

Hemostáza

- zástava krvácení při poranění
- udržení tekutosti krve při něporušeném cévním řečišti
- podílejí se všechny látky přítomné v krvi a na vnitřní straně cévy
 - ⇒ i červené krvinky
 - ⇒ leukocyty
 - ⇒ lipidy, bílkoviny, minerály atd.

Krev

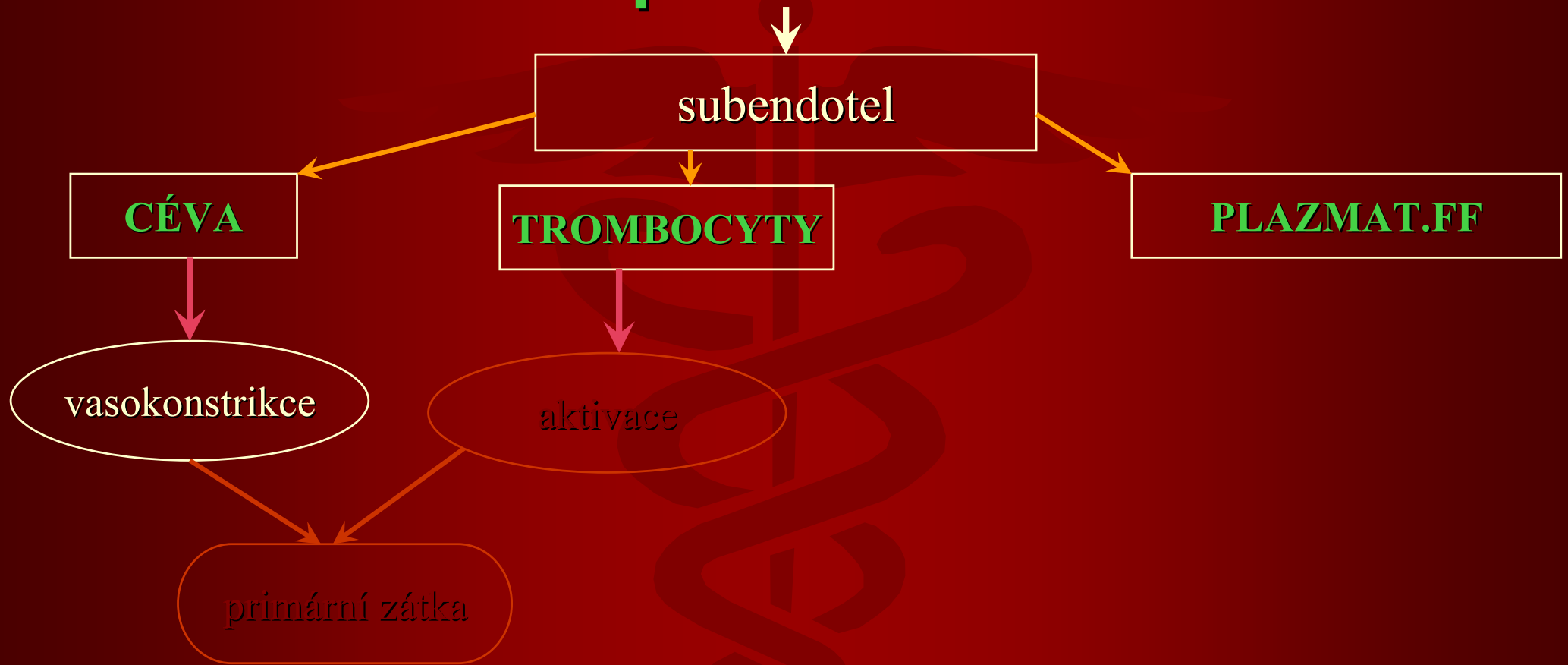
Tekutá část – plazma

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

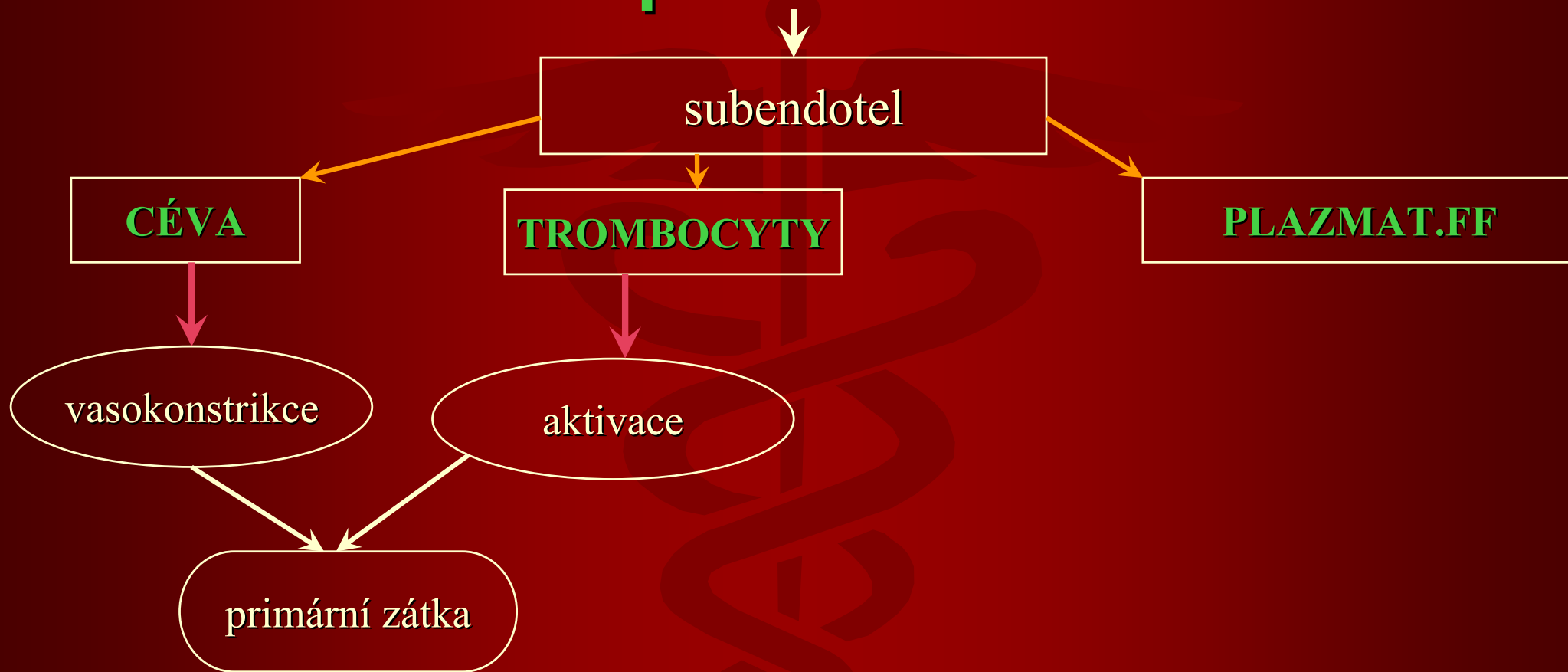
Buňky – krevní tělíska

- Červené krvinky
- Bílé krvinky
- Krevní destičky

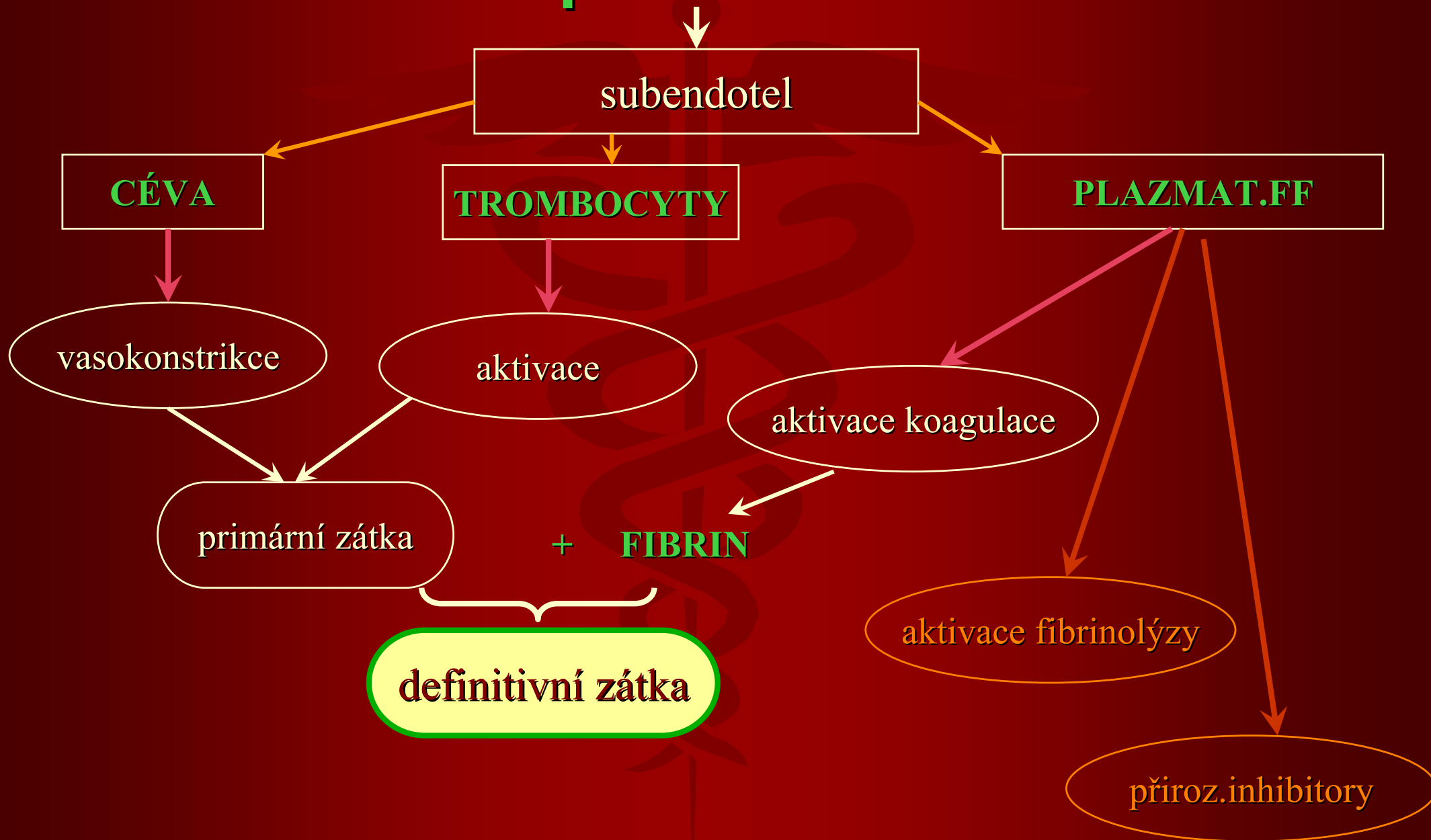
Poranění = poškození endotelu



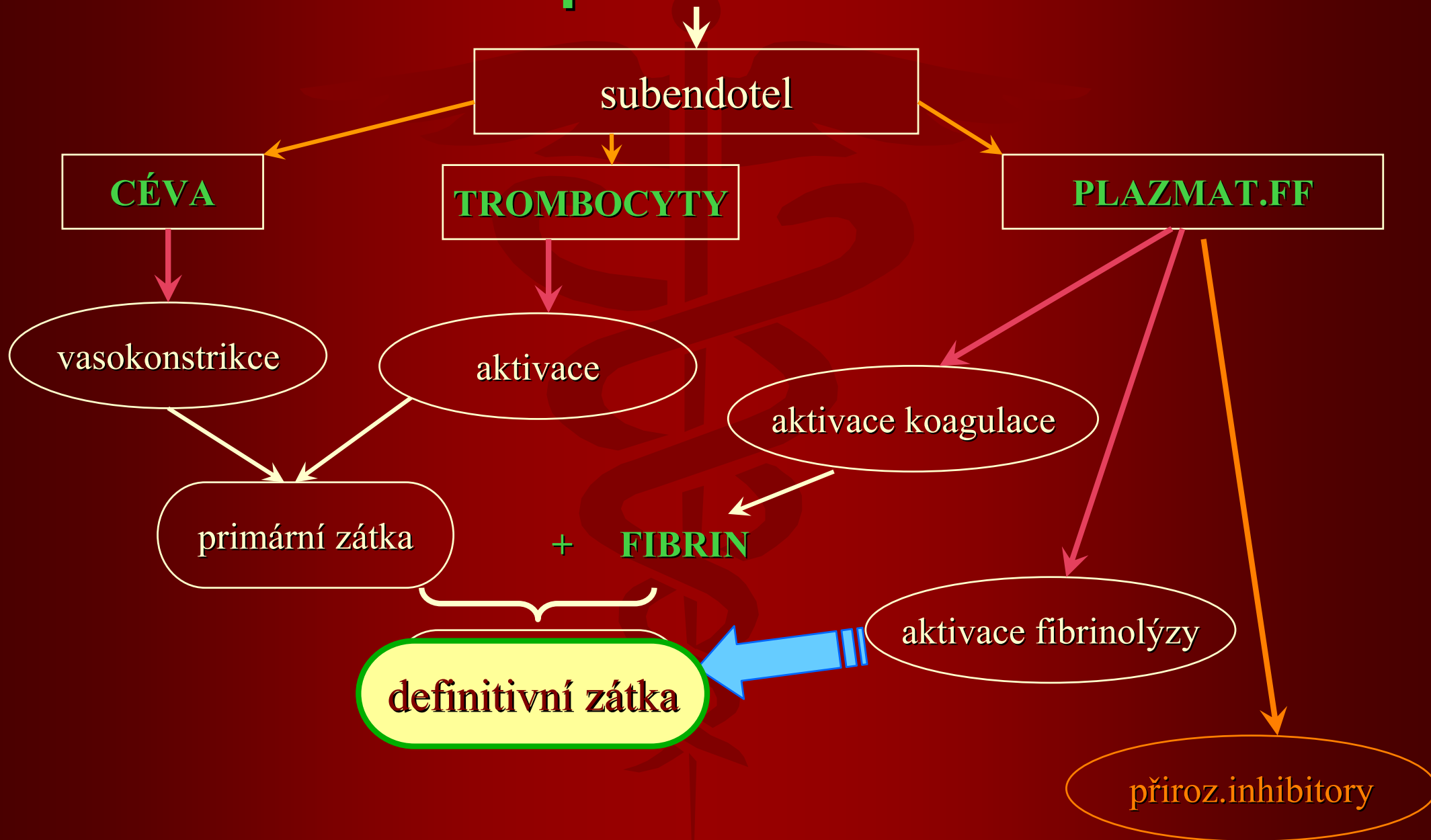
Poranění = poškození endotelu



Poranění = poškození endotelu



Poranění = poškození endotelu



Hemostáza

➤ primární

↳ vasokonstrikce

ihned

↳ adheze trombocytů

sekundy

↳ agregace trombocytů

minuty

➤ sekundární (koagulace)

↳ aktivace koagul. faktorů

sekundy až minuty

↳ tvorba fibrinu

minuty

➤ fibrinolýza

↳ aktivace

minuty

↳ lýza krevní sraženiny

hodiny

Endotel

- je aktivní jednovrstevná buněčná výstelka všech cév, kapilár a serózních dutin
- hraje důležitou aktivní roli v celé řadě fyziologických i patologických procesů
- procentuální podíl na hmotnosti organismu je malý - cca 1,5 kg u dospělého člověka

Endotel

- 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

- EB kapilár uvolňují látky, které regulují prokrvení orgánů, 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

