

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Oddělení klinické hematologie ve FN Motol

Kateřina Klausová

**Detekce funkční poruchy krevních destiček
pomocí přístroje PFA ve srovnání s
klasickou agregometrií**

Bakalářská práce

Praha 2013

Autor práce: Kateřina Klausová

Vedoucí práce: RNDr. Iva Bártů PhD.

Oponent práce: Mgr. Hana Blažková

Datum obhajoby: 23.5.2013

Bibliografický záznam

KLAUSOVÁ, Kateřina. *Detekce funkční poruchy krevních destiček pomocí přístroje PFA ve srovnání s klasickou agregometrií*. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Oddělení klinické hematologie ve FN Motol, 2013, 30 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Iva Bártů PhD.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá korelací výsledků měření funkčních poruch krevních destiček mezi přístrojem PFA a agregometrem. Teoretická část shrnuje proces koagulace od primární hemostázy, přes koagulační kaskádu a fibrinolýzu až po souhrn nejdůležitějších inhibitorů koagulace. Podrobněji se zabývá stavbou a funkcí krevních destiček a jejich úlohou v procesu srážení krve. Tato část práce také obsahuje výčet nejznámějších onemocnění spojených s poruchami trombocytů a zabývá se metodami stanovení těchto krevních elementů

Praktická část této práce popisuje funkci a princip přístroje PFA a agregometru. Tato část práce obsahuje výsledky pacientů, jejichž diagnóza vyžadovala vyšetření na obou zmiňovaných přístrojích. Porovnála jsem, zda výsledky těchto dvou přístrojů odpovídají, zda se vzájemně doplňují a zhodnotila jsem výhody a nevýhody obou přístrojů. Výsledky pacientů poskytlo Oddělení Klinické Hematologie v nemocnici Motol v Praze.

Klíčová slova

krevní destička, trombocyt, funkční porucha, agregace, PFA, agregometr

Annotation

This bachelor work follows up the correlation of measurement results of function defects of platelets between the PFA device and the aggregometer. The theoretical part summarize the process of coagulation from primary haemostatis through the coagulation cascade and fibrinolysis to the summary of the most important coagulation inhibitors. It follows up the structure and function of the platelets and their role in the blood clotting more detailed. This part of work also contains enumeration of the most common diseases linked with the platelet disfunctions and follows up the methods of determinating these blood elements.

The practical part of this work describes the function and the principle of the PFA device and the aggregometer. This part of work contains the results of patients whose diagnosis require testing for both these devices. I compared whether the results of these devices match, whether they complement and I evaluate the advantages and disadvantages of both devices. The results of patients provided the Department of Clinical Haematology Motol hospital in Prague.

Keywords

platelet, trombocyte, malfunction, aggregation, PFA, aggregometer

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedení RNDr. Ivy Bártů PhD., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Kateřina Klausová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce RNDr. Ivě Bártů. PhD. za cenné rady a trpělivý a přátelský přístup při zpracování mojí práce. Děkuji také své rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Obsah

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD

1. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1. MECHANISMUS SRÁŽENÍ KRVE.....	13
1.1.1. FUKCE ENDOTELU V HEMOSTÁZE.....	13
1.1.2. ADHEZIVNÍ PROTEINY.....	14
1.1.3. PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZA.....	14
1.1.4. KOAGULAČNÍ KASKÁDA.....	16
1.1.4.1. Koagulační faktory.....	17
1.1.4.2. Aktivace plazmatického koagulačního systému.....	20
1.1.5. FIBRINOLÝZA.....	20
1.1.6. INHIBITORY HEMOSTÁZY.....	22
1.2. TROMBOCYTY.....	24
1.2.1. STAVBA TROMBOCYTŮ.....	24
1.2.1.1. Periferní oblast trombocytu.....	24
1.2.1.2. Otevřený kanálkový systém.....	26
1.2.1.3. Oblast solubilního gelu.....	26
1.2.1.4. Oblast organel.....	27
1.2.2. VÝVOJ TROMBOCYTŮ.....	28
1.2.2.1. Megakaryoblast.....	28
1.2.2.2. Promegakaryocyt.....	29
1.2.2.3. Megakaryocyt.....	29
1.2.2.4. Regulace vývoje trombocytů.....	29
1.2.3. ÚLOHA TROMBOCYTŮ V PROCESU SRÁŽENÍ KRVE.....	30
1.2.3.1. Aktivace trombocytu.....	31
1.2.3.2. Adheze trombocytu.....	32
1.2.3.3. Agregace trombocytu.....	33
1.3. PORUCHY TROMBOCYTŮ.....	35
1.3.1. PORUCHY KVANTITATIVNÍ.....	36

1.3.2. PORUCHY KVALITATIVNÍ.....	38
1.4. METODY STANOVENÍ TROMBOCYTŮ.....	39
1.4.1. MĚŘENÍ ADHEZE.....	39
1.4.2. MĚŘENÍ RETENCE.....	40
1.4.3. MĚŘENÍ AGREGACE.....	40
1.4.4. MĚŘENÍ LÁTEK UVOLNĚNÝCH Z TROMBOCYTU.....	41
1.4.5. SLEDOVÁNÍ PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZY.....	42
2. CÍLE PRÁCE.....	43
3. METODIKA.....	44
3.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE A REAGENCIE.....	44
3.1.1. PŘÍSTROJ PFA.....	44
3.1.1.1. Charakteristika přístroje.....	44
3.1.1.2. Testovací cartridge.....	46
3.1.1.3. Postup měření.....	47
3.1.2. AGREGOMETR.....	48
3.1.2.1. Charakteristika přístroje.....	48
3.1.2.2. Charakteristika induktorů.....	49
3.1.2.3. Postup měření.....	50
3.2. POUŽITÉ VZORKY PACIENTŮ.....	52
4. VÝSLEDKY.....	53
5. DISKUZE.....	57
ZÁVĚR.....	59
REFERENČNÍ SEZNAM.....	60

Seznam zkratek

ABP	protein vázající aktin
ADP	adenosindifosfát
AGG	ristocetin
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APC	aktivovaný protein C
APC-PCI	komplex aktivovaného proteinu C s inhibítozem proteinu C
APTT	aktivovaný parciální protrombinový čas
ARA	kyselina arachidonová
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
βTG	beta tromboglobulin
C4-bBP	C4 vazebný protein
Ca ²⁺	vápenaté kationty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
C-N	vazba uhlíku a dusíkem
COL	kolagen
CT	closure time
EDRF	oxid dusnatý
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPI	epinefrin
EPO	erythropoetin
FGF	růstový faktor fibroblastů
Gly	glycin
GM-CSF	faktor stimuluující kolonie granulocytů
GMP-140	granule membrane protein 140
GP	glykoprotein

HIT	heparinem indukovaná trombocytopenie
HLA	human leucocyte antigen
HMWK	vysokomolekulární kininogen
ID	identifikační číslo
IgA	imunoglobulin třídy A
IgG	imunoglobulin třídy G
IL	interleukin
LIF	leukemia inhibitory factor
LRG	glykoproteiny bohaté na leucin
P2Y ₁ , P2Y ₁₂	purinergní receptory
PAF	destičkový aktivační faktor
PAI-1	inhibitor plazminového aktivátoru
PAR-1	proteázou aktivovaný receptor
PC	protein C
PDGF	destičkový růstový faktor
PECAM-1	trombocytovo-endotelová adhezivní molekula
PF4	destičkový faktor 4
PFA	analyzátor funkce krevních destiček
PGD ₂	prostaglandin
PGI ₁	prostacyklin
pH	vodíkový exponent
PPP	plazma chudá na destičky
PRP	plazma bohatá na destičky
PT	protrombinový čas
PTA	plasma tromboplastin antecedent
pTGF β	destičkový transformační růstový faktor
RNA	ribonukleová kyselina
SCF	stem cell factor
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TNF	tumor nekrotizující faktor
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA ₂	tromboxan 2

u-PA

urokináza

vWf von

Willebrandův faktor

Úvod

Tématem mé bakalářské práce je porovnání dvou přístrojů, nově zavedeného přístroje PFA a klasického agregometru. Oba přístroje se používají při stanovení funkčních poruch krevních destiček, trombocytopatií, které jsou součástí onemocnění jako je Glanzmannova trombastenie, Bernardův-Soulierův syndrom nebo syndrom Heřmanského-Pudlákův.

Krevní destičky hrají zásadní roli v procesu srážení krve, účastní se především procesu primární hemostázy, při které dochází k jejich aktivaci, adhezi a agregaci a následnému vytvoření primární hemostatické zátky.

Oba zmiňované přístroje simulují proces agregace krevních destiček, ale fungují na odlišném principu. Agregometr využívá simulaci agregace pomocí čtyř induktorů v plazmě bohaté na destičky a výstupem jsou čtyři agregační křivky, každá pro jeden induktor. Přístroj PFA dokáže pracovat s plnou krví a vkládají se do něj jednorázové cartridge již potažené induktorem a výsledkem je jedna křivka, která sleduje uzavření hemostatické zátky v přístroji.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Mechanismus srážení krve

Krev se nachází v cévách, kde koluje v tekutém stavu. Úlohou cévy je chránit krev a oddělovat ji od vnějšího prostředí. Pokud dojde k narušení cévy, nastává proces hemostázy. Tekutá krev se přemění na tuhou krevní sraženinu, aby mohla uzavřít narušenou cévu. Po zhojení rány musí dojít k rozpuštění krevní sraženiny a obnovení tekutosti krve. Hemostáza je tedy schopnost organismu zastavit krvácení.

Mezi základní mechanismy hemostázy řadíme primární hemostázu, plazmatický koagulační systém, systém fibrinolýzy a inhibitory koagulace a fibrinolýzy.

Primární hemostáza je vytvořená zátky z krevních destiček a aktivuje se okamžitě, v řádu sekund. Následuje sekundární hemostáza, kde je vzniklý trombus stabilizován sítí z fibrinu. Důležitou roli v sekundární hemostáze hraje trombin, protože umožňuje polymerizaci fibrinogenu. Koagulační systém se aktivuje v řádu minut. Fibrinolýza je poslední fází procesu srážení krve, dojde k rozpuštění vzniklého trombu a obnovení proudění krve v cévě. Tento proces se děje v řádu hodin. Dochází k proliferaci poškozených tkání a nakonec dojde k úplnému zhojení cévy. V organismu je udržována rovnováha mezi aktivačními a inhibičními procesy a mezi koagulačním a fibrinolytickým systémem. [1, s. 26]

1.1.1. Funkce endotelu v hemostáze

Hemostázy se účastní více složek – cévní stěna, tkáňová složka, trombocyty a plazmatický koagulační systém. Při poškození cévní stěny, hraje nejdůležitější roli její endotel, reaguje s krevními destičkami. Při fyziologických podmínkách je nesmáčivý a tím udržuje tekutost krve, je také schopný vazokonstrikce. Na endotelu se také odehrávají důležité interakce složek hemostázy a sám je také zásobárnou důležitých faktorů, inhibitorů a dalších složek, účastnících se procesu zástavy krvácení. [1, s. 28]

Při poranění se céva smrští a zabrání tak úniku krve z cévního řečiště. Tato reakce je pouze dočasná a umožňuje, aby začaly působit další systémy pro zástavu krvácení. Začíná se tvořit primární hemostatická zátka. [1, s. 29]

Endotel a jeho subendotelové struktury slouží jako bariéra mezi krví a tkáněmi. Syntetizuje prostacyclin, sloužící ke stabilizaci trombocytu a zároveň uvolňuje oxid dusný, který tlumí aktivitu krevních destiček. Endotel také produkuje endonukleázy a je negativně nabitý, aby na něj nemohl přilnout trombocyt. Na hemostáze se endotel podílí aktivací proteinu C, tvorbou heparansulfátů a proteoglykanů a také produkuje TFPI, inhibitor tkáňového faktoru. [2, s. 32]

Poraněná tkáň uvolňuje do okolí ADP, adenosindifosfát, který slouží k vyvolání primární agregace a tkáňový faktor, sloužící k přeměně protrombinu na trombin. [2, s. 32]

1.1.2. Adhezivní proteiny

Hemostázy se účastní několik typů adhezivních proteinů, jako je fibronectin, sloužící k zprostředkování interakcí mezi receptory buněk a složkami extracelulární matrix. Podporuje adhezi trombocytů ke kolagenu. Dalším důležitým adhezivním proteinem je vitronectin, jehož úlohou je regulace procesu koagulace a fibrinolýzy. Ostatními adhezivními proteiny jsou trombospondin, stabilizující hemostatickou zátku a osteonectin a tenascin. [1, s. 30-32; 3 s. 23]

1.1.3. Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces tvorby primární hemostatické zátky. Ta uzavírá místo, kde byla céva narušena a tím se zastaví krvácení. Tohoto procesu se účastní zejména krevní destičky a složky cévy. [1, s. 32]

Krevní destičky v neaktivním stavu kolují volně cévní řečištěm, nereagují na cévní endotel a jsou udržovány v přirozeném tvaru disku. Pokud dojde k poranění cévy, odhalí se její endotel a krevní destičky se přichytí na kolagenní vlákna cévy, dochází k adhezi. Destičky se přichytí pomocí glykoproteinových receptorů typu Ia/IIa/IIIb a Ib/V/IX. Procesu se účastní i spojovací proteiny, kterými jsou von Willebrandův faktor a fibronectin. [2, s. 33]

Adheze destiček a aktivace receptorů je následována aktivací destiček. Krevní destičky změny tvar, granula se přesouvají do centra buňky. Tento děj je provázen také sekreční fází, uvolněním PDGF, destičkového růstového faktoru, PF4, destičkového faktoru 4, β TG, β -tromboglobulinu a fibrinogenu. Aktivují se receptory GP IIb/IIIa. [1 s. 35; 3, s. 20]

Z granul aktivované krevní destičky se secernuje ADP a z kyseliny arachidonové vzniká TXA_2 , tromboxan 2. Díky těmto signálům mezi buňkami jsou aktivovány další destičky. Váží se na receptory destiček a aktivují je. Destičky změny svůj tvar z diskovitého na kulovitý, vytvářejí pseudopodia, aktivují se vazebná místa receptorů GP IIb/IIIa. Krevní destičky se mezi sebou navážou pomocí vWf, vitronectinu a fibrinogenu. Dochází k agregaci, pospojování krevních destiček mezi sebou. [3, s. 21]

Jako první dochází k primární agregaci, která je vyvolána především ADP, uvolněného z poškozených buněk. Sekundární agregace je nevratný proces, vyvolaný uvolněním ADP a TXA_2 z granulí krevních destiček a působením trombospondinu, díky němuž se vytvoří stabilizující můstky mezi jednotlivými destičkami. Vzniká nestabilní trombus. Postupně jsou aktivovány stále další destičky, signál se zesílí a vytvoří se stabilní destičková zátka, nazývaná bílý trombus, která je zpevněna sítí fibrinu. Procesu agregace se dále účastní trombin a kolagenní vlákna poškozené cévy. [1, s. 36]

Primární hemostáza končí uvolněním fosfolipidů z vnitřní části membrány trombocytů a jejich přesunem do vnějších struktur membrány. Díky nim může dojít k polymeraci fibrinu a dochází k jeho nerozpustnosti. Trombocyty se slepují a postupně splynou, tento proces je nazýván viskózní metamorfóza. Trombus se zvětšuje. [1, s. 36]

Během procesu primární hemostázy se aktivuje i TF, tkáňový faktor, uvolněný z poškozených tkání. Na povrchu aktivovaných destiček se vytváří koagulačně aktivní komplexy. Povrch destičky je tak přístupný pro další interakci s faktory, které se účastní koagulace a dojde k tvorbě fibrinové zátky. Do nově vzniklé fibrinové sítě jsou vychytávány erythrocyty a leukocyty a tak se bílý trombus mění na červený. [1, s. 36]

Nejdůležitější úlohu v primární hemostáze hrají glykoproteiny trombocytu, typ Ib/IX, Ia/IIa a IV, dále adhezivní proteiny fibronectin, vitronectin a vWf. Tvorby trombu se účastní především fibrinogen a GP IIb/IIIa, prostaglandiny, trombin a cAMP, cyklická adenosinmonofosfát. Krevní destičky jsou také ovlivňovány plazmatickým koagulačním systémem a naopak. [3, s. 21-25]

