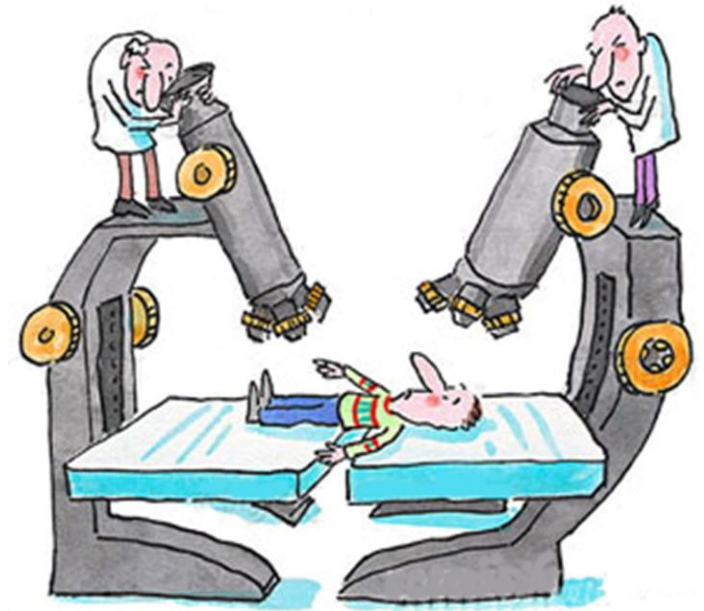


# Patofyziologie hematopoetického systému I

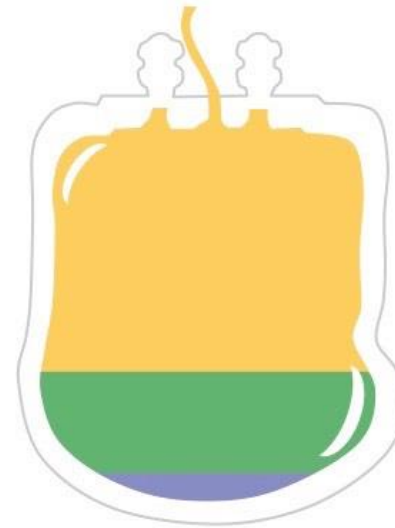
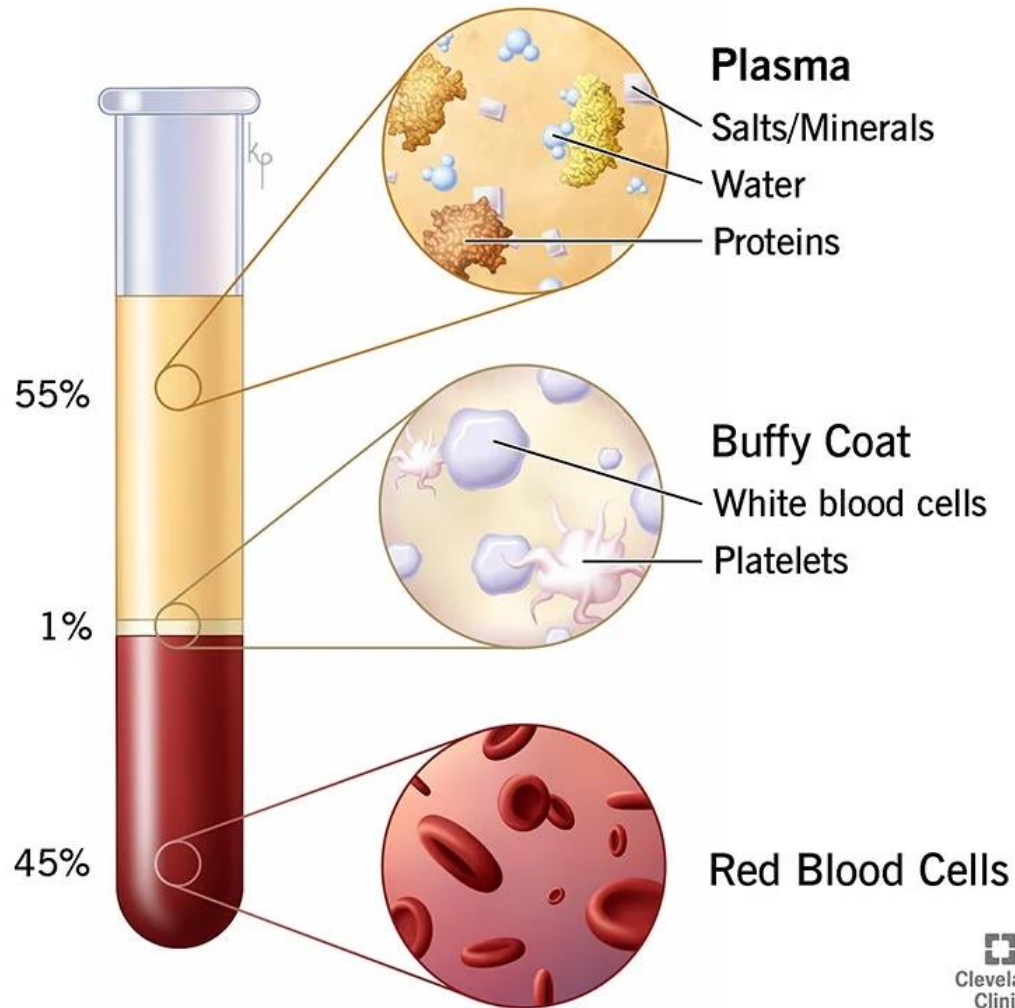
## – etiopatogeneze poruch primární a sekundární hemostázy

### Obsah

- Fyziologické hemostáza jako časově a prostorově regulovaný proces
- Virchowovo trias
- Hypokoagulační stavy (krvácivé diatézy) z důvodů
  - Poruch primární hemostázy (trombocytopenie a trombocytopatie)
  - Poruchy sekundární hemostázy (hemofilie a získané stavy)
- Principy anti-agregační terapie a vybraných koagulačních testů

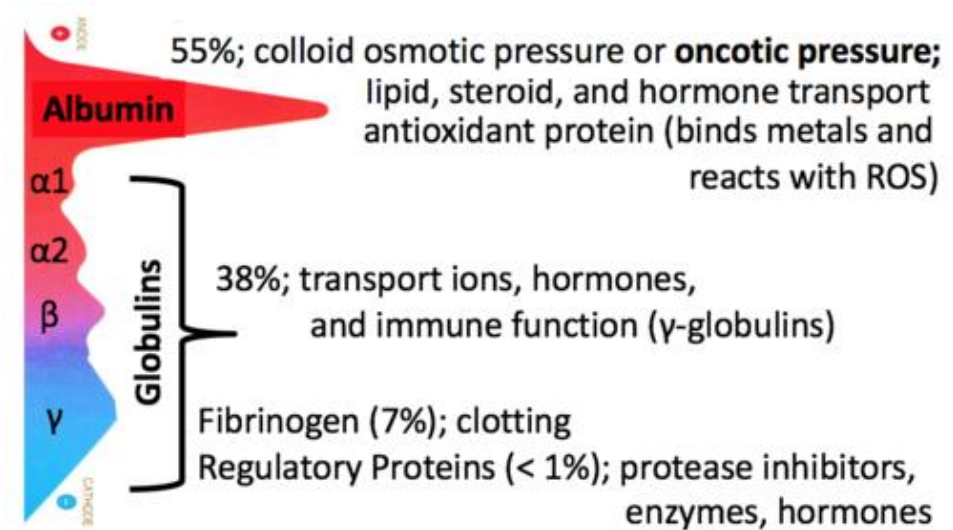


# Krev – hematokrit, plasma × sérum, proteiny, sedimentace

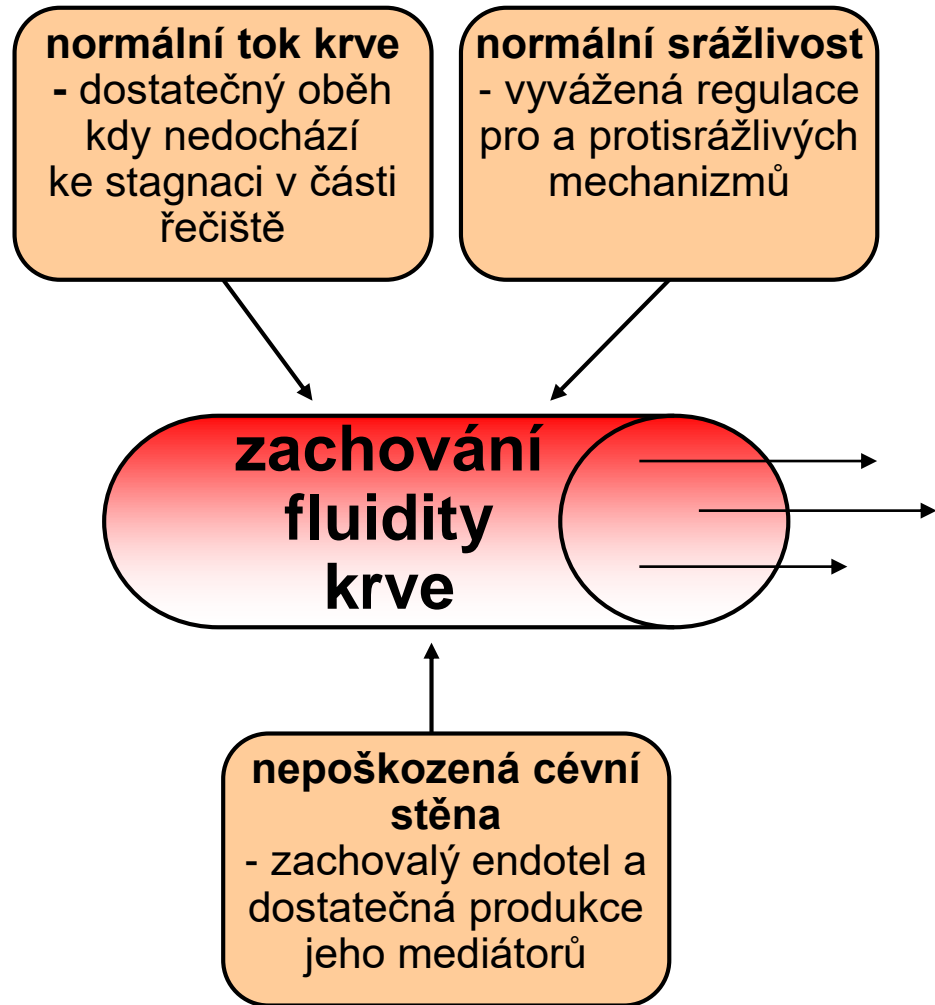


## Major Types:

- Albumin (60%)**  
 Major component of osmotic pressure of plasma
- Globulins (35%)**  
 Antibodies (immunoglobulin) and transport proteins
- Fibrinogens (4%)**  
 Functions in blood clotting
- Other (<1%)**  
 Various roles ( $\alpha$ -1-antitrypsin, coagulation factors, etc.)



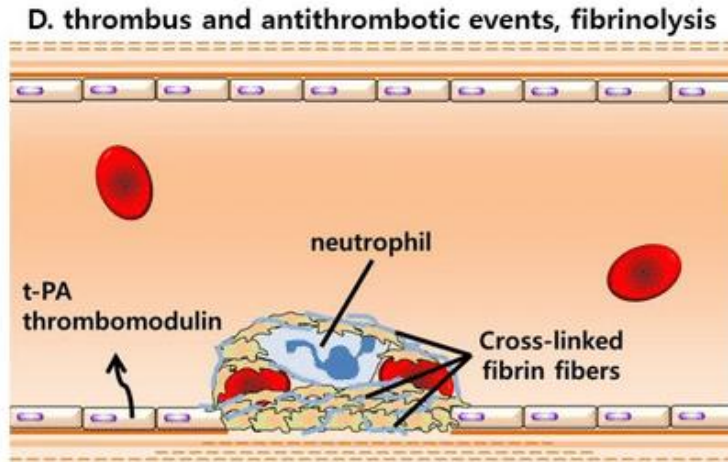
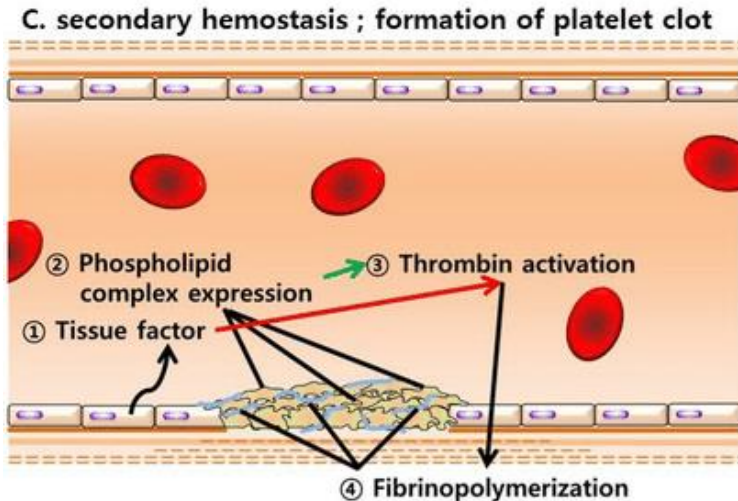
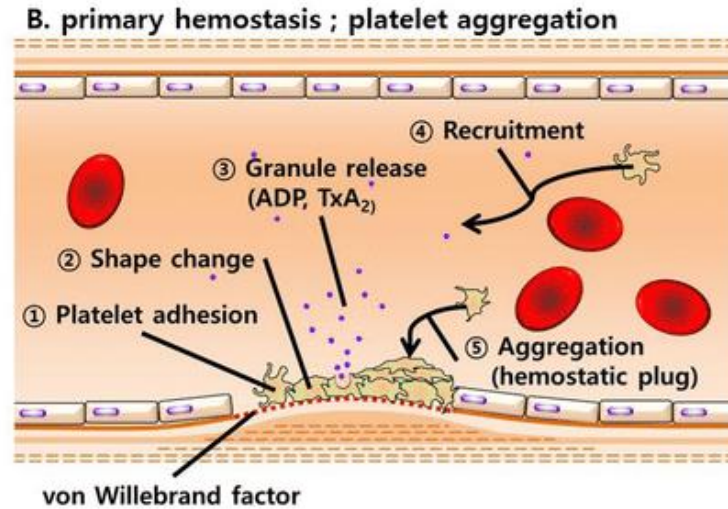
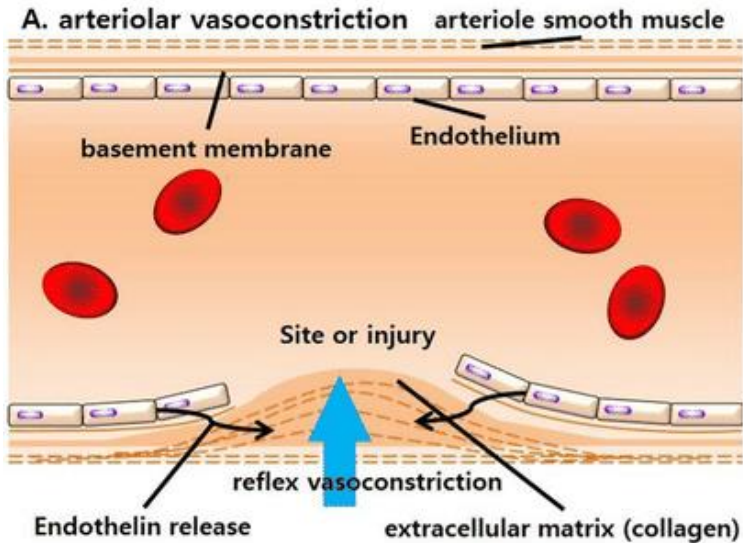
# Faktory zajišťující fluiditu krve



- fyziologické srážení krve (= **hemostáza**)
  - zabraňuje signifikantní ztrátě krve při poranění cévní stěny
    - primární hemostáza
    - sekundární hemostáza
- **Virchowova triáda**
  - abnormalita v kterémkoliv z těchto parametrů (nebo kombinovaná porucha) má za následek
- patologické srážení krve (= **trombóza**)
  - spontánní
  - vzniklá za rizikových okolností (riziko)
- následnou příp. komplikací je **embolizace** např.
  - do plic při venózní trombóze (VTE)
  - atherotrombóza a MI
  - kardioembolické příhody např. při fysi a následná mozková mrtvice

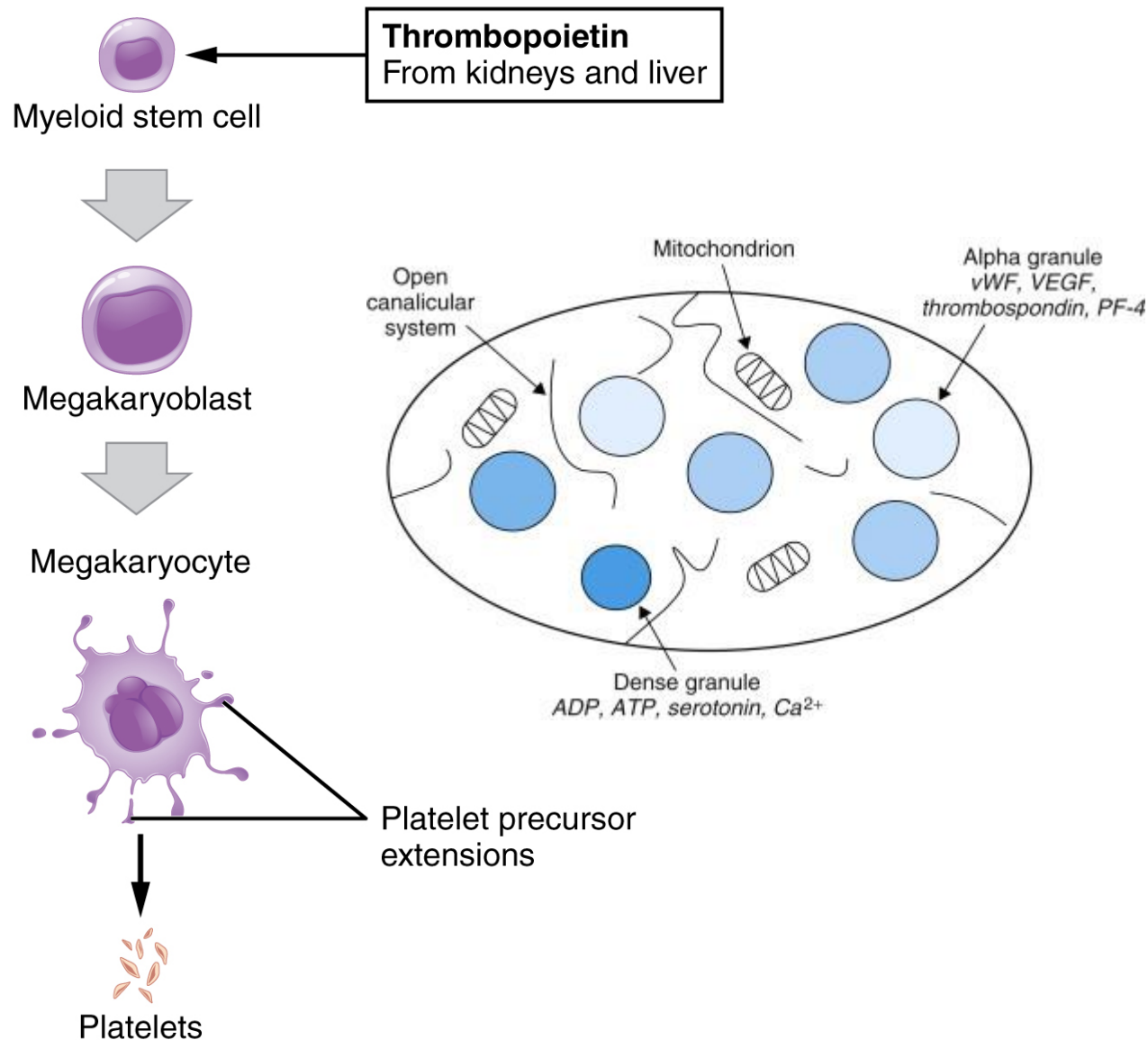


# Hemostáza – fáze



- (1) Arteriolar **vasoconstriction** occurs immediately by the **reflex mechanism** of the nervous system right after vascular injury, which can be enhanced by **endothelin**, a potent vasoconstrictor released from the endothelial cells constituting the vessel wall.
- (2) **Platelets** bind to the von **Willebrand factor** and **adhere** to the extracellular matrix at the site of injury, after that, they change their appearance (**activation**) and promote further recruitment and **aggregation** of platelets by releasing granules such as **ADP** and **TxA<sub>2</sub>**.
- (3) **Tissue factor** released from vascular endothelial cells expresses the platelet phospholipid complex. Through the **coagulation cascade**, they eventually activate thrombin and ultimately make the fibrin polymer to form a clot/coagulum/thrombus.
- (4) During this period, the platelet plug contains trapped neutrophils and RBCs in the blood vessels, showing permanent plugs and preventing further bleeding. In the absence of vascular injury or complete thrombus formation, the endothelial cells secrete **t-PA and thrombomodulin**, which inhibit platelet adhesion and aggregation, to exert **antithrombotic effects and fibrinolysis** that lead limitation of hemostasis.

