

Miroslav Pecka

**LABORATORNÍ
HEMATOLOGIE
V PŘEHLEDU**

Fyziologie
a patologie hemostázy

2004

Recenzenti: prof. MUDr. Ladislav Chrobák, CSc.
prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.

OBSAH

© Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc., 2004
Autor: Doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.
II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie
Fakultní nemocnice, Hradec Králové a Katedra interních oborů
Lékařské fakulty University Karlovy, Hradec Králové
Fotodokumentace: Irena Šulcová
Technická spolupráce: Martina Tomšíková
Grafická spolupráce: Ing. Eliška Slezáková
Vydal a vytiskl: tiskárna FINIDR, s. r. o., Český Těšín, 2004
Litografie: Infiniti art, s. r. o., Český Těšín
Vydání této publikace podpořili:
A. L. Instruments, s. r. o., Český Těšín
Biovendor, s. r. o., Brno
Biogenix, Praha
Distribuce: Hk Credit

ISBN (3. díl) 80-86682-03-X
ISBN (soubor) 80-86682-00-5
ISBN (1. díl) 80-86682-01-3

Úvod	11
1. CÉVY, CÉVNÍ SYSTÉMY A ENDOTELOVÉ BUŇKY	
1.1 Cévní systém (schéma, tlaky, distribuce krve)	13
1.1.1. Rozložení tlaků v cévních systémech	13
1.1.2. Distribuce krve do orgánů a cév	14
1.2. Cévy	15
1.2.1. Tepny (arterie)	15
1.2.2. Tepénky (arterioly)	15
1.2.3. Vlasečnice (kapiláry)	15
<i>1.2.3.1 Funkce vlasečnic (kapilár)</i>	<i>16</i>
1.2.4. Žilky (venuly)	18
1.2.5. Žíly (vény)	18
1.3. Struktura cévní stěny	19
1.4. Změna průsvitu cévy	21
1.5. Endotel a endotelové buňky	22
1.5.1. Vznik a vývoj endotelových buněk	22
<i>1.5.1.1. Funkce endotelových buněk</i>	<i>22</i>
<i>1.5.1.2. Aktivita endotelových buněk</i>	<i>23</i>
1.5.2. Znamky poškození nebo aktivace endotelu	24
2. FYZIOLOGIE HEMOSTÁZY	
2.1. Hemostáza (srážení krve)	26
2.1.1. Hemostáza od narození do dospělosti	27
<i>2.1.1.1. Fetální a neonatální hemostáza</i>	<i>27</i>
<i>2.1.1.2. Hemostáza dětského věku</i>	<i>27</i>
<i>2.1.1.3. Hemostáza pozdního věku</i>	<i>28</i>
2.1.2. Složky hemostázy	28
<i>2.1.2.1. Cévní stěna</i>	<i>28</i>
<i>2.1.2.2. Složka tkáňová</i>	<i>29</i>
<i>2.1.2.3. Krevní destička</i>	<i>30</i>
2.1.3. Kontakty mezi krevními a endoteliálními buňkami	30
2.1.4. Úloha některých adhezivních proteinů v hemostáze	30
2.1.5. Mechanismy hemostatických procesů	32

2.1.6.	Dynamika hemokoagulačních procesů	34
2.2.	Primární hemostáza	35
2.2.1.	Průběh tvorby primární destičkové zátky	35
2.3.	Plazmatický koagulační systém	38
2.3.1.	Historie vývoje názorů na proces hemostázy	38
2.3.2.	Koagulační faktory	39
2.3.2.1.	<i>Serínové proteázy</i>	40
2.3.2.2.	<i>Kofaktory</i>	44
2.3.2.3.	<i>Substráty</i>	44
2.3.2.4.	<i>Koagulačně aktivní komplexy</i>	44
2.3.3.	Popis, struktura a funkce plazmatických koagul. faktorů	48
2.3.4.	Přeměna protrombinu na trombin	65
2.3.4.1.	<i>Vnější (extrinsic) systém</i>	66
2.3.4.2.	<i>Vnitřní (intrinsic) systém</i>	67
2.3.5.	Přeměna fibrinogenu na fibrin	70
2.3.5.1.	<i>Přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin</i>	70
2.3.6.	Úloha trombinu v hemokoagulaci	72
2.3.7.	Nový pohled na koagulační děje	74
2.3.7.1.	<i>Iničiační fáze</i>	75
2.3.7.2.	<i>Amplifikační fáze</i>	80
2.3.7.3.	<i>Propagační fáze</i>	80
2.4.	Fibrinolytický systém	87
2.4.1.	Plazminogen	87
2.4.2.	Aktivátory plazminogenu	89
2.4.2.1.	<i>Vnitřní</i>	89
2.4.2.2.	<i>Vnější</i>	89
2.4.3.	Přeměna plazminogenu na plazmin	91
2.4.4.	Plazmin	92
2.4.5.	Štěpné produkty fibrinogenu a fibrinu	94
2.4.5.1.	<i>Štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu</i>	94
2.4.5.2.	<i>Štěpení nerozpustného fibrinu</i>	94
2.4.6.	Aktivace fibrinolýzy	96
2.5.	Systémy inhibitorů hemostázy	98
2.5.1.	Inhibitory koagulace a fibrinolýzy	99
2.5.1.1.	<i>Inhibitory plazmatického koagulačního systému</i>	99
2.5.1.2.	<i>Inhibitory fibrinolýzy</i>	116

2.5.2.	Inhibitory s nespecifickými vazbami	123
2.5.3.	Získané inhibitory	125

3. VYŠETŘOVACÍ METODY HEMOSTÁZY

3.1.	Přístroje a techniky používané v hemostáze	131
3.1.1.	Koagulační	131
3.1.2.	Zákalové (nefelometrické, turbidimetrické)	131
3.1.3.	Spektrofotometrické metody (chromogenní substráty)	132
3.1.4.	Imunochemické metody	134
3.1.4.1.	<i>ELISA (enzymimunoanalýza)</i>	134
3.1.4.2.	<i>EID (elektroimunodifuze)</i>	134
3.1.4.3.	<i>LIA (světelná nebo laserová imunoanalýza)</i>	135
3.1.4.4.	<i>RIA (radioimunoanalýza)</i>	135
3.1.4.5.	<i>Latex – aglutinační testy</i>	135
3.1.4.6.	<i>Hemaglutinační testy</i>	136
3.1.5.	Gelifikační testy	136
3.1.6.	Průtoková cytometrie	136
3.1.7.	PCR (polymerázová řetězová reakce)	136
3.2.	Typy koagulačních stanovení	137
3.2.1.	Manuální	137
3.2.2.	Přístroje (koagulometry)	137
3.2.2.1.	<i>Optické</i>	137
3.2.2.2.	<i>Elektromechanické</i>	137
3.3.	Testy používané v hemostáze	139
3.3.1.	Globální testy	139
3.3.2.	Skupinové testy	142
3.3.3.	Specifické	147
3.3.3.1.	<i>Metody ke stanovení fibrinogenu</i>	147
3.3.3.2.	<i>Funkční aktivita složek koagulačního a fibrinolytického systému</i>	148
3.3.3.3.	<i>Odlišení deficiencie faktorů od přítomnosti inhibitorů</i>	151

4. PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

4.1.	Krvácivé stavy	153
4.1.1.	Krvácivé stavy z cévních příčin (purpury)	153
4.1.1.1.	<i>Vrozené purpury</i>	154

4.1.1.2.	<i>Získané purpury</i>	155
4.1.2.	Krvácivé stavy z poruchy krevních destiček	156
4.1.2.1.	<i>Trombocytopenie</i>	156
4.1.2.1.1.	TROMBOCYTOPENIE Z NEDOSTATEČNÉ PRODUKCE TROMBOCYTŮ	158
4.1.2.1.2.	TROMBOCYTOPENIE ZE ZVÝŠENÉ DESTRUKCE TROMBOCYTŮ	159
4.1.2.1.3.	TROMBOCYTOPENIE ZE ZVÝŠENÉ KONZUMPCE TROMBOCYTŮ	162
4.1.2.1.4.	TROMBOCYTOPENIE ZE ZTRÁT TROMBOCYTŮ	164
4.1.2.2.	<i>Trombocytopatie</i>	166
4.1.2.2.1.	VROZENÉ TROMBOCYTOPATIE	167
4.1.2.2.2.	ZÍSKANÉ TROMBOCYTOPATIE	170
4.1.2.3.	<i>Trombocytóza, trombocytémie</i>	170
4.1.2.3.1.	TROMBOCYTÓZA	170
4.1.2.3.2.	TROMBOCYTÉMIE	171
4.1.3.	Koagulopatie	171
4.1.3.1.	<i>Vrozené koagulopatie</i>	172
4.1.3.1.1.	HEMOFILIE	172
4.1.3.1.2.	VON WILLEBRANDOVA NEMOC	177
4.1.3.1.3.	DEFEKTY OSTATNÍCH FAKTORŮ	179
4.1.3.2.	<i>Získané koagulopatie</i>	182
4.1.3.2.1.	PORUCHY RESORBCE A VYUŽITÍ VITAMINU K	183
4.1.3.2.2.	AUTOIMUNITNÍ A ALOIMUNITNÍ KOAGULOPATIE	184
4.1.3.2.3.	OSTATNÍ ZÍSKANÉ PORUCHY KOAGULACE	184
4.1.3.2.4.	KRVÁCIVÉ STAVY Z JINÝCH PŘÍČIN	185
4.2.	Trombotické a trombofilní stavy	191
4.2.1.	Trombotické stavy	191
4.2.1.1.	<i>Venózní trombózy</i>	194
4.2.1.2.	<i>Arteriální trombózy</i>	195
4.2.1.3.	<i>Laboratorní markery trombózy</i>	197
4.2.2.	Trombofilní stavy	198
4.2.2.1.	<i>Vrozené (kongenitální) trombofilní stavy</i>	199
4.2.2.1.1.	REZISTENCE NA AKTIVOVANÝ PROTEIN C (APC-R)	200
4.2.2.1.2.	DEFEKT 20210A ALELY PROTROMBINU	202
4.2.2.1.3.	HYPERHOMOCYSTEINÉMIE	202
4.2.2.2.	<i>Získané trombofilní stavy</i>	204
4.2.2.2.1.	ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM (APS)	204
4.2.2.3.	<i>Sekundární (přidružené) trombofilní stavy</i>	205

4.3.	Antitrombotická léčba	208
4.3.1.	Monitorování léčby	208
4.3.2.	Antikoagulační léčba	209
4.3.2.1.	<i>Nepřímé inhibitory trombinu</i>	209
4.3.2.2.	<i>Přímé inhibitory trombinu</i>	213
4.3.2.3.	<i>Potlačení geneze faktorů závislých na vitaminu K</i>	214
4.3.2.4.	<i>Monitorování antikoagulační léčby kumariny</i>	215
4.3.2.5.	<i>Monitorování antikoagulační léčby preparáty heparinu</i>	216
4.3.2.6.	<i>Monitorování léčby hirudinem</i>	219
4.3.3.	Trombolytická léčba	220
4.3.3.1.	<i>Mechanismus trombolýzy</i>	220
4.3.3.2.	<i>Trombolytika</i>	221
4.3.3.3.	<i>Nepřímá trombolytika</i>	221
4.3.3.4.	<i>Přímá trombolytika</i>	223
4.3.3.5.	<i>Monitorování trombolytické léčby</i>	225
4.3.4.	Antiagregační léčba	225
4.3.4.1.	<i>Blokáda adheze destiček na subendoteliální matrix</i>	226
4.3.4.2.	<i>Blokáda aktivačních cest a cyklů</i>	226
4.3.4.2.1.	BLOKÁDA ENZYMŮ CYKLU KYS. ARACHIDONOVÉ	226
4.3.4.2.2.	BLOKÁDA MEMBRÁNOVÝCH RECEPTORŮ KREVNÍCH DESTIČEK	228
4.3.4.3.	<i>Blokáda agregace destiček blokátory GP IIb/IIIa</i>	229
4.3.4.3.1.	BLOKÁTORY RECEPTORŮ GP IIb/IIIa	229
4.3.4.3.2.	BLOKÁTORY AKTIVÁTORU AGREGACE KREV. DESTIČEK – TROMBINU	230
4.3.4.4.	<i>Monitorování antiagregační léčby</i>	230
4.3.4.4.1.	SLEDOVÁNÍ INHIBICE AGREGAČNÍ KŘIVKY STIMULOVANÉ KOLAGENEM	230
4.3.4.4.2.	SLEDOVÁNÍ INHIBICE AGREGAČNÍ KŘIVKY S PROPYL GALÁTEM	230

Seznam použitých zkratk	233
-------------------------	-----

Rejstřík	238
----------	-----

ÚVOD

Po delší úvaze předkládám širší odborné veřejnosti se zájmem o laboratorní hematologii knihu **Laboratorní hematologie v přehledu (3. díl) – fyziologie a patofyziologie hemostázy**. Proti původnímu záměru jsem přeskočil část, která se týká „ultrastruktury, morfologie, fyziologie a patofyziologie krevních buněk“. Tato kniha by měla být publikována během Česko-slovenských dnů laboratorní hematologie v roce 2006. Přikročil jsem k tomu zejména z toho důvodu, že v posledních několika letech došlo k významnému pokroku v odhalování hemostatických procesů, a tak i tato oblast se v mnohém dostává do roviny molekulárních procesů a vzájemné interakce mezi buňkami či buňkami a prostředím. O těchto souvislostech je jen málo zmínek v současném českém písemnictví.

V této knize se věnuji zejména cévnímu systému, vztahu mezi endotelem a hemostázou, aktivaci koagulačních faktorů, vzniku koagulačně aktivních komplexů a toto dávám do spojitosti s klasickými a novými modely hemostatických procesů. V další části se věnuji problematice fibrinolýzy, inhibitorů krevního srážení a jejich přímému zásahu v oblasti aktivované hemostázy. V části zaměřené na patofyziologii hemostázy se zabývám příčinami vzniku daného onemocnění a laboratorními testy. Nezaměřuji se na klinické aspekty související s diagnostickou rozvahou a strategií léčby. V první části popisují krvácivé stavy z různých příčin (cévní stěna, krevní destička, koagulopatie), dále trombotické a trombofilní stavy a možnostmi jejich léčebného monitorování. Samostatný oddíl je věnován metodám a přístrojové technice využitelné při sledování změn hemostatických mechanismů. Kniha vychází z mých více než 27letých zkušeností s laboratorní problematikou oboru klinické hematologie a volnou formou navazuje na již dříve vydané publikace „Přehled laboratorní hematologie I–IV“.

Chtěl bych využít této příležitosti a poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Malému, CSc. za celoživotní spolupráci a nezištné přátelství. Je pro mně milou povinností poděkovat i oběma recenzentům prof. MUDr. Ladislavu Chrobákovi, CSc. a prof. MUDr. Miroslavu Penkovi, CSc. za jejich velmi kvalifikovanou, důslednou a pečlivou recenzi této knihy. Poděkování patří dále Martině Tomšíkové za včasné a rychlé vypsání a seřazení jednotlivých statí a pomoc při úpravě obrázků. Rovněž jsem velmi zavázán paní Ireně Šulcové za perfektní převedení obrázků do elektronické podoby a jejich kopírování, ing. Elišce Slezákové a Mgr. Filipu Vrbáckému za zhotovení digitálních fotografií a grafů k jednotlivým statím této knihy.

Firmám A.L. Instruments a HK Credit, především panu ing. L. Cimalovi a panu ing. J. Michálkovi a dalším firmám děkuji za podporu při vydání a případné distribuci této knihy. Na závěr bych chtěl poděkovat i všem dalším spolupracovníkům, laborantkám a lékařům za jejich pochopení pro mou práci a své rodině za trpělivost, kterou mi poskytovala po celou dobu sepsávání jednotlivých statí.

V Hradci Králové, září 2004

Miroslav Pecka

1. CÉVY, CÉVNÍ SYSTÉMY A ENDOTELOVÉ BUŇKY

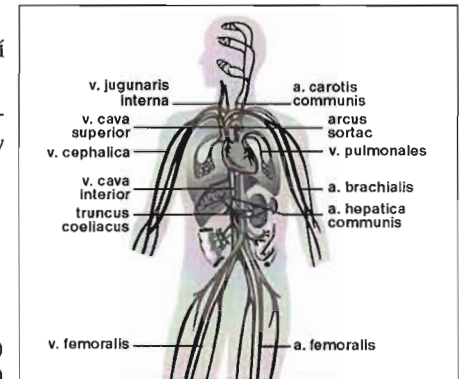
1.1. Cévní systém (schéma, tlaky, distribuce krve)

Cévy, to není jen jakýsi „potrubní systém“, pro rozvod okysličené krve a její návrat po předání kyslíku tkáním. **Cévní stěna** je jednou s velmi důležitých složek hemostatického procesu a to zejména její styčná plocha s krevním řečištěm – **endotel**.



V krevním oběhu můžeme rozlišit:

- ❑ **tepenný rozvod** (vyšší tlak) – rozvádí okysličenou krev ze srdce do tkání
- ❑ **žilní rozvod** (nižší tlak) – sbírá tekutinu z tkání a odvádí odkysličenou krev k srdci a k plicím.



Tepenný (červeně)
a žilní rozvod (modře)

SCHÉMA CÉVNÍHO SYSTÉMU

- ❑ Za průměrný lidský život se srdce smrští asi 2,5 miliardkrát a přes cévy přečerpá asi 145 milionů litrů krve.
- ❑ Vyšší rychlost krevního toku je v arteriích.
- ❑ Vyšší rychlost krevního toku je ve vnitřních částech cév.
- ❑ Erytrocyty proudí ve vnitřních částech cév, kdežto trombocyty podél cévní stěny.

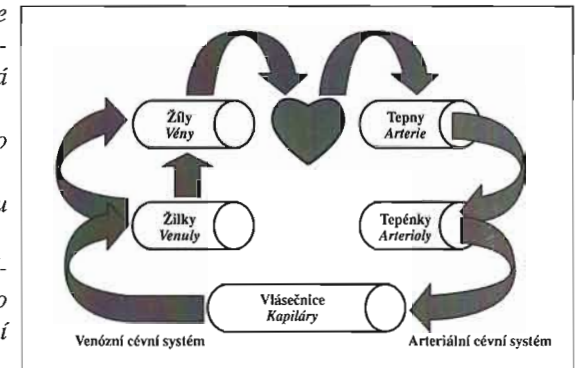
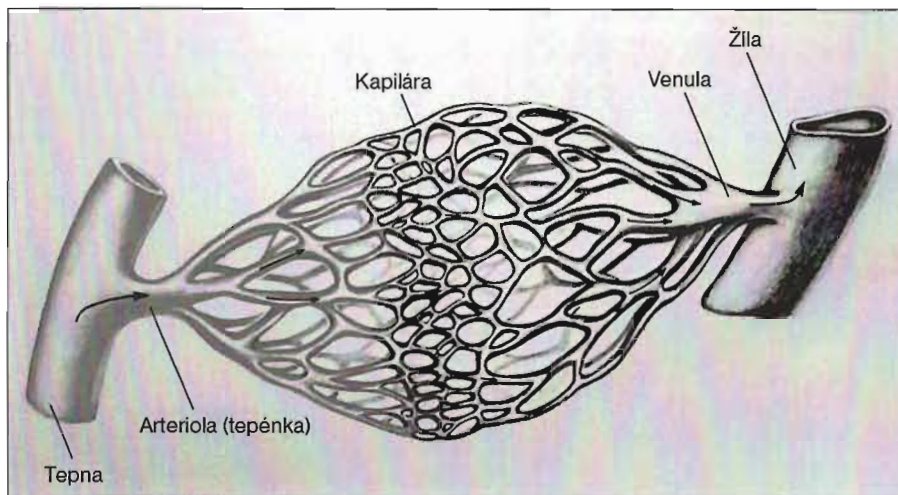


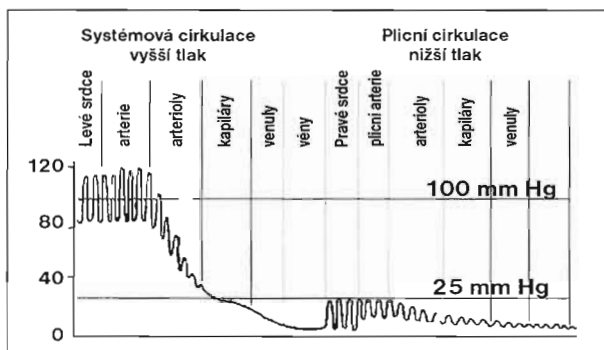
SCHÉMA KAPILÁRNÍHO ROZVODU



1.1.1. Rozložení tlaků v cévních systémech

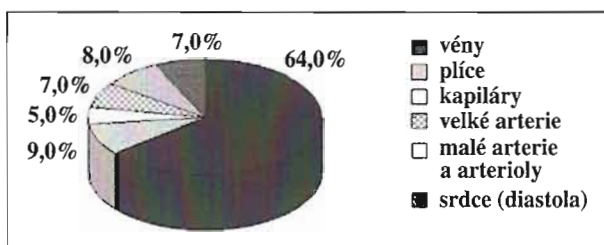
Tlak v cévách směrem od srdce k systému kapilár postupně klesá z hodnoty kolem 100 na hodnoty 25 mmHg.

Krevní tlaky v systémové a plicní cirkulaci



1.1.2. Distribuce krve do orgánů a cév

Krev v jednotlivých orgánech a částech cévního systému není rozložena rovnoměrně. Nejvíce krve se nachází ve věnách (64 % objemu krve), nejméně v kapilárách (přibližně 5 % objemu krve).



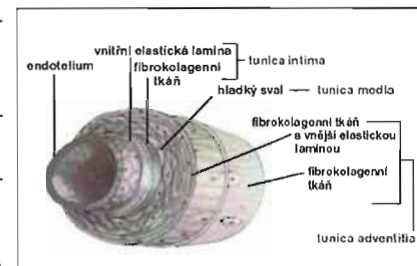
1.2. Cévy

1.2.1. Tepny (artérie)

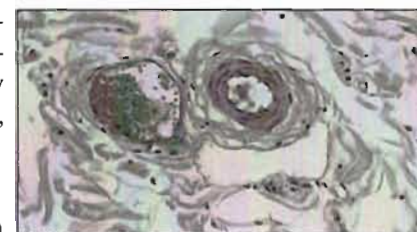
Mají průměr kolem 2–3 cm a silné a pružné stěny složené ze 3 vrstev:

- **vnitřní** – vystlaná endotelem
- **střední** – hladké svaly, kolagenní vlákna a fibroblasty
- **zvnějš** – fibroelastické vazivo, cévy vyživující artérie a nervy

Řez arterií – schéma



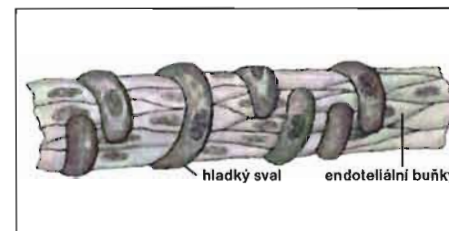
Tato struktura umožňuje tepnám vyrovnávat velké tlakové rázy vznikající při každém srdečním stahu. Svaly tepenné stěny jsou pod kontrolou nervového systému, který řídí *kontrakci* nebo *dilataci* tepny.



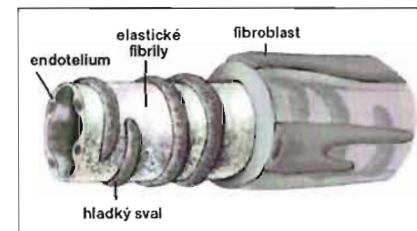
Řez arterií (vlevo) a vénou (vpravo)

1.2.2. Tepénky (arterioly)

Artérie se větví uvnitř tkání na menší tepénky (arterioly), jejichž stěny mají méně vaziva a vytvořenou vrstvu hladké svaloviny. Svaly arterioly jsou řízeny vegetativními nervy. Arterioly jsou místem hlavního odporu se kterým se při svém toku krevním řečištěm krev setkává – *periferní odpor*.



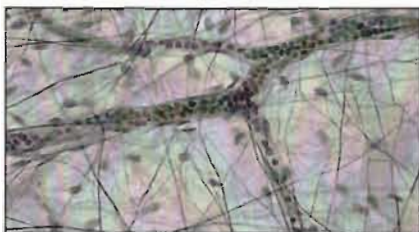
Menší (vlevo) a větší (vpravo) arterioly – schéma



1.2.3. Vlasečnice (kapiláry)

Z tepének může přecházet krev do žilek vlásečnicemi (kapilárami). Vlasečnice mají průměr blízký průměru lidského vlasu. Množství vlásečnic, kterým je tkáň vy-

bavená závisí na intenzitě jejího metabolismu. Jedna arteriola se může větvit až do 100 vlásečnic.



Struktura kapilár – tenký řez tkáně

- V kosterním svalu prochází krev za klidu v oblasti o průřezu 1 mm² asi 200 kapilárami, v době maximálního výkonu až 2 500 kapilárami.
- V těle člověka je asi 90 km vlásečnic.

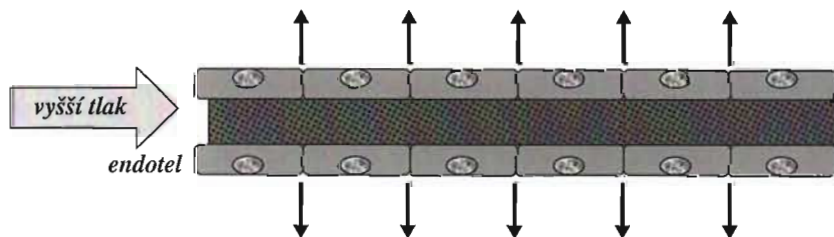
1.2.3.1. Funkce vlásečnic (kapilár)

Vlastní výměna plynů, živin a zplodin metabolismu mezi krví a tkáněmi se uskutečňuje v kapilárách. Stěny kapilár jsou složeny z jedné vrstvy endotelových buněk. Mají právě takový průřez, že se jimi musí pohybovat krvinky v řadě za sebou. Mezi kapilárami a extracelulární tekutinou dochází k ustavení rovnováhy mezi objemem krve a mezibuněčné tekutiny.



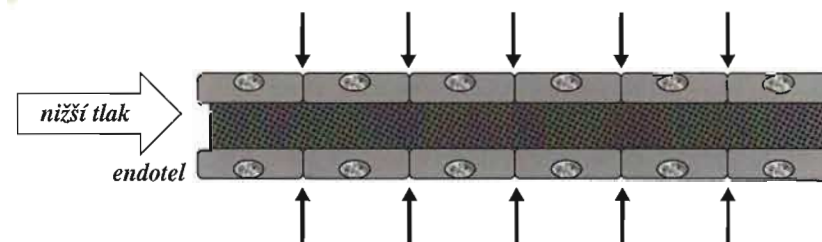
V **arteriální** části kapiláry je krevní plazma působením krevního tlaku filtrována přes kapilární stěnu, takže část tekutiny přechází do mezibuněčného prostoru. Krvinky a bílkoviny zůstávají v kapiláře.

KAPILÁRA ARTERIÁLNÍ ČÁSTI



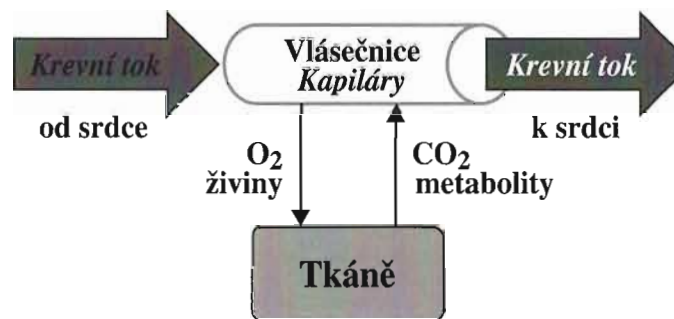
Ve **venózní** části kapiláry je krevní tlak nízký, nižší než osmotický tlak krevních bílkovin – tzv. **onkotický tlak**. Dochází proto k nasávání tekutiny do kapiláry. Při poruše této rovnováhy dochází ke vzniku **otoků (edémů)**.

KAPILÁRA VENÓZNÍ ČÁSTI



- V kapilárách dochází k výrazné látkové výměně, která se uskutečňuje na velké ploše vymezené endoteliální zónou kapilár. Např. plocha kapilár svalů dospělého člověka dosahuje rozměrů 6 400 m².
- V lidském organismu je síť zhruba 10 miliard kapilár, ve kterých je v daném okamžiku soustředěno asi 5 % celkového množství krve.

SCHÉMA OKYSLIČOVÁNÍ A VÝMĚNY LÁTEK MEZI VLÁSEČNICEMI A TKÁNĚMI



- V kapilárách kyslík opouští červené krvinky, prostupuje tenkými stěnami kapilár a difunduje intersticiální tekutinou až k jednotlivým buňkám. Opačným směrem prochází CO₂.
- Z krve do tkáně pronikají rovněž výživné látky, zatímco opačným směrem prostupují odpadní a vedlejší produkty (např. močovina).
- K orgánům, které produkty látkové přeměny a odpadové látky buď vylučují nebo zneškodňují patří: ledviny, plíce, játra, slezina a jiné.

1.2.4. Žilky (venuly)

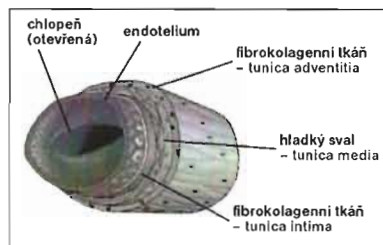
Krev z periferního kapilárního prokrvení se sbírá do žilek a odtud do žil.

1.2.5. Žíly (vény)

Žíly mají tenčí stěny než tepny a obsahují málo svalových vláken. Pouze v žilách končetin, které musí udržet velký hydrostatický tlak krve, mají stěny žil silnější vrstvu svaloviny. V žilách jsou vytvořeny chlopně, které dovolují krvi proudit pouze ve směru od tkání k srdci. Z žil se krev vrací horní a dolní dutou žilou do srdce.



Příčný řez venulou



Véna – schéma

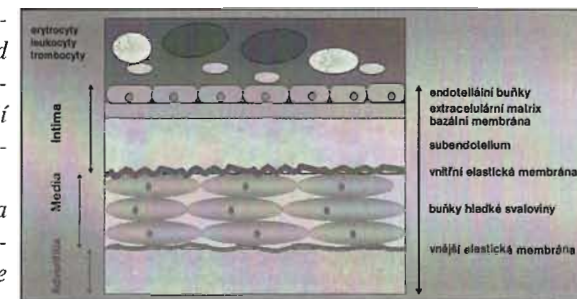
1.3. Struktura cévní stěny

Cévní stěna je tvořena *intimou, médií a adventicií*. *Intima* se skládá z jedné vrstvy endoteliálních buněk uložených na bazální membráně (BM). Cévní endotel vytváří styčnou plochu mezi cirkulující krví a tkáněmi. Monocelulární vrstva tenkých plochých endotelií spočívá na bazální membráně, která spolu se subendoteliální plochou vytváří sekundární bariéru přechodu tekutin, makromolekul a formovaných elementů do extracelulárního prostoru. Subendoteliální bazální membránu tvoří látky známé jako extracelulární matrix (EC). Její hlavní součástí je kolagen typu IV a V, elastin a mikrofibrily spolu s glykoproteiny (GP) a dále lamininem, entaktinem, vitronectinem a von Willebrandovým faktorem. Hlavním proteoglykanem BM je heparan sulfát.



Průřez cévní stěnou

- ☐ *Subintima* malých a velkých cév (prostor pod BM) obsahuje žírné buňky, které syntetizují a skladují heparin, histamin, serotonin.
- ☐ *Média* je ohraničena vnitřním a zevním elastickým listem (lamina) a je tvořena hladkým svalstvem obklopeným pojivovou tkání. Obsahuje kolagen typu I a III, elastická vlákna, glykozaminoglykany, strukturální glykoproteiny. Zodpovídá za elasticitu a tonus cévy. Pomocí elastických vláken a hladké svaloviny zajišťuje změnu průřezu cévy.
- ☐ V *adventicii* jsou fibroblasty (syntéza pojivové tkáně), adipocyty (syntéza lipidů) a nachází se zde i žírné buňky.
- ☐ Za *subendotel* považujeme obecně cévní stěnu mimo vrstvu endotelových buněk.



Podélný řez cévou

U dospělého jedince představuje cévní endotel přibližně 1 % hmotnosti těla a plochu kolem 5 000 m². V porovnání s velkými cévami se podíl plochy endotelu na jednotku krevního objemu v mikrocirkulaci mnohonásobně zvětšuje. *Mikrocirkulace představuje hlavní prostor, ve kterém se působení endotelu uplatňuje.* Neporušený a nesmáčivý endotel je nejlepším protisrážlivým prostředím.

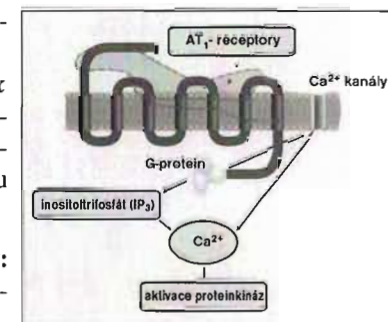
Protisrážlivě působí:

- ☐ *elektronegativní náboj* povrchu endoteliálních buněk
- ☐ *glykosaminoglykany* (heparan sulfát a heparin jsou přímo tvořeny endotelem)
- ☐ *přirozené inhibitory krevního srážení vázané na povrchu endotelu* (např. AT)
- ☐ *receptory membrány* (trombomodulin)
- ☐ *prostacyklin* (je syntetizován v cévním endotelu)

1.4. Změna průsvitu cévy

Hybnost (motilita) cévních stěn může být vyvolána dvěma mechanismy:

- *působky uvolněnými z endoteliálních buněk*
- *neurovegetativním systémem*. Tento systém ovlivňuje reflexně stimulaci nebo inhibici působků, které mohou ovlivnit změnu průsvitu cévy



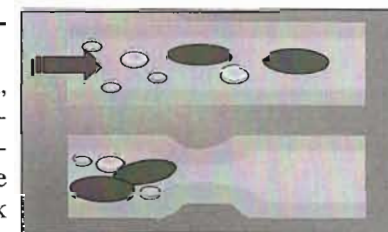
Přenos signálu pomocí AT₁-receptoru

Cévní tonus je regulován různými mechanismy:

- Hlavní úlohu zde hrají systémy angiotensin/renin (působení přes AT₁-receptory – uvolnění Ca²⁺) – vyvolá vazokonstrikci
- Systém oxidu dusnatého (NO), který vyvolá vazodilataci aktivací enzymu guanylátcyklázy.
- ☐ *NO je plynná substance, která se tvoří v endotelu oxidací aminokyseliny argininu – Arg. Snadno difunduje z endotelu do hladkého svalstva, kde aktivuje enzym guanylátcyklázu. Tento enzym ve zvýšené míře produkuje cyklický guanozinmonofosfát (cGMP), který vyvolá snížení koncentrace nitrobuněčného vápníku, sníží se kontrakce a dochází k vazodilataci. NO proniká rovněž do trombocytů, u kterých také snižuje kontraktilní pochody podobným mechanismem, tím tlumí adhezivní a agregační procesy krevních destiček.*

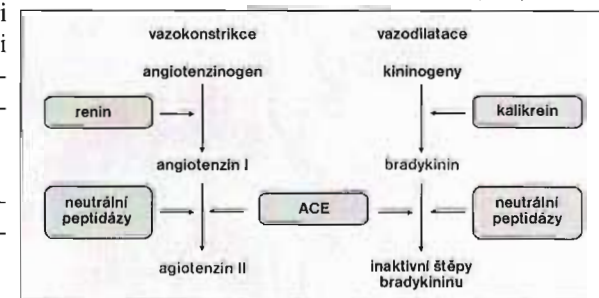
Změna průsvitu cévy nastává při vazokonstrikci nebo vazodilataci:

- ◆ *Vazokonstrikce* má extrémně rychlý průběh, který může velmi efektivně zabránit krvácení hlavně v malých cévách, ale nemůže zamezit krvácení v cévách větších. Zde se uplatní hlavně systémy krevních destiček (adheze a agregace). Vazokonstrikce představuje komplexní interakci mezi nervovým systémem, svalovými buňkami a některými mediátory, jako je serotonin, adrenalin, noradrenalin a jiné.



Normální céva (nahore) a vazokonstrikce (dole)

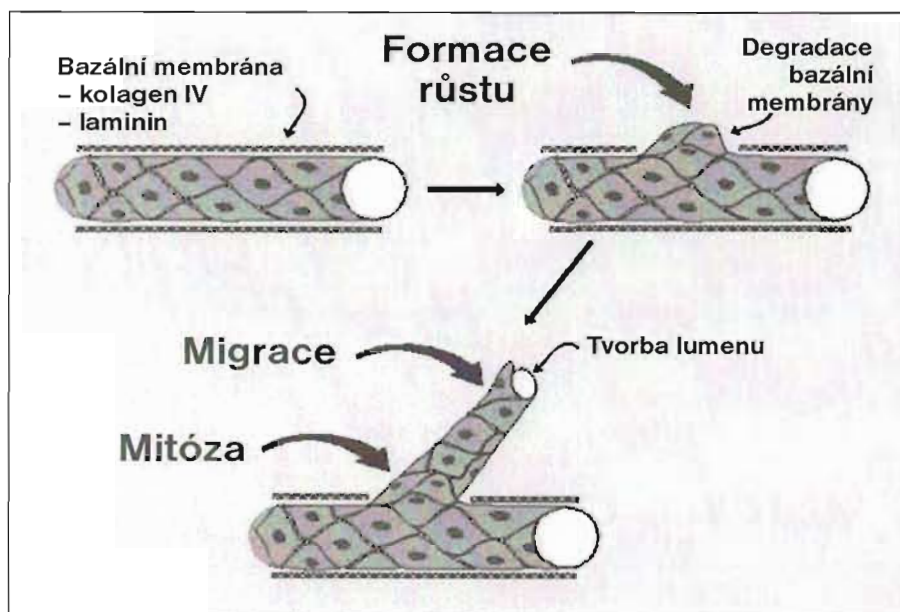
- ◆ *Vazodilatace* je vyvolána prostaglandiny, hlavně prostacyklinem I.



1.5. Endotel a endotelové buňky

Endotel tvoří funkční a dynamický netrombogenní povrch lumina cév a jeho poškození může být příčinou zánětu, trombózy nebo aterosklerózy. U dospělého jedince představuje endotel přibližně 1 % hmotnosti těla a plochu kolem 7 m² (Cines a spol., 1998). Endotel mimo jiné reguluje cévní tonus, průtok krve a permeabilitu kapilár, proliferaci buněk hladkého svalu i hemostázu (Poredoš, 2001). Endotel sehrává klíčovou roli v regulaci hemostázy, jak prostřednictvím exprese vazebných míst pro prokoagulační, tak i antikoagulační činitele na svém povrchu, či tvorbou a uvolňováním řady biologicky aktivních látek (Hudeček a spol., 2004).

ANGIOGENEZE



1.5.1. Vznik a vývoj endotelových buněk

Během embryonálního vývoje se endotelie diferencují z prekurzorových buněk, které jsou pravděpodobně totožné se subpopulací hemopoetických CD³⁴⁺ kmenových buněk. Tyto „hemangioblasty“ se mohou i v dospělosti mobilizovat z kostní dřeně do periferní cirkulace, kde se podílejí na angiogenezi (Poredoš, 2001).

1.5.1.1. Funkce endotelových buněk

Dříve se předpokládalo, že endotelové buňky pouze vytváří inertní vrstvu, která

pokrývá vnitřní povrch všech cév a tvoří fyzikální překážku mezi krví a cévní stěnou. Dnes se předpokládá, že endotelové buňky mají i významné výkonné a regulační funkce, které vyplývají z jejich sekrečních aktivit a schopnosti měnit tyto aktivity v závislosti na signálech přicházejících z kardiovaskulárního, imunitního a nervového systému (Schnitzer, 1997).

Podle současných poznatků se považuje cévní endotel za rozsáhlý a velmi aktivní endokrinní orgán, který zodpovídá za mnohé životně důležité funkce organismu (Ferančík a spol., 1997). Endotelové buňky mají velmi čilou biosyntézu bílkovin. Endotel umožňuje výměnu kyslíku, tekutin a makromolekul mezi krví a tkáněmi, udržuje rovnováhu mezi stimulací a inhibicí růstu cév, mezi vazokonstrikcí a vazodilatací, rozhoduje o adhezi krevních elementů, podílí se na metabolismu lipoproteinů a významně ovlivňuje procesy hemostázy (Davies, 1993). Účastní se rovněž i na metastázování solidních nádorů.

Endotelové buňky plní v organismu tyto funkce:

- zajišťují nesmáčivý (netrombogenní) povrch cév a kapilár
- udržují lumen cév otevřený a průchodný
- podílejí se na regulaci vazomotoriky cév (důležité pro krevní tlak a průtok krve)
- podílejí se na funkci trombocytů a hemostáze

1.5.1.2. Aktivita endotelových buněk

- **selektivní propustnost endotelu pro molekuly a buňky z cirkulace do okolního prostředí.** Endotelové buňky mají schopnost během několika minut reversibilně měnit svoji architekturu a tím i velikost mezery mezi sebou. Touto mezerou pak prochází makromolekuly a buňky do mimocévního prostoru.
- **schopnost endotelu syntetizovat a vylučovat množství mediátorů a cytokinů.** Tyto působky regulačně zasahují do kardiovaskulárního a imunitního systému. Endotelové buňky mají na svém povrchu receptory pro cytokiny, leukoadhezivní molekuly, chemotaktické faktory a neurotransmitery (Esmon, 2000). Endotelové buňky mají **intenzivní metabolismus**. Je u nich rozvinut cyklus kyseliny arachidonové a jsou schopny syntetizovat a uvolňovat substance, které:
 - způsobují změnu průsvitu cévy (*prostacyklin* a *oxid dusnatý*, dříve označovaný jako EDRF: endothelium – derived relaxing factor). Vazodilatace a vazokonstrikce jsou velmi důležité pro udržení krevního srážení pouze v místě poranění, a dále usnadňují rychlé odplavení koagulačně aktivních látek.
 - zabraňují agregaci krevních destiček (*prostacyklin*)
 - aktivují protein C (*trombomodulin*)
 - aktivují nebo inhibují fibrinolýzu (*t-PA*, *u-PA*, *PAI-1*)
 - potencují účinek AT a TM (*heparan sulfát*)
- **na povrchu endotelu je vyvážena řada receptorů.** Jde zejména o receptory pro: trombomodulin – TM, VWF, protein S, trombospodin, fibronectin a tPA.

1.5.2. Znamky poškození nebo aktivace endotelu

Je důležité rozlišit těžší stupeň poškození endotelu od funkčních změn, tj. od zvýšené aktivace endotelu a poruch inhibiční funkce endotelu (Bultas a Karetová, 2004):

■ Poškození endotelu

- Dezintegrace celé buňky – s uvolněním proteinů na jejím povrchu (TM, TFPI, adhezivní proteiny) nebo ze zásobních granúl endotelu (vWF)
- Poškození buněčné membrány – oxidačním stresem nebo proteolytickými enzymy uvolněnými z aktivovaných neutrofilů, spojeným s uvolněním transmembránových proteinů (TM, adhezivní proteiny) a proteinů vázaných v povrchové proteoglykanové vrstvě (TFPI, tPA).

■ Dysfunkce endotelu – porucha funkce se může týkat:

- Antitrombotického působení povrchu endotelu
- Regulace krevního tlaku
- Průtoku krve
- Permeability kapilár

Obecně jsou za známky poškození nebo aktivace endotelu považovány:

- ◆ *t-PA* a *PAI-1* (působky převážně syntetizované endotelem)
- ◆ *plazmatický trombomodulin* – (TM). Při poškození endotelu se z něho proteolytickou degradací tvoří různé nízkomolekulární fragmenty.
- ◆ *plazmatický vWF* (jeho zdrojem je endotel)
- ◆ *TF exprimovaný na povrchu endotelu* (odráží stupeň stimulace endotelových buněk)

Protože endotel při své odpovědi na stimulaci nebo poškození syntetizuje a exprimuje řadu proteinů ovlivňujících hemostázu, není možné určit jediný spolehlivý ukazatel jeho aktivace. Vždy je nutné brát v úvahu vyšetření více parametrů (Visseren a spol., 2000).

V SOUČASNOSTI SE PŘEDPOKLÁDÁ, ŽE ABNORMALITY V AKTIVITÁCH ENDOTELOVÝCH BUNĚK (DYSFUNKCE ENDOTELU) JSOU SOUČÁSTÍ PATOGENEZE TAKOVÝCH CHOROBNÝCH STAVŮ, JAKO JSOU HYPERTENZE, ATERIOSKLERÓZA, DIABETES MELLITUS A SEPTICKÝ ŠOK.

(Luscher a Nol, 1996).

Davies, P. F.: Endothelium as a signal transduction interface for flow forces. Cell surface dynamics. Thromb. Haemost. 70, 1993, s. 124–128.

Esmon, Ch. T.: The endothelial cell protein C receptor. Thromb. Haemost. 83, 2000, č. 5, s. 639–643.

Ferenčík, M., Štvrtinová, V., Hulín, I., Jahnová, E.: Cívný endotel ako endokrinný orgán ovplyvňujúci funkciu kardiovaskulárneho a imunitného systému. Klinická imunológia a alergológia 7, 1997, č. 3, s. 17–24.

Hudeček, J., Paceková, M., Chudej, J., Kubisz, P.: Infekce a hemostáza. Vnitř. Léč. 50, 2004, č. 6, s. 453–461.

Luscher, T. F., Nol, G.: Endothelial function as an end-point in interventional trials: Concept, methods and current data. J. Hypertension 14, 1996, suppl. 2, s. 111–119.