1.1.4. Koagulační kaskáda

Koagulační kaskáda je proces zprostředkovaný plazmatickým koagulačním systémem a vede ke vzniku nerozpustného fibrinu. Nejprve se fibrinogen štěpí na fibrin a ten na fibrinové monomery, které následně polymerují. Polymery se spojí navzájem kovalentními vazbami díky působení aktivovaného faktoru XIII, dochází ke vzniku nerozpustného fibrinu. [4, s. 20]

Ve vláknité fibrinové síti se zachycují krevní buňky a vzniká stabilní fibrinová zátka. Plazmatický koagulační systém se sestává z koagulačních faktorů, tvořených v játrech. Strukturně se jedná o glykoproteiny ve formě proenzymů a kofaktorů. Některé z nich ke své činnosti vyžadují přítomnost vitamínu K. Většina koagulačních faktorů se nachází v plazmě v nízkých koncentracích. Výjimku tvoří faktor I - fibrinogen a faktor II - protrombin. Kromě tkáňového faktoru se všechny koagulační faktory vyskytují v plazmě v podobě proenzymu, aby byly funkční, je nutné je proteolyticky naštěpit do formy koagulačně aktivního enzymu. V aktivní formě se nachází v plazmě pouze faktor VII ve velmi nízké koncentraci. Většina tohoto faktoru se nachází také ve formě neaktivní, jako proenzym. [1, s. 38]

Koagulační faktory procházejí během hemostázy strukturními změnami. Faktory II, V, IX, X, XI, XII se řadí mezi serinové proteázy, protože jejich aktivní místo obsahuje serin. Jedná se o hydrolytické enzymy, jejichž účelem je katalýza štěpení vazby C-N, uhlíku a dusíkem. Do této skupiny patří také prekalikrein, plazminogen, t-PA, tkáňový aktivátor plazminogenu u-PA, urokinázu a protein C. [3, s. 26]

Mezi kofaktory řadíme faktory V, VIII a vysokomolekulární kininogen HMWK. Účastní se tvorby koagulačně aktivních komplexů. Fibrinogen slouží jako substrát pro trombin a je jím štěpen. Pokud je faktorů nedostatek nebo vykazují špatnou funkci, dochází k projevům krvácení. Kofaktory mohou být plazmatické, mezi které se řadí faktory V, VIII, HMWK a protein S nebo mohou být navázané na buněčné membrány, jako tkáňový faktor, který již nepotřebuje být dále aktivován. Při aktivaci plazmatických faktorů dochází ke spojení kovalentní vazbou přes vápenaté kationty. [3, s. 38]

Koagulační reakce probíhají většinou na fosfolipidovém povrchu, nikoli volně v plazmě. Povrchy bývají nejčastěji součástí membrány krevních destiček, cévního endotelu nebo subendoteliálních struktur. Reakce mohou probíhat i na mikroparticulích, které se uvolňují z trombocytů. [3, s. 29]

Takto dochází ke vzniku koagulačně aktivních komplexů a ty mohou aktivovat další složky koagulace. Součástí těchto komplexů jsou enzymy, nejčastěji serinové proteázy, substráty, kofaktory, propojené vápenatými můstky, vápenaté kationty a fosfolipidové povrchy. [1, s. 45]

1.1.4.1 Koagulační faktory

Fibrinogen

Fibrinogen, faktor I, je glykoprotein, vyskytující se v plazmě a shromažďovaný v α -granulích trombocytů. Váže na glykoproteinový komplex krevní destičky GP IIb/IIIa a zastává tak úlohu hlavní krevní bílkoviny, působící na agregaci trombocytů. Je také substrátem pro trombin a plazmin. [2, s. 38]

Protrombin

Protrombin je protrombinázou štěpen na trombin, aktivní faktor II. Jeho hlavní funkcí je přeměna fibrinogenu na fibrin, dále se podílí na aktivaci faktorů V a VIII, IX a XIII. Aktivuje rovněž trombocyty a na endotelu působí na tvorbu a sekreci t-PA. Dále také aktivuje protein C a TAFI, trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy, po navázání na trombomodulin. [3, s. 33]

Tkáňový faktor

Faktorem III označujeme tkáňový faktor (TF). Jedná se transmembránový glykoprotein, který nacházíme na povrchu subendoteliálních buněk, fibroblastů a buněk svalových. Je na buňkách exprimován až po aktivaci různými stimuly, jako jsou cytokiny, růstové faktory, IL -1, interleukin 1 nebo TNF, tumor nekrotizující faktor. Tkáňový faktor funguje jako receptor pro aktivovaný faktor VII a následně s ním při přítomnosti Ca^{2+} , vápenatých kationtů vytváří komplex, který aktivuje faktor IX a X. [1, s. 50-53]

Vápenaté kationty

Vápenaté kationty se označují jako faktor IV. Jsou nutné pro uspořádání koagulačně aktivních komplexů vnitřní a vnější tenázy a protrombinázy a podílejí i na tvorbě inhibičních komplexů. [1, s. 53]

Proakcelerin

Faktor V se nazývá proakcelerin. Je obsažen v plazmě a v α -granulích trombocytů. Je aktivován proteolyticky trombinem nebo aktivovaným faktorem X při přítomnosti Ca^{2+} . Faktor V urychluje proteolytické štěpení protrombinu aktivovaným faktorem X. [1, s. 53]

Faktor VI

Název faktor VI se již nepoužívá, označuje některé membránové fosfolipidy ve vnitřní membráně trombocytu. [1, s. 54]

Prokonvertin

Faktor VII, prokonvertin je glykoprotein, nacházející se v cirkulaci ve formě neaktivního zymogenu. Aktivuje se v přítomnosti trombinu, aktivního faktoru IX, X nebo XI. Vytváří komplex s TF na negativně nabitým fosfolipidovém povrchu trombocytů a stává se tak silně enzymaticky aktivním, vytváří tzv. vnější tenázu. Prokonvertin je závislý na vápenatých kationtech a slouží jako katalyzátor aktivace faktorů IX a X. [3, s. 34]

Antihemofilický faktor

Faktor VIII je známý jako antihemofilický faktor A. V plazmě je vázán v komplexu s vWf. Odtud může být uvolněn kontaktem s trombinem nebo fosfolipidy. Aktivuje se proteolyticky trombinem nebo aktivovaným faktorem X v přítomnosti fosfolipidů. Aktivovaný faktor VIII slouží jako kofaktor při vnitřní cestě aktivace protrombinu a při tvorbě vnitřní tenázy. Jeho nedostatek nebo poškozená funkce vede ke vzniku hemofilie A. [3, s. 34]

Christmas faktor

Faktor IX, Christmas faktor je aktivován aktivní formou faktoru XI nebo vnější tenázou. Je součástí vnitřní tenázy, spolu s aktivovaným faktorem VIII, fosfolipidovým povrchem trombocytů a Ca^{2+} . [3, s. 35]

Faktor Stuarta-Prowerové

Faktor X se nazývá faktor Stuarta-Prowerové se aktivuje vnější nebo vnitřní tenázou. Aktivovaný faktor X je součástí protrombinázy, koagulačně aktivního komplexu, sloužící jako katalyzátor přeměny protrombinu na trombin. Faktor X je inaktivován pomocí proteinu Z. [1, s. 58]

Rosenthalův faktor

Faktor XI, plasma tromboplastin antecedent (PTA), nazývaný také Rosenthalův faktor, se nachází v cirkulaci jako neaktivní zymogen, navázaný nekovalentně na HMWK. Adheruje k povrchu krevní destičky a podléhá také silné adhezi na jiné aniontové povrchy, např. sklo, celit, kaolin. K aktivaci faktoru XI dochází proteolýzou, kterou zprostředkuje aktivovaný faktor XII v přítomnosti HMWK a negativně nabitého povrchu. [1, s. 60]

Hagemanův faktor

Faktor XII, Hagemanův faktor se nachází v plazmě i v séru a ve formě zymogenu nereaguje s nepoškozenou cévní stěnou. Při odhalení subendotelových struktur se aktivuje, reaguje i na jiné povrchy – sklo, kaolin, chrupavka, kůže apod. [1, s. 61]

Transglutamináza

Poslední z koagulačních faktorů je faktor XIII, transglutamináza, sloužící ke stabilizaci fibrinu. V plazmě je navázan na fibrinogen, aktivuje se hydrolýzou, katalyzovanou trombinem a podporovanou polymerním fibrinem. [4, s. 30]

Prekalikrein

Mezi faktory můžeme dále zařadit prekalikrein neboli Fletcherův faktor. V plazmě se nachází jak zymogen, navázaní na HMWK. Je aktivován pomocí faktoru XII α nebo β a vzniká tak α -kalikrein. Ten aktivuje faktor XII a zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů. [3, s. 38]

Vysokomolekulární kininogen

Vysokomolekulární kininogen (high molecular weight kininogen – HMWK) se váže na povrch aktivovaných trombocytů, na neutrofilů a endotel. Funkcí kininů je navázání na

poškozenou cévní stěnu společně s faktorem XI a prekalikreinem. HMWK dále slouží jako kofaktor při aktivaci faktoru XII pomocí kalikreinu. [1, s. 64]

1.1.4.2. Aktivace plazmatického koagulačního systému

Plazmatický koagulační systém může být aktivován dvěma cestami. Stejně tak k přeměně protrombinu na trombin může dojít buď vnější cestou, kontaktem aktivovaného faktoru XII s tkáňovým faktorem v případě narušení cévy, nebo cestou vnitřní, kdy reaguje faktor XII se strukturami subendotelu i bez narušení kontinuity cévy. [3, s. 29]

V případě vnější cesty koagulačně aktivní komplex tkáňového faktoru s aktivovaným faktorem VIIa aktivuje koagulaci v místě poškození cévy. Dále aktivuje faktor X a ten vstupuje s aktivovaným faktorem V do komplexu protrombinázy, díky níž se protrombin mění na trombin. Ten aktivuje tvorbu fibrinu z fibrinogenu. Monomery fibrinu polymerují, vniklý polymer je stabilizován aktivovaným faktorem XIII, který se aktivoval trombinem. Dochází ke vzniku nerozpustného fibrinu. Nutná je současná přítomnost vápenatých kationtů a fosfolipidového povrchu. [1, s. 66-70]

Během vnitřní cesty faktor XII aktivuje faktory XI a IX, dochází ke kaskádovité reakci a zesílení původního vyvolávajícího signálu. Aktivují se kofaktory V a VIII. Aktivované faktory VIII a IX vytváří tenázu, díky níž se aktivuje faktor X a ten společně s aktivovaným faktorem V působí na přeměnu protrombinu na trombin. Ten způsobí přeměnu fibrinogenu na fibrin. Monomery fibrinu polymerují, vzniklé polymery jsou stabilizovány aktivovaným faktorem XIII. Fibrin se stává nerozpustným. Vnitřní i vnější cesta tedy vedou k aktivaci faktoru X. Tyto dvě cesty nemohou působit odděleně, vždy jsou propojeny. [4, s. 23-26]

1.1.5. Fibrinolýza

Systém fibrinolýzy slouží k rozpuštění vzniklého fibrinového koagula, které musí být rozpuštěno, aby neomezovalo tok krve. Odbourává nerozpustný fibrin a zprůchodňuje cévu poté, co je rána zahojena. Aktivuje se současně s aktivací trombocytů, proces ale trvá přibližně 2 až 3 dny. Za abnormálních stavů se může tento

několikahodinový proces zkrátit do několika minut. Hyperfibrinolýza se vyznačuje zvýšenou produkcí plazminu, dochází k těžkým krvácivým stavům. Naopak při hypofibrinolýze je funkce některých složek fibrinolytického systému nedostatečná, dochází ke vzniku tromboembolických stavů. [2, s. 51-55]

Hlavní složkou systému fibrinolýzy je plazminogen, z kterého vzniká serinová proteáza plazmin. Vyskytuje se v plazmě a váže na membrány trombocytů, ale i jiných buněk. Na trombocytech se navazuje na receptor GP IIb/IIIa. Plazminogen je aktivován t-PA, a u-PA. Fibrinolytický systém je aktivován přítomností fibrinových vláken. Dochází k navázání plazminogenu na koagulum a poté se aktivuje na plazmin díky aktivátorům, které se uvolňují z endotelu. Plazmin koagulum proteolyticky štěpí a poté je inhibován antiplazminy. Fibrinolýza probíhá je v místě poranění, plazmin vzniká pouze na povrchu koagula. Aktivaci plazminogenu pomocí t-PA urychluje přítomnost fibrinu.

[4, s. 48]

Aktivátory plazminogenu se dělí na vnitřní a vnější. Vnitřní se nacházejí v krevní plazmě a jsou to především faktor XII, prekalkrein a HMWK. Patří mezi ně také trombin a trypsin. K aktivaci dochází při kontaktu faktoru XII s poškozenou stěnou cévy.

Vnější aktivátory plazminogenu pochází z organismu, ale nikoli z krevního oběhu.

Systém fibrinolýzy se aktivuje hned poté, co se vytvoří fibrin. Na jeho povrch se naváže t-PA a plazminogen. Společně vytvoří komplex a z plazminogenu tak vzniká plazmin, fibrin se této reakce účastní jako kofaktor. Plazmin začne štěpit koagulum na fibrin degradační produkty. Reakce je zesílena zpětnou vazbou. Koncové řetězce degradovaného fibrinu váží další plazminogen a t-PA, vzniká tak více plazmin a zesílí se účinnost fibrinolytického procesu. [1, s. 89-90]

Plazmin je proteolytický enzym, jeho hlavní funkcí je štěpení fibrinu, rozpuštění krevního koagula. Štěpí ale i fibrinogen, faktor II, V, VIII, glykoproteiny Ib, IIb/IIIa, vWf a trombospondin. Dále slouží k aktivaci faktorů VII a XII, působí na agregaci destiček a aktivuje některé části komplementu. [3, s. 45-48]

Aktivátory plazminogenu mají své inhibitory. Patří mezi ně PAI-1, inhibitor plazminového aktivátoru, a α_2 -antiplazmin, což jsou inhibitory serinových proteáz, nazývané také serpiny. [4, s. 49-50]

1.1.6. Inhibitory hemostázy

Inhibitory hemostázy slouží jako základní regulační mechanismus koagulace, chrání tak organismus před nadměrnou koagulací. Během koagulační kaskády dochází k zesílení prvotního signálu, což by bez regulace mohl vést k nekontrolovatelnému srážení krve, ucpání cév až úmrtí organismu. Proto je nutné, aby byla udržována hemokoagulační rovnováha díky působení inhibitorů krevního srážení. Ty se vyskytují přirozeně v cirkulaci a pomocí antikoagulačních mechanismů tlumí účinek koagulačního a fibrinolytického systému. Inhibitory mohou být přirozené i získané. Díky přirozeným inhibitorům nejčastěji dochází k inhibici serinových proteáz a kofaktorů těchto proteáz. Přirozené inhibitory mohou být i nespecifické. Mezi získané inhibitory řadíme serpiny a kuniny. [1, s. 98-99]

Všechny inhibitory jsou obsaženy v plazmě. Hlavními inhibitory hemostázy jsou antitrombin, systém proteinu C a TAFI, trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy. Jejich změněné hladiny představují zvýšené riziko vzniku trombózy.

