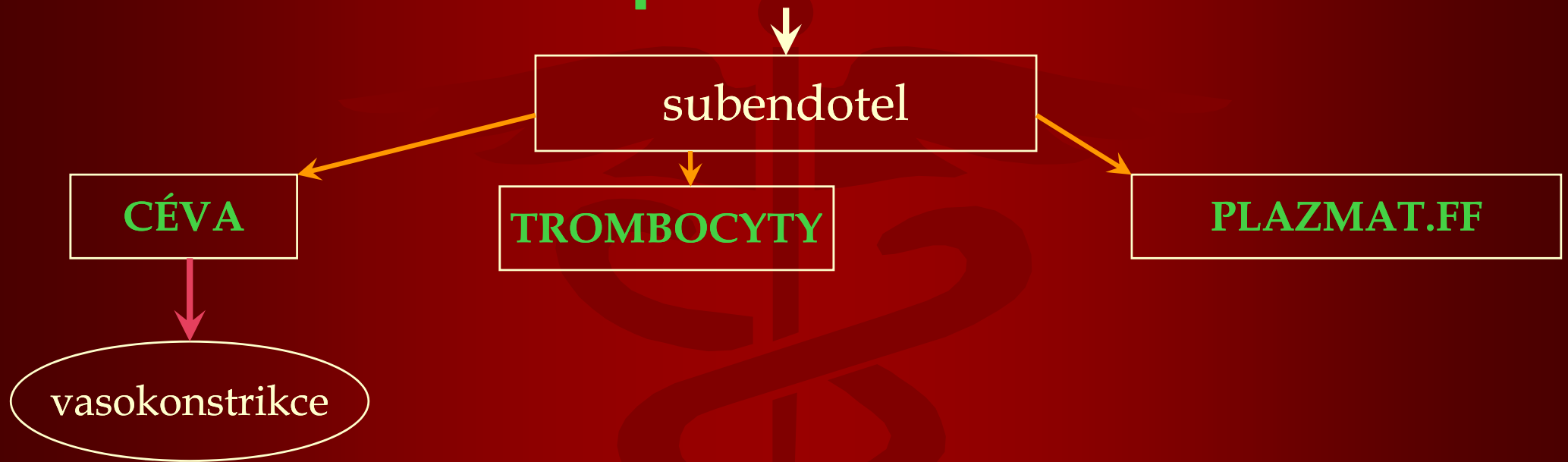


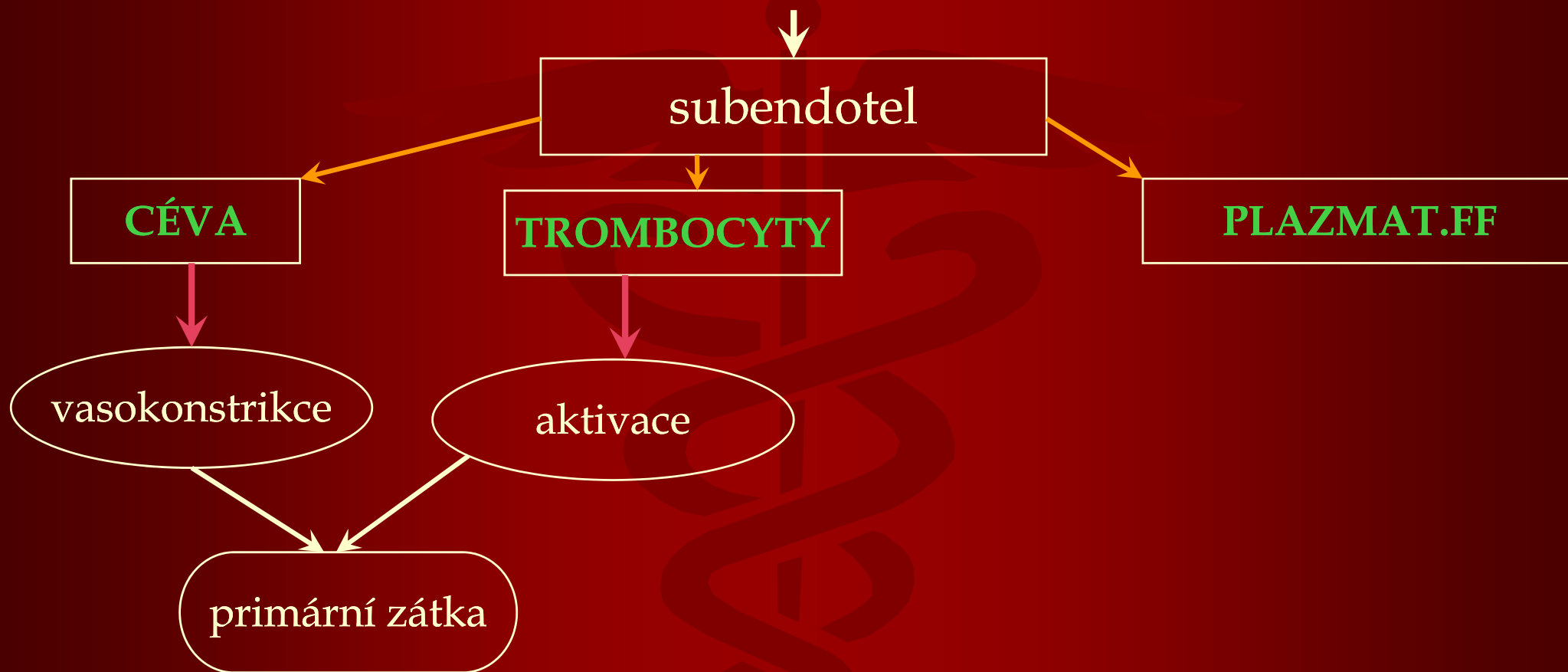
Hemostáza

- **je schopnost organismu zastavit krvácení**
 - ↳ udržení tekutosti krve při něporušeném cévním řečišti
- **účastní se:**
 - ↳ cévní stěna
 - ↳ endotel
 - ↳ látky přítomné v krvi a na vnitřní straně cévy:
 - ↳ trombocyty
 - ↳ červené krvinky, leukocyty
 - ↳ lipidy, bílkoviny, minerály atd.
 - ↳ porušená tkáň:
 - ↳ tkáňový faktor
 - ↳ ADP

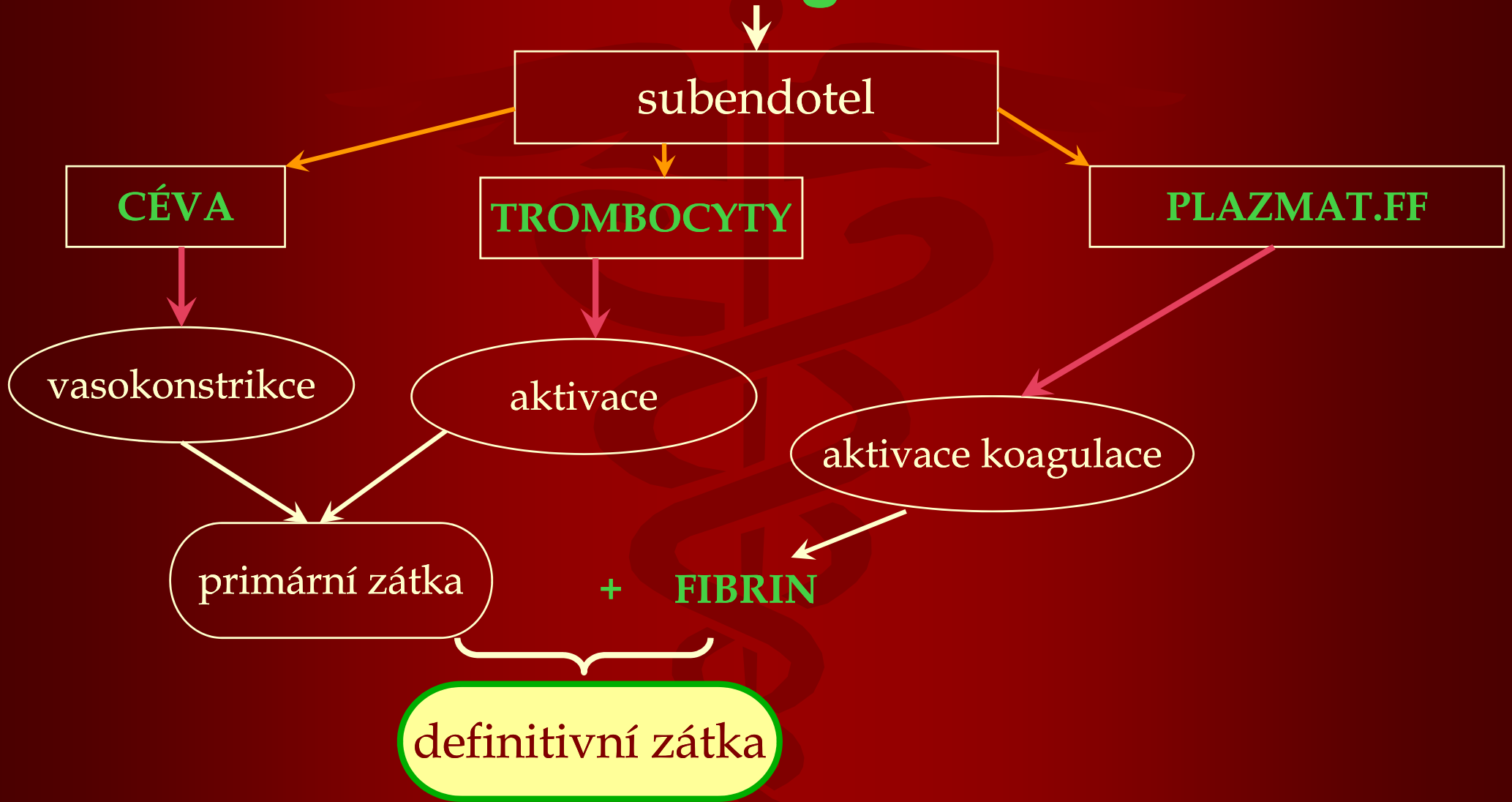
Poranění = poškození endotelu



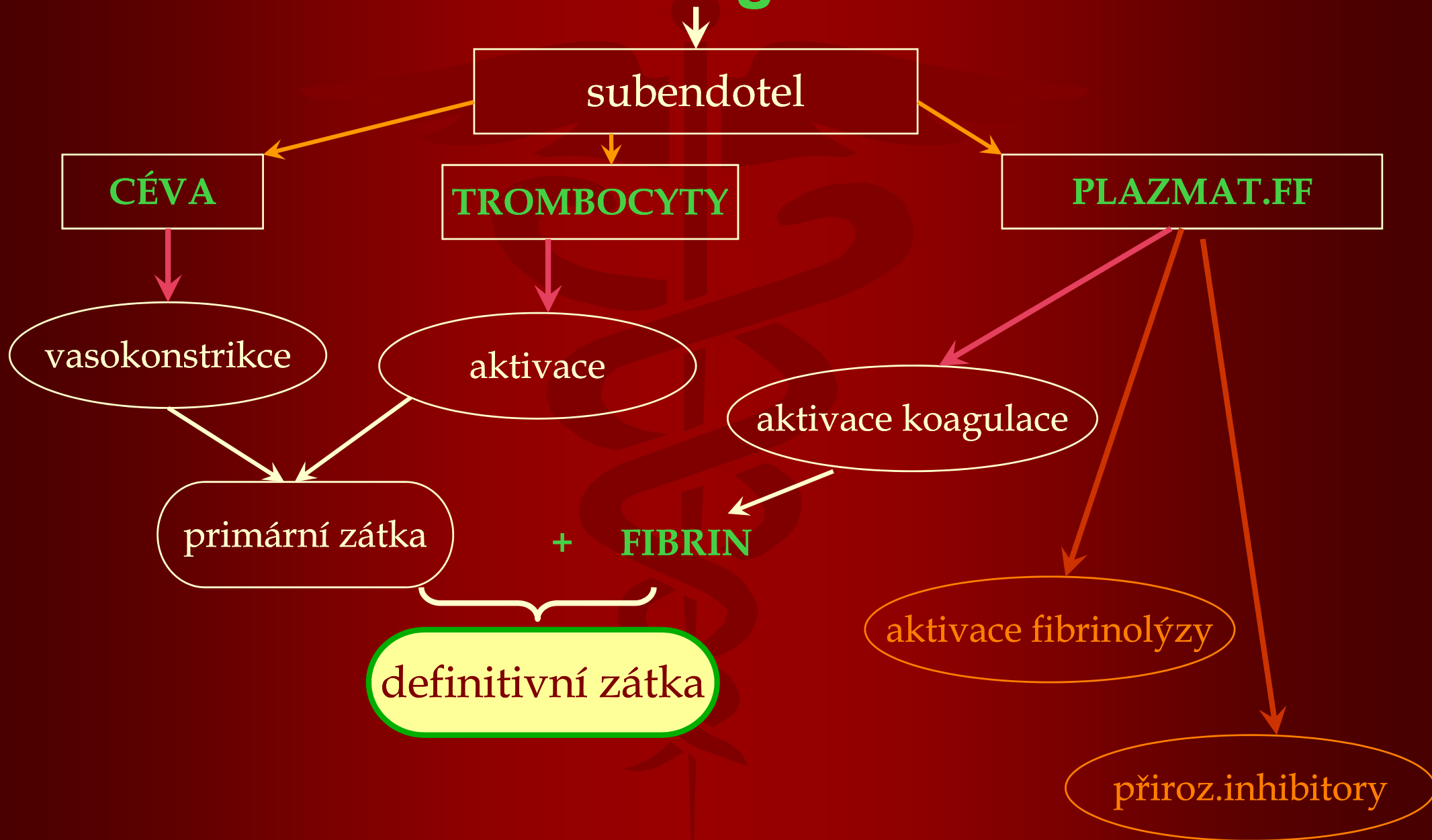
Primární hemostáza



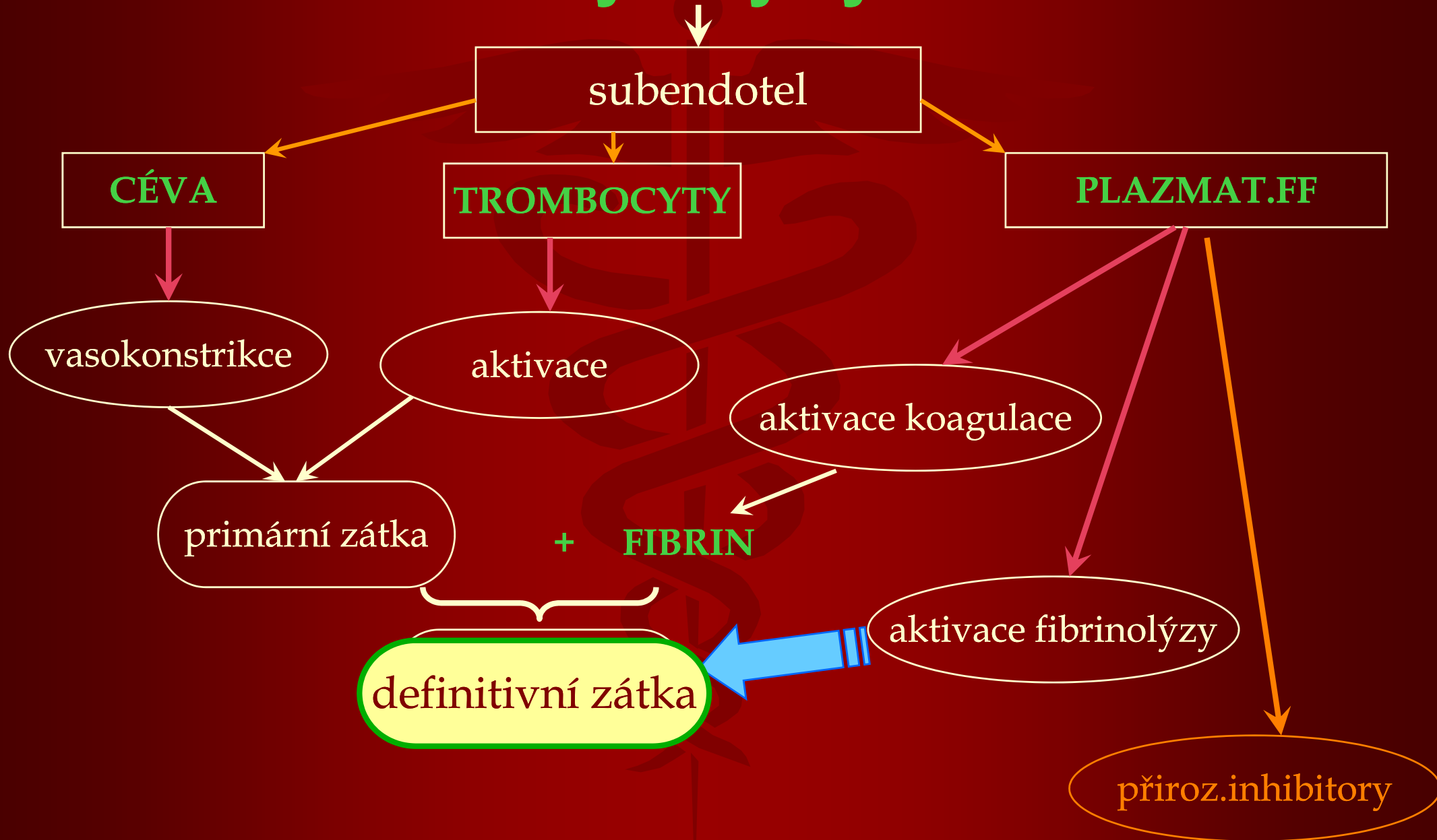
Hemokoagulace



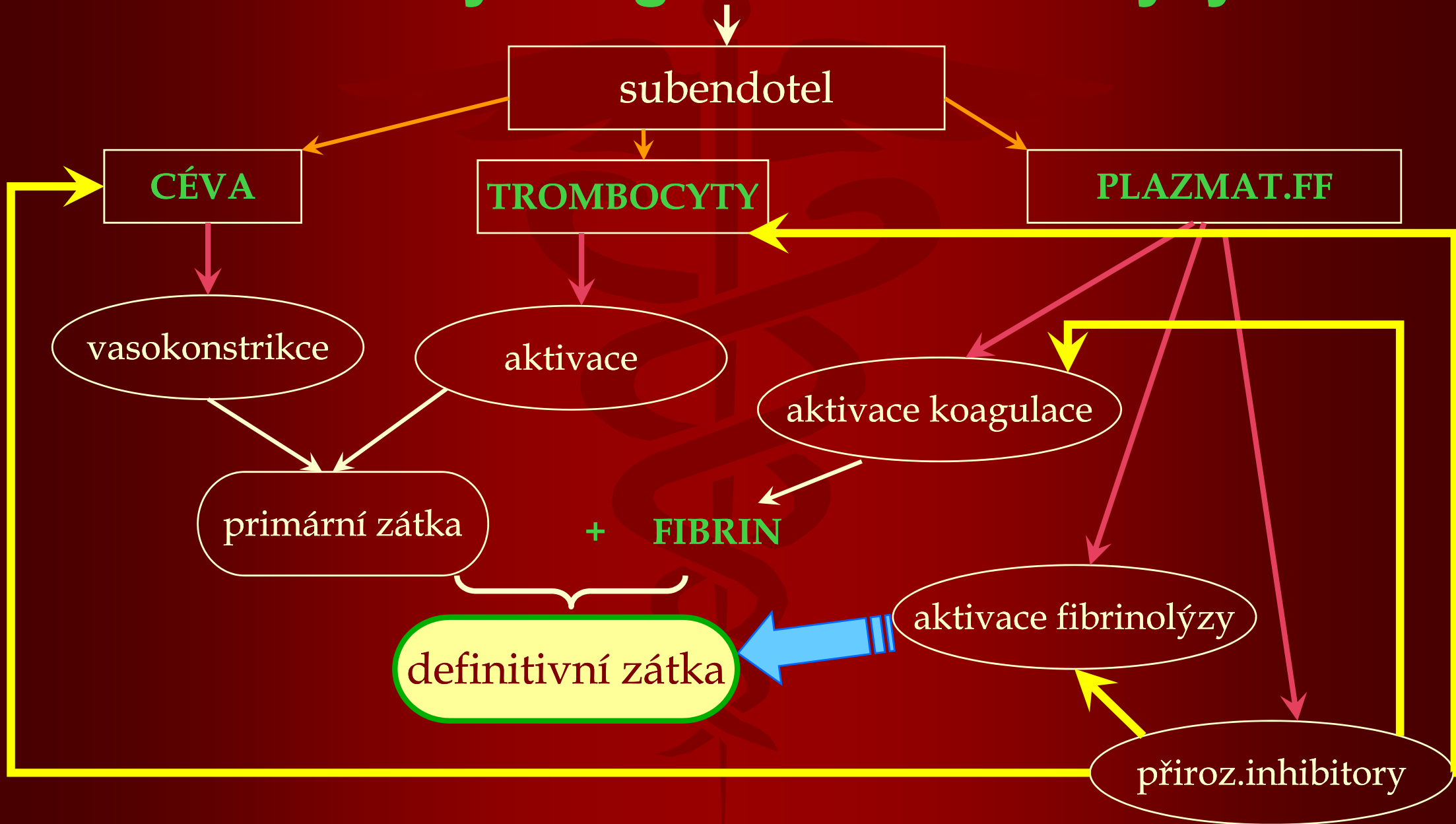
Hemokoagulace



Fibrinolytický systém



Inhibitory koagulace a fibrinolýzy



Hemostáza

➤ primární

↳ vasokonstrikce

ihned

↳ adheze trombocytů

sekundy

↳ agregace trombocytů

sekundy až minuty

➤ sekundární (koagulace)

