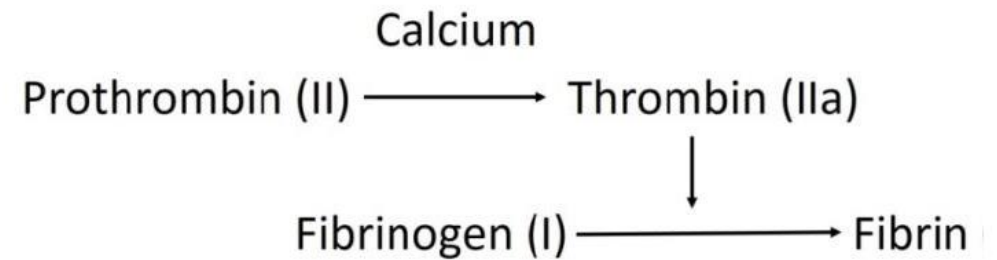


# PORUCHY HEMOSTÁZY

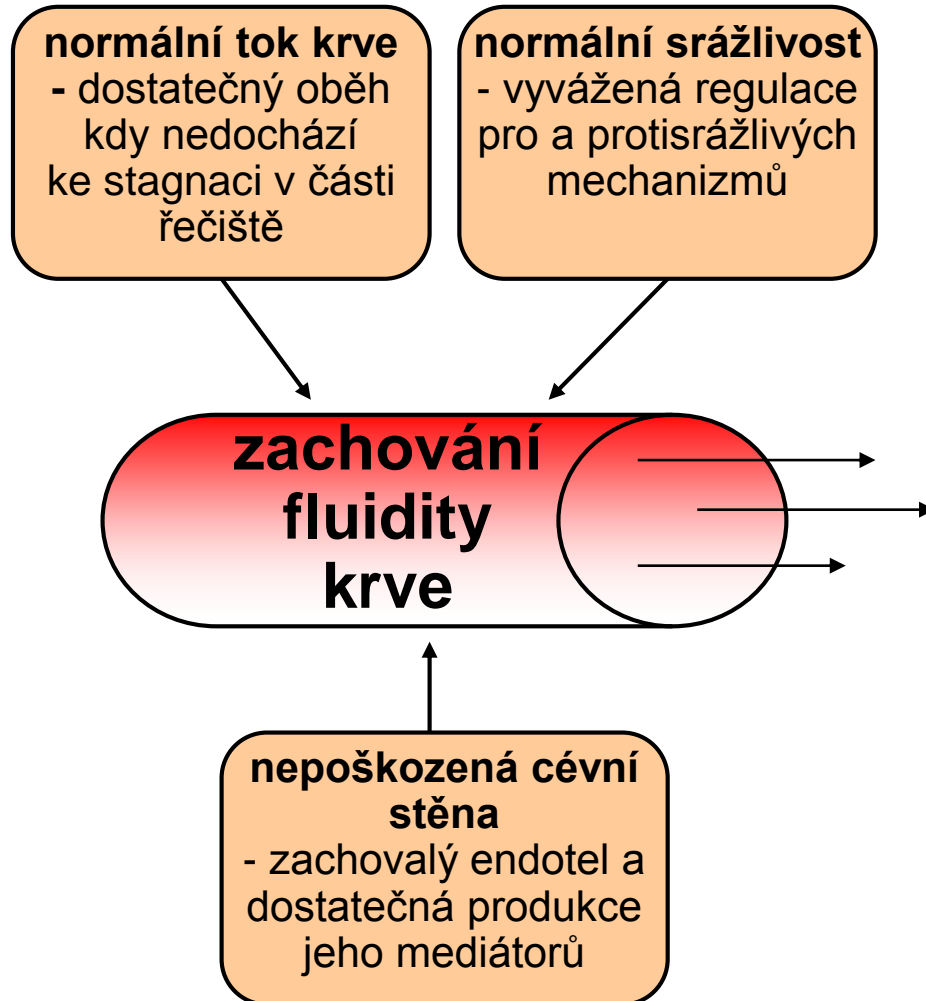
# Klasická teorie srážení - 1905

- 1860 – Virchow – tromby a tendence embolizace
- 1905 – P. Morawitz – klasický model
  - 4-faktorový model



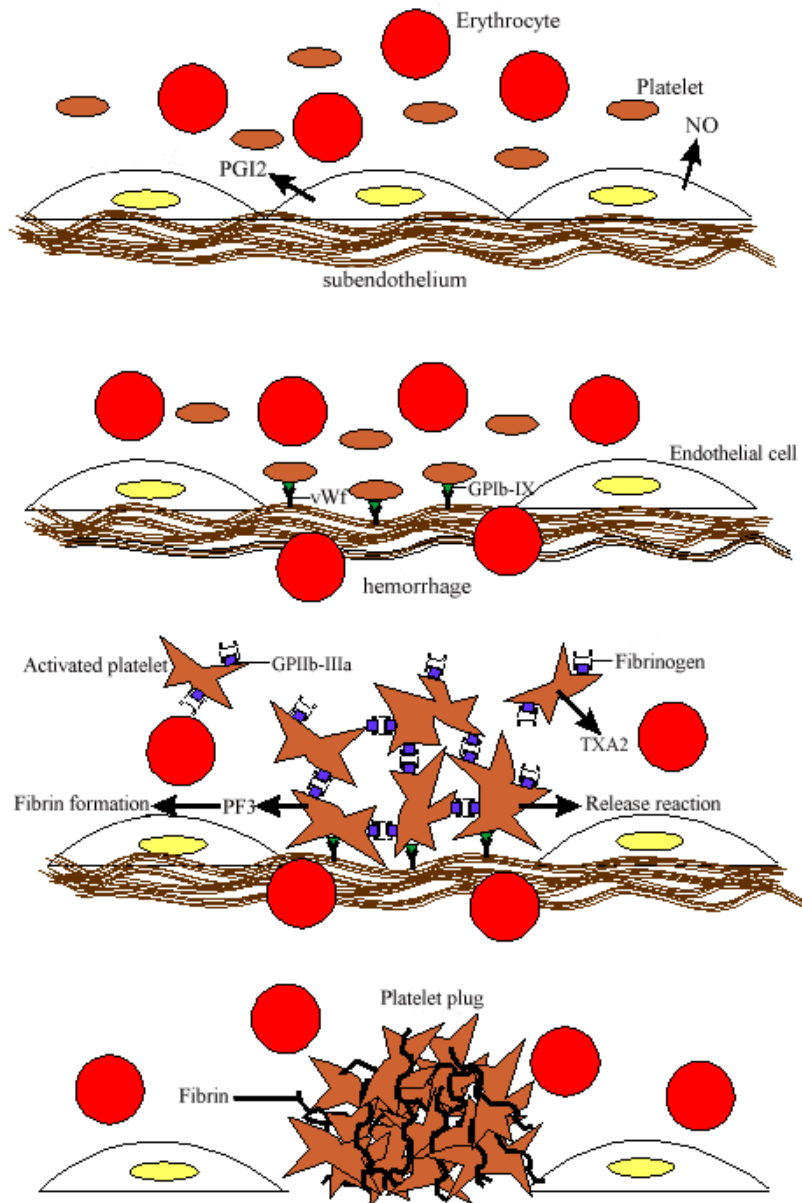
- 1964 – koagulační kaskáda
  - Vnitřní – všechny faktory jsou v krvi
    - Testováno aPTT
  - Vnější – vyžaduje faktory subendoteliálních buněk
    - Testováno PT

# Faktory zajišťující fluiditu krve

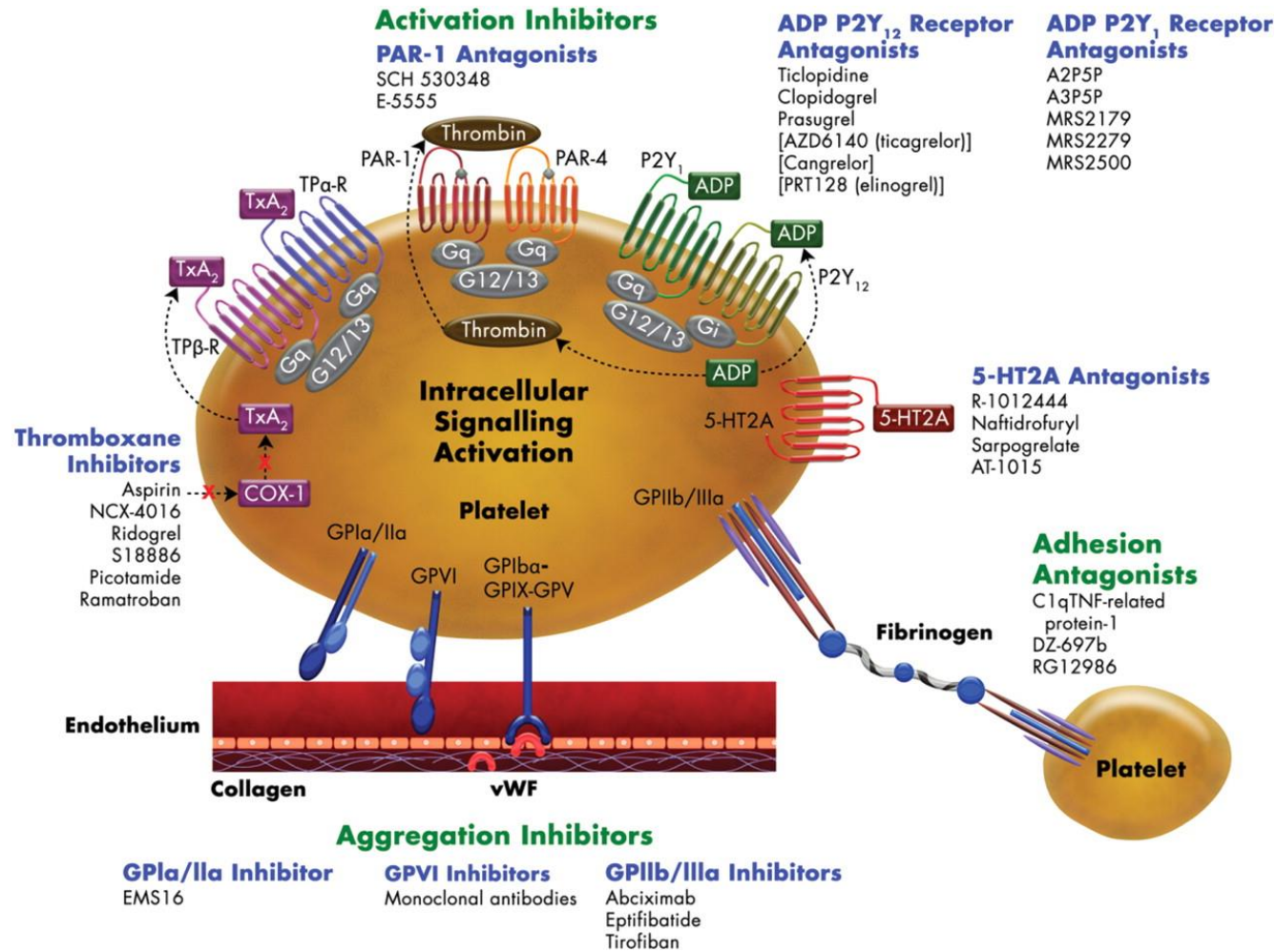


- změna nebo porucha v kterémkoliv z těchto faktorů (nebo kombinovaná porucha) má za následek
  - fyziologické srážení krve (= hemostáza)
    - primární
    - sekundární
  - patologické srážení krve (= trombóza)
    - zvýšení rizika
    - spontánní

