

HEMOSTÁZA (zástava krvácení)

= soubor mechanismů, které na jedné straně brání vzniku krvácení, na straně druhé staví krvácení již vzniklé

- Reakce cév v místě poranění
- Reakce tkáně v místě poranění – zvýšený tlak tkáně
- Činnost krevních destiček
- Srážení krve

HEMOSTÁZA jako součást homeostázy

Dokonalá rovnováha několika systémů:

- endotel cévní stěny
- kolagen ležící pod endotelem
- tonus cév
- počet a kvalita krevních destiček
- srážlivé a fibrinolytické systémy
- charakter proudění v cévě

brání jak *krvácení*, tak *intravaskulárnímu srážení* krve

REAKCE CÉV

Vasokonstrikce.

Stupeň vasokonstrikce závisí na stupni poškození cévy.

Serotonin a tromboxan A_2 z destičkových granul.

Adrenalin.

Trombin – stimulace endotelu a sekrece endotelinu-1.

KREVNÍ DESTIČKY (TROMBOCYTY)

Bezjaderné, bezbarvé, granulované, nejmenší formované elementy krevní.

Vznik: megakaryocyty kostní dřeně pod vlivem kolonie stimulujících faktorů – interleukinů (*IL-1, IL-3, IL-6*) a granulocyty a makrofágy stimulujícího faktoru (*GM-CSF*)

Počet: 200 000 – 500 000 v ml, z toho třetina ve slezině a dvě třetiny v cirkulaci

Žádné věkové ani pohlavní rozdíly v počtu.

Trombocytoza – po splenektomii.

Velikost: 2 – 4 μm průměr, 0,5 – 1 μm tloušťka, 4 – 8 fl
objem

Tvar: hladké, okrouhlé disky

Tvar udržován cytoskeletem - prstenec mikrotubulů kolem periferie, silně invaginovaná membrána, kanalikulární systém spojený s extracelulárním prostorem.

Membrána: obsahuje receptory pro přilnutí na vhodné povrchy, např. kolagen, von Willebrandův faktor, fibrinogen

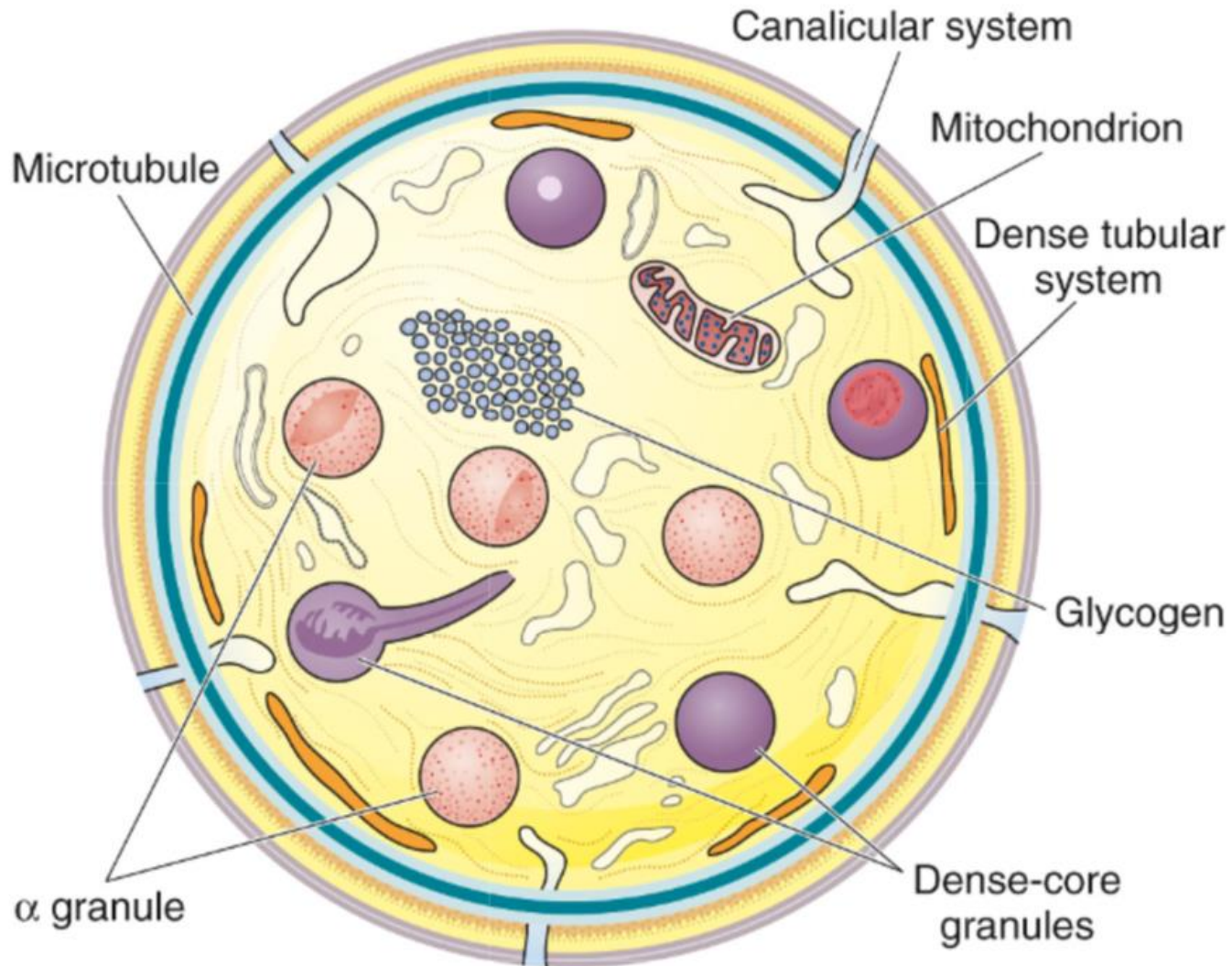
Cytoplasma: obsahuje aktin, myosin, glykogen, lysozomy a

Granula:

denzní granula (neproteinové substance – serotonin, ADP, adenonukleotidy) a *α granula* (proteinový obsah: faktory srážení, destičkový růstový faktor – PDGF)

Glykokalyx: 10 – 50 nm, směs bílkovin a mukopolysacharidů (faktory systému srážení, ionty, AMK, histamin, léky...)

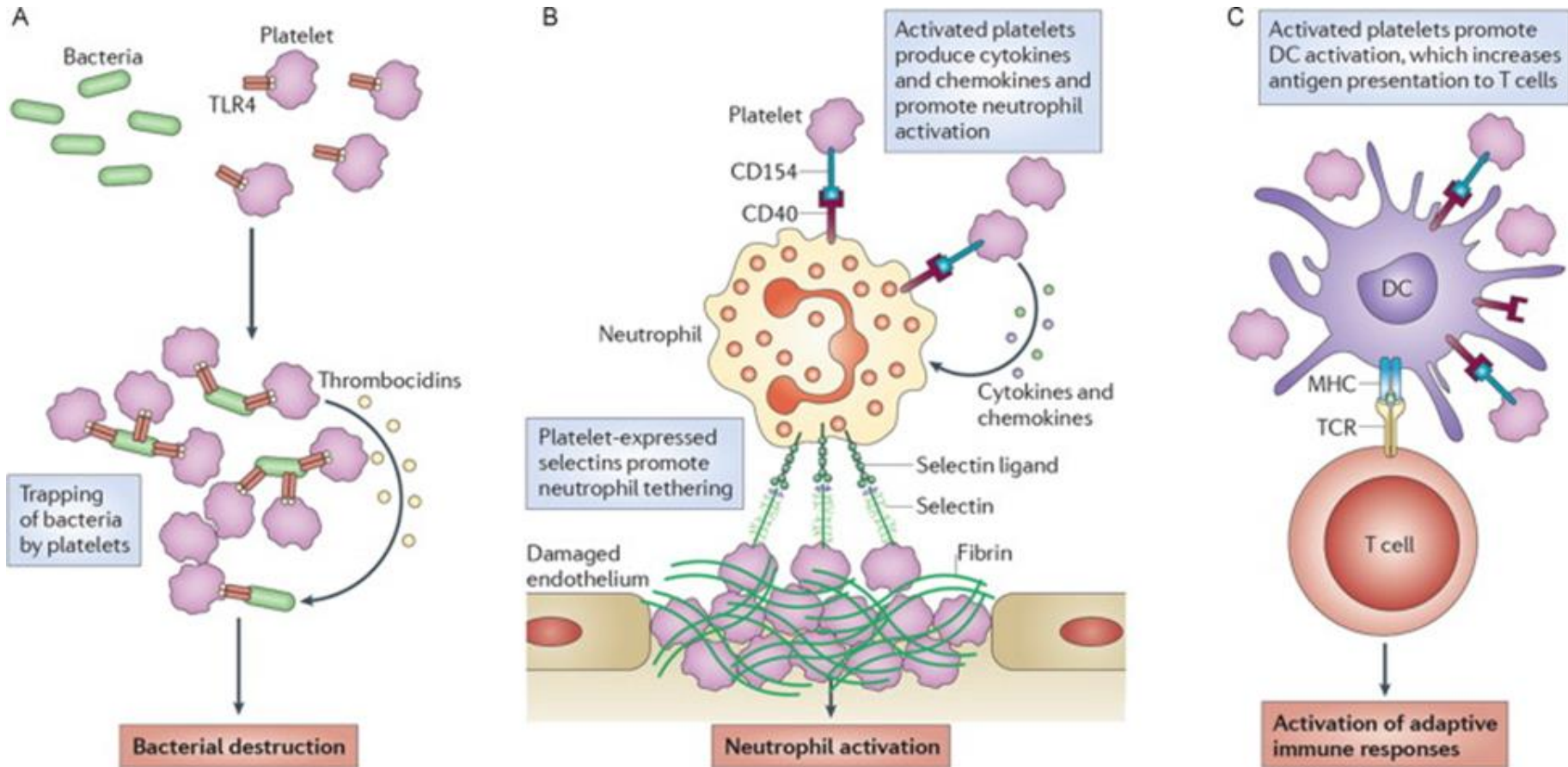
Stavba trombocytů



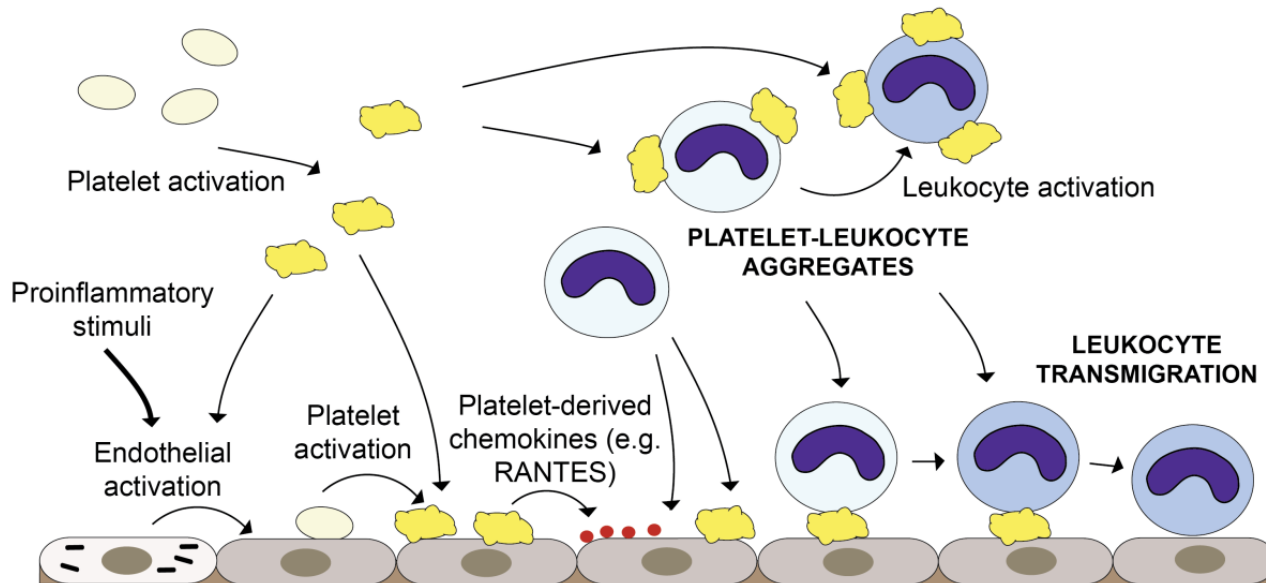
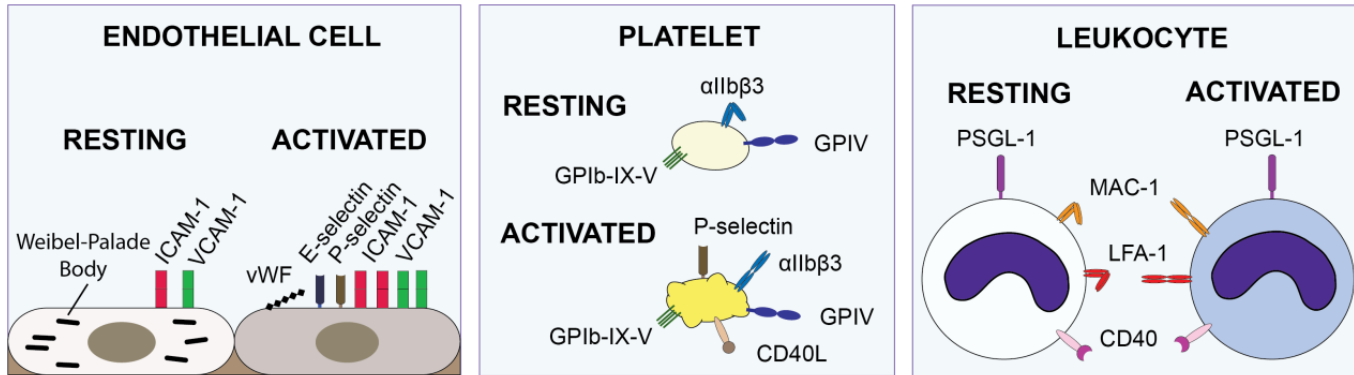
Funkce destiček