[1, s. 105; 4, s 40-51]

Inhibitory plazmatického koagulačního systému

Antitrombin a α_2 -makroglobulin jsou hlavními inhibitory plazmatického koagulačního systému. Protože se trombin během procesu koagulace vytváří v nadbytku, musí být po skončení procesu srážení krve rychle vyváznut, aby se krev dále nesrážela. [3, s. 54]

Antitrombin je nejúčinnější látka, která je schopna vyvazovat trombin. Jeho aktivita se zvyšuje v přítomnosti heparinu. Syntéza antitrombinu je zahájena díky štěpení fibrinogenu. S trombinem vytváří neaktivní komplex, který je následně degradován v játrech. Antitrombin může vyvazovat i faktor X a další složky koagulačního systému, s kterými vytváří neaktivní komplexy. [1, s. 99-104]

Dalším inhibitorem plazmatického koagulačního systému je heparinový kofaktor II. Inhibuje trombin, ale na rozdíl od antitrombinu nepůsobí na jiné složky koagulace, je tedy trombin-specifickým inhibitorem. Jeho aktivita se zvyšuje v přítomnosti heparinu, heparansulfátu, dermatansulfátu a jiných glykosaminoglykanů. [1, s. 104-105]

Dalším inhibitorem je systém proteinu C. Sestává se z proteinu C, proteinu S a trombomodulinu. Protein C je glykoprotein, vznikající v játrech za přítomnosti vitamínu K. Jedná se proenzym serinové proteázy. Aktivuje se nejčastěji na povrchu endotelu

cév, kde je vázán receptor trombomodulin. Ten navazuje trombin a vzniká komplex, který již není koagulačně aktivní. Tento komplex slouží k aktivaci proteinu C. Aktivovaný protein C, APC, má úzkou specifitu, inaktivuje faktory V a VIII v přítomnosti fosfolipidů a vápenatých kationtů a tím snižuje tvorbu dalšího trombinu. Tím se zmírní produkce tenázy a protrombinázy a potlačí se proces koagulace. Jako kofaktor zde působí protein S. [3, s. 56-58]

Protein S vzniká rovněž v játrech za přítomnosti vitamínu K. Velká část proteinu S se nachází v α -granulích krevních destiček a v endotelu. Odtud může být uvolněn působením protrombinázy a tenázy. Protein S se za účasti vápenatých kationtů váže na fosfolipidové povrchy. Slouží jako kofaktor APC, usnadňuje jeho vazbu na povrch trombocytů a endotelií. [3, s. 58]

Trombomodulin se nachází na endotelu cév a váže trombin. Ten ztratí svůj účinek na koagulaci a naopak se začne vytvářet inhibitor protein C. Hladina trombomodulinu slouží jako marker cévního poškození, protože se z odhaleného endotelu uvolňuje do krve. Trombomodulin slouží jako kofaktor pro aktivaci proteinu C trombinem. V komplexu s trombinem aktivuje faktory V, VIII, XIII a trombocyty. [1, s. 113]

Inhibitor tkáňového faktoru, TFPI, syntetizují buňky endotelu a do krve se uvolňuje současně s tkáňovým faktorem. inhibuje vnější cestu koagulačního systému, zejména komplex faktoru VII a s tkáňovým faktorem. Přímou inhibuje faktor X a společně s ním, tkáňovým faktorem a faktorem VIII vytváří neaktivní komplex. [4, s. 39-40]

Inhibitory fibrinolýzy

Mezi inhibitory fibrinolýzy řadíme α_1 -antiplazmin, glykoprotein, tvořící se v játrech a inhibující serinové proteázy. Vyvazuje z plazmy volný plazmin. Pokud je plazmin navázaný na fibrin, α_1 - antiplazmin už ho téměř vyvázat nemůže. Další jeho funkcí je inhibice navázání plazminogenu na fibrin a může štěpit faktory X, XI, XII, kalikrein, plazmin, t-PA a u-PA. Inhibitory aktivátorů plazminogenu, PAI, inhibují tkáňový aktivátor plazminogenu, t-PA. [1, s. 116-117]

Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy, TAFI hraje důležitou úlohu v propojení prokoagulačních, antikoagulačních a fibrinolytických procesů. TAFI snižuje tvorbu trombinu díky jeho vyvázání do komplexu s trombomodulinem. Tato reakce probíhá při vysoké koncentraci trombomodulinu. Při jeho nízké koncentraci jeho aktivace TAFI ovlivňována komplexem trombinu s trombomodulinem a dochází tak ke snížení

fibrinolytického efektu. TAFI je inhibován proteolytickým štěpením trombinem. [1, s. 118-123]

Mezi inhibitory proteáz s nescifickými vazbami řadíme α_1 -antitrypsin, α_2 -makroglobulin a C1-inhibitor, který je nesilnějším inhibitorem v kontaktní fázi a podílí se na inhibici faktorů XI, XII a také kalikreinu a plazmin. [1, s. 124; 4 s. 41]

Získané inhibitory řadíme mezi patologické nálezy, které do koagulace zasahují nepříznivě. Řadíme mezi ně antifosfolipidové protilátky, lupus antikoagulans a antikardiolipidové protilátky. [1, s. 125-129]

1.2. Trombocyty

1.2.1. Stavba trombocytů

Krevní destičky nemají jádro, jsou tedy stejně jako erytrocyty řazeny mezi tzv. neúplné, bezjaderné buňky. Trombocyt má citlivou membránu, která reaguje na změnu metabolických procesů destičky. Tvar destičky se změní při její aktivaci. V elektronovém mikroskopu můžeme v krevní destičce pozorovat tyto mikrostruktury: granula, mitochondrie, otevřený kanálkový systém, denzní tělíska, denzní tubulární systém a další struktury. Krevní destičku můžeme rozdělit na čtyři části – periferní oblast, otevřený kanálkový systém, oblast solubilního gelu a oblast organel.

[5, s. 381]

1.2.1.1. Periferní oblast trombocytu

V periferní oblasti nacházíme plazmatický obal, glykokalyx, membránové a submembránové struktury. Zde probíhají metabolické pochody, když se destička dostane do kontaktu s extracelulárním prostředím. [6, s. 17]

Plazmatický obal krevní destičky vzniká adsorpcí malého množství plazmatických bílkovin na její povrch. Je tvořen albuminem, fibrinogenem, plazmatickými koagulačními činiteli a vápníkovými kationty. Plazmatický obal hraje důležitou úlohu v přilnavosti trombocytu a v dalších jeho interakcích. [6, s. 17-21]

Membrána krevní destičky je silná asi 6 až 10 μm a svým složením se příliš neliší od membrán ostatních krvinek. Liší se pouze vchlípeninami do nitra destiček, které tvoří otevřený kanálkový systém. Trombocytární membrána se sestává z 57 % bílkovin a to zejména aktinu, myozinu, tropomyozinu a jiných kontraktilních bílkovin. Dále zde nacházíme enzymy a buněčné receptory. Lipidy tvoří 35 % membrány trombocytu. Jsou to zejména lipoproteiny, cholesterol a glykolipidy. Poslední složkou této membrány jsou sacharidy. Tvoří 8 % membrány trombocytu a jsou to především glykoproteiny, glykolipidy, glukosaminy a mukopolysacharidy. [6, s. 18-19]

Membrána samotná je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů, přičemž fosfatidyleatnolamin a fosfatidylserin, fosfolipidy s negativním nábojem, jsou v klidovém stavu ve vnitřní části dvojvrstvy. Fosfolipidy mají schopnost difuze a jsou schopny po aktivaci trombocytu přetočit dvojvrstvu membrány tzv. flip – flopem. Důležitou složkou membrány je cholesterol, jehož koncentrace je v zevním listu membrány dvakrát vyšší než ve vnitřním. Cholesterol má význam pro permeabilitu a fluiditu membrány a ovlivňuje transport přes membránu. [7, s. 4; 6 s. 108]

Další složkou membrány jsou transmembránové proteiny, které přenáší látky a signály přes membránu. Signály jsou zachyceny membránovými receptory. Mnoho biologických procesů zprostředkovávají glykoproteiny. Je jich více než padesát a značí se římskými číslicemi a malými písmeny. Kromě těchto receptorů má destička na svém povrchu i další receptory, sloužící k navázání stimulačních a aktivačních látek. Hlavními receptory na povrchu trombocytu jsou integriny, obzvláště GP IIb/IIIa, a GP Ia/IIa, dále glykoproteiny bohaté na leucin (LRG) a to GP Ib/IX, zprostředkovávající adhezi trombocytů na endotel. Důležitými receptory jsou i selektiny, které zprostředkovávají interakci trombocytů a endotelu s leukocyty. Jedná se zejména o selektin GMP-140, granule membrane protein 140, který se uvolňuje z trombocytů po jejich aktivaci. Poslední skupinou receptorů jsou imunoglobuliny PECAM-1, trombocyto-endotelové adhezivní molekuly, a proteiny neznámé funkce, nazývané quadraspaniny. Na povrchu trombocytu nalézáme i různé antigeny. Mohou být společné s jinými buňkami anebo specifické pro krevní destičky. Na povrch trombocytů se nalézají antigeny HLA I. třídy. HLA antigeny II. třídy se na destičkách nevyskytují. Z krevních systémů erytrocytů je součástí destiček pouze systém AB0. Na povrchu membrány se nalézá glykokalyx. Je to obal silný 10 až 50 nm a zasahuje o do kanálkového systému. Je tvořen hlavně glykoproteiny a z části i glykolipidy.

[7, s. 30-37]

1.2.1.2. Otevřený kanálkový systém

Otevřený kanálkový systém je tvořen vychlípeninami destičkové membrány. Jedná se o síť kanálků s průměrem 200 až 300 nm, procházející cytoplazmou. Kanálky jsou propojeny navzájem a současně i s denzním tubulárním systémem. Kanálkový systém nacházíme v aktivovaných i neaktivovaných trombocytech. Slouží k zvětšování povrchu destičky a urychluje transport. Pomáhá i při vyplavení granul na povrchu buňky. Jeho další funkcí je také vychytávání tekutých látek z okolí krevní destičky.

[6, s. 21]

Denzní tubulární systém funguje jako hladké endoplazmatické retikulum. Vypadá jako síť dlouhých kanálků a neobsahuje ribozomy. V denzním tubulárním systému jsou uloženy enzymy k syntéze prostaglandinů a některých bílkovin – např. enzymy cyklu kyseliny arachidonové. Další funkce je zásoba vápenatých kationtů, které denzní tubulární systém přesouvá v buňce a aktivuje kontraktilní systém. [7, s. 6-7]

1.2.1.3. Oblast solubilního gelu

Oblast solubilního gelu je tvořena viskózní matrix, obsahující fibrilární proteiny. Vyskytují se zde mikrotubuly, submembránová filamenta a mikrofilamenta, proteinové podjednotky s polymerizovanými vlákny. Tyto struktury vytváří kontraktilní systém destičky. [6, s. 21-23]

Kontraktilní systém trombocytu je složen z vláknitých struktur, které jsou v různém stupni polymerizace. Nazýváme ho cytoskelet. Slouží k udržení diskoidního tvaru trombocytu, tvoří pseudopodia, podílí se na vnitřní sekreci a kontrakci a také na aktivaci a změně tvaru krevní destičky. Soustava cytoskeletu je složena z fibrilárních elementů, uložených v cytoplazmě mezi organelami. Cytoskelet udržuje organely na místě, a jeho základní funkcí je transformace chemické energie v kinetickou. [7, s. 7-8]

Dvěma základními strukturami cytoskeletu jsou mikrotubuly a mikrofilameta. Střední filamenta se v trombocytech nevyskytují. Nejdůležitější částí filament je aktin, který je v klidové fázi v monomerní struktuře, po aktivaci dochází k polymeraci. Další součástí mikrofilament je profilin, protein vázající monomery aktinu a zabraňující tím jeho polymeraci. Tímto vzniká komplex těchto dvou proteinů, nazývaný profilaktin. Protein profilin slouží i k regulaci metabolických procesů v buňce. Do skupiny mikrofilament se řadí i protein vázající aktin (ABP), který slouží k navázání aktinu za tvorby gelu.

V cytoplazmě trombocytů v klidu nacházíme myozin, sloužící ke kontrakci sítě mikrofilament. Aktinmyozinový komplex je základní hybná jednotka mikrofilament. Mikrofilamenta slouží ke změně tvaru krevních destiček a podílí se na vytváření pseudopodií. Systém mikrofilament je řízen obsazením membránových receptorů. Dalšími proteiny mikrofilament jsou spektrin, gelsolin, tropomyozin, kaldesmon a talin. U tubulů slouží jako základní jednotka mikrotubulin, protein polymerizovaný do trubičkovitého tvaru. Mikrotubuly jsou složeny z 8 až 24 kruhových útvarů o průměru 25 nm. Pokud je destička v klidovém stadiu, mikrotubuly leží na obvodu pod plazmatickou membránou. Zde jsou drženy vlákna aktinu. Pokud dojde ke stimulaci trombocytu, potlačí se tvorba mikrotubulů a prstenec se naruší. Úlohou mikrotubulů je udržení tvaru destičky, přesun granulí a sekrece jejich obsahu. Schopnost kontrakce zajišťují mikrotubulům mikrofilamenta. [6, s. 22]

1.2.1.4. Oblast organel

V oblasti organel se nachází denzní granula, další, méně hustá tělíska (lysozomy, peroxizomy, alfa – granule) a mitochondrie. Granul trombocytů je v cytoplazmě několik typů. Jsou to granula sekreční nebo skladovací a jsou ohraničena membránou. Pokud je destička neaktivní, jsou granula volně rozptýlena. Při aktivaci se seskupují do středu destičky. Látky z granul se uvolňují do okolí. V jednom trombocytu nacházíme 6 až 8 granul denzních, mají průměr 80 až 150 nm a obsahují ATP, ADP, vápenaté kationty a serotonin. Ten je vychytáván krevními destičkami z plazmy. Hlavní zdroj serotoninu je střevní sliznice. Serotonin vyvolává vazokonstrikci. [6, s. 23-24]

Dále trombocyt obsahuje 10 až 15 α -granulí. Mají průměr 150 až 300 nm a nacházejí se v nich proteiny, které se tvoří při vývoji megakaryocytu – PF4, β -TG a vWf. Dále v nich jsou proteiny absorbované z plazmy megakaryocytu pomocí endocytózy – albumin, fibrinogen, IgA, IgG. Poslední složkou α -granulí jsou složky receptoru GP IIb/IIIa, složky membrány granulí, které se po vyplavení fixují na povrch krevní destičky. Dalšími organelami jsou lysozomy, o průměru 170 až 200 nm, které obsahují hydrolytické enzymy, β -glukoronidázu a kyselou fosfatázu. Tyto složky jsou secernovány po aktivaci krevní destičky pomocí trombinu nebo kolagenu. Poslední složkou jsou peroxizomy obsahující glutathionperoxidázu. [8, s. 439-440]

V cytoplazmě trombocytů nacházíme také růstové faktory – PDGF – destičkový růstový faktor, pTGF β – destičkový transformační růstový faktor a EGF – epidermální růstový faktor. [6, s. 24]

Mitochondrie, další významné organely, fungují jako energetické centrum buňky. energii získávají díky oxidativní fosforylaci. V mitochondriích probíhá také syntéza některých proteinů pro činnost trombocytu – destičkový činitel 4 PF4, β -TG a destičkový aktivační faktor PAF. Další funkcí mitochondrií je vychytávání volného vápníku. [6, s. 24]

1.2.2. Vývoj trombocytů

Trombocyty vznikají odštěpováním nebo fragmentací cytoplazmy megakaryocytů. Tento proces probíhá v kostní dřeni. Poté, co se vyplaví z místa svého vzniku, kostní dřeně, jsou zadržovány ve slezině jeden až dva dny. V krevním oběhu přežívají trombocyty za běžných podmínek 8 až 14 dní. Poté jsou odbourány mononukleárním fagocytárním systémem ve slezině, kostní dřeni a játrech. [9, s. 152]

Mladé trombocyty jsou nazývány retikulotrombocyty. Obsahují zbytky RNA a jejich zvýšený počet nacházíme u trombocytopenií, vyvolaných sníženým přežíváním trombocytů. [6, s. 104]

Megakaryocyty, z jejichž cytoplazmy se odštěpují trombocyty, vznikají stejně jako ostatní buňky kostní dřeně z pluripotentní buňky kmenové. Tato buňka se díky působením různých růstových faktorů stává unipotentní pro megakaryocytární řadu. [9, s. 152]

