



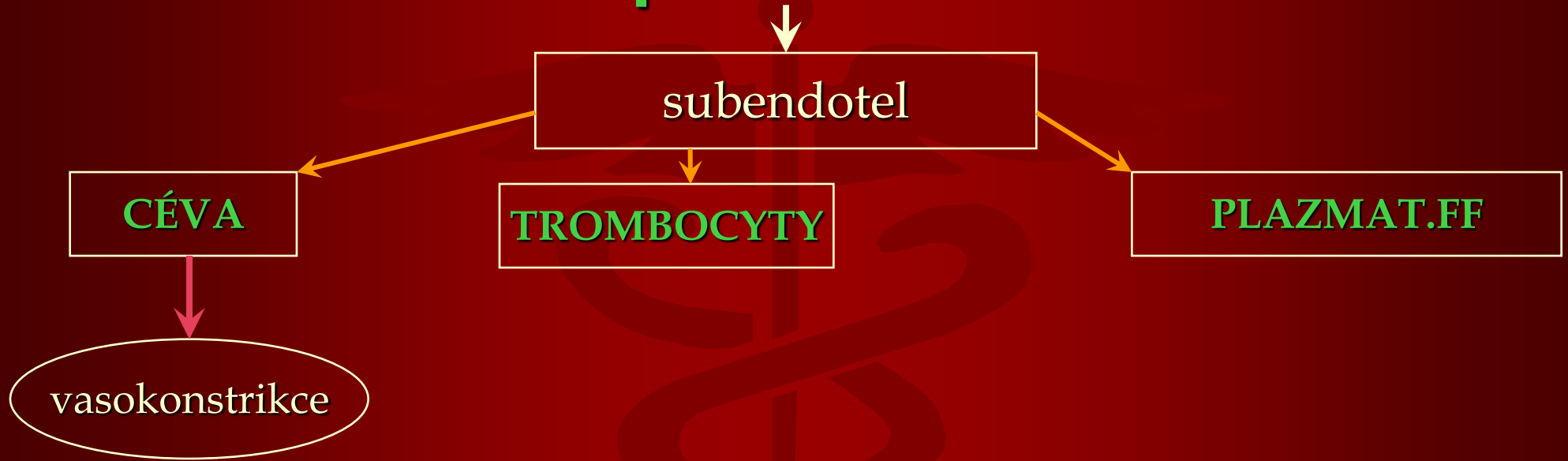
Fyziologie hemostázy

P. Smejkal

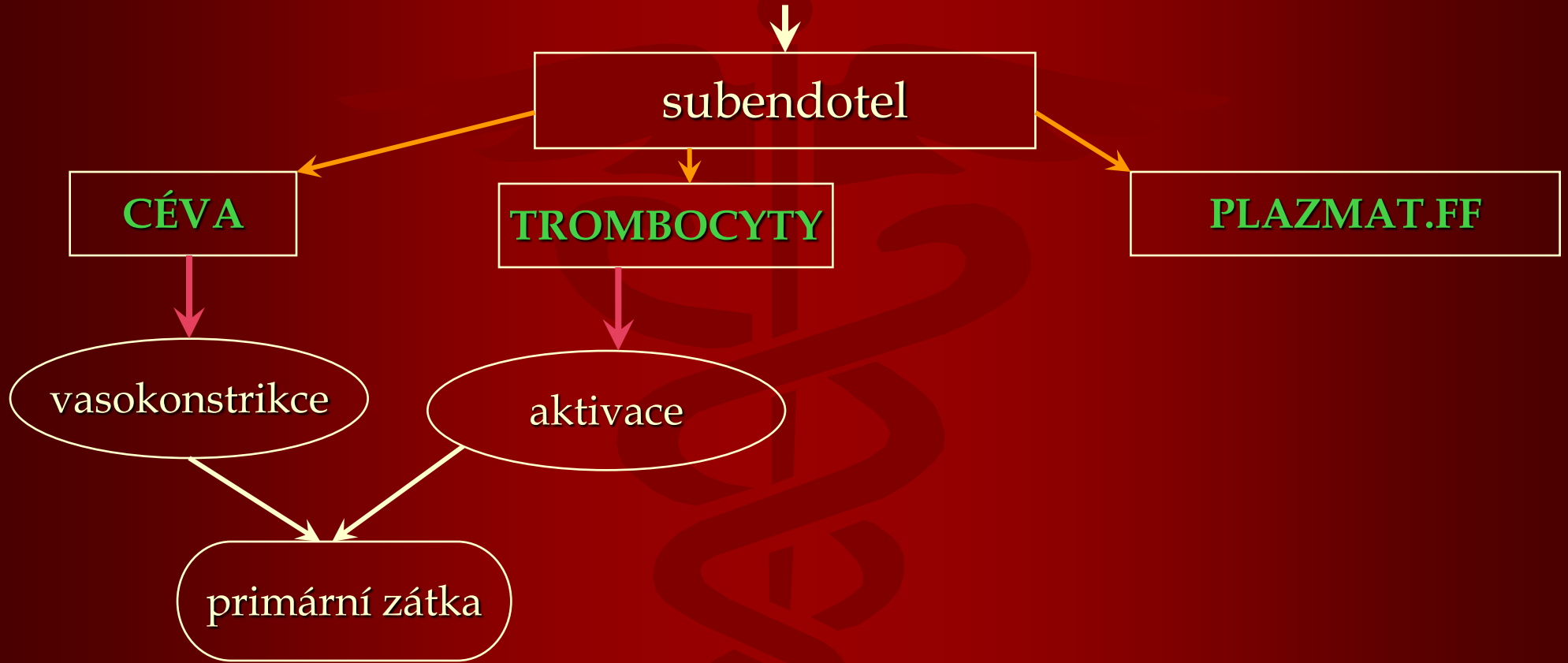
Hemostáza

- **je schopnost organismu zastavit krvácení**
 - ↳ udržení tekutosti krve při neporušeném 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

