpha_2\delta_2$ (HbA₂) a pouze stopy připadají na HbF ($\beta_2\gamma_2$) – fetální hemoglobin. Struktura hemoglobinu se mění během embryonálního, fetálního a postnatálního života. **Embryonální a fetální hemoglobiny** vykazují vyšší aktivitu ke kyslíku než adultní hemoglobiny (snadnější přebírání kyslíku z mateřské krve). Geny pro globinové řetězce jsou lokalizovány na chromozomech 16 (tzv. α -like cluster) a 11 (β -like cluster). Podrobnější popis překračuje rámec této učebnice, lze jen shrnout, že v dospělosti jsou aktivní β , α a δ geny a že poruchy v aktivaci jednotlivých genů (poruchy struktury genů, poruchy transkripce a/nebo translace) vidáváme u talasemií a méně často u myeloproliferací a myelodysplazií. Talasemie se endemicky vyskytují v oblastech kolem Středozemního moře a v jihovýchodní Asii. U bílé rasy jde nejčastěji o **β talasemii** s poruchami syntézy β řetězců. V erytrocytech klesá koncentrace HbA₁ a zvyšuje se hladina HbA₂ a HbF. Podle stupně postižení hovoříme o talasemii minima, minor a maior. Společným znakem talasemií je pokles koncentrace hemoglobinu, hypochromie a nápadně snížený střední objem červených krvinek, v krevním nátěru lze nalézt různý počet **terčovitých erytrocytů (tzv. target cells)**. V diferenciální diagnóze je nutno vyloučit především anémie z nedostatku železa a v endemických oblastech i jiné hemoglobinopatie (HbS, HbE, HbC, HbD aj.). Striktně vzato nepatří talasemie mezi klasické hemoglobinopatie, jelikož jde většinou o kvantitativní (snížení syntézy) a ne kvalitativní poruchu (patologické hemoglobiny s odlišnou strukturou). Nejčastějšími **hemoglobinopatiemi v užším smyslu slova** jsou hemoglobiny S, C, D a E (blíže v kapitole věnované anémiím).

Syntéza tetrapyrolového kruhu začíná aktivací genu pro δ aminolevulonátsyntázu (ALAS). Z δ aminolevulonové kyseliny a porfobilinogenu je syntetizován uroporfyrinogen – izomery I a III – jde již o tetrapyrolový kruh. Přes koproporfyrinogen III a protoporfyrinogen III je syntetizován finální produkt – protoporfyrin IX.

Enzym hemsyntetáza pak inkorporuje do protoporfyrinu IX atom dvojmočného železa a vzniká tak hem. **Hem** se mimo své hlavní funkce přenašeče kyslíku v hemoglobinu vyskytuje např. i v cytochromech, peroxidázách a myoglobinu. Hem plní i regulační funkce – stimuluje syntézu globinových řetězců i jiných proteinů. Při poklesu lokální koncentrace hemu dochází k útlumu syntézy těchto bílkovin. Při vrozených a/nebo získaných poruchách funkce enzymů syntetizujících jednotlivé porfyriny vznikají tzv. **porfyrie**.



Obr. 1.2 Schéma molekuly hemoglobinu

Hemoglobin se skládá ze dvou párů globinových řetězců, čtyř cyklických protoporfyrinů IX a čtyř atomů dvojmočného železa, umístěných v centru každého protoporfyrinu. Více než 97,5 % hemoglobinu dospělých představuje hemoglobin HbA₁, skládající se ze dvou řetězců α a ze dvou řetězců β (α₂β₂). Za normálních okolností dosahuje minoritní hemoglobin A₂ (α₂δ₂) maximálně 3,3 % celkového cirkulujícího hemoglobinu. Při poruše syntézy β řetězců (β talasemie) se zvyšuje podíl HbA₂ a HbF (α₂γ₂) v cirkulaci.

1.5 Tvorba a vývoj bílých krvinek

Granulopoéza a monocytopoéza vycházejí ze **společné kmenové buňky CFU-GM**, ze které se pak diferencují kmenové buňky pro granulopoézu (CFU-G) a monodendritický prekurzor s další diferenciací v monocyto-makrofágovou linii (CFU-M) a dendritický prekurzor (obr. 1.1). Pomocí morfologických, cytochemických, ultrastrukturálních a imunologických metod můžeme odlišit myeloblasty od monoblastů. Myeloblasty se dále diferencují v promyelocyty, nezralé a zralé myelocyty, metamyelocyty, tyčky a segmentované neutrofile. Monoblasty se diferencují v promonocyty a zralé monocyty/makrofágy.

Morfologicky lze v kostní dřeni identifikovat prekurzorové buňky bílé řady až ve stadiu **myeloblastů**. Jedná se o cca 10–18 μm velké nezralé elementy s vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem s jemným jaderným chromatinem s 2–5 prominujícími nukleoly. Jádru myeloblastu má zpravidla jemnější strukturu než jádro proerythroblastu a cytoplazma je méně bazofilní. Jádru se jeví síťovitě nebo vláknitě uspořádané, někdy má chromatin podobu jemných krupiček a je uloženo centrálně. V cytoplazmě myeloblastů mohou být detekována nečtetná primární (azurofilní) granula, která vykazují pozitivní reakci na myeloperoxidázu, někteří autoři však

blasty s nečetnými primárními granulami řadí již k promyelocytům. V případě leukemických myeloblastů většina autorit granula připouští (leukemické blasty I–III) (blíže v kapitole o leukemiích).

Dalším vývojovým stadiem myelopoézy jsou **promyelocyty**. Tyto buňky jsou nápadné svou velikostí (12–20 μm), mají zpravidla excentricky uložené jádro s hrubší strukturou chromatinu než myeloblasty s většinou dobře patrnými nukleoly. Jádro často vykazuje lehké vyhloubení jaderné membrány, ve kterém je patrné zřetelné projasnění cytoplazmy. Ultramikroskopicky je v této lokalizaci detekován tzv. Golgiho komplex (slouží ke třídění a „balení“ v buňce syntetizovaných makromolekul do granul). Cytoplazma promyelocytů si zachovává bazofilní barvení a jsou v ní patrná **četná primární granula**. Tato primární granula jsou syntetizována v promyelocytech a myelocyty je již netvoří, jsou však detekovatelná ve všech vývojových stádiích granulopoézy, včetně nejzralejších segmentů. Primární granula jsou velká asi 500 nm, jejich membrána nese četné antigenní struktury (CD63, CD66c, CD68) a obsahují myeloperoxidázu, lysozym, elastázu, defenziny a mnoho dalších látek, hrajících roli v obraně organismu proti infekci a v remodelaci tkání. Primární granula se již dále nevyvíjejí, jen perzistují. V promyelocytech nejsou přítomna sekundární granula.

Myelocyty se vyznačují poklesem nukleo/cytoplazmatického poměru, hrubší strukturou chromatinu a zvyšujícím se počtem sekundární granulace (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní – v závislosti na diferenciaci). Sekundární granula jsou menší než primární, mají průměr cca 200 nm a jsou negativní na myeloperoxidázu. Na povrchu nesou četné struktury jako CD15, CD66a, CD66b a mnoho dalších, obsahují kolagenázu, lysozym, histaminázu, heparinázu, vitamin B₁₂ vázající protein, aktivátor plazminogenu, laktoferin aj. Sekundární granula jsou na hranici viditelnosti světelným mikroskopem. Cytoplazma neutrofilních myelocytů pozbývá bazofilního zabarvení ve prospěch eozinofilního (růžového) odstínu. Ve zralejších elementech myeloidní řady se navíc popisují i terciální granula, rovněž obsahující různé proteiny, především želatinázu a lysozym.

Lze detekovat **nezralé a zralé myelocyty**. V nezralých myelocytech vidíme bazofilnější zabarvení cytoplazmy, jemnější strukturu jádra a vzácně mohou být patrné i nukleoly. Nukleoly jsou dobře patrné ultramikroskopicky. Myelocyty představují nejzralejší myeloidní elementy, které mají ještě schopnost buněčného dělení. Velikost těchto buněk se pohybuje mezi 12–18 μm .

Metamyelocyty jsou poněkud menší než myelocyty (10–18 μm), mají menší a hutnější jádro, které většinou vykazuje ledvinovitý tvar. Tyto buňky se za fyziologických okolností, stejně jako jejich dříve zmíněné prekurzory, vyskytují jen v kostní dřeni, nikoli v periferní krvi. Za normálních okolností se v periferní krvi vyskytují pouze tyče a segmenty. **Rozdíl mezi tyčemi a segmenty** se kupodivu v literatuře uvádí různě jako poměr tloušťky mezi nejtenčím a nejširším místem jádra – různí autoři hovoří o jedné třetině nebo polovině, jiní dokonce za segmenty považují až elementy s vláčenkovitým (jako nit tenkým) spojením mezi částmi jádra.

Zralé tyče a segmenty jsou uvolňovány do periferní krve. Přesný mechanismus regulace tohoto procesu není znám. Poločas zralých elementů v periferní krvi obnáší asi 6 hodin. Zralé neutrofile jsou atrahovány do míst infekce a/nebo poškození tkání, kde dochází k interakci s endoteliemi s následným vycestováním do tkání na bázi chemotaxe.

Osud zralých neutrofilních leukocytů u zdravých lidí bez infekce nebo poranění není zcela jasný, zdá se, že část je eliminována přestupem sliznice gastrointestinálního traktu.

Eozinofilní řada, bazofilní řada a mastocyty vycházejí ze společného prekursoru, pozitivního na CD34 znak a dosud nenesoucího specifické receptory pro IgE (Fc epsilon R). Tento precursor se pak diferencuje v již odlišené kmenové buňky pro **mastocyty (CFU-Mast)** a pro **Eo/Bazo řadu**. Kmenová buňka pro mastocytární řadu má na buněčné membráně na rozdíl od společné kmenové buňky pro eozinofilní/bazofilní řadu receptor pro SCF (stem cell factor) – **c-kit**. Společná kmenová buňka pro eozinofilní/bazofilní řady vyvrává přes stadia pre-Ba/Eo, common Ba/Eo v již oddělené prekurzory CFU-Eo a CFU-Bazo.

Eozinofilní řada pak již vychází ze specifické kmenové buňky CFU-Eo, dále se diferencující ve zralejší blasty a dále v eozinofilní promyelocyty, metamyelocyty, tyče a segmenty. K této diferenciaci je zapotřebí IL-3, IL-5 a GM-CSF. Sekundární eozinofilní granula vykazují specifickou strukturu v elektronové mikroskopii a obsahují řadu prozánětlivých cytokinů, bazický protein, kationický protein, neurotoxin a eozinofilní myeloperoxidázu.

Bazofilní granulocyty se diferencují z kmenové buňky CFU-bazo v bazofilní myeloblasty, promyelocyty, metamyelocyty a zralé segmenty. Bazofily se liší od mastocytů v řadě parametrů. Ve světelné mikroskopii je nejnápadnějším rozdílem vzhled jádra a počet a velikost bazofilních granul. Jádro bazofilu je na rozdíl od mastocytu laločnaté, granula mastocytu jsou většinou větší, ale vždy velmi početná, zakrývající jádro. V elektronové mikroskopii jsou tyto rozdíly jasně patrné. Bazofily a mastocyty se liší i obsahem specifických granul a expresí znaků na buněčné membráně. Obě řady obsahují histamin, chondroitin sulfát a destičky aktivující faktor (PAF), mastocyty navíc i heparin a daleko více mediátorů zánětu. V řízení proliferace a diferenciace mastocytů hraje hlavní roli SCF (stem cell factor nebo c-kit ligand), zatímco v bazofilní řadě IL-3, IL-5, GM-CSF a TGFβ (transforming growth factor β).

Monocyto-makrofágová řada se diferencuje ze společného prekursoru s granulopoézou (CFU-GM). CFU-GM vyvrává v CFU-G a monodendritický precursor. CFU-G dává vzniknout granulopoéze a **monodendritický precursor** se dále diferencuje ve dvě větve: nezralé elementy dendritické řady a monoblasty. Monoblasty lze ve světelné i elektronové mikroskopii jen velmi obtížně odlišit od myeloblastů. Monoblasty mohou být různě výrazně pozitivní na nespecifickou esterázu se zřetelným blokem reakce natrium fluoridem (NaF), myeloperoxidázová reakce v nich bývá zpravidla negativní nebo jen lehce pozitivní. Téměř specifická pro myeloidní řadu je reakce na chloroacéťesterázu, naproti tomu pro monocytární řadu je téměř specifická reakce na butyráťesterázu s následným blokem NaF.