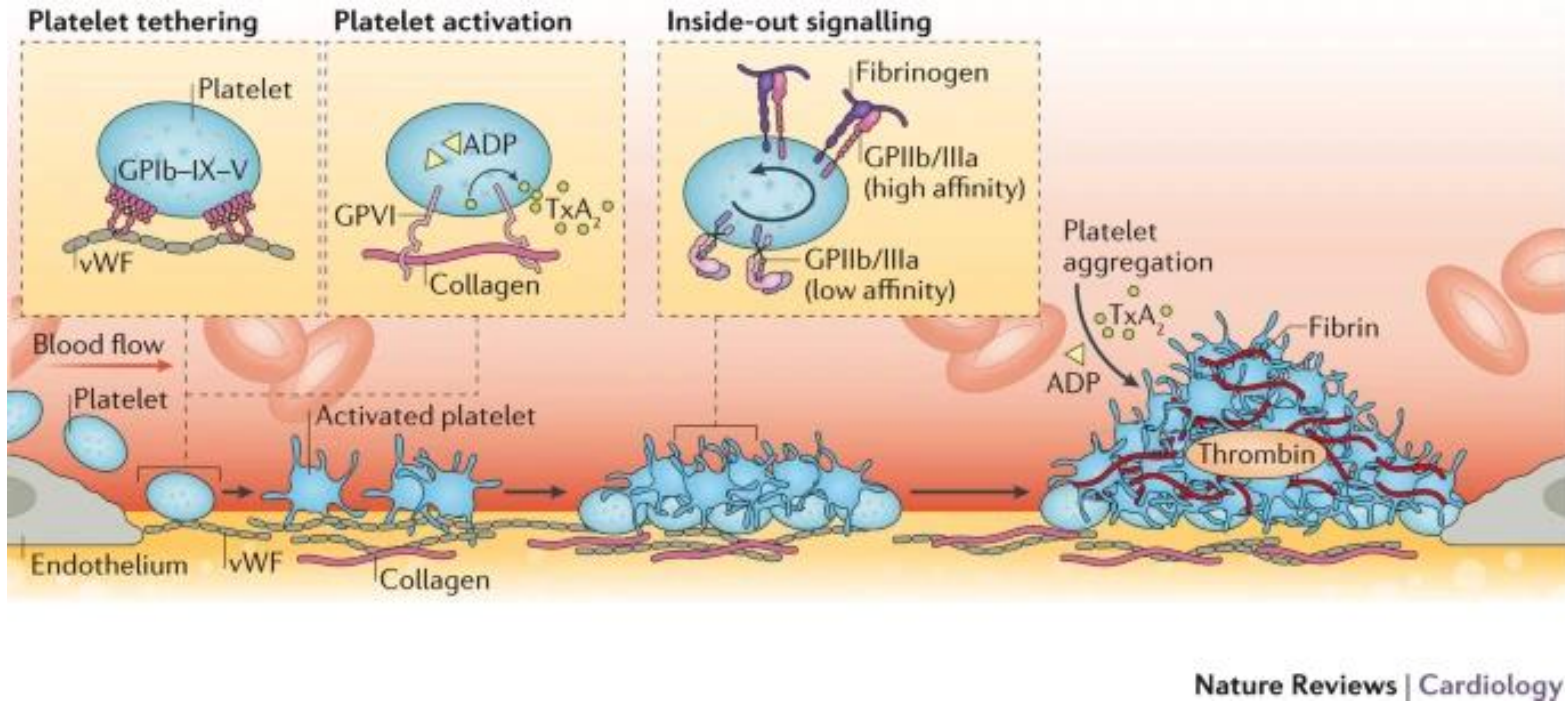
# Původ a struktura destiček



- **alfa granula** – obsahují proteiny zapojené zejm. v procesu adheze ale i následně v procesu hojení poškození
  - vWF, fibrinogen a vitronectin přispívají ke vzniku trombu a jeho stabilizaci
  - angiogenní faktory - VEGF, EGF a PDGF
  - inhibitory angiogeneze - angiostatin, thrombospondin a endostatin
  - regulátory zánětu a cytokiny - platelet factor 4 (PF4), CCL5 (RANTES) a interleukin-8 (IL-8)
- **denzní granula** – aktivace destiček a jejich „recruitment“ a stabilizace trombu v místě poškození
  - ATP, ADP, serotonin a kalcium
- **membrána trombocytů**
  - membránové receptory
    - GPIb-V-IX – adheze k povrchu
    - GPIIb-IIIa – je exprimován exklusivně megakaryocyty a destičkami a je zásadní pro iniciaci a propagaci výstavby destičkové zátky (agregace)
  - destičkové fosfolipidy – platelet factor 3 (PF 3)
    - součást komplexů krevního srážení



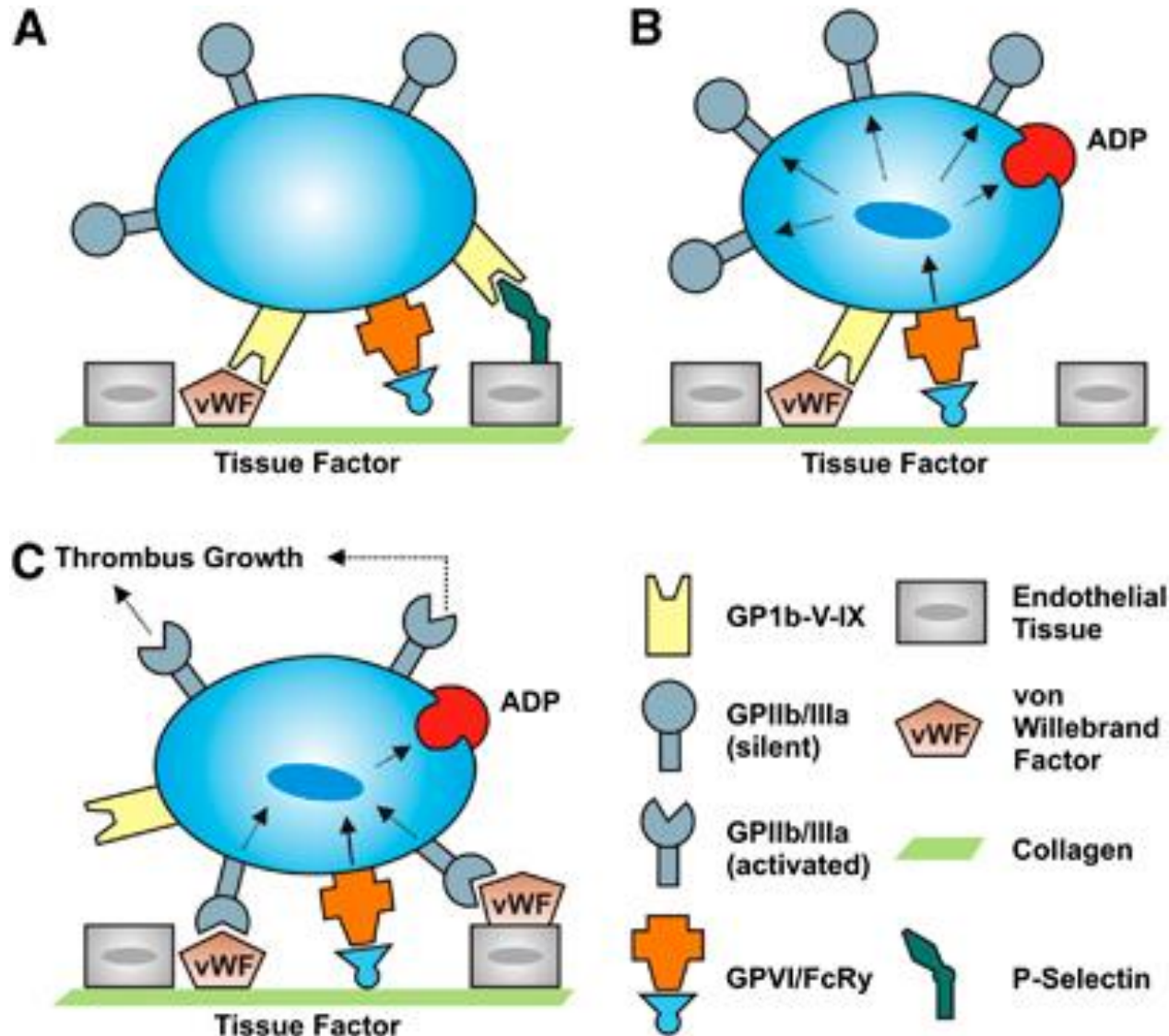
# Primární hemostáza



Mechanisms of platelet adhesion and aggregation: Erosion or rupture of an atherosclerotic plaque exposes the thrombogenic subendothelial matrix proteins von Willebrand factor (vWF) and collagen. vWF binds to exposed collagen and uncoils, exposing multiple binding sites for platelet glycoprotein (GP)Ib-IX-V. Under arterial shear stress, the capture of platelets is mediated by interactions between GPIb and vWF (platelet tethering), which allows GPVI to bind to collagen. The binding of collagen to GPVI results in platelet activation and the release of the soluble agonists ADP and thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), leading to GPIIb/IIIa activation via inside-out signalling. Activated GPIIb/IIIa changes conformation from the resting low-affinity state to a state of high affinity for its major ligand, fibrinogen. GPIIb/IIIa bound to fibrinogen acts as a bridge for platelets to aggregate. The nascent platelet thrombus is reinforced by the release of soluble agonists, such as ADP and TxA<sub>2</sub>. Thrombin generation is initiated by the release of tissue factor from the plaque and occurs on the surface of highly activated (procoagulant) platelets, resulting in a fibrin network that stabilizes the platelet thrombus.

- endotel normálně brání hemostáze sekrecí inhibitorů agregace destiček a koagulace
  - produkce oxidu dusnatého, prostacyklinu, trombomodulinu (protein C activator), heparan-sulfátu, tPA, ...
- při poškození endotelu **adherují** trombocyty k vWf exprimovanému na odkrytém subendotelu prostřednictvím jejich receptorů (prostřednictvím GPIb-IX)
- dochází k **aktivaci** destiček (pseudopodia) a uvolnění jejich mediátorů z granul
  - tromboxan, PAF, ADP, serotonin → aktivace dalších trombocytů + silnější vazokonstrikce
- exprese integrinů GPIIb/IIIa → vazba fibrinu → **agregace** a tvorba def. zátky
- trombocyty se podílí i na aktivaci sekundární hemostázy
  - uvolnění tkáňového faktoru, PF-3 a lokální tvorbou trombinu (FIIa)

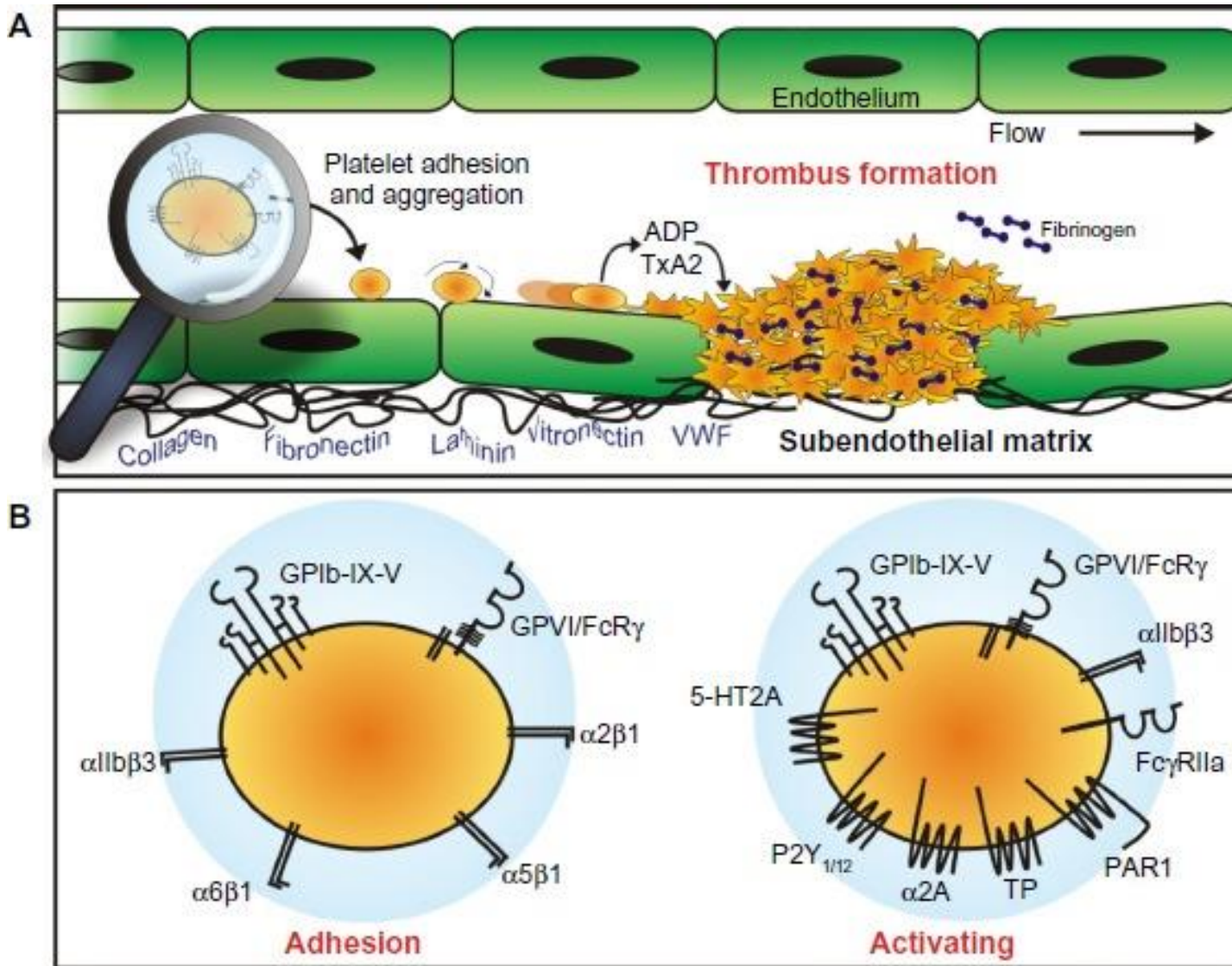
# Primární destičková zátka



- Distinct steps of platelet adhesion, activation, and aggregation at the activated endothelium. (A) The initial adhesion of platelets (tethering) is mediated by the binding of the glycoprotein (GP)Ib-V-IX receptor complex to the A1 domain of the von Willebrand factor (VWF) on endothelial cells. Additionally, binding to P-Selectin can enhance platelet recruitment to the intact vessel wall. (B) In a second step, interactions between GPVI and collagen stabilize the thrombus. Moreover, it comes to a cellular activation with secretion of platelet agonists (e.g., adenosine diphosphate, ADP) and transformation of the GPIIb/IIIa receptors to a state with high affinity. (C) The common final pathway of the platelet activation via the GPIIb/GPIIIa (integrin-fibrinogen) pathway culminates in an irreversible platelet aggregation and subsequent thrombus growth.