- Ochrana organismu před ztrátou krve
- Udržování integrity cévní stěny a hojení poranění cév (destičkový růstový faktor z α -granul)
- Zánětlivé reakce, změny permeability kapilár, odstraňování cizorodých látek, virů, bakterií, odvržení transplantátu...
- Nosič pro různé látky absorbované na povrch destiček

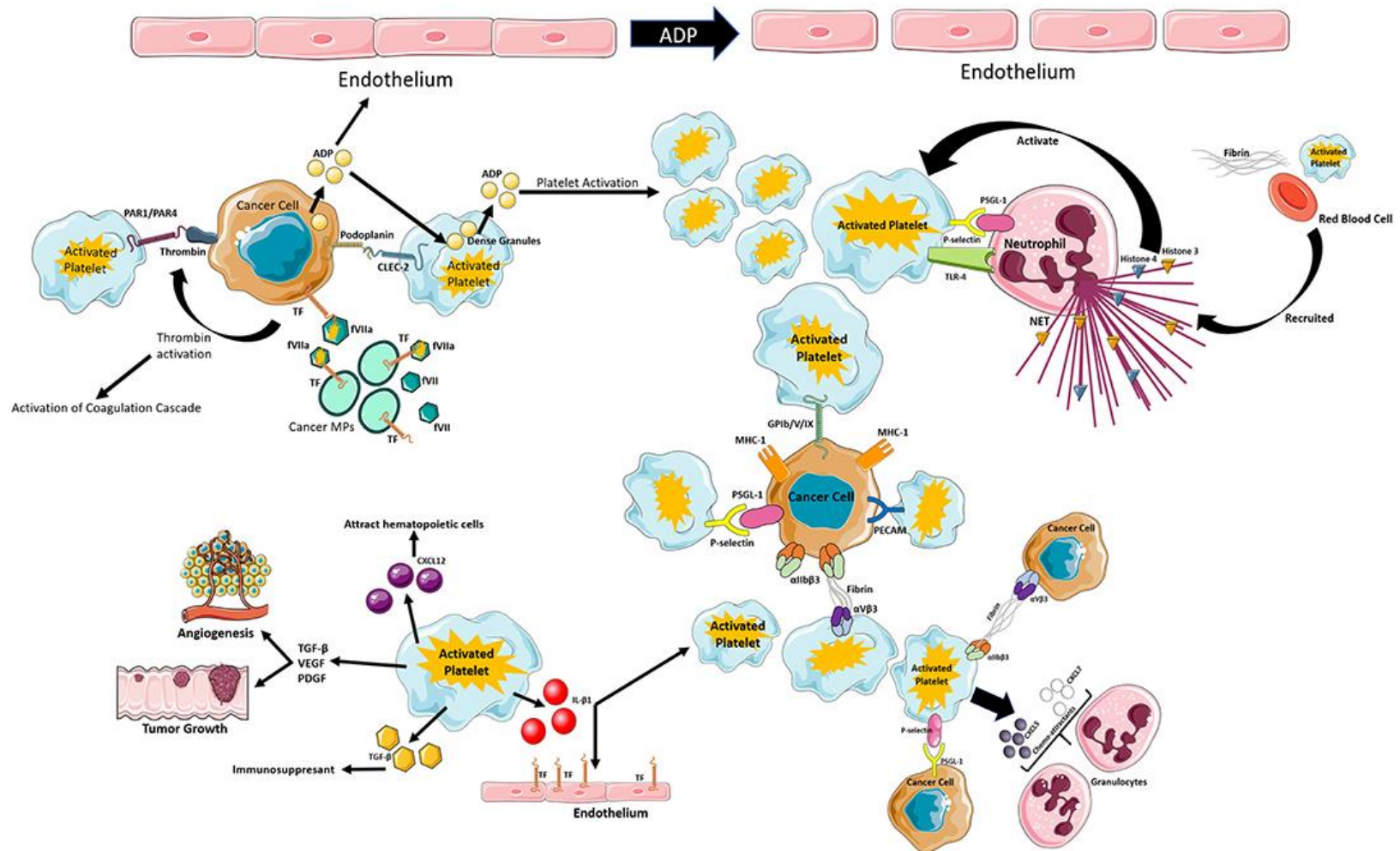
Trombocyty a imunita



Trombocyty a zánět



Trombocyty a nádorové buňky



<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01805/full>

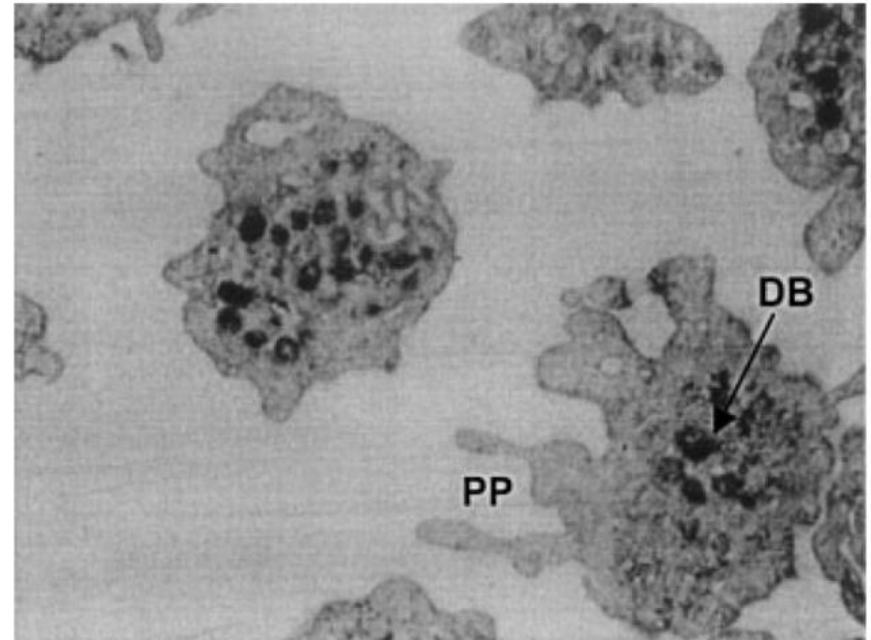
Trombocyty v hemostáze

Adheze

- Negativní náboj na povrchu trombocytů a endotelu (proteoglykany, heparan sulfát)
- Obnažení cévní stěny – kolagen a proteiny extracelulární matrix
- Receptory pro kolagen a další na trombocytu (integriny)
- von Willebrandův faktor (endotel, megakaryocyty, trombocyty) a jeho sekrece pod vlivem cytokinů a hypoxie - vazba na GP Ib/Ia
- Kolagen – Gp Ia/Iia
- Fibronektin, laminin – Gp Ic/Iia

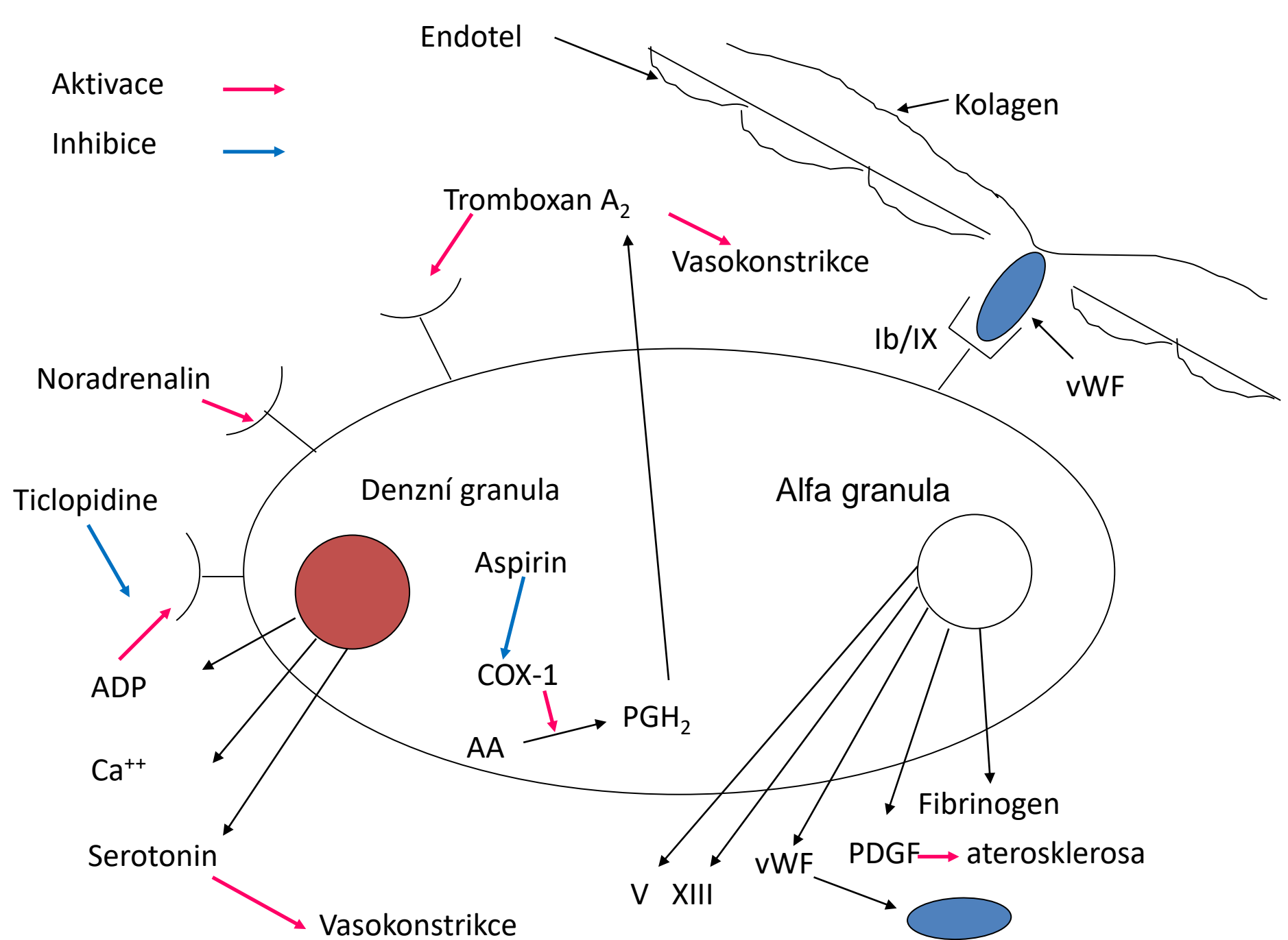
Aktivace a změna tvaru, degranulace

- Vazba ligandů (kolagen, ADP, trombin) na příslušné receptory
- Iniciací signálních kaskád a buněčné odpovědi – aktivace trombocytů
- Následná degranulace trombocytů (exocytóza)
 - Densní granula - ATP, ADP, serotonin, Ca^{2+}
 - α granula – vWF, faktor V, fibrinogen
- Aktivace COX a uvolnění tromboxanu A_2
- Změny cytoskeletu a tvaru trombocytů