Zralejší promonocyty již více připomínají monocytární elementy, mají většinou ledvinovité jádro s retikulárním chromatinem, kde ještě můžeme nacházet různé zřetelné nukleoly. Cytoplazma je bazofilní, ale již může pomalu nabývat typické kouřovité zabarvení. Zralé monocyty mají nepravidelné (většinou ledvinovité) jádro bez nukleolů a cytoplazma je kouřově šedá s jemnou (poprašek) azurofilní granulací. Monocyty vycestovávají do tkání, kde je označujeme jako makrofágy. **Makrofágy** jsou přítomny prakticky ve všech tkáních a orgánech, v některých mohou plnit specifické funkce (např. osteoklasty v kostní tkáni, mikroglie v mozku, Kupfferovy buňky v játrech, Langerhansovy buňky v kůži). Základními funkcemi monocyto-makrofágového systému

jsou fagocytóza mikroorganismů, eliminace a prezentace antigenů, výrazná účast na remodelaci tkání, destrukce starých nebo poškozených erytrocytů s nemalým podílem na ovlivnění metabolismu železa. S buňkami monocyto-makrofágového systému funkčně i vývojově spřízněné dendritické buňky detekujeme v primárních i sekundárních lymfatických orgánech (viz níže) a sliznicích, kde je nacházíme jako epiteliální, folikulární nebo interdigitující elementy. **Dendritické buňky** nesou na svém povrchu početné antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC – main histocompatibility complex) a prezentují v tomto kontextu cílové antigeny T lymfocytům. T lymfocyty mohou být následkem této interakce aktivovány. Při těchto pochodech je rovněž uvolňována jak lymfocyty, tak i dendritickými buňkami řada mediátorů. Prezentace antigenů se účastní i buňky monocyto-makrofágového systému.

Lymfocytární řada prodělává vzhledem ke svým zásadním regulačním funkcím v imunitních pochodech dosti složitý vývoj. Po diferenciaci ze společné multi (toti)-potentní buňky pro nelymfoidní i lymfoidní řadu se lymfoidní kmenové buňky dále diferencují do T řady nebo B řady.

Lymfoblasty jsou zpravidla poněkud menší než myeloblasty s úzkým lemem cytoplazmy kolem kulatého jádra s hutnějším chromatinem a zpravidla obsahují jen 1–2 nukleoly. Lymfoblasty jsou peroxidáza negativní. V jádrech nezralých prekurzorů lymfatické řady lze detekovat enzym **terminální deoxynukleotidyl transferázu (TdT)**, který je pozitivní u cca 90 % akutních lymfoblastických leukemií a jen vzácně u akutních myeloidních leukemií. **Prolymfocyty** jsou menší než lymfoblasty s hutnějším jádrem a většinou dobře patrným centrálním nukleolem. **Zralé lymfocyty** se vyznačují velkou morfologickou i funkční variabilitou a plasticitou. Pro vývoj lymfocytů jsou zásadními primární a sekundární lymfatické orgány. **Primárními lymfatickými orgány** jsou kostní dřeň a thymus. Lymfocyty se zde diferencují v B a T lymfocyty. Diferenciace T lymfocytů probíhá v tymu. **Tymus** se skládá z lalůčků (lobulů), kde diferencující se lymfocyty přicházejí do kontaktu s epiteloidními a interdigitujícími dendritickými buňkami a makrofágy, které jak přímým kontaktem, tak produkcí řady cytokinů indukují vyžívání ve zralé T helper (CD4+) nebo T supresor (CD8+) lymfocyty. T i B lymfocyty, které opouštějí primární lymfatické orgány a dosud se nesetkaly s cílovými antigeny, označujeme jako **naivní**. Po setkání s cílovými antigeny (může jít o infekční agens, tumory nebo i tělu vlastní nepatologické antigeny v případě autoimunitních onemocnění) se lymfocyty stávají „**paměťovými buňkami**“ – **memory cells** nebo **efektorovými lymfocyty** v podobě plazmatických buněk (B lymfocyty) nebo cytotoxických T lymfocytů. Memory cells při opětovném setkání s antigeny vytvářejí klon, který rychle reaguje tvorbou protilátek (B lymfocyty) nebo buňkami zprostředkovanou imunitní reakcí (T lymfocyty). Tvorbou a uvolňováním řady stimulačních i inhibičních cytokinů je pak ovlivněna i reakce ostatních složek imunitní odpovědi (granulocytů, monocytů/makrofágů, žírných buněk, retikulárních buněk). Lymfocyty tak představují centrální buňky v procesech i regulaci imunitní odpovědi a hovoříme zde o **specifické celulární i humorální imunitě**, na rozdíl od nespecifické imunity, představované komplementem a ostatními nelymfoidními buňkami.

Sekundárními lymfatickými orgány jsou lymfatické uzliny a slezina. Lymfatické uzliny mají aferentní a eferentní lymfatické cévy, přes které protéká lymfa s lymfocyty. Uzliny obsahují lymfatické folikuly, tvořené převážně B lymfocyty. V centru folikulů proliferují morfologicky „nezralé“ centroblasty, diferencující se ve zralé centrocyty.

Centroblasty jsou různě velké, mají zpravidla „naštěpené“ jádro. Velikost, nukleo/cytoplazmatický poměr a bazofilie cytoplazmy závisí na antigenní stimulaci v regionální lymfatické uzlině. Ve folikulech je přítomna i jistá populace T lymfocytů, které se účastní modulační imunitní odpovědi i pochodů celulární imunity. T lymfocyty jsou přítomny hlavně v plášťové (mantle) zóně lymfatických folikulů. Výrazně proliferující morfologicky „nezralé“ lymfocyty jsou někdy označovány jako **imunoblasty (B i T)**. Tyto buňky jsou zvláště při virových infekcích (nejmarkantněji při infekční mononukleóze) vyplavovány do periferní krve, kde jsou detekovány jako morfologicky velmi heterogenní populace, souhrnně některými autory označovaná jako „virocyty“ (také nepřesně jako lymfomonocyty, přesněji aktivované lymfocyty).

V regionálních lymfatických uzlinách a v lymfatických folikulech ve silnicích makrofágy a dendritické buňky prezentují cílové antigeny naivním i paměťovým lymfocytům, které pak recirkulují a znovu se mohou usazovat v místech antigenní stimulace (homing). Lymfatické folikuly ve sliznicích gastrointestinálního traktu nazýváme Peyerovy plaky. Postavení sleziny v řízení diferenciací lymfatické řady a v řízení specifické imunitní odpovědi není zcela jasné, představuje vzhledem ke své velikosti a struktuře značný rezervoár T i B lymfocytů. U splenektomovaných (zvláště pro úraz a ne pro hematologická onemocnění) však nejsou výše uvedené procesy proliferace a diferenciací lymfocytů výrazněji narušeny.

Proliferaci a diferenciaci B lymfocytů lze rozdělit na antigenu nezávislé a závislé období. Prvé období probíhá v kostní dřeni, kdy ze z kmenových buněk postupně diferenciuje nezralý pro-B element, CD34+ a CD19+. Další fází je pre-B buňka, která se dále diferenciuje ve zralý naivní B lymfocyt. Nevelká populace těchto lymfocytů nese společné znaky pro T (CD5) a B řadu (CD19). U typické chronické lymfatické leukemie je většina leukemických lymfocytů CD5+CD19+. Naivní lymfocyty po setkání s cílovými antigeny buď podléhají apoptóze (negativní selekce, eliminují se tak zvláště autoreaktivní klony), nebo se diferencují v plazmocyt, tvořící protilátky proti cílovému antigenu. Další možností je diferenciací v paměťové buňky, které recirkulují. Při dalším setkání s příslušnými antigeny jsou rychleji produkovány klony plazmocytů produkující protilátky. V této řadě lze rozlišit plazmablast, proplazmocyt a zralý plazmocyt.

Velmi zajímavou a důležitou kapitolou je postupná **aktivace genů pro imunoglobuliny v B prekurzorech**. Široký repertoár specifických imunoglobulinů je syntetizován jednotlivými klony B lymfocytů. Každý klon je zodpovědný za tvorbu protilátky, zaměřené pouze proti určitému antigenu nebo antigenní determinantě. Protilátky jsou tvořeny dvěma páry těžkých a dvěma páry lehkých řetězců, podle struktury těžkého řetězce pak rozeznáváme **5 tříd imunoglobulinů**: IgM, IgG, IgD, IgE a IgA. Specifita a jedinečnost každé protilátky je zajištěna specifickou strukturou (**hyper**) **variabilní části** molekuly, která pak rozeznává antigen na principu jedinečnosti klíče a zámku. Variabilní části molekul imunoglobulinů jsou kódovány variabilními úseky genů, které vykazují (hyper)mutace. V časném stadiu vývoje B lymfocytu lze molekulárně biologickými metodami detekovat nejprve aktivaci – **přestavbu (gene rearrangement)** genu pro těžké řetězce μ , následovanou přestavbou genů pro lehké řetězce κ a λ . Posléze dochází i k aktivaci genů pro těžké řetězce δ , α , ϵ a γ . Prvními molekulami v cytoplazmě B buněk jsou tak imunoglobuliny IgM, které jsou pak exprimovány na cytoplazmatické membráně jako receptory pro antigeny. IgM jsou na povrchu B buněk postupně vystřídány molekulami IgD. V jednotlivých klonech

B lymfocytů jsou v závislosti na aktivaci příslušného genu pro těžké řetězce syntetizovány imunoglobuliny IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. V úsecích genů, které kódují hypervariabilní oblasti protilátek (úseky, rozeznávající antigeny), dochází k „hypermutacím“. Vzniká tak široký rejstřík buněčných receptorů a protilátek. Klony těchto B buněk (již zmíněné centroblasty) se diferencují v centrocyty, které podléhají apoptóze (negativní selekce autoreaktivních klonů), nebo se diferencují v plazmocytů nebo paměťové buňky. Jak již bylo řečeno, tyto procesy jsou ovlivňovány antigen prezentujícími dendritickými buňkami a T lymfocyty.

Vývoj zralých T lymfocytů probíhá (viz výše) v tymu. Podobně jako u imunoglobulinů je struktura buněčných **receptorů T lymfocytů (TCR – T-cell receptor)** polymorfní a jedinečná pro každý vyvíjející se T klon. Rozeznáváme dva typy TCR: TCR z řetězců α a β a TCR z řetězců γ a δ . Nezralé tymocyty exprimují na svém povrchu CD34, postupně pak CD2, CD5, CD7 a v cytoplazmě CD3. Z hlediska funkce tymocytů jsou důležité antigeny CD4 a CD8. Nejméně zralé buňky jsou CD4⁻ CD8⁻, pak následují lymfocyty CD4⁺ CD8⁺ (double positive) a konečně CD4⁺ nebo CD8⁺.

Přestavba s následnou aktivací genů pro **TCR (gene rearrangement)** začíná v genu pro β řetězec TCR. Následně se diferencují již zmíněné CD4⁺ CD8⁺ buňky. Dalším krokem je rearrangement v genu pro α řetězec s kompletizací TCR α/β . Menšina tymocytů aktivuje geny γ a δ a kompletuje tak TCR γ/δ . Tyto lymfocyty jsou morfologicky patrné jako velké granulární lymfocyty a tvoří tak část populace LGL (large granular lymphocytes). Naivní zralé T lymfocyty pak ve spolupráci s dendritickými buňkami podléhají negativní a pozitivní selekci, kdy autoreaktivní a nereaktivní lymfocyty jsou eliminovány indukci apoptózy (programovaná buněčná smrt) a na cizí antigeny přiměřeně reagující klony jsou uvolňovány z tymu do cirkulace. **Zralé T lymfocyty** jsou cca 5–8 μm velké buňky s malým lemem cytoplazmy kolem hutně vyhlížejícího jádra s malým počtem organel v světle modré cytoplazmě.

CD4⁺ a TCR α/β nesoucí T lymfocyty jsou induktory a regulátory specifické imunitní odpovědi (T helper cells). Diferencují se v **Th1 a Th2 buňky**, lišící se spektrem produkce cytokinů. Th1 lymfocyty indukují reakce cytotoxických T a NK lymfocytů a zvyšují potenci monocyto-makrofágového systému, zatímco Th2 buňky aktivují protilátky produkující B lymfocyty.

CD8⁺ a TCR α/β buňky představují primárně cytotoxické T lymfocyty. Tyto buňky po stimulaci antigenem (prezentace dendritickými buňkami – první signál) exprimují receptor pro IL-2. Jako druhý signál k proliferaci cytotoxického T klonu slouží navázání IL-2 na tento receptor. IL-2 je sekretován aktivovanými Th1 lymfocyty. Aktivované cytotoxické CD8⁺ lymfocyty potom indukují apoptózu cílové antigeny nesoucích buněk poškozením membrány i jádra těchto elementů.

Nulové lymfocyty (null-cells) se vyvíjejí nejspíše ze společných kmenových buněk s klasickými T lymfocyty (T/NK prekurzory), nenesou však na svém povrchu většinu znaků pro B a T řadu. Jde o funkčně i fenotypicky heterologní populaci lymfocytů, které ve světelném mikroskopu označujeme jako velké granulární lymfocyty (LGL – large granular lymphocytes). Jedná se o velké buňky (10–12 μm) s vysokým podílem bledě modré cytoplazmy s azurofilními granulami, které jsou peroxidáza negativní. LGL mohou být zastoupeny v periferní krvi asi v 10–15 % z lymfocytární řady. Část LGL je pozitivní na CD56 a negativní pro CD8 a TCR. Tyto elementy jsou skutečnými **přirozenými zabiječi (NK cells, nature killer)**, které mohou být cytoto-

xické bez předchozí aktivace antigenem. Populace CD56-CD57+CD8+TCR α/β + se označuje jako NK-like cells. Nulové buňky jsou angažovány v regulaci hematopoézy, obraně proti infekcím a imunitním dozoru proti nádorům. Část populace LGL tvoří TCR γ/δ pozitivní lymfocyty (viz výše).