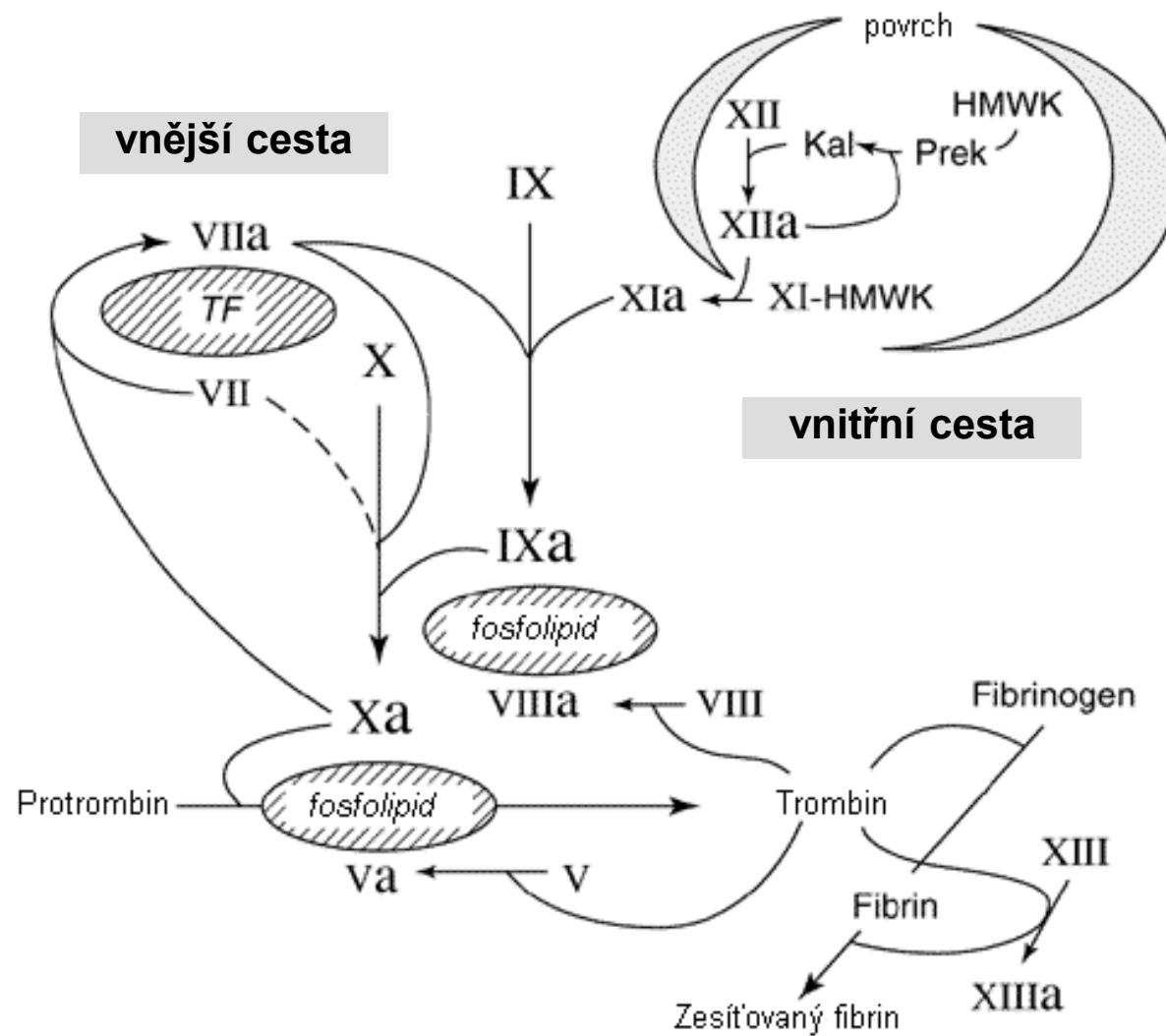
# Primární hemostáza



- endotel normálně brání hemostáze sekrecí inhibitorů agregace destiček a koagulace
  - oxid dusnatý
  - prostacyklin
  - trombomodulin
  - heparan-sulfát
  - tPA
- při poškození endotelu **adherují** trombocyty k vWf exprimovanému na odkrytém subendotelu prostřednictvím jejich receptorů (GPIb-IX)
- dochází k **aktivaci** destiček a uvolnění jejich mediátorů z granul
  - tromboxan, PAF, ADP, serotonin → aktivace dalších trombocytů (**agregace**), vazokonstrikce
  - exprese integrinů (GPIIb/IIIa) → vazba fibrinu a tvorba def. zátky
- trombocyty se podílí i na aktivaci sekundární hemostázy



# Sekundární hemostáza



## 2 typy aktivace

### - vnitřní cesta

- nastává po kontaktu HMWK, faktorů XII a XI s negativně nabitým povrchem, např.
  - ☛ obnažený kolagen v sub-endoteliální vrstvě cév
  - ☛ lipoproteiny (chylomikrony, VLDL)
  - ☛ stěna bakterií

### - vnější cesta

- tkáňová faktor (TF, fIII) uvolněný z poškozených tkání funguje jako kofaktor f VII a V

# Limitace koagulační kaskády

## ▪ **Dokonalá k vysvětlení procesu in vitro**

## ▪ Zajímavé poznatky z kliniky:

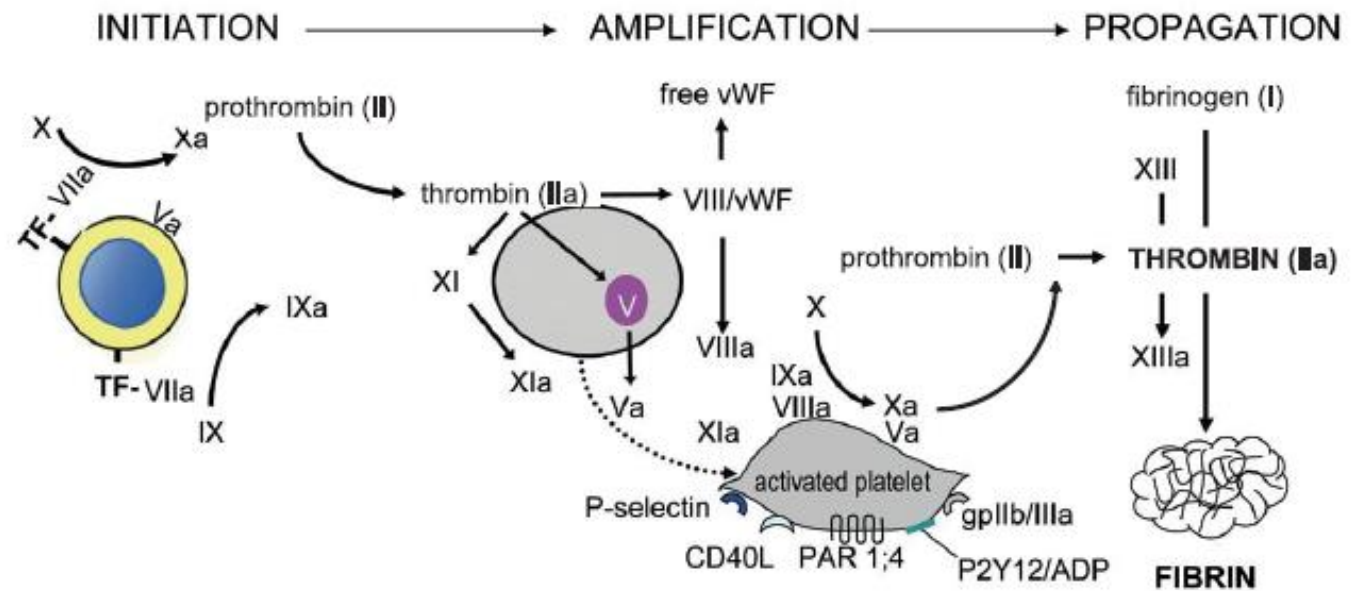
- Deficit faktoru XII
  - asymptomatický, aPTT test je prodloužený
- Defekt vysokomolekulárního kininogenu
  - Bez krvácivé poruchy

- Deficit faktoru IX a VIII
  - Závažné krvácení i přes to, že je vnější část kaskády OK
- Deficit faktoru VII
  - Krvácení i přes intaktní vnitřní dráhu kaskády

# Buněčný model

- Ústřední bod
  - Vznik trombinu z protrombinu
- Předchází však další reakce
- Tři fáze
  - Prolínají se
  - Překrývají se

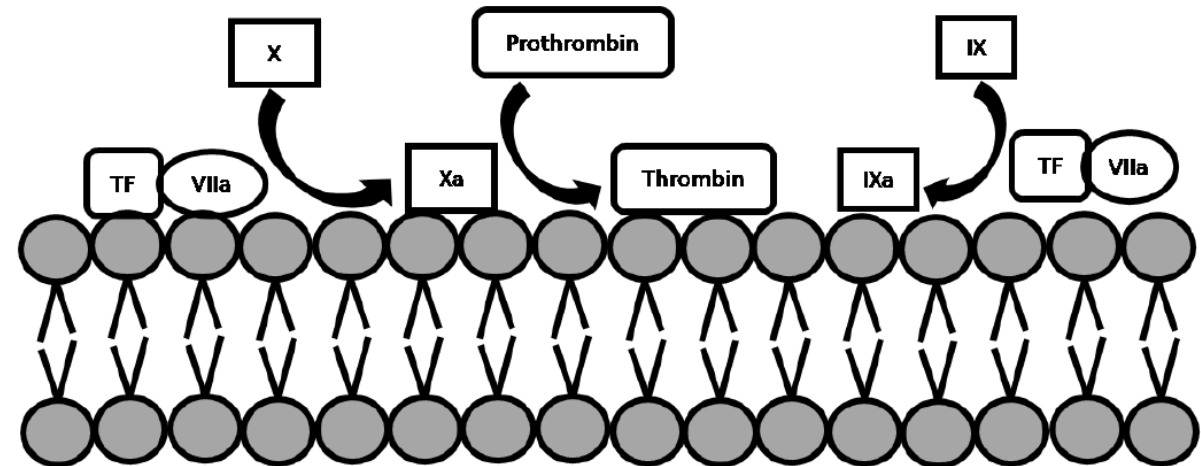
- Fáze iniciace
- Fáze amplifikace
- Fáze propagace





# Fáze iniciace

- TF – exprimován pouze po poškození
  - Subendoteliálně
    - Buňky hladké svaloviny, fibroblasty, makrofágy, endoteliální bb
  - V cirkulaci
    - Destičky – malé množství
- Na povrchu buněk nesoucích TF
  - Kontakt s faktorem VII, aktivace komplexu TF/VIIa
  - Aktivace faktoru X a IX
  - Konverze protrombinu na trombin
- V této fázi je vyrobeno jen malé množství trombinu
  - Inhibiční faktory
    - TFPI – inhibiční komplex TFPI/Xa
    - Antitrombin III



# Amplifikační fáze

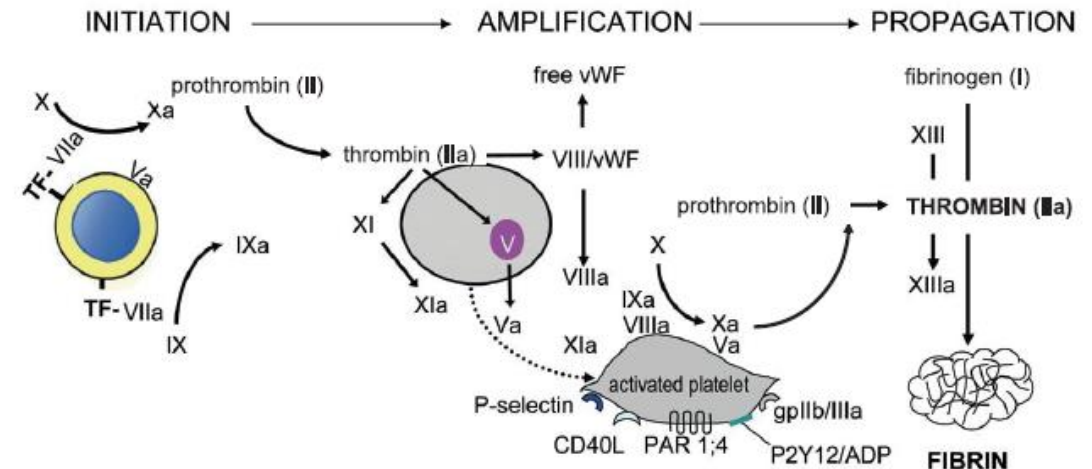
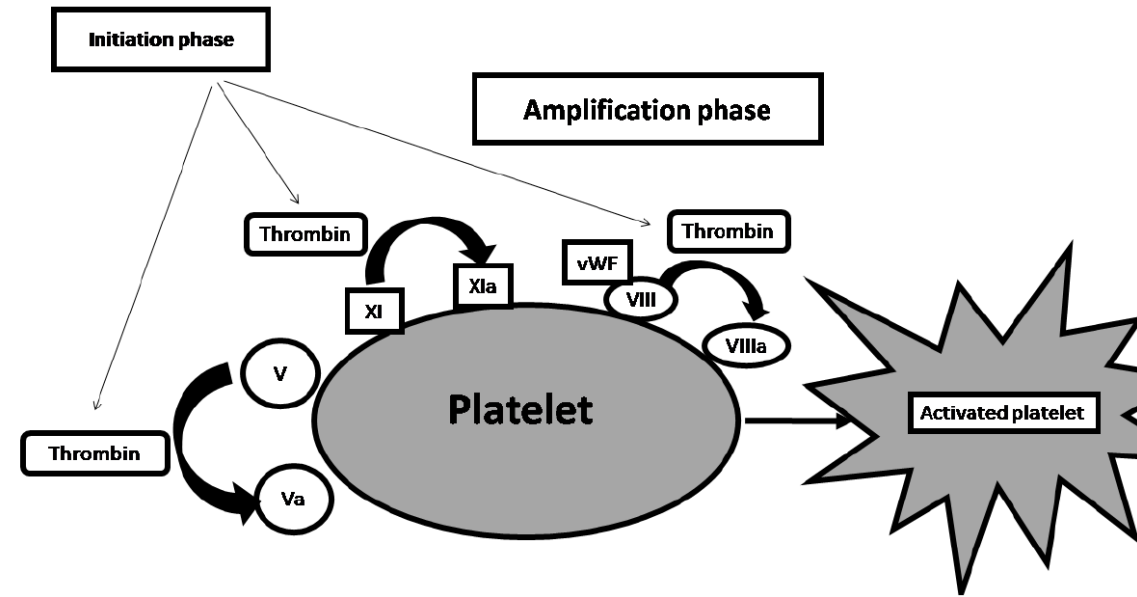
- Probíhá na povrchu destiček
  - Destičky adherují na vaskulární a extravaskulární struktury
    - Von Willebrandův faktor