Endotel - vlastnosti

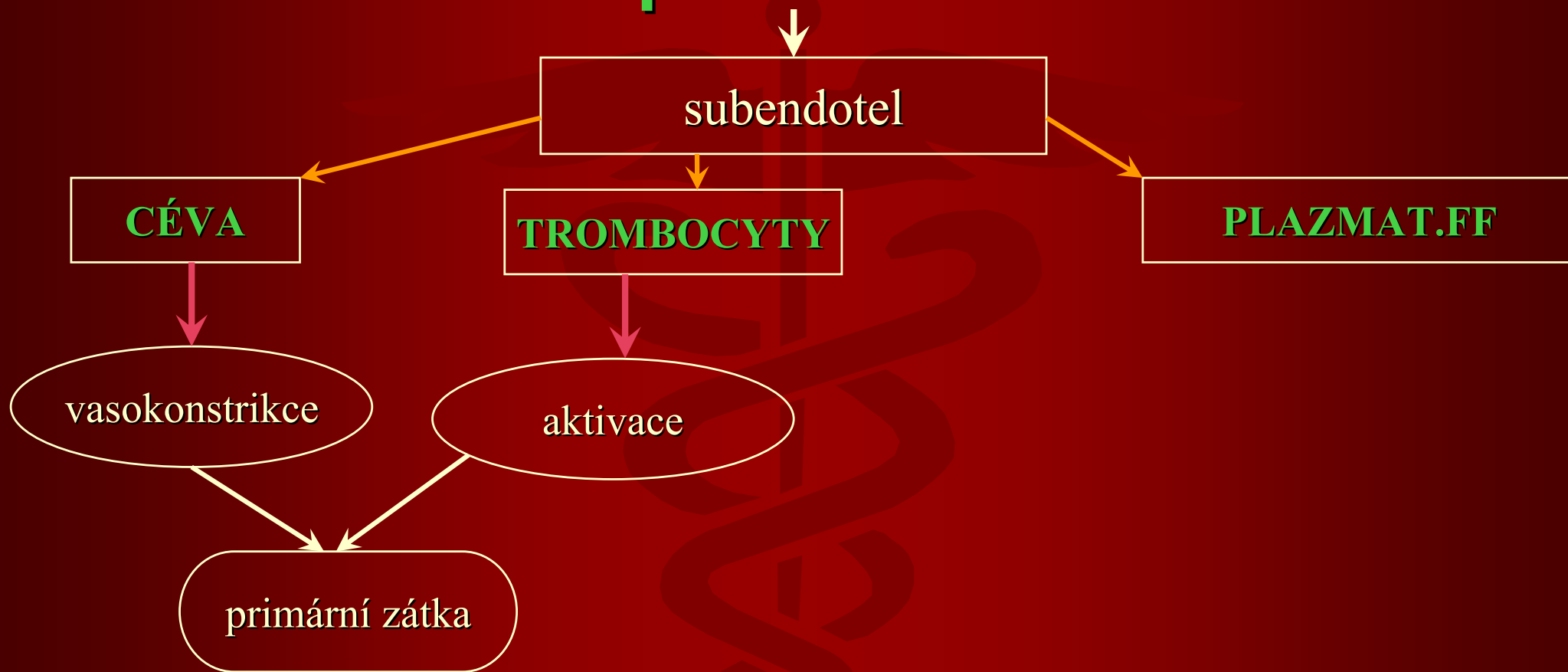
Antitrombotické

- 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

Poranění = poškození endotelu

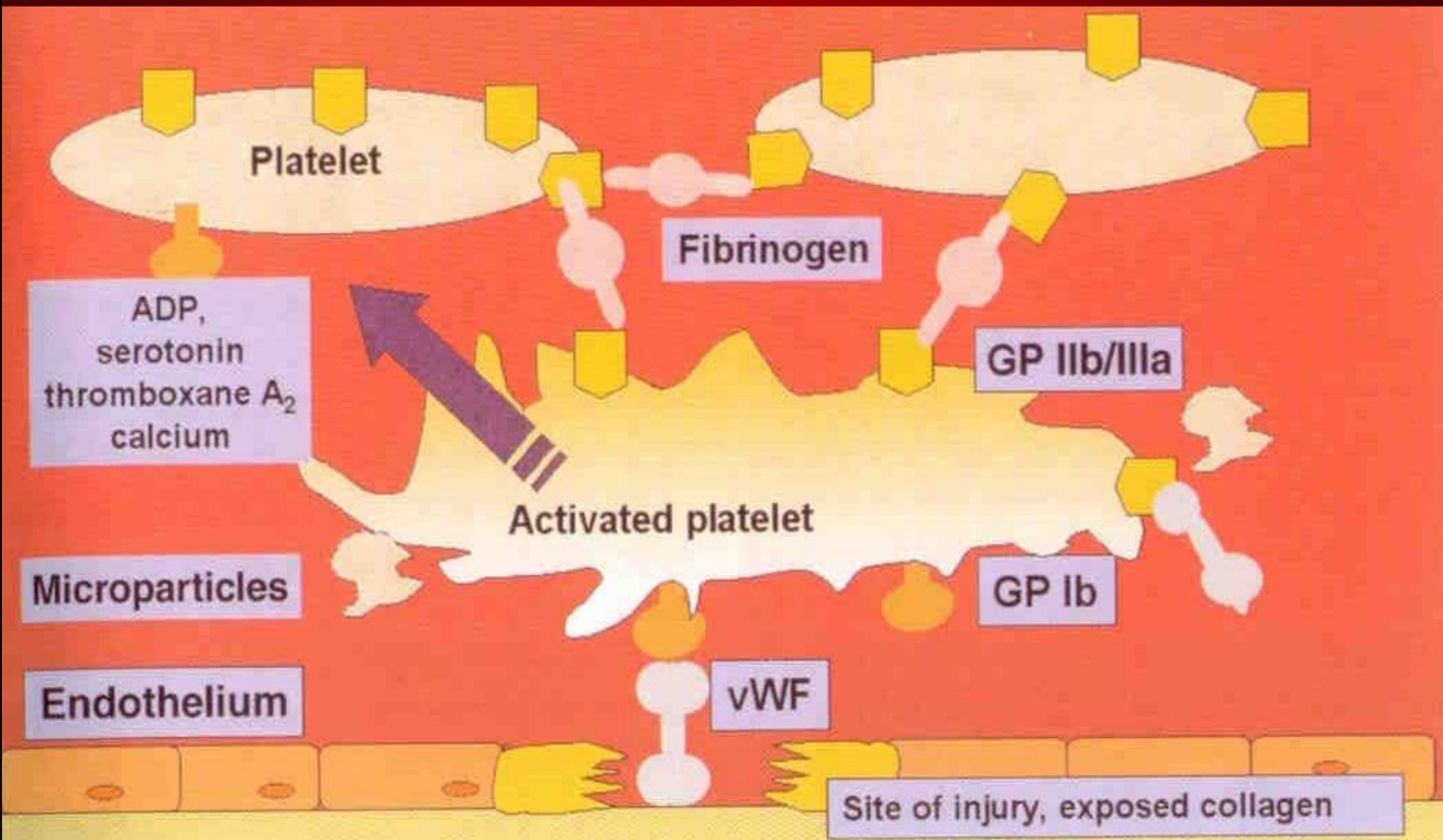


Krevní destičky

Funkce trombocytů při zástavě krvácení je dvojí:

- tvorba primární krevní zátky,
- tzv. prokoagulační
 - ↳ tj. poskytnutí povrchů = fosfolipidů pro řádný průběh koagulačních dějů - PF3.

Primární hemostáza



Trombocyty - aktivace

- ztrácí diskoidní tvar, začnou se tvořit pseudopodia (výběžky),
- objeví se přesun granulí k centru buněk a viditelná přeměna složek cytoskeletonu
- je výsledkem rychlých změn morfologie destičky a sekrece látek z granulí
- přesun negativně nabitých fosfolipidů na povrch
- Rozeznáváme:
 - ↪ adheze
 - ↪ změna tvaru
 - ↪ uvolňovací reakce
 - ↪ agregace
 - ↪ retrakce

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 proteiny (adhezivní) a
 - ↪ hemodynamické změny (smykové rychlosti, množství a viskozita krve, velikost a tvar cév).
- Adheze je přímo lineárně závislá na počtu trombocytů.

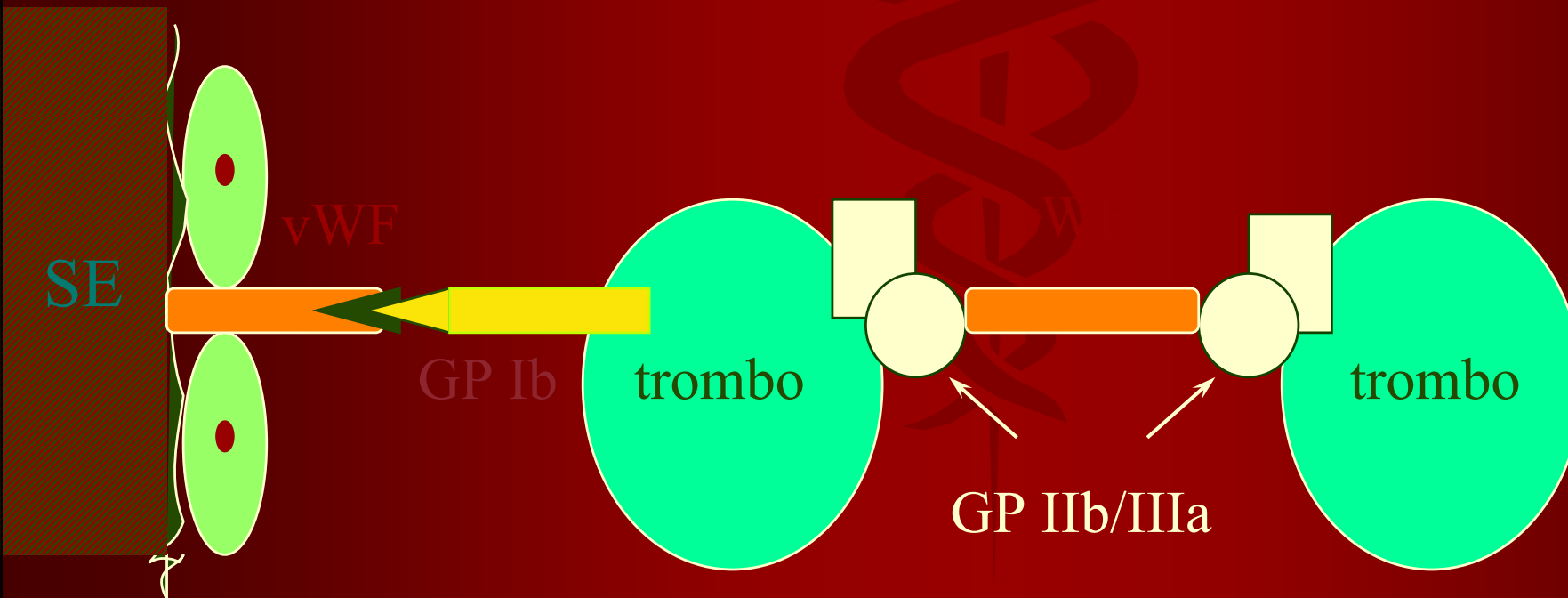
Von Willebrandův faktor

- 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

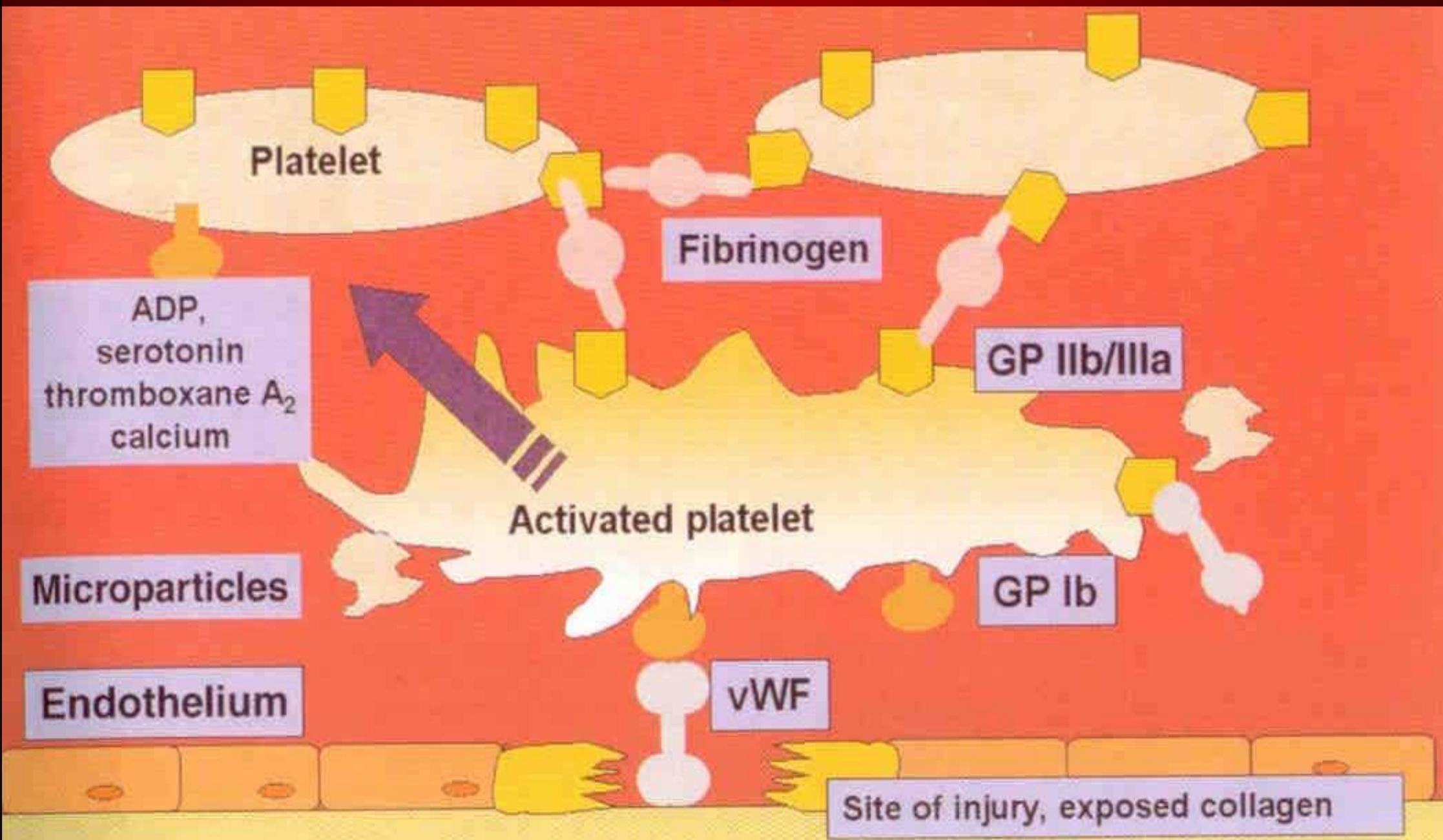
Aktivace destiček v důsledku adheze

- Adheze navodí s aktivací receptorů kaskádu pochodů – aktivace trombocytů
- Změna tvaru, centralizace granulí
- Uvolnění působků – sekreční fáze – PDGF, PF4, betaTG, fibrinogenu
- Aktivované destičky uvolňují ADP, metabolismem kyseliny arachidonové vzniká TXA2 – obě látky výrazné stimulatory agregace trombocytů
- Aktivaci receptorů GP IIb/IIIa

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

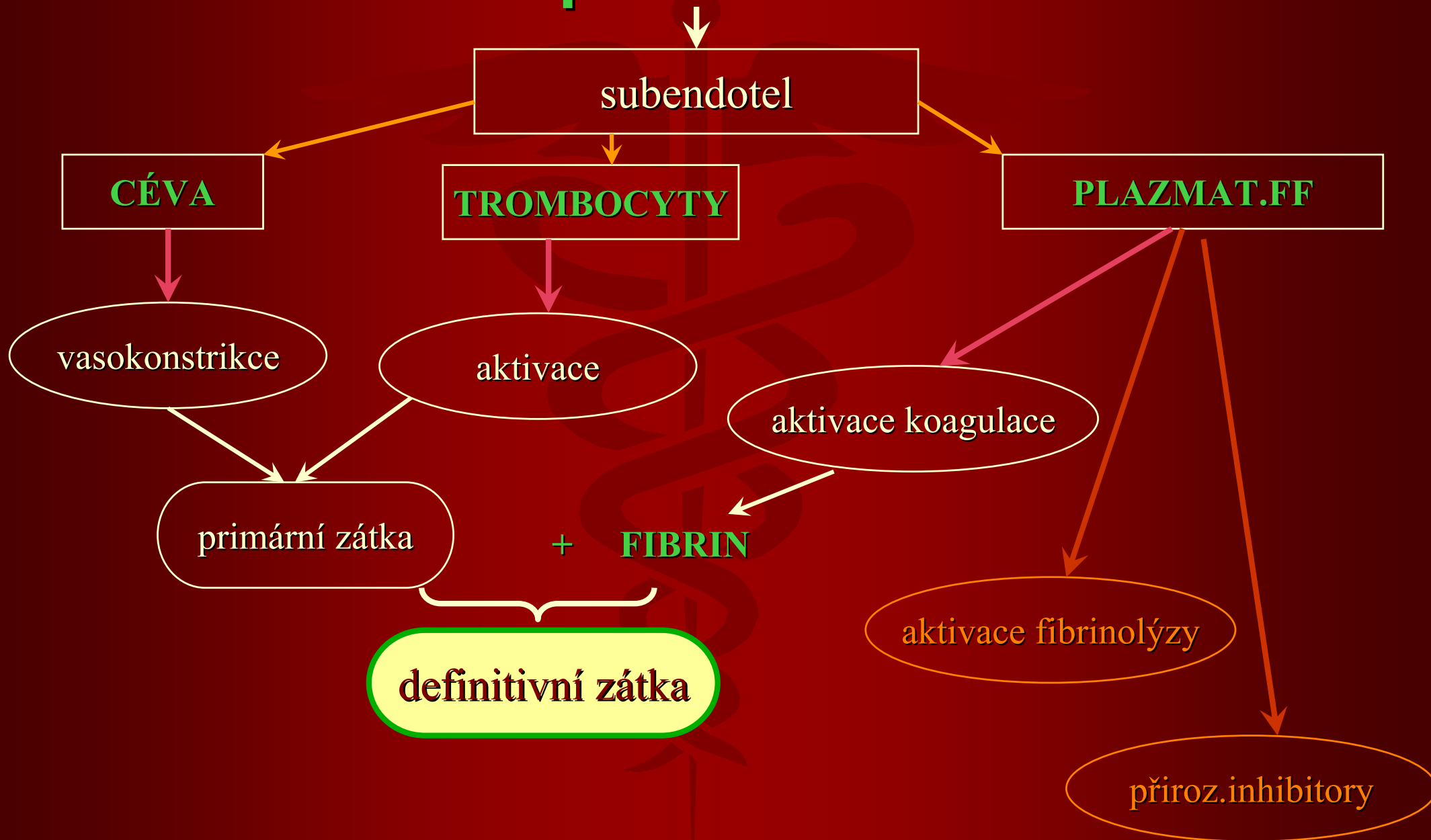
Primární hemostáza



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
- K retrakci koagula a také konstrikci cévní stěny přispívá i vazba fibrinogenu destiček na destičkový aktin prostřednictvím GP IIb/IIIa.