↳ aktivace koagul. faktorů

sekundy až minuty

↳ tvorba fibrinu

minuty

➤ fibrinolýza

↳ aktivace

minuty

↳ lýza krevní sraženiny

hodiny

Poranění = poškození endotelu



Vasokonstrikce:

- způsobena střední vrstvou cévy:
 - hladká svalovina
 - elastická vlákna
- především reflexní reakce
- dočasná

Endotel

- je aktivní jednovrstevná buněčná výstelka všech cév, kapilár a serózních dutin
- je místem kontaktu látek a buněk kolujících v krvi a látek navázaných na povrch endotelu
 - ↳ tyto buď cirkulují v krvi a na endotel se váží nebo
 - ↳ jsou endotelem syntetizovány
- je důležitým zprostředkovatelem a regulátorem látkové výměny mezi krví, lymfou a tkáněmi

Endotel

Cévní tonus

- endotelové buňky kapilár uvolňují látky, které regulují prokrvení orgánů, způsobují převážně vasodilataci, např.:
 - metabolity kyseliny arachidonové, např. prostacyklin PGI_2 - tromboxan A_2
 - NO - endotelin
 - bradykinin (potencuje uvolnění NO)

Endotel - hemostáza

Význam pro hemostázu

- EB na jedné straně podporují srážení (vWF)
- na druhé straně produkují faktory aktivní ve fibrinolýze
- v klidovém fyziologickém stavu převažují látky působící proti krevnímu srážení

V endotelu jsou syntetizovány

- Von Willebrandův faktor
- Platelet Derived Growth Factor (růstový faktor odvozený z destiček)
- destičky aktivující faktor (PAF)
- prostaglandiny, prostacyklin
- glykoproteiny, fibronektin, trombospodin
- některé typy prokolagenu
- Endothelium Derived Relaxing Factor (z endotelu odvozený faktor = NO)
- endotelin-1 a další

Endotel - vlastnosti

Antitrombotické

- vazodilatace
- modulující zánět
- potlačující růst
- prostacyklin - PGI₂
- NO = EDRF
- aktivátory plazminogenu
- proteoglykany (heparan)
- trombomodulin
- protein C, S

Prokoagulační

- vazokonstrikce
- podporující zánět
- podporující růst
- tkáňový faktor
- PAF
- vWF
- PAI

Markery aktivace a poškození endotelu

➤ TF

↳ exprimovaný na povrchu endotelu odráží stupeň jeho stimulace

➤ t-PA, PAI-1

Uvolnění při

➤ trombomodulin

poškození

endotelu

➤ vWF

Krev

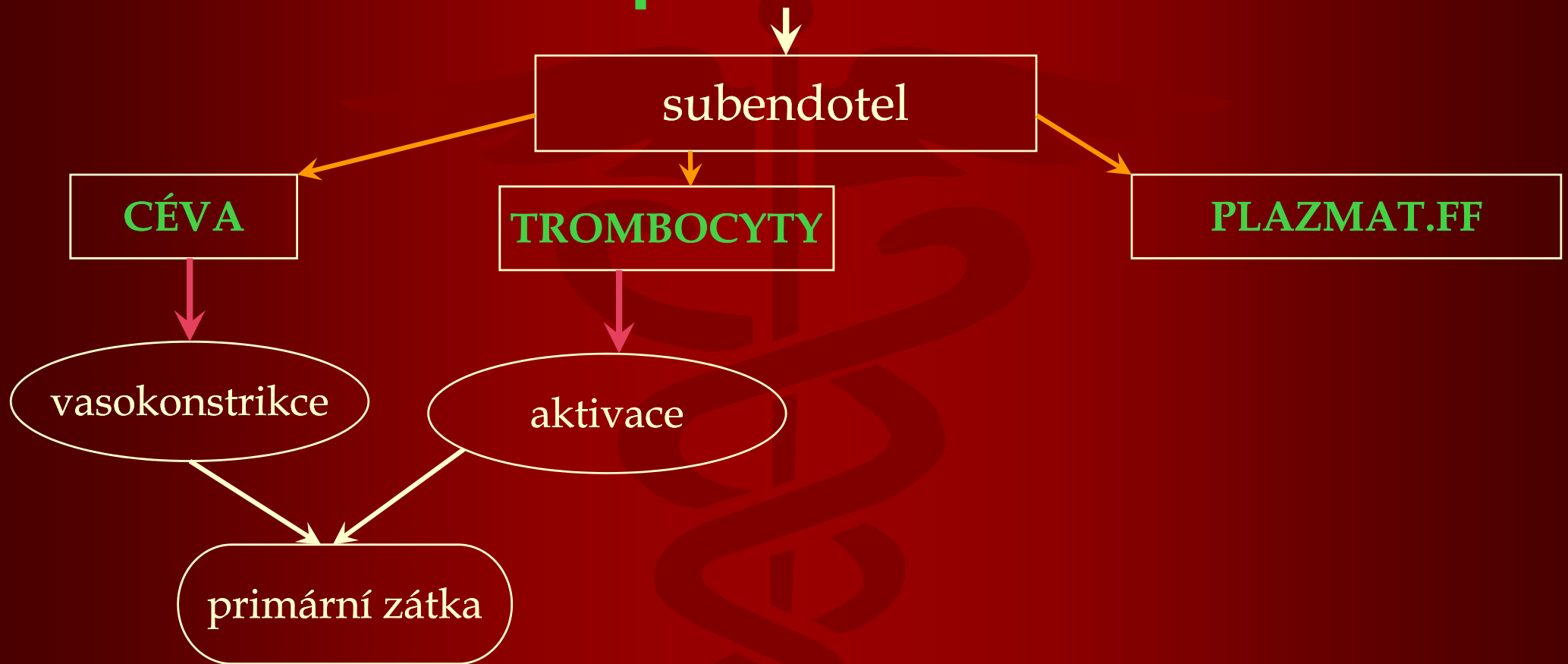
Tekutá část – plazma

- Voda
- Organické látky
 - ↳ Bílkoviny
 - ↳ Sacharidy
 - ↳ Tuky
 - ↳ Hormony
 - ↳ Vitaminy
 - ↳ Enzymy
- Anorganické látky

Buňky – krevní tělíska

- Červené krvinky
- Bílé krvinky
- Krevní destičky

Poranění = poškození endotelu



Krevní destičky

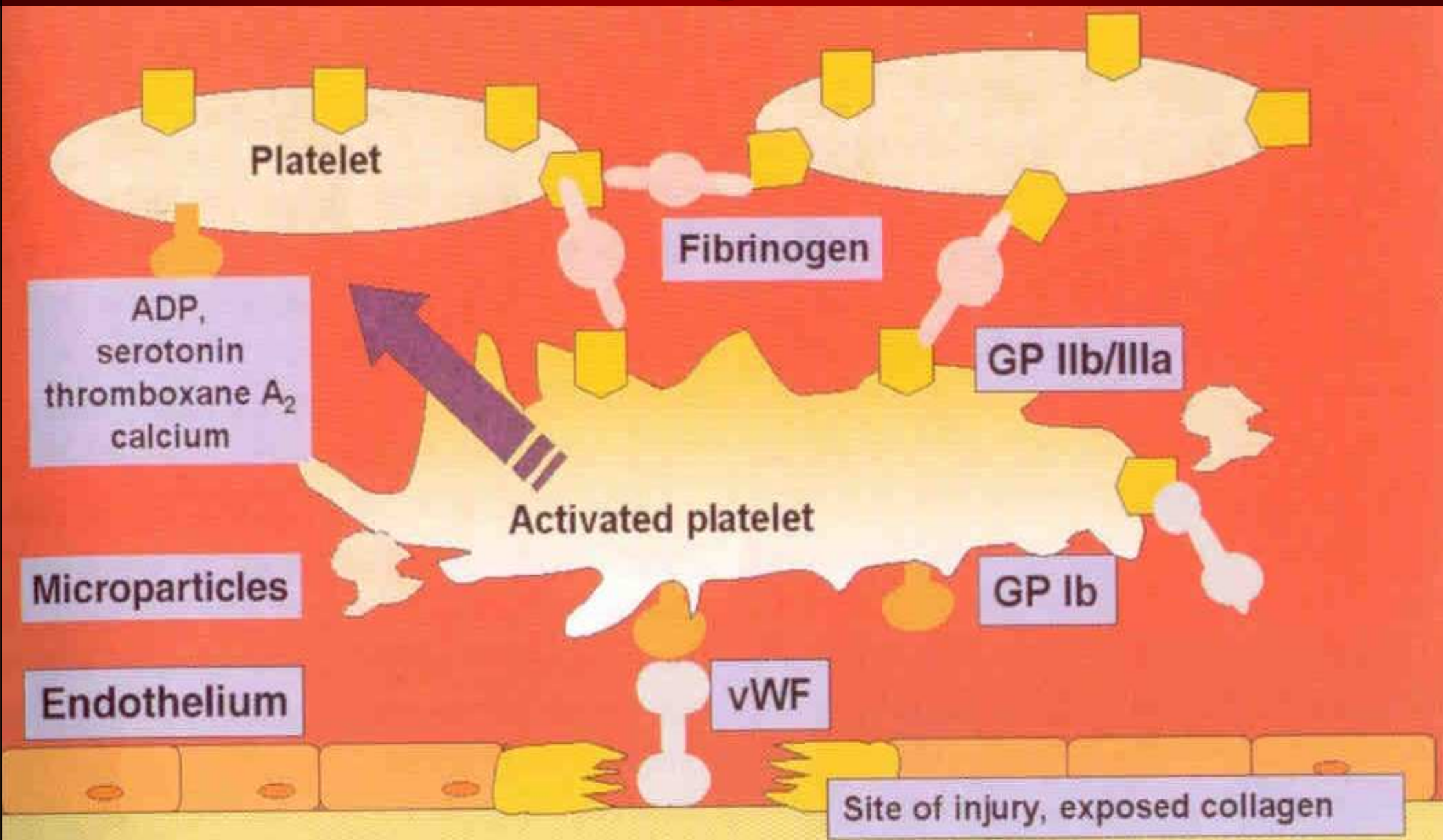
Funkce trombocytů při zástavě krvácení je dvojí:

- tvorba primární krevní zátky,
- tzv. prokoagulační
 - ↳ tj. poskytnutí povrchů = fosfolipidů pro průběh koagulačních dějů - PF3
 - ↳ vazba na vit. K závislých faktorů: FII, VII, IX, X
 - ↳ vazba kofaktorů: FV, VIII
 - ↳ vazba a aktivace: FXI, XII

Účast destiček v hemostáze:

- ⇒ adheze
- ⇒ změna tvaru
- ⇒ uvolňovací reakce
- ⇒ agregace
- ⇒ přesun negativně nabitých fosfolipidů na povrch
- ⇒ retrakce

Primární hemostáza



Granula trombocytů

α -granula

- DF4, β TG – neutralizace GAG
- vWF – adheze, agregace
- FV – prokoagulačně
- PAI-1 – inhibice fibrinolýzy
- PDGF – růst tkáně, hojení
- trombospondin – agregace
- fibrinogen – agregace
- fibronectin – adheze
- PS – inhibice koagul. FF

denzní granula

- ATP, ADP - agregace
- Ca - agregace
 - vazba koagul. FF
 - tvar-změna, retrakce
- serotonin - vasokonstrikce
- P-selektin – váže leukocyty

Adheze

- přilnutí krevních destiček na jakýkoliv povrch s výjimkou dalšího trombocytu
- vedle trombocytů se na ni podílejí
 - ↪ struktury subendotelu
 - ↪ **plazmatické adhezivní proteiny: vWF, fibronectin**
 - ↪ hemodynamické změny (smykové rychlosti, množství a viskozita krve, velikost a tvar cév).
- adheze je přímo lineárně závislá na počtu trombocytů

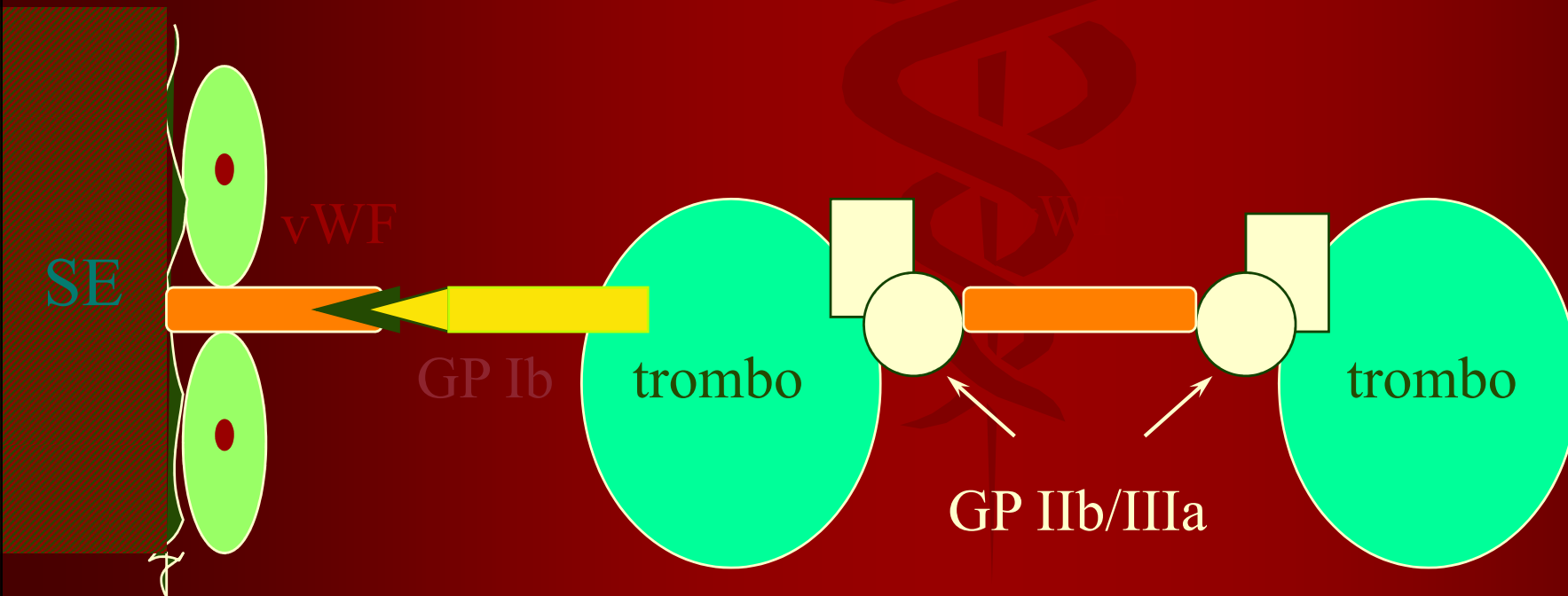
Von Willebrandův faktor

- je adhezivní protein
- **tvořen v endotelu a megakaryocytech**
- hraje klíčovou roli v primární hemostáze a koagulaci
- zralý vWF představuje sérii multimerů od 500 kD až přes 10.000 kD, každý s komplexní strukturou
- cirkulující vWF se váže s FVIII

vWF - primární hemostáza

Multimery o vysoké molekulové hmotnosti

- adheze trombocytů k subendotelovým strukturám prostřednictvím GP Ib
- agregace vazbou na aktivovaný GP IIb/IIIa



vWF - funkce v koagulaci

Multimery všech molekul. hmotností

- váže a stabilizuje FVIII (ochrana před proteolytickou degradací)
- lokalizuje FVIII v místě poruchy cévní stěny
- uvolňuje FVIII do oběhu
- efekt kofaktoru při aktivaci FVIII trombinem

Adheze (ale i trombin) navodí s aktivací receptorů komplexní aktivaci trombocytů

- ztráta diskoidního tvaru, tvorba pseudopodií (vývěžků)
- centralizace granulí a přeměna cytoskeletonu
 - ↳ uvolnění působků z granulí (sekreční fáze):
 - ↳ ADP, PDGF, PF4, β TG, fibrinogen a další
- metabolismem kyseliny arachidonové vzniká TXA2
 - ↳ výrazný stimulátor agregace trombocytů
- aktivace receptorů GP IIb/IIIa
- přesun negativně nabitých fosfolipidů na povrch
 - ↳ umožňují vazbu koagulačních faktorů v místě krvácení

