

Plazmatické bílkoviny, hemostáza, koagulopatie, hemoglobin

- Jindra Kučerová

Plazmatické bílkoviny

- **Biosyntéza** převážné většiny plazmatických bílkovin probíhá v játrech, menší část je syntetizována na jiných místech (např. v lymfocytech: imunoglobuliny)
- **Odbourávání** se uskutečňuje v hepatocytech a v mononukleárním fagocytárním systému, kde se degradují převážně bílkoviny po vytvoření komplexů (např. komplex hemoglobin-haptoglobin).
- Intracelulárně jsou peptidové vazby bílkovin hydrolyzovány pomocí proteáz a peptidáz za vzniku aminokyselin. Další způsob odstraňování sérových bílkovin se uskutečňuje exkrecí orgány, především ledvinami a gastrointestinálním traktem.
- Celková koncentrace bílkovin v séru je 65–85 g/l, což odpovídá onkotickému tlaku 3,33–3,52 kPa. V plazmě je koncentrace bílkovin vyšší o koagulační faktory

Plazmatické bílkoviny

- Bílkoviny v plazmě jsou zastoupeny mnoha druhy proteinů s různými funkcemi :
- udržování osmotického tlaku
- transport důležitých látek
- nutriční funkce
- udržování acidobazické rovnováhy
- hemokoagulace a fibrinolýza
- obranné reakce organismu – humorální imunita:
 - specifická imunita (imunoglobuliny),
 - nespecifická imunita (složky komplementu, bílkoviny akutní fáze).

Dysproteinemie (změna obsahu proteinů)

Obecné příčiny

- **hereditární** (geneticky podmíněná porucha syntézy proteinu nebo jeho uvolnění do oběhu),
- **ztráty určitých proteinových frakcí:**
- Ledvinami – proteinurie (nefrotický syndrom),
- Kůží – těžké popálení, rozsáhlé záněty,
- střevem – exsudativní enteropatie,
- **poruchy proteosyntézy:**
- játra – porucha jaterní proteosyntézy při cirhóze, hepatitidě apod.; snižuje se zejména syntéza transportních proteinů (albumin, prealbumin, transferrin ad.), při těžší poruše se nedostatečná syntéza koagulačních faktorů manifestuje krvácivostí,
- malnutrice s nedostatečným příjmem bílkovin v potravě – proteino-kalorická nebo čistá proteinová malnutrice,
- **relativní změny** při dehydrataci,
- **zánětlivá reakce** – syntéza imunoglobulinů, proteinů akutní fáze, útlum syntézy transportních proteinů.

Fyziologie krevního srážení

- Hemostáza je komplikovaný, přesně regulovaný proces, který dokáže zastavit krvácení pouze v místě poranění, při neporušení cév, udržuje tekutost krve.
- Na hemostáze se podílí především cévy, krevní destičky a plazmatické faktory (koagulační, přirozené inhibitory a faktory fibrinolýzy)

Cévy, cévní systém

- Funkce cirkulační
- Význam pro hemostázu: vaskulopatie mohou zapříčiňovat krvácivé stavy, častější jsou však hyperkoagulační stavy (IM, ischemické cévní mozkové příhody, končetinové ischemie)

Subendotel cévní stěny

- Při kontaktu s krví je subendotel velmi trombogenní a aktivuje okamžitě všechny systémy hemostázy
- Nejdůležitějšími hemostatickými složkami subendotelu jsou kolageny (vnitřní cesta koagulace) a tkáňový faktor (vnější cesta koagulace)

Subendotel cévní stěny

- Na negativně nabitých površích kolagenu dochází k adhezi destiček vytvořením vazby mezi kolagenem, vWF a receptory destiček (aktivované glykoproteinové komplexy GP Ib/V/IX a GP IIb/IIIa, přes GP VI může jít navíc o přímou vazbu destiček na kolagenové struktury)

Endotel cévních stěn

- Povrchové receptory : trombomodulin, receptor pro protein S, fibronektin, adhezivní receptory – itergriny
- Děje na endotelu : metabolismus kys. arachidonové, syntéza vWF, endotelinu, tPA => schopnost syntetizovat, hromadit a v případě nutnosti exprimovat na povrch nebo sekretovat řadu jak prokoagulačních, proagregačních a vazokonstrikčních, tak i antikoagulačních, antiagregačních a vazodilatačních působků, navíc systém tPA-PAI je hlavním modulátorem fibrinolýzy

