

HOMEOSTÁZA

Dokonalá rovnováha několika systémů:

- endotel cévní stěny
- kolagen ležící pod endotelem
- tonus cév
- počet a kvalita krevních destiček
- srážlivé a fibrinolytické systémy
- charakter proudění v cévě

brání jak *krvácení*, tak *intravaskulárnímu srážení* krve

HEMOSTÁZA (zástava krvácení)

= soubor mechanismů, které na jedné straně brání vzniku krvácení, na straně druhé staví krvácení již vzniklé

- Reakce cév v místě poranění
- Reakce tkáně v místě poranění – zvýšený tlak tkáně
- Činnost krevních destiček
- Srážení krve

REAKCE CÉV

Vasokonstrikce.

Stupeň vasokonstrikce závisí na stupni poškození cévy.

Serotonin a tromboxan A_2 z destičkových granul.

Adrenalin.

Trombin – stimulace endotelu a sekrece endotelinu-1.

Funkce destiček

- Ochrana organismu před ztrátou krve
- Udržování integrity cévní stěny a hojení poranění cév (destičkový růstový faktor z α -granul)
- Zánětlivé reakce, změny permeability kapilár, odstraňování cizorodých látek, virů, bakterií, odvržení transplantátu...
- Nosič pro různé látky absorbované na povrch destiček

KREVŇÍ DESTIČKY (TROMBOCYTY)

Bezjaderné, bezbarvé, granulované, nejmenší formované elementy krevní.

Vznik: megakaryocyty kostní dřeně pod vlivem kolonie stimulujících faktorů – interleukinů (*IL-1, IL-3, IL-6*) a granulocyty a makrofágy stimulujícího faktoru (*GM-CSF*)

Počet: 200 000 – 500 000 v ml, z toho třetina ve slezině a dvě třetiny v cirkulaci

Žádné věkové ani pohlavní rozdíly v počtu.

Trombocytoza – po splenektomii.

Velikost: 2 – 4 μm průměr, 0,5 – 1 μm tloušťka, 4 – 8 fl
objem

Tvar: hladké, okrouhlé disky

Tvar udržován cytoskeletem - prstenec mikrotubulů kolem periferie, silně invaginovaná membrána, kanalikulární systém spojený s extracelulárním prostorem.

Membrána: obsahuje receptory pro přilnutí na vhodné povrchy, např. kolagen, von Willebrandův faktor, fibrinogen

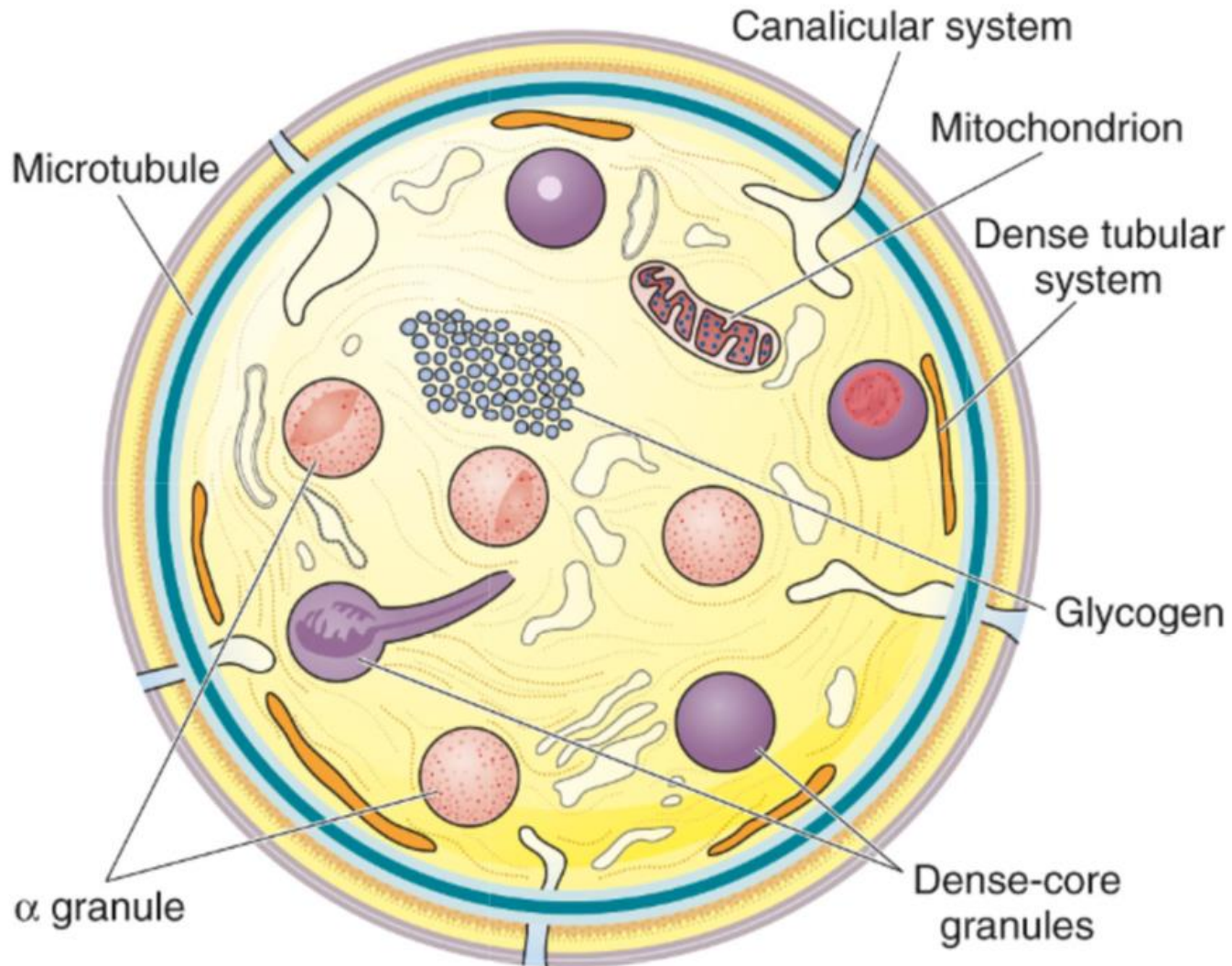
Cytoplasma: obsahuje aktin, myosin, glykogen, lysozomy a

Granula:

denzní granula (neproteinové substance – serotonin, ADP, adenonukleotidy) a *α granula* (proteinový obsah: faktory srážení, destičkový růstový faktor – PDGF)

Glykokalyx: 10 – 50 nm, směs bílkovin a mukopolysacharidů (faktory systému srážení, ionty, AMK, histamin, léky...)

Stavba trombocytů

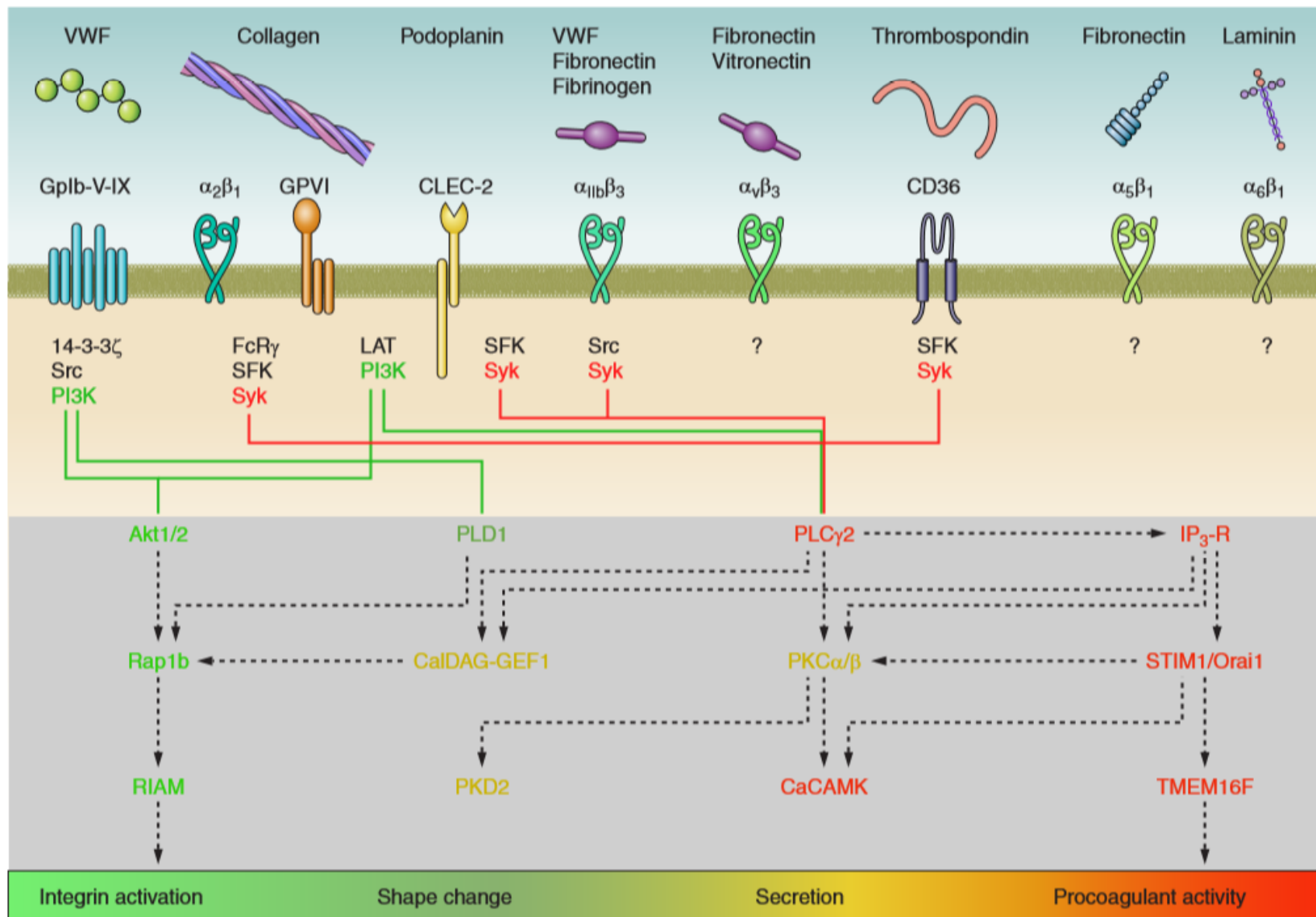


ZÁSTAVA KRVÁCENÍ I. – bílý trombus

Adheze

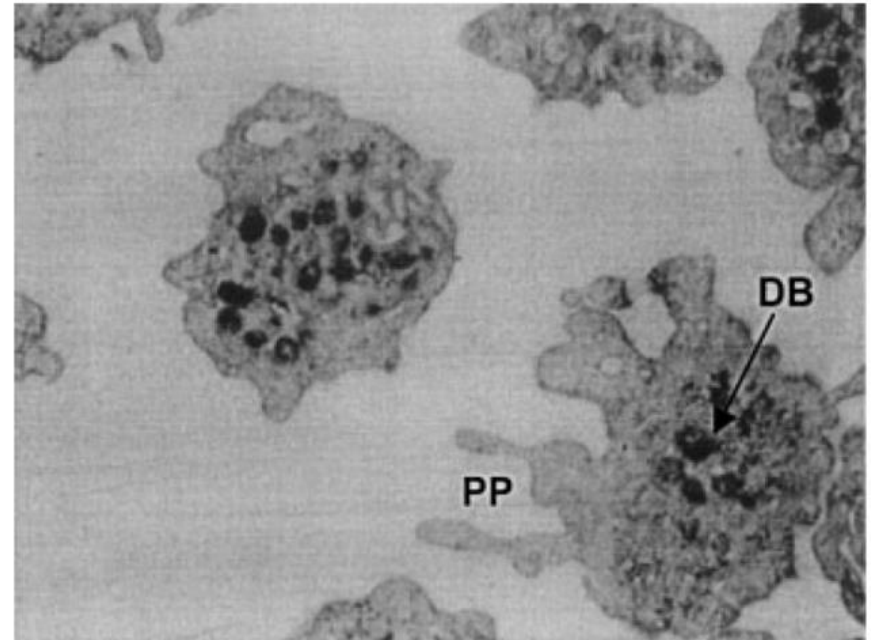
- Negativní náboj na povrchu trombocytů a endotelu (proteoglykany, heparan sulfát)
- Obnažení cévní stěny – kolagen a proteiny extracelulární matrix
- Receptory pro kolagen a další na trombocytu (integriny)
- von Willebrandův faktor (endotel, megakaryocyty, trombocyty) a jeho sekrece pod vlivem cytokinů a hypoxie - vazba na GP Ib/Ia
- Kolagen – Gp Ia/Iia
- Fibronektin, laminin – Gp Ic/Iia