# Primary platelet plug

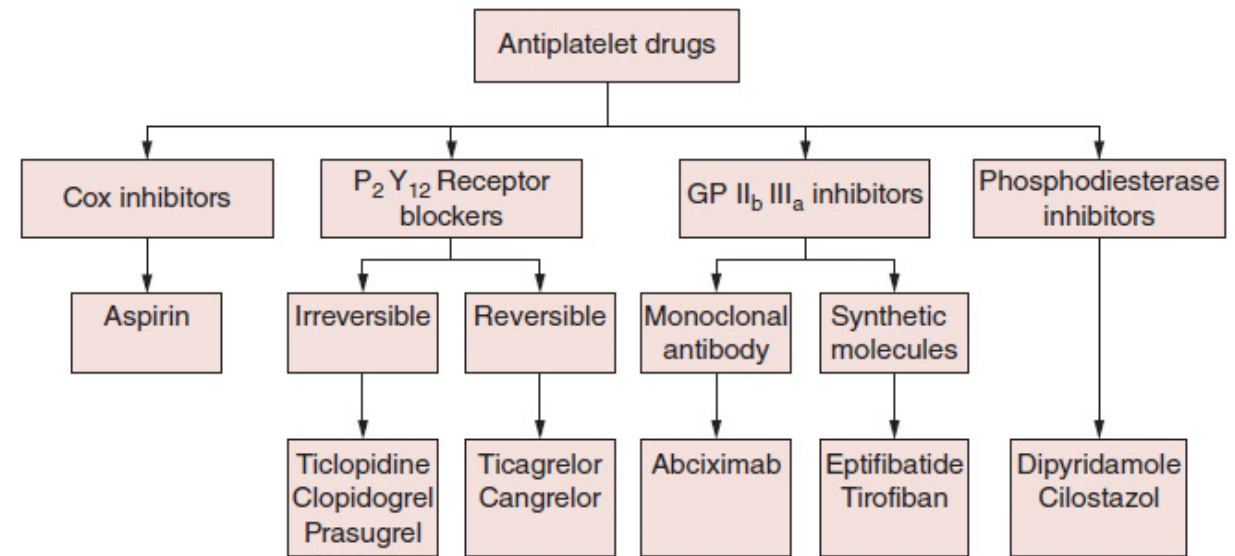
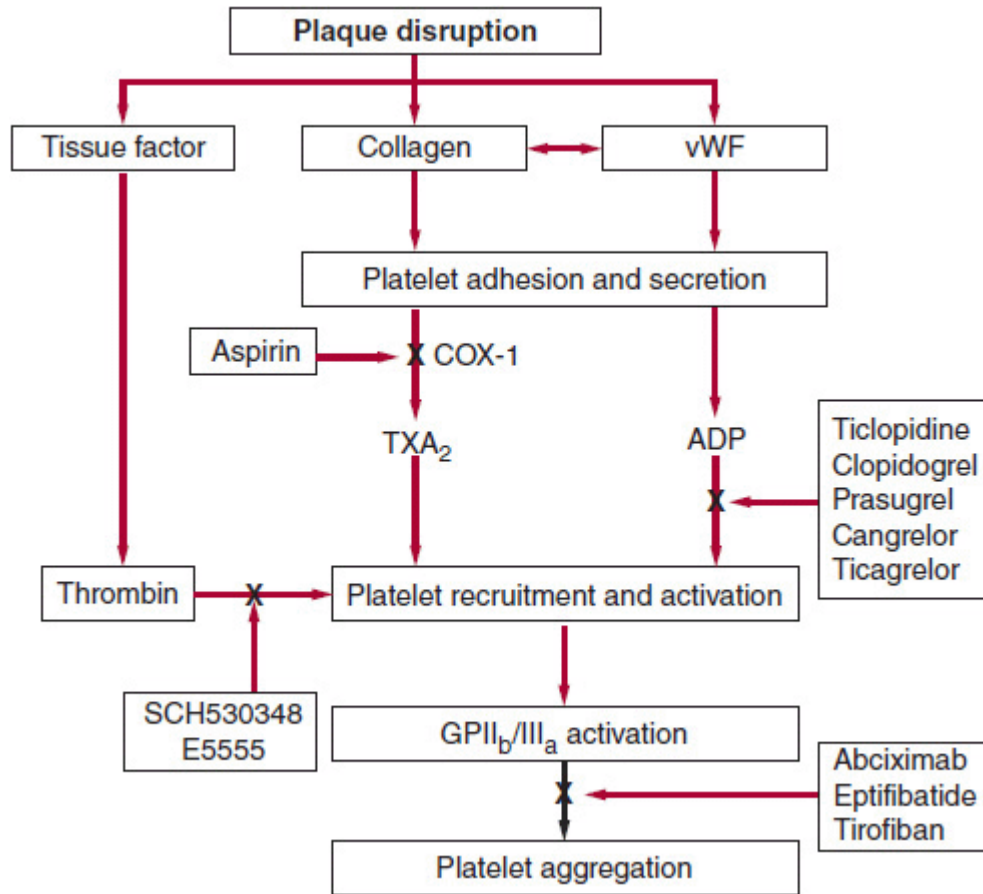


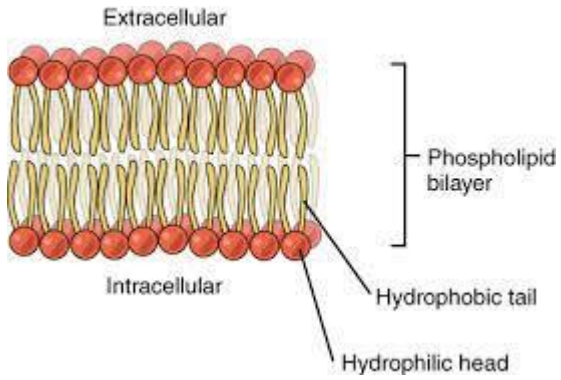
## Platelet adhesion and aggregation:

- (A) Platelets normally circulate through the vasculature in a nonadhesive state. Upon the detection of an exposed subendothelial matrix, platelets are induced to come into close contact with the vessel wall and roll, then arrest, at the site of vessel injury. The process of adhesion is orchestrated by the platelet adhesion receptors GPIb and GPIIb/IIIa. The release of soluble agonists, such as ADP and thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) amplify platelet activation. Platelet adhesion and activation, results in the formation of a platelet plug (thrombus).
- (B) Platelet engagement with the blood vessel wall is predominantly mediated by GPIb and GPIIb/IIIa; however, the platelet surface possesses receptors that can engage matrix proteins. Additional involvement of these other adhesion proteins, including integrins  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, and  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, which bind collagen, fibronectin, and laminin, respectively, and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 that binds VWF and fibrinogen, among others, help to stabilize the initial attachment and facilitate platelet recruitment and thrombus growth. Platelet activation occurs following agonist binding to GPIIb/IIIa and GPVI, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, Fc $\gamma$ R11a, and the G protein-coupled receptors for serotonin (5-HT<sub>2A</sub>), ADP (P2Y<sub>1/12</sub>), epinephrine ( $\alpha$ 2A adrenergic receptor), TxA<sub>2</sub> (TP), and thrombin (PAR1). Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; VWF, von Willebrand factor; GP, glycoprotein.



# Anti-agregační (protidestičková) léčba





# membrane phospholipids

phospholipase A2

steroids

**ARACHIDONIC ACID**

## Cyclooxygenase Pathway

## 5- Lipooxygenase Pathway

zileton

aspirin, NSAIDs

selective  
COX-2  
inhibitors

COX-1 / COX-2

Prostaglandin G2 (PGG2)

Prostaglandin H2 (PGH2)

Tissue  
specific  
synthesases

PGD2

PGE2

PGF2 $\alpha$

PGI2

Prostacyclin

endothelia

TXA2

Thromboxane A2

platelets

@VijayPatho

Hydroperoxyeicosatetraenoic acid

5HPETE

5HETE

Leukotriene B4

Leukotriene A4

Leukotriene C4

Leukotriene D4

Leukotriene E4

12-  
Lipoxy  
genase

bronchial  
SMCs

Lipoxin A4

Lipoxin B4

montelukast

Existuje jen 1 (~~2~~) způsob jak krev koagulovat, ale desítky jak ji ztratit (vykrváčet)





# Srážecí faktory

No.	Name	Role
I	Fibrinogen	Clot formation
II	Prothrombin	Activation of factors I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C and platelets
III	Tissue factor	Cofactor VIIa
IV	Calcium	Role in binding of phospholipid coagulation factors
V	Proaccelerin	Cofactor of X – prothrombinase complex
VI		Activated form of V
VII	Proconvertin	Enables factors IX and X
VIII	Antihemophilic factor A	Cofactor of IX complex
IX	Antihemophilic factor B or Christmas factor	Enables factor X, forms the complex tensor with factor VIII
X	Stuart–Prower factor	Forms the prothrombinase complex together with factor V, which will activate factor II
XI	Antecedent of plasma thromboplastin	Activates factor IX
XII	Hageman factor	Enables factors XI, VII and prekallikrein
XIII	Fibrin stabilizing factor	Creating cross-links between fibrin monomers
XIV	Prekallikrein – Fletcher factor	Precursor of kallikrein
XV	HMWK – Fitzgerald factor	Cofactor
XVI	von Willebrand factor	Role in platelet adhesion; it is linked to factor VIII
XVII	Antithrombin III	Inhibits IIa, Xa and other proteases
XVIII	Heparin cofactor II	Inhibits IIa
XIX	Protein C	Inactivates factors Va and VIIIa
XX	Protein S	Cofactor for activated C protein

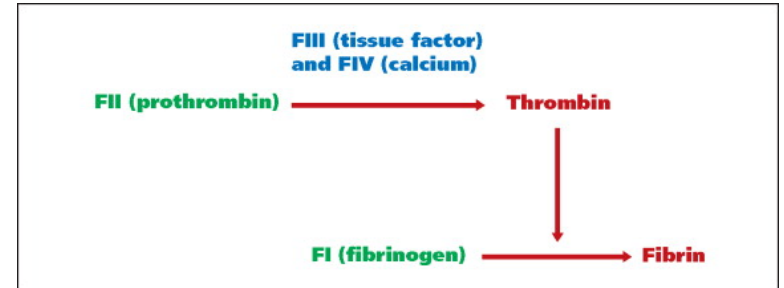
HMWK: High-molecular-weight kininogen.

- pojmenovány chronologicky podle svého objevení

- iničiálně Morawitz 1905

- „kaskádový/waterfall“ model v r. 1964

- ale koncept je postaven výhradně na in vitro datech!!



- všechny faktory s výjimkou TF (FIII) jsou přítomny v plasmě

- v neaktivní formě (zymogeny)

- pouze FVIIa normálně cirkuluje v malém množství jako aktivní

- většina faktorů (s výjimkou TF a FVIII) jsou syntetizovány v játrech

- FII, VII, IX a X jsou vit. K dependentní

- původ FVIII je stále ne zcela jasný – CD34+ bb. kostní dřeně vč. megakaryocytů, cirkulující monocyty/makrofágy a jaterní sinusoidy (endotelie)

- důležité pro event. genovou terapii hemofilie A

- substrát

- fibrinogen (FI)

- serinové proteázy

- aktivované FII, VII, IX, X, XI, XII a prekallikrein

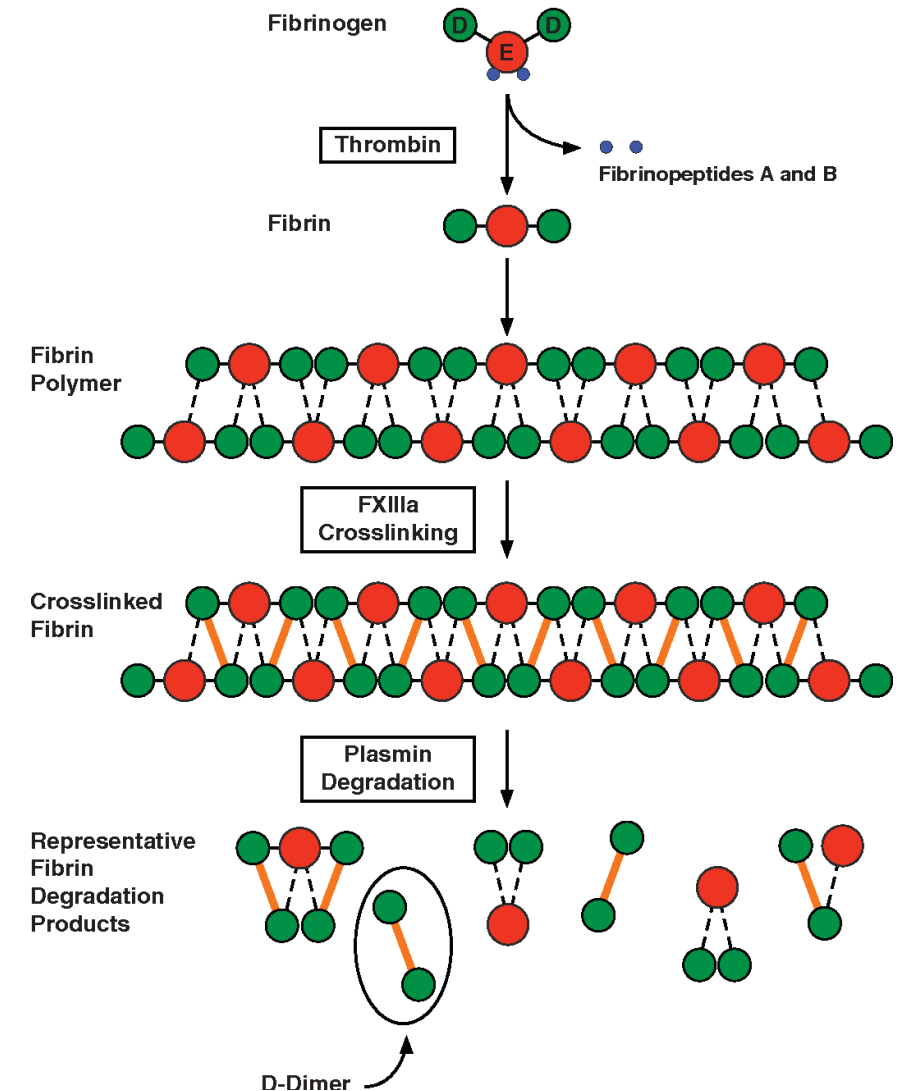
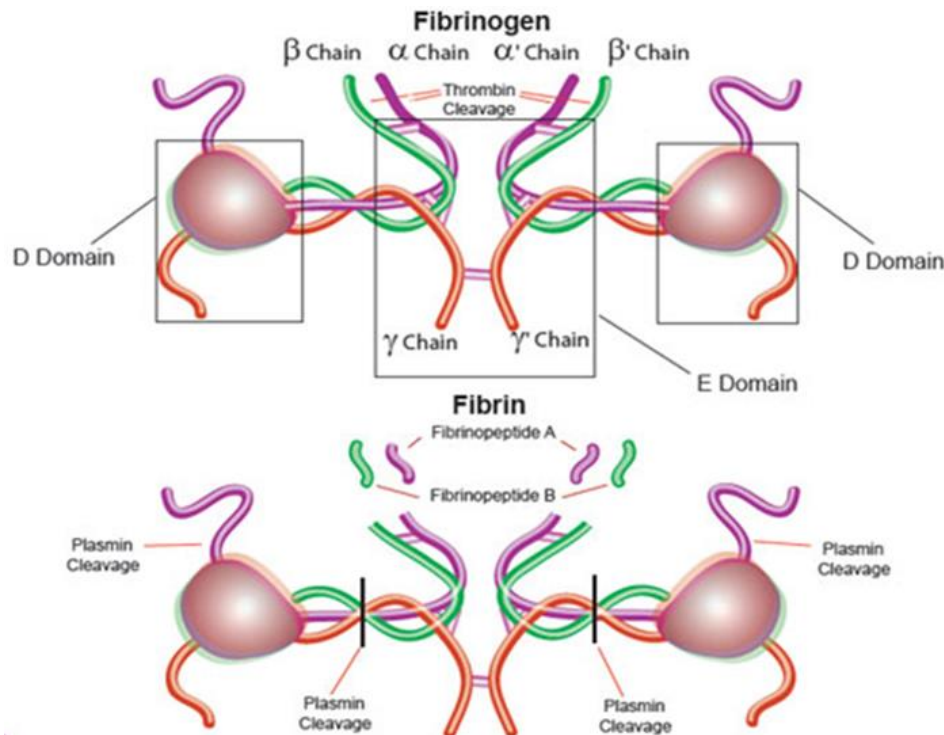
- plasminogen, t-PA a u-PA

- kofaktory (v tetramerních komplexech)

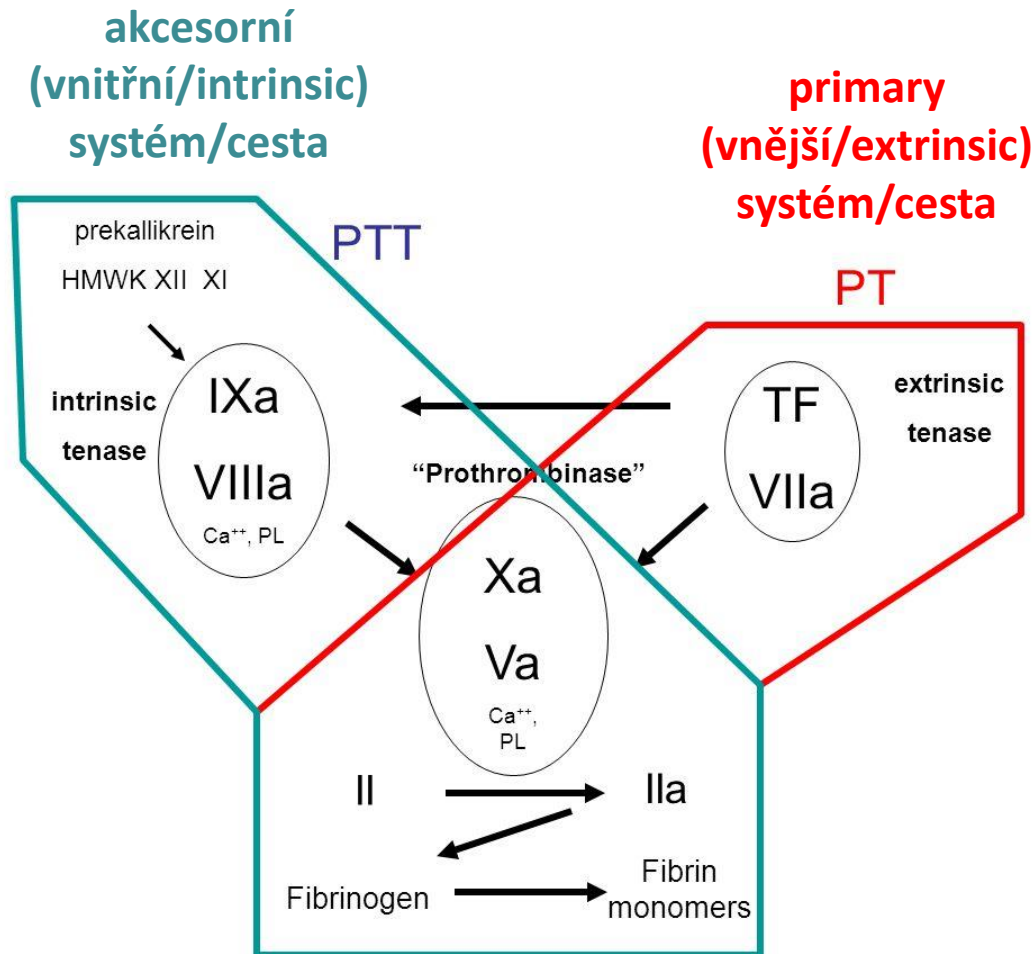
- HMWK, FVIII and FV

# Fibrinogen - fibrin

- 3 páry polypeptidů  $([A-\alpha][B-\beta][\gamma])_2$  – 340kDa
  - D – E – D domény
- FIIa (trombin, serinová proteáza) odštěpuje fibrinopeptidy A a B a generuje monomery fibrinu  $(\alpha-\beta-\gamma)_2$
- monomery spontánně agregují a vytváří fibrinovou síť
- trombin rovněž aktivuje fXIII (transglutamináza), který tvoří příčné vazby mezi polymery fibrinu
  - bez něj (např. při hereditárním deficitu fXIII) je koagulum nestabilní a dochází ke krvácení do hlubokých anatomických struktur (defekt 2-ní hemostázy)



