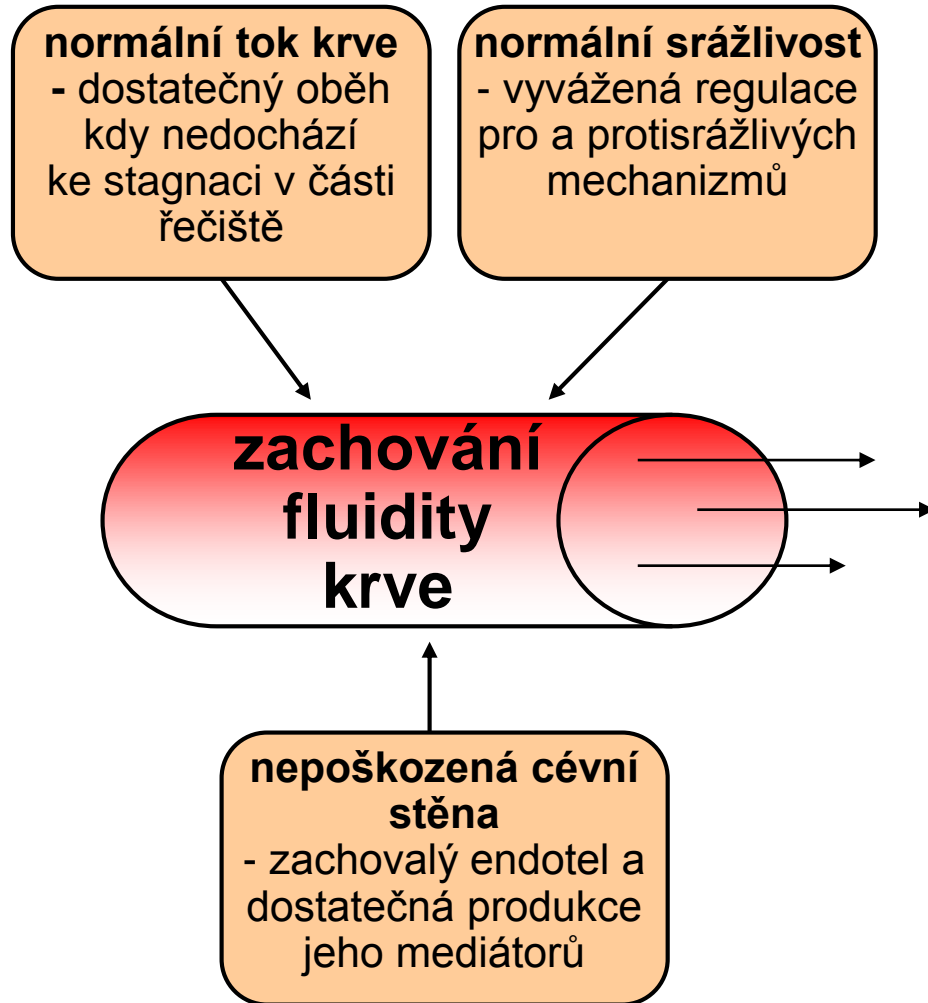


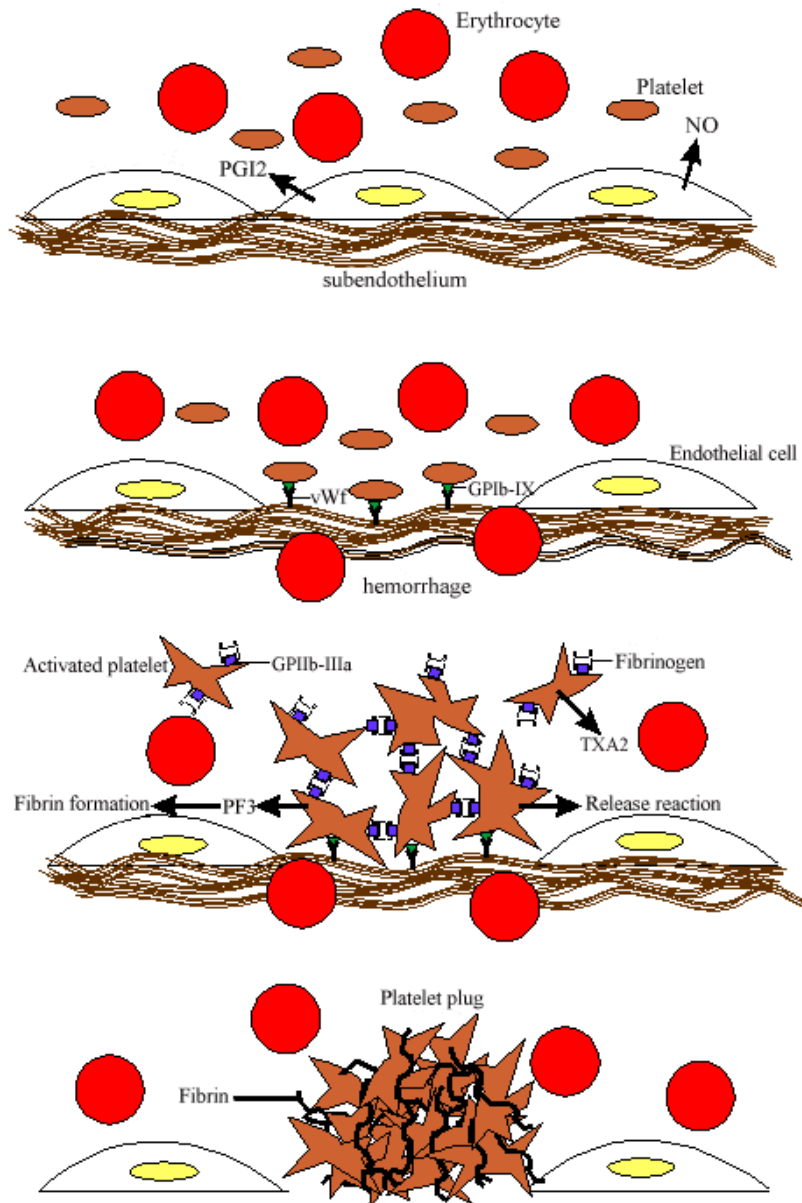
PORUCHY HEMOSTÁZY

Faktory zajišťující fluiditu krve

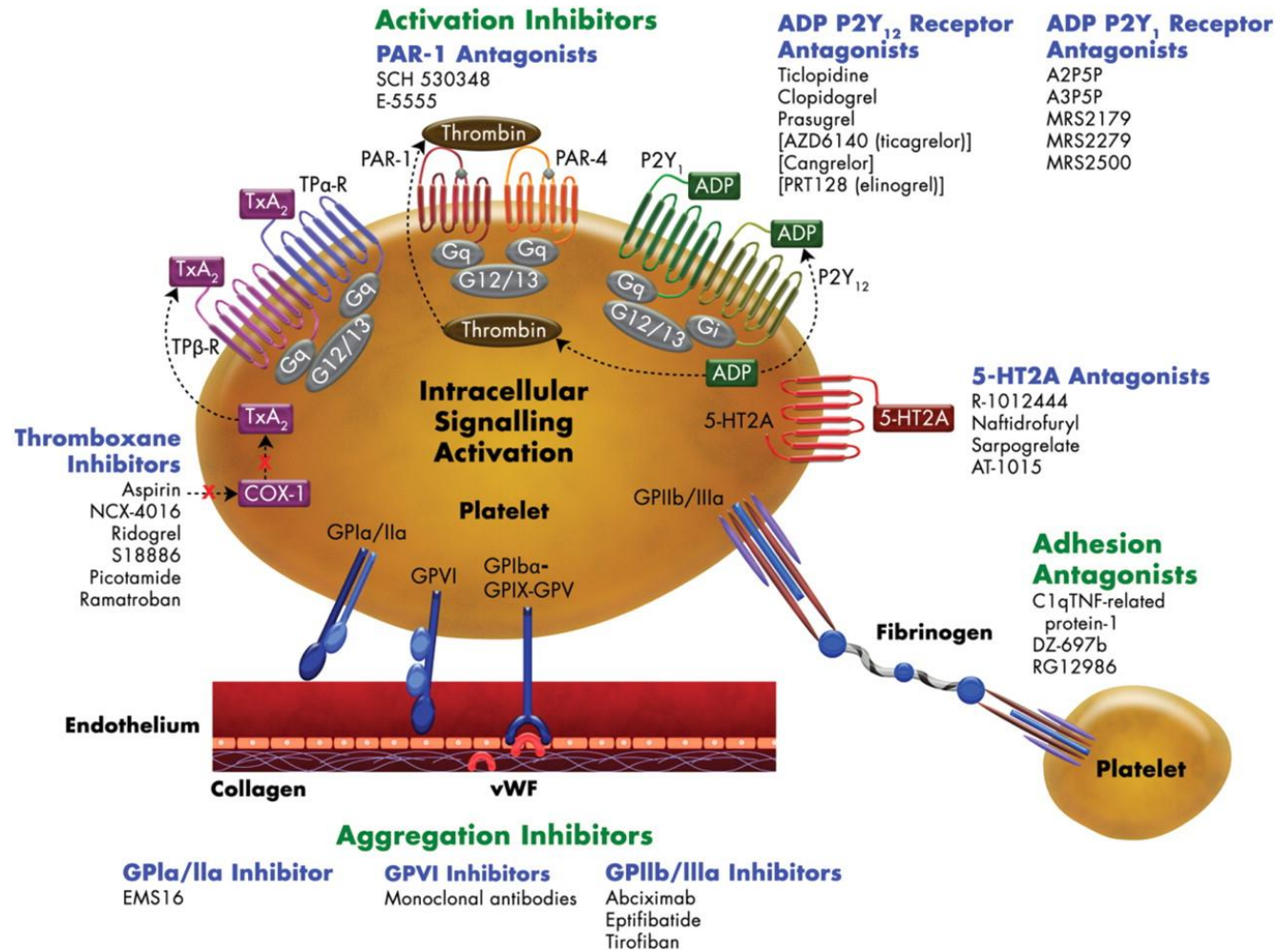


- změna nebo porucha v kterémkoliv z těchto faktorů (nebo kombinovaná porucha) má za následek
 - fyziologické srážení krve (= hemostáza)
 - primární
 - sekundární
 - patologické srážení krve (= trombóza)
 - zvýšení rizika
 - spontánní