Ligandy a receptory zapojené do adheze trombocytů



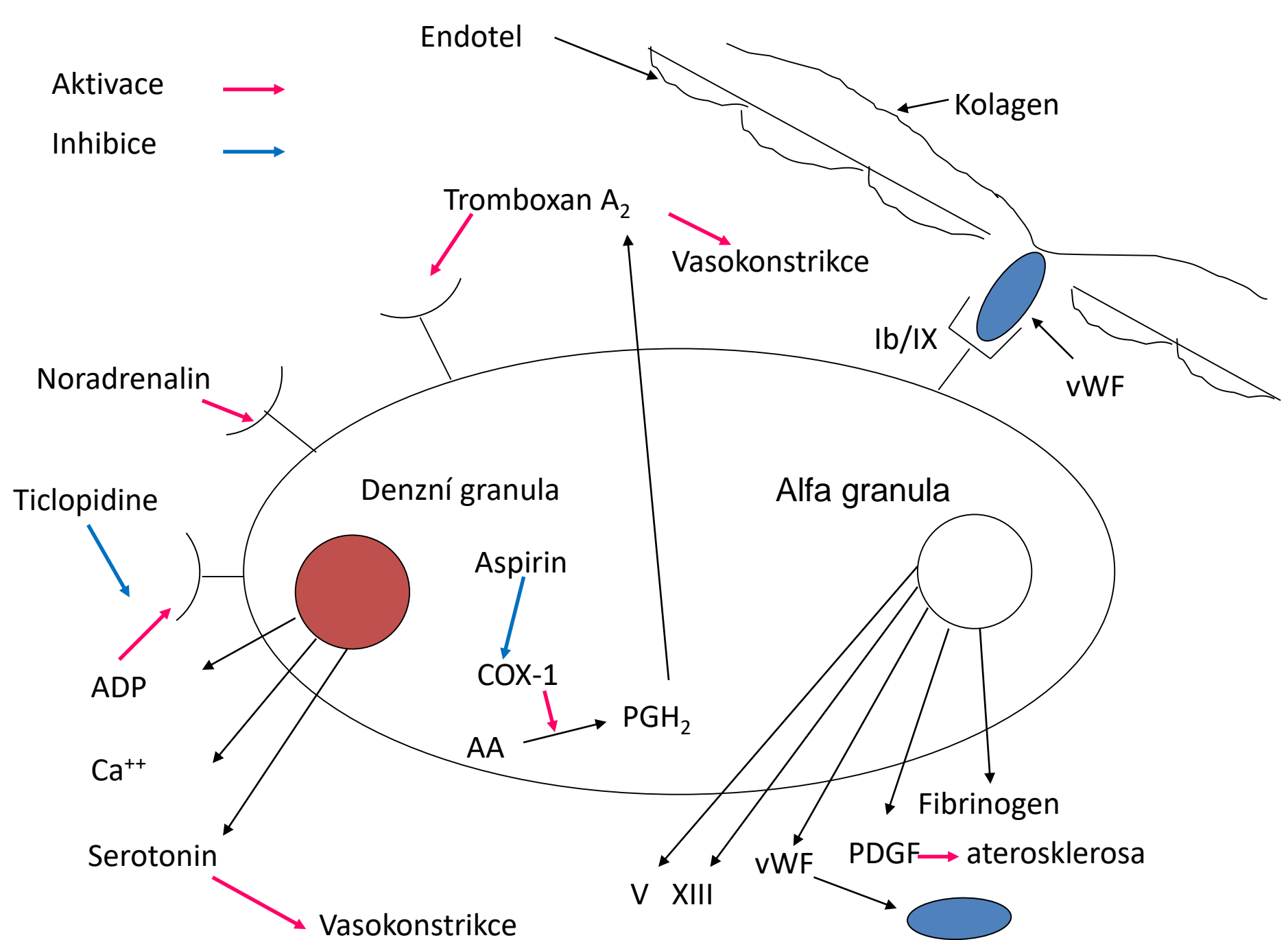
Aktivace a změna tvaru, degranulace

- Vazba ligandů (kolagen, ADP, trombin) na příslušné receptory
- Inicivace signálních kaskád a buněčné odpovědi – aktivace trombocytů
- Následná degranulace trombocytů (exocytóza)
 - Denzní granula - ATP, ADP, serotonin, Ca^{2+}
 - α granula – vWF, faktor V, fibrinogen
- Aktivace COX a uvolnění tromboxanu A_2
- Změny cytoskeletu a tvaru trombocytů



A

B



Agregace

- Amplifikace odpovědi po vazbě ligandů – nábor dalších trombocytů
- ADP (P2Y₁₂ receptory), serotonin, tromboxan A₂
- Uvolněný vWF se váže na příslušné receptory – nábor dalších trombocytů a „vazba“ mezi trombocyty
- Konformační změna receptoru Gp IIb/IIIa – vazba **fibrinogenu**
- Formace trombu
- Závěrečná fáze - obnažení a uvolnění fosfolipidů (serotonin, TXA₂) a za přítomnosti vápenatých iontů (uvolněných z trombocytů) dochází k *aktivaci* koagulační kaskády