Poranění = poškození endotelu



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

Ca

INTRINSIC



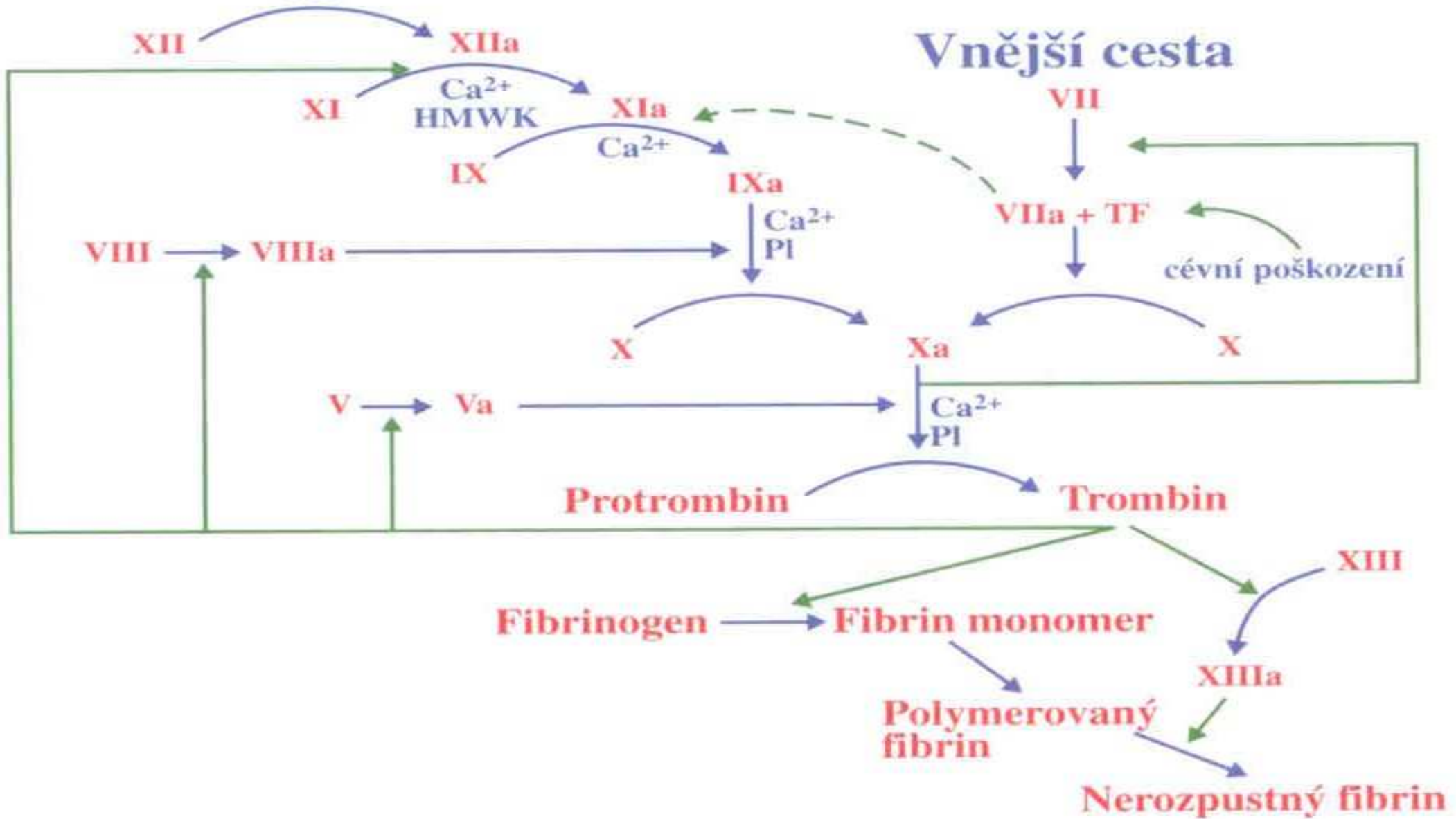
EXTRINSIC



Vnitřní cesta

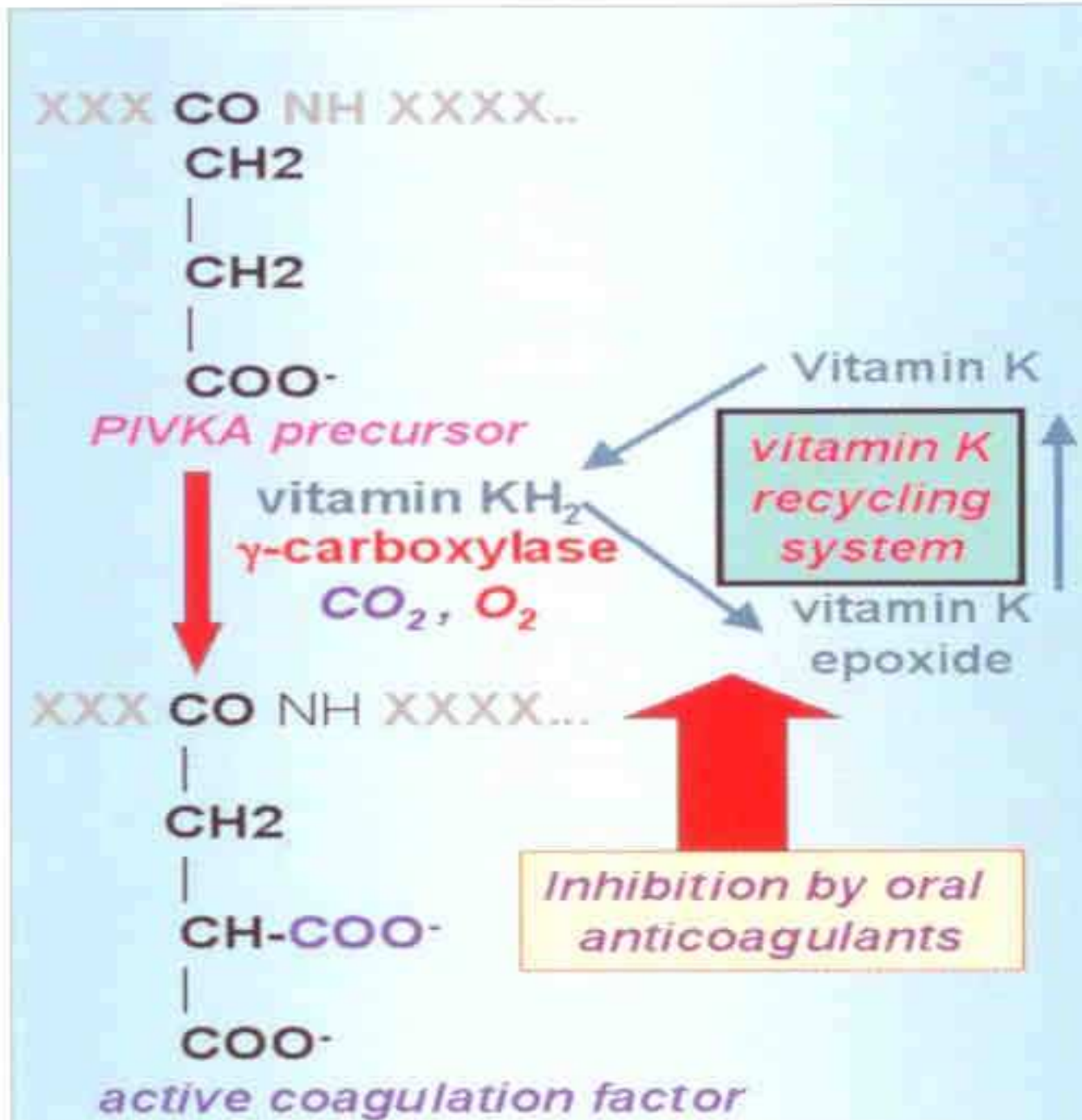
negativně nabitý povrch
HMWK
PK

Vnější cesta

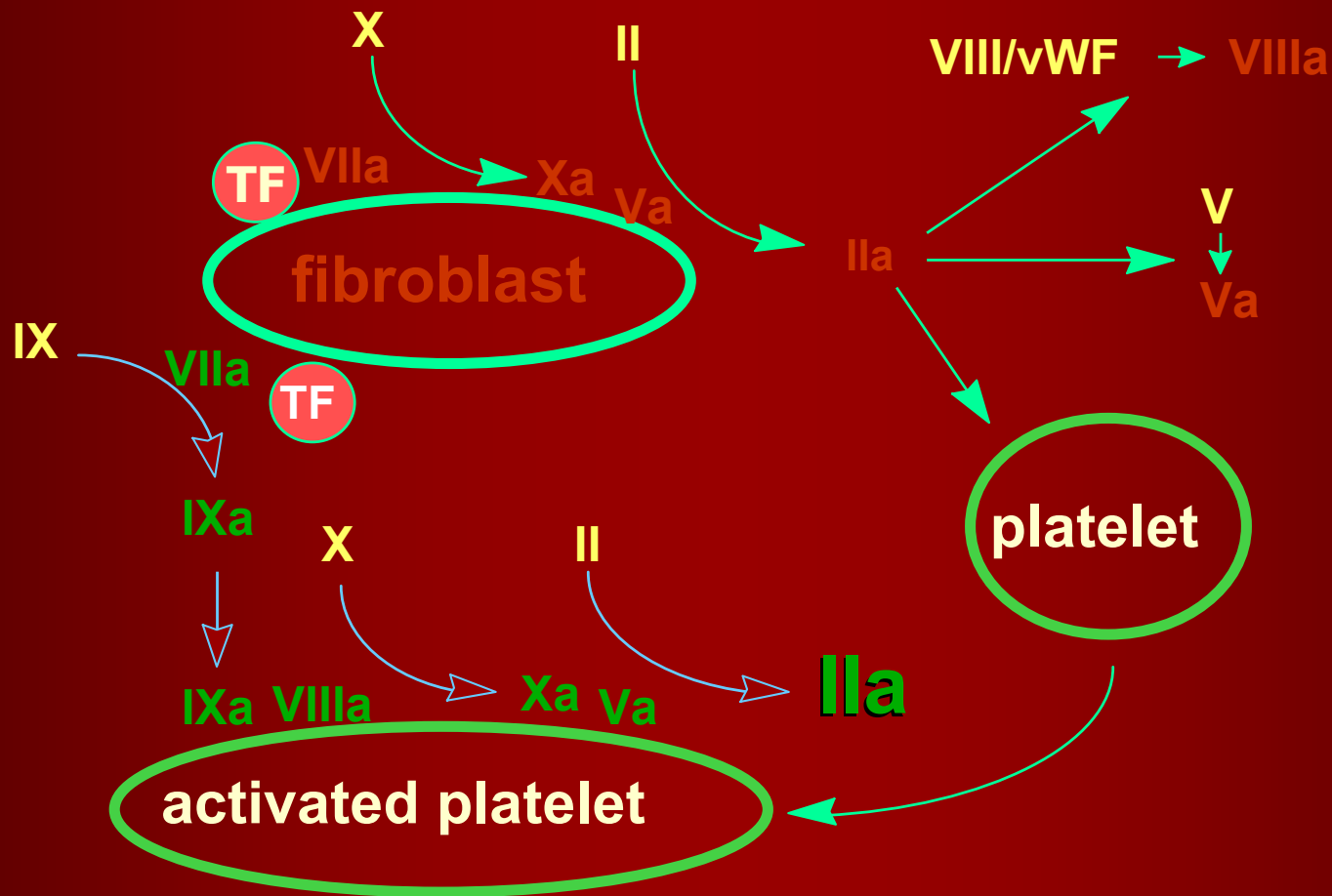


Koagulační faktory vitamín K dependentní

- 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)



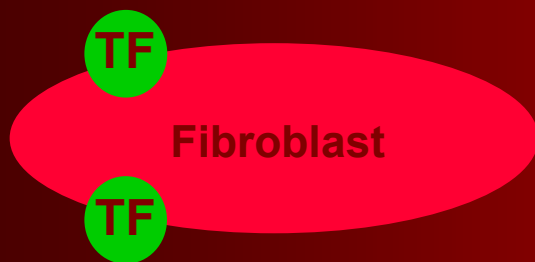
Model for tissue factor-initiated coagulation



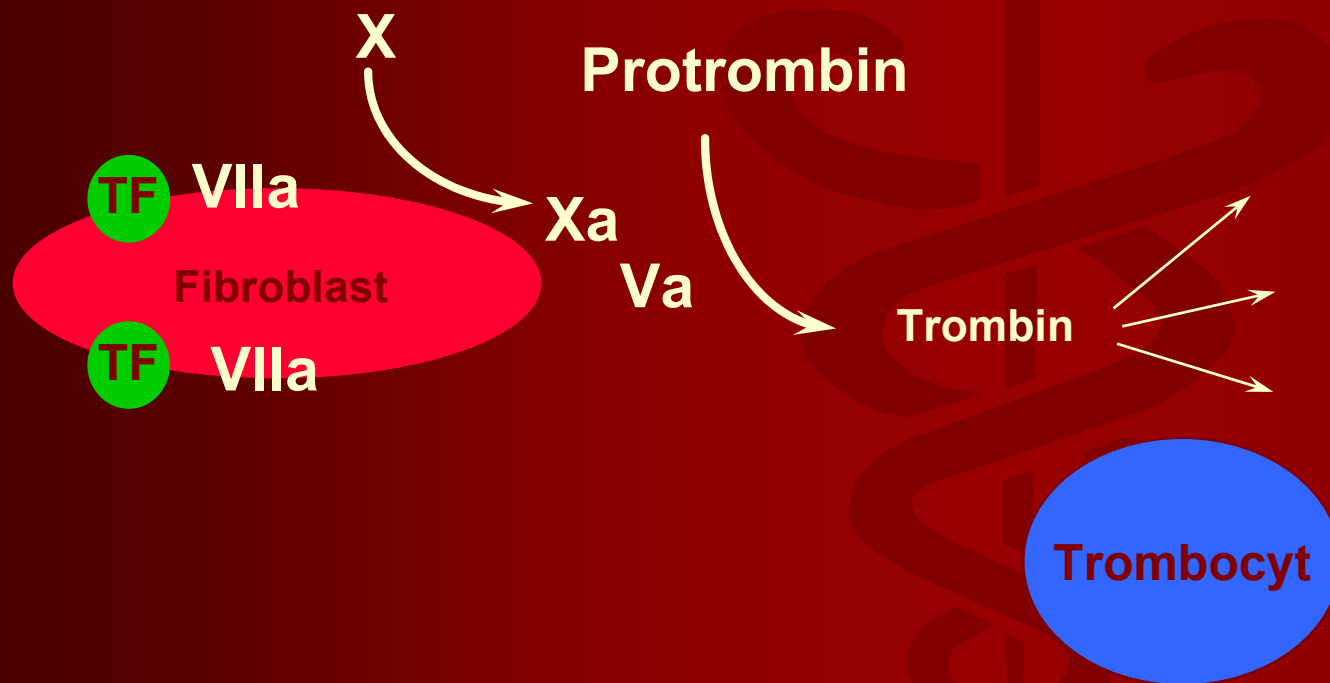
Hemostáza a tkáňový faktor (TF)