## 1) TF aktivuje destičky

- Aktivace zahrnuje
  - Nepravidelný tvar, pseudopodia (zvětšení povrchu)
  - Exprese receptorů a vazných míst
  - Vyplavení serotoninu, Ca, ADP, faktoru V, fibrinogen, PDGF, vWF

## 2) Aktivace faktoru V, VIII a XI

- Faktor V je na povrchu destiček aktivován trombinem z iniciační fáze
- Trombin aktivuje faktor VIII na destičkách
  - vWF se odděluje z komplexu a umožňuje další adhezi
  - Faktor VIII zůstává na povrchu destiček
- Trombin aktivuje i faktor XI





# Amplifikační fáze II

## 3) Tenázový komplex

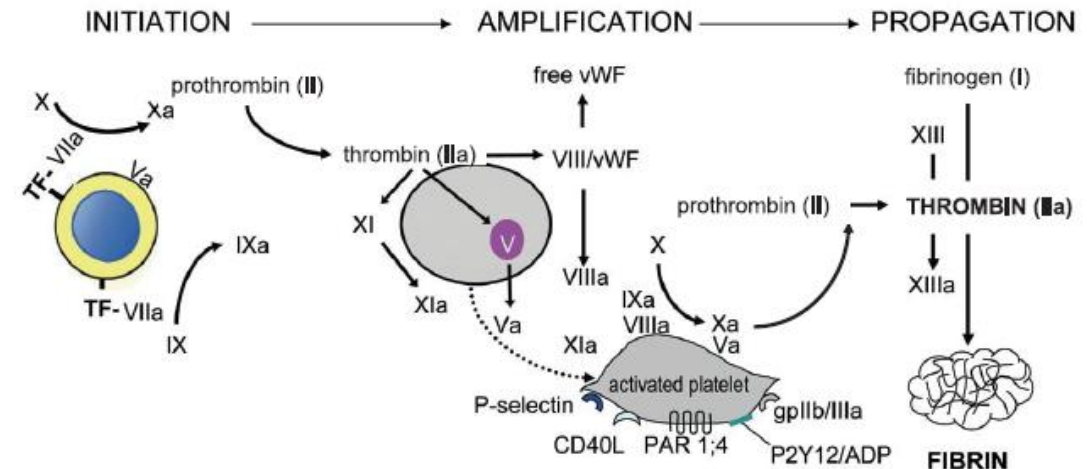
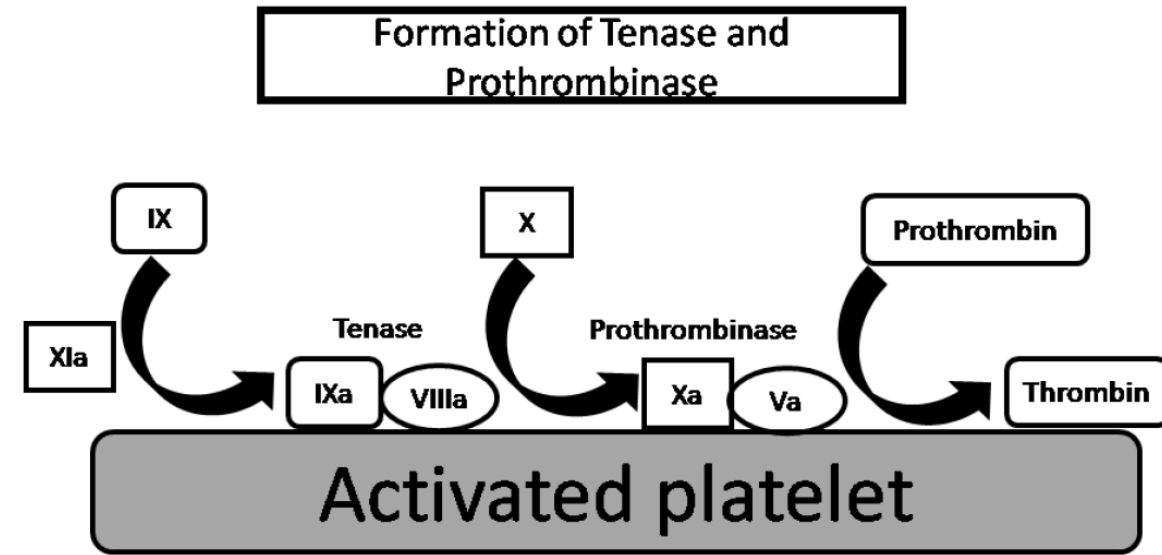
- Aktivovaný faktor IXa se váže na VIIIa – tenázový komplex (VIIIa/IXa)
  - Konvertuje faktor X na aktivní Xa

## 4) Protrombinázový komplex

- Aktivovaný faktor Xa tvoří komplex s Va

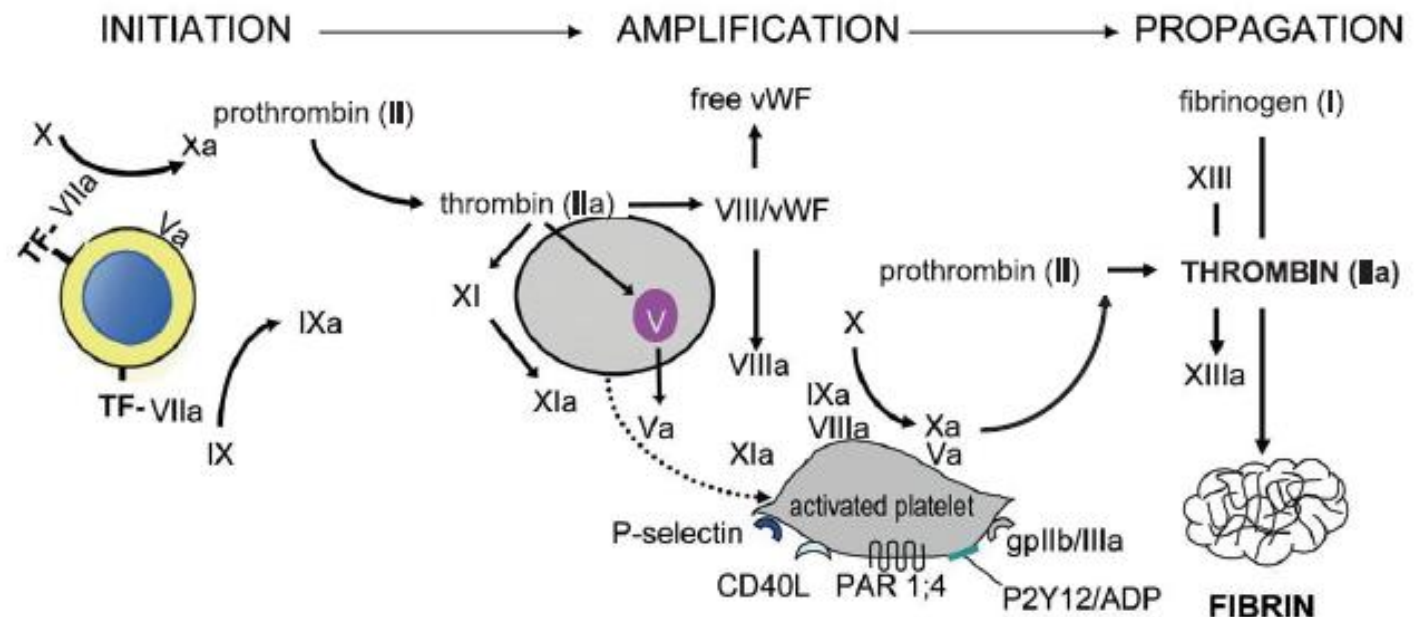
## 5) Tvorba trombinu

- Protrombináza konvertuje protrombin na velké množství trombinu
  - 300 000 účinnější než faktor Xa

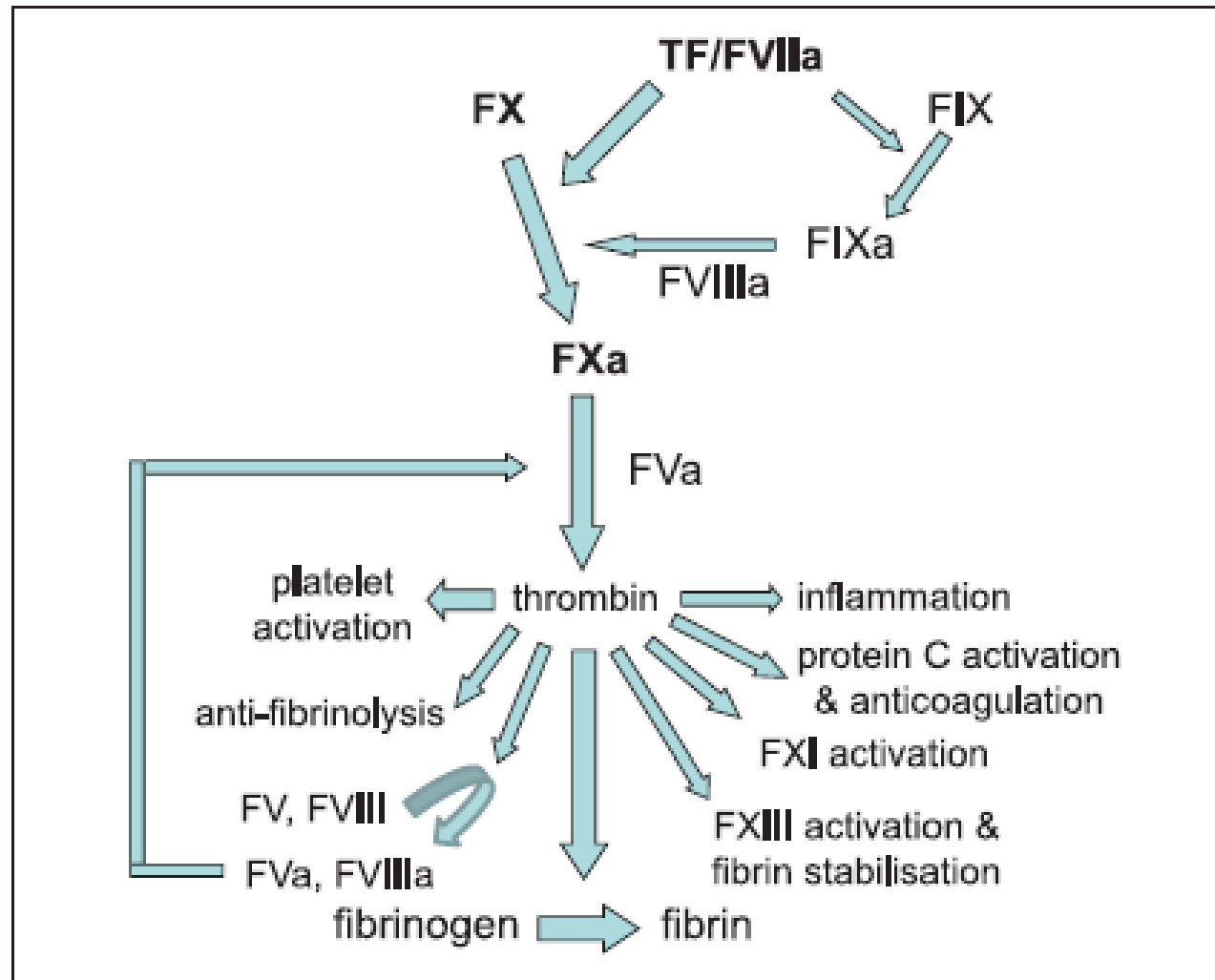


# Propagační fáze

- Další produkce trombinu
- Trombin konvertuje fibrinogen na fibrin
- Tvorba stabilní fibrinové sítě
  - Účast faktoru XIIIa