A

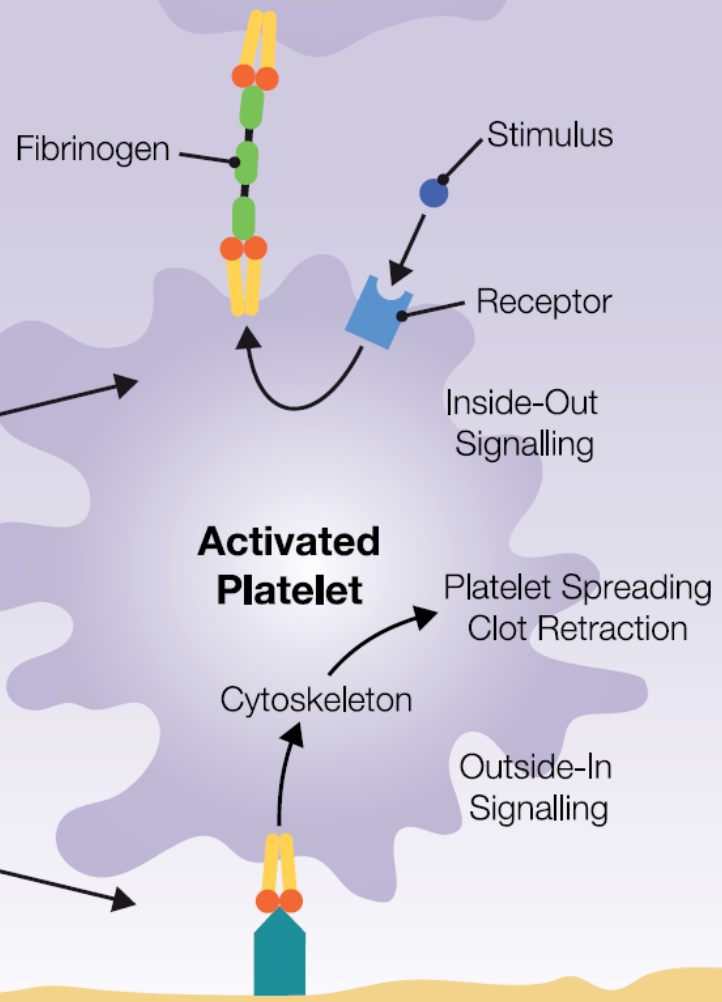
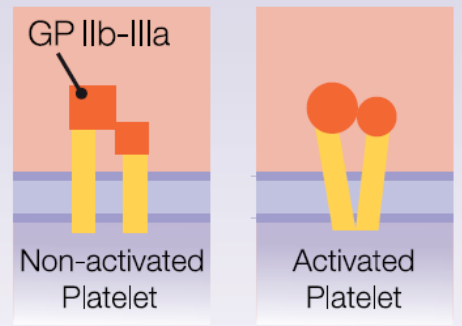
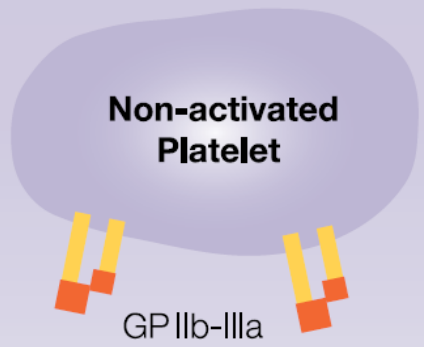
B



Agregace

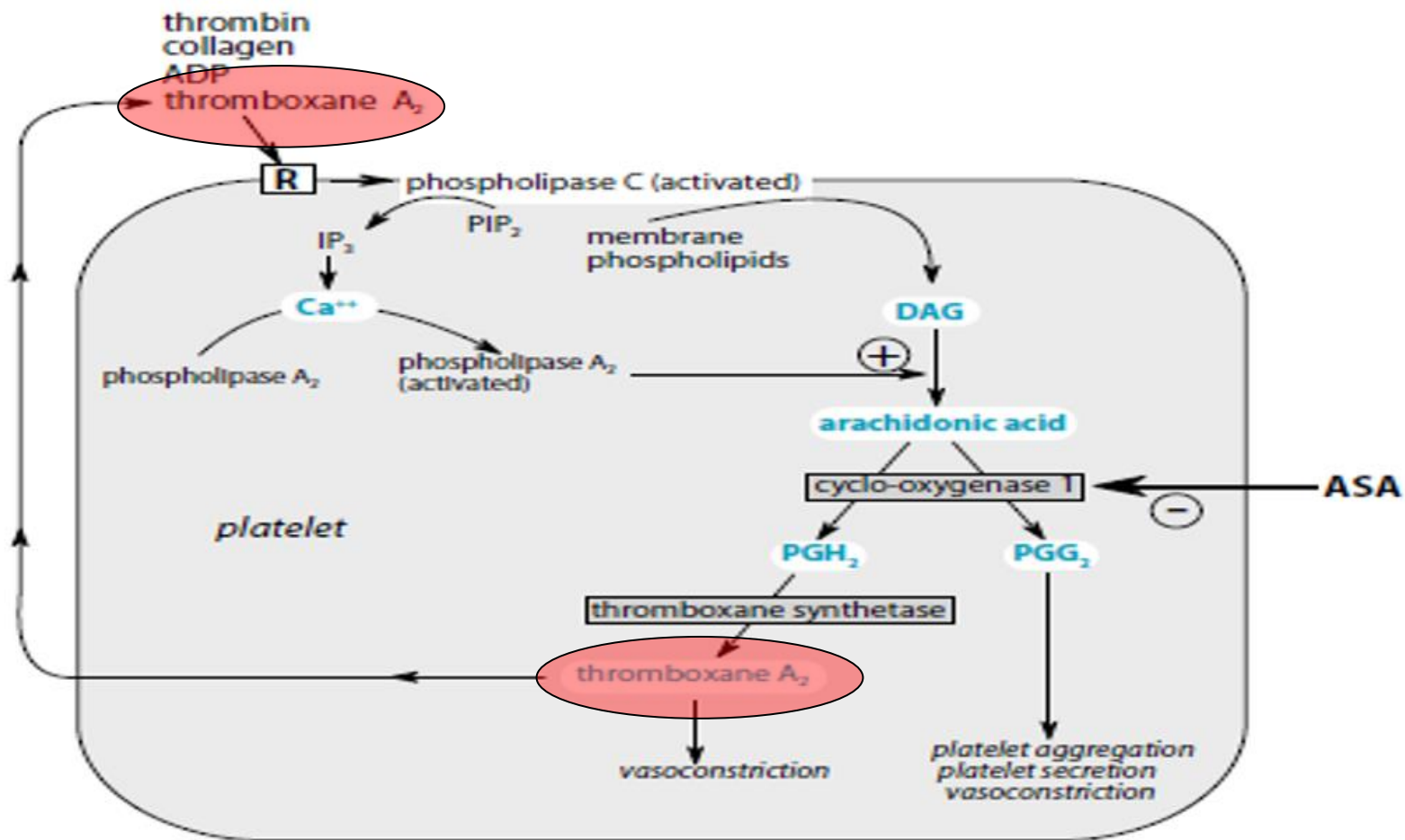
- Amplifikace odpovědi po vazbě ligandů – nábor dalších trombocytů
- ADP (P2Y₁₂ receptory), serotonin, tromboxan A₂
- Uvolněný vWF se váže na příslušné receptory – nábor dalších trombocytů a „vazba“ mezi trombocyty
- Konformační změna receptoru Gp IIb/IIIa – vazba **fibrinogenu**
- Formace trombu
- Závěrečná fáze - obnažení a uvolnění fosfolipidů (serotonin, TXA₂) a za přítomnosti vápenatých iontů (uvolněných z trombocytů) dochází k *aktivaci* koagulační kaskády

Aggregation



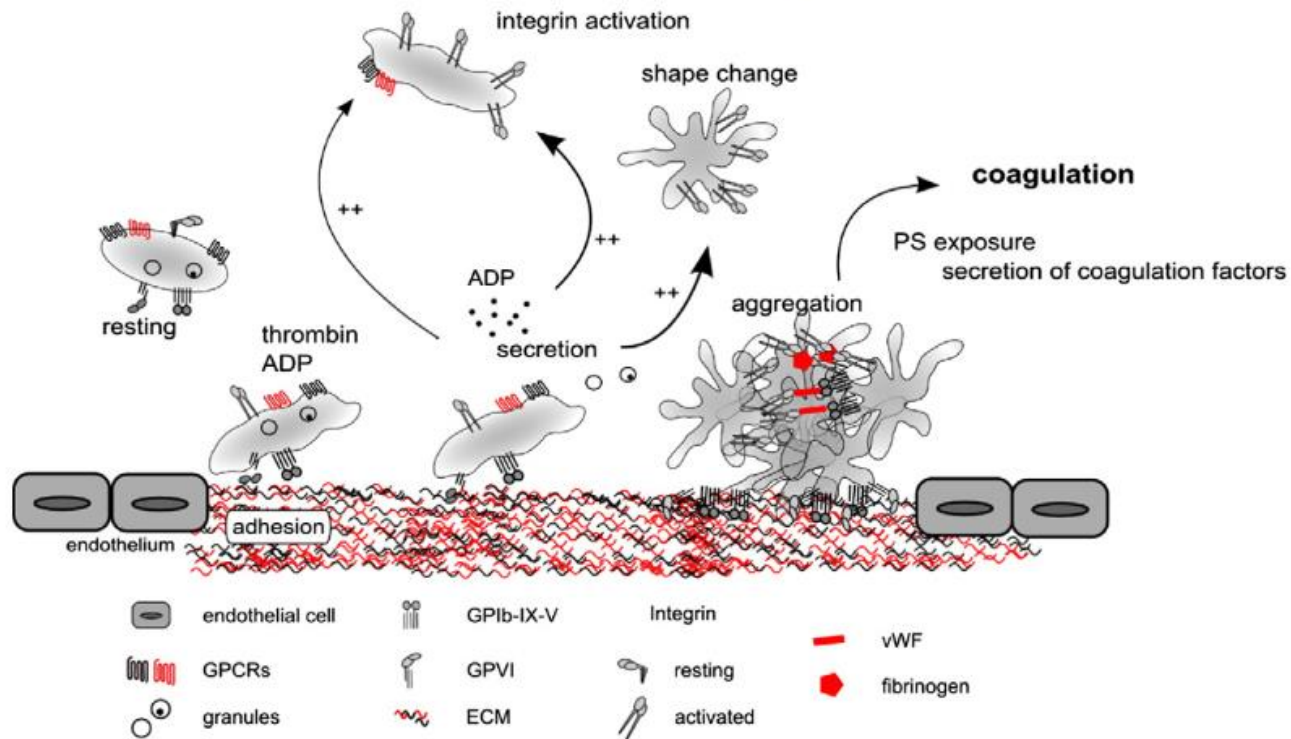
Subendothelial Matrix





Trombocyty - souhrn

E.M. Golebiewska, A.W. Poole / Blood Reviews 29 (2015) 153–162



Hemostáza - hemokoagulace

V klasickém pojetí se tvorba červeného trombu sestává ze dvou systémů - **Vnitřní** systém – **vnější** systém aktivace faktoru X.

Vnitřní – kontakt krve s negativně nabitým povrchem – **povrch trombocytů**

Vnější – kontakt s *poškozenými* buněčnými membránami – **membránově vázaný tkáňový faktor**

Následuje aktivace faktorů – kaskáda dějů – často zymogeny, aktivované faktory – serinové proteázy = **kontrolovaná proteolýza**

Finálními kroky jsou aktivace společného systému, vznik trombinu a polymerního fibrinu.

Protrombin (faktor X) – trombin

- sled enzymových reakcí
- anionické fosfolipidy (membrány trombocytů), vápenaté ionty

Fibrinogen – fibrin monomer – fibrin polymer (stabilizace, faktor III, Ca^{2+}).

Prokoagulační faktory

Faktor	Název faktoru	Biologický poločas (h)
I	fibrinogen	120-144
II	protrombin	48
III	tromboplastin, trombokináza	velmi krátký
IV	ionty vápníku	
V	proakcelerin	12-15
VII	(AHF) prokonvertin, stabilní f.	2-5
VIII	antihemofilní faktor A, a. globulin	5-12
IX	Christmas faktor, antihem. f. B	12-30
X	Stuart-Prower faktor	32
XI	antihemofilický f. C, PTA	méně než 12
XII	Hageman faktor	méně než 12
XIII	f. stabilizující fibrin	48-72
HMW-K	Fitzgerald f. (vysokomolekulární kininogen)	
Pre-K	prekallikrein	
Ka	kallikrein	
PL	destičkové fosfolipidy	