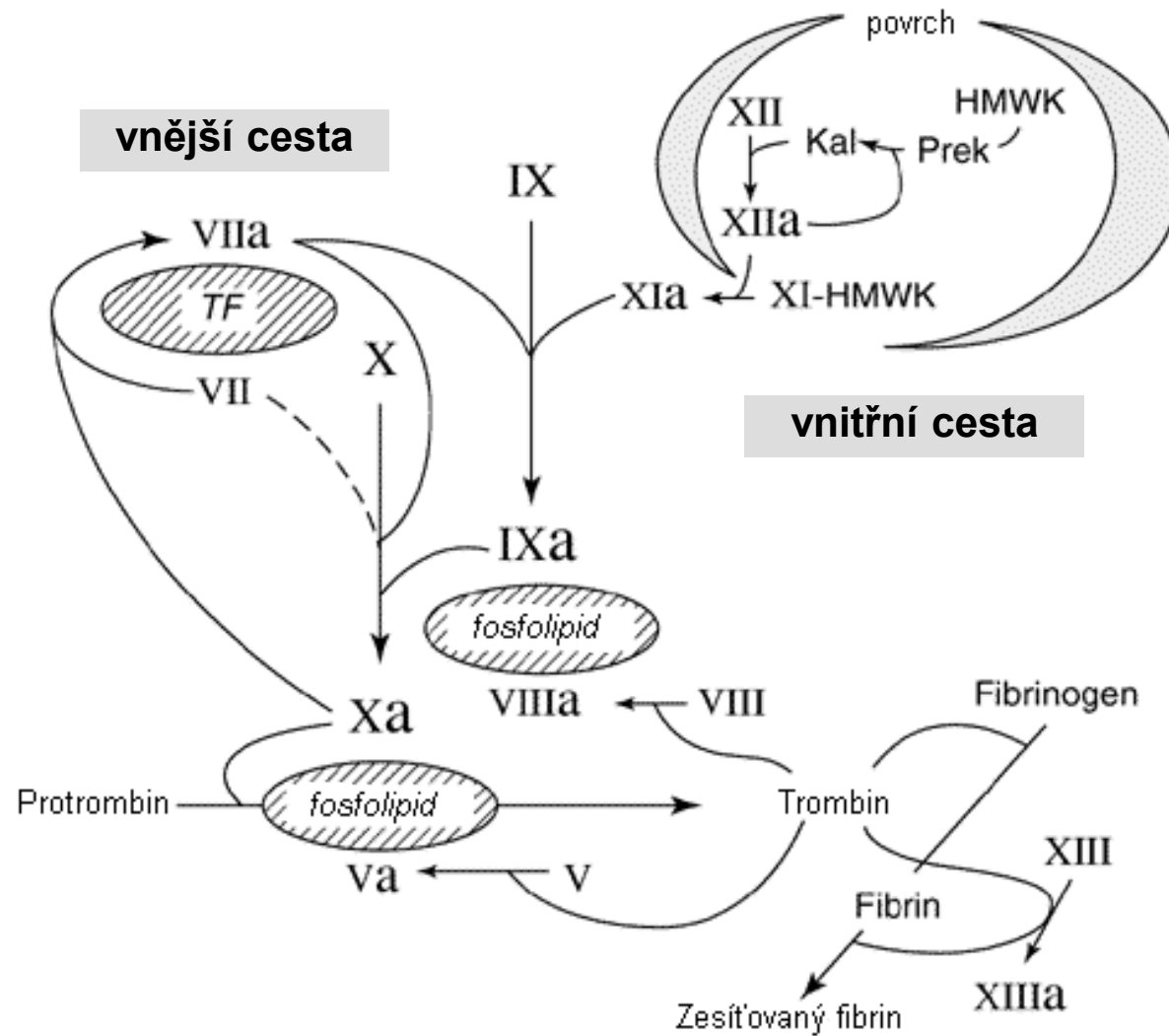
Primární hemostáza



- 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

Sekundární hemostáza

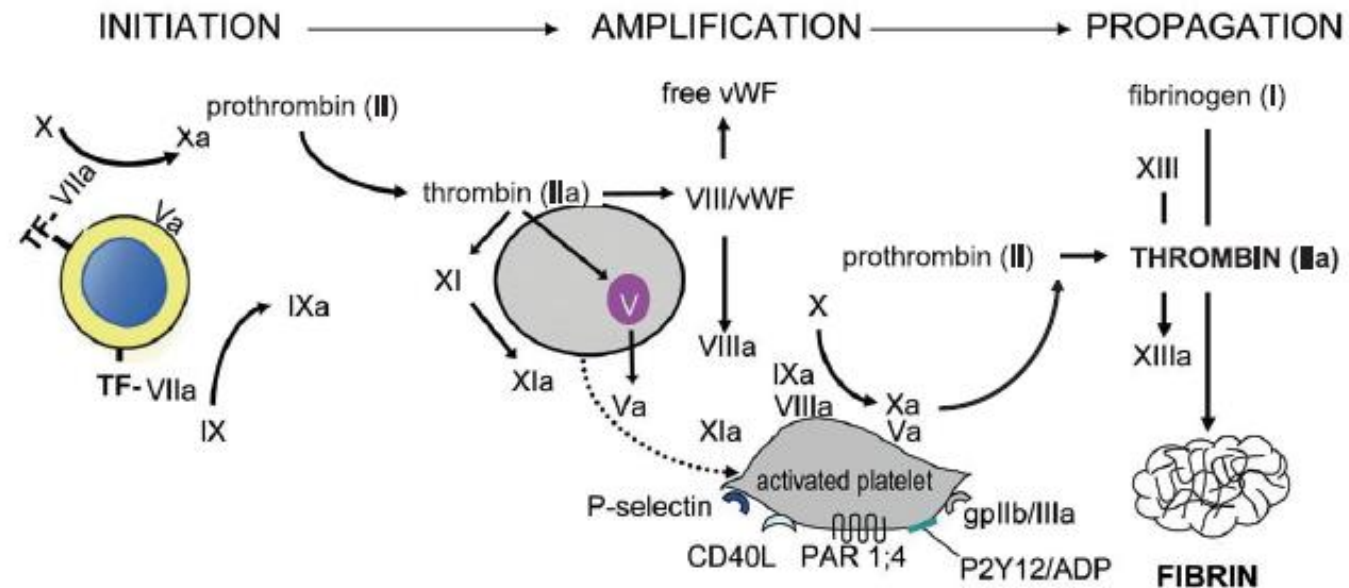
Po poškození cévní stěny je tkáňový faktor (TF) vystaven cirkulujícímu endogennímu faktoru VII/VIIa, který vede ke vzniku komplexu TF/VIIa, který iniciuje koagulaci

Na povrchu buněk nesoucích TF aktivuje komplex TF/VIIa:

Faktor IX na IXa

Faktor X na Xa

Faktor Xa se váže na faktor Va na povrchu buněk

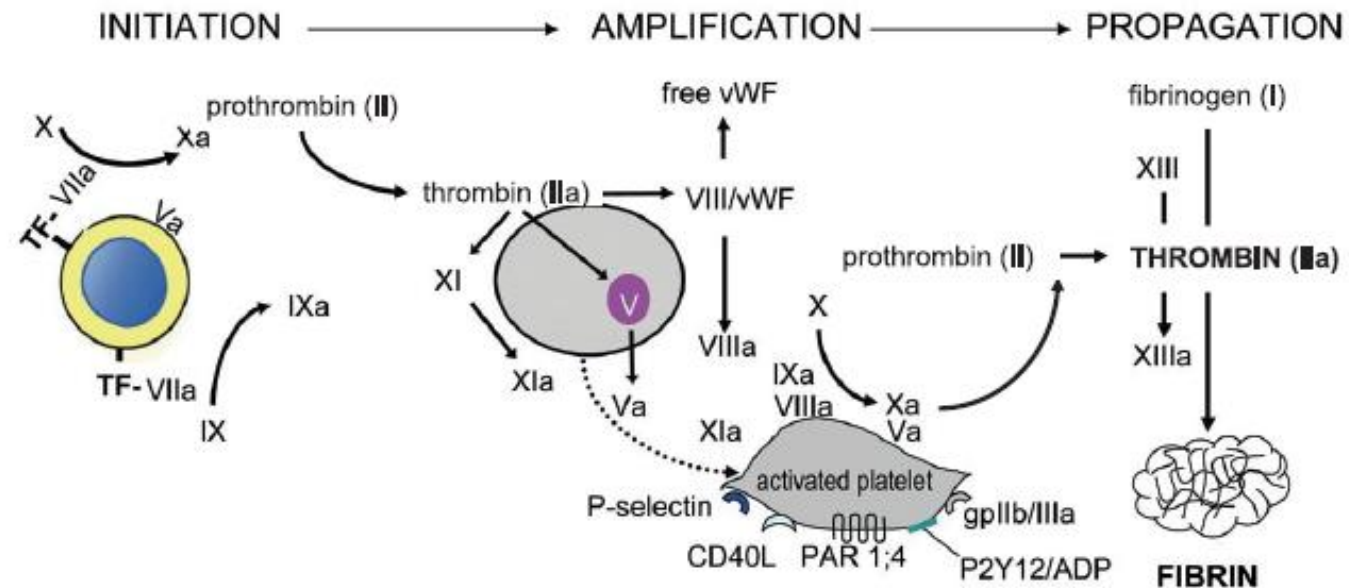


Sekundární hemostáza

Komplex faktoru Xa/Va aktivuje malé množství protrombinu na trombin na povrchu subendoteliálních buněk

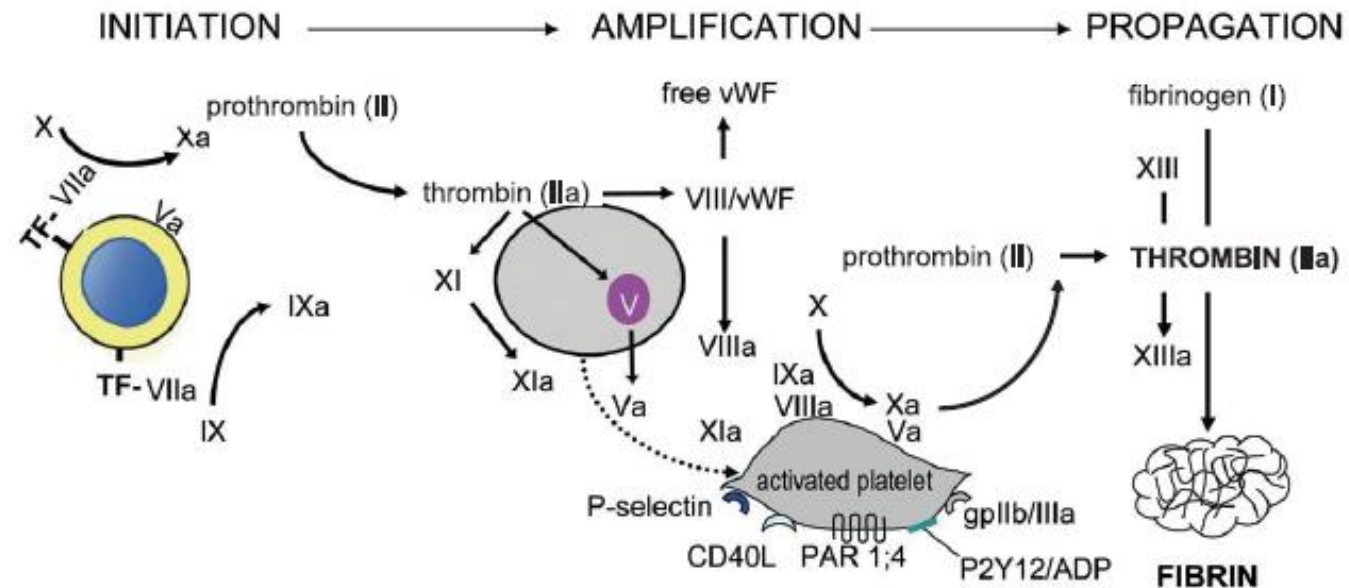
Toto omezené množství trombinu aktivuje faktory V, VIII a krevní destičky

Aktivovaná destička váže faktory Va, VIIIa a IXa

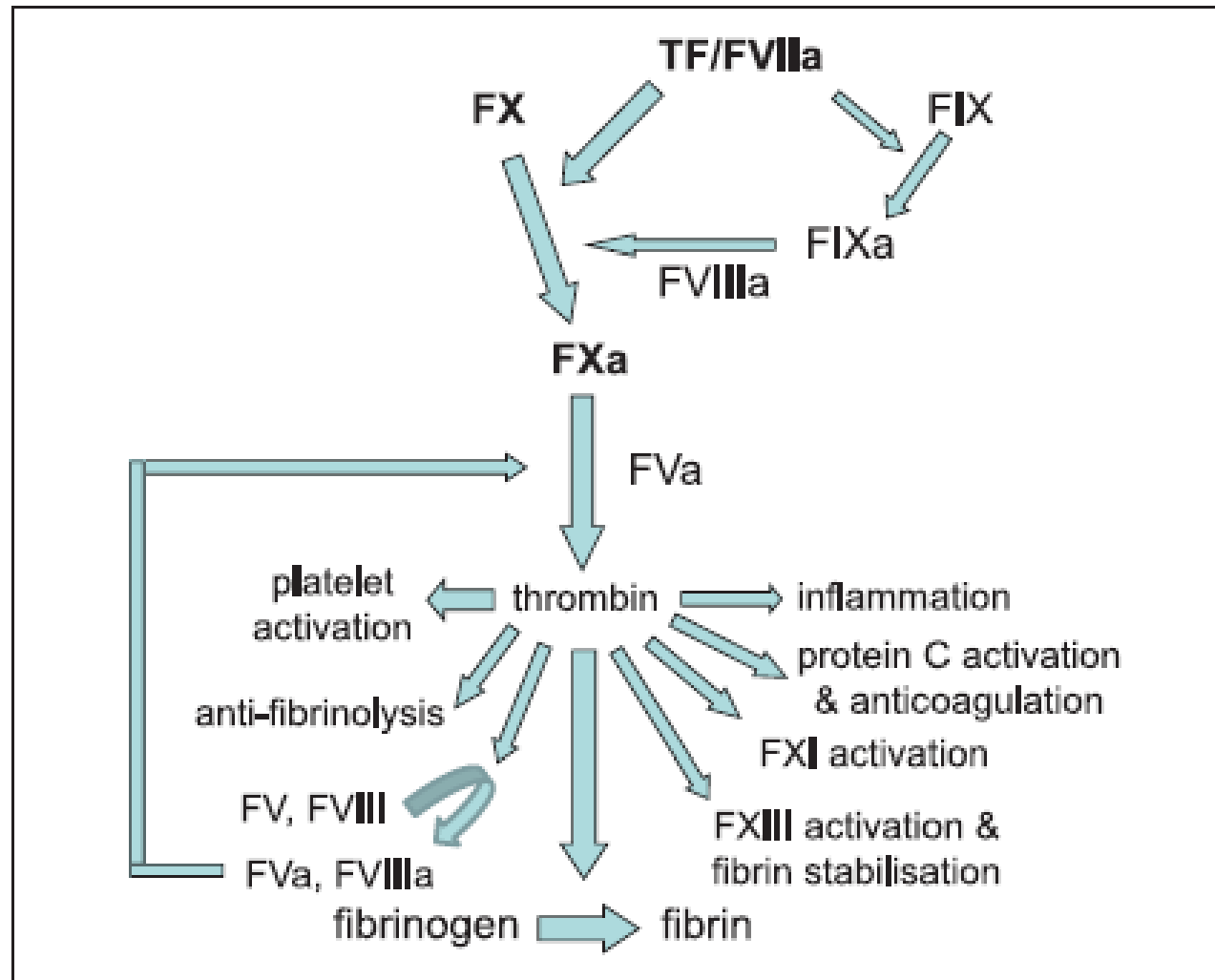


Sekundární hemostáza

Trombinem aktivované destičky mění tvar a vystavují negativně nabitě fosfolipidy, na které se váže komplex faktoru VIIIa/IXa
To vede k aktivaci faktoru X na povrchu aktivovaných destiček
Komplex faktoru Xa/Va aktivuje velké množství protrombinu, což vede k "výbuchu trombinu", který:
Štěpí fibrinogen na fibrin
Aktivuje faktor XIII stabilizující fibrin
Množství a rychlost tvorby trombinu určuje pevnost hemostatické zátky