Poredoš, P.: Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin. Appl. Thrombosis/Haemostasis 7, 2001, č. 4, s. 276–280.

Schnitzer, J. E.: The endothelial cell surface and alveolae in health and disease. In: Vascular Endothelium (G. V. R. Born, C.J. Schwartz – eds.) Stuttgart – New York, Schattauer 1997, s. 77–95.

Visseren, F. L. J., Bouwman, J. J. M., Bouter, K. P. et al.: Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. Thromb. Haemost. 84, 2000, č. 2, s. 319–324.

Literatura

Bultas, J., Karetová, D.: Léčba trombotických stavů – kde jsme a kam se ubíráme. Remedia 14, 2004, č. 2, s. 182–200.

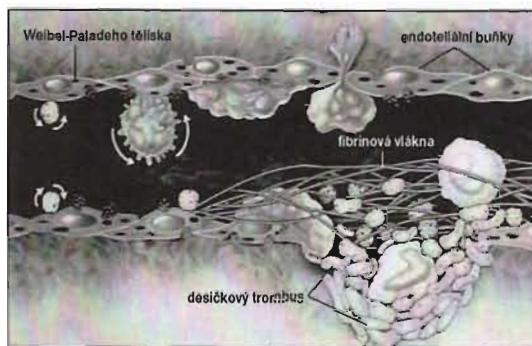
Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A. et al.: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 91, 1998, č. 10, s. 3527–3561.

2. FYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

2.1. Hemostáza (srážení krve)

Pro existenci živého organismu je zcela nezbytné zachování krevního oběhu a přítomnost krve v tekutém stavu. Krev je oddělena od vnějšího prostředí cévní stěnou, která ji chrání před unikáním. Při poškození cévní výstelky se začíná uplatňovat **hemostatický mechanismus**, který přemění tekutou krev na krevní sraženinu, která cévu uzavře. Po určité době se rána postupně zhojí, krevní sraženina se rozpustí a obnoví se původní cirkulace tekuté krve. Systém krevního srážení je tedy velmi důležitý pro zachování integrity (celistvosti) oběhového systému.

Za určitých okolností však může **docházet ke srážení krve i bez narušení integrity cévy** a tehdy může vést porucha krevního srážení ke komplikacím. Vedle patologických okolností, které ovlivňují proces krevního srážení v souvislosti s jinou chorobou nebo nepříznivým stavem, je známa celá řada **vrozených defektů**, které samy mohou ovlivnit procesy krevního srážení a tím i všechny další interakce v nichž může krevní srážení sehrát svou roli.



Tvorba fibrinové zátky v cévním systému

HEMOSTÁZA JE SCHOPNOST ORGANISMU ZASTAVIT KRVÁCENÍ. JDE O KOMPLEXNÍ PROCES, NA KTERÉM SE PODÍLÍ ŘADA SLOŽEK A MECHANISMŮ S ROZDÍLNÝMI VSTUPY A ÚČINKY. JEDNÁ SE O SLOŽITÝ MECHANISMUS SPOJENÝ S CELOU ŘADOU POZITIVNÍCH A NEGATIVNÍCH ZPĚTNÝCH VAZEB.

Požadavky kladené na hemostatické mechanismy se liší podle toho, zda tyto mechanismy probíhají v arteriální nebo venózní části cévního řečiště:

- ☐ Krevní tlak v **cévách** vyžaduje pohotovou interakci koagulačních faktorů s destičkami při tvorbě krevního uzávěru.
- ☐ V **žilách** je naopak důležitá účast inhibitorů plazmatických koagulačních faktorů, které brání růstu krevní sraženiny a její propagaci do cévního řečiště.

Na lokalizaci krevní zátky a především na jejím odbourávání se výrazně podílí fibrinolytické mechanismy.

Některé důležité pojmy

HEMOSTÁZA – KOMPLEXNÍ DĚJ, PŘI KTERÉM DOCHÁZÍ K ZÁSTAVĚ KRVÁCENÍ

HEMOKOAGULACE – SOUBOR MECHANISMŮ, PŘI KTERÝCH SE ZEJMÉNA UPLATŇUJE PLAZMATICKÝ KOAGULAČNÍ SYSTÉM

- ☐ *Proces srážení krve není ve své podstatě fyziologický děj. U zdravého jedince se krev za normálních okolností srážet nemá.*

2.1.1. Hemostáza od narození do dospělosti

Hemostáza je dynamický proces, který z hlediska vývoje organismu prochází různými stádii. Rozlišujeme hemostázu:

- **Fetální a neonatální**
- **Dětského věku**
- **Dospělosti**
- **Ve stáří**

2.1.1.1. Fetální a neonatální hemostáza

- Fetální a neonatální hemostáza je **nevyzrálá s velmi malou rezervní kapacitou** při odpovědi na různé podněty.
- **Koagulační proteiny neprocházejí placentární bariérou.**

Syntéza koagulačních proteinů

- začíná ve fetu kolem **10. týdne**, jejich koncentrace stoupá s prodlužující se dobou těhotenství.
- mezi **19.–29. týdnem** jsou hodnoty faktorů na 1/3 až 1/2 hodnot po narození.
- kolem **30.–38. týdne** na 1/2 až 3/4 hodnot po narození.
- u **zralého novorozence** jsou hodnoty faktorů K – dependentních a faktorů kontaktu na 1/3 až 1/2 oproti hodnotám dospělých. Koncentrace postupně stoupá a přibližně po 6 měsících od narození se blíží hodnotám dospělých. Koncentrace fetálního fibrinogenu odpovídá hladině dospělých (fibrinogen má však sníženou schopnost polymerace).

Laboratorní hodnoty

- **PT:** prodloužen mezi 19.–29. týdnem průměrně na trojnásobek (33 s) hodnoty dospělých (13 s). Ve 30.–38. týdnu poklesne na hodnoty kolem 23 s. Po narození se časy PT ustálí na hodnotách kolem 17 s.
- **APTT** je prodloužen na hodnoty kolem 160 s v 19.–29. týdnu a na 105 s ve 30.–38. týdnu. Po narození se hodnoty pohybují kolem 44 s.
- **Doba krvácení** je po porodu srovnatelná s hodnotami dospělých.

2.1.1.2. Hemostáza dětského věku

V dětském věku se jednotlivé parametry hemostázy postupně **blíží hodnotám dospělých**:

- hodnoty vitamin K – dependentních faktorů a faktorů kontaktu jsou asi o 20 % nižší.
- hodnoty faktorů V, VIII, XIII a vWF jsou podobné jako u dospělých.

Přes veškeré odlišnosti hemostázy v dětském věku od hemostázy dospělých:

- *zůstává zachována hemostatická rovnováha.*
- rovnováha je *velmi křehká* s velmi *nízkou rezervní kapacitou*.
- mírné *rozkolísání* nestabilní rovnováhy může vyvolat závažné komplikace.

V tomto věku se vyskytuje velmi málo trombóz a trombotických příhod (vrozených, či získaných). Rozkolísání rovnováhy vede spíše ke krvácivým komplikacím.

2.1.1.3. Hemostáza pozdního věku

Se *stoupajícím věkem (nad 50 let)* se:

- *zvyšují* signifikantně hladiny některých faktorů (fibrinogen, F VIII, F VIIa).
- u některých faktorů naopak dochází k jejich *snížení* (protrombin, F X, AT).

Významně se ve vyšších věkových skupinách *zvyšují hladiny molekulárních markerů aktivity koagulace a fibrinolýzy* (F IX a X, F 1 + 2, TAT, D-dimery) oproti mladším věkovým skupinám:

- **51–69 let:** zvýšení zhruba o 25 % (D-dimery o 72 %)
- **90–100 let:** zvýšení o 200–300 % (D-dimery o 1 100 %)

2.1.2. Složky hemostázy

Hemostáza je řízená optimální souhrou endoteliální bariéry, trombocytů, aktivních a inhibičních faktorů koagulační kaskády a fibrinolytického systému.

Hlavními složkami hemostázy jsou:

- *cévní stěna* (endotel a subendotelové struktury)
- *složka tkáňová* (uvolněná z porušené tkáně)
- *krvní destičky*
- *činitel plazmatického koagulačního systému* s aktivátory, inhibitory a složkami fibrinolýzy

2.1.2.1. Cévní stěna

Cévní stěna s endoteliální výstelkou hraje v hemostáze důležitou úlohu. Endotel kontroluje jak protrombotické děje v případě poškození cévy, tak udržuje fluiditu krve za fyziologických podmínek. Vedle modulace hemostázy má při poškození cévní stěny význam i vazokonstrikce, která nejen sníží průtok krve a zmenší riziko krvácení, ale umožní lokálně zvýšit protrombotické působky. Do procesu srážení krve zasahuje cévní stěna několika způsoby:

- *schopností vazokonstrikce* – dochází při ní ke stažení cévy
- je *místem interakce* jednotlivých složek všech systémů hemostázy
- je *zdrojem a zásobárnou* některých faktorů, inhibitorů a dalších látek důležitých pro zástavu krvácení.

Na poranění (porušení své celistvosti) reaguje cévní stěna *reflexním smrštěním – vazokonstrikcí*. Změnu průsvitu cévy zajišťuje střední vrstva elastickými vlákny a hladkou svalovinou. Tím se v okamžiku poranění zabrání unikání krve z řečiště. Krev nemůže v postiženém úseku proudit a tedy ani unikat. Vazokonstrikce je pouze dočasná a trvá krátce, ale umožňuje, aby se aktivovaly ostatní systémy. Především dochází k organizaci *primární (destičkové) hemostatické zátky* na obnažené subendotelové pojivové tkáni cévní stěny.

Nejdůležitější složkou z hlediska zástavy krvácení je *endotel* (cévní výstelka) a *subendotelové struktury*. Intaktní endoteliální buňky hrají podstatnou úlohu v primární hemostáze, protože udržují trombocyt v intaktním stavu a brání jeho adhezi na cévní stěnu. Aktivaci destiček kontrolují různými mechanismy:

- vytváří *bariéru mezi krví a tkáněmi* a oddělují tak od cirkulace vysoce trombogenní subendoteliální vrstvy, zejména struktury na bázi kolagenu (kolagen typu III).
- syntetizují *prostacyklin* (PGI₂), který stabilizuje destičku stimulací pomocí cAMP
- trvale *uvolňují NO*, který tlumí aktivaci krevních destiček pomocí cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP)
- produkují *endonukleázy* (zejména CD39/ADPázu), které přeměňují ADP na neaktivní AMP.
- vytváří *negativní elektrostatický náboj*, který nedovolí negativně nabitým trombocytům přilnout k endotelu

Vlastní hemostatické procesy ovlivňuje endotel:

- ☐ cestou *aktivity proteinu C* (trombomodulin se váže na endotelový receptor)
- ☐ tvorbou *heparansulfátů, proteoglykanů* – potencují účinek antitrombinu
- ☐ uvolněním *TFPI* z endotelových buněk

2.1.2.2. Složka tkáňová

Z poranění tkáně a okolních buněk se uvolňuje:

- *ADP* – vyvolává primární agregaci
- *Tkáňový faktor* – způsobí přeměnu protrombinu na trombin

2.1.2.3. Krevní destička

Krevní destičky se zúčastňují hemostatických procesů tím, že zprostředkují řadu **interakcí mezi krví a cévní stěnou**, ale hlavně se uplatňují v primární hemostáze. Dále krevní destičky poskytují **fosfolipidový povrch** pro navázání koagulačních faktorů závislých na vitaminu K přes Ca^{2+} můstky. Navíc se krevní destičky zúčastňují hemostázy tím, že specificky váží faktory VIII a V a jsou schopny přímo aktivovat faktory XII a XI.

2.1.3. Kontakty mezi krevními a endoteliálními buňkami

Aktivace krevních destiček vede k expozici některých aktivovaných receptorů, jako je selektin (CD-62). P-selektin je uvolňován z α -granulí krevních destiček a zabudovává se do jejich membrány. Určité množství p-selektinu přechází do plazmy. Předpokládá se, že p-selektin je důležitým receptorem pro navázání leukocytů.

Kontakt mezi destičkami vyvolává různé reakce v leukocytech, které odpovídají produkci a uvolněním některých cytokinů a adhezivních proteinů. Rovněž je známa stimulační funkce krevních destiček na endoteliální buňky. To vede k expresi adhezivních proteinů (ICAM-1, VCAM-1 a selektinů). K aktivaci endoteliálních buněk dochází i prostřednictvím aktivovaných koagulačních faktorů, interleukinem 1 (IL-1) a tumor nekrotizujícím faktorem (TNF).

Selektiny a adhezivní molekuly zprostředkují navázání endoteliálních buněk a leukocytů, hlavně granulocytů. Kontakt vede u granulocytů k rolování („rolling“) těchto buněk po endoteliální vrstvě, následné adhezi a migraci do tkání.

2.1.4. Úloha některých adhezivních proteinů v hemostáze

FIBRONECTIN (lidský)

- MW: 440 kDa
- Syntéza: v jaterních buňkách
- Koncentrace v plazmě: 300 mg/l

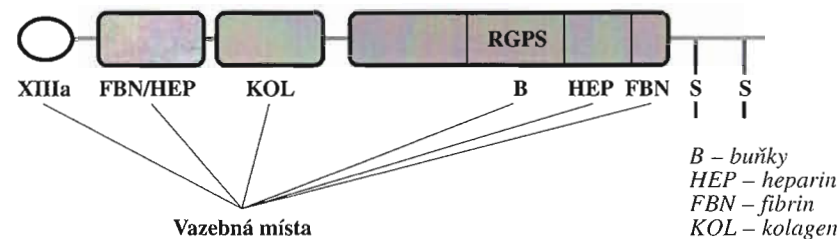
Lidský fibronectin je adhezivní glykoprotein, který se nachází v subendotelu a plazmě. Je syntetizován fibroblasty, endotelem, buňkami hladké svaloviny a epitelem. Je přítomen v plazmě, subendotelu a granulích krevních destiček. Rozlišujeme dva typy fibronectinu:

- Plazmatický
- Buněčný

Fibronectin je sloučenina dvou velmi podobných polypeptidových řetězců spojených disulfidickou vazbou blízko C-konce molekuly. Každá subjednotka je organizována do různých strukturálních domén, obsahujících specifická vazebná místa pro buňky, kolagen, fibrin a glykosaminoglykany.

Funkce fibronectinu: Fibronectin se zúčastňuje v komplexu interakcí s ostatními makromolekulami na ovlivnění buněčných vlastností zahrnujících adhezi, morfologii, migraci, fagocytózu, diferenciaci, hemostázu a antigenní transformace. Zprostředkovává vzájemná buněčná propojení interakcemi mezi buněčnými receptory a složkami extracelulární matrice. Fibronectin obsahuje v jedné části své molekuly sekvenci RGPS (*Arg-Gly-Asp-Ser*) – sekvence umožňující buněčné připojení. RGPS je místem připojení buněčného RGPS receptoru, který je členem skupiny integrinových proteinů. Pomocí RGPS adhezí sekvence váže fibronectin aktivované destičky. Na molekule fibronectinu jsou další vazebná místa pro některé makromolekuly.

STRUKTURA FIBRONECTINU (domény)



Fibronectin zprostředkovává adhezi destiček a jejich rozprostranění, jak v krevních podmínkách, tak i v cirkulaci. Podporuje adhezi krevních destiček k ostatním povrchům (kolagen typu I a III).

VITRONECTIN

- MW: 74 kDa (monomerní forma)
> 100 kDa (multimer)
- Syntéza: v jaterní buňce
- Koncentrace v plazmě: 200–400 $\mu\text{g/l}$

Vitronectin je adhezivní glykoprotein, který se nachází v lidské plazmě, tkáních a extracelulární tekutině. Vitronectin se po přidání do tkáňových kultur snadno mění v multimer. Podporuje připojení a navázání možných variant buněčných typů zahrnujících endotelie, osteosarkomové a melanomové buňky, krevní destičky, fibroblasty, osteoklasty a makrofágy.

Funkce vitronectinu: Vitronectin má ústřední regulační úlohu v systému komplementu, koagulace a fibrinolýzy. Je identický s S proteinem komplementu a inhibuje lýzu buněk zprostředkovanou komplementem.

Fibronectin redukuje rychlou inaktivaci trombinu a F Xa vyvolanou antitrombinem a dále váže a stabilizuje biologickou aktivitu PAI-1 a způsobuje jeho konverzi do latentní podoby nezbytné pro fibrinolýzu.

TROMBOSPONDIN

(anti-angiogenic factor; glykoprotein G)

Trombospondin je velký multifunkční glykoprotein uvolňovaný trombinem z α -granulí aktivovaných krevních destiček. Je rovněž syntetizován a uvolňován fibroblasty, buňkami endotelu a hladkých svalů. Podporuje agregaci krevních destiček a angiogenezi. Hraje důležitou roli ve zpevnění hemostatické zátky. Štěpí se trombinem.

OSTEONECTIN

Je protein vázající měď, který stimuluje angiogenezi a vede ke změně tvaru „zakulacení“ buněk dosud neznámým mechanismem.

TENASCIN

Působí přímo proti adhezivní funkci fibronectinu, ale podporuje adhezi k endoteliálním buňkám.

2.1.5. Mechanismy hemostatických procesů

Po jakémkoli poškození endotelu cévního povrchu (mechanické, chemické, biologické) je zahájen proces srážení kombinovanou adhezivní reakcí, která zahrnuje jak krevní destičky, tak i ostatní buňky nebo látky podílející se na hemostáze. K zástavě krvácení dochází bezprostředně po ataku tvorbou primární hemostatické zátky, která se aktivováním dalších procesů zpevní a po jejím smrštění se vytvoří definitivní krevní zátka.



Fibrinová zátka

MEZI ZÁKLADNÍ MECHANISMY HEMOSTÁZY PATŘÍ:

- ☐ Primární hemostáza
- ☐ Plazmatický koagulační systém
- ☐ Fibrinolytický systém
- ☐ Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy

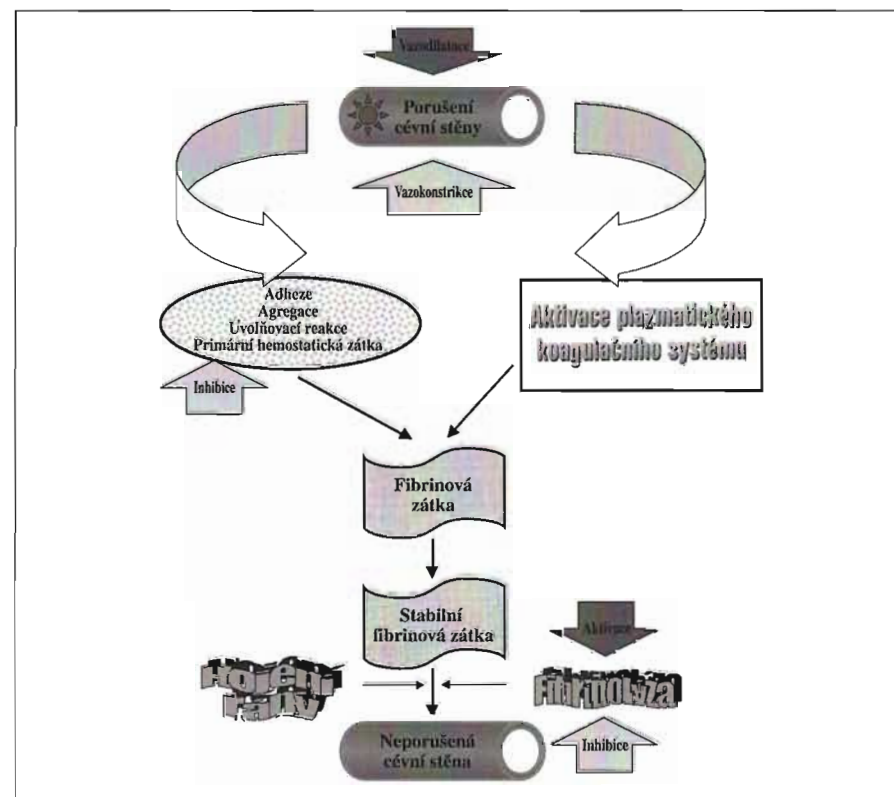
Primární hemostáza, tj. vytvoření destičkové zátky a **sekundární hemostáza**, tj. stabilizace trombu fibrinovou sítí jsou funkce důležité pro udržení integrity cévní stěny a cirkulace krve. V primární hemostáze zaujímají klíčovou roli trombocyty, dominantním momentem sekundární hemostázy je tvorba trombinu, vedoucí k polymeraci fibrinogenu. Oba pochody tvoří jeden navzájem se prolínající celek. Konečnou fází hemostatického děje je fibrinolýza, která umožní rozpuštění trombu, rekanalizaci

poškozeného úseku a obnovení plně funkčního průtoku. Současně s tímto dějem dochází k inicializaci procesů, které vedou k proliferaci poškozených tkání a nakonec k celkovému zhojení poškozené cévy (Colman a spol., 2001).

ČASOVÉ RELACE JEDNOTLIVÝCH PROCESŮ HEMOSTÁZY

Primární hemostáza	Koagulační systém	Fibrinolýza
☐ Vazokonstrikce (bezprostředně)	☐ Aktivace faktorů (sekundy až minuty)	☐ Aktivace fibrinolýzy (minuty)
☐ Adheze destiček (desetiny až jednotky sek.)	☐ Formace fibrinu (minuty)	☐ Lýza sraženiny (hodiny)
☐ Agregace destiček (sekundy až minuty)		

SCHÉMA HEMOSTÁZY

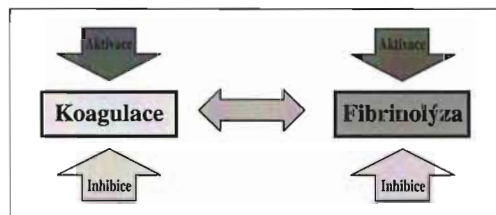


- **Krev v systému in vitro.** Umístíme-li nativní krev mimo cévní řečiště (např. do zkumavky), dochází po čase k samovolnému srážení krve – vzniká krevní koláč. Po centrifugaci se získá krevní sediment a nažloutlá tekutina, které říkáme **sérum**.

2.1.6. Dynamika hemokoagulačních procesů

V lidském organismu dochází pravděpodobně v některých místech k **aktivaci hemostatických procesů**. Tyto aktivační procesy jsou tlumeny inhibitory krevního srážení a pochody, kterými jsou aktivní látky transportovány do tkání. Současně se udržuje rovnováha mezi koagulačním a fibrinolytickým systémem.

Předpokládá se trvalá existence určité koncentrace trombinu v cirkulaci. Jeho biologický poločas se pohybuje mezi 20–30 sekundami a proto se musí určitá část trombinu stále tvořit. Je to přirozené, protože fyziologickou funkcí krevních destiček je uzavírat prostory mezi sousedními endotelovými buňkami i při jejich pouhém funkčním oddálení. Adheze a agregace krevních destiček vyvolá vnitřními podněty nevelkou iniciaci hemostázy, včetně uvolnění trombinu.



Literatura

Colman, R. W., Hish, J., Marder, V. J. et al.: **Hemostasis and Thrombosis**. New York 2001, Lippincott Williams and Wilkins.

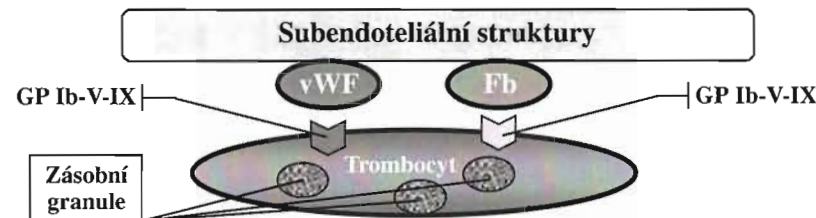
2.2. Primární hemostáza

Primární hemostáza je proces tvorby primární hemostatické zátky, která uzavírá místo narušení celistvosti cévní stěny a zastavuje tak krvácení (Levy–Toledano a spol., 1997). Primární hemostázy se hlavně zúčastňuje:

- **krevní destička**
- **cévní složka**

2.2.1. Průběh tvorby primární destičkové zátky

- Neaktivní cirkulující destičky volně smáčené krevním tokem mají oválný **diskoidní tvar**. Na normální (nenarušenou a nezměněnou) endotelovou výstelku cévní stěny krevní destičky nereagují.
- Jakmile dojde k narušení endotelové výstelky (poranění, zánětlivý nebo degenerativní proces), obnaží se pod endotelem pojivová tkáň. V místě, kde dojde k poškození cévní stěny a obnažení kolagenních vláken v subendoteliálním prostoru, dochází k **adhezi**, tj. přichycení krevních destiček pomocí jejich receptorů glykoproteinové povahy (GP Ia/IIa/IIIa a GP Ib/V/IX) ke kolagenovým vláknům. Spojení je zprostředkováno bivalentními proteiny: vWF nebo fibronectinem – Fb (Colman a spol., 2001).



- Adheze destiček s aktivací receptorů navodí kaskádu biochemických a metabolických pochodů – **aktivace krevních destiček**. Při tomto ději dochází ke změně tvaru, k centralizaci granulí. Proces je provázen uvolněním proagregačních a chemických působků (**sekreční fáze**), zejména PDGF, PF4, β TG, fibrinogenu a dochází i k aktivaci receptorů GP IIb/IIIa.
- Pomocí mezibuněčných signálů se **kontaktují další destičky**, protože aktivované destičky secernují ze svých granulí ADP a metabolismem kyseliny arachidonové vzniká TXA_2 . Obě dvě tyto látky jsou výraznými stimulatory agregace krevních destiček. Váží se na své receptory okolních destiček, aktivují je a ty po aktivaci mění svůj tvar na **kulovitý s výběžky**, přitom dochází ke změně struktury, k aktivaci a obnažení vazebných míst receptorů GP IIb/IIIa.
- Aktivace a změna struktury receptorů umožní vzájemnou vazbu trombocytů bivalentními proteiny – fibrinogenem, vWF a vitronektinem. Dochází k vzájem-

němu **pospojování krevních destiček – agregaci**. Nejprve probíhá **primární agregace**, která bývá hlavně vyvolána ADP uvolněným z porušených buněk a tkání. Z granulí krevních destiček se **uvolní** další proagregační působky (ADP, TXA₂) a trombospodin, který vytvoří stabilizující můstky mezi destičkami a agregace se tak stává nevratnou – **sekundární agregace**.

- Proagregační stimuly aktivují další destičky, dochází k amplifikaci (zesílení) děje a postupně se tvoří tzv. **bílý trombus – destičková zátka**.

- Dalšími důležitými stimuly ve vyvolání agregace jsou kolagenová vlákna a trombin.
- První vlna agregace navozená zevní aktivací destiček vede ke vzniku nestabilního trombocytárního agregátu, druhá vlna (vyvolaná uvolněnými destičkovými působky), vede ke vzniku stabilní zátky, zpevněné fibrinovou sítí.

- Vyvrcholením této fáze primární hemostázy je přesun fosfolipidů, z vnitřní membránové dvojvrstvy (fosfatidylserinu, fosfatidyletanolaminu) do vnějších membránových struktur krevní destičky. Uvolněné fosfolipidy výrazně potencují další fázi procesu hemostázy, tedy polymeraci rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin (Colman a spol., 2001).

- Viskózní metamorfóza způsobí slepení a splynutí trombocytů. Destičkový trombus se zvětšuje a je hlavním hemostatickým mechanismem.

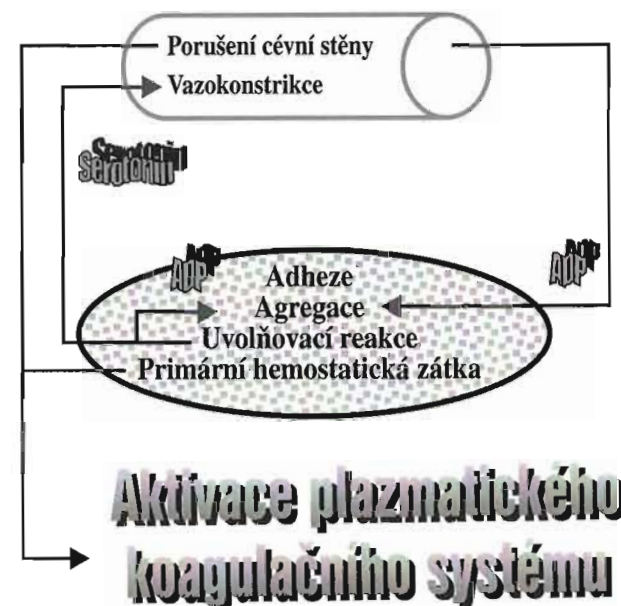
- Během tvorby destičkové zátky se uplatňuje i TF z poškozených perivaskulárních tkání. Na povrchu aktivovaných krevních destiček dochází k tvorbě koagulačně aktivních komplexů a povrch krevní destičky se tak stává přístupný pro interakce s koagulačními faktory, která vyústí nakonec v tvorbu fibrinové zátky. Fibrinová vlákna se objeví až později.



- Do vytvořené fibrinové sítě jsou vychytávány erytrocyty a leukocyty a „bílý“ trombus se postupně mění v „červený“.

V primární hemostáze hrají základní úlohu **glykoproteiny krevní destičky**, především komplexy GP Ib/IX, ale i GP Ia/IIa, GP Ib/IIa a GP IV. Rovněž svoji úlohu sehrávají adhezivní molekuly (vibronektin a fibronektin) a von Willebrandův faktor (Sussman, 1992). Při vytvoření destičkového trombu přebírají klíčovou úlohu GP IIb/IIIa a fibrinogen (Gordon a Chelladurai, 1992). Uplatňují se zde rovněž prostaglandiny, cAMP, trombin a další působky (Nemerson, 1992). Z účasti některých látek např. fibrinogenu a trombinu na krevních destičkách vyplývá vzájemná propojenost primární hemostázy s plazmatickým koagulačním systémem. Podobně i samotné destičky ovlivňují plazmatické koagulační procesy uvolněnými působky, adhezivními molekulami a fosfolipidy (Swars a spol., 1991).

SCHÉMA PRIMÁRNÍ HEMOSTÁZY



Literatura

Colman, R.W., Hirsh, K., Marder, V. J. et al.: **Hemostasis and Thrombosis**, New York 2001, Lippincott Williams and Wilkins.

Gordon, S.G. a Chelladurai, M.: **Non-tissue factor procoagulants in cancer cells**. Cancer and Metastasis Reviews 11, 1992, s. 267–282.

Levy – Toledano, S., Gallet, C., Nadal, F. et al.: **Phosphorylation and dephosphorylation mechanism in platelet function a tightly regulated balance**. Thromb. Haemost. 78, 1997, s. 226–227.

Nemerson, Z.: **The tissue factor pathway of blood coagulation**. Sem. Hematol. 29, 1992, č. 3, s. 170–176.

Sussman, I. I.: **Normal pathways of coagulation**. Sem. Hematol. 29, 1992, č. 3, s. 157–158.

Swars, H., Hafner, H. G., Erbel, R., Ehrental, W., Prellwitz, W., Meyer, J.: **Prothrombin fragment F₁₊₂: early sign of subacute thrombotic occlusion after coronary stent implantation**. Eur. Heart. J. 12, (Suppl), 1991, s. 940.

2.3. Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku **nerozpustného fibrinu**. Dochází postupně k přeměně fibrinogenu na fibrin, dále na fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Polymery fibrinu se pak propojují kovalentními vazbami působením aktivovaného faktoru XIII (XIIIa) – vzniká nerozpustný fibrin. Fibrin vytváří vláknitou síť, ve které se zachycují krevní buňky – tvoří se krevní sraženina tzv. **stabilní fibrinová zátka**, na jejímž stažení (retrakci) v poslední fázi hemostázy a tím i na stažení okrajů rány a její hojení se podílejí krevní destičky (Sussman, 1992).



2.3.1. Historie vývoje názorů na proces hemostázy

Vysvětlit některé procesy, které vedou ke srážení krve, se podařilo až ve 20. století:

SCHMIDT a MORAWITZ 1905

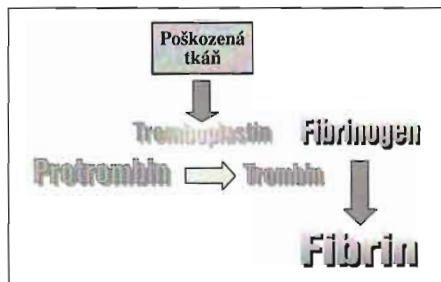
V roce 1905 navrhl Morawitz základní hemostatické schéma, ve kterém se uplatňovaly 4 koagulační faktory (Morawitz, 1905):

- fibrinogen (F I)
- protrombin (F II)
- tromboplastin (F III) – tkáňový faktor
- Ca^{2+} (F IV)

Představa:

Srážení krve probíhá ve dvou fázích:

1. Z poraněné tkáně se uvolní tkáňový tromboplastin (tromboplastin), která za přítomnosti Ca^{2+} aktivuje v plazmě přítomný proenzym protrombin na aktivní enzym trombin.
2. Trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin.



MacFARLANE 1964

MacFarlane rozšířil představu Morawitzovu o další cestu aktivace. V systémech in vitro vytvářel umělé podmínky, při kterých předpokládal odhalení subendotelových struktur. Kontaktem s těmito strukturami při tzv. kontaktní fázi se aktivoval F XII. Tato

aktivní složka (FXIIa) spustila následnou kaskádovitou reakci během které se aktivovaly další faktory (XI, IX a X). Proces srážení MacFarlane chápal jako sérii reakcí, která vedla k tvorbě trombinu a následně k přeměně fibrinogenu na fibrin (MacFarlane, 1964). Složky, které se na hemostáze podílely označil jako **faktory plazmatického koagulačního systému**. Vnější systém u této představy měl menší význam, k jeho aktivaci mělo docházet až při výraznějším poškození tkání a po uvolnění TF.

Rozvoj hemokoagulačních systémů a dějů po roce 1964

Krevní srážení bylo posuzováno jako komplexní děj, ve kterém se plně uplatňují vzájemné interakce buněčných a plazmatických systémů, jež jsou přítomny v krvi a v cévní stěně.

Krevní srážení je dáno především **interakcí mezi systémem krevních destiček, systémem plazmatických koagulačních faktorů, systémem inhibitorů krevního srážení, fibrinolýzou a cévní stěnou**. Kromě těchto základních systémů se na srážení krve podílí i erytrocyty, leukocyty, systémy adhezivních molekul a integrinů a dále produkty lipidového metabolismu. Celý proces vytváří řetězec reakcí založených na vzájemné aktivaci a inhibici, ovlivněný a kontrolovaný více mechanismy.

ÚČELEM TĚCHTO DĚJŮ JE UDRŽENÍ DYNAMICKÉ ROVNOVÁHY, NEBOŽ JEJÍ ROZKOLÁVÁNÍ MŮŽE VÉST KE VZNIKU ZÁVAŽNÝCH KLINICKÝCH PROJEVŮ.

2.3.2. Koagulační faktory

Mezinárodní komise pro názvosloví koagulačních faktorů sjednotila jejich názvy tak, že doporučila označovat jednotlivé faktory římskými čísly, podle časové posloupnosti jak byly objeveny. Současně ponechala i některá synonyma. Aktivované formy se označují indexem a (Př. F X → F Xa).

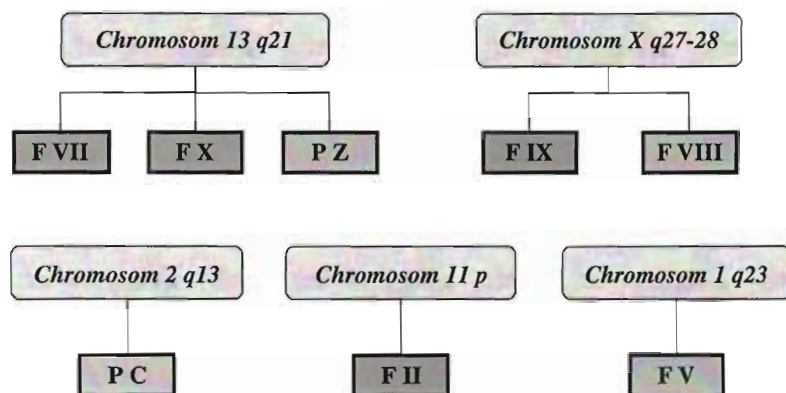
Většina koagulačních činitelů je tvořena v játrech, některé potřebují k syntéze vitamin K. Většina z nich, mimo faktory I a II (fibrinogen, protrombin) se nachází v plazmě ve velmi nízkých koncentracích. Převážná část faktorů, s výjimkou tkáňového faktoru, je v plazmě přítomna v podobě **proenzymu (koenzymu)** a pro svou správnou funkci vyžaduje proteolytické štěpení, při kterém z původního proenzymu vzniká **koagulačně aktivní enzym**. Jediný z faktorů, který koluje v cirkulaci v aktivní formě, ale ve velmi nízkých koncentracích, je faktor VIIa. Většina F VII je přítomna v plazmě v podobě neaktivního proenzymu.

V případě koagulačních faktorů se jedná převážně o glykoproteiny charakteru proenzymů a kofaktorů, které v procesu krevního srážení prodělávají strukturální změny. Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein po rozštěpení vykazují enzymatickou aktivitu a řadí se mezi **serinové proteázy**. Jejich aktivní místo obsahuje serin. Jiné koagulační faktory se po rozštěpení účastní tvorby koagulačně aktivních komplexů a chovají se jako **kofaktory**. Jsou to především faktory VIII, V a vysoko-

molekulární kininogen HMWK (high molecular weight kininogen). **Fibrinogen** tvoří substrát pro trombin, který jej štěpí.

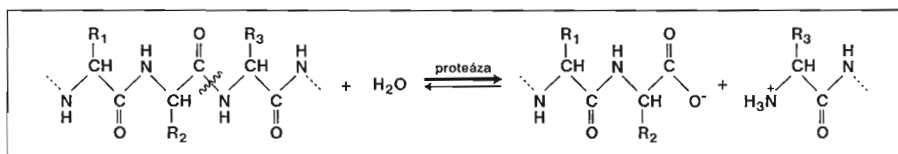
Chybění, pokles, nebo funkční nedostatečnost většiny faktorů (kromě faktoru XII) vedou ke **krvácivým projevům**.

CHROMOSOMÁLNÍ LOKALIZACE KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ



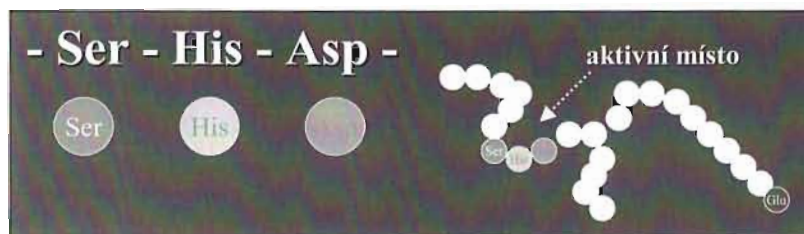
2.3.2.1. Serinové proteázy

Proteázy patří mezi hydrolytické enzymy, které katalyzují štěpení peptidické vazby, tedy vazby C–N.



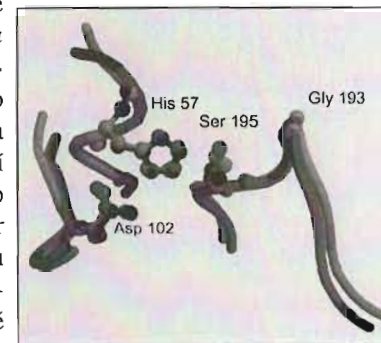
Serinové proteázy mají v aktivním místě aminokyselinu serin. Obsahují tzv. **katalytickou třídu**:

Serin–Histidin–Kyselina aspartamová (Ser–His–Asp)

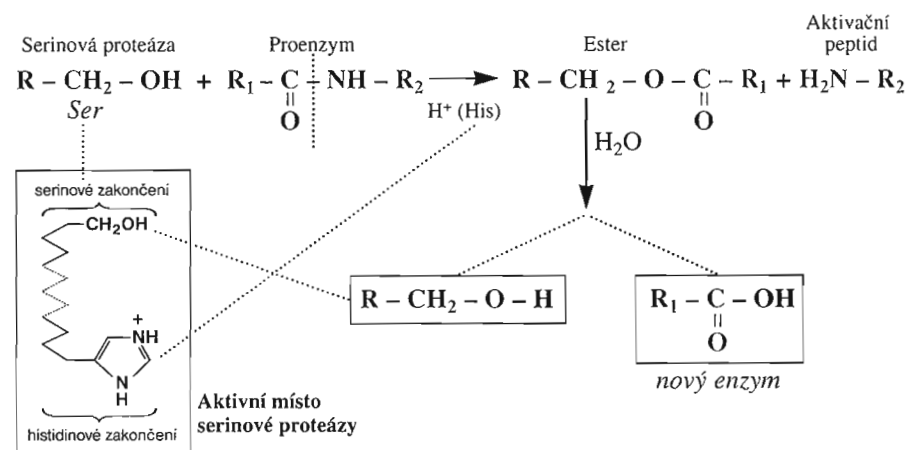


Funkce aktivního místa serinových proteáz

V aktivním místě serinové proteázy jsou uloženy aminokyseliny s reaktivními postranními řetězci, které vzájemně reagují se substrátem. **Pro katalytický účinek enzymu mají zejména význam postranní řetězce serinu (Ser) a histidinu (His)**. Histidin slouží jako donor a akceptor protonů. Karboxylová skupina Lys nebo Arg na molekule proenzymu, vytvoří nejprve s hydroxylovou skupinou serinového zbytku v aktivním místě serinové proteázy ester a odštěpí se aktivační peptid. Hydrolyzou esteru se uvolní produkt (většinou další serinová proteáza) a regeneruje se serin v aktivním místě enzymu, který provedl proteolýzu.



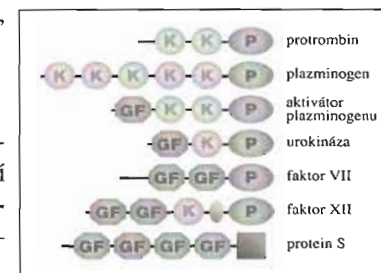
Faktor VII a – aktivní místo



K serinovým proteázám se řadí bílkoviny a glykoproteiny z oblasti:

- **Plazmatických faktorů** – faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein.
- **Fibrinolýzy** – plazminogen, t-PA, u-PA.
- **Serpinů** – protein C

Faktory II, VII, IX a X, XI, XII a dále protein C a S mají velmi podobnou molekulární strukturu. Jedná se o **faktory závislé na K vitamínu**. Bílkovinné řetězce těchto molekul bývají ukončeny glutamovou kyselinou.

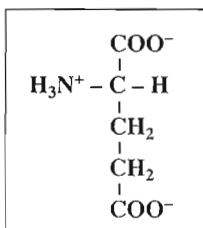


Struktura některých serinových proteáz (domény: P – proteázová, GF – růstového faktoru, K – Kring)

Syntéza prekurzorů (proenzymů) serinových proteáz

Část molekuly glutamové kyseliny zvaná též „*gla oblast*“ je důležitá k plné funkci těchto faktorů a navázání Ca^{2+} . Jedná se o tu část molekuly kyseliny glutamové, ve které je tzv. *γ*-karboxy-glutamové zakončení. V přítomnosti vitamínu K je tato část glutamové kyseliny karboxylována enzymem *γ*-glukarboxylázou.

Kyselina glutamová (Glu)

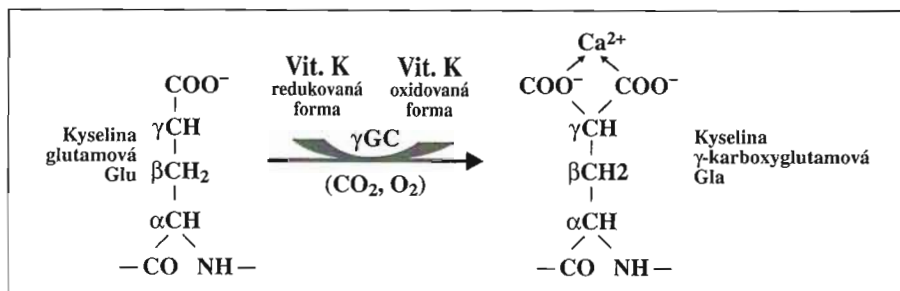


γ-glukarboxyláza je enzym uložený v membráně endoplazmatického retikula. Obsahuje 7 transmembránových hydrofóbních sekvencí a katalytickou doménu o délce 400 aminokyselin.



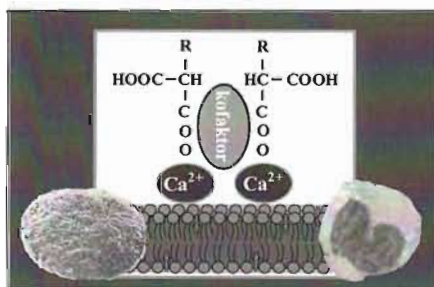
γ-glukarboxyláza (GC)

KARBOXYLACE GLUTAMOVÉ KYSELINY V *γ*-OBLASTI



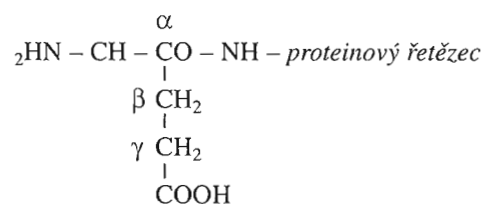
Druhá karboxylová skupina je nezbytná k vazbě na fosfolipidové struktury přes vápníkové můstky při tvorbě koagulačně aktivních komplexů, u kterých dochází k seskupení aktivního faktoru, neaktivního faktoru (zastupuje roli substrátu) a ko-faktoru. Fosfolipidovou matrix vytváří membrány aktivovaných buněk (většinou se jedná o monocyty a trombocyty).