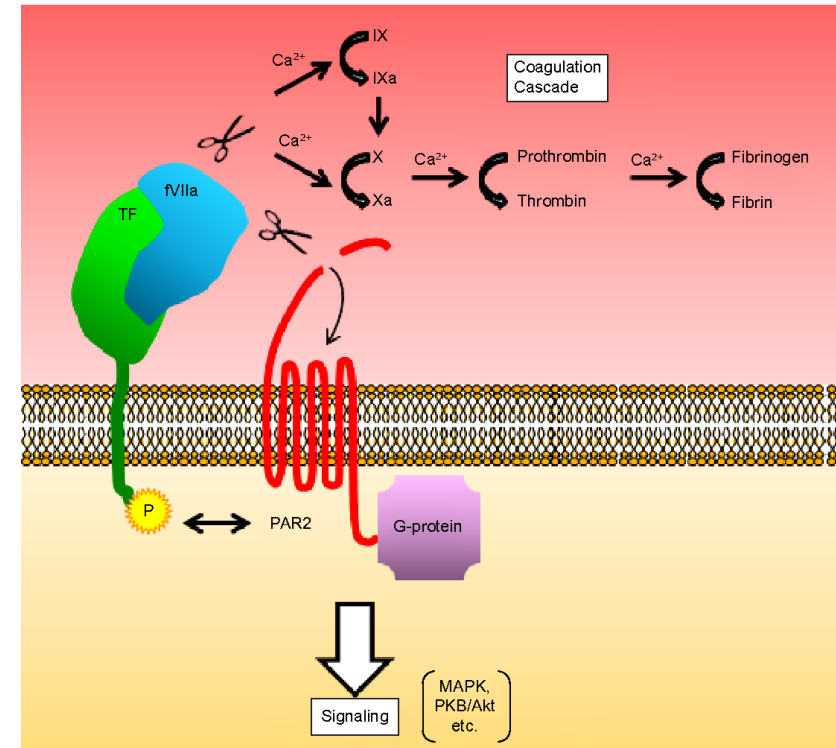
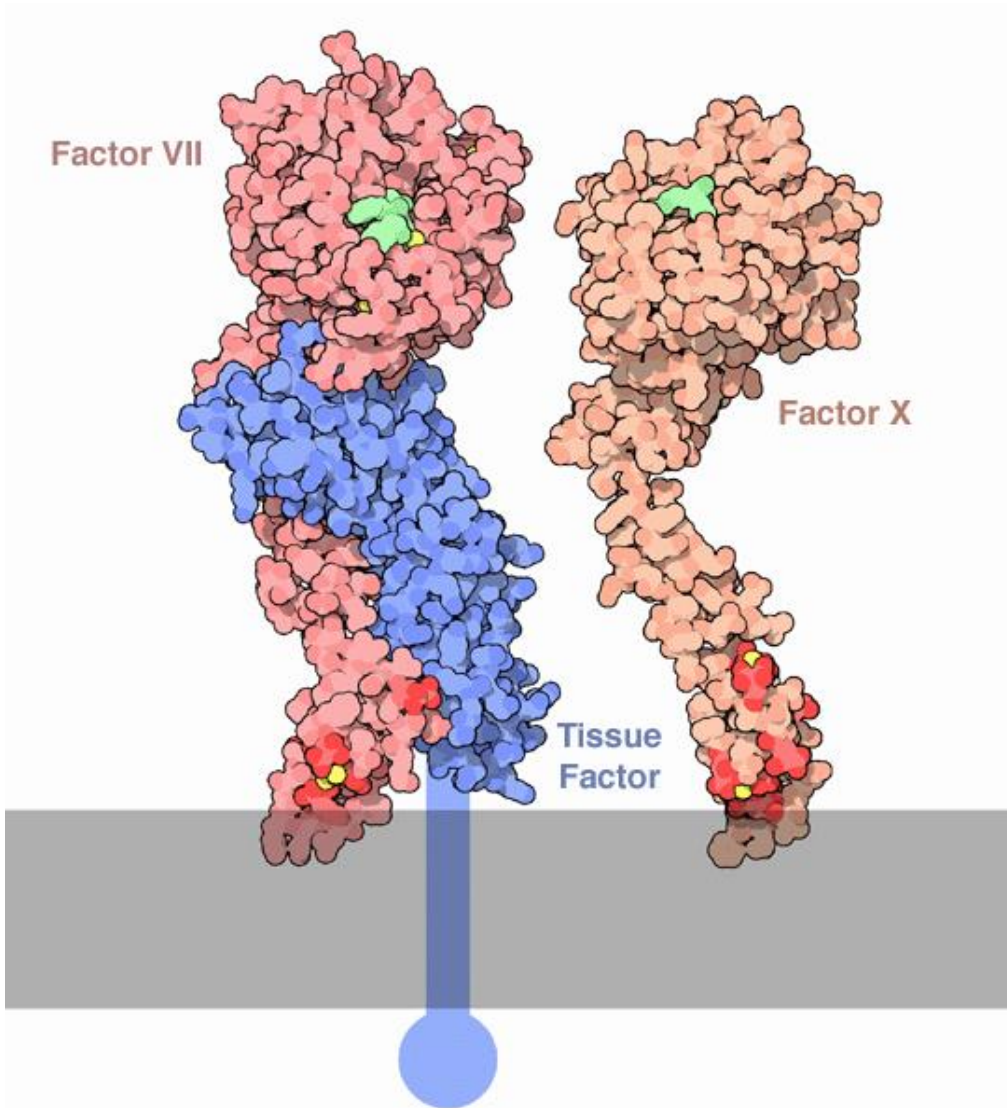
# Hemostáza jednoduše – původní kaskádový model



- Kaskádový/vodopádový model tvořil základ pro naše chápání koagulace téměř celé poslední půlstoletí
  - poskytoval logické vysvětlení srážecích reakcí, avšak výhradně na základě in vitro laboratorních studií
  - tyto používaly plazmatický protrombinový test bez přítomnosti destiček
    - PT a jeho mezinárodní normalizovanou poměrovou stupnici (INR) pro vnější a aktivovaný parciální tromboplastinový čas [aPTT] test pro vnitřní dráhy byly vyvinuty na základě měření času potřebného k vytvoření in vitro fibrinové sraženiny po re-kalcifikaci vzorku krve a za přítomnosti vhodných činidel
- Pacienti se specifickými nedostatky ve „vnitřní cestě“ koagulační dráhy – např. FXII, prekallikrein (PK) a HMWK - mají prodloužený aPTT (často extrémně), ale bez zvýšené tendence ke krvácení
- Pacienti s nedostatky v „downstream“ faktorech spojených s vnitřní cestou - FVIII a FIX – mají naopak závažnou tendenci ke krvácení v situaci, kdy je vnější systém plně funkční
- Pacienti s deficitem FVII „vnější cesty“ mají rovněž krvácivou diatézu, i když je „vnitřní systém“ plně funkční
- Vzácné defekty FX a FV, což jsou součásti „společné cesty“ mají porušenou hemostázu, u deficitu FXI je porucha klinicky mnohem méně prediktabilní
- Tudíž obě cesty/systémy jsou navzájem naprosto interdependentní in vivo!!! a nejsou to alternativy, ale sekvenční fáze jednoho procesu
- **buněčný model koagulace**
  - TF/FVIIa komplex je výhradním iniciátorem koagulace in vivo



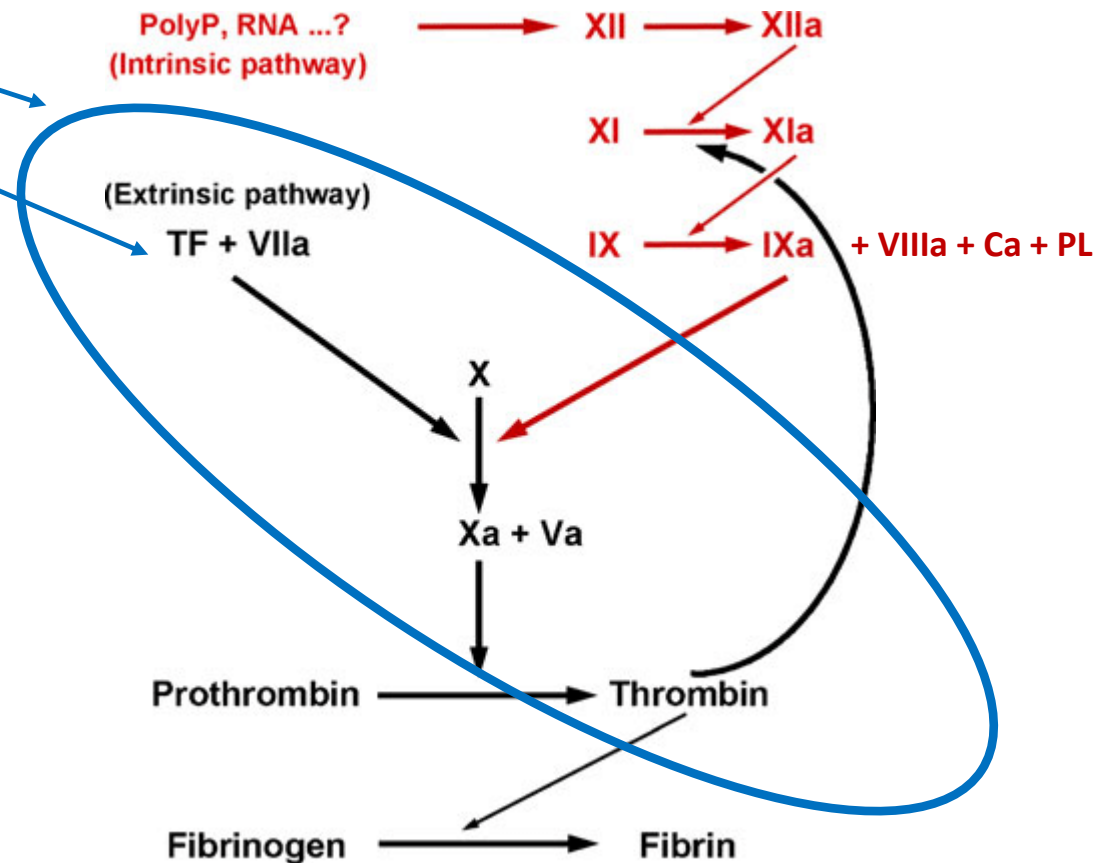
# Tkáňový faktor – koagulace a další role



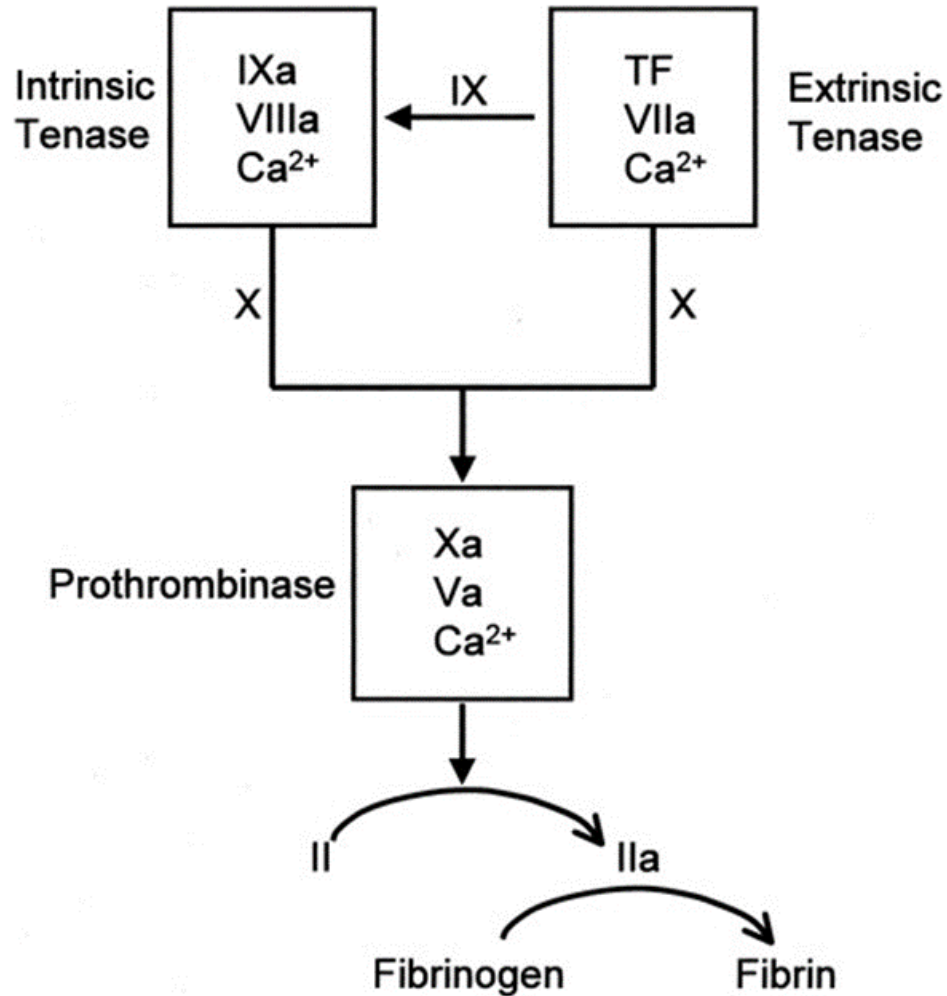
- TF–fVIIa complex formation on the surface of endothelial cells results in the activation of the extrinsic coagulation cascade and/or Pars. The serine protease activity of the TF–fVIIa binary complex associated with the plasma membrane initiates activation of downstream coagulation cascades associated with coagulation factors (IX, X, prothrombin, and fibrinogen). Otherwise, this protein complex cleaves the N-terminal end of PARs. PARs are then activated via intramolecular binding between the newly created n-terminus and an extracellular loop region of the receptors. activation of G-protein coupled receptors subsequently activates downstream signalling cascades. Phosphorylation of the C-terminal end of TF could also lead to association with Par2 in a coagulation-independent manner to augment the signalling cascade

# Hemokoagulace probíhá na povrchu krevních bb.

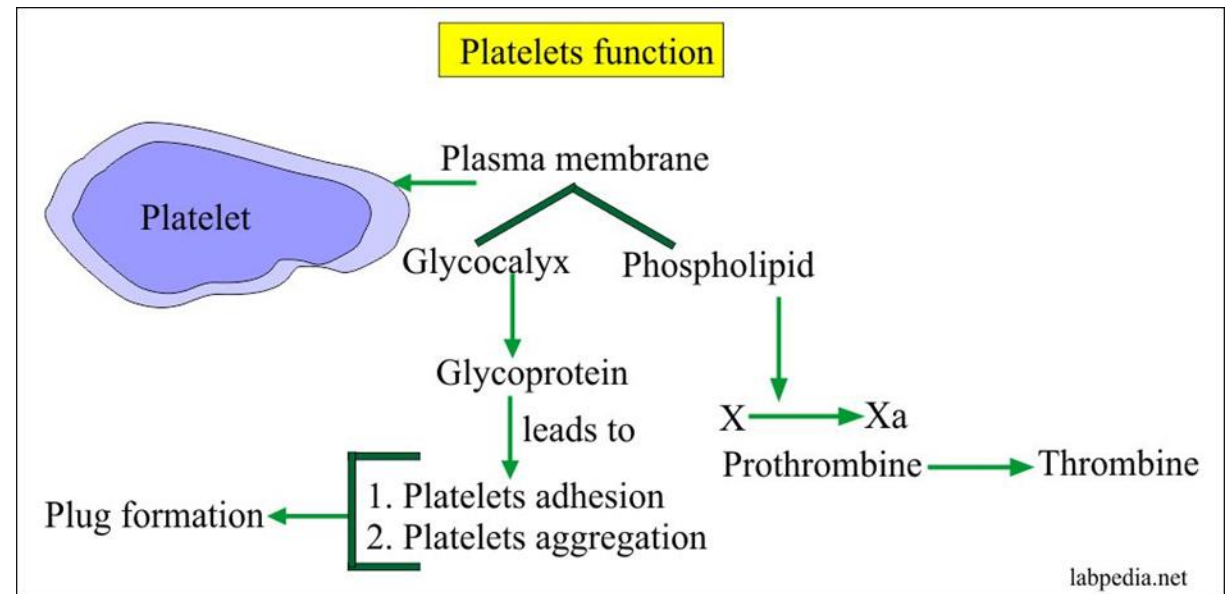
- **primární** (dříve vnější/extrinsic) cesta je rychlá, ale méně efektivní = **INICIACE**
  - TF je buněčný receptor pro fVIIa
  - TF + VIIa + Ca + PL = komplex **vnější tenáza**
  - množství aktivovaného trombinu je malé a nestačí na konverzi požadované množství fibrinogenu, ale je účinné k aktivaci fIX (a fXI, kofaktory fVIII a fV) a trombocytů
  - navíc dochází k rychlé inaktivaci TF inhibítorem (TFPI)
- po zablokování TF je aktivní **akcesorní** (dříve vnitřní/intrinsic) cesta, která je delší a více efektivní = **AMPLIFIKACE** a **PROPAGACE**
  - aktivace fXI, fIX, fVIII a fV trombinem
  - IXa + VIIIa + Ca + PL = **vnitřní tenáza**, která již účinně aktivuje fX
  - fXa v komplexu s Va, Ca a PL (= **protrombináza**) účinně konvertuje protrombin na fIIa a ten štěpí fibrinogen
- negativně nabitá PL, nezbytná pro tvorbu komplexů jsou poskytována trombocyty a monocyty
- úloha HMWK, faktorů XII a XI (v kontaktu s negativně nabitým povrchem, např.
  - obnažený kolagen v sub-endoteliální vrstvě cév
  - lipoproteiny (chylomikrony, VLDL)
  - stěna bakterií
- je méně jasná oproti dřívější koncepci
  - např. deficit fXII nevede ke krvácivým stavům



# Cell-based model of coagulation



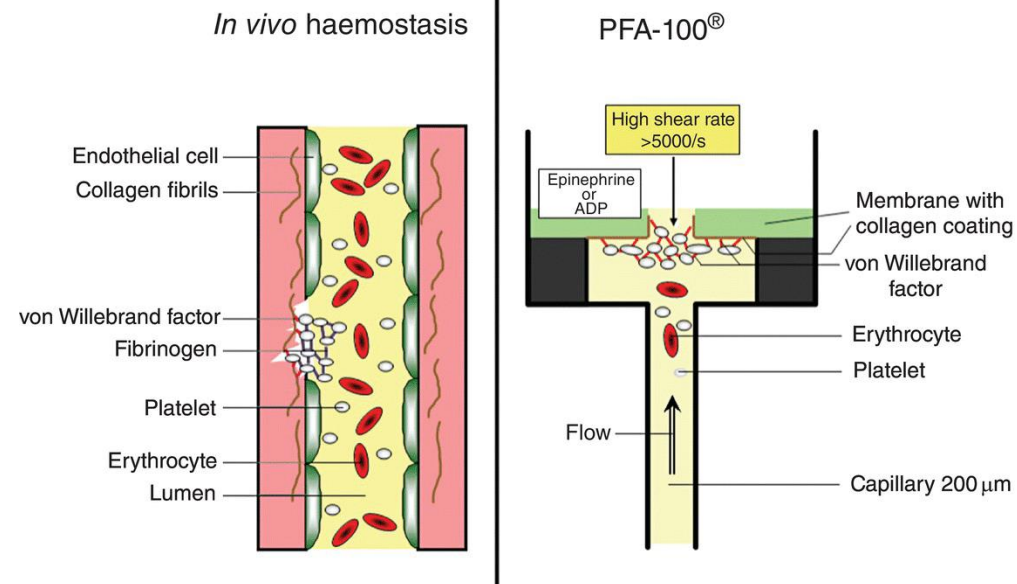
- Coagulation is initiated by extrinsic tenase, which forms when factor VIIa binds to tissue factor. Extrinsic tenase activates factors IX and X. In the presence of calcium, factor IXa binds to negatively charged phospholipid surfaces where it interacts with factor VIIIa to form intrinsic tenase, a complex that efficiently activates factor X. Factor Xa binds to factor Va on negatively charged phospholipid surfaces to form prothrombinase, the complex that activates prothrombin to thrombin. Thrombin then converts fibrinogen to fibrin. Activated platelets or monocytes provide negatively charged phospholipid surfaces on which these clotting reactions occur.