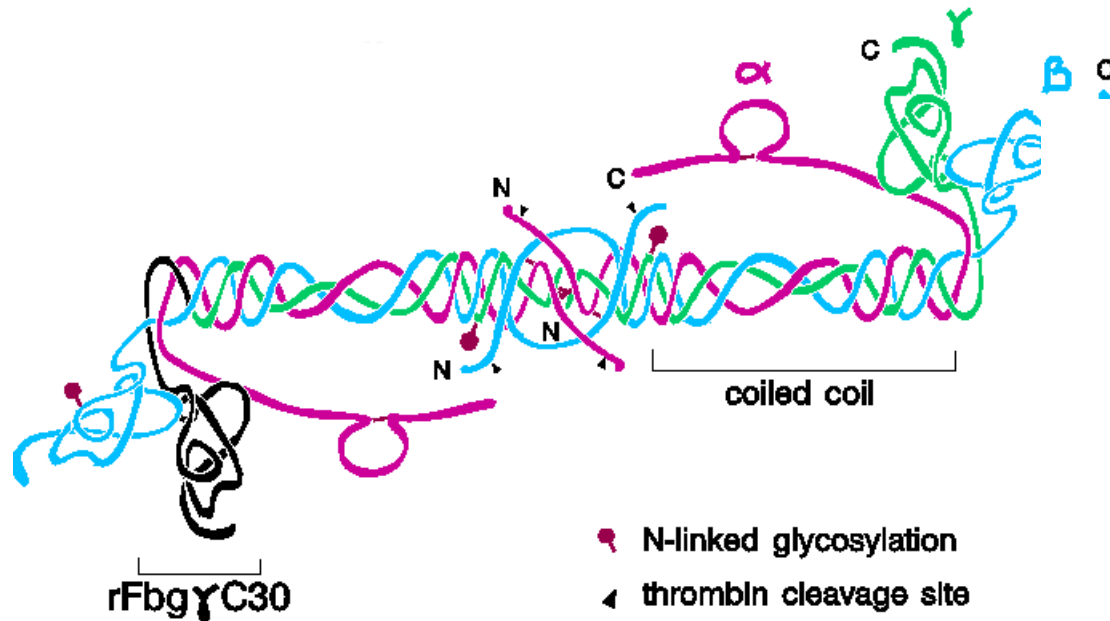


Funkce trombinu

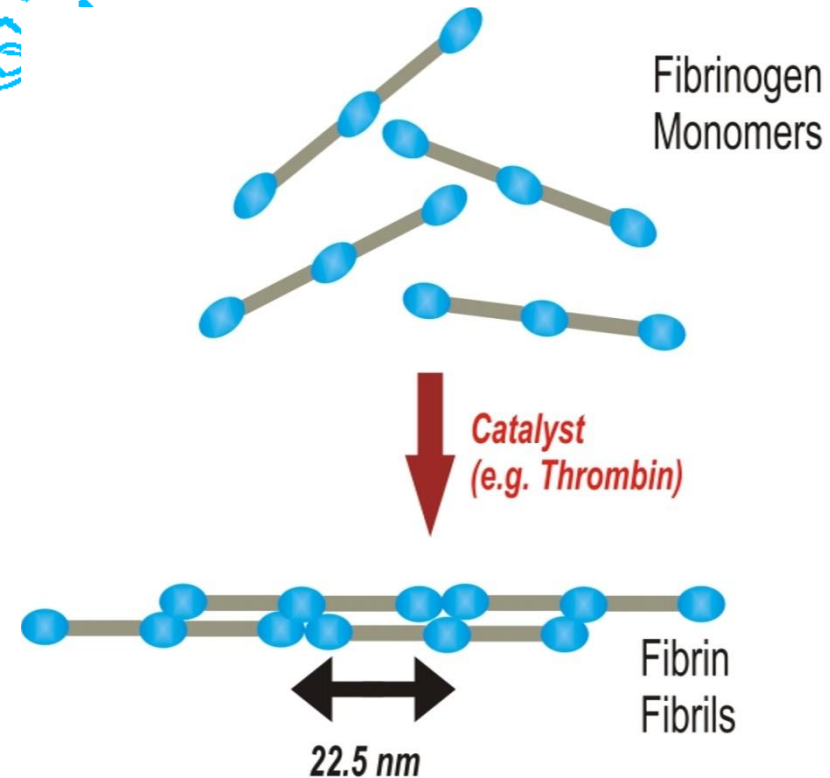


Fibrinogen - fibrin

- 3 páry polypeptidů ($[A-\alpha][B-\beta][\gamma]$)₂ – 340kDa

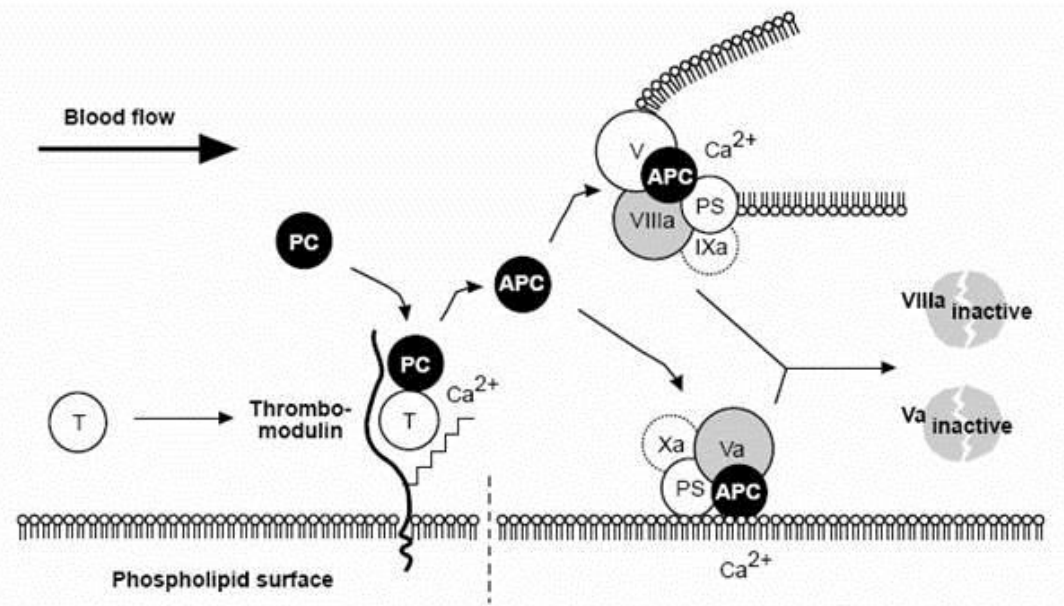
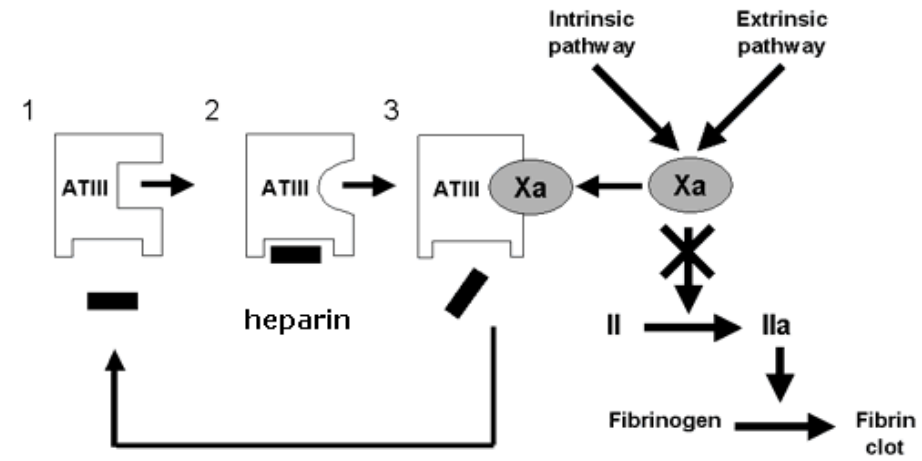


- trombin (serinová proteáza) odštěpuje fibrinopeptidy A a B a generuje monomery fibrinu (α - β - γ)₂
- monomery spontánně agregují a vytváří fibrinovou síť
- trombin rovněž aktivuje fXIII (transglutamináza), který tvoří příčné vazby mezi polymery fibrinu