V případě jaterní poruchy, snížení hladiny vitamínu K, anebo při antikoagulační léčbě preparáty kumarinového typu ke karboxylaci nedochází. Místo aktivních faktorů zůstávají koagulačně neaktiv-

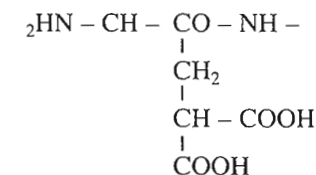


Vazba aktivované a neaktivované formy faktorů na fosfolipidovou matrix

ní tzv. **PIVKA** (**P**rotein induced by **v**itamin **K** absence or vitamin **K** antagonists) faktory.



PIVKA faktor



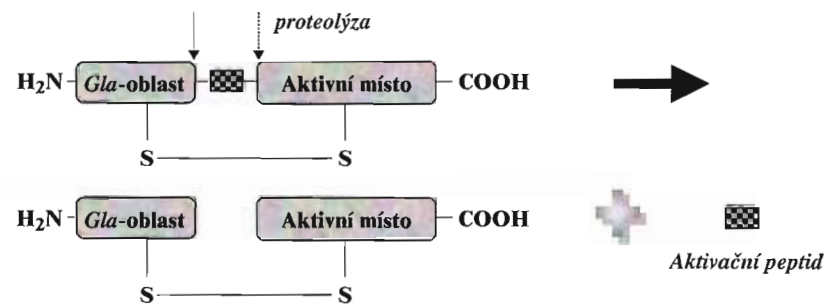
Koagulační faktor

□ Mimo *γ*-karboxylaci probíhají ve faktorech i jiné post-translační mechanismy, jako je fosforylace, sulfatace a jiné.

Aktivace serinových proteáz

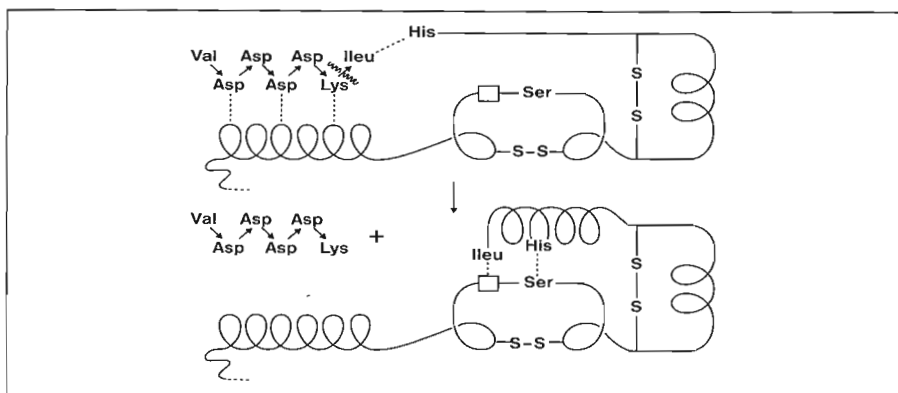
Prostorová struktura (konformace) enzymu je důležitá pro vznik aktivního centra. Tato prostorová struktura určuje i specifitu vazby pro substrát.

Aktivačním procesem se většinou rozumí *limitovaná* (částečná) *proteolýza*, při které je molekula rozštěpena za vzniku dvouřetězcové bílkoviny spojené disulfidickými můstky nebo nekovalentní vazbou. Proteolýza vyvolaná serinovými proteázami probíhá většinou v místě argininové (Arg) nebo lysinové (Lys) vazby. Vzniká látka s enzymatickou aktivitou serinové proteázy. Aktivní centrum je poblíž C- oblasti molekuly.



□ Nespecifická aktivace koagulačních faktorů může nastat i vlivem proteáz mikroorganismů, tumorózních buněk, leukocytů nebo proteáz uvolněných z poškozené tkáně.

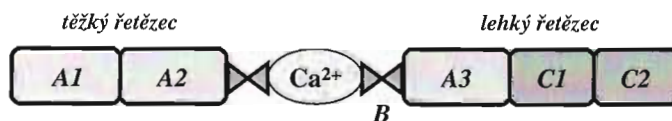
ODŠTĚPENÍ AKTIVAČNÍHO PEPTIDU A VZNIK AKTIVNÍHO MÍSTA



2.3.2.2. Kofaktory

Nachází se ve formě **plazmatické** (Faktory V a VIII, HMWK, Protein S) nebo **vázané do buněčné membrány** (TF). TF nepotřebuje být aktivován. Plazmatické kofaktory jsou aktivovány. Při aktivaci nedochází ke spojení disulfidickými, či nekovalentními vazbami, ale kovalentní vazbou přes Ca^{2+} . Faktory V a VIII jsou inaktivovány rozštěpením molekuly v systému proteinu C.

STRUKTURA FAKTORU V a



2.3.2.3. Substráty

Fibrinogen je substrátem v enzymové reakci, při které jej trombin štěpí na fibrin.

- **Doména** – je rozsáhlý polypeptidový řetězec vytvářející záhyby, který má charakter samostatné jednotky v molekule dané sloučeniny (bílkovina, glykoprotein a jiné).

2.3.2.4. Koagulačně aktivní komplexy

Membránové struktury

Většina hemokoagulačních reakcí probíhá na **makroskopickém povrchu a ne v roztoku**. Aktivační fosfolipidové povrchy poskytují poškozené cévní stěny (tkáň, monocyty), subendoteliální struktury, aterosklerotické pláty nebo membrány krevních destiček. Uplatňují se však i třírozměrné struktury, zejména jde o mikročástice

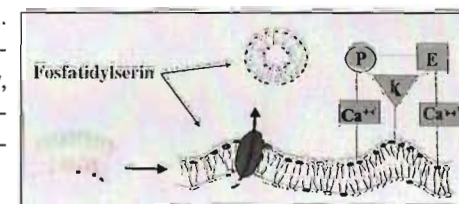
(**mikrovehikuly, mikropartikule**) uvolněné z membrán krevních destiček. Tyto drobné membránové struktury nejsou zjistitelné v běžných analyzátoch krevních částic.

V tomto strukturálním uspořádání vznikají **koagulačně aktivní komplexy**, které mohou aktivovat další složky koagulačního procesu. Na vzniku koagulačně aktivního komplexu se podílí:

- **Enzymy** – většinou jde o serinovou proteázu (poskytuje aktivní místo)
- **Substráty** – většinou jde o proenzym, který se proteolýzou aktivuje
- **Kofaktory** – většinou jde o struktury složené ze dvou řetězců, které jsou vzájemně propojeny Ca^{2+} můstkem. Tyto složky vytváří sterický blok a napomáhají natočit a udržet proenzym v katalytickém místě serinové proteázy.
- **Ionty Ca^{2+}** – umožňují vyvázání karboxylových skupin enzymů a proenzymů na záporně nabitý fosfolipidový povrch.
- **Fosfolipidové povrchy** – fosfolipidové membrány nebo jejich zbytky, které mají ve vnější povrchové vrstvě záporně nabitý fosfolipidy (fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin).



Mikročástice uvolněné z krevních destiček



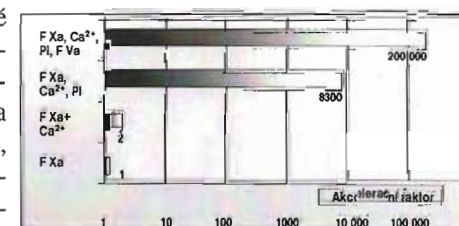
Vazba faktorů na fosfolipidové povrchy – červeně vyznačen fosfatidylserin (P – proenzym, E – enzym, K – kofaktor)

Vznik koagulačně aktiv. komplexů

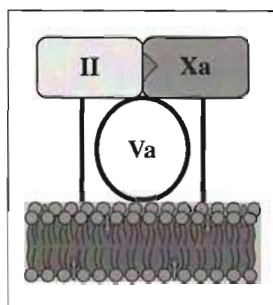
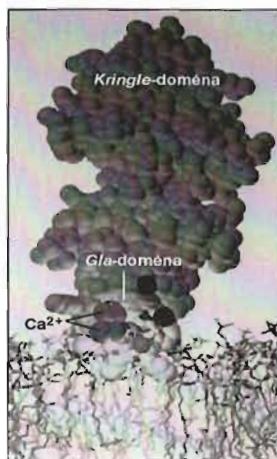
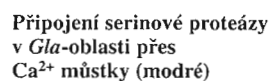
Zdvojená karboxylová skupina umožňuje následné připojení proteáz k fosfolipidovému povrchu buněčné membrány, prostřednictvím vápníkových můstků (Ca^{2+}). **Enzymový kofaktor** (TF, VIIIa, Va) specificky váže na vitamin K závislou proteázu (F VIIa, F IXa, F Xa). Kofaktor zvyší afinitu enzymu k fosfolipidovému povrchu a zvyší katalytickou rychlost enzymu.

Kofaktory vykazují mnohem vyšší afinitu k fosfolipidovým povrchům než enzymy. Enzym vzhledem ke své malé afinitě k povrchu se váže přesně v místě navázání kofaktoru na fosfolipidový povrch (Waxman a spol., 1992).

Při katalytické reakci se nejprve vytvoří komplex [enzym . substrát], v našem případě komplex [serinová proteáza . proenzym]. Za vazbu substrátu jsou odpovědné iontové vztahy a valence reaktivních skupin postranních řetězců. Serinová proteáza pomocí svého aktivního místa proteolyticky štěpí substrátovou část proenzymu, odštěpí se aktivační peptid a z proenzymu vzniká další serinová proteáza.



Vliv jednotlivých složek komplexu protrombinázy na rychlost reakce (PI – fosfolipid)



V koagulačně aktivním komplexu dochází ke štěpení neaktivovaného faktoru za vzniku koagulačně aktivní složky

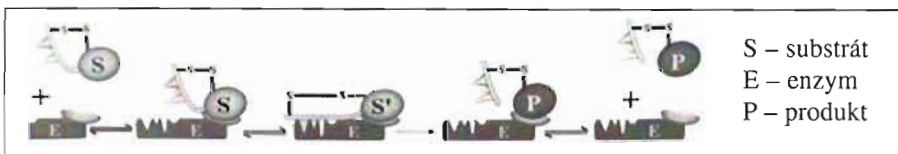
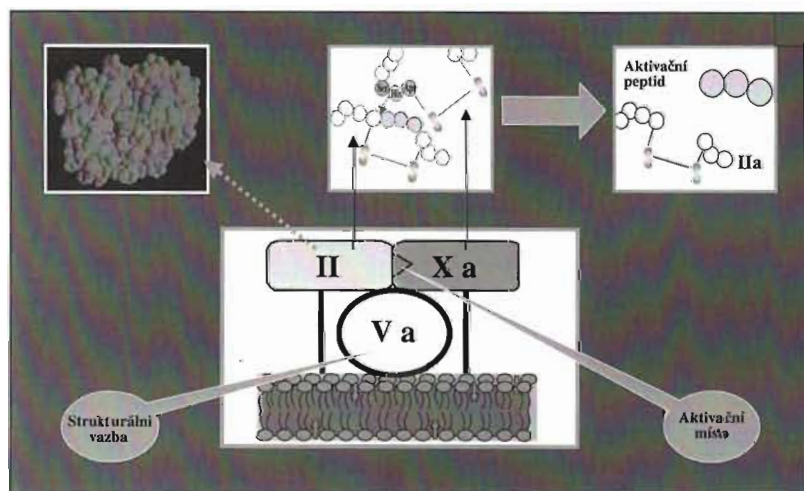
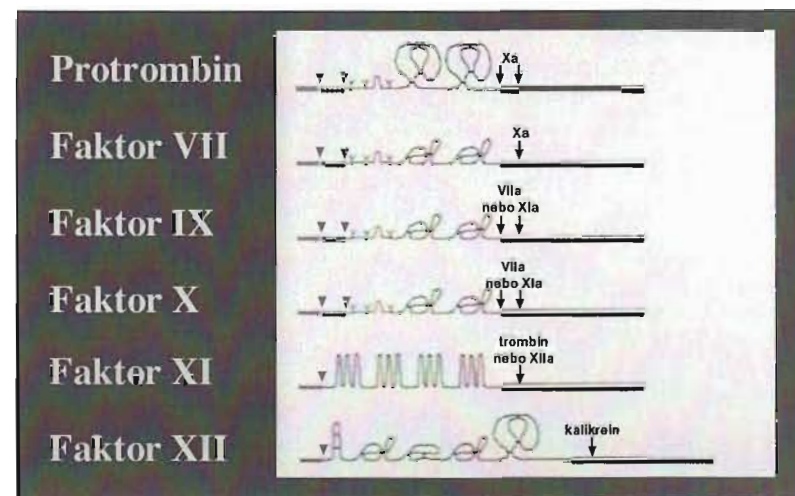


SCHÉMA AKTIVACE FAKTORŮ
A VZNIK KOAGULAČNĚ AKTIVNÍCH KOMPLEXŮ



NĚKTERÉ SERINOVÉ PROTEÁZY A MÍSTA JEJÍ AKTIVACE



PLAZMATICKE PROTEINY – MW A KONCENTRACE V PLAZMĚ

Protein	MW (kDa)	Konzentrace v plazmě (mg/l)	Konzentrace v plazmě (mmol/l)
Fibrinogen	330	3 000	9,09
Protrombin	72	90	1,388
Faktor V	330	10	0,03
Faktor VII	50	0,5	0,01
Faktor VIII	330	0,1	0,003
Faktor IX	56	5	0,08928
Faktor X	58,8	8	0,13605
Faktor XI	160	5	0,031
Faktor XII	80	30	0,375
Faktor XIII	320	10	0,03125
Protein C	62	4	0,0645
Protein S (volný)	69	10	0,1449
Protein Z	62	2,2	0,0355
Prekalikrein	86	50	0,5814
HMWK	110	70	0,6363
Fibronectin	450	300	0,667
Antitrombin	58	290	5
Plazminogen	90	216	2,4
Urokináza	53	0,1	0,001887
Heparin kof. II	66	90	1,3636
α-2-antiplazmin	63	60	0,9524
PCI	57	4	0,00702
α-2-makroglobulin	725	2 100	2,8966

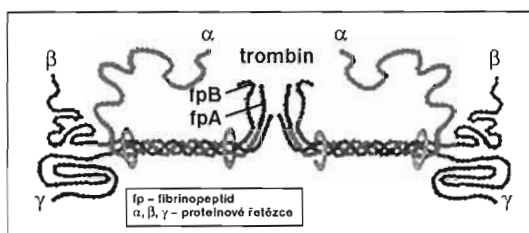
2.3.3. Popis, struktura a funkce plazmatických koagulačních faktorů

FIBRINOGEN (FAKTOR I)

- ❑ MW: 340 000
- ❑ Biologický poločas: 64–96 hodin
- ❑ Fyziologické hodnoty v plazmě: 2–4 g/l (8,8 $\mu\text{mol/l}$)

Fibrinogen je nejlépe charakterizovaný glykoprotein přítomný, jak v plazmě, tak i v granulích krevních destiček. Je syntetizován v játrech (Shafer a Higgins, 1988; Blombäck, 1996).

Struktura molekuly: Molekula fibrinogenu tvoří dimer, který se skládá ze 3 rozdílných párů polypeptidových řetězců α , β a γ , které jsou vzájemně vázány disulfidickými můstky. Důležitou úlohu v udržení struktury fibrinogenu hrají Ca^{2+} ionty.



Struktura molekuly fibrinogenu

Specifická vazebná místa na molekule fibrinogenu jsou často kryptická (skrytá) a jsou dostupná až po konformační změně molekuly a to buď přeměnou fibrinogenu na fibrin nebo odštěpením fibrinopeptidů B, případně vazbou na pevný povrch. Fibrinogen má 3 vazebná místa pro navázání Ca^{2+} . Jsou-li tato místa obsazena, je fibrinogen chráněn před štěpením plazminem. Cukerné složky navázané na α a β jsou nezbytné při polymerizaci fibrinových vláken. Jednotlivé řetězce molekuly fibrinogenu jsou kódovány geny na 4. chromosomu. Dále se fibrinogen váže na membránový bílkovinný komplex krevní destičky GP IIb/IIIa. Mimo tuto vazbu se fibrinogen váže i na některé další integrované i neintegrovane receptory (α 130 kDa receptor, CD 44 povrchový receptor, kalretikulin, 92–94 kDa receptor, ICAM-1) fibroblastů a endoteliálních, nádorových, hemopoetických, lymfoidních a mezoteliálních buněk a ovlivňuje jejich proliferaci, adhezi, agregaci, migraci a také uvolňování vWF.

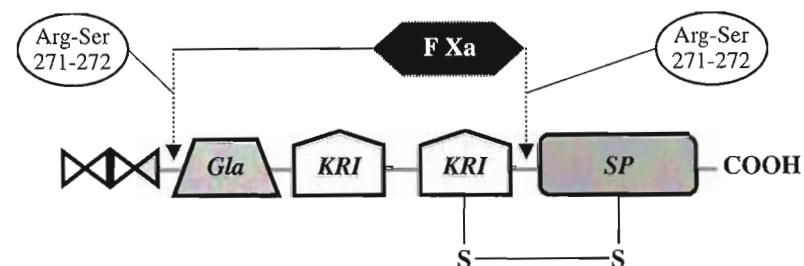
Funkce: Fibrinogen je substrátem nejen pro trombin, ale i pro plazmin (Hosseson, 1997). Kromě toho může být fibrinogen štěpen i jinými tzv. trombinu podobnými enzymy, jedná se především o hadí jedy (např. reptiláza). Fibrinogen je rovněž hlavní krevní bílkovinou podporující agregaci krevních destiček prostřednictvím interakce s destičkovými receptory na sousedících destičkách (GP IIb/IIIa).

- ❑ Fibrinogen je vychytáván trombocyty a shromažďován v jejich α -granulích.
- ❑ Minimální plazmatická koncentrace fibrinogenu pro hemostázu je 0,5–1,0 g/l.
- ❑ Fibrinogen patří mezi proteiny akutní fáze (cévní poškození, chirurgický zákrok, akutní infekce, infarkt myokardu). V průběhu několika hodin po navození těchto stavů dojde ke zvýšení syntézy fibrinogenu v játrech a jeho hladina se v průběhu 3–5 dnů zvýší na 3–5násobek výchozí hodnoty. Po této době se vrací k normálu.

PROTROMBIN (FAKTOR II)

- ❑ MW: 72 kDa (Trombin 37 kDa)
 - ❑ Biologický poločas: 48 hodin
 - ❑ Koncentrace v plazmě: 100–200 mg/l 1,4 $\mu\text{mol/l}$ aktivita: 0,7–1,3
- Protrombin je složený z 532 aminokyselin. Vzniká v játrech za přítomnosti vitamínu K. Účinkem protrombinázy se mění na trombin (FIIa).

STRUKTURA F II (domény)



GLA – oblast zahrnující γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny

KRI – „Kringel“ doména

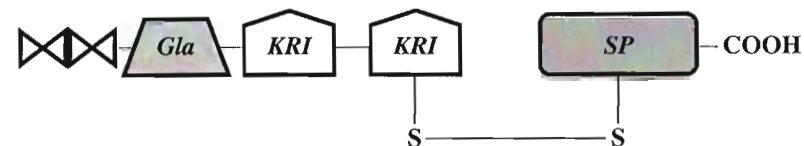
SP – serinová proteáza

✂ aktivací peptid uvolněný po přeměně zymogenu na aktivní serinovou proteázu – fragmenty 1 a 2

Přeměna protrombinu na trombin

Faktor Xa štěpí protrombin v místě Arg³²⁰ za vzniku **meizotrombinu**:

STRUKTURA MEIZOTROMBINU (domény)

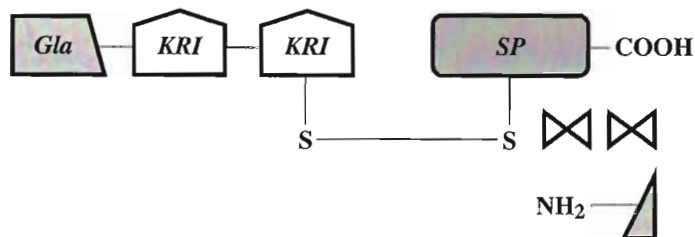


- Faktor Xa dále štěpí meizotrombin v místě Arg²⁷¹ a dochází k uvolnění fragmentu F1 a F2, současně α -trombin štěpí meizotrombin:

- v místě Arg¹⁵⁵: oddělí se fragment 1 a fragment 2

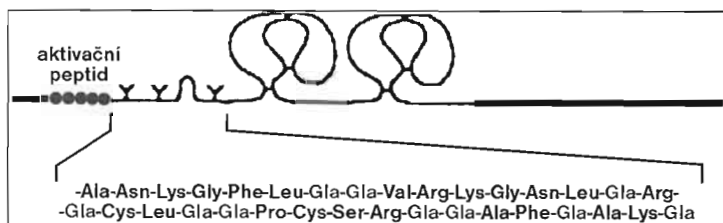
- v místě Arg²⁸⁴: oštěpí se malý fragment s N koncem (272–284)

STRUKTURA α -TROMBINU (domény)



Trombin vznikající touto cestou se nazývá α -trombin. Dalším štěpením B řetězce trombinu autoproteolýzou nebo trypsinem vznikají β trombin (řetězec B se štěpí v místě Arg 71 nebo 73 na B1 a B2 řetězec) a γ trombin (B2 řetězec se dále štěpí v místě Arg 154 na B5 a B4 řetězec).

SCHÉMA MOLEKULY PROTROMBINU – GLA-OBLAST



Funkce trombinu: Trombin působí jak koagulačně, tak i inhibičně. Nejdůležitější aktivity trombinu:

- ◆ štěpí fibrinogen na fibrin
- ◆ limitovanou proteolýzou aktivuje faktory V a VIII
- ◆ aktivuje faktory IX a XIII
- ◆ je významným aktivátorem krevních destiček
- ◆ na endotelu posiluje tvorbu a sekreci t-PA
- ◆ po navázání na trombomodulin aktivuje protein C a TAFI

Trombin se dále uplatňuje i v procesech zánětu a hojení.

TKÁŇOVÝ FAKTOR (TF)

(Tissue Factor – TF, -CD142, *dříve*: tkáňový tromboplastin, F III)

□ MW: 37 kDa

TF je membránový protein, který je exprimován na povrchu řady buněk. Je součástí membrán endoplazmatického retikula. Extrahuje se z tkáně s největší aktivitou v mozku, v plicích, placentě, ale i v jiných orgánech.

Výskyt TF a jeho stimulace

TF je ve velkém množství exprimován na subendoteliálních buňkách (buňky ne-soucí TF) v subendoteliálních strukturách (Scarpati a spol., 1987). Exprese TF na fibroblastech a svalových buňkách umožňuje aktivovat hemostázu okamžitě po porušení integrity cévní stěny (Rickles a spol., 1995). Makrofágy a hladké svalové buňky uvolňují TF do okolí a jsou pravděpodobně zdrojem extravaskulárního TF zjištěného v ateromatózních plátech (Giesen a Nemerson, 2000). Apoptóza provázená změnami v membráně vede ke zvýšení aktivity TF.

TF se za normálních okolností na buňkách krevní cirkulace nevyskytuje. Endotelové buňky a leukocyty normálně tkáňový faktor neexprimují. Různé stimuly (růstové faktory, endotoxin, cytokiny, TNF, IL-1) vedou in vivo ke zvýšení syntézy TF v buňkách, které ho běžně produkují, ale současně k jeho expresi buňkami, které jej za fyziologických podmínek neprodukují (endotelové buňky, monocyty aj.). In vitro se zjišťuje TF prakticky ve všech buněčných kulturách.

Aktivita tkáňového faktoru byla zjištěna v plazmě (Osterud a spol., 2000; Ozcan a spol., 2001). Zatím nebyla potvrzena schopnost granulocytů generovat aktivitu nebo antigen TF. **Za zdroj TF v cirkulující krvi jsou považovány monocyty.** TF uvolněný ze stimulovaných monocytů může vyvolat trombózu u chronických infekcí, u gram negativní sepsy, u endokarditidy, nestabilní anginy pectoris, ale i při operacích a traumatech (Osterud a spol., 2000). U nádorových onemocnění jsou monocyty stimulovány nádorovými buňkami k expresi TF. Hladinu TF v krvi mohou zvyšovat i nádorové a leukemické buňky (Rickles a spol., 1995). Některé buňky jsou po stimulaci schopné odštěpovat tzv. vezikuly obsahující TF. V podstatě jde o „prokoagulační mikročástice“, které vznikají při rekonstrukci a odštěpení membrány z celé řady buněk po jejich aktivaci nebo apoptóze (Greer, 2001). Tyto mikročástice obsahují některé prokoagulační fosfolipidy (fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin). Mikročástice odštěpené z trombocytů, monocytů a endotelových buněk souvisí pravděpodobně s protrombotickými stavy, jako je heparinem indukovaná trombocytopenie, paroxysmální noční hemoglobinurie a hemolyticko uremický syndrom (Greer, 2001; Osumi a spol., 2001).

Složení a zařazení TF

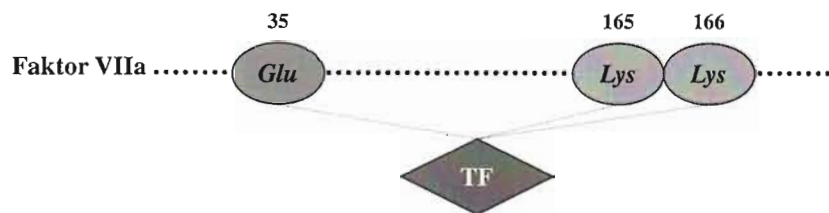
Lidský TF je integrální transmembránový glykoprotein o 263 aminokyselinách. Patří do 2. třídy rodiny cytokinových receptorů. Jeho koagulační aktivita kolísá podle druhu tkáně a způsobu přípravy.

Struktura molekuly: TF obsahuje extracelulární část (AA: 1–219), hydrofóbní transmembránovou část (AA: 220–242) a C-terminální cytoplazmatickou oblast (AA: 243–263). V extracelulární doméně má 3 glykosylovaná místa (Waxman a spol., 1992). Molekula je vysoce asymetrická. Extracelulární část sestává ze dvou domén typu fibronektinu III se dvěma fosforylačními místy. Tato část má význam při tvorbě koagulačně aktivního komplexu [TF · VIIa]. TF je pevně zakotven ve fosfolipidové membráně hydrofóbní částí své molekuly. Tím se vysvětluje nerozpust-

nost jeho molekuly. TF se snadno váže na membránový povrch nebo fosfolipidové vesikuly, což zajišťuje jeho aktivitu v suspenzi.

Funkce: TF nevyžaduje aktivizační kroky a není známo, že by měl enzymatickou aktivitu. Jakmile dojde ke kontaktu s krví, slouží TF jako vysoce afinitní receptor pro F VIIa a vytváří s ním v přítomnosti Ca^{2+} na fosfolipidovém povrchu komplex [TF . VIIa] v poměru 1:1, který dále vyvolá přeměnu F X na F X_a (Rapaport a Vijaya Mohan Rao, 1995). TF se váže u F VIIa na Lys¹⁶⁵, Lys¹⁶⁶ a Glu³⁵.

KOAGULAČNĚ AKTIVNÍ KOMPLEX [TF . VIIa]



Neaktivní faktor VII může také tvořit komplex s TF, který je proteolyticky neaktivní. Komplex [TF . VIIa] je navíc důležitým aktivátorem faktoru IX (Osterud a Rapaport, 1977). TF působí jako buněčný receptor pro F VIIa a současně zvyšuje jeho afinitu k substrátům.

Inhibice [TF . VIIa]

Inhibice tohoto komplexu je zajišťována dvěma cestami:

- **TFPI** – v procesu hemostázy probíhá inhibice [TF . VIIa] ve dvou stupních. Nejprve se váže F Xa k TFPI na Arg reaktivního místa druhé domény Kunitzova typu za vzniku komplexu [Xa . TFPI]. Ve druhém stupni se F VIIa váže na Lys reaktivního místa první domény za vzniku kvarterního komplexu [Xa . TFPI . VIIa . TF], který už není katalyticky aktivní. Úloha třetí domény není zatím známa.
- **AT** – v přítomnosti heparinu velmi rychle vyvazuje F VIIa vázaný na TF za vzniku ternárního komplexu [AT . heparin . VIIa]. TF bez vazby na VIIa postrádá koagulační aktivitu.

AT tedy na rozdíl od TFPI umožňuje vyvázání F VIIa z vazby na TF a tím uvolňuje TF pro vázání dalších molekul F VIIa. **TFPI** se z těchto důvodů považuje za **primární regulátor katalytické aktivity [TF . VIIa]** v procesu hemostázy.

Klinický význam: TF hraje významnou úlohu při vzniku hyperkoagulačních stavů a pravděpodobně i u většiny trombotických nemocí. Tkáňový faktor má i některé nehemostatické funkce. Patří k nim jeho účast v angiogenezi, aterogenezi, při zánětech a při růstu a metastázování tumorů. Tyto funkce pravděpodobně souvisí s působením TF v úloze signálního receptoru, který zprostředkovává přesun buněčného vápníku, aktivaci enzymů a expresi některých genů.

Neaktivní (kryptogenní) forma TF

V membráně buněk hladkého svalstva byla zjištěna neaktivní tzv. „kryptogenní“ forma TF. Tato forma váže F VIIa, ale vzniklá struktura nevykazuje koagulační aktivitu. Kryptogenní TF představuje tzv. latentní pool koagulačního TF. Předpokládá se, že příčinou jeho inaktivity, přestože má kompletní expozici a zakotvení v membráně je buď chybné expozice fosfatidylserinu a fosfatidyletanolaminu, nebo sterická zábrana (vyvolaná sousedními molekulami), která brání plné exprimaci TF na membráně. Je možné, že po expozici kolagenu se stává kryptogenní TF aktivním a podporuje vznik trombózy.

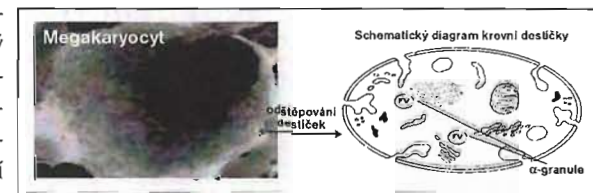
KALCIUM (FAKTOR IV)

Vápníkové ionty (Ca^{2+}) jsou nezbytné pro celou řadu reakcí ve všech systémech hemostázy. Nejmenší nutná koncentrace pro hemokoagulaci je **0,5 mmol/l**. U faktorů závislých na K vitaminu zprostředkují vápníkové ionty připojení γ karboxylové skupiny kyseliny glutamové na fosfolipidy. Kalciové ionty jsou mimo jiné vyžadovány pro uspořádání koagulačně aktivních komplexů vnitřní [VIIIa . IXa] a vnější [VIIa . TF] **tenázy** a **protrombinázy** [Va . Xa]. Na přítomnosti kalciových iontů je také odvislá tvorba některých inhibičních komplexů – např. [TFPI . Xa . VIIa . TF].

FAKTOR V (PROAKCELERIN)

- MW: 330 kDa
- Biologický poločas: 12–15 hodin
- Koncentrace v plazmě: 8–14 mg/l 20 nmol/l aktivita: 0,65–1,5

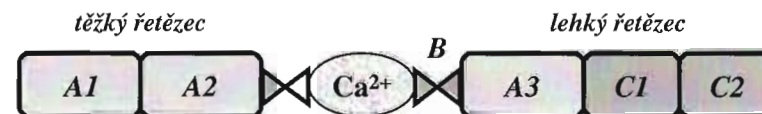
Faktor V je jednořetězový glykoprotein, který vzniká v játrech a megakaryocytech a váže se poměrně snadno na povrch buněčné membrány. Nachází se v plazmě cirkulující krve a v α -granulích krevních destiček (asi 20 %). Minimální aktivita nezbytná k zástavě krvácení je 10–15 %.



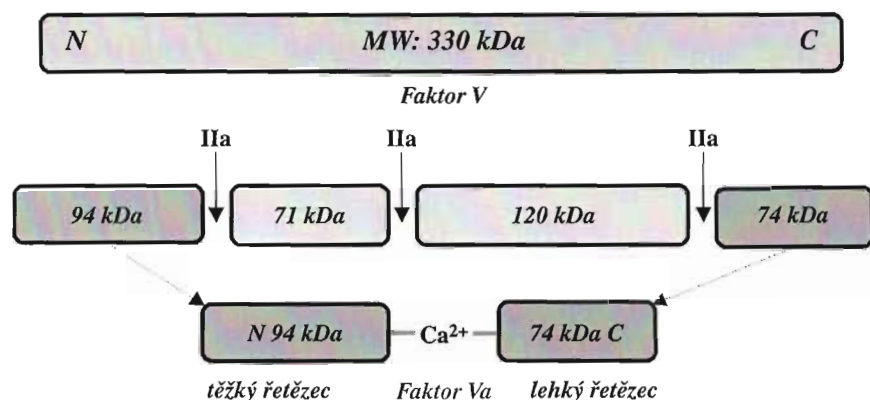
Tvorba FV v megakaryocytech a jeho ukládání do α -granulí krevních destiček

FV je podobný svým složením F VIII. Ionty Ca^{2+} stabilizují FV a jsou nezbytné pro jeho aktivaci. Faktor V je aktivován limitovanou proteolýzou trombinem nebo F Xa.

STRUKTURA F Va (domény)



AKTIVACE FAKTORU V TROMBINEM



F Va může být aktivován i některými dalšími působky v nízkých koncentracích: plazminem, elastázou neutrofilů, destičkovým kalpainem, jedem Russelovy zmije.

Funkce: V komplexu protrombinázy společně s Ca^{2+} a fosfolipidy urychluje F Va rychlost proteolytického štěpení protrombinu faktorem Xa až 200 000krát.

FAKTOR VI

Tento faktor je zde zmíněn z důvodu historického pohledu, aby byla respektována posloupnost vzniku číselných označení jednotlivých faktorů. Později se tvrdilo, že tento faktor u člověka neexistuje a že je přítomen pouze u hovězího dobytka.

Dnes se tento termín nepoužívá. Faktor VI byl ztotožněn s některými fosfolipidy, zejména membránovými fosfolipidy vnitřní dvojvrstvy membrány krevní destičky (fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin). V 70. a 80. letech minulého století se označoval jako destičkový faktor 3 (Platelet factor 3 – PF3).

FAKTOR VII (PROKONVERTIN)

❑ MW: 50 kDa

❑ Biologický poločas: 4–6 hodin

❑ Koncentrace v plazmě:

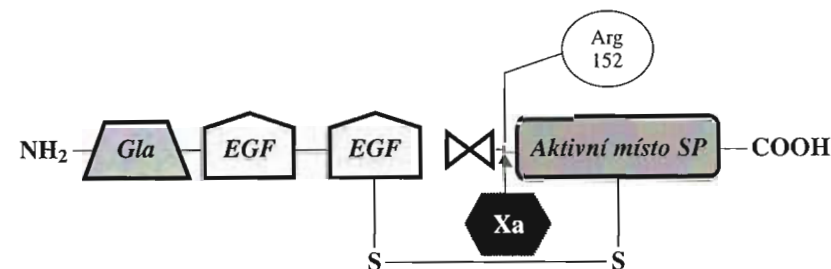
F VII: 2–5 mg/l (10 nmol/l) aktivita: 0,7–1,3

F VIIa: < 100 pmol/l

Lidský faktor VII cirkuluje v krvi ve formě zymogenu jako jednořetězcový glykoprotein o 406 aminokyselinách. Na N-konci se nachází doména bohatá na γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny – gla oblast. Tyto karboxylové skupiny se získávají karboxylací γ oblasti glutamové kyseliny zabudované v proteinovém řetězci prozymogenu F VII. Karboxylace probíhá za účasti vitamínu K v jaterní buňce (celkem je karboxylováno 10 Glu). F VII patří tedy mezi serinové proteázy – endopeptidázy s gla oblastí.

STRUKTURA F VII

(domény)



Gla – oblast zahrnující γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny

EGF – doména, ve které probíhají interakce mezi faktory

SP – serinová proteáza

X – aktivační peptid uvolněný po přeměně zymogenu na aktivní serinovou proteázu

F VII je v procesu koagulace proteolyticky štěpen na aktivní serinovou proteázu F VIIa. K aktivaci dochází v přítomnosti trombinu nebo některého z faktorů: IXa, Xa a XIa. Molekula F VII se štěpí v místě Arg^{152} za vzniku dvou řetězců spojených kovalentní jednoduchou disulfidickou vazbou.

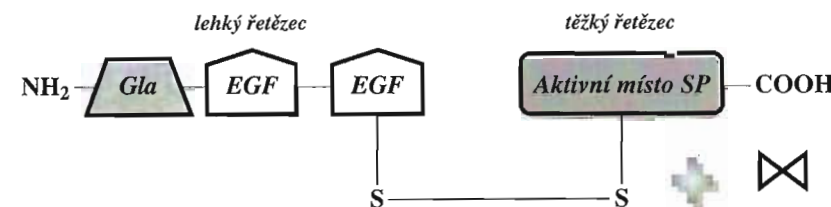
Řetězce aktivovaného F VII (F VIIa)

■ Lehký řetězec (MW: 20 kDa) – zakončen aminoskupinou

■ Těžký řetězec (MW: 30 kDa) – zakončen karboxylovou skupinou. Obsahuje katalytickou doménu.

STRUKTURA F VIIa

(domény)



Lehký řetězec obsahuje Gla doménu a dvě domény homologní s růstovým faktorem, těžký zahrnuje aktivní místo enzymu.

Aktivní forma F VII (F VIIa) je stabilní po dobu asi 2,5 hodiny. Minimální hemostatická hladina se pohybuje kolem 10 %. Aktivovaný faktor VII (F VIIa) se nachází volně v cirkulaci v koncentraci odpovídající přibližně 1 % celkového množství proteinu F VII, to odpovídá asi 2–5,5 µg/l. Množství volného aktivovaného F VII (FVIIa) v plazmě se postupně s věkem zvyšuje (Macík a Morrissey, 1991).

Funkce: F VIIa je velmi slabou serinovou proteázou. Plný enzymatický potenciál F VIIa se projeví teprve až v komplexu s TF. Po vyvázání na tkáňový faktor se její aktivita zvyšuje více než milionkrát (Waxman a spol., 1992). F VIIa a TF vytváří na negativním fosfolipidovém buněčném povrchu na kalcium závislý komplex [VIIa . TF . Ca²⁺. Pl]. Tento komplex tzv. **vnější tenáza**, katalyzuje přeměnu faktoru IX na IXa a faktoru X na Xa (Nemerson, 1992).

FAKTOR VIII (ANTIHEMOFILICKÝ FAKTOR A)

❑ MW: 330 kDa

❑ Biologický poločas: 15–20 hodin

❑ Koncentrace v plazmě: 0,1–0,2 mg/l 0,7 nmol/l aktivita: 0,5–1,5

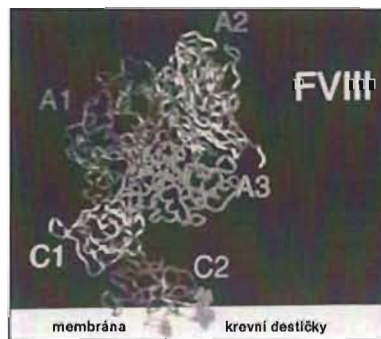
Faktor VIII je plazmatický glykoprotein – β globin o 2332 aminokyselinách. V plazmě je F VIII vázán do komplexu s vWF. Molekula F VIII se váže na vWF poblíž N – konce molekuly vWF. Vazebné místo pro vWF má F VIII v oblasti svého lehkého řetězce. Komplex [VIII . vWF] pravděpodobně chrání F VIII před jeho biologickým štěpením vlivem APC nebo F Xa (blíže o F VIII ve spojitosti s vWF – viz kapitola vWF). Z této vazby je uvolňován kontaktem s fosfolipidy nebo trombinem za současného uvolnění vazebného místa na strukturu fosfolipidů.

F VIII má řadu shodných sekvencí s F V. Minimální aktivita F VIII, která je nezbytná k zástavě krvácení je vyšší než 25 %. Popisujeme jednak **funkční aktivitu** faktoru VIII (**FVIII:C**) a **antigen** FVIII (**FVIII:Ag**).

Gen pro FVIII je poměrně velký a nachází se na vrcholu dlouhého raménka X chromosomu. V současné době je známo asi 80 různých mutací F VIII (Wood a spol., 1984).

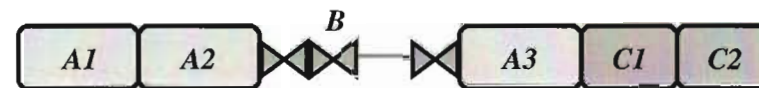
Funkční faktor VIII je charakterizován 3 strukturálními doménami A,B,C a dvěma kyselými peptidy (a1, a2). Z krevní plazmy se podařilo izolovat 2 řetězce F VIII:

- Těžký řetězec – HC (Heavy Chain) o MW 92 000–210 000, domény: A1, A2, B
- Lehký řetězec – LC (Light Chain) o MW 80 000, domény: A3, C1, C2



F VIII – struktura molekuly (A, C – domény)

STRUKTURA F VIII (domény)



Tyto řetězce v přítomnosti fosfolipidů se spojují prostřednictvím Ca²⁺ v koagulačně aktivní faktor VIIIa. K aktivaci F VIII dochází limitovanou proteolýzou vyvolanou trombinem. V přítomnosti fosfolipidů může být FVIII aktivován i působením F Xa.

Funkce: funkčně aktivní F VIII (FVIIIa) funguje jako proteinový kofaktor ve vnitřní cestě aktivace protrombinu, při tvorbě koagulačně aktivního komplexu **tenázy** [VIIIa . IXa . Pl . Ca²⁺], nezbytné k aktivaci F X (Vehar a spol., 1984). Reakce v komplexu tenázy je urychlena v přítomnosti všech složek asi 10 000krát. Nedostatek nebo funkční nedostatečnost F VIII může vést k těžkému krvácivému defektu – **hemofilii A**.

Klinická interpretace: hladina F VIII se zvyšuje při zánětech, při chronických infekcích a při stresu.

FAKTOR IX (CHRISTMAS FAKTOR)

❑ MW: 55 kDa

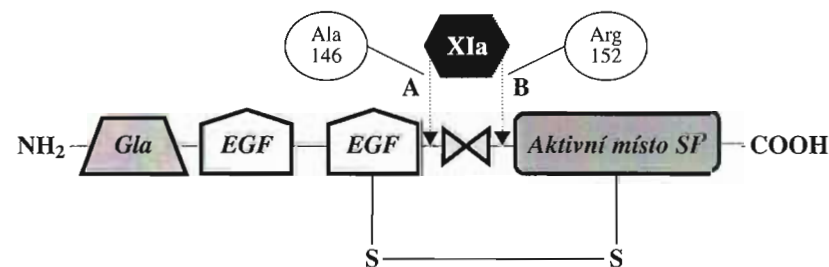
❑ Biologický poločas: 24 hodin

❑ Koncentrace v plazmě: 3–5 mg/l 90 nmol/l aktivita: 0,7–1,3

F IX je jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K. Gla oblast obsahuje celkem 12 skupin γ karboxyglutamové kyseliny. Při aktivaci se štěpí na 2 podjednotky vázané 2 disulfidickými můstky. Řadí se mezi endopeptidázy s gla oblastí.

❑ Je popsáno asi 400 mutací faktoru IX

STRUKTURA F IX (domény)



GLA – oblast zahrnující γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny

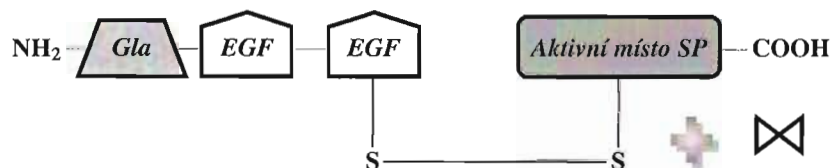
EGF – doména, ve které probíhají interakce mezi faktory

SP – serinová proteáza

✂ aktivační peptid uvolněný po přeměně zymogenu na aktivní serinovou proteázu

F IX je aktivován buď F XIa nebo koagulačně aktivním komplexem [VIIa . TF . PL . Ca^{2+}]. Nejprve dochází k rozštěpení molekuly v místě Ala¹⁴⁶ za vzniku meziproductu IX α , který je následně konvertován k plně aktivní formě IX $\alpha\beta$ štěpením v místě B (Arg¹⁸⁰). Lehký řetězec obsahuje Gla-doménu a 2 domény homologní s růstovým faktorem (EGF), těžký zahrnuje aktivní místo enzymu – serinovou triádu (Ser³⁶⁵, His²²¹, Asp²⁶⁹). Hemostatická hladina potřebná k zástavě krvácení se pohybuje mezi 20–30 %.

STRUKTURA F IXa (domény)



Funkce: F IXa tvoří koagulačně aktivní komplex vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin [VIIIa . IXa . PI . Ca^{2+}] tzv. **vnitřní tenázu**, která aktivuje F X na Xa.

FAKTOR X (FAKTOR STUARTA–PROWEROVÉ)

(název podle jména muže a ženy, u kterých byla porucha poprvé zjištěna)

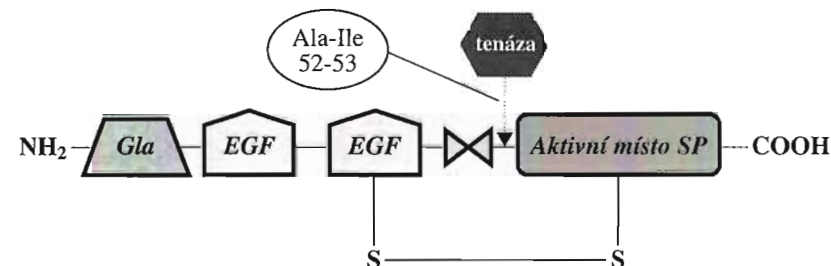
❑ MW: 58,9 kDa

❑ Biologický poločas: 32 hodin

❑ Koncentrace v plazmě: 6–10 mg/l 170 nmol/l aktivita: 0,7–1,4

F X je dvouřetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitaminu K. Gla oblast obsahuje celkem 11 skupin γ karboxyglutamové kyseliny. Řadí se mezi endopeptidázy s gla oblastí. Lehký řetězec obsahuje Gla doménu a 2 domény homologní s růstovým faktorem (EGF). Na těžkém řetězci je aktivní místo enzymu – serinová triáda (Ser–His–Asp).