# Koagulační testy

bleeding time (in vivo, 3-7 min) – primary hemostasis (PLT function)



First-line (screening) testing

Second-line (specific) testing

Hemorrhagic disorders

Primary hemostasis

Platelet count  
PFA-100

Platelet aggregation  
Platelet nucleotides  
Platelet factor 3 (PF3)  
von Willebrand factor (antigen and functiona

Secondary hemostasis

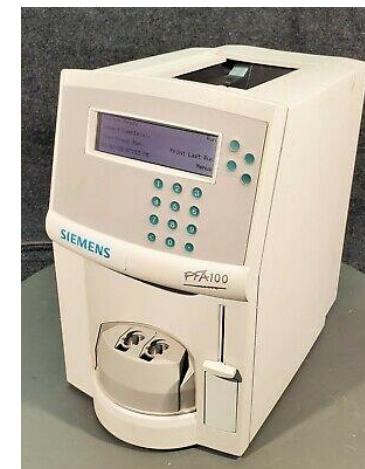
Activated partial thromboplastin time (APTT)  
Prothrombin time (PT)  
Fibrinogen (functional)

Intrinsic pathway factors  
Factor VII  
Fibrinogen (immunological)  
Factor XIII  
Thrombin time and/or reptilase time  
 $\alpha_2$ -Antiplasmin  
Plasminogen activator inhibitor-1

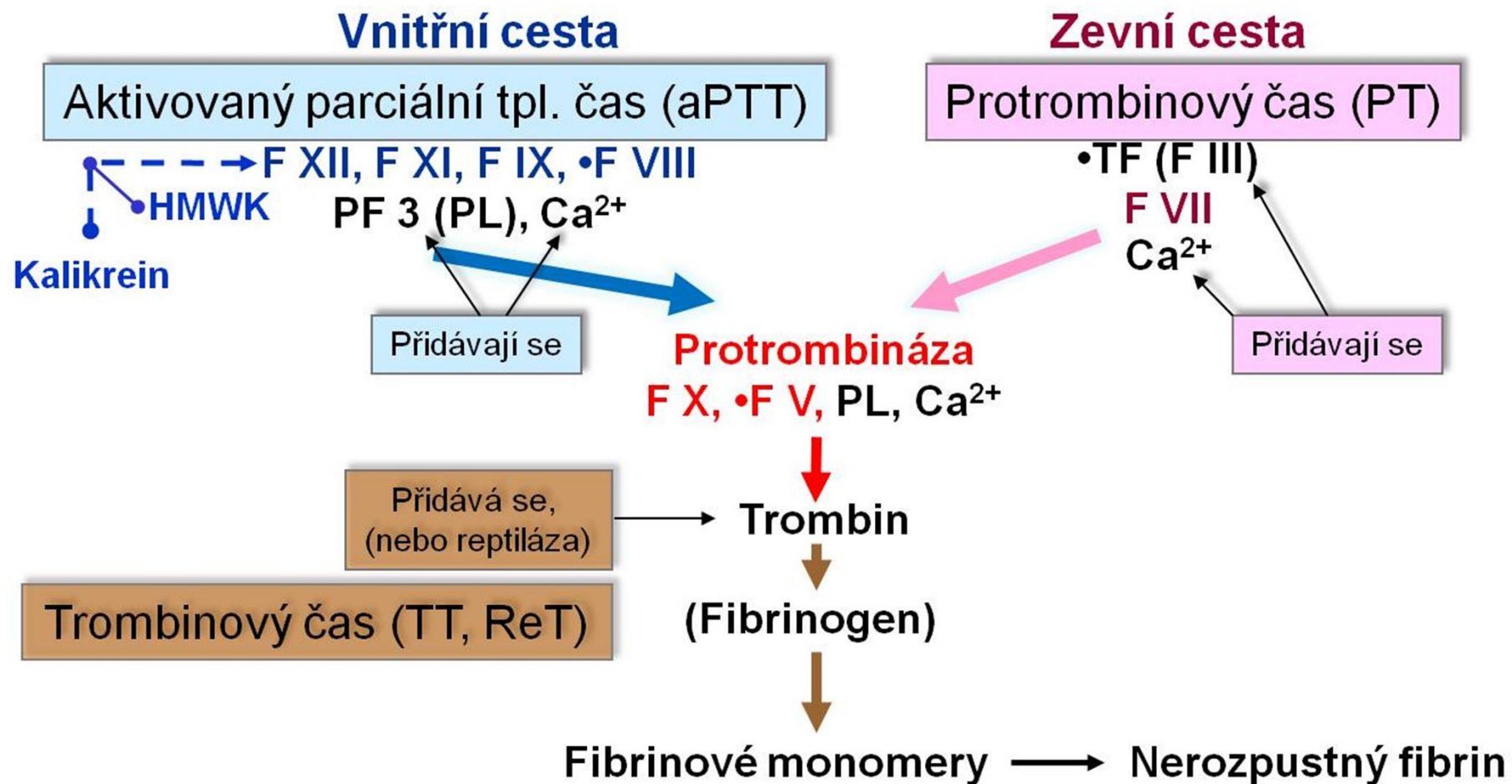
Global (alternative) tests

Thrombin generation assays  
Thrombelastography/thromboelastometry  
Clot waveform analysis  
Atomic force microscopy (AFM)

platelet  
aggregometry

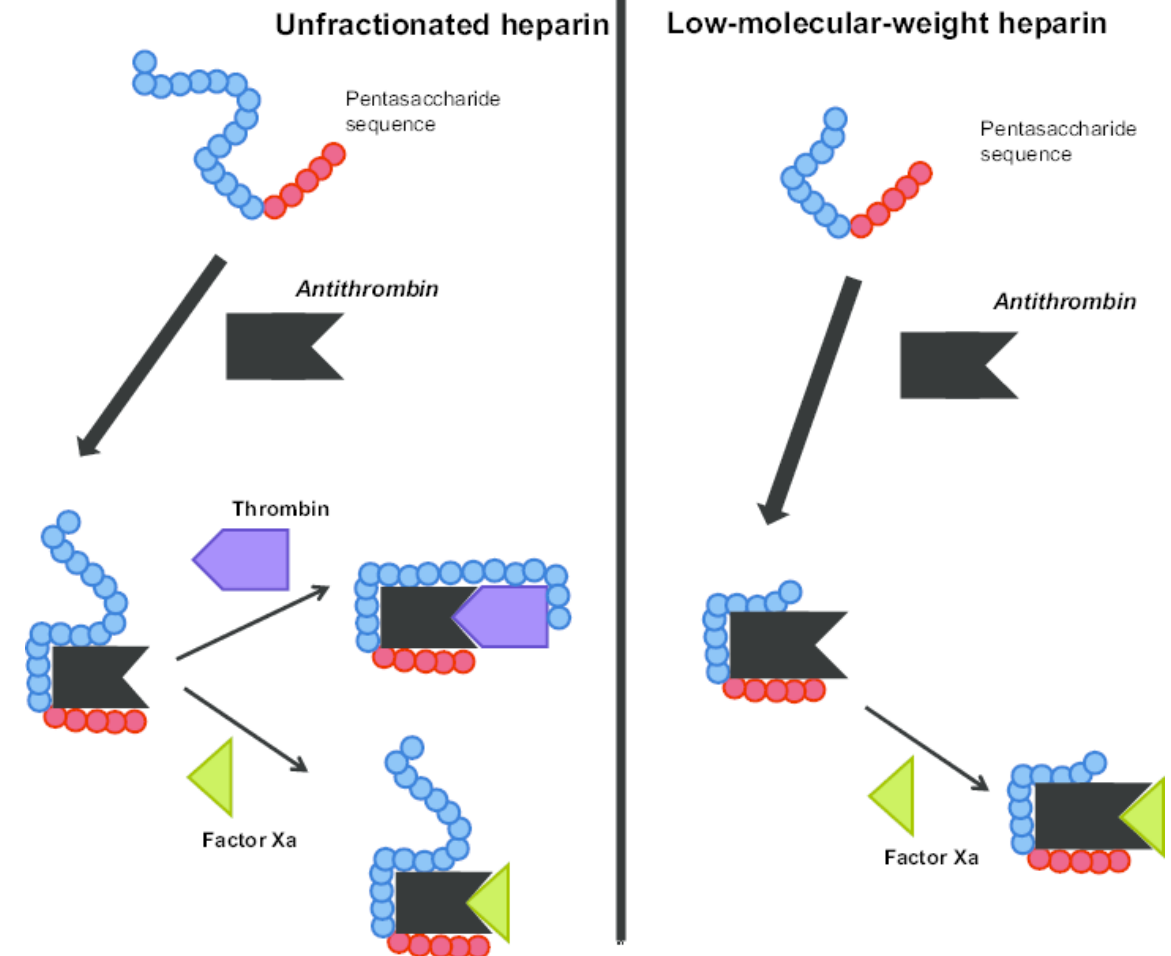


# Vyšetření krevní srážlivosti



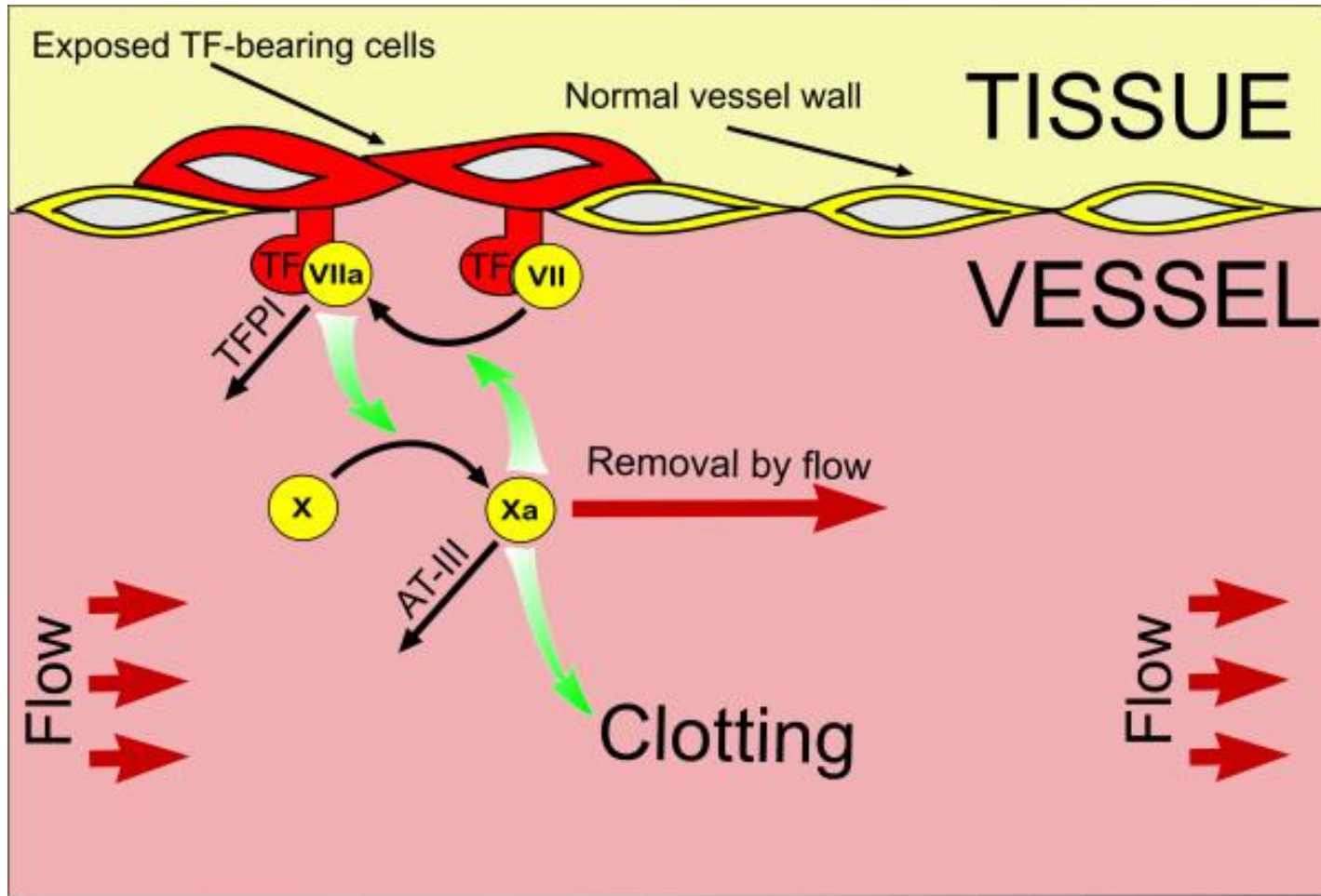
# Ztráta krve je život ohrožující stav, dlouhodobá absence perfuze rovněž

- Regulace krevního srážení
  - (1) rychlost krevního toku
  - (2) intaktní endotel
    - nesmáčivý, neadhezivní
    - vazodilatace a tedy vysoký průtok (NO, PGI<sub>2</sub>)
    - heparansulfát (neutralizuje serinové proteázy)
    - thrombomodulin (neutralizuje trombin)
    - t-PA (fibrinolýza)
  - (2) koncentrace inhibičních faktorů hemostázy
    - (a) kontrola na úrovni trombinu
      - heparin (přirozeně z mastocytů a bazofilů)
      - antithrombin III (a heparansulfát)
        - inhibice trombinu a také IX, X, XI a XII
      - a<sub>2</sub>-macroglobulin
      - heparin kofaktor II
      - a<sub>1</sub>-antitrypsin
    - (b) kontrola na úrovni FXa (inaktivace FVIII a V)
      - protein C + thrombomodulin
      - protein S
  - (3) aktivita fibrinolýzy





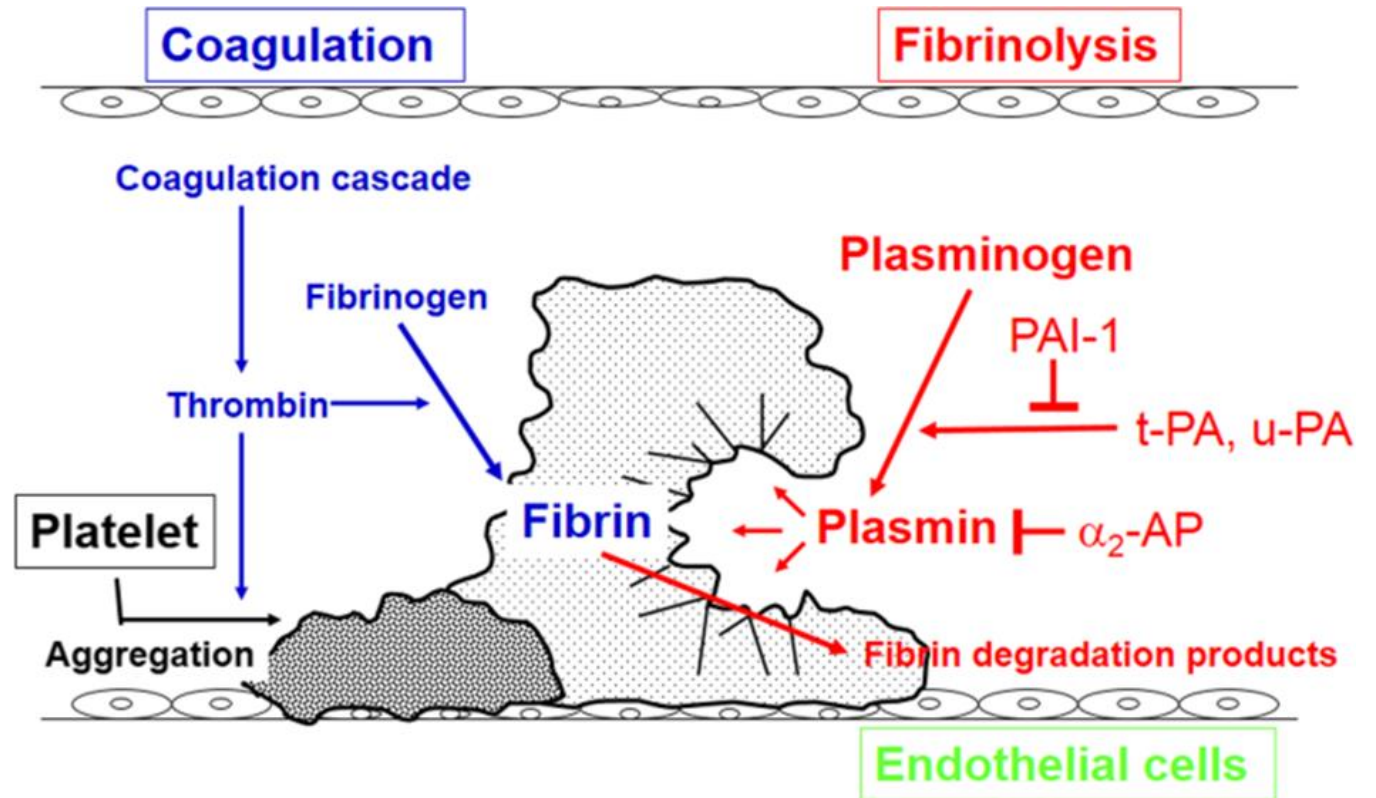
# Proč stáza krve může vést k trombóze (Virchow)



- Regulation of fibrin clotting by flow via the factor VII activation by factor Xa. The diagram illustrates the mechanisms controlling initiation of coagulation in the presence of flow. Factor VIIa initially present in plasma binds to TF and activates factor X; it is also inhibited by TFPI. Factor Xa can activate TF-bound factor VII in a positive feedback manner.
- In the absence of flow, both inhibition by TFPI and activation by factor Xa are not significant, because high concentrations of TF present on fibroblast rapidly bind factor VIIa; they do not need additional factor VII activation and are not particularly sensitive to factor VIIa-TF complex inhibition.
- When blood flow is present, factor Xa is rapidly removed, and the rate of factor X production becomes insufficient to create fibrin clot (factor VIIa-TF complex being inhibited by TFPI). This is when factor Xa-dependent feedback becomes important: factor Xa activates factor VII and increases its own production, counteracting the effects of flow. At higher shear rates, this feedback is insufficient, and factor Xa production is strongly inhibited. Thus, inhibition of factor VIIa-TF complex by TFPI and factor VII activation by factor Xa combine to create a threshold-like response of the system in flow: rapid clotting at low shear rates and almost no thrombus formation at higher shear rates.