- Hemostázu zahajuje tvorba komplexu mezi TF a FVIIa
- Tkáňový faktor není za normálních okolností vystaven působení cirkulující krve
- Tvorba komplexů TF-FVIIa na povrchu buněk nesoucích TF vede k aktivaci FIX a FX

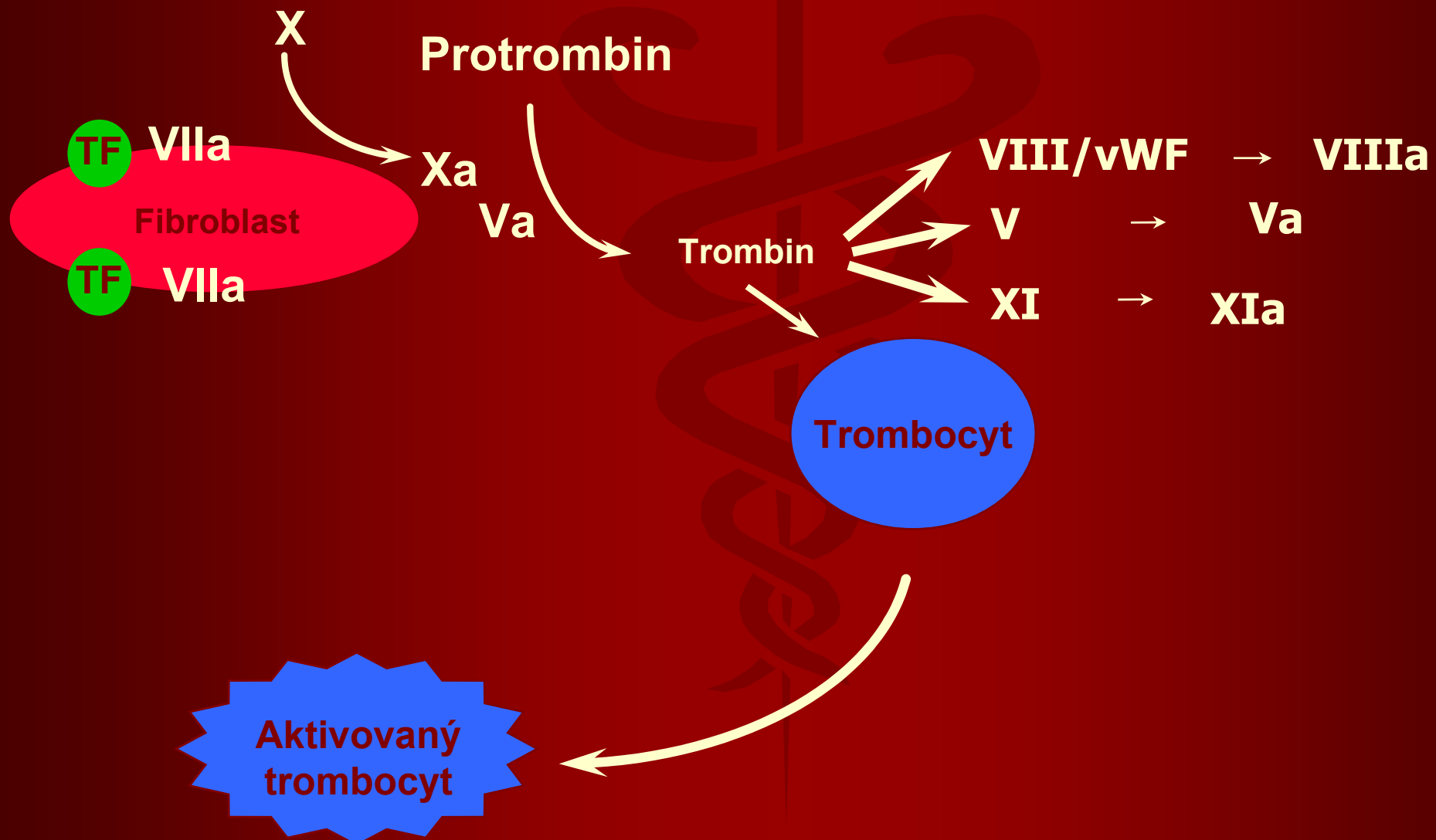
Zahájení (iniciace) hemostázy



Zahájení (iniciace) hemostázy



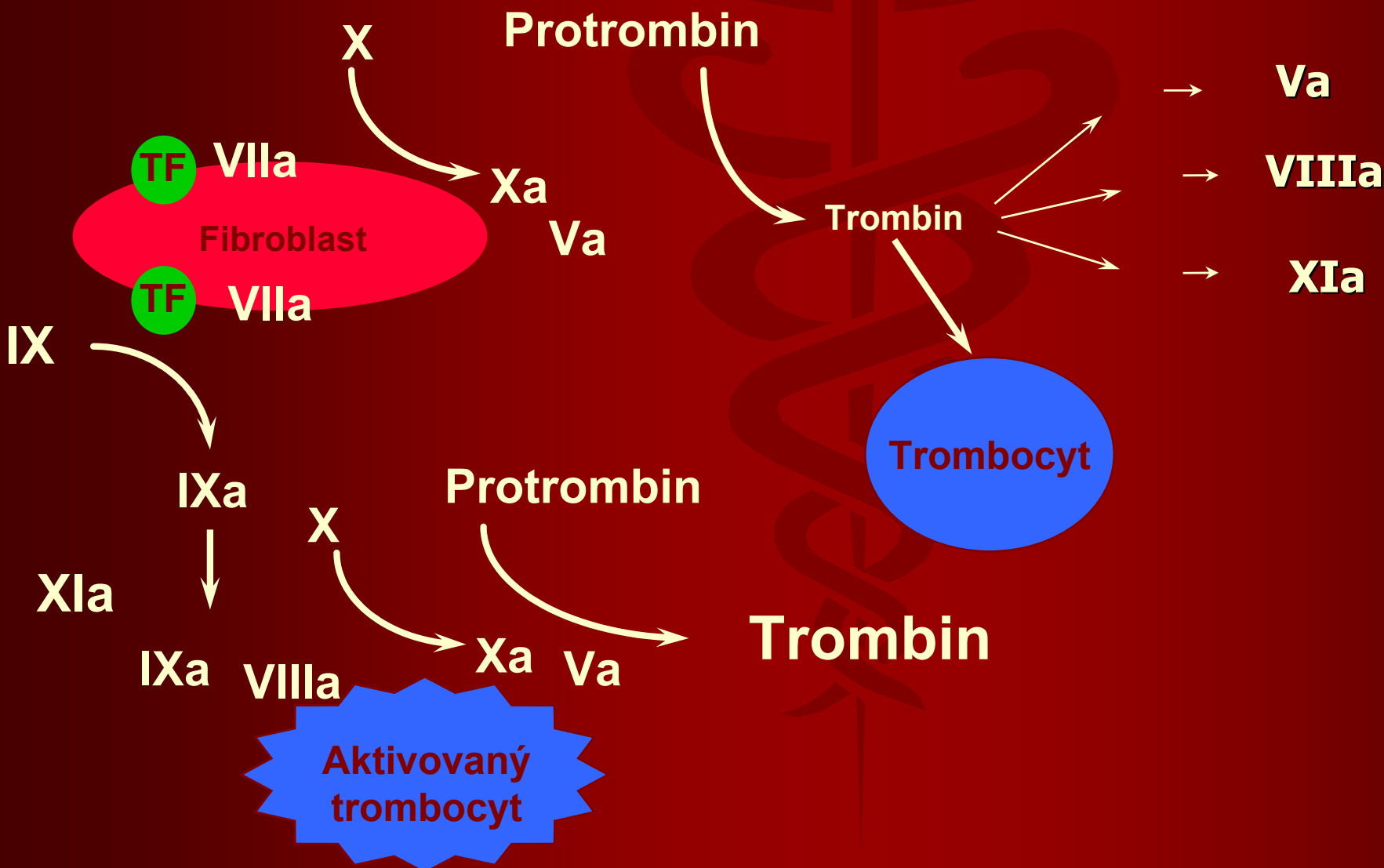
Fáze aplikace hemostázy (priming= narůstání)



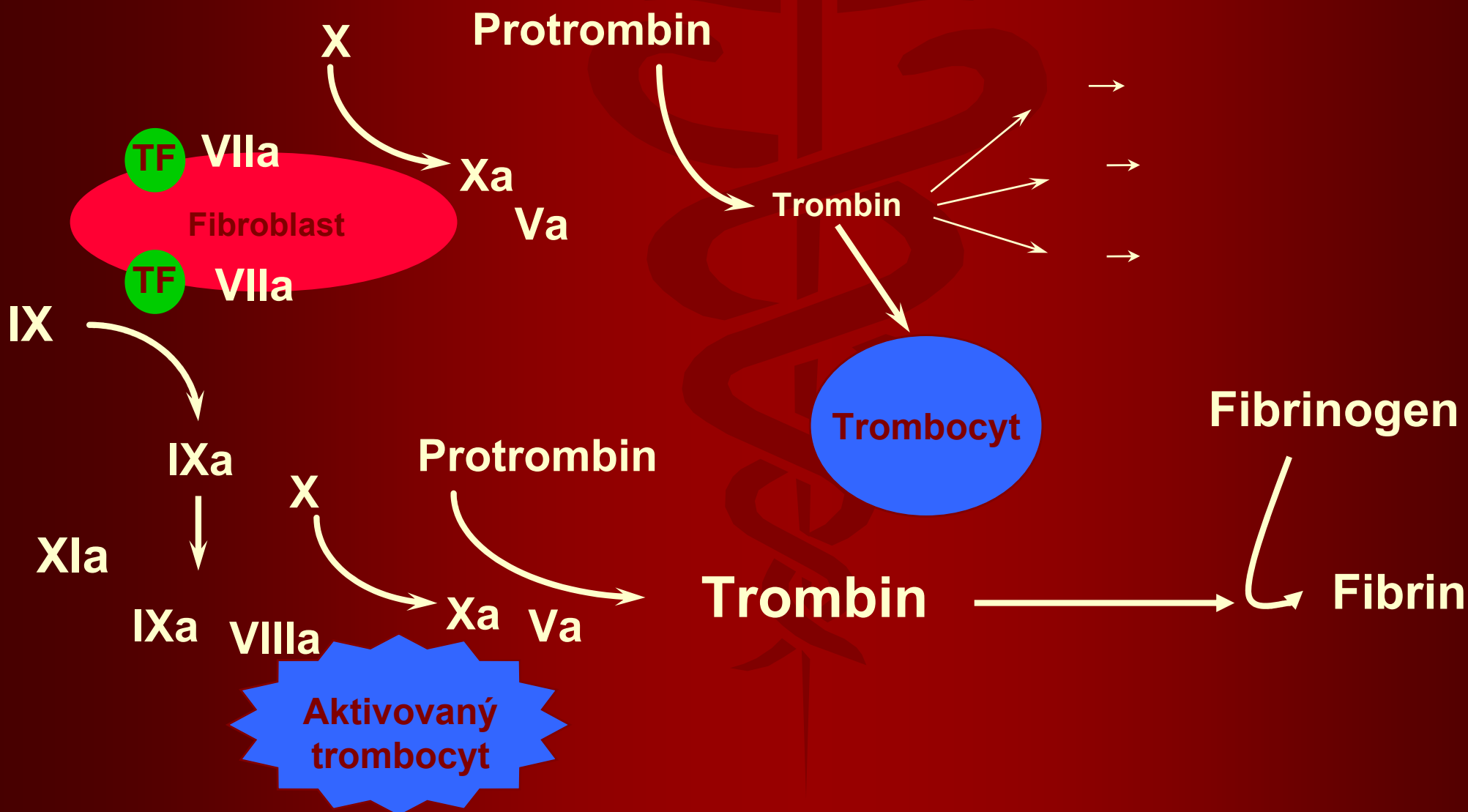
Zahájení tvorby trombinu

- Vytvoření iniciálního malého množství trombinu se následně podílí na aktivaci dějů, které zvyšují tvorbu trombinu více než 1000-násobně
 - Pomáhá aktivovat trombocyty v místě poranění a stimuluje je k vytvoření destičkového koagula, jenž je ideálním fosfolipidovým povrchem potřebným pro další aktivaci koagulačních faktorů
 - Aktivuje koagulační faktory V a VIII
 - Aktivuje koagulační faktor XI

Propagace (šíření, rozmnožení) hemostázy



Propagace (šíření, rozmnožení) hemostázy



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

FVIII a FV

TROMBIN

FXIII

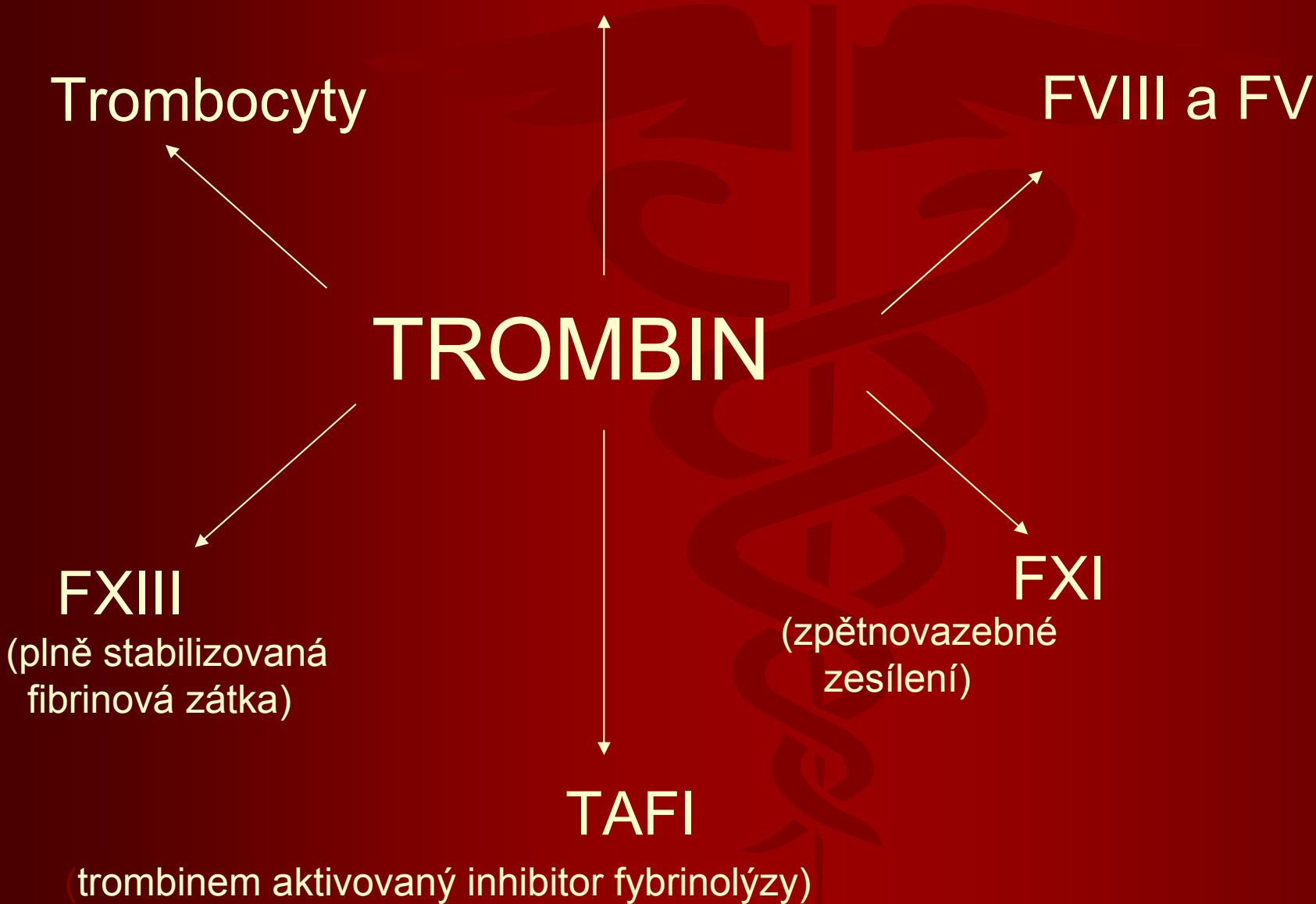
(plně stabilizovaná
fibrinová zátka)