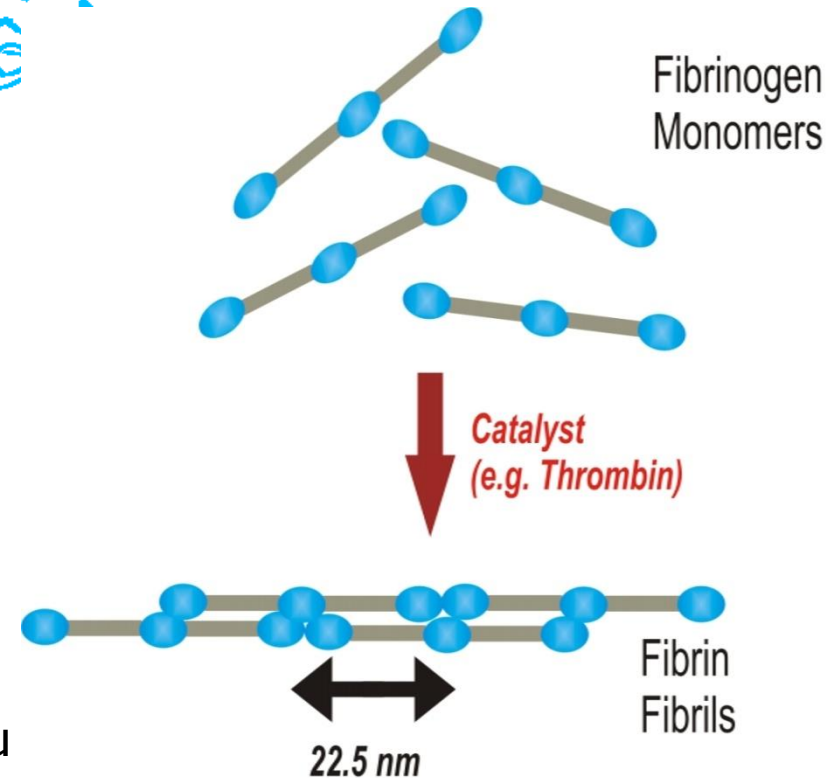
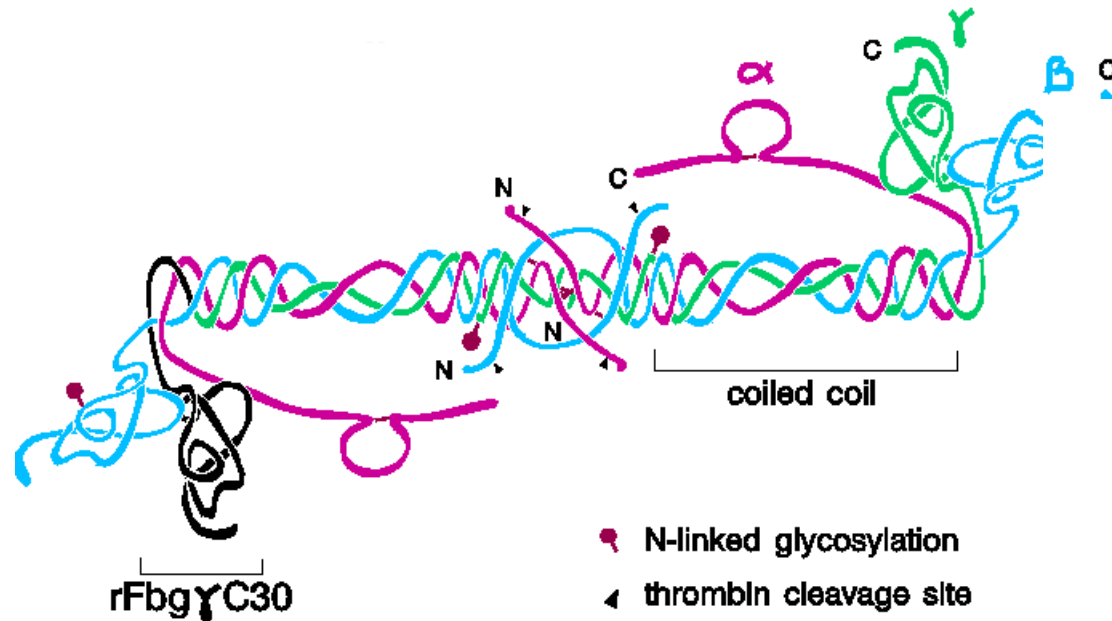


# Funkce trombinu



# Fibrinogen - fibrin

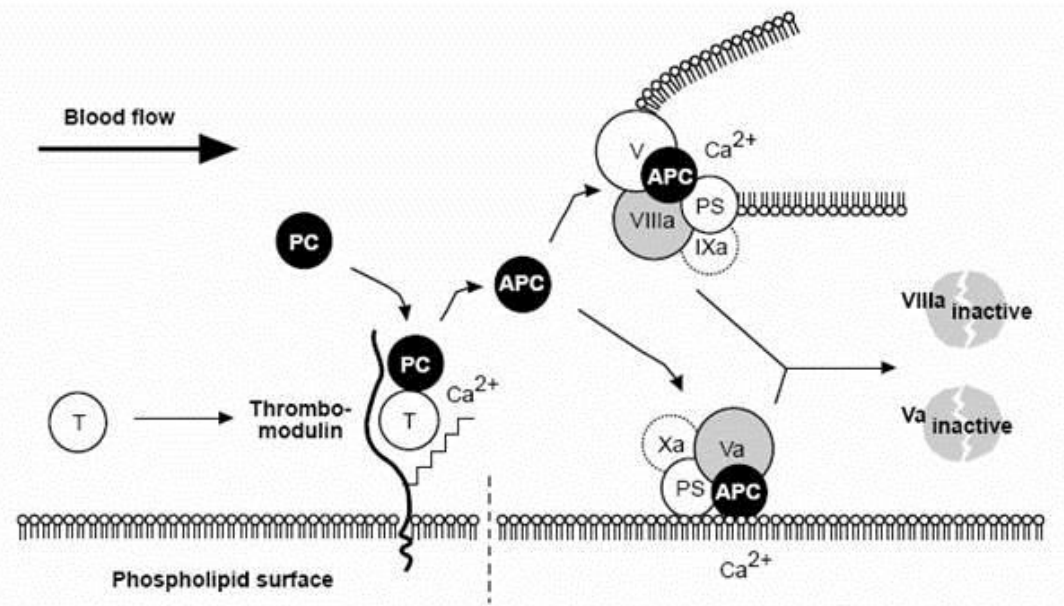
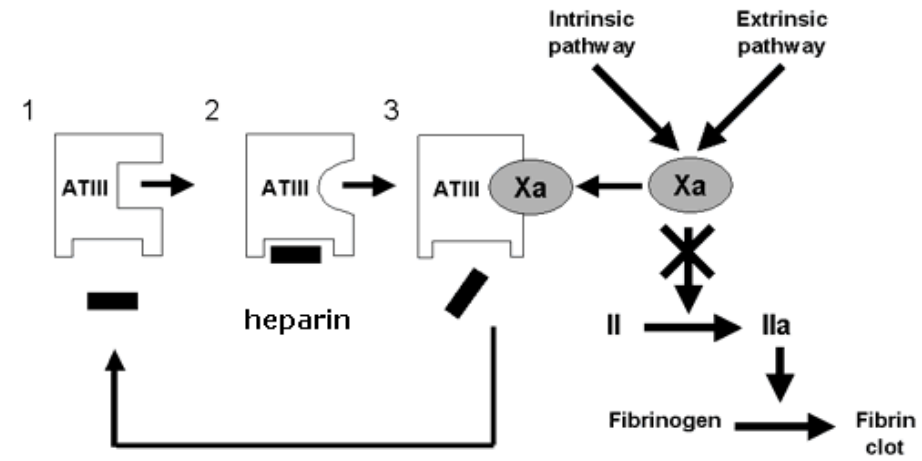
- 3 páry polypeptidů ( $[A-\alpha][B-\beta][\gamma]_2$ ) - 340kDa



- trombin (serinová proteáza) odštěpuje fibrinopeptidy A a B a generuje monomery fibrinu ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ )<sub>2</sub>
- monomery spontánně agregují a vytváří fibrinovou síť
- trombin rovněž aktivuje fXIII (transglutamináza), který tvoří příčné vazby mezi polymery fibrinu

# Regulační mechanismy srážení krve

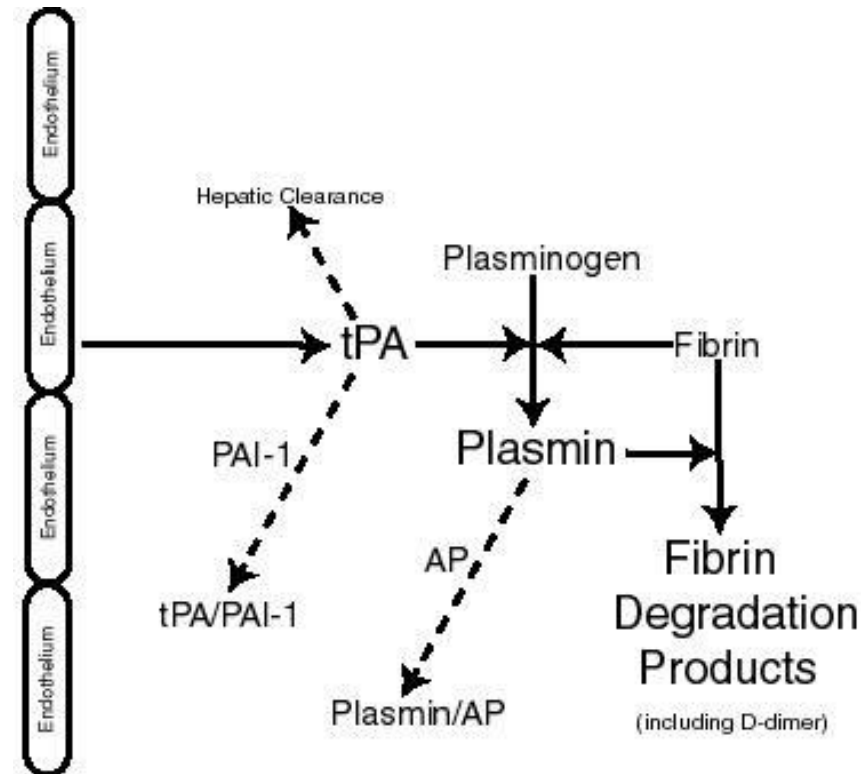
- rychlost toku krve
- koncentrace inhibičních faktorů
  - (1) kontrola na úrovni trombinu
    - antitrombin III (a heparan-sulfát)
      - ☛ inhibuje rovněž fVII, X, XI a XII
    - a2-makroglobulin
    - heparin kofaktor II
    - a1-antitrypsin
  - (2) kontrola na úrovni faktoru Xa
    - protein C + trombomodulin
    - protein S
- aktivita fibrinolýzy