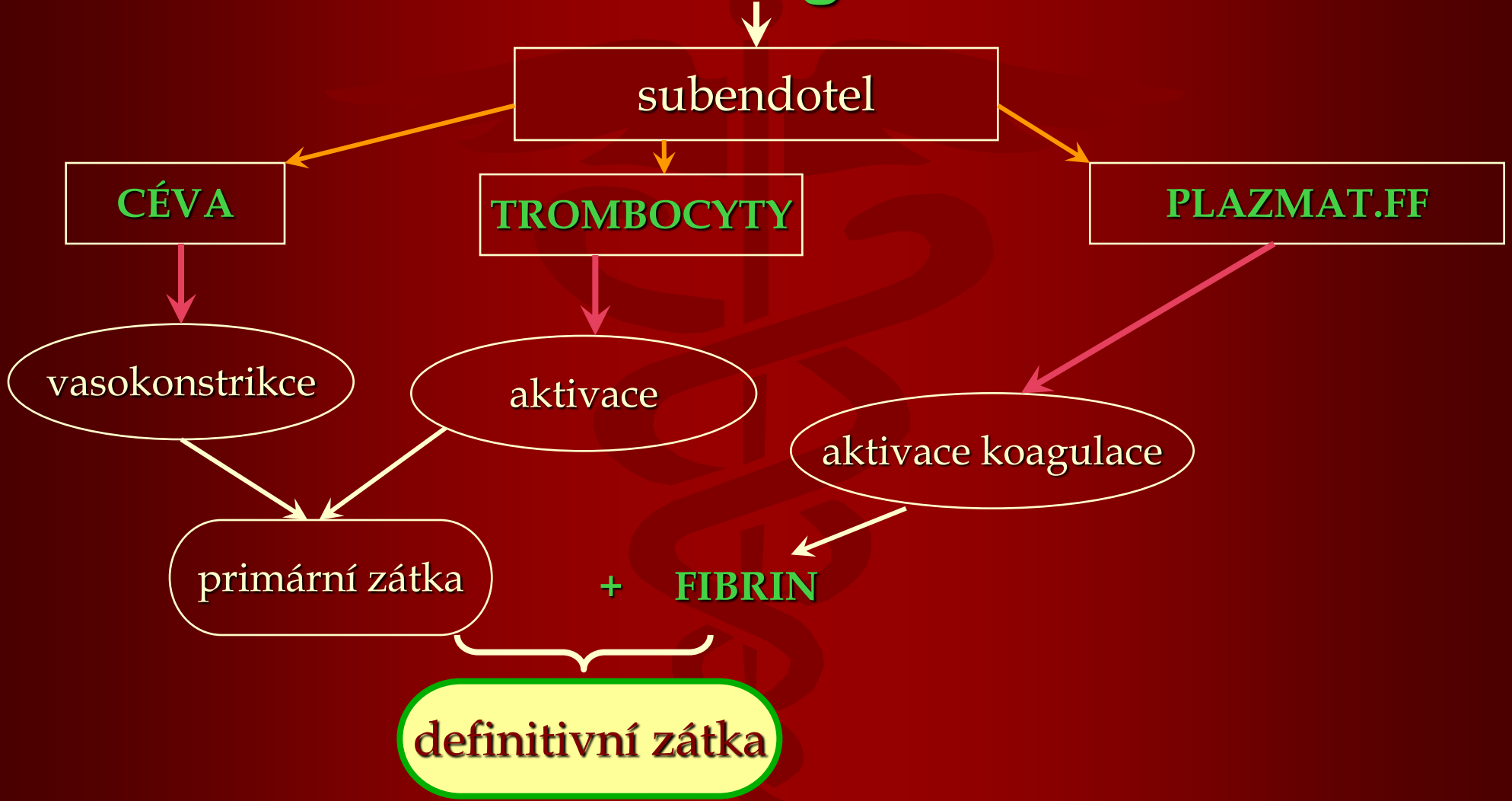
Poranění = poškození endotelu



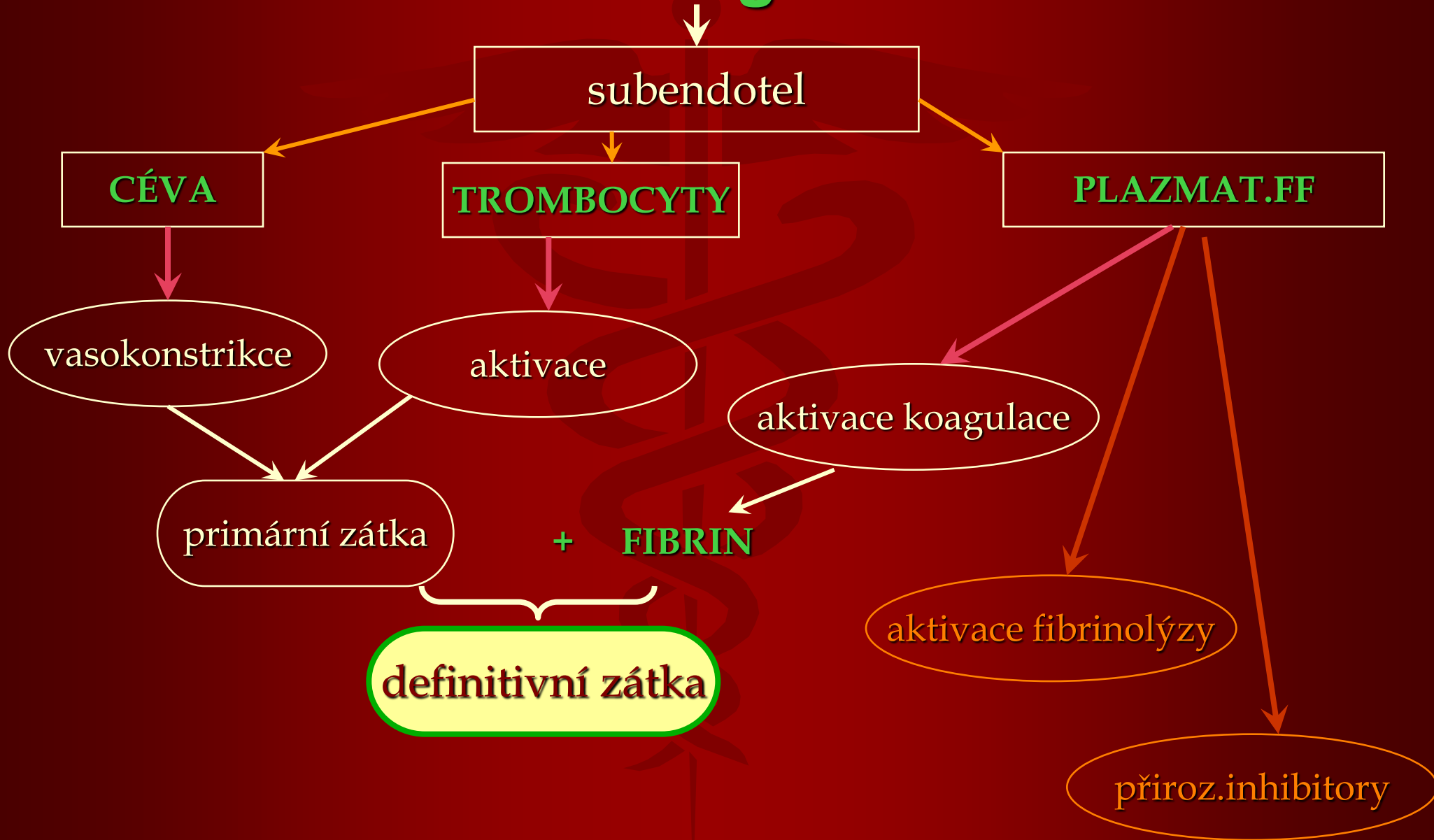
Primární hemostáza



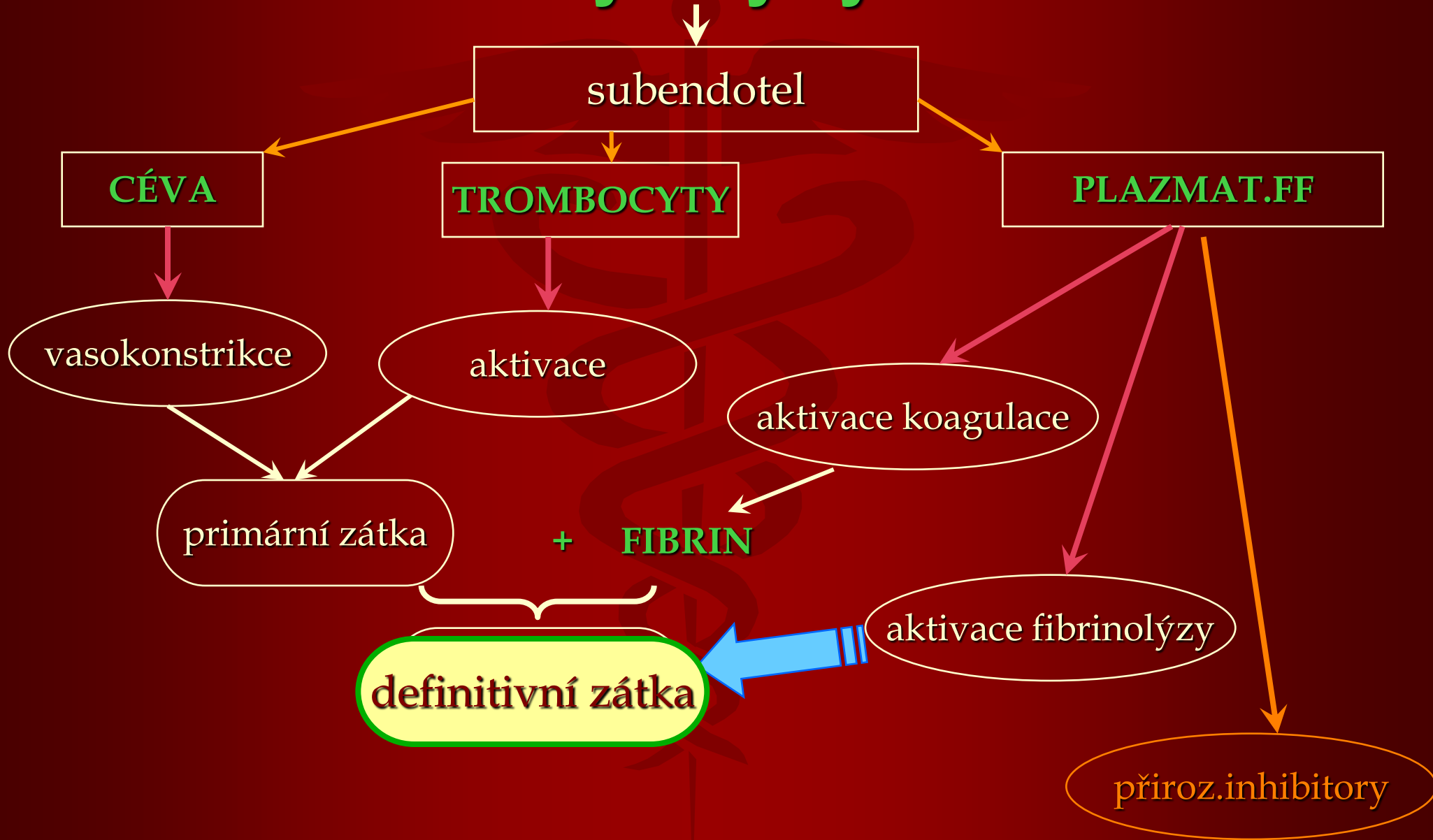
Hemokoagulace



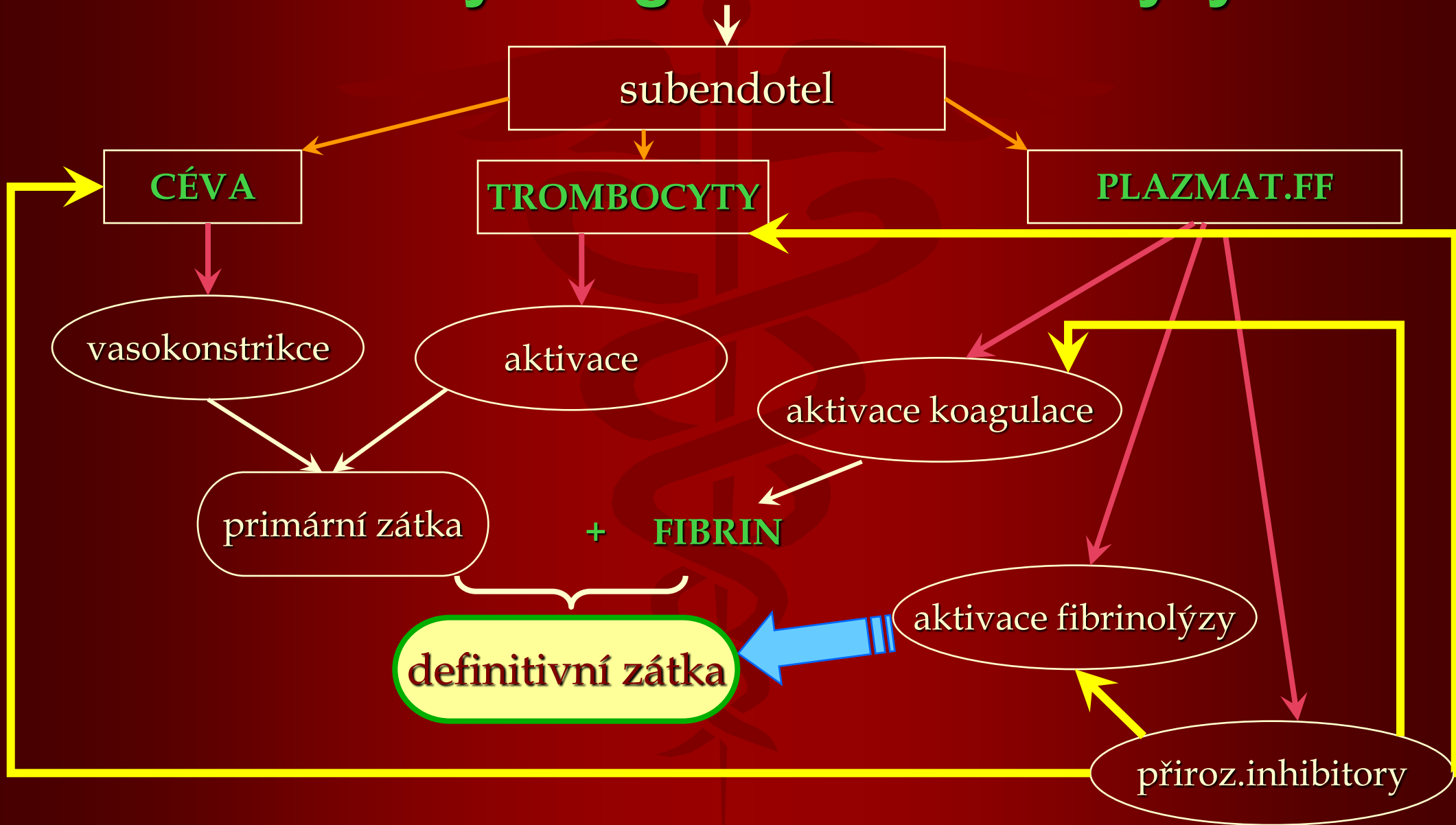
Hemokoagulace



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 (VWF)
- Platelet Derived Growth Factor (růstový faktor odvozený z destiček - PDGF)
- 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
 - ↳ endotelin
- podporující zánět
- podporující růst
- tkáňový faktor
- PAF
- VWF
- PAI

Markery aktivace a poškození endotelu

➤ TF (tkáňový faktor)

↳ exprimovaný na povrchu endotelu odráží stupeň jeho stimulace

➤ t-PA (tkáňový aktivátor plazminogenu,

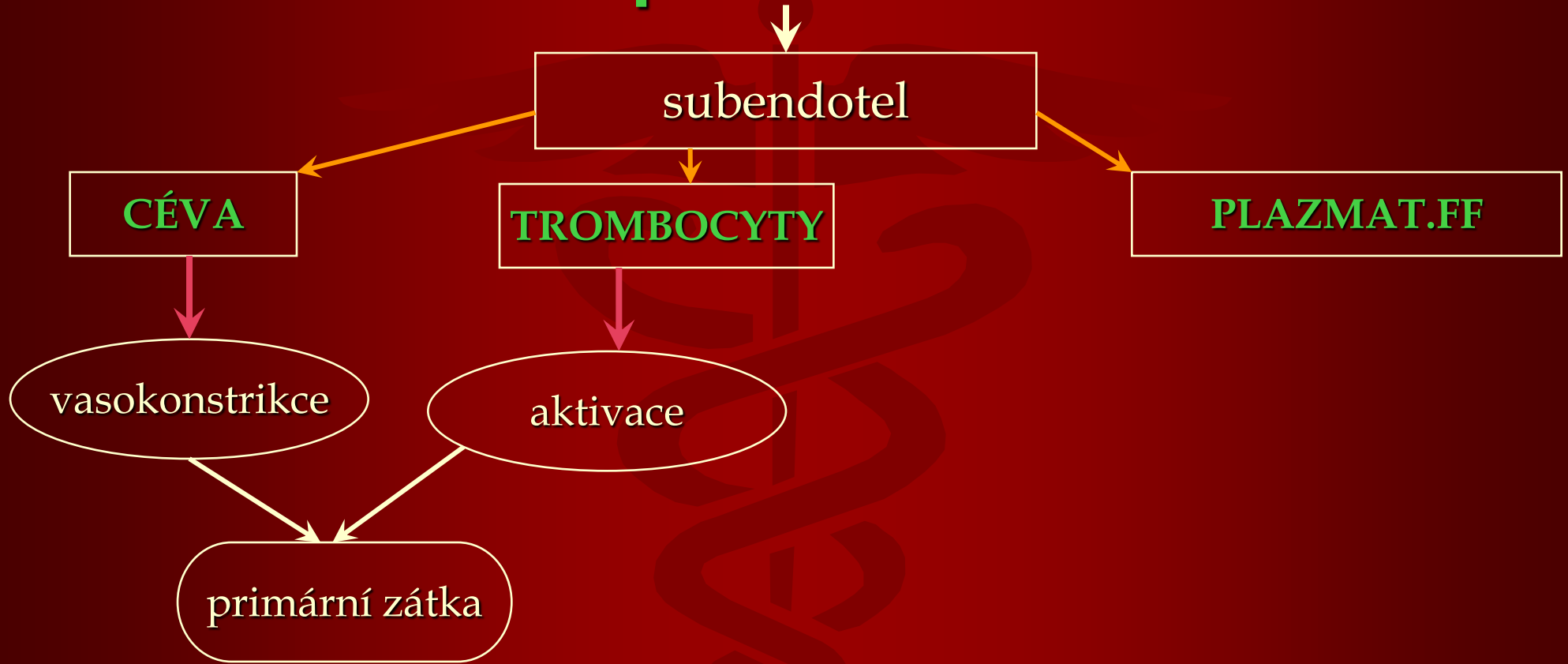
➤ PAI-1 (plazminogen aktivátor inhibitor)

➤ trombomodulin

➤ VWF

Uvolnění při poškození nebo aktivaci endotelu

Poranění = poškození endotelu



Krevní destičky

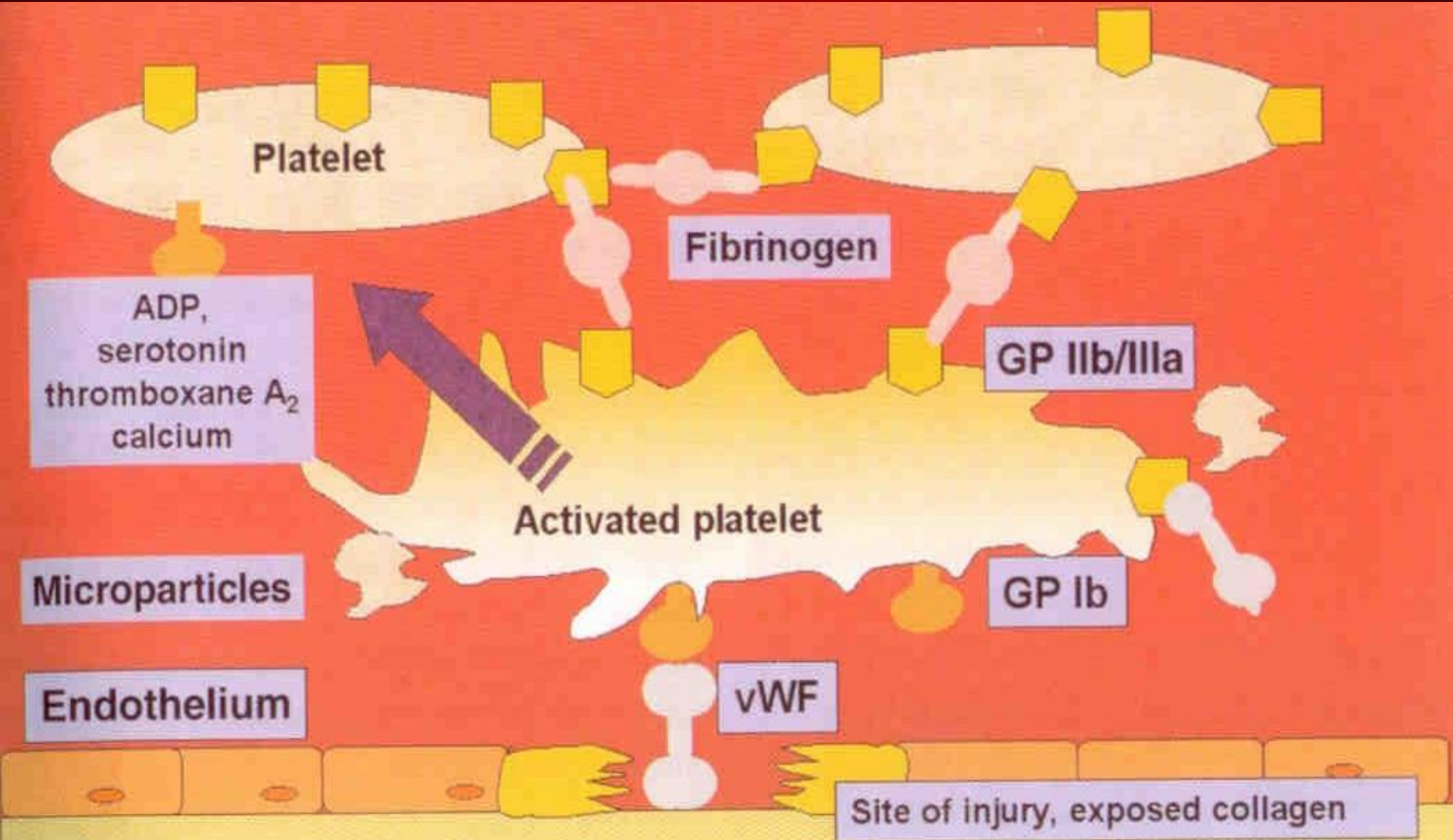
Funkce trombocytů při zástavě krvácení je dvojitá:

- tvorba primární krevní zátky,
- tzv. prokoagulační
 - ↪ tj. poskytnutí povrchů = fosfolipidů pro průběh koagulačních dějů - PF3 (dest. faktor)
 - ↪ 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 (tromboglobulin)
 - neutralizace GAG (glykosaminoglykanů)
- VWF – adheze, agregace
- FV – prokoagulačně
- PAI-1 – inhibice fibrinolýzy
- PDGF – růst tkáně, hojení
- trombospondin – agregace
- fibrinogen – agregace
- fibronectin – adheze
- PS (protein S) – inhibice koagul. ff.

denzní granula

- ATP (adenosin trifosfát)
ADP (adenisin difosfát)
 - 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: kolagen**
 - ↪ **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

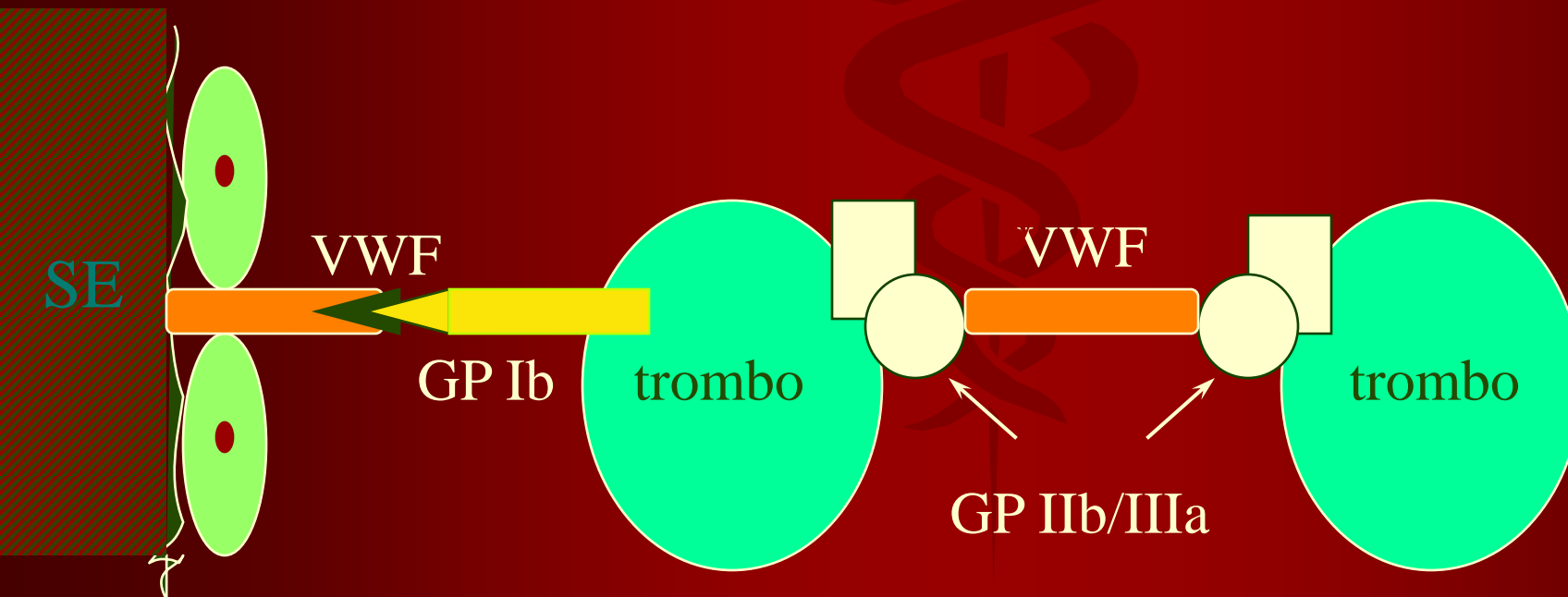
von Willebrandův faktor

- 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 (glykoprotein) 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

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 (tromboxanA2)
 - ↳ výrazný stimulátor agregace trombocytů
- aktivace receptorů GP IIb/IIIa
- přesun negativně nabitých fosfolipidů na povrch
 - ↳ umožňují vazbu koagulačních faktorů v místě krvácení