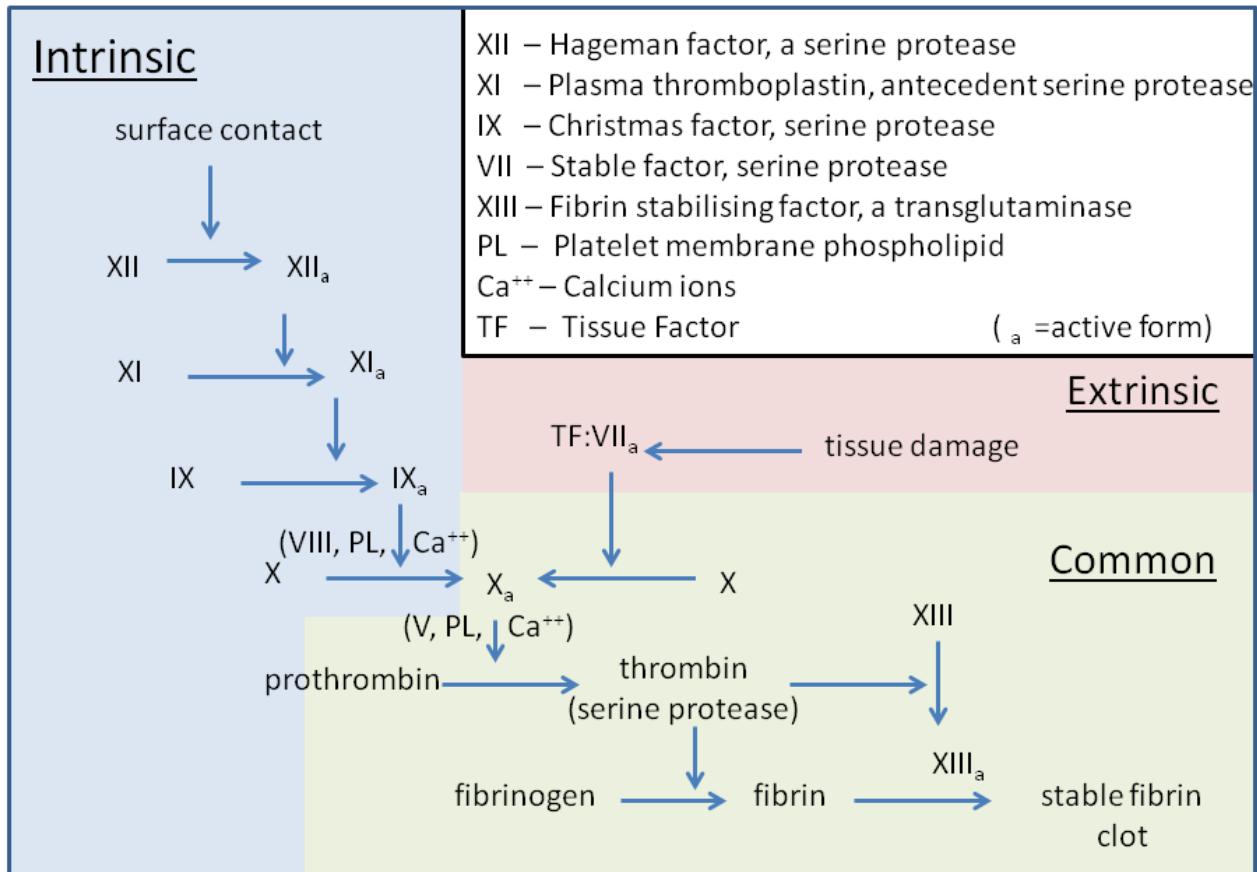
Proteiny koagulační kaskády mají typickou doménovou strukturu.

- Signální peptid
- Propeptid
- EGF-like doména
- Kringle (smyčka) doména
- Katalytická doména

Propeptidová doména je bohatá na zbytky kyseliny glutamové – γ -karboxylace (vitamín K) a vazba vápenatých iontů

II, VII, IX, X, protein C, protein S = vitamín K dependentní

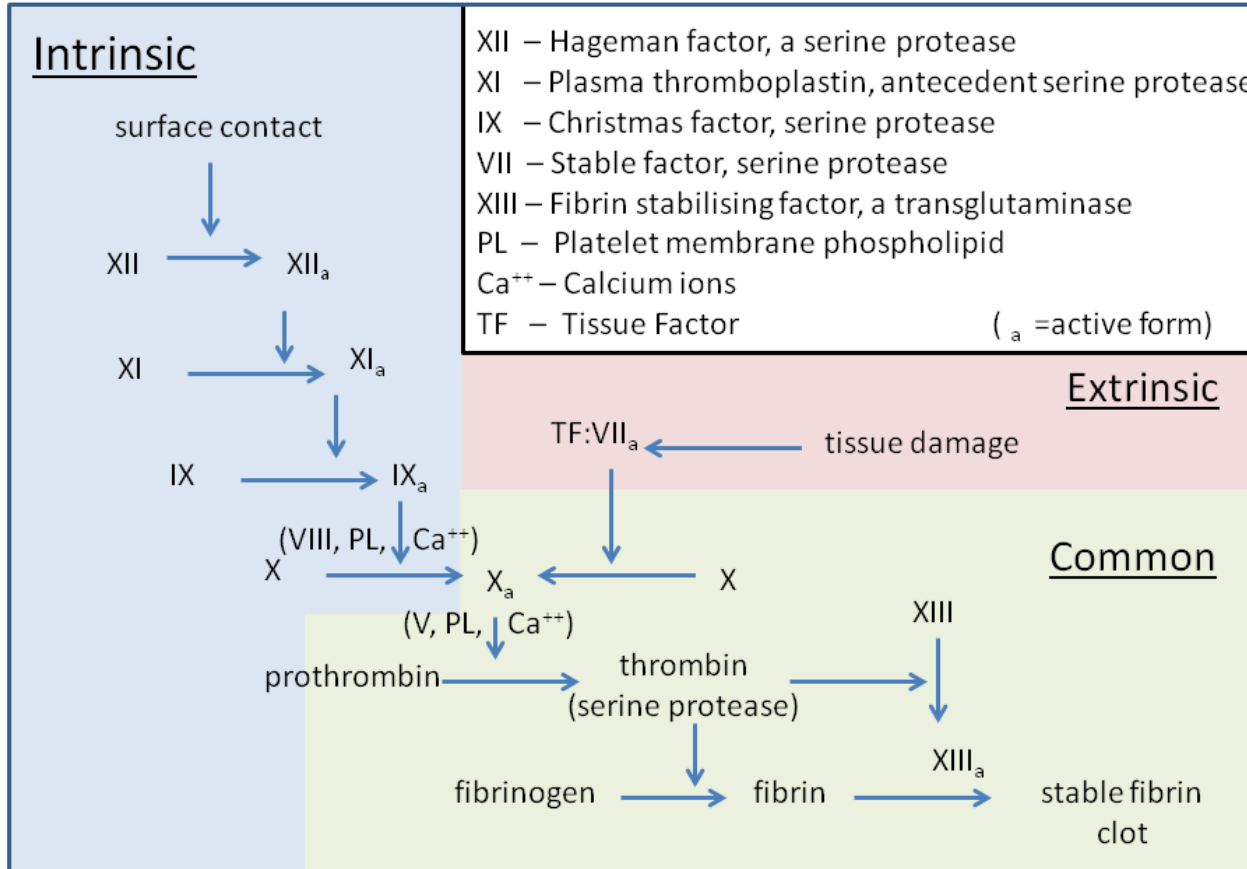
Vnitřní cesta



- Faktory IXa, Xa a trombin proteolyticky štěpí faktor VIII za vzniku VIIIa, který je kofaktorem další reakce.
- VIIIa spolu s IXa, vápenatými ionty (z destiček) a negativně nabitými fosfolipidy vytváří trimolekulární komplex **tenázu**.
- Tenáza konvertuje faktor X na Xa.

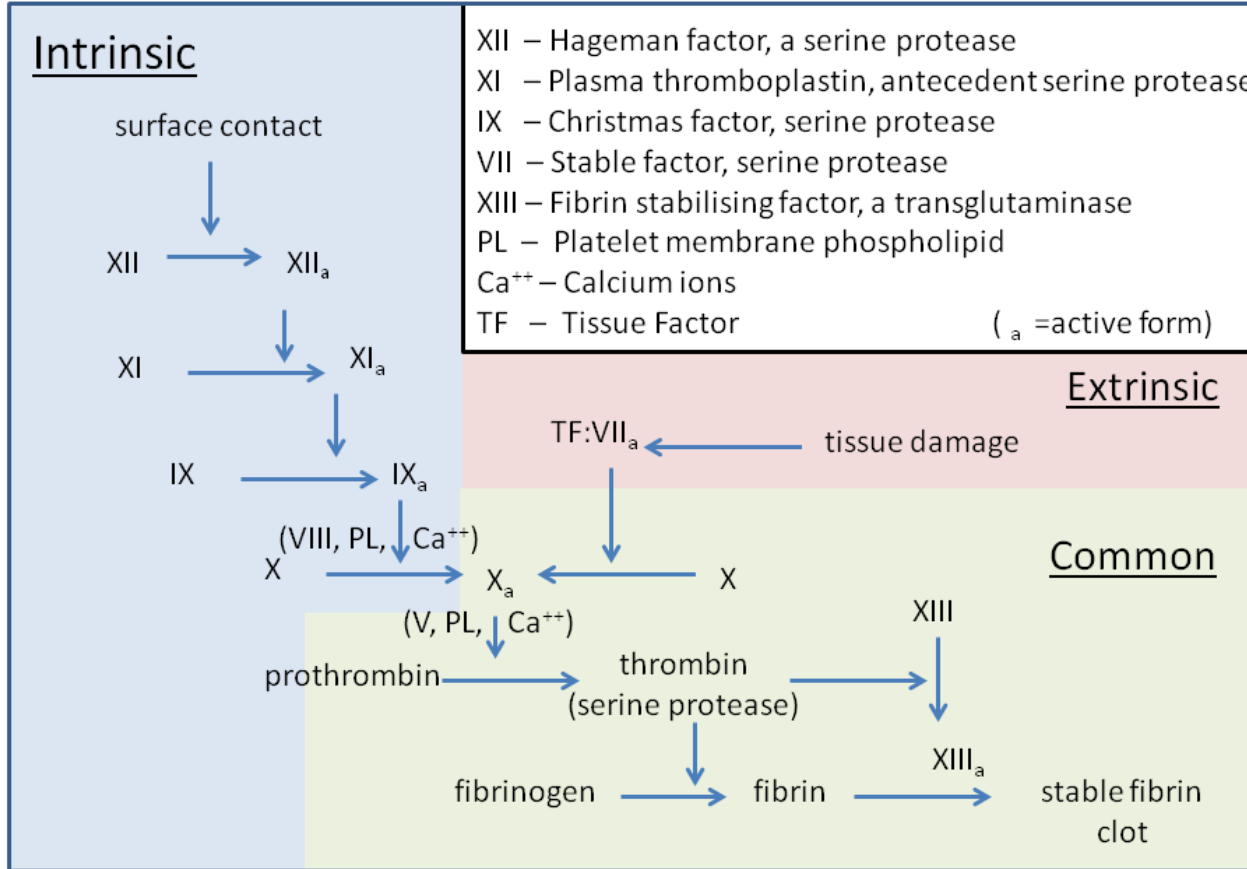
Faktor XIIa konvertuje prekalikrein na kalikrein, který zpětně katalyzuje a urychluje konverzi neaktivního faktoru XII na XIIa – příklad pozitivní zpětné vazby.

Vnější cesta



- Zahájena faktory mimo cévní systém
- Expres **tkáňového faktoru** mimo cévy
- Ten je receptorem pro plasmatický protein – faktor VII
- Aktivace – vznik VII_a
- Spolu s vápenatými ionty vznik trimolekulárního komplexu, který se podobá tenáze
- Proteolytická aktivace faktoru X

Společná cesta



- Zahájena faktorem Xa
- Následná aktivace faktoru Va
- Tvorba trimolekulárního komplexu (Xa, Va, vápenaté ionty spolu s PL) = **protrombináza**
- Konverze protrombinu na trombin
- Konverze fibrinogenu na fibrin

Trombin

- Trombin katalyzuje konverzi proteolýzu fibrinogenu (vznik fibrinopeptidů A a B) – α , β , γ
- Monomery fibrinu spontánně polymerizují a tvoří **gel** – zachycení krevních elementů
- Aktivace faktoru XIII a vznik polymerní sítě
- Trombin katalyzuje vznik dalšího trombinu a Va a VIIIa – pozitivní zpětná vazba
- Parakrinní působení trombinu – endoteliální buňky uvolňují NO, prostaglandin I₂, ADP, vWF, TPA – trombocyty (PAR-1) – spojení trombocytů s koagulační kaskádou

Moderní pojetí – proč ne tradiční model

1. Iniciační fáze

- = vnější cesta, expozice TF a následná kaskáda

2. Amplifikační fáze

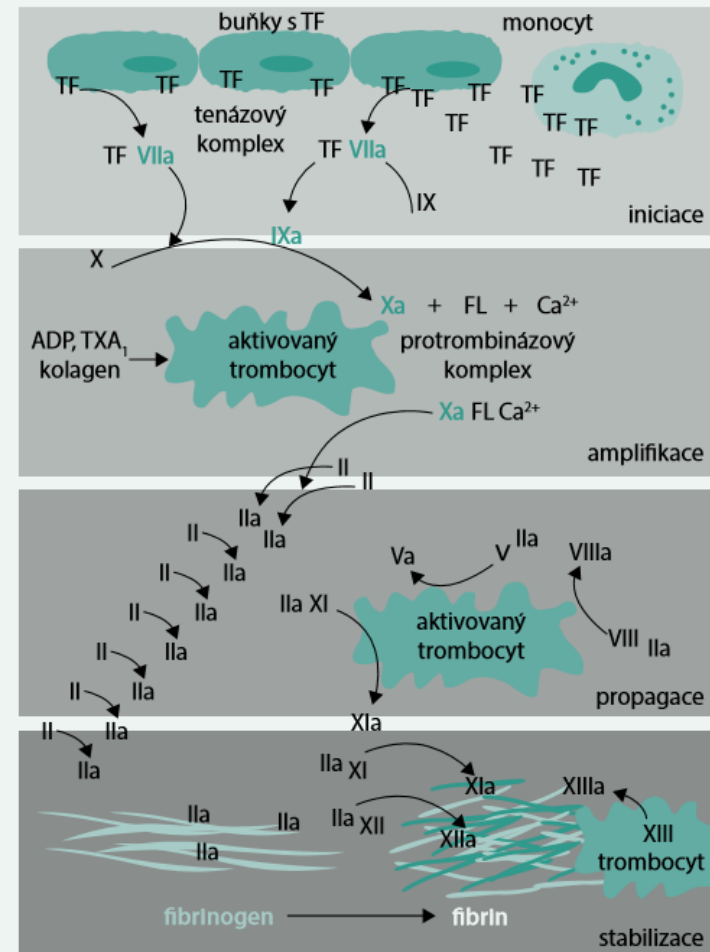
- Akumulace trombinu (pomalá)
- Nábór dalších trombocytů v místě poranění cévy
- Vznik Va a amplifikace protrombinázové aktivity