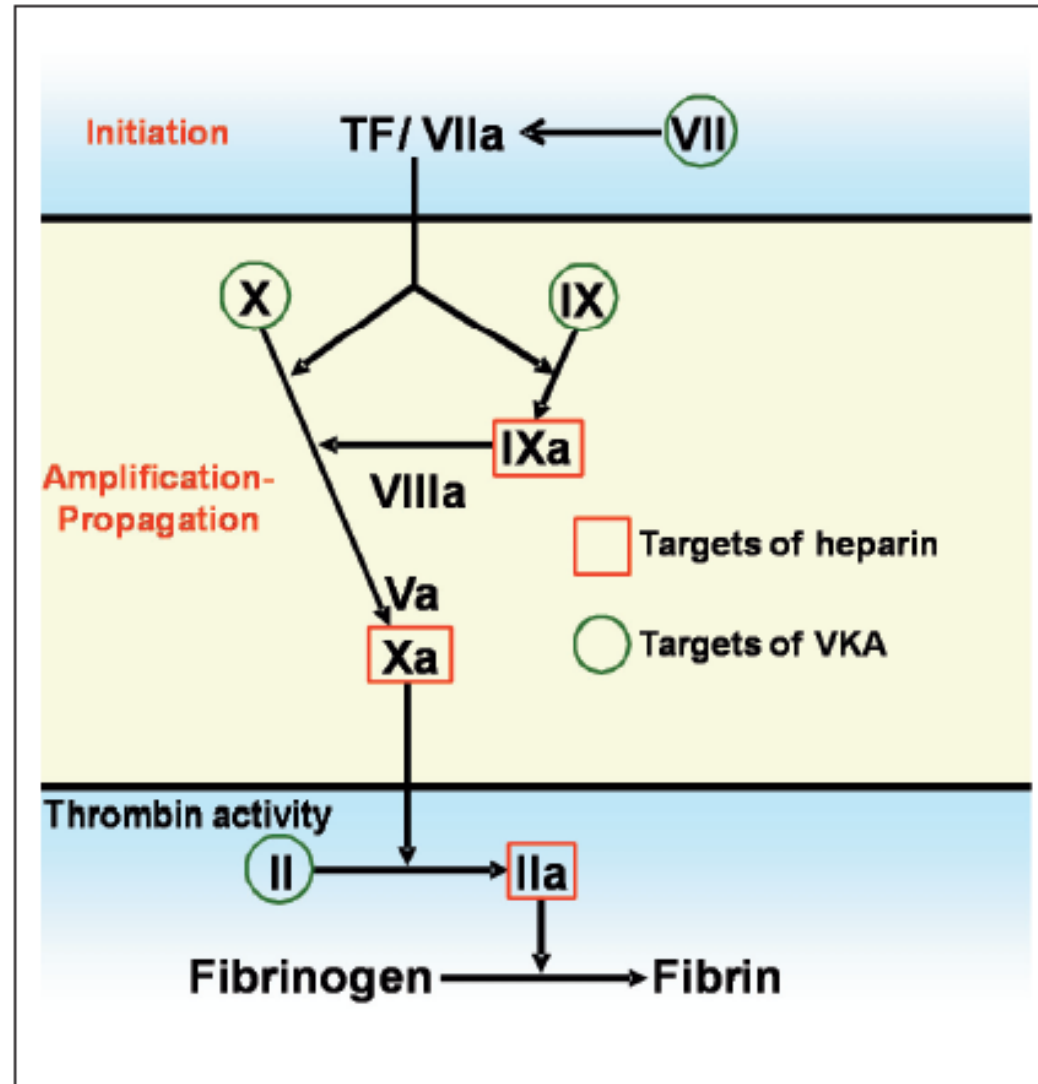


# Fibrinolytický systém

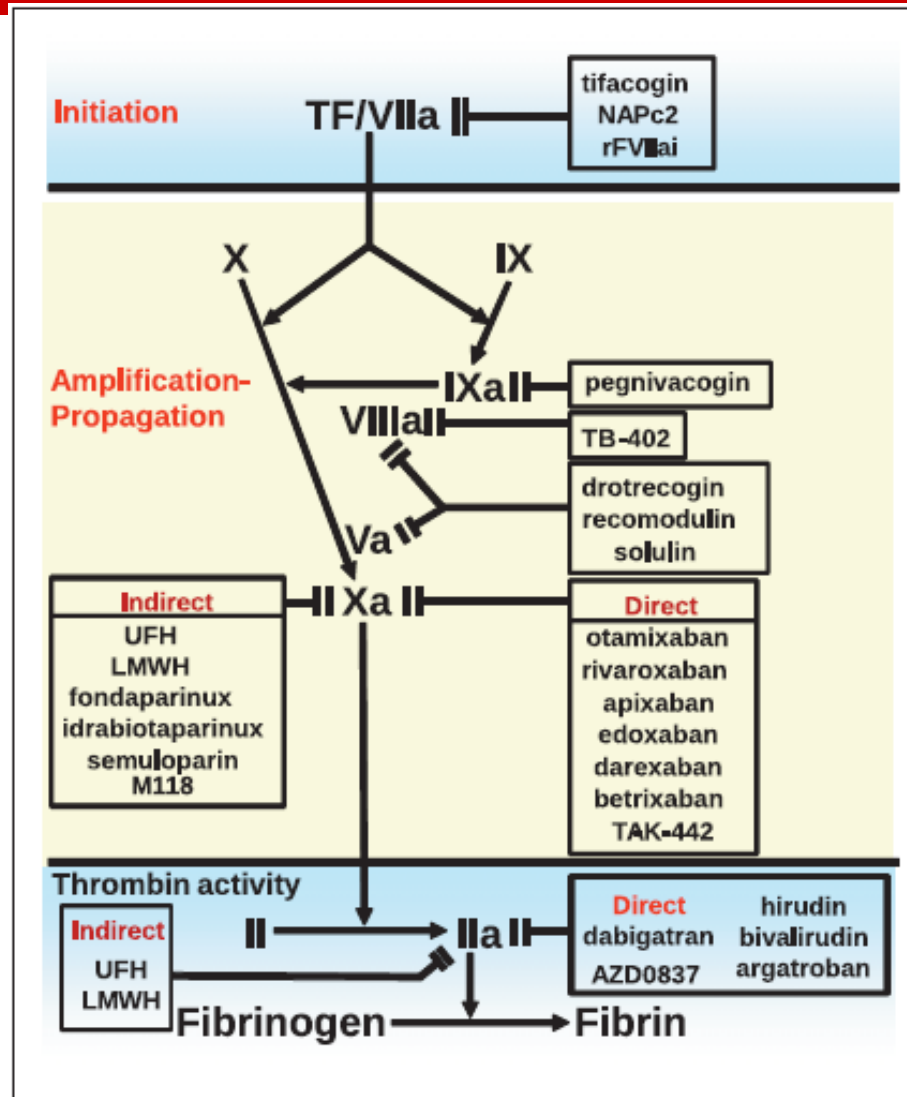
- plazmin (serinová proteáza) cirkuluje jako neaktivní proenzym (plazminogen)
  - volný plazmin rychle inhibován  $\alpha_2$ -antiplazminem
- aktivace plazminogenu pomocí tPA (endotel. bb.) a ukokinázy (epitel. bb.) na plazmin
- degradace fibrinu na degradační produkty
- aktivita tPA inhibována PAI-1



# Heparin vs. Warfarin



# Budoucnost



# Poruchy krevního srážení

- (A) hypokoagulační stavy (krvácivé diatézy)
  - defekt primární hemostázy
    - poruchy cévní stěny (senilní purpura)
    - trombocytopenie a trombocytopatie
    - von Willebrandova choroba
  - koagulopatie
    - hemofilie A a B
    - chronické jaterní onemocnění
- (B) hyperkoagulační stavy (trombofilie)
  - hereditární
    - activated protein C resistance (APCR)
  - získané
- (C) kombinované
  - syndrom diseminované intravaskulární koagulace (DIC)

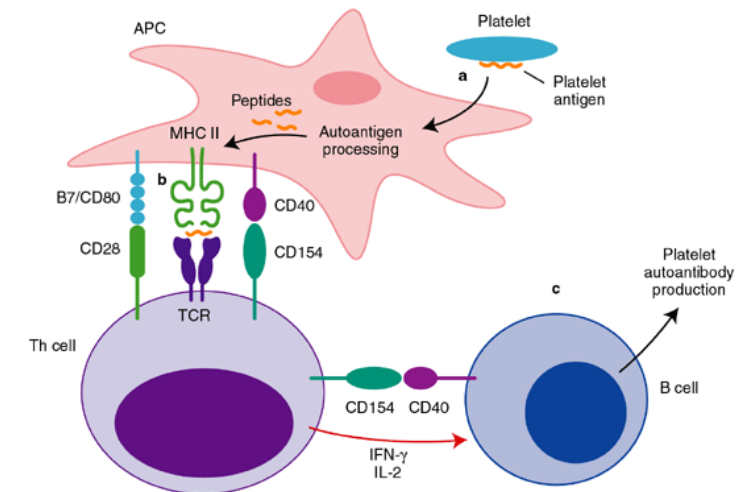
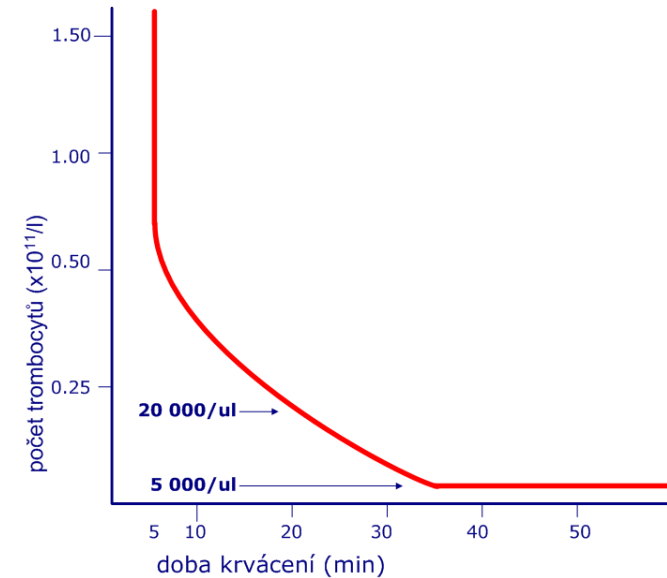
# Defekty primární hemostázy

- projevy: petechie, purpura, epistaxe, krvácení z dásní či do GIT, hematurie, menoragie
- (1) poruchy cévní stěny (vaskulopatie)
  - vrozené
    - telangiectasia hereditaria (m. Rendu-Osler)
      - ☛ AD, oslabení úseků stěny cév → telangiektazie (kůže, sliznice, plíce, urogenitální trakt)
    - Ehlers-Danlos a Marfanův syndrom
      - ☛ defekt struktury pojiva (kolagen)
  - získané
    - senilní purpura
    - bakteriální toxiny (spála, spalničky)
    - karence vit. C (scorbut)
    - imunokomplexy (Henoch-Schönleinova purpura)
- (2) trombocytopenie
- (3) trombocytopatie
- (4) von Willebrandova choroba



# Trombocytopenie a trombocytopatie

- počet trombocytů 150 – 400 000/ $\mu$ l ( $1.5-4 \times 10^{11}/l$ )
- v cirkulaci přežívají cca 8-10 dní
- (A) trombocytopenie = snížení počtu
  - <50 000/ $\mu$ l - zvýšené riziko krvácení
  - <20 000/ $\mu$ l - významné riziko
  - <5 000/ $\mu$ l - extrémně vysoké riziko
  - primární nebo sekundární
  - etiologie
    - snížená produkce
      - ☛ aplastická anemie
      - ☛ myelodysplastický syndrom
      - ☛ myelofibróza
    - destrukce
      - ☛ autoimunitní - idiopatická trombocytopenická purpura (ITP)
      - ☛ poléková
      - ☛ hypersplenismus
    - zvýšená spotřeba
      - ☛ DIC
      - ☛ trombotická trombocytopenická purpura (TTP)
- (B) trombocytopatie = porucha funkce
  - porucha adheze a agregace
    - Bernard-Soulierův syndrom (porucha receptoru GPIb-IX)
    - Glanzmannova trombastenie (porucha receptoru GPIIb-IIIa)
  - porucha degranulace
    - Heřmanského-Pudlákův syndrom
    - Chédiak-Higashiho syndrom

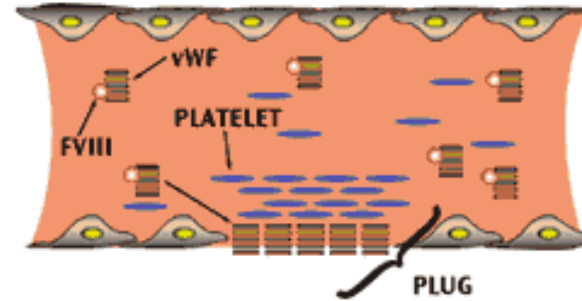


Model of platelet autoantibody production in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)