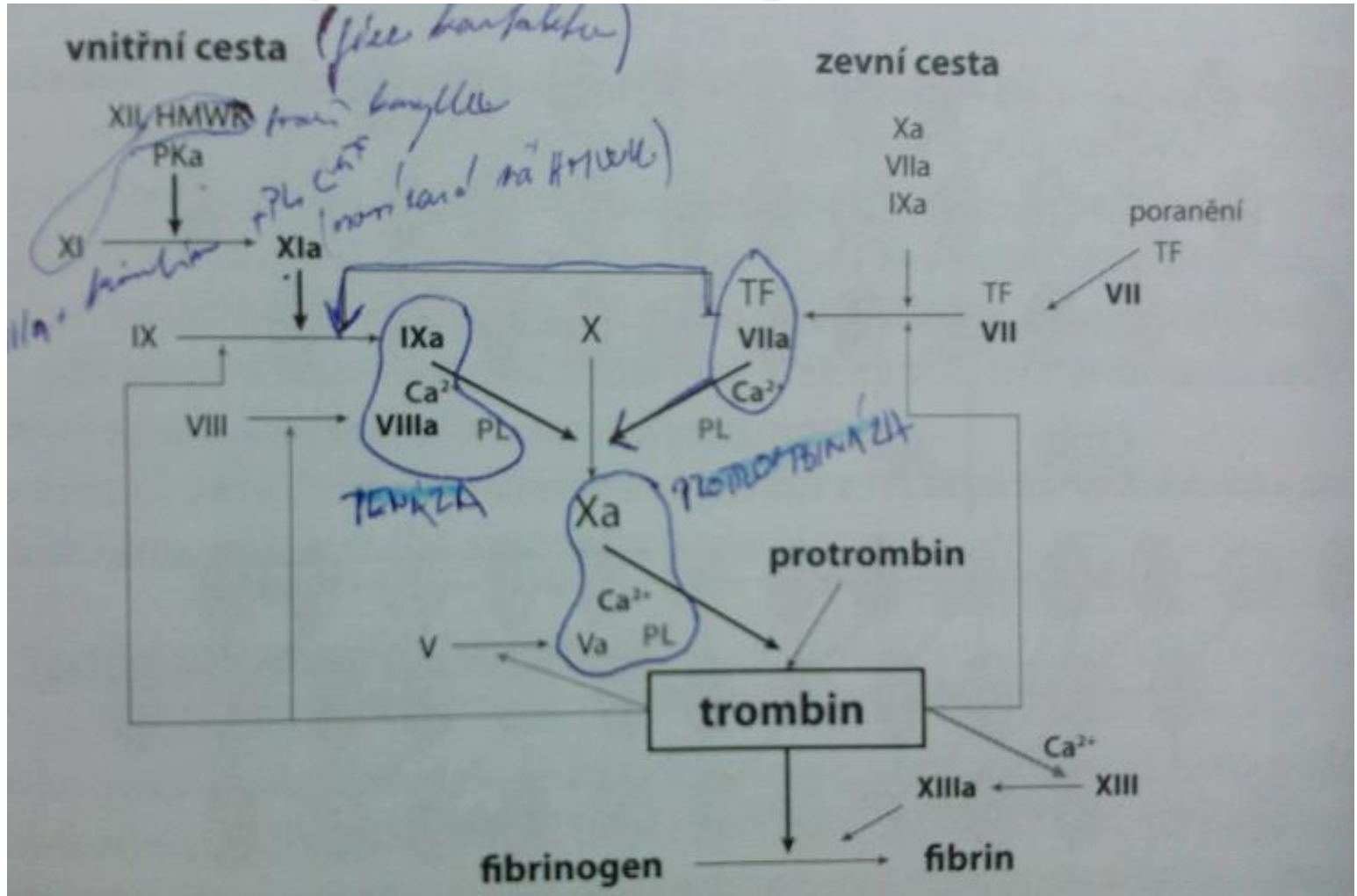
Primární hemostáza

- Výstavba primární cévní zátky (agregát destiček) je zahájena **adhezí** krevních destiček (receptor GP Ib) k receptorům kolagenních vláken bazální membrány cévní stěny prostřednictvím vWF
- Shlukování destiček (**agregace**) je umožněno reakcí destičkového receptoru GP IIb/IIIa s fibrinogenem a s vWF

Primární hemostáza

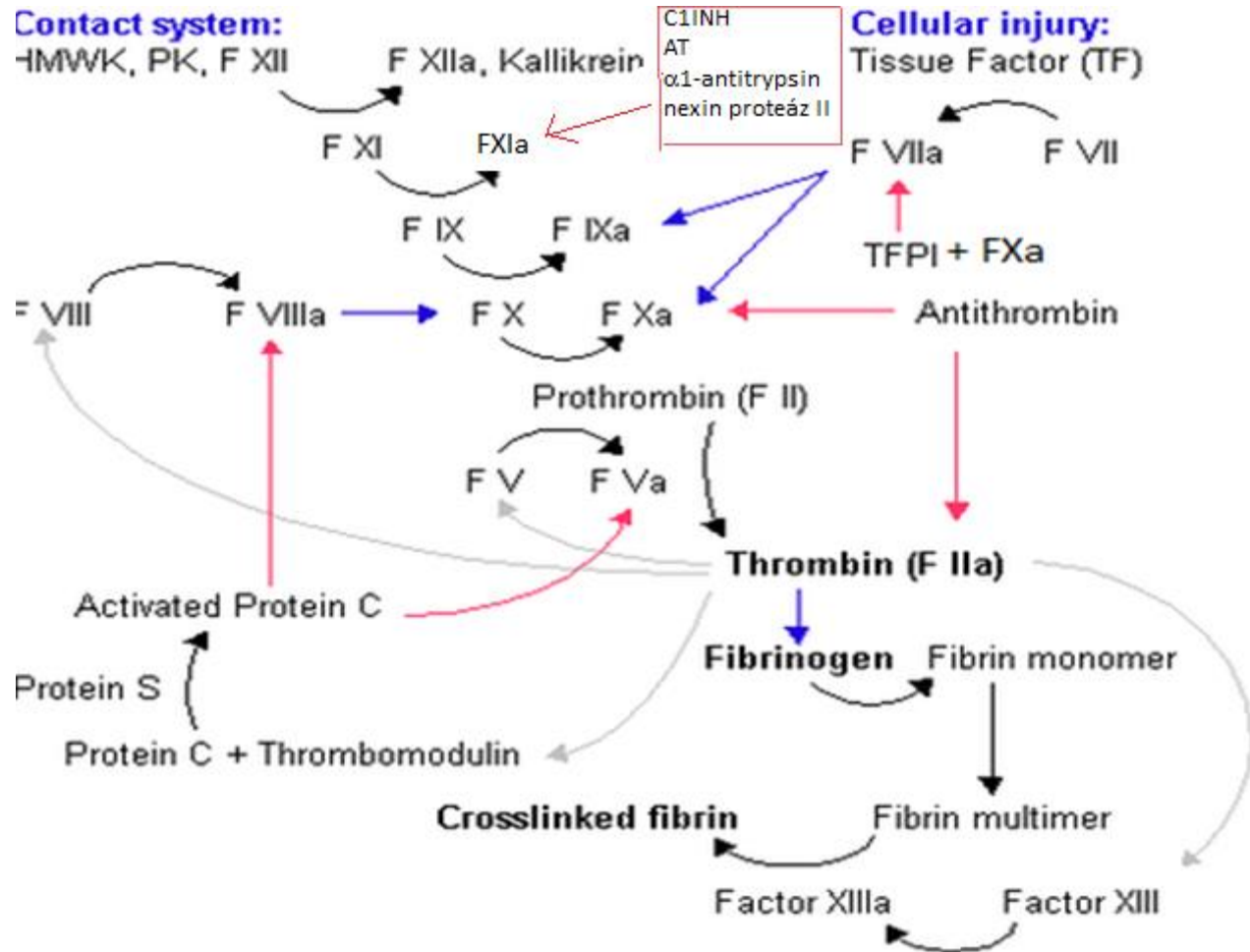
- Primární hemostáza vrcholí schopností rektraktibility destiček (kontraktibilní bílkoviny v destičkové membráně) a následným odplavením, pokud není destičkový agregát zpevněn a fixován fibrinovou sítí vytvořenou v procesu koagulace.