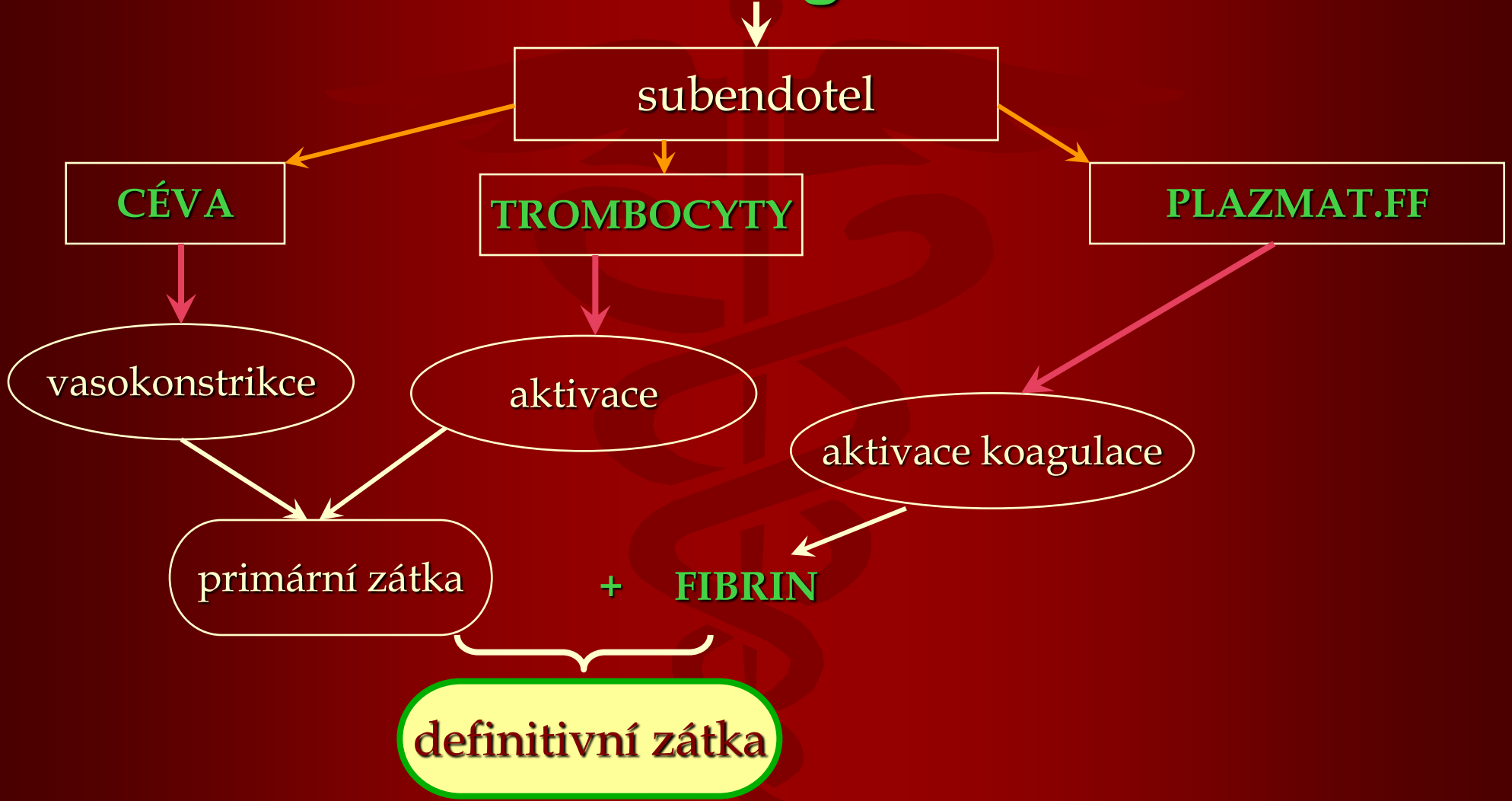
Agregace

- 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 (prekalikrein)
PLG (plazminogen), tPA, uPA (urokinázový aktivátor plazminogenu), PC (protein C)
- transglutaminázy: FXIII

Kofaktory:

- plazmatické: FV, VIII, HMWK (high molecular weight kininogen)
PS (protein S)
- buněčné: TF
TM (trombomodulin), EPCR (endotelový receptor PC)

Substrát: fibrinogen

Regulační proteiny: AT III (antitrombin), HC II (heparin kofaktor), C1inhibitor, α 2AP (antiplazmin), PAI-1,2,3 PC, TFPI (tissue factor pathway inhibitor), α 2MG (makroglobulin)

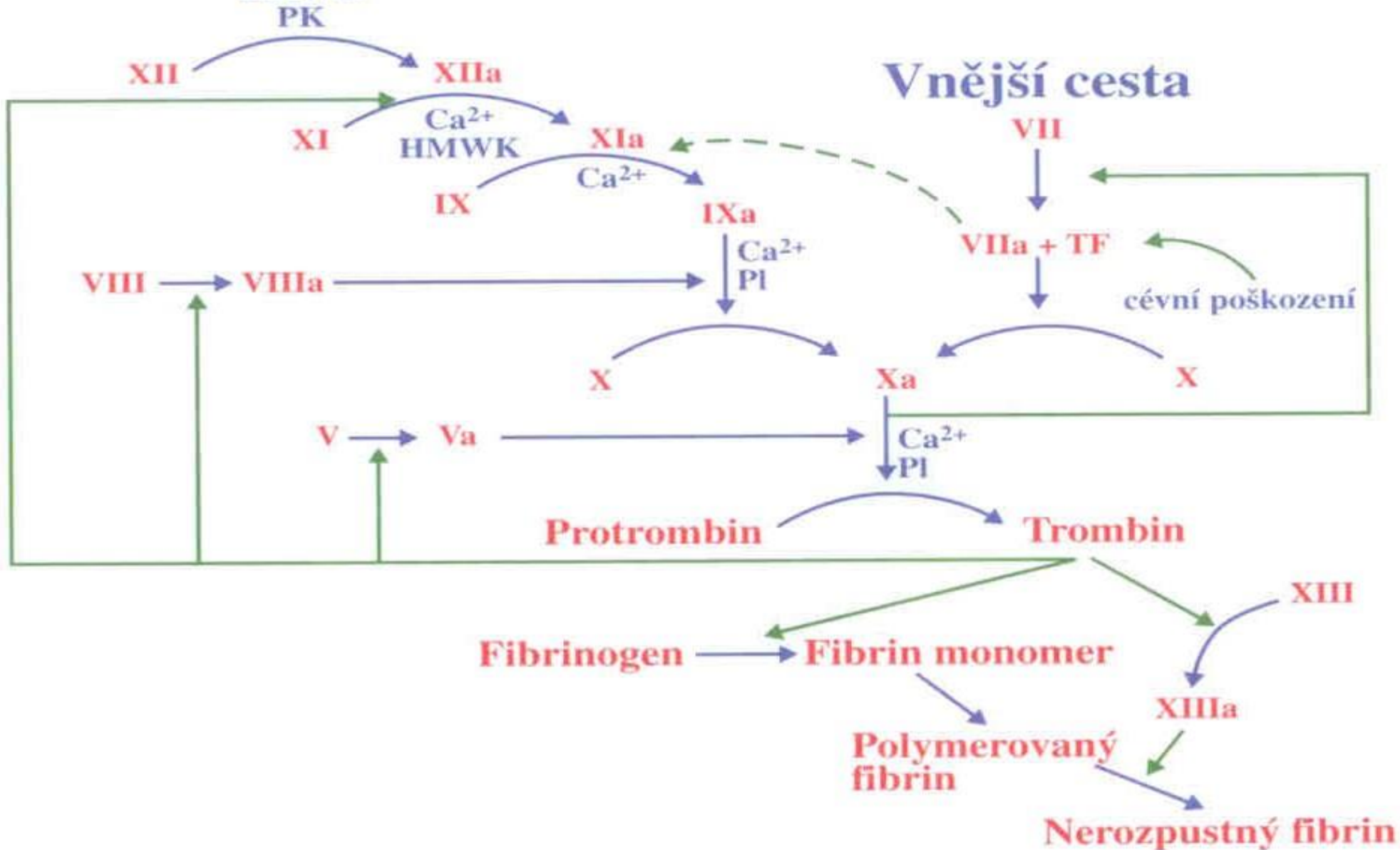
Fosfolipidy (negativně nabité): fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin

Ca²⁺

Vnitřní cesta

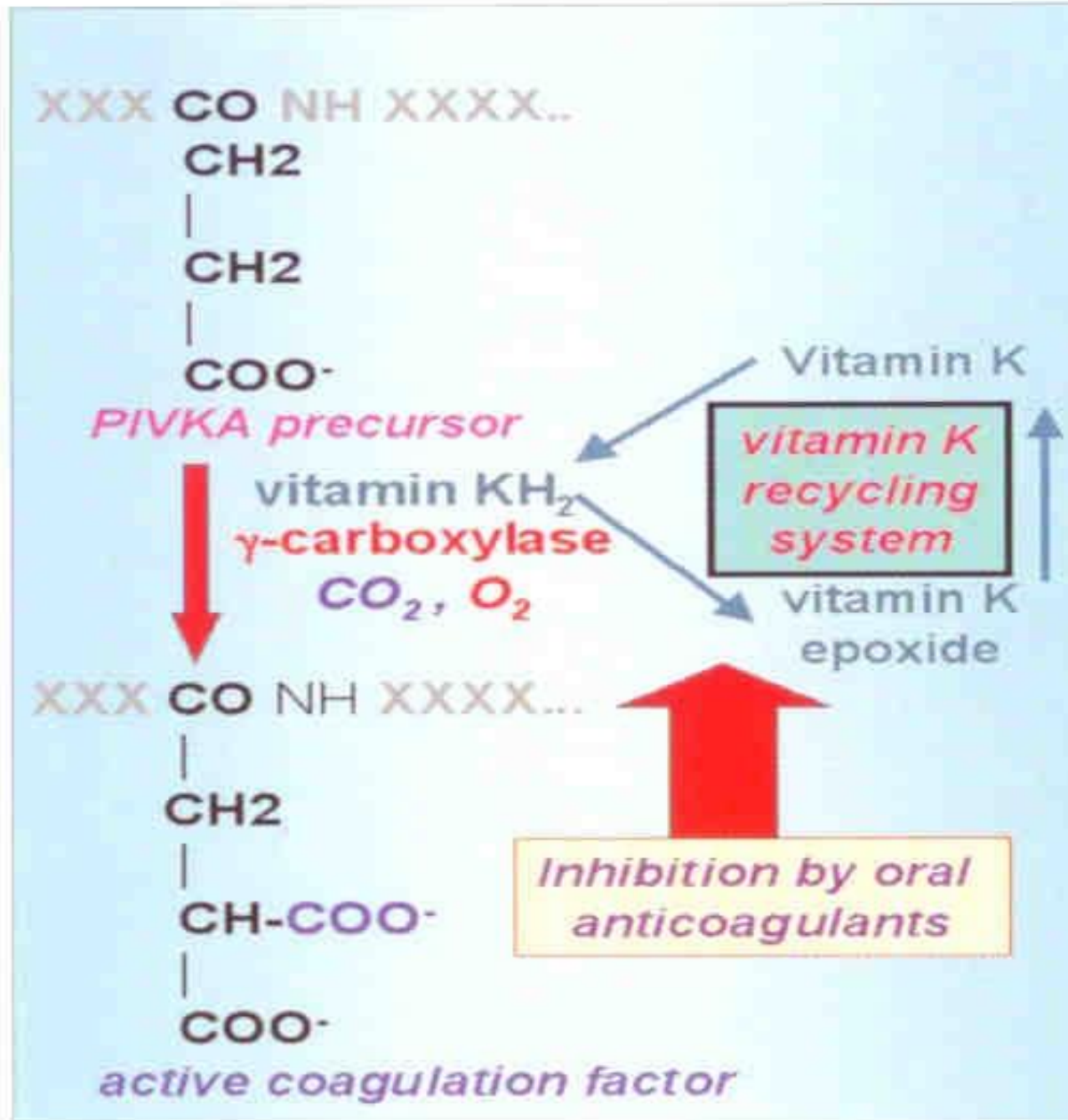
negativně nabitý povrch
HMWK
PK

Původní schéma koagulačních dějů

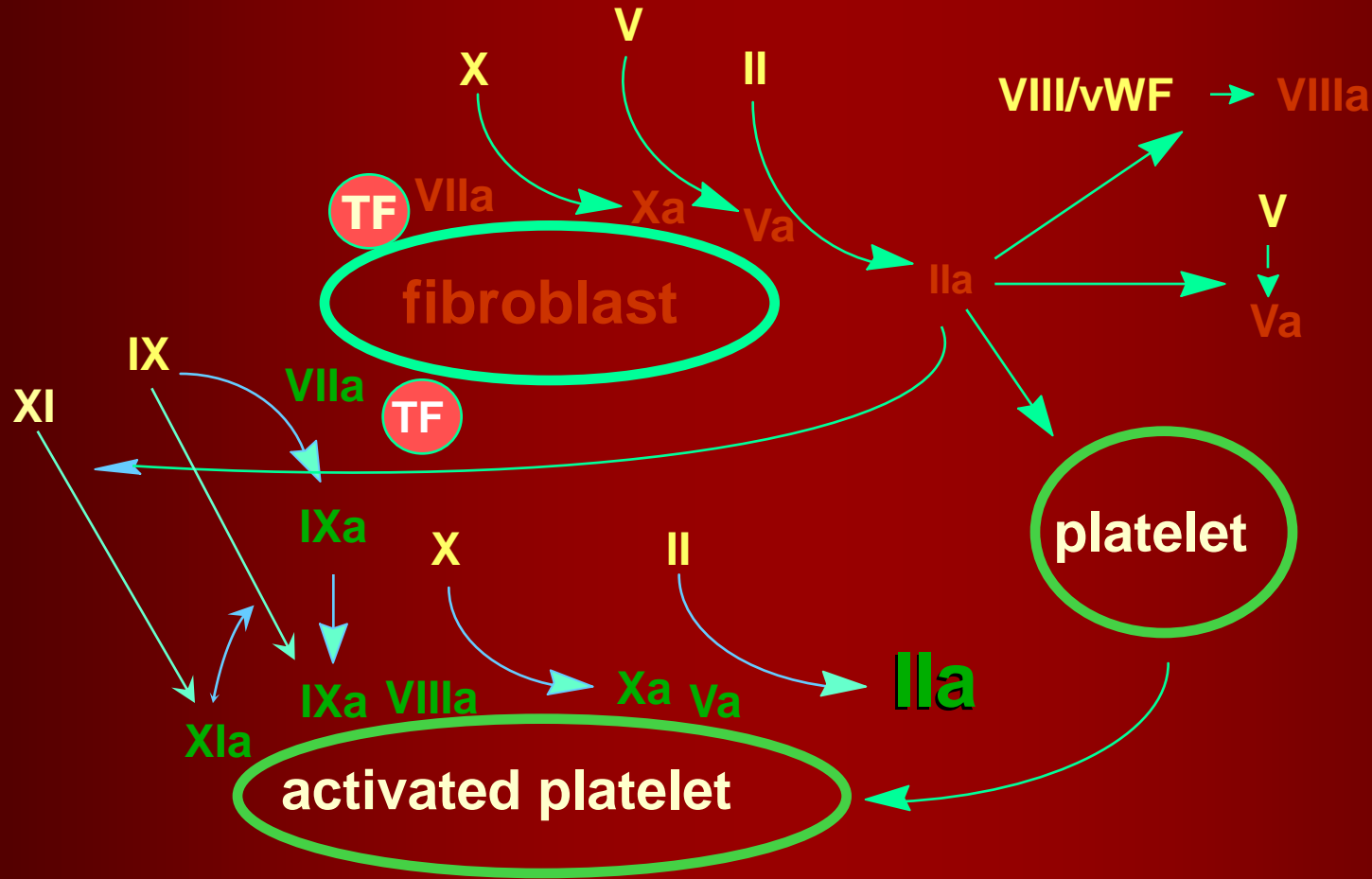


Koagulační faktory vitamín K dependentní

- FII, FVII, FIX, FX, PC, PS
- 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)