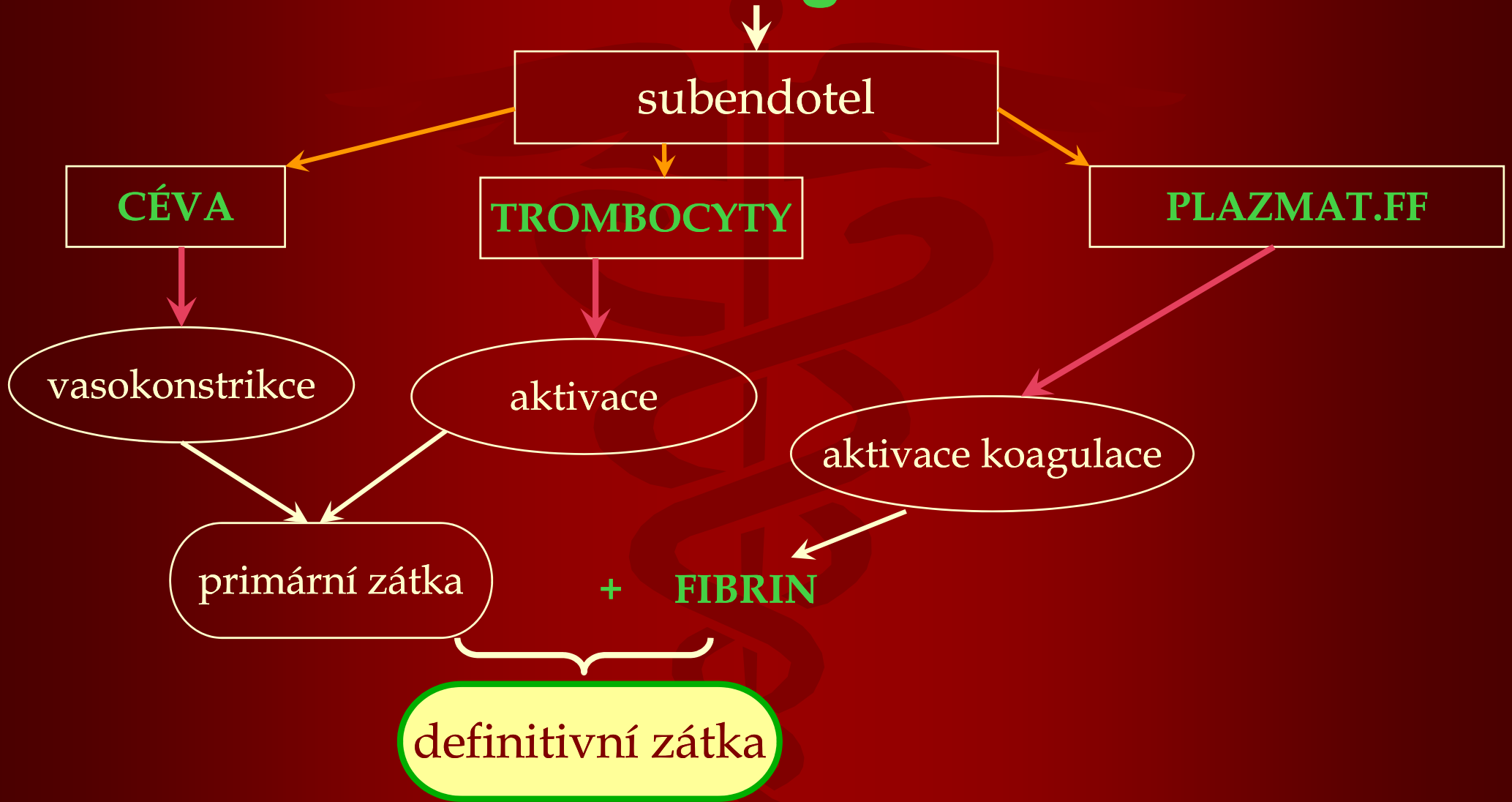
Agregace

- je vzájemné spojení destiček mezi sebou
- probíhá s pomocí specifického komplexu závislém na Ca^{2+} , GP IIb/IIIa a fibrinogenu
 - fibrinogen slouží jako můstek mezi destičkami; nereaguje s klidovými destičkami
- za vysokých smykových rychlostí je adheze a agregace trombocytů zprostředkována vazbou vWF na GPIIb/IIIa a to i v nepřítomnosti fibrinogenu
 - primární agregace
 - ADP z porušených buněk a tkání - reverzibilní
 - sekundární agregace
 - ADP a TXA_2 z trombocytů – ireverzibilní
- vznik bílého destičkového trombu

Retrakce

- = smrštění vytvořené krevní zátky
- jedná se o destičkovou funkci, která je analogní kontrakci svalů
- slouží k podpoře uzavření rány
- pro retrakci jsou destičky nezbytné
- pseudopodia destiček **přilnou k fibrinovým vláknům** a retrakce kontraktilních bílkovin destiček (tj. „zatažení“ pseudopodií) **vyvolá retrakci sraženiny**

Hemokoagulace



Plazmatický koagulační systém

Proenzymy

- serinové proteázy: FII, VII, IX, X, XI, XII, PK
PLG, tPA, uPA, PC
- transglutaminázy: FXIII

Kofaktory:

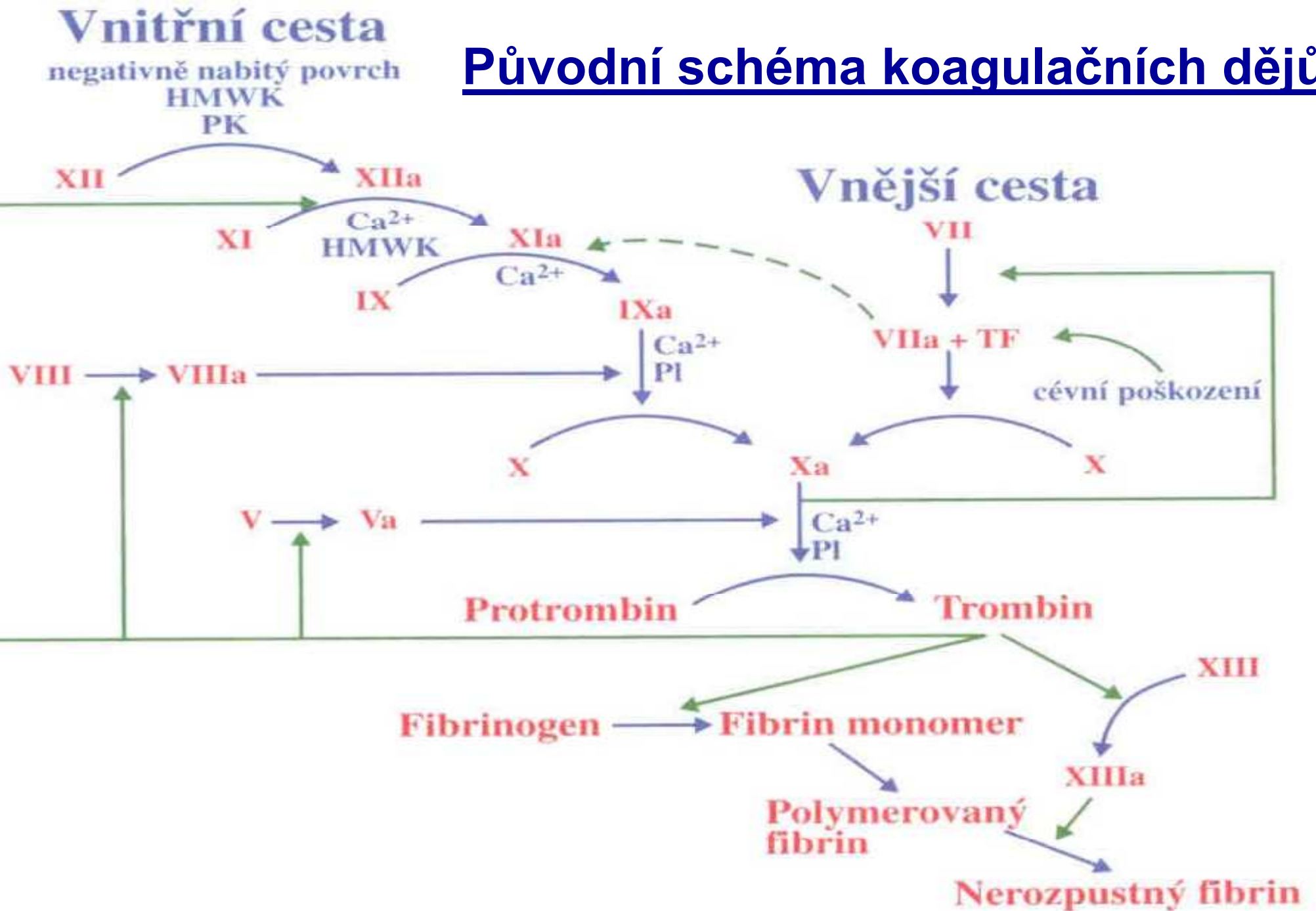
- plazmatické: FV, VIII, HMWK
PS
- buněčné: TF
TM, EPCR

Substrát: fibrinogen

Regulační proteiny: AT III, HC II, C1inh, α 2AP, PAI-1,2,3
PC, TFPI, α 2MG

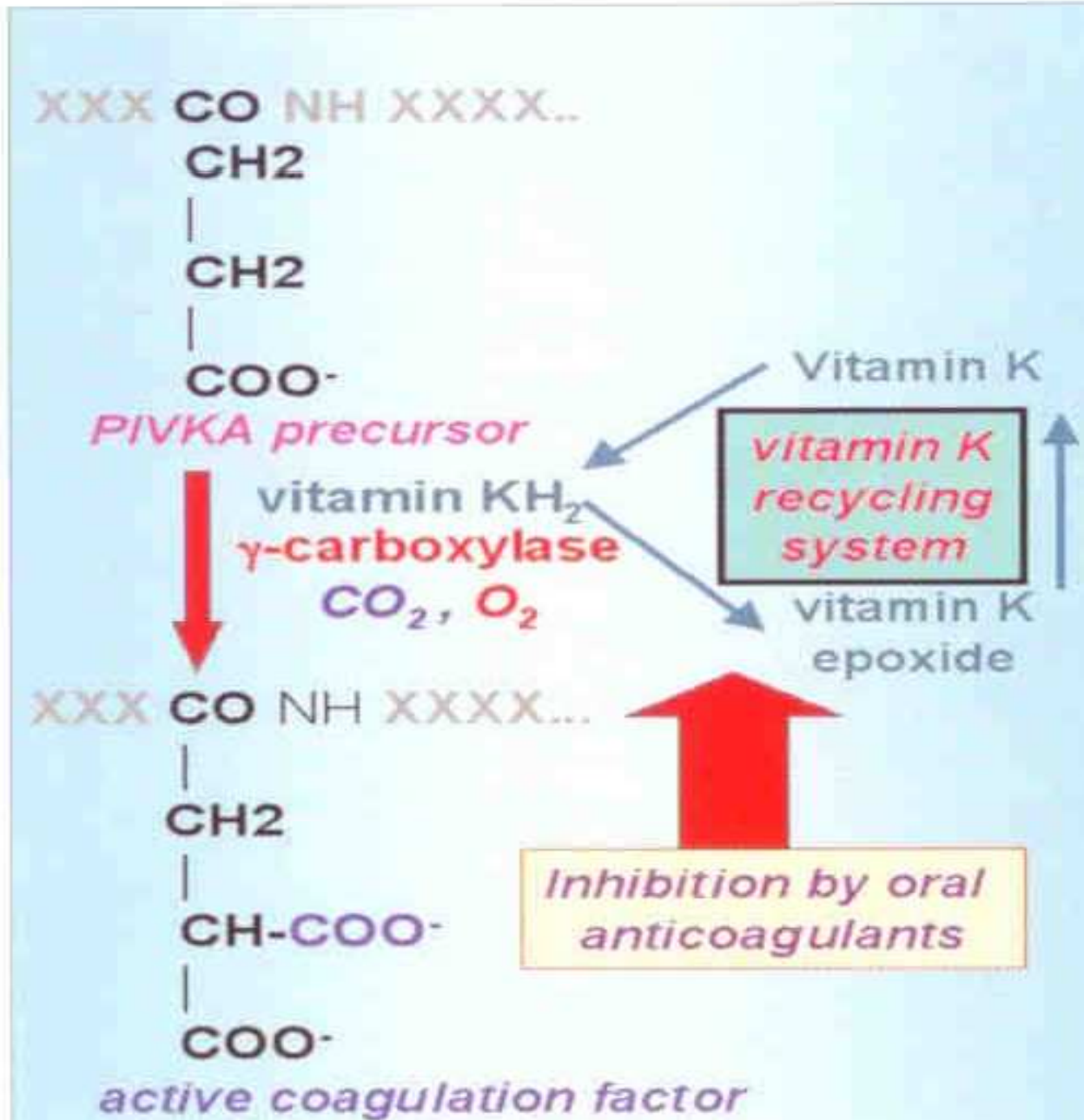
Fosfolipidy (negativně nabité): fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin
Ca²⁺

Původní schéma koagulačních dějů

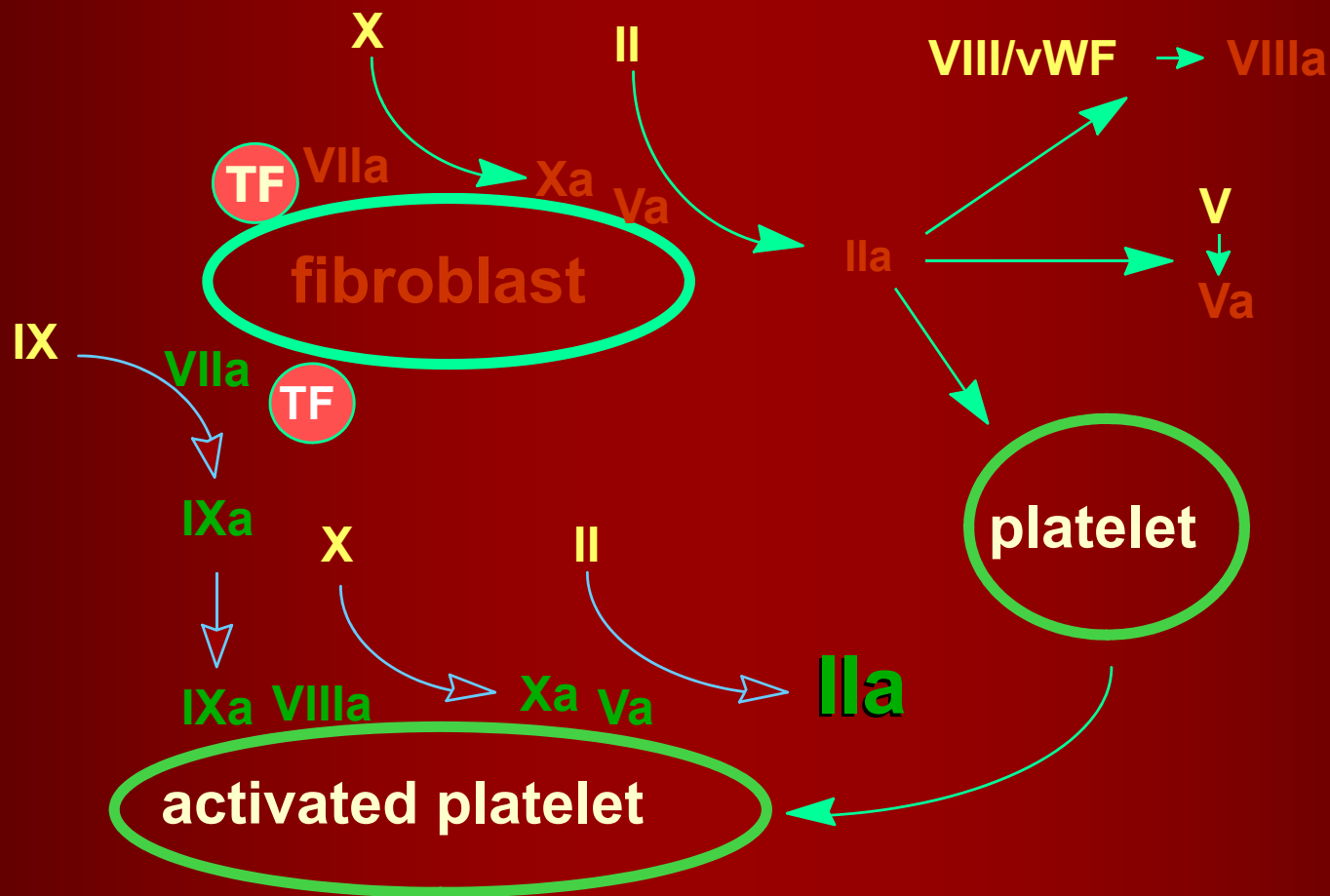


Koagulační faktory vitamín K dependentní

- FII, FVII, FIX, FX
- karboxylaxe glutamové kyseliny
- nutná k vazbě na fosfolipidy přes Ca můstky
- koagulační faktory jsou tvořeny, ale nejsou koagulačně aktivní - PIVKA formy (Protein Induced by Vitamin K Absence / Antagonist)



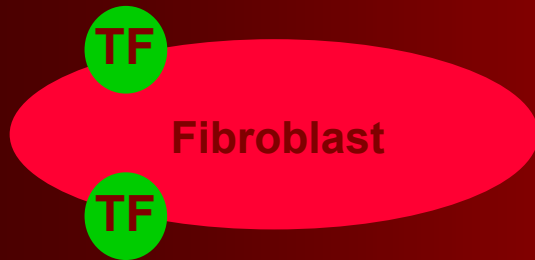
Současný model koagulace



Hemostáza a tkáňový faktor (TF)

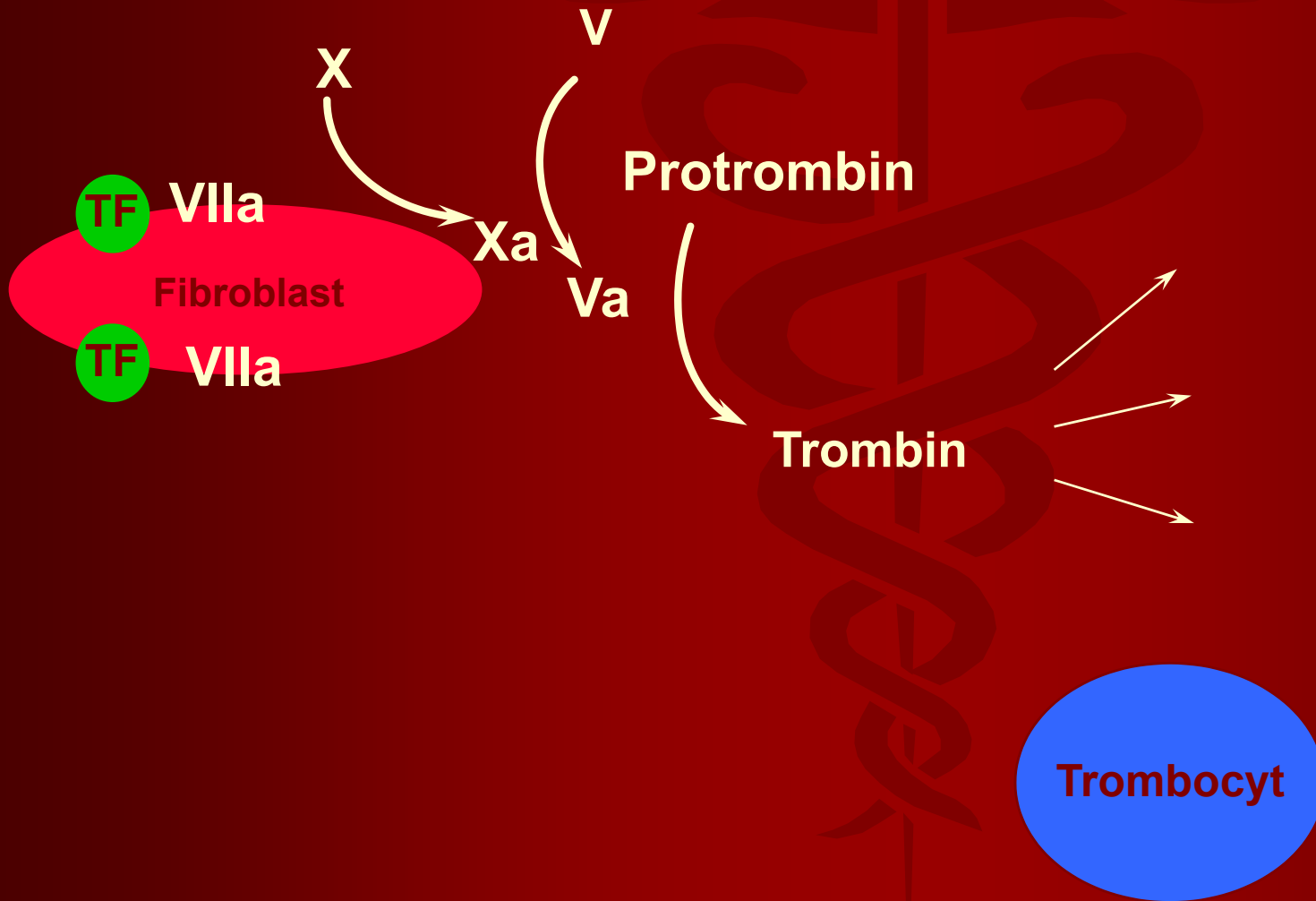
- transmembránový glykoprotein
 - ↳ v subendotelu na fibroblastech a svalových buňkách
 - ↳ fyziologicky na všech buňkách mimo cévní řečiště
 - ↳ za patologických stavů i na monocytech a endotelu
- tkáňový faktor není za normálních okolností vystaven působení cirkulující krve
- hemostázu zahajuje tvorba komplexu mezi TF a FVIIa
- tvorba komplexů TF-FVIIa na povrchu buněk nesoucích TF vede k aktivaci FIX a FX

