

XVI. Česko-slovenská konference o hemostáze a trombóze  
Hradec Králové, 21.-23.5.2009

# *tr om bocy ty*

Rokitanského prednáška

P. Kubisz

KHaT JLF UK a MFN, Martin





*“Patologická anatómia je základ pre patologickú fyziológiu, na ktorej sa bude v budúcnosti budovať patologická histológia, chemická patológia a experimentálna patológia.”*

**Karel Rokitský** (1804 - 1878)

# trombocyt - objav

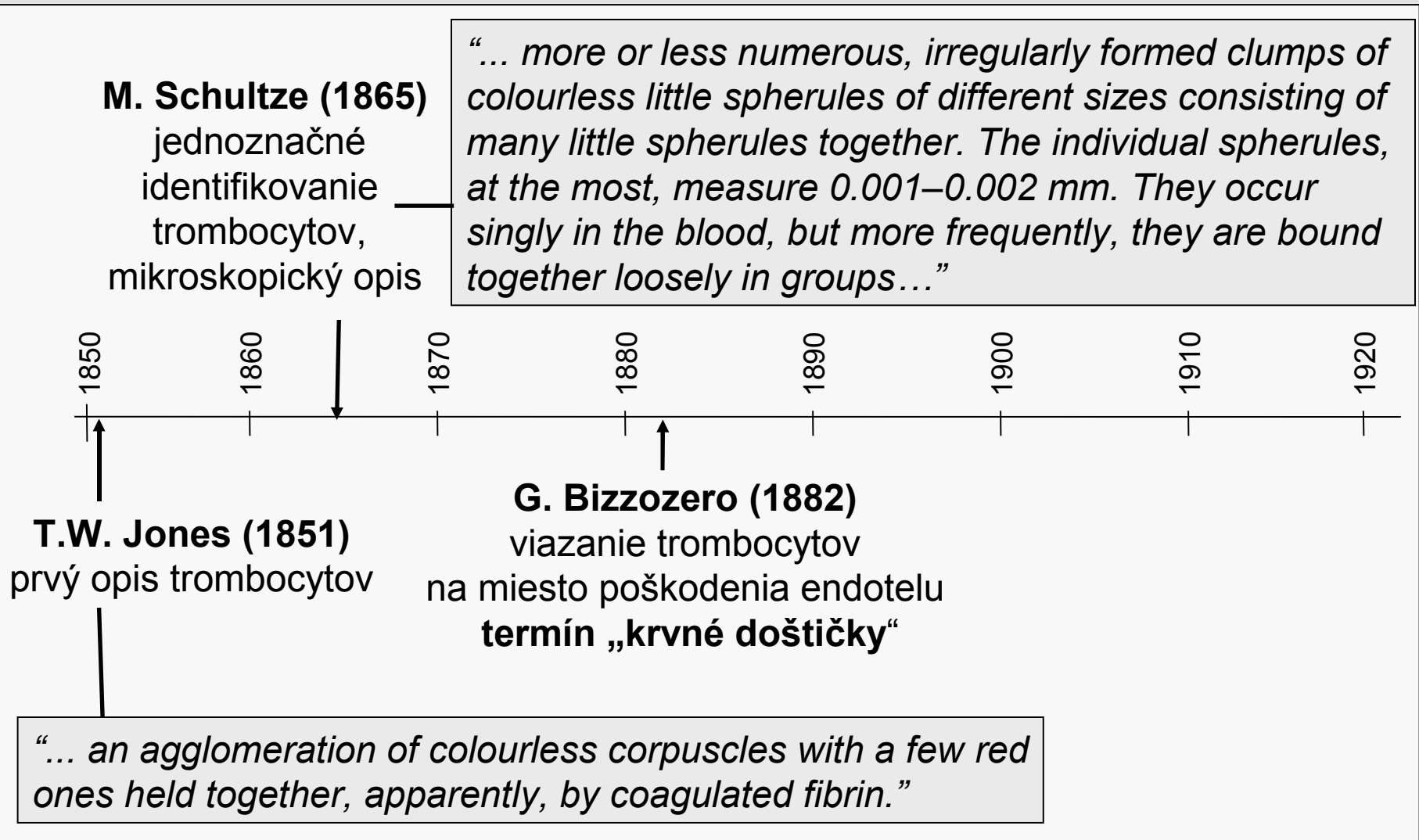


**M. Schultze  
(1865)**



**G. Bizzozero  
(1882)**

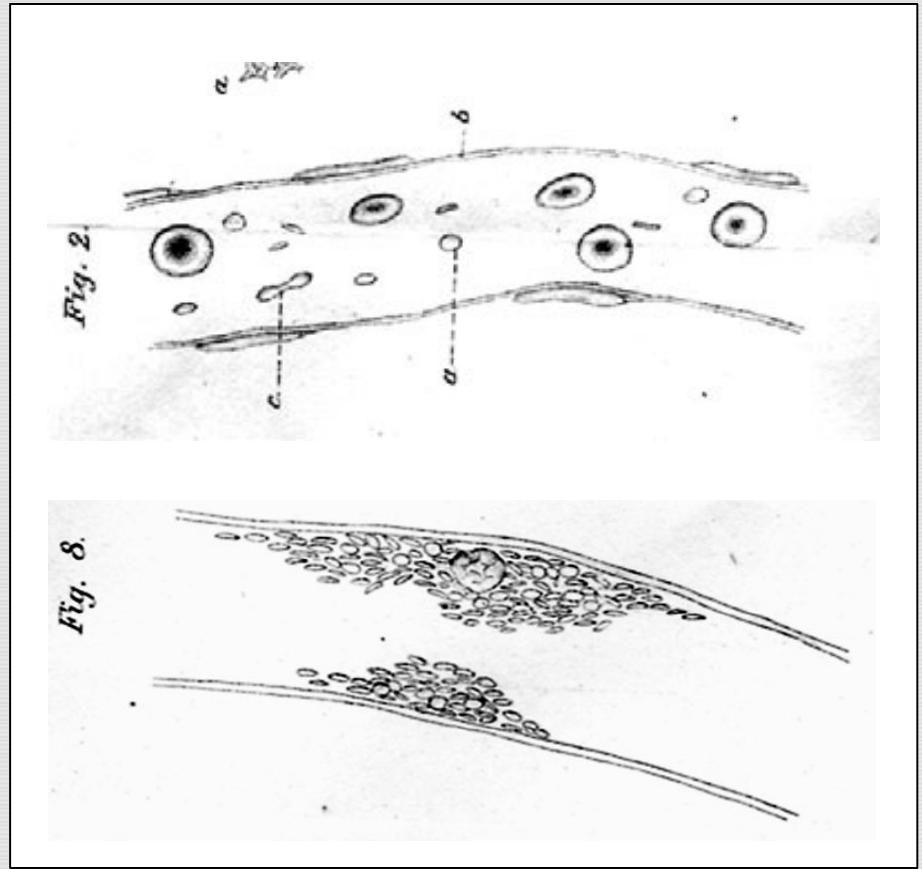
# trombocyt - objav



# prvé opisy trombocytov

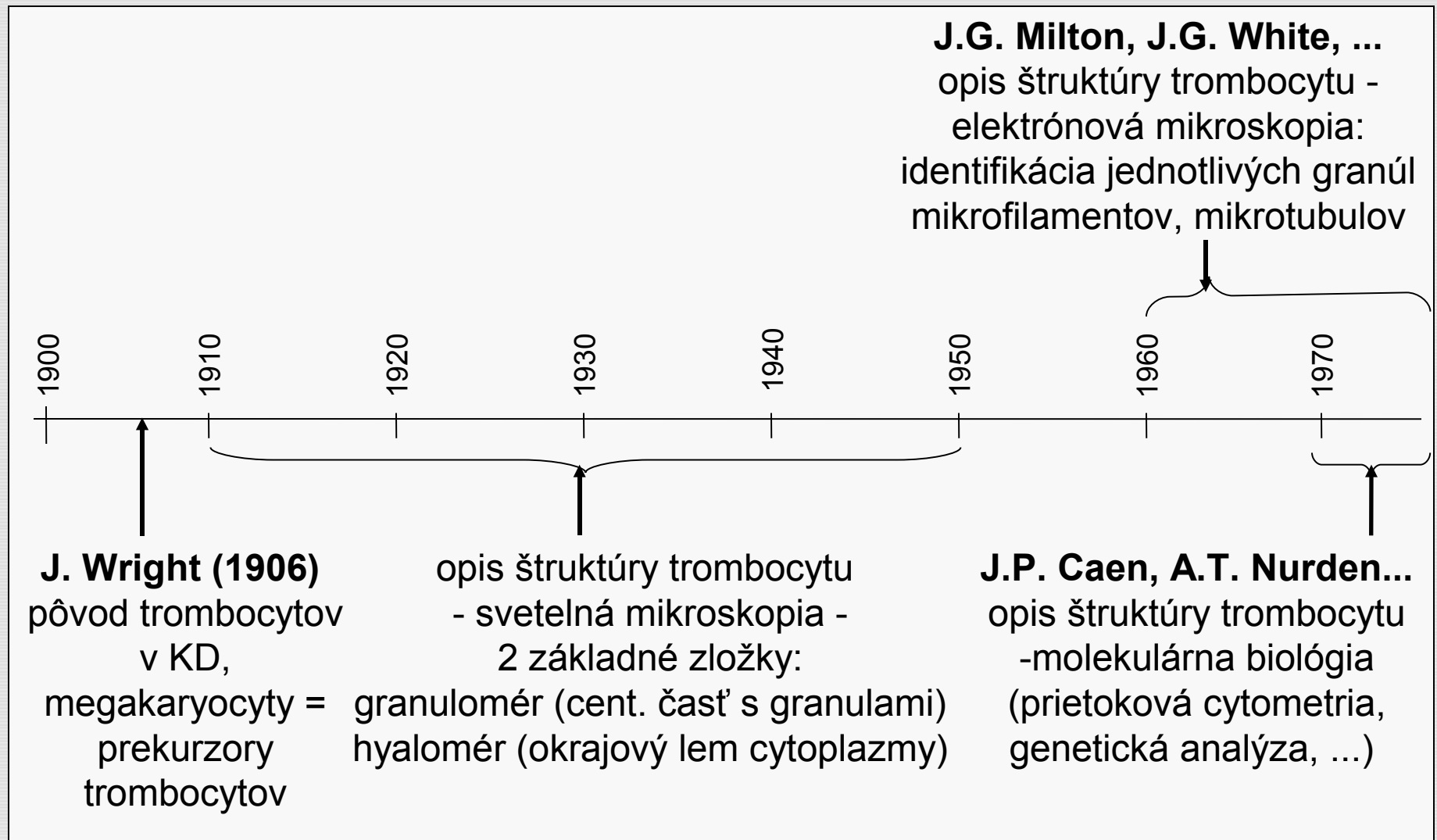


náter periférnej ľudskej krvi  
(M. Schultze)

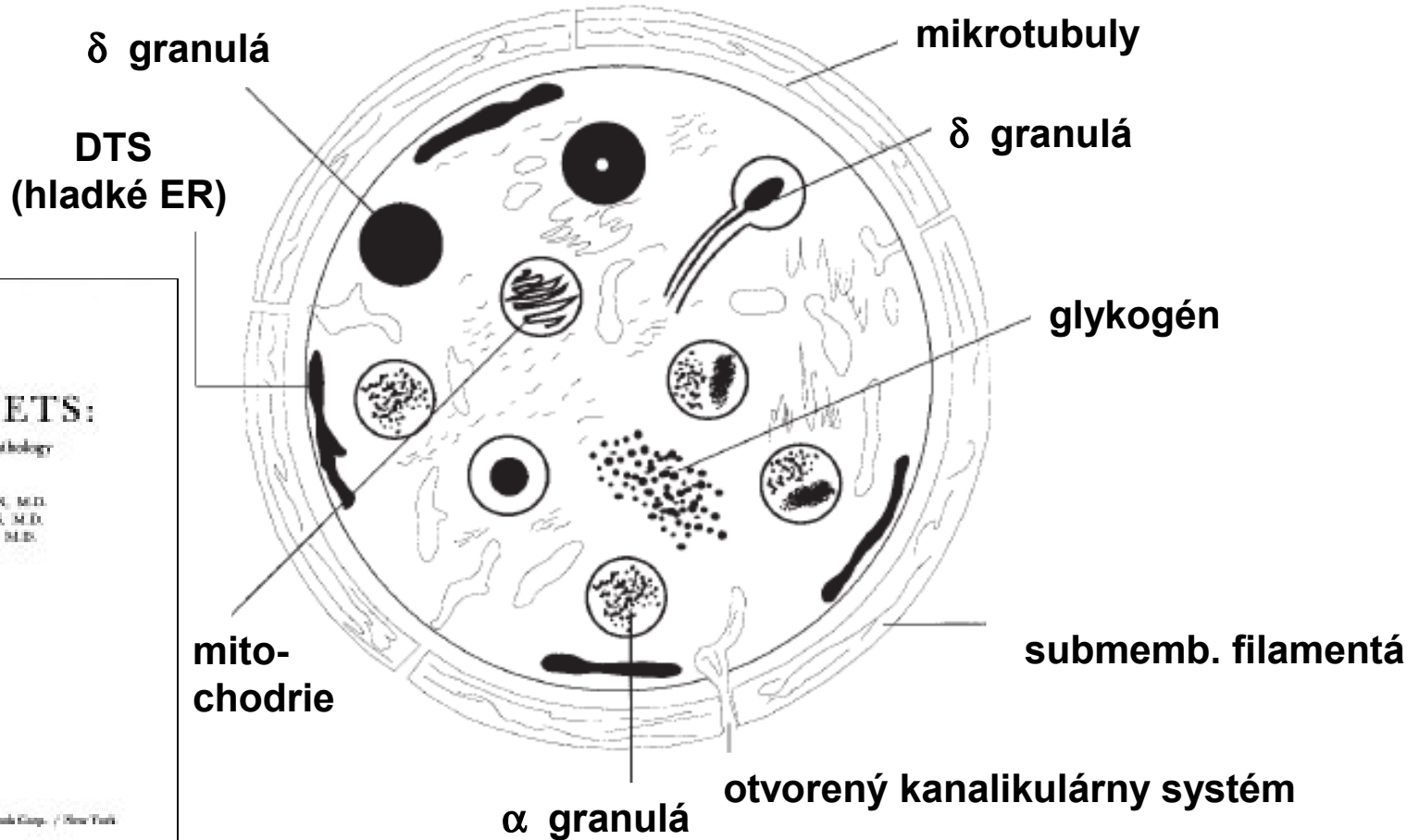


in vivo – arteriola mezenteria –  
morské prasa (G. Bizzozero)

# trombocyt - morfológia



# trombocyt - morfológia



## PLATELETS:

Physiology and Pathology

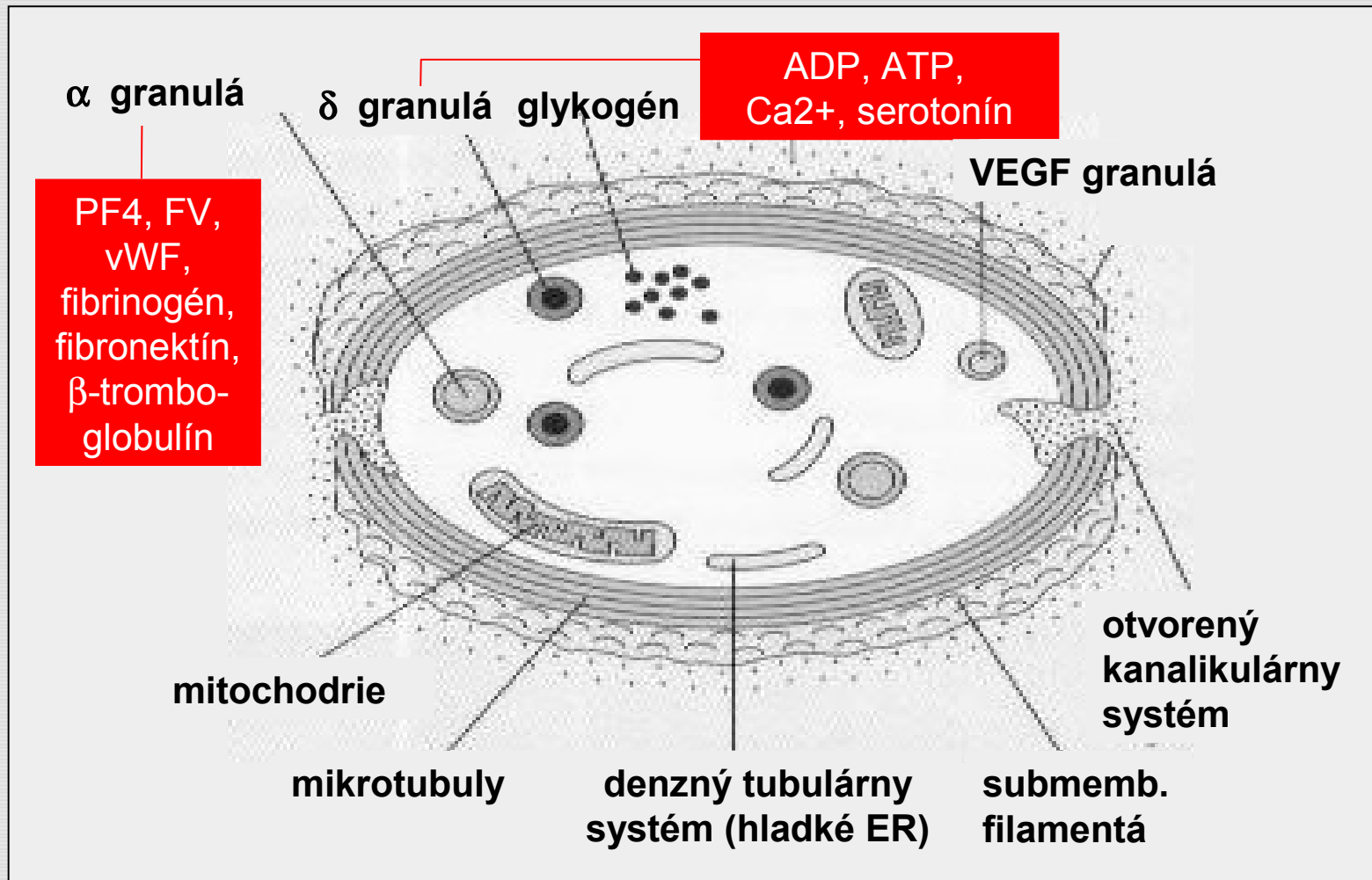
JACQUES F. CAEN, M.D.  
STIG CRONBERG, M.D.  
PETER KUBISZ, M.D.