STRUKTURA F X (domény)



GLA – oblast zahrnující γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny

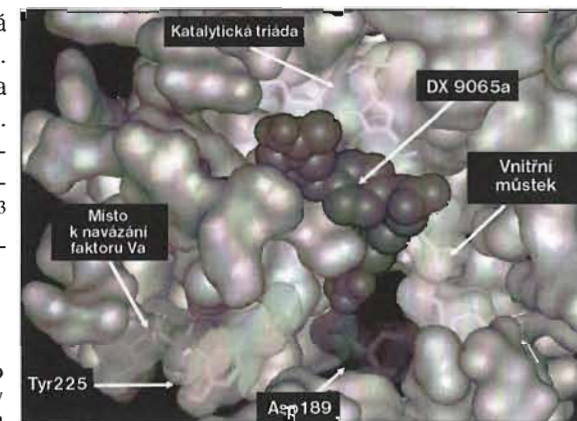
EGF – doména, ve které probíhají interakce mezi faktory

SP – serinová proteáza

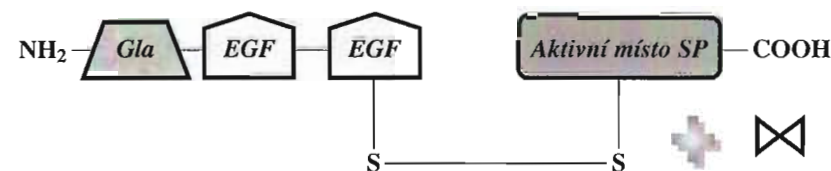
✂ aktivační peptid uvolněný po přeměně zymogenu na aktivní serinovou proteázu

Aktivace F X probíhá v přítomnosti tenázy [VIIIa . IXa . PL . Ca^{2+}] nebo za účasti komplexu [VIIa . TF . PL . Ca^{2+}]. Při aktivaci dochází ke štěpení těžkého řetězce F X v místě Arg⁵² – Ile⁵³ za současného uvolnění aktivačního glykopeptidu (AP).

Faktor Xa – aktivní místo serinové proteázy a vazebná místa



STRUKTURA F Xa (domény)

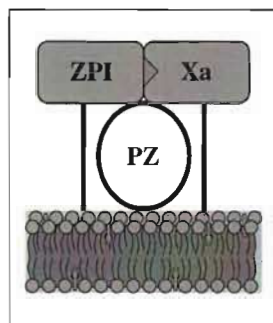


K zástavě krvácení je potřeba nejméně 20 % jeho koagulační aktivity.

Funkce: Faktor Xa je součástí enzymatického koagulačně aktivního komplexu *protrombinázy*, která katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin.

Inhibice F Xa v systému proteinu Z

Protein Z (PZ) slouží jako kofaktor pro inaktivaci F Xa na fosfolipidovém povrchu. Vytváří se komplex s inhibitelem proteázového typu závislým na proteinu Z (ZPI – protein Z protease inhibitor).



FAKTOR XI (PLASMA TROMBOPLASTIN ANTECEDENT – PTA)

(Nazývá se též Rosenthalův faktor podle autora, který tento faktor poprvé popsal)

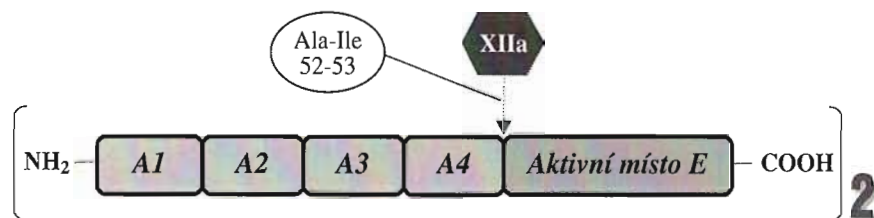
- MW: 160 kDa
- Biologický poločas: 60–80 hodin
- Koncentrace v plazmě: 4–5 mg/l (30 nmol/l) aktivita: 0,7–1,3

Koluje v krvi v neaktivní formě v podobě zymogenu (proenzymu) serinové proteázy. Je to glykoprotein, který je aktivován při tzv. kontaktní fázi plazmatického koagulačního procesu (Thompson a spol., 1977). F XI cirkuluje v obvodové krvi jako monodimer složený ze dvou identických řetězců, vyvázan nekovalentní vazbou do komplexu s HMWK (Hu a spol., 1998). Minimální hladina pro koagulaci je 15–20 % aktivity.

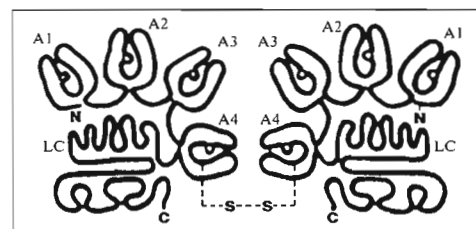
F XI silně adhezuje k aniontovým povrchům, jako je sklo, celit, kaolin a je také vyvazován na povrch krevní destičky. Studie prokázaly na každé destičce asi 300 navázaných molekul F XI (Hu a spol., 1998). F XI přítomný v destičkách není identický s F XI kolujícím v plazmě.

F XI je aktivován limitovanou proteolýzou zprostředkovanou F XIIa (v přítomnosti HMWK a negativně nabitých povrchů). Aktivace je možná i trypsinem, F VIIa a trombinem. Taxonomicky se řadí se mezi endopeptidázy.

STRUKTURA F XI (domény)



Během proteolýzy F XI dochází k rozštěpení dimerní molekuly v oblasti katalytického místa. Molekula zůstává propojena přes disulfidické můstky.



Struktura molekuly faktoru XI (A – domény, LŘ – lehký řetězec)

FAKTOR XII (HAGEMANŮV FAKTOR)

(podle nemocného, u kterého byla poprvé zjištěna nepřítomnost tohoto faktoru)

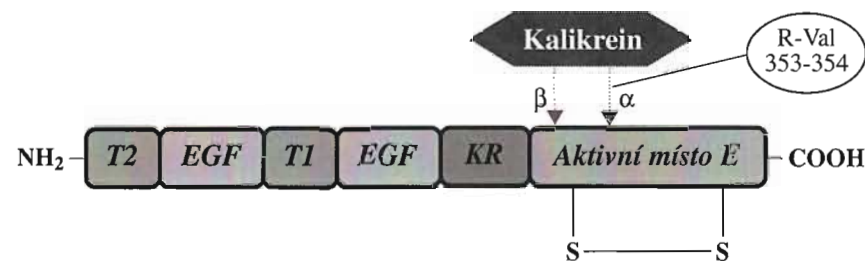
- MW: 80 kDa
- Biologický poločas: 50–70 hodin
- Koncentrace v plazmě: 30–40 mg/l 400 nmol/l aktivita: 0,7–1,3

Jde o glykoprotein vznikající v játrech. F XII se řadí mezi serinové proteázy. V podobě zymogenu (proenzymu) nereaguje za fyziologických podmínek s povrchem cévní stěny. Nachází se jak v plazmě, tak i v séru.

K aktivaci faktoru XII dochází kontaktem se subendoteliálními strukturami při poškození povrchu cévní stěny. Aktivačním povrchem může být i sklo, kaolin, celit, dextran, sulfáty, elegová kyselina, kloubní chrupavka, kůže, mastné kyseliny a endotoxiny.

Štěpení kalikreinem v místě F XII α směřuje k tvorbě F XIIa, vytváří se dva proteinové řetězce spojené disulfidickou vazbou. Lehčí řetězec (MW = 28 kDa) obsahující karboxylovou skupinu nese katalytickou triadu (His⁴⁰, Asp⁸⁹, Ser¹⁹¹), zatímco těžší řetězec (MW = 52 kDa) s amino (–NH₂) skupinou zajišťuje připojení molekuly k aniontovým povrchům. Štěpení kalikreinem v místě F XII β vede k tvorbě složky, která může aktivovat prekalikrein, ale nemá výraznou prokoagulační aktivitu.

STRUKTURA F XII (domény)



EGF – struktura podobná epidermálnímu růstovému faktoru
Type I a II – domény podobné těm, které se nachází u fibronectinu

FAKTOR XIII (TRANSGLUTAMINÁZA, EC 2.3.2.13)

(faktor stabilizující fibrin)

□ MW: 320 kDa

□ Biologický poločas: 40–50 hodin

□ Koncentrace v plazmě: 10–20 mg/l 50 nmol/l

F XIII je zymogenní forma *glutamyl-peptid γ -glutamyl transferázy*. Nachází se jak v **plazmě** vázán na molekulu fibrinogenu, tak i v **buněčných komponentách** (krevní destičky, megakaryocyty, monocyty), dále i v placentě a játrech. Krevní destičky obsahují asi 50 % celkové aktivity F XIIIa (většina je uložena v cytoplazmě krevní destičky a je uvolňována při její aktivaci).

Struktura faktoru XIII:

- ◆ Faktor XIII přítomný v **plazmě** je syntetizován v játrech a cirkuluje v podobě **tetrameru** (MW = 320 kDa), který obsahuje 2 páry dvou neidentických subjednotek (A2,B2). Podjednotky A a B jsou přítomny v plazmě i jako samostatné komponenty.
- ◆ F XIII přítomný v **buněkách** je v nich syntetizován v podobě **dimeru** (MW = 146 kDa) složeného ze dvou identických A řetězců (A2).

A jednotky z plazmy a z buněk jsou funkčně identické. A podjednotka je dále funkčně shodná s ostatními transglutaminázami, které zajišťují stabilizaci tkání kovalentně vázanými proteiny. Každá A subjednotka obsahuje 6 volných SH skupin, které poskytuje Cys, z nichž jedna je součástí aktivního místa F XIIIa (A2').

B podjednotka je částečně homologní se skupinou proteinů regulujících komplement. Hraje důležitou roli v regulaci aktivity F XIII. B podjednotka je tvořena v játrech a v plazmě je přítomna, buď v podobě tetrameru společně s A podjednotkou nebo samostatně v podobě dimeru. Je pravděpodobné, že jednou z funkcí B podjednotky je stabilizace podjednotky A (Muzbeck a spol., 1999).

Aktivace faktoru XIII

Přeměna F XIII na

F XIIIa je výsledkem hy-

drolýzy vyvolané trombi-

nem v místě $\text{Arg}^{36}\text{-Gly}^{37}$

u N-konce A subjednotky.

Tento proces je usnadněn

disociací B2 dimeru od A2 dimeru za

účasti iontů Ca^{2+} a fibrinogenu. Hydrolýza

F XIII katalyzovaná trombinem je podpo-

vána polymerním fibrinem. Tím je zajištěno,

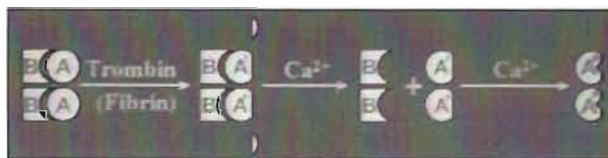
že nemůže vznikat velké množství F XIIIa

v době, kdy není ještě vytvořen fibrin. Fibrin

urychluje štěpení subjednotek faktoru XIII

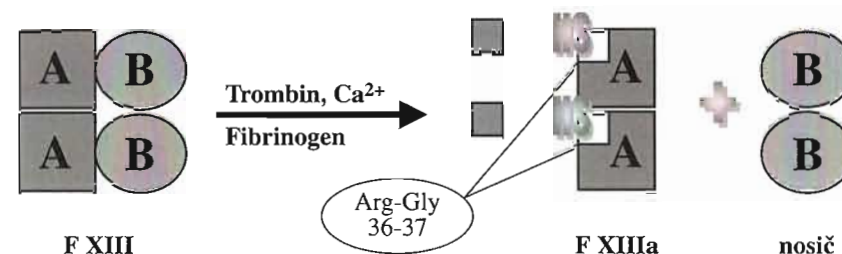
trombinem a usnadňuje jejich disociaci

z centrální molekuly.



Aktivace F XIII trombinem

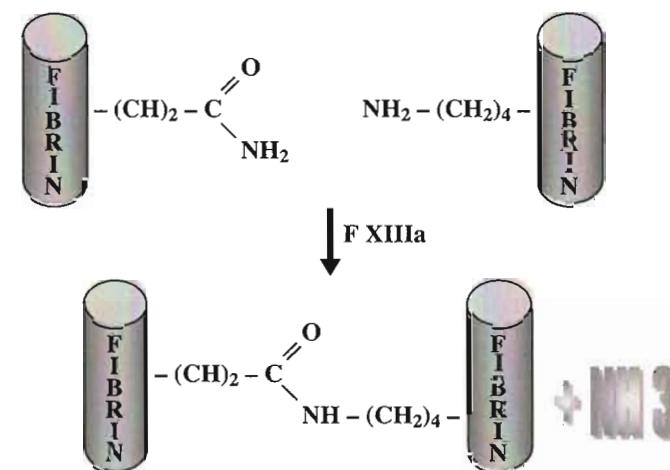
AKTIVACE F XIII (XIIIa)



Funkce F XIIIa

V koagulační kaskádě F XIIIa stabilizuje fibrinovou sraženinu provázáním α a γ řetězců fibrinu za vzniku homopolymery. F XIIIa katalyzuje formaci intermolekulárních vazeb mezi různými proteiny.

Další substráty, které může ovlivnit F XIIIa jsou fibronectin, α -2-antiplasmin, kolagen, F V a vWF. Mimo svoji úlohu v hemostáze ovlivňuje F XIIIa hojení ran a je důležitý i při udržení plodu v době těhotenství.



PREKALIKREIN (FLETCHERŮV FAKTOR)

□ MW: 90 kDa

□ Biologický poločas: 30 – 40 hodin

□ Koncentrace v plazmě: 35 – 50 mg/l 400 nmol/l

Prekalikrein (z řeč. kallikreas = slinivka břišní) je proteináza syntetizovaná ve

slinivce břišní a v játrech. V krevní plazmě se vyskytuje ve formě zymogenu, který je vyvázán na HMWK. Prekalikrein je aktivován F XII α nebo β na α -kalikrein. Kalikrein aktivuje F XII a zvyšuje uvolňování kininů z kininogenů (Schloesser a spol., 1997).

Struktura: molekula prekalikreinu je složena z jednoho těžkého a dvou typů lehkých řetězců.

VYSOKOMOLEKULÁRNÍ KININOGEN

(High molecular weight kininogen – HMWK)

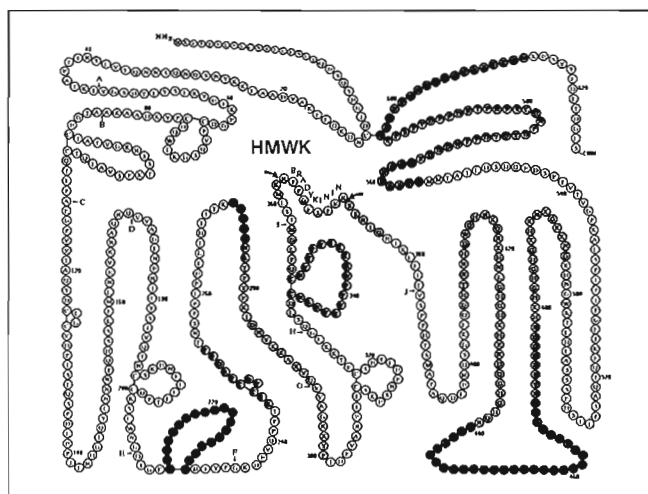
□ MW: 120 kDa

□ Biologický poločas: 120–150 hodin

□ Koncentrace v plazmě: 60–80 mg/l 700 nmol/l

Kininogeny jsou plazmatické proteiny syntetizované v játrech a endotelu pupečnických žil. Z kininogenů vznikají za spoluúčasti prekalikreinu nebo jiných kininogenáz v rámci kininového metabolického systému vazoaktivní peptidy nazývané **kininy** (Heimark a spol., 1980). Nejdůležitějšími kininy jsou bradykinin a lysylbradykinin (oba účinně snižují cévní propustnost, vyvolávají kontrakci hladkých svalů a navozují pocit bolesti). HMWK se váže na povrch aktivovaných krevních destiček a také na neutrofile a buňky endotelu.

Funkce: Kininy se v hemostáze váží společně s F XI a prekalikreinem na poškozenou cévní stěnu a to tak, aby se vytvořila optimální vazebná poloha vzhledem k faktoru XII. HMWK působí jako kofaktor při aktivaci F XII kalikreinem. Přítomnost HMWK umožňuje vyvázání prekalikreinu a F XI na záporně nabitě povrchy. HMWK je pak štěpen kalikreinem ve třech krocích na štěpné produkty (bradykinin vzniká ve druhém kroku štěpení).



HMWK – struktura molekuly s vazebnými místy

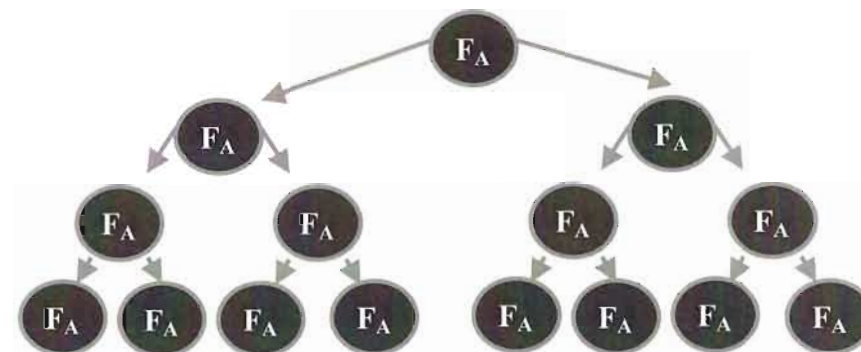
Plazmatický koagulační systém se aktivuje:

■ stykem s tkáňovým faktorem

■ kontaktem se subendotelovými strukturami

V některých částech systému koagulace se uplatňuje **kaskádovitě zesílení**. Původní vyvolávací signál je mnohonásobně zesílen. Na každém stupni pak dochází ke zvýšení koncentrace meziproduktu.

AMPLIFIKACE SIGNÁLU SE ZVÝŠENÍM KONCENTRACE FAKTORŮ

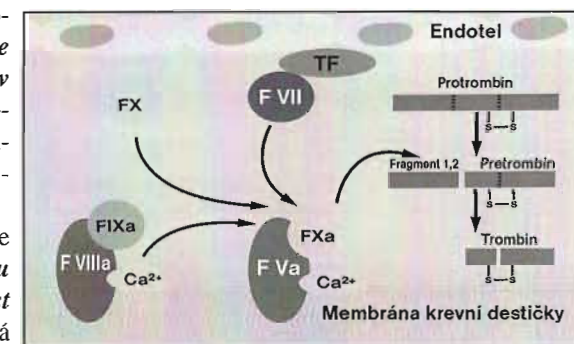


2.3.4. Přeměna protrombinu na trombin

K přeměně protrombinu na trombin může dojít dvěma cestami:

■ **vnější** cesta aktivace protrombinu – **většinou je porušena celistvost cév** a krev uniká s cévy a dostává se do okolních tkání. Aktivace nastává stykem s TF.

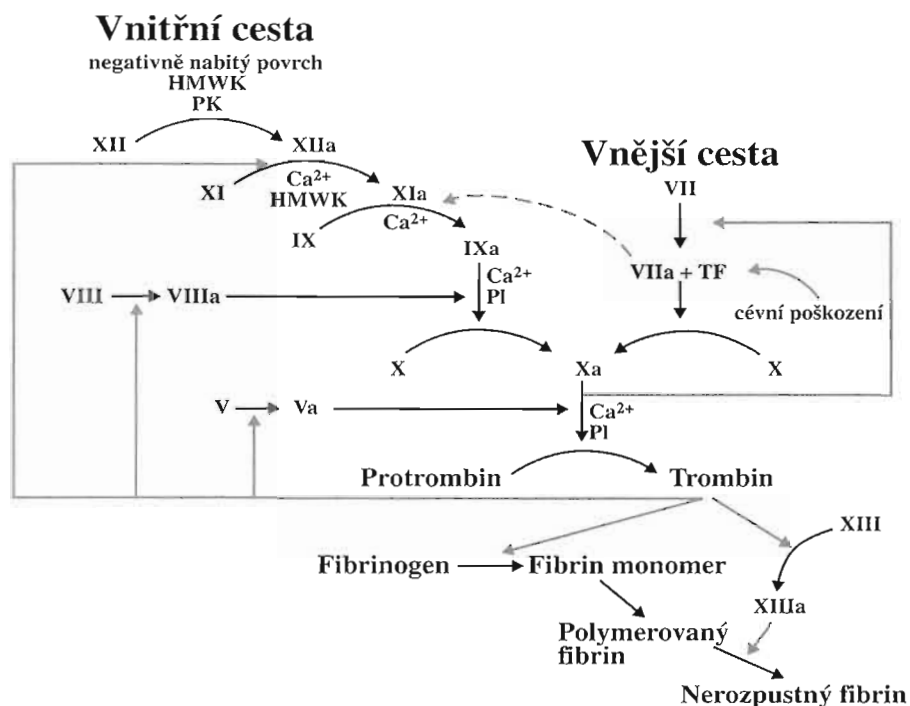
■ **vnitřní** cesta aktivace protrombinu – **většinou není porušena celistvost cév**. Aktivace nastává kontaktem se subendotelovými strukturami.



Přeměna protrombinu na trombin

Přestože jednotlivé reakce v procesu krevního srážení jsou poměrně dobře popsány, vlastní spouštěcí mechanismus celého procesu je bezpochyby komplexní a složitý děj, závislý na řadě složek a faktorů, z kterého známe jen část dílčích úseků.

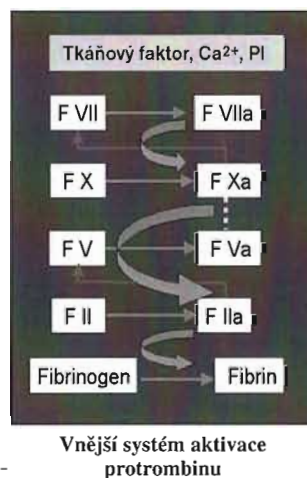
SCHÉMA KOAGULAČNÍCH DĚJŮ



2.3.4.1. Vnější (extrinsic) systém

Vnější systém aktivace přeměny protrombinu na trombin se spouští po expozici tkáňového faktoru, při které dochází k vazbě F VIIa volně cirkulujícího v plazmě na TF. Vytvořený komplex aktivuje F Xa, který společně s F Va vstupuje do komplexu protrombinázy a konvertuje přeměnu protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje tvorbu fibrinu z fibrinogenu. Fibrinové monomery polymerují a vzniklý polymer se stabilizuje F XIIIa aktivovaným trombinem – vzniká nerozpustný fibrin.

Při *porušení kontinuity cév* se krevní složky dostávají do tkání. Poškození tkáně vede k porušení endoteliální buněčné bariéry, která normálně odděluje buňky nesoucí **tkáňový faktor** – TF od cirkulující krve (Weiss a spol., 1989). Klíčovým bodem iniciace he-



mostázy je tvorba koagulačně aktivního komplexu [TF . VIIa] v místě poškození cévy (Nemerson, 1988). V plazmě je vždy přítomno malé množství aktivovaného F VII (F VIIa), který může volně cirkulovat v krvi.

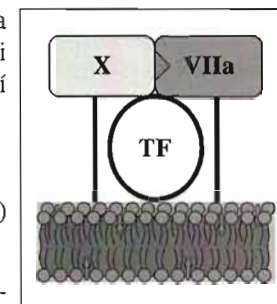
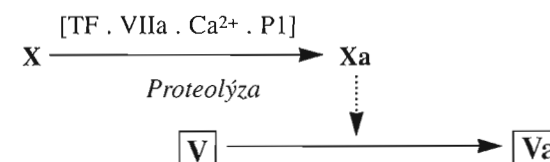
Koagulačně aktivní komplex [TF . VIIa] vyvázaný na fosfolipidové matrix buněčné membrány a v přítomnosti iontů Ca^{2+} aktivuje koagulaci přímo v místě poškození cévní stěny.

Komplex [TF . VIIa] konvertuje přeměnu:

- $F X \rightarrow F Xa$

Dochází k mnohonásobnému zesílení (amplifikaci) původního podnětu.

F Va potřebný k vytvoření protrombinázy je aktivován F Xa:

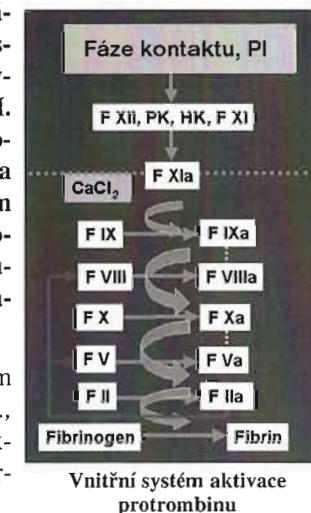


Nově generované faktory Va a Xa se pak uplatní při tvorbě koagulačně aktivního komplexu – **protrombinázy**.

2.3.4.2. Vnitřní (intrinsic) systém

Vnitřní systém aktivace přeměny protrombinu na trombin se spouští ve fázi kontaktu. Při ní dochází k aktivaci F XII. F XIIa dále aktivuje faktory XI a IX, přičemž během této kaskádové reakce dochází k amplifikaci (zesílení) vyvolávajícího efektu a k aktivaci faktorů V a VIII. Faktor IXa a VIIIa tvoří tenázu, která generuje dostatečné množství F Xa a ten společně s faktorem Va v komplexu protrombinázy konvertuje protrombin na trombin. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Fibrinové monomery polymerují a vzniklý polymer se stabilizuje F XIIIa aktivovaným trombinem – vzniká nerozpustný fibrin.

U vnitřního systému dochází k aktivaci kontaktem *při neporušené kontinuitě cév* (Heimark a spol., 1980). Sled dějů je zahájen aktivací Hagemanova faktoru po jeho kontaktu s poškozeným cévním povrchem (negativní náboj, subendotelové struktury).

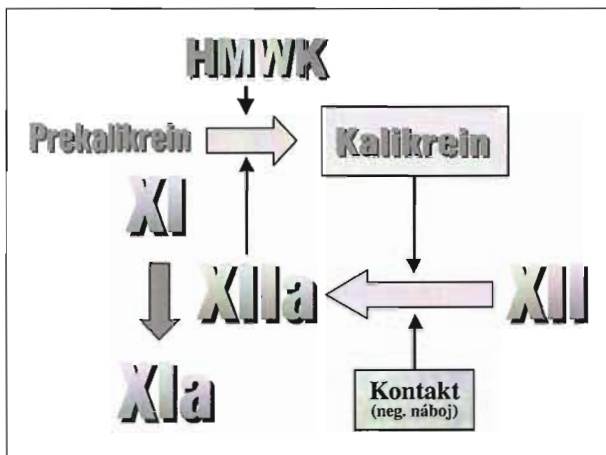


Kontaktní povrchy

- *in vivo* – subendotelová pojivová tkáň (kolagen), povrch trombocytů (destičkové fosfolipidy)
- *in vitro* – sklo, kaolin, silica

Průběh kontaktní fáze

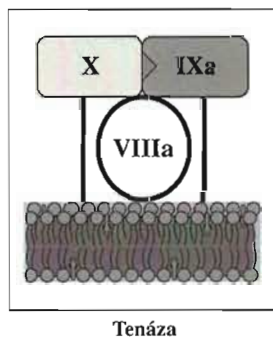
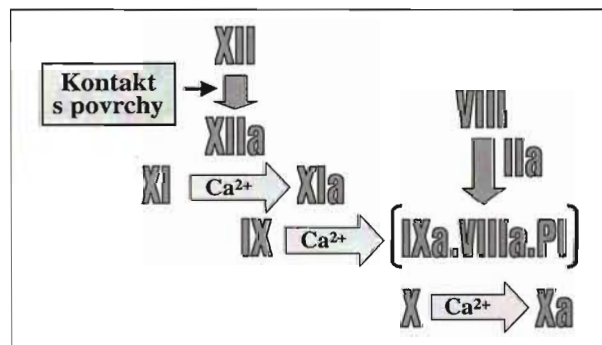
Molekulový charakter dějů během *kontaktní fáze* není ještě zcela objasněn. Předpokládá se, že F XII po styku se subendoteliální výstelkou mění svou konformaci a stává se stericky přístupným k působení komplexu HMWK (High molecular weight kininogen) a kallikreinu. Tento komplex jej hydrolyticky štěpí na dva fragmenty s aktivitou F XII (označují se F XIIa, f).



Vzniká tak cyklický děj, v němž se nejprve F XII aktivuje stykem se subendoteliální strukturou – vzniká malé množství F XIIa, který v přítomnosti HMWK přeměňuje prekallikrein na kallikrein. Ten pak hydrolyticky štěpí F XII na jeho fragmenty – vzniká F XIIa, f. F XIIa může aktivovat i přeměnu plazminogenu na plazmin.

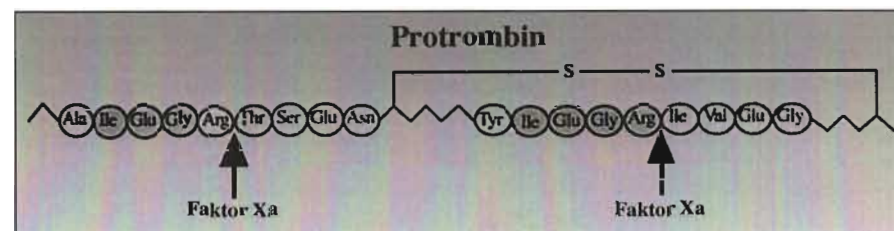
V průběhu koagulační kaskády se v této cestě postupně aktivují: $XII \rightarrow XI \rightarrow IX$

F VIIIa (aktivovaný trombinem) spolu s F IXa, s Ca^{2+} a fosfolipidy aktivuje F X. Tomuto komplexu se říká *vnitřní tenáza*.



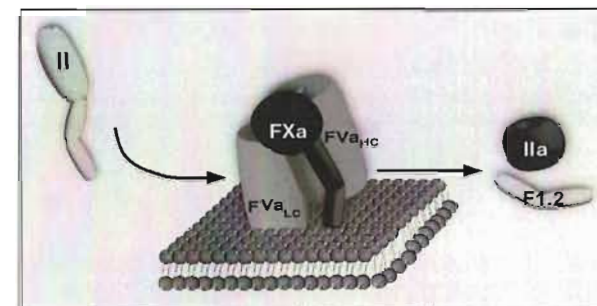
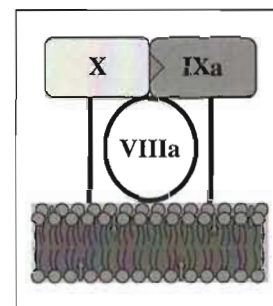
Obě cesty, jak vnitřní, tak i vnější vedou ve své konečné fázi k aktivaci F X.

F Xa společně s F Va, fosfolipidy buněčné membrány krevní destičky a ionty Ca^{2+} vytváří koagulačně aktivní komplex *protrombinázu*, který štěpí protrombin na trombin v místě, kde je navázána aminokyselina Arg. Podmínkou celého procesu je přesná prostorová orientace všech zúčastněných složek (Hemker a spol., 1967).



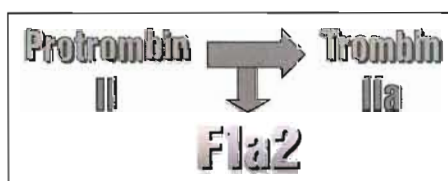
Faktor Xa proteolyticky štěpí protrombin v místě Arg (F Va při proteolýze funguje jako kofaktor).

Při tvorbě protrombinázy dochází ke změnám konformace molekul. Faktor Va se váže svým lehkým i těžkým řetězcem na F Xa a k protrombinu se váže F Va svým těžkým řetězcem.



Protrombináza je velmi účinně vyvazována na receptorová místa membrány krevní destičky. Na povrchu krevní destičky bývá 1 000–3 000 vazebných míst pro protrombinázu.

Protrombináza štěpí protrombin na trombin za uvolnění fragmentů 1 a 2 (F1, F2). Faktor Xa může sám vyvolat přeměnu protrombinu na trombin, ale vazbou protrombinázy na krevní destičky se přeměna protrombinu na trombin urychlí až 200 000krát (Swars a spol., 1991). Smyslem této neobyčejně rychlé produkce trombinu vázané na povrch trombocytu, je:



ZAJIŠTĚNÍ KOAGULACE V MÍSTĚ NARUŠENÉ ENDOTELOVÉ STRUKTURY, Tedy BEZPROSTŘEDNĚ V TÉ OBLASTI, VE KTERÉ SE TVOŘÍ DESTIČKOVÁ ZÁTKA.

Tomu brání:

- ředění aktivovaných faktorů jejich mísením s krevní plazmou – inaktivace trombinu
- inaktivace protrombinázy (inhibicí a cestou sterické zábrany)

2.3.5. Přeměna fibrinogenu na fibrin

Trombin vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrinové monomery, které spontánně polymerují a působením aktivovaného faktoru XIII (XIIIa) vytváří v konečné fázi nerozpustný fibrin. F XIII je aktivován trombinem (McKee a spol., 1972).

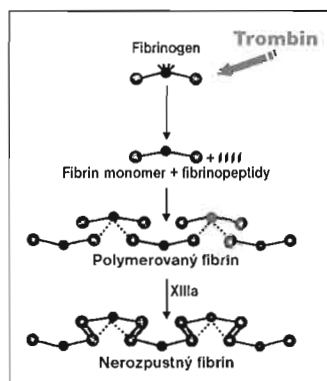
2.3.5.1. Přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin

Fibrinogen je molekula se 3 doménami (2-D-domény jsou propojeny přes doménu E). Trombin štěpí koncové aminokyseliny řetězců α v místě R 16 – G 17 a β -řetězce fibrinogenové molekuly v místě R 14 – G 15 za odštěpení dvou fibrinopeptidů A (FPA) a dvou fibrinopeptidů B (FPB). Jde o malé peptidy (FPA – peptid o 16 aminokyselinách a FPB – peptid o 14 aminokyselinách), které tvoří asi 3 % hmotnosti molekuly fibrinogenu. Uvolnění FPA probíhá rychleji než uvolnění FPB. Urychlení odštěpování fibrinopeptidu B z molekuly fibrinogenu je pak zprostředkováno postranní asociací fibrinových monomerů při tvorbě fibrinu (Dyr a spol., 1989).

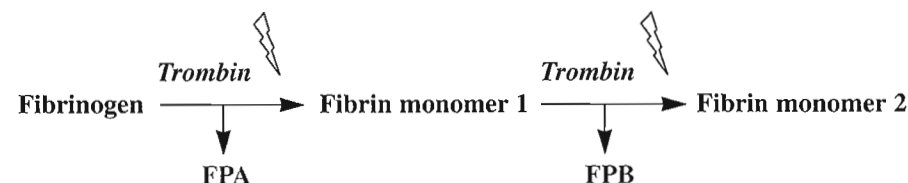
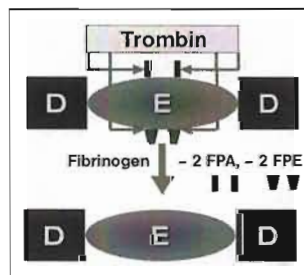
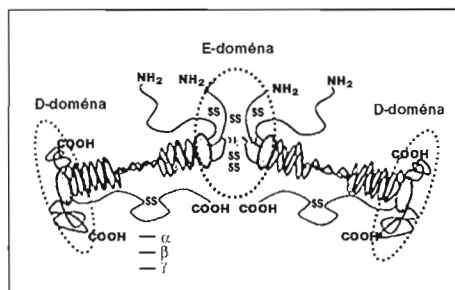
Fibrinové monomery

Uvolněním těchto peptidů se obnaží vazebná místa v centrální E-doméně fibrinogenu. Molekula tvoří nodulární strukturu, která může být dále segmentována do centrální E-domény a dvou D-domén – vznikají tzv. **fibrinové monomery**.

Nejprve se působením trombinu odštěpí fibrinopeptid A (FPA) – fibrin 1 monomer a v další trombin odštěpí fibrinopeptid B (FPB) – fibrin 2 monomer.



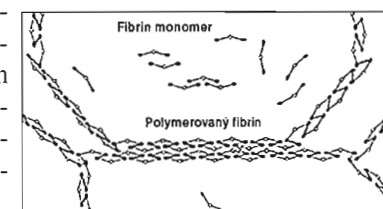
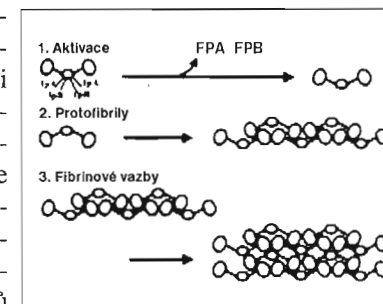
Přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin



Fibrin monomer vzniklý po odštěpení obou fibrinopeptidů má změněnou strukturu molekuly a je náchylný k polymeraci.

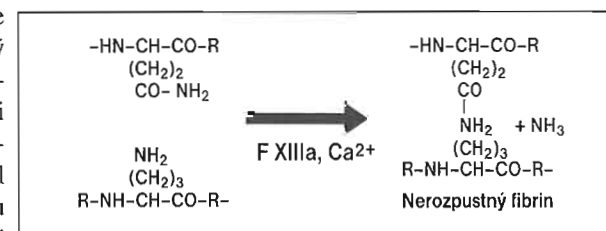
Polymerace fibrinu

Polymerace fibrinových monomerů probíhá v první fázi na základě interakce komplementárních vazebných míst mezi doménami E a D. Labilní částice se samovolně spojují nekovalentními vazbami do větších celků – vzniká **intermediární polymer**. Fibrinová vlákna se napojují na sebe svými konci (v oblasti D-domény). Následně vazebná místa E domény reagují s komplementárními místy γ řetězce D-domény přilehlých fibrinových monomerů (strana ke straně). Tak se postupně tvoří dvouvláknové protofibrily, ve kterých jsou jednotlivé monomery v sousedních vláknech navzájem posunuty o polovinu délky molekuly fibrinogenu – vzniká **rozpustný fibrin**. Tvoří se vlákna o průměru 40–200 nm, která nejsou mechanicky příliš pevná – **fibrinový gel**.



Stabilizace fibrinu F XIIIa

Zpevnění se dosahuje účinkem F XIIIa, který v přítomnosti vápníkových iontů vytváří mezi C-koncovými částmi γ řetězců sousedních molekul v protofibrilách fibrinu příčné kovalentní dvojné

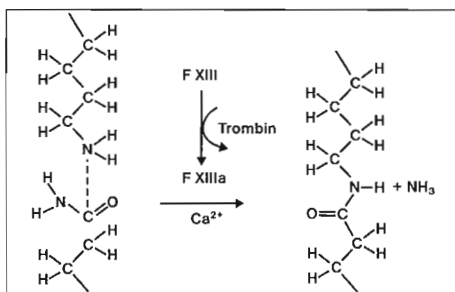


vazby (mezi $\text{H}_2\text{N--CH}_2$ - skupinou Lys^{406} jednoho monomeru a $\text{H}_2\text{N--CH}_2$ - skupinou Glu^{398} monomeru druhého). Dochází k příčnému vyztužování vláken, jejich zvětšení a tím zpevnění koagula – vzniká **polymerní stabilní fibrin** (Sobel a Gawinowicz, 1996). Tato třírozměrná struktura fibrinu není rozpustná v močovíně a je mnohem odolnější proti účinku proteináz (Olexa a Budzynski, 1980). Struktura fibrinu je určo-

vána počáteční rychlostí „aktivace“ fibrinogenu (tj. odštěpováním FPA a FPB trombinem) a koncentrací fibrinogenu.

Fibrin není pasivní substrát, reguluje mnoho různých fyziologických reakcí a procesů:

- moduluje lýzu fibrinu nebo fibrinogenu
- aktivitu trombinu
- aktivitu faktoru XIII
- adhezi buněk



Stabilizace polymerovaného fibrinu faktorem XIIIa

□ O tloušťce fibrinových vláken, o velikosti pórů fibrinové sítě a tím spojených mechanických vlastnostech – „trombogenicitě“ fibrinu a také odolnosti k fibrinolýze rozhodují kinetické faktory při tvorbě fibrinu. Podstatně se také uplatňuje koncentrace fibrinogenu.



□ Takto vytvořený stabilizovaný fibrin je **nerozpustný v roztoku močoviny a v kyselině monochloroctové**. Fibrin, který vznikl bez přítomnosti F XIII a Ca^{2+} je v těchto roztocích rozpustný.

□ Při přeměně fibrinogenu na fibrin se mění vlastnosti molekuly. Odštěpením fibrinopeptidů, působením trombinu a v důsledku konformačních změn provázejících polymerizaci se vytváří nové struktury, které mohou působit jako regulační místa pro řadu mechanismů (zejména v oblasti fibrinolýzy).



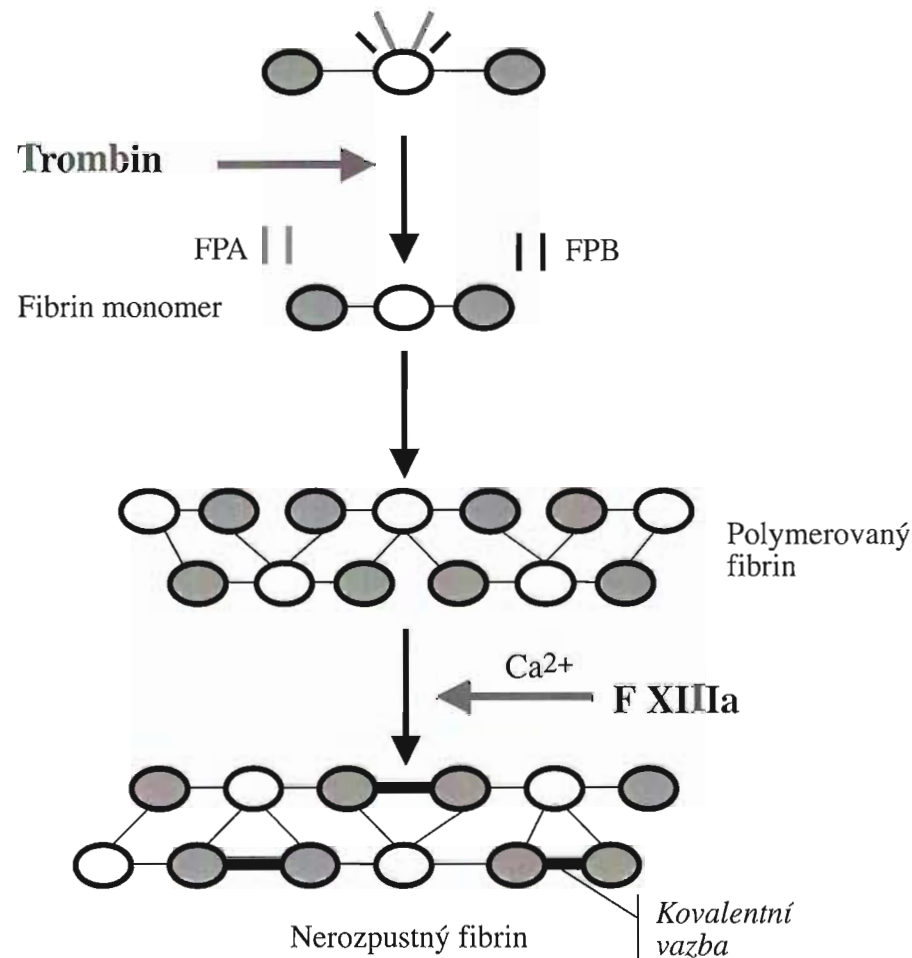
Nerozpustný fibrin – elektronový snímek

2.3.6. Úloha trombinu v hemokoagulaci

Trombin je vícefunkční bílkovina a mnohými biologickými aktivitami v hemostáze a trombóze:

- Aktivuje plazmatické faktory a krevní destičky
- Podílí se na formaci fibrinu (plazmatický koagulační systém, F XIII)
- Podílí se na inhibici koagulace a fibrinolýzy (APC, TAFI)
- Ovlivňuje funkce některých buněk

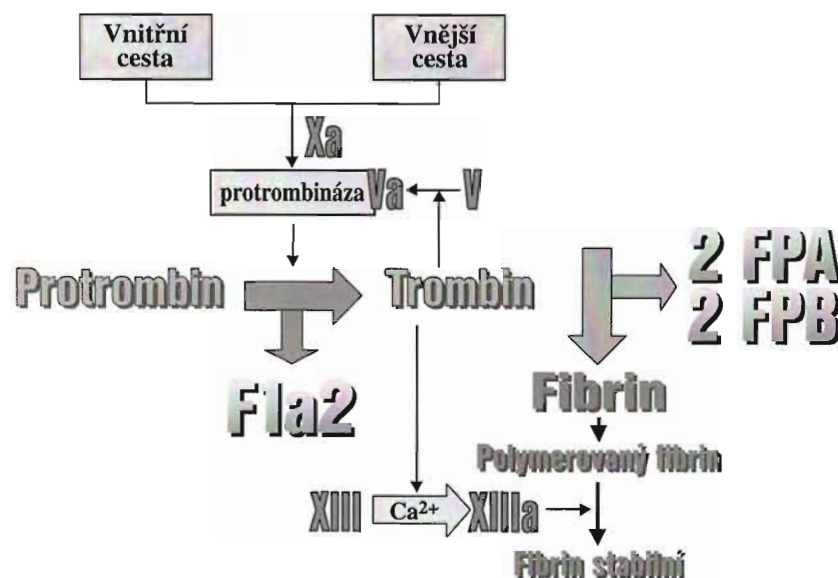
SCHÉMA ŠTĚPENÍ FIBRINOGENU NA FIBRIN A JEHO POLYMERACE NA FIBRINOVOU SÍŤ



Trombin má řadu specifických vazebných míst, které se různě uplatňují v jeho četných aktivitách.