Zahájení (iniciace) koagulace

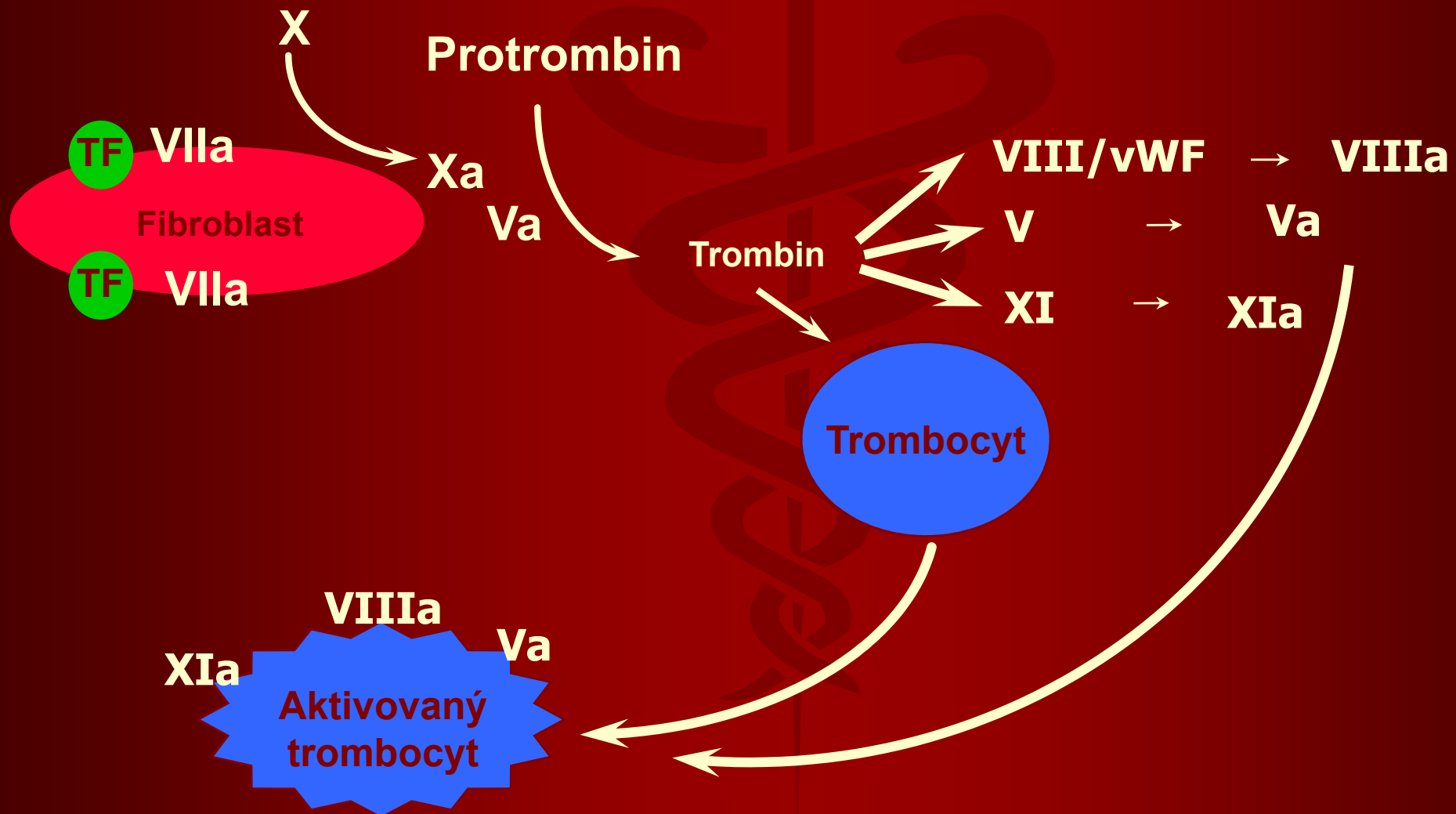


Trombocyt

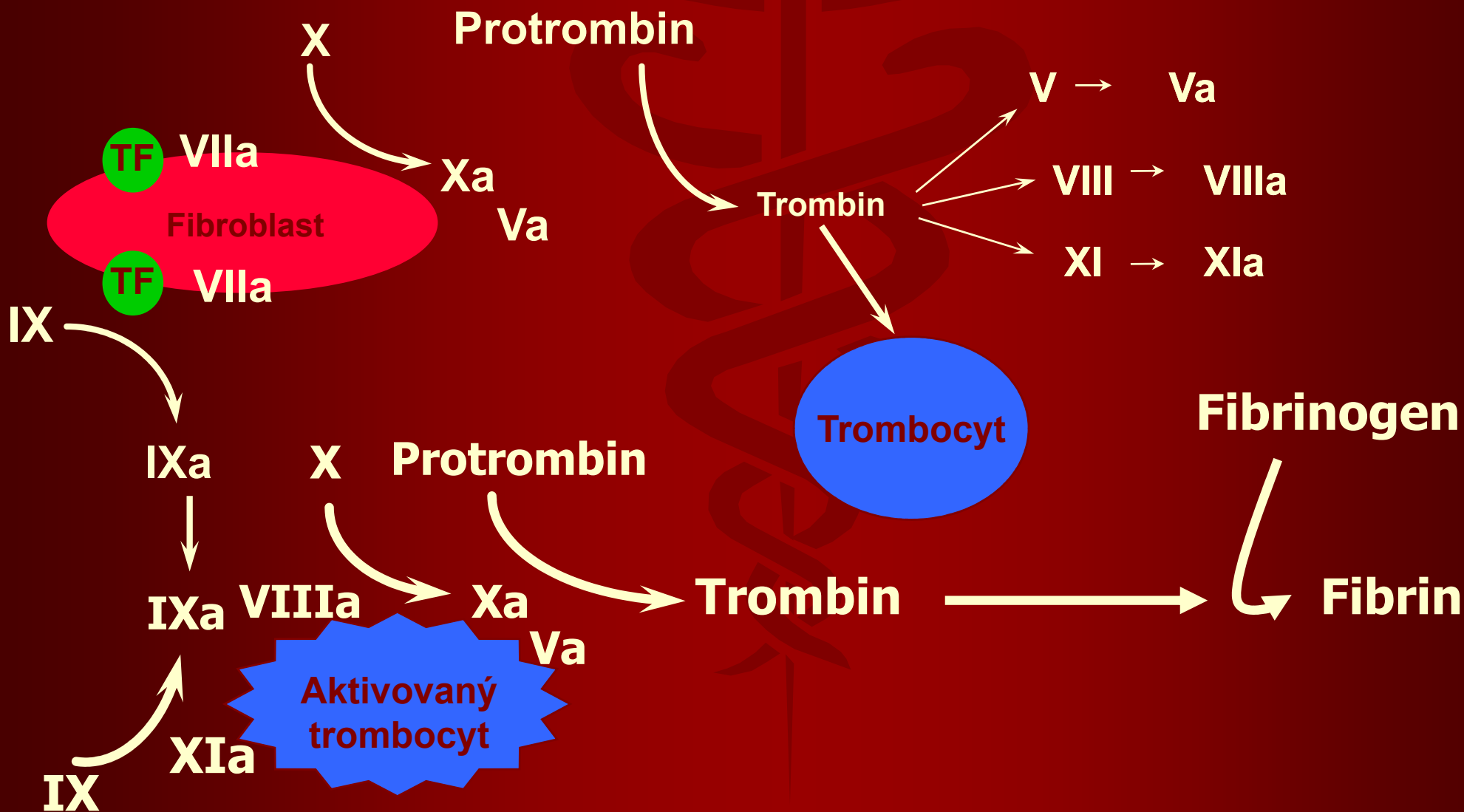
Zahájení (iniciace) koagulace



Fáze aplifikace koagulace (priming= narůstání)



Propagace (šíření, rozmnožení) koagulace



Propagace koagulace

klíčové enzymatické komplexy

➤ Tenáza (vnitřní)

- FIXa
- FVIIIa
- fosfolipidy
- Ca

➤ Protrombináza

- FXa
- FVa
- fosfolipidy
- Ca

Zahájení tvorby trombinu

- Vytvoření iniciálního malého množství trombinu se následně podílí na aktivaci dějů, které zvyšují tvorbu trombinu více než 1000-násobně
 - ↳ **Aktivuje koagulační faktory V, VIII, XI**
- **Pomáhá aktivovat trombocyty** v místě poranění, které následně **poskytují negativně nabitý fosfolipidový povrch** nutný pro další aktivaci koagulačních faktorů

Množství trombinu je rozhodující pro:

Tvorbu dostatečné a pevné fibrinové zátky

Aktivaci FXIII, vedoucí ke stabilizaci fibrinové sítě

Aktivaci TAFI, zajišťující rezistenci fibrinové zátky k fibrinolýze

Trombomodulin a protein C

Trombocyty

(PAR receptory)

FVIII a FV

(zpětnovazebné
zesílení)

TROMBIN

FXIII

(plně stabilizovaná
fibrinová zátka)

FXI

TAFI

(trombinem aktivovaný inhibitor fybrinolýzy)



Protease-activated Receptors

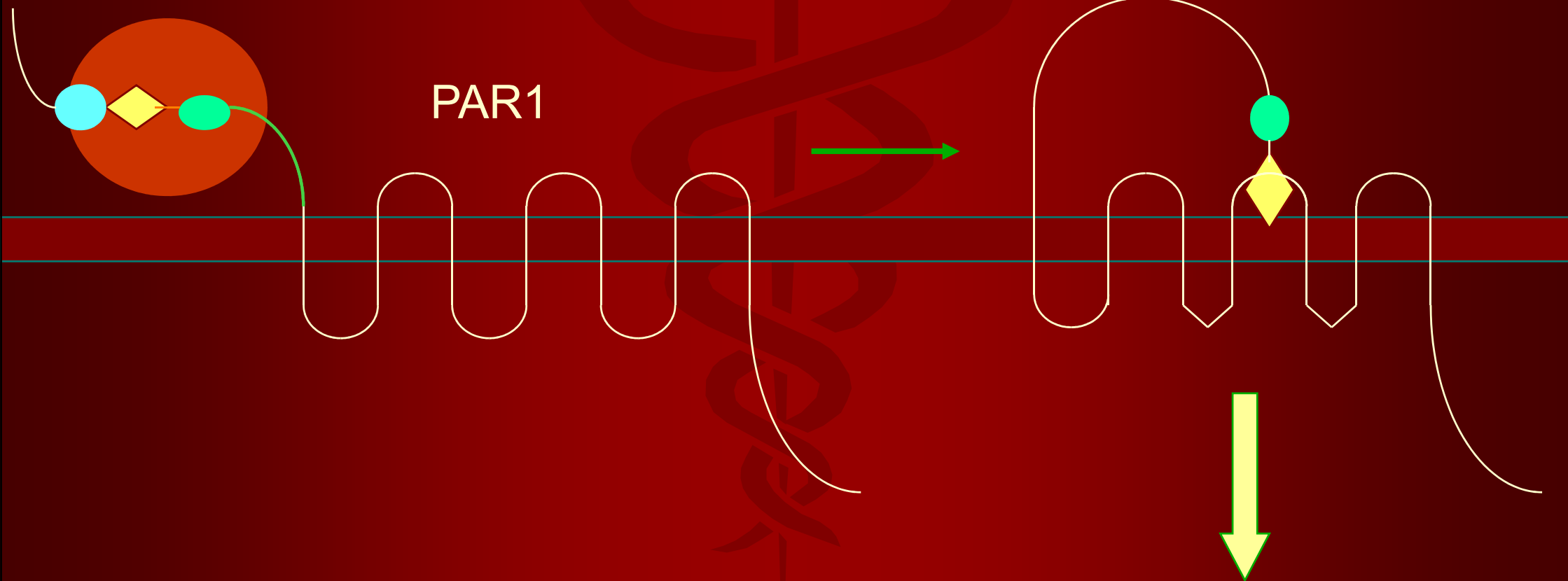
- Receptory spojené s G-proteinem
- Jsou schopné přeměnit EC probíhající proteolytické štěpení v transmembránový signál
- Prototypem skupiny je PAR1
 - ↳ Je aktivován, když trombin odštěpí jeho N-konec
 - ↳ Při této aktivaci se objeví nové N-zakončení, které slouží jako liganda – váže se IC na „tělo“ receptoru a slouží jako transmembránový signál