Vlastní proces koagulace



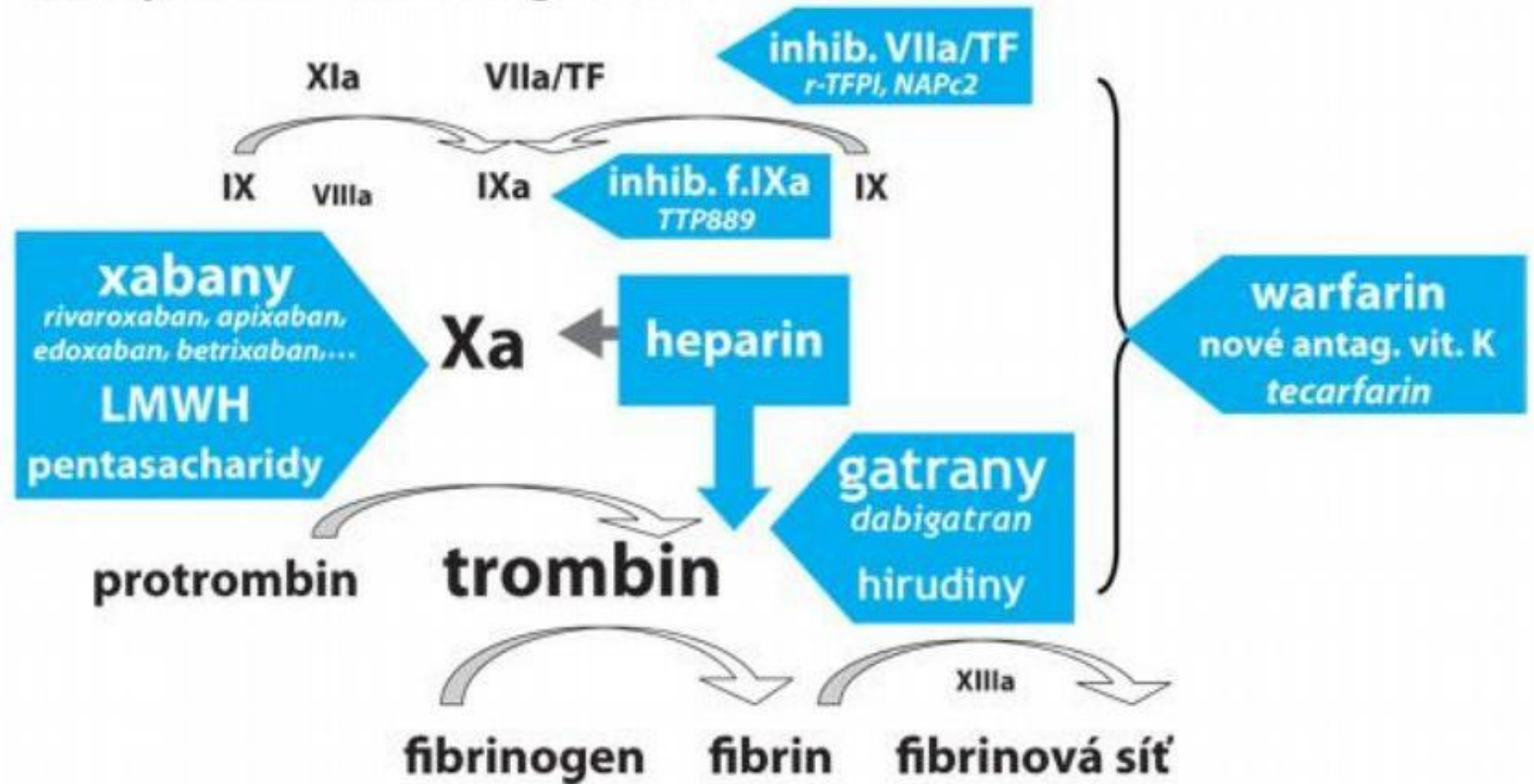
Miroslav Penka, Eva Tesařová a kol. Hematologie a transfuzní lékařství I. Praha: Grada Publishing, 2011.