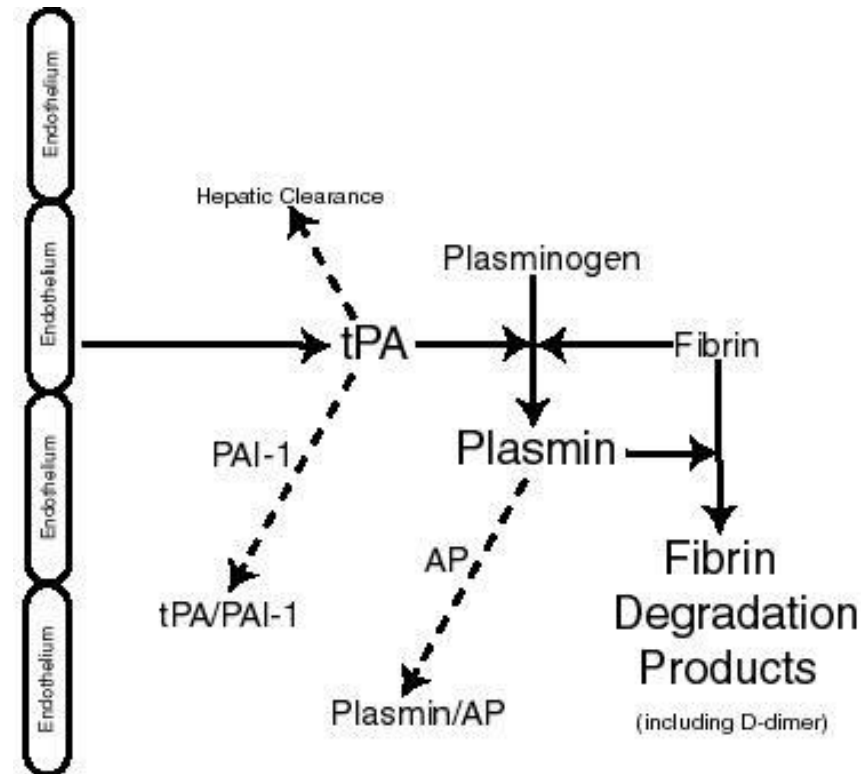
Regulační mechanismy srážení krve

- 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

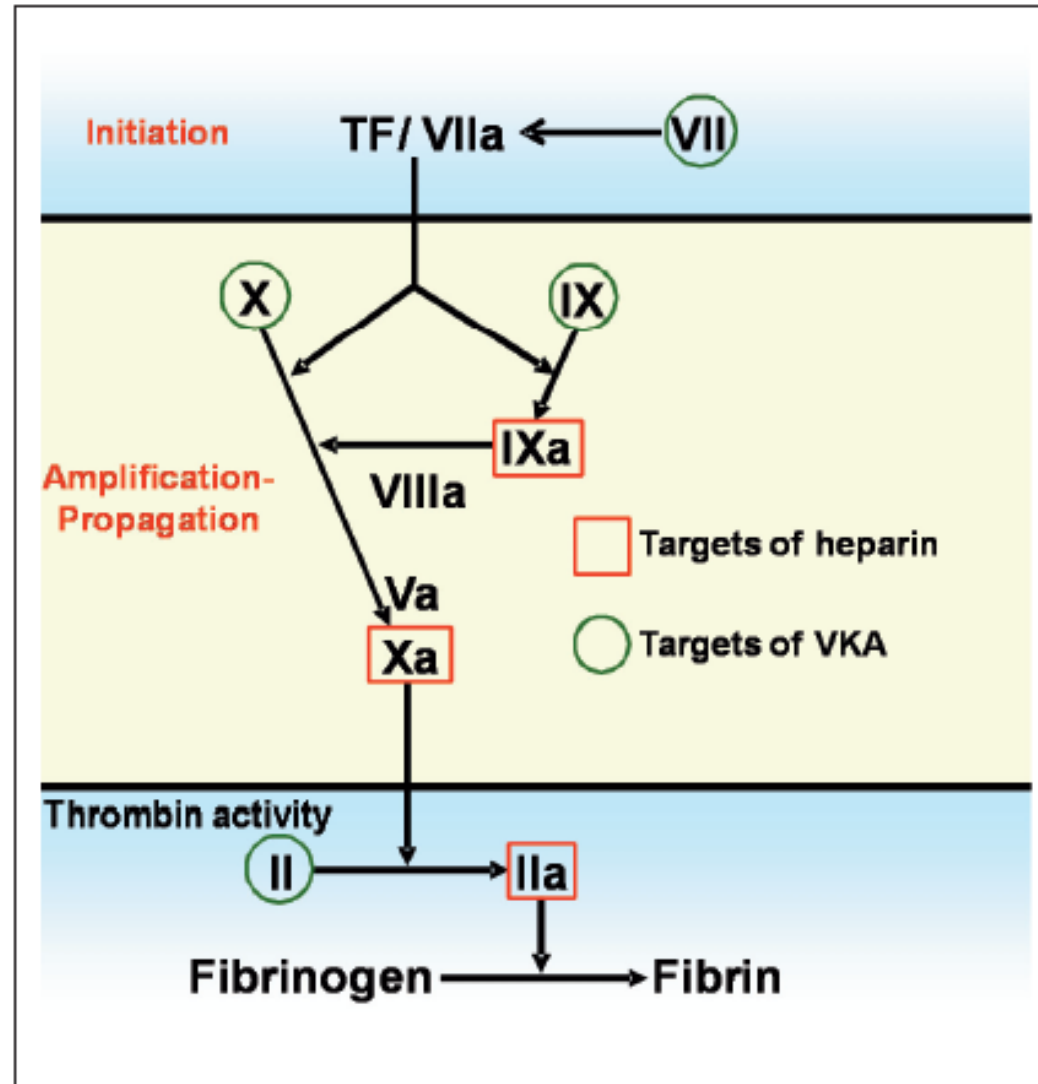


Fibrinolytický systém

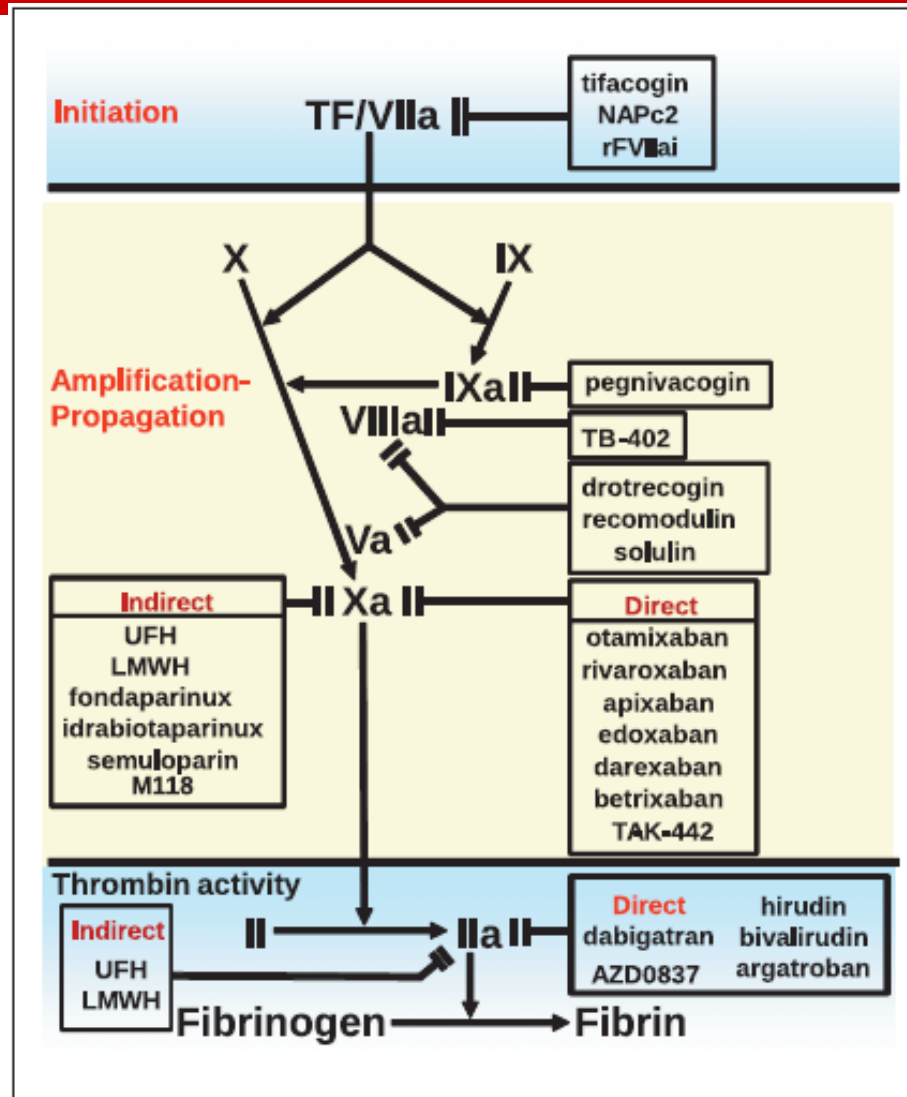
- plazmin (serinová proteáza) cirkuluje jako neaktivní proenzym (plazminogen)
 - volný plazmin rychle inhibován α_2 -antiplazminem
- aktivace plazminogenu pomocí tPA (endotel. bb.) a ukokinázy (epitel. bb.) na plazmin
- degradace fibrinu na degradační produkty
- aktivita tPA inhibována PAI-1



