

Megakaryopoéza a geneze destiček

M. Pecka

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky LF UK a FN a Katedra vnitřního lékařství LF UK Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Souhrn: Megakaryocyty vznikají podobně jako ostatní krvetvorné buňky z hemopoetické kmenové buňky. Proliferace a zrání v megakaryocytové řadě je stimulováno řadou faktorů. Probíhá odlišně v progenitorových a prekursorových buňkách. Zralé megakaryocyty se na konci svého vývoje přesouvají a jsou lokalizovány v těsné blízkosti stěny dřeňových sinusů. Ve výběžcích cytoplazmy megakaryocyty vznikají „prodestičky“, které se pak oddělují od mateřského megakaryocyty a vlastní destičky z nich vznikají až v cirkulaci.

Klíčová slova: trombocyty – megakaryopoéza – trombopoéza

Megakaryopoiesis and platelet genesis

Summary: Similar to other haematopoietic cells, megakaryocytes originate from haematopoietic stem cells. Proliferation and maturation of the megakaryotic cell line is stimulated by a number of factors. This process is different in progenitor and precursor cells. Towards the end of their development, mature megakaryocytes are transferred and are localized near the bone marrow sinus wall. „Proplatelets“ are formed in cytoplasmic extensions of megakaryocytes and are subsequently separated from parental megakaryocyte and transformed into platelets in the circulation.

Key words: thrombocytes – megakaryopoiesis – thrombopoiesis

Megakaryopoéza

Pod pojmy megakaryopoéza a trombopoéza si lze představit proces vývoje megakaryocyty a následnou tvorbu krevní destičky – trombocyty. Megakaryocyty vznikají podobně jako ostatní krvetvorné buňky z hemopoetické kmenové buňky (hemopoietic stem cell – HSC). Dříve byla HSC popisována jako pluripotentní kmenová buňka nebo buňka tvořící kolonie ve slezině (colony forming unit-spleen – CFU-S). Práce z poslední doby naznačují, že erytroidní a megakaryocytové prekursory jsou těsně propojeny jak na buněčné, tak i na molekulární úrovni. Megakaryocytární progenitor dává vznik megakaryocytové linii. Je charakterizován imunofenotypizačním nálezem CD34, CD31 a CD133 (zahrnuje asi 3 % z CD34 pozitivních buněk). Podle exprese HLA-DR lze odlišit dva typy progenitorů:

- méně zralý progenitor (BFU-MK), exprese HLA-DR je nízká,
- více zralý (CFU-MK), exprese HLA-DR je vysoká.

Proliferace a zrání v megakaryocytové řadě je stimulováno řadou fak-

torů. Probíhá odlišně v progenitorových a prekursorových buňkách. U progenitorových buněk a u megakaryoblastu se nachází normální vývoj a dělení buněk (proliferací impuls → mitóza → diferenciaci a maturaci). Ve vývojové fázi mezi megakaryoblastem a megakaryocytem dochází k zastavení cytokineze a ke změně v průběhu mitózy (proliferací impuls → endoreplikace → amplifikace). **Endoreplikace** je proces, při kterém během mitózy dochází k normálnímu rozdělení chromozomů a formování 2 jader. Ve fázi rozdělení jádra však neproběhne normální cytokineze. Endoreplikace spočívá v odchýlném procesu buněčného cyklu, kdy proběhnou normálně fáze G1, S i G2, resp. i začátek mitózy, tj. profáze a metafáze a nakonec i první část anafáze (tzv. anafáze A), která je charakterizována oddělením sesterských chromatid a pohybem chromozomů k pólům [1]. Následná část anafáze (tzv. anafáze B) probíhá odlišně – nenásleduje po ní normální rozdělení jaderného chromatinu do 2 separátních jader. Dochází k procesu tzv. **retrocytokineze**, při kterém nedo-

jde k oddělení jader, mikrotubuly vrátí jádra zpět – buňka se nerozdělí. Vlastní příčina této změny spočívá pravděpodobně v aparátu, který řídí mitózu. Na konci procesu se v megakaryocyty nachází jen jedno jádro s jednou jadernou membránou.