Inhibice 

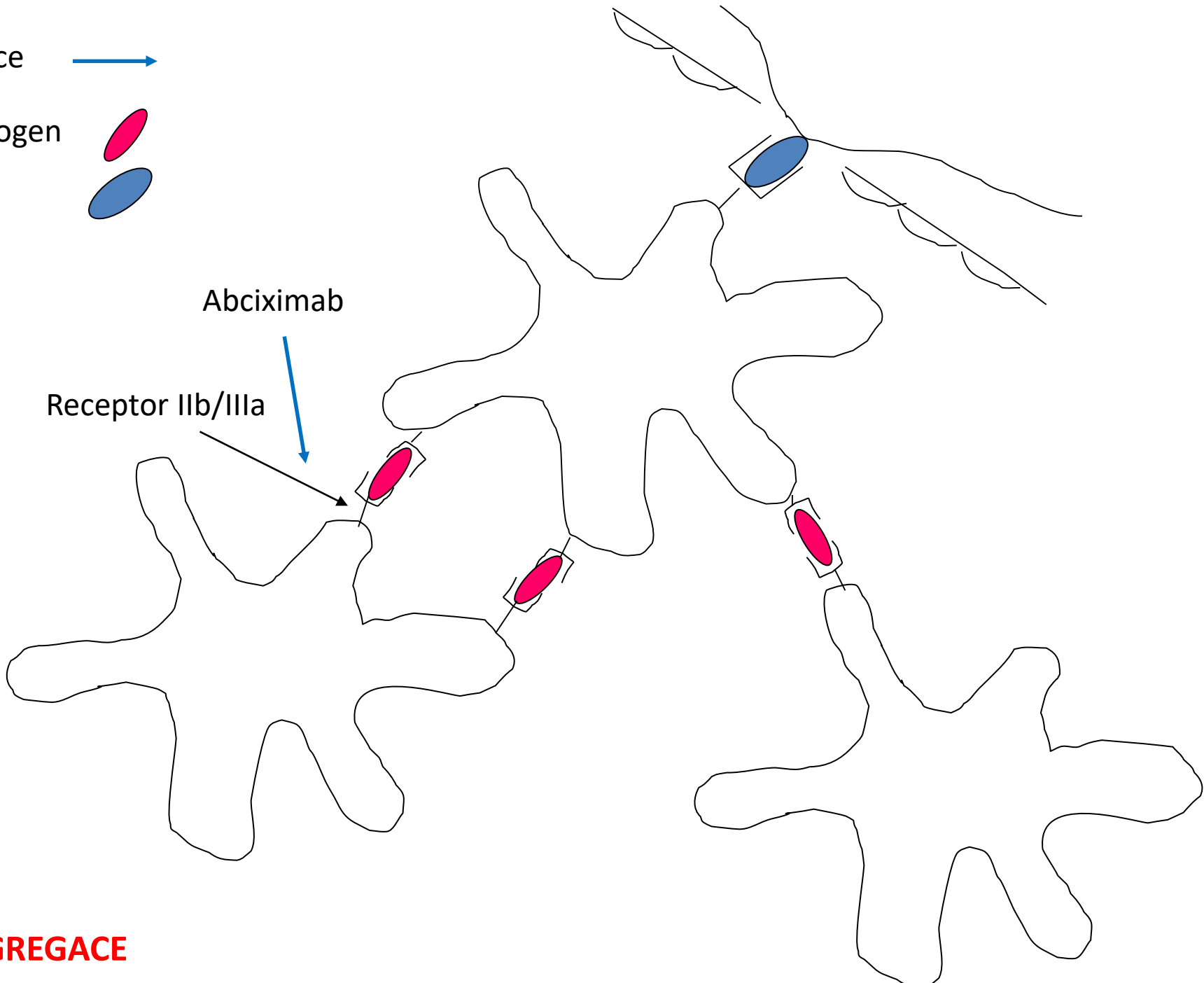
Fibrinogen 

vWF 

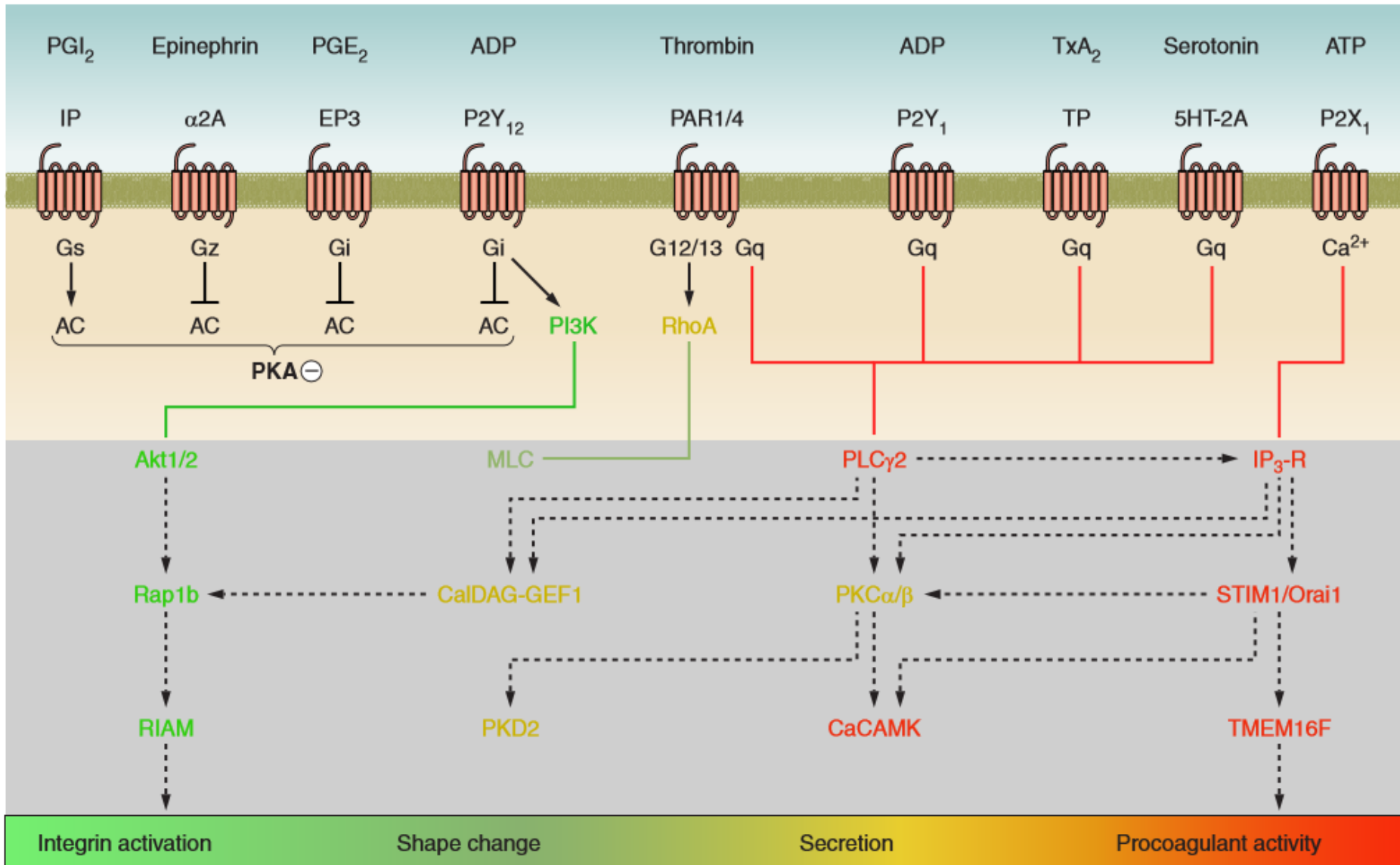
Abciximab 

Receptor IIb/IIIa 

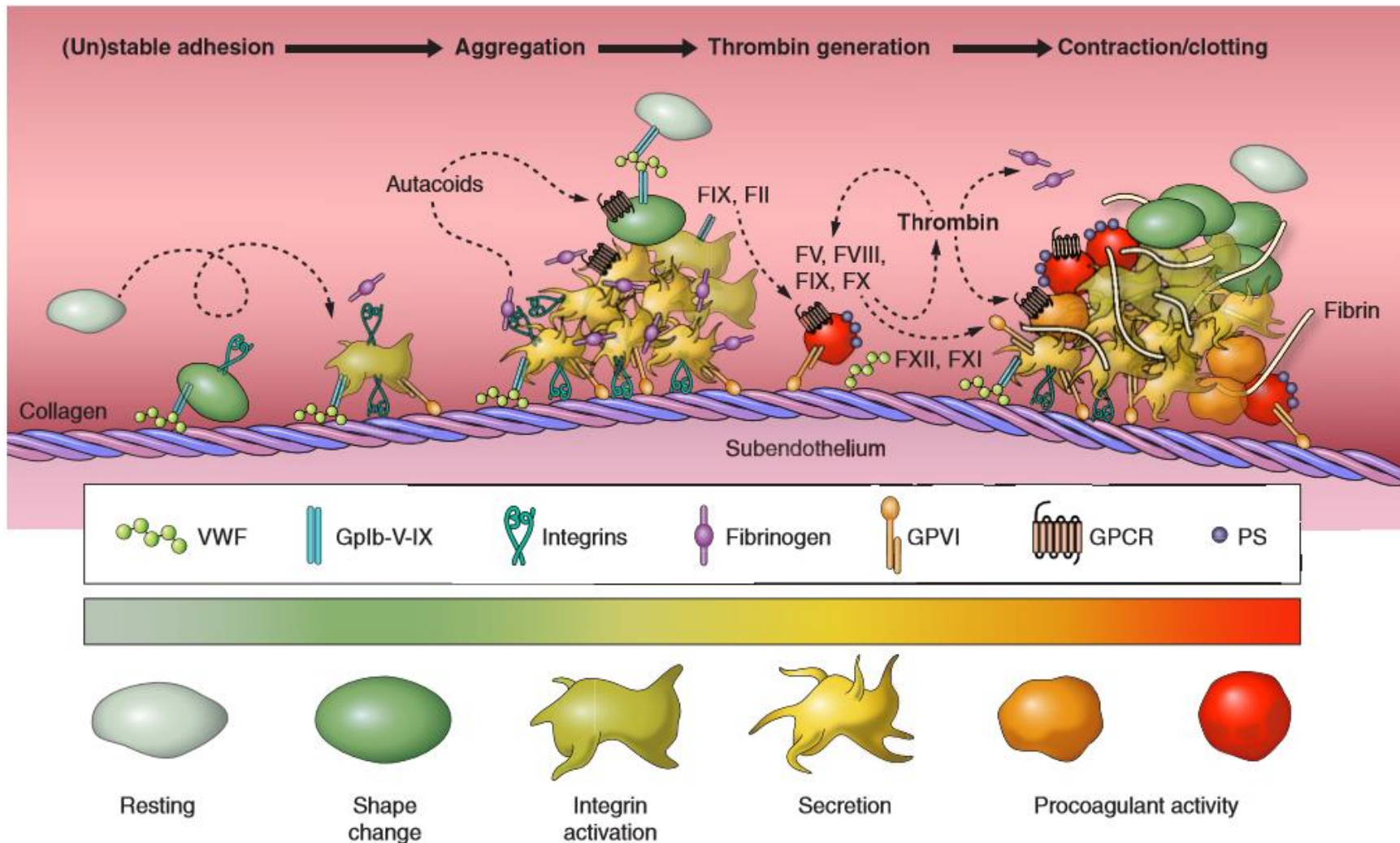
AGREGACE



Ligandy a receptory trombocytů spřažené s G prot.



ZÁSTAVA KRVÁCENÍ I. – bílý trombus – přehled a návaznosti



ZÁSTAVA KRVÁCENÍ II. – červený trombus

V klasickém pojetí se tvorba červeného trombu sestává ze dvou systémů - **Vnitřní** systém – **vnější** systém aktivace faktoru X.

Vnitřní – kontakt krve s negativně nabitým povrchem – **povrch trombocytů**

Vnější – kontakt s *poškozenými* buněčnými membránami – **membránově vázaný tkáňový faktor**

Následuje aktivace faktorů – kaskáda dějů – často zymogeny, aktivované faktory – serinové proteázy = **kontrolovaná proteolýza**

Finálními kroky jsou aktivace společného systému, vznik trombinu a polymerního fibrinu.

Protrombin (faktor X) – trombin

- sled enzymových reakcí
- anionické fosfolipidy (membrány trombocytů), vápenaté ionty

Fibrinogen – fibrin monomer – fibrin polymer (stabilizace, faktor III, Ca^{2+}).

Prokoagulační faktory

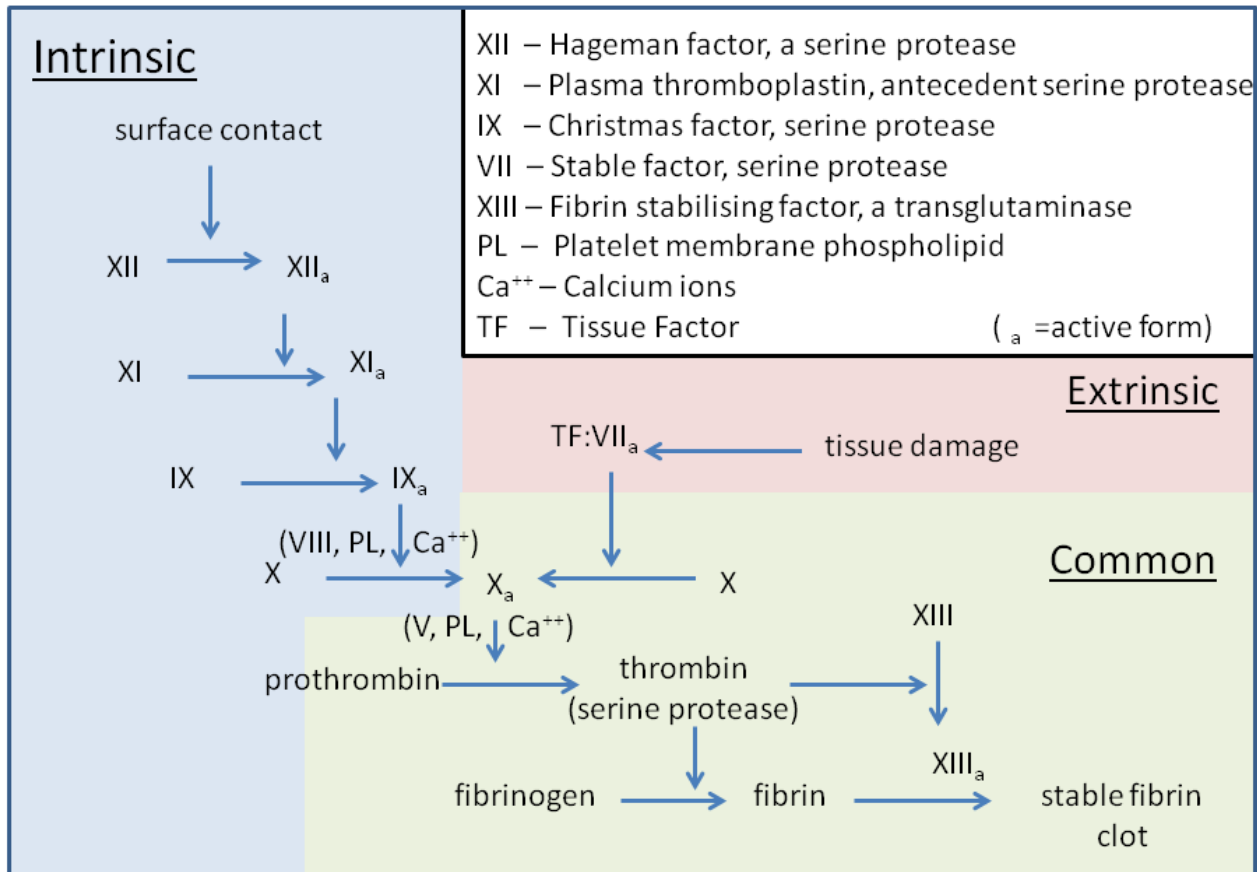
Faktor	Název faktoru	Biologický poločas (h)
I	fibrinogen	120-144
II	protrombin	48
III	tromboplastin, trombokináza	velmi krátký
IV	ionty vápníku	
V	proakcelerin	12-15
VII	(AHF) prokonvertin, stabilní f.	2-5
VIII	antihemofilní faktor A, a. globulin	5-12
IX	Christmas faktor, antihem. f. B	12-30
X	Stuart-Prower faktor	32
XI	antihemofilický f. C, PTA	méně než 12
XII	Hageman faktor	méně než 12
XIII	f. stabilizující fibrin	48-72
HMW-K	Fitzgerald f. (vysokomolekulární kininogen)	
Pre-K	prekallikrein	
Ka	kallikrein	
PL	destičkové fosfolipidy	

Proteiny koagulační kaskády mají typickou doménovou strukturu.