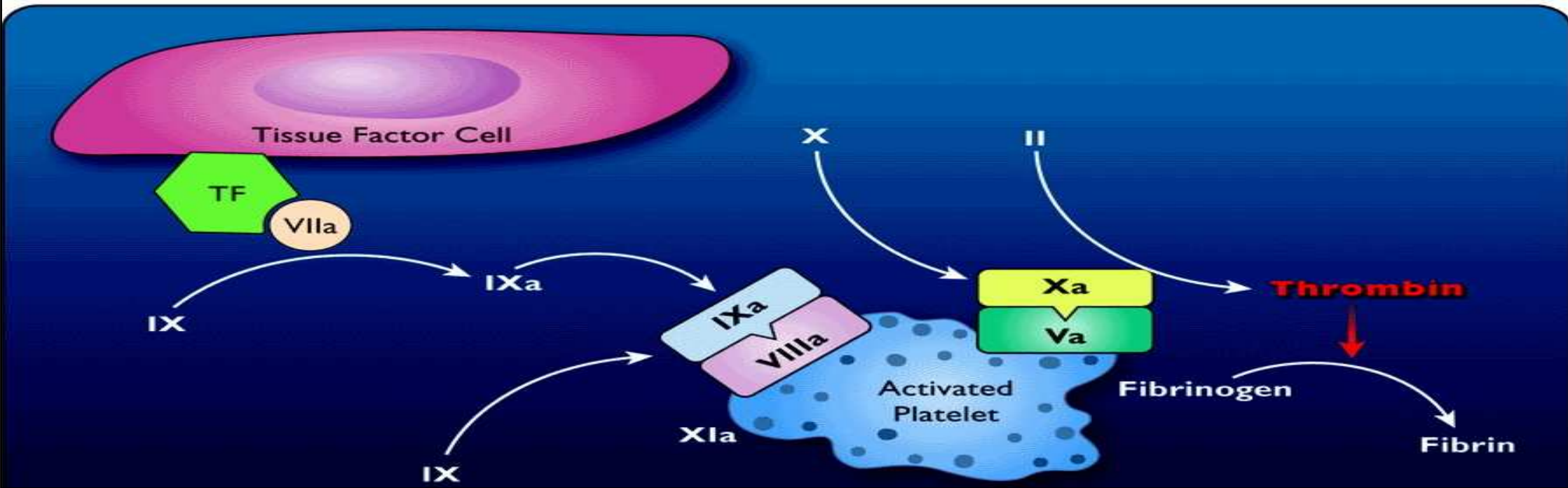
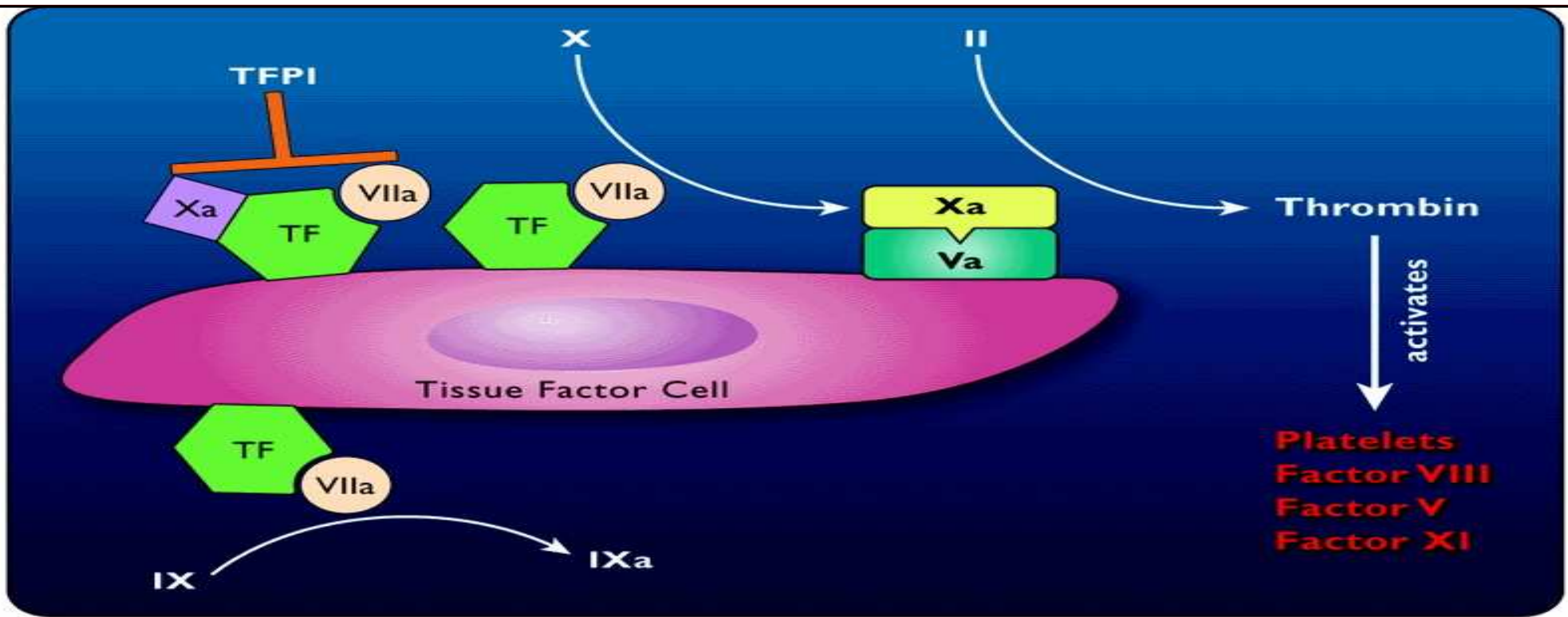
FXI

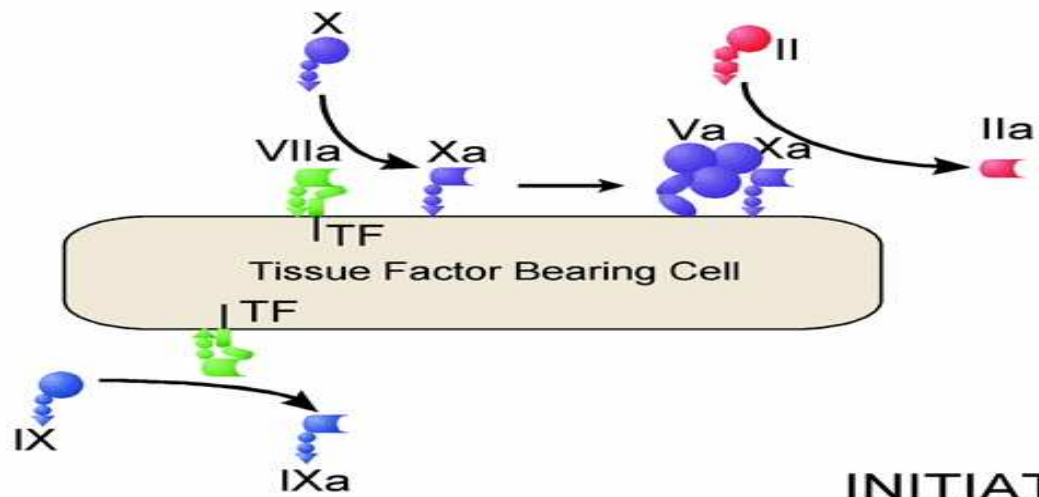
(zpětnovazebné
zesílení)

TAFI

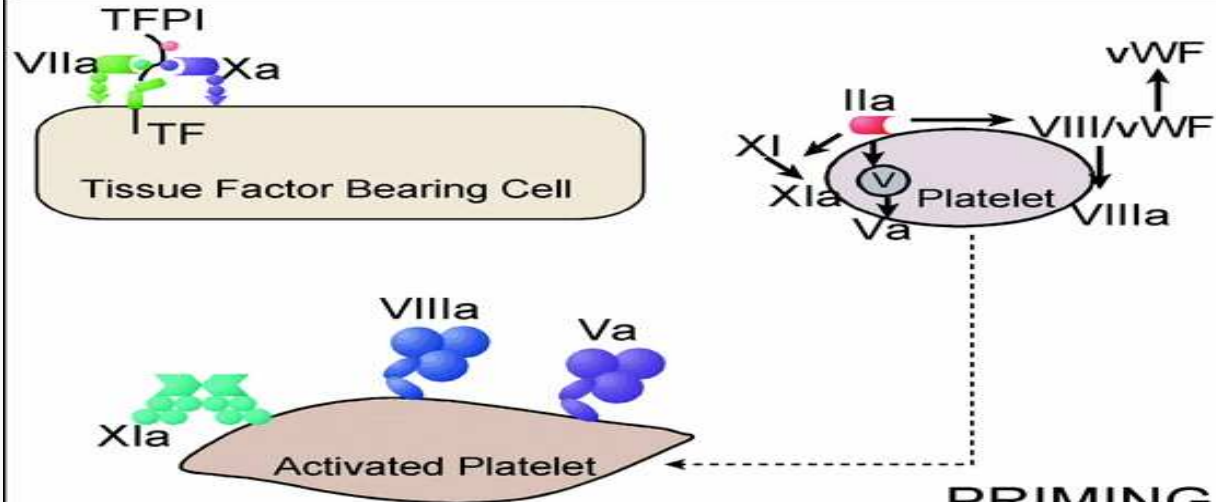
(trombinem aktivovaný inhibitor fybrinolýzy)