Přirozené inhibitory koagulace

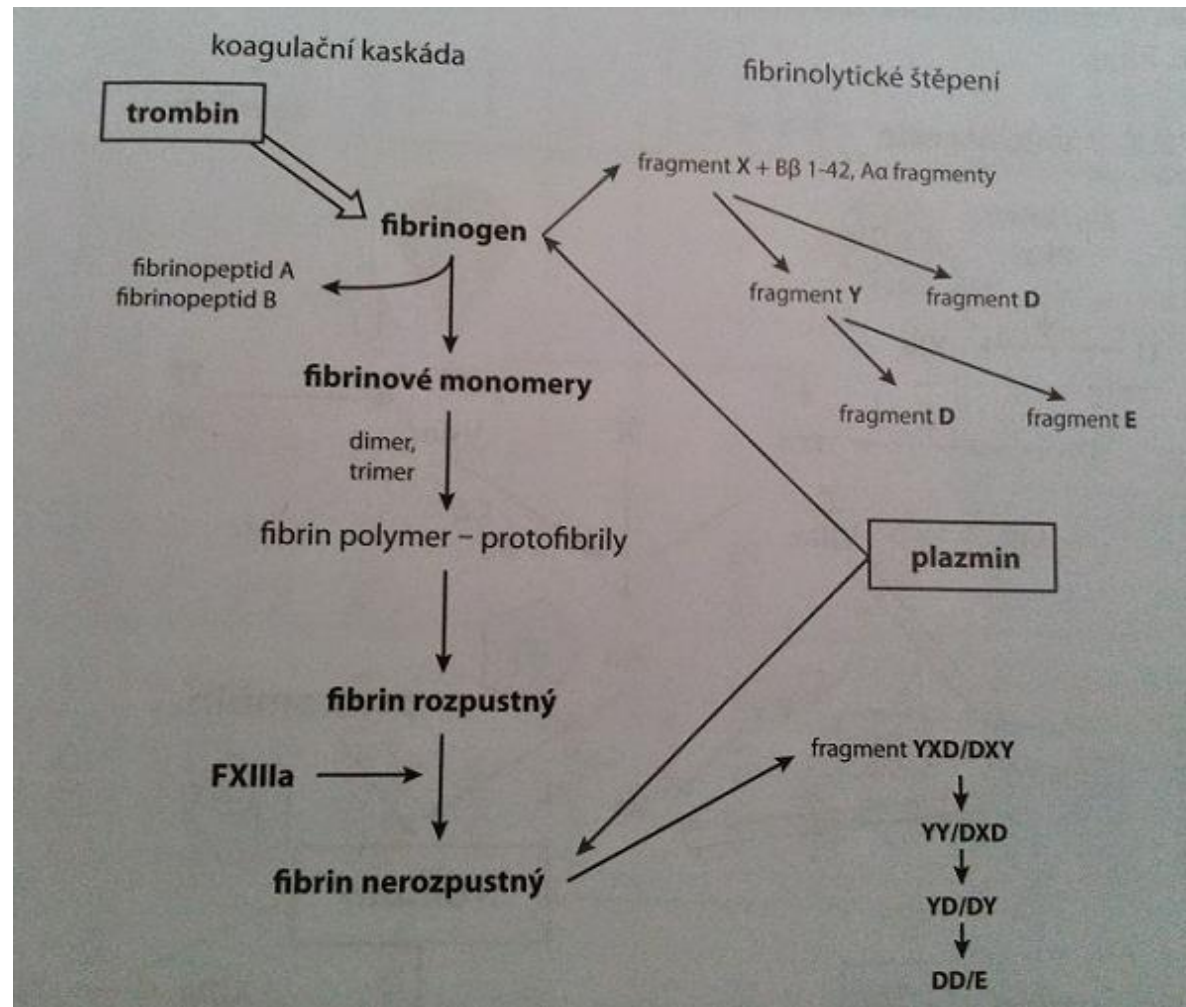


Antikoagulancia

Miesta pôsobení antikoagulancií

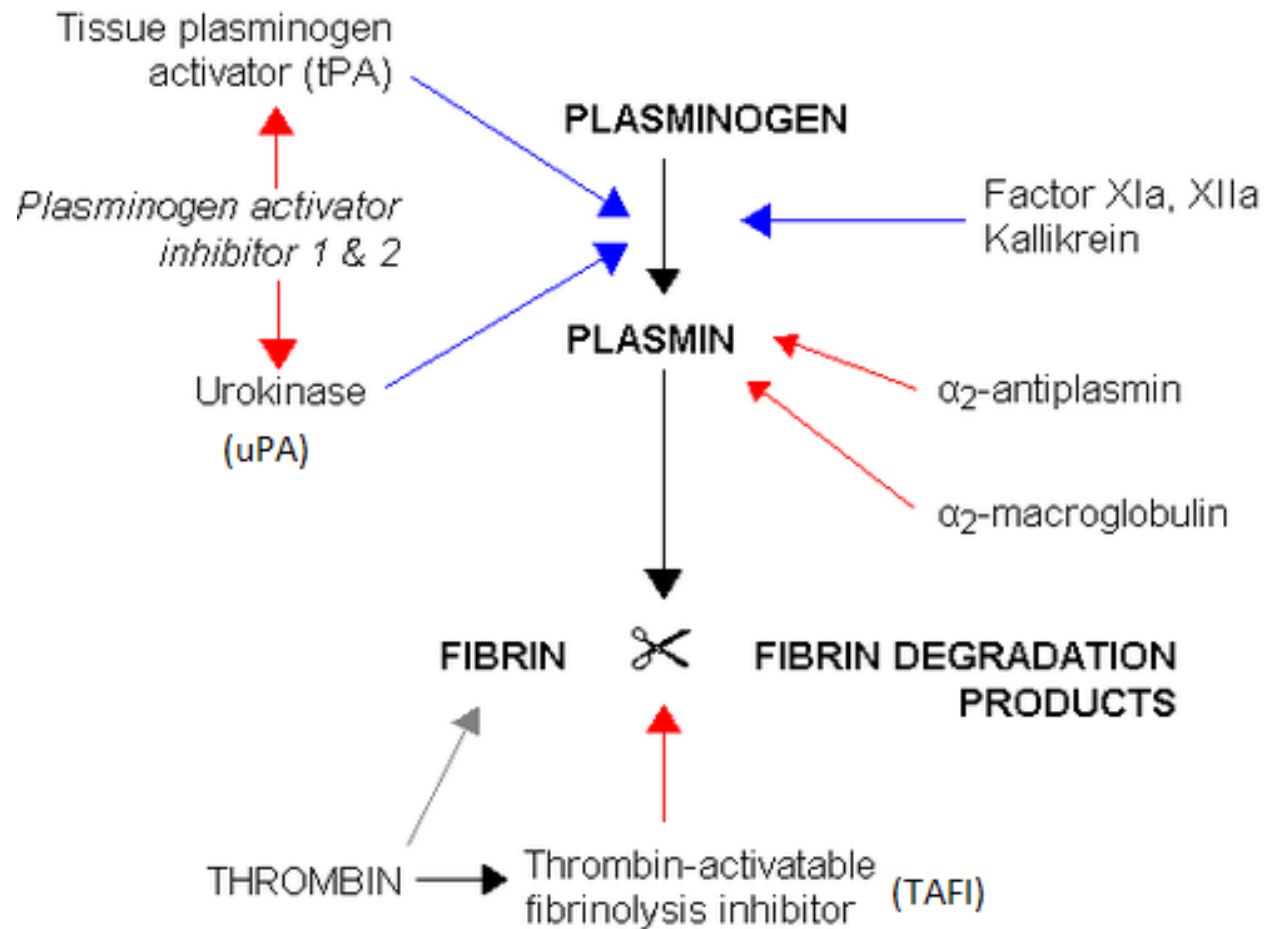


Štěpení fibrinogenu a fibrinu trombinem a plazminem



Miroslav Penka, Eva Tesařová a kol. Hematologie a transfuzní lékařství I. Praha: Grada Publishing, 2011.

Fibrinolytický systém



System plasmatických faktorů

- Dělení podle místa účinku:
- Koagulační faktory
- Přirozené inhibitory krevního srážení
- Faktory fibrinolýzy

System koagulačních faktorů

- Proenzymy, enzymy
- S výjimkou FXIII (transglutamináza) a kofaktorů FV, FVIII, jsou koagulační faktory serinové proteázy (katalytická třída Ser-His-Asp)

System koagulačních faktorů

- Faktory závislé na vitaminu K
- K-dependentní faktory (karboxylace gama glutámového zbytku)
- PIVKA formy
- FII, FVII, FIX, FX, protein C, S a Z
- *FIIa (trombin)*: prokoagulační i antikoagulační fce (PC), aktivace trombocytů, aktivace inhibice fibrinolýzy (aktivace TAFI), trombin moduluje prozánětlivé procesy (regulace aktivace trombocytů, exprese leukocytárních adhezivních molekul, chemotaxe leukocytů, produkce protrombotických faktorů) dále potencuje proliferaci endoteliálních buněk, fibroblastů, zvyšuje uvolňování jiných cytokinů a růstových faktorů, na endotelu indikuje sekrece vWF a produkci cytokinů.