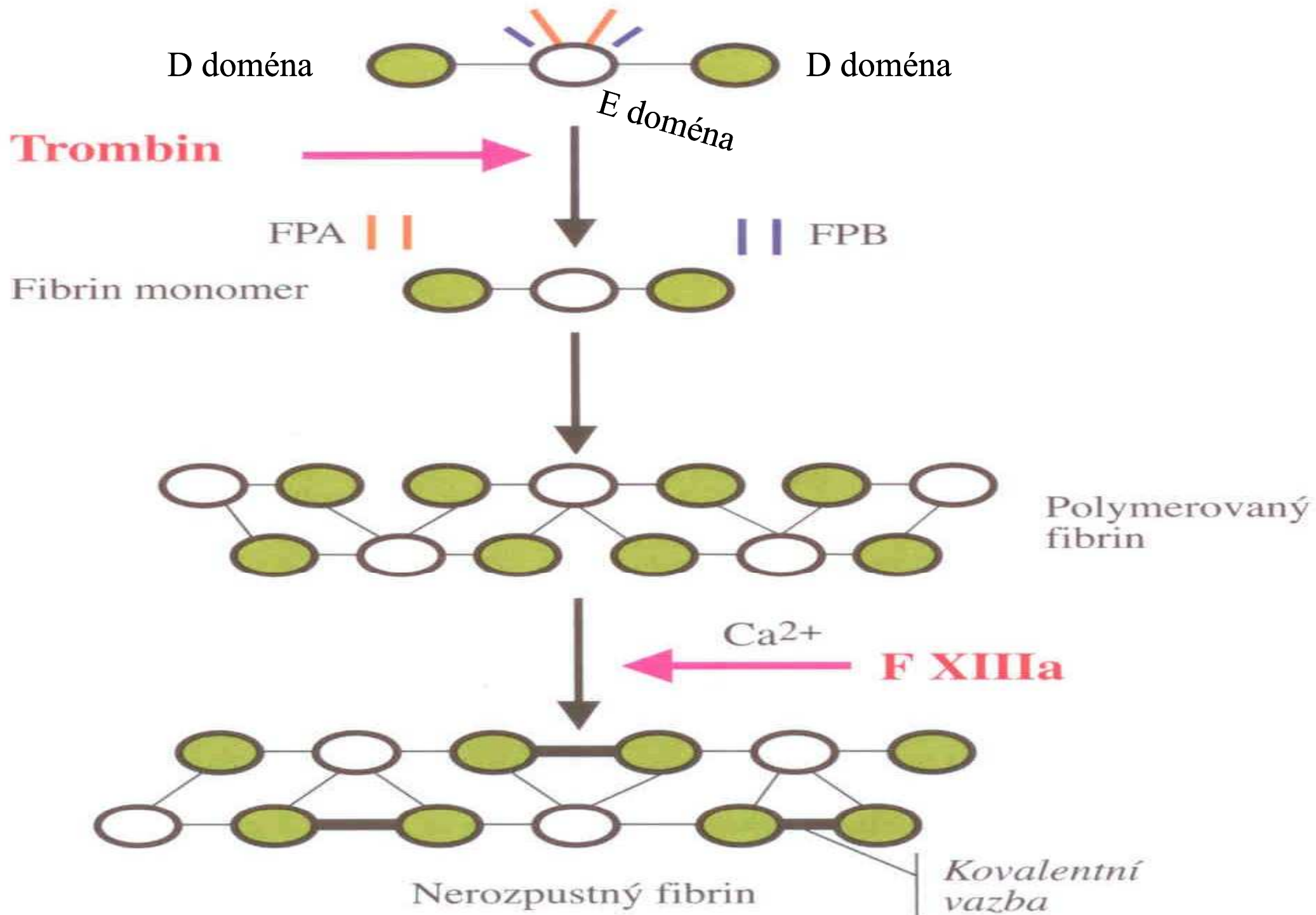
PAR

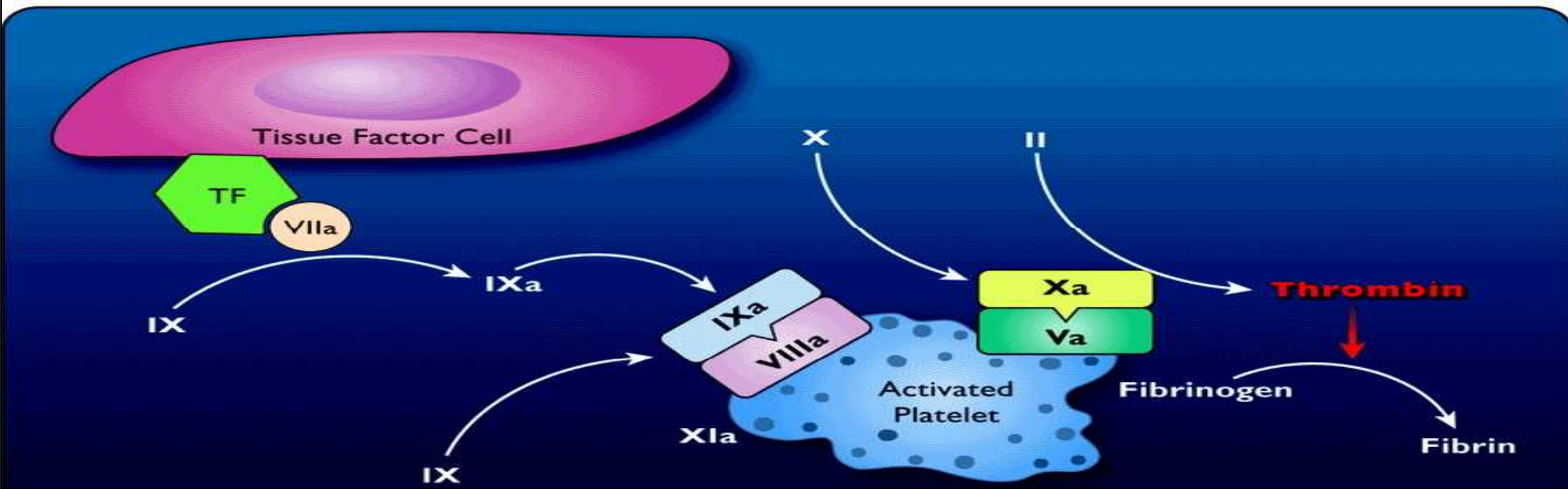
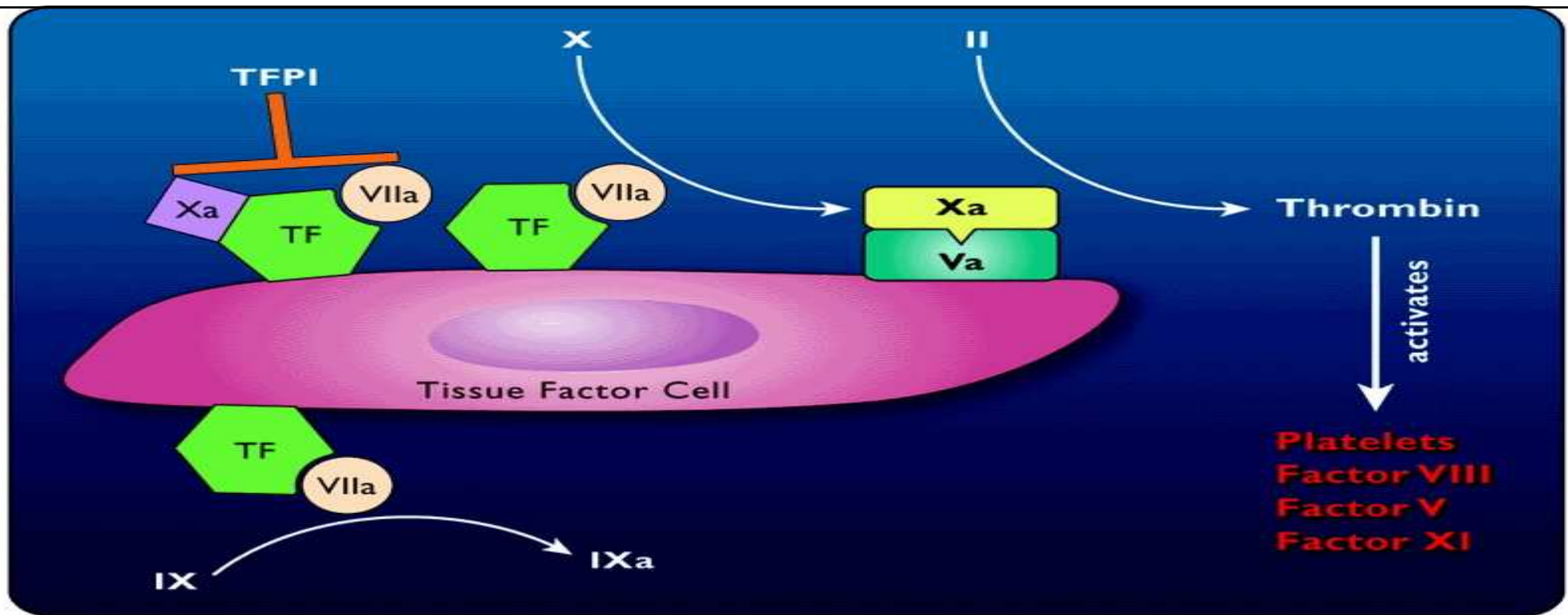
trombin

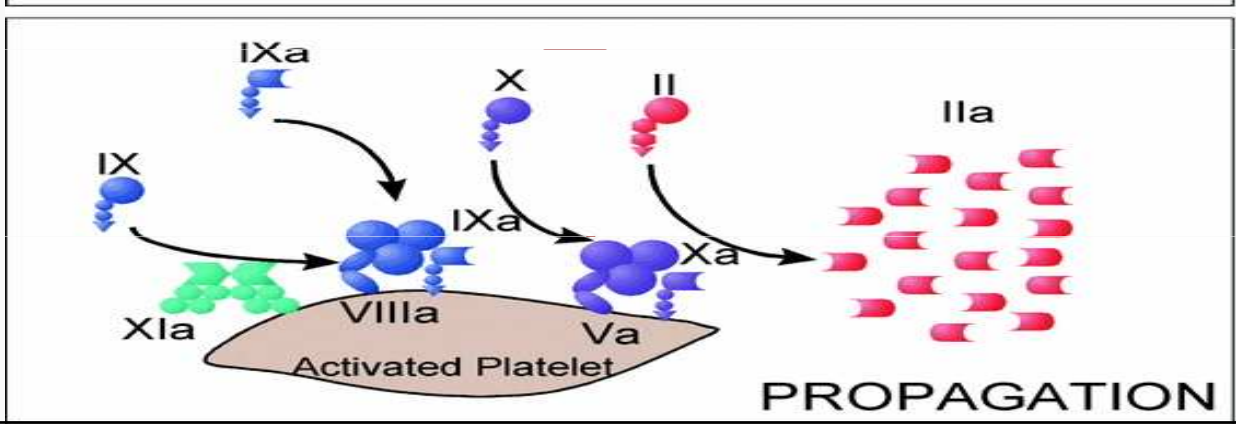
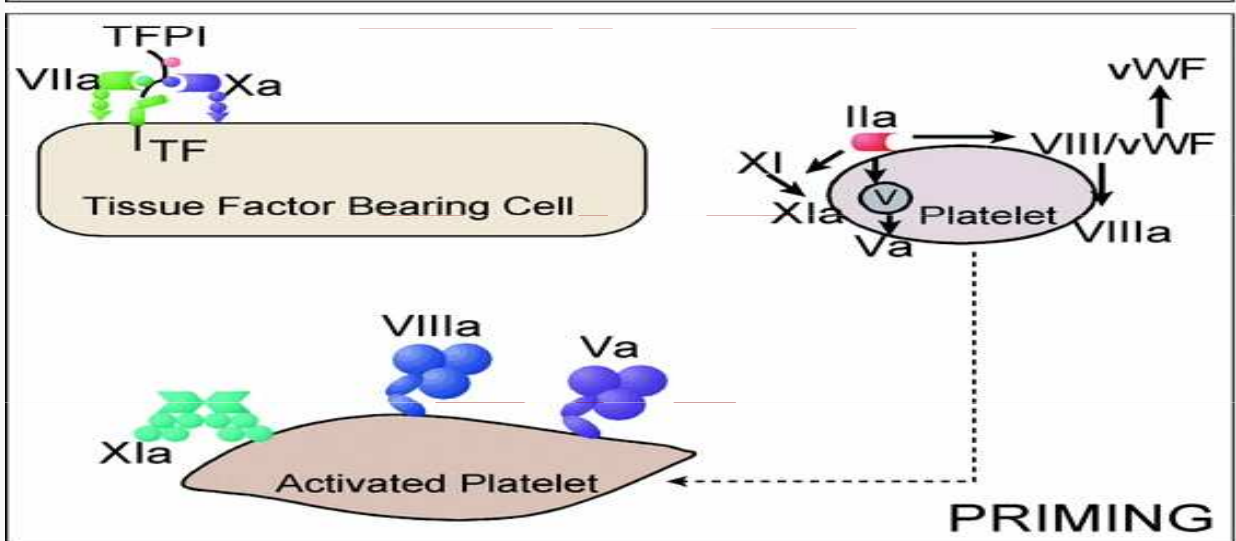
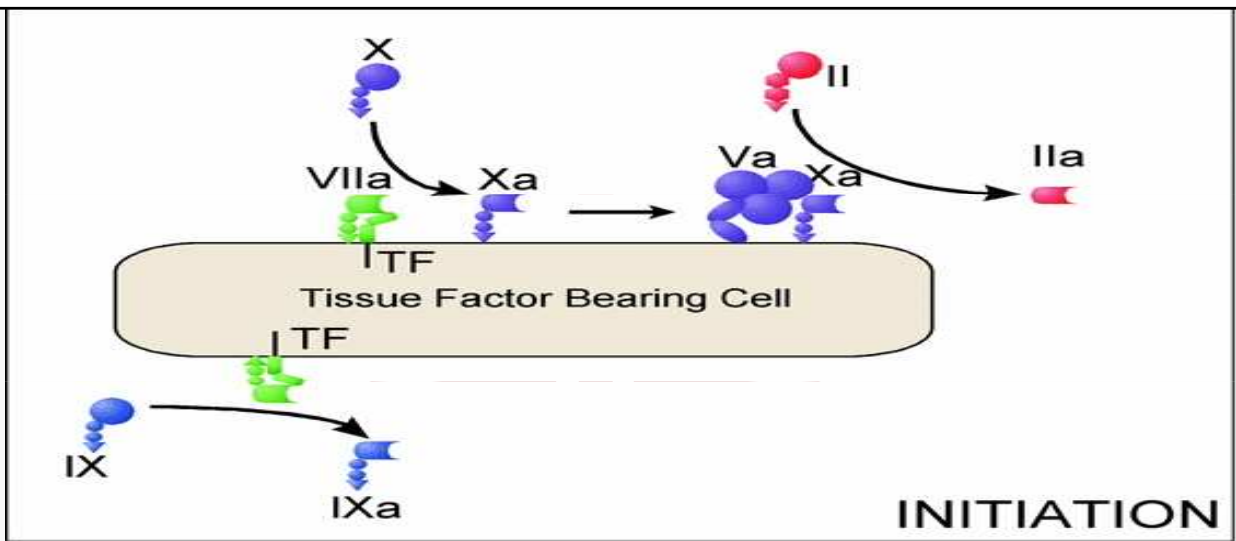
PAR1

PAR1*







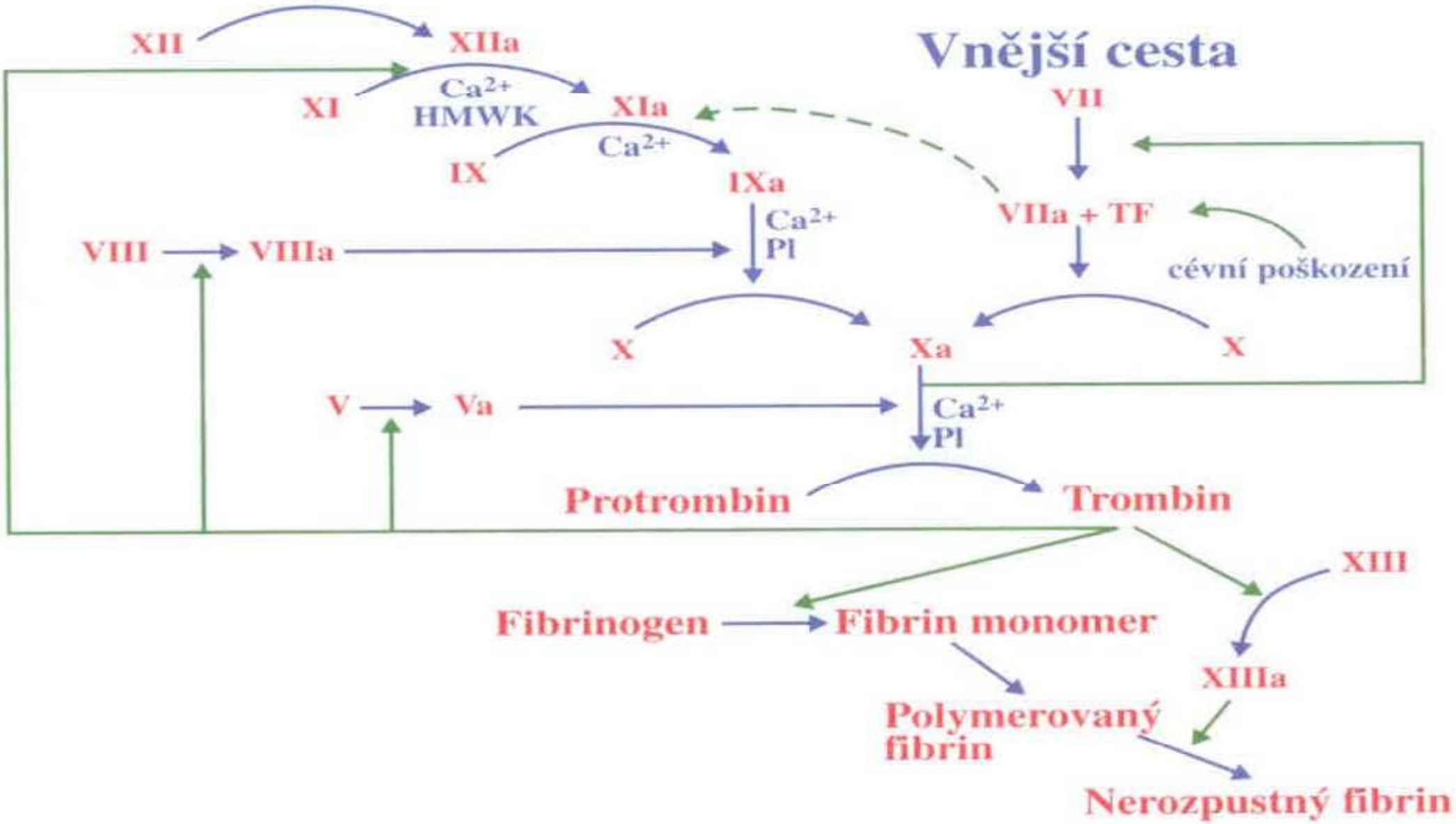


Vnitřní cesta

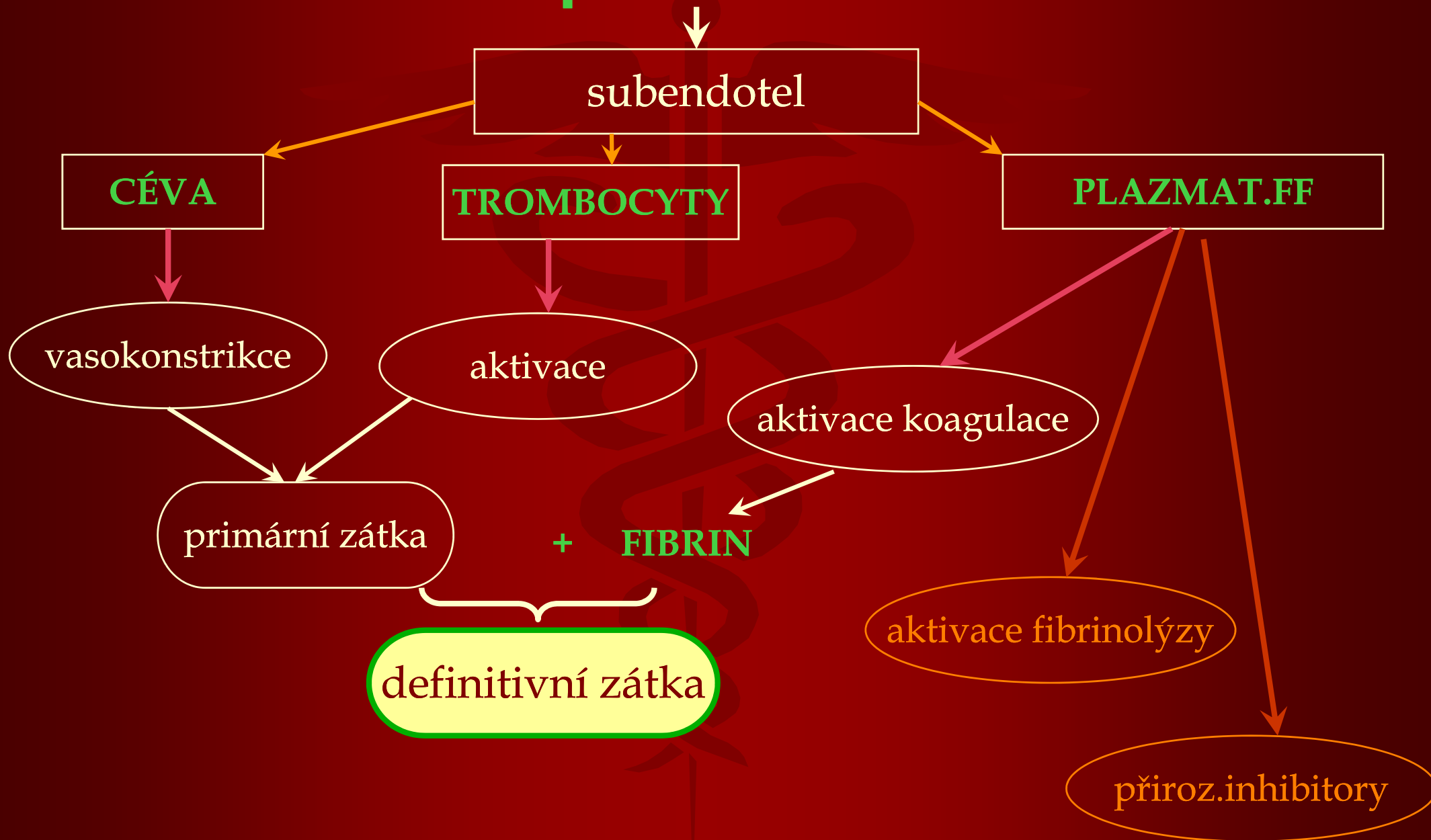
negativně nabitý povrch
HMWK
PK

Původní schéma koagulačních dějů

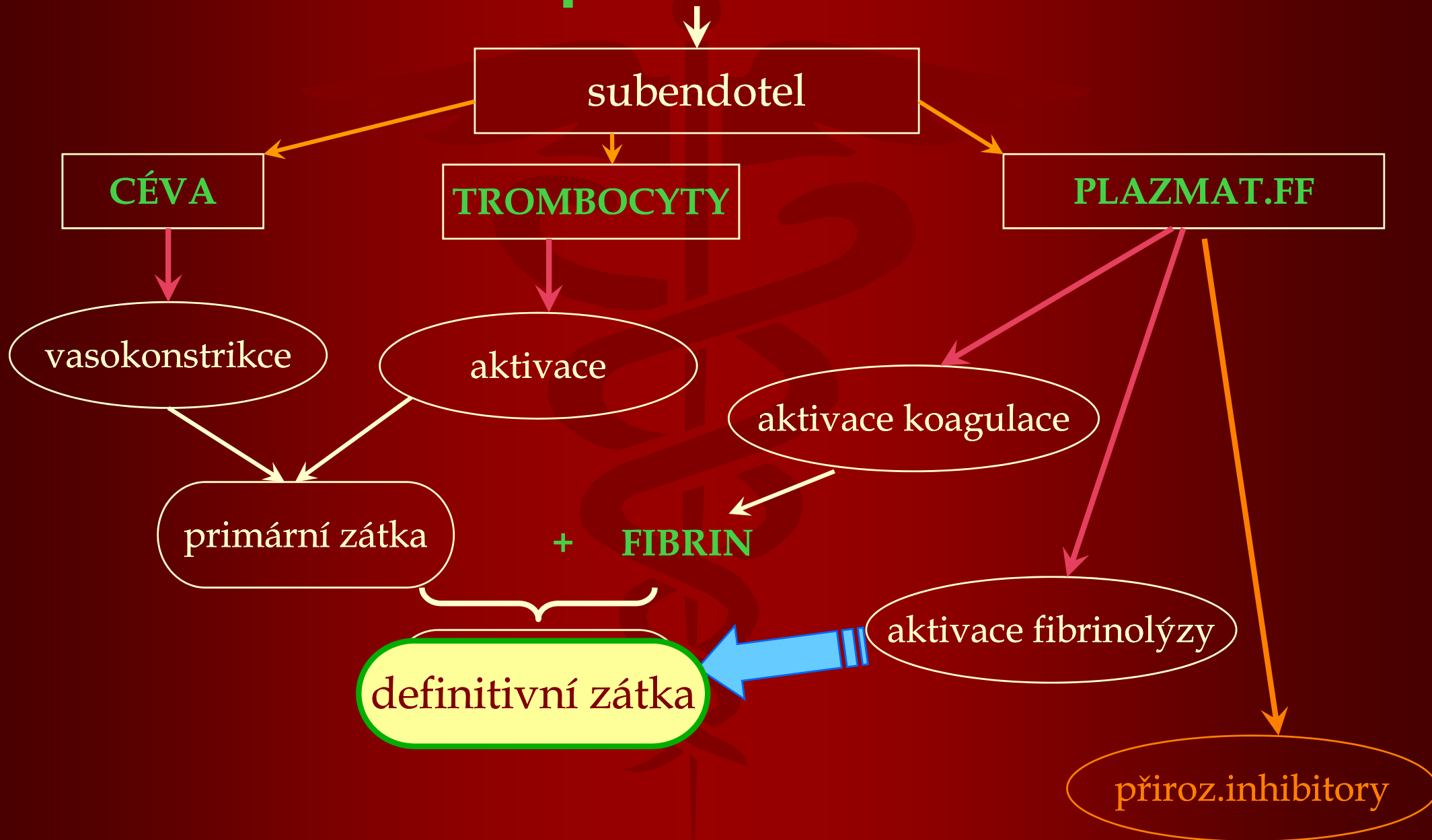
Vnější cesta



Poranění = poškození endotelu



Poranění = poškození endotelu



Fibrinolýza

- patří k základním fyziologickým mechanismům
- má dvě funkce v procesu hemostázy
 - ↳ odstraňuje fibrinová koagula po té, co naplnily svou funkci
 - ↳ limituje tvorbu koagula
- hraje dále roli v procesech zánětu, metastazování nádorů, ateroskleróze, odlučování placenty a embryogenezi