Pomocí molekulárně genetických metod, detekujících přestavbu genů pro imunoglobuliny v B lymfocytech (a analogicky genů pro T buněčné receptory v T lymfocytech) lze lépe diagnostikovat časně prekurzory jednotlivých řad u **akutních lymfoblastických leukemií**.

1.6 Tvorba a vývoj trombocytů

Megakaryocytární linie se vyvíjí z kmenové buňky BFU-Meg (BFU-MK) v CFU-Meg, která se pak diferencuje v promegakaryoblasty, megakaryoblasty, promegakaryocyty a nezralé a zralé megakaryocyty. Trombocyty vznikají odstěpováním cytoplazmy zralých megakaryocytů, které se již dále nedělí, pouze dochází k mnohonásobnému zmnóžení genomu (2N-4N-8N...) v jádře, tzv. **endomitóza**. V oblasti cytoplazmy zralých megakaryocytů lze detekovat vznik demarkačních membrán lemujících úseky, které se někdy označují jako **prototrombocyty**. Prototrombocyty jsou fragmentací uvolňovány do kapilárního systému v kostní dřeni. Terminologie jednotlivých vývojových stádií vývoje megakaryocytární linie není zcela ujednocena – klasickou morfologií neidentifikovatelné stadium tohoto vývoje je nejčastěji označováno jako **promegakaryoblast**. V těchto blastech však již může být ultrastrukturálně pozitivní reakce na pro trombocyty specifický GP IIb (glykoprotein IIb), dále pak von Willebrandův faktor a peroxidázu. Promegakaryoblasty tvoří cca 5–20 % celého megakaryocytárního poolu. Morfologicky jde o malé „lymfoidně“ vyhlížející blasty s vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem, výrazně bazofilní cytoplazmou bez granul, flowcytometricky je již ve většině promegakaryoblastů prokazována endomitóza (duplikace genomu bez dělení jádra).

Dalším diferenciačním stadiem je **megakaryoblast**, někdy je označován za nezralý megakaryocyt I, který představuje asi 20 % megakaryocytární populace. Ve světelné mikroskopii se jedná o asi 6–20 μm velkou buňku s intenzivně bazofilní cytoplazmou, jádro je velké, kulaté nebo lobulizované, nukleo/cytoplazmatický poměr je vysoký, jádro obsahuje několik prominujících nukleolů. Elektronová mikroskopie odkryje několik pro megakaryocyty typických a granula a ojedinělé struktury vznikajícího demarkačního membránového systému. Cytoplazma megakaryoblastů může někdy vytvářet výběžky a občas vidáme adheenci zralých trombocytů na tyto prekurzory, což může pomoci v morfologické diagnostice. Tyto nálezy však bohužel nejsou jednoznačně spolehlivé.

Megakaryoblasty se dále diferencují v **promegakaryocyty**, místy označované jako zrající megakaryocyt II. Jde o buňky velikosti 15–20 μm se snižujícím se nukleo/cytoplazmatickým poměrem a vyhasínajícím bazofilií cytoplazmy, která má již narůžovělé tóny. Jádro je již výrazně lobulizované s násobkem genomu mezi 8N a 64N, hrubší struktury a většinou bez výrazných nukleolů. Ultramikroskopicky již nacházíme četnější a granula a struktury demarkačního membránového systému. Promegakaryocyty (megakaryocyty II) jsou v megakaryocytární populaci zastoupeny v asi 25 %.

Zrající a vyzrálé **megakaryocyty** (megakaryocyty III) se vyznačují postupnou výraznou ztrátou bazofilie cytoplazmy, nápadnou polarizací jádra na okraj cytoplazmy, výraznou lobulizací (ne segmentací) hutného chromatinu bez nukleolů. U zcela zralých megakaryocytů je zřejmé zřetelné „políčkování“ cytoplazmy s následnou fragmentací v podobě uvolňování destiček. V cytoplazmě zralých megakaryocytů lze detekovat redukci endoplazmatického retikula a Golgiho komplexů, naopak dochází k výraznému vývoji demarkačního membránového systému, expresi destičkových glykoproteinů GP IIb/IIIa, komplexu GP I/V/I a zmnožení a granul, hutných tělísek (dense bodies) apod. Zralé megakaryocyty jsou rovněž největší z celé této vývojové řady (cca 40–60 μm v průměru), nejfrekventnější (cca 60 % megakaryocytární řady) a vykazují rovněž nejvyšší nukleo/cytoplazmatický poměr. Vývoj zralého megakaryocytu trvá asi 5–10 dní.

Trombocytopoéza není dosud do všech detailů prozkoumána. Nejčastěji se uvádí teorie o extenzi výběžků cytoplazmatických membrán (tzv. pseudopodií) megakaryocytů do kapilárního systému sinusoid v kostní dřeni s následným uvolňováním preformovaných útržků cytoplazmy megakaryocytů v podobě trombocytů do cirkulace. Odhaduje se, že jeden megakaryocyt je schopen vyprodukovat 1000–5000 destiček. Kontakt mezi megakaryocyty a sinusoidami ve dřeni je velmi důležitý jak z hlediska modulace megakaryo/trombocytopoézy přímým intercelulárním kontaktem (cell to cell), tak i pro produkci řady interleukinů a cytokinů, které ovlivňují vyzrávání megakaryocytů i produkci destiček (hematologické induktivní mikroprostředí – HIM), včetně interakce všech zúčastněných složek s tzv. extracelulární matrix.

Počet destiček v periferní krvi je citlivě regulován a ukazuje se, že hlavním proteinem řídícím procesy megakaryo/trombocytopoézy je **trombopoetin (TPO)**. TPO vykazuje asi 20% homologii s erythropoetinem (EPO) a usuzuje se, že geny pro oba proteiny se vyvinuly ze společného základního genu. Do této mozaiky dobře zapadá i existence společného prekursoru pro erytropoézu a trombocytopoézu. V pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že markantní umělé snížení počtu trombocytů vede ke stimulaci megakaryopoézy a trombocytopoézy následkem zvýšené hladiny TPO v krvi. Naopak po mnohočetných trombocytárních transfuzích koncentrace TPO klesá a dochází i k redukci megakaryo/trombocytopoézy. TPO se váže na specifické receptory (označované jako c-MPL), které jsou umístěny na kmenových buňkách, megakaryocytech a trombocytech. Vazba TPO na c-MPL na trombocytech pravděpodobně částečně zabraňuje interakci TPO s c-MPL na kmenových buňkách a zralejších prekurzorech megakaryopoézy. Částečně je tak vysvětlen inverzní vztah mezi počtem krevních destiček a koncentrací TPO v krvi. Lze shrnout, že TPO po vazbě na c-MPL zvyšuje počet i diferenciaci buněk megakaryocytární linie včetně zvýšené tvorby destiček a že koncentrace TPO je v inverzní relaci s počtem trombocytů, přesněji s celkovou trombocytární masou v periferní krvi.

Na vývoji megakaryocytární řady se v určitých stádiích diferenciaci megakaryopoézy podílejí i některé další regulační proteiny (IL-3, IL-6, IL-11 a G-CSF), avšak řídící funkci TPO nenahrazují, jenom ji doplňují. Z celkové trombocytární masy je asi třetina lokalizována ve **slezině**, u splenektomovaných nemocných se může objevit trombocytóza. Regulační funkce sleziny není zcela jasná, nebyla prokázána produkce stimulačních a/nebo inhibičních faktorů ve slezině. Zdá se, že slezina je hlavním místem zániku „starých“ destiček, destiček poškozených nebo destiček

s navázanými autoprotilátkami (ITP – idiopatická nebo imunitní trombocytopenická purpura). U pacientů se splenomegalií často vidáváme trombocytopenii různého stupně. Dalšími místy destrukce starších trombocytů jsou játra a kostní dřeň, slezina zde však hraje hlavní roli. Denně se vyprodukuje a u zdravého člověka zanikne asi $1,2\text{--}1,5 \times 10^{11}$ trombocytů.

Vztah mezi **bilancí železa a trombocytopoézou** je diskutován v důsledku pozorování trombocytózy u některých pacientů se sideropenií. Železo má jako kofaktor řady enzymů vliv na syntézu nukleových kyselin, bílkovin, dále na regulaci procesů proliferace, diferenciaci a apoptózy různých buněčných linií. U těžkého deficitu železa byly zaznamenány i trombocytopenie. Můžeme říci, že vliv železa na produkci trombocytů není jasný – pacienti mohou mít normální, zvýšený nebo snížený počet destiček v periferní krvi a dosud nebyla realizována žádná klinická studie v tomto směru, jde jen o publikované kazuistiky. S ohledem na významnou podobnost molekuly TPO a EPO je však pravděpodobné, že vede-li sideropenie k anémii a tím i zvýšení EPO, mohou vysoké hladiny EPO stimulovat kromě erytropoézy i trombocytopoézu a vést tak k reaktivní trombocytóze. Po upravení hladiny Hb se zpravidla normalizují i počty trombocytů.

Na závěr kapitoly o krvetvorbě lze uvést, že hematopoéza má u zdravého člověka **velkou rezervu** – podle potřeby může mnohonásobně (až 10×) zvýšit produkci jednotlivých krevních elementů. Za patologických stavů (útlumy kostní dřeně, ineffektivní hematopoéza, metastázy do dřeně) je tato rezerva snížena až vyčerpána.

1.7 Hodnocení

Stav hematopoézy v praxi nejčastěji hodnotíme korelací nálezů v periferní krvi s nálezy v kostní dřeni. Izolované nebo různě kombinované cytopenie mohou vykazovat útlum (hypoplazie až aplazie) krvetvorby v kostní dřeni, ineffektivní hematopoézu (apoptózu zralejších elementů ve dřeni), myelofibrózu, akutní hemoblastózy, metastázy maligních tumorů apod. U obrazů zvýšené proliferace nutno rozlišit primární a sekundární procesy (např. reaktivní leukocytózu od chronické granulocytární leukemie). Kromě klasických metod hodnocení hematopoézy máme k dispozici řadu moderních postupů, např. ultramikroskopii, průtokovou cytometrii, cytogenetiku a molekulární biologii, kultivační metody aj.

1.8 Klinický význam

Nerovnováha v produkci a zániku jednotlivých krevních elementů může mít za následek proliferační a/nebo cytopenické poruchy s různými klinickými obrazy (únava a dušnost u anemických stavů, krvácivé projevy u trombocytopenií, zvýšená náklonnost k infekcím u granulocytopenií nebo u poruch lymfatické složky apod.). Je zřejmé, že přesná diagnostika poruch krvetvorby je jedním ze základních faktorů podporujících náležité léčebné postupy u konkrétního pacienta. Výzkum v oblasti kmenových buněk otvírá nové možnosti léčby nejen v klinické hematologii, ale i např. v kardiologii, neurologii aj.

Literatura

1. Doulatov S, Notta F, Epperl K, et al. Revised map of the human progenitors hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphocytic development. *Nat Immunol*, 2010; 11: 585–932.
2. Kaushansky K. Determinants of platelets number and regulation thrombopoiesis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*, 2009: 147–1524.
3. Kosagi K. Platelet production by megakaryocytes: Protoplatelets theory justifies cytoplasmatic fragmentation model. *Int J Hematol*, 2008; 3: 255–257.
4. Lee GR, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Vol. 1. 10th ed. Williams and Wilkins, 1999. 1484 s.
5. Orkin S, et al. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7th ed. Saunders, 2008, 1872 s.
6. Pecka M. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR s.r.o., 2002. 160 s.

2 Fyziologie krevního srážení

Hemostáza je nezbytná pro život. Jedná se o velmi komplikovaný, přesně regulovaný proces, který dokáže zastavit krvácení pouze v místě poranění, při neporušeném cévním řečišti naopak udržuje tekutost krve. Na hemostáze se podílí především cévy, krevní destičky a plazmatické faktory (koagulační, přirozené inhibitory a faktory fibrinolýzy). Ve skutečnosti však v těchto systémech hrají roli všechny látky přítomné v krvi a na vnitřní straně cévy, tj. i červené krvinky, leukocyty, lipidy, další bílkoviny, minerály atd.