Heparin vs. Warfarin



Budoucnost



ESC Working Group on Thrombosis – Task Force on Anticoagulants in Heart Disease: Anticoagulants in heart disease

Thrombosis and Haemostasis 109.4/2013

Poruchy krevního srážení

- (A) hypokoagulační stavy (krvácivé diatézy)
 - defekt primární hemostázy
 - poruchy cévní stěny (senilní purpura)
 - trombocytopenie a trombocytopatie
 - von Willebrandova choroba
 - defekt sekundární hemostázy (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)

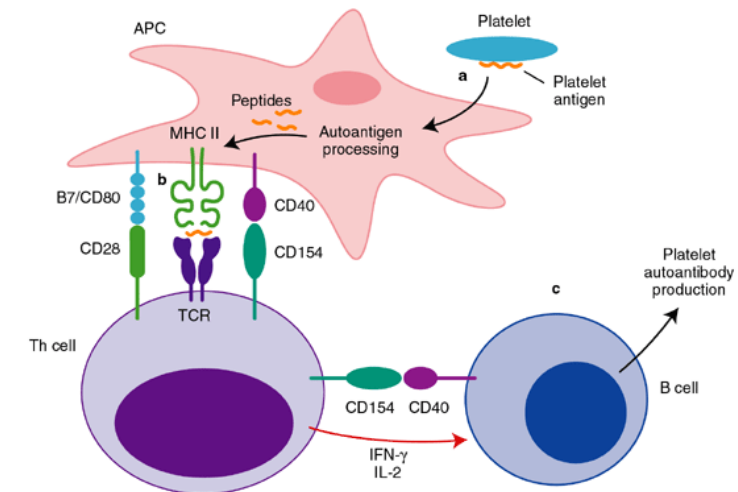
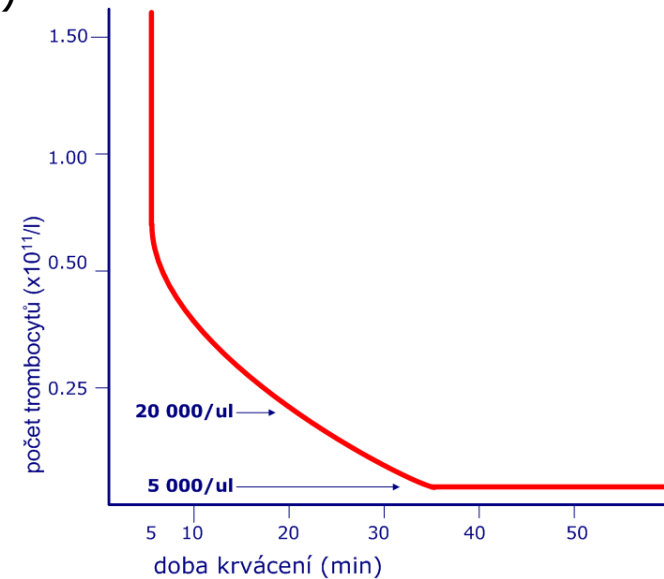
Defekty primární hemostázy

- projevy: petechie, purpura, epistaxe, krvácení z dásní či do GIT, hematurie, menorigie
- (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/ μ l ($1.5-4 \times 10^{11}$ /l)
- v cirkulaci přežívají cca 8-10 dní
- (A) trombocytopenie = snížení počtu
 - <50 000/ μ l - zvýšené riziko krvácení
 - <20 000/ μ l - významné riziko
 - <5 000/ μ 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 GPIIb-IX)
 - Glanzmannova trombastenie (porucha receptoru GPIIb-IIIa)
 - porucha degranulace
 - Heřmanského-Pudlákův syndrom
 - Chédiak-Higashiho syndrom

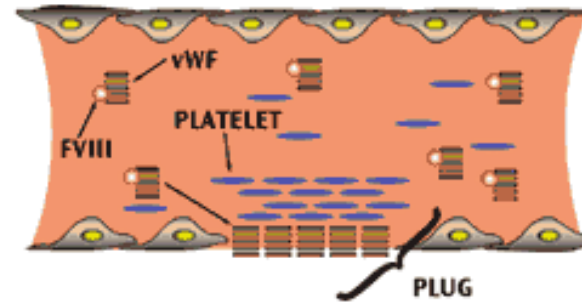


Model of platelet autoantibody production in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)

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.

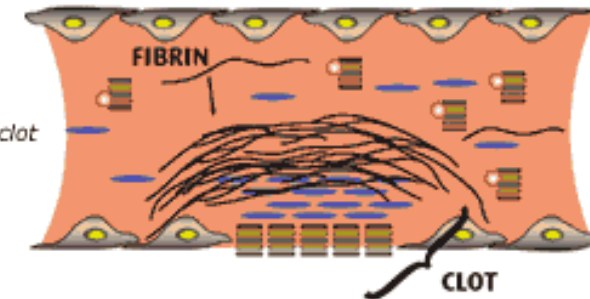
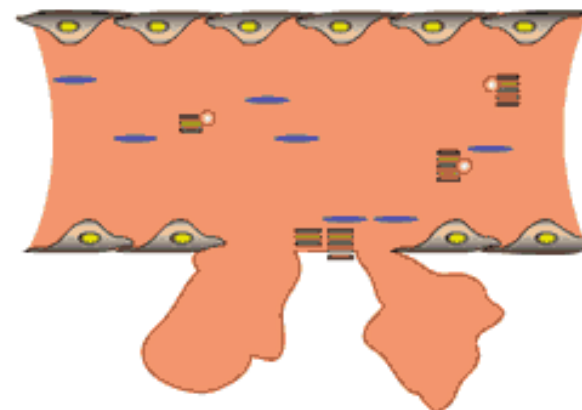


Figure 2. Broken Blood Vessel in vWD



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.

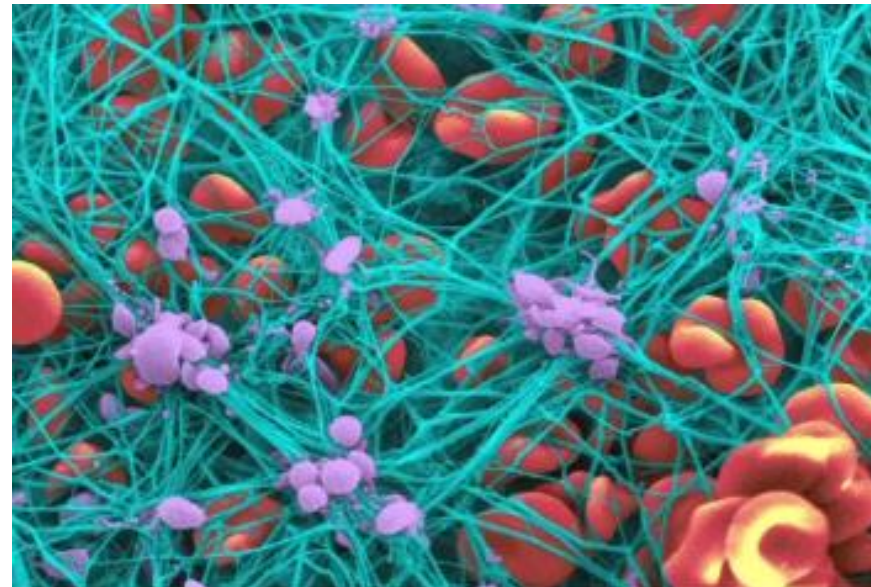
Defekty sekundární hemostázy

- 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% normálů 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



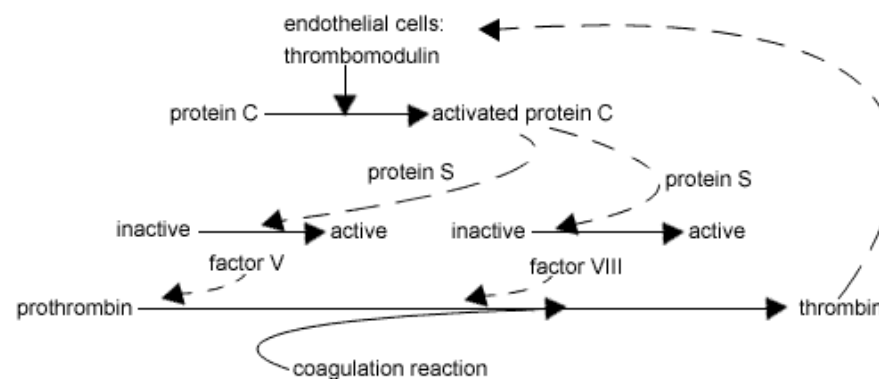
DIC (konzumpční koagulopatie)