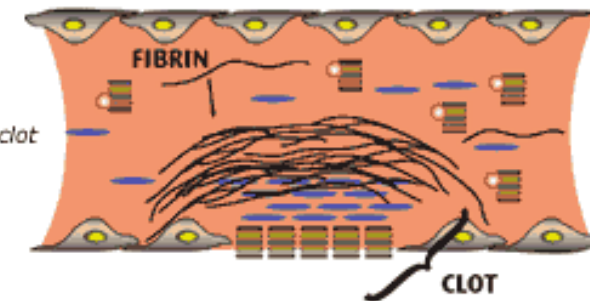
# von Willebrandova nemoc

- nejčastější vrozená porucha koagulace
- skupina stavů vedoucích k snížení hladiny vWf v plazmě
  - porucha adheze trombocytů, tedy primární hemostázy
  - vWf je rovněž plazm. nosič fVIII (bez něho je nestabilní a rychle degradován) → tedy i porucha sekundární hemostázy
- několik typů vW nemoci
  - typ 1 (~75%) – snížení koncentrace vWf
  - typ 2 (~20%) – normální koncentrace nefunkčního vWf
    - porucha vazby na destičky (typ 2A)
    - porucha vazby na kolagen subendoteliální vrstvy (typ 2B)
    - porucha transportu fVIII (typ 2N)
  - typ 3 – absolutní deficit vWf (homozygoti)

Figure 1. Normal Broken Blood Vessel

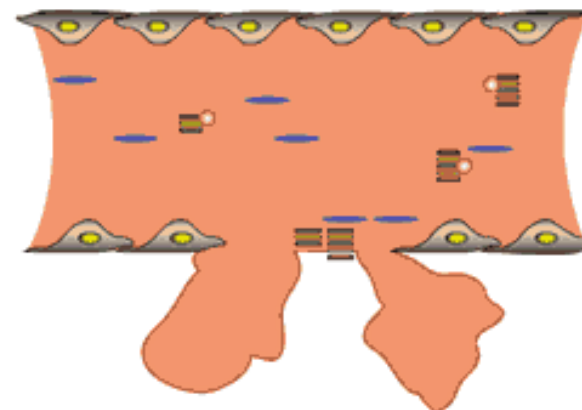


First, vWF proteins from the blood line up along the broken vessel wall and attract "sticky" platelets to form a plug.



Then the platelets attract strands of fibrin to strengthen the plug and form a clot. The clot helps stop the bleeding.

Figure 2. Broken Blood Vessel in vWD



When a person has vWD, there isn't enough vWF or the vWF is damaged. The clot may take longer to form or not form properly, and bleeding may take longer to stop.

# Defekty „sekundární hemostázy“

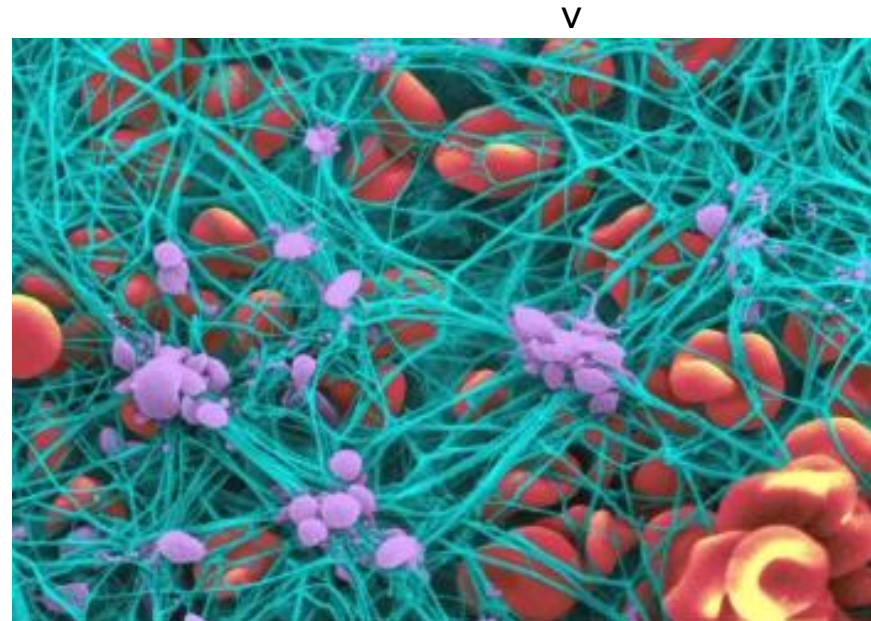
- typické krvácení do tkání (hematomy), např. klouby, svaly, mozek, retroperitoneum, nejsou petechie a purpury
- (A) vrozené poruchy
  - hemofilie A (Xq-chromozom vázaná) – defekt fVIII
    - fVIII je kofaktor při aktivaci fX na fXa v reakci katalyzované fIXa
    - snížení koncentrace až na 25% normálu nepůsobí koagulační poruchu, snížení na 25-1% mírná forma, <1% těžká forma
    - >150 bodových mutací v fVIII genu – velká fenotypová variabilita!!!
    - prevalence v mužské populaci 1:5,000 až 1:10,000
  - hemofilie B (Xq-chromozom vázaná) – defekt fIX
    - prevalence 10x menší než hemofilie A
    - >300 bodových mutací v fIX genu (85% bodové, 3% krátké delece a 12% rozsáhlé delece)
  - defekty ostatních faktorů
    - vzácné, většinou autozomálně recesivní, klinicky manifestní poruchy jen při těžkém deficitu
      - afibrinogenemie (defekt fI)
      - hemofilie C (defekt fXI) – Aškenazy Židé
      - ostatní
- (B) získané poruchy
  - jaterní insuficience/selhání
  - nedostatek vitamínu K (porucha resorpce tuků ve střevě)
  - DIC





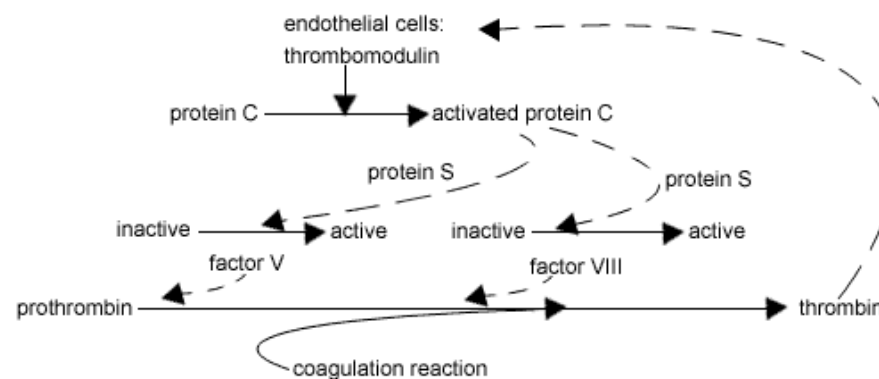
# DIC (konzumpční koagulopatie)

- zpočátku nadměrná koagulace (trombotický stav), posléze vyčerpání koagul. faktorů (krváčivý stav)
- koagulace při DIC je místně neohraničená a není primárně reakcí na poškození rečiště
- patogeneze
  - v cirkulaci není normálně přítomen TF!!!
    - endotel ani kr. bb. jej na svém povrchu neprodukuje
  - při některých patologických stavech se vyskytuje a aktivuje faktor VII (a následně vnější cestu kr. srážení)
    - patologické zdroje TF
      - buňky jiných tkání – např. bb. plodu při porodu, rozsáhlá poranění, rozsev nádorových bb. při operaci atd.
      - patologické kr. elementy exprimující TF – např. při myelo- a lymfoproliferačních nemocech
      - patologicky aktivované endotelie a monocyty, které začnou exprimovat TF v membráně – např. endotoxinem při sepsi
      - TF z cytoplazmy erytrocytů uvolněný při hemolýze
- důsledky
  - 1. fáze - tvorba mikrotrombů mikrocirkulaci
    - ischemie až gangrény
  - 2. fáze - hypo- až afibrinogenemie,
    - krvácení do orgánů
  - patologicky vystupňovaná fibrinolýza



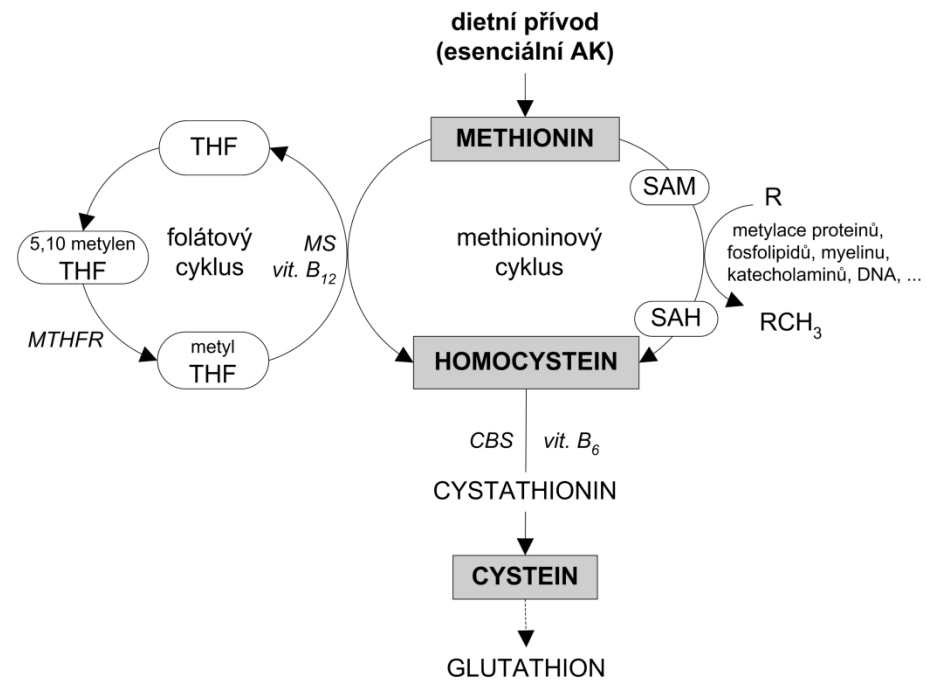
# Hyperkoagulační stavy

- vedou ke zvýšení rizika nebo až spontánním a často opakovaným venózním trombózám a tromboembóziím (do plic nejčastěji), popř. ke komplikacím těhotenství a infertilitě
- (A) vrozené trombofilie
  - (1) poruchy tvorby inhibitorů srážení
    - defekt AT III (AR)
    - defekt proteinů C a S (AD)
    - syndrom rezistence fV k aktivovanému proteinu C (APCR)
      - nejčastější vrozená porucha ("Leidenská" mutace fV)
    - mutace protrombinového genu (promotor → kvantitativní efekt)
    - hyperhomocysteinemie (mutace s genu pro MTHFR)
    - antifosfolipidový syndrom
      - protilátky anti-kardiolipinové, lupus antikoagulans aj.
      - patofyziologie nejasná
  - (2) porucha fibrinolýzy
    - ↑LP(a)
    - ↑PAI-1 (promotor → kvantitativní efekt)
- (B) získané trombofilie
  - (1) klin. situace a komplikace léčby
    - imobilizace
    - hyperestrogenní stavy (těhotenství, orální kontraceptiva, HRT)
  - (2) patologické stavy
    - ateroskleróza
    - obezita (↑ PAI-1)
    - hyperviskózní syndromy
      - polycytémia vera, trombocytémie, sek. polyglobulie, gamapatie)
    - nádorová onem.
    - srdeční selhání
    - hyperlipidémie, nefrot. syndrom
    - žilní insuficience