2.1 Cévy, cévní systém

Anglický lékař William Harvey zveřejnil v roce 1628 svůj objev uzavřeného krevního oběhu u lidí i zvířat. Krev, pumpovaná z levé komory srdeční do aorty, se přes menší arterie a arterioly dostává až na kapilární úroveň, kde je předáván kyslík do tkání. Z kapilár pak krev protéká venulami a většími cévami, stékajícími se do horní a dolní duté žíly a do pravého srdce, odkud je plicní tepnou přiváděna do plic. V plicních kapilárách je krev okysličována a přes plicní žíly je transportována do levého srdce, kde se cyklus uzavírá. Cévní systém má vedle své funkce cirkulační i nesmírný význam pro hemostázu. Vaskulopatie mohou zapříčínovat krvácivé stavy, častěji však vidíme výrazný podíl vaskulární složky v oblasti jak venózních, tak hlavně arteriálních hyperkoagulačních stavů (infarkty myokardu, ischemické cévní mozkové příhody, končetinové ischemie).

2.1.1 Cévní stěna

Cévy, kromě kapilár, mají třívrstvou strukturu v podobě intimy, medie a adventicie. Intimu tvoří jednovrstvá výstelka endoteliálními buňkami, které jsou spojené polysacharidovou intracelulární matrix a obklopené bazální membránou, která je syntetizována fibroblasty i samotnými endoteliemi. Pod bazální membránou nacházíme extracelulární matrix (ECM). Hlavními buňkami ECM jsou fibroblasty a hladké svalové buňky.

Integrita cévního systému je důležitým faktorem hemostázy. Při poranění dochází k reflexnímu spazmu arterioli, venul a menších cév s relativní ischemií postižené oblasti s vytvořením podmínek pro vznik primární hemostatické zátky, tvořené převážně aktivovanými trombocyty.

Subendotel se fyziologicky do kontaktu s krví dostává pouze při poranění, je velmi trombogenní a aktivuje okamžitě všechny systémy hemostázy. Nejvýznamnějšími hemostatickými složkami subendotelu jsou kolageny a tkáňový faktor (TF). Na negativně nabitých površích kolagenů dochází k aktivaci vnitřní koagulační kaskády a dále k adhezi destiček vytvořením vazby mezi kolagenem, von Willebrandovým faktorem (VWF) a receptory destiček, reprezentovanými aktivovanými glykoproteinovými komplexy GP Ib/V/IX a GP IIb/IIIa, přes GP VI může jít navíc o přímou vazbu destiček na kolagenové struktury.

2.1.2 Endotel

Velmi důležitou a metabolicky nesmírně aktivní složku tvoří systém endotelií. Jde o obrovský povrch (700–1000 m²), kde se krev stýká s cévní stěnou. Na svém povrchu endotelie nesou řadu receptorů (např. trombomodulin, receptor pro protein S, fibronektin) včetně adhezivních receptorů (integrinů). Probíhá zde metabolismus kyseliny arachidonové, syntetizují např. VWF, endotelin, tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA), tj. jsou schopny syntetizovat, hromadit a v případě nutnosti exprimovat na povrch nebo sekretovat řadu jak prokoagulačních, proagregačních a vazokonstrikčních, tak i antikoagulačních, antiagregačních a vazodilatačních působků, navíc systém tPA-PAI je hlavním modulátorem fibrinolýzy. Seznam hlavních protrombotických a antitrombotických substancí je uveden v tabulce 2.1.

Neporušený, nesmáčivý endotel je nejdůležitějším fyziologickým antitrombotickým prostředkem organismu. Endotelie dále hrají navíc důležitou roli v modulaci lokální i celkové zánětlivé aktivity produkcí a/nebo vazbou a modulací účinku řady cytokinů.

Tab. 2.1 Endoteliální faktory modulující hemostázu

stimulace hemostázy	inhibice hemostázy
tkáňový faktor (TF)	TFPI (tissue factor pathway inhibitor)
von Willebrandův faktor (VWF)	VWF – proteáza (metabolizuje VWF)
tPA	inhibitor aktivátorů plazminogenu 1 (PAI-1)
tromboxan A ₂ (TXA ₂)	prostacyklin (PGI ₂)
faktor aktivující destičky (platelet activating factor – PAF)	NO (EDRF – endothelium dependent relaxing factor)
trombinový receptor (PAR – protease activated receptor)	trombomodulin (TM)
heparinázy	glykosaminoglykany (heparansulfát, dermatansulfát)
selektiny, cytoadhezivní molekuly	„down-regulation“ těchto molekul
cytokiny	antagonisté, „down-regulace“ receptorů, inhibiční cytokiny

Endotelie mohou být přeladěny do protrombotického stavu nejen přímým traumatem, nýbrž i řadou cytokinů (např. interleukinem-1, tumor nekrotizujícím faktorem – TNF), vysokou hladinou homocysteinu, oxidovanou formou LDL (low density lipoproteins) a vysokým krevním tlakem. Rozsáhlá aktivace endotelu cytokiny u sepse nebo polytraumatu může vést k rozvoji syndromu diseminované intravaskulární koagulace.

Jako neoangiogenezi označujeme novotvorbu drobných cév (tvorba kolaterál při arteriálních uzávěrech, tumory indukovaná neoangiogeneze k výživě nádorů). Souhrou koagulačních, antikoagulačních, celulárních a mnoha dalších faktorů dochází k remodelaci cév (bližší kapitola o fibrinolýze). Remodelace cév je velmi důležitým faktorem rozvoje aterosklerózy a neoangiogeneze je velmi podrobně studovaným dějem v oblasti maligního bujení.

2.2 Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces výstavby primární cévní zátky neboli agregátu krevních destiček. Jedná se o zacelení porušené integrity cévy, ať již z důvodu jejího poranění či nutné obnovy. Právě díky destičkovému agregátu dochází k zástavě krvácení. Jakákoli porucha na úrovni systému krevních destiček vede k pozměnění či ztrátě schopnosti krvácení zastavit. Je proto nutná znalost procesu primární hemostázy, tedy výstavby destičkového agregátu ve všech jeho etapách.

Destičky jsou bezjaderná tělíška vznikající odštěpením cytoplazmy megakaryocytů v kostní dřeni. Megakaryocyty naléhají na krevní kapiláry a skrze jejich membránu se krevní destičky dostávají do krevního oběhu. Denní produkce destiček je $1,2\text{--}1,5 \times 10^{11}$, počet v periférii se pohybuje mezi $150\text{--}350 \times 10^9/\text{l}$ krevního objemu. K tomu, aby dostatečným způsobem zajišťovaly proces primární hemostázy, nestačuje jen jejich normální počet, ale ani jejich normální funkce. K tomu je třeba, aby destičky disponovaly odpovídajícím vybavením. Tím je především tzv. granulomer neboli granula uspořádaná většinou v centrální části destiček. Rozlišují se dvojí granula α a δ . Obsah granulí je vyjmenován v následující tabulce 2.2.

Tab. 2.2 Destičková granula

denzní (δ) granula	α granula	lysozomy
ATP	destičkový faktor 4 (PF4)	galaktozidázy
ADP	β -tromboglobulin (β TG)	fukozidázy
kalcium	fibrinogen	hexozaminidázy
serotonin	faktor V	glukouronidázy
pyrofosfát	trombospondin	katepsin
P selektin (CD62)	fibronektin	glukohydrolázy
transformující růstový faktor b	destičkový růstový faktor (PDGF)	jiné
katecholaminy (nor- a adrenalin)	plazminogen aktivátoru inhibitor 1	
GDP/GTP	na histidin bohatý glykoprotein	
	α_2 -makroglobulin	
	α_2 -antiplazmin	
	P selektin (CD62)	

Destičky obsahují řadu dalších inkluzí, které zajišťují jejich energetické a životní nároky. Destička není schopna se dělit (nemá jádro) a žije pouhých 7–10 dní, přičemž je degradována a odstraňována ve slezině.

Základní funkcí krevní destičky je tedy tvorba primární cévní zátky. Ta je započata adhezí krevních destiček k receptorům kolagenních vláken bazální membrány cévní stěny. Tato reakce je umožněna interakcí mezi zmíněným receptorem kolagenního vlákna bazální membrány a receptorem membrány krevní destičky – glykoproteinem Ib (GP Ib) prostřednictvím von Willebrandova faktoru. Dalším a asi nejvýznamnějším krokem je agregace destiček – tedy vzájemné shlukování, které je umožněno reakcí destičkového membránového receptoru glykoproteinu IIb/IIIa

(GP IIb/IIIa) s fibrinogenem a s von Willebrandovým faktorem. Zatímco je první krok, tedy adheze destiček indukována malým množstvím adenosin difosfátu (ADP), který pochází z okolní perivaskulární tkáně, pak je agregace navozena velkým množstvím endogenního ADP pocházejícího z granul destiček. Agregaci vyvolává ale i trombin, adrenalin, kolagen, kyselina arachidonová a celá řada dalších látek, které pak lze použít i jako induktory testování agregability destiček v laboratorních testech. Shlukování destiček není jen záležitostí membránových receptorů, ale také řady dalších změn, které jsou spojeny se změnou tvaru destiček a jejich povrchových vlastností, především jejich „lepivosti“.

Třetí významnou vlastností krevních destiček je vedle jejich adhezivní a agregační schopnosti retraktibilita, tedy schopnost stažení či smrštění destičkové zátky. Ta je dána přítomností kontraktibilních bílkovin v destičkové membráně, které vedou ke smrštění destičkového trombu, a tím i k reparativním pochodům.

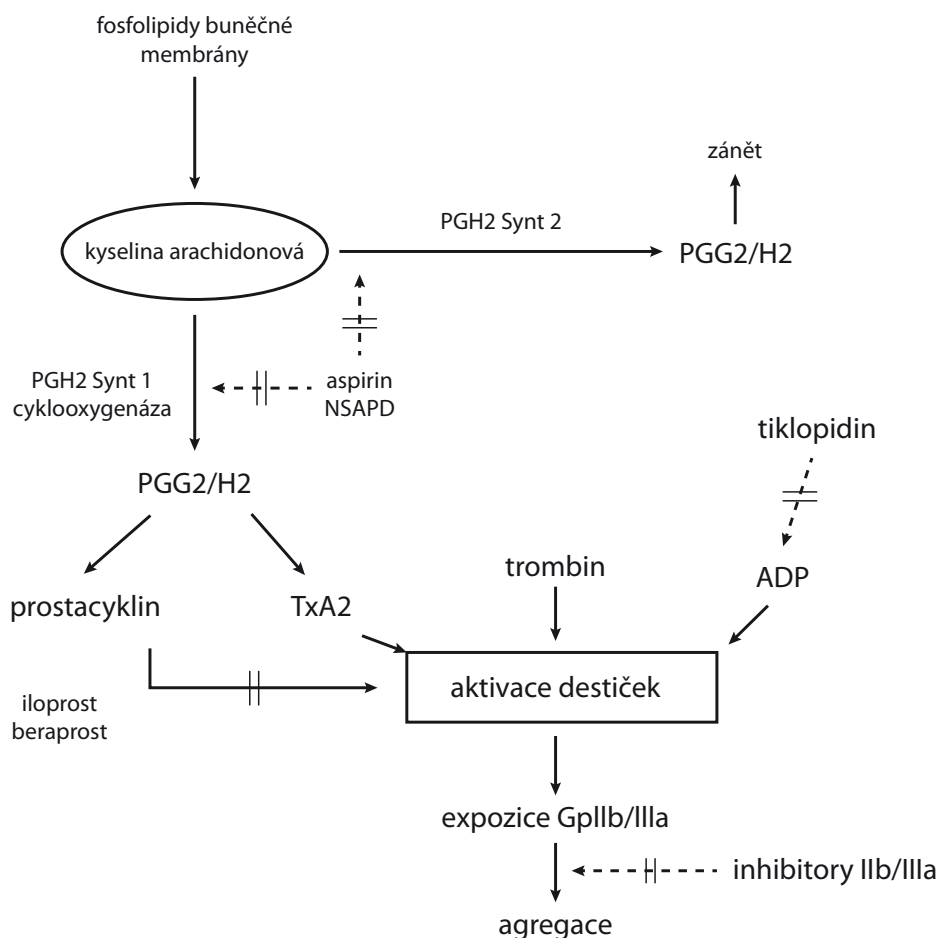
Primární hemostáza tedy vrcholí vytvořením destičkového agregátu, který podléhá smrštění a odplavení, pokud není zpevněn a fixován fibrinovou sítí vytvořenou v procesu krevního srážení (koagulace). Nepřekvapí proto vzájemná souhra primární hemostázy a plazmatické koagulace. Hovoříme o tzv. prokoagulační schopnosti destiček, tedy schopnosti účasti destiček v krevním srážení, která je dána destičkovým faktorem 3 (PF3). Jedná se o fosfolipidy destičkové membrány, které poskytují povrch ke vzájemnému kontaktu faktorů plazmatického systému krevního srážení. Vlastní destičková membrána se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů (PL). V klidových destičkách jsou na povrchu sfingomyelin a fosfatidylcholin, zatímco negativní PL fosfatidylserin a fosfatidylinositol směřují do nitra destičky. Aktivace destiček vyvolá transmembránový přesun PL (tzv. **flip-flop reakce**), kdy se na zevní membráně exprimují negativní PL. Tyto potom poskytují katalytické povrchy pro koagulační reakce. Opačně, jak bylo již zmíněno, je také primární hemostáza významně aktivována klíčovým enzymem plazmatické koagulace – trombinem (blíže v kapitole o krevním srážení).