# Fibrinolytický systém

- plazmin (serinová proteáza) cirkuluje jako neaktivní proenzym (plazminogen)
  - volný plazmin rychle inhibován  $\alpha_2$ -antiplasminem
- aktivace plazminogenu pomocí t-PA (endotel. bb.) a ukokinázy u-PA (epitel. bb.) na plazmin
- degradace fibrinu na degradační produkty
  - jedním z nich jsou D-dimery využitelné k diagnostice trombózy
- aktivita t-PA je inhibována PAI-1
  - PAI-1 je protein akutní fáze a rovněž rizikový parametr asociovaný s obezitou



# Poruchy krevního srážení

- (A) hypokoagulační stavy (krvácivé diatézy)
  - defekt primární hemostázy
    - poruchy cévní stěny (senilní purpura)
    - trombocytopenie
    - trombocytopenie/thrombastenie
      - vč. von Willebrandova choroba
  - defekt sekundární hemostázy (koagulopatie)
    - hereditární
      - hemofilie A a B
      - von Willebrandova choroba
    - získané
      - malnutrice, chronické jaterní onemocnění apod.
- (B) hyperkoagulační stavy (trombofilie)
  - hereditární
    - activated protein C resistance (APCR)
  - získané
- (C) kombinované
  - syndrom diseminované intravaskulární koagulace (DIC)



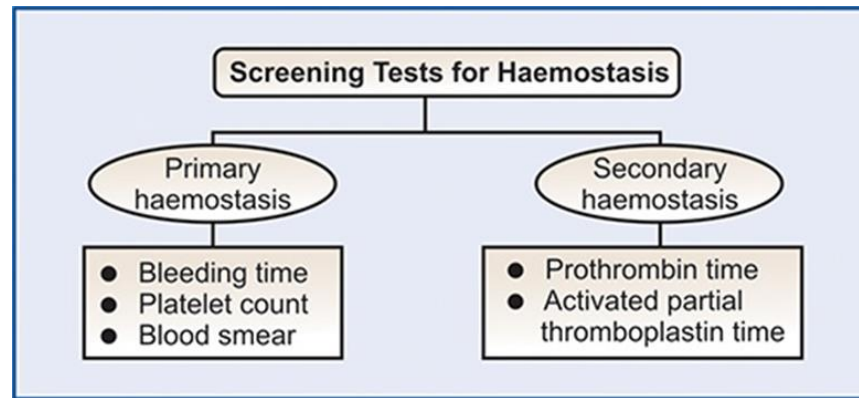




# **HYPOKOAGULAČNÍ STAVY (KRVÁCIVÉ DIATÉZY)**

# Defekty primární hemostázy

- projevy: povrchové krvácení
  - kůže: petechie (1-2mm), purpura (>2mm), snadná tvorba modřin - ecchymosis (>1cm, horší u malnutrice a alkoholiků)
  - slizniční: epistaxe, krvácení z dásní či do GIT, hematurie, menoragie, hemoptýza
  - intrakraniální krvácení až při těžké poruše popř. intraspinální hematom po lumbární punkci



## Primary hemostatic disorder

Petechiae  
Ecchymoses  
Epistaxis  
Gingival bleeding  
Menorrhagia  
Hyphema  
Hematuria  
Melena

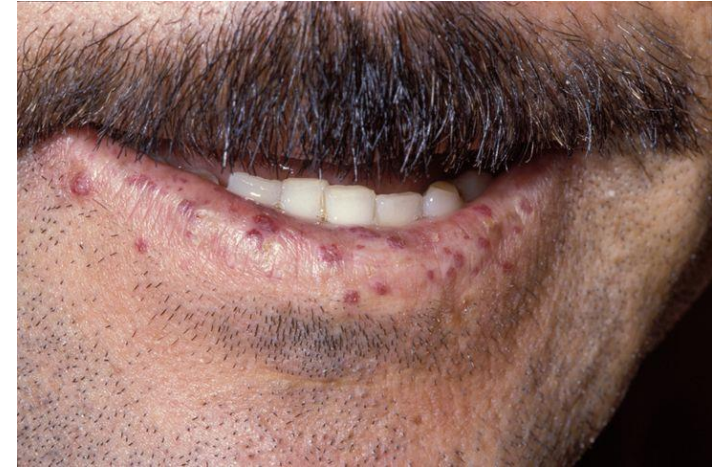
## Secondary hemostatic disorder

Hematomas (single or multiple)  
Subcutaneous bleeding  
Hemoperitoneum  
Hemothorax, including hemomediastinum and pulmonary parenchyma  
Hemarthrosis  
Bleeding into muscles  
Central nervous system hemorrhage



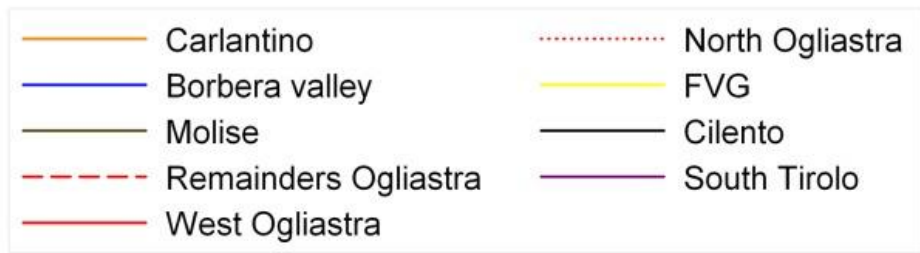
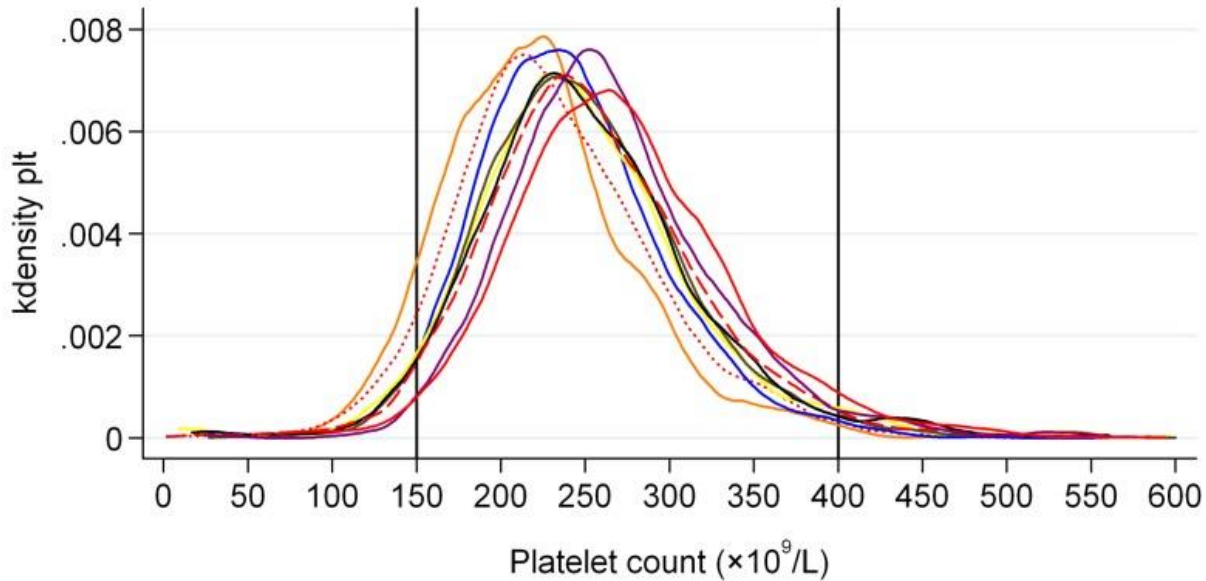
# Kožní a slizniční krvácení při poruše 1-ní hemostázy

- (1) poruchy cévní stěny (vaskulopatie)
  - vrozené
    - telangiectasia hereditaria (m. Rendu-Osler)
      - AD, oslabení úseků stěny cév → telangiektazie (kůže, sliznice, plíce, urogenitální trakt)
    - Ehlers-Danlos a Marfanův syndrom
      - defekt struktury pojiva (kolagen a elastin)
  - získané
    - senilní purpura
    - bakteriální toxiny (spála, spalničky)
    - karence vit. C (scorbut)
    - imunokomplexy (Henoch-Schönleinova purpura)
- (2) trombocytopenie
- (3) trombocytopenie/trombastenie
- (4) von Willebrandova choroba

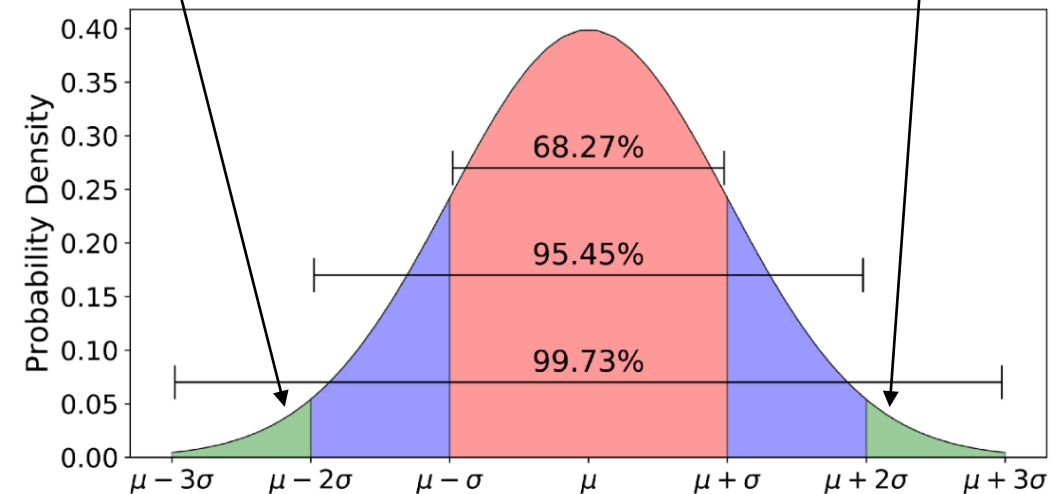




# Thrombocytopenie – počet trombocytů v KO



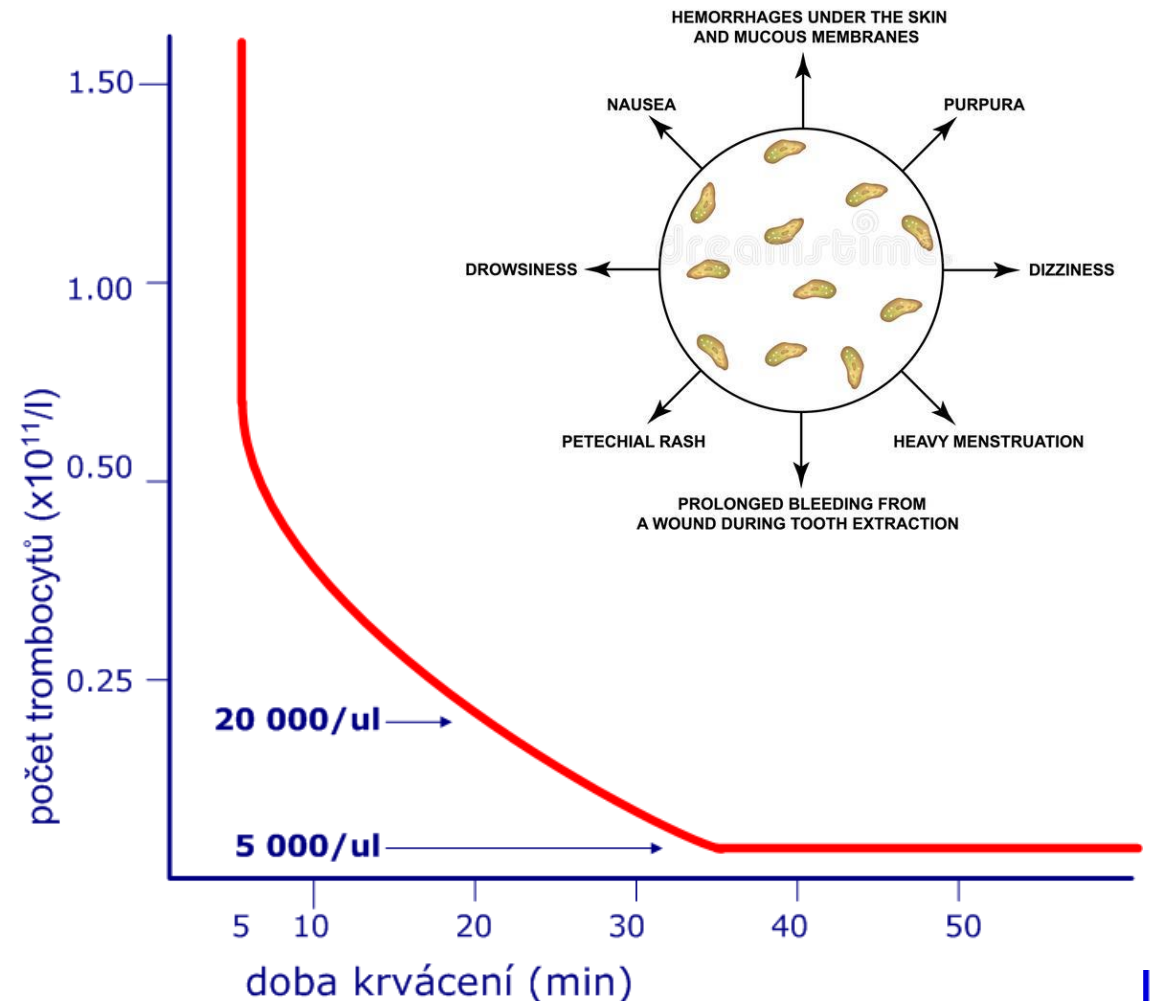
- referenční interval 150,000 – 400,000/ $\mu L$
- klinicky významné hodnoty až  $\pm 2SD$ 
  - riziko krvácení  $< 50,000/\mu L$  + symptomy
  - trombocytémie  $> 750,000/\mu L$



# Thrombocytopenie

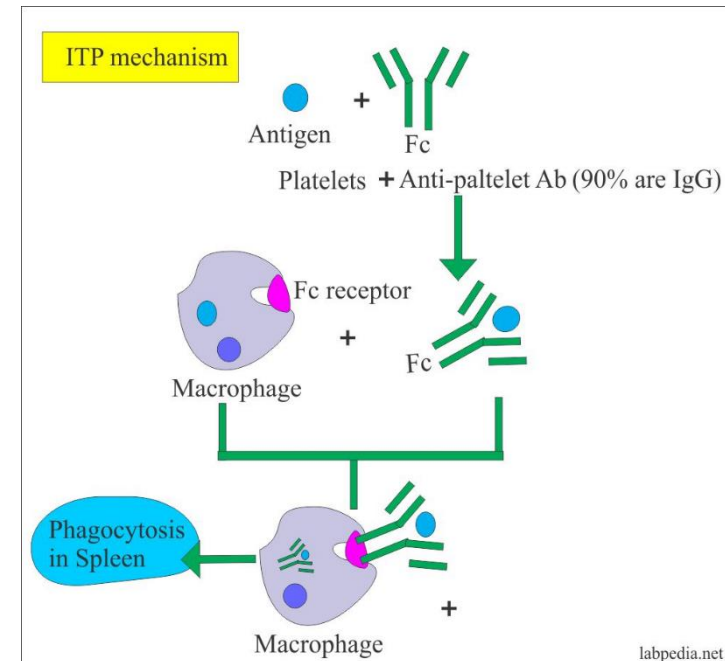
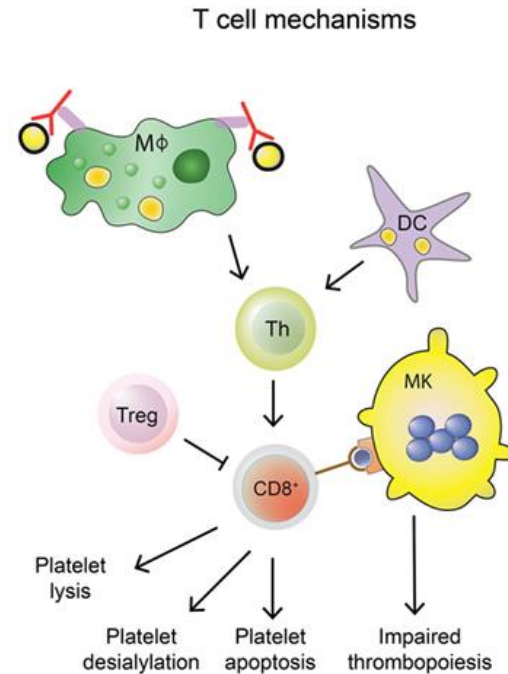
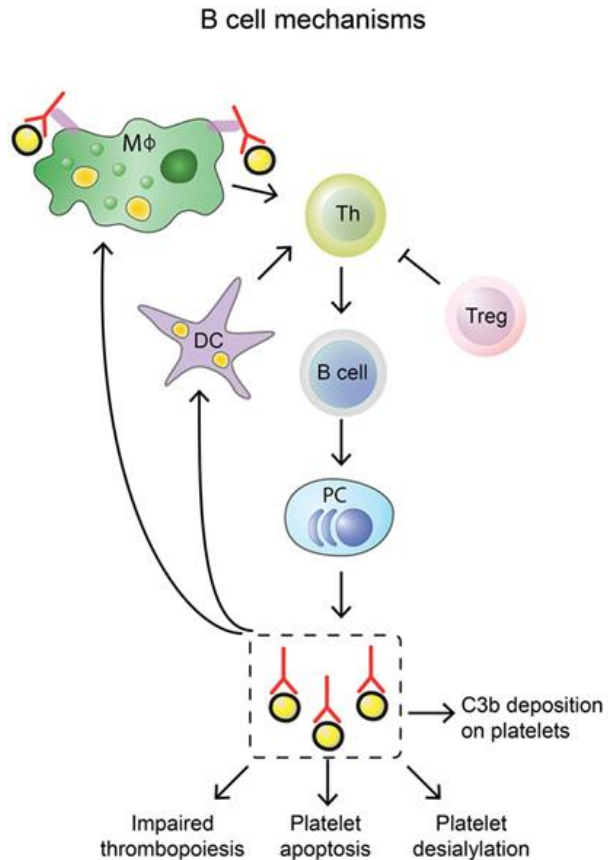
- počet trombocytů 150 – 400 000/ $\mu$ l ( $1.5-4 \times 10^{11}$ /l)
- v cirkulaci přežívají cca 8-10 dní
- etiologie - primární nebo sekundární
  - snížená produkce
    - aplastická anemie (pancytopenie)
    - myelodysplastický syndrom (hypercelulární dřevě)
    - myelofibróza
    - jaterní nemoci ( $\downarrow$  TPO)
    - B12 a/nebo folát
  - destrukce/zvýšená spotřeba
    - **autoimunitní – imunitní trombocytopenická purpura (ITP)**
      - SLE (systémový lupus erythematodes)
      - APS (anti-fosfolipidový syndrom)
      - AIHA + ITP = Evansův syndrom
      - viry indukovaná (HIV, hepatitida C)
      - u nádorů (CLL, lymfomy)
    - poléková (valproát, metotrexát, ...)
    - hypersplenismus - sekvence
  - zvýšená spotřeba/konzumpce - při mikrotrombotizaci
    - DIC
    - trombotická trombocytopenická purpura (TTP)
    - hemolyticko-uremický syndrom
    - HELLP (těhotenství) = hypertension, elevated liver enzymes and low platelets
  - diluční
    - většinou benigní, např. v těhotenství (expanze volumnu)
- krvácení při trombocytopenii
  - povrchové (na rozdíl od hlubokého při poruše 2y hemostázy) = kůže, sliznice
    - $<50\ 000/\mu$ l - zvýšené riziko krvácení
    - $<20\ 000/\mu$ l – významné riziko
    - $<5\ 000/\mu$ l – extrémně vysoké riziko

## SYMPTOMS OF THROMBOCYTOPENIA



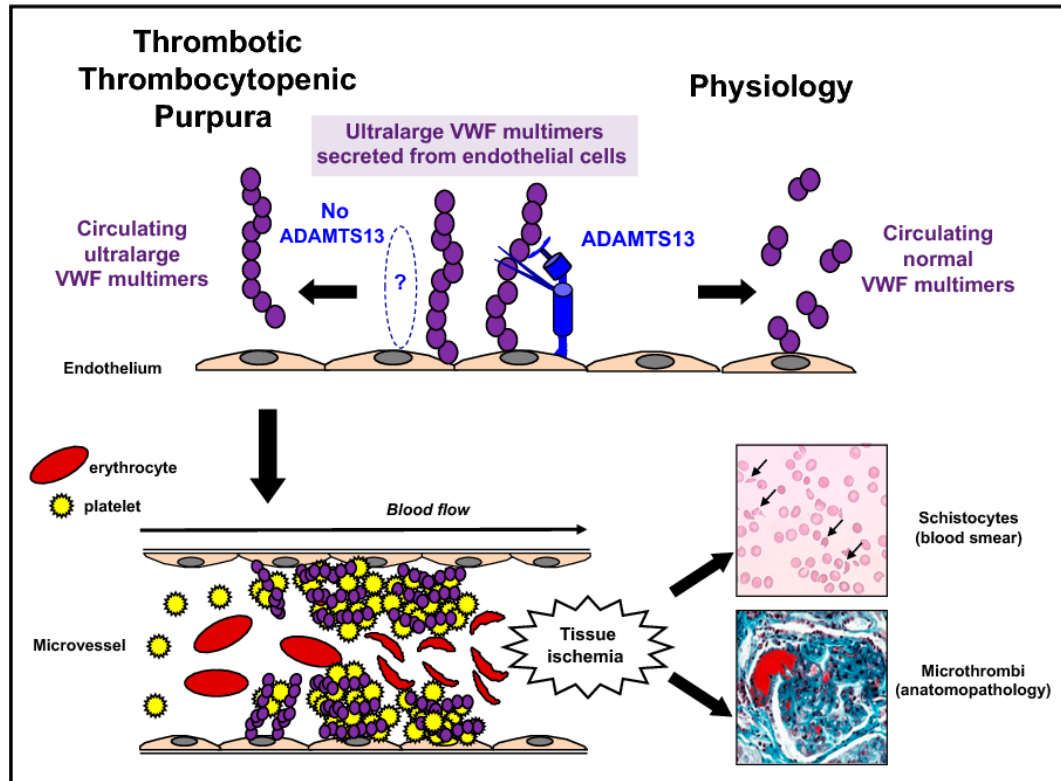
# Imunitní trombocytopenická purpura (ITP)