- FXa in vitro nejmocnější aktivátor FVII, reakce je významně rychlejší, pokud je FVII navázán na TF. Mimoto FXa v přítomnosti PL a Ca^{2+} aktivuje také FV. Je schopen vazby na TM a tak aktivuje PC. Inaktivace FXa antitrombinem je v přítomnosti FV, Ca^{2+} a PL výrazně snížena. Při nedostatečném množství trombinu může FXa tento enzym nahradit, např. v začátcích krevního srážení.

System koagulačních faktorů

- Faktory citlivé k trombinu
- FXIII (fibrin stabilizující faktor) je transglutamináza, který je jediným koagulačním enzymem s cysteinem v aktivním místě
- Skládá se ze dvou párů polypeptidů (A a B řetězec)
- A podjednotka je tvořena v megakaryocytech a progenitorovými buňkami mononukleárů
- B podjednotka je tvořena v játrech
- FXIIIa katalyzuje formaci intermolekulárních vazeb mezi různými proteiny jako např. fibrinovými monomery, α_2 -antiplasminem, fibronektinem, kolagenem. Působením na rozpustný fibrin mění nekovalentní vazby na kovalentní (D-dimery). Navázáním α_2AP na fibrin chrání koagulum před fibrinolýzou.
- Další proteiny citlivé k trombinu: FV, FVIII, FXI, atd.