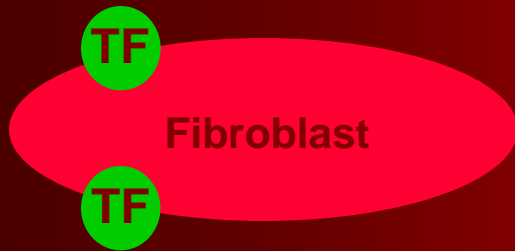
Současný model koagulace



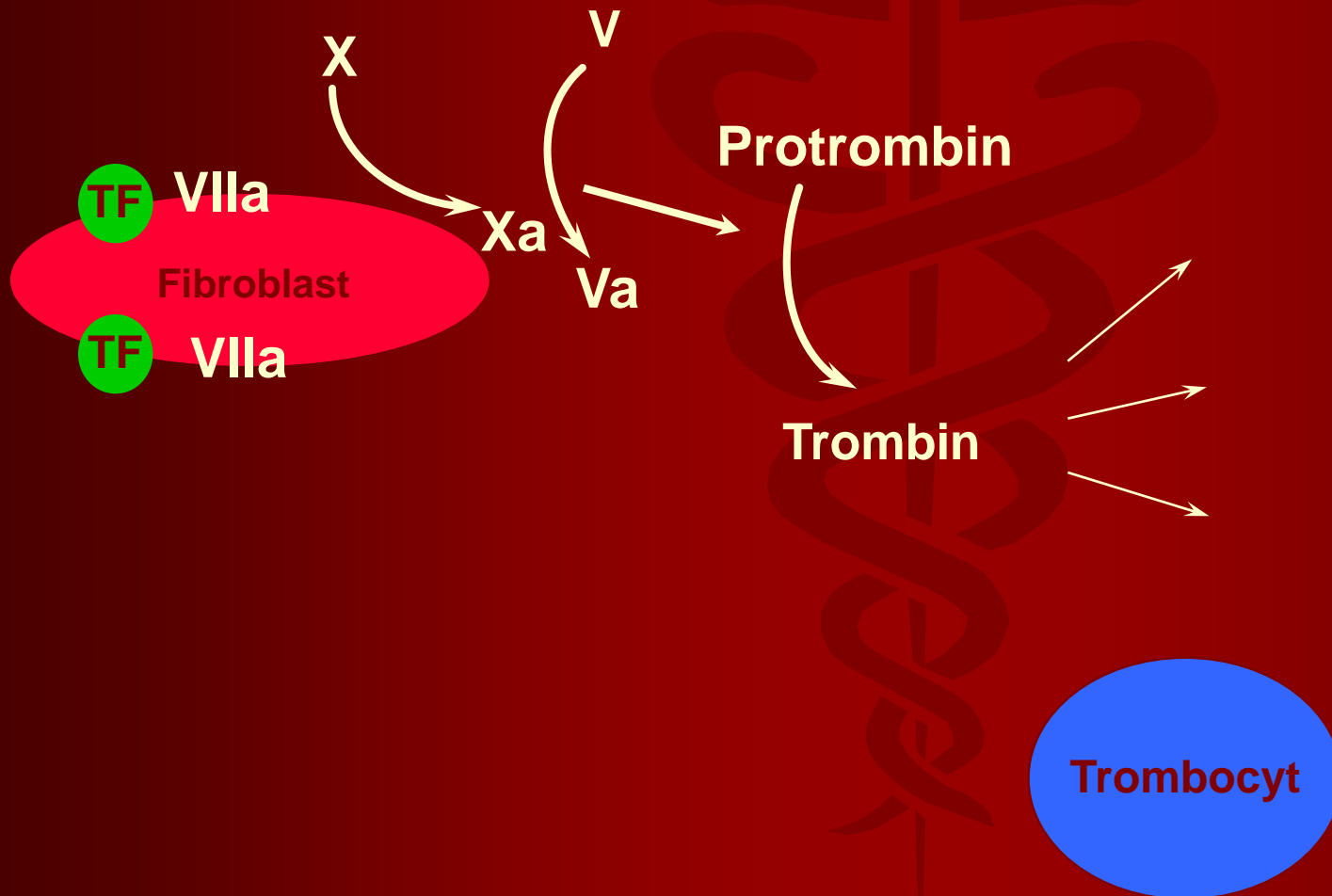
Hemostáza a tkáňový faktor (TF)

- 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

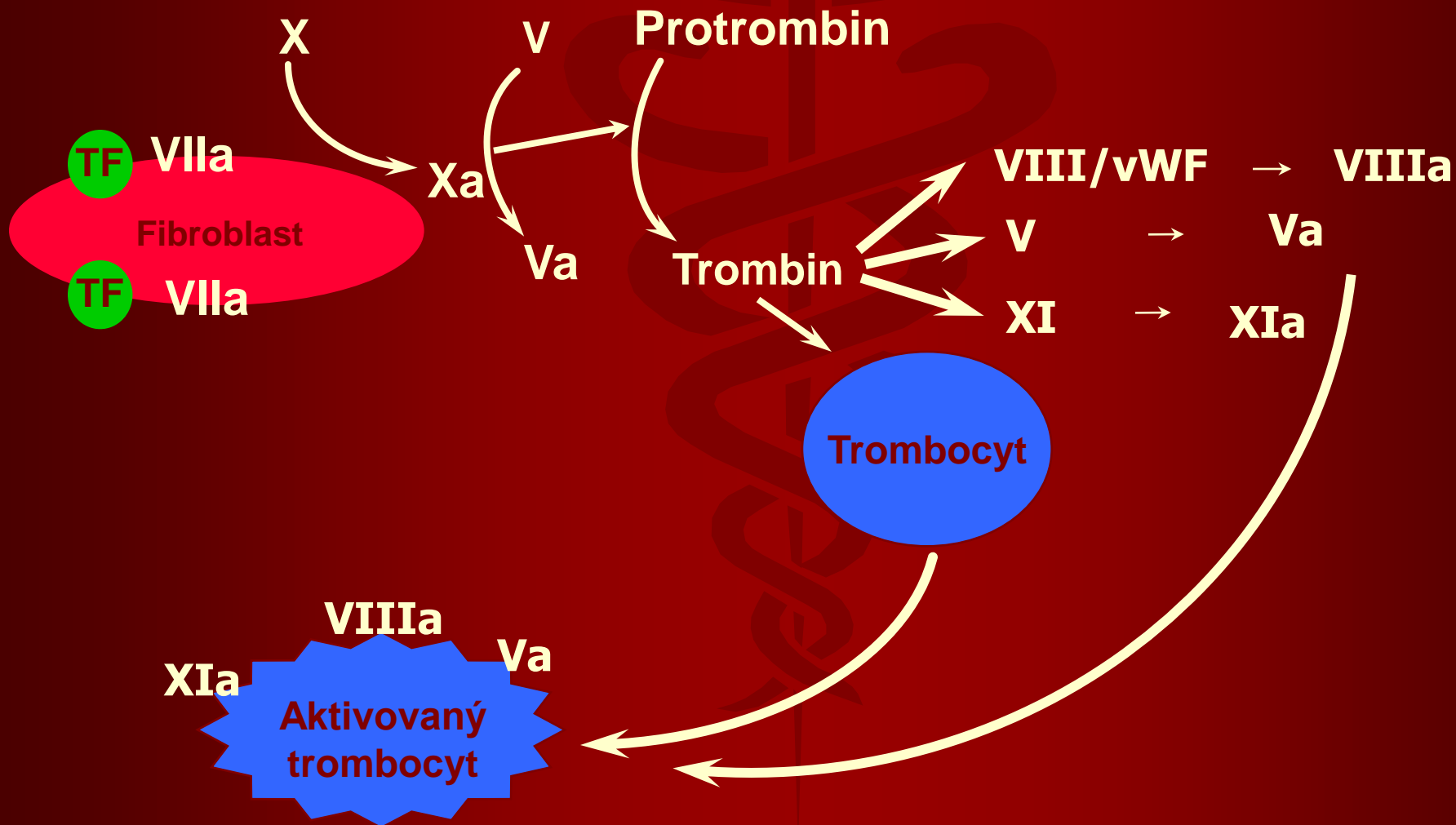


Zahájení (iniciace) koagulace

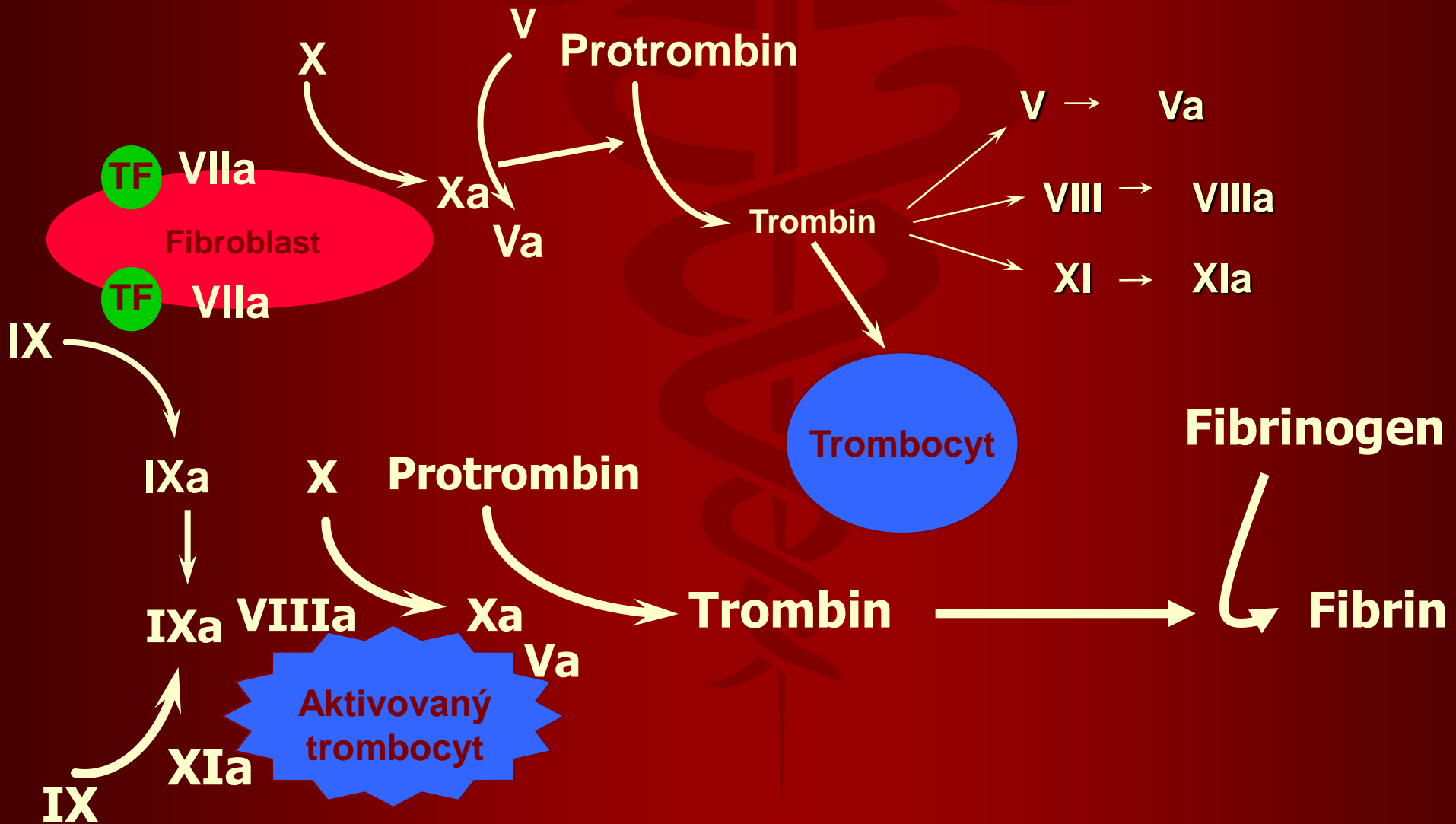


Fáze aplifikace koagulace

(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 (trombin activated fibrinolysis inhibitor),
zajišťující rezistenci fibrinové zátky k fibrinolýze

Trombomodulin a protein C

Trombocyty

(PAR receptory)

FVIII a FV

(zpětnovazebné
zesílení)

TROMBIN

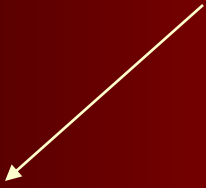
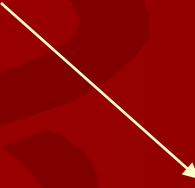
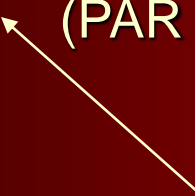
FXIII

(plně stabilizovaná
fibrinová zátka)

FXI

TAFI

(trombinem aktivovaný inhibitor fybrinolýzy)



Protease-activated Receptors

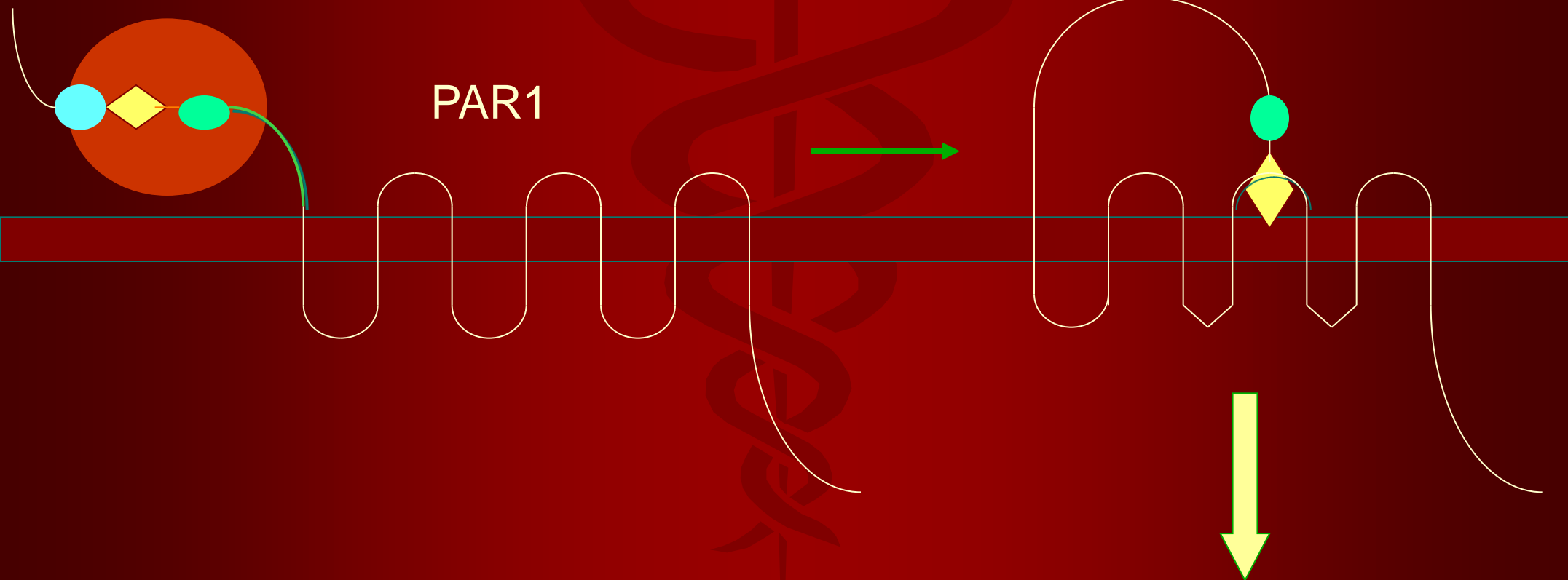
- Receptory spojené s G-proteinem
- Jsou schopné přeměnit extracelulární probíhající proteolytické štěpení v transmembránový signál
- Prototypem skupiny je PAR1
 - Je aktivován, když trombin odštěpí jeho N-konec
 - Při této aktivaci se objeví nové N-zakončení, které slouží jako liganda – váže se intracelulárně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