- the initial event(s) leading to anti-platelet autoimmunity remains unclear, but strong evidence exists that autoantibodies and autoreactive CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells (Tc) trigger enhanced platelet destruction and impair platelet production by megakaryocytes (MKs) in the bone marrow
  - In approximately 60% of all ITP patients, **autoantibodies** are found, predominantly **against platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa (~70%)** and/or the GP Ib-IX-V complex

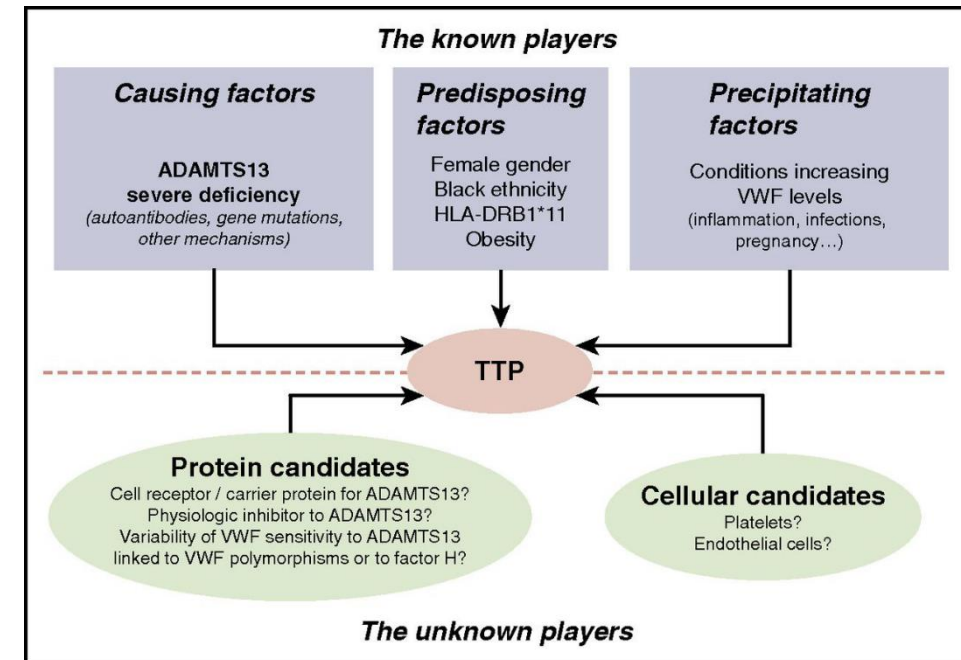




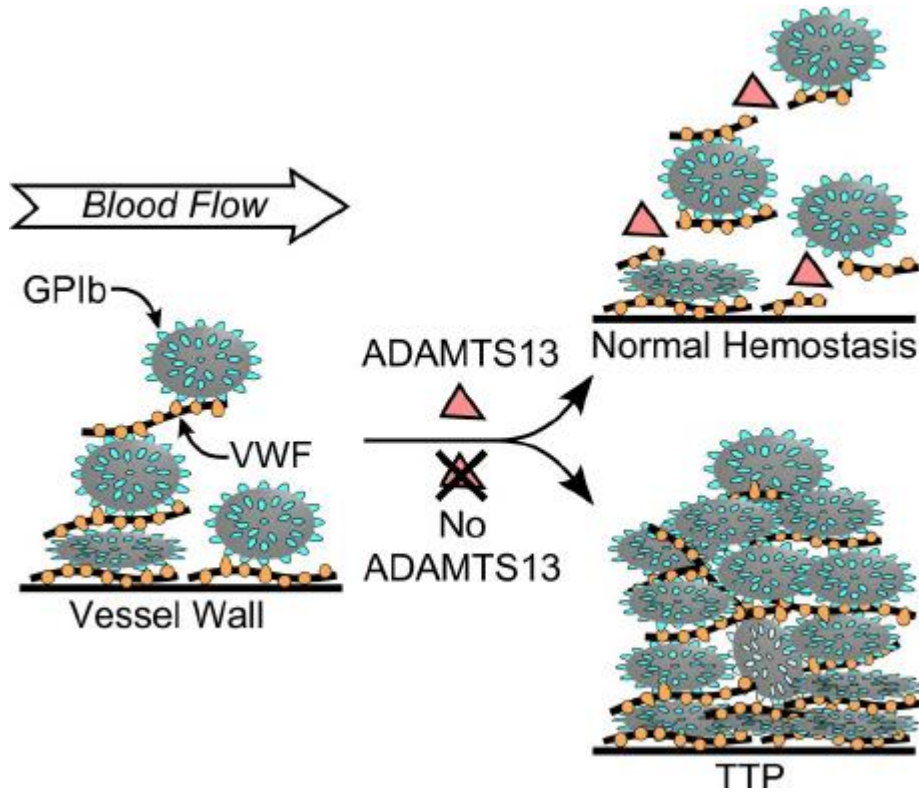
# Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)



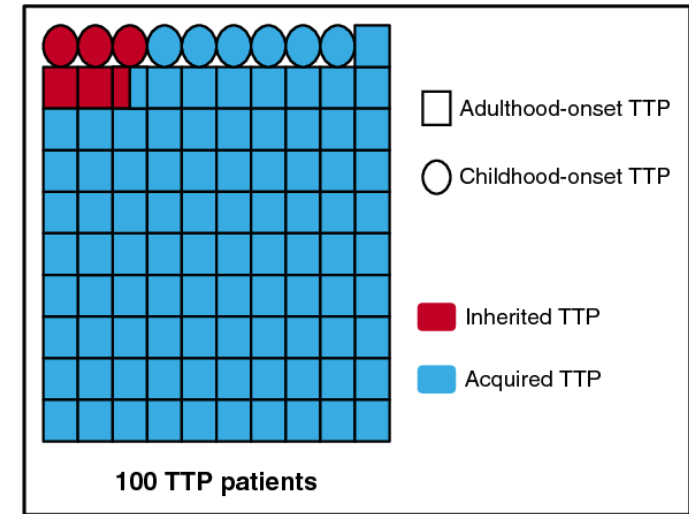
- TTP is a rare and life-threatening thrombotic microangiopathy characterized by pentad
  - microangiopathic hemolytic anemia (MAHA)
    - jaundice, tiredness, chest pain, ...
  - severe thrombocytopenia
    - superficial bleeding (hence purpura)
  - organ ischemia linked to disseminated microvascular platelet rich-thrombi
    - esp. brain!!! - seizures, altered mental status and other neurological symptoms
  - acute kidney failure/AKI
    - hemoglobinuria → ATN, Fe toxicity
  - fever
- TTP is related to a severe deficiency in ADAMTS13
  - a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13
  - ADAMTS13 is the specific von Willebrand factor-cleaving protease
  - ADAMTS13 deficiency is most frequently acquired via autoantibodies**
    - the first acute episode of TTP usually occurs during adulthood
  - but rarely, it is inherited via mutations of the ADAMTS13 gene
    - TTP begins as soon as childhood



# Pathogenesis of TPP caused by ADAMTS13 deficiency

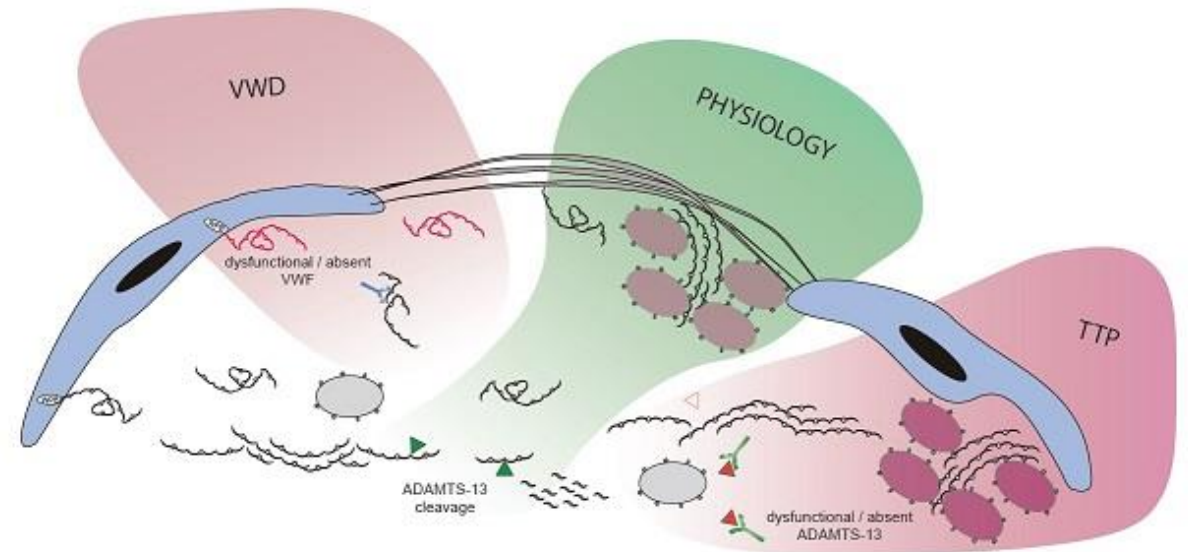


- ADAMTS13 deficiency could be primary or secondary
  - child from TPP due to hereditary defect
  - adult form due to an inhibitor
    - note atypical HUS (uremic syndrome) later
- Multimeric vWF adheres to endothelial cells or to connective tissue exposed in the vessel wall
- Platelets adhere to vWF through platelet membrane GPIb
- In flowing blood, vWF in the platelet-rich thrombus is stretched and cleaved by ADAMTS13, limiting thrombus growth
- If ADAMTS13 is absent, vWF-dependent platelet accumulation continues, eventually causing microvascular thrombosis and TTP



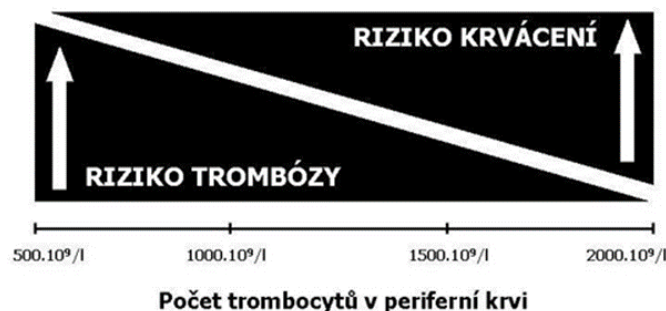
# Diseases associated With von Willebrand factor leading to thrombocytopenia/thrombasthenia

- The **vWF** has two important functions in hemostasis
  - first, it promotes the adhesion of blood platelets to the injured vessel wall and
  - secondly it functions as a carrier protein for factor VIII and protects it as a chaperone from premature inactivation
- The vWF is a glycosylated protein, that is organized in multimers
  - the size of the VWF multimers is regulated in vivo by a specific plasmatic protease **ADAMTS-13**
- von Willebrand disease & TTP
  - With a prevalence of 0.03 to 0.1% the von Willebrand disease is the most frequent bleeding disorder
  - The lack or a severe reduction of the vWF cleaving metalloprotease **ADAMTS-13** is associated with the thrombotic thrombocytopenic purpura (**TTP**)



# Trombocytóza (= trombocytémie) = ↑ trombocyty v KO

- klinicky nevýznamné do  $>750,000/\mu\text{L}$
- primární (esenciální) – vzácné
  - jedna z forem myeloproliferativních onemocnění (typicky onemocnění staršího věku)
    - esenciální trombocytémie nebo polycythaemia vera (klonální proliferace)
- sekundární (reaktivní) – běžnější
  - 100% u dětí
  - 80% u dospělých
  - příčiny
    - ↑ TPO (thrombopoetin)
      - (↑ IL-6 → TPO)
    - ↑ EPO (mimikuje efekt TPO)
      - Fe defice, krvácení, hemolytická anémie, malignita (anémie)
    - ↑ IL-6 (záněť)
      - infekce, malignita



Clonal	Reactive	Spurious
Essential thrombocythemia	Infection	Microspherocytes
Polycythemia vera	Inflammation	Neoplastic cell fragments
Primary myelofibrosis	Iron deficiency	Schistocytes
Chronic myeloid leukemia	Hyposplenism	Bacteria
	After surgery	
	Hemolysis	
	Malignancy	
	Effect of drugs	

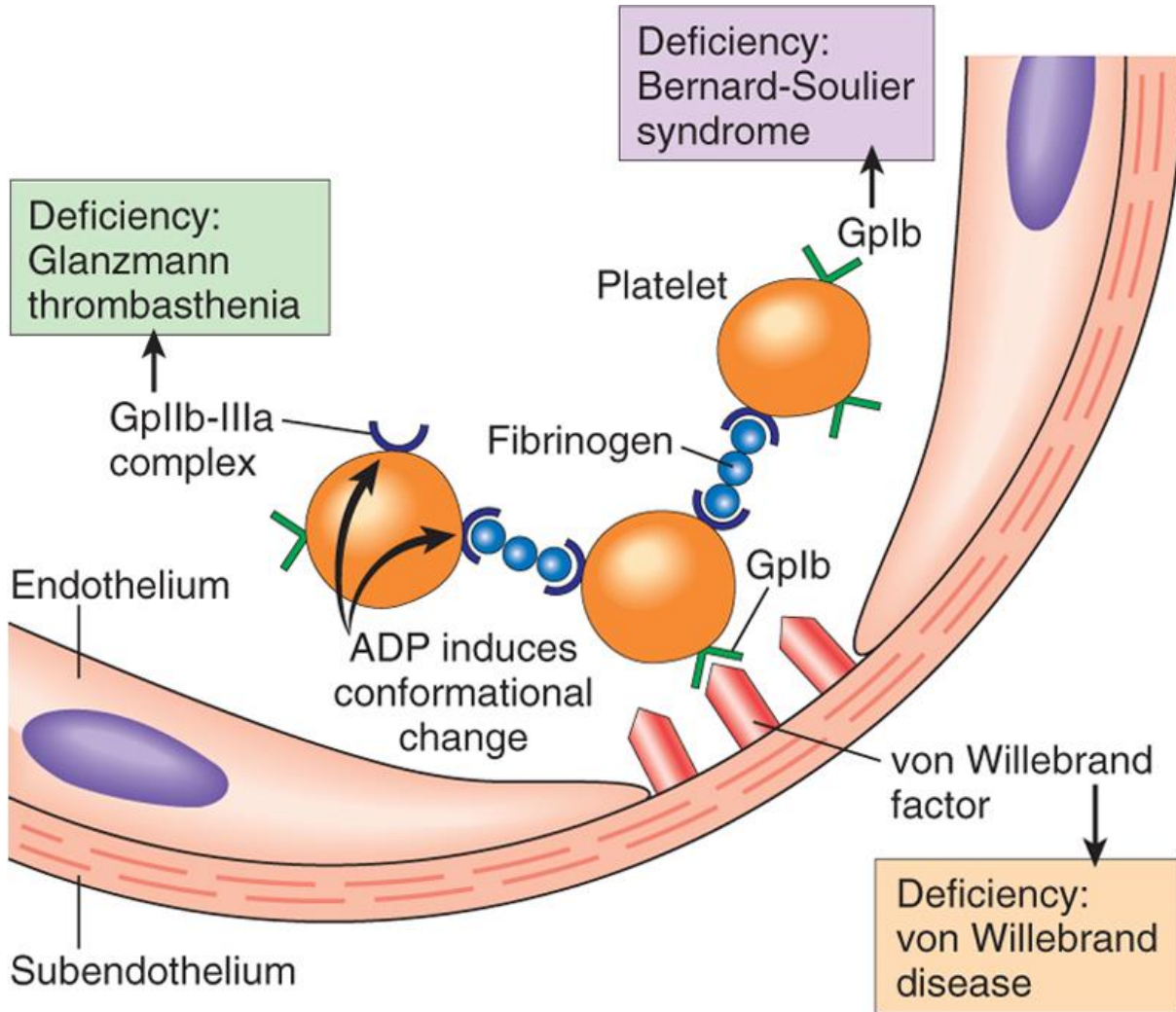
Source: adapted from Bleeker and Hogen<sup>(6)</sup>

## SYMPTOMS OF THROMBOCYTOSIS





# Thrombocytopatie = porucha funkce destiček



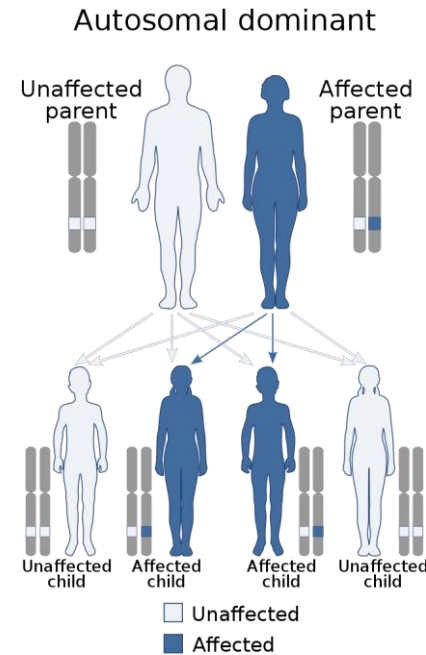
© Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e - www.studentconsult.com

- porucha adheze a agregace
  - Bernard-Soulierův syndrom
    - porucha receptoru GPIb-IX
  - Glanzmannova trombastenienie
    - porucha receptoru GPIIb-IIIa
  - von Willebrandova nemoc
    - vWf deficiency
- porucha degranulace
  - Heřmanského-Pudlákův syndrom
  - Chédiak-Higashiho syndrom