- Trombin vázaný na fibrin významně ovlivňuje aktivaci plazminogenu. Trombin vyvázaný v tomto dimerním komplexu je necitlivý k heparinu a je pravděpodobně příčinou řady heparinových rezistencí u některých klinických stavů. Vazba trombinu závisí na struktuře fibrinu, na tloušťce jeho vláken a na množství odštěpených fibrinopeptidů.

SCHÉMA AKTIVACE KOAGULAČNÍCH PROCESŮ



2.3.7. Nový pohled na koagulační děje

VÝSLEDKY ZKOUMÁNÍ RŮZNÝCH MODELŮ HEMOSTÁZY IN VITRO A OBJASNĚNÍ ÚLOHY INHIBITORŮ POTVRDILY, ŽE VNITŘNÍ A VNĚJŠÍ SYSTÉM NEMOHOU V ORGANISMU PŮSOBIT ODDĚLENĚ A ŽE EXISTUJÍ VZÁJEMNÉ INTERAKCE MEZI ŘADOU KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ A TĚM I MEZI OBLASTI SYSTÉMY KOAGULACE. ZJISTILO SE, ŽE:

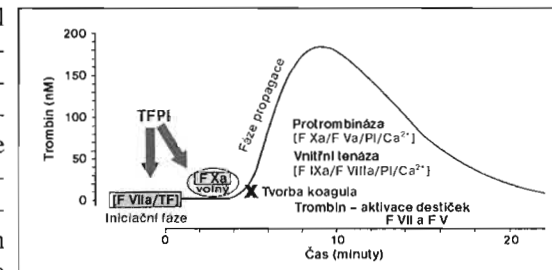
- Vnitřní systém není nezbytný pro iniciaci koagulace
- Koagulace převážně probíhá na povrchu membrán krevních buněk
- Průběh koagulačních reakcí není přísně kaskádovitý, ale dochází k řadě interakcí mezi faktory vnitřního a vnějšího systému
- Hemostáza není jen aktivována při poškození cévy, ale i fyziologicky po nánáze nebo po jídle. Dále bylo zjištěno, že jednotlivé součásti a procesy v hemostáze podléhají dennímu rytmu v závislosti na změnách neurohumorálního a imunitního systému. Rovněž krevní destičky jsou aktivovány v cévním řečišti i při zachování integrity cévy (Galajda a spol., 1998).

TYTO NOVÉ POZNATKY VEDLY K REVIZI DO TĚTO DOBY POUŽÍVANÝCH MODELŮ A K VYTVOŘENÍ NOVÉ KONCEPCE SRÁŽENÍ KRVĚ.

Podle nejnovější teorie existují tři fáze koagulace:

- **Iniciační fáze**
- **Amplifikační fáze**
- **Propagační fáze**

Nový třístupňový model koagulace vystihuje proces hemostázy in vivo, lépe než klasický MacFarlanův model kaskádovitých reakcí a umožňuje vysvětlit patogenezi protrombotických stavů. V koagulačních procesech probíhajících v organismu se více uplatňuje vnější systém, kdežto vnitřní systém iniciuje koagulační děje hlavně na umělému povrchu in vitro.



Iniciační fáze probíhá na povrchu monocytů, kdežto fáze amplifikační a částečně i propagační probíhají na povrchu aktivovaných trombocytů.

2.3.7.1. Iniciační fáze

Ve „fázi iniciace“ je hlavním iniciátorem koagulačního procesu in vivo nyní pojímán **tkáňový faktor** (TF). Proces iniciace hemostázy, který probíhá hlavně na povrchu monocytů vede k procesu regulované genese trombinu (Andree a Nemer-son, 1995).

Výsledkem iniciační fáze je tvorba malého množství trombinu, který sice nedostačuje pro přeměnu fibrinogenu na fibrin, ale má význam pro pokračování koagulace v tzv. „amplifikační“ a „propagační fázi“.

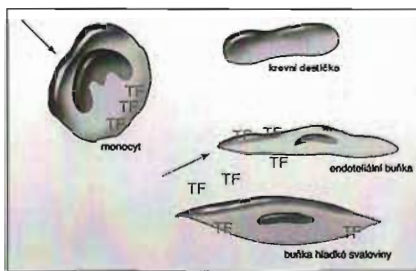
- *F XIIa se na iniciaci koagulační kaskády in vivo většinou nepodílí. Jak se ukázalo byla aktivace koagulace v tzv. kontaktní fázi pouze artefaktem in vitro studií, při kterých se používaly nadměrné dávky aktivátorů a arteficiální povrchy. Vyšetření nemocných s deficitem nebo defektem F XII ukázala, že u těchto nemocných nedochází k narušení iniciace hemostázy a to i v případě kardiokirurgických zákroků s mimotělním oběhem. Experimentální práce na zvířatech prokázaly, že vyvážení F XII protilátkami neovlivní průběh koagulačních reakcí in vivo (Miller a spol., 1996).*

Tkáňový faktor se normálně nachází ve dvou rozdílných podobách, které se zúčastňují na iniciaci koagulace za různých podmínek:

- **Subendotelová a perivaskulární složka TF** – zahrnuje povrch fibroblastů v subendoteliální a perivaskulární oblasti a dále parenchymové buňky jako jsou mozek, plíce, ledviny, endometrium a placenta. Tato složka je charakterizována bazální expresí TF a zvýšením jeho syntézy vlivem některých růstových faktorů.

Perivaskulární exprese TF vytváří ochrannou vrstvu před masivním krvácením. Zúčastňuje se hemostázy hlavně při poškození cévy, když se krev dostane do kontaktu s tkáněmi.

- **Cévní složka TF** – zahrnuje monocyty a endotel. V těchto buňkách nedochází k syntéze TF. Exprese na těchto buňkách je indukována různými podněty mezi které patří TNF (tumor necrosis factor), endotoxin, interleukin1, lipopolysacharidy, některé růstové faktory a trombin. (Conkling a spol., 1988; Conway a spol., 1989; Moore a spol., 1987; Cozzolino a spol., 1988).



Exprimace TF na některých buňkách

Za fyziologických podmínek oddělují TF od cirkulace jednak endotelová bariéra (subendotelová a perivaskulární složka), tak i mechanismy selektivní exprese (cévní složka TF). Buňky, které jsou s krví v přímém kontaktu (endotelie, krevní elementy) exprimují TF až po stimulaci. Pokud nedojde k přímému poškození cévního systému, probíhá exprese TF hlavně **na aktivovaných monocitech**. Aktivace monocytů může být vyvolána řadou příčin – zánět, sepse, metabolický rozvrat, aterosklerotické změny aj. (Osterud a Bjorklid, 2001).

- Na povrchu aktivovaných monocytů se nachází jen asi 20 % jejich TF aktivity. Aby se projevila celá kapacita aktivity TF je pravděpodobně nutná spolupráce monocytů s granulocyty a trombocyty. Předpokládá se, že aktivované monocyty produkují TNF- α , který stimuluje granulocyty k tvorbě faktoru aktivujícího trombocyty (PAF). Tento faktor zvyšuje expresi a aktivitu monocytárního TF prostřednictvím trombocytů (Osterud a Bjorklid, 2001; ten Cate a spol., 1999).

K INICIACI KOAGULACE JE NEZBYTNÉ VYTVOŘENÍ KOMPLEXU [TF . VIIa]. TENTO PROCES JE ZÁVISLÝ NA UVOLNĚNÍ TF Z POVRCHU NĚKTERÝCH BUNĚK NACHÁZEJÍCÍCH SE V KRVÍ NEBO PŘÍCHÁZEJÍCÍCH DO STYKU S KRVÍ A DÁLE NA DOSTATEČNÉM MNOŽSTVÍ FVIIa, KTERÝ V MALÉM MNOŽSTVÍ CÍRKULUJE V PLAZMĚ.

Průběh koagulace při exprimaci cévní složky TF

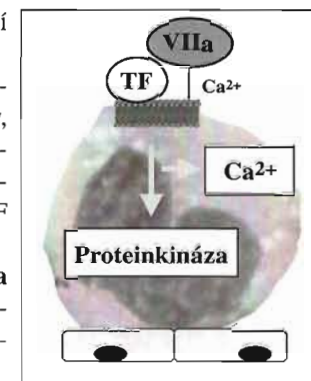
Iniciační fáze koagulace probíhá na povrchu aktivovaných monocytů exprimujících TF. Faktor VIIa se váže k membránovému TF na povrchu buněk za vzniku dimerního komplexu [TF . VIIa]. TF v komplexu s F VIIa působí nejen jako kofaktor, ale zvyšuje jeho proteolytický účinek až 3 000krát.

Při vazbě F VIIa na TF dochází současně k přenosu aktivačního signálu do buňky. Zvyšuje se koncentrace nitrobuněčného vápníku, aktivují se proteinové kinázy C a adhezivní kinázy. To se projeví inhibicí fosfolipidové translokázy a zafixováním části buněčné membrány – vzniká plně účinný tetramerní komplex

[TF . VIIa . Ca²⁺ . P1] a současně se potencuje další exprese TF (Preissner a Kanse, 1996).

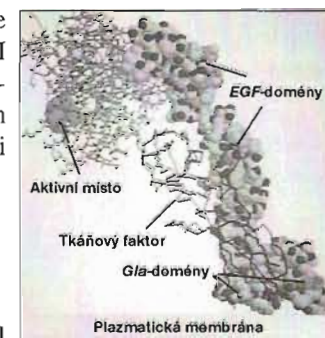
Aktivované monocyty jsou nejúčinnějším spouštěčem koagulace v cévním systému a to zejména tehdy, je-li exprese TF na endotelu velmi malá. K účinné hemostáze je však potřebná adheze monocytů k aktivovanému povrchu endotelu, která zvýší i expresi TF (Camerer a spol., 1996).

V krvi koluje vždy malé množství F VIIa (< 100 pmol/l), který na rozdíl od ostatních serinových proteáz nemá sám o sobě prakticky žádnou proteolytickou aktivitu (Macík a Morrissey, 1991).

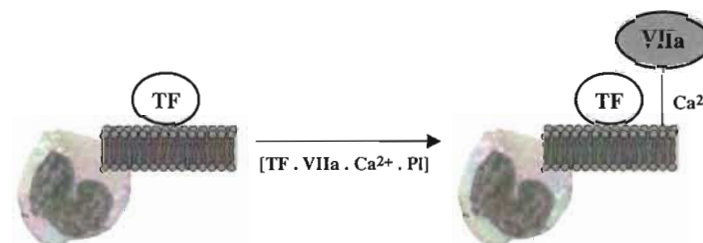
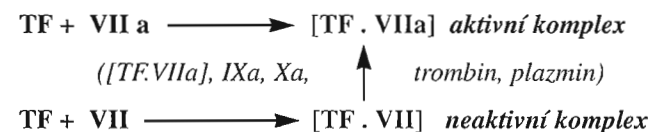


- Původ v plazmě cirkulujícího faktoru VIIa není zcela jasný. Předpokládá se, že se v malých množstvích samovolně aktivuje, zejména po jídle účinkem lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly. K aktivaci by mohlo docházet na povrchu fosfolipidových mikropartikul za spoluúčasti F IXa (Bauer, 1997).

TF váže přímo aktivní faktor VII (F VIIa), ale současně může vázat i inaktivní formu (F VII). F VII je následně konvertován v komplexu s TF na aktivovanou formu (F VIIa) autokatalytickým komplexem [TF . VIIa] případně dalšími koagulačními proteázami (IXa, Xa, trombin, plazmin).

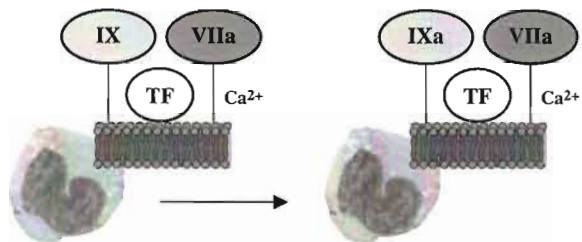


Komplex [TF . VIIa]

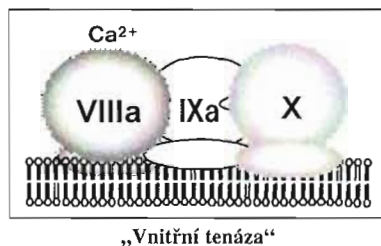


Komplex [TF . VIIa] společně s fosfolipidy a ionty Ca^{2+} :

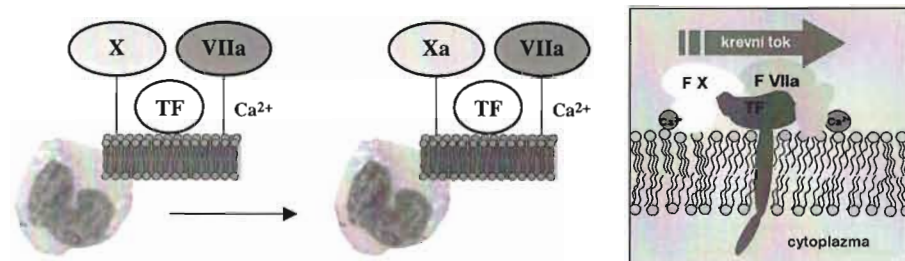
- Limitovanou proteolýzou **aktivuje faktor IX na IXa** (Rao a Rapaport, 1988):



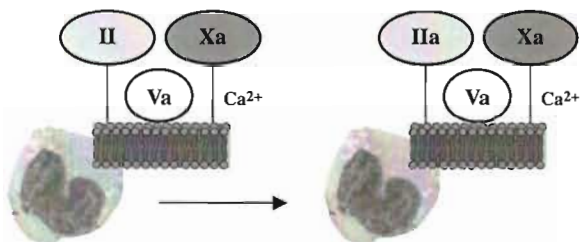
- *F IXa je daleko lépe chráněn proti inhibičním vlivům než F Xa a proto v aktivní formě přetrvává až do propagační fáze, kdy je adsorbován na membránu trombocytu a společně se svým kofaktorem (F VIIIa) tvoří tzv. „vnitřní tenázu“.*



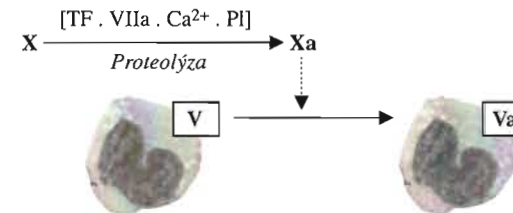
- V systému tzv. „vnější tenázy“ aktivuje komplex [TF . VIIa] faktor X:



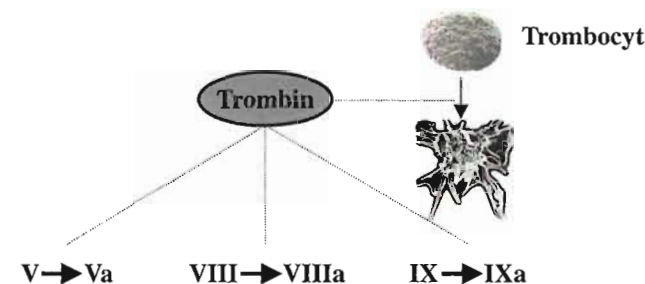
Aktivovaný faktor X se na membránu aktivovaných monocytů váže do komplexu protrombinázy a v této formě generuje malé množství trombinu (Osterud a Rapaport, 1977):



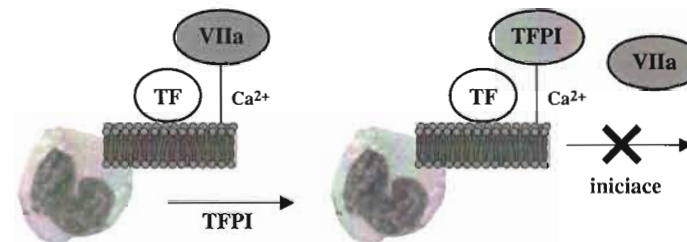
F Va potřebný k vytvoření malého množství protrombinázy na povrchu buněk exprimujících TF je aktivován buď F Xa nebo buňkami, které produkují nekoagulační proteázy.



Vzniklé malé množství trombinu **aktivuje faktory V, VIII, XI, a krevní destičky** nahromaděné v místě poškození tkáně.



Souběžně se vznikem komplexu [TF . VIIa] dochází k **aktivaci inhibitoru tkáňového faktoru (TFPI – tissue factor protein inhibitor)**. Protože působení komplexu [TF . VIIa] je ohraničené jen na povrch buněk exprimujících TF, dojde po navázání TFPI k zablokování této cesty aktivace. Dochází i k inhibici faktoru Xa, který pokud opustí ochranné prostředí buněčného povrchu je rychle vyvázan AT na inaktivní komplex.



Vnější cestou aktivovaný F Xa nestačí k zabezpečení kompletní hemostázy, tj. přeměny fibrinogenu na fibrinové vlákno. Koagulace pak probíhá dále jen vnitřní cestou **ve fázi amplifikace a propagace**.

- *Proteázy iniciační fáze hemostázy neaktivují jen hemostázu, ale jsou současně polyfunkčními molekulami, které působí na široké spektrum buněk přes specifické receptory. Trombin působí přes proteolyticky aktivovaný receptor PAR-1, F Xa přes efektorový proteázový receptor EPR-1 a TF je receptorem pro F VIIa a společně s ním se zúčastňuje na přenosu signálu do buňky. Proteázy koagulační kaskády takto nepřímou regulují tvorbu zápalových cytokinů, chemotaxi leukocytů, proliferaci lymfocytů a jsou důležitými růstovými faktory pro endoteliální buňky (Hudeček a spol., 2004).*

2.3.7.2. Amplifikační fáze

Ve „fázi amplifikace“ dochází k vyvázání faktorů aktivovaných ve fázi propagace na povrchy aktivovaných trombocytů, které se v procesu adheze a agregace soustředily v místě poranění k vytvoření dostatečného množství protrombinázy.

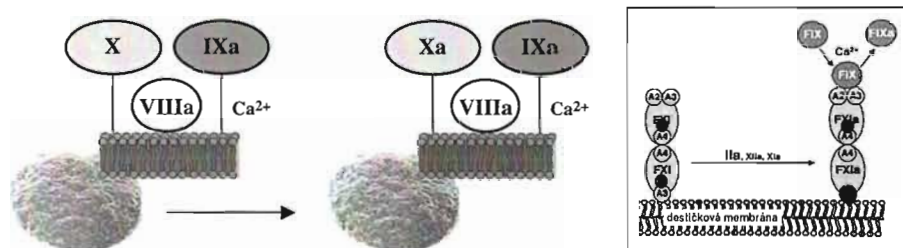
- *Aktivaci destiček zajišťuje v této fázi hlavně interakce destičkových receptorů s trombinem (Hoffman a spol., 1996; Morrissey a spol., 1997).*

Trombinem aktivované formy faktorů VIIIa, Va a faktor IXa, aktivovaný komplexem [TF . VIIa] se s vysokou účinností váží na povrch záporně nabitých fosfolipidů, odhalených po flip-flop reakci aktivovaných destiček (Bever a spol., 1982).

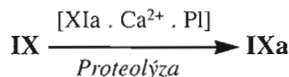
2.3.7.3. Propagační fáze

Ve „fázi propagace“ koagulačně aktivní komplexy tenáza a protrombináza vyvázané na povrchu krevních destiček, zajistí dostatečné množství trombinu, který vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrin.

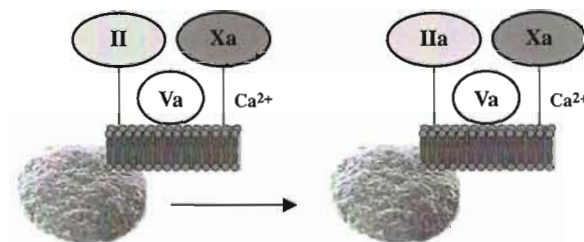
Fosfolipidový komplex tenáza zajišťuje de novo na povrchu krevních destiček aktivaci F X na F Xa.



Ve fázi propagace se rovněž uplatňuje faktor XIa, aktivovaný trombinem ve fázi iniciace, který po navázání na povrch trombocytů podporuje další aktivaci faktoru IX.



Hlavní tvorba trombinu je pak zajištěna fosfolipidovým komplexem – **protrombinázou** [Va . Xa . Ca²⁺ . PI] vyvázaného na membráně aktivovaných krevních destiček, ve kterém je F Xa již dostatečně chráněn proti inaktivaci. Touto cestou vzniká dostatečné množství trombinu nezbytné k vytvoření pevné fibrinové zátky (Hoffman a Monroe, 2001).



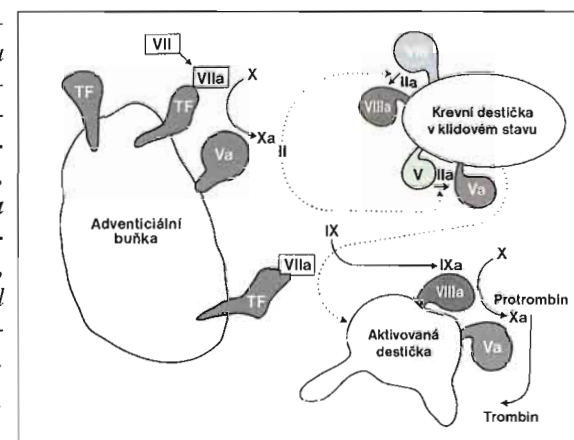
Trombin je klíčovým enzymem hemostázy, který ovlivňuje jak koagulační a antikoagulační děje, tak i fibrinolytické a antifibrinolytické systémy. Souhra funkcí těchto systémů je zabezpečována různou citlivostí jejich složek k působení trombinu (Hudeček, 2004).

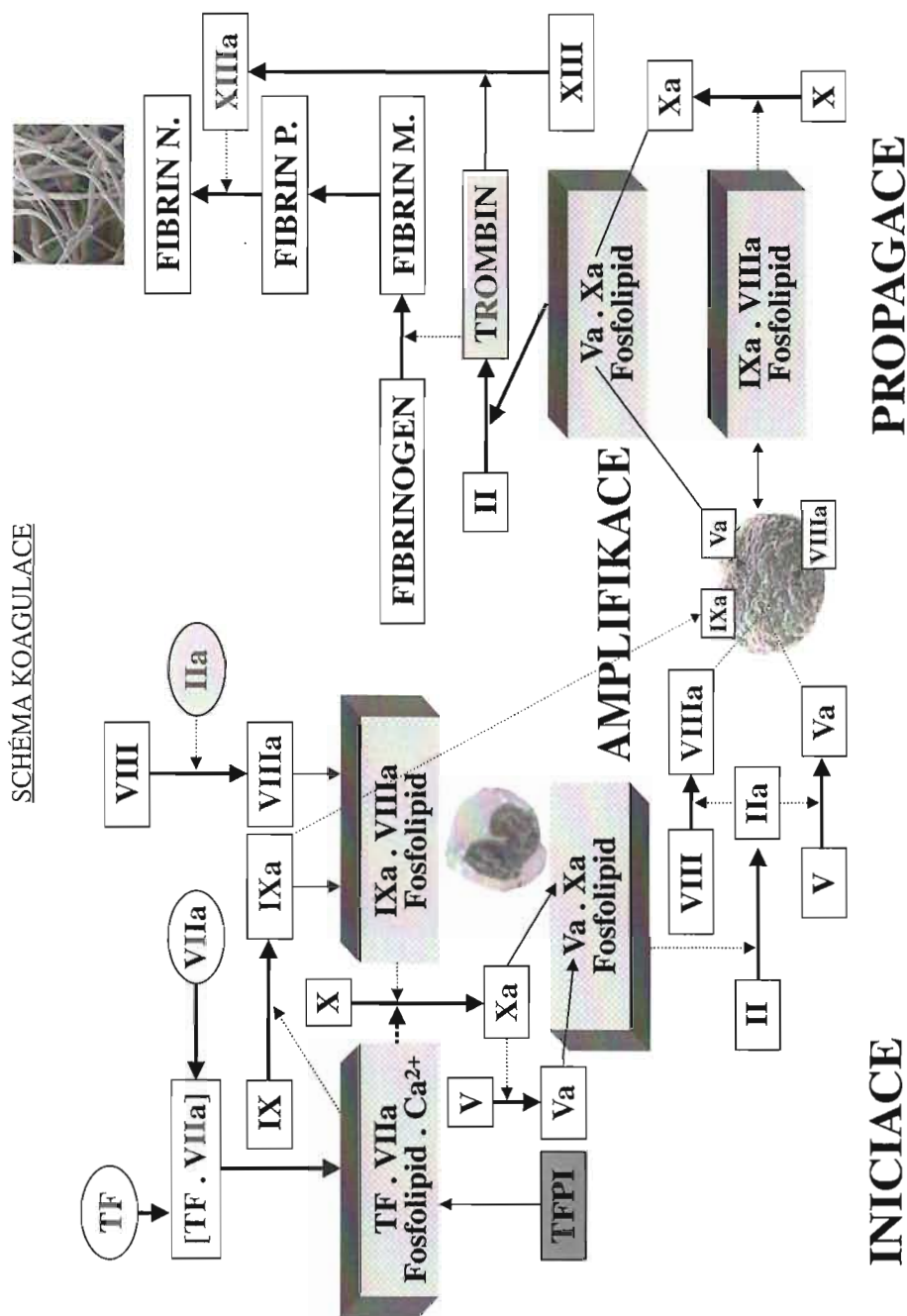
Dostatečná tvorba trombinu je nezbytná.

- K vytvoření **plně stabilizované a pevné fibrinové hemostatické zátky**. K tomu je nezbytná funkčnost obou tenáz, jak vnější [TF . VIIa], tak vnitřní [IXa . VIIIa].
- K **aktivaci F XIII** – stabilizace fibrinové sítě
- K **aktivaci trombinem aktivovaného inhibitoru fibrinolýzy – TAFI** (Thrombin Activable Fibrinolytic Inhibitor), který je vyžadován k normální rezistenci fibrinové zátky během fibrinolytického procesu.

- *Mezi jednotlivými komplexy tohoto schématu existují pozoruhodné podobnosti. Každý z nich obsahuje neenzymový ko-faktor (TF, VIIIa, Va), který specificky váže na vitamín K závislou serinovou proteázu (F VIIa, F IXa, F Xa). Na rozdíl od F VIII a F V nevyžaduje tkáňový faktor aktivaci.*

Iniciační a amplifikační fáze koagulace





- Při deficitech faktorů IX, VIII, V, (XI) je snížena tvorba trombinu na povrchu krevních destiček a tvoří se nestabilní destičková zátka (zvýšená permeabilita, zvýšená lýza). Hemofilie A i B je tedy onemocnění s poruchou koagulace, ale i fibrinolýzy. Hemostatická zátka tvořená při nedostatečné aktivitě F XI (deficit F XI) je citlivější na lýzu a současně je narušena i aktivace TAFI. Nemocným s deficitem F VII chybí možnost aktivovat F X.

Normálně funkční endotel

Funkčně normální endotel je schopen zabránit amplifikační a propagační fázi koagulace a vytvoření fibrinové zátky. Slouží k tomu 2 inhibiční mechanismy:

- **Antitrombin** navázaný na povrchové proteoglykany na membráně endotelu inhibuje trombin
- **Systém proteinu C** – který se tvoří na endotelu za účasti systému trombomodulin/trombin štěpí faktory Va a VIIIa – znesnadňuje tvorbu tenázy a protrombinázy a tím snižuje genezi trombinu.

Inhibitory v novém modelu koagulace

Před nekontrolovanou aktivací koagulačního procesu je organismus chráněn třemi hlavními antikoagulačními systémy:

- **TFPI**
- **Systém PC**
- **AT**
- ◆ Vzestup hladiny F Xa vyvolá tvorbu **TFPI**, který jej přímo inhibuje vytvořením komplexu [FXa . TFPI]. Tento komplex blokuje aktivitu komplexu [TF . VIIa], který se nachází na povrchu dysfunkčních nebo aktivovaných buněk, hlavně monocytů.
- ◆ Vzestup hladiny trombinu vyvolá tvorbu rovnocenného množství **APC** komplexem [TM . IIa]. Inaktivací faktorů Va a VIIIa snižuje APC další tvorbu trombinu. Účinnost systému PC zvyšuje EPCR a PS, který je nezbytný pro inaktivaci F VIIIa v tenázovém komplexu.
- ◆ Antitrombin inaktivuje většinu složek koagulace. Tvorbu komplexů s těmito složkami významně urychluje přítomnost heparinu nebo jiných glykosylaminoglykanů. Vazba heparinu na molekulu komplexu je v případě trombinu podmínkou. AT odstraňuje trombin i z komplexu [TM . trombin] (de Jonge a spol., 2001).

Literatura

Andree, M. A. H. a Nemerson, Y.: **Tissue factor: regulation of activity by flow and phospholipid surfaces.** Blood Coagul. Fibrinol., 6, 1995, s. 189–197.

Bauer, K. A.: **Activation of the factor VII – tissue factor pathway.** Thromb. Haemostat. 78, 1997, s. 108–111.

Beyers, E. M., Comfurius, P., Zwaal, R. F. A.: The nature of the binding site for prothrombinase at the platelet surface as revealed by lipolytic enzymes. *Eur. J. Biochem.* 122, 1982, s. 81–85.

Blombäck, B.: Fibrinogen and fibrin – proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.*, 83, 1996, s. 71–75.

Camerer, E., Kolsto, A. B., Prydz, H.: Cell biology of tissue factor, the principle initiator of blood coagulation. *Thromb. Res.*, 81, 1996, s. 31–41.

Conkling, P. R., Greenberg, C. S., Weinberg, J. B.: Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U 937 and peripheral blood monocytes. *Blood* 72, 1988, s. 128–133.

Conway, E. M., Bach, R., Rosenberg, R. D., Konigsberg, W. H.: Tumor necrosis factor expression of tissue factor mRNA in endothelial cells. *Thromb. Res.* 53, 1989, s. 231–241.

Cozzolino, F., Torcia, M., Miliani, A. et al.: Potential role of interleukin – 1 as the trigger for diffuse intravascular coagulation in acute nonlymphoblastic leukemia. *Am. J. Med.* 84, 1988, s. 240–250.

Dyr, J., Blombäck, B. and Hessel, B. et al.: Conversion of fibrinogen to fibrin induced by prompt release of fibrinopeptide B. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 1989, s. 18–24.

Galajda, P., Baláž, D., Mokáň, M., Kubisz, P.: K problematice nového modelu hemostázy. *Vnitřní lékařství* 44, 1998, č. 11, s. 671–674.

Giesen, P. L. a Nemerson, Y.: Tissue factor on the loose. *Semin. Thromb. Haemost.* 26, 2000, č. 4, s. 379–384.

Greer, I. A.: Procoagulant microparticles: new insight and opportunities in pregnancy loss? *Thromb. Haemost.* 85, 2001, s. 3–4.

Heimark, R. L., Kurachi, K., Fujikawa, K., Davie, E. W.: Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation. *Nature* 286, 1980, s. 456–460.

Hemker, H. C., Ecnouf, M. P., Hemker, P. W., Swart, A. C., MacFarlane, R. G.: Formation of prothrombin converting activity. *Nature* 215, 1967, č. 98, s. 248–251.

Hoffman, M., Monroe, D. M., Roberts, H. R.: Cellular interactions in hemostasis. *Haemostasis* 26, 1996, suppl. 1, s. 12–16.

Hoffman, M. a Monroe, D. M.: A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85, 2001, č. 6, s. 958–965.

Hosesson, M.: Fibrinogen and fibrin polymerization: Approval of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin clot assembly. *Blood Coagul. Fibrinol.* 8, 1997, s. 257.

Hu, Ch., Baglia, F. A., Mills, D. C. B., Konkle, B. A., Walsh, P. N.: Time-specific expression of functional XI expression. *Blood* 91, 1998, s. 3800–3807.

Hudeček, J., Paceková, M., Chudej, J., Kubisz, P.: Infekce a hemostáza. *Vnitř. Léč.*, 50, 2004, č. 6, s. 463–471.

MacFarlane, R. G.: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its functions as a biochemical amplifier. *Nature* 202, 1964, s. 498–499.

Macik, B. G. a Morrissey, J. H.: Determination of activated factor VII (FVIIa) levels in plasma using a clotting assay specific for FVIIa. *Blood* 78, 1991, Suppl, s. 61–63.

McKee, P. A., Schwartz, M. L., Pizzo, S. V., Hill, R. L.: Cross-linking of fibrin by fibrin stabilizing factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 202, 1972, s. 127.

Miller, G. J., Martin, J. C., Mitropoulos, K. A. et al.: Activation of factor VII during alimentary lipemia occurs in healthy adults and patients with congenital factor XII or factor XI deficiency, but not in patients with factor IX deficiency. *Blood* 87, 1996, s. 4187–4196.

Moore, K. L., Andreoli, S. P., Esmon, N. L., Esmon, C. T., Bang, E. U.: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* 79, 1987, s. 124–130.

Morawitz, P.: Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergeb. Physiol.* 4, 1905, s. 207–223.

Muzbeck, L., Yee, V. C., Hevessy, Z.: Blood coagulation factor XIII: Structure and function. *Thromb. Res.* 94, 1999, s. 271–305.

Nemerson, Y.: Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71, 1988, s. 1–8.

Nemerson, Z.: The tissue factor pathway of blood coagulation. *Sem. Hematol.* 29, č. 3, 1992, s. 170–176.

Olexa, S. A. a Budzynski, A. Z.: Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 1980, s. 1374.

Osterud, B. a Rapaport, S. I.: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 1977, s. 5260–5264.

Osterud, B., Vijaya Mohan Rao, L., Olsen, L. O.: Induction of tissue factor expression in whole blood: Lack of evidence for the

presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb. Haemost.* 83, 2000, s. 861–867.

Osterud, B. a Bjorklid, E.: The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin. Thromb. Hemost.* 27, 2001, č. 6, s. 605–617.

Osumi, K., Ozeki, Y., Saito, S., Nagamura, Y., Ito, H., Kimura, Y., Ogura, H., Nomura, S.: Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet – derived microparticles. *Thromb. Haemost.* 85, 2001, s. 326–330.

Ozcan, M., Morton, C. T., Solovey, A., Dandele, L., Bach, R. R., Hebbel, R. P., Slungaard, A. Key, N. S.: Whole blood tissue factor procoagulant activity remains detectable during severe aplasia following bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation. *Thromb. Haemost.* 85, 2001, s. 250–255.

Preisner, K. T. a Kanse, S. M.: Protease receptors in the vasculature: Novel aspects of regulation of haemostasis and wound repair. *Biomed. Progress*, 9, 1996, s. 22–27.

Rapaport, S. I. a Vijaya Mohan Rao, L.: The tissue factor pathway: How it has become a „prima ballerina“. *Thromb. Haemost.* 74, 1995, č. 1, s. 7–17.

Rickles, F. R., Hair, G. A., Zeff, R. A., Lee, E., Bona, R.: Tissue factor expression in human leucocytes and tumor cells. *Thromb. Haemost.* 74, 1995, s. 391–395.

Scarpati, E. M., Wen, D., Broze, G. J., Mileich, J. P.: Human tissue factor cDNA sequence and chromosome localisation on the gene. *Biochemistry* 26, 1987, s. 5234–5238.

Shafer, J. A. a Higgins, D. L.: Human fibrinogen. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 26, 1988, s. 1.

Schloesser, M., Zeerlender, S., Lutze, G. et al.: **Mutations in the Human Factor XII Gene.** Blood 90, 1997, č. 10, s. 3967–3977.

Sobel, J. H. a Gawinowicz, M. A.: **Identification of the α chain lysine donor sites involved in factor XIIIa fibrin cross-linking.** J. Biol. Chem. 271, 1996, s. 19288

Sussman, I. I.: **Normal pathways of coagulation.** Sem. Hematol. 29, č. 3, 1992, s. 157–158.

Swars, H., Hafner, H. G., Erbel, R., Ehrenthal, W., Prellwitz, W., Meyer, J.: **Prothrombin fragment F 1+2: early sign of subacute thrombotic occlusion after coronary stent implantation.** Eur. Heart. J. 12, (Suppl), 1991, s. 940.

Ten Cate, Timmerman, J. J., Levi, M. M.: **The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation.** Thromb. Haemost. 82, 1999, č. 2, s. 713–717.

Thompson, R. E., Mandle, R., Kaplan, A. P.: **Association of factor XI and high-molecular-weight kininogen in human plasma.** J. Clin. Invest. 60, 1977, s. 1376.

Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D.: **Structure of human F VIII.** Nature 312, 1984, s. 337.

Waxman, E., Ross, J. B. A., Laue, T. M. et al.: **Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of complex.** Biochemistry 31, 1992, s. 3998–4003.

Weiss, H. J., Turitto, V. T., Baumgartner, H. R., Nemerson, Y., Hoffmann, T.: **Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium.** Blood 73, 1989, s. 968–975.

Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. J. et al.: **Expresion of active human factor VIII from recombinant DNA clones.** Nature 312, 1984, s. 330

2.4. Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je odpovědný za lýzu fibrinového koagula, ale hraje také podstatnou úlohu při degradaci kolagenu, v angiogenezi, u metastáz tumoru. V této části bude popsána a diskutována pouze úloha fibrinolytického systému v hemostáze.



Lidská krev obsahuje enzymový systém schopný rozpouštět krevní fibrinovou sraženinu. Za fyziologických podmínek systém udržuje hemostatickou rovnováhu. Fibrinové koagulum výrazně omezuje krevní tok, což může vést při nekontrolovatelné aktivaci i k uzavření cévy.

Fibrinolýza je v řadě svých aktivačních a reakčních kroků podobná plazmatickému koagulačnímu systému. Centrální složkou fibrinolytického systému je **plazminogen**, který je prekurzorem (proenzymem) serinové proteázy – **plazminu**. Nejdůležitějšími aktivátory plazminogenu jsou prekurzory serinových proteáz **tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)** a **urokináza (u-Pa)**.

Na fibrinové koagulum nebo na přítomnost fibrinových vláken reaguje organismus aktivací fibrinolytického systému (Davie a spol., 1991). Plazminogen se váže na krevní koagulum, je aktivován na plazmin působením aktivátorů uvolněných z endotelu. Plazmin proteolyticky působí na koagulum a je nakonec inaktivován cirkulujícími antiplazminy. Fibrinolýza je fyziologicky vázána na místo poranění, plazmin je generován pouze na povrchu koagula. Schopnost fibrinolýzy specificky štěpit fibrin a ne fibrinogen je dána zvýšenou afinitou jak plazminogenu, tak i jeho aktivátoru (t-PA) k fibrinu.

- ☐ Zvýšení fibrinolytických schopností krve může vést ke krvácení, snížení fibrinolýzy může naopak vyvolat trombotické stavy (Bachman, 1994).

2.4.1. Plazminogen

- ☐ MW: Glu-plazminogen 90 kDa
Lys-plazminogen 83 kDa
- ☐ Biologický poločas: Glu-plazminogen 48–60 hodin
Lys-plazminogen 12–20 hodin
- ☐ Fyziologické hodnoty: 2,4 $\mu\text{mol/l}$ plazmy 200–210 mg/l plazmy

Plazminogen je jednořetězcový glykoprotein, který je syntetizován játry ve dvou formacích **Glu- a Lys- plazminogen**. Je přítomen i v jiných tkáních a buňkách

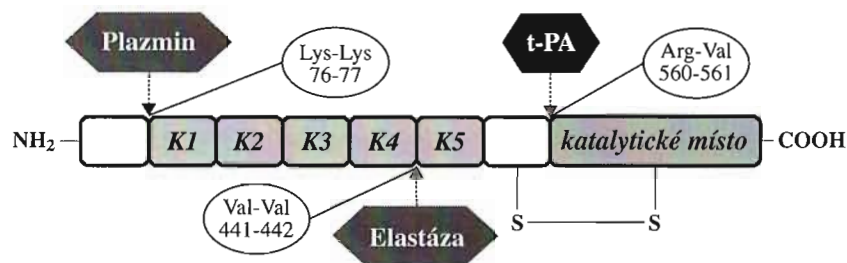
(eozinofily, ledviny). *Lyz*-plazminogen tvoří menší molekulu a má kratší biologický poločas, než *Glu*-plazminogen. V plazmě se plazminogen vyskytuje částečně vyvázan na glykoproteiny bohaté na histidin. Plazminogen se váže na povrchy nejrůznějších buněk a na membrány krevních destiček. Buněčných receptorů pro plazminogen je několik, v případě krevních destiček se jedná o GP IIb/IIIa.

Plazminogen je prekurzorem antikoagulačního proteinu plazminu, který jako serinová proteáza aktivuje disociaci fibrinové složky krevní sraženiny. Bílkovinný řetězec plazminogenu sestává ze 790 aminokyselin a 2 cukerných složek navázaných v místech *Asp*²⁸⁹ a *Thr*³⁴⁶.

Lidský plazminogen sestává s 5 „Kringles“ modulů spojených disulfidickými vazbami. Dále obsahuje proteázovou doménu a peptid s koncovou aminokupinou. Domény označované „Kringles“ obsahují afinitní místa pro vazbu lysinu. Interakce plazminogenu s fibrinem a α_2 -antiplazminem je zprostředkována právě těmito lysinovými vazebnými místy. Každý „Kringles“ modul je složen ze 78 residuí, které mají podobnou sekvenci.

- „Kringles“ moduly obsahují také některé krevní koagulační proteiny, jako je *prothrombin*, *tPA*, *uPA*, *F X* a jiné. Podobnost těchto enzymů v oblastech zvaných *Kringles* ukazuje na to, že tyto sloučeniny se vyvinuly během evolučního vývoje z primitivnější společné formy.

STRUKTURA PLAZMINOGENU (domény)



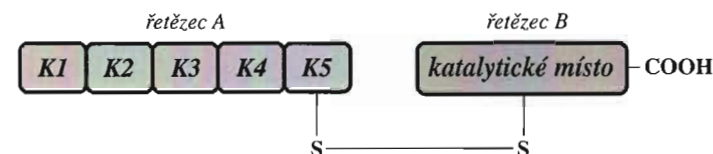
K – Kringles domény

K aktivaci plazminogenu dochází současně s aktivací koagulace. K přeměně plazminogenu na plazmin dochází působením aktivátorů plazminogenu. Plazminogen se váže na fibrin přes vazebná místa lysinu na jeho molekule. V místech navázaného plazminogenu jsou i vazebná místa pro jeho aktivátory. Aktivace pomocí t-PA je několikrát urychlena v přítomnosti fibrinu, který slouží jako kofaktor při aktivaci plazminogenu vyvolanou t-PA. Interakce *Glu*-plazminogenu s fibrinovým povrchem zvyšuje rychlost aktivace t-PA 12–13krát. Forma *Lys*-plazmino-

genu je aktivována t-PA nebo u-PA asi 10–20krát rychleji než *Glu*-formace.

Aktivační působky štěpí molekulu plazminogenu v místě *Lys*⁷⁷ a uvolní se peptid. Potom následuje další štěpení v místě *Arg*⁵⁶⁰. Vzniká dvouřetězcová molekula sestávající ze dvou fragmentů spojených disulfidickou vazbou:

- těžší A řetězec
- lehký B řetězec – obsahuje aktivní katalytické místo



2.4.2. Aktivátory plazminogenu

2.4.2.1. Vnitřní

Jsou součástí krevní plazmy a tvoří je hlavně kontaktní systém: F XII, prekalkrein a HMWK. Aktivace nastává po kontaktu F XII s poškozenou cévní stěnou. Mezi vnitřní aktivátory plazminogenu se dále řadí trombin a trypsin (*Champan, 1997*).

2.4.2.2. Vnější

Pocházejí z lidského organismu, ale z míst mimo krevní oběh (*Champan, 1997*).

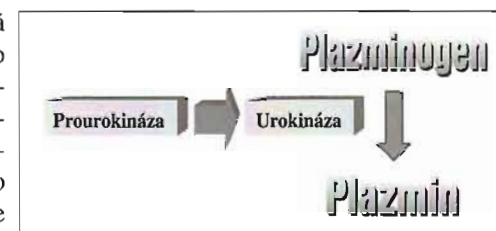
Za fyziologických podmínek se na aktivaci plazminogenu podílí z přibližně 1/4 F XIIa, z 1/4 u-PA a z 1/2 t-PA (*Spraggon a spol., 1995*).

Urokináza – u-PA (lidská HMW)

- MW: 54 kDa (HMW forma)
- Biologický poločas: 6 min
- Koncentrace v plazmě: 2–8 µg/l

Prourokináza je jednořetězcová glykosylovaná proteáza serinového typu, která se nachází hlavně v ledvinách. Je uvolňována z endoteliálních buněk v přítomnosti endotoxinu nebo tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). Prourokináza (single chain urokinase: scu-PA) se nachází se v nízké koncentraci v plazmě.

Vlivem kontaktního systému (kalikerin, HMWK, F XIIa) a plazminu přechází jednořetězcová formace (*prourokináza – scu-PA*) na aktivní dvouřetězcovou forma-



ci (**urokináza – u-PA**). Urokináza je uvolňována v rámci fibrinolýzy a je rychle vazovaná hlavním modulátorem fibrinolýzy PAI-1.