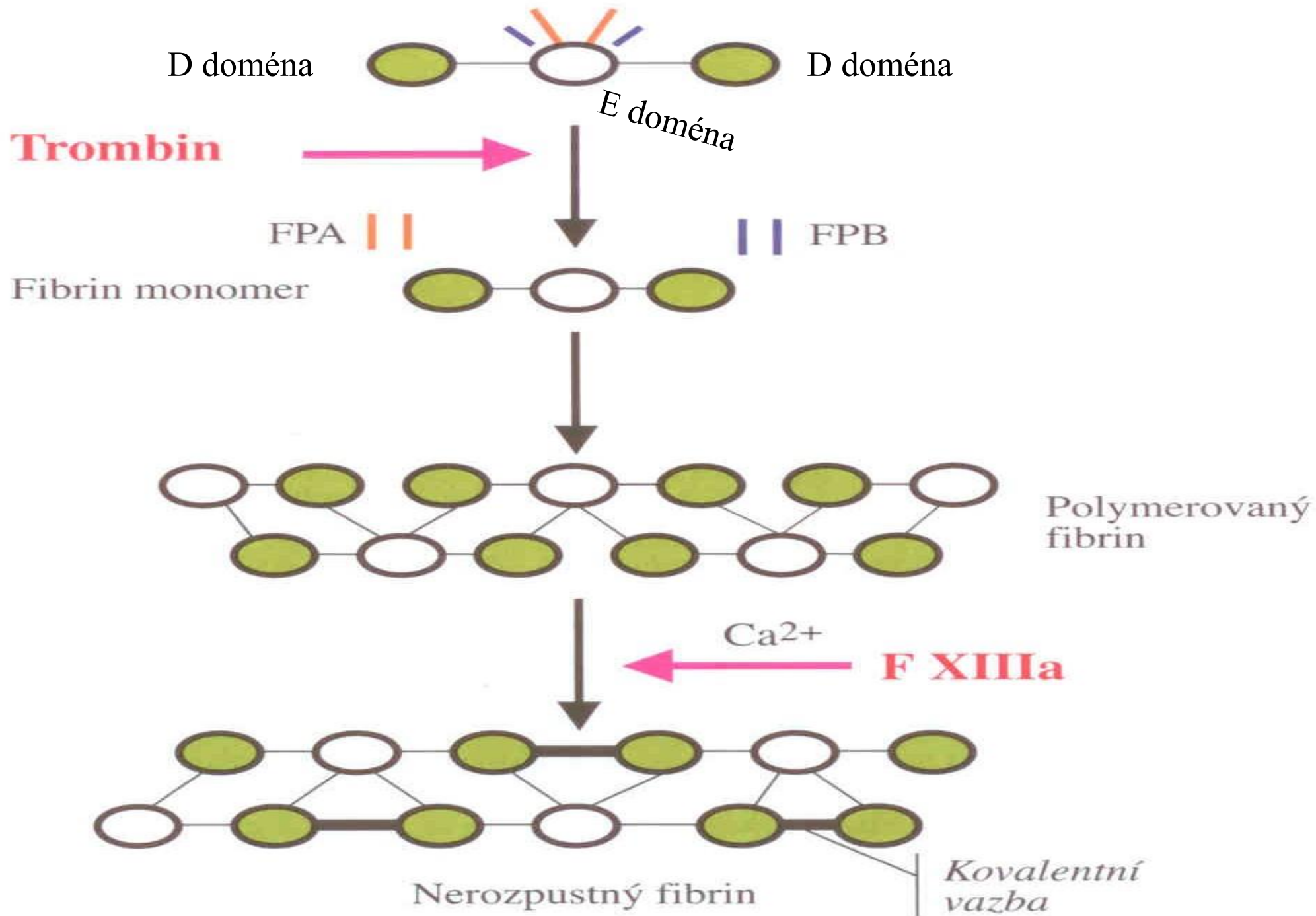
PAR

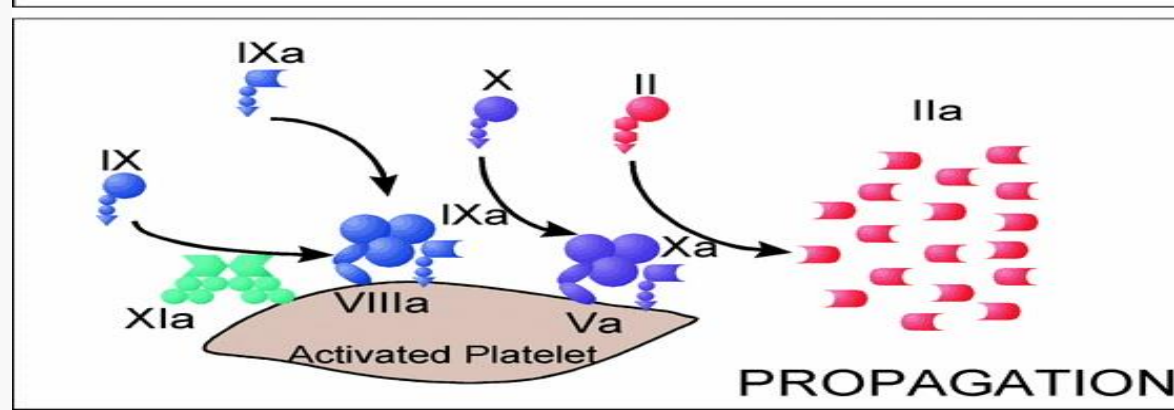
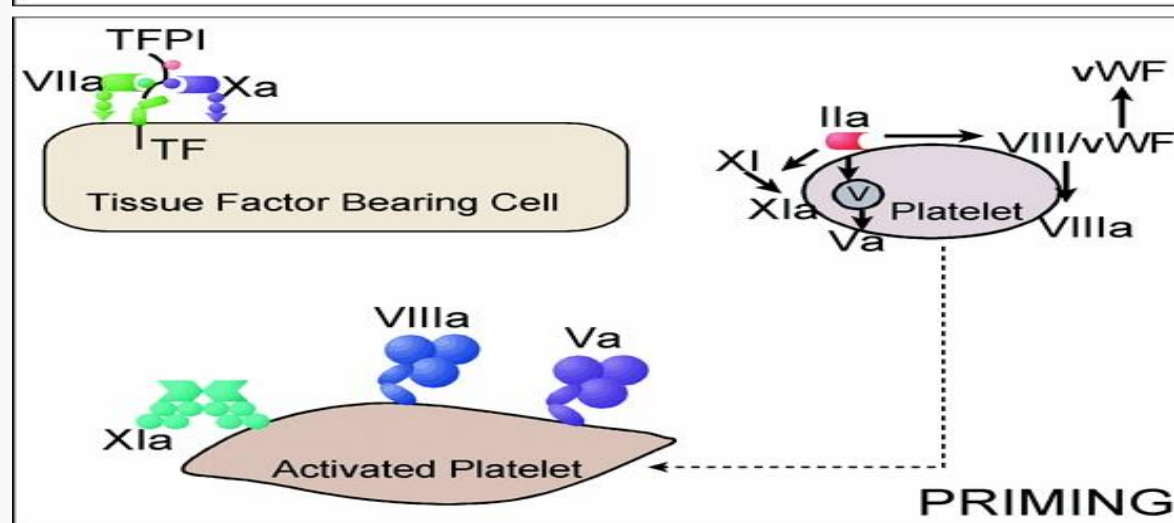
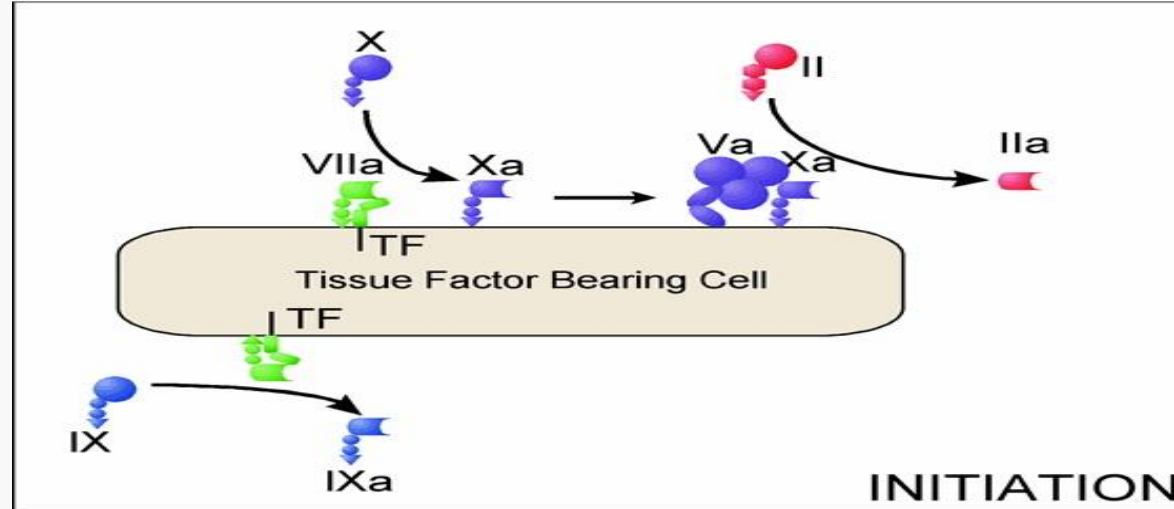
trombin