System koagulačních faktorů

- Faktory fáze kontaktu
- FXII, FXI, PKa (gamaglobulin), HMWK
- Kofaktory: plazmatické a buněčné
- Plazmatické kofaktory: Kininogeny, FV(Leidenská mutace), FVIII
- Buněčné kofaktory: TF , trombomodulin, endoteliární receptor pro protein C, PZ

System koagulačních faktorů

- Fibrinogen (F1) je fibrilární protein, přítomný jak v plazmě, tak v α -granulách trombocytů. Fibrinogen je štěpen buď trombinem na fibrin, nebo plazminem na fibrinogen degradační produkty (systém fibrinolýzy). Může být štěpen i trombinu podobnými enzymy – hadí jed reptiláza. Je proteinem akutní fáze, koncentrace se zvyšuje při zátěži, zánětu v těhotenství

System koagulačních faktorů

- Adhezivní proteiny umožňují kontakt buněk mezi sebou navzájem a mezi buňkou a extracelulární matrix. V hemostáze je nejdůležitější vWF
- vonWillebrandův faktor je syntetizován výhradně v megakaryocytech a endoteliálních buňkách. Patří k největším molekulám v plazmě, tvoří multimery (dimery až 50-100podjednotek)

System přirozených inhibitorů

- Antitrombin
- Protein akutní fáze, regulace syntézy AT je navázána na regulaci syntézy fibrinogenu. Při štěpení fibrinogenu při aktivaci koagulace klesá i antitrombin- Proto štěpení fibrinogenu dává signál i k další syntéze AT
- Inhibitor FIIa, FXa, TF/FVIIa, FIXa (heparin), serinové proteázy obecně

System přirozených inhibitorů

- CI inhibitor : inhibitor fáze kontaktu a zasahuje do systému komplementu, dále je schopen inhibovat i plazmin
- Inhibitor aktivovaného PC (PCI) je identický s PAI-3

Po vazbě na heparin inhibuje proteázy APC, FIIa, FIIa v komplexu s TM, FXa, tPA, uPA. Má zřejmě jak prokoagulační tak antikoagulační vlastnosti v závislosti na tom, kterou proteázu inhibuje a který kofaktor je přítomen.

System přirozených inhibitorů

- Proteinázový inhibitor závislý na proteinu Z (ZPI) je serpin produkovaný játry. V přítomnosti PZ, Ca^{2+} a PL je rychlým inhibitorem FXa, bez kofaktorů ZPI inhibuje FXIa a tato fce je cca 2x urychlena heparinem. Předpokládá se, že hlavní fce je tlumit koagulační odpověď před vytvořením protrombinázy

System přirozených inhibitorů

- Protein Z (PZ): K dependentní GP, v plazmě komplex ZPI. PZ působí jako kofaktor při inhibici FXa cestou PZI na PL. Při podávání kumarinů klesá koncentrace velmi rychle a na rozdíl od ostatních K dependentních faktorů se snižuje i antigen PZ.

System přirozených inhibitorů

- System proteinu C je přirozená antikoagulační cesta tvořená PC, PS, TM, PCI, receptor pro protein C na endotelu.
- Aktivace PC probíhá na povrchu cévních endotelií. Jako kofaktor této reakce působí specifické endoteliální receptor trombinu TM. Trombin vázaný na TM již není koagulačně aktivní. Komplex trombin-TM za přítomnosti Ca^{2+} aktivuje PC. Aktivovaný PC za přítomnosti kofaktoru PS inaktivuje FVa, kofaktorem inaktivace FVIIIa je vedle PS i FV. Štěpení obou kofaktorů je inhibováno ceruloplazminem. APC zasahuje rovněž do systému fibrinolýzy- uvolňuje tPA z vazby na PAI-I (tvorí komplex s PAI-I)

System přirozených inhibitorů

- Kuniny : inhibitory proteáz se strukturou zvanou Kunitzova doména v molekule, patří sem TFPI a nexin proteáz II
- TFPI (inhibitor zevní cesty koagulace) přímo inhibuje FXa a reakce je urychlována heparinem. Na FXa závislá inhibice TF/FVIIa vyžaduje vytvoření komplexu FXa-TFPI-TF/FVIIa. Působení TFPI je první důležitá negativní zpětná vazba v systému koagulace, která zabraňuje její nadměrné aktivaci

System přirozených inhibitorů

- Metaloproteinázy
- ADAMTS13 nezbytný pro štěpení vWF
- TAFI systém fibrinolýzy, proteináza obsahující zinek

Faktory fibrinolýzy

- Plazminogen, plazmin
- PLG je jednořetězcový GP syntetizovaný v játrech i v jiných tkáních (eozinofily, ledviny)
- PLG se váže na povrchy buněk, včetně endotelu či nádorových buněk
- Aktivace na plazmin probíhá rozštěpením jedné peptidické vazby
- Plazmin je nespecifická serinová proteáza
- Plazmin má v plazmě krátký poločas (volný 0,1s), navázaný na fibrin se poločas významně prodlužuje (10s)
- Plazmin navázaný na fibrin je chráněn před vlivem antiplazminu