- Signální peptid
- Propeptid
- EGF-like doména
- Kringle (smyčka) doména
- Katalytická doména

Propeptidová doména je bohatá na zbytky kyseliny glutamové – γ -karboxylace (vitamín K) a vazba vápenatých iontů

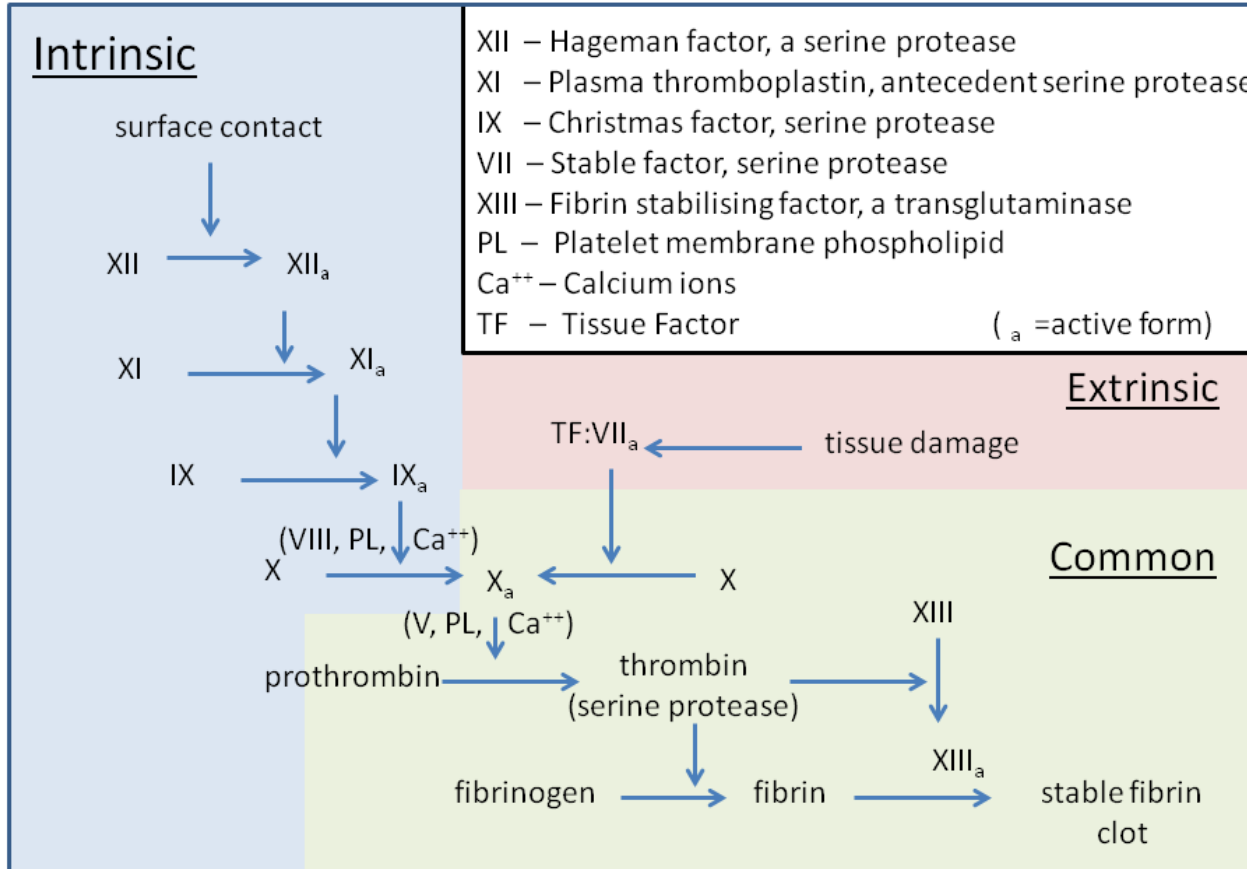
Vnitřní cesta



- Faktory IXa, Xa a trombin proteolyticky štěpí faktor VIII za vzniku VIIIa, který je kofaktorem další reakce.
- VIIIa spolu s IXa, vápenatými ionty (z destiček) a negativně nabitými fosfolipidy vytváří trimolekulární komplex **tenázu**.
- Tenáza konvertuje faktor X na Xa.

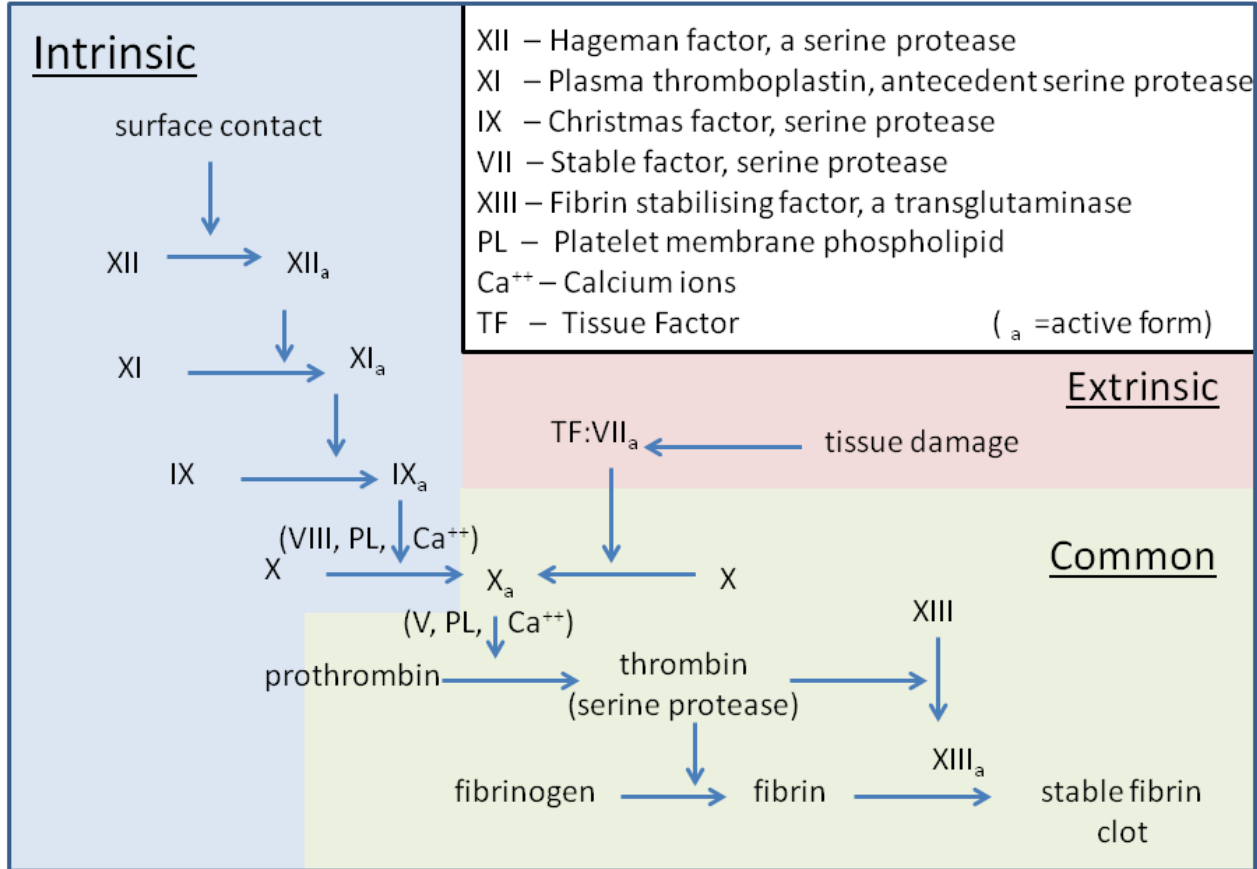
Faktor XIIa konvertuje prekallikrein na kallikrein, který zpětně katalyzuje a urychluje konverzi neaktivního faktoru XII na XIIa – příklad pozitivní zpětné vazby.

Vnější cesta



- Zahájena faktory mimo cévní systém
- Expres **tkáňového faktoru** mimo cévy
- Ten je receptorem pro plasmatický protein – faktor VII
- Aktivace – vznik VII_a
- Spolu s vápenatými ionty vznik trimolekulárního komplexu, který se podobá tenáze
- Proteolytická aktivace faktoru X