- 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 v mikrocirkulaci
 - ischemie až gangrény
 - 2. fáze - hypo- až afibrinogenemie, trombocytopenie
 - krvácení do orgánů
 - patologicky vystupňovaná fibrinolýza



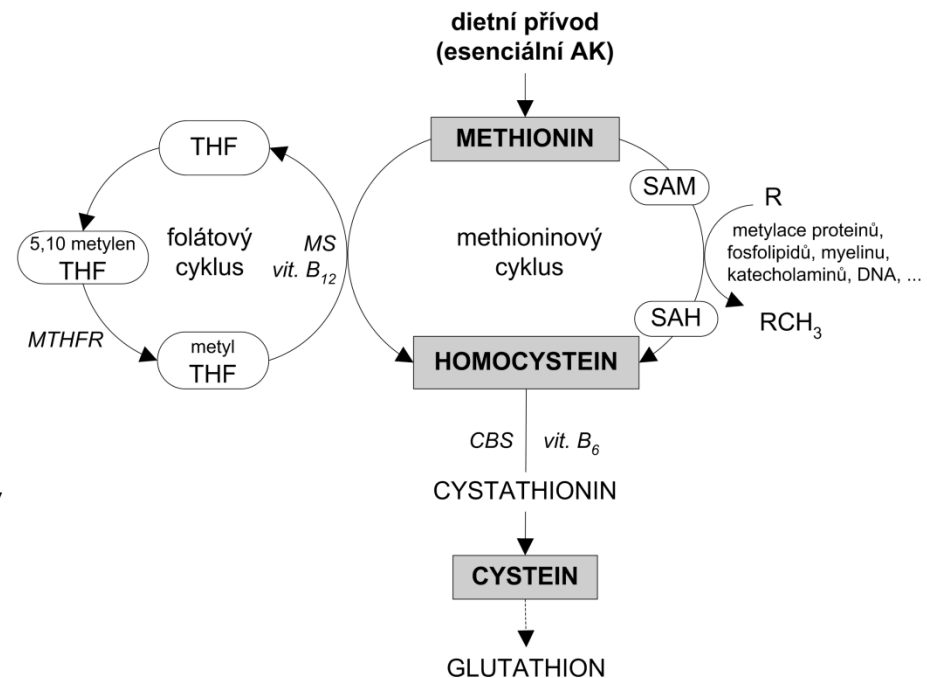
Hyperkoagulační stavy

- vedou ke zvýšení rizika nebo až spontánním a často opakovaným venózním trombózám a trombemboliím (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

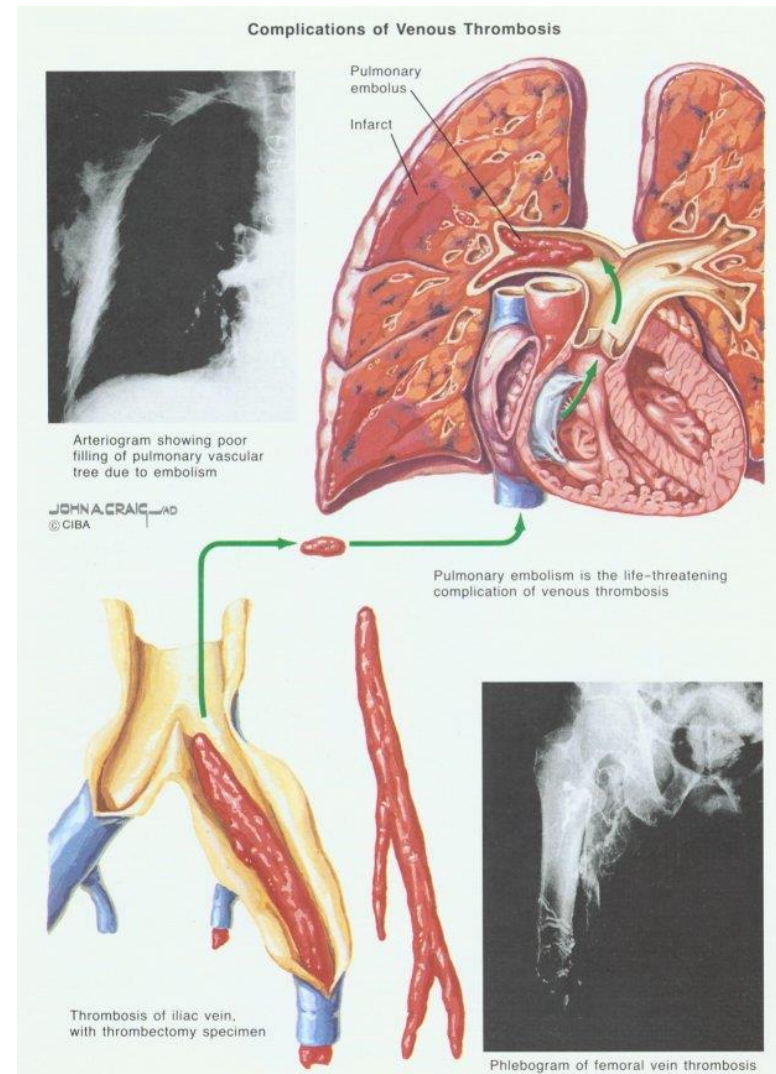
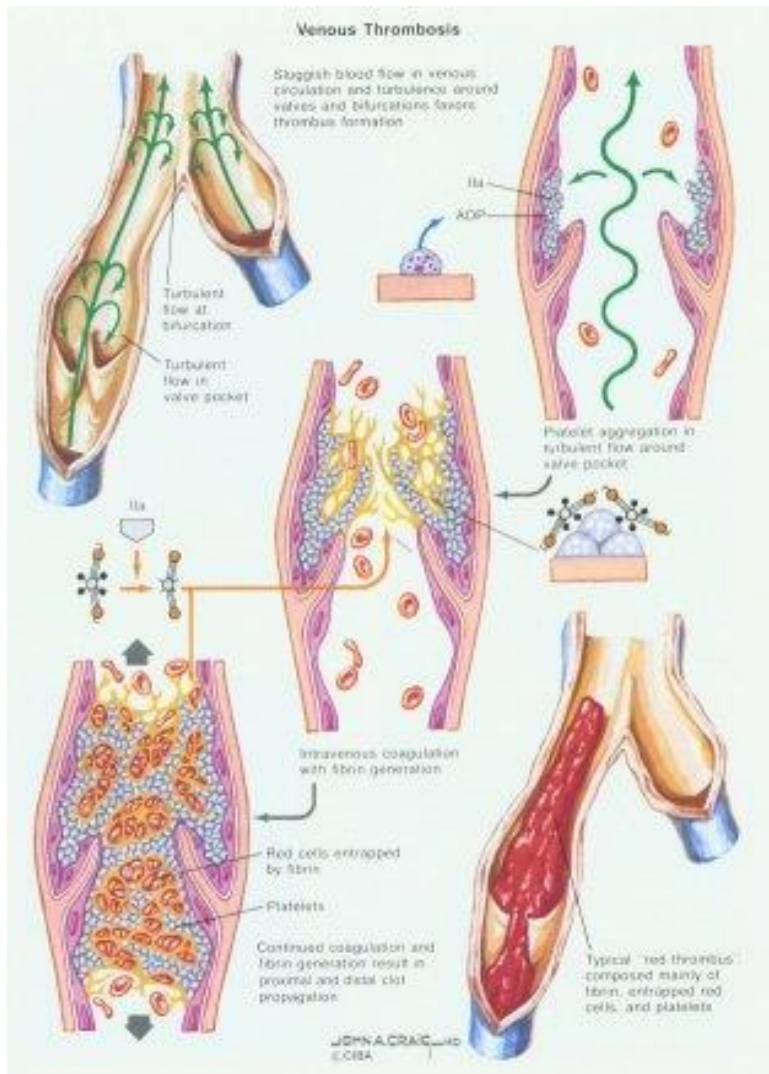


Hyperhomocysteinemie

- homocystein je meziprodukt 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 trombembolizmu, poruch fertility a některých vývojových a neurologických abnormalit (rozštěpové vady páteře)
- homocystein způsobuje endotelovou dysfunkci a iniciuje apoptózu
- (A) monogenní homocystinurie
 - deficit cystathionin- β -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).