PAR1

PAR1*





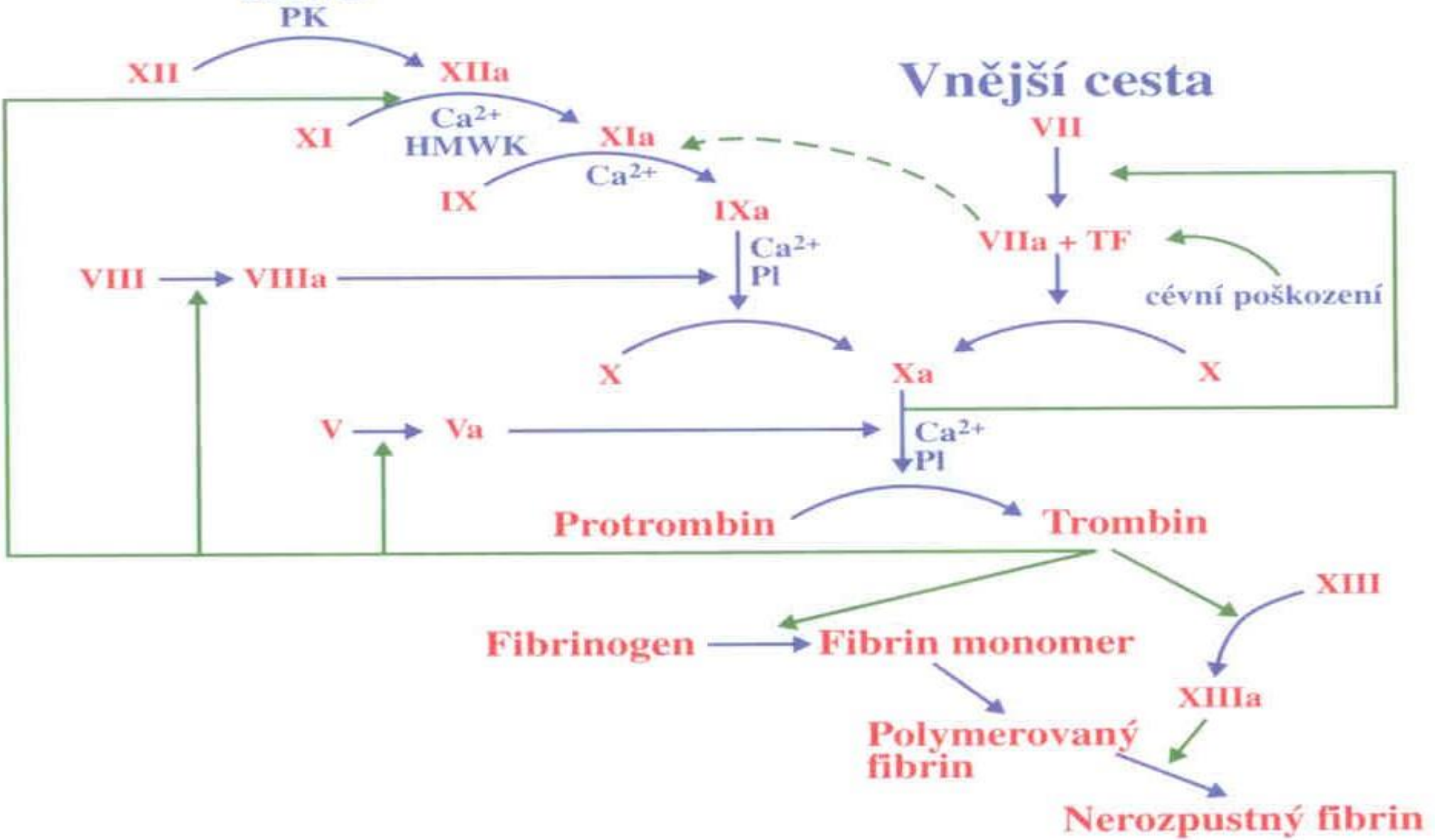


Vnitřní cesta

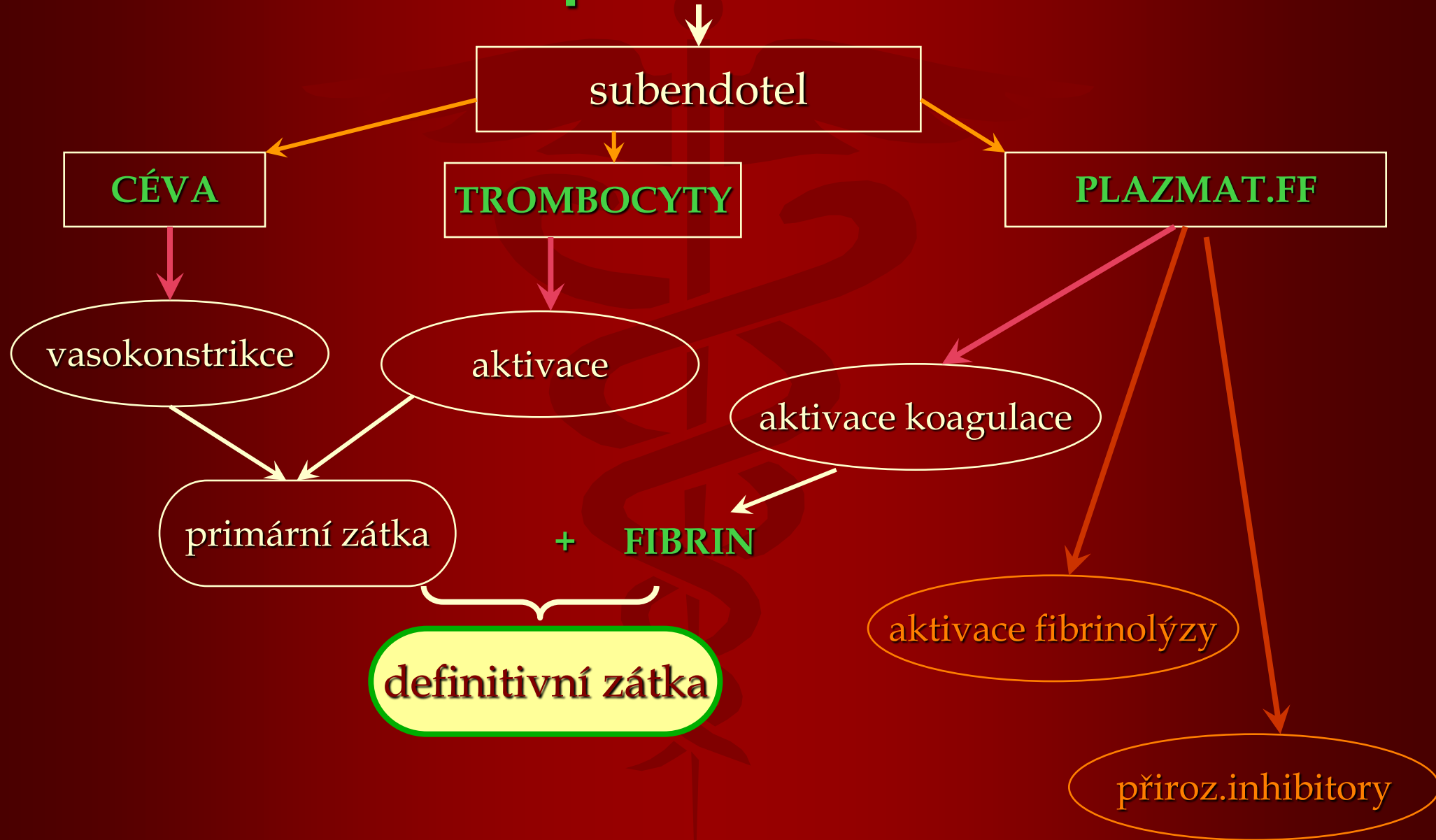
negativně nabitý povrch
HMWK
PK

Původní schéma koagulačních dějů

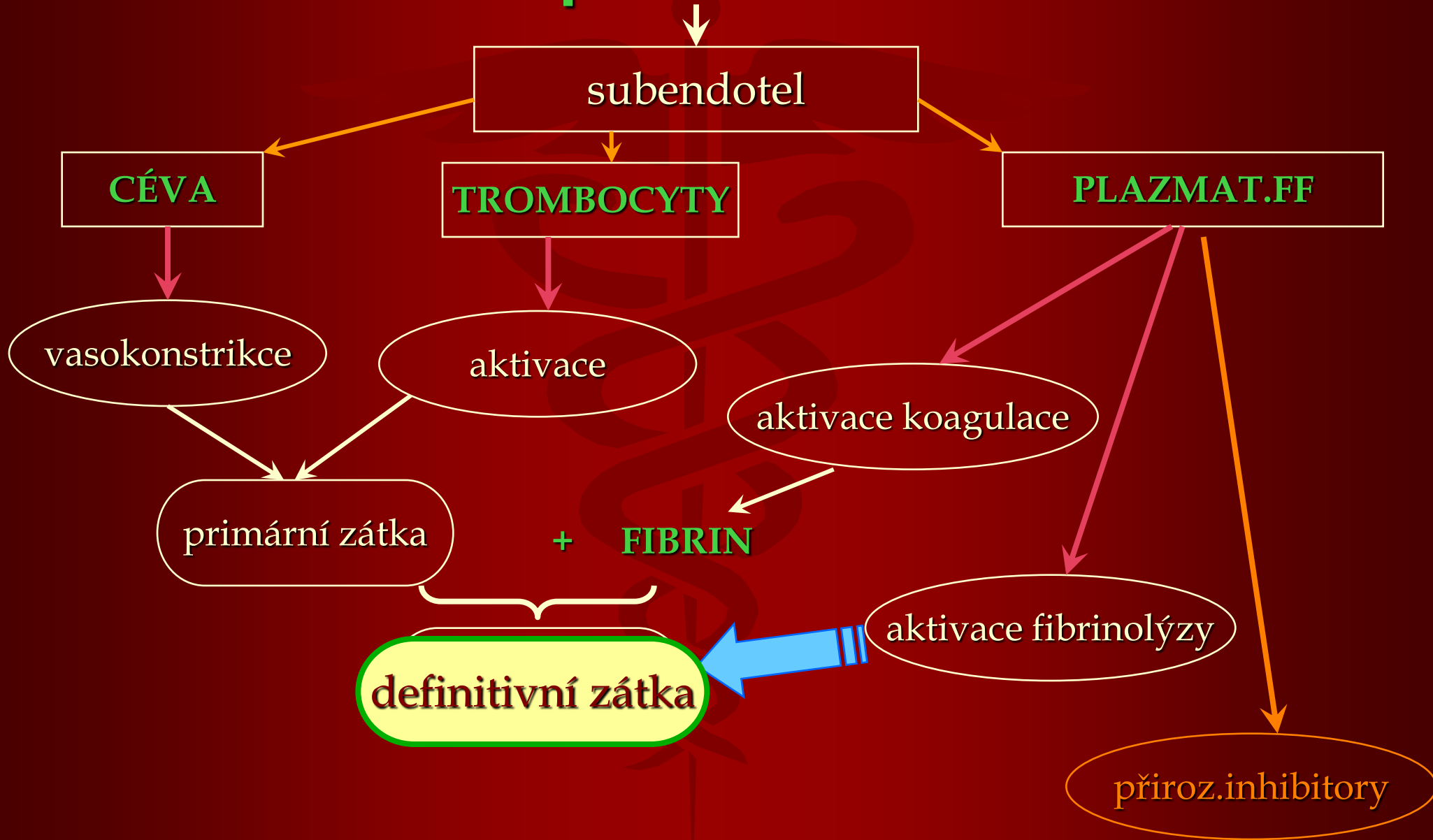
Vnější cesta



Poranění = poškození endotelu



Poranění = poškození endotelu



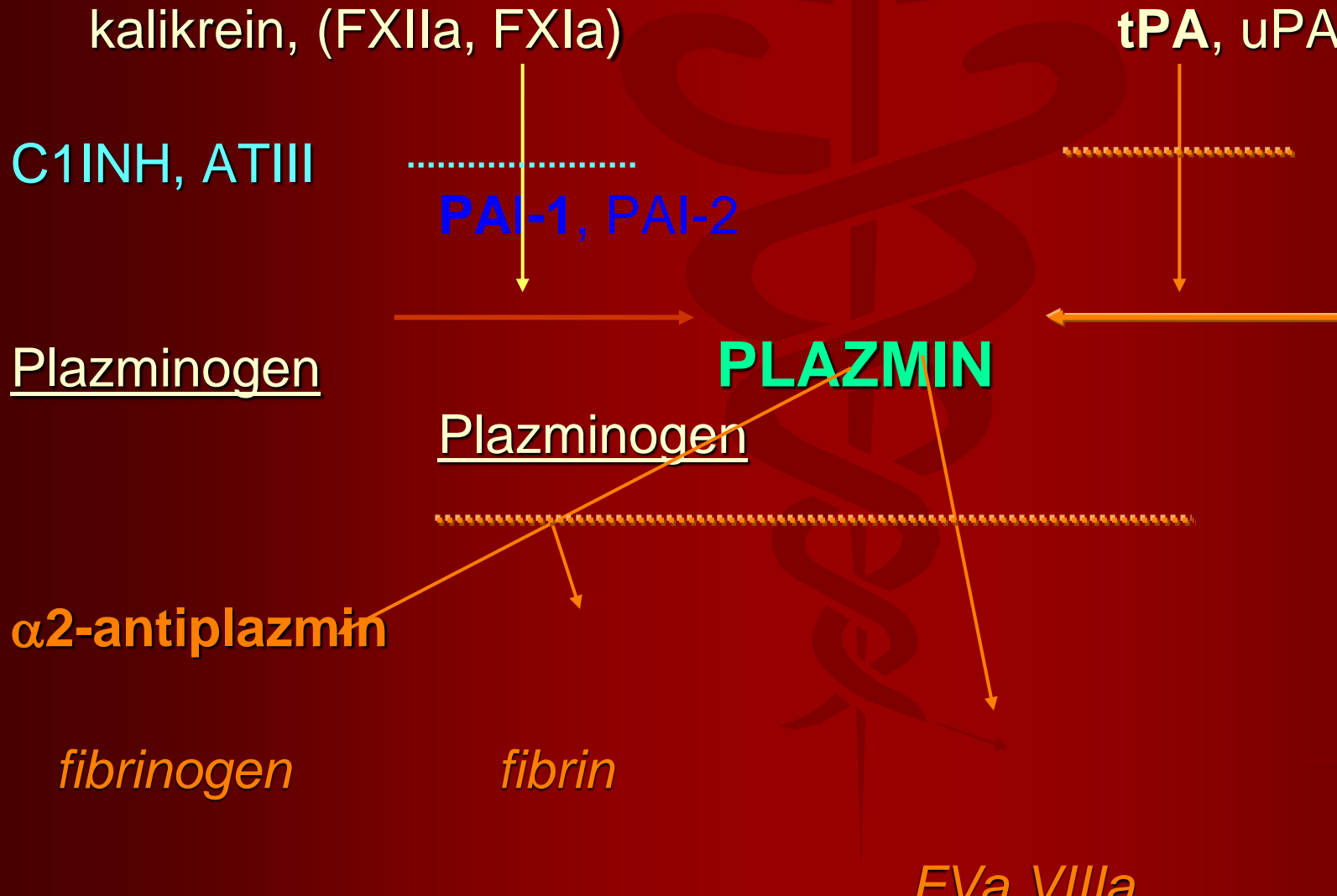
Fibrinolýza

- 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)



Aktivace fibrinolýzy

Plazminogen

silné aktivátory

tkáňový aktivátor

plazminogenu - tPA

urokinázový aktivátor

plazminogenu - uPA

slabé aktivátory

kalikrein

fXIIa, f XIa

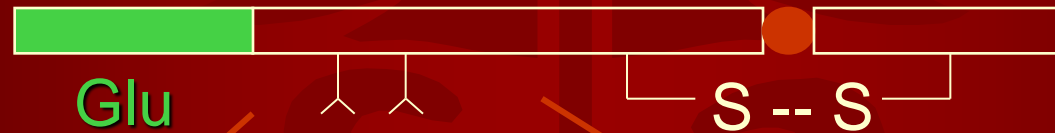
Plazmin

Aktivace fibrinolýzy - přeměna plazminogenu na plazmin

- Fibrinolýza - po formaci fibrinu dojde k navázání jak plazminogenu 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 2AP

Formy plazminogenu, plazminu

Glu - plazminogen (mol.hmot. 90 000)



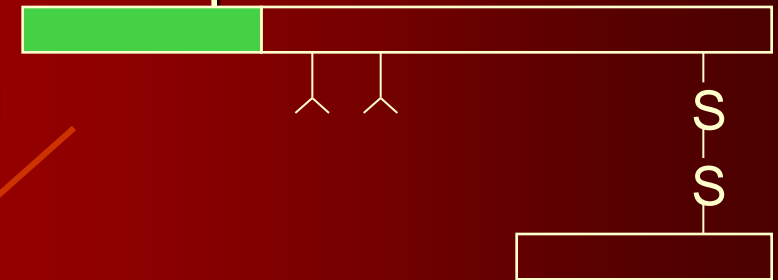
aktivátor plg

Lyz - plazminogen (mol.hmot.82 000)

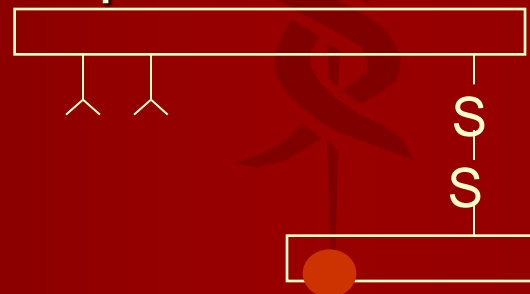


aktivátor plg

Glu - plazmin



lyz - plazmin



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

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

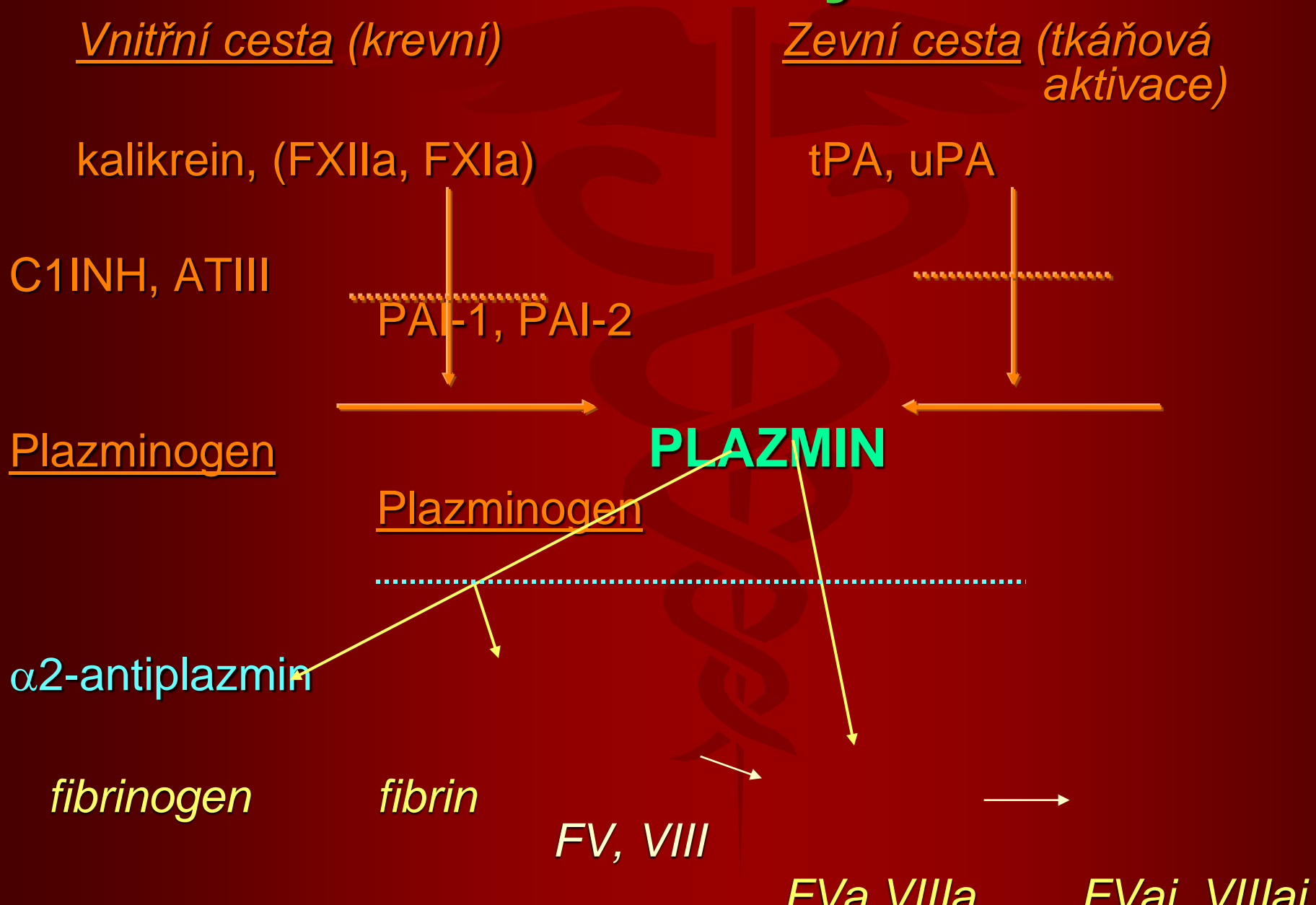
fibrinogen

fibrin

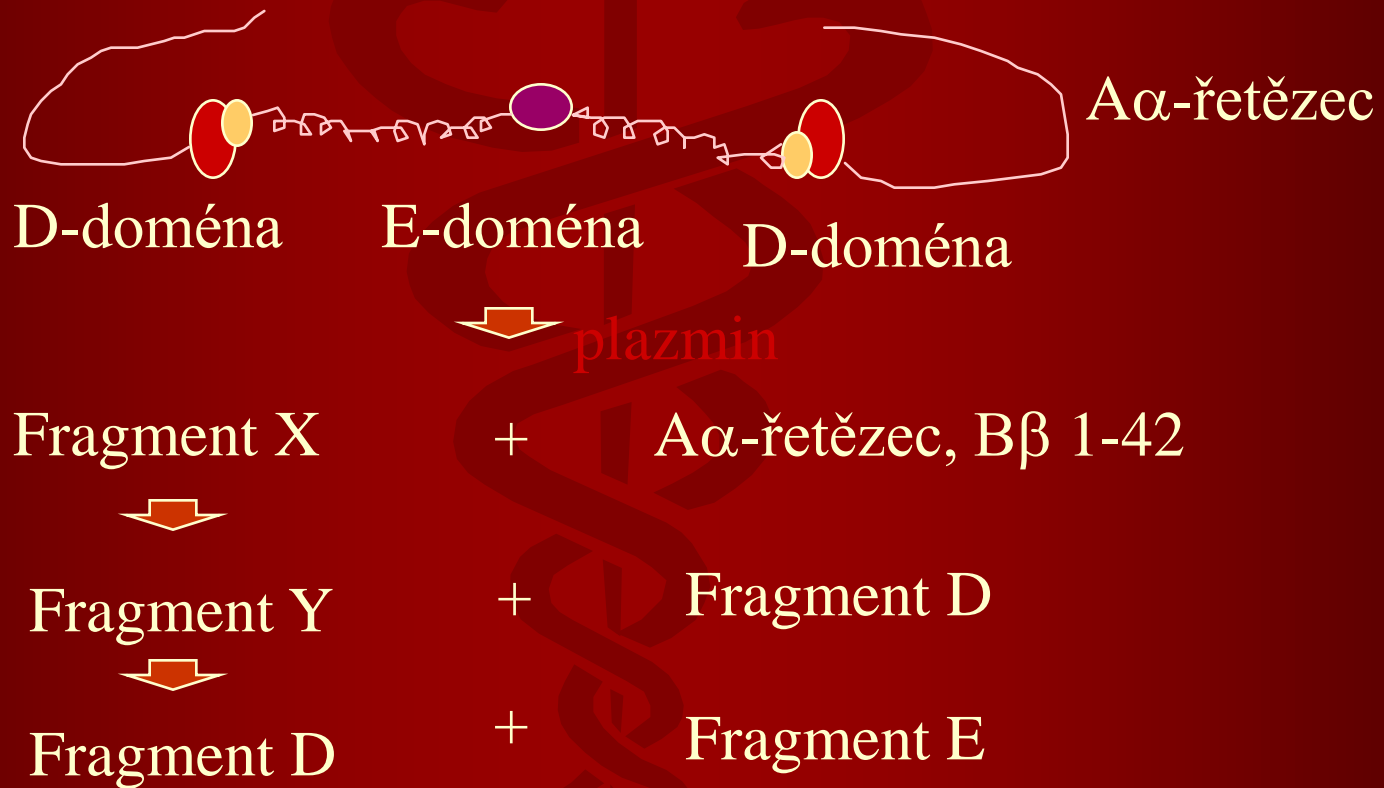
FV, VIII

FVa VIIIa

FVai VIIIai



Štěpení fibrinogenu plazminem



Štěpení fibrinu plazminem



Vznikají fibrin degradační produkty, obsahující zkříženou vazbu

Inhibitory fibrinolýzy

➤ inhibitory plazminu:

↪ alfa₂-antiplazmin

↪ TAFI - **T**rombin **A**ctivated **F**ibrinolysis **I**nhibitor

➤ 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** (histidin rich glycoprotein):
 - ↪ Inhibice vazby plazminogenu na fibrin obsazením lyzinových zbytků fibrinu
- **Trombospondin:**
 - ↪ Vazbou na plazminogen působí jako inhibitor aktivace plazminogenu tPA
- **Lipoprotein (a):**
 - ↪ Vazbou na endotel snižuje koncentraci plazminogenu na endotelu

TAFI

Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor

- glykoprotein syntetizovaný v játrech
- pravděpodobně koluje v plazmě v komplexu s plazminogenem
- **odštěpuje z fibrinu lyzinové zbytky**
 - ↳ **odstraní tak vazebná místa pro plazminogen a t-PA**
 - ↳ **tím snižuje vznik plazminu**
- inhibuje aktivaci glu-plg (glu-plazminogen) a jeho konverzi na lyz-plg
- uvolňuje PAI-1 z trombocytů