Stratton International Medical Book Corp. / New York

upravené podľa: Gruchy GC et al., *Clinical Hematology in Medical Practice* (2nd ed), 1968, Oxford, Blackwell; Caen JP, Cronberg S, Kubisz P, *Platelets: Physiology and Pathology*. 1977, New York, Stratton Int. Medical Book Corp

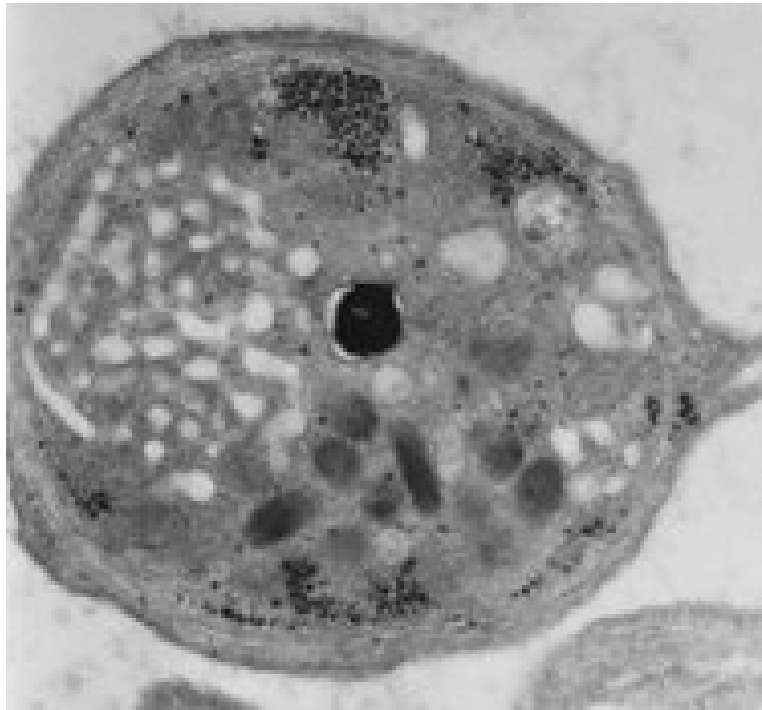
# trombocyt - morfológia



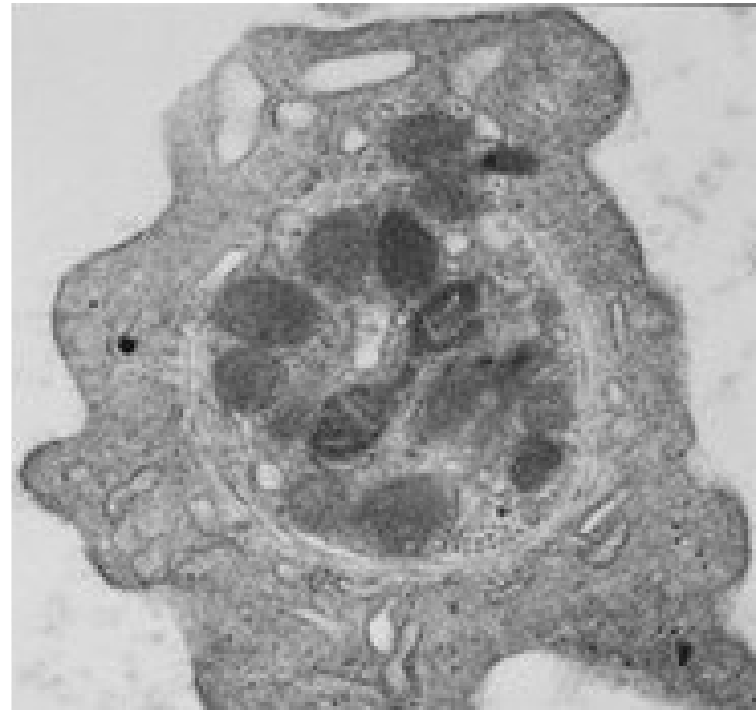
upravené podľa: E. Hiller. Basic principles of hemostasis. In: R. Munker et al., Modern Hematology, 2nd Edition, 2006, Humana Press, 513s

# trombocyt - elektrónová mikroskopia

trombocyt v kludovom stave



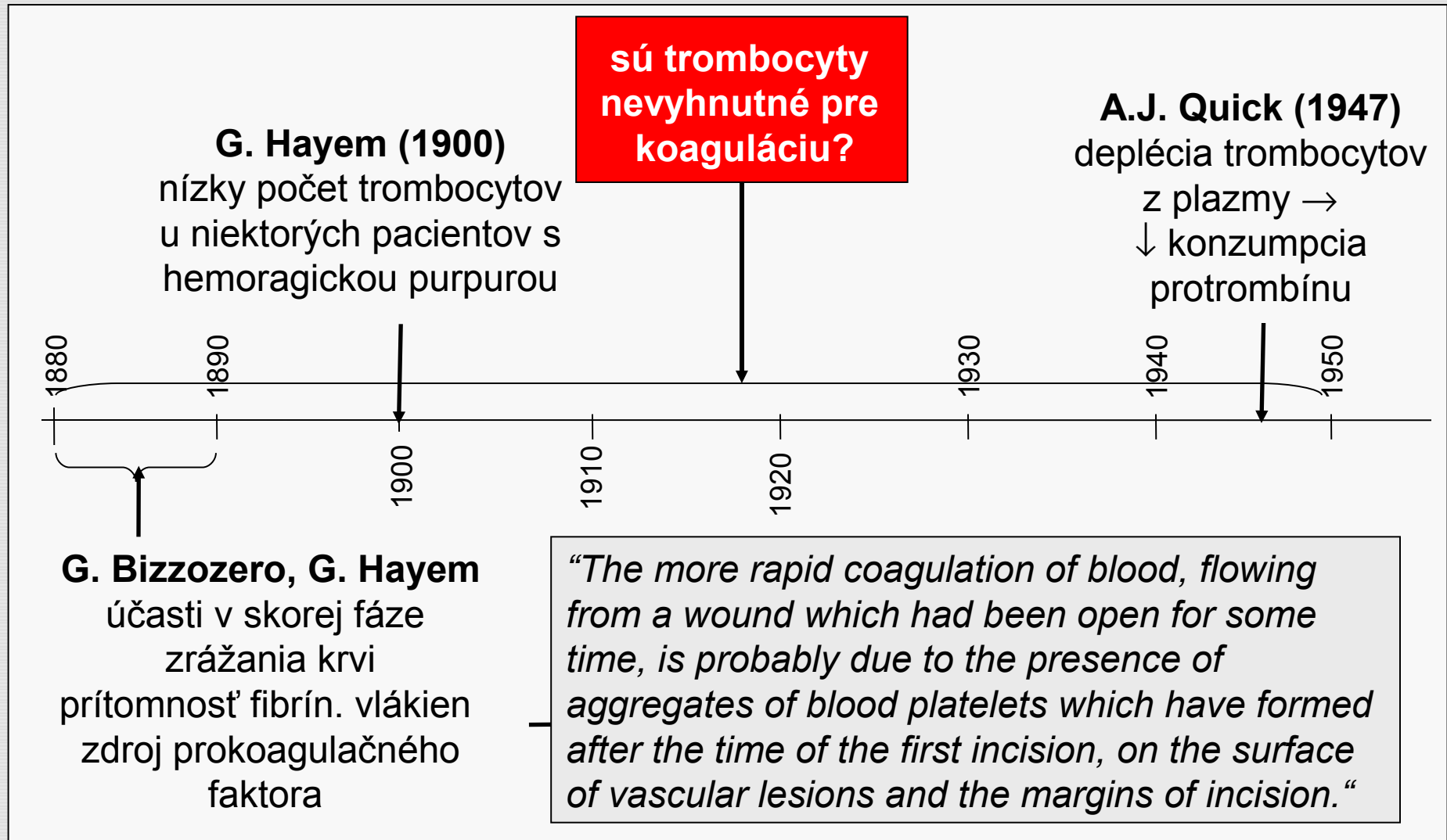
aktivovaný trombocyt



☑ morfológia trombocytu vrátane intracelulárnej štruktúry dobre známa a detailne opísaná už v 70 rokoch 20. stor.

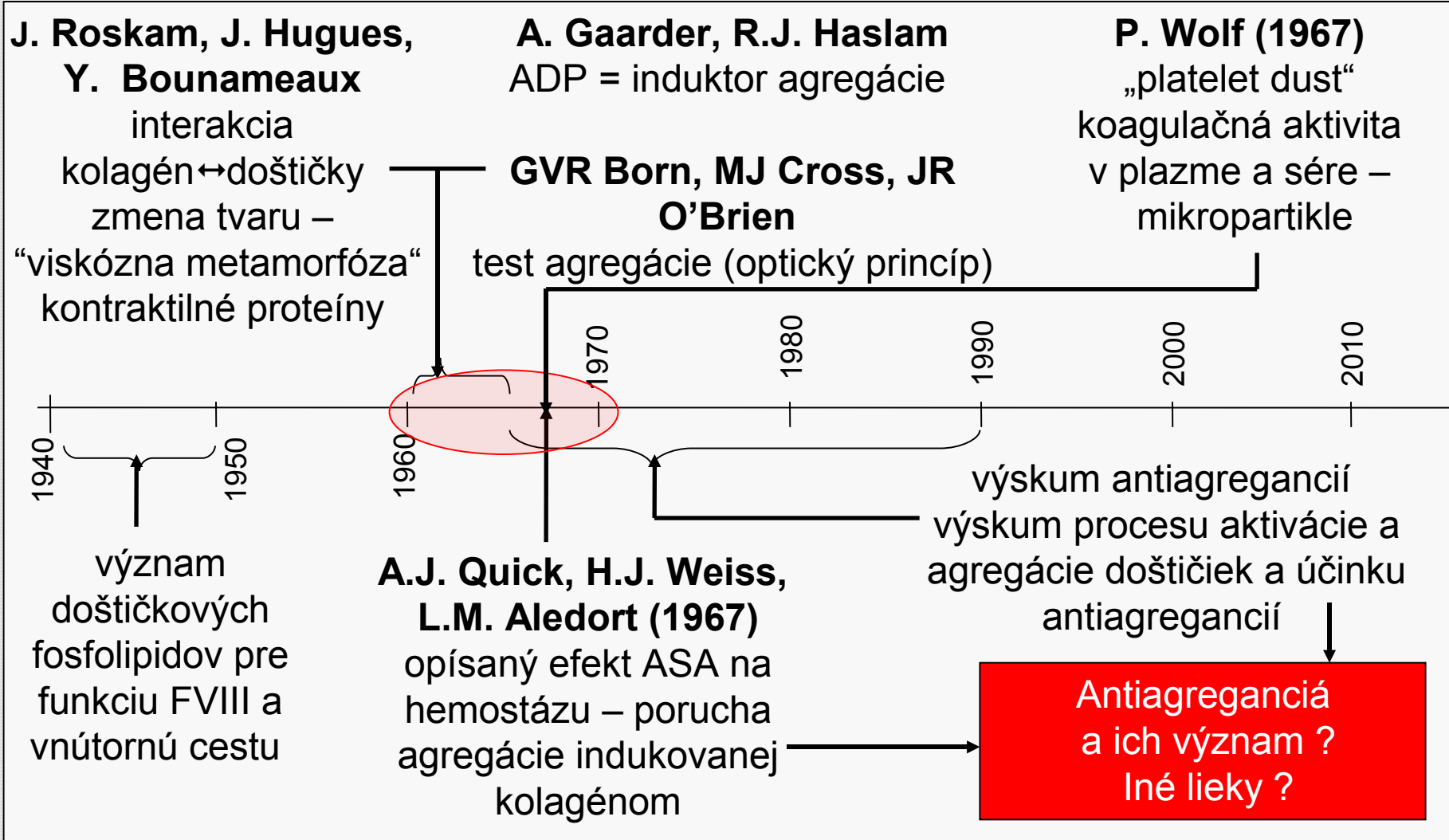
❓ funkcia trombocytu

# trombocyt - funkcia



podľa: Hayem G. Leçons sur les maladies du sang. Masson, Paris, 1900; Quick A.J., Am J Med Sci 1947; 241: 272-80; De Gaetano G, Haematologica 2000; 85: 3-11;

# trombocyt - funkcia



podľa: O'Brien JR, Lancet 1968; 1:1431; Weiss HJ, Aledort LM, Lancet 1967; 2:495-7; Quick AJ. Bleeding problems in clinical medicine. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970; Roskam J et al., J Physiol 1961; 53:175-83; De Gaetano G, Haematologica 2000; 85: 3-11; Wolf P, Br J Haematol 1967; 13:269-288.