Opakovanou retrocytokinezí dochází k hromadění jaderného chromatinu v buňce, tzv. polyploidii. Polyploidie bývá spojována s termínem **endomitóza** – podobně jako u mitózy dochází při ní k rozdělení chromozomů a k oddělení sesterských chromatid (např. vznik dvoujaderných buněk u myelomu). Vřeténka u polyploidie jsou mnohápólová s počtem vláken odpovídajícím aktuální ploidii [1]. Vřeténka zůstanou krátká – nedojde k jejich prodloužení jako u normální mitózy. Jádra převážně většiny normálních polyploidních megakaryocytů tvoří nepravidelné laloky spojené chromatinovými vlákny. Jádro je tedy mnoholaločné – každý lalok odpovídá jednotlivým částem mnohápólového vřeténka. Jejich počet odráží počet ploidii [2].

Předpokládá se, že polyploidizace by mohla být vyvolána de-

fektem abnormální depolymerace submikroskopických struktur nebo defektem kontraktilních sil souvisejících s aktin/myozinovým komplexem. Výhody polyploidie nejsou dnes známy, možná jde o proces, kterým se zvýší syntéza proteinů a modifikuje se exprese genu. Proces polyploidizace je pravděpodobně geneticky zabudován do diferenciačního programu megakaryocyty [2]. Stupeň ploidity je totiž v přímé korelaci s množstvím genetického materiálu (DNA) v megakaryocyty a se schopností megakaryocyty produkovat prorodestičky [3].

Buněčný cyklus je během ploidizace složen z fází G1-S-G2, M fáze však není úplná. Po neukončené M fázi přejde megakaryocyt do G1 fáze – další zdvojení DNA – a tento děj se cyklicky opakuje. Duplikace DNA může být v megakaryocyty ukončena kdykoli mezi 2N (tedy normální diploidní buňka) a 64N, případně i 128N. Lidské megakaryocyty dosahují průměrné ploidie 16 N – asi 50 % megakaryocytů. V průběhu tohoto procesu se navyšuje syntéza proteinů důležitých pro tvorbu a funkci krevních destiček. Procesy maturace charakterizované vývojem specifických organel jsou zahájeny až poté, co je amplifikace ukončena [4].

Průměr megakaryocytů při ploidii 2N je $21 \pm 4 \mu\text{m}$ ve srovnání s $56 \pm 8 \mu\text{m}$ u polyploidie 64N. Tím se navýší 81násobně objem megakaryocytů a teoreticky i počet produkovaných destiček [3]. Za ploidii je odpovědný hlavně trombopoetin, který ji vyvolá v pozdní megakaryopoéze.

Zvýšená produkce DNA je využívána k syntéze proteinů a lipidů důležitých pro tvorbu a funkci krevních destiček, které zvětšují objem buňky. V krevních destičkách se pak vytváří specifická granula, cytoskeletární proteiny a rozsáhlé vnitřní membránové systémy, které poskytují membránové struktury vznikajícím protodestičkám.

První prekurzorovou, tedy morfologicky rozlišitelnou buňkou této řady je **megakaryoblast**. Je to buňka nejvýše diploidní o průměru 20–30 μm . Je

o něco větší než myeloblast s nukleocytoplazmatickým poměrem (N/C) 10 : 1. Jádro je kulaté, často i oválné, někdy ledvinovité s více jadérky. Je uloženo centrálně a vyplňuje větší část buňky. Chromatin jádra je jemný, bez charakteristického uspořádání. Cytoplazma tvoří úzký lem kolem jádra, je středně bazofilní (tmavší než u myeloblastu) a neobsahuje již granula. V megakaryocytové vývojové řadě je zastoupen 0–5 %, ve všech jaderných buňkách kostní dřeně méně než 0,1 %.

Dalším vývojovým stadiem je **megakaryocyt** (promegakaryocyt se v současné době nepokládá za vývojové stadium megakaryocytové řady). Z morfologického hlediska lze rozlišit tři stadia zralosti megakaryocytů [5]. Jejich průměry se pohybují v rozmezí 30–80 μm , případně i více, podle stupně jejich zralosti. Megakaryocyty skupiny I mají silně bazofilní cytoplazmu a vysoký nukleo-cytoplazmatický poměr. V této skupině jsou nejvíce zastoupeny tetraploidní megakaryocyty. Skupinu II reprezentují megakaryocyty s nižším N/C poměrem, cytoplazma je méně bazofilní s méně výraznou azurofilní ganulací spíše difuzního charakteru. Megakaryocyty zařazené do skupiny III mají poměrně objemnou mírně bazofilní cytoplazmu s bohatou azurofilní ganulací. Granula chybí v okrajových partiích megakaryocyty. Do skupiny III jsou zařazovány megakaryocyty, u kterých je proces ploidizace již ukončen a zahajuje se proces vývoje protodestiček. V této skupině jsou nejvíce zastoupeny megakaryocyty s ploidii 32N. Megakaryocyty s ploidii 8N a 16N jsou nepravidelně zastoupeny ve všech 3 skupinách.