1.2.2.1 Megakaryoblast

Megakaryoblast je první morfologicky rozlišitelnou buňkou. Je velký přibližně 20 μm , má centrálně uložené kulaté až ledvinovité jádro a více jadérek. Chromatin megakaryoblastu není příliš hustý, cytoplazma tvoří úzký lem okolo jádra, které vyplňuje většinu buňky. Je středně bazofilní a neobsahuje cytoplazmatické granula. Tato buňka je většinou diploidní a podstupuje několik atypických mitóz. Při této opakované mitóze dojde k zmnožení jaderného materiálu (polyploidie), buňka se ale prozatím nedělí. [9, s. 153]

1.2.2.2. Promegakaryocyt

Dalším vývojovým stadiem megakaryoblastu je promegakaryocyt. Je velký přibližně 30 μm , jeho jádro má jen zářez naznačující rozdělení na více laloků a neobsahuje jadérka. Chromatin promegakaryocytu se barví červenofialově. Cytoplazma promegakaryocytu se barví bazofilně a neobsahuje granula. [9, s. 153-154]

1.2.2.3. Megakaryocyt

Poslední fází vývoje je megakaryocyt. Megakaryocyt se dále nedělí, pouze vyzrává. Je velký 40 až 70 μm , jádro má více laloků díky polyploidii. Je členité a má nepravidelný obrys. Megakaryocyt obsahuje hustý chromatin a jeho cytoplazma je růžová až růzovofialová a nacházejí se v ní glykoproteiny a azurofilní granula. V periferní části je fragmentovaná, což značí, že je připravena k odštěpení krevních destiček. Na obvodu zralých megakaryocytů pak můžeme pozorovat nahlučení uvolňujících se destiček. [10, s. 23]

Z megakaryocytů destičky vznikají buď přímým rozpadem megakaryocytu, nebo tvorbou pseudopodií, následovanou fragmentací. Megakaryocyt může vytvořit trombocyt, když je minimálně oktaploidní. Z jednoho zralého megakaryocytu se může vytvořit dva až čtyři tisíce trombocytů. [9, s. 154]

Megakaryocyty nacházíme za fyziologických podmínek pouze v kostní dřeni, nikoliv v periferní krvi. V případě některých onemocnění (např. chronická myeloidní leukemie) se mohou megakaryocyty objevit i v obvodové krvi. [9, s. 154]

Zvýšení počtu megakaryocytů v kostní dřeni nastává u některých druhů idiopatických trombocytopenií. Snížení jejich počtu, až úplné vymizení megakaryocytů se vyskytuje u dřeňového útlumu. U perniciozní anémie nacházíme hypersegmentaci jádra megakaryocytu. U vrozených trombocytopenií pozorujeme převahu méně zralých forem. [11, s.39; 139]

1.2.2.4. Regulace vývoje trombocytů

Tvorba krevních destiček je přísně regulována, především trombopoetinem. Jedná se o specifický růstový faktor pro trombopoézu o 332 aminokyselinách, jehož N-terminální část je na 23% shodná a na 50% příbuzná erythropoetinu. Gen pro lidský

trombopoetin leží na dlouhém raménku 3. chromozomu. Trombopoetin dále nalézáme v ledvinách, hladkém svalstvu, v kostní dřeni a slezině. Na regulaci trombopoézy se podílí cytokiny IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů), EPO (erythropoetin), růstový faktor fibroblastů (FGF – fibroblast growth factor), SCF – stem cell factor, LIF – leukemia inhibitory factor. Stimulem k tvorbě krevních destiček je pokles jejich celkového počtu. Aktivace trombopoézy se skládá ze dvou stupňů – proliferace a následné vyzrávání megakaryocytů. Poté následuje inhibice trombopoézy. [9, s. 154-156]

1.2.3. Úloha trombocytů v procesu srážení krve

Krevní destička je za normálních podmínek součástí krve a je obklopena mimobuněčnou tekutinou. Podléhá různým interakcím s narušeným endotelem a s rozpustnými složkami krve. Tímto se destička aktivuje, změní se její tvar a metabolismus. [6, s. 103]

Úlohou trombocytu je kromě hlavní role v primární hemostáze zprostředkování interakcí mezi krví a endotelem cévní stěny. Krevní destička má povrch složený z fosfolipidů, kde se mohou K-dependentní koagulační faktory navázat přes můstky vápenatých kationtů. Po aktivaci trombocytů se aktivují specifické receptory, jako je selektin, uvolněný z α -granulí destiček. Vzájemný kontakt mezi trombocyty způsobuje reakce v leukocytech, které poté produkují cytokiny a adhezivní proteiny. Destičky stimulují i buňky endotelu, které mohou být rovněž aktivovány koagulačními faktory, IL-1 nebo TNF. [6, s. 103]

Trombocyty zastávají v organismu více funkcí. Jejich hlavní úlohou je zástava krvácení, kde se účastní zejména tvorby primární hemostatické zátky, a dále aktivace plazmatických koagulačních faktorů. Mají ale také vliv na správnou funkci buněk endotelu a vykazují i aktivitu fagocytární. [3, s. 19]

Krevní destičky, které se pohybují v cirkulující krvi, mají různou velikost, tvar a hustotu. Jsou to nejmenší částice v krvi, nemají jádro, mají tvar oválných disků a průměr 1,5 až 3,5 μm . Mladší a starší trombocyty se od sebe odlišují. Mladší trombocyty jsou větší, mají jinou strukturu, jiný metabolismus a také více funkcí. Jejich cytoplazma je hustší a má více vazebných míst. Mladší krevní destičky mají také více

granul, obsahujících serotonin. Starší destičky jsou menší a méně funkční. Mají sníženou denzitu a nižší aktivitu nitrobuňčných procesů. [6, s. 103]

1.2.3.1. Aktivace trombocytu

Destička může být aktivována intracelulárně nebo extracelulárně. Změny funkce destičky vyvolávají stimuly řazené do různých skupin. Může se aktivovat kontaktem se subendotelem, např. při poškození cévní stěny nebo látkami, nazývanými aktivátory, které se vyplaví do krevního oběhu. Krevní destičky mohou po aktivaci reagovat i s dalšími buňkami – leukocyty, aktivovanými subendotelovými buňkami apod. V organismu jsou destičky aktivovány silnými aktivátory – trombinem a kolagenem. Aktivace je komplexní proces a podílí se na ní více procesů – např. aktivace fosfolipázy C, cyklus kyseliny arachidonové a mobilizace vápníkových kationtů. [3, s. 20]

Mezi silné agonisty je řazen trombin, kolagen, prostaglandiny, endoperoxidy, TXA_2 (tromboxan 2) a PAF. Mírní agonisté jsou ADP, vasopresin a serotonin. Účinek těchto agonistů se projeví až po sekreci granul trombocytů. Mezi agonisty slabé řadíme adrenalin a antagonisté jsou PGI_1 (prostacyklin), PGD_2 (prostaglandin) a EDRF (oxid dusnatý). [6, s. 105]

Proces aktivace trombocytu probíhá v několika fázích. Začíná ligand – receptorovou interakcí, pokračuje přenosem signálu do krevní destičky a končí odpovědí destičky. Když se trombocyt aktivuje, deformuje se, uvolňují se faktory nutné ke koagulaci a obsah granulí. Z těch se uvolňuje ADP a TXA_2 . Hladina nitrobuňčného vápníku se zvyšuje díky sekreci z denzního tubulárního systému, z mitochondrií a přesunem extracelulárního vápníku. Díky deformaci trombocytu se zvětší plocha, kde může docházet k interakci faktorů, které se účastní koagulační kaskády. Negativní náboj fosfolipidové membrány urychluje interakci těchto faktorů. V membráně dochází k „flip flop“, přetočení a tvoří se membránové mikročástice. [10, s. 319-320]

Při „flip flop“ dochází k přetočení fosfolipidové dvojvrstvy membrány, když je destička aktivována. K přetočení dochází v horizontální rovině, fosfolipidy vnitřní části dvojvrstvy se přesouvají do vnější části membrány a naopak. Záporně nabitě fosfolipidy (fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin) jsou vystaveny na vnějším povrchu membrány. Slouží jako podklad pro tvorbu koagulačně aktivních procesů. [6, s. 107-108]

K tvorbě destičkové zátky dochází díky aktivaci destiček fyziologickými agonisty (ligandy). Ty zprostředkovávají kompletní biologickou odpověď. Může dojít k zesílení

odpovědi díky uvolnění obsahu granulí do mimobuněčného prostoru nebo syntézou aktivních sloučenin (např. syntéza TXA₂ v cyklu kyseliny arachidonové). [10, s. 320]

Destička mění tvar díky svému kontraktilnímu aparátu, mikrotubuly depolymerují a a aktin naopak polymery vytváří. Poté destička vytváří pseudopodie. K této reakci je potřeba dodat velké množství energie ve formě adenosin- trifosfátu (ATP). Přítomny musí být i vápníkové kationty. Změna tvaru krevní destičky probíhá přibližně do 15 s a můžeme ji laboratorně pozorovat imunofluorescenčními metodami a elektronovým mikroskopem. [6, s. 109]

1.2.3.2. Adheze trombocytu

Adheze znamená, že destička přilne na jiný povrch než povrch destičkový. Při poranění cévy a odhalení endotelu krevní destička na tento endotel přilne. Je nutná přítomnost několika adhezivních proteinů. Obzvláště se uplatňuje vWf, fibrinogen, fibronectin a také Ca²⁺. [3, s. 20]

Von Willebrandův faktor má vazebná místa pro receptory destiček GP Ib, GP IIb/IIIa a pro kolagen typu I, II, VI. Tato vazebná místa slouží k navázání vWf na obnažené endotelové struktury, kterými jsou kolagenní vlákna. Poté dojde k připojení trombocytů díky vyvázání vWf na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX. Trombocyty jsou schopné adheze ke kolagenním vláknům i přímo pomocí komplexu receptorů GP Ia/IIa. Na adhezi se kromě destiček podílí i struktury endotelu, plazmatické adhezivní proteiny a dále množství a viskozita krve a velikost a tvar cév. Adhezivita je závislá lineárně na počtu krevních destiček. [3, s. 24]

Při vysokých střižných silách závisí adheze trombocytů ke strukturám subendotelu na vWf. Ten se váže na receptory na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX. Při nízkých střižných silách adheze na tomto faktoru nezávisí. VWf se naváže jen na komplex GP Ib/V/IX. Adheze může probíhat i při blokaci GP IIb/IIIa a takto probíhá i u pacientů s Glanzmannovou chorobou. [6, s. 110]

Když se trombocyt setká s kolagenní nebo subendoteliální strukturou, během několika málo sekund změní svůj tvar díky tvorbě výběžků (pseudopodií) přilne k povrchu. Během tohoto procesu se může trombocyt zvětšit až na desetinásobek své běžné velikosti. Při přítomnosti hořečnatých kationtů se zvyšuje adheze destiček na kolagen až pětinašobně. Rychleji jsou trombocyty navázány hlubšími vrstvami cévní stěny,

především elastinem, svalovými buňkami, subendoteliálními mikrofibrilami a kolagenem. [6, s. 110]

Pokud dojde k obnažení cévní výstelky, dochází k adhezi trombocytů pomocí komplexu GP Ib/V/IX. Ten se naváže na vWf na obnažené cévní stěně. Tento komplex se skládá se čtyř glykoproteinových podjednotek GP Iba, GP Ib β , GP V a GP IX. Komplex obsahuje také vazebné místo pro trombin, který slouží k modulaci destičkové odpovědi k trombinu. Komplex GP Ib/V/IX adhezuje pomocí vazby GP Ib na doménu AA vWf. Ten je přes doménu A3 vázán ke strukturám kolagenu. V přítomnosti α -trombinu proběhne navázání k A1 doméně přibližně trojnásobnou rychlostí. Neaktivované trombocyty se mohou navázat na fibrin nebo na povrchově vázaný fibrinogen. [6, s. 111-112]

1.2.3.3. Agregace trombocytů

Agregací nazýváme vzájemné shlukování trombocytů. Dochází k němu díky změně konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorů agonisty na membráně trombocytu. Změna konformace umožňuje vyvázání molekuly fibrinogenu nebo vWf mezi dvěma receptory GP IIb/IIIa na dvou různých krevních destičkách. Destičky se při agregaci spojují nejprve přes receptory v pseudopodiích. Tento jev se nazývá primární agregace. V jeho průběhu se destičky spojují pouze částečně menším počtem glykoproteinů IIb/IIIa. [3, s.21]

Pokud dojde k silnějšímu aktivačnímu impulsu, krevní destičky se spojí těsněji. Tento děj je nazýván sekundární agregace. Dochází k odkrytí většího počtu glykoproteinových receptorů a v trombocytu proběhnou již nevratné změny. Agregované krevní destičky se rozplývají a poté splývají navzájem. Tento proces je nazýván viskózní metamorfóza trombocytů. [6, s.113]

Agregace ve většině případů následuje až po adhezi, ale může být vyvolána i samostatně. Přímo ji může způsobit řada induktorů, např. ADP, TXA₂, kyselina arachidonová, kolagen, adrenalin, trombin, vasopresin, serotonin, PAF a další induktory. Pro aktivaci destiček pomocí ADP slouží purinergní receptor P2Y. Tento receptor je podobný GP IIIa. ADP působí zároveň s několika dalšími látkami. TXA₂ může působit přes dva rozdílné receptory. Kolagen může trombocyt aktivovat pouze ve své polymerní struktuře a je nutná přítomnost ADP. Nejprve trombocyty adherují na kolagenní vlákna a po obsazení receptorů dochází k vyvolání agregačního signálu.

[10, s.201]

Účinkem protrombinázy na protrombin na povrchu destiček vzniká trombin. Ten destičky může aktivovat díky proteázou aktivovanému receptoru PAR-1 a působí také na receptor GP Ib. Automaticky vyvolá agregaci adrenalin, pokud je překročena jeho fyziologická koncentrace. Působí přes α_2 adrenergní receptor pomocí G proteinu. Dochází k zesílení účinku dalších destičkových aktivátorů. [6, s.114]

Když dojde k navázání aktivátoru na receptor na membráně trombocytu, odkryjí se vazebná místa receptoru glykoproteinu IIb/IIIa. V neaktivních trombocytech se tyto glykoproteiny vyskytují volně. Pokud dojde ke stimulaci trombocytu a následnému uvolnění vápenatých kationtů, glykoproteiny se aktivují a nastane změna konformace. Během této změny vznikne komplex receptorů GP IIb/IIIa vytvoří se vhodné podmínky pro navázání fibrinogenu. Glykoproteinový komplex IIb/IIIa se řadí do rodiny destičkových adhezivních integrinových receptorů, které se uvolňují, pokud dojde k adhezivní reakci. Tyto receptory se skládají z několika částí – intracelulární domény, transmembránové části a extracelulární domény. [3, s.21]

Pokud se krevní destička nachází v klidu, receptor nemá příliš velkou afinitu k fibrinogenu. Když se destička aktivuje, povrchová denzita receptorů GP IIb/IIIa se zvýší. Receptory se uvolňují z denzních a α - granulí trombocytu. Receptor se aktivuje díky konformační změně jeho dvou extracelulárních ramének. Na glykoproteinový receptor IIb/IIIa se vážou ty části fibrinogenu, které obsahují sekvence Arg-Gly-Asp a zároveň i dodekapeptid karboxylové části γ -řetězce fibrinogenu. Na tento receptor se ale může vázat i vWf, fibronectin, vitronectin a trombospondin. Trombocyty jsou spojovány můstky přes fibrinogen. Pro tuto vazbu mají velký význam koncové karboxylové skupiny gama řetězců ve fibrinogenové D doméně. Jeden trombocyt obsahuje až čtyřicet tisíc vazebných míst pro fibrinogen. [10, s.319-321]