# funkcia trombocytu

## receptory dôležité pre hemostázu (1)

| <i>receptor</i>   | <i>synonymické<br/>označenie</i> | <i>agonista</i>        | <i>funkcia</i>                   |
|-------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| GPVI              |                                  | kolagén                | adhézia                          |
| GPIa/IIa          | $\alpha 2\beta 1$<br>CD49b/29    | kolagén                | adhézia na kolagén (pomocná)     |
| GPIIb/IIIa        | $\alpha IIb\beta 3$<br>CD41/61   | fibrinogén<br>vWF      | agregácia, retrakcia koagula     |
| $\alpha 6\beta 1$ | CD51/61                          | fibronektín<br>laminín | adhézia<br>adhézia               |
| GPIb-IX-V         | CD42                             | vWF                    | “viazanie (tethering)” doštičiek |
| FcεRII            | CD23                             | Fc fragment Ig         | imunitná aktivácia trombocytov   |
| FcγRII            | CD30                             | Fc fragment Ig         | imunitná aktivácia trombocytov   |

# funkcia trombocytu

## receptory dôležité pre hemostázu (2)

| <i>receptor</i>         | <i>agonista</i> | <i>funkcia</i>                                                            |
|-------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| PAR1<br>PAR4            | trombín         | “koagulačná“ aktivácia trombocytov                                        |
| P2Y1                    | ADP             | aktivácia trombocytov (inicálna)                                          |
| P2Y12                   | ADP             | aktivácia trombocytov (feedback)                                          |
| Sky<br>Axl<br>Mer       | Gas6 proteín    | aditívna úloha pri aktivácii (modifikácia signálu prenášaného GPIIb/IIIa) |
| TP                      | tromboxány      | aktivácia trombocytov (feedback)                                          |
| $\alpha$ 2<br>$\beta$ 2 | adrenalin       | aktivácia trombocytov                                                     |
| IP                      | prostacyklíny   | inhibícia podmienená endotelom                                            |

# trombocyt - hlavná hemostatická funkcia

hlavná hemostatická funkcia  
=  
tvorba doštičkového trombu v mieste poranenia cievnej steny

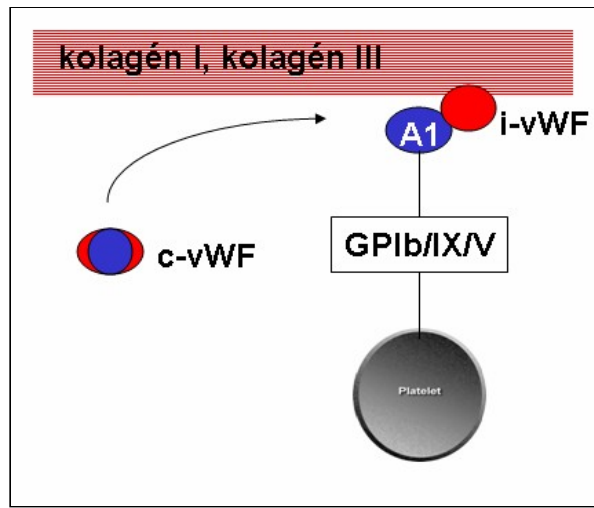


- iniciálne naviazanie trombocytov na subendotel a ich aktivácia (**úvodná fáza**)
- naviazanie a aktivácia ďalších trombocytov - pôsobenie agonistov uvoľňovaných v iniciálnej fáze a počas aktivácie trombocytov (**propagačná fáza**)
- stabilizácia vytvoreného trombu a zabránenie jeho predčasnému rozpusteniu pred zhojením miesta poranenia (**stabilizačná fáza**)
- zabránenie progresie trombu do okolia (**regulácia**)

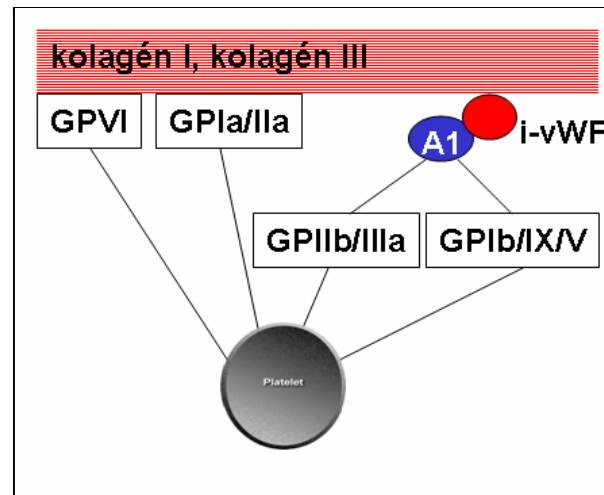
# úvodná fáza

- **adhézia trombocytov** v mieste poranenia cievnej steny na vhodný trombogénny povrch (kolagén I, kolagén III, fibronektín, laminín)
- **proces závislý na cievnych hemodynamických pomeroch:**
  - pri pôsobení vysokých strihových síl (arteriálne riečisko, stenóza ciev) závislá na vWF
  - pri pôsobení nízkych strihových síl (venózne riečisko) môže prebehnúť aj bez vWF - priama väzba trombocytov na subendotel cez špecifické receptory
- **interakcia s kolagénom (receptory GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa) a vWF (GPIIb/IIIa/V) je spojená s aktiváciou trombocytov**

# úvodná fáza - adhézia trombocytov

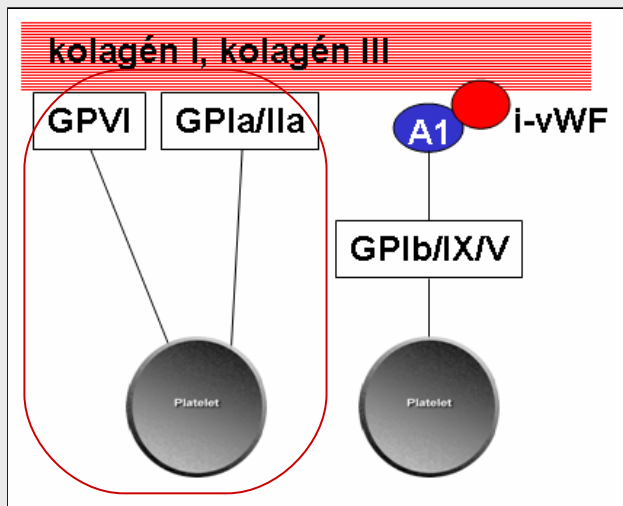


“platelet thetering”  
iniciálna adhézia (nestabilná)



stabilná adhézia - pevná  
fixácia doštičiek

↑ *strihové sily*  
( $>1000 \text{ s}^{-1}$ )



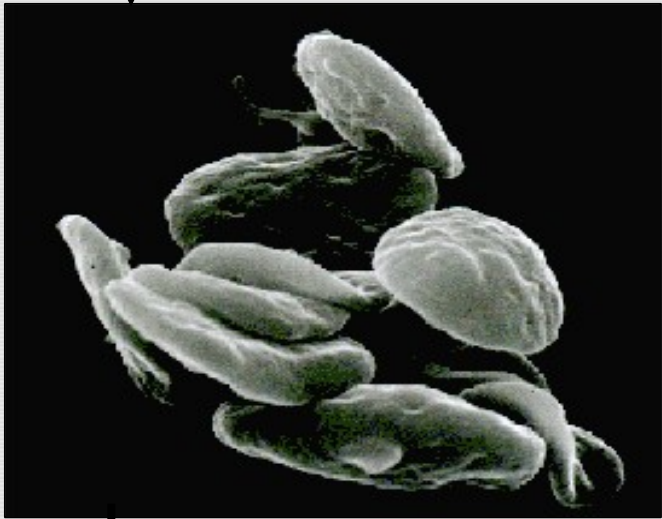
adhézia bez  
„theteringu“

↓ *strihové sily*  
( $<1000 \text{ s}^{-1}$ )

# aktivácia trombocytov

*trombocyty v kludovom stave*

doštičkoví agonisti



*aktivované trombocyty*



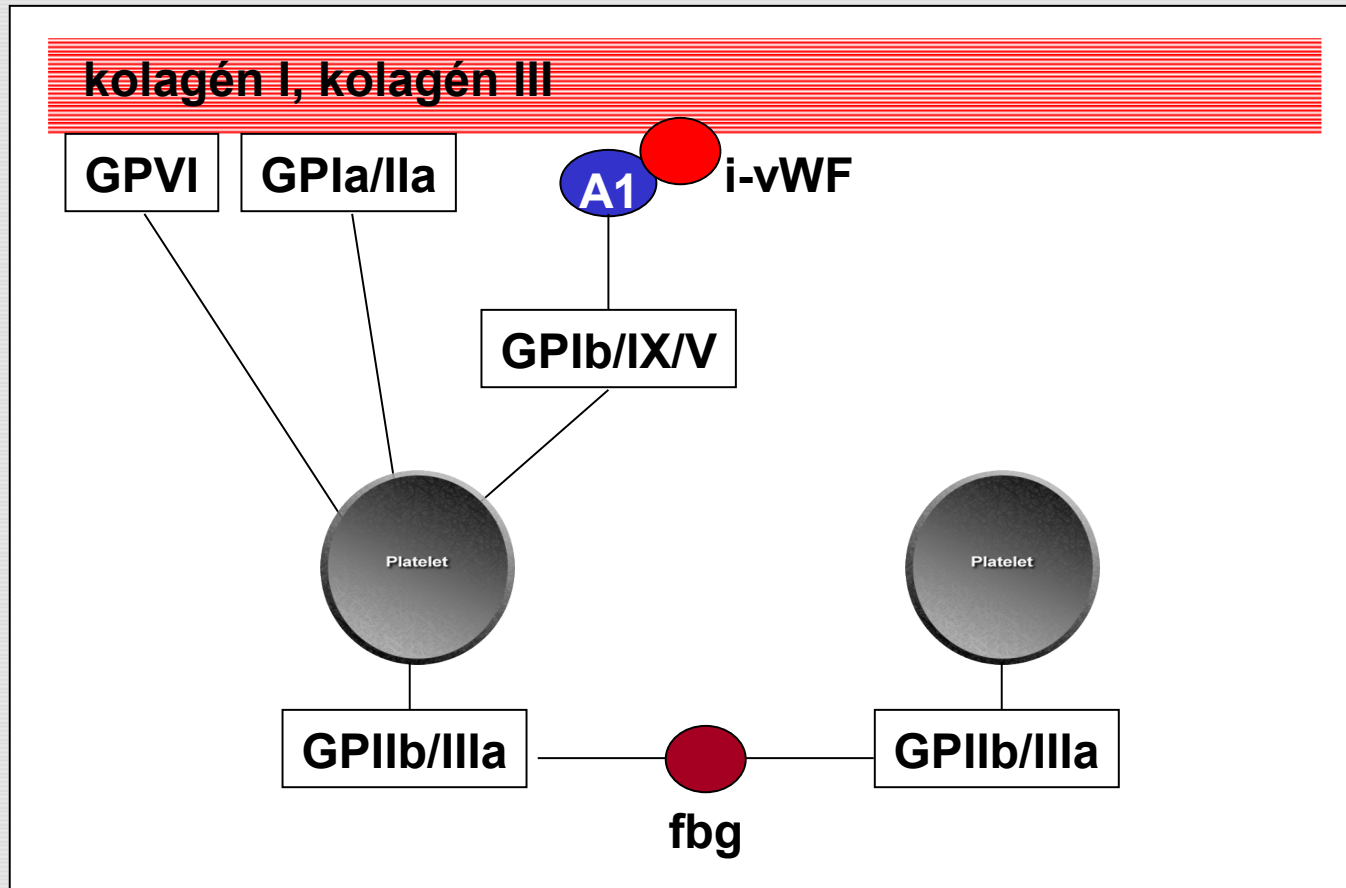
- “shape change”
- “flip-flop” (zmena zloženia plazmatickej membrány - fosfolipidy, proteíny)
- aktivácia metabolismu kyseliny arachidónovej (tvorba mediátorov - TXA<sub>2</sub>, PGI, ...)
- degranulačná reakcia
- tvorba mikropartikúl

# fyziologickí agonisti trombocytov

| <i>agonista</i> | <i>receptor</i>             | <i>zdroj</i>                             | <i>konečný efekt</i>                                                                                                                                                 |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| kolagén         | GPIa/IIa<br>GPVI            | subendotel                               | intracelulárny vzostup $Ca^{2+}$<br>syntéza TXA2<br>fosforylácia intracelulárnych<br>proteínov<br>sekrečná reakcia<br>zmena tvaru<br>expresia a aktivácia GPIIb/IIIa |
| vWF             | GPIb/IX/V                   | endotel. bb.<br>doštičky ( $\alpha$ gr.) |                                                                                                                                                                      |
| ADP             | P2Y1<br>P2Y12               | erytrocyty<br>doštičky ( $\delta$ gr.)   |                                                                                                                                                                      |
| TXA2            | TP                          | doštičky                                 |                                                                                                                                                                      |
| trombín         | GPIb/IX/V<br>PAR-1<br>PAR-4 | hemokoagulácia                           |                                                                                                                                                                      |
| adrenalín       | $\alpha$ 2A                 | dreň nadobličiek                         | synergický účinok s ostatnými<br>agonistami (inhibícia syntézy<br>cAMP intracelulárne)                                                                               |

# propagačná fáza

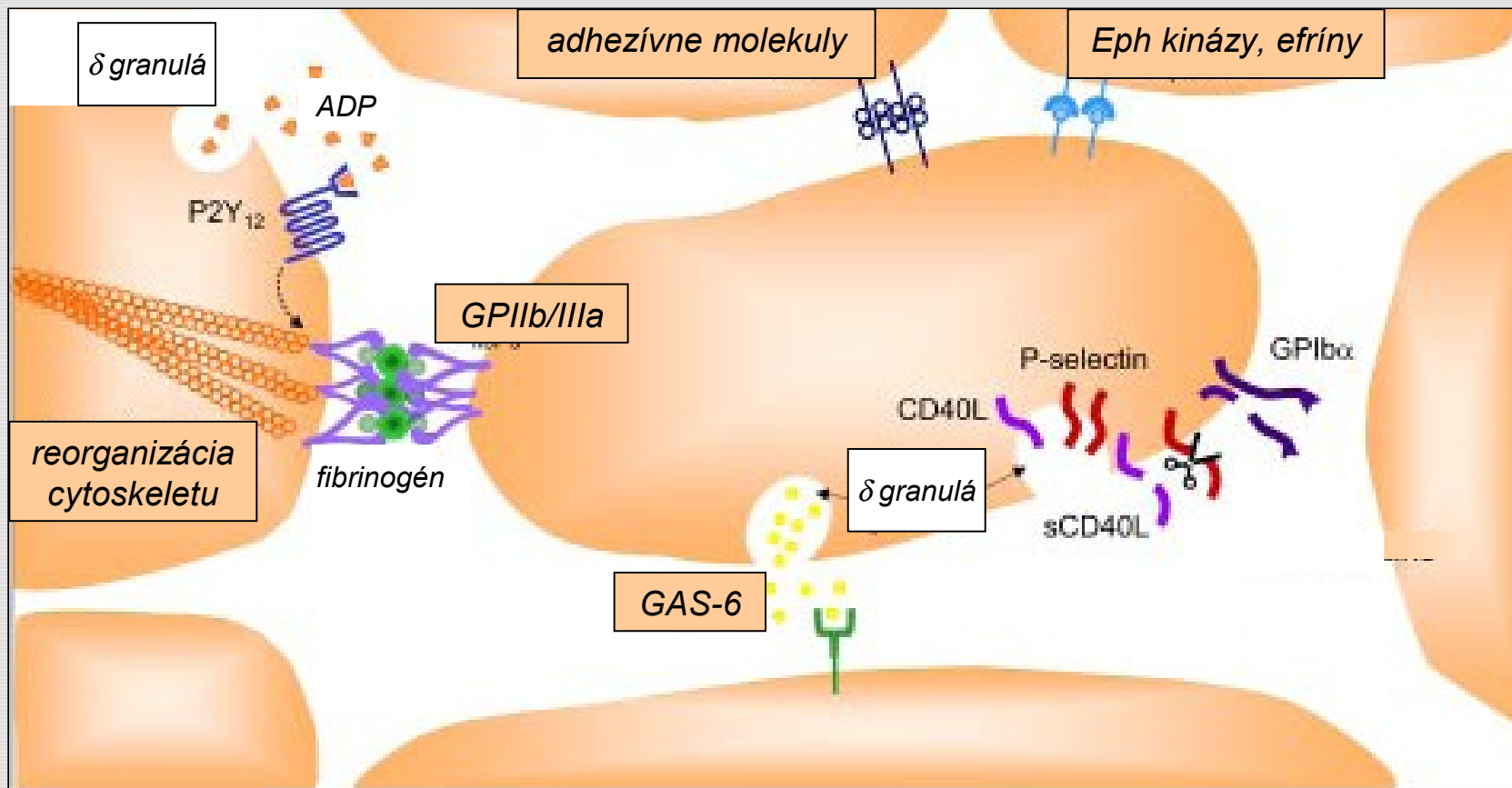
## agregácia za fyziologických podmienok



# stabilizačná fáza - známe mechanizmy

- “outside-in signaling” (GPIIb/IIIa) → reorganizácia cytoskeletu, retrakcia koagula <sup>1</sup>
  - interakcia adhezívnych molekúl trombocytov (JAM-A, JAM-C, SLAM, CD40 ligand) → plt ↔ plt, plt ↔ leukocyt <sup>2</sup>
  - interakcie regulačných proteínov: <sup>3, 4</sup>
    - GAS6 (R: Axl, Mer, Sky)
    - efrín B1 (R: Eph1, Eph2)
    - semaforín 4D (R: CD72, plexín-B1)
- deficit u zvieracích modelov:  
porucha retrakcie koagula a  
odpovedí na agonistov
- ↑ účinok agonistov uvoľnených počas aktivácie trombocytov → ↑ lokálnych koncentrácií pri retrakcii koagula <sup>2</sup>
  - tvorba fibrínovej siete (dôležitá zložka: TF derivovaný z monocytov → interakcie plt ↔ monocyt?; P-selektín dôležitý pre väzbu TF na povrch trombocytov) <sup>5</sup>