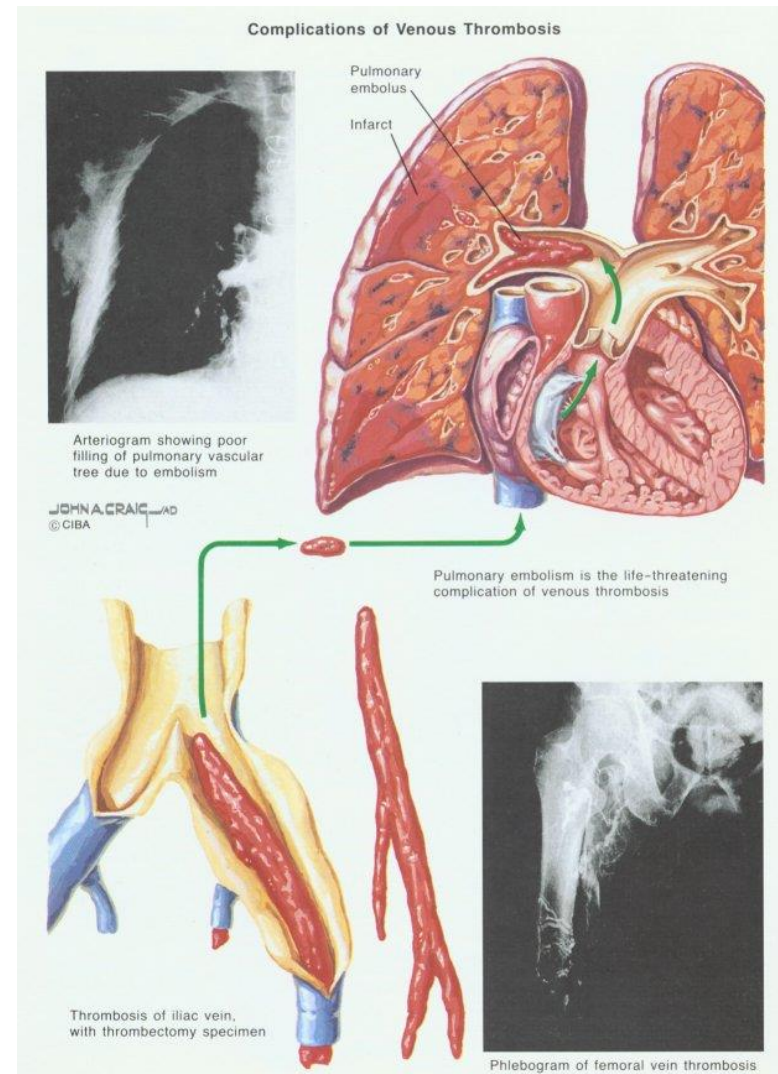
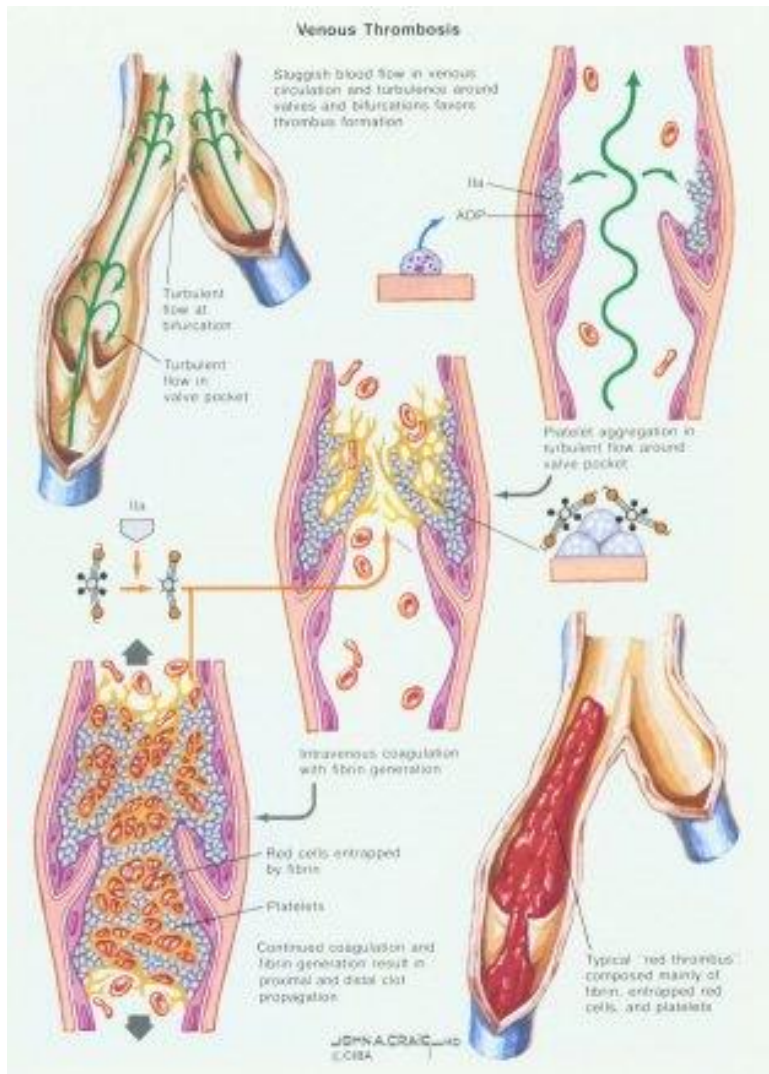


# Hyperhomocysteinemie

- homocystein je meziproduct přeměny methioninu v methioninovém cyklu
  - je buď dále metabolizován na cystein
  - nebo remetylován zpět na methionin (ve folátovém cyklu)
- nutná přítomnost několika enzymů a jejich kofaktorů (vitaminů skupiny B, kyseliny listové)
- důvodem poruchy metabolismu homocysteinu a následné HHcy mohou být genetické a nutriční faktory
  - mutace v genech kódujících enzymy
  - snížený příjem vitaminu B6, B12 a kyseliny listové
- HHcy = patologické zvýšení plazm. koncentrace homocysteinu
- HHcy je nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy a tromboembolizmu, poruch fertility a některých vývojových a neurologických abnormalit (rozštěpové vady páteře)
- homocystein způsobuje endotelovou dysfunkci a iniciuje apoptózu
- (A) monogenní homocystinurie
  - deficit cystathionin- $\beta$ -syntázy vede v homozygotním stavu ke značné elevaci plazmatických hladin Hc
  - poměrně vzácné onemocnění
- (B) tzv. mírná hyperhomocysteinemie
  - polymorfismus v genu pro metylentetrahydrofolátreduktázu (MTHFR)



# Hluboká žilní trombóza a následná plicní embolie



# Princip testů

- Smícháním zkoumané plazmy, tkáňového tromboplastinu a vápenatých iontů se spustí vnější část koagulační kaskády.
- Kaskáda končí vytvořením fibrinové sraženiny.
- Výsledkem testu je čas od smíchání uvedených látek do vytvoření sraženiny.

# Aktivovaný parciální

- informace o funkci **vnitřní části koagulační kaskády**.
- Na rozdíl od Quickova testu koagulační kaskádu spouští kaolin (**A**ktivátor), který zastupuje záporně nabitý povrch poraněné cévy.
- Pro některé reakce vnitřní části koagulační kaskády (zejména pro aktivaci faktoru X) je nutná přítomnost fosfolipidu - destičkového faktoru 3 (PF3) z aktivovaných trombocytů.
- Plazma používaná v APTT testu krevní destičky neobsahuje, je třeba fosfolipid k reakci přidat. Místo PF3 se používá tkáňový fosfolipid kefalin (**P**arciální **T**romboplastin).

# Výsledná hodnota APTT testu

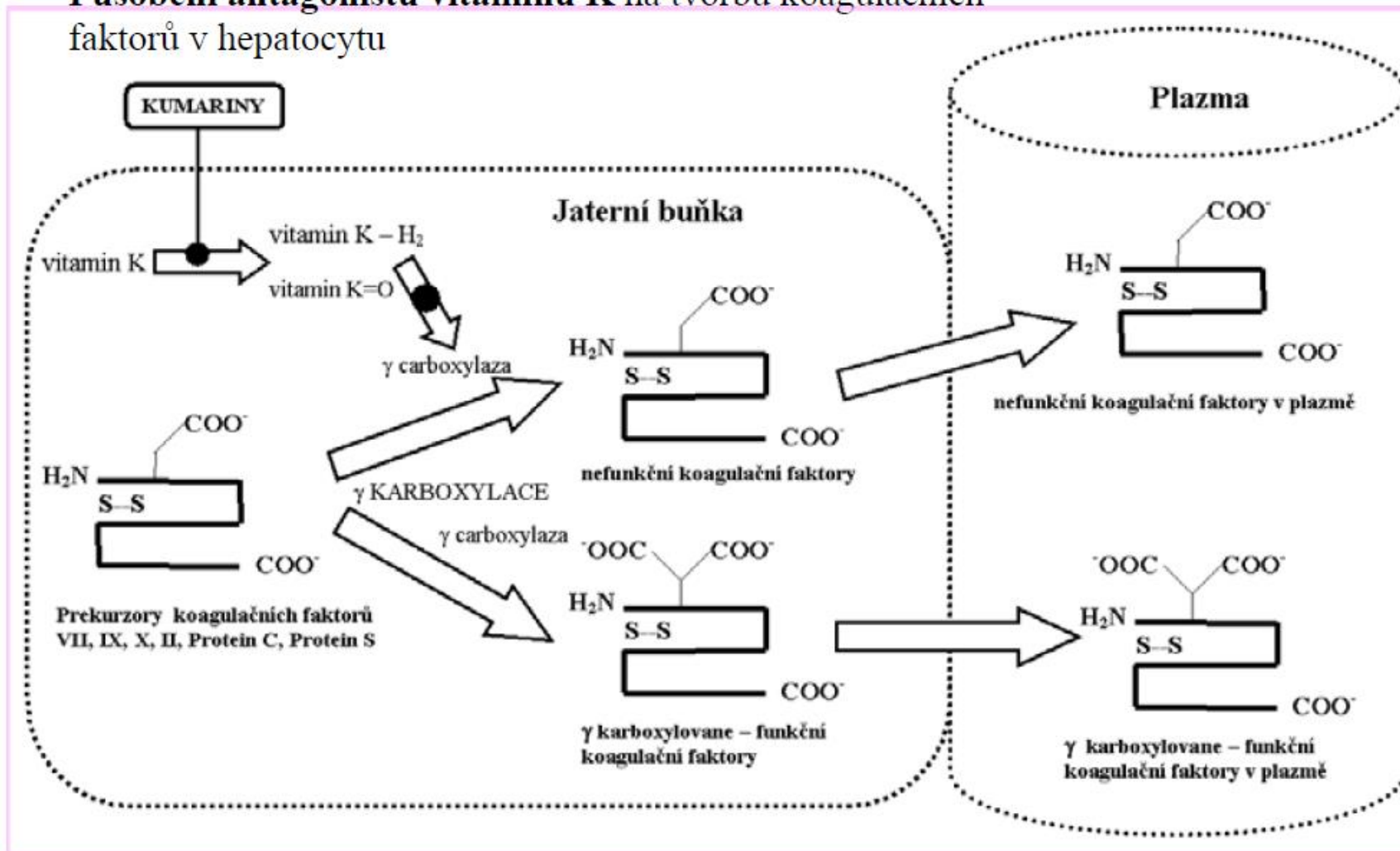
- udává čas od spuštění koagulační kaskády vápenatými ionty do vytvoření fibrinové sraženiny.
- Normální hodnoty se pohybují mezi 25-39 s.
- Příčinou prodloužení APTT je například
  - nedostatek koagulačních faktorů vnitřní části kaskády (hlavně VIII a IX),
  - terapie heparinem,
  - výrazné předávkování warfarinem.
- U heparinizovaných pacientů je doporučená hodnota APTT 1,5 až 2,4 násobek normy.

# Quickův test (prothrombin time, PT)

- informuje o rychlosti přeměny protrombinu na trombin působením tkáňového tromboplastinu.
- Tkáňový tromboplastin je tvořen lipoproteinovou složkou (tzv. tkáňovým faktorem) a složkou fosfolipidovou (rovněž tvořenou v tkáních).
- Tímto testem se určuje aktivita tzv. protrombinového komplexu a funkčnost **vnější části** koagulační kaskády.
- Nejčastěji se používá při testování účinnosti antikoagulační léčby antagonisty vitamínu K (**warfarin**).



## Působení antagonistů vitamínu K na tvorbu koagulačních faktorů v hepatocytu



- CYP3A4 – 50% metabolizovaných léků
- CYP2D6 – 20%
- CYP2C9 + CYP2C19- 15 %
- CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2A6 byly prokázány jako funkčně polymorfní
- Např. ovlivňuje metabolismus warfarinu, acenocoumarolu a dalších léků (phenytoin, tolbutamid, glipizide a další perorální antidiabetika typu sulfonylurey).