A nyní k jednotlivým krokům samotné výstavby destičkového agregátu. Je to proces, který trvá řádově minuty a k zástavě krvácení by mělo dojít do pěti minut.

Prvotním procesem je adheze (přilnutí) destiček ke smáčivé ploše – v typickém případě k obnažené subendoteliální vrstvě cévní stěny. Tuto reakci zajišťují strukturální součásti destičkové membrány. V ní nacházíme fosfolipidy (cholesterol, sfingomyelin, fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidyletanonalim), glykolipidy a glykoproteiny (GP I–IX). Po narušení celistvosti cévní stěny dochází k odhalení jejích hlubších vrstev a zároveň s tím k odhalení receptorů kolagenních vláken bazální membrány cévní stěny. K těmto receptorům má afinitu glykoprotein Ib v komplexu s glykoproteinem IX (GP Ib – GP IX) destičkové membrány, který ke zmíněným receptorům kolagenu přilne. Proces je zprostředkován tzv. von Willebrandovým faktorem (VWF), který se nachází v krevní plazmě a je součástí makromolekulárního komplexu faktoru VIII plazmatického systému krevního srážení. Adheze je provokována celou řadou stimulů – asi nejvýznamnější je účinek ADP pocházejícího z okolní – perivaskulární tkáně.

Zevní ADP také vede k uvolňování látek přítomných v destičkových granulách, s nichž je opět nejvýznamnější ADP, tentokrát destičkám vlastní, který vyvolává agregaci destiček neboli jejich vzájemné shlukování. Zde hraje roli změna tvaru

a povrchových vlastností, tzv. lepivosti destiček, která je dána především expozicí – nabídnutím destičkových membránových receptorů GP IIb/IIIa. Na tento receptor se váže rovněž von Willebrandův faktor, ale také fibrinogen, které umožňují vzájemné shlukování destiček. Navození agregace nezpůsobuje jen ADP, ale i trombin, adrenalin, kolagen či kyselina arachidonová destičkové membrány a jeden z jejich konečných metabolitů tromboxan B₂, jakož i všechny látky a léky, které ovlivňují zmíněné působky. S vyjmenovanými látkami je spojena řada metabolických pochodů, z nichž k těm významnějším patří metabolismus cyklických endoperoxidů, tedy látek vznikajících v metabolismu kyseliny arachidonové (obr. 2.1) a dále také energetický metabolismus makroergních fosfátových vazeb, především kolísání množství cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP).



Obr. 2.1 Cesty aktivace destiček

Důsledkem ovlivnění některých zmíněných pochodů je změna v obsahu kalciových iontů destičky, které hrají roli při vzniku tubulárních systémů a degranulaci trombocytu. V ovlivnění procesu agregace tromboxanem či měnícím se obsahem cAMP hraje roli celá řada látek, ať již fyziologicky regulujících tento proces nebo používaných léčebně. Sem patří především inhibitory cyklooxygenázy I (COX1) v cyklu tvorby prostaglandinů a dále inhibitory fosfodiesterázy a agonisté adenylátcyklázy v ovlivnění tvorby cAMP.

V procesu retrakce hraje roli kontraktilní (stažlivý) systém sestávající z denzního mikrotubulárního systému a cirkumferenčních mikrofilament, které normálně udržují diskoidní tvar destiček. Nejdůležitějšími součástmi systému jsou aktin, myozin a regulační protein kalmodulin.

2.3 Systém plazmatických faktorů

Proteiny plazmy, které se přímo účastní krevního srážení, označujeme jako plazmatické faktory. Podle jejich hlavního místa účinku je dělíme na faktory koagulační, přirozené inhibitory krevního srážení a faktory fibrinolýzy.

Z biochemického hlediska se jedná o (1) **enzymy**, které kolují v krvi jako neaktivní proenzymy (zymogeny), jsou serinové proteázy – faktory (F) II, VII, IX, X, XI, XII; prekalikrein (PKa), plazminogen (plg), tkáňový a urokinázový aktivátor plazminogenu (tPA, uPA); protein C (PC) a transglutamináza FXIII. Dále jsou to (2) **kofaktory** (látky, které urychlují enzymatické reakce), a to jednak plazmatické: FV, VIII, vysokomolekulární kininogen (HMWK), protein S (PS) a protein Z (PZ), jednak buněčné: tkáňový faktor (TF, dříve tkáňový tromboplastin, faktor III), trombomodulin (TM), endoteliální receptor pro protein C (EPCR). (3) **Fibrinogen** (fbg) je substrát trombinu, jehož účinkem se mění na fibrin (tab. 2.3). (4) Mezi **adhezivní plazmatické proteiny** patří von Willebrandův faktor, fibronectin, vitronectin a další. (5) **Regulační proteiny** (= přirozené inhibitory krevního srážení) se dělí na inhibitory ze skupiny serpinů – antitrombin (AT), heparin kofaktor II (HCII), C1 inhibitor (C1INH), α_2 -antiplazmin, inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1, PAI-2), inhibitor aktivovaného proteinu C (PCI = PAI-3), proteázové inhibitory Kunitzova typu – TFPI, metaloproteinázy (ADAMTS13, TAFI, MMP) a samostatnou skupinu tvoří α_2 -makroglobulin (α_2 MG). Podle účinku sem patří i serinová proteáza protein C a kofaktory protein S a Z (tab. 2.5).

Krevního srážení se dále účastní (6) **fosfolipidy** (PL), estery glycerolu a kyseliny fosforečné, které jsou integrální součástí buněčných membrán. Negativní PL jsou především fosfatidylserin, k neutrálním patří fosfatidyletanolamin. Hlavní funkce PL v organismu je účast na vzniku a přeměně membrán, transport tuku v organismu a poskytování negativně nabitých povrchů pro koagulační reakce. Nezbytné jsou i (7) **ionty minerálů** – vápníkové (Ca^{2+}), hořčíku, zinku a další. Vápníkové ionty jsou potřebné při celé řadě reakcí ve všech systémech hemostázy, jsou nezbytné ve všech reakcích faktorů závislých na vitaminu K. Vyvážením vápníkových iontů dosáhneme nesrážlivé krve.

Tab. 2.3 Plazmatické hemostatické faktory

název	značení/ zkratka	syntéza	koncentrace	poločas/h	mol. hmot. kDa	chrom.	min.akt. %
fibrinogen	FI	játra	2,0–4,0 g/l	72–120	340	4	0,6 g/l
protrombin	FII	játra (vitamin K)	0,1–0,2 g/l	60–96	72	11	40
proakcelerin	FV	játra, mgk	8–14 µg/ml	8–24	330	1	10–15
prokonvertin	FVII	játra (vitamin K)	2–5 µg/ml	4–6	50	13	10
antihemofilický globulin	FVIII	játra a jiné	0,1 µg/ml	8–12	330	X	20–30
antihemofilický faktor	FIX	játra (vitamin K)	3–4 µg/ml	18–30	56	X	20–30
Stuartův-Prowerové faktor	FX	játra (vitamin K)	6–8 µg/ml	30–48	56	13	20
Rosenthalův faktor	FXI	játra	5–7 µg/ml	48–60	160	4	15–20
Hagemanův faktor	FXII	játra	30–40 µg/ml	50–70	80	5	20–30
faktor stabilizující fibrin	FXIII	játra (B), mgk (A)	10–20 µg/ml	72–160	320	1(B), 6(A)	1–2
prekalikrein	PKa	játra	35–50 µg/ml	30–40	90	4	
vysokomolekulární kininogen	HMWK	játra?	60–80 µg/ml	120–150	120	3	
von Willebrandův faktor	VWF	endotelové buňky	10 µg/ml	6	220	12	
proteáza aktivující FVII	FSAP	játra	12 µg/ml		64 kDa	10	
tkáňový faktor	TF	subendotel, fibroblasty			45 kD	1	
plazminogen	plg	játra, eozinofily	200 µg/ml	48–60	90	6	
tkáňový plazminogen aktivátor	tPA	cévní endotel, monocyty, mgk	0,005 µg/ml	5 min	68	8	
urokináza	uPA	ledviny	0,008 µg/ml	6 min	54	10	

2.3.1 Systém koagulačních faktorů

Zástava krvácení je velmi komplexní děj, na kterém se podílí celá řada plazmatických faktorů.

2.3.1.1 Koagulační faktory

▪ Proenzymy – enzymy

S výjimkou FXIII a kofaktorů FV a FVIII, jsou koagulační faktory serinové proteázy, tj. mají v aktivním místě enzymu tzv. katalytickou triádu (aminokyseliny serin, histidin a kyselina aspartamová).

Faktory závislé na vitaminu K

Tzv. K dependentní, potřebují ke své funkci vitamin K, který je nezbytný pro karboxylaci gama glutámového zbytku. Bez karboxylace není faktor schopen vazby na Ca^{2+} a PL. Na vitaminu K závislé faktory jsou při nedostatku vitaminu sice tvořeny, ale nejsou koagulačně aktivní (tzv. PIVKA formy) a zůstávají na úrovni prekurzorů. Zbytky glutaminu neumožňují proteinu vazbu na negativně nabitě fosfolipidy. V hemostáze se uplatňují FII, FVII, FIX, FX, protein C, S a Z.

Základní charakteristiky faktorů a vztahy mezi nimi jsou uvedeny v tabulkách 2.3 a 2.4.

Tab. 2.4 Vztahy mezi koagulačními faktory

faktor	aktivován/štěpen	funkce/aktivuje	Ca^{2+}	degradován
Fbg	trombin, plazmin	krevní koagulum, převod signálů, aktivace trombocytů	–	plazmin
II	protrombináza ($\text{Xa} + \text{Va} + \text{PL} + \text{Ca}^{2+}$)	Fbg, FV, VIII, XI, XIII, trombocyty, TAFI, protein C	ano	AT, HCII, $\alpha_2\text{MG}$
V	trombin, Xa	kofaktor při aktivaci FII	–	trombin, plazmin
VII	TF, TF/VII, FVIIa, FSAP, Xa, XIa, IXa	FX, IX	ano	pouze inhibice komplexu TF/VIIa – TFPI, AT
VIII	trombin, Xa	kofaktor při aktivaci FX	–	trombin, plazmin
IX	FXIa, VIIa	FX	ano	AT
X	TF/VIIa, tenáza ($\text{IXa} + \text{VIIIa} + \text{PL} + \text{Ca}^{2+}$)	FII, V, VIII,	ano	AT, $\alpha_2\text{MG}$
XI	TF/VIIa, IIa, XIIa	IX, HMWK, XII, Aa řetězec fbg, plg	–	nexin proteáz II, AT, C1INH, $\alpha_1\text{AT}$
XII	Ka, trypsin, plazmin, XIa; povrchy	XI, HMWK, PKa	–	C1INH, AT, PAI-1
XIII	trombin	stabilizuje fibrin	ano	
FSAP		FVII, uPA	ano	PAI, $\alpha_2\text{AP}$

Faktor II, proenzym **protrombin** se váže pomocí Ca^{2+} na negativně nabitě PL, kde je štěpen protrombinázou na aktivní formu α trombin. V koagulaci hraje trombin klíčovou roli, podle potřeby působí jak prokoagulačně, tak antikoagulačně. V hemostáze trombin vedle štěpení fibrinogenu katalyzuje v podstatě tři skupiny reakcí, které slouží k regulaci tvorby koagula. První skupina zahrnuje aktivaci buněk (např. trombocyty), které poskytují povrchy pro koagulační reakce. Druhá skupina reakcí slouží k posílení probíhající koagulace a zpevnění vznikajícího koagula (aktivace FV, FVIII, FXIII, FXI). Poslední typ reakcí je naopak nutný k zabránění nadměrnému srážení. Jedná se o reakce vedoucí k inaktivaci kofaktorů krevního srážení (inhibice FVa a FVIIIa cestou aktivovaného proteinu C – APC, přímé štěpení kofaktorů vyšším množstvím trombinu). Do systému fibrinolýzy trombin také zasahuje aktivací TAFI.

Vznik trombinu v místě poranění je explozivní, autoamplifikující se, současně ale vysoce regulovaný proces, který hraje důležitou roli nejen v procesech hemostázy a trombózy, ale i zánětlivé a proliferační odpovědi organismu.

Trombin má vedle enzymatické funkce i funkce neenzymatické – reaguje s fibrinem, váže se na trombomodulin (TM), GP Ib formou nekovalentní vazby, aktivuje PAR receptory.

Trombin moduluje řadu prozánětlivých procesů cestou regulace aktivace trombocytů, exprese leukocytárních adhezivních molekul, chemotaxe leukocytů, produkce protrombotických faktorů endoteliálních buněk. Dále potencuje proliferaci endoteliálních buněk, fibroblastů, zvyšuje uvolňování jiných cytokinů a růstových faktorů. Na endotelu indukuje např. sekreci von Willebrandova faktoru a produkci cytokinů.