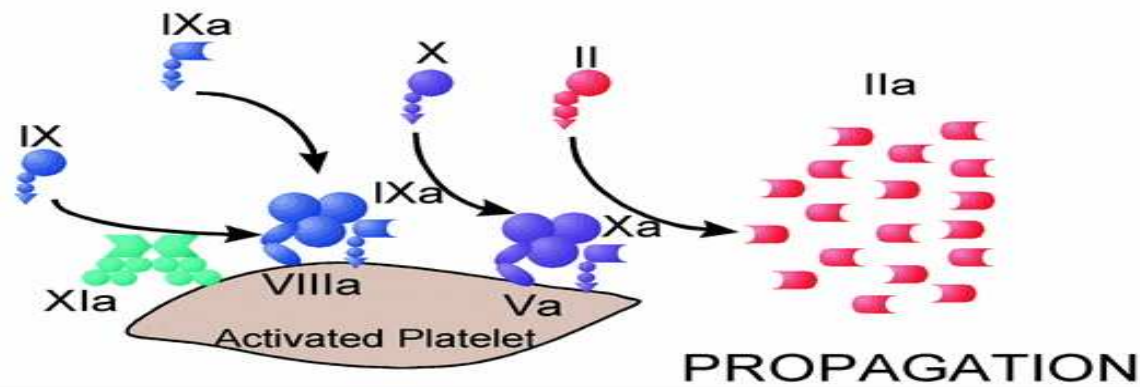




INITIATION



PRIMING

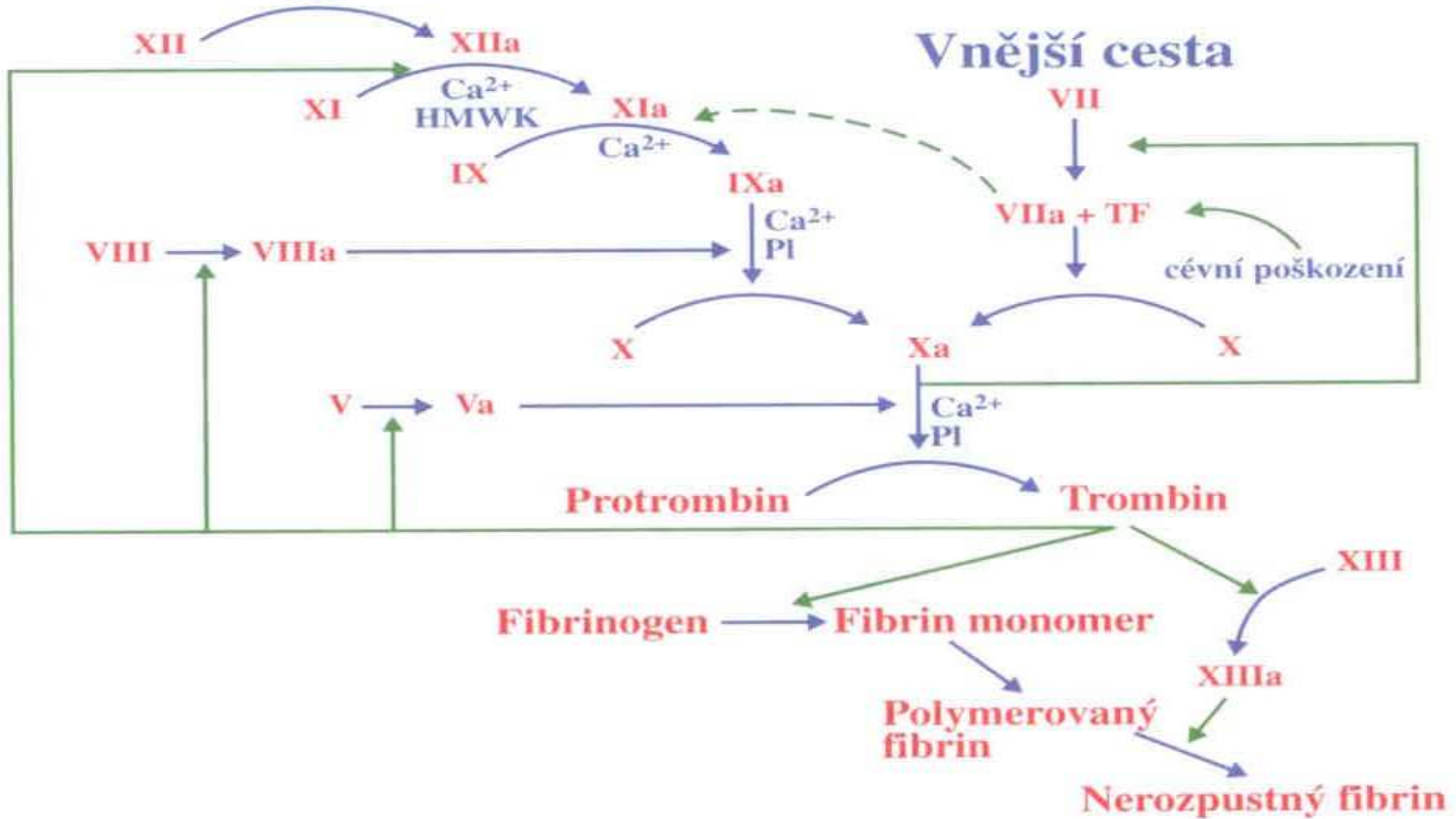


PROPAGATION

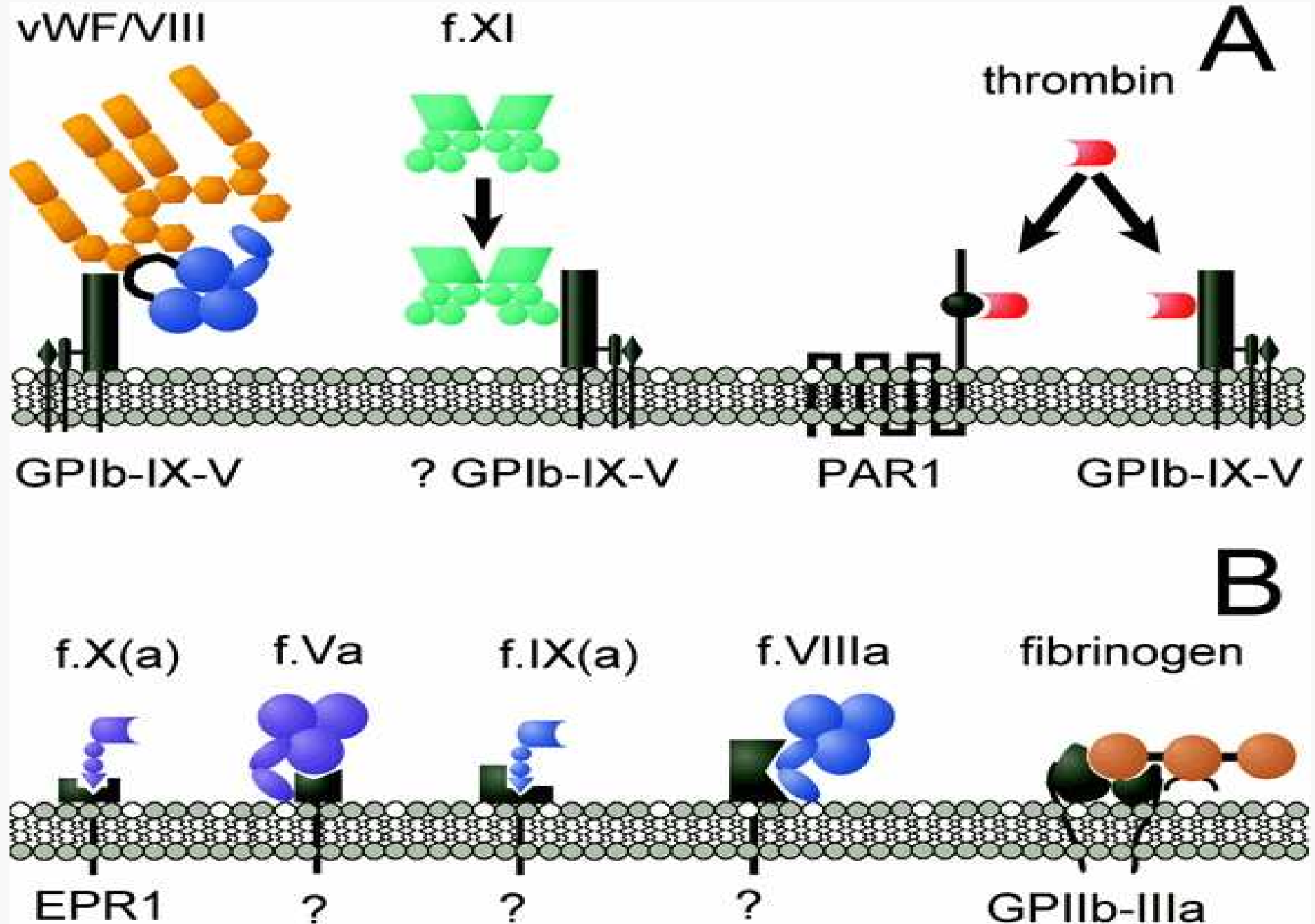
Vnitřní cesta

negativně nabitý povrch
HMWK
PK

Vnější cesta



Vazba koagulačních faktorů na plazmatické membrány



Protease-activated Receptors

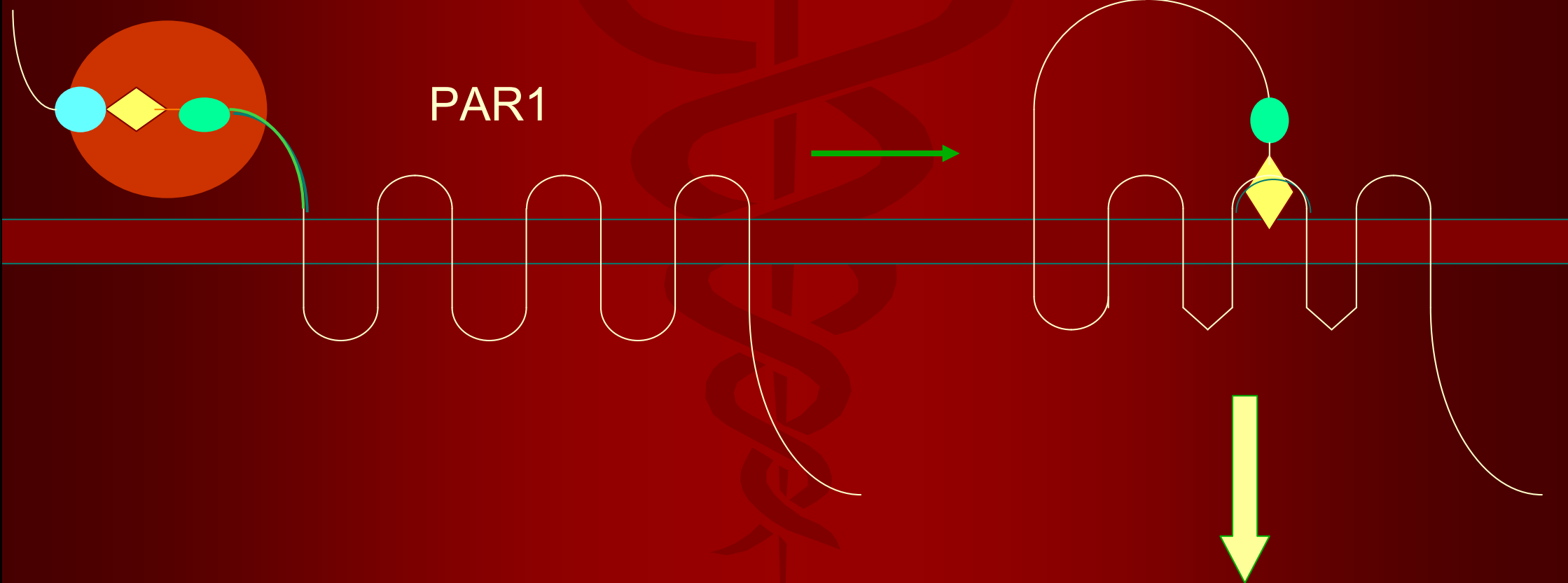
- Receptory spojené s G-proteinem
- Jsou schopné přeměnit EC probíhající proteolytické štěpení v transmembránový signál
- Prototypem skupiny je PAR1
 - ↪ Je aktivován, když trombin odštěpí jeho N-konec
 - ↪ Při této aktivaci se objeví nové N-zakončení, které slouží jako liganda – váže se IC na „tělo“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

PAR

trombin

PAR1

PAR1*



Skupina PAR

Dosud popsány čtyři

➤ PAR1

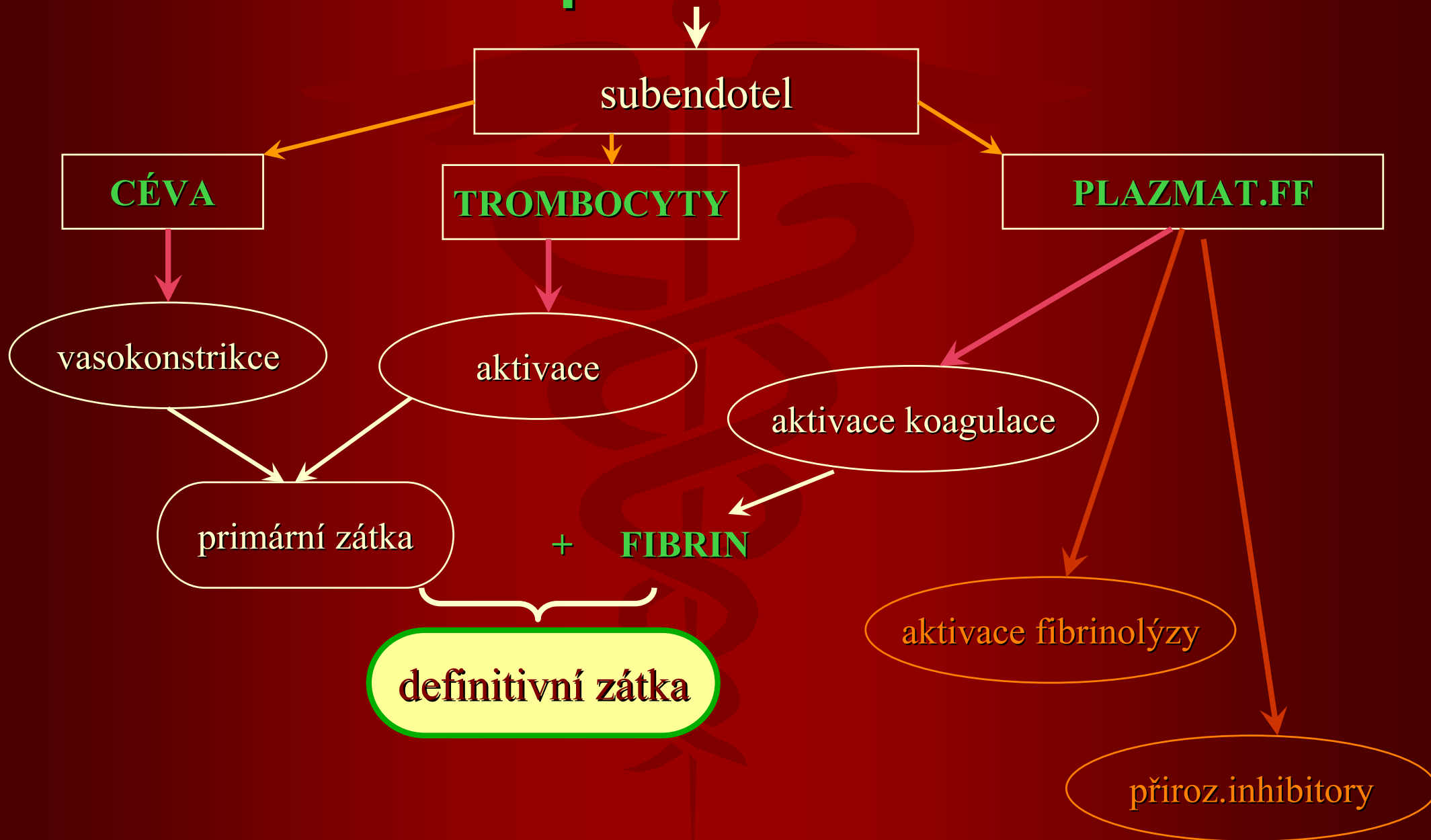
➤ PAR3

➤ PAR4

Aktivovány trombinem

➤ PAR2 je aktivován trypsinem, tryptázou, dále
FVIIa a Xa

Poranění = poškození endotelu



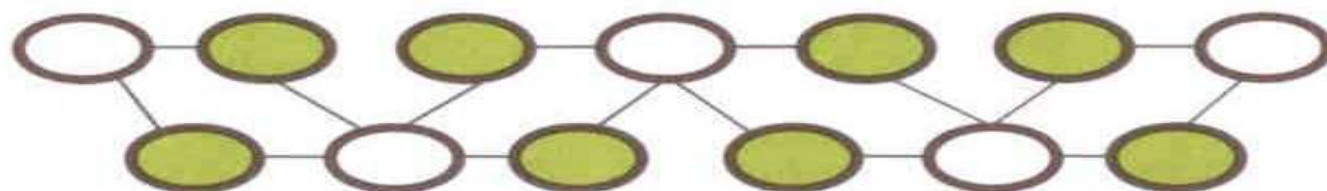
Trombin



FPA ||

|| FPB

Fibrin monomer

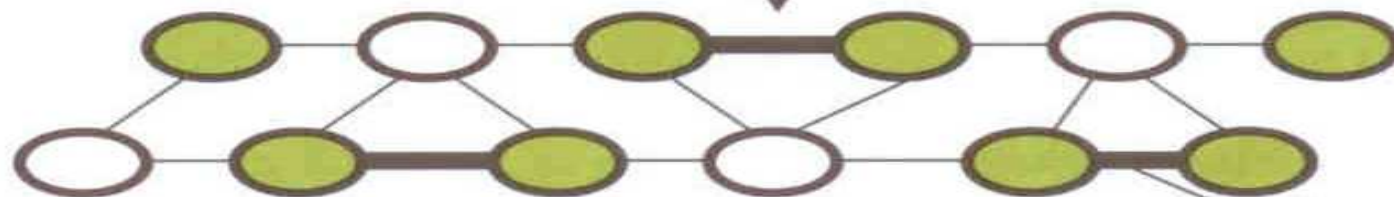


Polymerovaný fibrin

Ca^{2+}



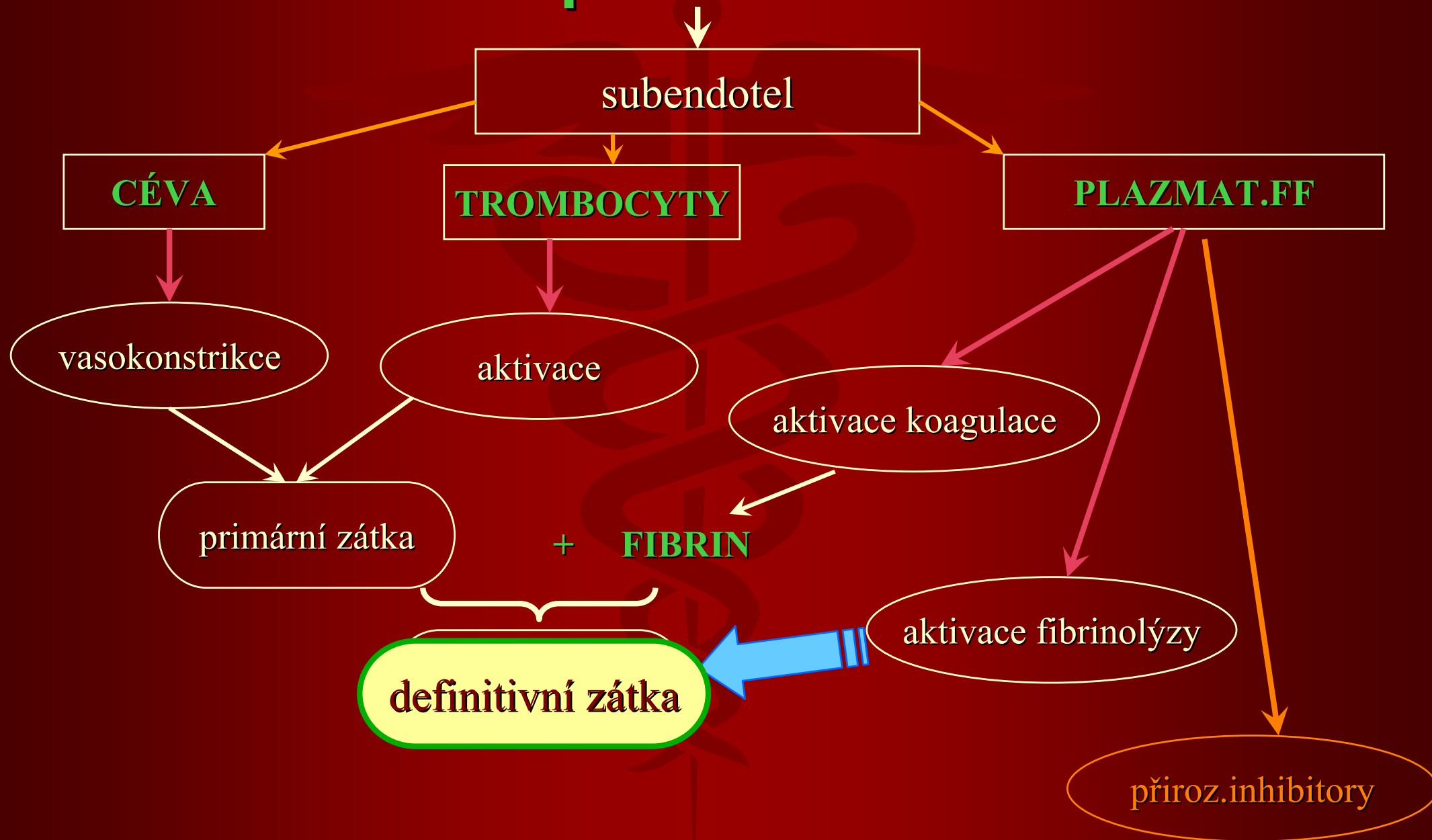
F XIIIa



Nerozpustný fibrin

Kovalentní vazba

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

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

Aktivace fibrinolýzy - přeměna plazminogenu na plazmin

Plazminogen

silné aktivátory

tkáňový aktivátor

plazminogenu - tPA

urokinázový aktivátor

plazminogenu - uPA

slabé aktivátory

kalikrein

fXIIa, f XIa

Plazmin

Fibrinolýza

Vnitřní cesta (krevní)

kalikrein, (FXIIa, FXIa)