Společná cesta

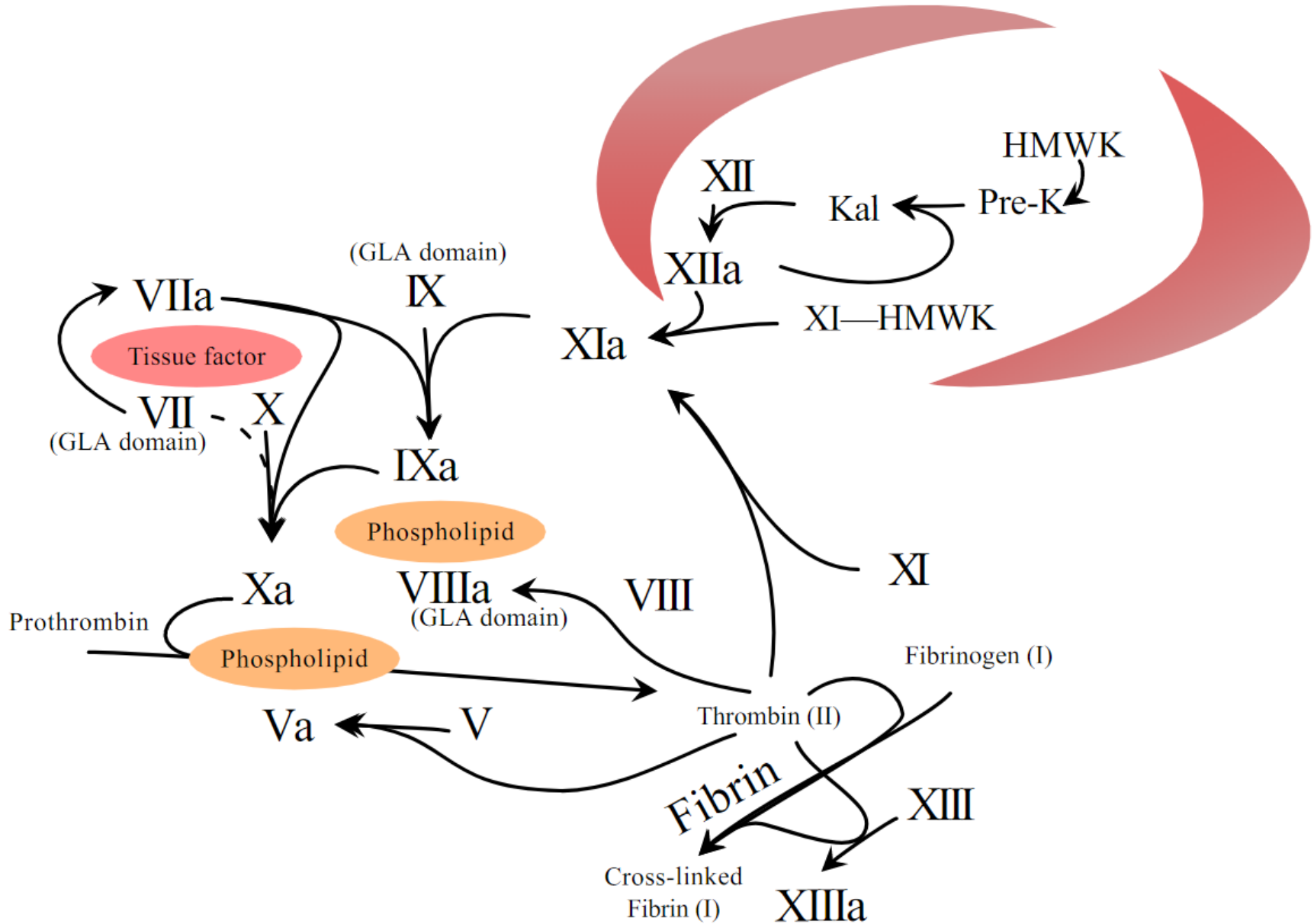


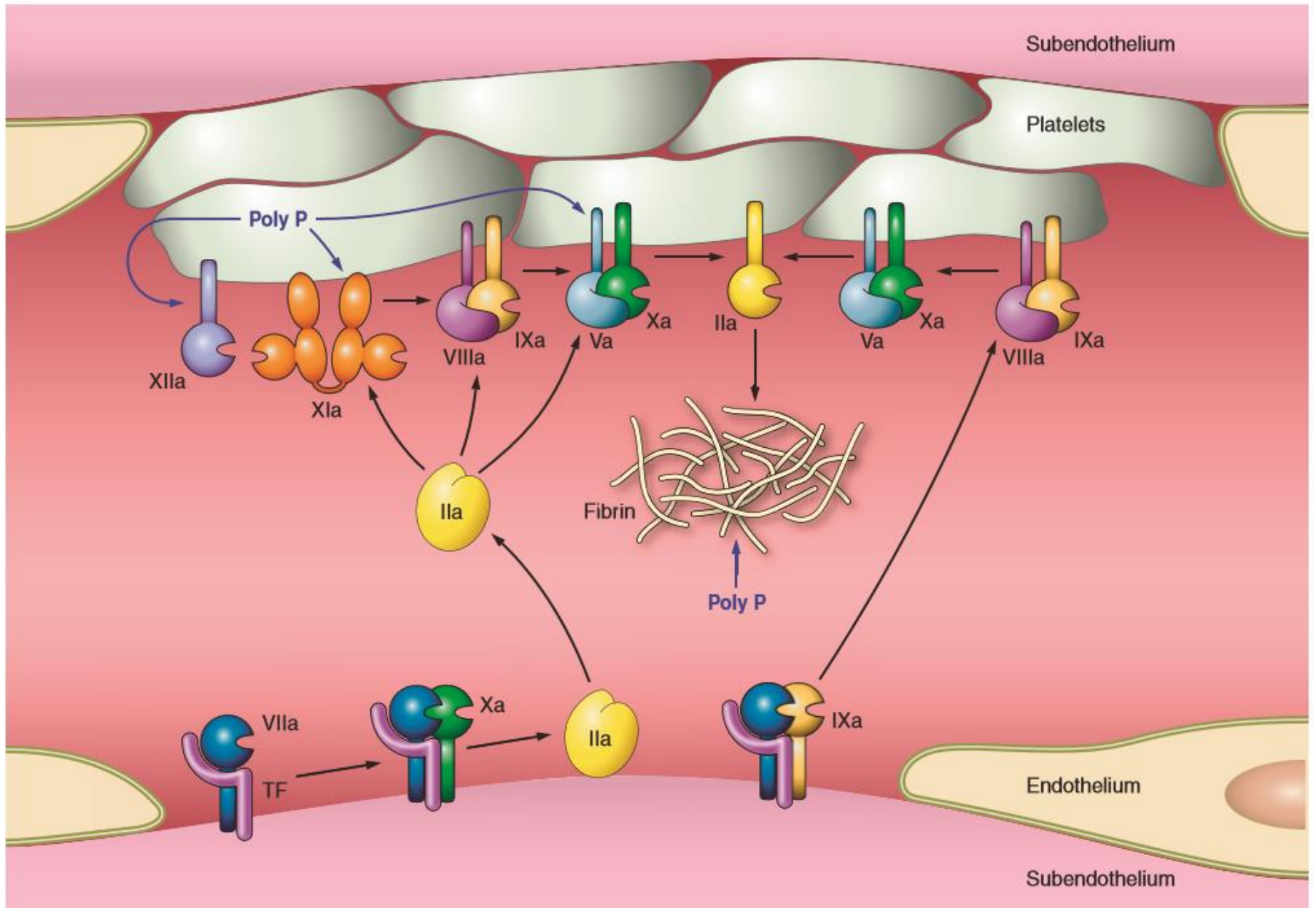
- Zahájena faktorem Xa
- Následná aktivace faktoru Va
- Tvorba trimolekulárního komplexu (Xa, Va, vápenaté ionty spolu s PL) = **protrombináza**
- Konverze protrombinu na trombin
- Konverze fibrinogenu na fibrin

Trombin

- Trombin katalyzuje konverzi proteolýzu fibrinogenu (vznik fibrinopeptidů A a B) – α , β , γ
- Monomery fibrinu spontánně polymerizují a tvoří **gel** – zachycení krevních elementů
- Aktivace faktoru XIII a vznik polymerní sítě
- Trombin katalyzuje vznik dalšího trombinu a Va a VIIIa – pozitivní zpětná vazba
- Parakrinní působení trombinu – endoteliální buňky uvolňují NO, prostaglandin I₂, ADP, vWF, TPA – trombocyty (PAR-1) – spojení trombocytů s koagulační kaskádou

Moderní pojetí





Moderní pojetí – fáze koagulace

1. Iniciační fáze

- = vnější cesta, expozice TF a následná kaskáda

2. Amplifikační fáze

- Akumulace trombinu (pomalá)
- Nábór dalších trombocytů v místě poranění cévy
- Vznik Va a amplifikace protrombinázové aktivity

3. Propagační fáze

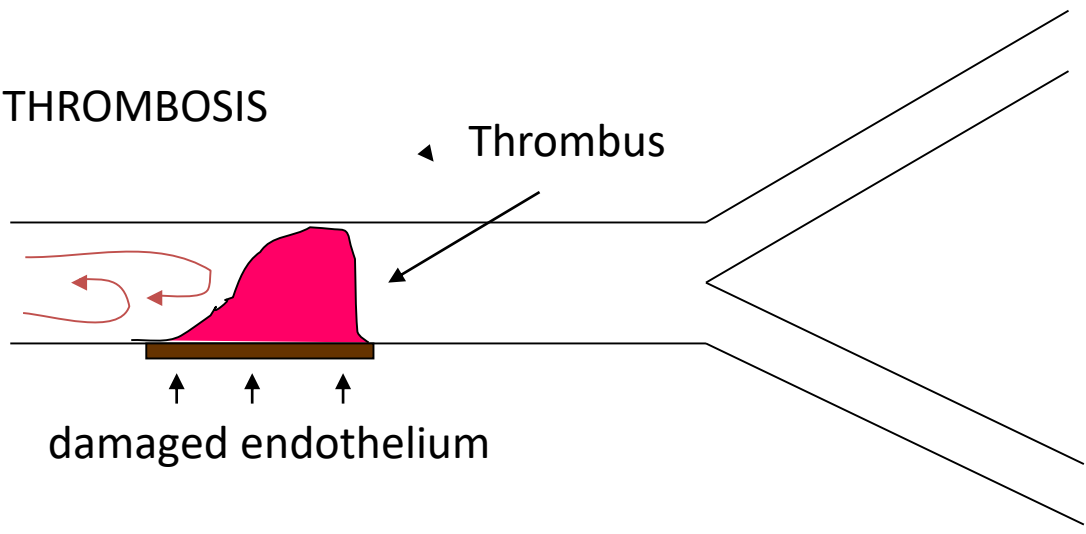
- Na povrchu prokoagulačních fosfolipidů – trombocytů
- Kaskáda se vznikem trombinu, fibrinu a jeho polymerizace - zesíťování

INTRAVASKULÁRNÍ KOAGULACE

Poškození endotelu způsobené:

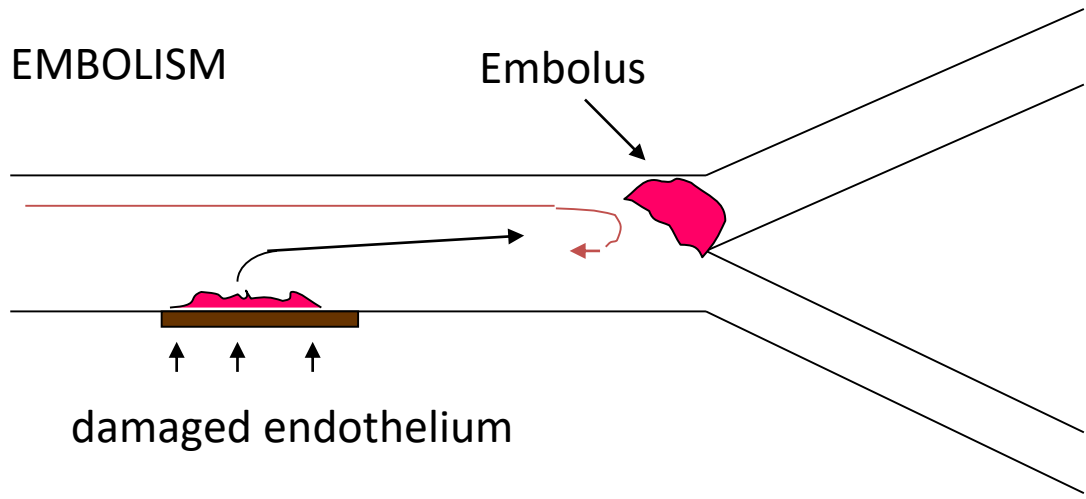
- 1) Aterosklerosou (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda)
- 2) Zánět (žilní trombosa, plicní embolie)