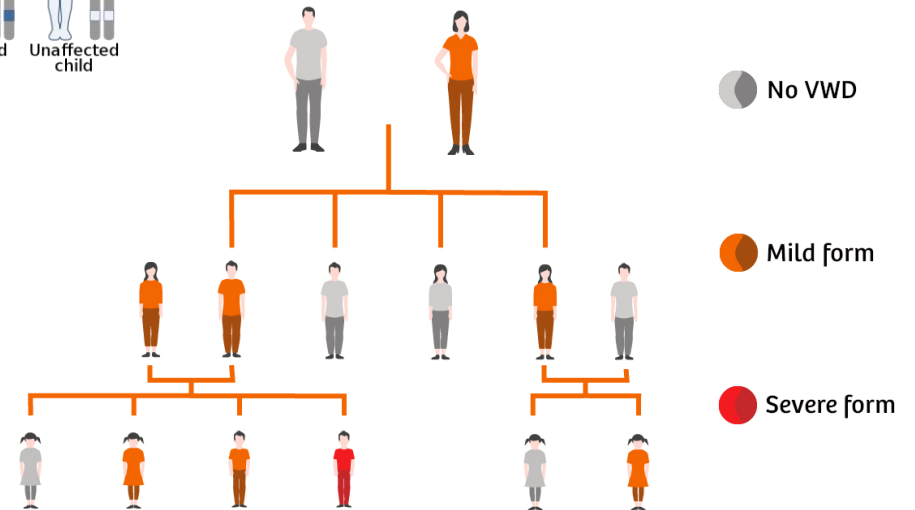


# von Willebrandova nemoc

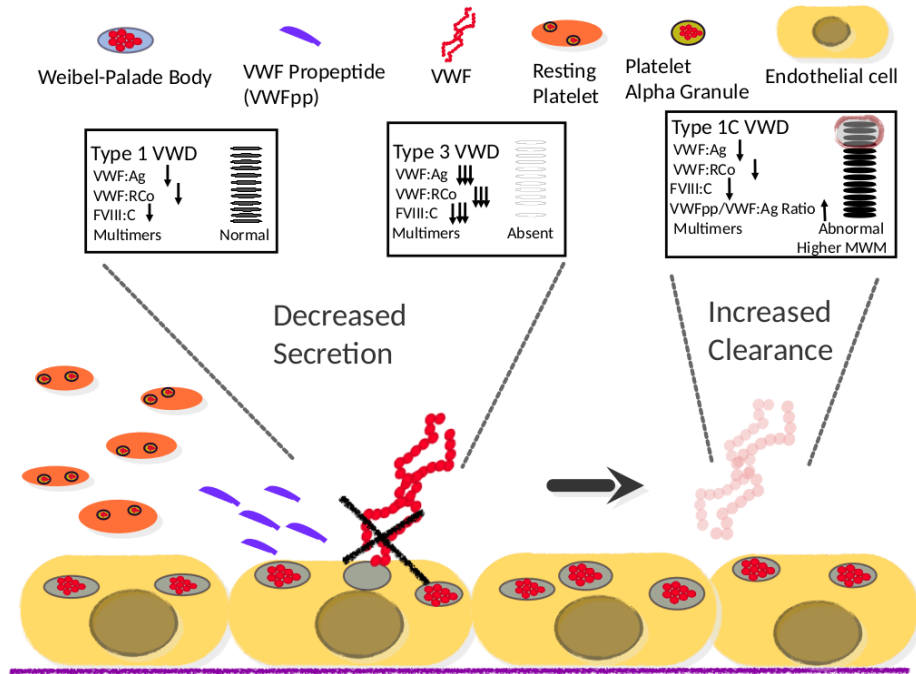
- nejčastější vrozená porucha koagulace
- skupina stavů vedoucích ke snížení hladiny vWf v plazmě a subendotelu
  - vWf je nezbytný k funkci 1-ní hemostázy - porucha adheze trombocytů
  - i 2-ní hemostázy - vWf je rovněž plazm. nosič fVIII
    - bez něho je nestabilní a rychle degradován
- gen pro vWf je na autozomu (chrom. 12)
  - vyskytuje se tudíž (na rozdíl od hemofilie) u mužů i žen
    - při AD dědičnosti vWD je 50% pravděpodobnost onemocnění (i chlapce či dívky)
- několik typů vW nemoci
  - typ 1 (~75%) – snížení koncentrace vWf (kvantitativní porucha)
    - symptomy obvykle mírné
  - typ 2 (~20%) – normální koncentrace nefunkčního vWf (kvalitativní porucha), 4 podtypy
    - porucha vazby na destičky (typ 2A)
    - porucha vazby na kolagen subendoteliální vrstvy (typ 2B)
    - porucha transportu fVIII (typ 2N)
  - typ 3 – absolutní deficit vWf (homozygoti) (těžká kvantitativní porucha)



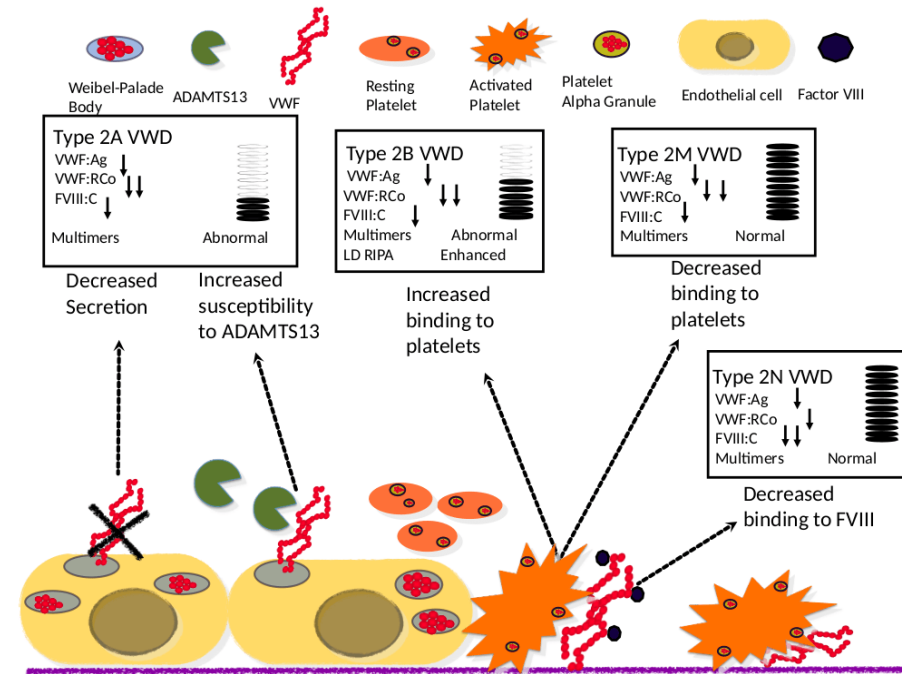
## Inheritance of VWD (von Willebrand Disease)



# Existuje mnoho subtypů vWD a proto velmi variabilní symptomatologie



Quantitative defects of von Willebrand factor, as seen in von Willebrand disease types 1 & 3. In the classic presentation, type 1 vWD sees a decrease in VWF:Ag, VWF:RCo, and FVIII:C, and multimer levels are normal. Type 3 vWD presents with the same decreases, but to a much greater degree, and multimers are absent. Types 1 & 3 both show decreased secretion. Type 1C presents similar decreases to type 1, but shows an increase in the ratio of VWFpp to VWF:Ag and an abnormally high quantity of multimers, as well as increased clearance.

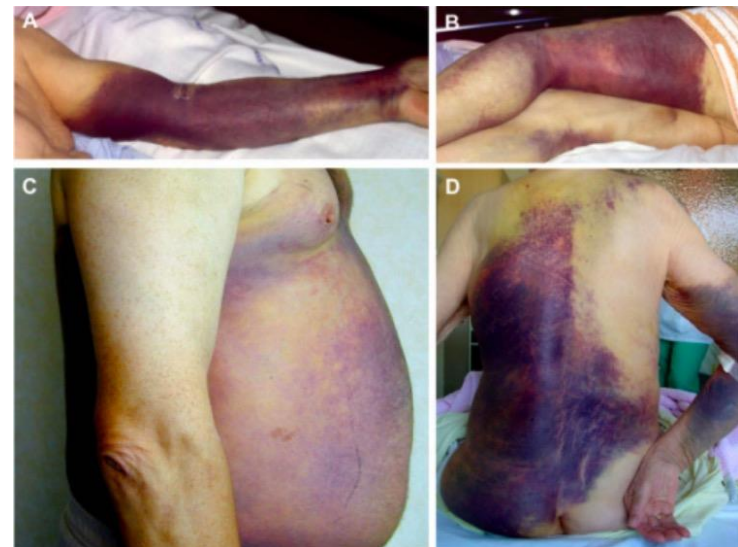


Qualitative defects of von Willebrand factor, as seen in von Willebrand disease type 2. Like types 1 & 3, all forms of type 2 vWD present with a decrease in VWF:Ag, VWF:RCo, and FVIII:C. In type 2A, there is decreased secretion of VWF and an increased susceptibility to ADAMTS13 and abnormal multimers. Type 2B presents with increased binding to platelets, abnormal multimer count, and enhanced LD RIPA. Type 2M shows decreased binding to platelets and multimer levels are normal, while type 2N presents with decreased binding to FVIII and normal multimers as well.



# Poruchy sekundární hemostázy

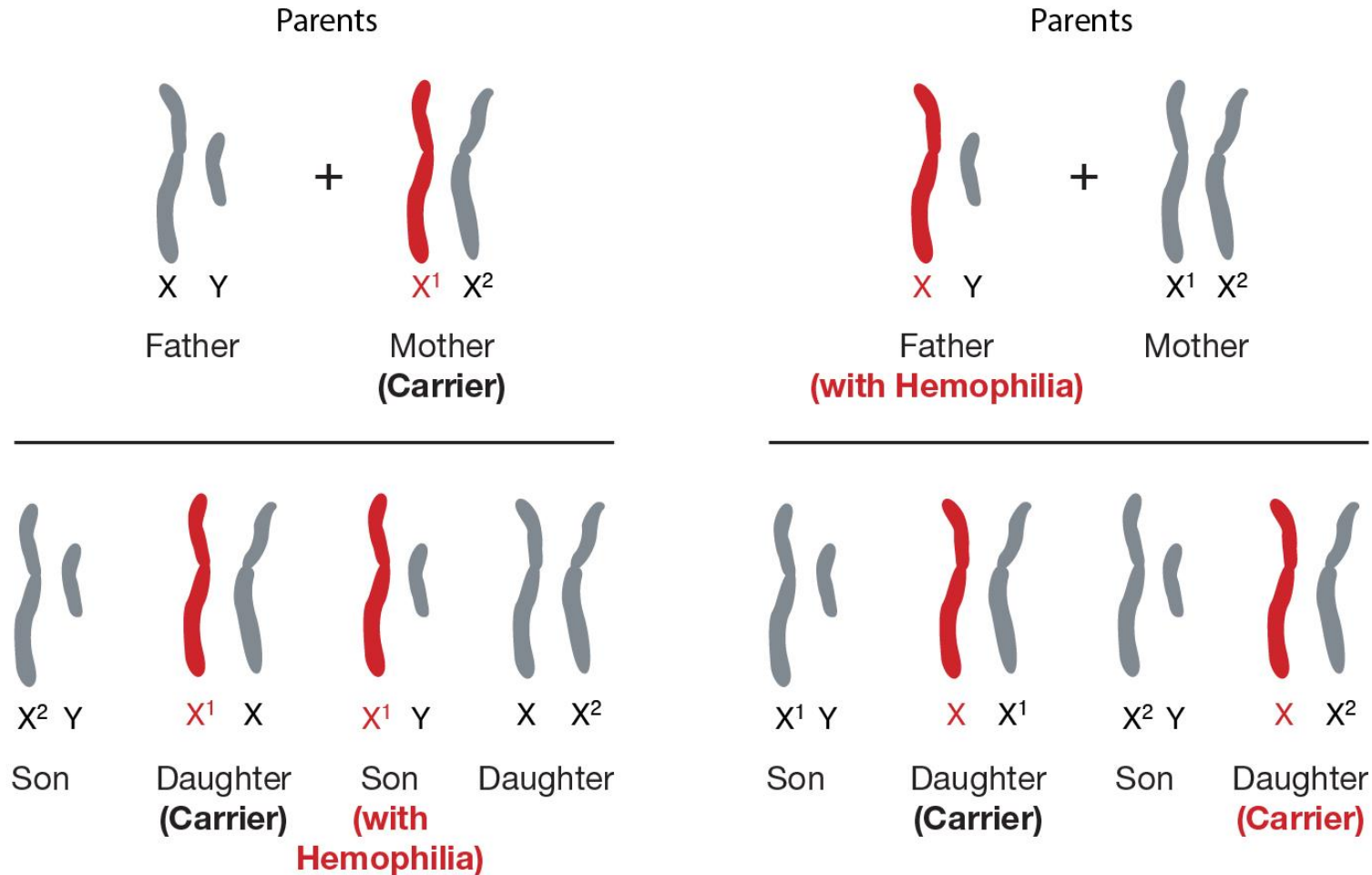
- typické krvácení do hlubších anatomických struktur/tkání, např. klouby, svaly, mozek, retroperitoneum, pleura, ...(nejsou petechie a purpury)
- **(A) vrozené poruchy**
  - **hemofilie A** (Xq-chromozom vázaná) – defekt fVIII
    - fVIII je kofaktor při aktivaci fX na fXa v reakci katalyzované fIXa (intrinsic tenase)
    - snížení koncentrace až na 25% normálu nepůsobí koagulační poruchu, snížení na 25-1% mírná forma, <1% těžká forma
    - >150 bodových mutací v fVIII genu – velká fenotypová variabilita!!!
      - případně je na vině inhibitor fVIII
    - prevalence v mužské populaci 1:5,000 až 1:10,000
  - **hemofilie B** (Xq-chromozom vázaná) – defekt fIX
    - prevalence 10x menší než hemofilie A
    - >300 bodových mutací v fIX genu (85% bodové, 3% krátké delece a 12% rozsáhlé delece)
  - defekty ostatních faktorů - RICD (recessively inherited coagulation disorders)
    - vzácné, většinou autozomálně recesivní, klinicky manifestní poruchy jen při těžkém deficitu
    - afibrinogenemie (defekt fI)
    - hemofilie C (defekt fXI) – Aškenazy Židé
    - ostatní
- **(B) získané poruchy**
  - jaterní insuficience/selhání
  - nedostatek vitamínu K (porucha resorpce tuků ve střevě)
  - DIC



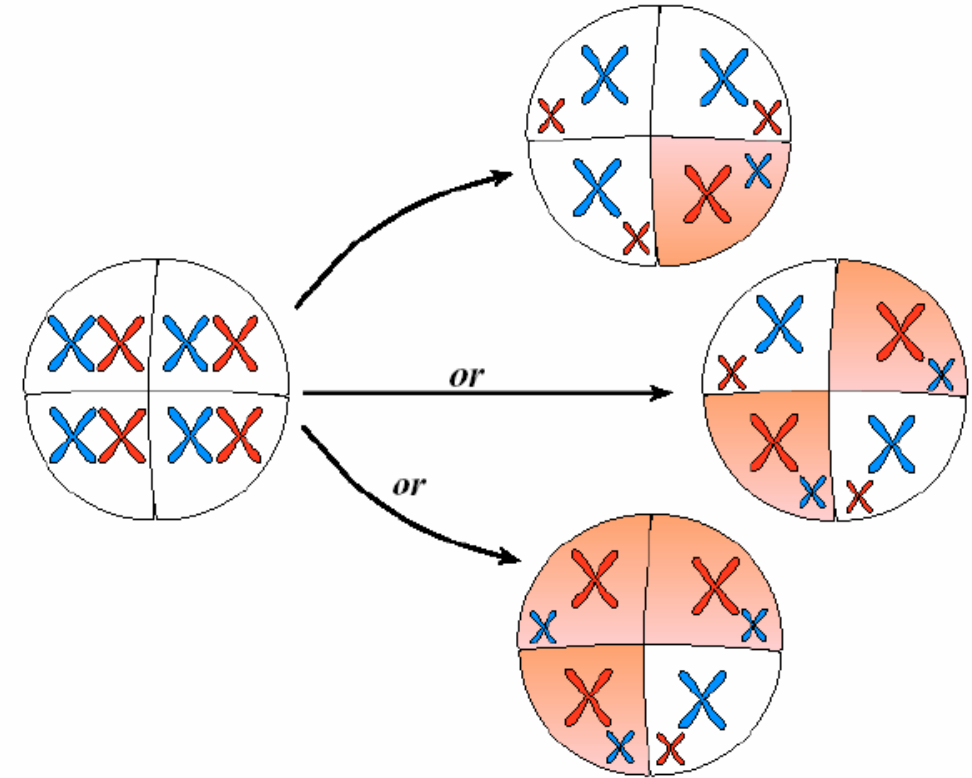


# Genetika hemofilie A ad B – X-chromosom vázané

## Hemophilia



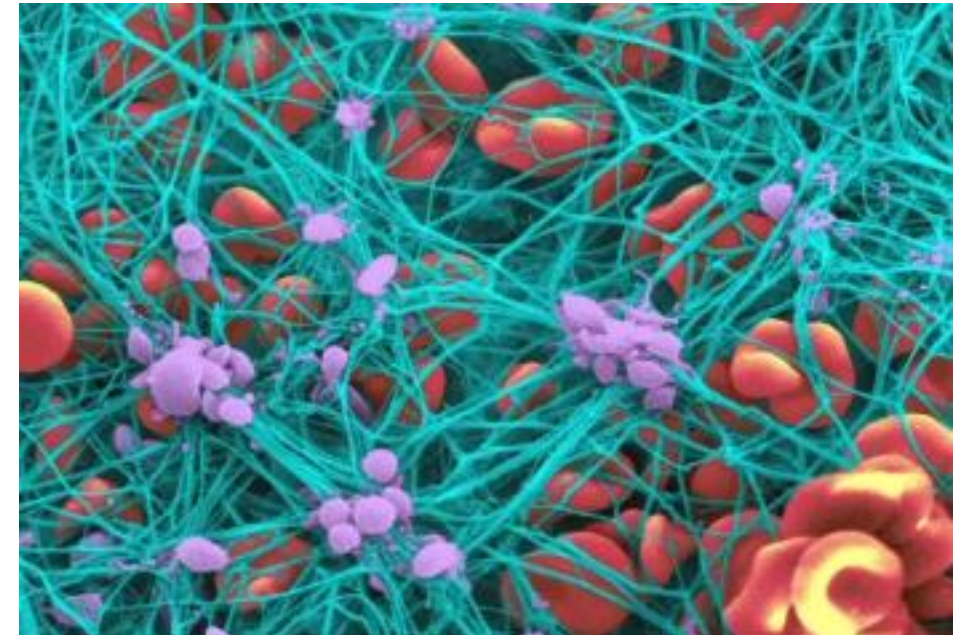
# Manifestní hemofilie u žen – rodiče nebo chromosomální mozaicismus (lyonizace)



- An early female embryo chooses, at random, to inactivate paternal X chromosomes (blue, normal) in some cells and maternal ones (red, with a hemophilia A mutation) in others. On average (middle right) half the cells retain the ability to make factor VIII normally and half do not. Occasionally, most cells retain the ability to make factor VIII (top right) or lose that ability (bottom right).

# DIC (konzumpční koagulopatie)

- zpočátku nadměrná koagulace (trombotický stav), ale posléze vyčerpání koagul. faktorů (krvácivý stav)
- koagulace při DIC je místně neohrazená a není primárně reakcí na poškození řečiště
- patogeneze
  - v cirkulaci není normálně přítomen TF!!!
    - endotel ani kr. bb. jej na svém povrchu neprodukuje
  - při některých patologických stavech se vyskytuje a aktivuje faktor VII (a následně vnější cestu kr. srážení)
    - patologické zdroje TF
      - buňky jiných tkání – např. bb. plodu při porodu, rozsáhlá poranění, rozsev nádorových bb. při operaci atd.
      - patologické kr. elementy exprimující TF – např. při myelo- a lymfoproliferačních nemocech
      - patologicky aktivované endotelie a monocyty, které začnou exprimovat TF v membráně – např. endotoxinem při sepsi
      - TF z cytoplazmy erytrocytů uvolněný při hemolýze
- důsledky
  - 1. fáze - tvorba mikrotrombů v mikrocirkulaci
    - ischemie až gangrény
  - 2. fáze - hypo- až afibrinogenemie, trombocytopenie
    - krvácení do orgánů
  - patologicky vystupňovaná fibrinolýza





I agree O-positive is rather nice,  
but my favourite by far is AB-negative...