Fibrinolýza

Vnitřní cesta (krevní)

Zevní cesta (tkáňová aktivace)

kalikrein, (FXIIa, FXIa)

tPA, uPA

C1INH, ATIII

PAI-1, PAI-2

Plazminogen

PLAZMIN

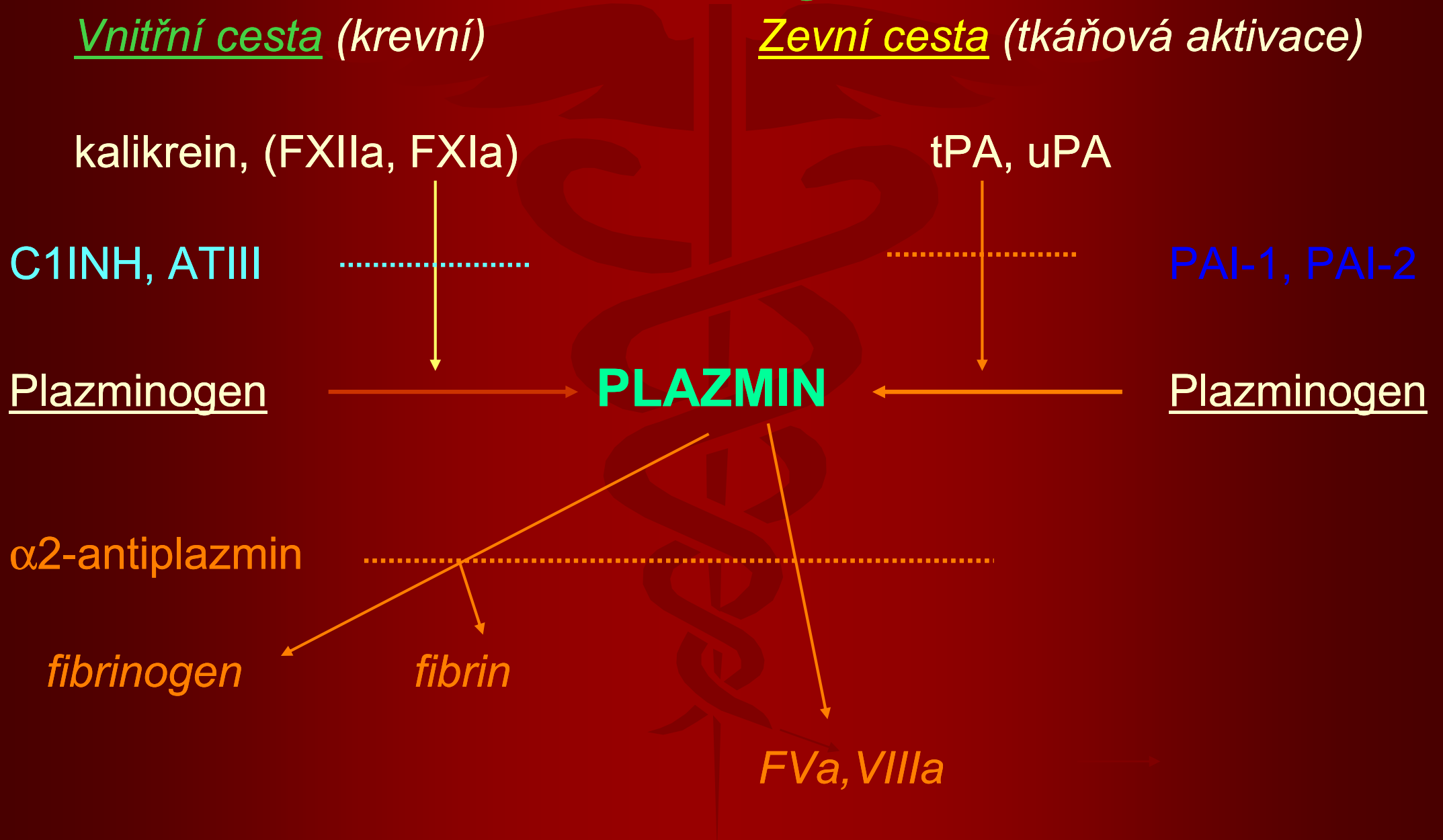
Plazminogen

α 2-antiplazmin

fibrinogen

fibrin

FVa, VIIIa



Aktivace fibrinolýzy

Plazminogen

silné aktivátory

tkáňový aktivátor

plazminogenu - tPA

urokinázový aktivátor

plazminogenu - uPA

slabé aktivátory

kalikrein

fXIIa, f XIa

Plazmin

Aktivace fibrinolýzy - přeměna plazminogenu na plazmin

- Fibrinolýza - po formaci fibrinu dojde k navázání jak plg tak t-PA na jeho povrch
- Následkem této vazby je tvorba komplexu, který výrazně urychluje formaci plazminu
- Na fibrin navázaný plg je výrazně lepším substrátem pro t-PA než volný plg
- Navíc – navázaný plazmin je chráněn před inaktivací α_2 AP

Formy plazminogenu, plazminu

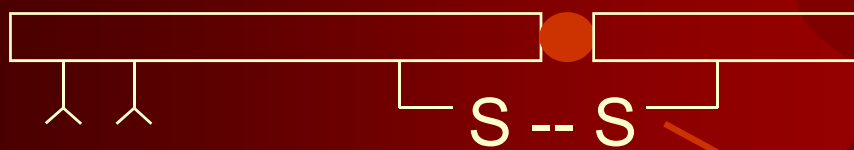
Glu - plazminogen (mol.hmot. 90 000)



plazmin

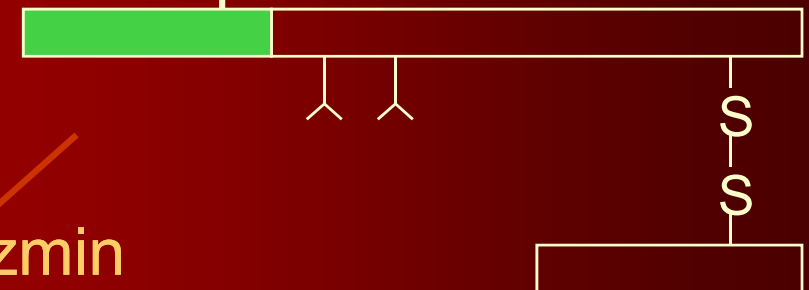
aktivátor plg

Lyz - plazminogen (mol.hmot.82 000)



aktivátor plg

Glu - plazmin



Glu

plazmin

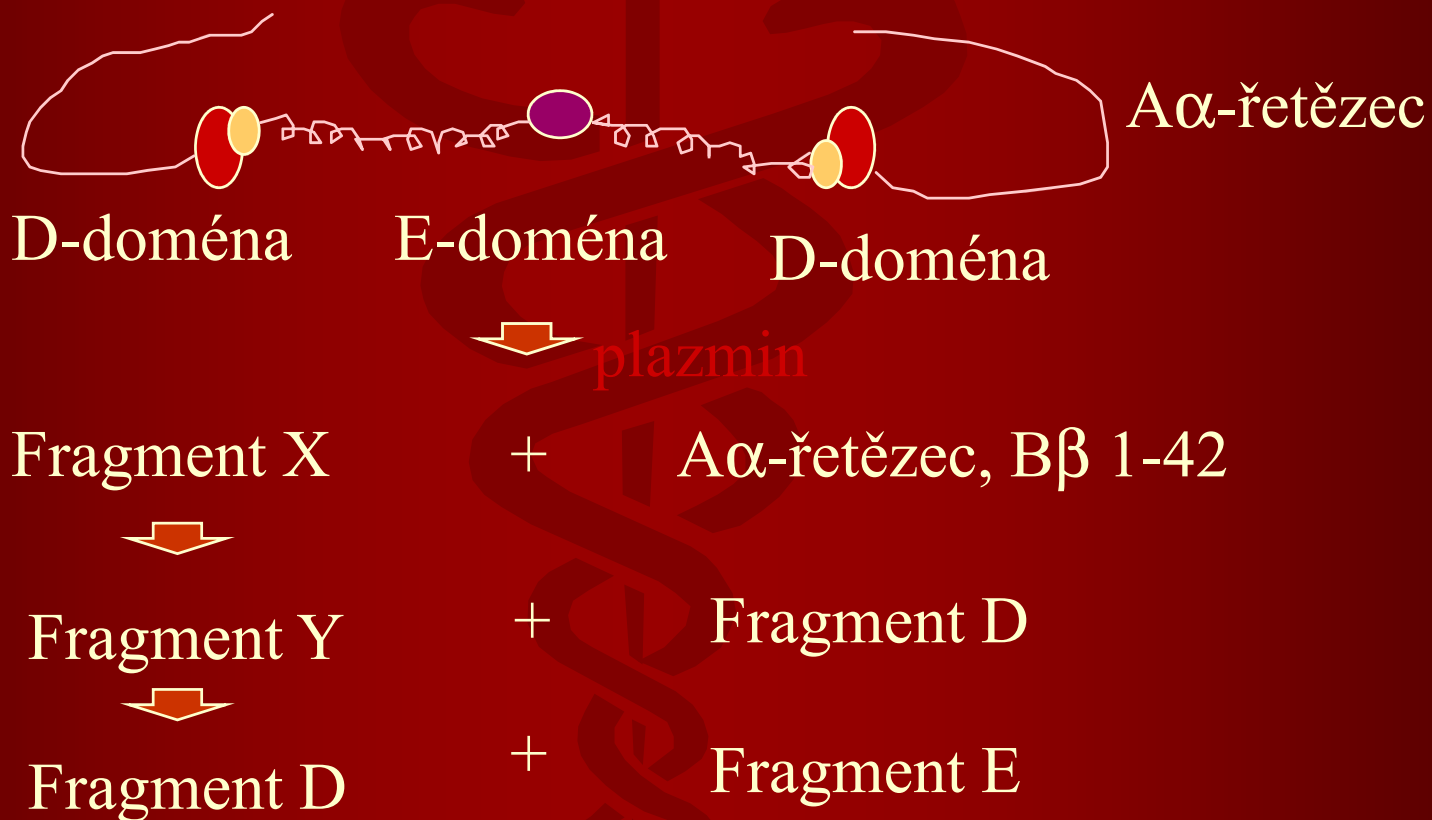
lyz - plazmin



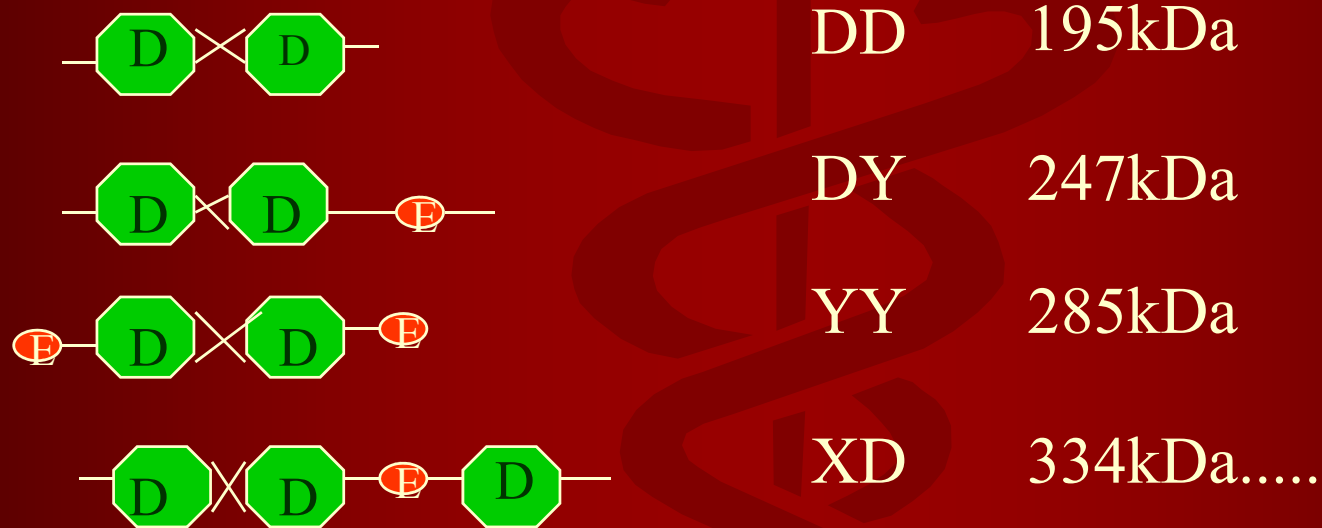
└ vazebné miesto pro lyzin
- S - S - disulfidové můstky



Štěpení fibrinogenu plazminem



Štěpení fibrinu plazminem



Vznikají fibrin degradační produkty, obsahující zkříženou vazbu

Inhibitory fibrinolýzy

➤ inhibitory plazminu:

↪ alfa₂-antiplazmin

↪ TAFI - Trombin Activated Fibrinolysis Inhibitor

➤ inhibitory aktivátorů plazminu:

↪ PAI-1 (endotel)

↪ PAI-2 (placenta)

↪ PAI-3 (úloha v patofyziologii fibrinolýzy je nejasná)

Nespecifické inhibitory fibrinolýzy

- přírozené inhibitory serinových proteáz:
 - svůj inhibiční vliv uplatňují zejména proti plazminu
 - patří sem: α_2 -makroglobulin
 α_1 -antitrypsin
C1- esterase inhibitor
ATIII
 - jde za fyziologických stavů o slabé inhibitory
- jiné mechanismy inhibice fibrinolýzy:
 - HRGP, trombospondin, lipoprotein (a)

TAFI

- **Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor**
- **Syntetizován v játrech**
 - ↳ Glykoprotein – mol. hmotnost 55 kDa
 - ↳ Metalokarboxypeptidáza - obsahuje zinkové ionty
- **Předpokládá se, že TAFI koluje v plazmě v komplexu s plazminogenem**
 - ↳ TAFI se váže s 10x vyší afinitou k lyz-plazminogenu (x glu-plg)
- **Poločas cirkulujícího TAFI – několik hodin**
 - ↳ Hladina TAFI je podmíněna geneticky

Aktivace TAFI

- Pouze trombinem – neefektivní – potřebná velká množství IIa
 - ↳ V přítomnosti trombomodulinu probíhá reakce 1250x rychleji
- Aktivace plazminem pomalejší
 - ↳ Vyžaduje přítomnost glykoasaminoglykanů endotelu
 - ↳ Úloha plazminu v aktivaci TAFI zatím není jasná
- Fyziologicky IIa předchází plazmin a je účinnější

Působení TAFIa

- **odštěpuje z fibrinu lyzinové zbytky**
 - ↳ odstraní tak vazebná místa pro plazminogen a t-PA
- uvolňuje PAI-1 z trombocytů
- inhibiční efekt TAFI je dále podporován aktivací TAFI plazminem a inaktivací plazminu TAFIa (přímá inhibice)
 - ↳ přitom ale plazmin inaktivuje také TAFIa

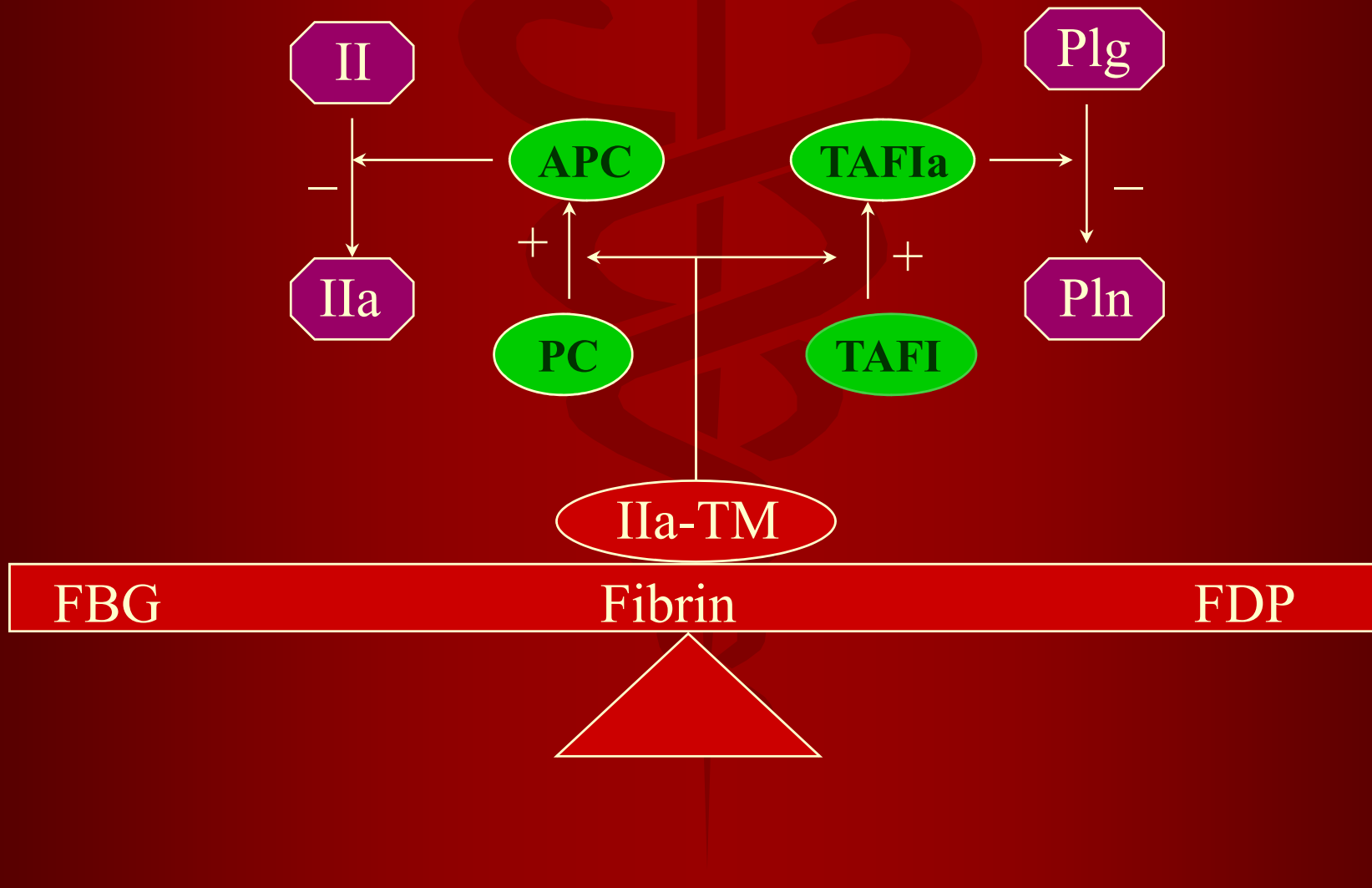
Fibrinolýza a koagulace

- Aktivace TAFI trombinem indikuje důležitost koagulačního systému v regulaci fibrinolýzy
 - **Veškeré poruchy generace trombinu mají za následek i zvýšenou rychlost fibrinolýzy**
 - Toto bylo jako první potvrzeno pro defekty FXI – krvácení z tkání s bohatou lokální fibrinolýzou
 - Naopak – zvýšená aktivita TAFI
 - ⇒ buď v důsledku zvýšené aktivity koagulačních faktorů
 - ⇒ nebo samotného TAFI
- je považována za trombofilní stav