3. Propagační fáze

- Na povrchu prokoagulačních fosfolipidů – trombocytů
- Kaskáda se vznikem trombinu, fibrinu a jeho polymerizace – zesíťování

4. stabilizace trombu

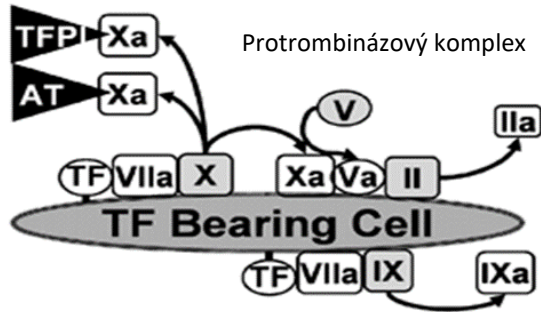
Obr. 1. Modifikované schéma koagulační kaskády podle současně platných názorů



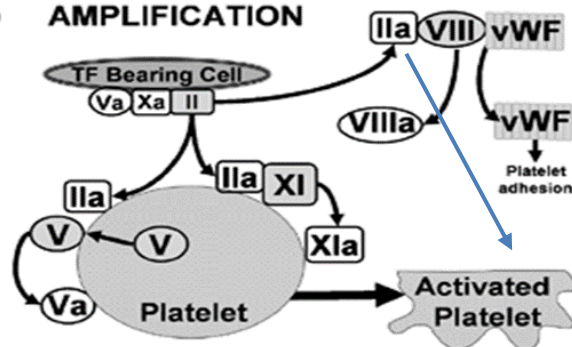
TF – tkáňový faktor ADP – adenosindifosfát FL – fosfolipidy
TX – tromboxan

Moderní pojetí – buněčný model

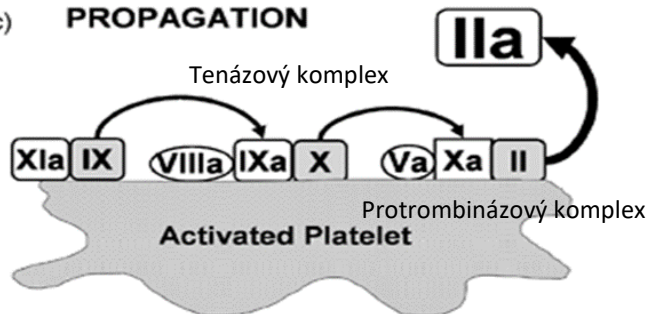
(a) INITIATION



(b) AMPLIFICATION



(c) PROPAGATION



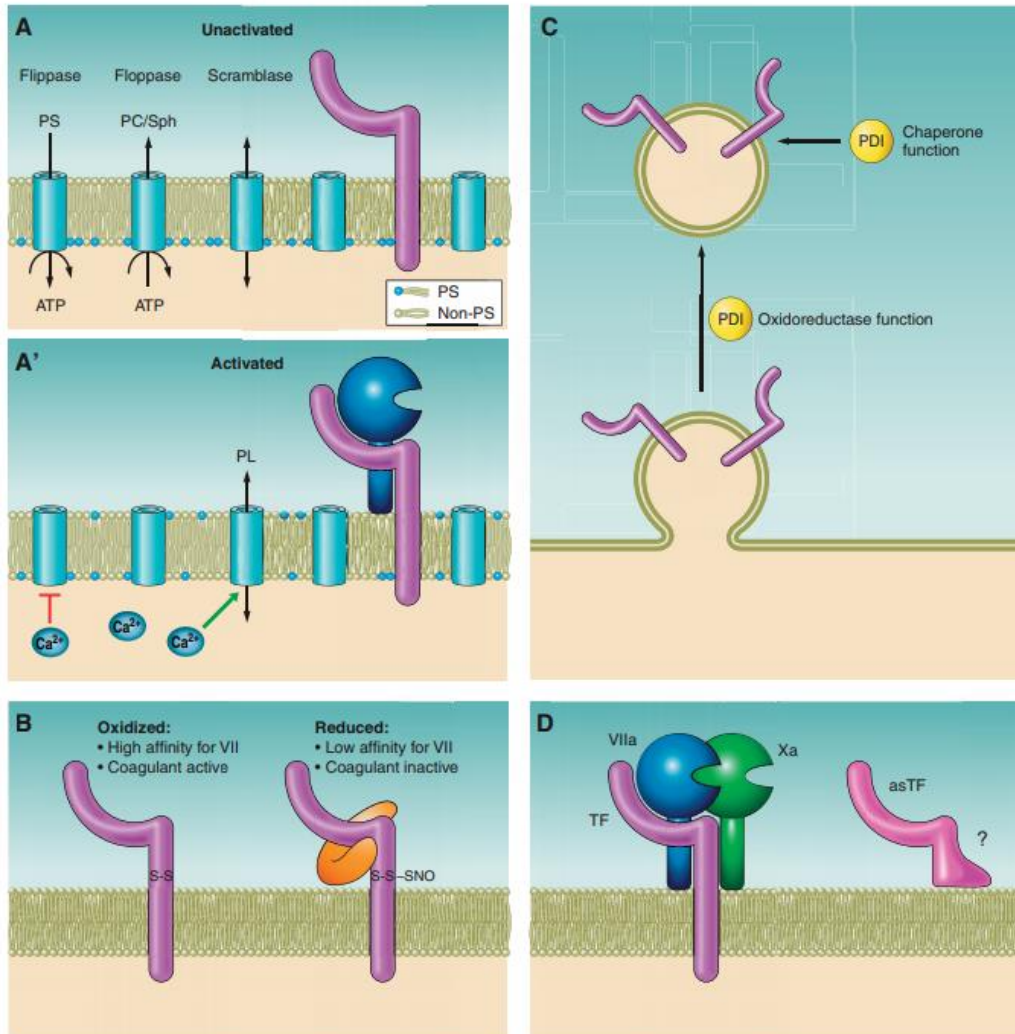
Význam vápenatých iontů a fosfolipidů

No.	Name	Role
I	Fibrinogen	Clot formation
II	Prothrombin	Activation of factors I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C and platelets
III	Tissue factor	Cofactor VIIa
IV	Calcium	Role in binding of phospholipid coagulation factors
V	Proaccelerin	Cofactor of X – prothrombinase complex
VI		Activated form of V
VII	Proconvertin	Enables factors IX and X
VIII	Antihemophilic factor A	Cofactor of IX complex
IX	Antihemophilic factor B or Christmas factor	Enables factor X, forms the complex tensor with factor VIII
X	Stuart–Prower factor	Forms the prothrombinase complex together with factor V, which will activate factor II
XI	Antecedent of plasma thromboplastin	Activates factor IX
XII	Hageman factor	Enables factors XI, VII and prekallikrein
XIII	Fibrin stabilizing factor	Creating cross-links between fibrin monomers
XIV	Prekallikrein – Fletcher factor	Precursor of kallikrein
XV	HMWK – Fitzgerald factor	Cofactor
XVI	von Willebrand factor	Role in platelet adhesion; it is linked to factor VIII
XVII	Antithrombin III	Inhibits IIa, Xa and other proteases
XVIII	Heparin cofactor II	Inhibits IIa
XIX	Protein C	Inactivates factors Va and VIIIa
XX	Protein S	Cofactor for activated C protein

V cirkulaci 1% jako VIIa

HMWK: High-molecular-weight kininogen.

Tkáňový faktor

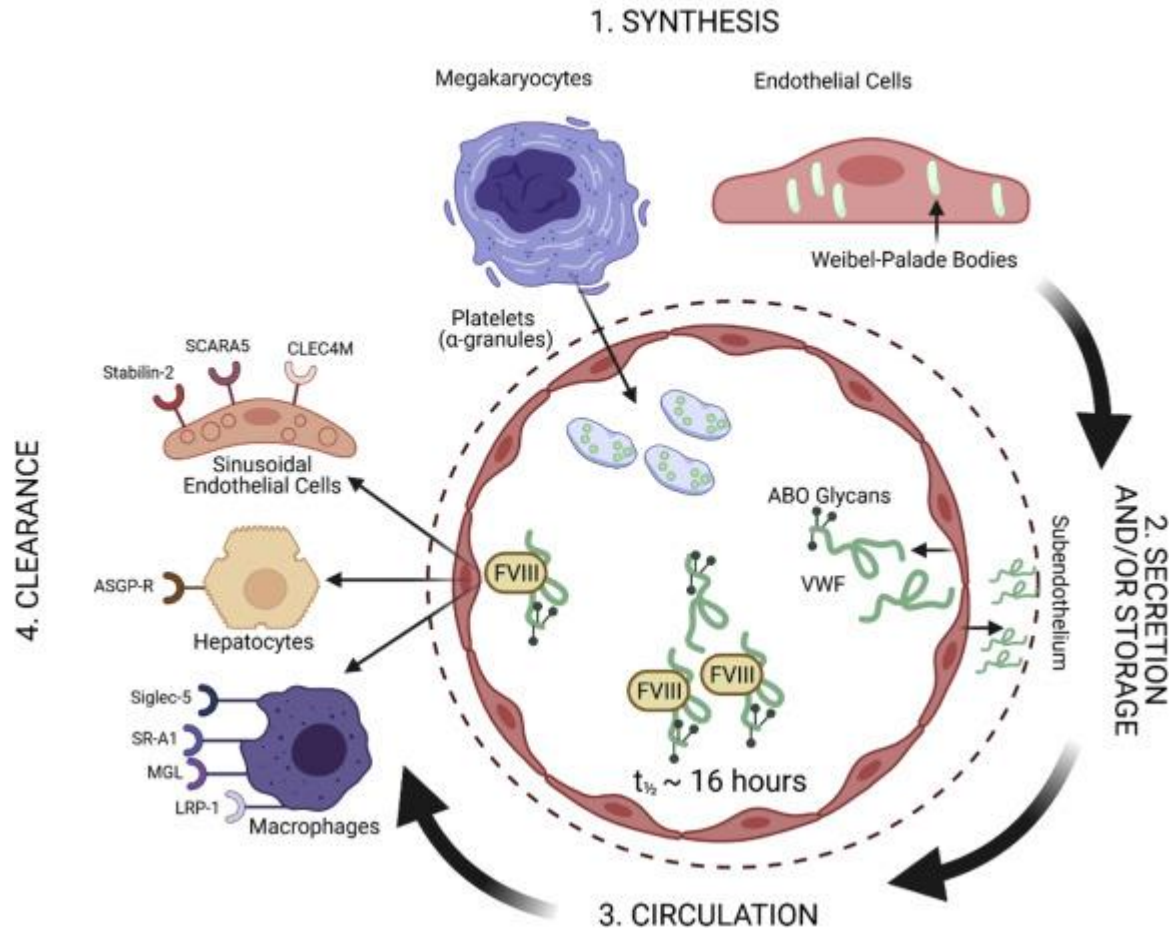


Regulation of TF activity. A: induced exposure of phosphatidylserine (PS). Under resting conditions, TF-exposing cells maintain a nonsymmetrical membrane composition, resulting in low PS contents in the outer membrane leaflet and high contents in the inner leaflet. This asymmetry is maintained through ATP-dependent inward transport of PS by flippases and outward transport of non-PS by floppases. Upon stimulation, calcium transients will inhibit flippase and stimulate the nonselective lipid transporter scramblase, resulting in PS exposure and the creation of a negatively charged surface that functions to bind coagulation factors. B: TF disulfide regulation. TF is kept on the cell surface in an inactive state through PDI- and/or nitric oxide (NO)-dependent reduction of the TF allosteric disulfide. Oxidation of the allosteric disulfide restores TF coagulant function. C: intravascular cells, such as activated monocytes, PDI-dependently shed TF-positive MPs. D: asTF on cellular surfaces or MPs may synergize with normally spliced TF to enhance TF procoagulant activity