Zesílit agregační signál můžeme více induktory. Patří mezi ně ADP, TXA₂ a PAF. ADP se uvolňuje z porušené tkáně a dochází k primární agregaci. Tato reakce je vratná. Trombocyty se spojují přes aktivované glykoproteinové části. Pokud není signál od ADP dostatečně silný, vrátí se destičky do původního stavu. Membránové receptory, sloužící ke zprostředkování reakce destiček na ADP se nazývají P2Y. Pokud je koncentrace ADP nadále dostatečně vysoká nebo pokud jsou receptory obsazeny dalšími induktory, dojde k sekundární agregaci a α -granula secernují trombospondin a fibronectin, což je důležité ke stabilizaci vazby fibrinogenu na destičkách. Denzní granula vylijí svůj obsah, kde se nachází zásobní ADP, a kyselina arachidonová se

přemění na TXA₂. Trombocyty jsou v těsném kontaktu a reakce je nevratná. Trombocyt může být ovlivňován některými druhy prostaglandinů, které jsou deriváty kyseliny arachidonové. Ta se v trombocyту uvolňuje z membránových fosfolipidů deacylací, kterou zprostředkují fosfolipázy. Uvolnění kyseliny arachidonové stimuluje noradrenalin, vasopresin a bradykinin, inhibována je kortikosteroidy. Aby z kyseliny arachidonové vznikl TXA₂, musí být její metabolismus započat různými stimuly, např. trombinem, kolagenem nebo ADP. TXA₂ následně aktivuje další trombocyty, váže se na specifické receptory na povrchu destičky a dává tím signál k agregaci. Po stimulaci trombocyту se vytváří PAF, platelet activating factor. Dokáže destičky aktivovat nezávisle na ADP a TXA₂. [6, s.117-121]

Uvolňovací reakce začíná vypuzením obsahu nejprve α - a poté i denzních granulí. Trombocyt dostává kulovitý tvar, granula se přesouvají do jeho centra, zatímco jejich obsah je secernován ven z buňky pomocí kanálkového systému. Tvoří se a uvolňují další aktivační látky, zejména ADP a TXA₂, které agregaci zesilují, adrenalin a serotonin, které vyvolávají vazokonstrikci a další látky, které zasahují do procesu srážení krve. Součástí procesu je také kontraktilní systém destičky. [6, s.122]

Poslední reakcí, kterou destička v procesu srážení krve prochází, je retrakce. Díky působení cytoskeletálního aparátu trombocyту dochází ke stažení trombu. Tímto procesem se znovu uvolní průchodnost cévy, která byla uzavřena hemostatickou zátkou. Schopnost retrakce mají pouze zdravé a plně funkční trombocyty a vyžadují přitom značné množství energie, dodávané formou ATP. Sérum se vytlačí ze stahujícího koagula. Vazba fibrinogenu na aktin pomocí GP IIb/IIIa podporuje retrakci koagula a kontrakci stěny cévy. [3, s.21-22]

1.3. Poruchy trombocytů

Poruchy krevních destiček jsou jednou z příčin vzniku krvácivých stavů. Současně může být změněn jako počet, tak i funkce destiček. Obojí vede k narušení tvorby hemostatické zátky a nedostatečné koagulaci. Rozdělujeme je na poruchy kvantitativní, přičemž snížení počtu trombocytů nazýváme trombocytopenie, zvýšení trombocytózy nebo trombocytopenie. Při poruchách kvalitativních je narušena funkce destiček a nazývávané je trombocytopenie. [12, s. 99]

1.3.1. Poruchy kvantitativní

Trombocytopenií nazýváme snížení počtu krevních destiček pod $100 \cdot 10^9/l$ krve. Dle počtu trombocytů v obvodové krvi rozdělujeme trombocytopenii na lehkou, při které je počet destiček snížen na $90-130 \cdot 10^9/l$, střední s hodnotami $50-90 \cdot 10^9/l$ a těžkou, kdy klesají destičky pod $50 \cdot 10^9/l$. [12, s. 101]

Trombocytopenie rozdělujeme na vrozené, neboli primární, a získané, neboli sekundární, které provázejí jiné patologické stavy. Primární trombocytopenie může vznikat z důvodu předčasného zániku krevních destiček. Nazývá se periferní, tvorba destiček je v dřeni normální, ale v krvi jsou destičky spotřebovány při zvýšené koagulaci anebo jsou rychleji odbourávány. Druhým typem je trombocytopenie centrální, vzniká z nedostatečné produkce destiček, počet megakaryocytů je v kostní dřeni snížen a následně je i méně destiček v cirkulaci. Třetím typem primární trombocytopenie je zadržování krevních destiček ve slezině, nazývané také sekvestrace. [3, s. 66-68]

Trombocyty se kromě procesu koagulace podílí na nepropustnosti cévní stěny pro erythrocyty. Nejčastějším příznakem trombocytopenie je tedy krvácení do kůže a sliznic. Při poruše primární hemostázy nacházíme drobné výlevy krve do kůže, petechie. Někdy ale může být i výrazné snížení trombocytů bezpříznakové. [1, s. 153]

Mezi trombocytopenie ze snížené produkce trombocytů řadíme několik vrozených chorob, které se často vyskytují dohromady s dalšími anomáliemi. Dědí se nejčastěji jako autozomálně dominantní nebo recesivní onemocnění. Jsou to Fanconioho anémie, May-Hegglinova choroba, kdy dochází k poruše vyžívání megakaryocytů, a Aldrichova-Wiskottova choroba, autoimunitní onemocnění, kdy je produkováno málo destiček a nacházíme hlavně poruchy imunity. [11, s. 137]

Získané trombocytopenie ze snížené produkce mohou mít různé příčiny, např. působení chemikálií, léků, prodělání infekce anebo v návaznosti na jiné onemocnění. Toxicky působí na megakaryocyty např. chlorothiazid, alkohol, cytostatika. Virová onemocnění působí represivně přímo na megakaryopoézu. Megakaryocyty mohou být místem replikace virů nebo mohou být poškozeny virovými endotoxiny. Dále na megakaryocyty mohou negativně působit některé těžké kovy, leukemie, metastázy nebo nedostatek kyseliny listové a vitamínu B₁₂. [1, s. 159]

Trombocytopenie ze zvýšeného zániku destiček mohou být imunitní povahy a jsou vyvolány auto- nebo alo- protilátkami. Autoprotilátky mohou být zaměřeny proti trombocytům anebo proti cévní stěně. Destičky se ve zvýšené míře rozpadají, protože mají membránu poškozenou protilátkami nebo imunitními komplexy. Tyto autoimunitní trombocytopenie mohou mít příčinu známou, vyvolanou např. léky, těhotenstvím, AIDS nebo jinými autoimunitními chorobami. Pak je označujeme jako sekundární autoimunitní trombocytopenická purpura. Pokud je příčina zvýšeného rozpadu destiček neznámá, nazýváme tento stav idiopatická trombocytopenická purpura. [3, s. 70]

V případě tohoto onemocnění si pacient vytváří autoprotilátky proti vlastním trombocytům. Ty se vážou na jejich membránu. Forma může být akutní nebo chronická. Akutní se objevuje nejčastěji po virovém onemocnění, může dojít ke spontánní remisi nebo přechodu do chronické fáze. V krvi nacházíme cirkulující imunokomplexy, kde antigenem bývá virus, který vyvolal předchozí infekci. Chronická forma většinou neohrožuje pacienta na životě. Nacházíme při ní autoprotilátky proti antigenům krevních destiček. Toto onemocnění se léčí podáváním imunosupresiv, které potlačují tvorbu protilátek. Součástí léčby je i potlačování krvácivých projevů, provázejících tyto chorobné stavy. [1, s. 160-162]

Trombocytopenie aloimunitní vznikají kvůli inkompatibilitě destičkových antigenů u dárce a příjemce nebo u matky a plodu. Při chronickém onemocnění jater, zejména cirhózy, nacházíme trombocytopenie neimunitní povahy. [11, s. 143]

Dalším typem trombocytopenií jsou trombocytopenie ze zvýšené spotřeby krevních destiček. Do této skupiny patří trombotická trombocytopenická purpura, závažné onemocnění celé krevní cirkulace, které bez léčby vede k úmrtí pacienta. Dříve se pokládalo za neléčitelné, dnes se léčí plazmaferézou. Na vzniku onemocnění se podílí deficit metaloproteinázy a k rozvoji může docházet po prodělání infekčního onemocnění, v těhotenství, po podání léků, po očkování. [1, s. 162-163]

Dalším podobným onemocněním je hemolyticko-uremický syndrom. Při něm krevní destičky vytváří agregáty, které poškozují ledviny a ty selhávají. Aktivuje se krevní srážení, vytváří se tromby a dochází ke změnám endotelu cév. Erytrocyty na něm hemolyzují, vyplavují koagulačně aktivní látky a ty dále aktivují proces krevního srážení. Hemolyticko-uremický syndrom se léčí podáním infuze plazmy. [11, s. 145]

Při diseminované intravaskulární koagulopatii dochází k nitrocévní aktivaci koagulace, spotřebovávají se ve zvýšené míře trombocyty, vytvářejí se mikrotromby a kostní dřeň nestačí tvořit dostatek destiček. [11, s. 145]

Trombocytopenie může vznikat i ze zvýšených ztrát krevních destiček. Může k nim docházet po rychlém nahrazení objemu krve, když v dárcovské krvi není dostatečný počet trombocytů. Další příčinou může být mimotělní oběh při operaci, kdy je snížena teplota krve a destičky začnou spontánně adherovat a agregovat. Příčinou bývá i splenomegalie, destičky se ve slezině ve zvýšené míře ukládají a v obvodové krvi nalézáme trombocytopenii. [1, s. 164]

V průběhu léčby heparinem se může objevit heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT), kdy dochází k aglutinaci z důvodu reakce heparinu s trombocyty. Tento stav se nazývá HIT-1 a není nebezpečný. Vzácnější a nebezpečnější je HIT-2, spojený s trombózami. Při tomto stavu vznikají imunitní komplexy heparinu s autoprotilátkami, které působí na aktivaci a agregaci destiček. Je nutné úplné vysazení heparinu a podávání jiného typu antikoagulancia. [3, s. 71-73]

Trombocytóza je stav, kdy v obvodové krvi nacházíme zvýšené množství krevních destiček na hodnoty 400-600.10⁹/l, v některých případech až 1000.10⁹/l. V kostní dřeni je většinou zvýšený počet megakaryocytů. K tomuto stavu dochází při infekci nebo zánětu, splenektomii, kdy chybí sekvestrace destiček ve slezině, po masivním krvácení, u některých nádorů jako je Hodgkinova choroba a po zvýšené námaze. Léčba většinou není nutná, trombocytóza je sekundární, po odstranění prvotní příčiny vymizí.

[3, s. 74-75]

Trombocytémie je trvalé zvýšení počtu trombocytů na hodnoty 600-1000.10⁹/l, někdy i vyšší. Příčinou je myeloproliferativní proces – chronická myeloidní leukemie, pravá polycytémie a esenciální trombocytémie. [1, s. 170-171]

1.3.2. Poruchy kvalitativní

Trombocytopatie, funkční poruchy krevních destiček, se vyznačují většinou normálním počtem trombocytů, ale jejich změněnou funkcí, strukturou nebo metabolismem. Poruchy mohou vrozené nebo získané. [12, s. 119]

Vrozené trombocytopatie jsou vzácné. Většinou při nich nacházíme kožní a slizniční krvácení. Bývají součástí dalších onemocnění. Poruchou membrány trombocytu se vyznačují Glanzmannova-Naegeliho trombastenienie a Bernardův-Soulierův syndrom. Při Glanzmannově-Naegeliho trombastenii dochází k poruše destičkové zátky kvůli defektu

membránových glykoproteinů IIb/IIIa. Bernard-Soulierův syndrom se vyznačuje poruchou hemostatické zátky, kdy nedochází k adhezi trombocytů. [12, s. 130]

Dalším onemocněním může být porucha skladovacích granul trombocytů, kam řadíme poruchu skladovacího poolu nebo syndrom šedých destiček, kde nacházíme snížený počet nebo úplné vymizení α -granul destiček. Ty pak přežívají kratší dobu a mají šedé zabarvení. Do této skupiny patří syndrom Heřmanského-Pudlákův, při kterém nejsou destičky schopné dostatečně tvořit nebo uvolňovat ADP z denzních granulí. Destičková zátka se netvoří dostatečně. [11, s. 152]

Další poruchy mohou být v nedostatečnosti enzymů, mobilizaci nitrobuněčného vápníku, odpovědi na TXA_2 nebo v uvolňovací reakci. [1, s. 167-168]

Získané trombocytopenie vznikají většinou sekundárně v důsledku jiné primární poruchy. Nacházíme je častěji než trombocytopenie vrozené, krvácivé projevy bývají mírné a není nutné je léčit. Získané trombocytopenie se objevují u myeloproliferativních onemocnění, kdy se tvoří nefunkční nebo poškozené destičky. Dále je nacházíme u lymfoproliferativních onemocnění, kdy se na membránu destičky vážou patologické bílkoviny. Další příčinou může být anémie, kdy na funkci destiček působí toxické zplodiny, vznikající při urémii. Trombocytopenie může být i poléková, kdy dojde k útlumu tvorby destiček např. při užívání cytostatik, vysokých dávek antibiotik, antipyretik nebo analgetik. [3, s. 79; 1, s. 170]

1.4. Metody stanovení trombocytů

Při laboratorních metodách je pro sledování správné funkce trombocytů vždy využívána plná krev nebo plazma bohatá na destičky (PRP – Platelet Rich Plasma). Zjišťuje buď přímou adhezi destiček, nebo tzv. retenci, kde se projevuje současně adheze a agregace. Retrakci můžeme laboratorně stanovit v plné krvi, kde se měří množství vytlačené tekutiny, anebo v plazmě bohaté na destičky, kde měříme schopnost smrštění sloupce, vytvořeného z trombocytů. [13, s. 176]

1.4.1. Měření adheze

U trombocytů můžeme měřit jejich schopnost adheze. Používáme k tomu plazmu bohatou na destičky, nativní nebo nesrážlivou venózní krev. Destičky mohou

adherovat na povrchy nefyziologické, nejčastěji skleněné kuličky, nebo na povrchy fyziologické, kolagenní vlákna. Můžeme zjišťovat přímou adhezi trombocytů anebo jejich retenci, kdy měříme současně jejich schopnost adheze i agregace. [3, s. 145]

Přímou adhezi trombocytů měříme metodou podle Fredina. Počítáme destičky adherované na určité ploše sklíčka, které je ponořené do plazmy bohaté na destičky. Poté stanovujeme počet destiček v této plazmě před a po adhezi na sklíčko. Rozdíl v jejich počtu vyjadřuje schopnost adheze destiček a nazývá se index adheze. Tato metoda se již většinou v praxi neprovádí. Hodnoty bývají sníženy např. u trombastenií, von Willebrandovy choroby, urémií. [13, s. 176]

In vitro můžeme simulovat spojení jednotlivých destiček mezi sebou prostřednictvím vazby receptorů komplexu GP Ib/V/Ix na molekuly vWf pomocí induktoru ristocetinu. Je potřeba toto provádět v plazmě bohaté na destičky. Destičky takto monitorujeme v agregometrii. [13, s. 177]

1.4.2. Měření retence

Pro měření retence trombocytů používáme metodu podle Hellema. Destičky se počítají elektronicky před a po pasáži na sloupec se smáčivým povrchem, kterým bývá nejčastěji vrstva skleněných kuliček. Trombocyty přilnou k jejich povrchu. Měřítkem retence destiček je koeficient retence. Zvýšené hodnoty retence nacházíme u trombotických stavů, snížené u trombocytopenií. [12, s. 184]

1.4.3. Měření agregace

Dalším parametrem, měřeným u trombocytů, je jejich schopnost agregace. Ta většinou následuje po adhezi, ale může být i vyvolána působením induktorů jako je ADP, TXA₂, kolagen, adrenalin, trombin, kyselina arachidonová a další. Agregaci sledujeme v plazmě bohaté na destičky nebo v plné krvi. Můžeme sledovat agregaci spontánní, bez přidání stimulačních látek nebo stimulovanou po přidání induktorů. Vyšetření samovolné agregace využíváme k průkazu zvýšené aktivity trombocytů. Sledujeme změnu optické hustoty v agregometru. Stimulovanou agregaci používáme k vyšetření funkce destiček. Jako induktory přidáváme ADP, trombin, ristocetin, kolagen, adrenalin nebo další látky. [12, s. 183]