Megakaryocyty se za normálních okolností nenachází v obvodové krvi, ale pouze v kostní dřeně. U některých nemocí (chronická myeloidní leukemie, polycythaemia vera, myelofibróza aj.) se mohou i v periferní krvi nacházet fragmenty megakaryocytů. Převahu méně zralých forem megakaryocytů nacházíme u některých vrozených

trombocytopenií. U nemocných s perniciózní anémií a u některých dalších megaloblastových anémií se nachází hypersegmentované formy megakaryocytů. Zvýšený počet megakaryocytů se zjišťuje u některých idiopatických trombocytopenií, snížení až úplné vymizení megakaryocytů u aplazií kostní dřeně [6].

Trombopoéza

Zralý megakaryocyt produkuje krevní destičky fragmentací cytoplazmy pomocí dynamicky regulovaného procesu nazývaného **formace protodestiček**. Pouze megakaryocyty s ploidii vyšší než 8N jsou schopné tvořit protodestičky. Protodestičky v cytoplasmě megakaryocytů tvoří podlouhlá tubulární uskupení, na jejichž koncových částech vznikají zárodky trombocytů [7].

Cytoplazma megakaryocytů začíná vyzávat současně se zvyšováním jejich ploidie, stává se objemnější a zvyšuje se v ní počet granul – tvoří se specifická granula. Dochází k výrazné produkci membránových systémů. Vznikají mikrotubulární svazky, jež se následně přesouvají k cytoplazmatické membráně, která vytváří pseudopodie. Ve výběžcích cytoplazmy megakaryocytů vznikají protodestičky [8]. Proces jejich formování a prodlužování trvá 4–10 hod – vznikají tenká rozvětvení s průměry kolem 2–4 μm . V těchto větvích se tvoří zárodečná centra destiček, do kterých se ke konci procesu dostávají granula a organely. Protodestičky obsahují 50–200 mikrotubulů, které pochází z mikrotubulů tvořených matečními megakaryocyty v kostní dřeně. Mikrotubuly vytváří protodestičkové svazky, které mívají 4 a více sekcí, z nichž každá je složena z 10 či více mikrotubulů.

Zatímco mikrotubuly slouží k prodlužování protodestiček, tak na aktinu závislé procesy vedou k jejich rozdvíjení a větvení [9]. Polymerace a depolymerace tubulinu je vlastně hnacím motorem prodlužování protodestičkových seskupení, která zasahují až do sinusoid kostní dřeně. Cytoplazmatické

proteiny (dynein a kinesin) umožňují vzájemné klouzání jednotlivých vrstev mikrotubulů v protodestičkách. Mikrotubuly v permeabilizovaných protodestičkách vedou následně k jejich prodlužování. Cytoplazmatické proteiny (dynein a kinesin) dále umožňují pomalý pohyb granulí a organel ($0,1 \mu\text{m}/\text{min}$) a ty následují rodící se protodestičky. Granula a organely se postupně posouvají v protodestičkách až k jejich konci, kde vstupují do pupenů rodící se destičky a zde končí svoji cestu.

V místech ohraničených mikrotubuly s nahromaděnými granulemi se začne vytvářet membránový skelet, který vymezí základní strukturu primitivních destiček. Ve fázi svého konečného vývoje mají protodestičky vzhled podlouhlých objektů cylindrického, bipolárního nebo vřetenovitého tvaru. Protodestička se nakonec oddělí od megakaryocyty, uzavře se, dojde k překřížení tubulárních systémů a tvorba destiček začne probíhat na obou jejích koncích. Mikrotubuly se začnou přeskupovat a vytváří cibulovitou strukturu typickou pro krevní destičku [10].