THROMBOSIS

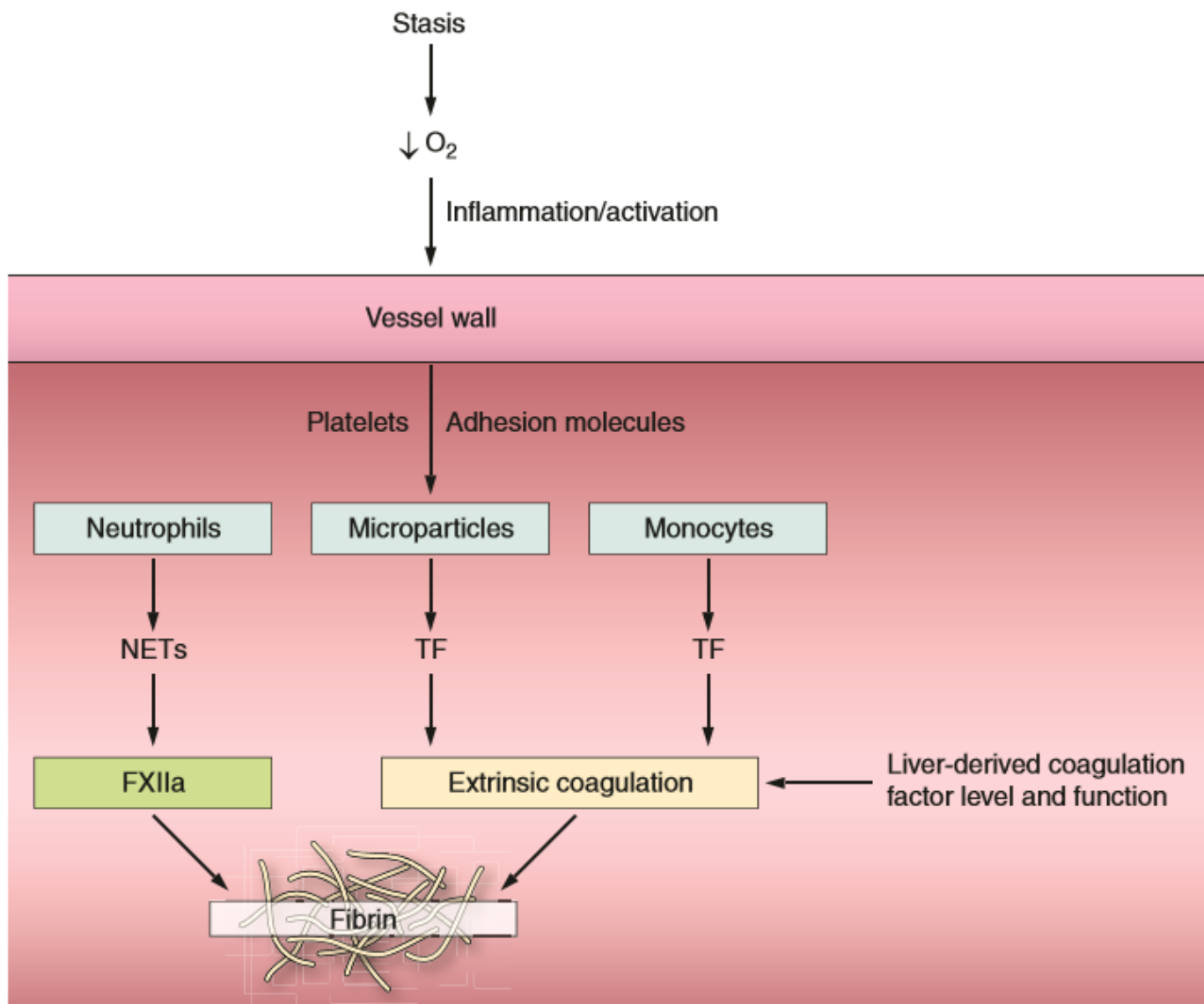


Example:
MI
Stroke

EMBOLISM



Example:
Pulmonary embolism



Mechanismus vedoucí ke vzniku trombů – hypoxická aktivace endotelu a exprese adhezních proteinů typu P-selektinu. Ten je signální molekulou pro cirkulující monocyty, neutrofilů, trombocytů a mikročástic a indukuje jejich vazbu k povrchu endotelu s následným uvolněním faktorů (TF, NETs) a iniciací vnější a vnitřní cesty koagulace.

ŘÍZENÍ HEMOKOAGULACE

Hemokoagulace vyvažována protisrážlivými mechanismy:

Nehumorální řízení:

Souvislý neporušený endotel.

Proud krve: omezení zvětšování koagula, zředění a odplavení faktorů srážení krve.

Vzájemné negativní působení tromboxanu A_2 a prostacyklinu.

Humorální řízení:

Fibrin: silně váže trombin – „antitrombin“

Antitrombin III: cirkulující inhibitor proteáz (aktivních forem faktorů IX, X, XI, XII), vazba na proteázy koagulačního systému usnadněna heparinem pocházejícím ze žírných buněk (kofaktor heparinu)

Trombmodulin: trombin vážící protein, produkován endoteliálními buňkami

Trombin + Trombmodulin = aktivátor proteinu C

Protein C: inaktivace faktorů V a VIII

inhibice inhibitoru aktivátoru tkáňového plasminogenu
(=více plasminu – rozklad fibrinu)

Protein S: kofaktor proteinu C

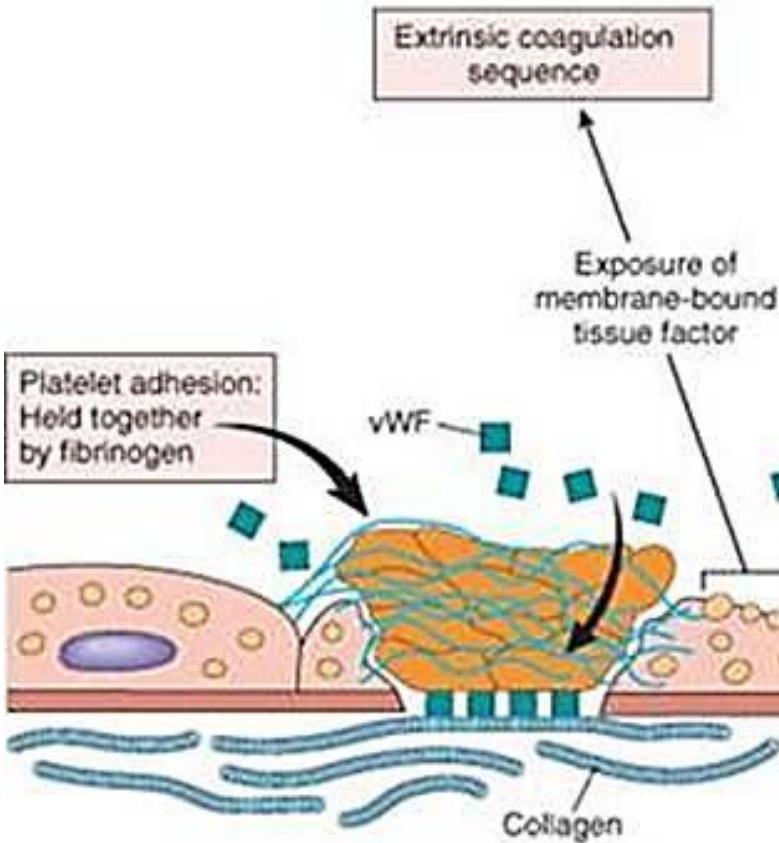
Plasmin (fibrinolysin): aktivní složka fibrinolytického systému. Prekurzor: plasminogen, katalýza trombinem a **tkáňovým aktivátorem plasminu (TPA)** – využití v terapii infarktu myokardu!!! Streptokináza.

Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI): plazmatický protein asociovaný s membránou endoteliálních buněk, komplex s VIIa a vápenatými ionty – inhibice proteázové aktivity VIIa („antitrombotický povrch cév“)

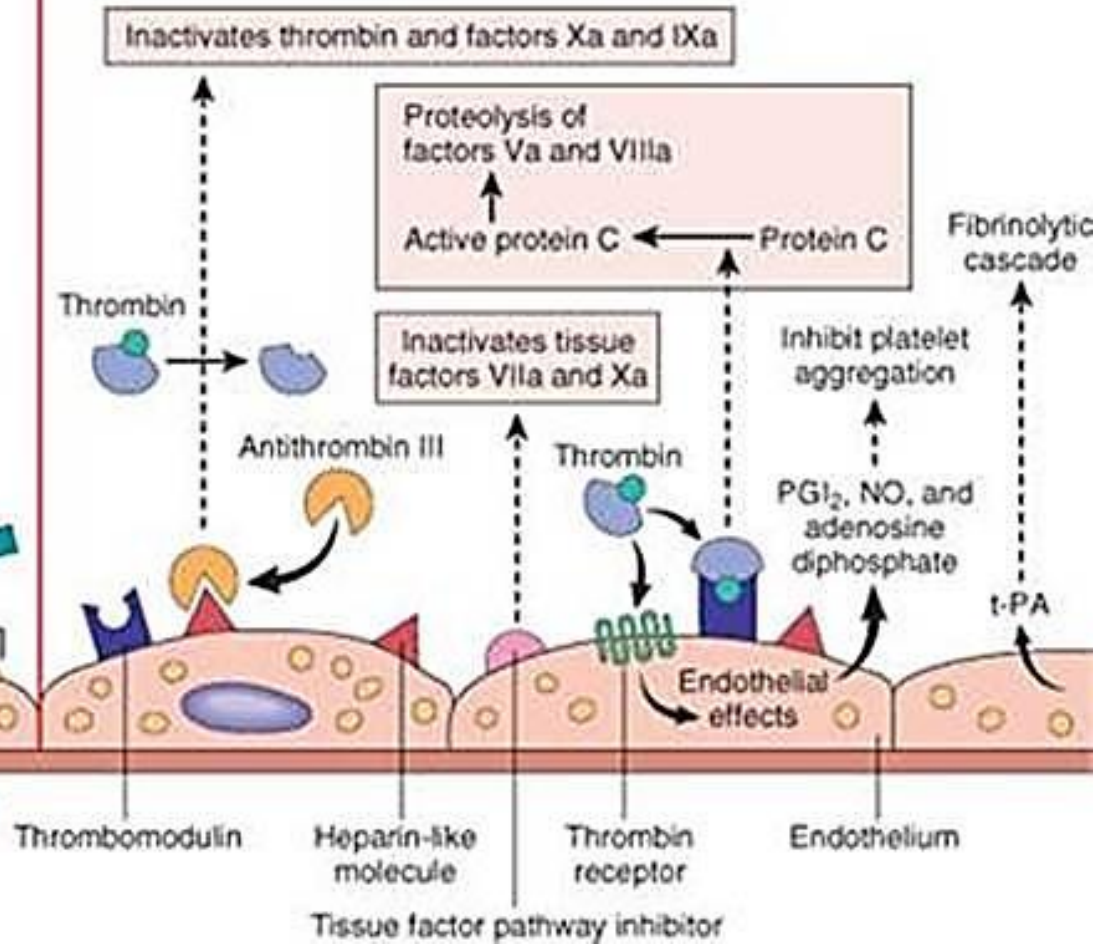
Parakrinní antikoagulační faktory

- **PGI₂** – vazodilatace – buňky endotelu
 - Tok krve, inhibice aktivace trombocytů
- **Oxid dusnatý** – endoteliální buňky, inhibice adheze a agregace trombocytů