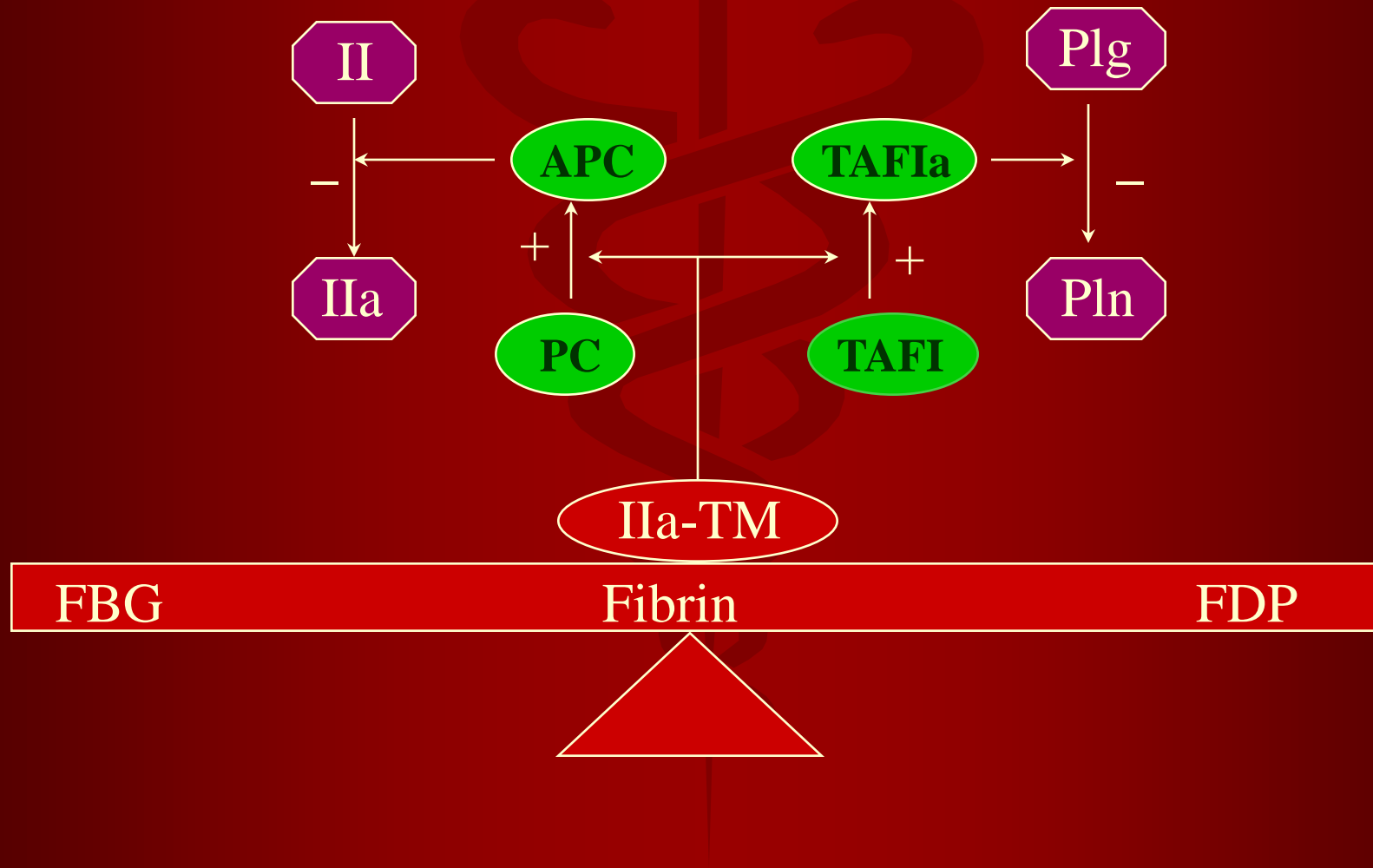
Aktivace TAFI

- 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

TAFI a trombomodulin

- Při nízké koncentraci TM je stimulována aktivace TAFI na TAFIa (antifibrinolytické působení TM)
- Při vysoké koncentraci TM 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

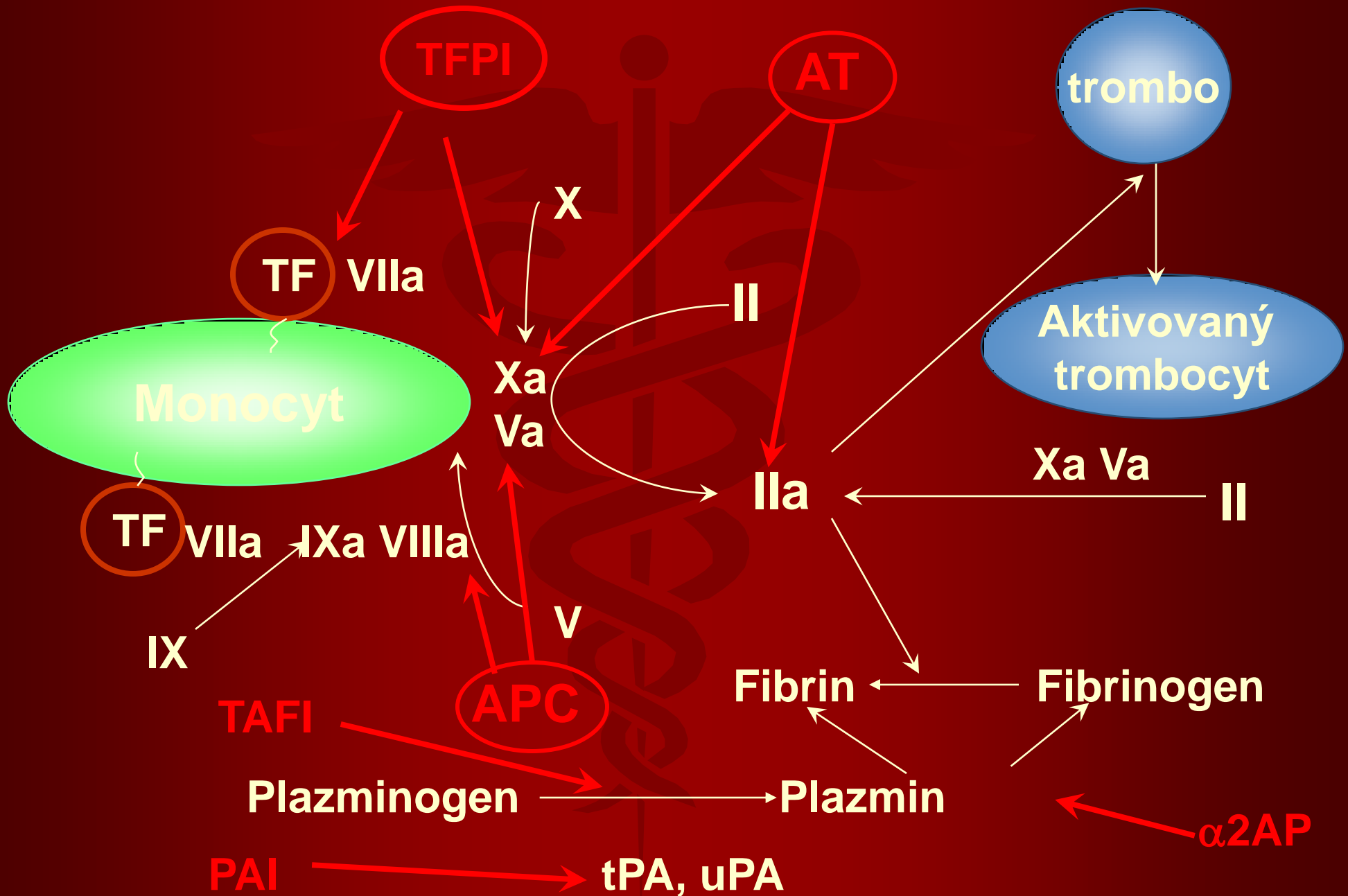


Fibrinolýza a koagulace

- 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 je trombofilní stav
 - ↳ buď v důsledku zvýšené aktivity koagulačních faktorů
 - ↳ nebo samotného TAFI

Přirozené inhibitory koagulace

- serpiny (inhibitory proteáz): Inhibovaná proteáza:
 - ↪ **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 (binding protein)
 - ↪ TM
 - ↪ inhibitor akt.proteinu C
 - ↪ EPCR (endotelový receptor PC)
- **TFPI** (inhibitor zevní koagulační cesty) (TF/FVIIa/FXa)
- nespecifické inhibitory:
 - ↪ alfa2 MG (IIa, kalikrein, plazmin)



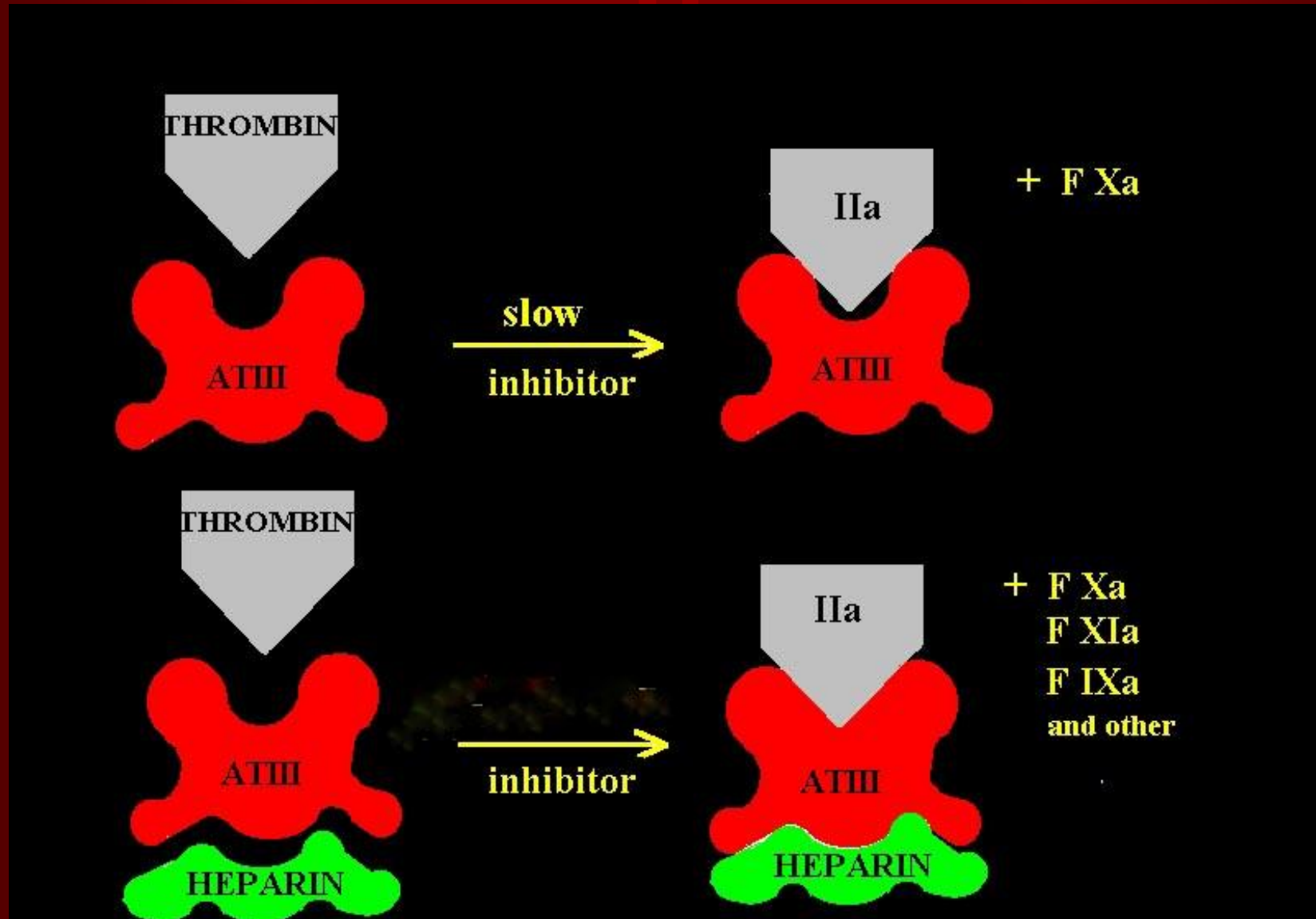
Antitrombin

- 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 1000 – 2 000x - vazba na AT je reverzibilní
- GAG mají úlohu kofaktoru v této reakci