Nachází se v nízké- i vysoko-molekulárních formách (LMW: 31 kDa, HMW: 55 kDa). V plazmě cirkuluje samostatně (Spraggon a spol., 1995). Poprvé byla izolována z moči.

- Urokináza (u-PA) byla zjištěna i v pojivové tkáni, v buňkách podobných fibroblastům, dále v epitelálních buňkách, monocitech a makrofázích.

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)

- MW: 68 kDa (HMW forma)
- Biologický poločas: 5–8 minut
- Koncentrace v plazmě: 5–10 µg/l

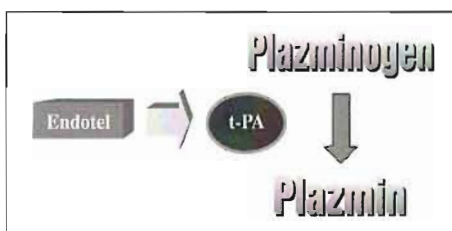
Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími proces fibrinolýzy in vivo jsou **tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA)** a jeho inhibitor (**PAI-1**). Většina t-PA v cirkulaci je vyvázána v komplexu s PAI-1, část je ve formě volné.

t-PA je proteinázou serinového typu, která se uvolňuje jako jednořetězcová molekula ze zdravých endotelových buněk po jejich stimulaci trombinem nebo aktivovaným proteinem C, případně histaminem, bradykinem, či IL1. Dalším buněčným zdrojem t-PA jsou aktivované monocyty a megakaryocyty (Lanbda a spol., 1996). Tkáňový aktivátor plazminogenu se vyskytuje hlavně v orgánech s bohatým cévním zastoupením, jako jsou děloha, ledviny, plíce. Koncentrace t-PA se zvyšuje po žilní okluzi, po svalovém cvičení, ale i při stresové reakci (uvolnění katecholaminů a vazopresinu).

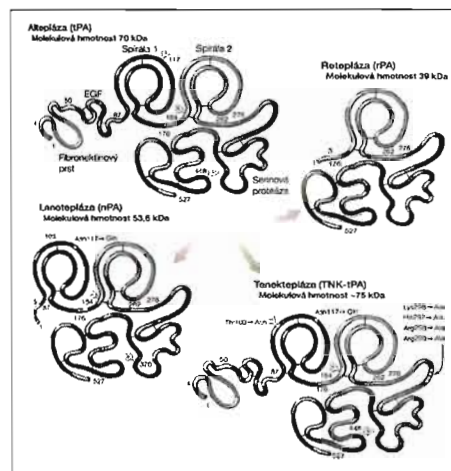
Jednořetězcová molekula je proteolyticky štěpena buď plazminem nebo tkáňovým kalikreinem, či F Xa za vzniku dvouřetězové aktivní formy.

t-PA je fibrin specifický aktivátor plazminogenu. Fibrinová specifita je výsledkem interakce kringle-2 domény t-PA se specifickým lysinovým reziduem na nerozpustném fibrinu. Nenavázaný t-PA se rychle neutralizuje v játrech, kde je metabolizován. Aktivita t-PA vůči plazminogenu se zvyšuje, je-li plazminogen navázan na fibrinovou síť nebo částečně degradovaný fibrin (Wiman a Collen, 1978). Odpovídá tedy za specifickou fibrinolýzu (Hoyleaerts a spol., 1982). Toho se využívá při trombolytické léčbě cévních uzávěrů zejména při trombotizaci koronárních tepen. t-PA má příznivý efekt při redukci trombofilie a obnovy recirkulace po trombolýze.

- t-PA je silná proteáza a účastní se např. procesu nidace oplodněného vajíčka a je spolu s dalším aktivátorem plazminogenu – urokinázou, účinný při procesu proliferace a migrace buněk (Godyna a spol., 1996). Nyní byl zjištěn také zvýšený obsah t-PA v mozku při procesu „učení“ pokusných zvířat.



- t-PA se rovněž podílí na procesu neovaskularizace buňky nebo tkáni, kde jeho proteolytická aktivita napomáhá migraci proliferujících endotelií i buněk hladké svaloviny, popřípadě i nádorových buněk při metastázování (Desana a spol., 1988). Takto musíme pohlížet na t-PA i z opačného ne-příznivého hlediska. V novějších studiích byla potvrzena zvýšená hladina t-PA u osob s rizikem IM a s rozvojem aterosklerózy. Vyšší koncentrace t-PA je považována za další rizikový faktor kardiovaskulárních chorob.



Struktura t-PA, reteplázy (r-PA), lanoteplázy (n-PA) a tenekteplázy (TNK-t-PA)

Laboratorní stanovení

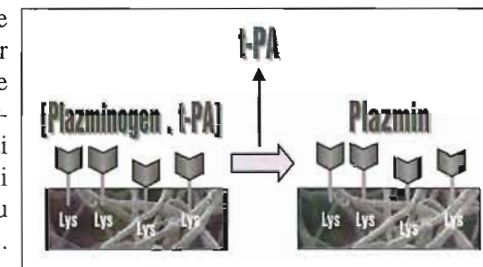
- stanovení antigenu
- stanovení aktivity t-PA

Proaktivátory

Jsou to extrakty tkáňových kultur některých bakterií, které se využívají zejména léčebně (Gonzales–Gronow a spol., 1978). Nejznámější je **Streptokináza** (enzym, který je produkovaný β-hemolytickým streptokokem).

2.4.3. Přeměna plazminogenu na plazmin

Fibrinolytický systém se aktivuje ihned po vytvoření prvních struktur fibrinu. Na fibrinový povrch se naváže plazminogen a t-PA. Dochází k formaci ternárního komplexu mezi t-PA, plazminogenem a lysinovými strukturami na C- řetězci fibrinu [**t-PA . plazminogen . fibrin**]. Plazminogen v komplexu s t-PA, vyvázaný k fibrinu je velmi účinně konvertován na plazmin. Fibrin působí v této reakci jako kofaktor.

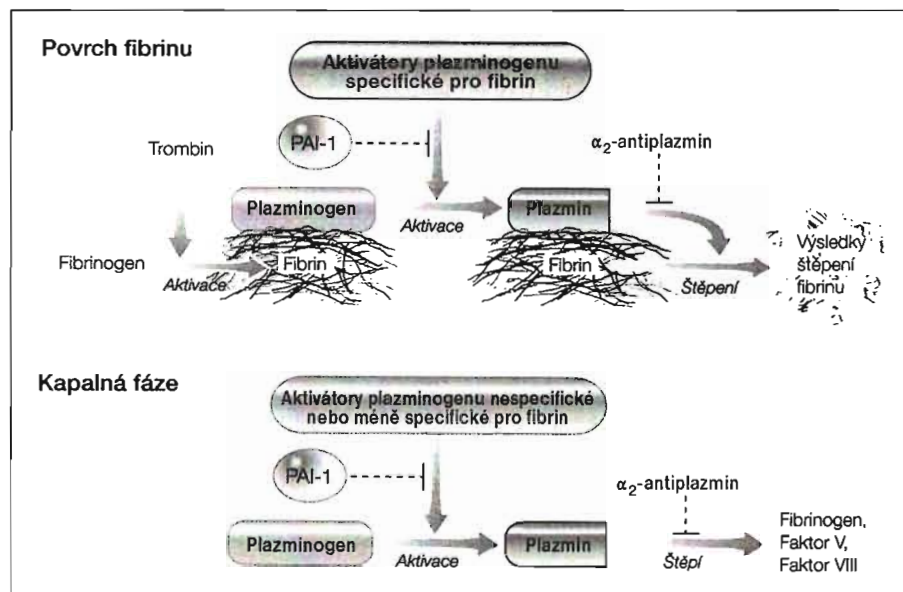


Plazmin štěpí fibrinové koagulum na jednotlivé fragmenty (fibrin degradační produkty – FDP). K zesílení účinku dochází zpětnou vazbou. V průběhu štěpení fibrinu plazminem vznikají koncové karboxylové lysinové řetězce degradovaného fibrinu, které na sebe váží další plazminogen a t-PA. Tím se zvyšuje tvorba plazminu a následně účinnost fibrinolýzy.

Podle specifity k fibrinu rozlišujeme tyto aktivátory přeměny plazminogenu na plazmin:

- s *vyšší specifitou pro fibrin*, aktivují především plazminogen na povrchu fibrinu
- s *nižší nebo žádnou specifitou pro fibrin*. Tyto aktivátory vedou k rozsáhlé systémové aktivaci plazminogenu, při níž dochází ke štěpení některých plazmatických bílkovin, například fibrinogenu, faktoru V a faktoru VIII.

PŘEMĚNA PLAZMINOGENU NA PLAZMIN – AKTIVÁTORY PLAZMINOGENU SPECIFICKÉ A MĚNĚ SPECIFICKÉ PRO FIBRIN



Inhibitory aktivátorů plazminogenu

Inhibitor aktivátoru plazminogenu PAI-1 a α₂-antiplazmin jsou inhibitory serinových proteáz – tzv. *serpiny* (serine proteinase inhibitor) a působí jako hlavní inhibitory aktivátorů plazminogenu, resp. plazminu v lidské plazmě. O dalších inhibitech fibrinolýzy viz kapitola inhibitory.

2.4.4. Plazmin

- MW: 83 kDa
- Biologický poločas: 0,1 sekundy

Plazmin je proteolytický enzym o malé specifitě, který kromě fibrinu štěpí i některé další bílkoviny koagulačního systému (fibrinogen, fibrin ve všech jeho podobách

a koagulační faktory II, V a VIII, GP Ib, GP IIb/IIIa, vWF, trombospondin). Plazmin může aktivovat F VII a XII, stimulovat agregaci trombocytů a aktivovat části komplementu.

Plazmin je přítomen ve třech odlišných formacích. Lehký řetězec je ve všech strukturách stejný, těžký se liší podle místa štěpení molekuly. Ve všech třech případech jde o endopeptidázy, které nespecificky hydrolyzují v neutrálním prostředí (pH kolem 7) citlivé argininové a lysinové vazby proteinů.

Plazmin zajišťuje rozpouštění krevního koagula. Vzniká ze zymogenu plazminogenu účinkem aktivátorů fibrinolýzy. Je generován na povrchu fibrinového koagula v komplexu [Plazminogen . tPA . fibrin]. Fyziologicky je působení plazminu omezeno na místa fibrinových depozit. Štěpí popsaným mechanismem jak fibrinogen, tak i fibrin postupně na stále menší částice tzv. **štěpné produkty fibrinogenu (fibrinu)**, nejdříve vzniká fragment X, pak Y a nakonec štěpy D a E. Štěpení fibrinu probíhá déle než štěpení fibrinogenu.

Plazmin je ze systému vyvazován svými inhibitory a v neaktivní podobě je vychytáván monocytomakrofágovým systémem.

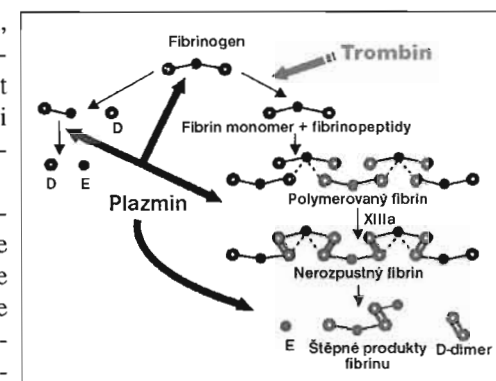
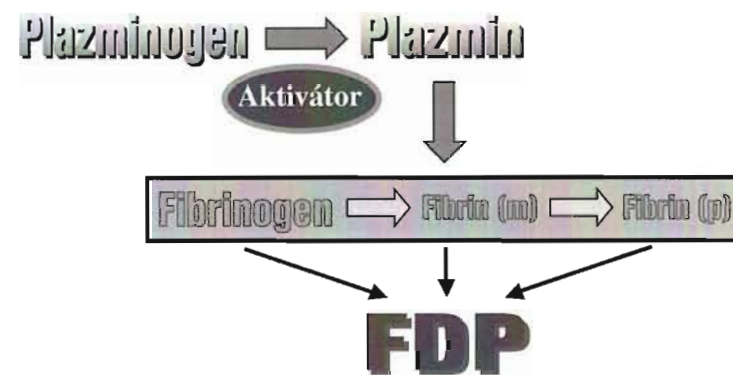


Schéma štěpení fibrinogenu/fibrinu plazminem

SCHÉMA FIBRINOLYTICKÉHO SYSTÉMU



- Plazmin se dále zúčastňuje při zánětlivé reakci, stimuluje proliferaci B lymfocytů, zvyšuje tvorbu protilátek a kapacitu různých cytotomických buněk.

2.4.5. Štěpné produkty fibrinogenu a fibrinu

(Fibrinogen / Fibrin Degradation Products – FDP)

(Fibrinogen / Fibrin Splits Products – FSP)

2.4.5.1. Štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu

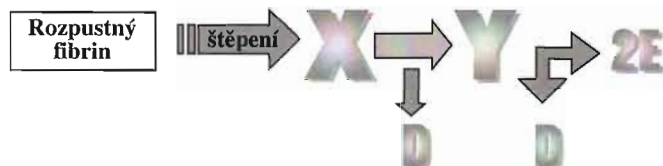
Při štěpení fibrinogenu a rozpustných fibrinů vznikají fragmenty (Mirshahi a spol., 1986):

- ◆ vysokomolekulární (X,Y)
- ◆ nízkomolekulární (D,E)

Štěpy X a Y

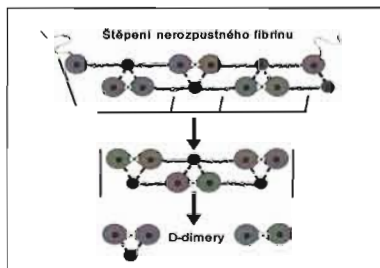
- mají antipolymerační účinek a tvoří s monomery fibrinu rozpustné komplexy. Tím zabraňují monomerům fibrinu v jejich polymeraci, tedy ve vzniku fibrinové sítě – v tom se projevuje jejich **antikoagulační účinek**. Jsou schopny inhibovat agregaci krevních destiček.
- Dále se štěpí na složky D a E. Štěpy D a E jsou odbourávány MFS (Amiral a spol., 1990).

SCHÉMA ŠTĚPENÍ FIBRINOGENU A ROZPUSTNÉHO FIBRINU

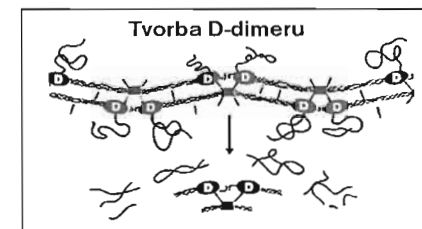
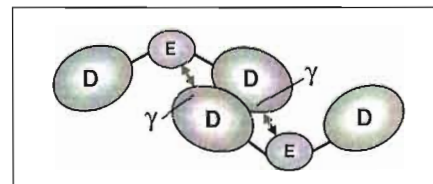


2.4.5.2. Štěpení nerozpustného fibrinu

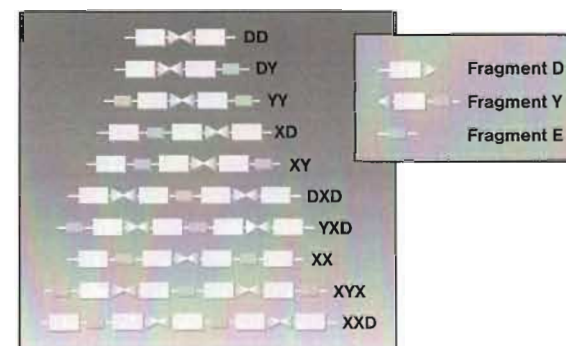
Při proteolytické degradaci nerozpustného fibrinu plazminem probíhá štěpení podobně (Bounameux a spol., 1994). Jsou odštěpovány fragmenty X a Y, které se ale vzhledem k příčným kovalentním vazbám od sebe neoddělují. Konečným stadiem jsou fragmenty o MW 182 kDa, nazývané D-dimery, které jsou odplavovány do obvodové krve. Molekula D-dimeru se skládá ze dvou D-domén vzniklých z přilehlých fibrinových jednotek, spojených kovalentní Glu–Lys vazbou mezi jejich γ řetězci. Tato kovalentní vazba zajišťuje jeho odolnost proti štěpení plazminem a laboratorní průkaz D-dimeru je **přímým důkazem štěpení nerozpustného fibrinu** (Bounameux a spol., 1994).



- D-dimer slouží jako **marker trombofilních stavů**. Splňuje totiž všechny požadavky, které by marker takovýchto stavů měl obsahovat. Jejich hladina v krvi odráží aktuální aktivaci systému in vivo a nevzniká ex vivo (Amiral, 1998). Biologický poločas in vivo je 4–6 hodin.

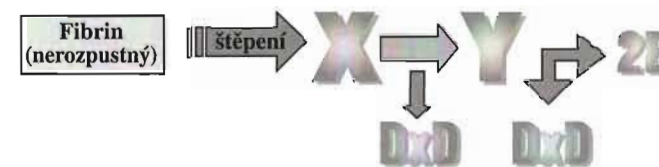


RŮZNÉ FORMY D-DIMERŮ



- Pro rychlost proteolytické degradace fibrinu je určujícím parametrem tloušťka fibrinových vláken. Byla popsána korelace mezi rychlostí fibrinolýzy a průměrem vláken. Gely s většími póry a s tlustšími vlákny, opticky hustší a mechanicky méně odolné lyzují rychleji, než gely s tenčími vlákny, které vznikají při větší koncentraci trombinu (Bachman, 1994).

SCHÉMA ŠTĚPENÍ NEROZPUSTNÉHO FIBRINU



2.4.6. Aktivace fibrinolýzy

Fibrinolytická aktivita je schopnost odbourávat nerozpustný fibrin. Tento proces patří mezi základní fyziologické děje v organismu. Aktivita odpovídá za odbourávání již nepotřebného fibrinového koagula po proběhlém procesu srážení krve a zhojení rány.

Fibrinolýza tedy zprůchodňuje cévy a uvádí je do původního stavu. Je aktivována stejně jako ostatní systémy při porušení endotelu. Přestože k její aktivaci dochází současně s aktivací krevních destiček a koagulace, probíhá celá fibrinolýza podstatně déle tj. 48–72 hodin. Rovněž rozpouštění fibrinové zátky fibrinolytickými ději je za normálních okolností *několikahodinový proces*. Za chorobných stavů se může tento proces výrazně zkrátit (až na několik minut).

Hyperfibrinolýza je spojována s výraznou produkcí plazminu. Jedná se o velmi nebezpečnou klinickou situaci, která je spojována s těžkými krvácivými stavy, ale někdy může predisponovat i k trombóze. Hyperfibrinolýza se může vyvinout u nemocných s traumatem v průběhu sepse, u DIK.

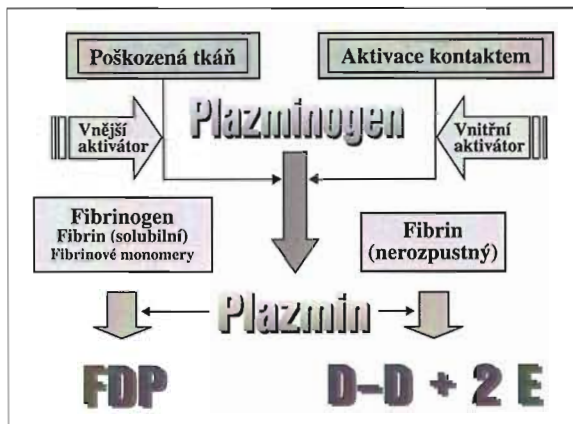
Většina laboratorních testů zahrnující formaci plazminu, a generaci FDP není vhodná k průkazu stavu se zvýšenou fibrinolýzou. Nejvhodnějším globálním testem bezprostředně prokazujícím hyperfibrinolytický stav je trombelastografie.

Hypofibrinolýza vzniká většinou jako následek poškození nebo nedostatečné funkce některé komponenty v systému fibrinolýzy:

- defektní molekula nebo nízká koncentrace t-PA, u-PA a plazminogenu
- nedostatečné uvolňování tPA z endotelu (syntéza, skladovací pool)
- zvýšená koncentrace některých inhibitorů fibrinolýzy, zejména PAI-1 a α -2-antiplazminu.
- nefunkční kontaktní systém.

Hypofibrinolýza je často spojována s vývojem tromboembolické nemoci.

- Fibrinolýza je nepřetržitý proces, probíhající v normálně fungujícím organismu:
 - s vyšší aktivitou během dne a po fyzické námaze
 - s nižší aktivitou v těhotenství
- Fibrinolýza má význam u mnohých reparativních procesů, jako je rekanalizace trombosovaných cév a různých zánětlivých změn s tvorbou fibrinu.



- Fibrinolytickou aktivitu nalézáme nejen v krvi, ale také v jiných tělních tekutinách, např. v slzách, synoviální tekutině, menstruační krvi, mléku, moči.

FIBRINOLÝZA JE OMEZENÁ JAKO VŠECHNY REAKCE V PROCESU SRÁŽENÍ JEN NA MÍSTO ENDOTELIÁLNÍ LÉZE. FYZIOLOGICKY PROBÍHÁ JEN TAM, KDE VZNIKL FIBRIN. SYSTÉM PŘIROZENÝCH INHIBITORŮ PLAZMINU SPOLU S KREVNÍM PROUDEM ZAMEZUJE ROZŠÍŘENÍ TÉTO REAKCE DO DALŠÍCH ČÁSTÍ ORGANISMU. ZA FYZIOLOGICKÉHO STAVU NENÍ V PLAZMĚ BĚŽNÝMI TESTY FIBRINOLYTICKÁ AKTIVITA PROKAZATELNÁ.

Literatura

Amiral, J., Grosley, M., Mimilla, F. et al.: Monoclonal antibodies to different neo-epitopes as fibrinogen and fibrin degradation products. Blood Coag. Fibrinolysis 1, 1990, s. 447–452.

Amiral, J.: Analytical criteria, performances and diagnostic value of D-Dimer assays. Haemostasis 28, 1998, suppl. 2, s. 188.

Bachman, F.: Fibrinolysis. In: Haemostasis and Thrombosis 1. Eds: A. L. Bloom, C. D. Forbes, D. P. Thomas a E. G. D. Tuddenham. Churchill Livingstone, London 1994, s. 549–625.

Bounameaux, H., de Moerloose, P., Perrier, A., Reber, G.: Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. Thromb. Haemostas. 71, 1994, s. 1–6.

Davie et al.: The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. Biochemistry 30, 1991, s. 10363–10370.

Desana, E., Zanetti, A., Conforti, G.: Biochemical and functional characteristics of fibrinogen interaction with endothelial cells. Haemostasis 18, 1988, s. 262.

Godyna, S., Diaz Ricart, M., Agraves, W. S.: Fibulin – 1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. Blood 88, 1996, s. 2569.

Gonzales-Gronow, M. et al.: Mechanism of activation of human plasminogen by the activator complex streptokinase – plasmin. J. Biol. Chem. 253, 1978, s. 1090–1094.

Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., Collen, D.: Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. J. Biol. Chem. 257, 1982, s. 2912.

Champan, H. A.: Plasminogen activators, integrins and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. Curr. Opin. Cell Biol. 9, 1997, s. 714–724.

Lanbda, D. et al.: The 2,3 A crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue – type plasminogen activators. J. Mol. Biol. 258, 1996, s. 117–135.

Mirshahi, M., Soria, J., Soria, C. et al.: A latex immunoassay of fibrin, fibrinogen degradation products in plasma using a monoclonal antibody. Thromb. Res. 44, 1986, s. 715–728.

Spraggon, G. et al.: The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase – type plasminogen activator. Structure 3, 1995, s. 681–691.

Wiman, B., Collen, D.: Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. Nature 272, 1978, s. 549.

2.5. Systémy inhibitorů hemostázy

Inhibitory krevního srážení jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace. Po proběhnutí celé koagulační kaskády se docílí značného zesílení prvotního aktivačního impulsu (*u vnitřní cesty aktivace se předpokládá zesílení až 1:1 000 000*). Tento sled reakcí by v krátké době mohl vést k masivnímu srážení krve, k ucpání cév a následně ke smrti. Udržování dynamické hemokoagulační rovnováhy je základním principem procesů krevního srážení. Podílí se na něm celá řada mechanismů a při jeho regulaci je nejvýznamnějším účinek *fyziologických inhibitorů* koagulačního a fibrinolytického systému.

Inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které tlumí antikoagulační mechanizmy proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou. Tyto látky inhibují aktivní složky hemostatického procesu – proteolytické enzymy (hlavně serinové proteázy). V organismu slouží inhibitory k zabránění nekontrolovatelného srážení a tím k udržení dynamické koagulační rovnováhy.

POZMĚNĚNÉ HLADINY, PŘÍPADNĚ FUNKČNÍ ABNORMALITY NĚKTERÝCH INHIBITORŮ (ZEJMÉNA ANTITROMBINU, SYSTÉMU PROTEINU C A TAFI) PŘEDSTAVUJÍ ZNÁČNÉ RIZIKO PRO VZNIK TROMBÓZY.

Kritéria pro rozdělení inhibitorů

Inhibitory krevního srážení můžeme třídit podle různých kritérií dle:

- **původu:** přirozené
získané
- **specifity:** inhibitory serinových proteáz (serpinů)
inhibitory kofaktorů serinových proteáz
nespecifické inhibitory s rozšířeným spektrem
- **systému:** inhibitory koagulace a fibrinolýzy

V této stati jsme použili pro inhibitory následujícího rozdělení:

Přirozené inhibitory

- Specifické inhibitory koagulace a fibrinolýzy
- Nespecifické inhibitory koagulace a fibrinolýzy

Získané inhibitory

SERPINY

Serpiny tvoří velkou skupinu inhibitorů serinových proteáz (serpin – Serine Protease Inhibitor). Serpiny se vyskytují v tělových tekutinách nejen u savců, ale i u dalších druhů živočichů a rovněž i u rostlin. Většinou jde o nespecifické inhibitory, které tvoří komplex v poměru 1 : 1 s cílovým enzymem [serpin . serinová pro-

teáza], který je z cirkulace vychytáván serinovými receptory 1 a 2 uloženými na hepatocytech.

Serpiny sehrávají důležitou úlohu v systémech hemostázy. Nadměrné štěpení serpinů u některých patologických stavů má pro organismus závažné následky (většinou se vyvine DIK).



Inhibice serinových proteáz serpiny

KUNINY

Kuniny jsou inhibitory proteáz se strukturou v molekule, které se říká doména Kunitzova typu. Jsou to látky homologní s aprotininem.

2.5.1. Inhibitory koagulace a fibrinolýzy

2.5.1.1. Inhibitory plazmatického koagulačního systému

Trombin je proteolytický enzym, který se tvoří po dobu srážení krve v nadbytku. Po ukončení srážecího procesu musí být trombin rychle a účinně vyvázan (inhibován), aby srážení krve nepokračovalo. Inhibice není vázána jen na trombin, ale i na ostatní aktivované složky krevního srážení.

Všechny známé inhibitory plazmatického koagulačního systému jsou obsaženy v plazmě a jejich specifita je velmi nízká. Vedle hlavního substrátu inhibují v menší míře většinu ostatních faktorů (serinových proteáz).

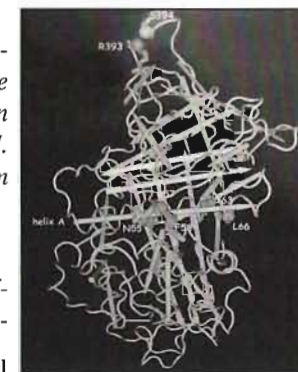
Z fyziologických inhibitorů krevního srážení se v plazmatickém koagulačním systému nejvíce uplatňují **Antitrombin (AT)** a **alfa₂ – makroglobulin**. Oba jsou v plazmě obsaženy v poměrně vysoké koncentraci. AT společně s kofaktorem heparinu II odpovídá za 80 % inhibiční koagulační aktivity.

ANTITROMBIN (AT)

(dříve: Antitrombin III – AT III)

Název antitrombin byl poprvé použit na začátku století pro látky, které působily proti trombinu. V té době se nazýval „heparin cofactor“. Byl poprvé izolován v r. 1968 Abildgaardem a pojmenován Antitrombin III. Dnes se používá spíše názvu antitrombin, protože pojem „antitrombin“ není v jiných souvislostech používán.

- MW: 58 kDa
- Biologický poločas: 65–70 hod (68 hodin). V přítomnosti heparinu se může biologický poločas zkrátit.



Antitrombin – strukturní model

tit na 32 hodin i méně. Patologicky dochází ke zkrácení biol. poločasu při šoku nebo u DIK, kde se může zkrátit až na několik hodin.

Fyziologické hodnoty:

Funkční aktivita: 0,8–1,2 (80–120 %)

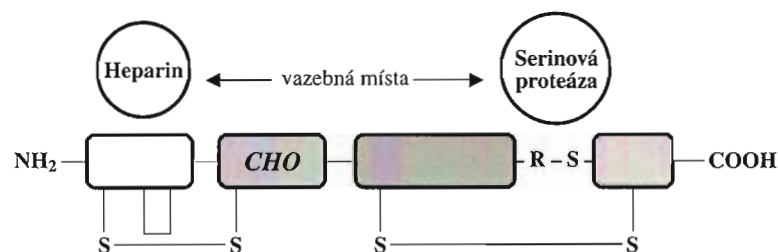
Koncentrace v plazmě: 0,10–0,25 (průměrně 0,14) g/l

Antitrombin je jednořetězcový α_2 -glykoprotein o 424 aminokyselinách, který se tvoří v játrech, ale byl zjištěn i v endotelových buňkách. Jedná se o antikoagulačně nejúčinnější látku, která je schopna neutralizovat účinek trombinu (Lechner a Kyrle, 1995). Nepůsobí však okamžitě, ale má opožděný účinek (15–30 minut).

Syntéza AT má spojitost se syntézou fibrinogenu. Štěpení fibrinogenu je důsledkem aktivace koagulačních mechanismů, při kterých dochází k poklesu AT. Štěpení fibrinogenu dává tedy signál k následné syntéze AT.

STRUKTURA ANTITROMBINU

(domény)

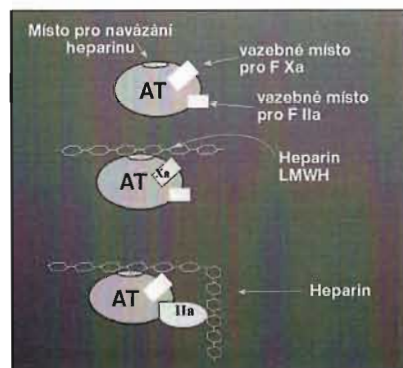


CHO: doména bohatá na karbohydráty

Funkce AT

AT působí jako nejdůležitější fyziologický inhibitor serinových proteáz, tak že vyvazuje trombin a jiné plazmatické proteázy (v poměru 1:1) za vzniku komplexu, který je odbouráván v MFS (Barrowcliff a Thomas, 1987; Lechner a Kyrle, 1995). Vazba se uskuteční mezi aktivním místem serinové proteázy (Ser) a místem Arg^{385} – Ser^{386} v molekule antitrombinu.

Rychlost vzniku tohoto komplexu může být mnohonásobně zvýšena navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endotelových buněk. Interakcí mezi heparinem a AT dochází ke konformační změně, při které se zpřístupní (odkryjí) sekvence sulfátovaných nebo nesulfátovaných monosacharidových jednotek na heparinu a rezidua lysinu na molekule AT. Na tato rezidua (Lys) se molekula heparinu váže.



Antitrombin – vazebná místa serinové proteázy a heparinu

vých jednotek na heparinu a rezidua lysinu na molekule AT. Na tato rezidua (Lys) se molekula heparinu váže.

Serinové aktivní centrum trombinu má zásadní význam pro jeho reakci s AT. Trombin štěpí argininové vazby v bílkovinách (zejména v molekule fibrinogenu). Bazické oblasti AT (zejména v místech Lys a Arg) přitahují záporně nabitě oblasti molekuly heparinu. Vazebné místo pro AT na heparinu tvoří specifická sekvence monosacharidů.

Reakce s trombinem

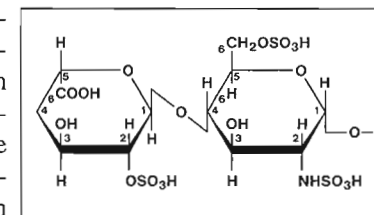
Je-li přítomno malé množství trombinu vzniká komplex označovaný jako TAT – [Trombin . Antitrombin], který postrádá koagulační aktivitu obou složek:



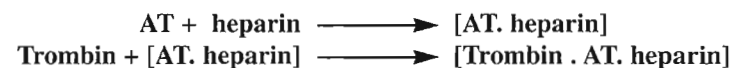
Tento komplex se oddělí z receptorových struktur na buněčné membráně a je v několika minutách odbouráván v játrech (buňkami MFS). TAT informuje nepřímo o hyperkoagulačním stavu systému.

Reakce s trombinem v přítomnosti heparinu

Neutralizační aktivita AT vůči trombinu (případně faktorů Xa) se 300–1 000 krát zvýší působením látek s negativním povrchovým nábojem – polyglykosaminoglykanů, jako je např. heparan sulfát (Lechner a Kyrle, 1995). Hepariny se nacházejí na povrchu endotelových buněk a mohou být uvolněny z tkáňových bazofilů (žírných buněk). Vazba heparinu s AT je reversibilní – heparin uvolněný z komplexu je schopen vazby z další látkou:



Heparan sulfát – strukturní vzorec



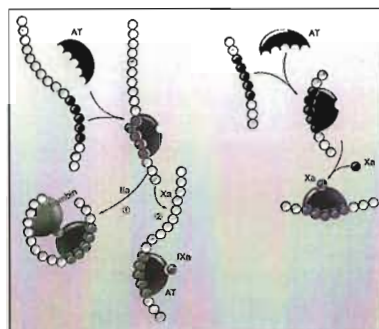
Heparin jako směs mukopolysacharidů má různou afinitu k AT. Z komerčně dostupných heparinů se na AT vážou jen ty molekuly heparinu, které mají sekvenci pentasacharidu. Následná konformační změna AT vede až k tisícnásobnému zvýšení jeho antiproteázového účinku.

Inaktivace trombinu vyžaduje současnou vazbu trombinu i AT na jednu molekulu heparinu. Tato reakce požaduje heparin tvořený minimálně 18 monosacharidovými jednotkami. Kratší molekuly trombin neinhibují, zachováva-



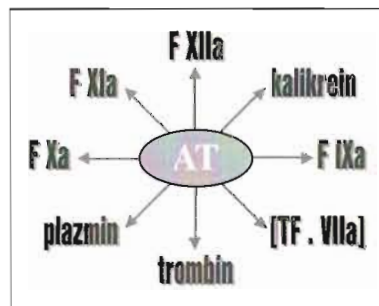
Vazba AT a trombinu na heparin

jí si však možnost *inhibovat F Xa. Heparin v komplexu s AT inhibuje faktory IIa a Xa.* Vazba heparinu s AT vyžaduje minimální koncentraci AT v plazmě **> 40 %**. Důležitá je i hladina koagulačních faktorů, počet krevních destiček a přítomnost proteinů akutní fáze. Svými četnými zápornými náboji vytváří hepariny jakousi matrix, na které se mohou snadněji AT a trombin uspořádat a vytvářet tak snadněji komplex [AT . trombin].



Inhibiční vliv AT

AT funguje jako velmi potentní inhibitor trombinu. Podobně samotný AT může vyvazovat i F Xa. Ostatní proteázy vyvazuje účinněji jen v přítomnosti heparinu. Kromě trombinu a F Xa vyvazuje i některé jiné složky koagulačního systému se kterými podobně jako s trombinem tvoří inaktivní komplexy. Jedná se zejména o další serinové proteázy uvedené ve schématu. Mimo to inhibuje urokinázu, C1-esterázu a trypsin. Reakce s trombinem trvá kolem 35 sekund, s ostatními proteázami kolem 25 minut. AT zasahuje i do regulace systému komplementu.



AT ovlivňuje i další složky koagulačního systému

Laboratorní vyšetření:

- průkaz biologické aktivity
- průkaz antigenu

MĚŘENÍ HLADINY AT V PLAZMĚ

1. Metody na bázi imunoanalýzy (průkaz antigenu)

Klasické techniky zahrnující radiální imunodifúzi a elfo-techniky jsou časově náročné a byly nahrazeny nefelometrickými technikami (**LIA**), radioimunoanalýzou (**RIA**) a enzymimunoanalýzou (**ELISA**).

2. Metody měření biologické aktivity

U **koagulačního** stanovení AT je kvantitativní hodnocení redukováno na sledování reziduální aktivity trombinu nebo F Xa po jejich reakci s AT v prostředí s nadbytkem enzymu a v přítomnosti heparinu. (Neutralizace trombinu v nepřítomnosti heparinu je pomalá a účinek α_2 -makroglobulinu i α_1 -inhibitoru proteináz může konkurenčně inaktivovat trombin).

Daleko praktičtější a dnes i rozšířenější jsou metody používající **chromogenní**

syntetické substráty. Po aplikaci AT in vivo lze touto metodou snadno monitorovat jeho hladinu v krevním oběhu.

Imuno a afinitní analýzy poskytují podobné výsledky. Diskrepance byly pozorovány u dědičných chorob s afunkčním AT, při stanovení AT v neonatální plazmě a při stanovení AT v jeho koncentrátech. V posledním případě je poměr aktivita/antigen nižší. V uvedených případech není imunoanalýza vhodná a může poskytovat nesprávné údaje.

Klinická interpretace: Klinický význam má snížení hladiny AT anebo změny v jeho molekule – defekt AT. Riziko žilní nebo tepenné trombózy vzniká, jestliže plazmatická hladina AT poklesne **pod hodnotu 70 %**. Zvýšená hladina nemá diagnostický význam.

Nedostatek AT je možným rizikovým faktorem tromboembolické nemoci:

- **Kongenitální (vrozený)** nedostatek AT (autosomálně dominantní typ dědičnosti) se vyskytuje asi u 3 % pacientů s tromboembolickým onemocněním. Existuje v několika podtypech a antigenní exprese AT není vždy paralelní s jeho biologickou aktivitou. Asi 50 % nosičů má v anamnéze trombózu, často rekurentní a spontánní.
- Častější než kongenitální nedostatek AT je nedostatek **získaný**. Ten pak může vést k zvýšenému ohrožení žilní trombózou a k zvýšení rezistence na heparin.

Získaný nedostatek AT může vznikat:

- ◆ v důsledku snížení syntézy AT. Nejčastěji u některých jaterních onemocnění (cirhóza), u nezralých nedonošených dětí a to zvláště v souvislosti s respiračním distress syndromem, gastrointestinálními komplikacemi apod.
- ◆ u některých typů medikamentózní terapie např. léčba L-aspiraginázou a estrogeny. Nepochybný pokles vyvolává déle trvající a vysoko dávková heparinová terapie, protože může docházet k rezistenci na heparin.
- ◆ při zvýšených ztrátách AT sekrecí – např. u onemocnění gastrointestinálního traktu vedoucích ke zvýšeným ztrátám bílkovin a u nefrotického syndromu paralelně se ztrátami albuminu.
- ◆ zvýšená konzumpce AT u DIK – v souvislosti s šokovými stavy, sepsí, spáleninami, některými gynekologickými nemocemi, porodními komplikacemi a některými závažnými operacemi. Spouštěcím mechanismem u gram negativní sepsy je uvolnění endotoxinu, u gram pozitivní sepsy sehrávají úlohu mukopolysacharidy. Snížená hladina AT omezí terapeutický účinek komplexu [AT . heparin].

Výskyt AT v jiných tělních tekutinách

- AT se vyskytuje nejen v plazmě, ale i v pleurální a peritoneální zánětlivé tekutině. V cerebrospinální tekutině se AT vyskytuje ve stálém poměru k albuminu jako neagregovaný protein bez prokazatelné inhibiční aktivity. Tato skutečnost bývá připisována funkci bariéry krevní oběh – cerebrospinální mok.

- *Exkrece AT močí u normálních jedinců je menší než 3 µg za den. U pacientů s proteinurií se poměr AT/Albumin mění ve velkém rozsahu. AT vylučovaný u těchto pacientů má znatelně sníženou afinitu k heparinu a není schopen vázat trombin ani F Xa.*

HEPARINOVÝ KOFAKTOR II (HC II)

Inhibiční účinek HC II byl poprvé zjištěn v r. 1974 Briginshawem a Shanbergem jako reversibilní pomalá inhibice trombinu heparinen, která byla nazvána „heparin kofaktorem A“ (Briginshaw a Shangerge, 1974). Látka způsobující tento inhibiční efekt byla v roce 1981 izolována z lidské plazmy Tollefsenem a byla nazvána HC-II (Tollefsen a Blank, 1981).

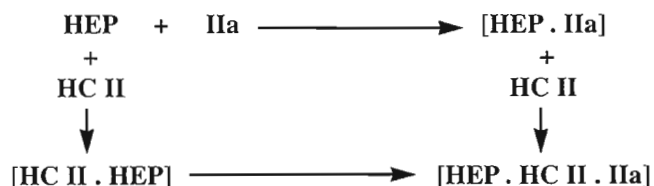
- MW: 65,6 kDa
- Koncentrace v plazmě: 8 – 9 mg/l 1.2 µmol/l

HC II je jednořetězcový glykoprotein patřící mezi *inhibitory serinových proteáz*, který se *nachází hlavně na cévním endotelu* a má zřejmě jen *lokální význam*. Je syntetizován endotelovými buňkami a játry. Molekula je složena ze 480 aminokyselin (Jaffe a spol., 1985). Gen pro HC-II se nachází na 22. chromosomu (Tollefsen, 1981).

Funkce Heparinového kofaktoru II

HC II je homologní inhibitor k AT. Na rozdíl od AT je *aktivita HC II naměřena výhradně proti trombinu*. V prostředí o vyšší koncentraci heparinu (> 1 IU/ml) inhibuje HC II trombin, ale neinhibuje faktory Xa a IXa. Jedná se tedy o specifický inhibitor trombinu, se kterým tvoří *komplex v poměru 1:1* (Tollefsen, 1995). Blokuje účinek trombinu nejen v hemostáze, ale i v dalších oblastech jeho působení.

Trombin se váže u HC II na vazebné místo bílkovinného řetězce, které je uloženo v místě *Leu⁴⁴⁴–Ser⁴⁴⁵*. Účinek inhibičního působení HC II se *zvýší až 1000 x v přítomnosti heparinu, heparansulfátu, dermatansulfátu a dalších glykosaminoglykanů*. Dochází k *nespecifické vazbě HC-II na malou oblast sacharidového řetězce glykosaminoglykanu*. Výraznější urychlení inhibice nastane naváže-li se na trombin minimálně 20 monosacharidových jednotek heparinu. Heparin a dermatansulfát reagují s různými místy povrchu HC-II a tato místa se částečně překrývají (Tollefsen, 1995).



HC II (spolu s AT) se podílí na udržení netrombogenních vlastností vnitřního povrchu cév. **HC II se uplatňuje v inhibici trombinu až tehdy, poklesne-li hladina AT pod 30 %**. Účinek HC II se projeví u vysokých dávek heparinu. HC II zprostředkovává antikoagulační účinky dermatansulfátu a laktobionových kyselin.

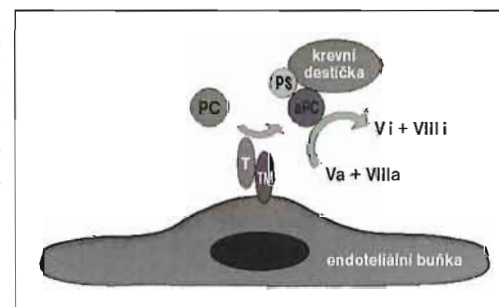


Klinická interpretace: hladina HC-II je snížena u novorozenců, zvyšuje se v těhotenství a s přibývajícím věkem. Bývá zvýšena také během akutních zánětlivých reakcí. Zvýšená aktivita HC II byla zjištěna při vyšším INR během antikoagulační terapie dikumariny (Bertina a spol., 1987).

SYSTÉM PROTEINU C

Společně s AT a TFPI je systém proteinu C nejúčinnějším inhibičním systémem hemostázy. Systém proteinu C je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem (Esmon, 1992).

Systém proteinu C je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty, která je aktivována na povrchu endotelových buněk trombinem navázaným k trombomodulinu. Systém proteinu C je schopen inaktivovat některé faktory krevního srážení (VIIIa a Va) a tím reguluje tvorbu trombinu (Debize a spol., 1995).



Systém proteinu C – inaktivace faktorů Va a VIIIa

PROTEIN C

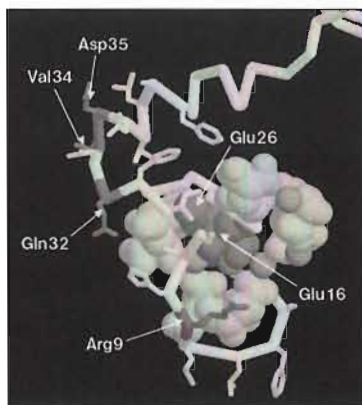
- MW: 62 kDa (APC 56 kDa)
- Biologický poločas: 5–7 hodin
- Koncentrace v plazmě: 4–5 mg/l. Stejná u mužů i žen, mírně vzrůstá s věkem.

Protein C izoloval a popsal Stenflo v r. 1976. Ukázalo se, že popsaná substance je identická s autoprotrombinem IIa popsaným r. 1960 Seegersem a spol. Název protein C dostal podle pořadí při chromatografii, kde se projevil jako třetí (C) protein.