Přístroj agregometr poté sleduje změnu optické hustoty nebo lze použít měření impedanční, při kterém destičky přilnou na senzory, jejich agregace je poté detekována díky zvýšení elektrického odporu mezi dvěma elektrodami. V optických agregometrech využíváme plazmu bohatou na destičky, impedanční mohou pracovat s plnou krví. Výsledkem je agregační křivka. Vyšetření stimulované agregace používáme v případě podezření na krvácivé stavy z poruchy funkce destiček. Agregaci nacházíme sníženou u získaných trombocytopenií jako je uremie, abusus analgetik, antikoagulační léčba, myeloproliferativní stavy, leukemie nebo u trombocytopenií vrozených, jako jsou von Willebrandova choroba, syndrom Heřmanského-Pudlákův nebo May-Hegglinova choroba. [13, s. 177-180]

1.4.4. Měření látek uvolněných z trombocytu

Můžeme také vyšetřovat cirkulující destičkové agregáty, kdy počítáme destičky ve dvou různých roztocích. Jeden je pufovaný roztok s EDTA a druhý obsahuje EDTA s formalinem. Formalin fixuje destičkové mikroagregáty, které se poté při centrifugaci oddělí. V druhém roztoku k tomu nedochází. Po centrifugaci zjistíme počet destiček v obou roztocích a vypočteme index cirkulujících mikroagregátů. Toto stanovení se používá při sledování trombofilních stavů a tromboembolické nemoci. K průkazu zvýšené aktivity trombocytů používáme vyšetření syndromu lepivých destiček. K destičkám přidáváme podprahové hodnoty induktorů. U zdravých destiček nedochází k agregaci, zatímco syndrom lepivých destiček se vyznačuje jejich hyperagregabilitou. Onemocnění se dědí autozomálně dominantně a dochází při něm k tromboembolickým příhodám. [13, s. 181-182]

Měřit můžeme i aktivační působky krevní destičky, jako je PF-4, uvolňovaný po aktivaci z α -granulí destiček a vázající heparin. K jeho stanovení používáme nejčastěji imunochemickou metodu ELISA. Vyšetření používáme u diagnostiky trombocytopenií. Další látkou uvolňovanou z α -granulí je β -tromboglobulin, k jeho stanovení se rovněž používá ELISA a jeho zvýšené hladiny nacházíme u stavů spojených s aktivací trombocytů, jako je infarkt myokardu, embolie, žilní trombóza, diseminovaná intravaskulární koagulopatie. [4, s. 73-74]

Tromboxan B₂ je látka vznikající z TXA₂, produktu metabolismu kyseliny arachidonové. Měříme jeho hodnoty v plazmě a v moči, abychom posoudili antiagregační léčbu kyselinou acetylsalicylovou. [13, s. 183-184]

1.4.5. Sledování primární hemostázy

Hned poté, co se plná nativní krev dostane z cévního řečiště, dochází k hemostáze. Vytvoří se hemostatická zátka a poté dojde k retrakci krevního koagula. Podobné procesy probíhají i v plazmě bohaté na destičky. Během nich dojde k vypuzení nitrobuněčné tekutiny z krevních destiček. Laboratorně stanovujeme objem této tekutiny, abychom změřili účinnost kontraktálního systému destičky. Snížené hodnoty nacházíme u nemocí, kde je kontraktální systém destičky poškozen, jako jsou trombocytopenie a trombastenien. [5, s. 379]

Ke sledování primární hemostázy využíváme několik přístrojů. Jedním z nich je PFA-100, který měří funkci trombocytů při tvorbě hemostatické zátky. Přístroj simuluje proces adheze a agregace trombocytů v případě poranění cévy. Destičkový trombus uzavírá otvor v bioaktivní membráně potažené induktory. Vyšetření využíváme při podezření na krvácivý stav vyvolaný poruchou funkce destiček. [2, s. 96]

Multiplate je další používaný přístroj sloužící k celkovému vyšetření funkce trombocytů v plně nesrážlivé krvi a k monitorování antiagregační léčby. Používáme impedanční měření, destičky přilnou na senzory potažené induktory a jako výsledek získáme agregační křivku z každého měřicího kanálu s rozdílným induktorem. Přístroj používáme k detekci funkčních poruch destiček, jejich zvýšené nebo snížené agregability. Můžeme tak zachytit onemocnění jako Glanzmannova trombastenien nebo Bernardův-Soulierův syndrom. [13, s. 187-189]

Přístroj IMPACT-R testuje funkci trombocytů za předem definovaných fyziologických podmínek. Zjišťujeme adhezi a agregaci destiček na povrchu polystyrénové misky za podmínek laminárního proudění. Uplatňuje se přitom von Willebrandův faktor, glykoproteiny IIb/IIIa a fibrinogen. Zjišťuje abnormality hemostázy jako je trombocytopenie, Glanzmannova trombastenien a afibrinogemie. Přístroj také slouží k rychlému monitorování odpovědi pacientů na antiagregační léčbu. Na principu optické agregometrie je založen přístroj Verify now. Slouží k celkovému posouzení funkce destiček a k monitorování antiagregační léčby. [13, s. 190-191]

2. CÍLE PRÁCE

1. Porovnat výsledky vyšetření pomocí přístroje PFA a agregometru pro stejnou skupinu pacientů
2. Zjistit, který přístroj je pro běžné používání vhodnější nebo zda je vhodné používat oba pro doplňující se výsledky
3. Popsat výhody a nevýhody používání těchto přístrojů, jako přesnost výsledku, rychlost provedení měření, cena a náročnost údržby

3. METODIKA

3.1. Použité přístroje a reagensy

3.1.1. Přístroj PFA

3.1.1.1. Charakteristika přístroje

Přístroj PFA zjišťuje funkci trombocytů z nesrážlivé (citrátové) plné krve. Přístroj rychle vyhodnocuje výsledek a je založen na Kratzerově/Bornově metodě. Využívá se k zjišťování dysfunkcí krevních destiček. Ty mohou být dědičné, získané nebo způsobené inhibitory, trombocytů. Nejčastěji detekujeme pomocí PFA uremii a von Willebrandovu chorobu. Dále můžeme zjistit užívání léků s obsahem kyseliny acetylsalicylové (např. aspirin, ibuprofen). [13, s. 185; 14]

Přístroj simuluje proces adheze a agregaci pomocí induktorů v měřící cartridge. Cartridge se skládá z kapiláry, zásobníku na vzorek a biochemicky aktivní membrány, která má ve svém centru kruhový otvor. Vzorek krve prochází ze zásobníku kapilárou a dále otvorem v bioaktivní membráně, pokryté induktory, které aktivují destičky. Trombocyty jsou v tomto procesu vystaveny velkým třecím silám. Kolagen, kterým je bioaktivní membrána potažena, je subendoteliální protein, spouštějící adhezi krevních destiček. Trombocyty se na kolagenu zachytávají a aktivují se. [13, s. 185-187]

Dále se na membráně vyskytuje epinefrin nebo ADP, které se také používají pro aktivaci krevních destiček. Destičky se aktivují a po kontaktu s ADP nebo epinefrinem dochází k uvolňování granul. Poté dojde ke vzniku agregátu trombocytů díky jejich adhezi. Jako měřítko funkce trombocytů se používá proces jejich agregace a tvorba zátky na membráně. Tato zátka způsobí snížení a poté zastavení průtoku krve. [16]

Přístroj měří dobu od začátku reakce do uzavření otvoru membrány (CT - closure time) a tím sleduje správnou schopnost adheze a agregace trombocytů. Tvorba trombocytové zátky je ovlivněna nízkým počtem trombocytů, jejich sníženou funkcí nebo oběma těmito faktory. Dále může dojít k ovlivnění díky nízké plazmatické koncentraci vWf a nízkým hematokritem, který ovlivňuje proudění krve. [13, s. 186; 15]

Obrázek 1: Příklad PFA



3.1.1.2. Testovací cartridge

Přístroj PFA-200 má tři typy testovacích cartridge pro zjištění dysfunkce trombocytů v plné citrátové krvi. Testovací cartridge obsahující kolagen a epinefrin (PFA COL/EPI) se používá pro zjištění poruchy funkce krevních destiček, které jsou vyvolány vnitřními poruchami, von Willebrandovou chorobou nebo látkami, působícími proti agregaci. Testovací cartridge obsahující kolagen a ADP (PFA COL/ADP) se používá při abnormálním výsledku s testovací cartridge PFA Col/EPI. Zjišťujeme, zda mohl být abnormální výsledek způsoben užíváním léků s obsahem kyseliny salicylové. Třetí cartridge slouží k monitorování léčby clopidogrelem. Referenční rozmezí pro zdravého jedince se liší dle typu cartridge. [14; 17; 18]

Obrázek 2: Testovací cartridge



3.1.1.3. Postup měření

Příprava přístroje:

Zapnula jsem přístroj PFA a nechala ho 15 minut vytemperovat na 37 °C. Přístroj má integrovanou dotykovou obrazovku. Na ní jsem klikla na „přihlásit se“. Vyplnila jsem uživatelské jméno a heslo. [17; 19]

Údržba přístroje:

Přístroj vyžaduje 3 typy údržby. První údržba je trigger solution – promytí fyziologickým roztokem. Druhá údržba se nazývá self test a poslední údržba čistí o – kroužek. Promytí přístroje a self – test se provádí denně, manuální čištění o – kroužku 1x týdně. Přístroj nás sám navádí a dává nám dole na liště pokyny na provedení údržby. Provedla jsem první údržbu – trigger solution. Vložila jsem do pozice A promývací cartridge, po promytí přístroje jsem ji vyjmula. Promývací cartridge je na více použití. Poté jsem provedla self test – promývací cartridge s vakuovou nádobkou jsem vložila do pozic A i B. Dále jsem vložila molitanovou podušku s pěti kapkami isopropanolu do prohlubně karuselu. Přístroj zkontroluje utěsnění vakua. Po správném provedení testu je vidět v cartridge kapka na středu filtračního papírku – signalizuje správné pipetování startovacího roztoku. Čistící podušku jsem odstranila pinzetou, kazetu jsem vyjmula z karuselu. [19; 20]

Následně jsem provedla poslední část údržby, vyčistila jsem manuálně o – kroužek. Do karuselu jsem vložila servisní nástroj pro o - kroužek. Přístroj vyndá o – kroužek do pozice remove, vyčistila jsem kroužek manuálně pomocí destilované vody a vložila jsem ho zpátky do pozice install. Po vyčištění o – kroužku vyžaduje přístroj opětovné provedení vakuum leak testu – kontrola utěsnění vakua. Znovu jsem vložila promývací cartridge do pozice A a provedla tento poslední test. Údaje o manuálním vyčištění o - kroužku jsem uložila do historie. Přístroj je nyní připraven k měření. [17; 19]

Vlastní měření:

Z lednice jsem vyndala cartridge pro měření a nechala ji vytemperovat na pokojovou teplotu. Na obrazovku do pozice A jsem zadala údaje pacienta – ID, jméno pacienta, název oddělení, požadujícího vyšetření. Do pozice A jsem vložila měřící cartridge. Vzorek krve pacienta jsem promíchala třikrát otočením zkumavky, nesmí se třepat, přístroji vadí bubliny. Do cartridge jsem napipetovala 800 µl plné krve. Na obrazovce

jsem zadala „start“. Inkubace krve probíhá 150 sekund. Dalších max. 300 s probíhá měření „closure time“ – čas uzavření kapiláry. Pokud by měření trvalo déle než 300 s, napíše přístroj na obrazovku, že k uzavření kapiláry nedošlo. Výsledek měření se vytiskne přímo z přístroje na malém papíře. Výsledky zálohujeme na externí disk flash, vstup je součástí přístroje. Po změření všech vzorků jsem znovu provedla údržbu přístroje promývacím roztokem – vložila jsem promývací cartridge do pozice A. Vypudí se zbylá tekutina z přístroje. Promývací roztok jsem z přístroje vyjmula. Na obrazovce jsem klikla na shutdown, na zadní straně jsem přístroj vypnula. [17; 19]

3.1.2. Agregometr

3.1.2.1. Charakteristika přístroje

Přístroj agregometr slouží k určování funkčních poruch krevních destiček, vrozených nebo získaných. Pomocí agregometru také můžeme sledovat účinnost antiagregační léčby. Sníženou agregaci pozorujeme u získaných (např. způsobené léčbou) nebo vrozených (von Willebrandova choroba) trombocytopenií. [13, s. 187; 21] Měření agregace je založeno na turbidimetrické Bornově metodě. Agregometr je speciálně upravený nefelometr. Pracuje na principu stimulování agregace (shlukování krevních destiček) induktory in vitro. Měření probíhá v plazmě bohaté na destičky. Sledujeme změnu optické hustoty během agregace. Po přidání induktoru do plazmy bohaté na destičky se mění průchodnost světla vzorkem vlivem tvorby destičkových agregátů. Suspenzí krevních destiček prochází paprsek infračerveného světla o vlnové délce 950 nm. Tato změna se zaznamenává během agregace na v časovém úseku na agregační křivce. Křivka každého induktoru má rozdílnou barvu. [3, s. 145-146; 13, s. 187-189]

Měřicí část přístroje se skládá ze čtyř měřících kanálů schopných pracovat zároveň se stejnou plazmou, ale čtyřmi rozdílnými induktory. Součástí přístroje je počítač s operačním systémem Windows XPE a tiskárna. [21]

Obrázek 3: Přístroj agregometr

3.1.2.2. Charakteristika induktorů

Pracujeme se čtyřmi induktory. Pro některé induktory je na membráně krevní destičky více receptorů. Záleží na koncentraci induktoru, který receptor se obsadí. Agregace stimulovaná ADP závisí na koncentraci přidaného ADP. Tento induktor působí jako aktivátor krevních destiček. V organismu se uvolňuje z poškozených trombocytů, erytrocytů a cévní stěny. Zvyšuje agregaci. Pro ADP existují na membráně trombocytu dva receptory $P2Y_1$ a $P2Y_{12}$. První se obsazuje receptor $P2Y_1$, vyvolá se primární vlna agregace, dojde k uvolnění jen Ca^{2+} . K tomuto dochází při nízkých koncentracích induktoru. Na membráně trombocytu se exprimuje a aktivuje pouze malá část glykoproteinových komplexů GP IIb/IIIa. Pokud je koncentrace induktoru vyšší, obsazuje se i receptor $P2Y_{12}$. Dojde k vyvolání sekundární agregační odpovědi a také se exprimuje a aktivuje velký počet glykoproteinových komplexů. Poté dochází k sekreci obsahu granul. [13, s. 180; 22; 23]

Při stimulaci antibiotikem Ristocetinem (AGG) závisí agregaci krevních destiček na funkčnosti a přítomnosti vWf. Lze pomocí ní detekovat funkčnost vazebného místa A1 domény vWF na GP Ib. [24]

Při stimulaci agregace kyselinou arachidonovou (ARA) dochází k přeměně této kyseliny na TXA₂, který je silné propagační činidlo. Po delším stání při laboratorní teplotě kyselina arachidonová oxiduje a ztrácí indukční agregační aktivitu, reagencie může získat i nažloutlé zbarvení. [25]

Agregace stimulovaná kolagenem (COL) závisí na reakci krevních destiček po přidání tohoto induktoru. Křivka kolagenu poskytuje i informaci o adhezi trombocytu. [26]

3.1.2.3. Postup měření

Příprava reagií pro agregaci trombocytů:

Pro měření každého vzorku jsem použila vždy 25 µl každého induktoru, poměr 1:10 objemu induktoru k objemu vzorku. [22]

ADP jsem rozpustila v 1 ml destilované vody - roztok obsahuje 200µM ADP. Poté jsem ho nechala stabilizovat 10 minut při pokojové teplotě. Před měřením jsem ADP naředila 1:2 fyziologickým roztokem. [23]

Ristocetin (AGG) jsem rozpustila v 6,6 ml fyziologického roztoku a stabilizovala 10 minut při pokojové teplotě. Pracovní roztok obsahuje 15 mg/ml ristocetinu. [24]

Reagencie kolagen (Collagen Reagent) je připravena k použití. Roztok obsahuje 1 mg/ml kolagenu. [26]

Kyselinu arachidonovou (Arachidonic Acid) jsem rozpustila v 1 ml destilované vody a stabilizovala 10 minut při pokojové teplotě. Roztok obsahuje 5 mg /ml ARA. [25]

Faktory ovlivňující agregaci trombocytů:

Centrifugace při 4 °C způsobuje spontánní agregaci, stejně tak mohou působit špinavé kyvety nebo přítomnost kryoglobulinů. Měření v době kratší než 30 minut od odběru způsobuje necitlivost k induktorům. Agregaci mohou snižovat fragmenty erytrocytů a leukocytů, lipemie plazmy nebo měření v době delší než 2 hodiny od odběru. Nižší procento agregace se objevuje i u počtu trombocytů nižší než $150 \cdot 10^9/l$ nebo vyšší než $400 \cdot 10^9/l$ nebo při rychlosti centrifugace pod 800 nebo nad 1200 otáček/min.