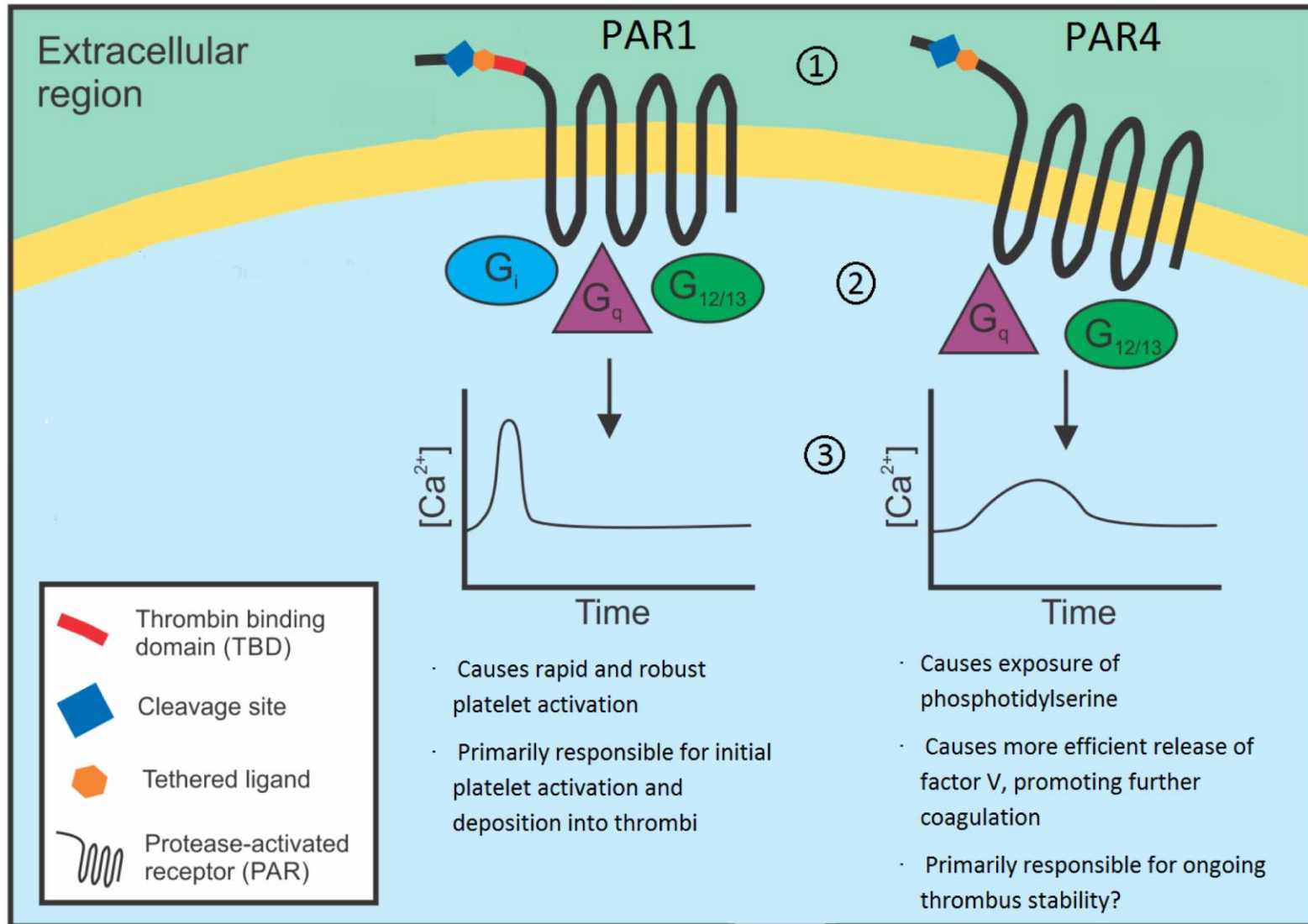
- Zdroje TF?

Von Willebrand faktor

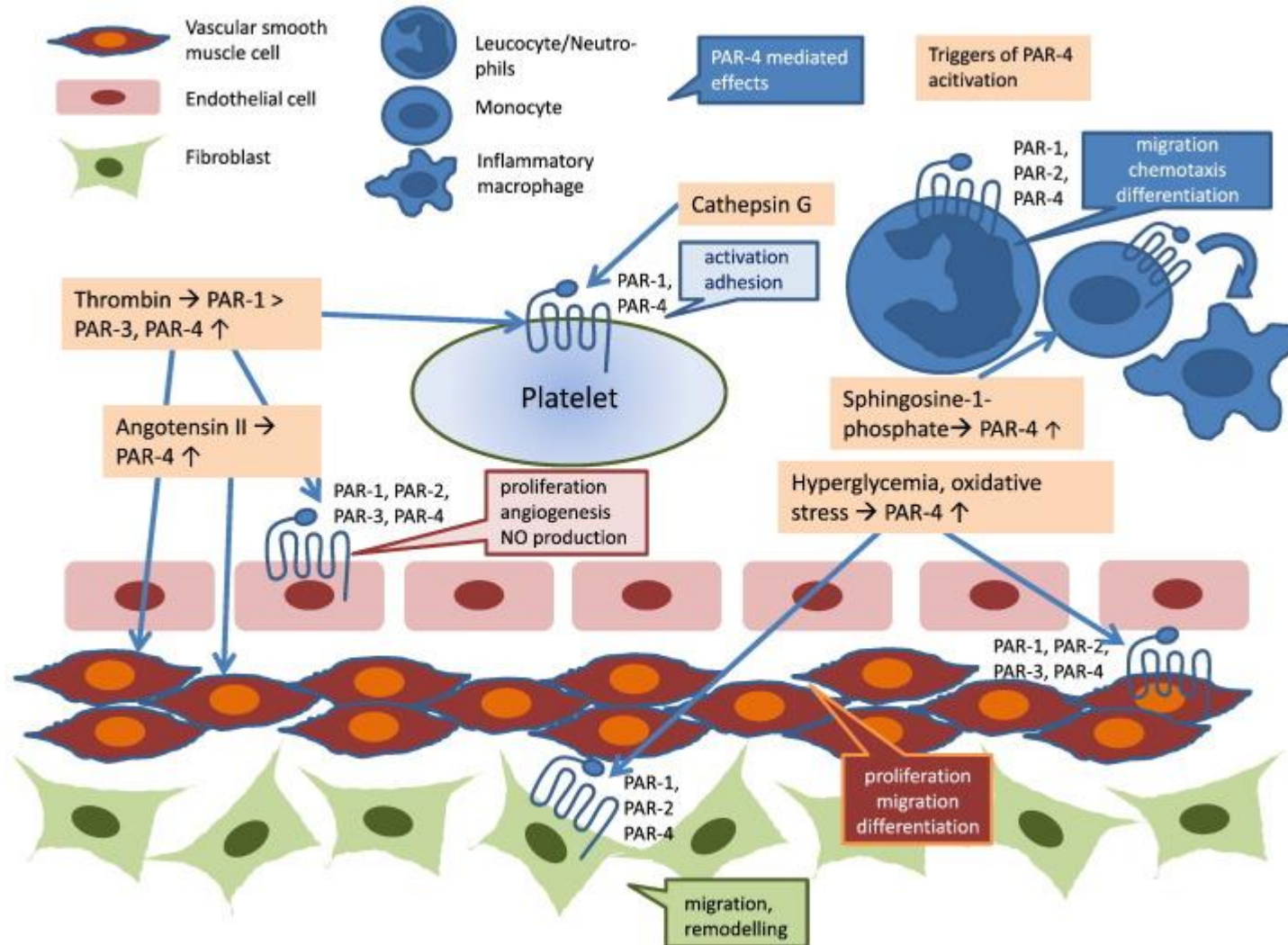
The Life Cycle of von Willebrand Factor

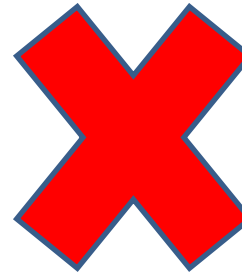
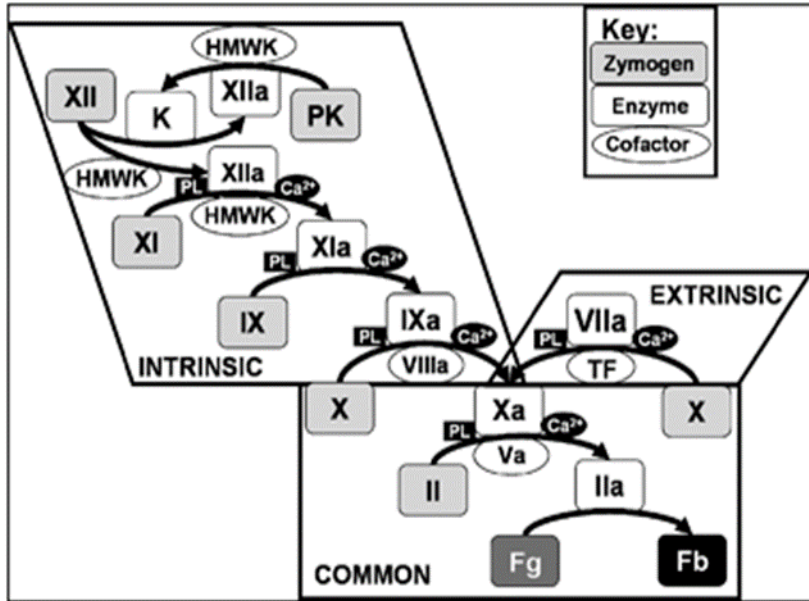


Trombin a tromboocyty

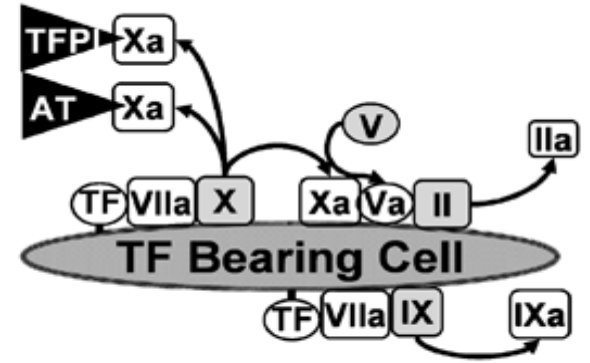


Trombin a tromboocyty

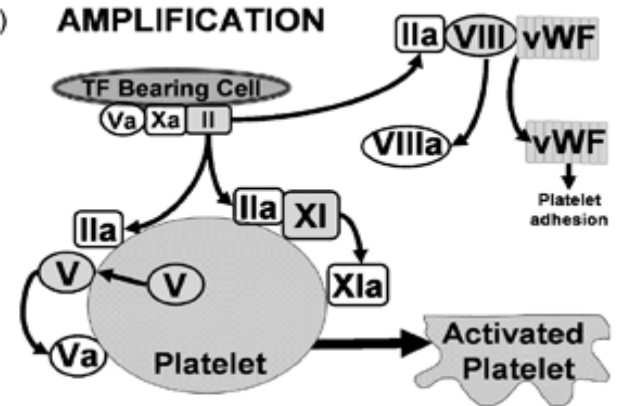




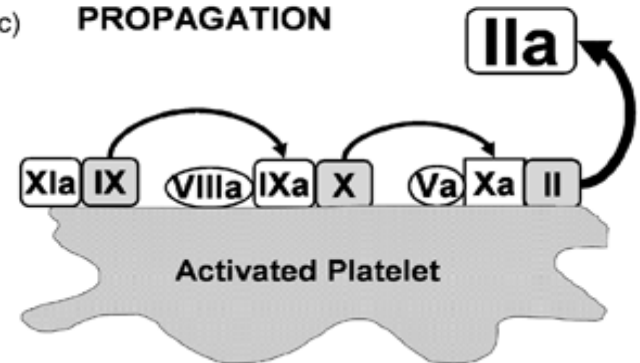
(a) INITIATION



(b) AMPLIFICATION



(c) PROPAGATION



ŘÍZENÍ HEMOKOAGULACE

Hemokoagulace vyvažována protisrážlivými mechanismy:

Nehumorální řízení:

Souvislý neporušený endotel.

Proud krve: omezení zvětšování koagula, zředění a odplavení faktorů srážení krve.

Humorální řízení:

Vzájemné negativní působení tromboxanu A_2 a prostacyklinu.

Fibrin: silně váže trombin – „antitrombin“

Antitrombin III: cirkulující inhibitor proteáz (aktivních forem faktorů IX, X, XI, XII), vazba na proteázy koagulačního systému usnadněna heparinem pocházejícím ze žírných buněk (kofaktor heparinu)

Trombmodulin: trombin vážící protein, produkován endoteliálními buňkami

Trombin + Trombmodulin = aktivátor proteinu C

Protein C: inaktivace faktorů V a VIII

inhibice inhibitoru aktivátoru tkáňového plasminogenu
(=více plasminu – rozklad fibrinu)

Další funkce proteinu C – receptor EPCR, vazba VIIa?

Protein S: kofaktor proteinu C

Plasmin (fibrinolysin): aktivní složka fibrinolytického systému. Prekurzor: plasminogen, katalýza trombinem a **tkáňovým aktivátorem plasminu (TPA)** – využití v terapii infarktu myokardu!!! Streptokináza.