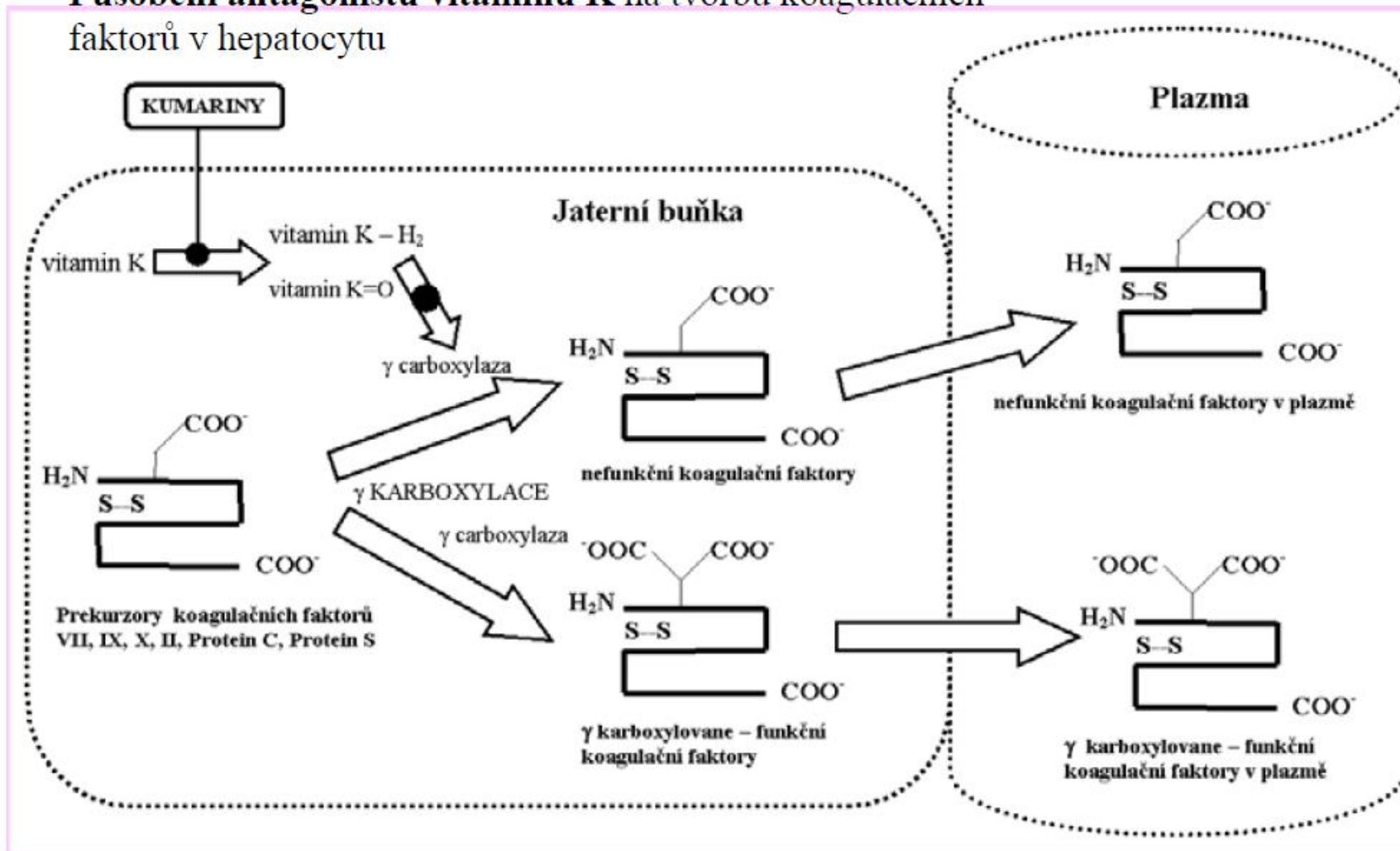
Výsledná hodnota APTT testu

- 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 P₄₅₀2C9 (CYP2C9)

- dvě alelické varianty genu CYP2C9^{1, 2}
 - CYP2C9*2
 - záměna C⁴³⁰T v exonu 3 vede k substituci Arg¹⁴⁴Cys
 - CYP2C9*3
 - záměna A¹⁰⁷⁵C v exonu 7 vede k substituci Ile³⁵⁹Leu
- in vitro má CYP2C9*1 normální, zatímco varianta CYP2C9*2 vykazuje menší a CYP2C9*3 podstatně menší enzymatickou aktivitu^{3, 4}
- fenotypickým projevem je snížení clearance léků závislých na CYP2C9

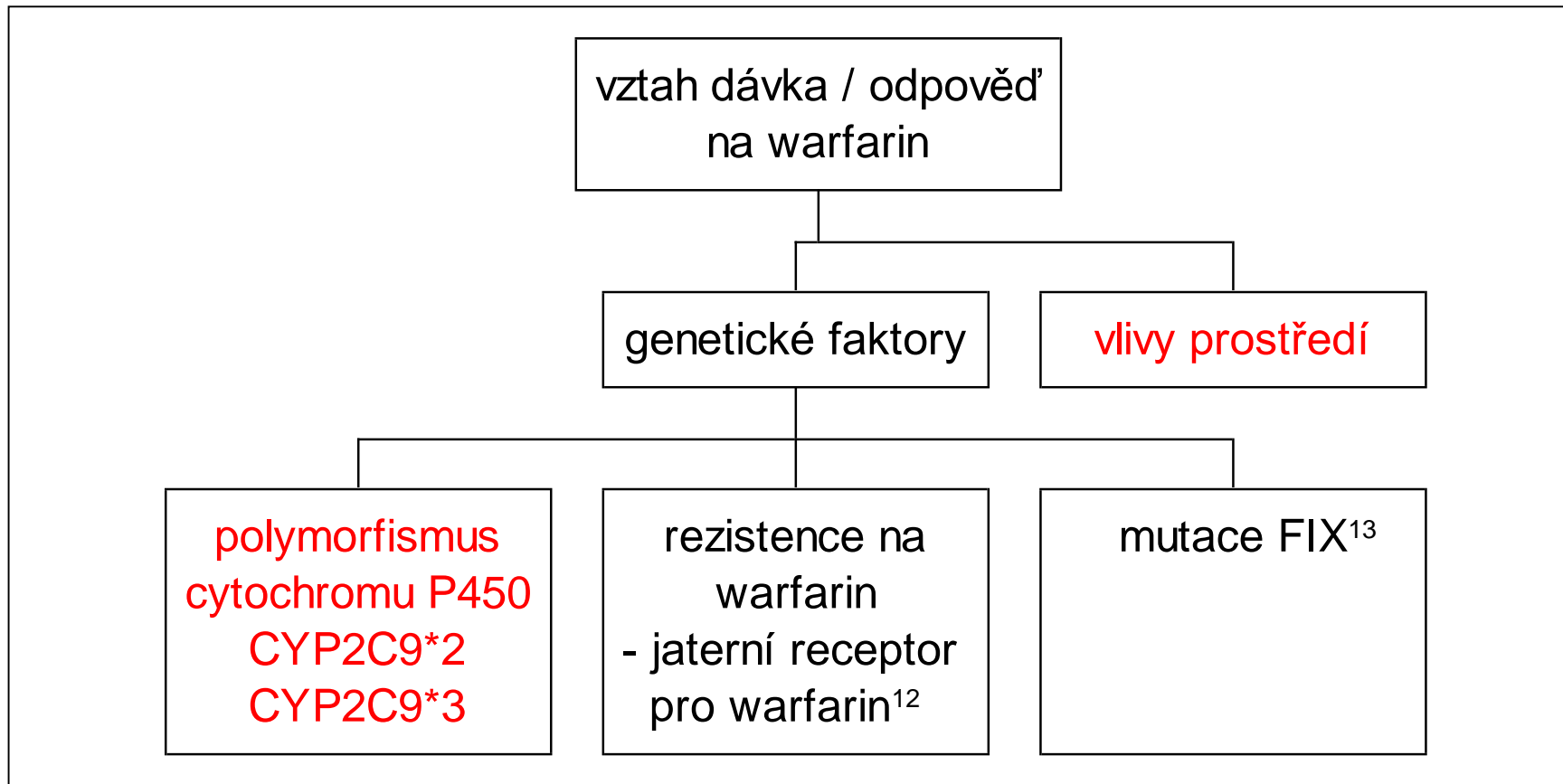
1. Stubbins MJ et al: Pharmacogenetics 1996; 6:429-329

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 ^{14, 16, 17, 18, 19}
- nižší udržovací dávka nutná k dosažení a udržení terapeutického rozmezí ^{11, 15, 16, 18, 19}
- vyšší riziko předávkování dané interakcemi s léky metabolizovanými a/nebo reagujícími s CYP2C9 ^{17, 21}
- nestabilita antikoagulační terapie ^{15, 16}
- 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 NSAID	rifampicin	fluvoxamin (ostatní SSRI slabí)
fenobarbital, fenytoin	fenobarbital, fenytoin	omeprazol
S-warfarin	karbamazepin	inhibitory HMG-CoA reductázy
losartan		tolbutamid
tolbutamid		cimetidin (slabý)
sulfonamidy, dapson		azolová antimykotika (slabá)
diazepam , tenazepam		ritonavir
fluoxetin, moclobemid		desethylamiodaron
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