Enzymatická aktivita trombinu je kontrolována přirozenými inhibitory, především α_2 -makroglobulinem, dále serpiny AT, heparin kofaktorem II (jako kofaktor působí glykosaminoglykany – GAG).

PAR (protease-activated receptors) přenášejí signály trombinu. Patří do skupiny receptorů spojených se sedmou transmembránovou doménou G proteinu (největší skupina receptorů u savců). Tyto receptory jsou schopné přeměnit extracelulární probíhající proteolytické štěpení v transmembránový signál a tím zprostředkovávají např. trombinem indukovanou vazodilataci, zvyšují cévní permeabilitu a adhezi neutrofilů-endotel.

Faktor VII je faktor s velmi krátkým biologickým poločasem, na druhé straně poločas aktivované formy (2,5 hodiny) je výrazně delší než ostatních aktivních faktorů. Je syntetizován v játrech, lokálně jsou jeho důležitým zdrojem i aktivované monocyty/makrofágy. Faktor VII má i sám proteolytickou aktivitu a je schopen štěpit faktor X. Není dosud popsán inhibitor samotného FVIIa, pouze komplexu TF/FVIIa (TFPI a AT). Aktivita FVII se zvyšuje s věkem a v těhotenství. Prokoagulační aktivita FVII pozitivně koreluje s příjmem tuků v potravě a hladinou sérových lipidů, hlavně triglyceridů.

Aktivní forma **faktoru IX** FIXa je enzymaticky aktivní v komplexu zvaném tenáza (FIXa + FVIIIa + PL (fosfatidylserin) + Ca^{2+}), která aktivuje FX na Xa. FVIIIa je kofaktorem této reakce. FIXa je schopen také zpětně aktivovat za přítomnosti Ca^{2+} a fosfolipidů FVII na VIIa.

Faktor X je ve své aktivní formě Xa in vitro nejmocnější aktivátor FVII. Reakce je významně rychlejší, pokud je FVII navázán na TF. Mimoto FXa v přítomnosti PL a Ca^{2+} aktivuje také FV na Va (i když štěpení je odlišné), je schopen vazby na TM a tak aktivace proteinu C. Inaktivace FXa antitrombinem je v přítomnosti FV, Ca^{2+}

a PL výrazně snížena. Při nedostatečném množství trombinu může FXa tento enzym nahradit, např. v začátcích krevního srážení.

Faktory citlivé k trombinu

Faktor XIII, tzv. fibrin stabilizující faktor, je poslední faktor koagulační kaskády – transglutamináza, který je jediným koagulačním enzymem s cysteinem v aktivním místě. Skládá se ze dvou párů polypeptidů (A a B řetězec). A podjednotka (podj.) je homologní s ostatními transglutaminázami, které zajišťují stabilizaci tkání kovalentně vázanými proteiny. B podj. hraje důležitou roli v regulaci aktivace FXIII. Podjednotky nalézáme v plazmě i samostatně. A podj. je tvořena megakaryocyty a progenitorovými buňkami mononukleárů a je také přítomna v celé řadě tkání (děloha, placenta, prostata, trombocyty, makrofágy) jako α' -dimer. B podj. je tvořena v játrech a v plazmě ji nalézáme buď jako tetramer spolu s A podj., nebo samostatně jako dimer. Struktura FXIII se liší v závislosti na místě tvorby. V destičkách cytoplazmy je FXIII tvořený pouze dvěma A podjednotkami, je uvolňována při aktivaci trombocytů. V plazmě cirkuluje FXIII společně s fibrinogenem a je aktivován trombinem za přítomnosti Ca^{2+} . Po tvorbě fibrinu zůstává B podj. v séru, zatímco A řetězec je vázán ve fibrinové sraženině.

FXIIIa katalyzuje formaci intermolekulárních vazeb mezi různými proteiny jako např. fibrinovými monomery, α_2 -antiplasminem ($\alpha_2\text{AP}$), fibronectinem, kolagenem. Působením na rozpustný fibrin mění nekovalentní vazby na pevné vazby kovalentní (tzv. D-dimery). Navázáním $\alpha_2\text{AP}$ na fibrin chrání koagulum před fibrinolýzou. FXIIIa hraje důležitou úlohu nejen v hemostáze, ale i hojení ran a např. udržení těhotenství.

Do této skupiny lze také zařadit FV, FVIII (viz kofaktory), FXI (viz faktory fáze kontaktu) a další.

Faktory fáze kontaktu

Faktor XII je aktivován kontaktem např. se subendotelovými strukturami při poranění (autoaktivace nebo tzv. aktivace pevnou fází) nebo proteázami (enzymatická fáze). Aktivační povrch může být i sklo, kaolin, elagová kyselina, endotoxiny a jiné. FXIIa aktivuje kromě FXI i prekalikrein a HMWK. Faktor XII zasahuje vedle koagulace především do systémů imunologických. Zvýšená hladina je u žen v těhotenství a po menopauze.

Plazmatický **FXI** cirkuluje v plazmě v komplexu s HMWK a je odlišný od trombocytárního FXI. Je aktivován limitovanou proteolýzou FXIIa (za přítomnosti HMWK), FVIIa a trombinem v přítomnosti negativně nabitých částic. V přítomnosti Ca^{2+} probíhá aktivace rychleji. FXIa i při aktivaci FIX zůstává navázán na HMWK, který jednak stabilizuje vazbu FXIa na povrchy, jednak brání štěpení FXIa. FXIa je schopen také štěpit HMWK, aktivuje FXII, může štěpit A α řetězec fibrinogenu, plazminogen na plazmin. Specifickým inhibítozem FXIa je nexin proteáz II (reakce je urychlována heparinem a Zn^{2+}). FXIa je inhibován také antitrombinem, C1INH a α_1 -antitrypsinem.

Prekalikrein (PKa) je gamaglobulin, v plazmě cirkuluje navázán na HMWK. PKa je aktivován faktorem XIIa nebo XII f na α kalikrein (Ka). Mezi faktory fáze kontaktu je zařazován i vysokomolekulární kininogen (viz kofaktory).

Jiné

FSAP – proteáza aktivující FVII (**factor VII-activating protease**) je nově identifikovaná serinová proteáza, která je silným aktivátorem FVII. Aktivuje také jednořetězovou uPA. Aktivní FSAP je závislá na Ca^{2+} a je inhibována PAI-1 a $\alpha_2\text{AP}$.

▪ Kofaktory

Plazmatické kofaktory

Kininogeny jsou plazmatické proteiny, ze kterých se uvolňují vazoaktivní peptidy (bradykinin). V plazmě se nalézají ve formě **vysokomolekulární** (HMWK) a **nízkomolekulární** (LK). HMWK působí jako kofaktor aktivace na povrch navázaného FXII kalikreinem. HMWK se váže na aktivované trombocyty, na neutrofilů a buňky endotelu. Těžký řetězec HMWK i LK má schopnost inhibovat cysteinové proteázy (kalpain, katepsin L).

Faktor V je homologní s FVIII. Komplex kofaktorů s Ca^{2+} a PL významně zvyšují rychlost aktivace faktorů. FV se nalézá v plazmě a α granulách krevních destiček (asi 20 %). FV je aktivován limitovanou proteolýzou trombinem a FXa (vyžaduje přítomnost PL) za přítomnosti Ca^{2+} . FV může být aktivován i plazminem (bez Ca^{2+}), elastázou neutrofilů, jedem Russelovy zmiže. Inhibitorem FVa je aktivovaný protein C (APC), štěpen může být i plazminem. FVa navázaný na FXa a protrombin je chráněn před účinkem plazminu.

Faktor VIII cirkuluje v plazmě navázan na von Willebrandův faktor (VWF). Z vazby na VWF se uvolňuje kontaktem s PL nebo trombinem. Působením trombinu dochází k limitovanému štěpení FVIII. V přítomnosti PL může být FVIII štěpen i faktorem Xa. Dlouhé působení většího množství trombinu naopak FVIIIa (stejně jako FVa) inaktivuje, dalším inhibitorem je APC za přítomnosti PL, Ca^{2+} , FV a proteinu S. FVIII je syntetizován především v játrech, dále potom např. ve slezině, uzlinách, slinivce, ledvinách. Jako u ostatních proteinů akutní fáze se hladina FVIII zvyšuje při zánětech, ale i chronických infekcích a při stresu.

V koagulační kaskádě působí faktor VIIIa v komplexu s faktorem IXa, PL a Ca^{2+} zvaném „tenáza“. Na VWF je FVIII vázán nekovalentní vazbou a poměr hladiny VWF a FVIII zůstává v plazmě zachován i při změnách hladiny VWF. FVIII v komplexu s VWF je chráněn před biologickým štěpením APC a faktorem Xa. VWF dále lokalizuje FVIII v místě poranění a má efekt kofaktoru při proteolytické aktivaci FVIII trombinem.

Buněčné kofaktory

Tkáňový faktor (TF) je syntetizován plně funkční, nepotřebuje k plnění své funkce proteolytickou modifikaci. Jedná se o integrační transmembránový glykoprotein, který patří do skupiny cytokinových receptorů. Jeho bílkovinná složka je úzce spojena s PL a tato vazba je nutná pro prokoagulační aktivitu TF. TF působí jako buněčný receptor pro FVII a tvorba komplexu s FVII nebo FVIIa zahajuje koagulaci. Tvorba komplexu vyžaduje přítomnost Ca^{2+} . Současně TF zvyšuje afinitu FVIIa k jeho substrátům.

TF se nalézá v organismu na buňkách, které se fyziologicky nedostanou do kontaktu s krví, tj. běžně není přítomen na cévních endoteliích, krevních elementech ani jeho část necirkuluje v plazmě jako tzv. solubilní TF. Tkáňový faktor se do kontaktu s krví dostává v případě porušení nebo poranění cévy, ale může být exprimován i při intaktní cévě, např. při stimulaci endotoxiny, cytokiny (IL-1, TNF) a trombinem, a to jak na

endotelu, tak i na monocytech. Aktivita TF na endotelu může být indukována také imunitními komplexy a lipopolysacharidy.

Mezi buněčné kofaktory také patří **trombomodulin, EPCR, PZ** (blíže v kapitole o systému přirozených inhibitorů).

▪ Fibrinogen (faktor I)

Fibrinogen je fibrilární protein, přítomný jak v plazmě, tak v α granulách trombocytů. Molekula je složena ze tří párů polypeptidových řetězců ($A\alpha$, $B\beta$ a γ). Důležitou úlohu v udržení struktury a stability fibrinogenu hrají Ca^{2+} . Fibrinogen je štěpen buď trombinem na fibrin (obr. 2.3), nebo plazminem na fibrinogen degradační produkty (obr. 2.4 a systémy fibrinolýzy). Kromě toho může být fibrinogen štěpen tzv. trombinu podobnými enzymy (např. hadí jed reptiláza). Jako protein akutní fáze se zvyšuje při zátěžích, jako je poranění, záněty, těhotenství.

Fibrin vzniká působením trombinu na fibrinogen. Je důležitý pro vazbu krevních destiček mezi sebou a přispívá k jejich vazbě na cévní stěnu, která je zprostředkována destičkovými GP a dalšími adhezivními proteiny.

▪ Adhezivní proteiny

Adhezivní proteiny umožňují kontakt buněk mezi sebou navzájem a mezi buňkou a extracelulární matrix (ECM). V hemostáze je nejdůležitější von Willebrandův faktor. Je to adhezivní protein, který je syntetizován výhradně v megakaryocytech a endoteliálních buňkách. Je přítomen v α granulách destiček, plazmě a subendotelu. V endotelu ho můžeme prokázat v tzv. Weibelových-Paladeho tělíscích. VWF patří k největším molekulám v plazmě, tvoří tzv. multimery (VWFm). Nejmenší multimery jsou dimery, největší obsahují i 50–100 podjednotek. Extrémně velké VWFm jsou přítomny v endoteliálních buňkách, subendotelu a destičkách a pouze občas se objeví v krvi. Jsou neefektivnější v procesu adheze destiček a agregace. Malé multimery jsou uvolňovány z endotelu bez stimulace. Každá podjednotka VWF multimeru je schopna vázat jeden heterodimer FVIII. VWF je ihned po uvolnění na buněčném povrchu štěpen ADAMTS13, dále je citlivý na proteolýzu plazminem.

Výrazem koagulační aktivity VWF je aktivita „ristocetinového kofaktoru“ – VWF:RCo, schopnost vazby na kolagen (collagen binding activity – VWF:CBA), případně agregace destiček indukovaná ristocetinem (RIPA). VWF:Ag je zkratka pro antigen. Dřívější označení AHF-like (antihemofilickému globulinu podobný) se již neužívá.

VWF hraje klíčovou roli v primární hemostáze, formaci trombu a koagulaci. Má dvě hlavní funkce: v primární hemostáze a v koagulaci.