# stabilizačná fáza



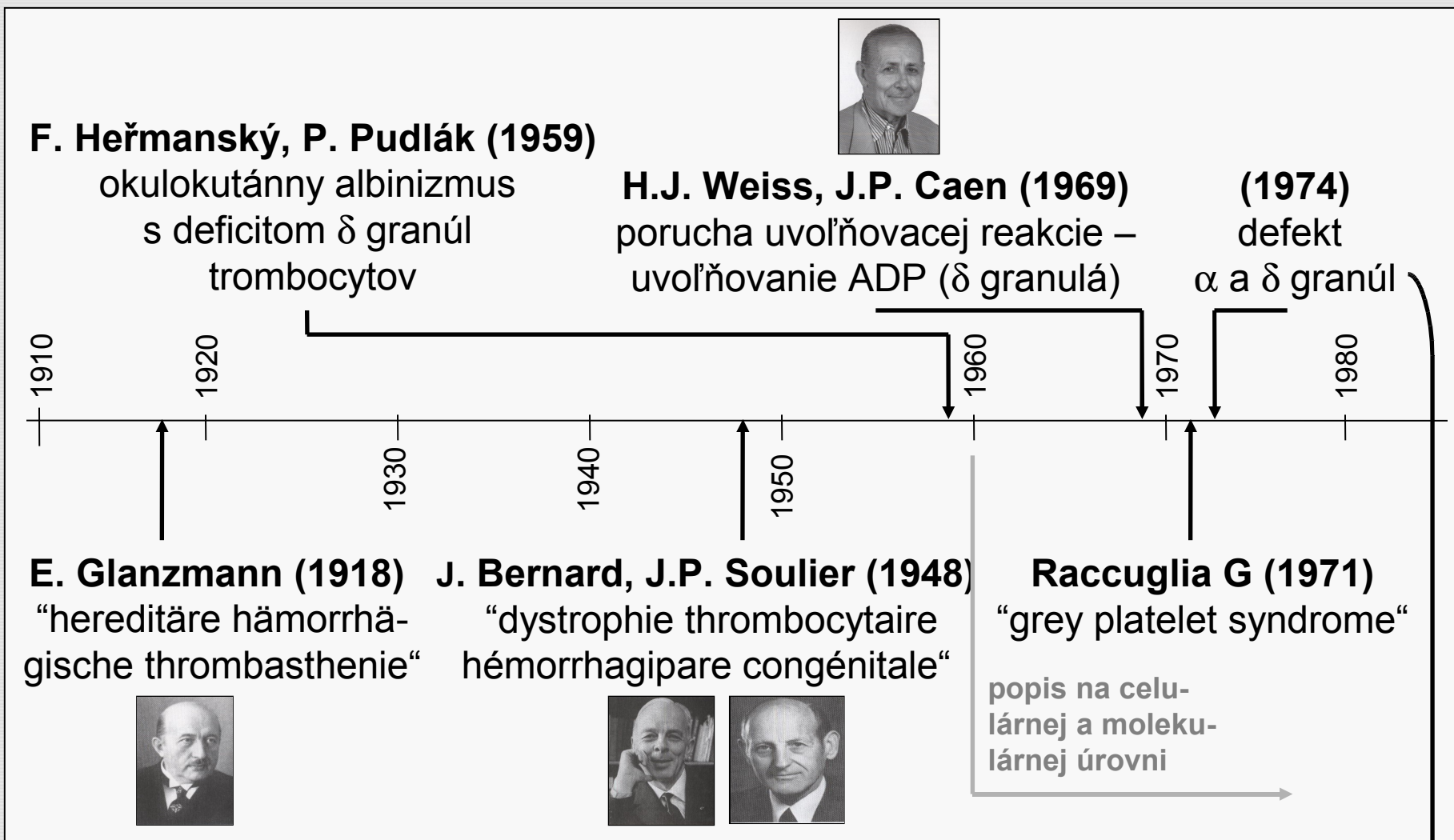
✓ morfológia trombocytu vrátane intracelulárnej štruktúry dobre známa a detailne opísaná už v 70 rokoch 20. stor.

✓ funkcia trombocytu - 2009



Ⓢ patologické odchýlky (trombocytopatie)

# trombocyt - trombocytopatie



podľa: Seligsohn U, Pathophysiol Haemost Thromb; 32: 216–7; Lanza F, Orphanet J Rare Dis; 16: 46; Raccuglia G, Am J Med 1971; 51: 818-28 ; Kubisz P. a spol., Thrombosis Research, 1974; 4: 119-130

# predpokladaný výskyt vybraných trombocytopatií

| <i>porucha</i>           | <i>dedičnosť</i> | <i>odhad. počet<br/>prípadov (UK)</i> | <i>odhad. počet<br/>prípadov (svet)</i> |
|--------------------------|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Bernardov-Soulierov sy   | AD               | < 100                                 | < 1000                                  |
| Glanzmanova trombasténia | AD               | < 100                                 | < 1000                                  |
| Storage pool disease     | AD               | < 100                                 | < 1000                                  |
| Wiskottov-Aldrichov sy   | X                | < 100                                 | < 1000                                  |
| Heřmanského-Pudlákov sy  | AR               | < 100                                 | < 1000                                  |
| Chediakov-Higashiho sy   | AD               | < 100                                 | < 1000                                  |
| poruchy MYH9             | X                | < 100                                 | < 1000                                  |
| Syndróm šedých dostičiek | AR               | < 10                                  | < 100                                   |
| Parisov-Trousseauov sy   | AD               | < 10                                  | < 100                                   |
| Scottov syndróm          | AD               | < 10                                  | < 100                                   |

# klasifikácia - typ poruchy

## *poruchy adhézie*

- doštičkový typ vWCh
- Bernardov-Soulierov sy

## *poruchy agregácie*

- Glanzmannova trombasténia

## *poruchy sekrécie*

- poruchy receptorov (pre  $\text{TXA}_2$  / ADP / kolagén)
- poruchy metabolizmu kys. arachidónovej /  $\text{TXA}_2$
- poruchy metabolizmu fosfatidylinozitolu
- porucha fosforylácie pleckstrínu
- porucha mobilizácie  $\text{Ca}^{2+}$

- poruchy doštičkových granúl
  - deficit  $\delta$ -granúl
    - Heřmanského-Pudlákov sy
    - Chediakov-Higashiho sy
    - trombocytopénia so sy absencie rádia
  - deficit  $\alpha$ -granúl
    - sy šedých doštičiek
    - porucha “Quebec“
    - Parisov-Trousseauov/Jacobsenov sy
  - súčasný deficit  $\alpha$ - a  $\delta$ -granúl

## *poruchy prokoagulačnej funkcie*

- Scottov syndróm

# klasifikácia - klinika

- väčšina opísaných porúch sú krvácavé, niektoré aj s genetickým základom

 poruchy trombofilné

# trombofilné trombocytopatie

**H. Sinzinger (1990)**

defekt doštičkovej lipoxigenázy  
(Wien-Penzing defect)

1980

**P.L. Holliday (1983)**

“Sticky platelet  
syndrome”

1990

identifikovanie  
polymorfizmov  
doštičkových  
glykoproteínov

2000

klinické (populačné štúdie)

**vzťah polymorfizmov  
k trombóze?**

2010

# trombocytopatie - trombofilné poruchy

- **polymorfizmy s možným trombofilným účinkom**
  - GPIb $\alpha$  VNTR
  - GPIb $\alpha$  C3550T (Thr145Met)
  - GPIb $\alpha$  -5T/C (Kozak)
  - GPIa C807T
  - GPIIIa P1A (Leu33Pro)
  - GPVI T13254C (Ser219Pro)
  - GAS-6 c.834 + 7G>A
- **syndróm lepivých doštičiek**
- **defekt doštičkovej lipoxxygenázy (Wien-Penzing defekt)**

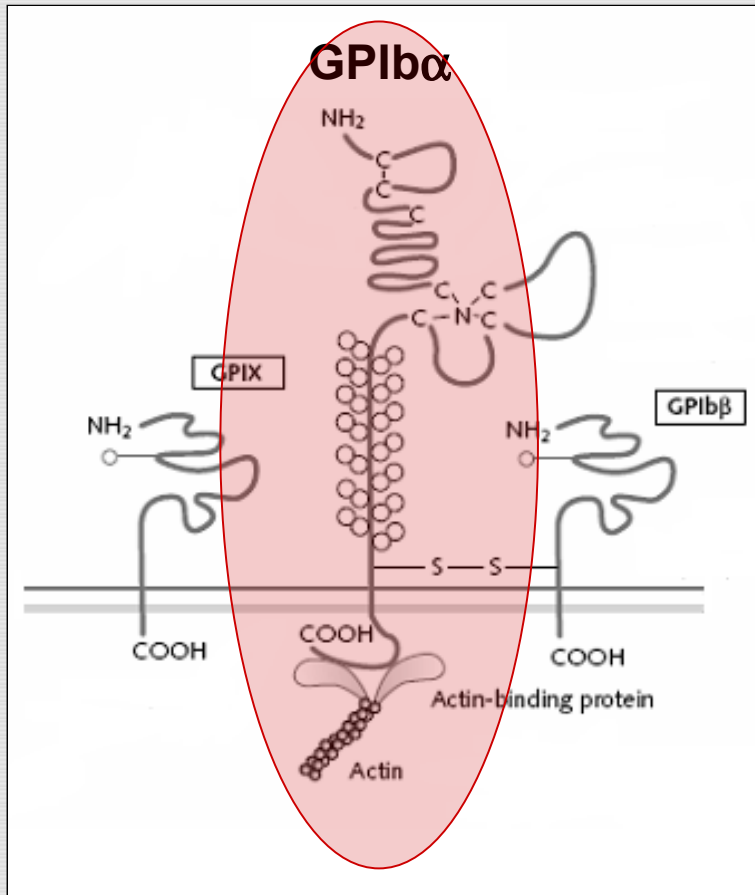
# výskyt trombofilných porúch v celej populácii

| <i>porucha</i>                       | <i>výskyt</i> <sup>2-5</sup><br><i>He (Ho)[%]</i> | <i>ČR</i> <sup>1</sup> |               |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|---------------|
|                                      |                                                   | <i>He [%]</i>          | <i>Ho [%]</i> |
| GPIb $\alpha$ C3550T (alela T)       | 12-30 (1-3)                                       | -                      | -             |
| GPIb $\alpha$ -5T/C (alela C)        | 20-25 (1-2)                                       | -                      | -             |
| GPIa C807T (alela T)                 | 40-60 (13-17)                                     | 47,27                  | 16,70         |
| GPIIIa P1A (alela PI <sup>A2</sup> ) | 15-30 (1-3)                                       | 27,38                  | 3,66          |
| GPVI T13254C (alela C)               | 13-23 (1-3)                                       | 21,45                  | 1,79          |
| GAS-6 c.834 + 7G>A                   | neznámy *                                         | -                      | -             |
| SPS                                  | neznámy **                                        | -                      | -             |
| Wein-Penzing defekt                  | neznámy **                                        | -                      | -             |

\* nerealizované štúdie s veľkým počtom pacientov; \*\* nerealizované štúdie v zdravej populácii  
*He* = heterozygot; *Ho* = homozygot

1) Kvasnička J et al., *Cor Vasa* 2009; 51: 187–193; 2) Ollikainen E et al., *Atherosclerosis* 2004; 176: 95–9;  
3) Benze G et al., *eur Heart J* 2002; 23: 325-330; 4) Baker RI et al., *Blood* 2001; 98: 36-40; 5) Mattson JC,  
*Jour-nal of Clinical Ligand Assay* 2001;24:96-109;

# polymorfizmy GPIb



- **známe polymorfizmy GPIbα**

- VNTR (variable number of tandem repeats) – alely A, B, C, D
- C3550T (Thr145Met)
- **-5T/C (Kozak)**

---

Thr145Met a VNTR sú vo väzbovej nerovnováhe (Met145/VNTR B, VNTR A)

- **hemostazeologické dôsledky**

- známe len pri -5T/C polymorfizme  
→ zmeny v expresii GPIbα →  
alela C: ↑ denzita GPIb/IX/V na  
povrchu trombocytov

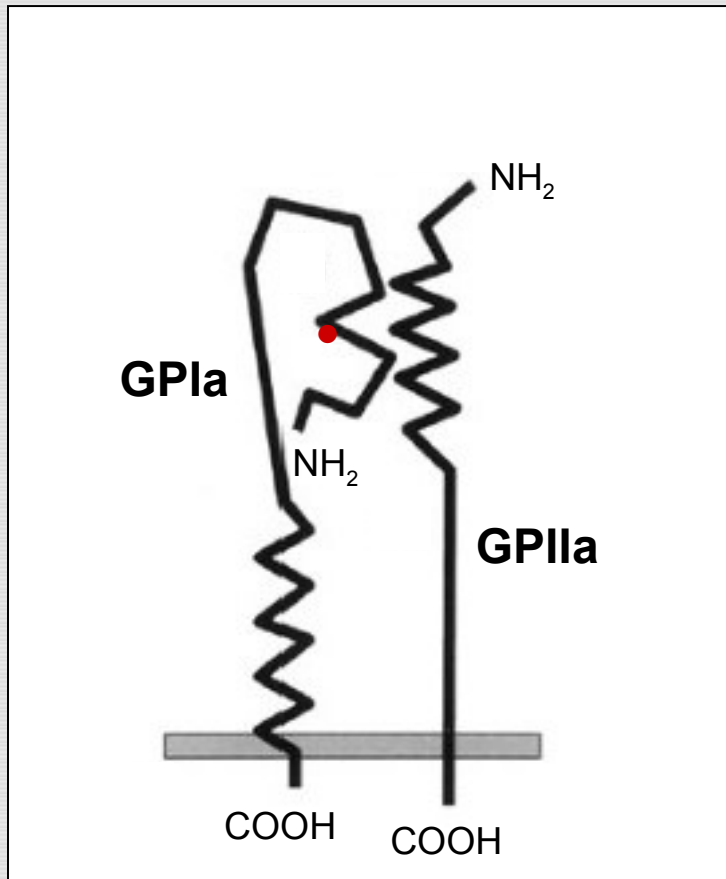
# Kozak (-5T/C) polymorfizmus a tromboembolizmus

- *Meisel C et al.*, n=2000 (1000 pacientov s trombózou / stenózou koronárnych aa. verif. koronarografiou) <sup>1</sup>  
alela -5C rizikový faktor pre akútny koronárny syndróm (RR=1.43); a komplikácie po PTCA (RR=3.75)
- podobné závery zistené aj v ďalších štúdiách <sup>2,3</sup>

- *Frank MB et al.*, 78 žien s IM, 106 žien s iCMP < 45 r. <sup>4</sup>  
alela -5C nie je rizikovým faktorom pre IM a iCMP
- *Croft SA et al.*, n=1037 (539 pacientov s IM) <sup>5</sup>  
alela -5C nie je významným rizikovým faktorom IM

1) *Meisel C et al.*, J Am Coll Cardiol 2001; 2) *Kenny D et al.*, Thromb Thrombolysis 2002; 3) *Douglas H et al.*, Heart 2002; 4) *Frank MB et al.*, Blood 2001; 5) *Croft SA et al.*, Blood 2000

# polymorfizmy GPIa/IIa



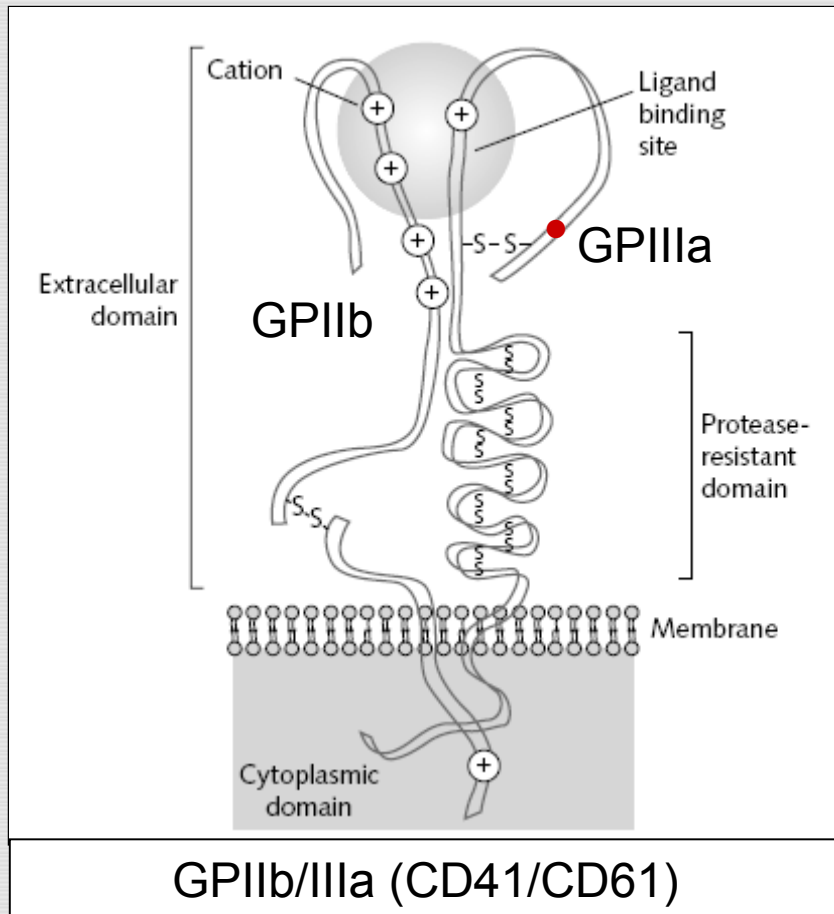
- **polymorfizmy GPIa**
  - C807T
- **hemostazeologické dôsledky**
  - pri C807 polymorfizme → alela 807T spojená so ↑ GPIa/IIa na povrchu trombocytov

*NATO Science Programme,  
Collaborative Linkage Grant  
J. Musial, Jagellonian Univeristy Medical School,  
PL; C. Marcinkiewicz, Temple Universitay,  
Philadelphia, USA; P. Kubisz, JLF UK, SK:  
Viper-venom derivated disintegrins as therapeutic  
agents against collagen integrin receptors;  
2003*