FAVOR THROMBOSIS

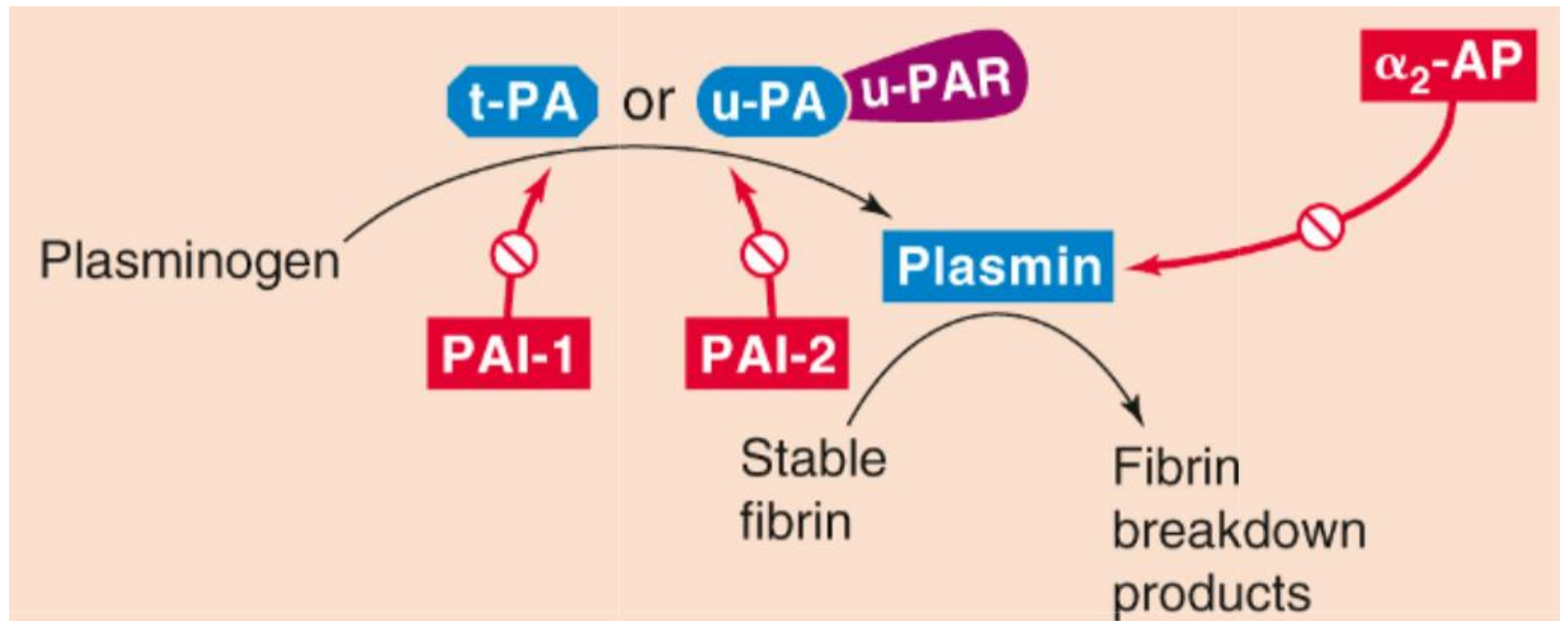


INHIBIT THROMBOSIS

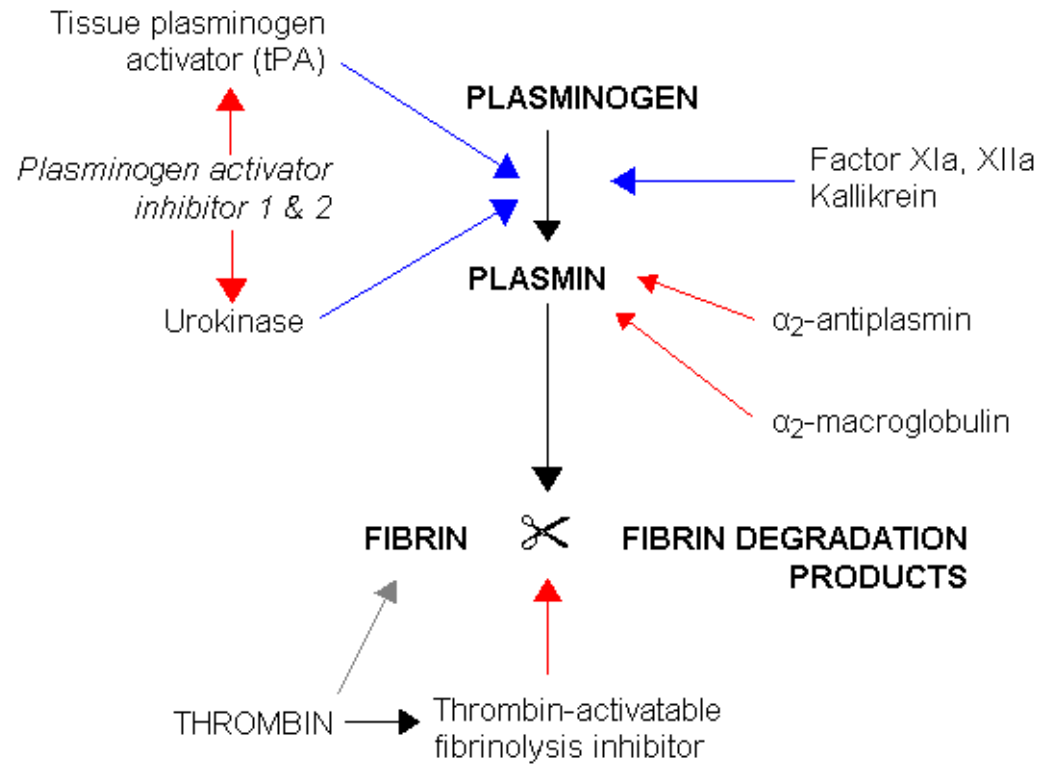
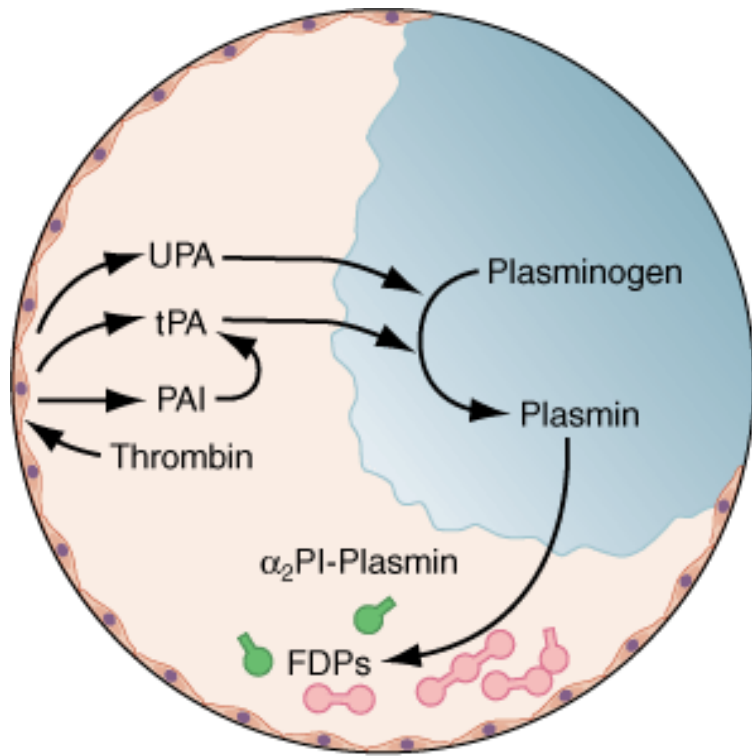


Fibrinolytické faktory

- **t-PA** – serinová proteáza, hydrolýza plazminogenu a vznik plazminu (endotel)
 - Katecholaminy a bradykinin zvyšují hladiny cirkulujícího t-PA
- **u-PA** – serinová proteáza urokinázového typu (plasma)
- **u-PAR** – receptor pro u-PA
- **Plasminogen – plasmin** (játra)
- **PAI-1** – inhibitor aktivátoru plasminogenu, plasma a trombocyty
- **PAI-2** – jen těhotenství (placenta) – zvýšený risk trombózy během těhotenství?
- **α_2 -antiplasmin** – játra, ledviny - vazba plasminu (1:1) a jeho inaktivace



TROMBOLÝZA



UPA, urokinase plasmin activator tPA, tissue plasmin activator

PAI, plasmin activator inhibitor α_2 PI-Plasmin, complex

ANTIKOAGULACE

Defibrinace: odstranění fibrinu (preparáty z hadích jedů) – *in vitro*

Dekalcifikace: vyvázání nebo odstranění vápenatých iontů (citrát sodný, šťavelan draselný nebo amonný) – *in vitro*

Heparin: přirozené antikoagulans, žírné buňky, účinné pouze za přítomnosti antitrombinu III, také *in vivo*

Kumarinové deriváty (dikumarol, warfarin): inhibice účinků vitamínu K v játrech – poruchy faktorů II, VII, IX, X, proteinu C, proteinu S (usnadňuje aktivaci Va a VIIIa pomocí proteinu C)

Hirudin: obsolentní, slinné žlázy pijavek (*Hirudo medicinalis*)

Pozn. Vitamín K a jeho antagonisté

- Vitamín K
 - Podporuje v játrech karboxylaci glutamátových zbytků v prekurzorech některých faktorů (II, VII, IX a X) a některých antikoagulačních faktorů za vzniku gama-karboxyglutamátu
 - Karboxylové skupiny nutné pro vazbu na povrch fosfolipidů, která je zprostředkována vápenatými ionty
- Strukturální analoga vitamínu K = 4-hydroxykumariny = „falešný vitamín K“
 - Fenoprokumon, warfarin
 - Nutné hledání optimální dávky pro každého pacienta zvlášt
 - Kontroly, hodnoty INR
 - Výhoda = je antidotum (= vitamín K)

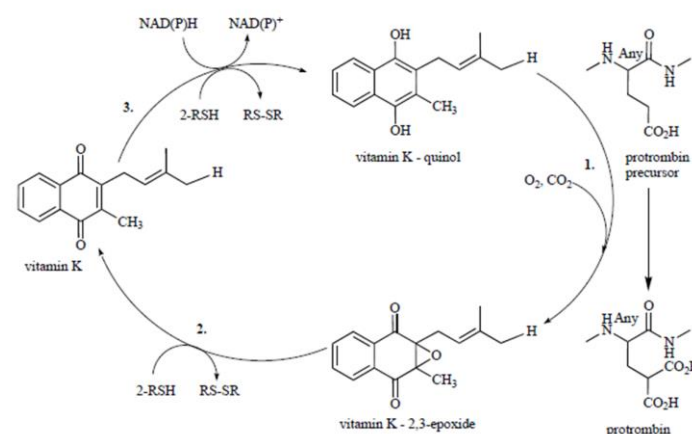
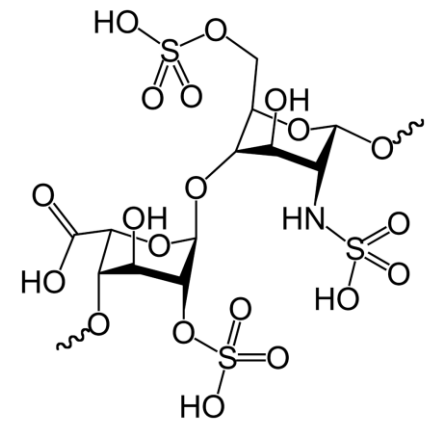


Fig. (15). The role of vitamin K in coagulation.