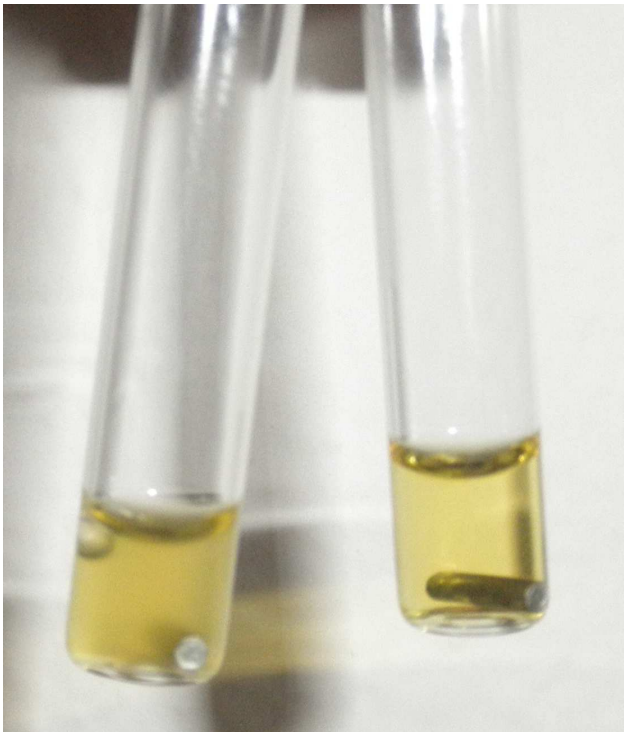
Hematokrit by neměl být nižší než 0,55 a teplota nižší než 35 °C. Ph nižší než 7, 7 nebo vyšší než 8 agregaci naopak zvyšuje. [21; 22]

Agregace může být také ovlivněna léky, které užívá pacient, např. aspirinem. Ten může snižovat hodnoty agregace u některého z induktorů. [14; 27]

Příprava plazmy:

Krev se centrifugovala při 800 otáčkách/10 minut. Získala jsem plazmu bohatou na destičky (PRP). Odpipetovala jsem 1 ml (4x 250 μ l) plazmy bez příměsi erytrocytů a leukocytů do zkumavky. Počet trombocytů v této zkumavce jsem změřila na analyzátoru Celtac F. Cílová hodnota parametrů je $250 \cdot 10^9/l \pm 50 \cdot 10^9/l$ trombocytů, pod $0,2 \cdot 10^9/l$ erytrocytů. Pokud je hodnota trombocytů vyšší než $500 \cdot 10^9/l$, vzorek je potřeba naředit plazmou chudou na destičky (PPP) nebo fyziologickým roztokem. Zbytek vzorku z původní centrifugované krve jsem dále centrifugovala znovu při 5300 otáčkách na 15 minut. Vznikla plazma chudá na destičky (PPP). [21; 27]

Obrázek 4: Plazma bohatá na destičky (vlevo) a plazma chudá na destičky (vpravo)



Vlastní postup měření:

Během centrifugace jsem zapnula agregometr tlačítkem on/off na přední desce. Přístroj se zahřívá 30 minut. Inkubační a měřicí pozice se vytemperují na 37 °C. Zapne se monitor a spustí se program Windows XP. Automaticky se po nastartování počítače spustí program agregometru SW. Zapnula jsem tiskárnu. Připravila jsem si 5 kyvet s kovovými michadélky. [21; 22]

Do první jsem napipetovala 250 µl PPP, plní funkci blanku - agregace je 100%. Do ostatních kyvet jsem napipetovala 250 µl PRP – agregace je 0%. Na obrazovce v programu jsem klikla na „Měření“. Měření se spustilo. Vyplnila jsem údaje pacienta – příjmení, jméno, do „Info“ rodné číslo, počet destiček (po naředění). Zaškrtnula jsem kanály číslo 1, 2, 3, 4, napsala jméno obsluhy a klikla na „ok“. [21; 22] První kyvetu s PPP (blank) jsem proměřila postupně ve všech kanálech. Klikla jsem myší na obrazovce nebo na klávesnici F1, F2, F3, F4. Na obrazovce se tlačítka změnila z PPP na PRP kanál. Následně jsem vložila zbylé 4 kyvety s PRP do měřicích kanálů. Klikla jsem myší na obrazovce nebo na klávesnici F1, F2, F3, F4, tlačítka na obrazovce se změnila z „PRP kanál“ na „spustit kanál“. [21; 22]

Pozice reagentů : 1 – ADP, 2 – AGG, 3 – KOL, 4 – ARA. Po stěně kyvety jsem přidala 25 µl reagentie (poměr induktor:PRP je 1:10). Klikla jsem myší na obrazovce nebo na klávesnici F1, F2, F3, F4, tlačítka na obrazovce se změnila ze „spustit kanál“ na „zrušit kanál“. Měření jsem zastavila mezi 8 a 10 minutou, klikla jsem na „stop“. Poté jsem hodnotila průběh a tvar křivky vyvolané stimulací agregace induktory. [21; 22]

Referenční rozmezí: > 60% agregace – norma, < 30% patologický průběh křivky - patologická hodnota, < 40% sníženo, 40 – 60% hraniční, > 120% hyper. [21; 22]

Uložila jsem jméno a příjmení pacienta, datum zpracování, klikla jsem na „save“. Vytiskla jsem výsledky měření. Ukončila jsem program. [21; 22]

3.2. Použité vzorky pacientů

Vzorky pacientů, na kterých je vidět korelace mezi výsledky měření přístrojem PFA a agregometrem, poskytlo Oddělení Klinické Hematologie nemocnice Motol v Praze. Bylo vybráno 13 vzorků pacientů, jejichž diagnóza vyžadovala zhodnocení funkce trombocytů pomocí obou přístrojů. Pacienti byli rozděleni do tří skupin, zdraví, s hraničními hodnotami agregace a s hodnotami patologickými.

K měření jsem ze vzorku pacienta použila plazmu bohatou na destičky v případě měření agregometrem a plnou krve pro změření přístrojem PFA.

4. VÝSLEDKY

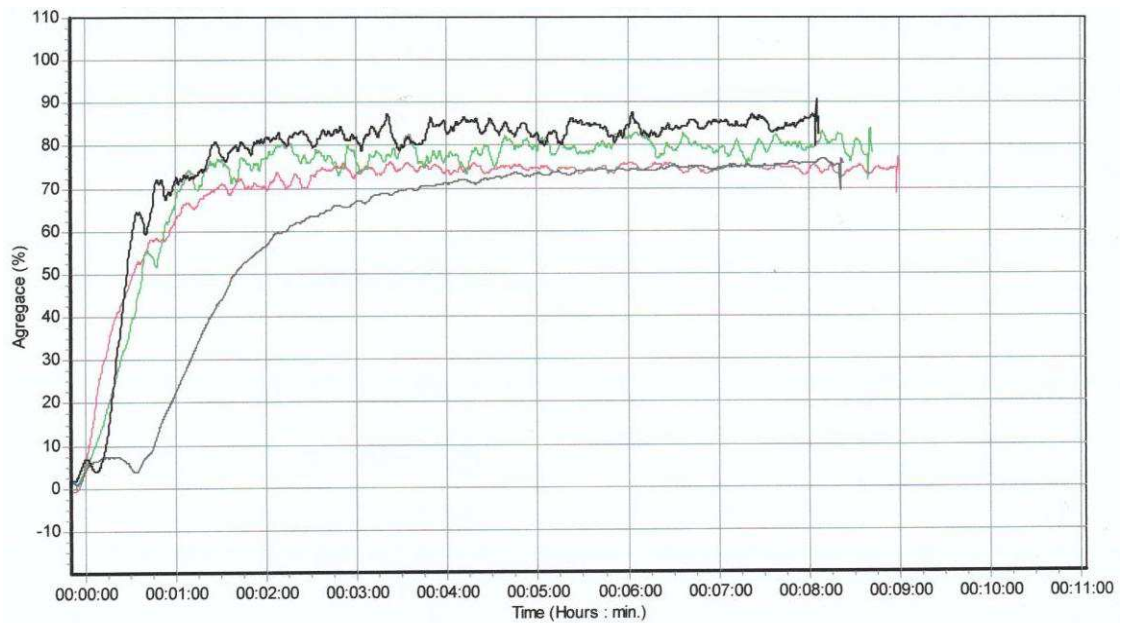
U vybraných pacientů jsem sledovala v případě měření agregometrem procento agregace vždy u každého ze čtyř kanálů s odlišným přidaným induktorem při měření zastaveném v osmé minutě. U přístroje PFA jsem sledovala čas uzavření kapiláry na bioaktivní membráně, potažené induktory kolagenem a epinefrinem, tyto výsledky jsem porovnávala, zda odpovídají diagnóze, popř. způsobu léčby pacienta a zda se tyto výsledky navzájem doplňují nebo zda se odlišují.

Pacienty jsem rozdělila do tří skupin, dle procenta agregace. První skupina jsou pacienti zdraví, druhá skupina pacienti s mírně sníženým procentem agregace a třetí skupina pacienti s velmi sníženým procentem agregace.

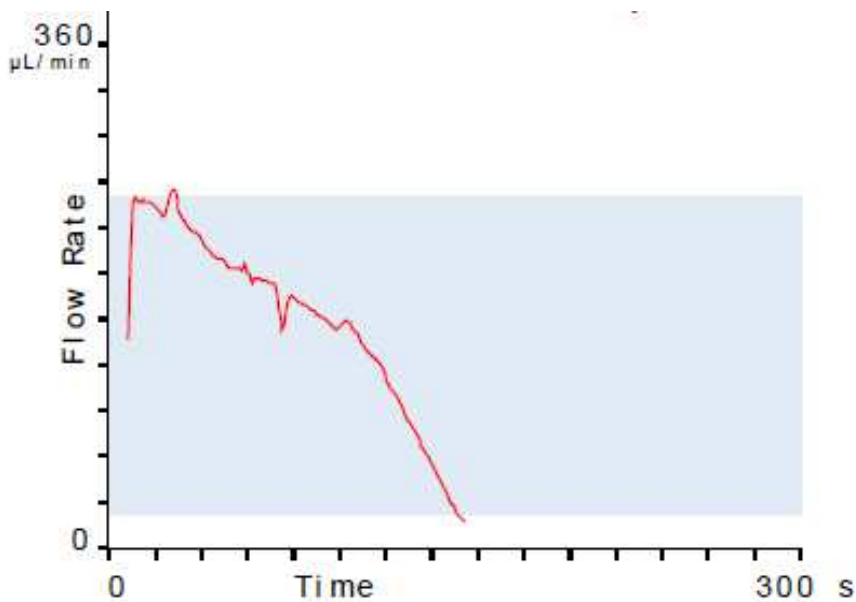
Tabulka 1: Pacienti s agregací v normě (> 60% agregace norma, CT Col/Epi norma 74-145 s) [28]

Pacient	%agreg.ADP	%agreg.AGG	%agreg.KOL	%agreg.ARACH	tCOL/EPI(s)
1	84,38	95,32	103,0	78,99	105
2	90,33	83,83	82,06	77,29	155
3	83,39	87,21	91,83	85,43	133
4	73,88	78,74	74,67	84,71	155

Obrázek 5: Normální průběh křivky agregace – závislost agregace v procentech na čase v sekundách (červená křivka – ADP, zelená křivka AGG, modrá křivka KOL, černá křivka ARACH)



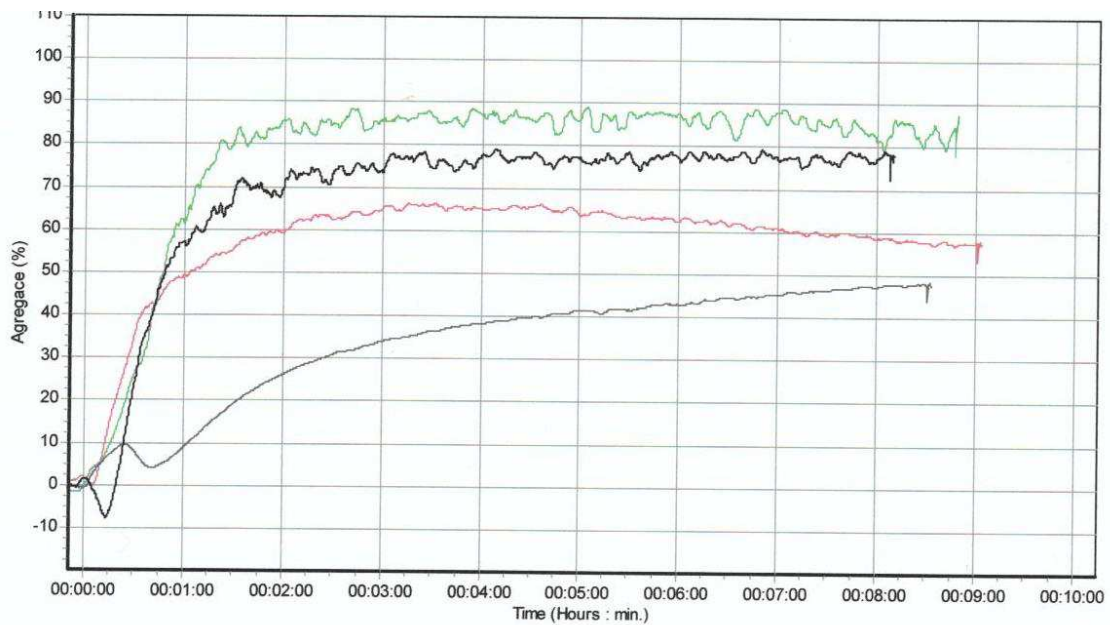
Obrázek 6: Normální průběh křivky PFA – závislost objemu krve v μl proteklého bioaktivní membránou za minutu na čase v sekundách



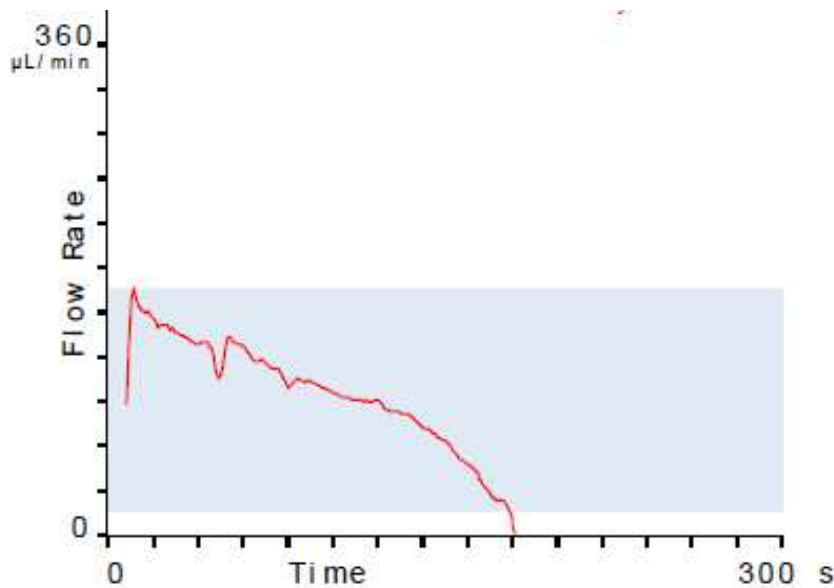
Tabulka 2: Pacienti s hraniční agregací (agregace 40-60%), PFA prodlouženo nad 178 s nebo v normě 74-145 s [28]