Faktory fibrinolýzy

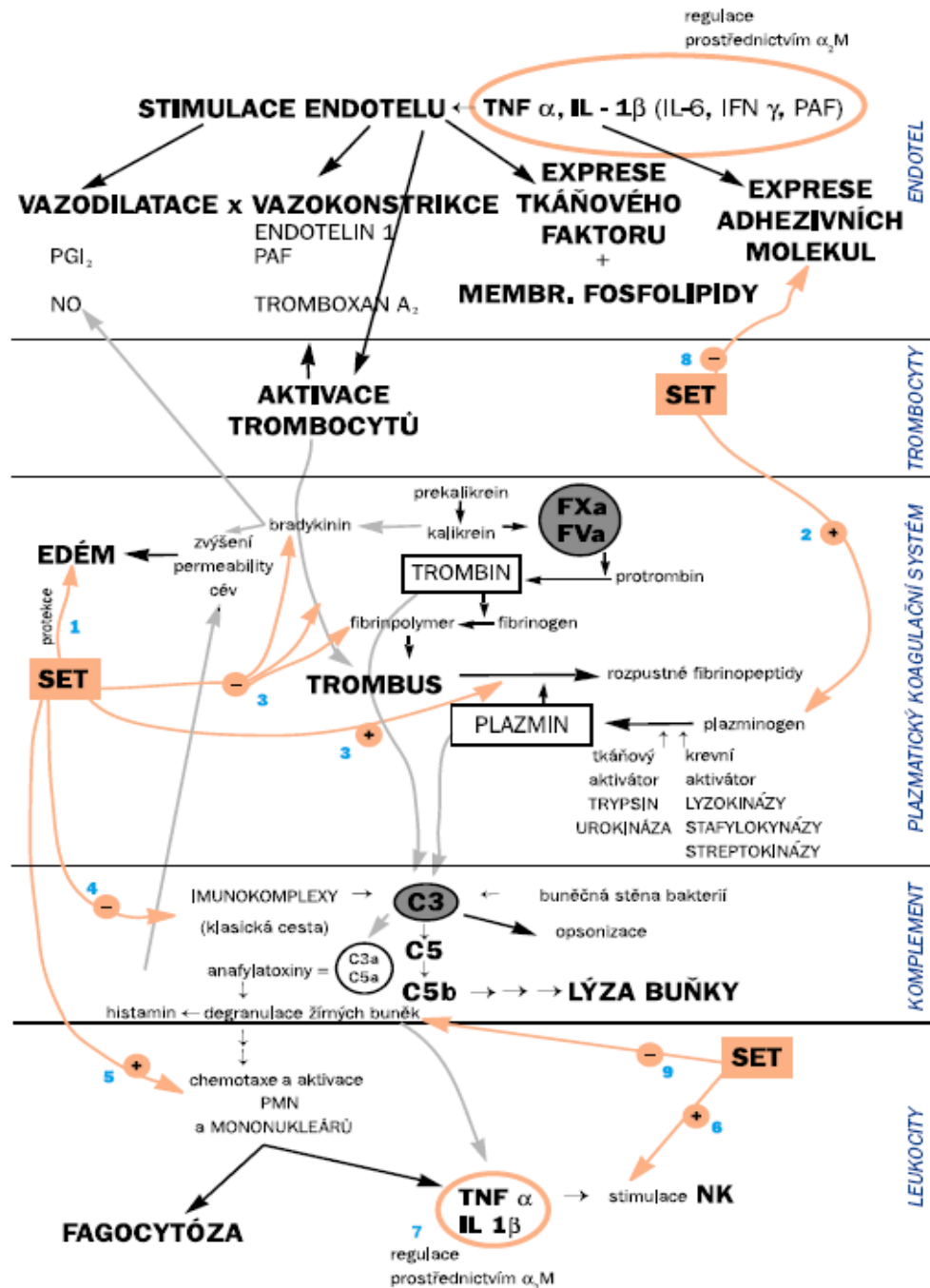
Aktivátory plazminogenu

- Tkáňový aktivátor plazminogenu (tPA) syntetizován endotelem, ale i monocyty a megakaryocyty
- Z endotelu se uvolňuje působením APC, histaminu, bradykininu, IL-1, vlivem stresu, fyzické zátěže, či při žilní okluzi
- V plazmě se vykytuje volný, nebo v komplexu s PAI-1
- Urokinázový aktivátor plazminogenu (uPA)
- V plazmě cirkuluje samostatně, jeho hlavní fce je role při štěpení ECM (extracelulární matrix), tím umožňuje migraci buněk (hojení ran, zánět, embryogeneze, invaze nádorových buněk a metastazování zhoubných nádorů)

Faktory fibrinolýzy

Inhibitory v systému fibrinolýzy

- α 2-antiplazmin je tvořen v játrech
- Fce: kompetice s plazminem o vazebné místo na fibrinu
- Inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI)
- Přirozené inhibitory tPA
- Inhibitor fibrinolýzy aktivovaný trombinem (TAFI)
- Fce spočívá v odštěpení C-terminálních molekul Lys a Arg z fibrinových vláken. Tím dochází k blokaci vazby tPA a plazminogenu na fibrin a výrazně se zpomalí aktivace plazminogenu na plazmin. Výsledkem je snížení fibrinolytického potenciálu.
- Další fce TAFI: potencuje uvolňování PAI-1 z aktivovaných destiček (inhibice fibrinolýzy)
- **Veškeré poruchy generace trombinu mají za následek i zvýšenou rychlost fibrinolýzy**
- Antiplazmin cleaving enzyme (APCE) odštěpuje z α 2-antiplazminu peptid o 12 AMK, kratší forma je 13x rychleji zabudována faktorem XIIIa do fibrinové sítě (zvýšená odolnost fibrinu proti plazminu)



Definice lékařského slovníku koagulopatie

- nemoc charakterizovaná zvýšenou krvácivostí způsobenou nedostatkem nebo poruchou koagulačních faktorů, popř. přítomností jejich inhibitorů. Může být dědičná (*hemofilie*) nebo získaná (*např. při těžkých jaterních chorobách, poruše vstřebávání vitamínu K*).