Zevní cesta (tkáňová aktivace)

tPA, uPA

C1INH, ATIII

PAI-1, PAI-2

Plazminogen

Plazminogen

PLAZMIN

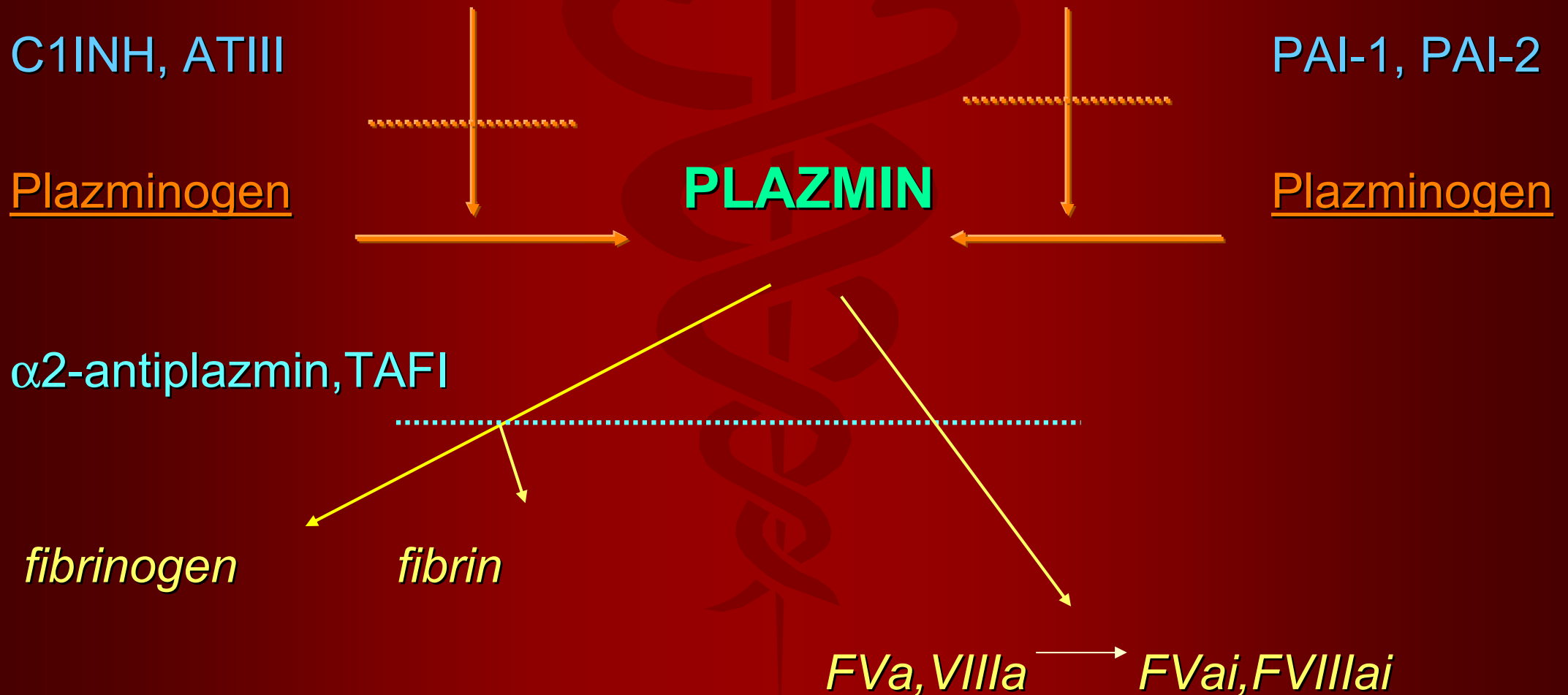
α 2-antiplazmin, TAFI

fibrinogen

fibrin

FVa, VIIIa

FVai, FVIIIai



Aktivace fibrinolýzy

- 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

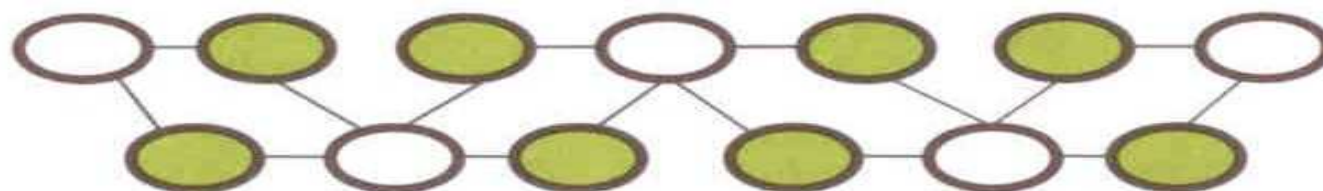
Trombin



FPA

FPB

Fibrin monomer

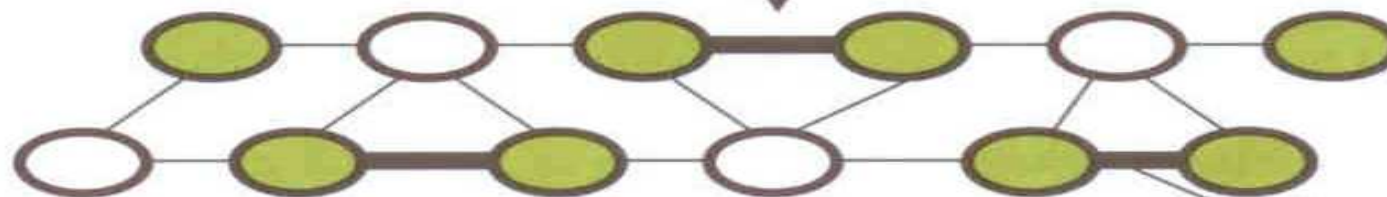


Polymerovaný fibrin

Ca^{2+}



F XIIIa



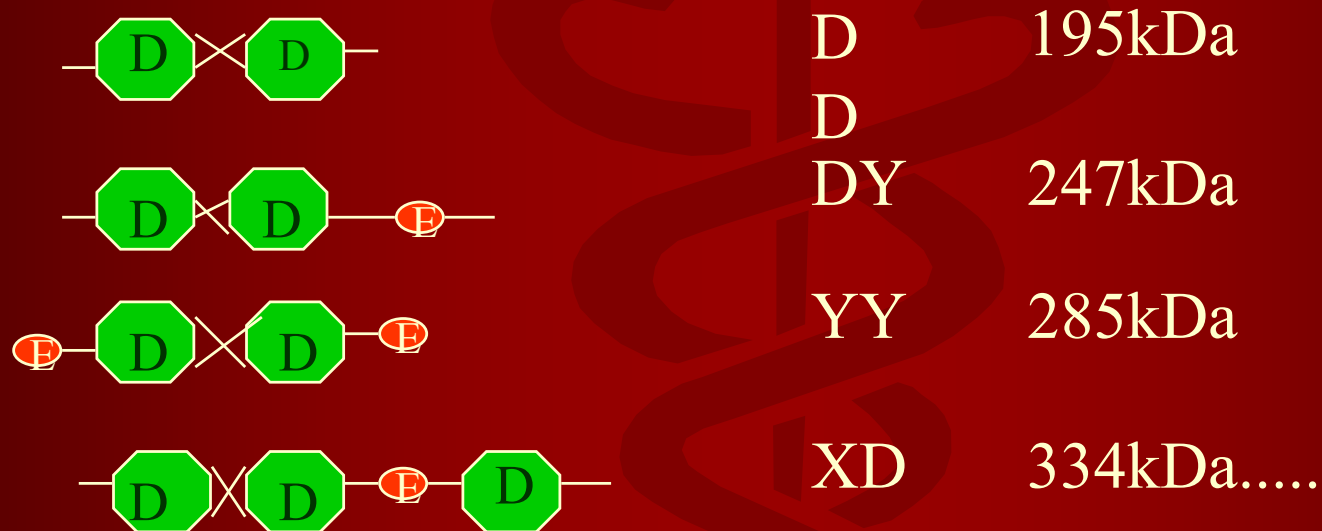
Nerozpustný fibrin

Kovalentní vazba

Štěpení fibrinogenu plazminem



Štěpení fibrinu plazminem



Vznikají fibrin degradační produkty, obsahující zkříženou vazbu

Časným štěpným produktem je peptid Bb-15-42

Inhibitory fibrinolýzy

➤ inhibitory plazminu:

↪ alfa₂-antiplazmin

↪ TAFI - trombin activated fibrinolysis inhibitor

➤ inhibitory aktivátorů plazminu:

↪ PAI-1, PAI-2

↪ PAI-3, proteinase-nexin (jejich 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 -proteinase inhibitor (α_1 -antitrypsin)

antitrombin, C1- esterase inhibitor

➤ jde za fyziologických stavů o slabé inhibitory

Jiné mechanismy inhibice fibrinolýzy

↪ HRGP

↪ vazbou na Fbg a Fbn obsadí vazebná místa pro Plg

↪ Trombospondin

↪ vazbou na Plg obsadí místa pro tPA

↪ Lipoprotein a Lp(a)

↪ vazbou na endotelové receptory Plg sníží koncentraci Pln na endotelu

TAFI

Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor

➤ Funkce:

➤ Odštěpuje z fibrinu lyzinové zbytky

➤ odstraní tak vazebná místa pro plazminogen a t-PA

➤ Uvolňuje PAI-1 z trombocytů

➤ Syntetizován v játrech

➤ Glykoprotein – mol. hmotnost 55 kDa

➤ Metalokarboxypeptidáza - obsahuje zinkové ionty

➤ Předpokládá se, že TAFI koluje v plazmě v komplexu s plazminogenem

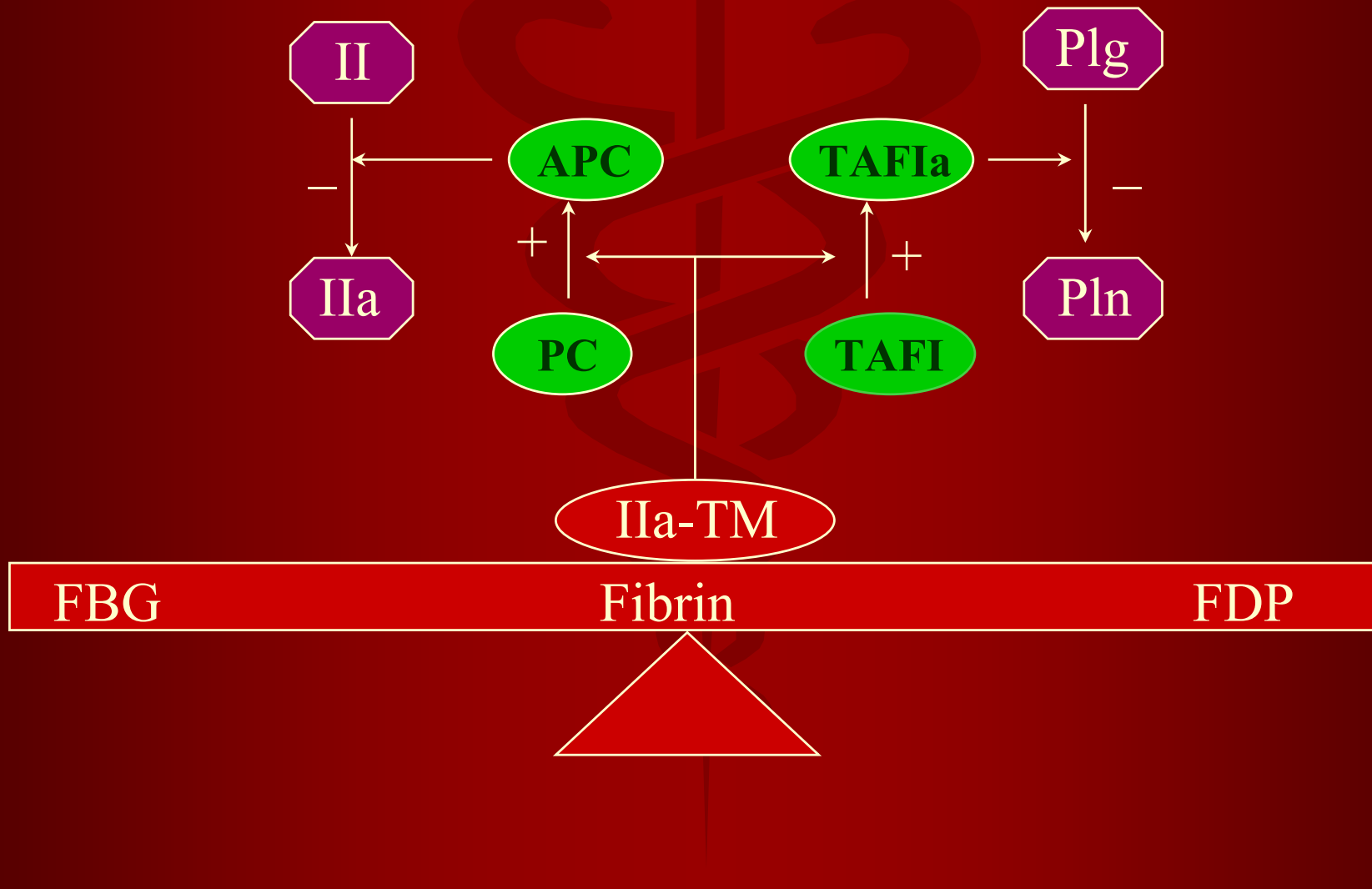
Aktivace TAFI

- 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

- TM hraje v koagulaci dvojí roli
 - ↳ V komplexu s IIa aktivuje PC na APC
 - důležitá je přítomnost 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

Vztah koagulace a fibrinolýzy

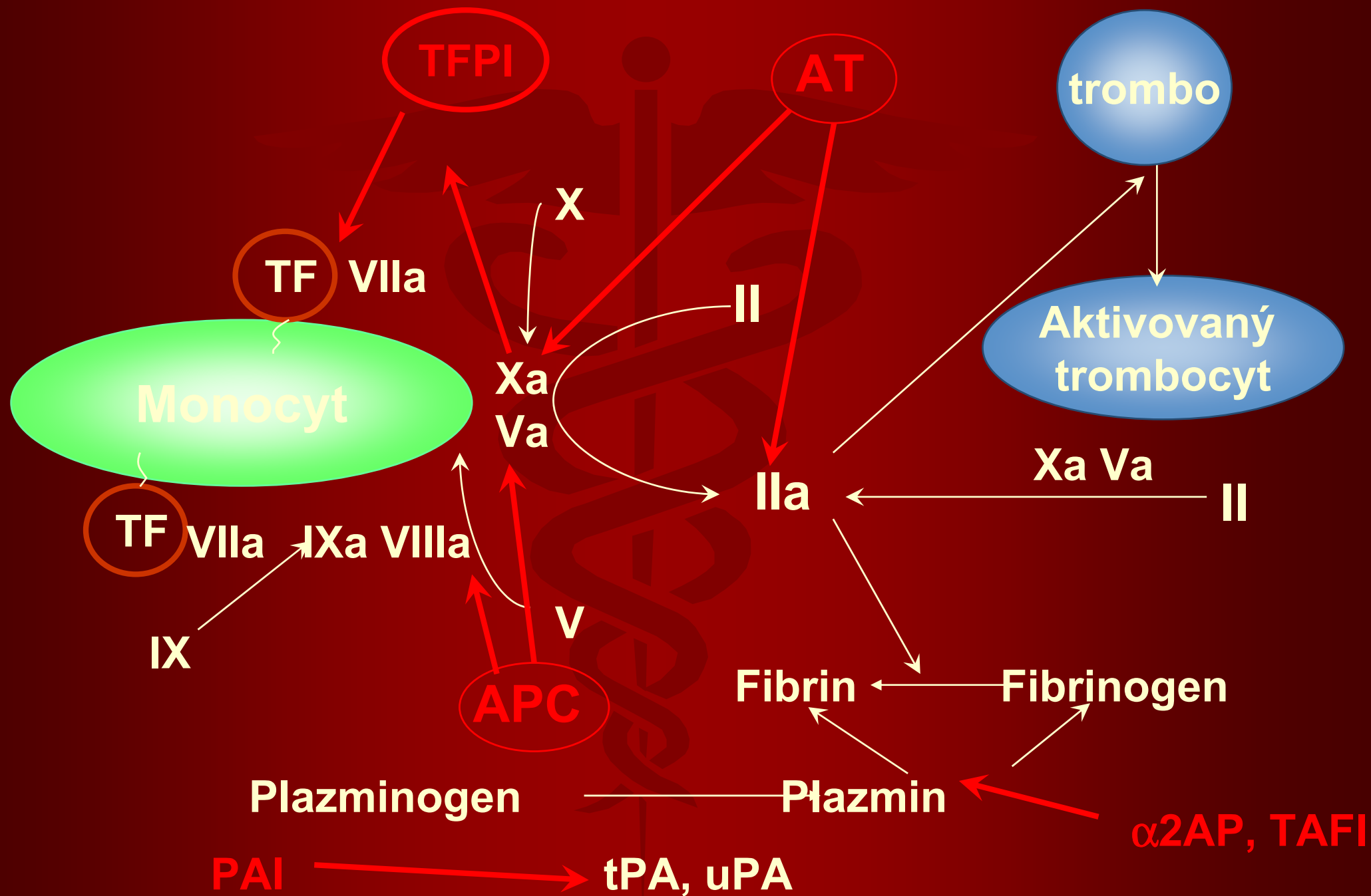


Fibrinolýza a koagulace

- 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

Přirozené inhibitory koagulace

- **serpiny**
 - 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
- **kuniny – TFPI (TF/FVIIa/FXa)**
- **nespecifické inhibitory:**
 - alfa2 MG (IIa, kalikrein, plazmin)