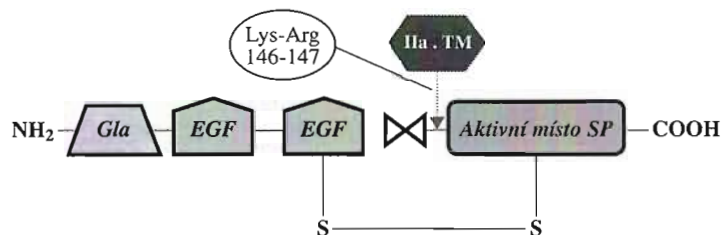
PC je jednořetězcový plazmatický glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vitamínu K a pravděpodobně i v endotelu. Tento řetězec o 461 aminokyselinách je následně štěpen. Molekula proteinu C pak sestává ze 2 polypeptidových řetězců, těžkého a lehkého, které jsou navzájem propojeny disulfidickými (-S-S-) můstky.

Lehký řetězec zahrnuje na kalcium závislé domény pro navázání k fosfolipidovému povrchu a pro připojení proteinu S. Katalytické místo této **serinové proteázy** je umístěno na těžkém řetězci. Asi 10 % proteinu C zůstává v plazmě v jednořetězcové podobě (McClure a spol., 1992). Protein C obsahuje podobnou homologní strukturu jako protrombin a některé další serinové proteázy. Je známo již více než 160 mutací v genu proteinu C. Většina těchto mutací nemá klinický význam.

Protein C – Gla oblast



STRUKTURA PROTEINU C (domény)



Gla – oblast zahrnující γ karboxylové skupiny glutamové kyseliny

EGF – doména, ve které probíhají interakce mezi faktory

SP – serinová proteáza

✂ aktivací peptid uvolněný při přeměně zymogenu na aktivní serinovou proteázu

Aktivace proteinu C

Protein C je proenzymem serinové proteázy. K neúčinnější aktivaci dochází in vivo **na povrchu cévních endotelií**, kde je navázán specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin – TM (Esmon a spol., 1982). Trombomodulin váže trombin a moduluje jeho prokoagulační aktivitu. Trombin navázaný na trombomodulin ve stechiometrickém poměru 1 : 1 již není koagulačně aktivní, ale umožňuje aktivaci PC. Aktivace trombinem v komplexu s trombomodulinem [trombin . trombomodulin] probíhá více než 1 500–2 000krát rychleji, než se samotným trombinem. Aktivace proteinu C samotným trombinem je velmi pomalý a neefektivní proces.

Protein C se váže na specifický receptor (EPCR – endoteliální receptor proteinu C). Aktivace nastává přednostně na větším cévním endotelu. **EPCR zvyšuje aktivací účinek komplexu [trombin . trombomodulin] až pětinašobně.**

Při aktivaci proteinu C dojde k odštěpení peptidu o 12 aminokyselinách z N-konce jeho molekuly – vzniká tzv. **aktivní protein C (Activated Protein C – APC)**. APC má biologický poločas kolem 15 minut.

Vazba Gla-domény PC na EPCR

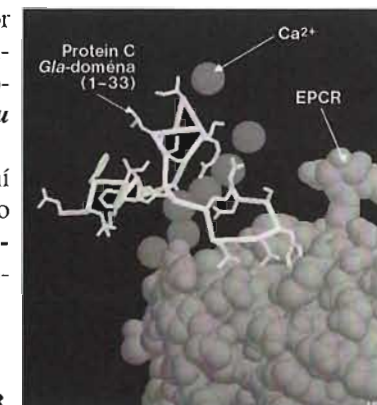
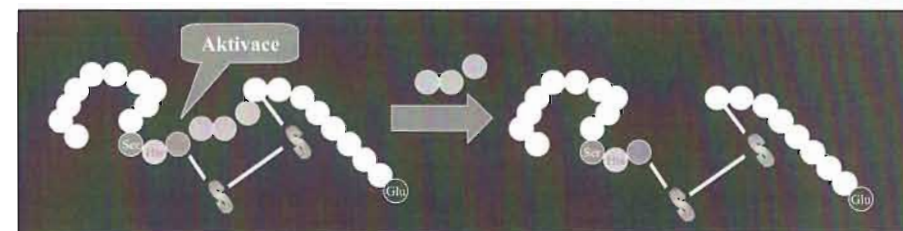
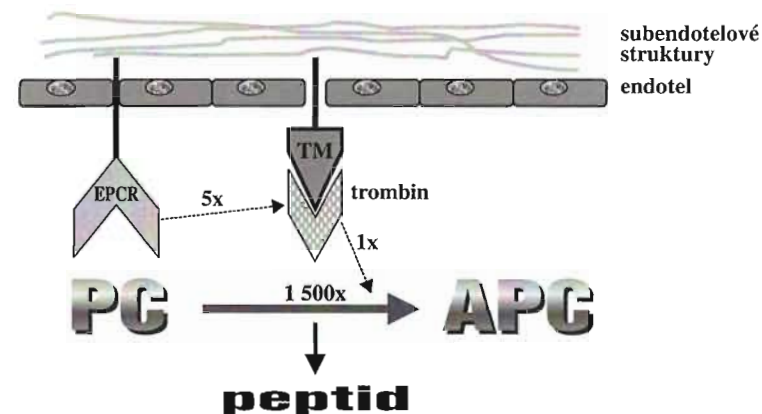
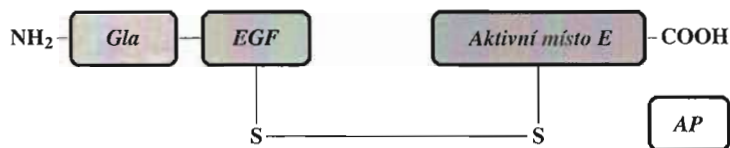


SCHÉMA AKTIVACE PROTEINU C



□ K aktivaci proteinu C může docházet, mimo aktivaci komplexem [trombin . trombomodulin], různým způsobem – např. působením trypsinu, plazminu, jedu Russelovy zmije (RVV), PROTACEM, případně F Xa navázaným na trombomodulin v přítomnosti negativně nabitých fosfolipidových povrchů.

STRUKTURA AKTIVNÍHO PROTEINU C (domény)



Funkce APC

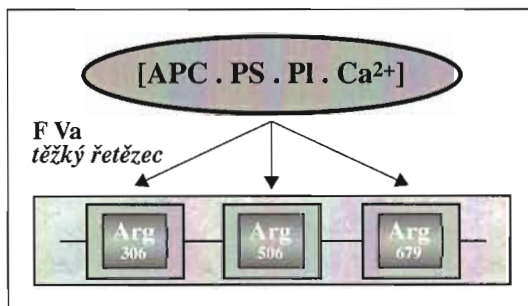
Aktivovaná forma proteinu C vykazuje úzce specifickou účinnost serinové proteázy. Na rozdíl od účinku AT, který vyvazuje enzymy do komplexu, působí APC, tak že v přítomnosti fosfolipidů a Ca^{2+} , **proteolyticky štěpí a tím inaktivuje**, na membráně navázané plazmatické faktory neenzymového původu – **F Va a VIIIa**. Inhibice aktivity těchto faktorů, vede k blokaci nebo k menší produkci koagulačně aktivních komplexů **tenázy a protrombinázy** a celkově k potlačení aktivovaného koagulačního procesu. Kofaktory jsou v tomto případě Protein S a pravděpodobně i neaktivovaná forma faktoru V (Debize a spol., 1995).

ŠTĚPENÍ FAKTORU Va

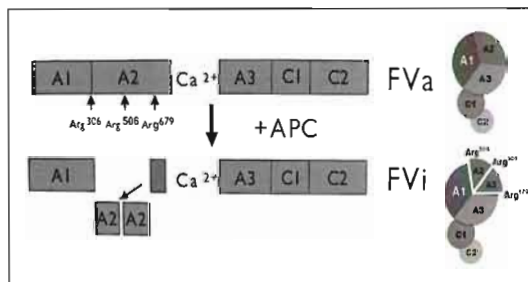
Aktivovaný faktor V (Va) je tvořen dvěma řetězci, těžším (A1, A2) a lehčím (A3, C1, C2). APC hydrolyticky štěpí těžší řetězec F Va a to ve 3 specifických místech (Arg^{306} , Arg^{506} , Arg^{679}):

Inaktivace F Va koagulačně aktivním komplexem APC nastává sekvenčním štěpením jeho molekuly v místě Arg^{506} , následované rozštěpením v místech Arg^{306} a Arg^{679} :

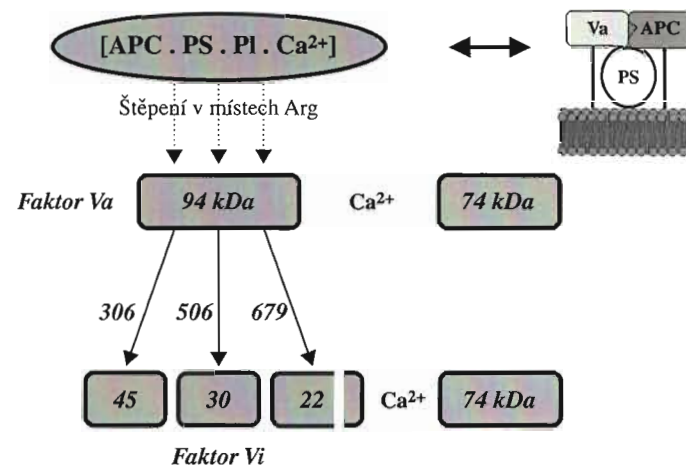
- Arg^{506} – odkrytí vazebných míst v místě 306 a 679
- Arg^{306} – snížení aktivity o 70 %
- Arg^{679} – snížení aktivity o 30 %



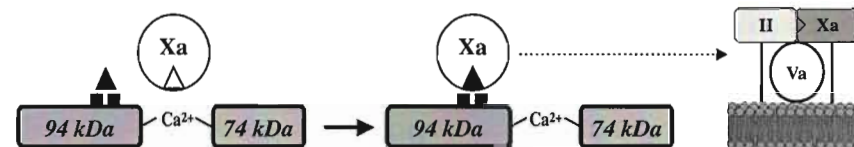
Štěpení těžkého řetězce F Va komplexem [APC . PS . PI . Ca^{2+}]



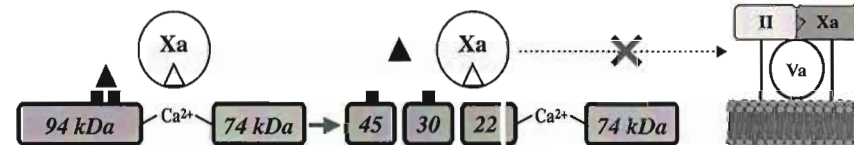
SCHEMA ŠTĚPENÍ F Va KOMPLEXEM APC (domény)



Těžší řetězec F Va obsahuje doménu pro navázání F Xa.



Odštěpením vazebného místa pro F Xa se inaktivovaný F Va (označovaný jako F Vi) stává nepoužitelný pro vznik protrombinového komplexu.



Oddělení a vytěsnění hydrolyticky odštěpeného vazebného místa pro F Xa z povrchu membrány urychluje komplex [APC . PS . PI . Ca^{2+}]. Protein S vystupuje v této reakci jako kofaktor APC, konformačním uspořádáním ovlivňuje tuto reakci částečně i molekula faktoru Vai.

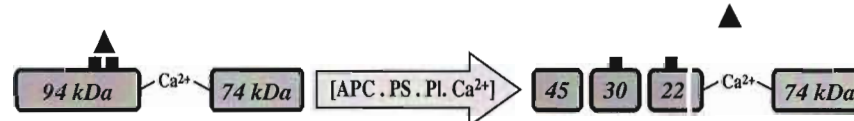
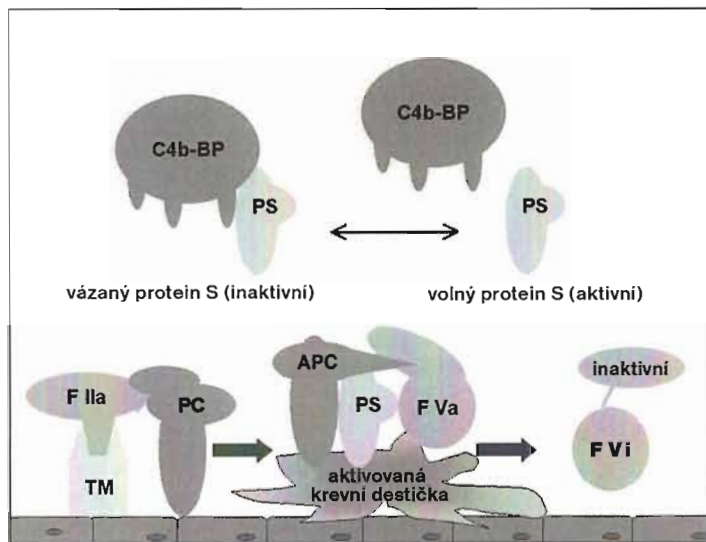


SCHÉMA AKTIVACE SYSTÉMU PROTEINU C A INAKTIVACE FAKTORU Va



ŠTĚPENÍ FAKTORU VIIIa

Aktivovaný protein C inaktivuje podobným způsobem i F VIIIa. Štěpí F VIIIa v místě Arg³³⁶ v A1 podjednotce a v místě Arg⁵⁶² v A2 podjednotce:

Arg³³⁶ – A1 podjednotka

Arg⁵⁶² – A2 podjednotka

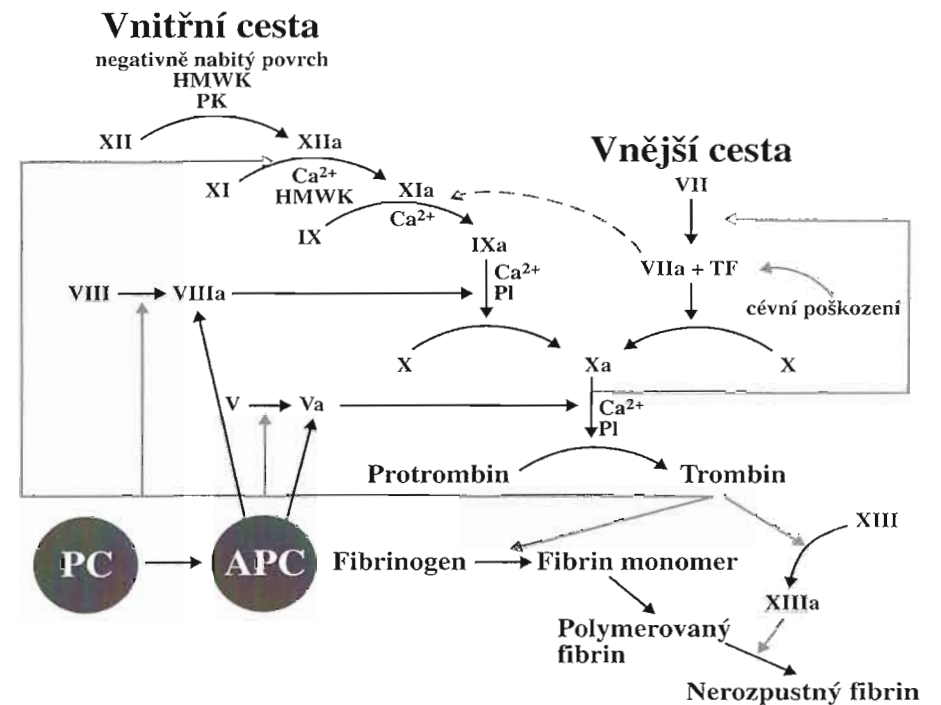
- ☐ Protein S s APC vytváří komplex ve stechiometrické poměru (1:1) a urychluje reakci 3–10x.
- ☐ Protein S zde působí jako kofaktor a umožňuje navázání proteinu C k fosfolipidovým povrchům (např. k membráně krevních destiček, nebo k membráně poškozených endotelií apod.).
- ☐ Aktivovaný protein C má navíc i profibrinolytickou aktivitu (zvyšuje uvolňování t-PA z vazby na PAI-1 v cévních endoteliích, s PAI-1 tvoří komplex).

Inaktivace proteinu C

K inaktivaci aktivovaného proteinu C dochází v přítomnosti:

- ◆ přirozeného inhibitoru proti APC–PCI (Protein C Inhibitor)
- ◆ lehkých řetězců faktoru Va
- ◆ lupus antikoagulans
- ◆ α₂-makroglobulinu
- ◆ α₁-antitrypsinu

SYSTÉM PROTEINU C V HEMOSTÁZE



Laboratorní vyšetření:

- průkaz biologické aktivity: koagulační metody na bázi APTT s aktivací PC hadím jedem Protacem (Kraus a spol., 1995)
- průkaz antigenu: imunologické metody (ELISA)

PROTEIN S (PS)

- ☐ MW: 69 kDa
- ☐ Biologický poločas: 60 hodin
- ☐ Koncentrace v plazmě:
 - Celkový PS (Ag): u žen 20–40 mg/l plazmy (hodnota je asi o 10–15 % vyšší u mužů), stoupá s věkem u obou pohlaví
 - Volný PS: 10 mg/l plazmy
 - funkční test: 65–130 %

Protein S izoloval v r. 1977 di Scipiemma spol. v Seetle – odtud název protein S. Úlohu proteinu S jako kofaktoru aktivovaného PC popsal až v roce 1980 Walker. Protein S je jednořetězcový glykoprotein, který vzniká v játrech za účasti vita-

minu K, dále může vznikat v endoteliálních buňkách a megakaryocytech (Esmon, 1992). Gen pro protein S je přítomen na 3. chromosomu. Převážná část proteinu S je uložena v α -granulích krevních destiček a v endotelu. Odtud může být uvolněn působením *protrombinázy* a *tenázy*.

Vyskytuje se:

- **navázaný na specifický receptor** přítomný na cévních endoteliích
- **plazmatický protein S**, který může být ve dvou formách:
 - ◆ **vázané (60 %):** část proteinu S je vázána s C4-bBP (C4-bound Binding Protein) složkou komplementu v komplexu [PS . C4-bBP]. Tato forma se neváže na APC.
 - ◆ **volné (40 %):** část proteinu S je v plazmě ve formě volné. Tato forma se váže na APC.

Kofaktorem proteinu C je pouze volný plazmatický protein S.

STRUKTURA PROTEINU S (domény)



TSR – oblast citlivá k trombinu

EGF – doména, ve které probíhají interakce mezi faktory

Gla – oblast zahrnující 8 karboxylové skupiny glutamové kyseliny

Funkce proteinu S

Protein S má v přítomnosti Ca^{2+} afinitu k fosfolipidovým povrchům. Působí, jako kofaktor aktivovaného proteinu C, váže se na něj ve stechiometrickém poměru 1 : 1. Protein S usnadňuje vazbu APC k fosfolipidovým povrchům destiček a endotelií. Vzniká pravděpodobně komplex [APC . PS . PI . Ca^{2+}]. Aktivita proteinu S může být zvýšena v přítomnosti β_2 GP I. Protein S je inaktivován trombinem proteolytickým štěpením v místě řetězce s NH_2 ukončením.

Protein S ve své volné i vázané formě má vlastní inhibiční aktivitu nezávislou na APC. Vázaná forma inhibuje F Xa. Volná forma se navíc váže na faktory V, Va, PS a dále na F VIII a to i ve formě vázané – komplex [C4-bBP . PS] má vyšší afinitu k F VIII než volný PS. Vyvázáním na tyto faktory blokuje PS vznik tenázy a protrombinázy a inhibuje tak aktivaci F Xa a trombinu. V menší míře se PS váže i na F VIII v komplexu [FVIII . vWF].

Stanovení proteinu S

- **Vázaný protein S:** PS vázaný na frakci komplementu C4-bBP
- **Volný protein S:** funkční test
- **Celkový protein S:** stanovení antigenu proteinu S

SLOŽKA KOMPLEMENTU C4-bBP (C4 – bound Binding Protein)

C4-bBP je regulační protein cesty komplementu. Je to vysokomolekulární (multimerní) protein složený ze 6–7 α řetězců, který buď obsahuje nebo neobsahuje β řetězec. Pouze forma s β řetězcem váže reversibilně PS.

PS v systému komplementu pravděpodobně zprostředkovává vazbu C4-bBP na povrch buněk. C4-bBP patří mezi proteiny akutní fáze, jejichž hladina se zvyšuje při zánětech, u akutních stavů a u žen při léčbě steroidy (antikoncepce). U těchto stavů dochází k vyvázání C4-bBP na volný protein S, přičemž se hladina PS v plazmě výrazně snižuje.

TROMBOMODULIN

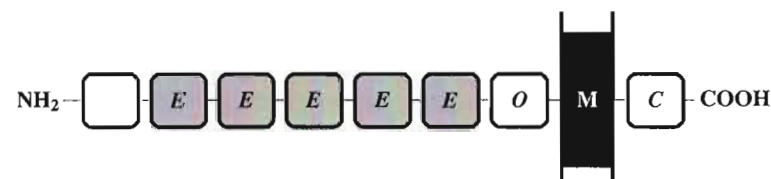
□ MW: 74 kDa

Trombomodulin je integrální transmembránový glykoprotein trvale přítomný na cévním endotelu, který váže trombin. Trombin vyvázaný na trombomodulin ztrácí svůj prokoagulační účinek a naopak potencuje aktivaci proteinu C, který štěpením F V a VIII výrazně tlumí koagulační procesy.

Z povrchu endotelových buněk je trombomodulin uvolňován do krevní plazmy proteolytickým štěpením elastázou aktivovaných neutrofilů. Hladina plazmatického TM je závislá na stavu endotelu a zvyšuje se v případě jeho poškození a může být tak markerem pro endoteliální poškození, jak velkých, tak i malých cév, zatímco zvýšená hladina solubilního – sEPCR odráží poškození jen malých cév.

Mutace v molekule trombomodulinu by mohly být příčinou některých arteriálních trombóz.

STRUKTURA TROMBOMODULINU (domény)



E – EGF: oblast obsahující sekvence blízké lidskému epidermálnímu růstovému faktoru

O – O-GLYCOS: oblast bohatá na o-glykosylovaná místa

M – MEM: oblast překlenující membránu

C – CYTO: cytoplazmatická doména obsahující volný cystein

V hemostáze se TM uplatňuje v těchto oblastech:

- kofaktor pro aktivaci PC trombinem (reakci urychluje asi 1 500krát) – v poměru 1:1 vzniká komplex [TM . Trombin], který nevyžaduje Ca^{2+} . Nízká koncentrace F Va urychluje vazbu PC na [TM . Trombin].

- inhibuje proteolytické působení trombinu na makromolekulární substráty
- obsahuje-li molekula TM galaktozaminoglykan urychluje TM inaktivaci trombinu působením AT.
- komplex [TM . Trombin] aktivuje faktory XIII, VIII, V a krevní destičky

ENDOTELIÁLNÍ RECEPTOR PROTEINU C

(Endothelial protein C receptor – EPCR)

EPCR je transmembránový protein. Existují 2 formy EPCR plazmatická a buněčná. **Buněčná (membránová) forma** podporuje aktivaci PC na endotelu. **Plazmatická (rozpuštěná) forma** EPCR (sEPCR) si zachovává vazebné vlastnosti pro PC, ale nezvyšuje jeho aktivaci, tak jako jeho membránová forma – EPCR.

Klinická interpretace: Zvýšené hladiny sEPCR se nachází u nemocných se sepsí nebo SLE, či dalších systémových nemocí.

INHIBITOR AKTIVOVANÉHO PROTEINU C

(Protein C Inhibitor – PCI, dříve: PAI-3)

- ❑ MW: 57 kDa
- ❑ Koncentrace v plazmě: 3–5 mg/l plazmy
- ❑ PCI byl izolován Suzukim v r. 1983.

PCI je serinová proteáza syntetizovaná v játrech bez závislosti na vitaminu K. PCI s proteinem C tvoří ekvimolární komplex. Tato reakce je potencována heparinem (účinek se zvýší asi 30 krát). Inhibitor APC není specifický jen k proteinu C, ale inhibuje též komplex [TM . Trombin] i jiné složky koagulace (F IIa, Xa, tPA, kalikrein, trypsin). PCI byl ztotožněn s PAI-3.

INHIBITOR TKÁŇOVÉHO FAKTORU – TFPI

(TFPI – Tissue Factor Pathway Inhibitor)

- ❑ MW: 33 kDa
 - ❑ Koncentrace v plazmě: 1 µmol/l plazmy
 - ❑ Fyziologické hodnoty:
- | | volný TFPI | celkový TFPI | jednotka |
|-------------------|------------|--------------|-------------|
| Děti 0–6 měsíců | 7,8 ± 2,0 | 76,0 ± 16,5 | µg/l plazmy |
| 6 měsíců – 4 roky | 8,9 ± 2,3 | 90,6 ± 17,8 | µg/l plazmy |
| více než 4 roky | 8,8 ± 3,6 | 89,2 ± 19,4 | µg/l plazmy |
| Dospělí | 10,0 ± 4,8 | 81,2 ± 30,4 | µg/l plazmy |

Koncentrace TFPI v plazmě stoupá s vyšší hladinou cholesterolu a klesá při medikamentózní léčbě vrozených hypercholesterolemií. Obsah TFPI se zvyšuje po poranění.

TFPI byl poprvé popsán v roce 1987. Dříve byl označován jako EPI – extrinsic pathway inhibitor nebo LACI – lipoprotein associated coagulation inhibitor.

TFPI je **plazmatický inhibitor serinových proteáz Kunitzova typu** – obsahuje 3 Kunitzovy domény (Sprecher, 1994). Jde o specifický inhibitor zevní cesty aktivace koagulačního systému o 276 aminokyselinách, který inhibuje komplex [VIIa . TF]. Na molekule jsou 2 aktivní místa. TFPI je syntetizován endotelovými buňkami a je uvolňován do krevního oběhu společně s tkáňovým faktorem. Většina cirkulujícího TFPI je navázána na frakce cholesterolu (lipoproteiny HDL-LDL-VLDL, hlavně LDL). TFPI je vychytáván z plazmy především játry a ledvinami.

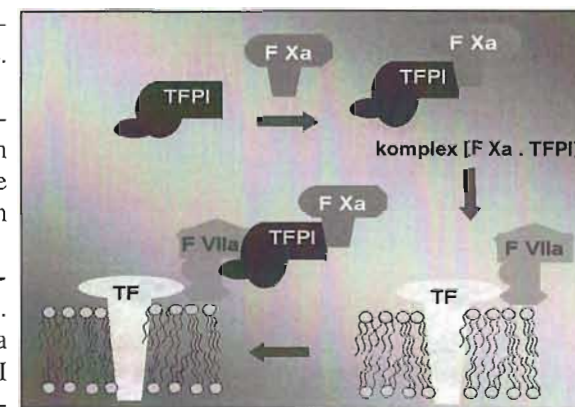
Nachází se:

- v **plazmě** (20 %): tento pool se může vázat na lipoproteiny (LDL a HDL), vznikají aterosklerotické pláty s následnou neutralizací TF.
- **vázaný na endotel** (80 %): uvolňuje se heparinem během heparinové terapie – heparin stimuluje uvolňování TFPI z endoteliálních buněk. Může dojít ke zvýšení hladiny plazmatického TFPI 2–10krát (Kijowski a spol., 1994). Kontinuální infuze nefrakcionovaného heparinu zvyšuje na dvojnásobek koncentraci TFPI v plazmě. Léčebné hladiny LMWH zvyšují hladinu TFPI podstatně méně (Esmon, 1992). Uvolnění TFPI a zvýšení jeho inhibiční aktivity po podání heparinu se považuje za jeden z hlavních momentů pro vysvětlení antikoagulační aktivity endotelu.
- **vázaný na trombocyty** (2–10 %): z krevních destiček se uvolňuje po stimulaci trombinem. Proto je v místech destičkové agregace nalézána zvýšená hladina TFPI.

Funkce TFPI

TFPI je důležitým inhibitorem zevní cesty koagulace. Má dvojí inhibiční účinek:

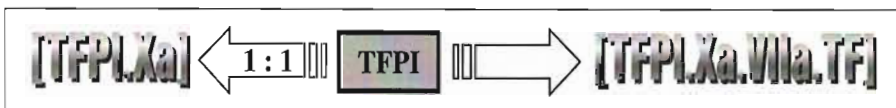
- ◆ **přímá inhibice F Xa** – váže se ve stechiometrickém poměru (1:1). Reakce je urychlována heparinem a dalšími polyanionty
- ◆ **tvorba koagulačně neaktivního komplexu** [TFPI . Xa . VIIa . TF] – závisí na koncentraci Ca²⁺. TFPI se váže pouze na komplex s [VIIa . TF], ale neinhibuje volný F VIIa.



Úloha TFPI v hemostáze

- ❑ TFPI indukuje mimo jiné vazbu F Xa na monocyty a inhibičně vyvazuje trypsin

ÚLOHA TFPI SPOČÍVÁ V TOM, ŽE INHIBUJE I MALÁ MNOŽSTVÍ TF!



Klinická interpretace: Zvýšené hodnoty se nachází v počáteční fázi DIK, při sepsi a u některých nádorů. Snížená hladina TFPI, případně defekt jeho molekuly mohou být podobně jako u ostatních defektů inhibitorů provázeny trombofilií.

Laboratorní stanovení: sledování aktivity TFPI (funkční test).

TFPI-2

Byl popsán **TFPI-2**. Jde to homologní protein k TFPI o MW 32 kDa, který je primárně vázaný k extracelulární matrix. Jeho koncentrace v plazmě je velmi nízká (kolem 0,45 µg/l), ale v průběhu těhotenství se zvyšuje 40–70násobně. TFPI-2 inhibuje proteázy s různými specifitami a funkcemi, jako je trypsin, chymotrypsin, plazmin, plazmatický kalikrein, faktory XIa a XIIa a pravděpodobně inhibuje i amidolytickou aktivitu komplexu [VIIa . TF].

OSTATNÍ PLAZMATICKÉ INHIBITORY

Hlavní fyziologický inhibitor elastázy je inhibitor α_1 *proteázy*. Ostatní inhibitory mají pravděpodobně jen minimální důležitost pro hemostázu.

Inhibitory vázané na buňky mají trochu odlišnou úlohu při kontrole hemostatických procesů. Mezi důležité inhibitory této skupiny řadíme **proteázové nexiny I a II** a trombomodulin. Proteázové nexiny nacházíme v endoteliálních buňkách, ale částečně i na povrchu ostatních buněk. Tyto inhibitory reagují s některými proteázami.

2.5.1.2. Inhibitory fibrinolýzy

Podobně jako koagulační systém má i fibrinolytický systém své inhibitory, které za fyziologických podmínek **zajišťují lokalizaci a utlumení fibrinolytických dějů a zabraňují jejich šíření do okolí**.

α_2 -ANTIPLAZMIN

MW: 70 kDa

Biologický poločas: 60 hodin

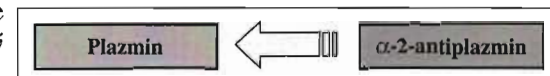
Koncentrace v plazmě: 50–70 mg/l 1 µmol/l plazmy

Po dlouhou dobu se hlavní inhibitory plazminu považovaly α_2 -makroglobulin a α_1 -antitrypsin. Teprve v roce 1976 byl popsán nejvýznamnější inhibitor plazminu – α_2 -antiplazmin.

Antiplazminy jsou přítomny v plazmě v nadbytku a okamžitě váží velmi účinně veškerý nadbytečný plazmin v poměru (1:1). Biologický poločas volného plazminu v krvi je jen 0,1 sekundy.

Zejména α_2 -antiplazmin je velmi důležitým inhibitorem systému fibrinolýzy. Je to glykoprotein tvořený v játrech, který patří mezi inhibitory proteináz serinového typu. α_2 -antiplazmin má velkou afinitu k vazebnému místu pro *lysin* na plazminu a podobně jako fibrin se k tomuto místu velmi účinně váže.

α_2 -antiplazmin vyvazuje **jen volný plazmin přítomný v plazmě** se kterým tvoří komplex v poměru 1:1 [plazmin . α_2 -antiplazmin]. Takto vyvázaný α_2 -antiplazmin je odstraněn pomocí MFS.



Je-li **plazmin vyvázan na fibrin** pak α_2 -antiplazmin takto vyvázaný plazmin již prakticky neváže. Má sice nepatrný inhibiční vliv, ale reakce probíhá asi 50krát pomaleji, než s volným plazminem.



α_2 -antiplazmin dále inhibuje navázání plazminogenu na fibrin, případně může štěpit faktory XIIa, XIa, Xa, případně kalikrein, trombin, u-PA a t-PA. Volný α_2 -antiplazmin je inaktivován, v přítomnosti F XIIIa, vyvážením na α řetězec fibrinu.

INHIBITORY AKTIVÁTORŮ PLAZMINOGENU (PAI)

(Plasminogen Activator Inhibitor – PAI)

Inhibitory aktivátorů plazminogenu jsou přirozené inhibitory tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA). Zatím jsou popsány 3 typy: PAI-1, PAI-2 a PAI-3.

PAI-1

- MW: 52 kDa (glykosylovaná forma)
43 kDa (neglykosylovaná forma)
- **Biologický poločas:** Biologický poločas latentní (neaktivní) formy je kolem 1 hodiny při fyziologickém pH a teplotě. Lehce stabilnější forma vzniká navázáním PAI-1 na adhezivní protein Vitronectin (biologický poločas 2 hodiny). Mutované formy PAI-1 mají biologické poločasy až 145 hodin.
- **Koncentrace v plazmě:** 20–100 µg/l

Lidský PAI-1 se řadí mezi serinové proteázy. Je syntetizován endoteliálními buňkami cév, megakaryocyty a hepatocyty (po stimulaci cytokiny), jako jednořetězcový glykoprotein, který je z převážné části přítomen v α -granulích krevních destiček, v menší míře v endotelu a v plazmě. Syntéza je regulována trombinem i některými hormony např. glukokortikoidy, či inzulinem.

Funkce PAI-1

PAI-1 je inhibitor obou typů aktivátoru plazminogenu (t-PA a u-PA), PAI-2 inhibuje pouze u-PA, zatímco PAI-3 inhibuje u-PA, t-PA a trombin.

Nejúčinnějším inhibitorem z této řady je PAI-1, který vytváří s tPA stechiometrický komplex [PAI-1 . t-PA], v poměru 1:1 a tím jej inaktivuje. Proces je urychlován fibrinem, na který se PAI-1 váže a v této vazbě rychleji vychytává t-PA z plazmy. Komplex pak disociuje z molekuly fibrinu a je odbouráván v játrech vazbou na receptor podobný lipoproteinovým receptorům. Po uvolnění PAI-1 poměrně rychle konvertuje na neaktivní formu a v této podobě koluje v plazmě. Aktivuje se změnou konformace a odhalením aktivního místa vazbou na negativně nabitý povrch fosfolipidů.

Klinické použití: Vyšší hodnoty PAI-1 ukazují na indukci endotelu, navozuje je i endogenní insulin. Zvýšené hodnoty PAI-1 jsou rovněž spjaty s dyslipemií smíšeného typu a obezitou. Vyskytují se i v těhotenství, při horečce a zánětu.

- ❑ Účinek PAI-1 je namířen proti aktivaci plazminogenu, to znamená, že jeho účinek spadá do období, kdy ještě není aktivována fibrinolýza (výhoda v porovnání s účinkem α_2 -antiplazminu, který je namířen proti vznikajícímu plazminu).
- ❑ Klinické studie prokazují, že jedinci se zvýšenou hladinou PAI-1 se po prodělaném IM dožívají kratšího věku.
- ❑ PAI-1 je možné spolu s fibrinogenem a dalšími proteiny zánětlivého procesu (C-reaktivní protein, alfa 1 – antitrypsin a jiné) zahrnout do skupiny proteinů tzv. akutní fáze, jejichž syntéza a uvolnění jsou indukovány v rámci zánětlivé (imunitní) reakce organismu.

PAI-2

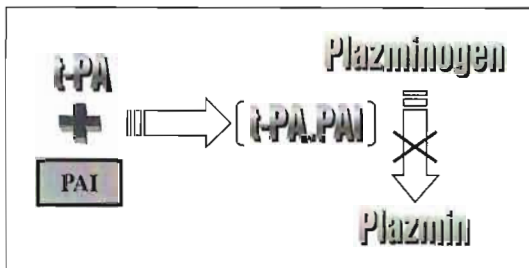
- ❑ MW: 48 kDa
- ❑ Koncentrace v plazmě: 2–4 $\mu\text{g/l}$. Zvyšuje se v průběhu těhotenství.

TROMBINEM AKTIVOVANÝ INHIBITOR FIBRINOLÝZY (TAFI)

(Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor – TAFI, plasma pro-carboxypeptidase B /CPB/, pro-carboxypeptidase U /CPU/, E.C.3.4.17.3.)

- ❑ MW: 58 kDa
- ❑ Koncentrace v plazmě: 2,5 – 5 mg/l (50 nmol/l)

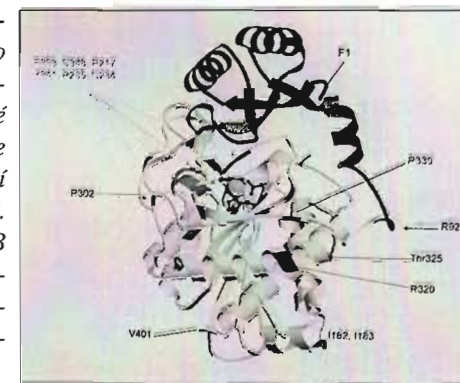
TAFI je členem rodiny metalokarboxypeptidáz. Karboxypeptidázy jsou enzymy, které hydrolyzují C- koncový řetězec peptidu. Dělíme je na serinové karboxypeptidázy, cysteinové karboxypeptidázy a metalokarboxypeptidázy.



tidázy, mezi které patří i TAFI jsou **nositeli atomu Zn**, který je nezbytný pro jejich katalytickou funkci. Karboxypeptidáza B (CPB) hydrolyzuje bazické aminořetězce. Byla objevena v roce 1958 jako pankreatická proteáza. Její hladina v séru je prakticky nulová. Vzhledem k velké podobnosti CPB a TAFI ve struktuře a katalytickém mechanismu jejich účinku je většina autorů ztotožňuje a jejich názvy používá jako synonyma (Hendriks a spol., 1989).

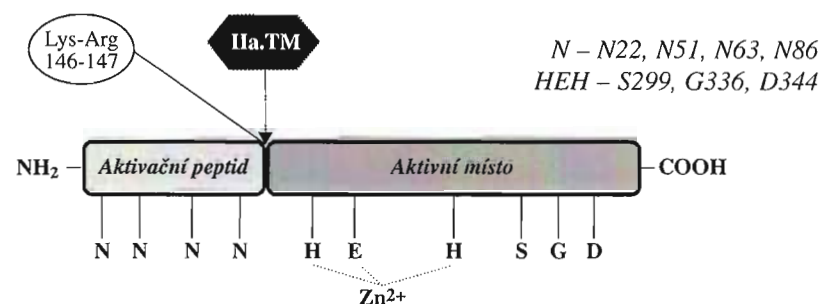
TAFI byl popsán v roce 1988, jako labilní karboxypeptidáza v séru, která interferovala při měření karboxypeptidázy N (lysinová karboxypeptidáza – CPN). Vyskytuje se jako jednořetězcový glykoprotein o 401 aminokyselinách. Neaktivní zymogen o 423 aminokyselinách je syntetizován v játrech. Během sekrece TAFI v jaterní buňce je odštěpen N- koncový signální peptid o 22 aminokyselinách (Tan a Eaton, 1995). Gen pro TAFI má velikost 48 kB, obsahuje 11 exonů a nachází se v chromosomu 13q14.11.

- ❑ V současné době je navržena nová nomenklatura: místo TAFI – pro TAFI, místo TAFIa – TAFI, místo TAFIai – TAFIi (Antovic, J.P., 2004)



Model molekuly TAFI

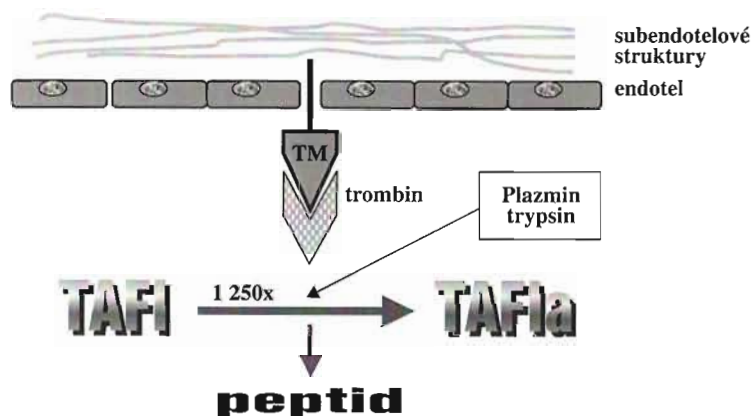
STRUKTURA TAFI (domény)



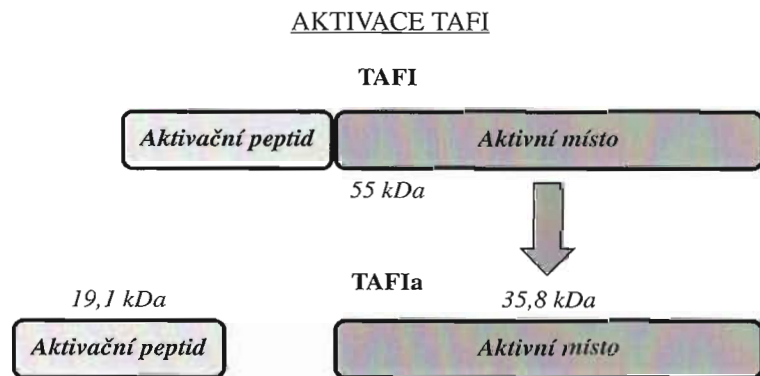
Tato část molekuly je homologní s tkáňovou karboxypeptidázou B, která obsahuje 7 reziduí cysteinu (Cys^{64, 77, 136, 151, 160, 165, 291}), dále koordinační místa Zn²⁺ (H67, E69, H196) a místo k vyvázání substrátu poblíž C- konce molekuly (D257, G244, S207).

Aktivace TAFI (TAFIa)

TAFI je neaktivovaná forma karboxypeptidázy U, která se aktivuje trombinem, plazminem a pravděpodobně také trypsinem. Trombin, plazmin a trypsin proteolyticky štěpí TAFI v místě Arg⁹² proteinového řetězce počítáno od N konce molekuly. Při štěpení se oddělí od katalytické domény aktivační peptid s N- koncem, obsahující 4 N- glykosylovaná místa, která jsou důležitá pro stabilizaci a prodloužení biologického poločasu TAFI. Při štěpení se oddělí katalytická doména (TAFIa) s C- koncem chováající se jako karboxypeptidáza, která může hydrolyzovat Lys a Arg v C oblasti proteinu (Fuentes-Prior a spol., 2000).



Komplex trombinu s TM zvyšuje rychlost štěpení trombinem až 1 250krát. Aktivační účinek TM je zprostředkován jeho doménami pro epidermální růstový faktor (EGF-domény). Trombin se váže na domény EGF-5 a 6, kdežto EGF-4 je nezbytná pro aktivaci proteinu C. Nejmenší mutant TM schopný ještě aktivovat TAFI musí mít uspořádání těchto domén EGF-3, 4, 5 a 6 (Wang a spol., 2000).



TM má dvojí úlohu v koagulačním systému:

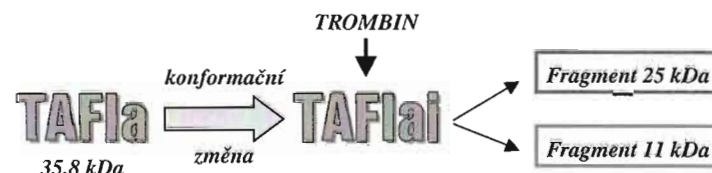
- Snižuje tvorbu trombinu v systému aktivace proteinu C vyvázáním do komplexu [TM . trombin] – reakce probíhá zejména při **vyšších** koncentracích trombomodulinu.
- v systému komplexu [TM . trombin] ovlivňuje aktivaci TAFI a tak nepřímo působí snížení fibrinolytického efektu – reakce probíhá zejména při **nízkých** koncentracích trombomodulinu.

□ I když obě reakce mohou probíhat současně, zdá se že určujícím faktorem pro výsledný účinek vlivu TM na TAFI a PC je jeho koncentrace. K aktivaci TAFI vedou nízké koncentrace TM (kolem 5 nmol/l), zatímco při vyšších koncentracích (kolem 10 µg/ml) se aktivace TAFI snižuje. To se vysvětluje zvýšenou tvorbou aktivovaného proteinu C, který zasahuje do koagulačních dějů a snižuje produkci trombinu.

Trombomodulin působí profibrinolyticky při vyšších a antifibrinolyticky při nižších koncentracích. Důležitým faktorem pro regulační účinek in vivo TM na TAFI je **průsvit cévy**. Koncentrace TM v plazmě se zvyšuje směrem od aorty ke kapiláram. V kapilárách je díky vyšší koncentraci trombomodulinu, nejmenší aktivace TAFI a v důsledku toho i snížená inhibice fibrinolýzy.

Inhibice TAFIa

TAFIa se inaktivuje konformační změnou na TAFIai. Při této změně nedochází k proteolytickému štěpení. Degradace TAFIai je umožněna trombinem, který jej proteolyticky štěpí v místě Arg³⁰² na 2 fragmenty o MW 25 a 11 kDa (Marx a spol., 2000).

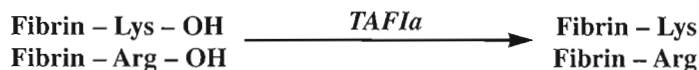


Úloha TAFI v organismu

TAFI hraje klíčovou úlohu v interakci mezi prokoagulačními, antikoagulačními a fibrinolytickými systémy. V plazmě koluje neaktivní forma TAFI v komplexu s plazminogenem [TAFI . plazminogen]. V tomto komplexu se TAFI váže 10krát vyšší afinitou k Lys-plazminogenu, než Glu-plazminogenu. Vazba TAFI na plazminogen je zprostředkována glykosylovými místy na aktivačním peptidu TAFI (Wang a spol., 1998).