V **primární hemostáze** zprostředkovává adhezi trombocytů (kontakt destička-cévní stěna) a agregaci trombocytů. Pro tyto funkce je nutná interakce VWF s destičkovým GP Ib (adheze) a následně s GP IIb/IIIa. Tato vazba vede k rozproštění trombocytů s následnou ireverzibilní destičkovou adhezí a agregací. Tato funkce je závislá na správné struktuře VWFm. Pouze velké multimery jsou schopny plnit funkci v primární hemostáze.

Funkce VWF v **koagulaci** není závislá na velikosti multimerů. VWF jako nosič váže a stabilizuje FVIII. Zabraňuje inaktivaci FVIII aktivovaným proteinem C nebo FXa a lokalizuje FVIII v místě tvorby sraženiny.

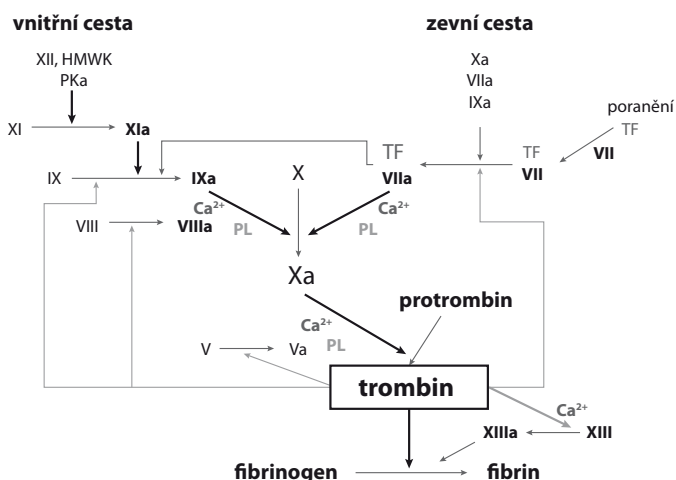
Hladina VWF v plazmě (stejně jako FVIII) závisí na krevní skupině. Nejnížší hladiny mají lidé se skupinou 0 a nejvyšší hladiny byly zjištěny u nositelů skupiny AB. VWF patří k proteinům, které nesou antigeny AB0 krevního systému.

Dalšími adhezivními proteiny jsou např. fibronektin (FN – také řazen mezi strukturální proteiny), který je přítomen v plazmě, subendotelu, α granulách destiček a ECM. Zodpovídá za adhezi buněk, morfologii, migraci, diferenciaci, fagocytózu a hemostázu. Zprostředkovává adhezi destiček a rozptřeni jak v klidových podmínkách, tak za cirkulace. FN podporuje adhezi trombocytů k ostatním povrchům jako kolagenu typu I a III. Vitronektin (VN) je přítomen v cirkulaci a v řadě tkání. VN má ústřední regulační funkci v systému komplementu, koagulace a fibrinolýzy.

2.3.1.2 Vlastní proces koagulace

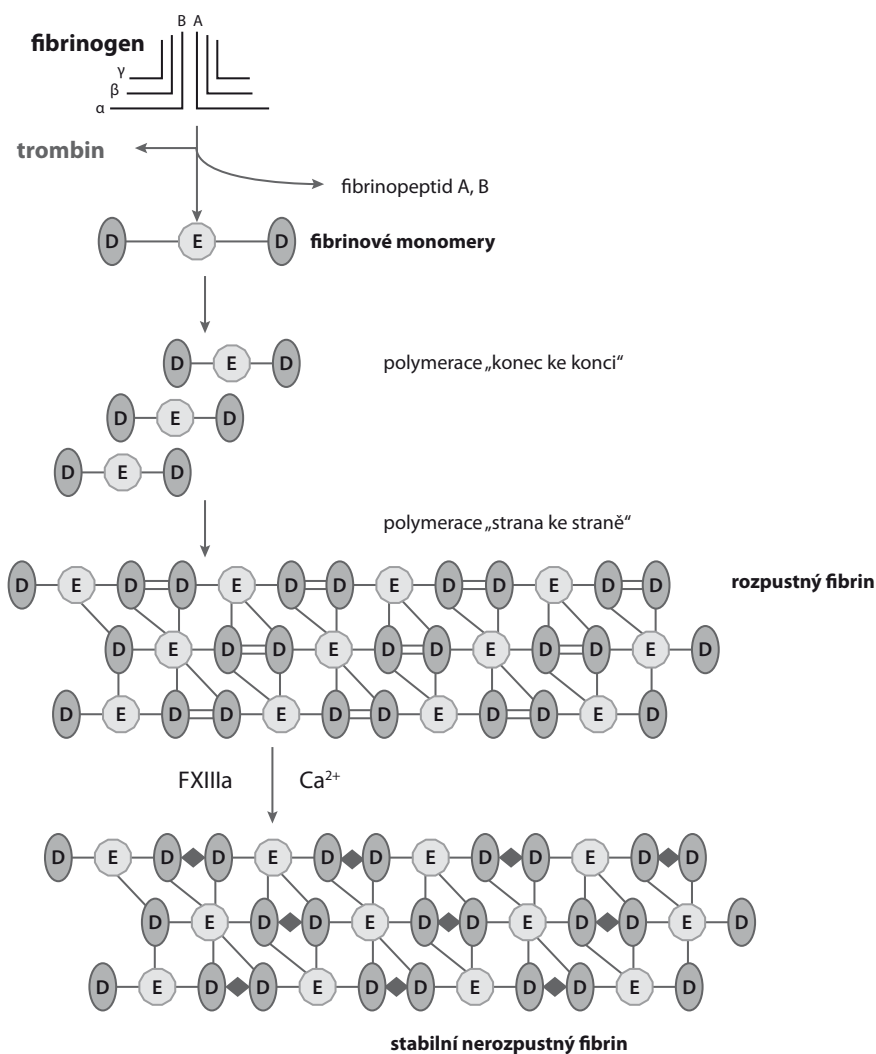
Cílem koagulace je zástava krvácení, tj. generace trombinu a vytvoření pevného fibrinového vlákna. Tohoto je dosaženo postupnou, přesně koordinovanou a regulovanou kaskádovitou enzymatickou reakcí. Při ní jsou faktory, které jsou v krvi přítomny jako neaktivní formy – proenzymy, štěpeny na aktivní formu. Označujeme je jako koagulační faktory a značíme „F“ a římskou číslici, aktivované formy (vlastní enzymy) s malým „a“ (např. FII se aktivuje na FIIa).

Podle teorie publikované v roce 1964 se koagulační kaskáda podle způsobu aktivace dělí na zevní a vnitřní systém, který se spojuje při aktivaci FX na Xa a společně generuje trombin (obr. 2.2). K aktivaci zevního systému je potřeba tkáňový faktor, který se uvolňuje např. v případě poranění, k aktivaci vnitřní cesty dochází kontaktem FXII a FXI s aktivním povrchem (také nazývaná fáze kontaktu), fyziologicky kolagenem obnaženým po poranění. Předpokládalo se, že důležitější je tzv. vnitřní cesta. V devadesátých letech 20. století bylo prokázáno, že primární je zevní cesta a vnitřní cesta je vedlejší a větší význam mají faktory kontaktu v aktivaci systému kalikreinu, kininu a komplementu. Navíc je zřejmé, že koagulační komplexy se tvoří pouze na površích buněk (trombocyty, subendotel, fibroblasty a další).



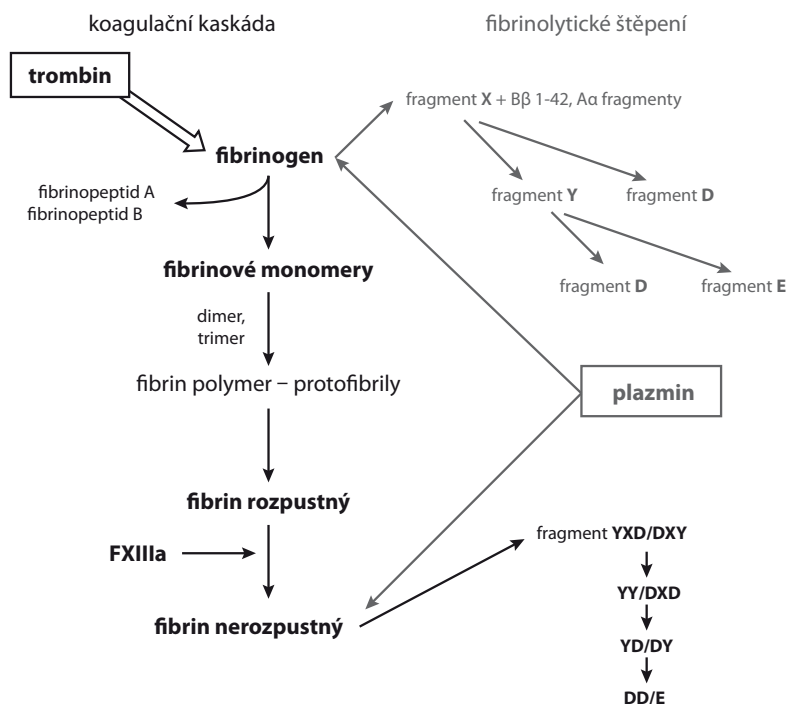
Obr. 2.2 Koagulační kaskáda (HMWK – vysokomolekulární kininogen, PKa – prekalikrein, PL – fosfolipidy, TF – tkáňový faktor, Ca^{2+} – vápníkové ionty)

K aktivaci koagulace dochází poté, co se FVII, který je běžně přítomný ve stopových množstvích krvi, dostane do kontaktu s TF (obr. 2.2). Komplex TF/FVII, případně FVIIa přímo aktivuje FX na Xa (za přítomnosti Ca^{2+}). Komplex TF/FVIIa dále aktivuje i FIX a zasahuje tak i do vnitřní cesty. FXa tedy vzniká jednak přímo aktivací TF/FVIIa, jednak vnitřní cestou komplexem zvaným tenáza: FIXa/VIIIa/PL/ Ca^{2+} . Po aktivaci FXa následuje tvorba komplexu zvaného protrombináza. Tato je fyziologickým aktivátorem protrombinu a je složena z FXa, kofaktoru FVa navázaného na povrch (PL) za přítomnosti Ca^{2+} . Tento komplex štěpí neaktivní protrombin na α trombin a fragmenty protrombinu 1+2 (F1+2). Trombin aktivovaný faktorem Xa, který byl štěpen komplexem TF/FVIIa je důležitý pro aktivaci krevních destiček, včetně uvolnění FVa, uvolňuje FVIII z vazby na VWF, aktivuje FXI. Zatímco trombin vzniklý cestou aktivace faktoru X tenázou štěpí fibrinogen (obr. 2.3).



Obr. 2.3 Formace fibrinu ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, γ – řetězce fibrinogenu)

Trombin je jediným koagulačním enzymem, který je schopen štěpit fibrinogen na fibrin. Působením trombinu (obr. 2.3 a 2.4) dochází k odštěpení fibrinopeptidu A a B (FPA, FPB) z řetězce A α a B β fibrinogenu. Tím se obnaží vazebná místa v centrální E doméně a vznikají fibrinové monomery (FM). Tyto spontánně polymerizují na rozpustný fibrin.



Obr. 2.4 Štěpení fibrinogenu a fibrinu trombinem a plazminem

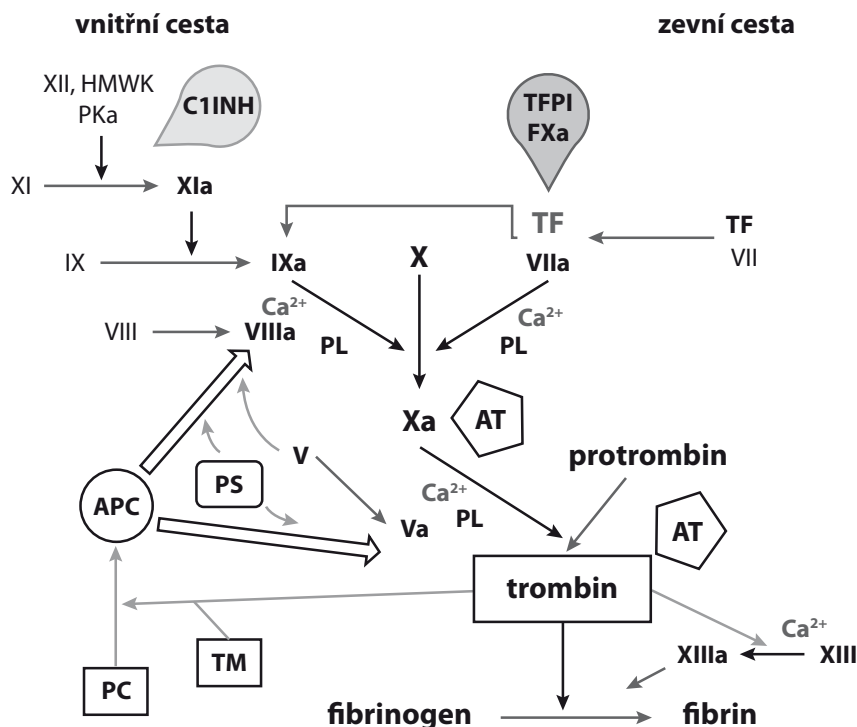
Polymerizace probíhá postupně, jako první se tvoří vlákna jednotlivých konců FM (vazba D domén). Následně vazebná místa E domény reagují s komplementárními místy v řetězce D domény přilehlých FM (polymerizace „side to side“, tj. strana ke straně). Tato nekovalentní interakce probíhá v tzv. E-D kontaktním místě. Prvotní vlákna bývají nazývána protofibrily. Působením FXIIIa na rozpustný fibrin dochází ke vzniku příčných vazeb mezi jednotlivými vlákny v místě D domén a vytvoří se trojrozměrná síť stabilního, nerozpustného fibrinu.