TAFI a trombomodulin

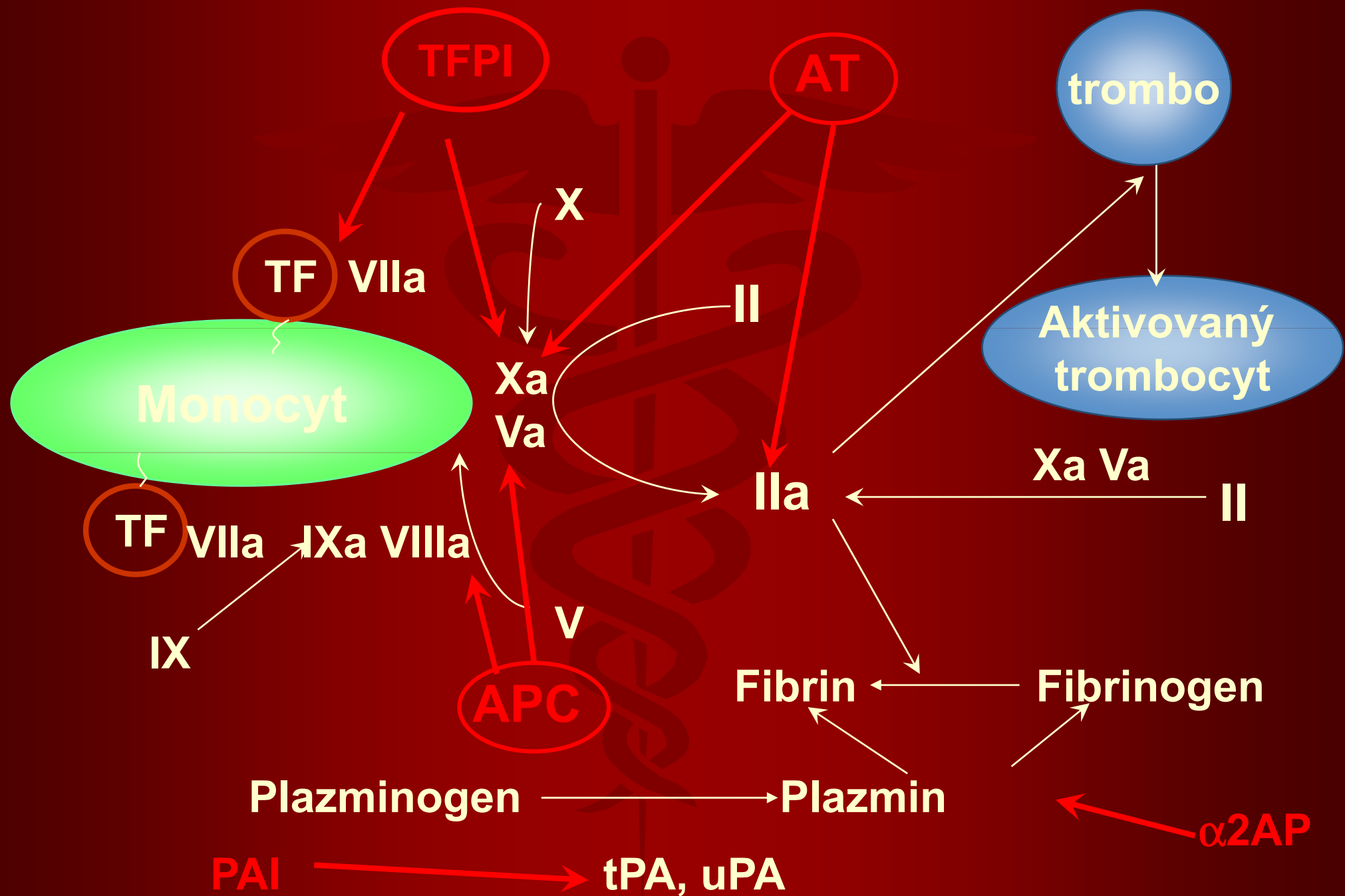
- Přidání TM k faktor deficitní plazmě (VIII, IX, X, XI) koriguje in vitro předčasnou lýzu koagula
- TM hraje v koagulaci dvojí roli
 - ↳ V komplexu s IIa aktivuje PC na APC
 - důležitá je přítom koncentrace TM
- Při nízké koncentraci je stimulována aktivace TAFI na TAFIa (antifibrinolytické působení TM)
- Při vysoké koncentraci je aktivace potlačována (zvyšována aktivace PC – profibrinolytické působení TM)
- Navíc je zřejmě důležitá i velikost cév – koncentrace TM na endotelu stoupá směrem ke kapilárám

Dvojitá úloha trombomodulinu



Přirozené inhibitory koagulace

- serpiny (inhibitory proteáz):
 - **Antitrombin** (IIa, Xa)
 - HC II (IIa, Xa)
 - α -1-antitrypsinm (Xa, aPC)
 - C-1inhibitor (kalikrein, plazmin)
- **system proteinu C:** (Fva, FVIIIa)
 - protein C, S
 - C4bBP
 - TM
 - inhibitor akt.proteinu C
 - EPCR
- **TFPI** (TF/FVIIa/FXa)
- nespecifické inhibitory:
 - alfa2 MG (IIa, kalikrein, plazmin)



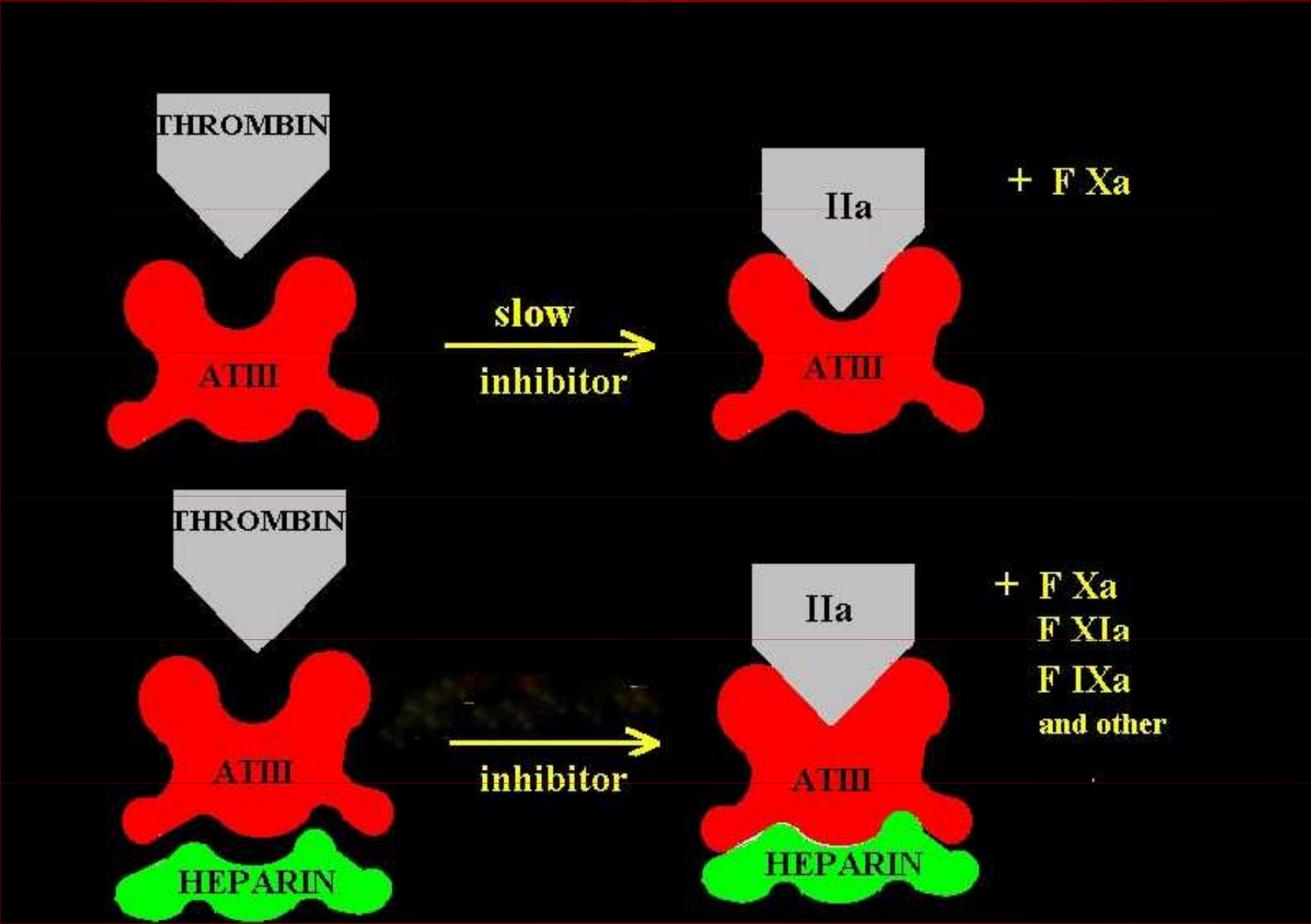
Antitrombin

- Přirozeně se vyskytující inhibitor proteáz
- **Další serpiny:** heparin kofaktor II, α_2 -antiplazmin, PAI-1, PAI-2, protein C inhibitor, α_1 -proteinase inhibitor (antitrypsin), α_1 -antichymotrypsin, C1inhibitor
- Serpiny tvoří s cílovými proteinázami ireversibilní 1:1 komplex

Antitrombin

- Je hlavní fyziologický inhibitor **trombinu (IIa)** a **faktoru Xa**
 - ↳ inhibuje i IXa, XIa, XIIa a fragmenty, kalikrein, plazmin, TF-FVIIa
- přítomnost heparinu a heparinu podobných látek (glykosaminoglykanů - GAG) urychluje tuto reakci 1,000 - 2,000x - vazba na AT je reverzibilní
- GAG mají úlohu kofaktoru v této reakci

Antitrombin



Rozdíl mechanismu reakce AT III s UFH a LMWH

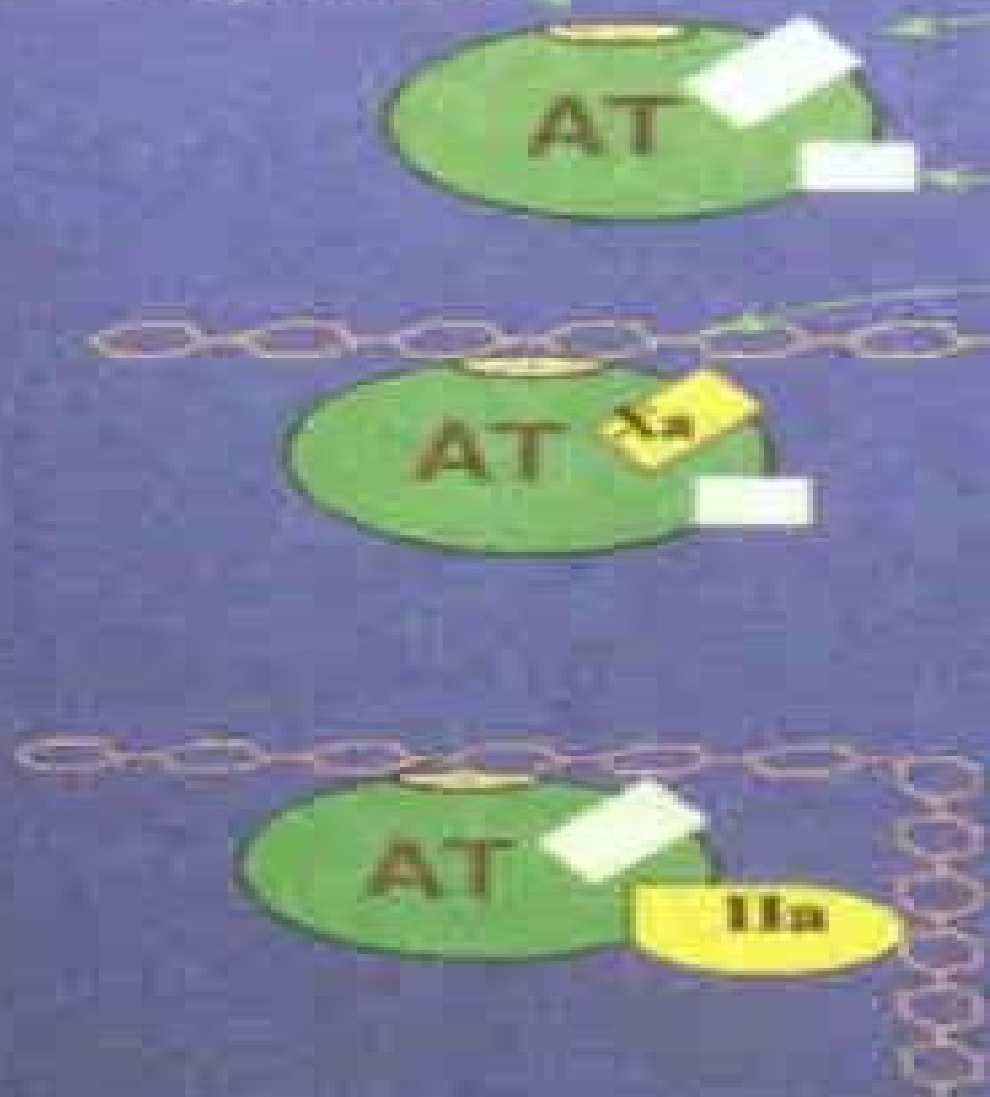
Místo pro navázání heparinu

vazebné místo pro F Xa

vazebné místo pro F IIa

Heparin LMWH

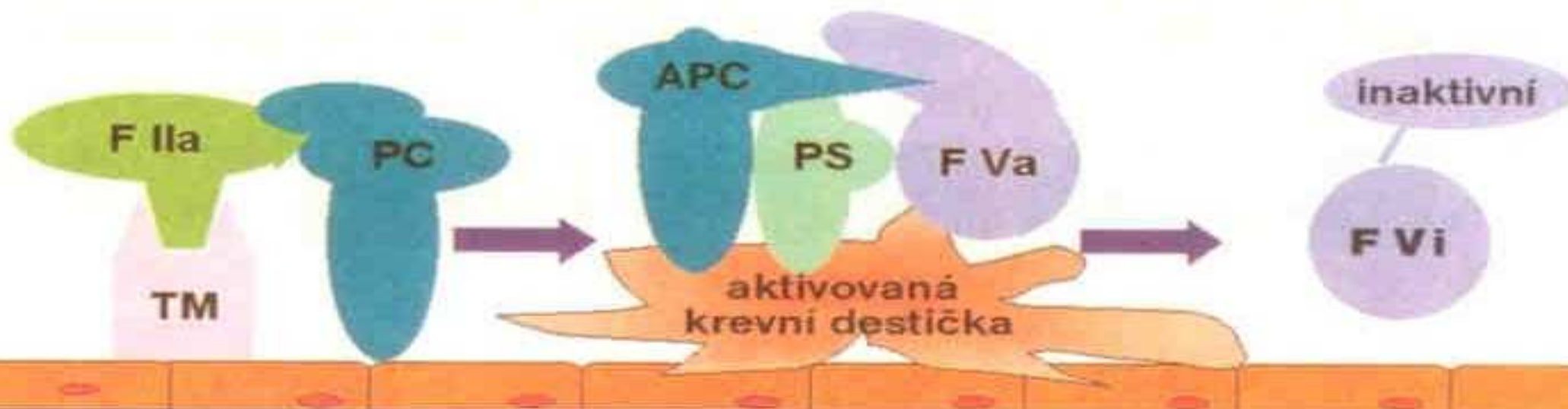
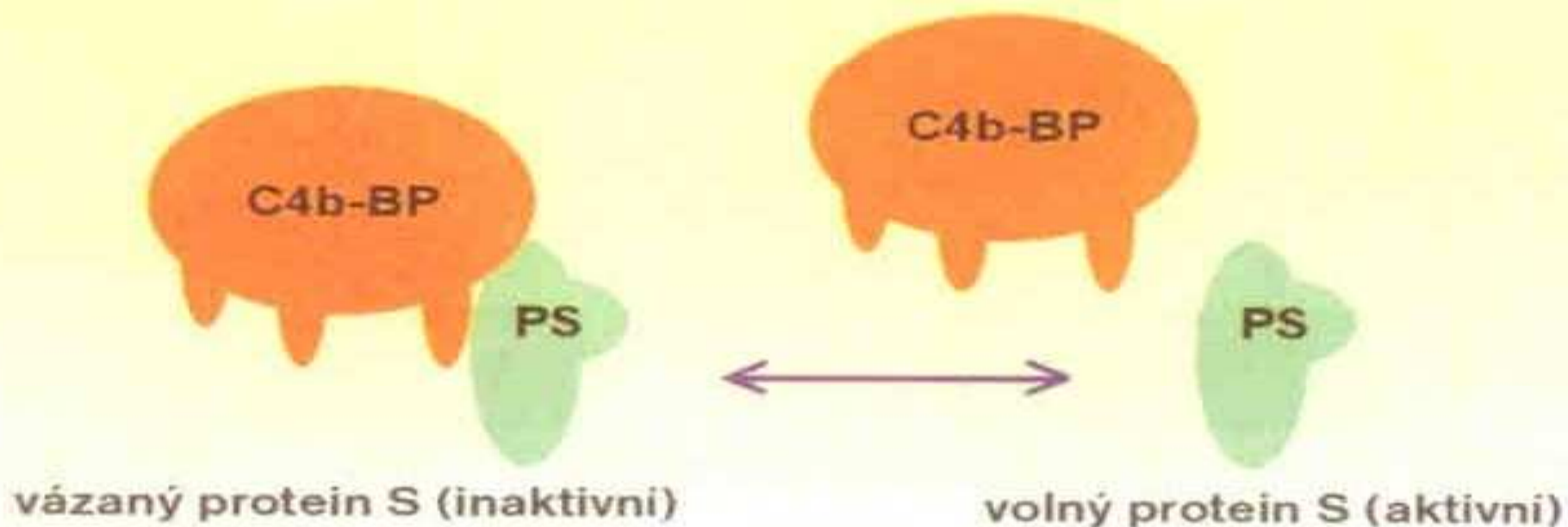
Heparin