# GP1a C807T polymorfizmus a tromboembolizmus

- *Carlsson LE et al.*, n=411 (227 pacientov s iCMP) <sup>1</sup>  
alela 807T je nezávislým rizikovým faktorom pre iCMP u pacientov < 50 r.
- *Santoso S et al.*, 2237 pacientov s trombózou / stenózou koronárnych artérií verif. koronarografiou <sup>2</sup>  
alela 807T je rizikovým faktorom pre IM u mladších skupín (< 50r)
- *Croft SA et al.*, n=1053 (546 pacientov s IM) <sup>3</sup>  
alela 807T nie je nezávislým rizikovým faktorom pre IM, nezvyšuje riziko IM pri kombinácii s inými silnými rizikovými faktormi
- *Tsantes AE et al.*, metanalýza 19 štúdií, n=13835 <sup>4, 5</sup>  
alela 807T nie je rizikovým faktorom pre IM a iCMP

# polymorfizmy GPIIa



- **polymorfizmy GPIIIa**

- PIA (Leu33Pro)

- Leu = alela PI<sup>A1</sup>

- Pro = alela PI<sup>A2</sup>

- **hemostazeologické účinky**

- *Framingham Offspring Study*, n=1422; agregácia trombocytov → nosiči alely PI<sup>A2</sup> vykazovali *in vitro* ↑ agregabilitu trombocytov (pri aktivácii ADP, adrenalín) <sup>1, 2</sup>

- nosiči alely PI<sup>A2</sup> mali ↑ tvorbu fibrínu a ↓ antiagregačný účinok ASA <sup>3, 4</sup>

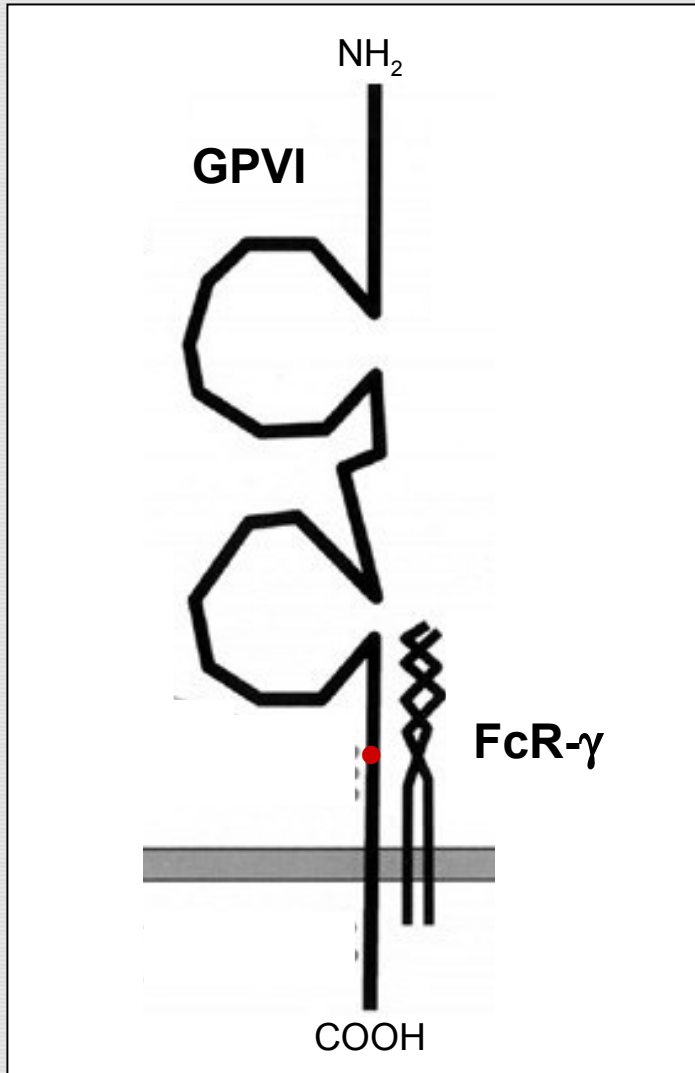
1) Feng DL et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999 - Framingham Offspring Study; 2) Kubisz P et al., *Trombóza a hemostáza*, 1999, Hradec Králové 27.-29.05.1999; 3) Musial et al., *Circulation* 2001; 4) Macchi L et al., *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1115-19; obr. opravený podľa: Provan D, Gribben J, *Molecular Hematolo-gy*, Blackwell Publishing 2005

# GIIIa PIA polymorfizmus a tromboembolizmus

- *Copenhagen City Heart Study*, pacienti s CAD (n=9149)  
alela  $PI^{A2}$  je spojená s 3-4x  $\uparrow$  rizikom IM u mužov < 40 rokov <sup>1</sup>
  - *metanalýza klinických štúdií*, pacienti s CAD (n=3400)  
alela  $PI^{A2}$  je rizikový faktor retrombózy koronárneho riečiska,  
trombózy stentu v koronárnom riečisku <sup>2</sup>
  - *Carter et al.*, pacienti s iCMP (n=609)  
signifikantne  $\uparrow$  výskyt alely  $PI^{A2}$  u pacientov < 50 rokov  
(49% vs. 27%) <sup>3</sup>
  - *Grove et al.*, pacienti s CAD s IM a bez IM (n=1019)  
u pacientov s IM signifikantne  $\uparrow$  výskyt alela  $PI^{A2}$  (35% vs. 28%)
- 
- *Physicians' Health Study*, prospekt. populačná štúdia, n=14916  
 $PI^{A2}$  alela nie je významný rizikový faktor pre IM a iCMP <sup>5</sup>

1) Bojesen SE et al., J Am Coll Cardiol 2003; 2) Burr D et al., Stat Med 2003; 3) Carter AM et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 4) Grove EL et al., J Intern Med 2004; 155: 637-44; 5) Ridker PM et al., Lancet 1997; 6) Kubisz P et al., Clin Appl Thromb/Hemost 2006; 12: 117-119

# polymorfizmy GPVI



- **polymorfizmy GPVI**
  - T13254C (Ser219Pro)
- **hemostazeologické dôsledky**
  - na povrchu trombocytov u nositeľov alely 13254C paradoxne ↓ počet receptoru GPVI <sup>1, 2</sup>
  - avšak vzťah hladiny GPVI a funkčnej aktivity nie je jednoznačný → podľa niektorých prác výrazne neovplyvňujú funkčnú aktivitu doštičiek <sup>1</sup>

# polymorfizmus GPVI T13254C

- *Helsinki Sudden Death Study*, 300 mužov  
alela 13254C je predstavuje signifikantný rizikový faktor pre trombózu koronár. aa. ( $p=0.02$ ), pozorovaný trend ku signifikantnosti vo vzťahu k IM ( $p=0.07$ )<sup>1</sup>  
podobný nález aj v ďalších štúdiách<sup>4</sup>
- *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*, 2090 žien, sledovanie výskytu ochorení koronár. aa. po dobu 5.8 rokov<sup>2</sup>  
alela 13254C je spojená s ↑ výskytom CAD vrátane IM u žien liečených hormonálnou substitučnou liečbou v klimaktériu
- štúdia MEGA (Leidská skupina)
- mutácia GP VI 13254 T > C je rizikovým faktorom pre vznik žilnej trombózy<sup>3</sup>

---

1) Ollikainen E et al., *Atherosclerosis* 2004; 176: 95–9; 2) Bray PF et al., *Blood* 2007; 109: 1862–9;  
3) Bezemer ID et al., *JAMA* 2008;299:1306–14; 4) Takagi S et al., *Atherosclerosis*. 2002;165:397-398.

# GAS-6



- gén GAS-6 (growth arrest specific) → produkt: **vit. K-dependentný proteín, similarita s proteínom S** <sup>1</sup>
- **regulácia agregácie trombocytov** po ich aktivácii → modifikácia prenosu signálu cez GPIIb/IIIa (*outside-in signaling*) <sup>2</sup>
- **zvieracie modely (myši):** <sup>3</sup>
  - **inaktivácia génu GAS6 (myš Gas6-/-)** → **zabránenie** fatálnej iatrogénnej **embolizácii** indukovanej kolagénom a EPI; bez zvýšených krvácajúcich prejavov, a to aj po poranení
  - protilátky proti GAS6 proteínu → **inhibujú agregáciu trombocytov *in vitro***, chránia pred iatrogénnou embolizáciou *in vivo*

# polymorfizmy GAS-6

## **GAS-6 c.834 + 7G > A**

- *Muñoz et al.*, <sup>1</sup>
- výskyt polymorfizmu GAS-6 proteínu v exóne 8 (GAS-6 c.834 + 7G > A) u pacientov s iCMP → signifikantne ↓ výskyt alely A)



*Alela G protrombotický efekt? Alela A ochranný účinok?*

## **Ala228Val**

- *Hooper WC et al.*, n=1104 (468 pacientov s IM), sledovaný polymorfizmus Ala228Val

mierne ↑ prevalencia alely Ala a ↑ rizika IM, bez signifikantnosti (výskyt alely 1,5% vs. 0,9%; OR=1,2; P>0,2)

prevalencia podľa rasy → vyššia u belochov v porovnaní s Afroameričanmi (1,4 vs. 0,4%)

# sticky platelet syndrome (SPS) - história

- 1983 → opísaný Hollidayom a spol. <sup>1</sup>
  - 30-r. pacientka s IM v gravidite (3.trimester)
  - hyperagregabilita trombocytov in vitro po aktivácii adrenalínom
  - dôkaz hyperagregability u rodinných príslušníkov (brat)
  - skríning na známe trombofilné stave negatívny, koagulačné testy v norme
- 1988 → E.F. Mammen: 41 pacientov s CAD a SPS <sup>2</sup>
- 1999 → E.F. Mammen: súbor 200 rodín s arteriálnymi a venóznymi trombózami <sup>3</sup>

\* CAD = coronary artery disease

---

1) Holliday PL et.al., Phoenix (Arizona), Conference on Stroke and Cerebral Circulation 1983; 2) Mammen EF. et.al., Folia Haematol., Leipzig, 1988; 115: 361-365; 3) Mammen EF., Seminars in Thromb/Hemostasis 1999; 25: 361-365

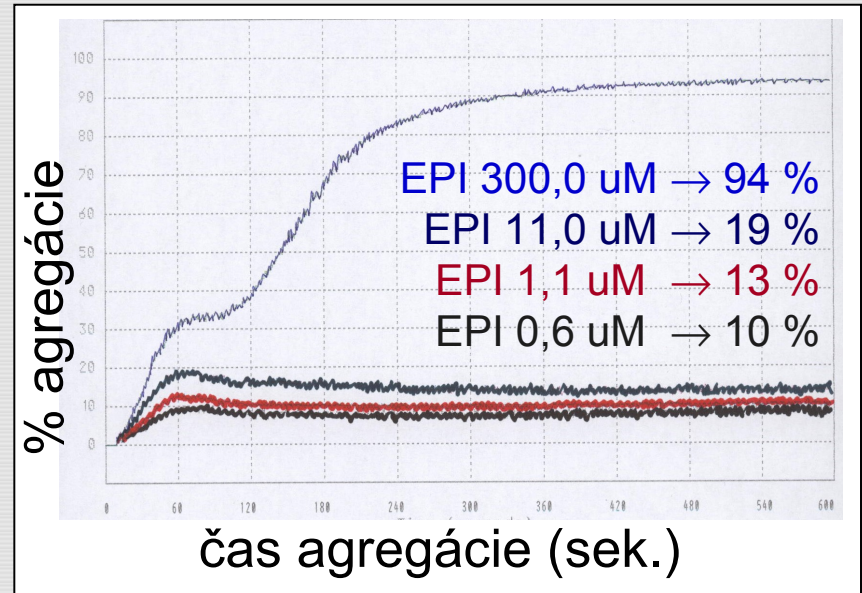
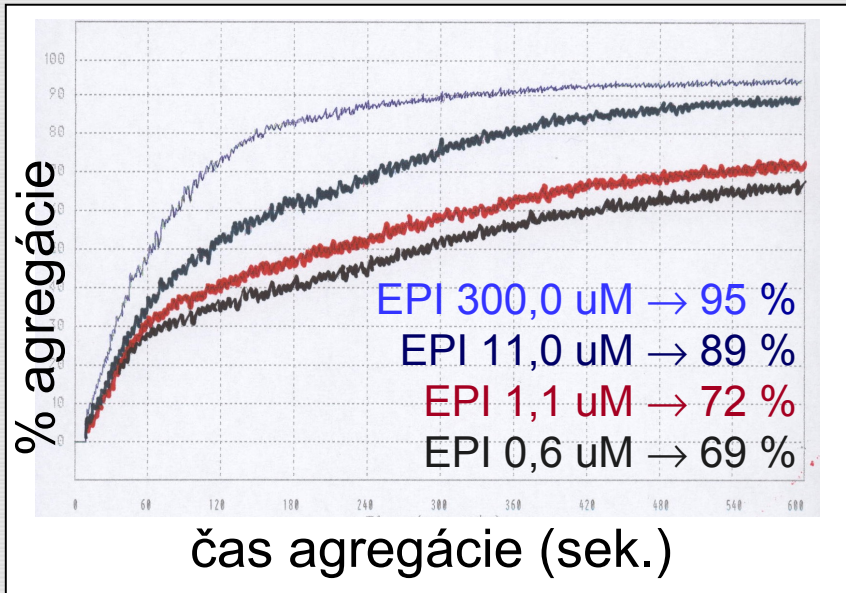
# SPS - klinická a laboratórna charakteristika

- ∇ ↑ **agregácia trombocytov po aktivácii** (pri subfyziologických koncentráciách):
  - ADP a adrenalínom (typ I)
  - adrenalínom (typ II)
  - ADP (typ III)
- laboratórne exaktne definovaná porucha <sup>1</sup>
- klinika: **arteriálne a / alebo venózne tromboembol. príhody**  
často pri liečbe antikoagulanciami (antagonisti vitamínu K)
- zdá sa byť **relatívne častý defekt**, najmä v podskupine pacientov s arteriálnou trombózou (Mammen: *“the most common thrombophilia in patients with arterial thrombosis”*) <sup>1</sup>
- pozorovaný **familiárny výskyt**, predpokladaná **AD dedičnosť**

---

1) Mammen EF., *Seminars in Thromb/Hemostasis* 1999; 25: 361-365;

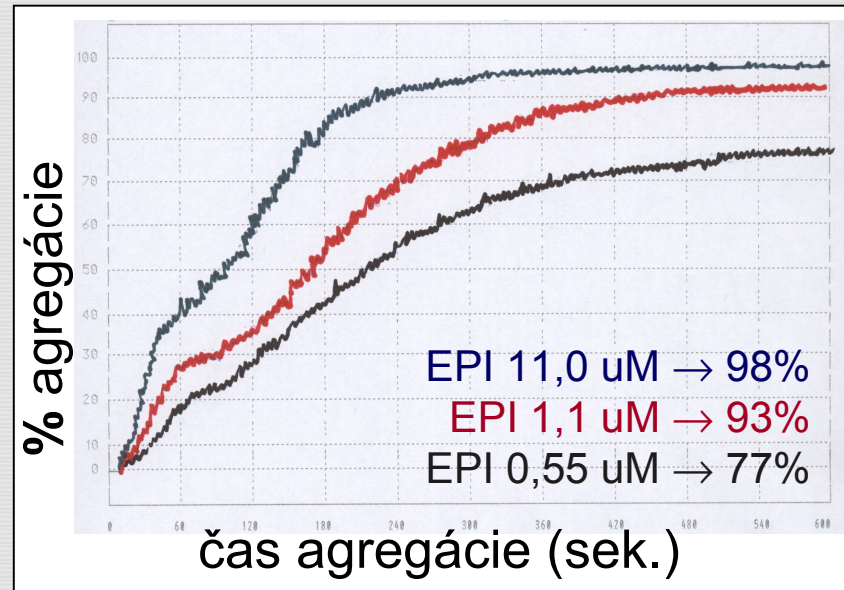
2) **Bartošová L a spol., Lek Obz 2008; 56: 512 – 513**



otec, 1950

matka, 1961

diet'a (dievča), 1995

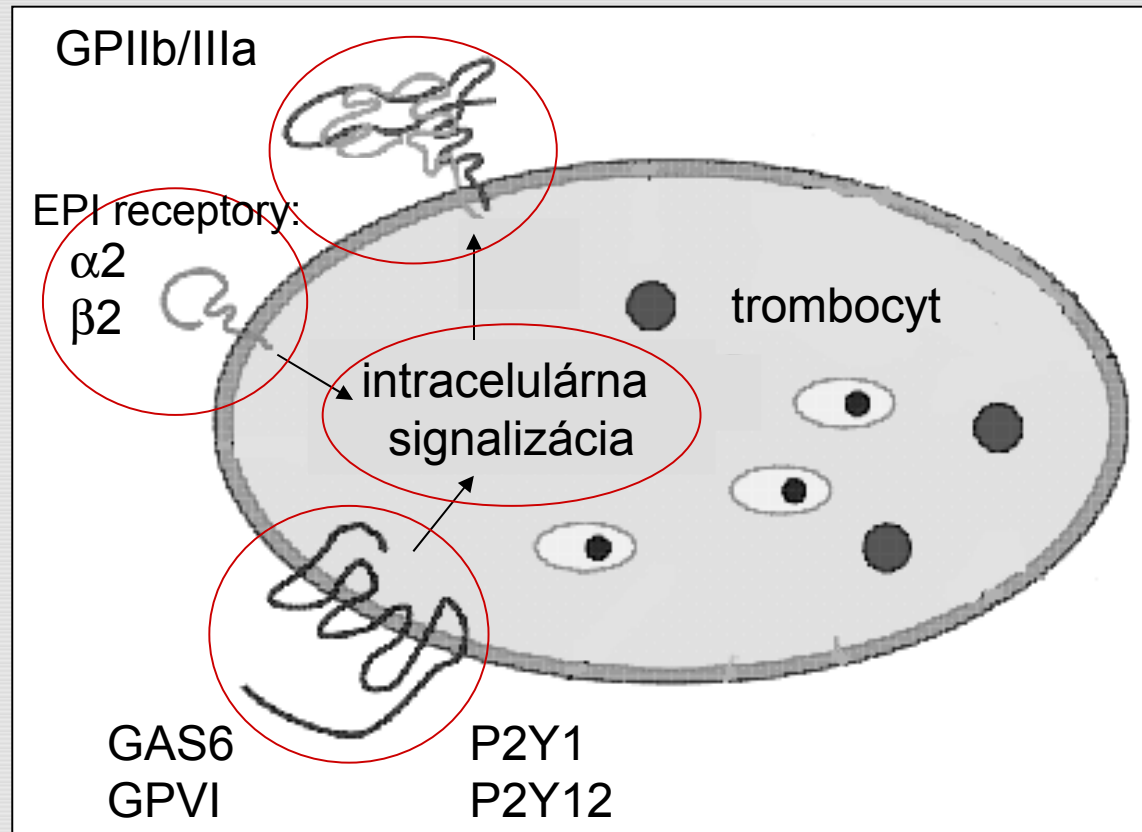


# SPS - genetický defekt ?

- klinicky a laboratórne presne definovaný syndróm <sup>1</sup>
- genetický defekt doteraz presne neidentifikovaný
- hypotézy:

## defekt na úrovni ?

- receptory agonistov
- receptory priamo sa účastiace agregácie a aktivácie trombocytov
  - GPIa/IIa
  - GPIIb/IIIa
  - GAS-6
  - GPVI
- intracel. signalizácia
- iné?



# SPS - vzťah k polymorfizmom GPIIIa C98T a GPIa C807T

*n = 103 pacientov s SPS*

|               |                | SPS              |                   |                    |                    |
|---------------|----------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|               |                | <i>typ I (%)</i> | <i>typ II (%)</i> | <i>typ III (%)</i> | <i>kontroly(%)</i> |
| <i>GPIIIa</i> | <i>He</i>      | 16,1             | 19,4              | 1                  | 33                 |
|               | <i>Ho</i>      | 6,5              | 1,4               | -                  | 2                  |
| <i>GPIa</i>   | <i>He</i>      | 45,2             | 29,2              | -                  | 52                 |
|               | <i>Ho</i>      | 12,9             | 13,9              | -                  | 12                 |
|               | <i>He + He</i> | 9,7              | 2,8               | -                  | -                  |
|               | <i>He + Ho</i> | 3,2              | 2,8               | -                  | -                  |
|               | <i>Ho + He</i> | -                | -                 | -                  | -                  |
|               | <i>Ho + Ho</i> | -                | 1,4               | -                  | -                  |

*He = heterozygot; Ho = homozygot;*

*He + He = dvojitý heterozygot; Ho + Ho = dvojitý homozygot;*

*He + Ho = heterozygot pre C98T GPIIIa a homozygot pre C807T GPIa;*

*Ho + He = homozygot pre C98T GPIIIa a heterozygot pre C807T GPIa;*

# SPS - vzťah k polymorfizmu

## GAS-6 (c.834+7G>A GAS-6; intron 8)

|                       | $p = 0,072$ | $p = 0,072$ | $p = 0,84$ |
|-----------------------|-------------|-------------|------------|
|                       | GG (%)      | GA (%)      | AA (%)     |
| kontroly<br>(n = 137) | 83 (60,6%)  | 42 (30,7%)  | 12 (8,7%)  |
| SPS<br>(n = 128)      | 63 (49,2%)  | 53 (41,4%)  | 12 (9,4%)  |

|         |            |            |          |
|---------|------------|------------|----------|
| typ I   | 23 (17,9%) | 9 (7,0%)   | 3 (2,3%) |
| typ II  | 40 (31,2%) | 42 (32,8%) | 9 (7,0%) |
| typ III | 0          | 2          | 0        |

# SPS – expresia povrchových GP

- súbor: 75 (M=22, Ž=53; priemer.vek 42 rokov), bez akútnej tromboembol. príhody, SPS - typ I. 19, typ II. 53, typ III. 3
- prietoková cytometria

| <i>%<br/>expresie</i> | <i>priemer<br/>(SPS)</i> | <i>medián<br/>(SPS)</i> | <i>priemer<br/>(kontroly)</i> | <i>medián<br/>(kontroly)</i> | <i>P-value<br/>(<math>&lt;0.05</math>)</i> |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|
| CD62                  | 56%                      | 57%                     | 39%                           | 43%                          | 0.01                                       |
| CD36/63               | 20%                      | 15%                     | 31%                           | 24%                          | 0.93                                       |
| CD41                  | 96%                      | 97%                     | 97%                           | 98%                          | 0.75                                       |
| CD61/63               | 18%                      | 11%                     | 7%                            | 6%                           | 0.001                                      |
| CD29/49b              | 96%                      | 97%                     | 97%                           | 98%                          | 0.40                                       |
| CD51                  | 2.4%                     | 1.6%                    | 1.2%                          | 0.5%                         | 0.02                                       |

# Čo vieme o vrodených trombofilných stavoch u trombocytov

- klinicky najvýznamnejšie sa javia byť polymorfizmy GPIIIa P1A, GPIa C807T a GPVI T13254C
- doterajšie klinické štúdie sa zameriavali najmä na arteriálnu trombózu, vzťah k venóznemu tromboembolizmu je potvrdený len u niektorých (napr. GPVI T13254C)
- výsledky klinických a populačných štúdií nie sú jednoznačné
- skúmané polymorfizmy doštičkových GP sa nejavia byť silnými nezávislými rizikovými faktormi pre arteriálnu trombózu (iCMP, IM)
- môžu však zvyšovať riziko pri kombinácii s inými rizikovými faktormi, resp. u niektorých subpopulácií (pacienti < 40r)

# Čo vieme o vrodených trombofilných stavoch u trombocytov - SPS

- naše výsledky nepodporili príčinný vzťah medzi vybranými polymorfizmami doštičkových glykoproteínov, ktoré vplývajú (priamo či nepriamo) na agregáciu (GPIIIa P1A, GPIa C807T)
- na základe doteraz získaných výsledkov vyšetrenia polymorfizmu GAS-6 proteínu (c.834+7G>A GAS-6) nemožno zatiaľ vysloviť jednoznačné závery
- pri analýze povrchových trombocytárnych GP (FC) sme zistili:
  - ∇↑ expresiu antigénov exprimovaných po aktivácii trombocytov (P-selektín (CD62), CD61/63, VNR receptoru (CD51)) →  
trombocyty v cirkulácii sú pri SPS aktivované
  - nezistili sme ↑ expresiu GPIa/IIa (CD29/49b) a GPIIb/IIIa (CD41/61)

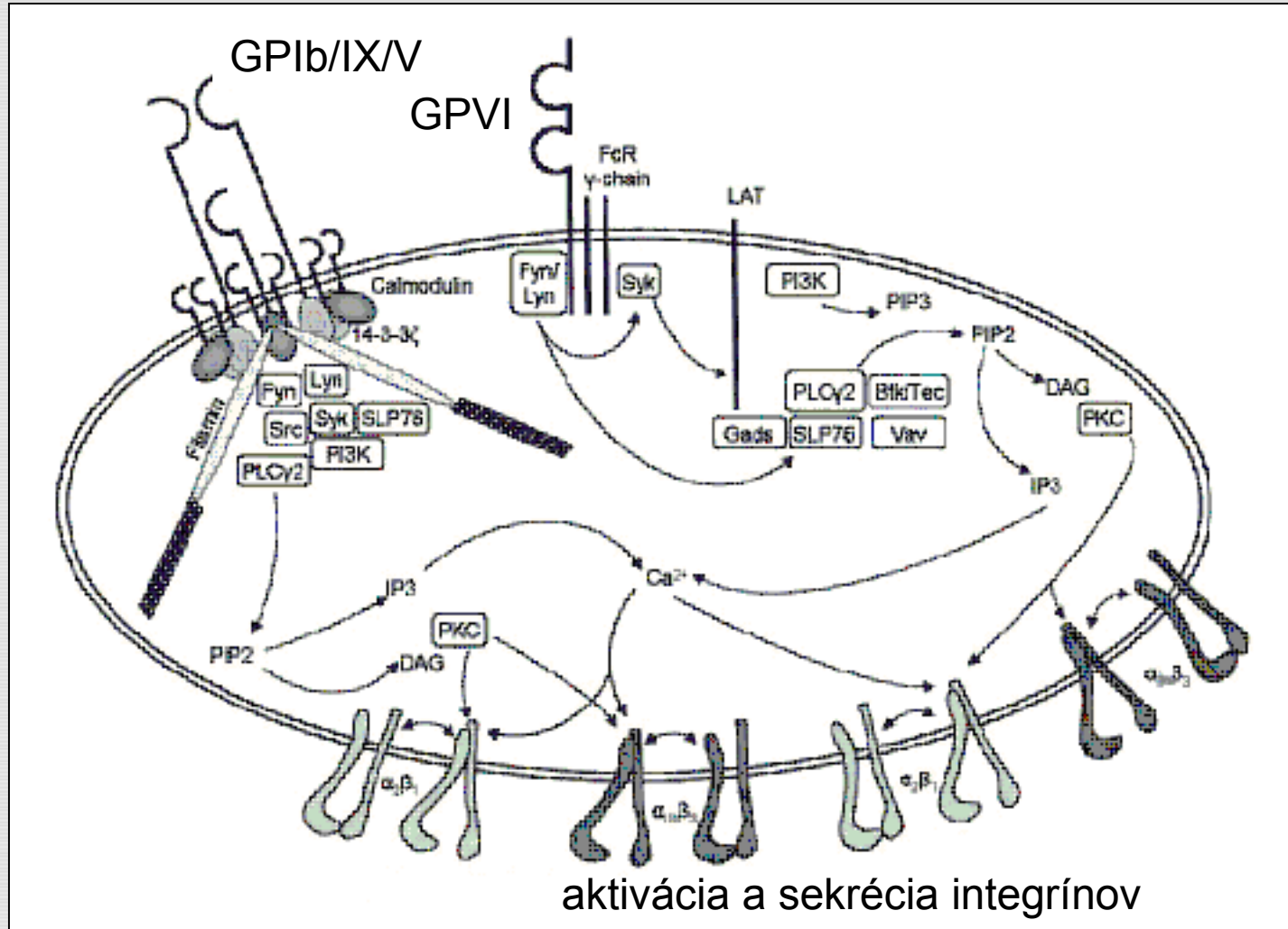
*“Patologická anatómia je základ pre patologickú fyziológiu,  
na ktorej sa bude v budúcnosti budovať patologická histológia,  
chemická patológia a experimentálna patológia.”*