Pacient	%agreg.ADP	%agreg.AGG	%agreg.KOL	%agreg.ARACH	tCOL/EPI(s)
5	49,44	88,47	85,55	76,45	286
6	62,40	87,74	42,42	76,99	164
7	86,26	95,45	44,10	94,93	143
8	46,65	68,30	79,97	68,00	240

Obrázek 7: Hraniční průběh křivky agregace



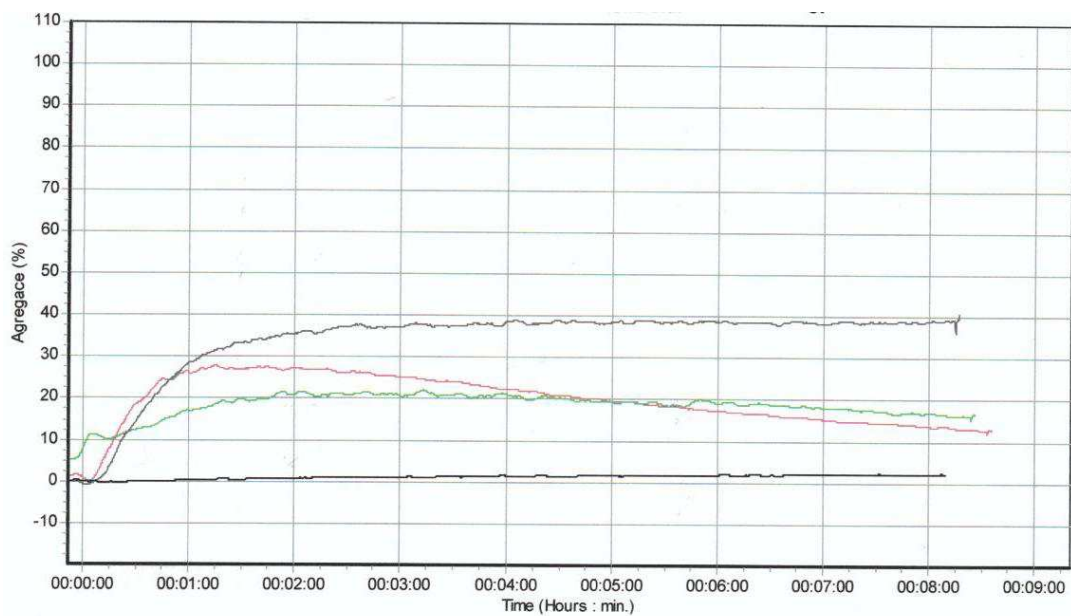
Obrázek 8: Prodloužený průběh křivky PFA



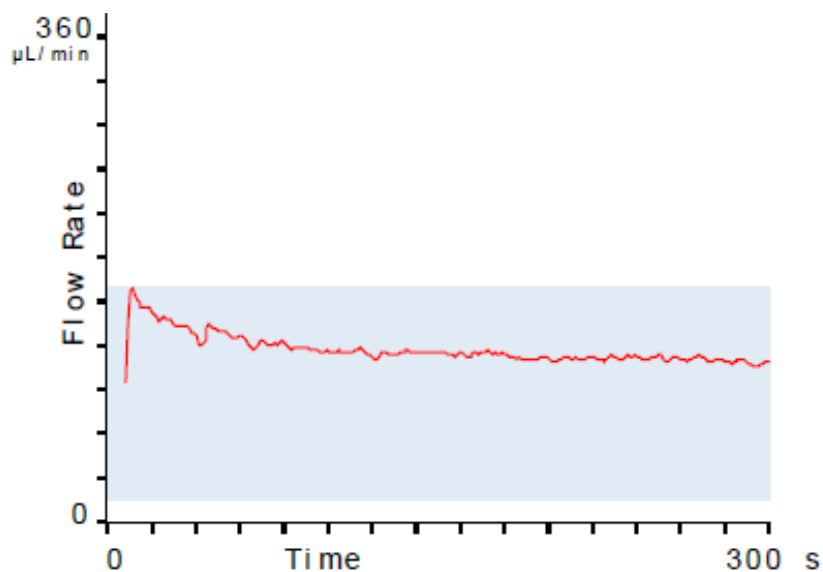
Tabulka 3: Pacienti s patologickou agregací - (agregace < 40 %), PFA prodlouženo nad 178 s nebo se otvor v kapiláře neuzavřel > 300 s [28]

Pacient	%agreg.ADP	%agreg.AGG	%agreg.KOL	%agreg.ARACH	tCOL/EPI(s)
9	17,95	18,23	39,41	1,85	300
10	55,60	88,60	88,69	11,69	182
11	28,93	86,59	37,80	6,13	300
12	42,27	92,13	23,91	64,46	168
13	22,64	86,00	92,02	71,01	176

Obrázek 9: Patologický průběh křivky agregace



Obrázek 10: neuzavřený otvor kapiláry PFA (> 300 s)



5. DISKUZE

Účelem této práce je porovnání nového přístroje PFA s klasickým agregometrem. Oba přístroje slouží ke sledování funkce agregace krevních destiček a oba vyžadují 30-ti minutové vytemperování na teplotu lidského těla. Na tyto dva přístroje se nevyrábí kontroly, protože zatím není možné uměle vytvořit funkční krevní destičky. Pokud vychází několik příliš nízkých nebo vysokých výsledků za sebou a je podezření na nefunkčnost induktoru nebo poruchu přístroje, změní se pro kontrolu krev zdravého pacienta.

Před prvním vzorkem dne je nutné na přístroji PFA provést více typů údržby. Agregometr údržbu nevyžaduje, je ale nutné před začátkem měření krev každého pacienta centrifugovat pro oddělení PRP. Přístroj agregaci nezměří, pokud je počet destiček pacienta příliš nízký. Pokud je příliš vysoký, je nutné ředit vzorek PPP. U PFA toto není nutné, měření probíhá v plné krvi.

Agregometr potřebuje 250 μ l PRP s 25 μ l induktoru do každého měřicího kanálu, PFA měří jen jeden vzorek 800 μ l plné krve. Není tedy nutné pipetovat vícekrát malá množství vzorku a induktorů a přidávat kovová micradélka, jako je tomu u agregometru. Vzniká menší prostor pro chyby. U obou přístrojů ale nesmí být ve vzorku přítomny bubliny.

K agregometru je nutné dokupovat již zmíněné čtyři induktory ADP, AGG, COL a ARA. Pro měření jednoho vzorku ale používáme pouze 25 μ l každého induktoru. Induktory můžeme zamrazit a poté před vlastním měřením ředit, vydrží tedy na více použití. K přístroji PFA není nutné zvlášť dokupovat induktory. Používají se vyměnitelné cartridge, které již induktory obsahují. Pro jedno měření se použije vždy jedna cartridge.

Součástí agregometru je počítač s vlastním programem, který ukládá výsledky měření, které je poté možné vytisknout. Ve výsledku pozorujeme čtyři agregační křivky, každou patřící k jednomu induktoru. Výsledky z přístroje PFA lze vytisknout na malém listu papíru, součástí přístroje je port pro přenosné zařízení flash. Výsledek, obsahující jednu křivku znázorňující dobu uzavření kapiláry, si můžeme na flash přenést na jiný počítač v laboratoři a následně vytisknout.

Oba přístroje mají hodnotu v řádu statisíců. Ceny induktorů pro agregometr se pohybují okolo 1000 Kč za 1 ml, AGG stojí 16 0000 za 6,6 ml. Cena cartridge je vyšší než cena induktorů. Balení 20 kusů cartridge COL/EPI stojí přibližně 7000 Kč. Do nákladů je potřeba započítat i cenu roztoku trigger solution a pomůcek pro provádění pravidelné údržby. Cena jednoho vyšetření pomocí agregometru včetně centrifugace je pohybuje okolo 800 Kč, cena jednoho měření pomocí PFA je přibližně 500 Kč.

Porovnáním výsledků pacientů jsem došla k závěru, že pro přesnou diagnostiku pacientů s funkčními poruchami krevních destiček, je vhodné používat oba přístroje. Díky přístroji agregometru můžeme pozorovat reakci oddělených trombocytů v plazmě na čtyři odlišné podané induktory nebo účinnost léčby. Přístroj PFA nám podává informaci, zda jsou trombocyty v plné krvi schopny agregovat a uzavřít otvor v kapiláře. Díky tomu můžeme odhalit další možná onemocnění pacienta, popř. zjistit, jaké další léky užívá.

Na výsledcích tří souborů pacientů můžeme vidět korelaci snížené agregace u pacientů s prodlouženým časem uzavření kapiláry. V případě, kdy je výsledek jednoho z induktorů agregace patologický a křivka PFA ukazuje normální čas uzavření kapiláry, je potřeba pomyslet na léčbu, která může být podávána pacientovi. Mírné neshody mezi výsledky obou přístrojů mohou být také způsobeny vlivem ostatních složek krve, např. hematokritu, při měření plné krve v přístroji PFA. Pokud je ale pacient zdravý, oba přístroje podají výsledek v referenčním rozmezí. Pokud pacient trpí funkčním onemocněním trombocytů, oba přístroje změří výsledek patologický.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat dva přístroje pro stanovení funkčních poruch krevních destiček – agregometr a přístroje PFA, zjistit, který přístroj je pro detekci funkčních poruch trombocytů vhodnější, a popsat výhody a nevýhody používání obou přístrojů.

Na obou přístrojích bylo změřeno 13 pacientů, jejichž diagnóza vyžadovala funkční vyšetření agregace. Protože přístroj PFA byl zaveden nově, nebylo možné použít větší soubor pacientů. Existovalo více vzorků, ale pacientům bylo lékařem diagnostikováno vyšetření pouze na přístroji agregometru nebo přístroji PFA, nebylo tedy možné tyto výsledky porovnat. Pokud by byl k dispozici větší soubor pacientů, bylo by jistě porovnání korelace přístrojů přesnější.

I přesto je na výsledcích vidět, že naměřené hodnoty oběma přístroji navzájem odpovídají. Pokud u pacienta pozorujeme sníženou agregaci, vidíme zároveň i prodloužený čas uzavření kapiláry. Pokud tomu tak není, je možné v diagnóze pacienta dohledat, že je mu podáván lék snižující agregaci při měření s určitým induktorem. Je nutné přihlídnout k tomu, že v případě agregometru probíhá měření v PRP a v případě PFA v plné krvi.

Závěrem lze říci, že pro přesnější diagnostiku pacientů je vhodné mít v laboratoři oba zmiňované přístroje, vzorky pacientů změřit na agregometru i přístroji PFA a mít k dispozici oba doplňující se výsledky.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2004, 237 s. ISBN 80-866-8203-X.
2. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s., 30, 8, 23 s. obr. příl. ISBN 978-802-4734-590.
3. MATÝŠKOVÁ, Miloslava, Jiřina ZAVŘELOVÁ a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 203 s. ISBN 80-701-3278-7.
4. KOLDE, Hans Jürgen. *Haemostasis: Physiology, Pathology, Diagnostics*. Basel, Switzerland: Pentapharm Ltd., 2004. 2nd edition.
5. LEWIS, S, Barbara J BAIN, Imelda BATES, John V DACIE a John V DACIE. *Dacie and Lewis practical haematology*. 10th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier, c2006, xiii, 722 p. ISBN 978-044-3066-603.
6. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2006, 304 s. ISBN 80-866-8202-1.
7. GAWAZ, Meinrad. *Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease : 47 tables*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2001. ISBN 31-310-5811-0.
8. COLMAN, Robert W. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams, c2006, xxiv, 1827 p. ISBN 07-817-4996-4.
9. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: buňka a krvetvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2002, 160 s. ISBN 80-866-8201-3.
10. MICHELSON, Alan D. *Platelets*. 2nd ed. Boston: Academic Press/Elsevier, c2007, xlii, 1343 p. ISBN 01-236-9367-5.
11. FRIEDMANN, Bedřich a Jaroslav VAŇÁSEK. *Hematologie v praxi*. Praha: Galén, c1994, 368 s., [16] s. obr. příl. ISBN 80-858-2405-1.
12. PENKA, Miroslav. *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 201 s., [12] s. barev. příl. ISBN 80-247-0023-9.

13. *Praktická hematologie: laboratorní postupy*. Vyd. 1. Editor Miroslav Pecka. Český Těšín: Infiniti art, 2010, 343 s. ISBN 978-809-0387-195.
14. JÁŘMBOR, Csilla, Klaus-Werner VON PAPE, Michael SPANNAGL, Wulf DIETRICH, Andreas GIEBL a Heike WEISSER. Multiple Electrode Whole Blood Aggregometry, PFA-100, and In Vivo Bleeding Time for the Point-of-Care Assessment of Aspirin-Induced Platelet Dysfunction in the Preoperative Setting. *Anesthesia*. 2011, roč. 113, č. 1, s. 31-39. ISSN 0003-2999. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31821acddc. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
15. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *INNOVANCE® PFA P2Y: Ke zjištění blokace destičkového receptoru P2Y12 u pacientů, kteří jsou léčeni antagonistou receptoru P2Y12. Pro použití v klinické laboratoři s citrátovou lidskou plnou krví*. 2010.
16. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Dade® PFA Collagen/EPI Test Cartridge and Dade® PFA Collagen/ADP Test Cartridge: Pro zjištění dysfunkce trombocytů v plné citrátové lidské krvi*. 2010.
17. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Systém INNOVANCE® PFA-200*: Návod k obsluze*. Marburg, Německo: Emil-von-Behring, 2010.
18. Practical-Haemostasis.com: a practical guide to laboratory haemostasis. *Platelet Function Testing: PFA-100*[online]. 2012 [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_pfa100.html
19. ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE. *Innovance PFA-200 System: stručný návod k obsluze*. Praha, 2012.
20. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH. *Dade® PFA Trigger Solution*: 2010.
21. SD MEDICAL. *ThromboAggregometer TA~4V - TA~8V: SOFTWARE USER'S MANUAL*. HEILLECOURT- FRANCE, 2012.
22. FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE. *Standardní operační postup - metodický č. IISOPM_1OKH_328/2011-02: Agregace krevních destiček po stimulaci ADP, ristocetinem, kyselinou arachidonovou a kolagenem*. Praha, 2012.
23. ABP LTD. *ADP Reagent: REF ABP-ADP-1(1x1 ml)*. Epsom, Surrey, UK, 2011.
24. AMERICAN BIOCHEMICAL & PHARMACEUTICAL LIMITED. *RISTO.abp.CETIN: (Ristocetin Sulfate)*. USA, 2011.

25. ABP LTD. *Arachidonic Acid Reagent: REF ABP-ARA-1(1x1 ml)*. Epsom, Surrey, UK, 2011.
26. ABP LTD. *Collagen Reagent: REF ABP-COL-1(1mg/ml x1 ml),ABP-COL-2(2mg/ml x1 ml)*.Epsom, Surrey, UK, 2011.
27. PANICCIA, Rita, Emilia ANTONUCCI, Anna GORI, Rossella MARCUCCI, Serena POLI, Eloisa ROMANO, Serafina VALENTE, Cristina GIGLIOLI, Sandra FEDI, Gian GENSINI, Rosanna ABBATE a Domenico PRISCO. Comparison of Different Methods to Evaluate the Effect of Aspirin on Platelet Function in High-Risk Patients With Ischemic Heart Disease Receiving Dual Antiplatelet Treatment. DOI: 10.1309/0G1PEJ00J8KP8357. Dostupné z: <http://ajcp.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/0G1PEJ00J8KP8357>
28. Česká hematologická společnost: ČLS JEP. *Doporučení pro hematologickou laboratoř: referenční meze*[online]. 2012-2013 [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://www.hematology.cz/doporuceni-chs-meze.php>