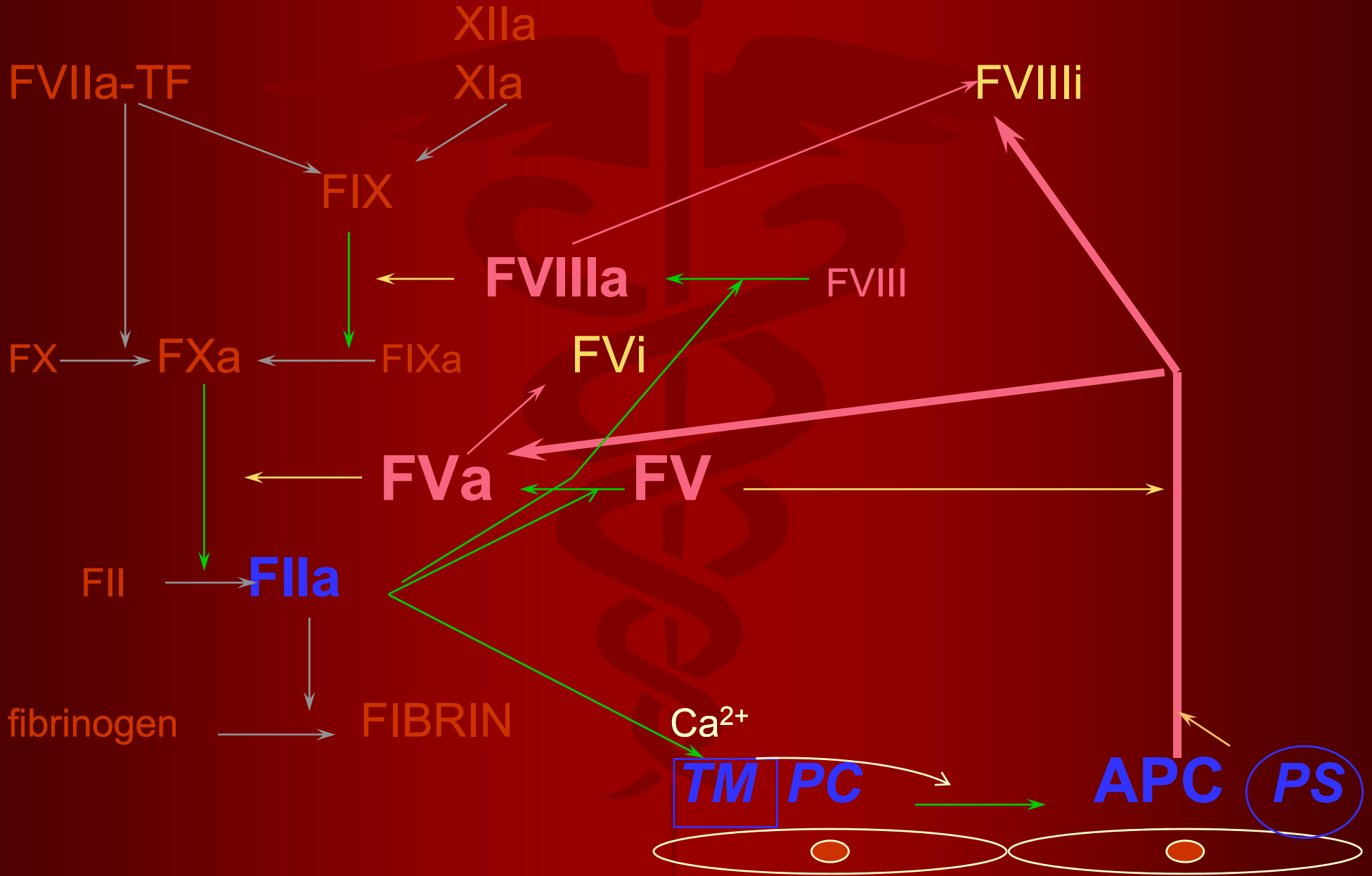
Antitrombin

- Protizánětlivé působení - schopnost AT stimulovat tvorbu prostacyklinu v buňkách endotelu
 - ⇒ prostacyklin působí
 - ↯ vazodilataci
 - ↯ inhibičně na destičky
 - ↯ inhibičně na aktivaci mononukleárů
 - ↯ indukci rezistence na endotoxin
- Heparin inhibuje tuto funkci AT

System proteinu C



System proteinu C



Protein C

- K-dependentní glykoprotein, serin. proteáza
- syntetizován v játrech jako jednořetězový polypeptid
- v plazmě přítomen zralý dvouřetězový protein (těžký řetězec 41kDa, lehký 21 kD)
- **aktivován na endotelu komplexem IIa/TM**

Protein S

- K-dependentní protein
- syntetizován v játrech, cévním endotelu, megakaryocytech a d.
- uložen v α -granulích trombocytů
- **kofaktor APC při enzymatickém štěpení kofaktorů Va a VIIIa**
- nezávisle na APC přímo inhibuje faktory Va a Xa

Protein S

- koncentrace v plazmě 25 mg/L
- v plazmě je asi 60% nekovalentně vázáno (komplex 1:1) na C4BP
- vázaný PS již nemá funkci kofaktoru
- funkce tohoto komplexu v systému komplementu je neznámá

EPCR - receptor endotel.buněk pro PC

- transmembránový protein typu 1
- homologní s HLA 1.třídou/CD1 - buňky zahrnutý v imunitní odpovědi
- **podporuje aktivaci PC na endotelu**

Trombomodulin

- transmembránový protein
- **v komplexu s trombinem aktivuje PC**
- **v komplexu s trombinem aktivuje TAFI**
(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)
- urychluje inhibici trombinu antitrombinem

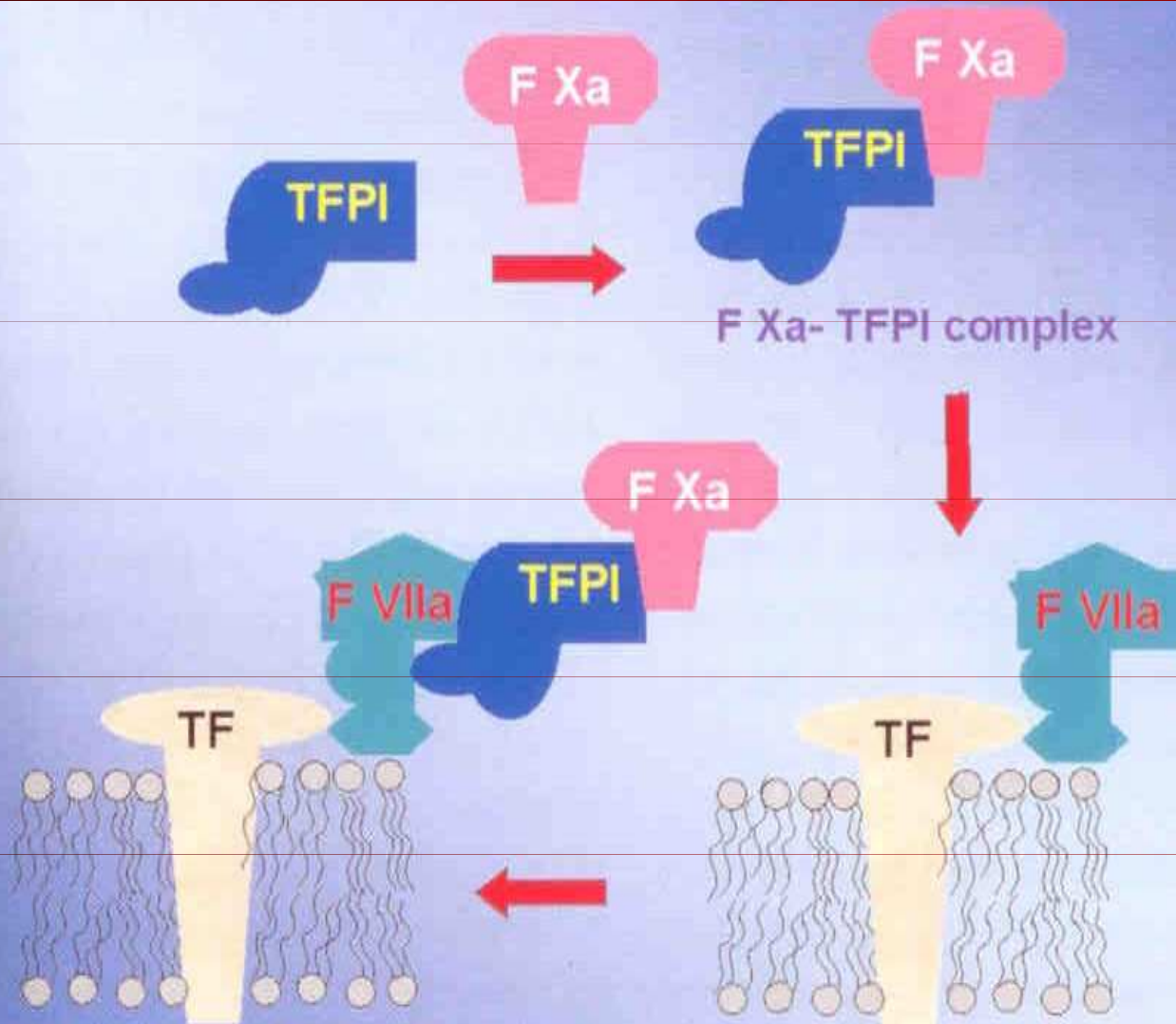
C4b-BP

- regulační protein cesty komplementu
- multimerní protein složený ze 6-7 a řetězců s nebo bez b řetězce
- forma s b řetězcem (C4b-BP b+) - 80% celkového proteinu
- pouze forma s b řetězcem **váže PS**
- **vazba je reverzibilní**

TFPI

V iniciační fázi koagulace **inhibuje:**

- uvolněný FXa
- komplex TF/FVIIa
- až po vazbě na FXa



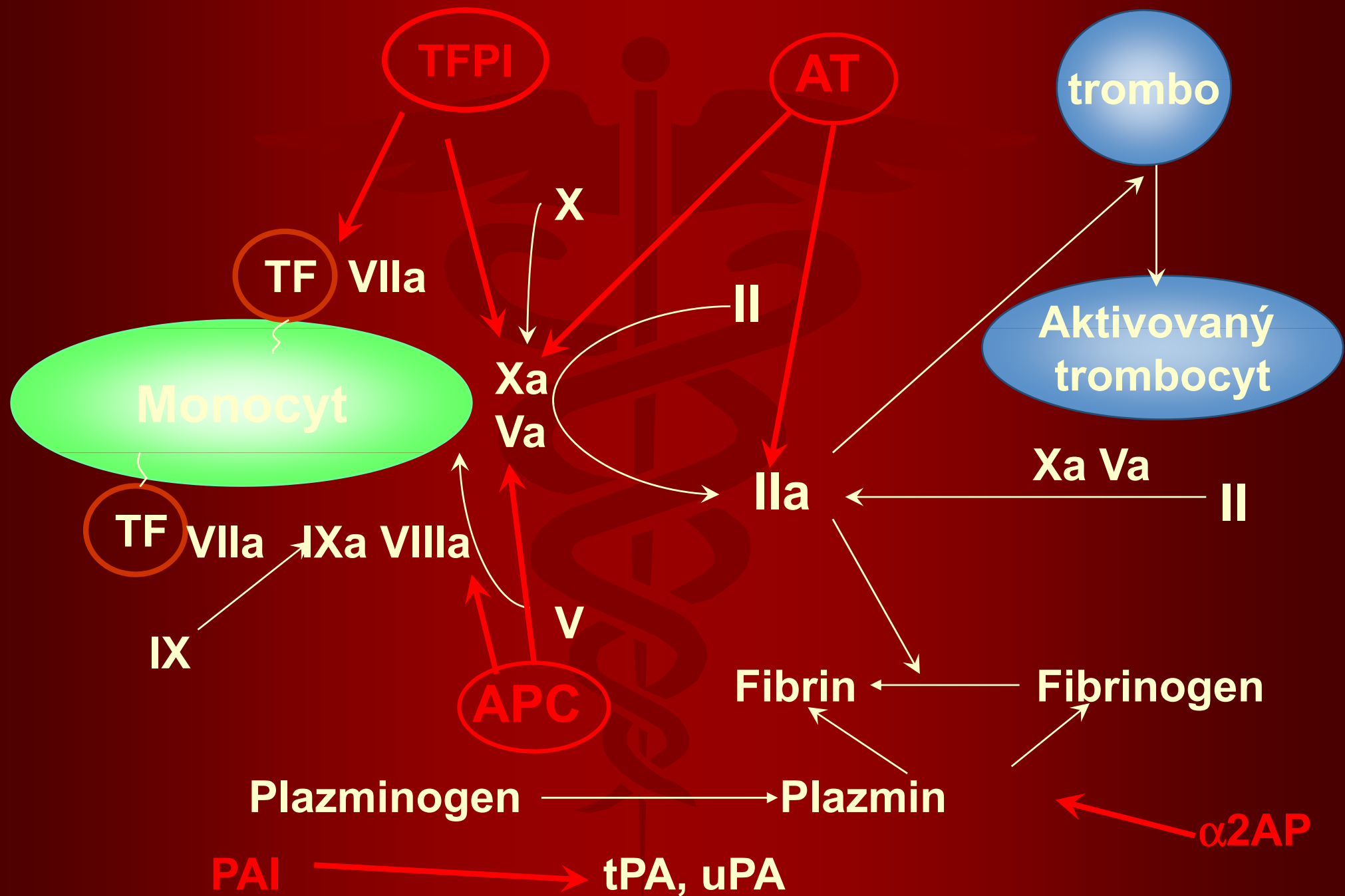
tvořen:

- v endotelu

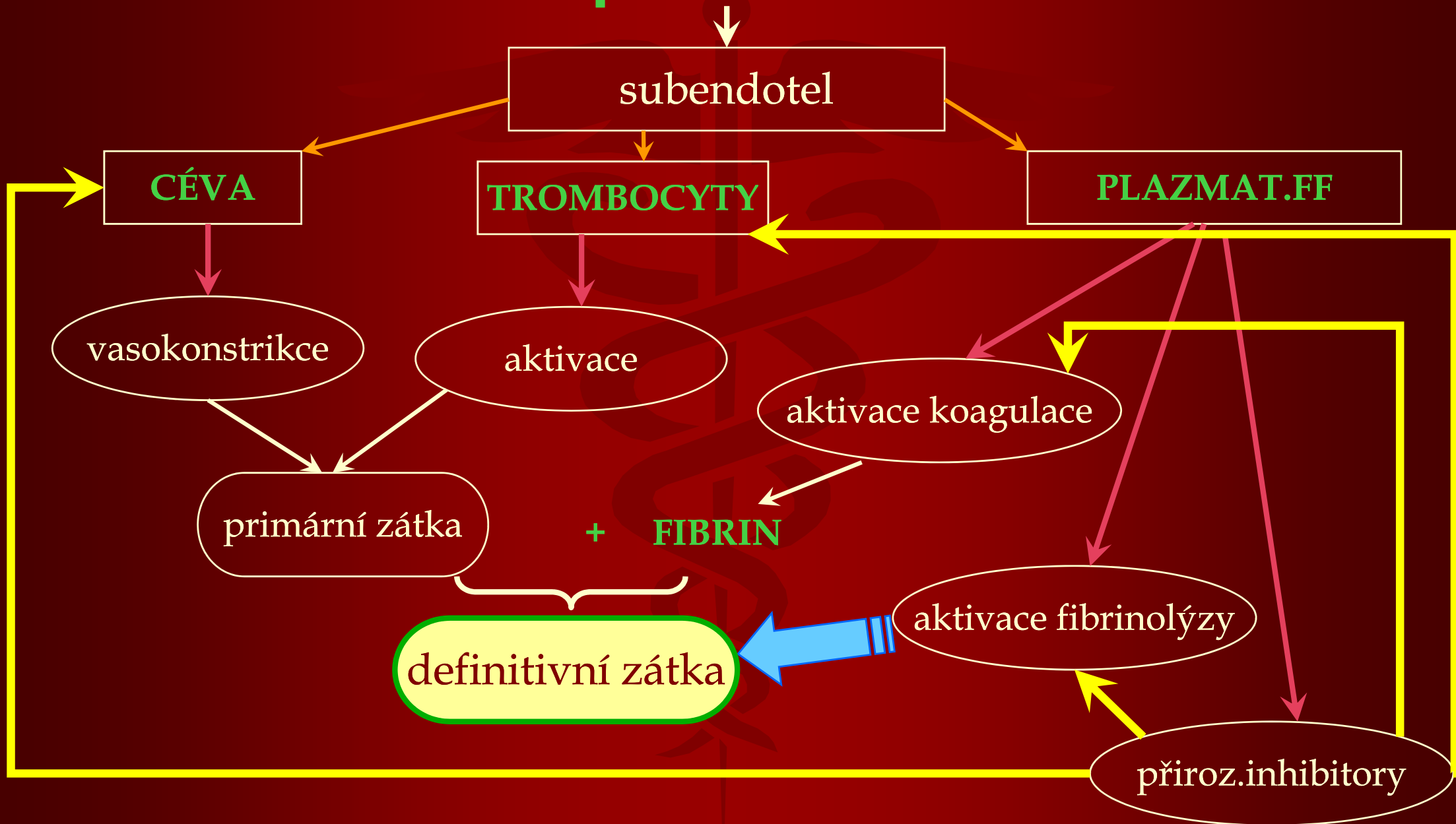
uvolňuje:

- současně s TF

- heparin



Poranění = poškození endotelu



Factors	Plasma half life (hour)	Plasma Concentration (microgram/ml)
Fibrinogen	72-120	2,000-4,000
Prothrombin	60-70	100-150
V	12-16	5-10
VII	3-6	0.5
VIII	8-12	0.1
IX	18-24	4-5
X	30-40	8-10
XI	52	5
XII	60	30
Protein C	6	4-5
Protein S (total)	42	25
Tissue Factor	---	---
Thrombomodulin	---	---
Antithrombin	72	150-400
Tissue Factor Pathway Inhibitor	---	0.1

Zkratka	Místo tvorby	Koncentrace	Poločas hod.	Mol.hm kDa	Chromozom	Typ	Cil.enzym/ bílkovina
ATIII	játra, endotel	0,10 - 0,25 g/l	45 - 70	62	1	serpin	Ila, Xa
HCII	endotel	8,0 - 9,0 mg/ml	-	65	22	serpin	Ila, Xa
a ₂ MG	trombo, endotel.bb. makrofágy	2,0 - 2,5 g/l	200 -250	725	12	-	Ka, plazmin, Ila
C1INH	játra	0,18 - 0,22 g/l	38 - 40	105	11	serpin	XIIa, Ka
a ₁ AT	trombo, mgk	1,3 - 2,5 g/l	90 - 96	55		serpin	Xa, APC
a ₂ AP	játra	0,05 - 0,07 g/l	60	67	18	serpin	plazmin
PAI-1	endotel, trombo	0,01 mg/l	-	52	7	serpin	tPA, uPA
PAI-2	placenta	<0,005	-	46/70	18	serpin	uPA
TFPI	endotel	0,1 mg/ml	-	33	2	kunin	Xa, TF/VIIa
PC	játra (K.vit.)	4,0 - 5,0 mg/ml	5 - 6	62	2	serin. proteáza	Va, VIIIa
PS	játra (K.vit.)	0,02 - 0,04 g/l	60	69	3	kofaktor	Xa, FVIII
TM	endotel	-	-	75-105	20	kofaktor	Ila, (Xa)
iAPC	játra	3,0 - 5,0 mg/ml	-	57		serpin	APC, Ka