Fibrin zpevní primární destičkové koagulum a vzniká pevná krevní sraženina. Tím je vlastní proces krevního srážení uzavřen.

2.3.2 Systém přirozených inhibitorů

Fyziologicky je i v klidovém stavu v krvi přítomno malé množství aktivních koagulačních faktorů včetně trombinu. K udržení rovnovážného stavu je nutná důsledná regulace, tj. množství generovaných enzymů se musí rovnat množství, které je inaktivováno – toto platí pro FXa a FIIa, v případě FVII je zřejmě hlavním regulačním mechanismem přítomnost či nepřítomnost TF.

Velmi důležitou roli v procesech krevního srážení hrají tzv. regulační proteiny, tj. přirozené inhibitory, jež patří k základním plazmatickým faktorům. V organismu slouží jako jeden ze zpětnovazebných mechanismů k zabránění nekontrolovaného srážení krve a tím k udržení koagulační rovnováhy (tab. 2.5 a obr. 2.5). Vedle inhibitorů v regulaci krevního srážení spolupůsobí i samotné koagulační faktory (trombin, FV, FXa).



Obr. 2.5 Působení přirozených inhibitorů v koagulační kaskádě (APC – aktivovaný protein C, AT – antitrombin, C1INH – C1 inhibitor, HMWK – vysokomolekulární kininogen, PC – protein C, PKa – prekalikrein, PL – fosfolipidy, PS – protein S, TF – tkáňový faktor, TFPI – inhibitor zevní cesty tkáňového faktoru, TM – trombomodulin)

Na začátku našeho století byl pro látky, které inhibovaly trombin, použit název antitrombiny. A byly označovány I–VI. Název zůstal zachován pouze v názvu nejmocnějšího inhibitoru serinových proteáz antitrombinu (dříve antitrombin III – římská číslice se nemusí používat).

2.3.2.1 Serpiny

Inhibitory serinových proteáz serpiny jsou většinou nespecifické inhibitory. Komplex serpin-serinová proteáza je po uvolnění do cirkulace vychytáván v játrech serpinovými receptory. Jsou důležitým regulačním faktorem nejen v systémech hemostázy. V roce 2006 byla vydána klasifikace serpinů (tab. 2.6).

Tab. 2.5 Přírodní inhibitory

název	zkratka	místo tvorby	koncentrace	poločas hod.	mol. hm. kDa	chromo- zom	typ	cílový enzym/ bílkovina
antitrombin	AT	játra, endotel	0,10–0,25 g/l	45–70	62	1	serpin	Ila, Xa
heparin kofaktor II	HCII	endotel	8,0–9,0 µg/ml	–	65	22	serpin	Ila, Xa
C1-inhibitor	CIINH	játra	0,18–0,22 g/l	38–40	105	11	serpin	XIIa, Ka
α_1 -antitrypsin (proteázový inhibitor)	α_1 AT	trombocyty, mgk	1,3–2,5 g/l	90–96	55	14	serpin	Xa, APC
α_2 -antiplazmin	α_2 AP	játra	0,05–0,07 g/l	60	67	18	serpin	plazmin
inhibitor aktivátoru plg-1	PAI-1	endotel, tuková tkáň, trombocyty	0,01 µg/l	–	52	7	serpin	tPA, uPA
inhibitor aktivátoru plg-2	PAI-2	placenta	< 0,005	–	IC – 43; EC – 60	18	serpin	uPA, tPA
inhibitor cesty tkáňového faktoru	TFPI	endotel	0,1 mg/ml	–	33	2	kunin	Xa, TF/VIIa
protein C	PC	játra (vitamin K)	4,0–5,0 µg/ml	5–6	62	2	serinová proteáza	Va, VIIIa
protein S	PS	játra (vitamin K)	0,02–0,04 g/l	60	69	3	kofaktor	Xa, FVIII
trombomodulin	TM	endotel	–	–	75–105	20	kofaktor	Ila, (Xa)
inhibitor aktivovaného proteinu C	PCI	játra	3,0–5,0 µg/ml	–	57	14	serpin	APC, Ka
α_2 -makroglobulin	α_2 MG	trombocyty, endotelo- vé buňky, makrofágy	2,0–2,5 g/l	200–250	725	12	–	Ka, plazmin, IIa
protein Z	PZ	játra (vitamin K)	1,16–2,9 ng/ml	48–72	62	13	kofaktor	komplex s PZI
inhibitor proteáz závislý na PZ ADAMTS13	ZPI	játra	1,0–1,6 µg/ml	48–72	72	14	serpin	FXa, FXIa
inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem	TAFI	játra, endotel, trombocyty játra	1 µg/ml 2,5 µg/ml	–	180–200 60	9 13	metalo- proteináza metalo- proteináza	VWF

Tab. 2.6 Nová klasifikace serpinů (Law et al., 2006)

název	klasifikace	cílová proteáza	kofaktory
AT	<i>SERPINC1</i>	trombin, Xa, IXa	GAG
HCII	<i>SERPIND1</i>	trombin	GAG
ZPI	<i>SERPINA10</i>	Xa, IXa	Ca ²⁺ , PL, PZ
PCI	<i>SERPINA5</i>	trombin, APC, tPA	heparin, TM
α_1 PI	<i>SERPINA1</i>	trombin, APC	–
α_2 AP	<i>SERPINF2</i>	plazmin	–
PAI-1	<i>SERPINE1</i>	tPA, uPA	–

Antitrombin (AT) (tab. 2.5) je protein akutní fáze, jeho poločas v plazmě se za patologických stavů výrazně zkracuje z běžných 45–60 hodin i na méně než tři. AT je přítomný i extravaskulárně a je s plazmatickým v rovnováze. Regulace syntézy AT je navázána na regulaci syntézy fibrinogenu. Při štěpení fibrinogenu při aktivaci koagulace klesá i antitrombin. Proto štěpení fibrinogenu dává signál i k další syntéze AT.

AT působí primárně na endotelu a má širokou antiproteázovou aktivitu, je primárním inhibítozem trombinu. Tvoří ireverzibilní komplex nejen s trombinem, ale i s dalšími serinovými proteázami. Sám je schopen pomalé inhibice FIIa a Xa, za přítomnosti heparinu jako kofaktoru inhibuje i FIXa a v různé míře serinové proteázy vůbec. Není schopen inhibovat samotný FVIIa, ale je důležitým inhibítozem komplexu TF/FVIIa. AT zasahuje i do regulace systému komplementu a působí i protizánětlivě.

Heparin kofaktor II (HCII) je fyziologický, specifický inhibitor trombinu. Je přítomen především na cévním endotelu a fyziologicky má zřejmě pouze lokální význam. Jeho účinek je urychlován heparinem, hlavně však dermatan sulfátem, který také patří do GAG.

C1 inhibitor (C1INH) je nejmocnějším inhibítozem faktorů kontaktu a zasahuje především do systému komplementu (C1s), dále je schopen inhibovat i plazmin. C1INH je syntetizován v játrech. Byl zjištěn kromě v plazmě i v α granulách trombocytů a je uvolňován v průběhu aktivace destiček.

Inhibitor aktivovaného PC (PCI) je přítomen i v řadě tělních tekutin (sliny, mléko, slzy, sperma). Ukázalo se, že je identický s PAI-3. Po vazbě na heparin inhibuje řadu proteáz včetně APC, Ila, Ila v komplexu s TM, FXa, tPA, uPA. Má zřejmě jak prokoagulační tak antikoagulační vlastnosti v závislosti na tom, kterou proteázu inhibuje a který kofaktor je přítomen.

Proteinázový inhibitor závislý na proteinu Z (ZPI) je serpin produkovaný játry. V přítomnosti PZ, Ca²⁺ a PL je rychlým inhibítozem FXa, bez kofaktorů ZPI inhibuje FXIa a tato funkce je cca 2× urychlována heparinem. Předpokládá se, že jeho hlavní funkcí je tlumit koagulační odpověď před vytvořením protrombinázy.

Protein Z (PZ) K dependentní GP, v plazmě cirkuluje v komplexu se ZPI. PZ působí jako kofaktor při inhibici FXa cestou PZI na PL. Při podávání kumarinů klesá koncentrace velmi rychle a na rozdíl od ostatních K dependentních faktorů se snižuje i antigen PZ.

2.3.2.2 Systém proteinu C

Je to přirozená antikoagulační cesta, jejímž cílem je štěpení faktorů Va a VIIIa a tím regulace tvorby sraženiny. Systém tvoří protein C (PC), protein S (PS), trombomodulin (TM), inhibitor aktivovaného proteinu C a receptor pro protein C na endotelu (EPCR).

Aktivace PC probíhá na povrchu cévních endotelií (obr. 2.6 v příloze). Jako ko-faktor této reakce působí specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin. Trombin vázaný na TM již není koagulačně aktivní. Komplex trombin-trombomodulin za přítomnosti Ca^{2+} aktivuje PC. Aktivovaný protein C (APC) za přítomnosti kofaktoru PS inaktivuje FVa, kofaktorem inaktivace FVIIIa je vedle PS i FV. Štěpení obou kofaktorů je inhibováno ceruloplazminem. APC zasahuje rovněž do systému fibrinolýzy – uvolňuje tPA z vazby na PAI-1 (tvoří komplex s PAI-1).

Vzhledem ke svým antikoagulačním a protizánětlivým schopnostem systém proteinu C moduluje obranu organismu na cizí stimulus. Řada studií prokázala, že akutní záněty (hlavně sepse) snižují hladiny proteinu C a proteinu S, tím významně snižují antikoagulační potenciál, tj. schopnost regulovat generaci trombinu. Byl prokázán protizánětlivý účinek PC. APC má protizánětlivé a cytoprotektivní aktivity (antiapoptotické) a ukazuje se, že především protein S zřejmě hraje centrální roli v regulaci zánětu a hemostázy.

Protein C je tvořen v hepatocytech a pravděpodobně i v endotelu. Jeho koncentrace je stejná u mužů i žen a mírně stoupá s věkem. Jeho aktivace probíhá na endotelu. APC má v plazmě poměrně dlouhý poločas (20–30 minut). Protein C může být vedle IIa/TM aktivován také FXa navázaným na TM za přítomnosti negativně nabitých PL, plazminem a hadím jedem Protac. Jeho hlavním inhibitorem je PCI a α_1 -antitrypsin, méně potom působí i $\alpha_2\text{MG}$, $\alpha_2\text{AP}$.

Protein S je uložen v endotelu a α granulách krevních destiček. Asi 40 % PS je v plazmě ve volné formě, zbytek je vázán s C4bBP složkou komplementu. Koncentrace PS je asi o 10–15 % vyšší u mužů, u obou pohlaví stoupá s věkem. PS podporuje vazbu APC na PL. Kofaktorem PC je pouze volný PS. PS nezávisle na APC také přímo inhibuje protrombináza a tenázu a tato funkce je nezávisle na vazbě na C4bBP. Protein S také specificky inhibuje aktivitu TF podporou neutralizace FXa cestou vazby TFPI, urychluje APC zprostředkovanou neutralizací PAI-1 a tím zvyšuje lýzu fibrinové sraženiny. Inhibuje aktivaci TAFI jednak jako kofaktor APC, jednak nezávisle na APC.

C4b vázající protein (C4bBP) je regulační multimerní protein cesty komplementu složený z α řetězců (6–7) a část také s β řetězcem. Pouze forma s β řetězcem reverzibilně váže protein S. Jeden z účinků PS je zprostředkování vazby C4bBP na povrch buněk.

Trombomodulin (TM) je integrální transmembránový GP stále přítomný na cévním endotelu. V hemostáze TM působí třemi způsoby: je kofaktorem pro aktivaci PC trombinem, inhibuje proteolytické působení trombinu, pokud TM v molekule obsahuje galaktozaminoglykan urychluje inaktivaci trombinu antitrombinem. Vazba TM-T nevyžaduje Ca^{2+} . Nízká koncentrace FVa urychluje vazbu PC na TM-T.

EPCR (endoteliální receptor pro protein C) je také transmembránový protein. Je homologní s HLA 1. třídou/CD1 – spolupůsobící v imunitní odpovědi. Zvyšuje aktivaci PC na endotelu, snižuje antikoagulační působení APC.