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

Antitrombin

- Přirozeně se vyskytující inhibitor proteáz
- strukturální a funkční podobnost s ostatními proteiny zahrnovanými do skupiny SERPINů
- **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** 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

Rozdíl mechanismu reakce AT III s UFH a LMWH

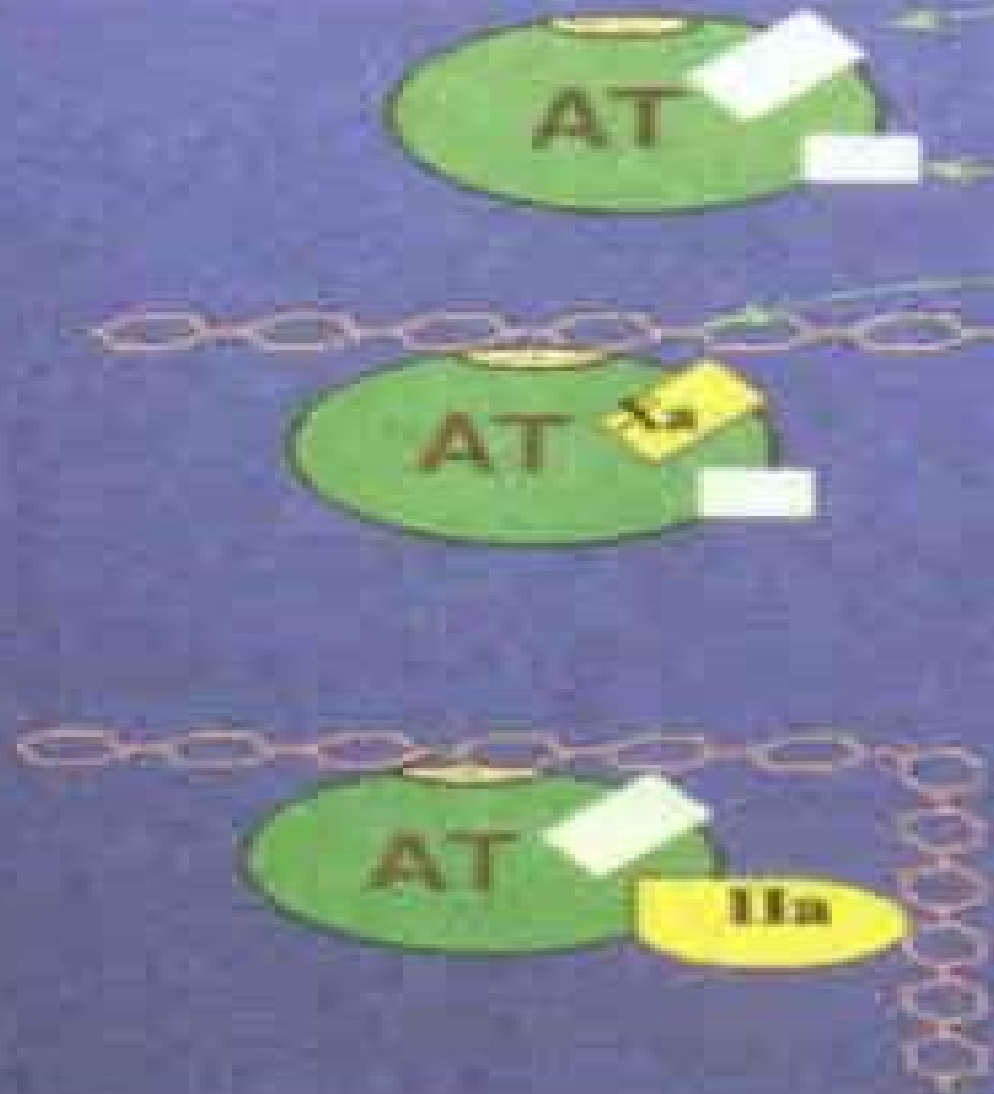
Místo pro navázání heparinu

vazebné místo pro F Xa

vazebné místo pro F IIa

Heparin LMWH

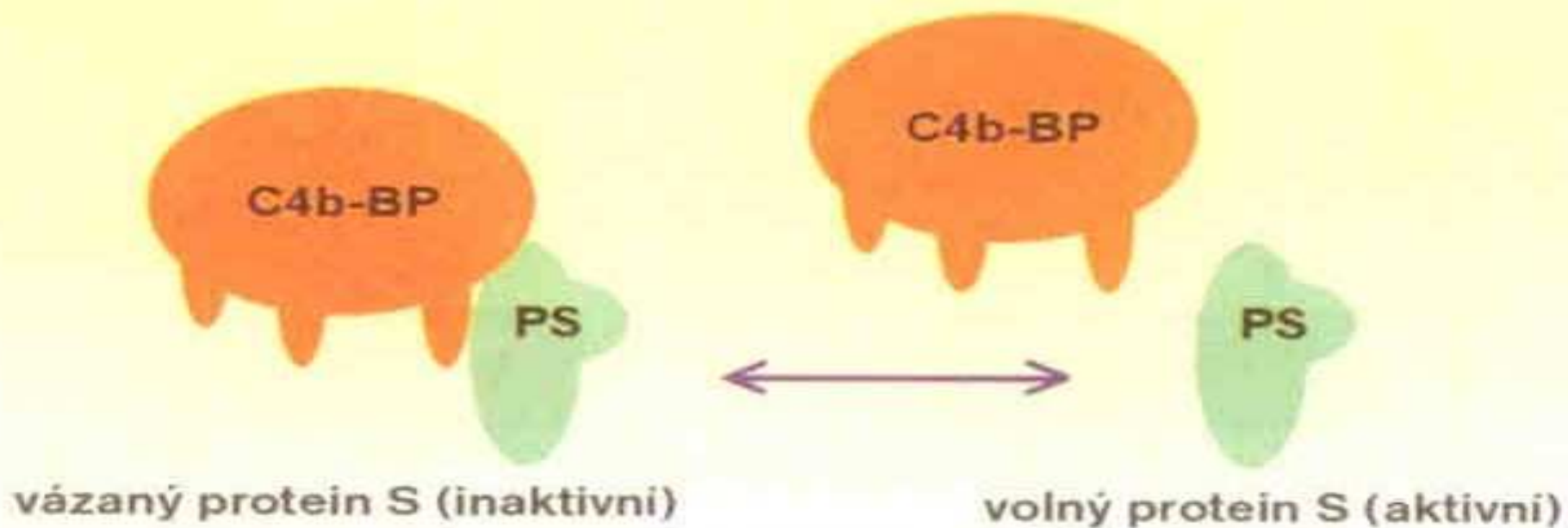
Heparin



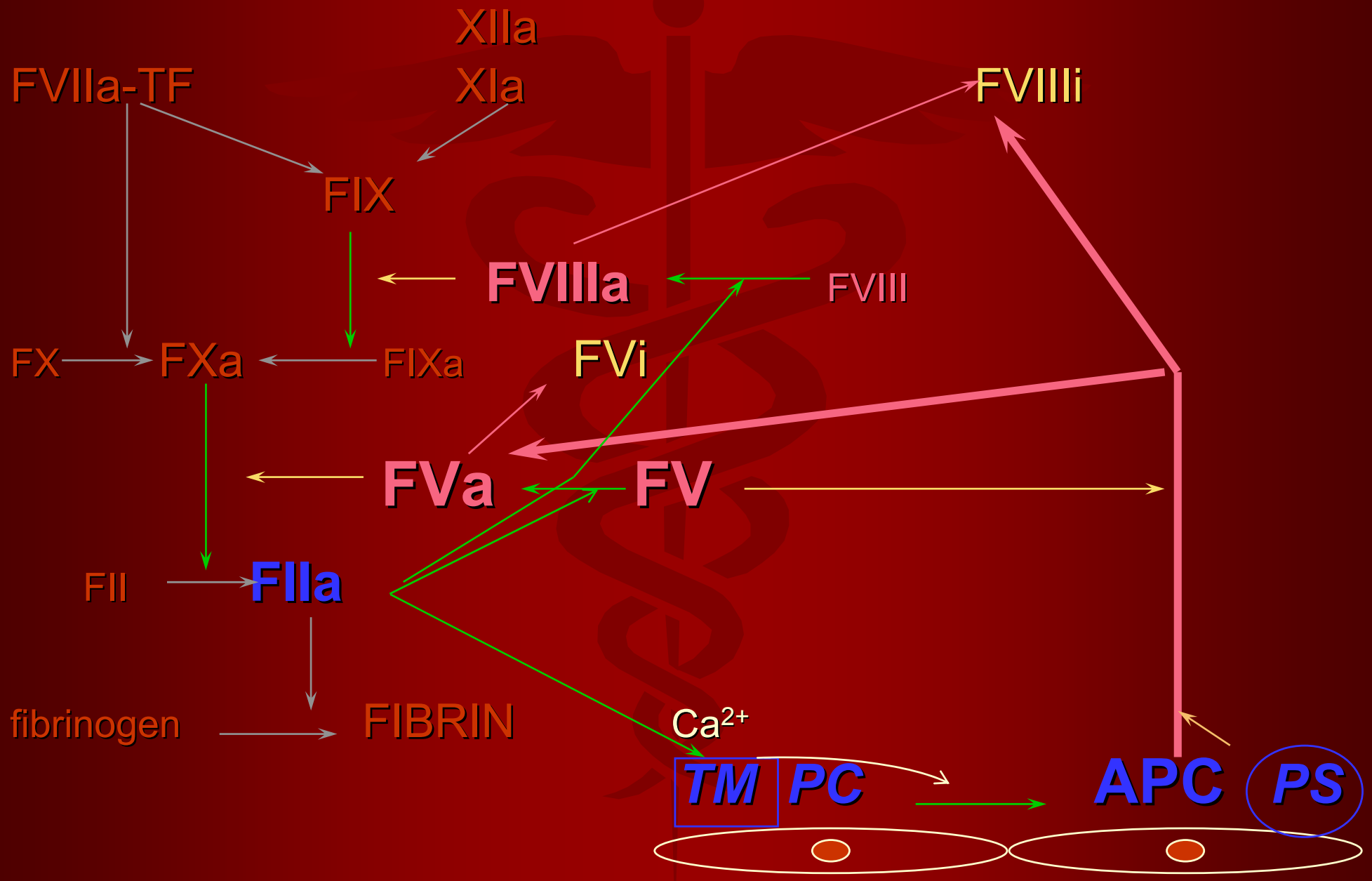
Antitrombin

- 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



Trombomodulin

- transmembránový protein
- v komplexu s trombinem aktivuje PC
- v komplexu s trombinem aktivuje TAFI
(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)
- urychluje inhibici trombinu antitrombinem
- homozygotní defekt vede u myši k úmrtí
embrya

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

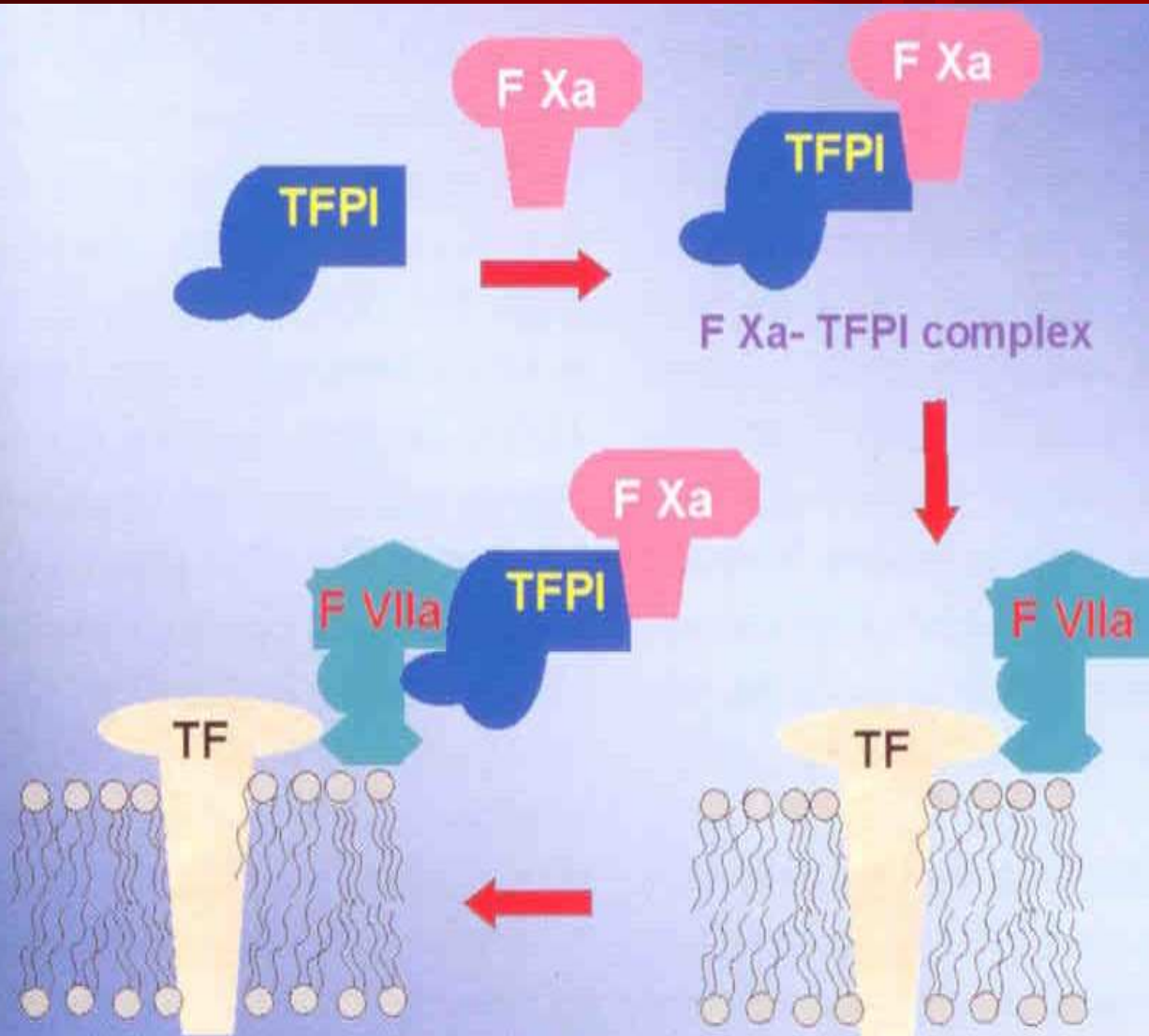
- transmembránový protein typu 1
- homologní s HLA 1.třídou/CD1 - buňky zahrnutý v imunitní odpovědi
- zvyšuje aktivaci PC na endotelu
- snižuje antikoagulační působení APC
- zdá se, že je ovlivňován trombinem

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



tvořen:

- v endotelu

uvolňuje:

- současně s TF

- heparin

Poranění = poškození endotelu