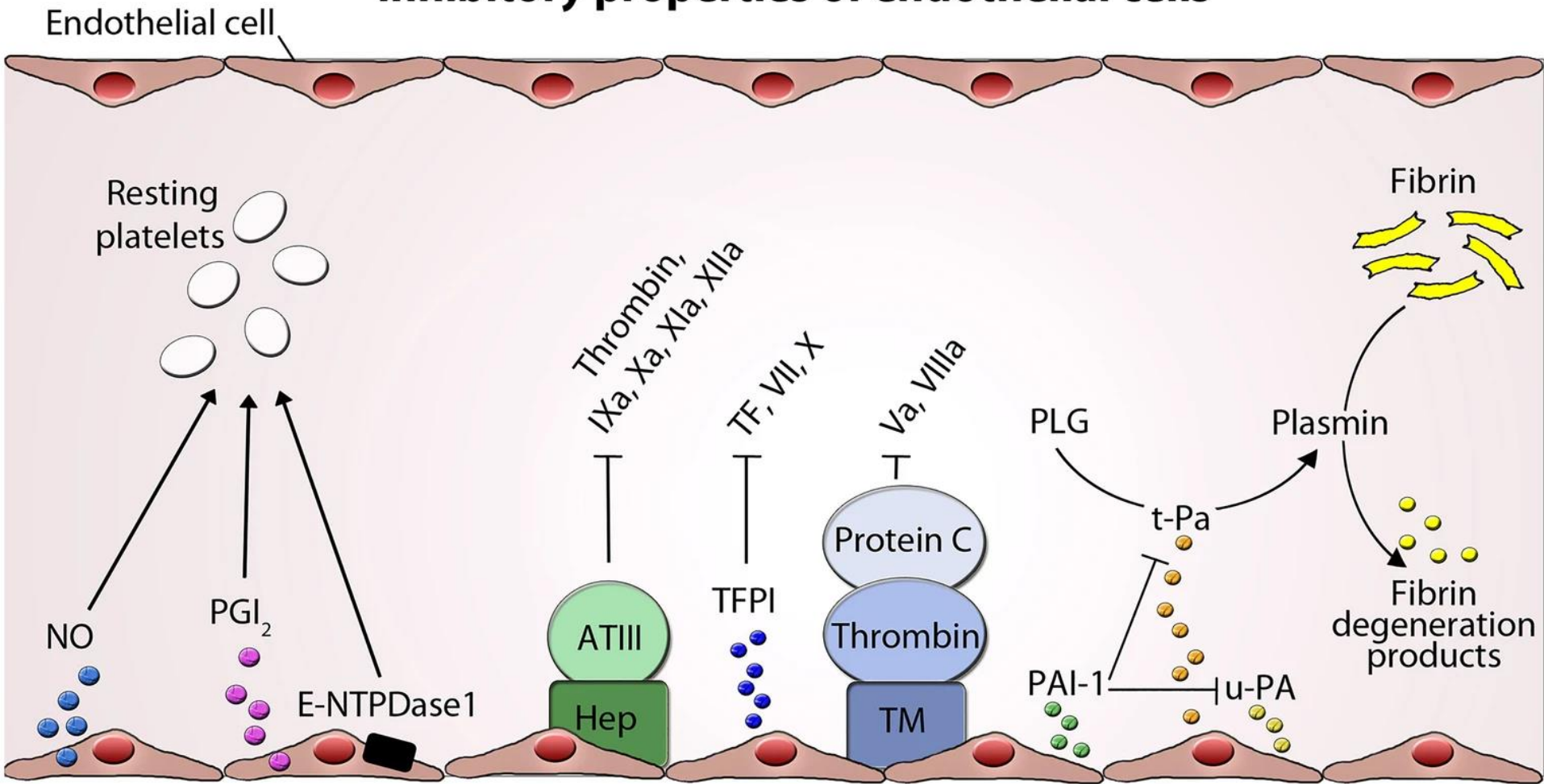
Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI): plazmatický protein asociovaný s membránou endoteliálních buněk, komplex s VIIa a vápenatými ionty – inhibice proteázové aktivity VIIa („antitrombotický povrch cév“)

Parakrinní antikoagulační faktory

- **PGI₂** – vazodilatace – buňky endotelu
 - Tok krve, inhibice aktivace trombocytů
- **Oxid dusnatý** – endoteliální buňky, inhibice adheze a agregace trombocytů

Protistážlivé mechanismy a endotel - přehled

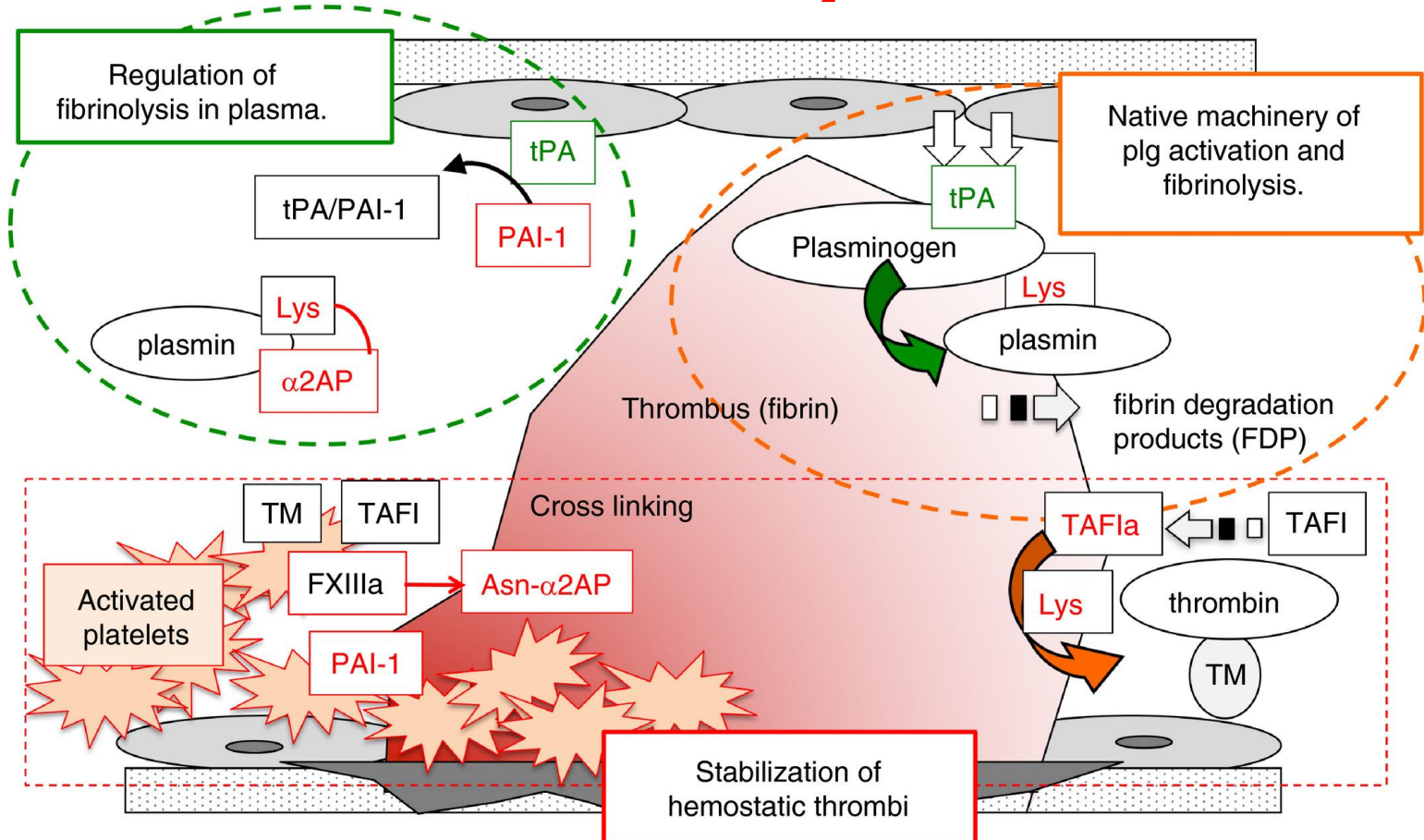
Inhibitory properties of endothelial cells



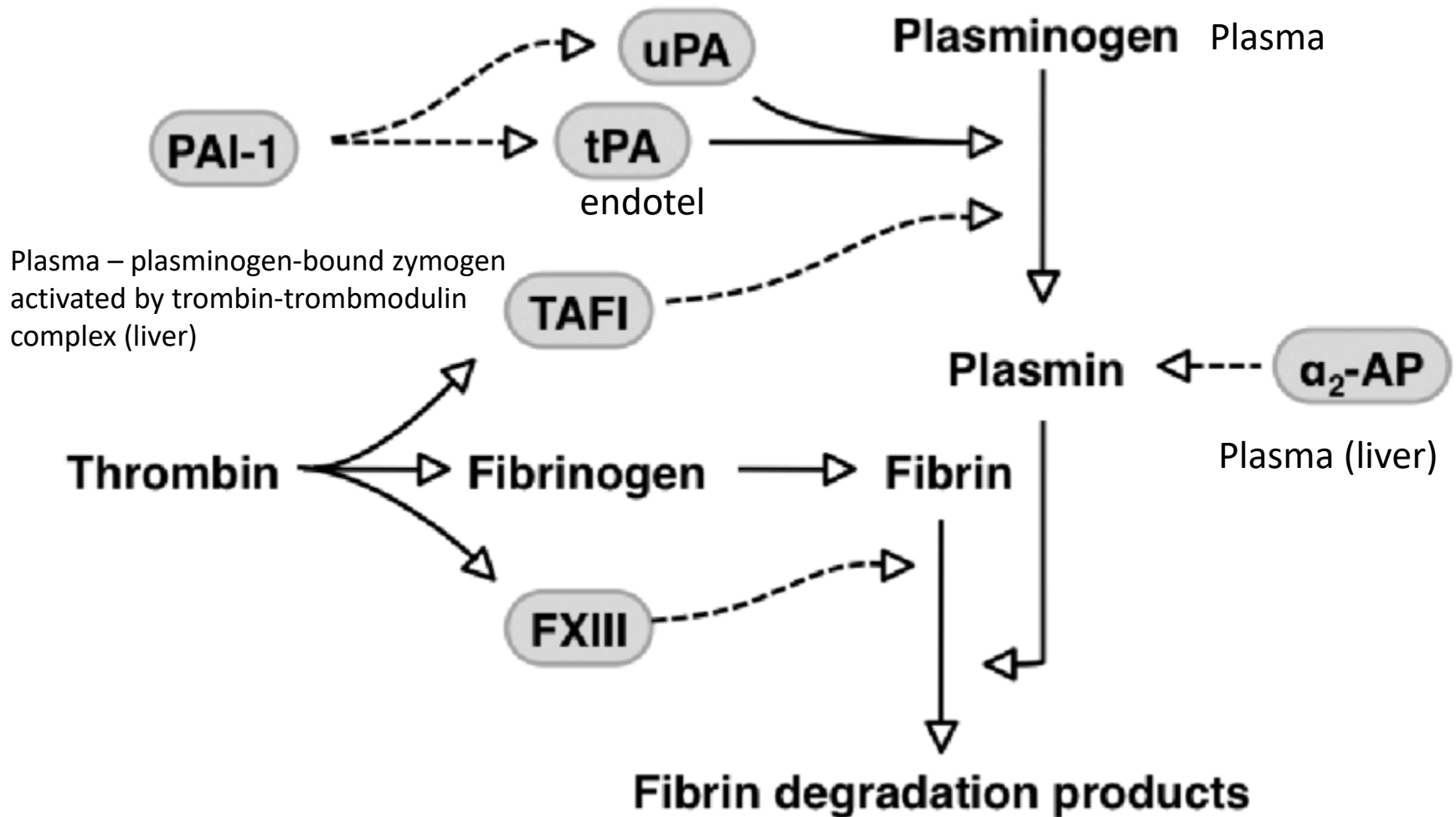
Fibrinolytické faktory

- **t-PA** – serinová proteáza, hydrolýza plazminogenu a vznik plazminu (endotel)
 - Katecholaminy a bradykinin zvyšují hladiny cirkulujícího t-PA
- **u-PA** – serinová proteáza urokinázového typu (plasma)
- **u-PAR** – receptor pro u-PA (vazba)
- **Plasminogen – plasmin** (játra)
- **PAI-1** – inhibitor aktivátoru plasminogenu, plasma a trombocyty
- **PAI-2** – jen těhotenství (placenta) – zvýšený risk trombózy během těhotenství?
- **α_2 -antiplasmin** – játra, ledviny - vazba plasminu (1:1) a jeho inaktivace

Fibrinolýza



Native machinery of plasminogen (plg) activation and fibrinolysis and its modification by vascular endothelial cells (VECs) and platelets. (1) The upper right panel shows native machinery of plg activation and fibrinolysis. VECs secrete and retain tissue-type plasminogen activator (tPA) and maintain adequate fibrinolytic potential on their surfaces. When fibrin is generated, tPA and plg accumulate on fibrin surfaces through C-terminal lysine residues bound to the lysine binding sites (LBSs) of plg, which trigger plg activation and fibrinolysis. (2) The lower right panel illustrates the inhibitory function of VECs on fibrinolysis. When thrombin is generated adjacent to thrombomodulin (TM)-expressing VECs, TM-bound thrombin effectively generates the carboxypeptidase B, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa), which specifically cleaves C-terminal lysine residues and inhibits fibrinolysis. (3) The lower left panel shows the inhibitory function of platelets on fibrinolysis. Activated platelets secrete plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and the FXIIIa catalytic A subunit, the latter of which cross-links α 2AP to fibrin to stabilize thrombus. The mechanisms shown in (2) and (3) are coordinated to protect hemostatic thrombi from immature lysis. (4) In plasma, free tPA and free plasmin are effectively inhibited by PAI-1 and α 2AP, respectively. PAI-1 also inhibits tPA activity on VECs by facilitating the dissociation of the membrane-bound tPA on the surface of VECs and regulates plg activation potential (upper left panel).