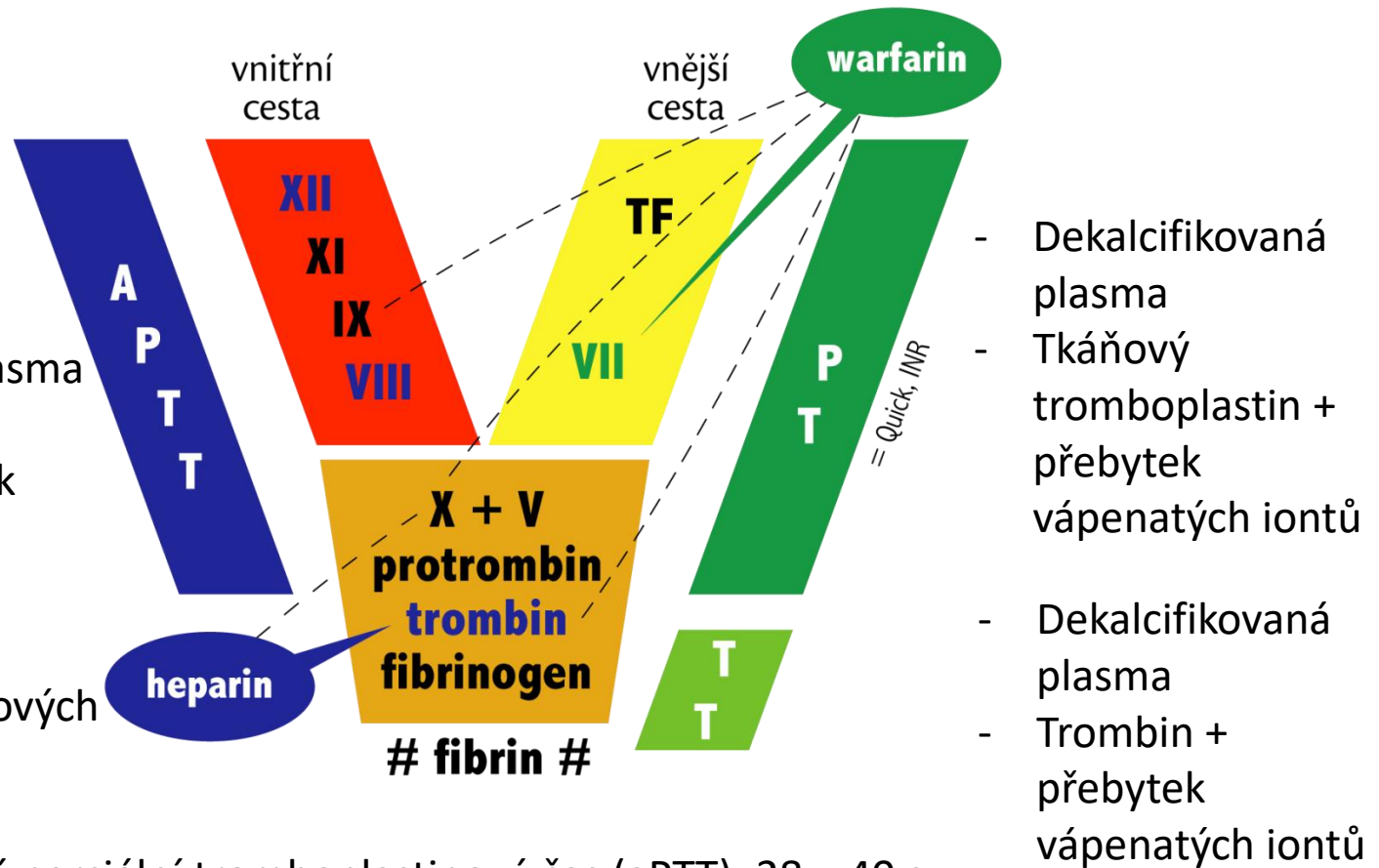
Převzato. Babula, P. et al. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. Current Pharmaceutical Analysis, 5(1), 2009.

Pozn. Heparin a hirudin a jejich deriváty

- Heparin
 - Zdrojem je střevní sliznice vepřů
 - Antikoagulační schopnost závisí na délce řetězců
 - Nefrakcionovaný standardní heparin (4000 – 40000 Da)
 - Nízkomolekulární frakcionovaný heparin (cca 5000 Da, certoparin, dalteparin, enoxaparin)
 - Syntetické deriváty (fondaparinux)
 - Aktivace antitrombinu III
 - Reverzibilní inaktivace trombinu a dalších koagulačních faktorů
- Hirudin a jeho deriváty
 - Zdrojem jsou sliny pijavice *Hirudo medicinalis*
 - Blokují aktivní centrum trombinu
 - Lepirudin, desirudin



Vyšetření krevní srážlivosti

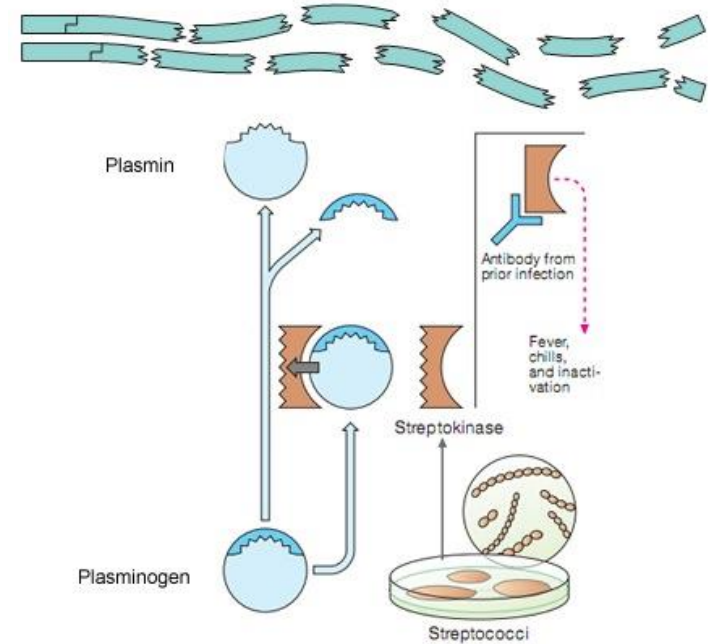
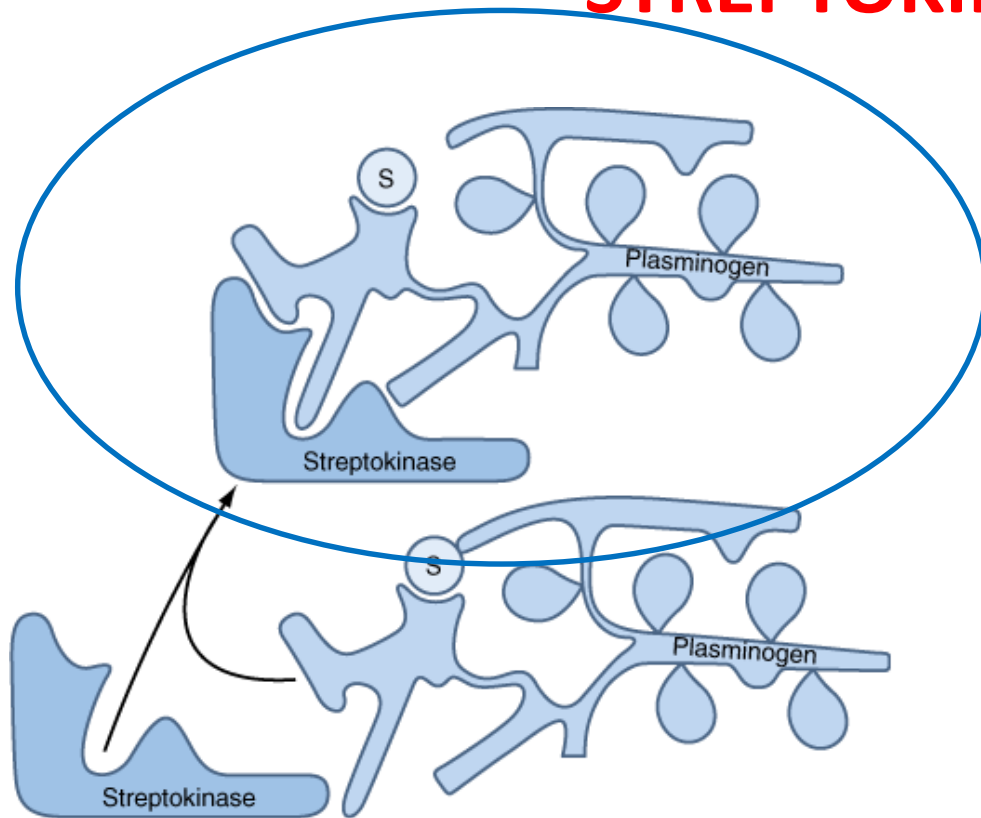


- Dekalcifikovaná plasma
- kaolin-kefalinový komplex + přebytek vápenatých iontů
- Kefalin nutný pro aktivaci faktoru X („náhražka destičkových fosfolipidů“)

- Dekalcifikovaná plasma
- Tkáňový tromboplastin + přebytek vápenatých iontů
- Dekalcifikovaná plasma
- Trombin + přebytek vápenatých iontů

- aPTT - Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), 28 – 40 s
- Quick – rychlost přeměny protrombinu na trombin 12 – 15 s; International Normalized Ratio 0,8 -1,2
- TT – trombinový čas 17 – 24 s
- Pozn. FDP (fibrinové degradační produkty) a D-dimery = markery koagulace s následnou fibrinolýzou

STREPTOKINÁZA



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

- Beta-hemolytický streptokok
- Konverze plasminogenu na aktivní plasmin;
- Terapie tromboembolických stavů

PORUCHY HEMOSTÁZY

Krvácivé stavy = chorobné stavy, u kterých vznikají krvácivé projevy buď spontánně nebo po neúměrně malém podnětu.

- **Vasogenní poruchy krevního srážení**

- **Trombocytární krvácení:**

 - 1) *trombocytopenie*

 - 2) *trombocytopatie*

- **Koagulopatie** – chybění nebo nedostatek plazmatických koagulačních faktorů:

 - 1) *Poruchy syntézy*: dědičné (hemofilie), získané (karence vitamínu K, terapie deriváty kumarinu)

 - 2) *Poruchy přeměny*:

 - konsumpční koagulopatie a hyperfibrinolýza
 - mnohočetné transfuze
 - imunokoagulopatie
 - terapie heparinem
 - paraproteinemie