**Karel Rokitanský (1804 - 1878)**

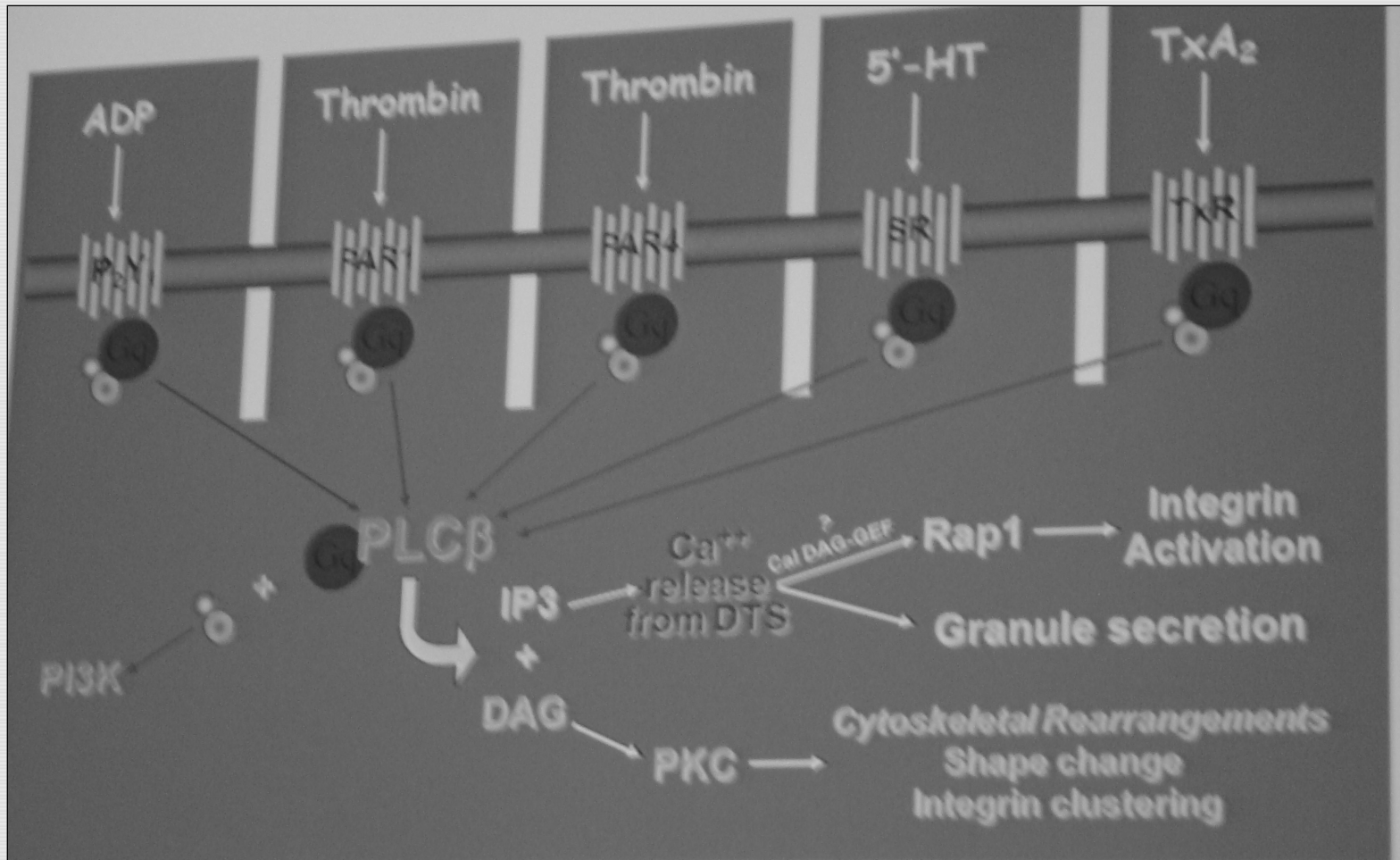
*d'a ku jem*  
*za pozomost'*



# iniciálna aktivácia cez GPIIb/IIIa a GPIIb/IX/V

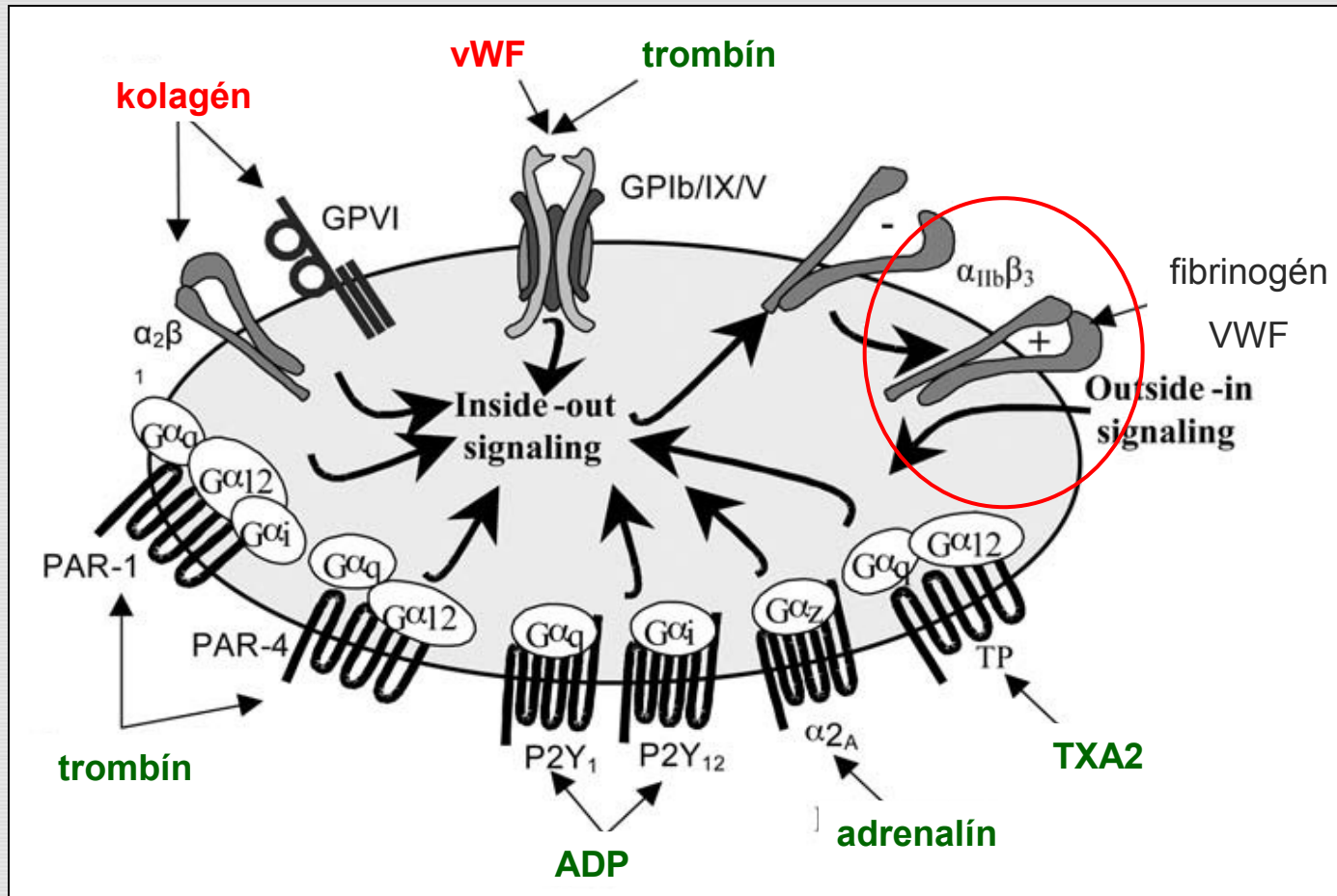


# aktivácia cez ADP, trombín, TXA<sub>2</sub>, serotonín



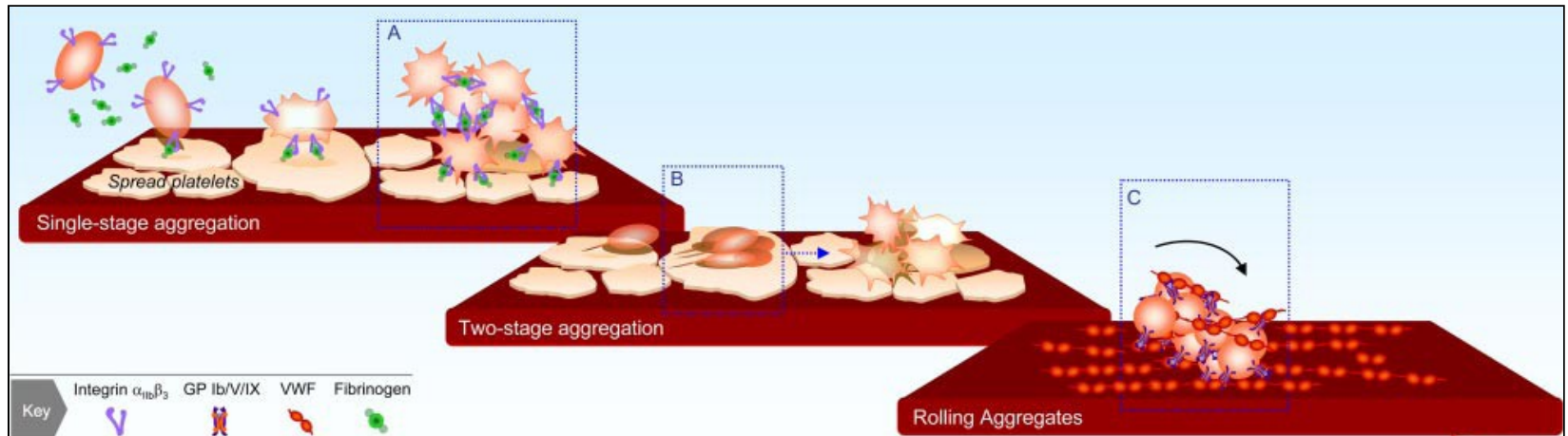
# aktivácia doštičiek

interakcia s ligandami počas adhézie, resp. s agonistami uvoľnenými pri aktivácii trombocytov a hemokoagulácie vedie k zvýšeniu expresie a aktivácii GPIIb/IIIa



# agregácia doštičiek

## závislosť od hemodynamických pomerov



strihové sily

$1000 \text{ s}^{-1}$

$10000 \text{ s}^{-1}$

agregácia

“single-stage”

“two-stage”

“rolling”

receptory

GP1a/IIa

GP1a/IIa, GPIb/IX/V

GPIb/IX/V

ligand

fibrinogén

fibrinogén, fibrín, vWF

vWF

„tethering“

nie

áno

áno

aktivácia plt

áno

áno

nie

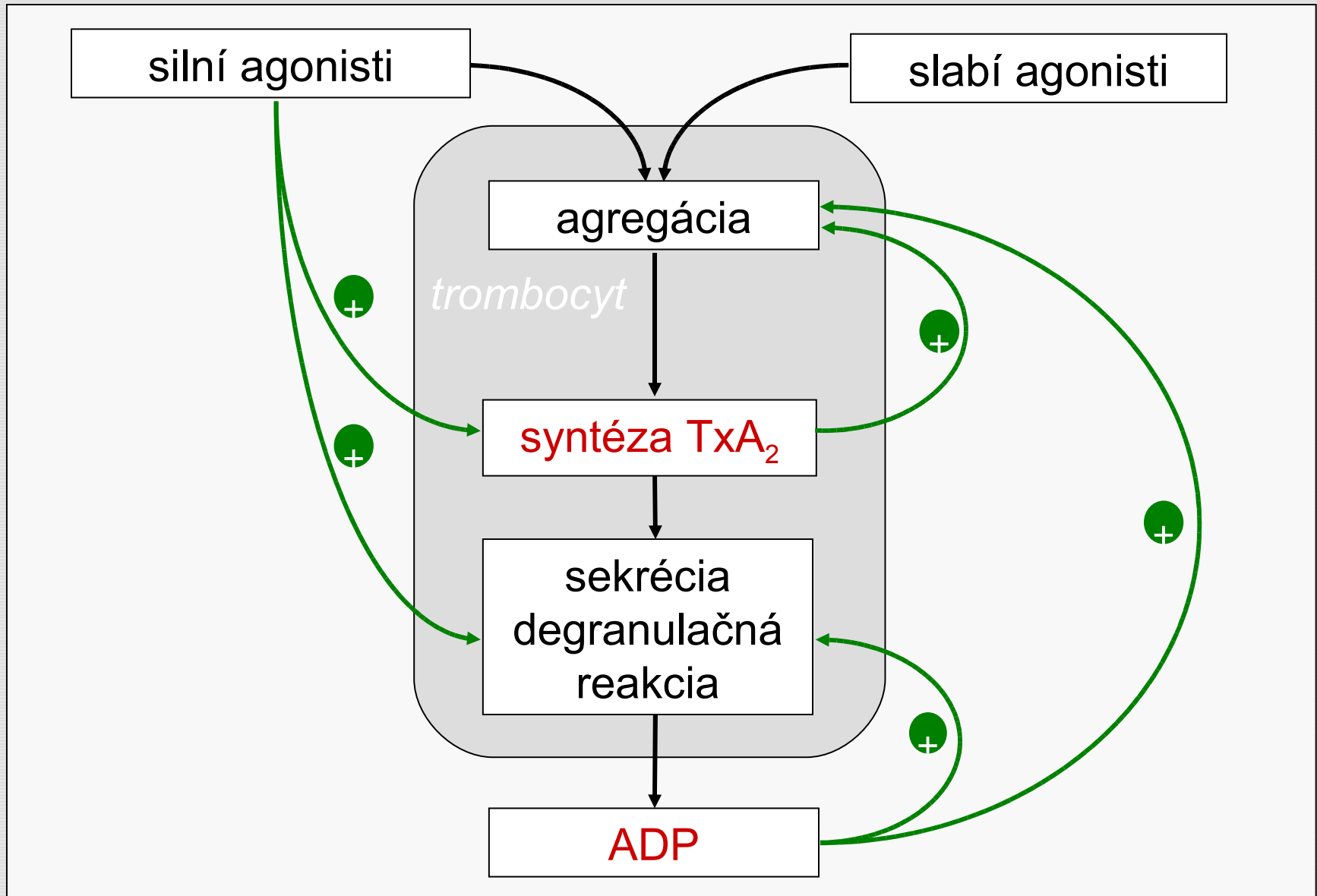
tvar plt

sférický, filopódiá

diskoidný

sférický

# amplifikácia aktivácie trombocytov a ich odpovede na agonistov



# regulácia šírenia trombu do okolia

- NO
- PGI<sub>2</sub>
- signalizácia cez PECAM-1 (CD31) a ESAM <sup>1</sup>
- pôsobenie plazmatických proteáz - proteíny rodiny ADAM → štiepenie aktivovaných receptorov na bunkovom povrchu (GPVI, GPIbα) <sup>2</sup>
- proces aktivácie receptorov trombocytov (napr. GPIIb/IIIa) nie je ireverzibilný → možná inaktivácia receptorov <sup>3</sup>



# trombocytopatie - výskyt

- značne **heterogénna skupina** ochorení
- pomerne **vzácné poruchy hemostázy** <sup>1</sup>
- presný výskyt (väčšina z nich) v populácii nie je známy
- **väčšinou ide o krvácavé poruchy**; spolu s vWCh sa zdajú byť relatívne častou vrodenou príčinou zvýšeného krvácania <sup>2</sup>
- častejšie diagnostikované u žien (lepší záchyt a diagnostika v súvislosti s poruchami menštruácie, tehotenstvom a pôrodom ?)
- **najčastejšie sa zdajú byť poruchy sekrécie a vnútrobunkovej signalizácie** <sup>2, 3</sup>
- **pri vrodených je typ dedičnosti je rozdielny** → opísané poruchy dedičné autozomálne (recesívne aj dominantne) ako aj poruchy s gonozomálnou dedičnosťou
- u značnej časti porúch nie je známa presná genetická porucha

---

1) Bolton-Maggs PHB, Chalmers EA, Collins PW, et al., Br J Haematol 2006; 135: 603-633; 2) Hayward CPM, Rao AK, Cattaneo M, Haemophilia 2006; 12 (Suppl. 3): 128-136; 3) Cattaneo M, Thromb Res 2005; 115 (Suppl. 1): 10-13

# klasifikácia trombocytopatií - používané kritériá

## *morfológia trombocytov*

- trombocyty malej veľkosti
- trombocyty normálnej veľkosti
- trombocyty nadmernej veľkosti

## *typ poruchy*

- poruchy adhézie
- poruchy agregácie
- poruchy sekrécie
- poruchy prokoagulačnej aktivity

## *lokalizácia poruchy*

- poruchy doštičkových receptorov
- poruchy doštičkových granúl
- poruchy vnútrobunkovej signalizácie
- poruchy membránových fosfolipidov
- iné poruchy

## *klinika*

- krvácavé poruchy
- trombofilné poruchy

# GPIb $\alpha$ 145Met / VNTR A/B polymorfizmy a AT

- *Murata M et al.*, 91 pacientov s IM / AP <sup>1</sup>  
Met145 je rizikový faktor pre IM u skupiny < 60r
- *Mikkelsson J et al.*, 145 pacientov s IM / stenózou koronár. aa. <sup>2</sup>  
haplotyp Met145/VNTR B je rizikový faktor pre IM, trombózu koronárnych artérií a náhlej smrti
- *Ito T et al.*, n=327 (158 pacientov s CAD) <sup>3</sup>  
Met145 nie je rizikový faktor pre CAD
- *Ardissino D et al.*, 200 pacientov s IM mladších ako 45 r. <sup>4</sup>  
Met145/VNTR B nie je spojený so  $\uparrow$  so rizikom IM v mladom veku
- *Carter AM et al.*, 609 pacientov s iCMP < 45 rokov <sup>5</sup>  
VNTR polymorfizmus nie je rizikovým faktorom pre CMP

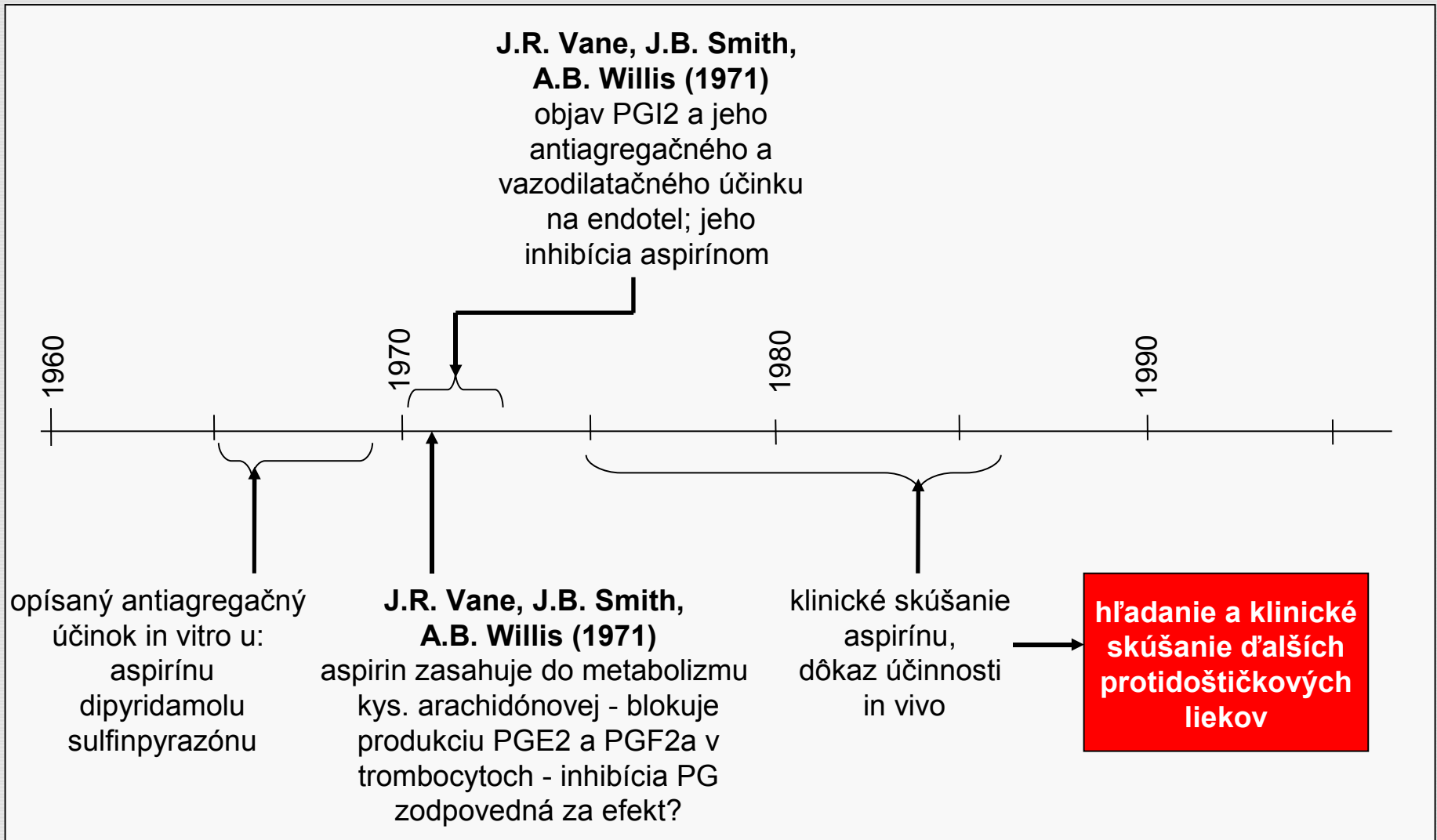
☑ morfológia trombocytu vrátane intracelulárnej štruktúry dobre známa a detailne opísaná už v 70 rokoch 20. stor.