Antitrombin



Rozdíl mechanismu reakce AT III s UFH a LMWH

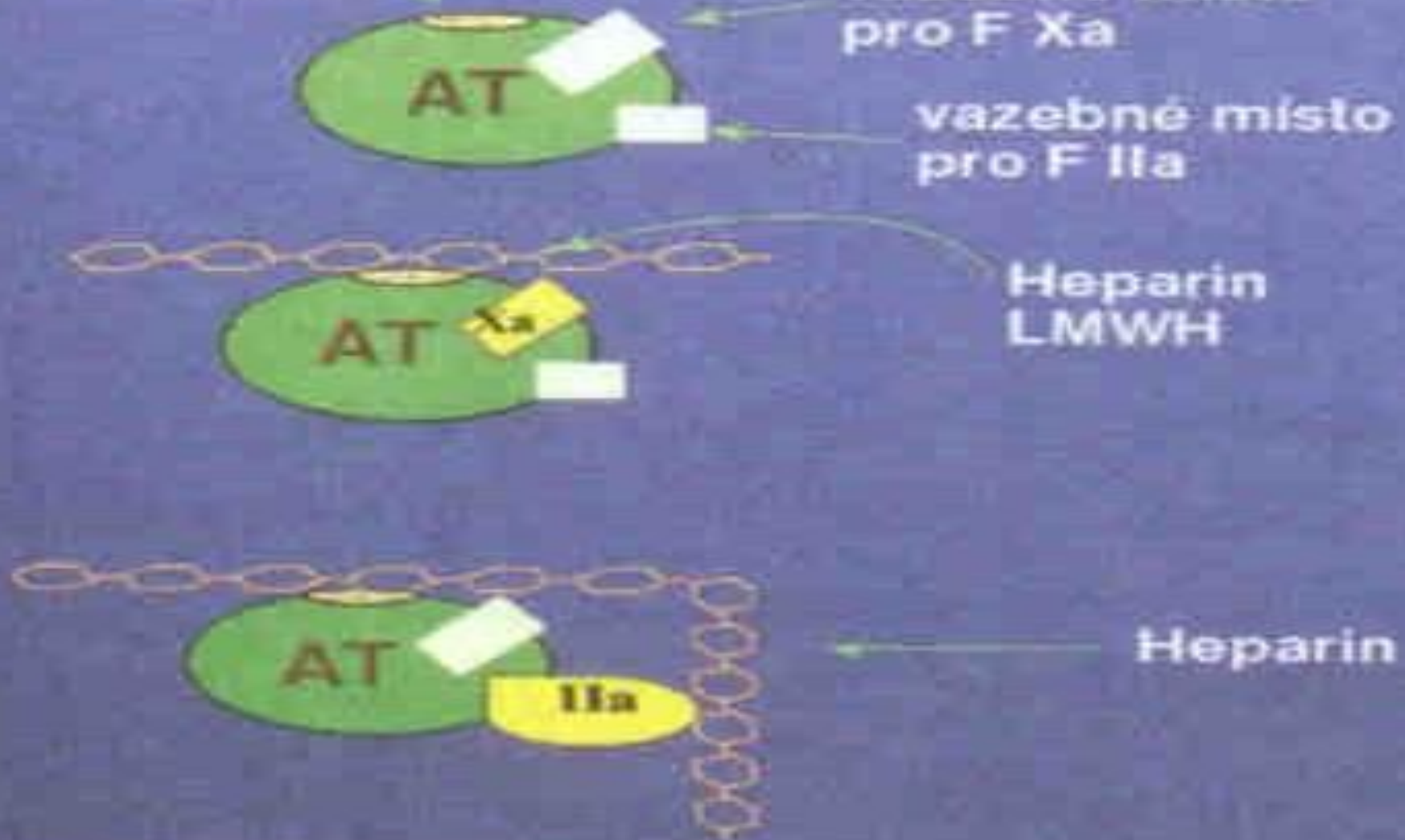
Místo pro navázání heparinu

vazebné místo pro F Xa

vazebné místo pro F IIa

Heparin
LMWH

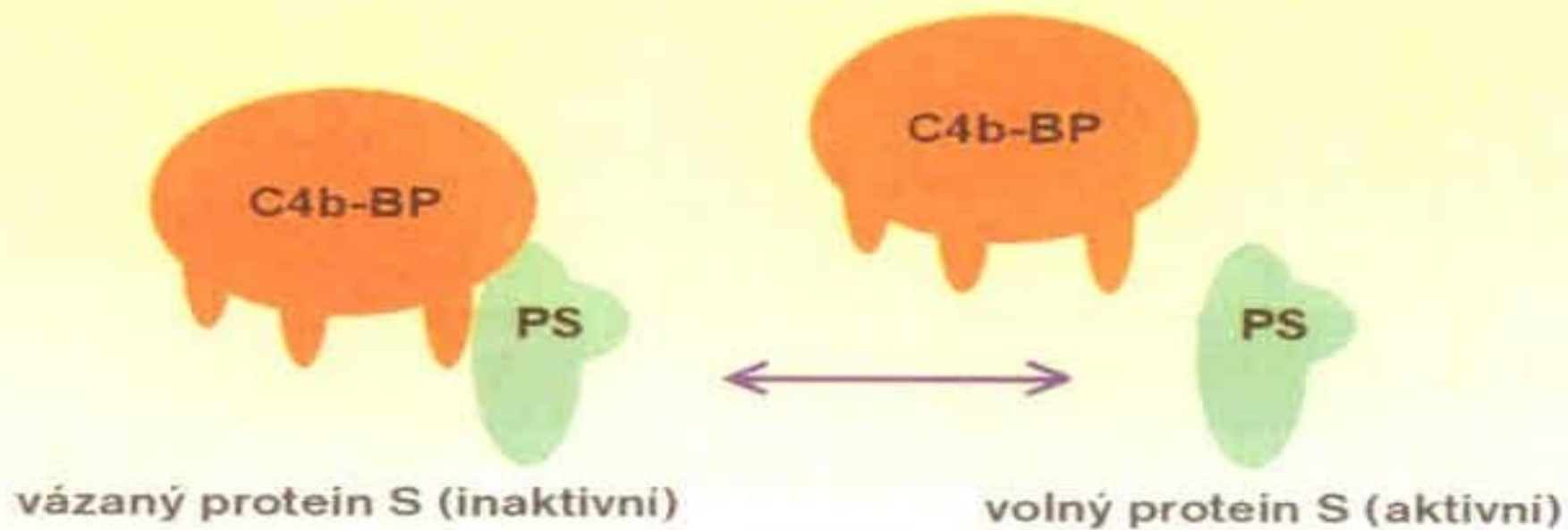
Heparin



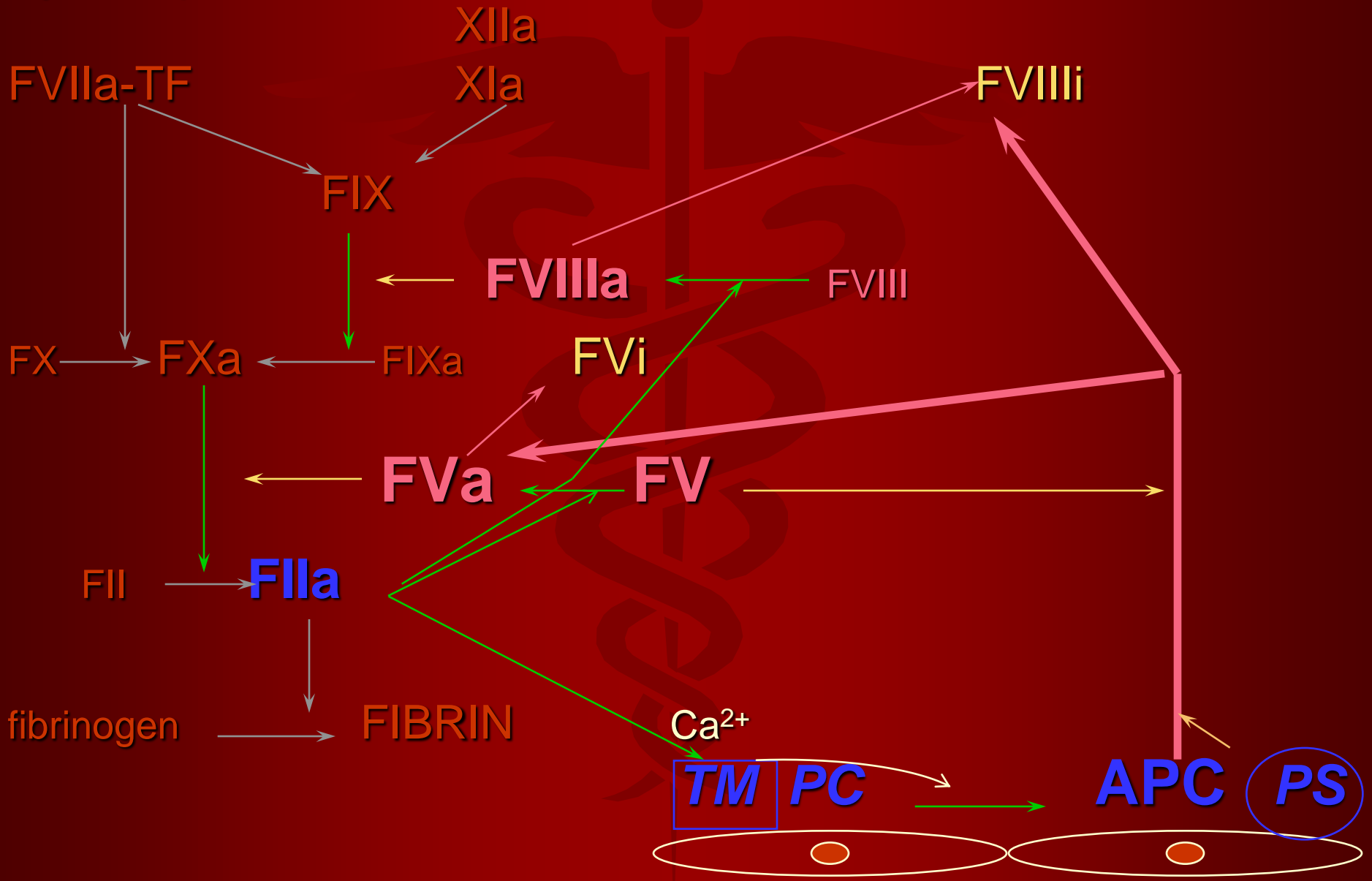
Antitrombin

- 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
- **aktivován na endotelu komplexem IIa/TM**
- **EPCR** - receptor endotel. buněk pro PC
 - ↳ podporuje aktivaci PC na endotelu
- **za přítomnosti kofaktoru proteinu S:**
 - ↳ štěpí FVa, FVIIIa

Protein S

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

Protein S

- **v plazmě je asi 60% nekovalentně vázáno (komplex 1:1) na C4BP:**
 - ↳ regulační protein cesty komplementu
- **vazba je reverzibilní**
- **vázaný PS již nemá funkci kofaktoru**

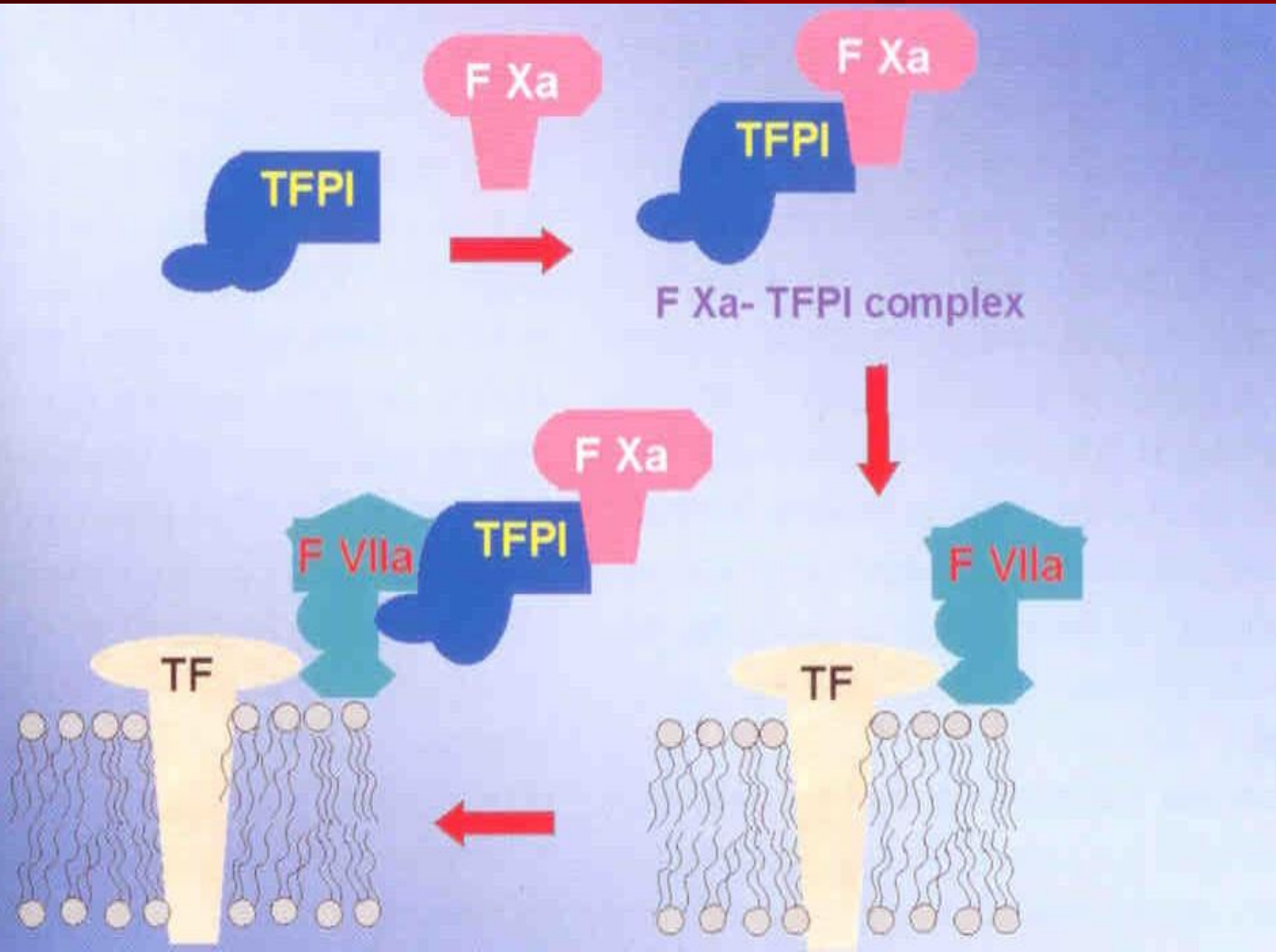
Trombomodulin

- transmembránový protein
- trombin vázaný na TM ztrácí koagulační aktivitu
- **v komplexu s trombinem aktivuje PC**
- **v komplexu s trombinem aktivuje TAFI**
(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)
- urychluje inhibici trombinu antitrombinem

TFPI - inhibitor zevní koagulační cesty

V iniciační fázi koagulace inhibuje:

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

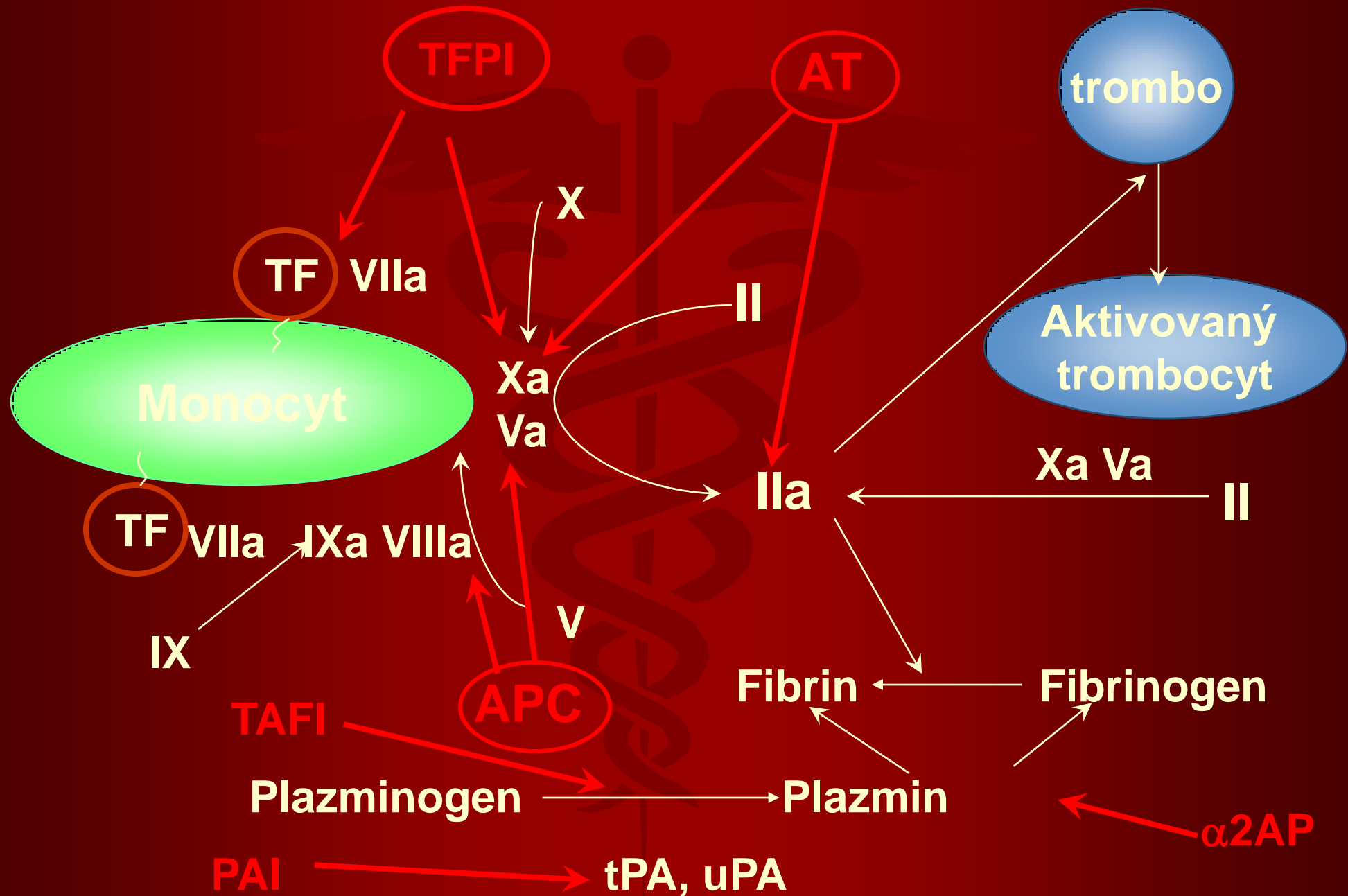


Je tvořen:

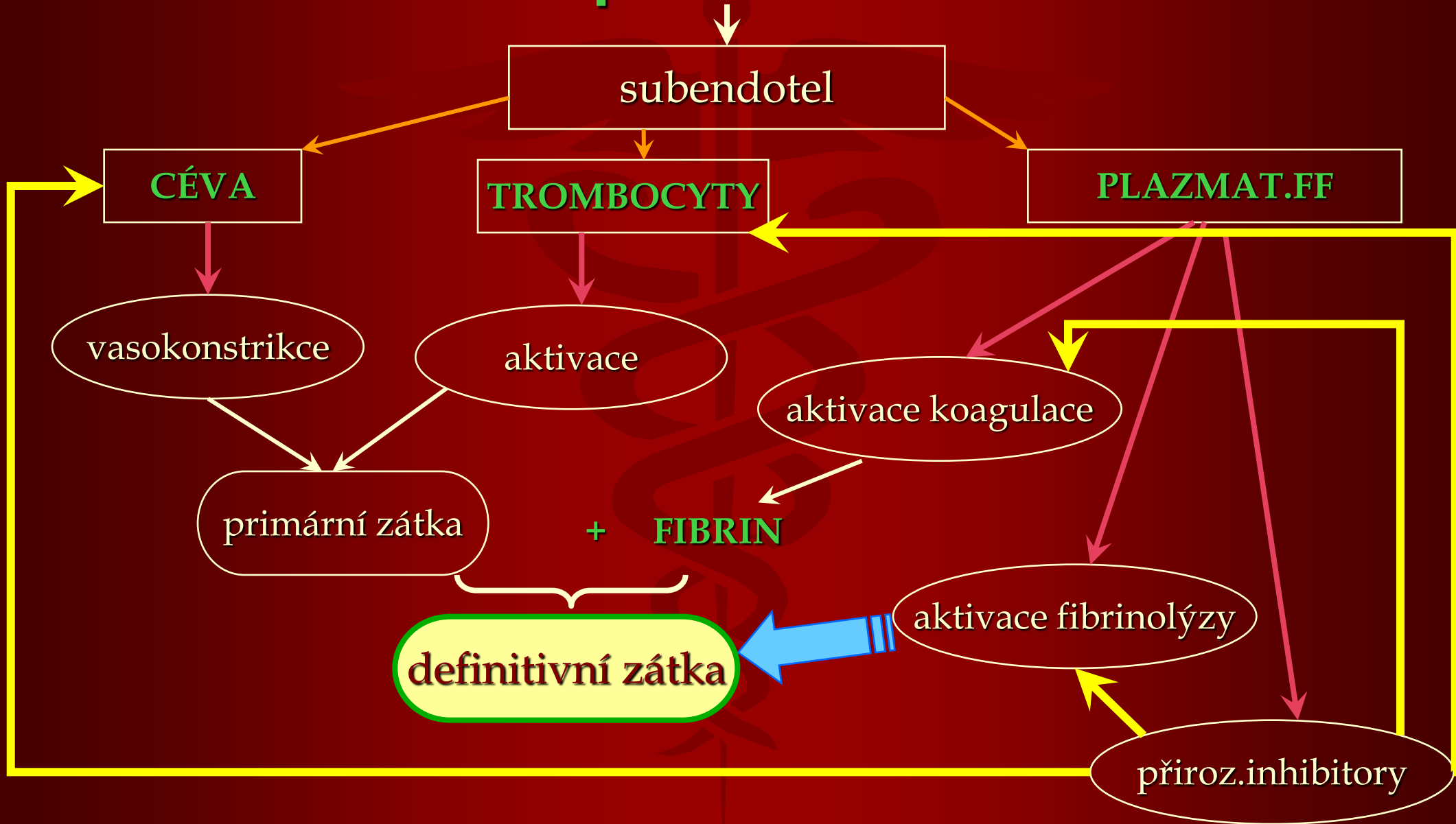
- v endotelu

Je uvolňován:

- heparinem
- současně s TF



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