Zralé megakaryocyty se přesouvají a jsou lokalizovány v těsné blízkosti stěny dřeňových sinusů. Ve výběžcích cytoplazmy megakaryocyty vznikají „prodestičky“, ty se větví a prodlužují a zasahují do vlastního sinusu. Velké protodestičky se pak oddělují od mateřského megakaryocyty a vlastní destičky z nich vznikají až v cirkulaci [7]. Proces uvolňování destiček musí probíhat v krevní cirkulaci, jinak by došlo k jejich zadržení v kostní dřeni. Podobně dochází i k uvolňování destiček z malého počtu megakaryocytů v plících. Polyploidní megakaryocyty (od ploidie 8N) mohou tvořit protodestičky. Zralý megakaryocyt může gene-

rovat až 2 000–4 000 krevních destiček. Víceploidní megakaryocyty tvoří více a větší destičky. Více destiček produkují větší megakaryocyty [11]. K uvolnění destiček dochází dvěma způsoby, buď tvorbou pseudopodií a následným odštěpováním cytoplazmy (proces popsal již v roce 1906 Wright) nebo přímým rozpadem (fragmentací) cytoplazmy megakaryocytů [12]. Proces uvolnění destiček ze zralého megakaryocyty trvá přibližně 5 hod. Po úplném rozpadu cytoplazmy jsou v nátěru vidět jen **holá jádra megakaryocytů** s úzkým srpkem cytoplazmy. Jádra jsou pak fagocytována makrofágy kostní dřene [13]. Denně se v organismu zdravého dospělého jedince vytvoří kolem $1,5\text{--}1,8 \times 10^{11}$ krevních destiček.

Regulace megakaryopoézy je humorální, podílí se na ní jak trombopoetin (TPO), tak i několik dalších endogenních faktorů. Regulace je zprostředkována 2 typy transkripčních faktorů, jak těmi, které regulují diferenciační proces, jako je GATA-1, tak i těmi, co regulují formaci prodestiček, jako je NF-E2. TPO je pravděpodobně hlavním humorálním regulátorem diferenciace megakaryocytů a produkce krevních destiček. Na progenitoru megakaryocytové vývojové řady působí prostřednictvím svého receptoru MPL [14]. Aktivace trombopoézy probíhá v několika stupních. Nejprve dochází k proliferaci prekurzorů, následně k ploidizaci megakaryocytů a v konečné fázi po zastavení ploidizace k vyhrávání a tvorbě krevních destiček. Stimulem k tvorbě trombocytů je zřejmě pokles jejich celkového počtu [15]. Celý proces megakaryopoézy s následným uvolněním destiček trvá kolem 8–10 dní.

Literatura

1. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 2002; 99: 888–897.
2. Chang Y, Bluteau D, Debili N et al. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): 318–327.
3. Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): 18–23.
4. Roy L, Coullin P, Virat N et al. Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood* 2001; 97: 2238–2247.
5. Bessis M. Blood smears reinterpreted (transl. Brechner G). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1977: 129–144.
6. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Bone marrow pathology. 4th ed. Wiley-Blackwell 2010: 20–26.
7. Hartwig J, Italiano J JR. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1/3: 1580–1586.
8. Schwer H, Lecine P, Tiwari S et al. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of mammalian blood platelets. *Curr Biol* 2001; 11: 579–586.
9. Barkalow K, Italiano JE jr, Matsuoka Y et al. Alfa-Adducin dissociated from F-actin filaments and spectrin during platelet activation. *J Cell Biol* 2003; 161: 557–570.
10. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet repase. *Blood* 1980; 56: 996–999.
11. Buliková A, Kíssová J, Antořová M et al. Dysplastické změny megakaryopoézy podle WHO klasifikace 2008. *Vnitř Lék* 2010; 56 (Suppl 1): 531–538.
12. Yamanaka M. Blood platelets. Kobe: Sysmex corporation 2000.
13. Li J, Kuter DJ. The end is a just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 2001; 74: 365–374.
14. Chen J, Hecceg-Harjacek L, Groopman JE et al. Regulation of platelet activation in vitro by c-Mpl ligand, trombopoietin. *Blood* 1995; 86: 4054–4062.
15. Yang C, Li YC, Kuter DJ. The physiological response of trombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat. *Br J Haematol* 1999; 105: 478–485.

doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.

www.fnhk.cz

e-mail: pecka@fnhk.cz

Doručeno do redakce: 15. 5. 2012