☑ funkcia trombocytu - 2009



❓ modifikovanie funkcie za účelom prevencie a liečby porúch hemostázy (protidoštičkové lieky)

# trombocyt - antiagregancia



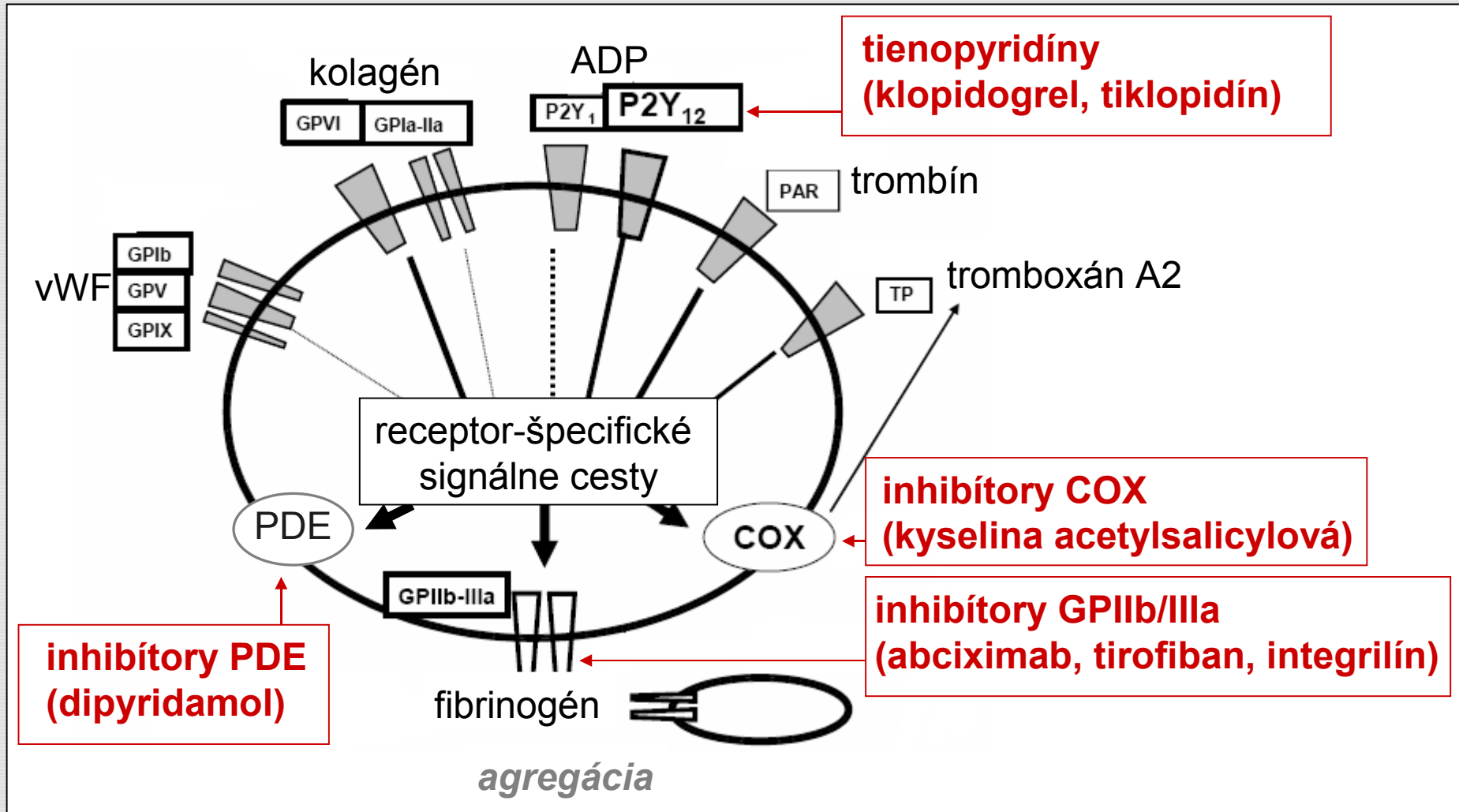
# **látky so známym antidoštičkovým účinkom súčasnosť (1)**

- **látky interferujúce s metabolizmom kys. arachidónovej**
  - inhibítory COX (kys. acetylsalicylová, sulfinpyrazón)
  - inhibítory TxA<sub>2</sub>-syntetázy (imidazol, dazoxiben)
  - antagonisti receptora pre prostaglandín endoperoxid/TxA<sub>2</sub> (SQ 29548, SKF 88046, BM 13177)
  - inhibícia uvoľňovania kys. arachidónovej z plazmatickej membrány (fenotiazíny, tricyklické antidepresíva)
- **látky zvyšujúce hladiny c-AMP**
  - aktivátory adenylátcyklázy (PGD<sub>2</sub>, epoprostenol, carbacyklín, iloprost)
  - inhibítory fosfodiesterázy (dipyridamol, metylxantíny)
- **látky interferujúce so serotoninom**
  - ketanserín
- **látky interferujúce s PAF**
  - CV 3988
  - kadsurenon
  - BN 52021
- **látky interferujúce s GAS-6 a jeho receptorom**

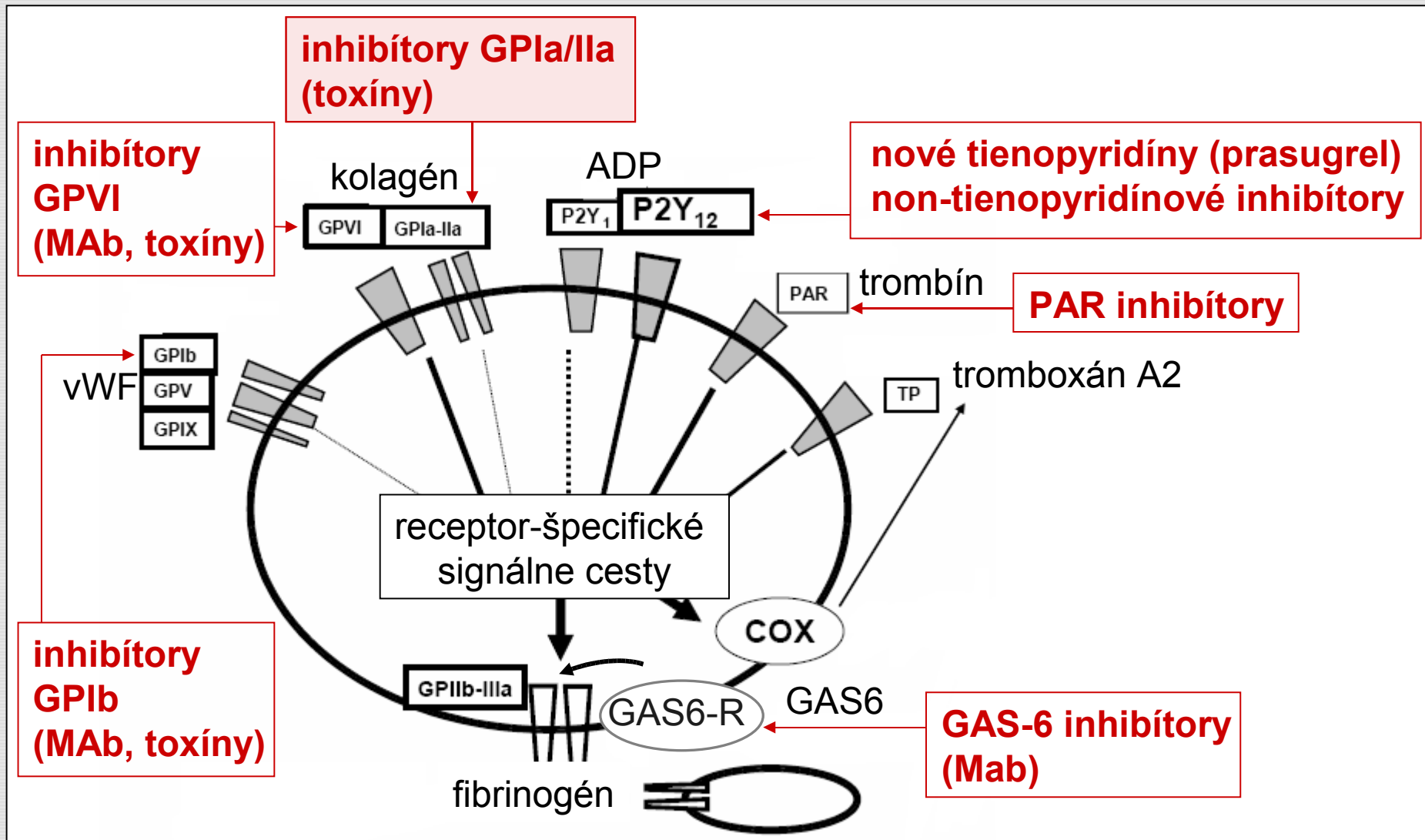
# **látky so známym antidoštičkovým účinkom súčasnosť (2)**

- **látky interferujúce s väzbou fibrinogénu**
  - inhibítory GPIIa/IIIb – abciximab, eptifibatid, integrilín, tirofiban
  - RGD peptidy
- **inhibítory receptorov doštičkových agonistov**
  - inhibítory ADP receptorov
    - tienopyridíny (ticlopidín, klopidogrel, prasugrel)
    - iné
  - inhibítory GPIba
  - inhibítory GPVI
  - inhibítory PAR receptorov
  - $\beta$  blokátory
- **látky pôsobiace cez mechanizmy priamo nesúvisiace s trombocytmí**
  - nitroprusid sodný
  - blokátory Ca kanála
  - látky s antitrombínovým účinkom
- **iné (komplexný účinok / mechanizmus nie úplne objasnený)**
  - volumexpandery (hydroxyetylškrob, dextran)
  - ATB (penicilíny, cefalosporíny, nitrofurantoin)
  - chemoterapeutiká

# zavedené (klinicky využívané) protidoštičkové lieky



# potenciálne protidoštičkové lieky



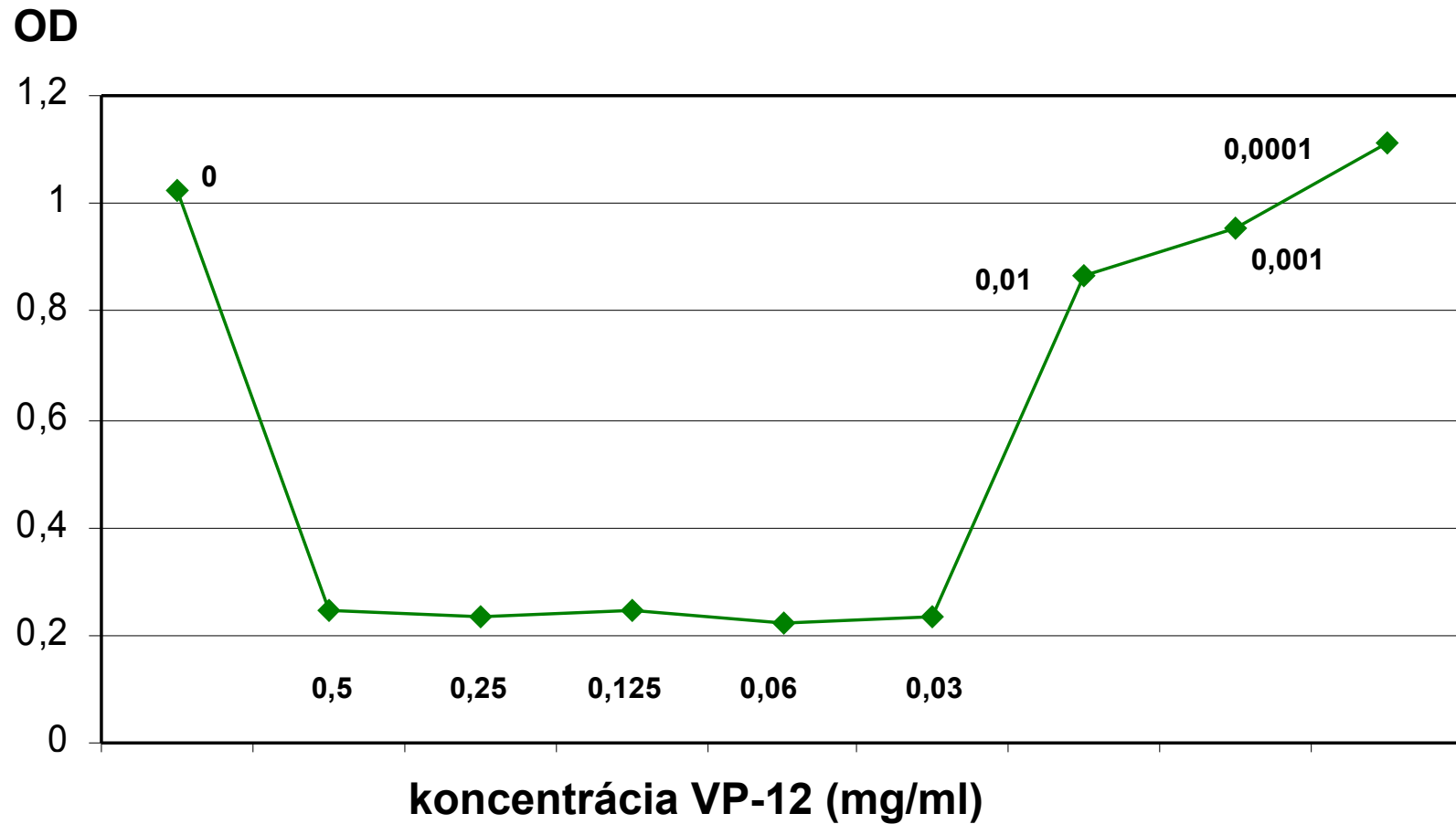
# hadie toxíny

- hadie jedy obsahujú viaceré látky (prevažne bielkovinovej povahy) pôsobiace na hemostázu na rôznej úrovni (koagulačná kaskáda, endotel, trombocyty)
- tieto látky zistené najmä u druhov z čeľade vretenovitých
- účinok inhibičný ↔ stimulačný, pozorované rozdiely *in vitro* a *in vivo*, často komplexný efekt na hemostázu
- zložky pôsobiace na trombocyty sú z biochemického hľadiska: <sup>1</sup>
  - metaloproteázy
  - disintegríny
  - lektíny C-typu

| <i>toxín</i>          | <i>druh</i>                           | <i>cieľ. Ag</i> | <i>funkcia</i>                                           |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|
| <b>catrocollastín</b> | <i>Crotalus atrox</i>                 | kolagén         | vyvážovanie kolagénu,<br>inhibícia agregácie             |
| <b>kauothiagín</b>    | <i>Naja kaouthia</i>                  | vWF             | vyvážovanie vWF,<br>inhibícia adhézie cez<br>vWF         |
| <b>alborhagín</b>     | <i>Trimeresurus<br/>albolabris</i>    | GPVI            | aktivácia trombocytov                                    |
| <b>mocarrhagín</b>    | <i>Naja mossambica<br/>mossambica</i> | GPIIb<br>GPVI   | proteolýza GPIIb<br>(Glu282/Asp283), blok<br>väzby s vWF |
| <b>jararhagín</b>     | <i>Bothrops jararaca</i>              | GPIa/IIa        | proteolýza GPIIa, blok<br>väzby na kolagén               |

| <i>toxín</i>                | <i>druh</i>                             | <i>cieľ. Ag</i> | <i>funkcia</i>                                             |
|-----------------------------|-----------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|
| <b>botroacetín</b>          | <i>Bothrops jararaca</i>                | vWF             | inhibícia adhézie<br>cez vWF                               |
| <b>alboaggregín B</b>       | <i>Trimeresurus<br/>albolabris</i>      | GPIba<br>GPVI   | inhibícia väzby s vWF,<br>aglutinácia trombocytov          |
| <b>echicetín<br/>(EC10)</b> | <i>Echis carinatus</i>                  | GPIba<br>GPVI   | inhibícia väzby<br>s vWF a trombínom,<br>inhibícia adhézie |
| <b>crotalin</b>             | <i>Crotalus atrox</i>                   | GPIba<br>GPVI   | inhibícia väzby s vWF                                      |
| <b>mamushigín</b>           | <i>Agkistrodon halys<br/>blomhoffi</i>  | GPIba<br>GPVI   | inhibícia väzby s vWF<br>(pri ↑ strih. silách)             |
| <b>alboaggregín A</b>       | <i>Trimeresurus<br/>albolabris</i>      | GPIba<br>GPVI   | aktivácia trombocytov                                      |
| <b>convulxín</b>            | <i>Crotalus durissus<br/>terrificus</i> | GPVI            | aktivácia trombocytov                                      |
| <b>rhodocetín</b>           | <i>Calloselasma<br/>rhodostoma</i>      | GPIa/IIa        | inhibícia väzby<br>na kolagén                              |

# inhibícia adhézie trombocytov s VP-12 pri GPIa polymorfizme - T/T homozygot



*spolupráca Philadelphia - Krakov - Martin*