A simplified representation of the fibrinolytic system. Solid arrows denote stimulation and activation, and dotted arrows denote inhibition. $\alpha_2\text{ap}$ α_2 -antiplasmin; PAI-1 plasminogen activator inhibitor; TAFI thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; t-PA tissue-type plasminogen activator; u-PA urokinase plasminogen activator

ANTIKOAGULACE

Defibrinace: odstranění fibrinu (preparáty z hadích jedů) – *in vitro*

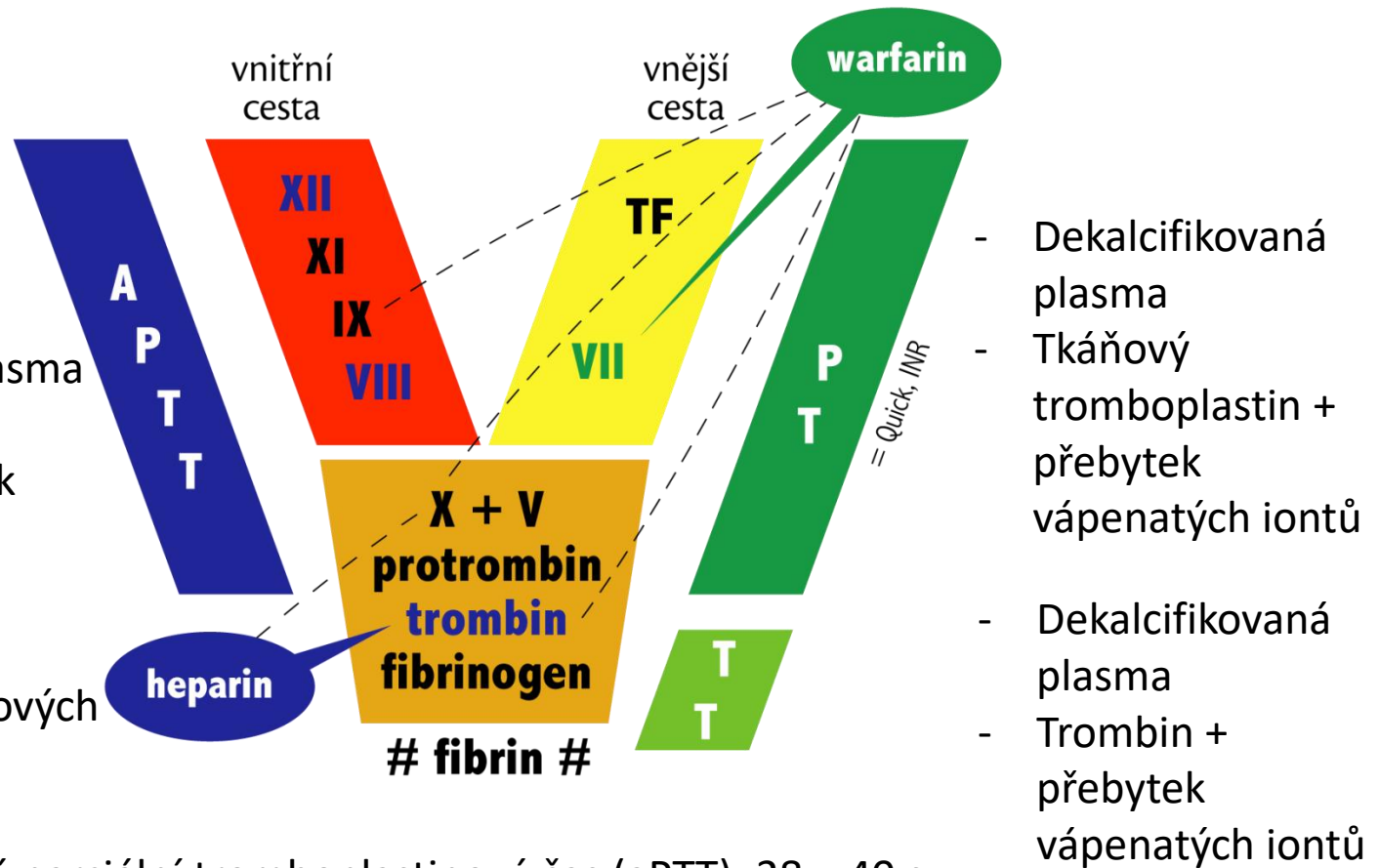
Dekalcifikace: vyvázání nebo odstranění vápenatých iontů (citrát sodný, šťavelan draselný nebo amonný) – *in vitro*

Heparin: přirozené antikoagulans, žírné buňky, účinné pouze za přítomnosti antitrombinu III, také *in vivo*

Kumarinové deriváty (dikumarol, warfarin): inhibice účinků vitamínu K v játrech – poruchy faktorů II, VII, IX, X, proteinu C, proteinu S (usnadňuje aktivaci Va a VIIIa pomocí proteinu C)

Hirudin: obsolentní, slinné žlázy pijavek (*Hirudo medicinalis*)

Vyšetření krevní srážlivosti

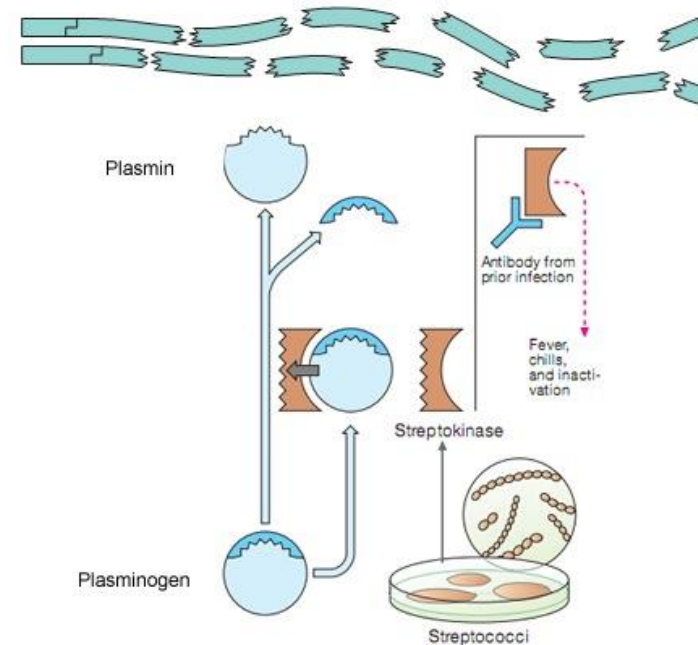
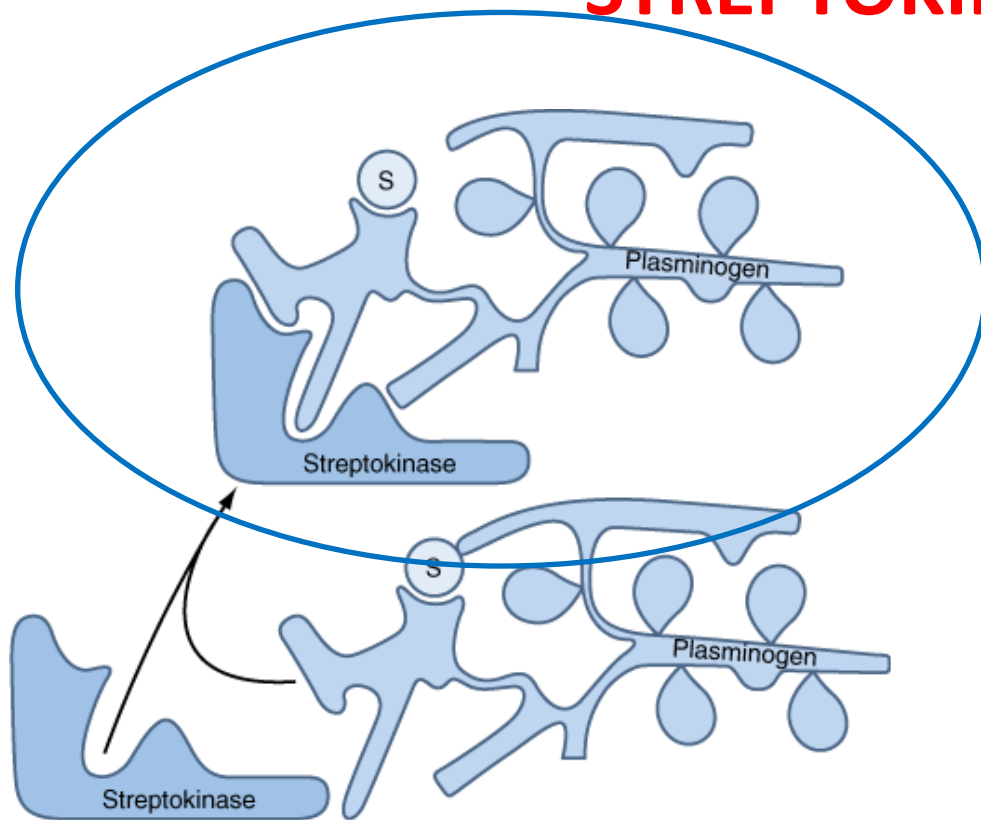


- Dekalcifikovaná plasma
- kaolin-kefalinový komplex + přebytek vápenatých iontů
- Kefalin nutný pro aktivaci faktoru X („náhražka destičkových fosfolipidů“)

- Dekalcifikovaná plasma
- Tkáňový tromboplastin + přebytek vápenatých iontů
- Dekalcifikovaná plasma
- Trombin + přebytek vápenatých iontů

- aPTT - Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), 28 – 40 s
- Quick – rychlost přeměny protrombinu na trombin 12 – 15 s; International Normalized Ratio 0,8 -1,2
- TT – trombinový čas 17 – 24 s
- Pozn. FDP (fibrinové degradační produkty) a D-dimery = markery koagulace s následnou fibrinolýzou

STREPTOKINÁZA



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

- Beta-hemolytický streptokok
- Konverze plasminogenu na aktivní plasmin;
- Terapie tromboembolických stavů

ONTOGENEZE HEMOSTÁZY

- vWF, trombomodulin, tkáňový faktor, TFPI – mRNA detekovatelná již 4 týdny po oplození
- Syntéza koagulačních faktorů začíná 5. týden
- Srážecí a fibrinolytická aktivita detekovatelná 10. týden
- Difúzní exprese tkáňového faktoru, který se podílí na řízení buněčné proliferace a diferenciaci
- Animální modely:
 - Absence TF, TFPI a protrombinu je pro embryo letální
 - Absence FVIII, TPA, PAI-1 a plasminogenu není letální a nemá vliv na vývoj embrya
- Velmi rychlé generování trombinu (i u předčasně narozených dětí) – kombinace zvýšeného množství cirkulujícího TF a sníženého TFPI a antitrombinu, zvýšená exprese TF na monocytech a endoteliálních buňkách
- Snížená koncentrace koagulačních faktorů u plodu (zvyšuje se po porodu) s výjimkou WF, faktoru VIII a fibrinogenu
- Snížená koncentrace vitamín-K dependentních proteinů (10% plazmatická koncentrace vitamínu K matky) – zvýšené riziko krvácení
- Fibrinogen plodu má více negativní náboj, jiná je i struktura vWF
- Po porodu se zvyšuje koncentrace koagulačních faktorů, některé dosahují normální struktury a hladin dospělých již po třech týdnech (fibrinogen, vWF), jiné až v průběhu puberty (protrombin, protein C)
- U novorozenců zvýšená adheze trombocytů (vlivem struktury vWF)
- V případě nutnosti suplementace koagulačních faktorů – větší Vd, větší dávky

PORUCHY HEMOSTÁZY

Krvácivé stavy = chorobné stavy, u kterých vznikají krvácivé projevy buď spontánně nebo po neúměrně malém podnětu.

- **Vasogenní poruchy krevního srážení**

- **Trombocytární krvácení:**

- 1) *trombocytopenie*

- 2) *trombocytopatie*

- **Koagulopatie** – chybění nebo nedostatek plazmatických koagulačních faktorů:

- 1) *Poruchy syntézy*: dědičné (hemofilie), získané (karence vitamínu K, terapie deriváty kumarinu)

- 2) *Poruchy přeměny*:

- konsumpční koagulopatie a hyperfibrinolýza

- mnohočetné transfuze

- imunokoagulopatie

- terapie heparinem

- paraproteinemie