Koagulopatie – vrozené krvácivé stavy

- von Willebrandova choroba
- Hemofilie
- Vrozené defekty ostatních koagulačních faktorů
- Kombinované defekty

Hemofilie- vrozená koagulopatie

- Hemofilie A a B jsou dědičné krvácivé choroby, která jsou způsobeny deficitem koagulačního FVIII, respektive FIX. Podle tíže defektu koagulační aktivity FVIII nebo FIX se oba typy hemofilie dělí na hemofilii těžkou (pod 1%), středně těžkou (1-5%) a lehkou (5-40%)
- Etiopatogeneze:
- dědičnost recesivní, vázaná na pohlavní chromozom X
- Příčinou krvácení u hemofilie je selhání sekundární hemostázy. Dojde sice k vytvoření primární trombocytární zátky a vzniku menšího množství trombinu, vlivem defektu FVIII či FIX však selhává cesta amplifikace a následné propagace koagulace, protože se tvoří nedostatečné množství tzv. vnitřní tenázy, která aktivuje FX. Celkově vytvořené množství trombinu je nedostatečné pro vznik kvalitní fibrinové zátky. Nedochozí tak k úplné zástavě krvácení, u těžkých forem dojde pouze ke zmírnění krvácení.

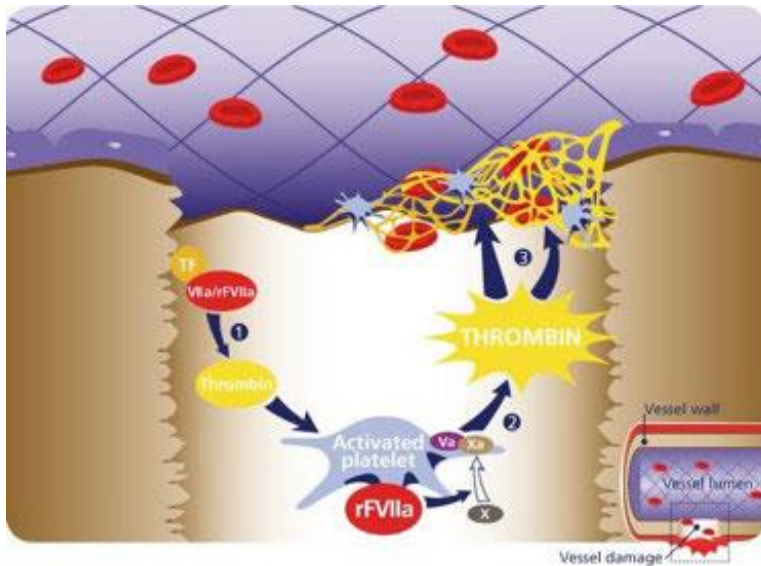
Hemofilie- vrozená koagulopatie

- Léčba: standardem v ČR je použití plazmatických, vysoce čištěných a protivirově ošetřených koncentrátů FVIII/IX. K vyloučení rizika přenosu infekce byly vyvinuty rekombinantní koncentráty FVIII/IX, které by měly být vyhrazeny pro nově narozené, dosud neléčené hemofiliky.
- Komplikace terapie: vznik protilátek proti FVIII/IX. Jde o reakci imunitního systému hemofilika na cizorodý FVIII/IX. Protilátka se váže na molekulu faktoru a znemožňuje tak vykonávat jeho funkci v průběhu srážení krve, případně dochází ke zrychlení clearance komplexu faktor+inhibitor.

Hemofilie- vrozená koagulopatie

- Ke vzniku inhibitoru dochází většinou během prvních 50 dnů podávání koncentráту faktoru. Množství inhibitoru je udáváno v tzv. Bethesda jednotkách (BU). Pokud opakované podání faktoru nedojde ke vzestupu inhibitoru nad 5BU/ml, pak se pacient označuje jako low responder (nárůst nad 5BU/ml-high responder)
- U low respondera, pak v léčbě krvácení lze užít koncentrát chybějícího faktoru. Vysokou dávkou podávaného faktoru lze inhibitor vyvázat na aplikovaný faktor a faktor podaný nad toto množství pak zabezpečí jeho terapeutickou hladinu (nelze u high respondera)
- U high respondera lze použít preparát aktivovaného protrombinového komplexu (FEIBA[®]) nebo rekombinantní FVIIa (NovoSeven[®])

NovoSeven[®] mechanismus účinku



- Rekombinantní faktor VIIa ve farmakologických dávkách **přímo aktivuje faktor X na povrchu aktivovaných destiček lokalizovaných v místě poranění** nezávisle na přítomnosti tkáňového faktoru. To vede ke vzniku dostatečného množství trombinu nezávisle na přítomnosti tkáňového faktoru a také nezávisle na přítomnosti FVIII a IX.
- NovoSeven[®] zvyšuje tvorbu iniciálního trombinu a zkracuje tak čas nutný k aktivaci dostupných destiček, i když nenormalizuje celkové potřebné množství trombinu.
- NovoSeven[®] zvyšuje ukládání fibrinu na trombogenní povrchy. Fibrin váže na tyto povrchy trombin, a tak dochází k posilování procesů probíhajících na povrchu destiček (další aktivace destiček, aktivace koagulačních faktorů VIII, IX).
- NovoSeven[®] zvyšuje adhezi a agregaci destiček a zvyšuje dostupnost fosfolipidových molekul na povrchu destiček

Koagulopatie – získané krvácivé stavy

- Nedostatek vitamínu K
- Jaterní postižení
- Metabolický syndrom
- Uremie
- Nádorové onemocnění
- Paraprotienemie
- Trauma
- Sepse
- Virové infekce
- Syndrom diseminované intravaskulární koagulace (DIC)
- Biologické látky (hadí jedy)
- Získané poruchy krevního srážení z poruchy plazmatických faktorů vznikající na imunitním podkladě (specifické inhibitory, nespecifická antikoagulancia např. LA)