# Cytochrom P<sub>450</sub>2C9 (CYP2C9)

- dvě alelické varianty genu CYP2C9<sup>1, 2</sup>
  - CYP2C9\*2
    - záměna C<sup>430</sup>T v exonu 3 vede k substituci Arg<sup>144</sup>Cys
  - CYP2C9\*3
    - záměna A<sup>1075</sup>C v exonu 7 vede k substituci Ile<sup>359</sup>Leu
- in vitro má CYP2C9\*1 normální, zatímco varianta CYP2C9\*2 vykazuje menší a CYP2C9\*3 podstatně menší enzymatickou aktivitu<sup>3, 4</sup>
- fenotypickým projevem je snížení clearance léků závislých na CYP2C9

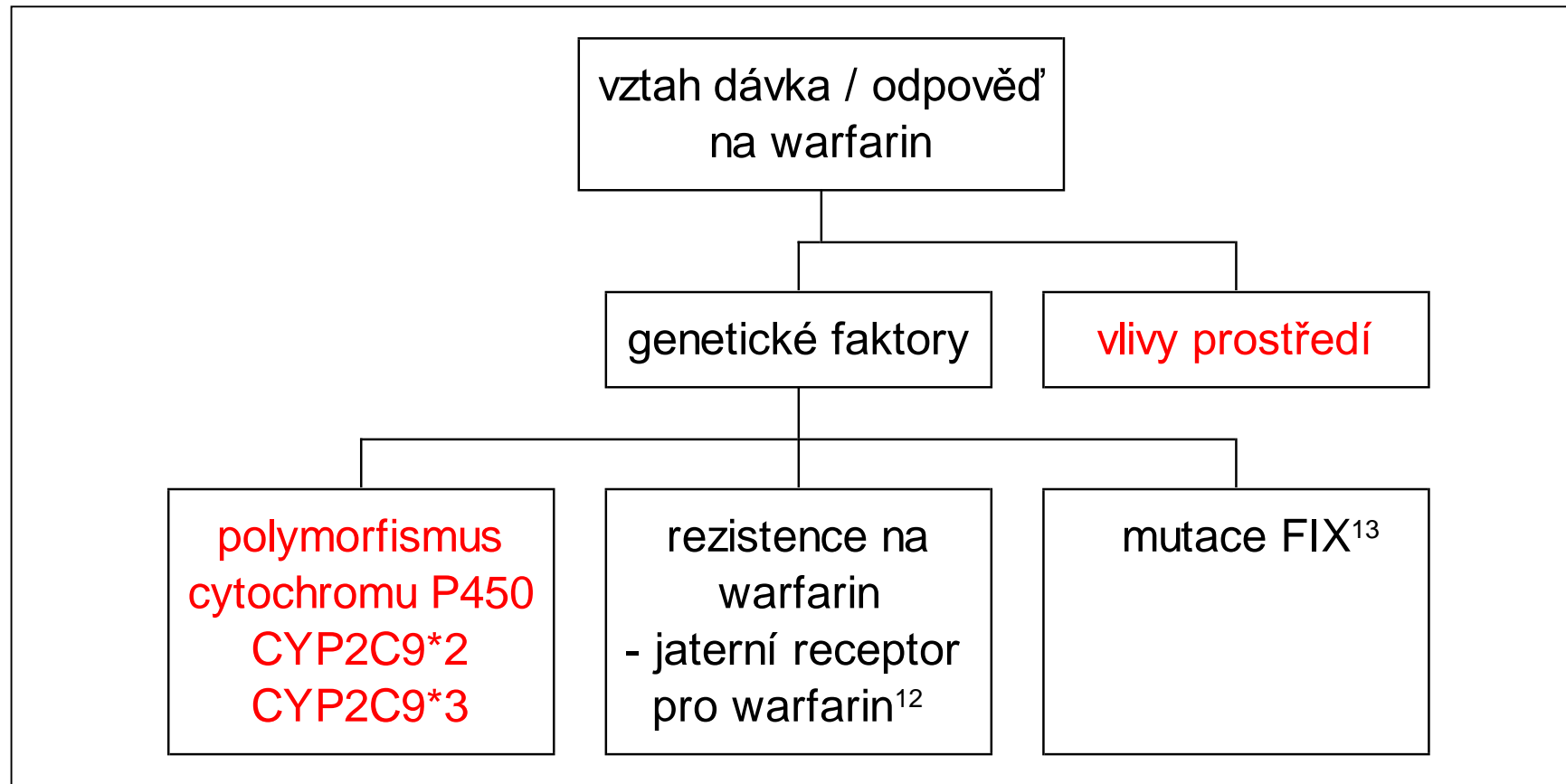
1. Stubbins MJ et al: Pharmacogenetics 1996; 6:429-329

2. Veronese ME et al: Biochem J 1993; 289:533-8

3. Rettie AE et al: Pharmacogenetics 1994; 4:39-42

4. Haining RL et al: Arch Biochem Biophys 1996; 333:447-58

# Dávka / antikoagulační efekt warfarinu



12. Alving BM et al: Arch Intern Med 1985; 145:499-501

13. Oldenburg J et al: Br J Hematology 1997; 98:240-4

# CYP2C9 ACTIVITA

<u>Warfarin Dose*</u>	<u>Genotype</u>
5.63 (2.56)	*1/*1
4.88 (2.57)	*1/*2
3.32 (0.94)	*1/*3
4.07 (1.48)	*2/*2
2.34 (0.35)	*2/*3
1.60 (0.81)	*3/*3

From: Higashi MK, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 287:1690-1698, 2002.

# Klinické projevy polymorfismu CYP2C9

- předávkování při zahájení antikoagulace standardními režimy <sup>14, 16, 17, 18, 19</sup>
- nižší udržovací dávka nutná k dosažení a udržení terapeutického rozmezí <sup>11, 15, 16, 18, 19</sup>
- vyšší riziko předávkování dané interakcemi s léky metabolizovanými a/nebo reagujícími s CYP2C9 <sup>17, 21</sup>
- nestabilita antikoagulační terapie <sup>15, 16</sup>
- delší přetrvávání antikoagulačního efektu po přerušení léčby nebo snížení dávky warfarinu

14. Aithal GP et al: Lancet 1999; 353:717-9

15. Taube J et al: Blood 2000; 96:1816-9

16. Higashi HK et al: JAMA 2002; 287:1690-8

17. Verstuyft C et al: Eur J Clin Pharmacol 2003; 58:739-45

# Interakce s léky metabolizovanými

17, 20, 21

Soutěž o substrát	Enzymový induktor	Enzymový inhibitor
ASA a většina <a href="#">NSAID</a>	rifampicin	fluvoxamin (ostatní SSRI slabí)
fenobarbital, fenytoin	fenobarbital, fenytoin	<a href="#">omeprazol</a>
S-warfarin	<a href="#">karbamazepin</a>	<a href="#">inhibitory HMG-CoA reductázy</a>
losartan		tolbutamid
tolbutamid		cimetidin (slabý)
sulfonamidy, dapson		<a href="#">azolová antimykotika</a> (slabá)
<a href="#">diazepam</a> , tenazepam		ritonavir
fluoxetin, moclobemid		<a href="#">desethylamiodaron</a>
zidovudin		

20. Topinková E et al: Postgrad Med 2002; 5:477-82

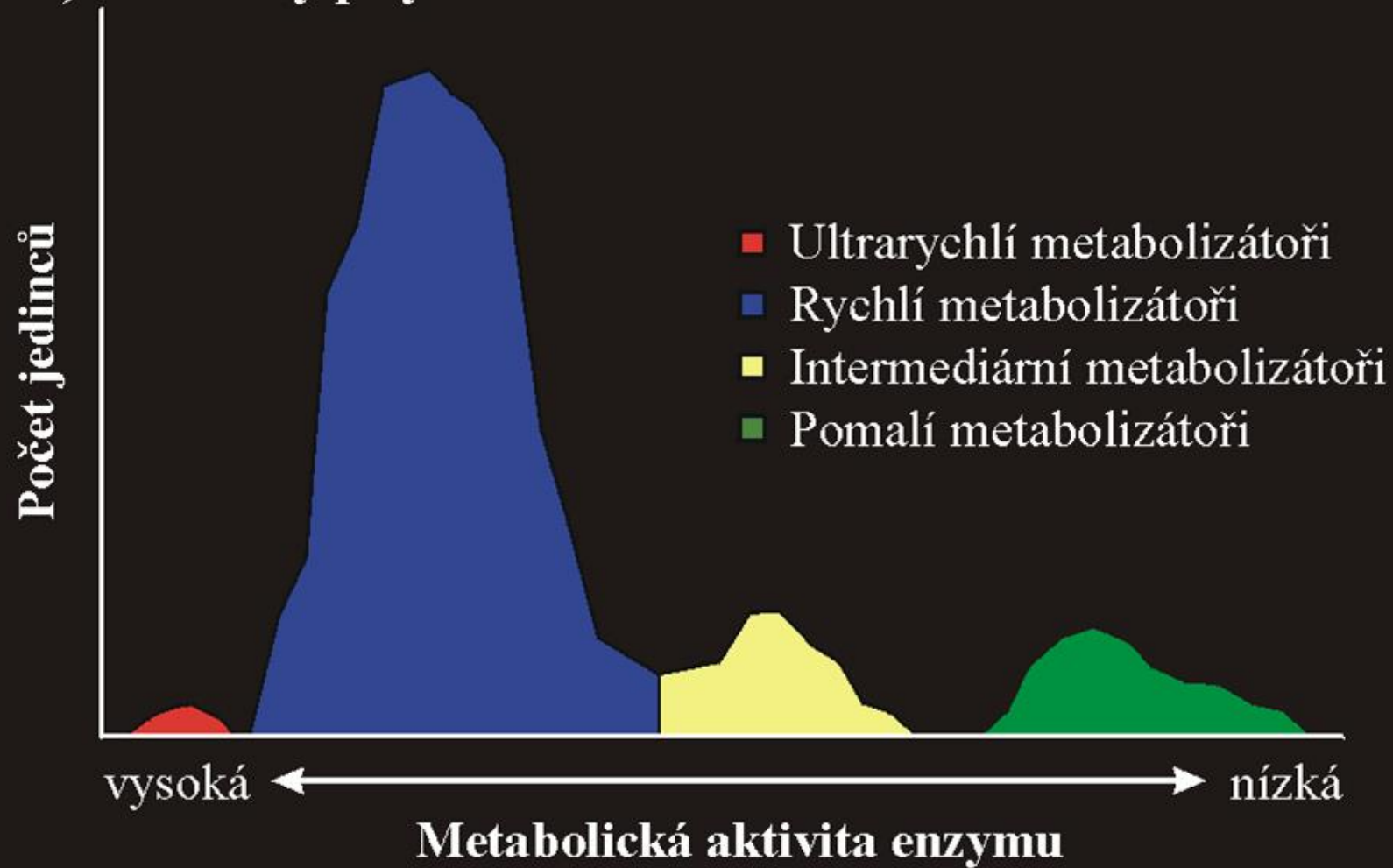
21. Naganuma M et al: J Cardiovasc Pharmacol Ther 2001; 6:636-7

# Rychlost metabolismu

- Dle aktivity enzymu může být populace rozdělena do čtyř hlavních skupin - pomalí metabolizátoři (PM), intermediární metabolizátoři (IM), efektivní metabolizátoři (EM) a ultrarychlí metabolizátoři (UM).
- Většina jedinců bílé populace patří mezi tzv. extenzivní metabolizátory (EM), u nichž jsou léčiva metabolizována předpokládanou rychlostí.
- 5-10 % jedinců je geneticky determinováno jako pomalí metabolizátoři (PM), kteří mají zpomalené odbourávání látek metabolizovaných a jsou ohroženi vyšším výskytem nežádoucích účinků léčby.
- Intermediární metabolizátoři (IM) jsou zastoupeni v 10-15 % a při dlouhodobé léčbě jsou svými reakcemi na léčbu srovnatelní se skupinou PM.
- U ultrarychlých metabolizátorů (UM) probíhá metabolizace intenzivněji a klinicky nereagují na běžné dávky léků a je zastoupena v 5-10 %.



## b) Genetický polymorfismus



# Praktikum