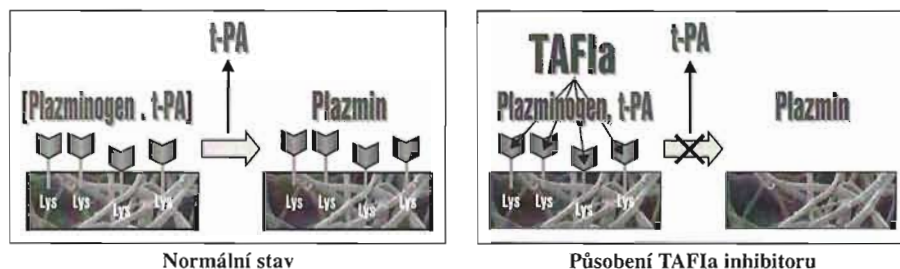
TAFI nepatří mezi serpiny a jeho inhibiční funkce je zcela odlišná. Plazminogen

a následně i generovaný plazmin jsou vyvázány v počáteční fázi fibrinolytického štěpení na bílkovinný řetězec molekuly fibrinu vazbami na karboxyskupiny koncových aminokyselin v jeho molekule – *Lys* a *Arg*. TAFIa hydrolyticky štěpí tyto aminokyseliny v koncových oblastech řetězce fibrinu v tzv. karboxy C- oblasti a tím snižuje počet vazebných míst pro plazminogen a t-PA na molekule fibrinu.



Protože jak plazminogen, tak i plazmin se nemohou dostatečně vyvázat k molekule fibrinu, nedochází k tvorbě trimerního komplexu [t-PA . plazminogen . fibrin], snižuje se tvorba plazminu a následně i účinek fibrinolytického systému.

TAFI v případě fibrinolýzy aktivované t-PA modifikuje koncové části molekuly fibrinu a tím znemožňuje připojení komplexu [t-PA . plazminogen] k aktivačnímu povrchu fibrinu a vytvoření komplexu [t-PA . plazminogen . fibrin], jak je patrné z obrázku.



TAFIa cirkuluje v plazmě vázaný v nekovalentním komplexu s α_2 -makroglobulinem [α_2 -makroglobulin . TAFI]. TAFIa je velmi citlivý na teplotu. V organismu je jeho biologický poločas kolem 10 minut. TAFIa též uvolňuje PAI-1 z granulí aktivovaných krevních destiček.

Funkce TAFI v organismu

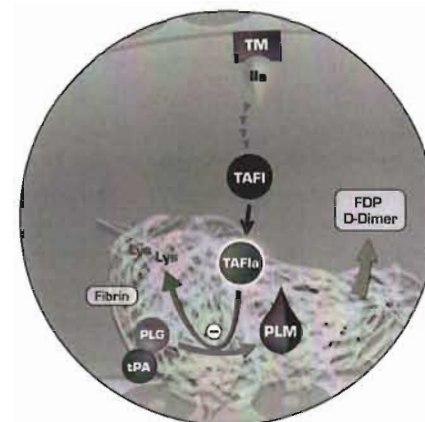
Aktivace TAFI účinkem komplexu [trombin . TM] spojuje oba jevy koagulace a to jednak inhibiční vliv TAFI na fibrinolýzu a profibrinolytický efekt aktivovaného proteinu C. Aktivovaný TAFIa moduluje fibrinolýzu in vivo. *Expres TAFIa vyvolá inhibici fibrinolýzy zejména u získaných trombotických stavů (např. u infarktu myokardu a cévní příhody mozkové).*

Naopak je-li tento systém narušen, dochází ke zvýšení fibrinolýzy. To může mít za následek krvácení u vrozených defektů vnitřní cesty aktivace koagulace (např. u he-

mofilie A i B). Tito nemocní mají sníženou tvorbu trombinu v iniciační fázi koagulace díky nízkým koncentracím TF a současně sníženou tvorbu trombinu vnitřní cestou aktivace. *Aktivace TAFI a následně i inhibice fibrinolýzy jsou v těchto případech narušeny a vytvořený fibrin bude rychleji lyzován. Naopak u nemocných s vysokými koncentracemi F VIII, IX a XI je fibrinolýza blokována a následkem toho se zvyšuje riziko trombózy.*

Nemocní s deficitem F XI jsou náchylní ke krvácení do tkání s vysokou lokální fibrinolytickou aktivitou. Vysvětlením pro tento jev by mohla být nedostatečná inhibice fibrinolýzy z důvodu snížené tvorby trombinu (vlivem deficitu F XI) a snížená aktivita TAFI.

Klinická interpretace: Klinické studie ukazují pozitivní korelaci mezi koncentrací TAFI a věkem mužů a žen, které nepoužívali orální kontraceptiva. Hormonální léčba orálními kontraceptivy zvyšuje hladinu TAFI. U černošské populace – v porovnání s bílou rasou byla zjištěna významně nižší hodnota TAFI. Zvýšené hladiny TAFI byly nalezeny u nemocných s anginou pectoris, ICHS, u nemocných s venózní trombózou a při zánětech. U revmatoidní artritidy a u některých hemoblastóz byly naopak zjištěny snížené hladiny TAFI (van Tilburg a spol, 2000).



TAFIa – inhibiční efekt (PLM – plazmin, PLG – plazminogen)

2.5.2. Inhibitory s nespecifickými vazbami

Vedle specifických inhibitorů existují také inhibitory s nespecifickými vazbami na cílové molekuly. K této skupině inhibitorů se řadí:

- alfa₂-makroglobulin
- alfa₁-antitrypsin
- C1-inhibitor

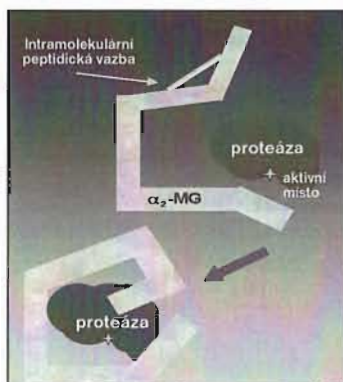
Jde obecně o inhibitory proteáz, jejichž účinek přesahuje rámec koagulačních a fibrinolytických dějů. V těchto systémech se však mohou významně uplatnit.

α_2 -MAKROGLOBULIN

- ☐ MW: 725 kDa
- ☐ Biologický poločas: 200–250 hodin
- ☐ Koncentrace v plazmě: 2–2,5 mg/l plazmy. Koncentrace se snižuje s věkem (v dětství asi 2,5krát více než v dospělosti). Výrazně se zvyšuje v těhotenství.

α_2 -makroglobulin je v historickém vývoji jedním z nejstarších plazmatických proteinů. Molekula existovala v organismech již někdy před 600 miliony let.

α_2 -makroglobulin je tvořen hepatocyty v játrech i řadou dalších buněk včetně makrofágů. Je přítomen v plazmě i mimo cévní systém. Je složen ze dvou, či čtyř identických podjednotek. Má nejširší spektrum antiproteázové aktivity. Je schopen vytvářet komplexy s proteolytickými enzymy plazmy, leukocytů, bakterií i hadími jedy. Působí odlišně v porovnání se serpiny, nevyužívá limitovanou proteolýzu. Tato velká molekula působí podobně jako past na myši. Molekula α_2 -makroglobulinu změní svou konformaci, obklopí molekulu enzymu a tak uzavře vstup substrátu k němu, zejména do oblasti aktivního místa cílového enzymu. Vazba nevede tedy **k inaktivaci aktivní složky, ale ke sterické zábraně** (neumožní se odkrytí vazebného místa).



Inhibice proteáz α_2 -makroglobulinem (MG)

Klinická interpretace: Jeho účinek nenastupuje ihned, ale postupně se zvyšuje. Uplatňuje se zejména v situacích, kdy jsou vyčerpány kapacity ostatních inhibitorů.

C-1 INHIBITOR (C1INH)

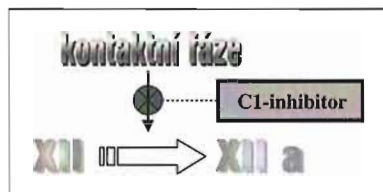
- ☐ MW: 105 kDa
- ☐ Biologický poločas: 38 – 40 hodin
- ☐ Koncentrace v plazmě: 0,18 – 0,22 g/l plazmy

Je to glykoprotein, který je syntetizován v játrech a je uvolňován v průběhu aktivace destiček (je přítomen v α granulích krevních destiček).

Je nejmočnějším inhibitorem kontaktní fáze, inhibuje faktory XIIa, XIa a kalikrein, ale i plazmin a zasahuje do systému komplementu.

Účinek je asi 10–20krát zesílen v přítomnosti heparinu.

Klinická interpretace: Jsou známy jak vrozené, tak i získané deficeience C1-inhibitoru (např. při sepsi).



α_1 -ANTITRYPSIN

- ☐ MW: 55 kDa
- ☐ Biologický poločas: 90 – 96 hodin
- ☐ Koncentrace v plazmě: 1.3 – 2.5 mg/l plazmy

Je to glykoprotein, který je syntetizován v játrech. Inhibuje především F Xa a je i poměrně silným inhibitorem aktivovaného PC. Jeho hlavní význam spočívá v inhibici proteáz slinivky břišní a bílých krvinek.

2.5.3. Získané inhibitory

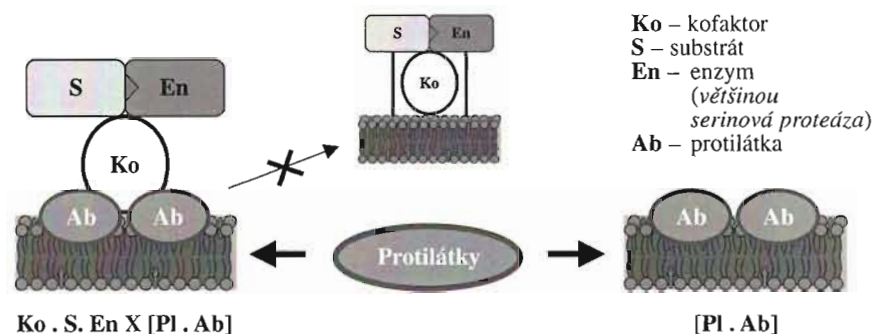
Zatímco přirozené inhibitory jsou součástí a zároveň i základním regulačním mechanismem koagulace, jsou získané inhibitory **nálezem patologickým**, nepříznivě zasahujícím do koagulace. Ze získaných inhibitorů hrají nejvýznamnější úlohu tzv. **antifosfolipidové protilátky** (Cines a McCrae, 1995; Debize a spol., 1995).

ANTIFOSFOLIPIDOVÉ PROTILÁTKY

(APA – Antiphospholipide Antibody, Antifosfoproteinové protilátky)

Antifosfolipidové protilátky představují heterogenní skupinu protilátek (imunoglobulinů – hlavně IgG a IgM), které vytvářejí komplexní sloučeniny s negativně nabitými fosfolipidy (kardiolipin, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin) nebo s jejich komplexy s makromolekulární látkou – kofaktorem, nejčastěji bílkovinné povahy. Jako proteinové kofaktory pro vazbu APA na negativně nabitý fosfolipid se uplatňují α_2 -glykoprotein I, protein C, protein S, annexin V, HMWK, F X a další.

Vazba antifosfolipidových protilátek na fosfolipidové struktury znemožní nebo omezí tvorbu koagulačně aktivních komplexů.



Po vazbě kofaktoru v koagulačně aktivním komplexu *dochází k modifikaci konformace fosfolipidů spočívající v přechodu z lamelární do hexagonální fáze, pro niž je charakteristická vyšší antigenicita*. Tím se vytvářejí podmínky pro reakci APA s proteinfosfolipidovým komplexem.

Pro APA je typická výrazná heterogenita. Pacienti často vytvářejí „koktejl“ protilátek reagujících s různými fosfolipidy. Specifické účinky jednotlivých druhů APA zůstávají zatím ne zcela objasněny.

S antifosfolipidovými protilátkami se setkáváme za různých situací:

- u pacientů s autoimunitním onemocněním
- u jedinců po prodělaném infekčním onemocnění
- u zdravých lidí

Podle jednoduché klasifikace rozdělujeme APA na:

- autoimunitní
- alloimunitní

Autoimunitní APA

Autoimunitní APA se vyskytují v séru 20–50 % pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE), méně často ve spojitosti s jiným onemocněním pojivové tkáně. Přítomnost autoimunitní APA bývá spojována s opakovanými žilními i arteriálními trombózami, trombocytopenií a u žen s opakovanými spontánními potraty.

Alloimunitní APA

Alloimunitní APA doprovázejí přechodně některá infekční a maligní onemocnění a na rozdíl od autoimunitních APA není jejich přítomnost v séru doprovázena klinickými příznaky. Nalézají se v 8 % u normální populace a jejich výskyt stoupá s věkem.

Klasifikace APA

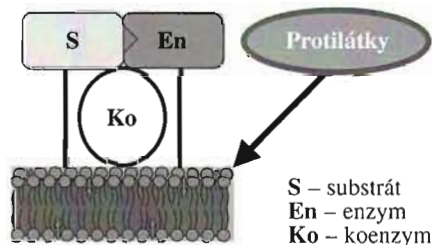
Antifosfolipidové protilátky (APA) tvoří heterogenní skupinu, kam řadíme:

- *lupus antikoagulans* (LA)
- *antikardiolipinové protilátky* (ACLA) typu IgM, IgG a IgA (Debize a spol., 1995).

LUPUS ANTIKOAGULANS

V r. 1952 Conley a Hartman prokázali v séru pacientů se systémovým Lupus Erythematoses substanci, která způsobovala prodloužení srážlivosti krve a času potřebného k přeměně protrombinu na trombin. Později byla tato látka pojmenována „lupus antikoagulans“ (LA).

Jedná se o skupinu imunoglobulinů, které interferují s jedním nebo více koagulačními testy závislými na fosfolipidech. Jde hlavně o autoprotilátky, které jsou namířeny proti fosfolipidovým složkám protrombinového komplexu koagulační kaskády (Debize a spol., 1995).



Může jít o:

- protilátky typu A
- protilátky namířené proti protrombinu

Cílový antigen:	Výskyt:
β_2 -glykoprotein I	1/3 LA
protrombin	2/3 LA

Tyto autoprotilátky vstupují do koagulačního děje na různých úrovních koagulačního procesu, reagují s prokoagulačními fosfolipidy a soutěží o místa na nich

s faktory koagulačního systému. Tím omezují vázání těchto faktorů do koagulačních aktivních komplexů a způsobují abnormální nálezy koagulačních testů, zejména APTT. Dochází k interferenci např. při endoteliální aktivaci systému proteinu C, ale i k interferencím na úrovni primární hemostázy, popřípadě v dalších místech, ve kterých se uplatňují koagulačně aktivní fosfolipidové povrchy.

Jedním z proteinů, který vytváří podobné komplexy je i β_2 -glykoprotein 1 (β_2 -GP1). β_2 -GP1 se dále váže na lipoproteiny bohaté na triacylglyceroly. Protilátka proti β_2 -glykoproteinu 1 je β_2 -globulin, který může inhibovat cestu koagulační kaskády tím, že váže negativně nabitě fosfolipidy, které se dostávají na povrch buněk např. u krevních elementů, endotelií nebo trofoblastů v důsledku jejich poškození. β_2 -GP1 se po navázání autoprotilátky inaktivuje a ztrácí své antikoagulační vlastnosti.

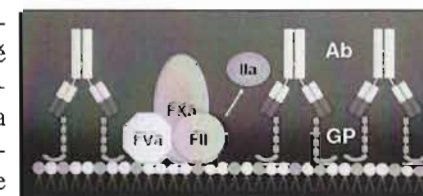
Klinická interpretace: Nemocní s LA mají zvýšené riziko vzniku trombózy (Cines a Mc Crae, 1995). LA jsou často nalézány u pacientů s trombocytopenií, u hepatitid, vazospastických poškození, kožních ulcerací, infarktu myokardu, trombózy mozkových tepen, po přestálých bakteriálních a virových infekcích, po malárii, lymské borelióze a neurologických nezánětlivých chorobách (epilepsie, migréna).

□ Frekvence LA narůstá s věkem.

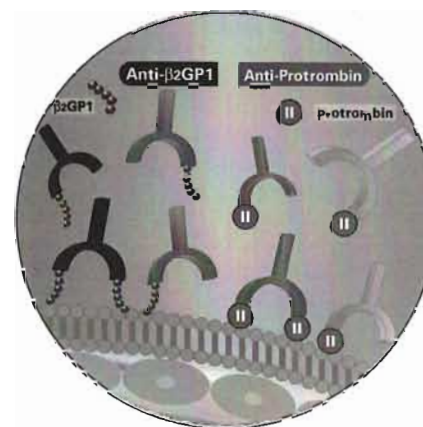
Laboratorní stanovení protilátek typu LA

Od roku 1988 je diagnostika LA pod dohledem Subcommittiee on Lupus Anticoagulant-Antifosfolipid Antibodies of the SSC of the ISTH. Používají se:

- ◆ **funkční vyšetření:** na základě jejich schopnosti ovlivňovat koagulační testy závislé na fosfolipidech (Lupus Anticoagulans – LA)
 - PT – asi 2/3 všech případů, antiprotrombinové protilátky. Trombóza asi u 20 % případů
 - APTT
 - ředěný RVVT (Rusel Viper Venom Time) – anti- β_2 -glykoproteinové protilátky. Trombóza se vyskytuje asi u 70 % případů



Kompetice faktorů a protilátek o místo na fosfolipidovém povrchu (GP – glykoprotein, Ab – protilátka).

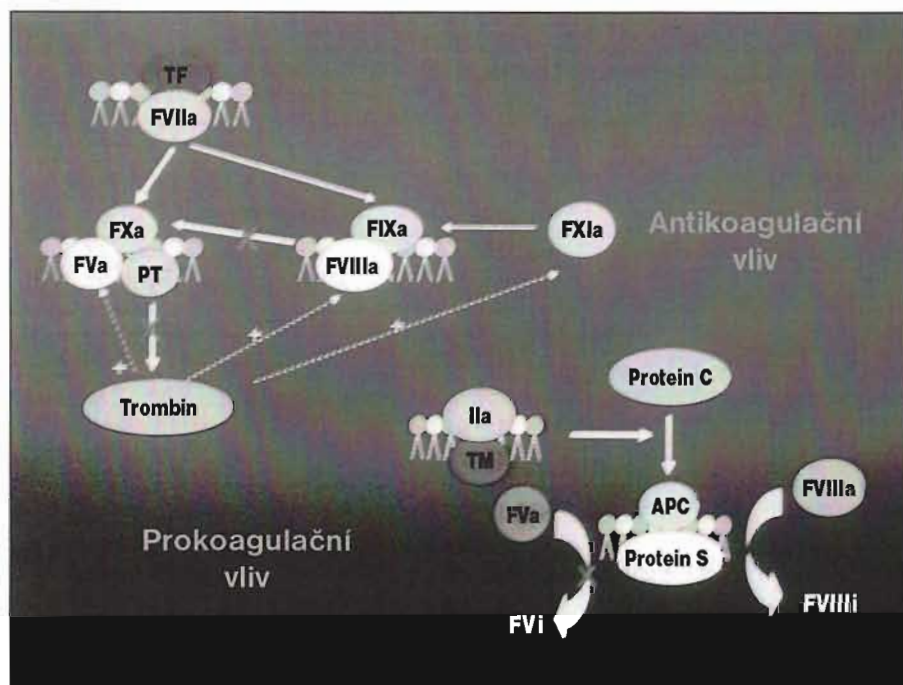


APA namířené proti protrombinu a β_2 -GP

- ◆ **ředící studie:** Jestliže testy jsou abnormální provádí se ředící studie (smísením plazmy pacienta a plazmy normálu)
- ◆ **konfirmační testy:** nedojde-li k normalizaci testu v ředících studiích provádí se konfirmační testy (ředí se fosfolipid – APTT, tkáňový faktor – PT nebo účinná reagenční složka přítomná v setu – RVVT)

□ Neexistuje žádný absolutně spolehlivý screeningový test na průkaz LA.

ANTIKOAGULAČNÍ A PROKOAGULAČNÍ PŮSOBNÍ PROTILÁTEK TYPU LA

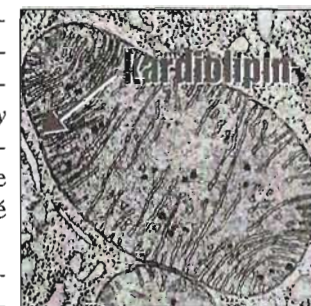


ANTI-KARDIOLIPINOVÉ PROTILÁTKY (ACLA – Anticardiolipin Antibody)

V r. 1906 objevil Wasserman v séru pacientů se syphilis protilátky, které nazval reaginy. V následujících 30 letech se hledaly pro záchyt těchto protilátek vhodné zdroje antigenů a především vhodné metody k jejich záchytu. V r. 1951 Pangborn zjistil, že antigen, který váže reaginy, je kyselý fosfolipid, získaný alkoholovou extrakcí hovězího srdečního svalu a nazval ho **kardiolipin**.

Kardiolipin je součástí vnitřní membrány mitochondrií. Protilátky proti kardio-

lipinu reagují s fosfodiesterovou skupinou kardiolipinu a reprezentují tak pouze jeden člen skupiny protilátek, které se mohou vázat na fosfolipidy, kdežto negativně nabitě fosfolipidy, na které se váží protilátky typu LA jsou téměř ve všech membránách různých tkání (v mozku, trombocytech, endotelu). Tento rozdíl ve schopnosti vázat kardiolipin nebo negativně nabitě fosfolipidy je klinicky velmi důležitý.



Laboratorní stanovení: Od r. 1986 probíhá diagnostika antifosfolipidových protilátek podle doporučení International Anticardiolipin Standardisation Workshops. Používají se komerční ELISA testy pro ACLA ke stanovení hladin IgG, IgA a IgM (The Subcommittee on Lupus Anticoagulans, 1995):

■ **stanovení antigenu** – ELISA metoda:

- vyšetřují se antikardiolipinové protilátky (ACLA) – IgG, IgM a IgA.
- stanovují se protilátky proti některým fosfolipidům (fosfatidyletanolaminu, fosfatidylcholinu, fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinozitolu, kyselině fosfatidylové).

Literatura

Barrowcliff, T. W., Thomas, D. P.: **Anti-thrombin III and heparin**. In: Bloom, A. L., Thomas, D. P., eds. Haemostasis and Thrombosis. Second edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987, s. 849

Bertina, R. M., van der Linden, I. K., Engesser, L. at al.: **Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis**. Thromb. Haemost. 57, 1987, s. 196–200.

Brigshaw, G. F., Shanberge, J. N.: **Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. II. Inhibition of thrombin and activated factor X**. Thromb. Res. 4, 1974, s. 463–477.

Cines, D. B., McCrae, K. R.: **The Anti-phospholipid-protein syndrome**. J. Clin. Immunol. 15, 1995, č. 6, s. 965–1005.

Debize, G., Massignon, D., Couer, P.: **Anti-phospholipid antibodies and thrombotic risk: relationship to thrombomodulin, D-dimers and prothrombin fragment 1 + 2**. Nouv. Rev. Fr. Hématol. 37, 1995, Suppl II, s. 93–96.

Esmon, E. L., Owen, W. G., Esmon, C. T.: **Isolation of a membrane – bound cofactor for thrombin – catalyzed activation of protein. C. J. Biol. Chem.** 257, 1982, s. 859–864.

Esmon, Ch. T.: **Protein S a Protein C. Biochemistry, Physiology and Clinical Manifestation of Deficiencies**. Trends. Cardiovasc. Med. 2, 1992, č. 6., s. 214–219.

Hendriks, D., Scharpe, S., van Sande, M., Lommaert, M. P.: **Characterization of a carboxypeptidase i human serum distinct from carboxypeptidase**. N. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27, 1989, s. 277–285.

Jaffe, E. A., Armellino, D., Tollefsen, D. M.: Biosynthesis of functionally active heparin cofactor II by a human hepatoma-derived cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132, 1985, s. 368–374.

Kijowski, R., Hoppensteadt, D., Walenga, J., Borris, L., Lassen, M. R., Fareed, J.: Role of tissue factor pathway inhibitor in post surgical deep venous thrombosis (DVT) prophylaxis in patients treated with low molecular weight heparin. *Thromb. Res.* 74, 1994, s. 53–64.

Kolodziej, S. J. et al.: Three dimensional structure of the human plasmin α_2 -macroglobulin complex. *J. Struct. Biol.* 123, 1998, s. 124–133.

Kraus, M., Noah, M., Fickenscher, K.: The PCAT – a simple screening assay for assessing the functionality of the protein C anticoagulant pathway. *Thromb. Res.* 79, 1995, s. 217–222.

Lechner, K., Kyrle, P. A.: Antitrombin III concentrates – are they clinically useful? *Thromb. Haemost.* 83, 1995, č. 3, s. 340–348.

Mc Clure, D. R., Walls, J. D., Grinnell, B. W.: Post-translational processing events in the secretion pathway of human protein C, a complex vitamin K-dependent antithrombotic factor. *J. Biol. Chem.* 267, 1992, s. 19710.

Sprecher, C. A., Kiesel, W., Mathewes, S., Foster, D. C.: Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1994, s. 3353–3357.

Tan, A. K. a Eaton, D. L.: Activation and characterization of procarbocypeptidase B from human plasma. *Biochemistry* 34, 1995, s. 5811–5816.

The Subcommittee on Lupus Anticoagulant – Antophospholipid antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH: Criteria for the diagnosis lupus anticoagulans: an update. *Thromb. Haemostas.* 74, 1995, č. 4, s. 1185–1190.

Tollefsen, D. M., Blank, M. K.: Detection of a new heparin – dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Clin. Invest.* 68, 1981, s. 589–596.

Tollefsen, D. M.: Insight into to mechanism of action of Heparin Cofactor II. Review Article. *Thromb. Haemost.*, 74, 1995, č. 5, s. 1209–1214.

Van Tilburg, N. H., Rosendaal, F. R., Bertina, R. M.: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 95, 2000, s. 2855–2859.

Wang, W., Boffa, M. B., Bajzar, L., Walker, J. B., Nesheim, M. E.: A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin – activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.* 273, 1998, s. 27176–27181.

Wang, W., Nagishama, M., Schneider, M., Morser, J., Nesheim, M.: Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombinactivable fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 2000, s. 22942–22947.

3. VYŠETŘOVACÍ METODY HEMOSTÁZY

3.1. Přístroje a techniky používané v hemostáze

3.1.1. Koagulační

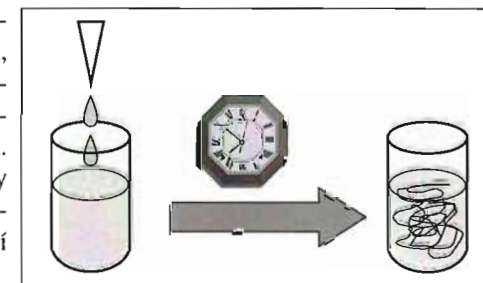
Jednotlivé složky koagulačního systému jsou přítomny v plazmě většinou ve formě neaktivních složek – proenzymů (zymogenů). Aby mohl proběhnout srážecí proces je nutné tyto složky **aktivovat**.

Používají se tyto aktivátory:

- **nefyziologické:** sílika, kaolin, celit
- **fyzilogické:** tkáňové extrakty nebo čištěné či rekombinantní aktivované koagulační faktory
- **specifické:** zmijí enzymy (jedy). Tyto mají svá omezení. Některé hadí enzymy nejsou závislé na inhibitech a aktivují nejen proenzymy (zymogeny), ale i PIVKA formy těchto koagulačních faktorů. Hadích jedů je možné využít i k inaktivaci inhibitorů proteáz, které by jinak v systému běžných koagulačních testů mohly interferovat s některými složkami systému a vykazovat prodloužené hodnoty koagulačních časů.

Enzymatické cesty (zejména oblast působení serinových proteáz) vyžadují nejen aktivované faktory, ale i aktivované kofaktory a dále fosfolipidy a vápníkové ionty. Jedná se tedy většinou o velmi komplexní směsi relativně nestabilních proteinů. Takovýto nestabilní systém lze jen obtížně standardizovat.

Princip: Techniky využívané u koagulačních vyšetření spočívají v tom, že se měří reakční čas od spuštění reakce až po vytvoření zjevného koagula nebo fibrinového vlákna. Naměřené časy se porovnávají s časy standardní poolové normální kontrolní plazmy v komerčním provedení (ISO 9001).



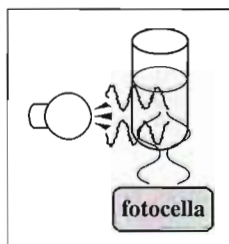
Detekce:

- vizuální
- optická
- elektrická
- magnetická

3.1.2. Zákalové (nefelometrické, turbidimetrické)

Princip: Zákalové metody jsou vlastně fotooptické metody. Při měření těmito me-

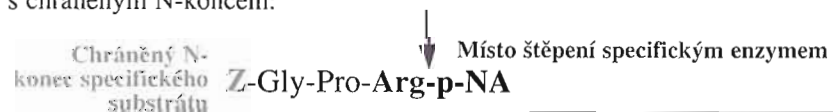
- **Nefelometrie:** zjišťuje se množství rozptýleného záření na částicích koloidního charakteru ve směru kolmém na dopadající paprsek (detektor je umístěn v úhlu 90 stupňů).
- **Turbidimetrie:** zjišťuje se změna optické hustoty po průchodu systémem



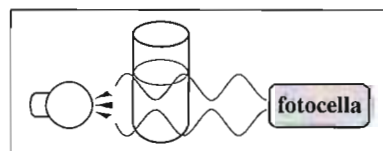
3.1.3. Spektrofotometrické metody (chromogenní substráty)

- *nebylo možné zavést jednoduché koagulační testy* (např. stanovení F XIII nebo C1-inhibitoru)
- *byla obtížná standardizace* pro jejich snadné ovlivnění řadou dalších působků (např. antitrombinem).

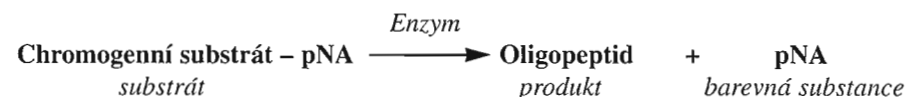
Princip: V tomto systému se zjišťuje intenzita zabarvení (absorbance), kterou vykazuje odštěpený peptid po proběhlé proteolytické reakci. Koagulační faktory jsou většinou serinové proteázy, které štěpí peptidy nebo proteiny zejména v místě navázání argininu v molekule proteinu. Metody využívající chromogenní syntetické substráty používají **chromogenní peptid o 2–4 aminokyselinách**, který má ve snadno štěpitelné koncové oblasti navázanou látku tzv. chromofor, která po odštěpení z vazby peptidu poskytne výrazné zabarvení, měřitelné při určité vlnové délce. Většinou se jedná o p-nitroanilin (p-NA). Aminokyselinová sekvence je totožná nebo podobná s místem účinku (aktivním místem) enzymu na přirozený substrát s chráněným N-koncem:



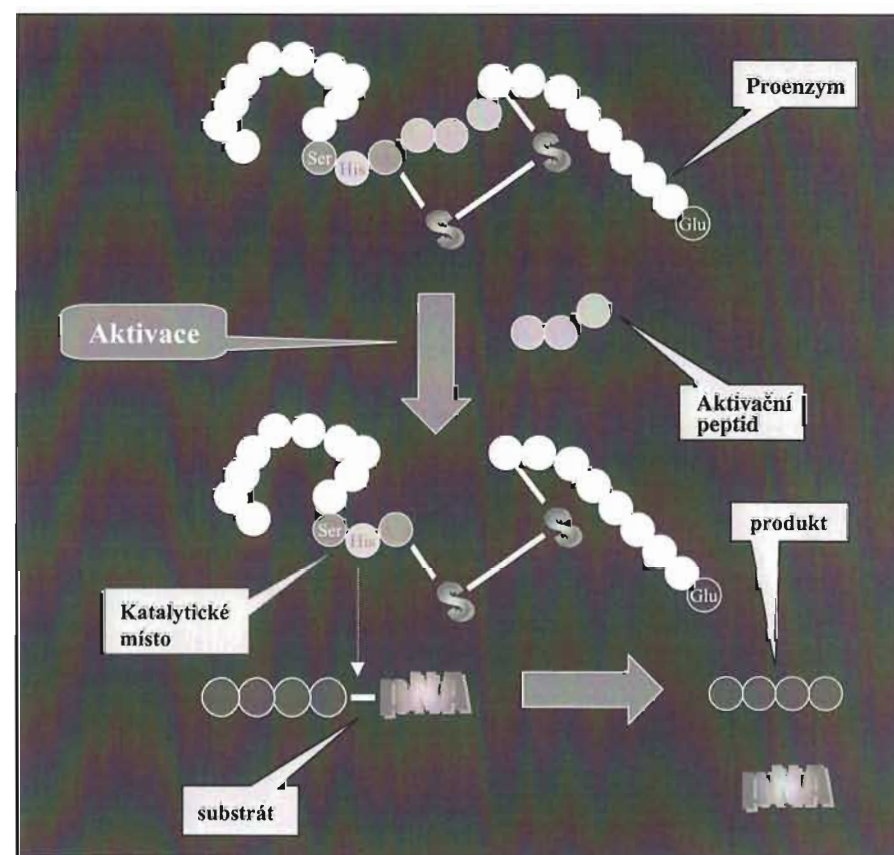
Chromogenní peptid je štěpen na oligopeptid a p-nitroanilin, který je možné stanovit fotometricky na spektrofotometru. Maximum absorpce peptidu s navázaným pNa (380 nm)



Detekce: spektrofometrické stanovení



AKTIVACE ENZYMU A ODŠTĚPENÍ CHROMOFORU



Někdy se místo chromogenních substrátů používají *fluorogenní substráty*. Detekce se provádí na jiném typu zařízení (spektrofluorometry). Nejčastěji použí-

vanou fluorogenní skupinou je 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), který vykazuje maximální fluorescenci při 440 nm. Spektrofluorometrická měření s fluorogenními substráty jsou obecně považována za přesnější než spektrofotometrická měření s chromogenními substráty. Tyto metody se hlavně využívají k měření enzymů s nízkou koagulační aktivitou.

Důležitým údajem je *specifita* nebo-li *selektivita* enzymatického systému, kterou je nezbytné znát zejména tam, kde je stanovení prováděno v plazmě, která mimo cílový enzym obsahuje i řadu dalších proteáz. Při zjištění tohoto údaje se měří reakční rychlost cílového enzymu proti reakčním rychlostem kontaminujících enzymů.

3.1.4. Imunochemické metody

3.1.4.1. ELISA (enzymimunoanalýza)

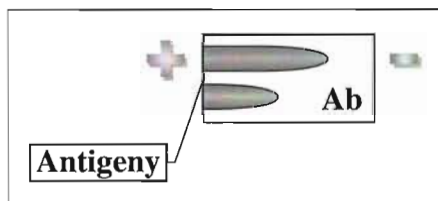
V hemostáze se hlavně využívá sendvičové techniky. ELISA testy detekují antigeny v koncentraci menší než 1 ng/ml. Zjišťuje se pouze množství dané látky, ne její funkčnost.

Princip: ke stanovení antigenu se využívá protilátky značené enzymem (většinou peroxidázou). Při tzv. „sendvičové metodě“ se na pevnou část, kterou reprezentuje stěna mikrotitrační destičky neznámé, či známé (kalibrace) připojí určité množství antigenu. Po promytí systému se z druhé strany naváže protilátka značená enzymem (tzv. konjugát). Po promytí se enzym a nepřímo i antigen prokáží přidáním specifického chromogenního substrátu, který je enzymem štěpen – vzniká barevný produkt. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci antigenu.

Detekce: spektrofotometrické stanovení barevného produktu. Jde o metody, při kterých se využívá reakce antigenu s protilátkou. Vznikající komplex se buď zviditelní vhodným způsobem nebo funguje jako nosič pro navázání substance, kterou se daná látka detekuje.

3.1.4.2. EID (elektroimunodifuze)

Princip: zjišťovaný antigen, se pohybuje ve stejnosměrném elektrickém poli a reaguje s protilátkou přítomnou v gelu za vzniku precipitačního píku (raketky). Délka píku je přímo úměrná koncentraci



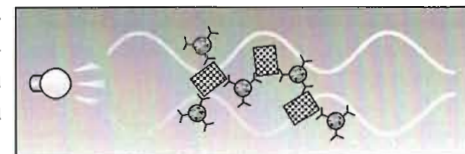
antigenu. Laurellova elektroforéza a Ouchterlonyho elektroimunodifuze jsou používány pro velmi speciální aplikace.

Detekce: elektroforéza

3.1.4.3. LIA (světelná nebo laserová imunoanalýza)

(LIA – Liquid Immuno Assay)

Princip: Na latexové částice se váže polyklonální protilátka a v přítomnosti antigenu dochází k zeslabení průchodu světelného nebo laserového svazku (snížení absorbance).



Antigen

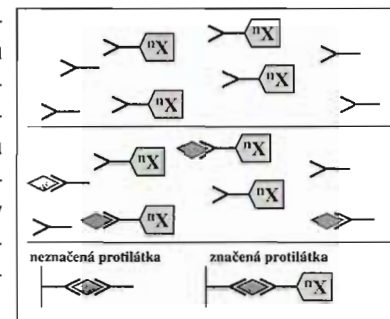


Latexová částice s navázanou protilátkou

Detekce: zeslabení světelného nebo laserového paprsku po průchodu měřicí kyvetou.

3.1.4.4. RIA (radioimunoanalýza)

Princip: RIA metoda je obecně určena k měření koncentrace rozpustných antigenů, haptenu nebo protilátek. U této metody se používá protilátky značené radionuklidem. Dochází k vzájemné soutěživosti (kompetici) mezi značenou a neznačenou protilátkou, která vytváří komplex s určitým antigenem. Z kalibrační křivky zhotovené se známou hodnotou značené protilátky se po odečtení na gama čítači vypočte výsledná hodnota.



Detekce: čítač gama záření.

Latex – aglutinační test

3.1.4.5. Latex – aglutinační testy

Princip: Na latexové částice jsou nespecificky navázány protilátky proti hledané substance (např. protilátka proti fibrinogenu). V pufrovacím prostředí dochází k vyvazování vhodné substance (antigenu) na latexové částice s protilátkou, částice se spojují, nastává jejich shlukování – aglutinace.



Detekce: Aglutinaci hodnotí subjekt, buď vizuálně na tmavé podložce nebo ve zkuševce, případně pod mikroskopem.

3.1.4.6. Hemaglutinační testy

Princip: krvinky (nejčastěji se používá červených krvinek) mají na svém povrchu navázány receptory nebo protilátky proti řadě induktorů. V plazmě přítomný induktor (antigen) se naváže na příslušné receptory nebo protilátky a dochází ke shlukování (aglutinaci) krvinek.

Detekce: Aglutinaci hodnotí subjekt, buď vizuálně na tmavé podložce nebo ve zkumavce, případně pod mikroskopem.

3.1.5. Gelifikační testy

Princip: Snadno polymerující složky (např. monomery fibrinu) v přítomnosti některých látek (protamin sulfát, ethanol) výrazněji polymerují, případně tvoří komplexy.

Detekce: Gel hodnotí subjekt – v plazmě se objevují vločky, či vlákna fibrinu nebo se vytváří viditelný gel.

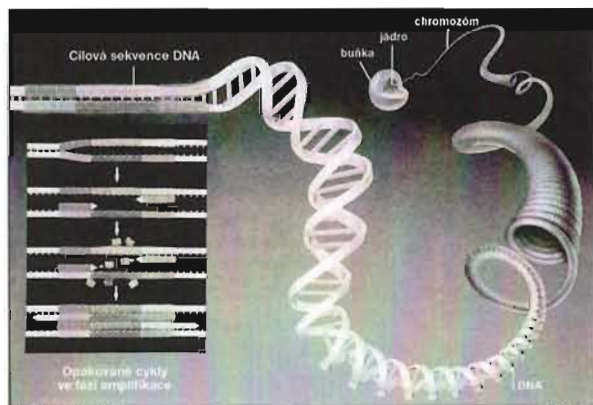
3.1.6. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je využívána zejména ke stanovení receptorů nebo ostatních antigenů na povrchu buněk, dále ke stanovení aktivačních produktů jako jsou destičkové vesikuly. Metody průtokové cytometrie umožňují rozlišit aktivované a neaktivované buňky a využívají se hlavně v hematologii.

Detekce: Speciální stanovení pomocí průtokového cytometru, využívající značených monoklonálních protilátek

3.1.7. PCR (polymerázová řetězová reakce)

PCR je používána k identifikaci mutací některých složek hemostatického procesu, jako jsou: FV Leiden, protrombin 20210, polymorfismy faktorů XII a XIII a další.



3.2. Typy koagulačních stanovení

3.2.1. Manuální

Princip: detekce tvorby prvního fibrinového vlákna v koagulačním médiu pomocí pohybu háčku v temperované vodní lázni

Detekce: měření koagulačního času od okamžiku přidání startovací reagentie až do vytvoření fibrinového vlákna

□ Tento způsob vyšetření se v dnešní době prakticky nepoužívá

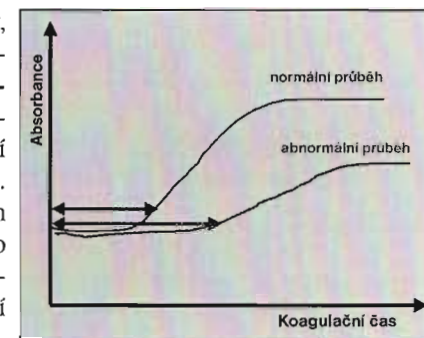
3.2.2. Přístroje (koagulometry)

3.2.2.1. Optické

Princip: monochromatické světelné záření prochází kyvetou, která na fotobuňku propouští nebo odráží jen určité množství záření. Optická hustota dopadajícího záření odráží vlastnosti média v aktuálním stavu koagulačního děje. Využívá se metod:

- Turbidimetrie
- Nefelometrie

Detekce: měří se snížení optické hustoty, buď po vytvoření **fibrinové struktury** (stroměčková struktura), nebo po vytvoření **koagula**. K výpočtu nastavení optimální absorbance a její hodnoty při ukončení měření se používá různých algoritmů. Konečný bod měření (end-point) je počítán ze změny absorbance a odrazu světelného paprsku nebo se využívá jen předdefinované změny absorbance (30 mA nad základní linii optické hustoty), či se vychází z derivace křivky absorbance světelné hustoty.



Normální a abnormální koagulace

Koagulometry využívající derivace detekují velmi časně koagulační změny a poskytují relativně krátké časy srážení. Většina těchto optických metod je závislá na koncentraci fibrinogenu v plazmě, ke které je nutné při měření přihlížet.

□ Optické koagulometry mohou mít problémy se stanovením **hemolytických, lipemických nebo ikterických vzorků**.

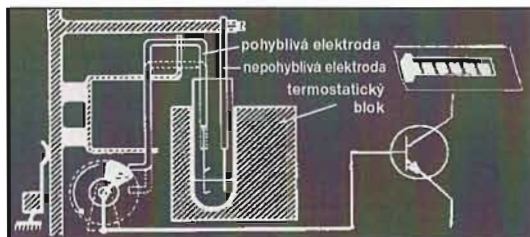
3.2.2.2. Elektromechanické

Elektromechanické přístroje se rozdělují do dvou hlavních skupin:

Háčkové

Princip: do měřicí kyvety jsou vloženy dvě elektrody. Levá je pohyblivá, pravá pevná. Na elektrody je napojen elektrický proud. Jakmile dojde k vytvoření prvního fibrinového vlákna, proběhne elektrický impuls mezi elektrodami a zastaví se ukazatel času.

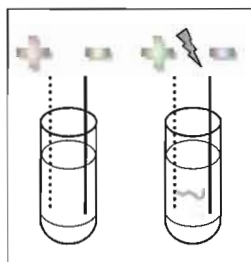
Detekce: proběhnutí elektrického signálu mezi elektrodami.



Koagulometr podle Schnitgera a Grosse – schéma



Koagulometr
Schnitger and Gross

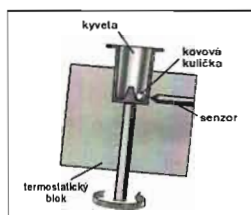


Kuličkové

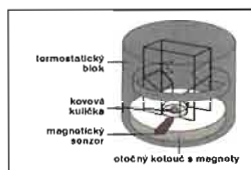
Princip: kovová kulička se pohybuje v magnetickém poli (buď krouží nebo se kýve). Vlivem změny viskozity prostředí, po spuštění koagulačního procesu, dojde ke zpomalení pohybu kuličky a k jejímu vychýlení z dřívějšího směru.

Detekce: změna magnetického pole po vychýlení kuličky. Tato změna je pak převedena na elektrický impuls, který zastaví ukazatel času.

- ❑ Některé typy elektromechanických přístrojů mohou mít určité problémy se stanovením **lipemických vzorků**. Lipemický vzorek může snížit viskozitu koagula.



Systém Amelung



Princip AMAC 200 a 400



Amelung KC 4



COMPACT



AMAC 400

3.3. Testy používané v hemostáze:

- **globální** – popisují celý srážecí proces
- **skupinové** – popisují určitou část koagulačního děje
- **specifické** – stanovuje se jeden z koagulačních činitelů

3.3.1. Globální testy

Doba srážlivosti nativní krve (LEE – WHITE)

Metodu zavedli v roce 1913 Lee a White (Lee a White, 1913). Doba srážlivosti se dnes již neužívá, jde o **obsoletní vyšetření**, které se nahrazuje většinou skupinovými koagulačními testy.

Princip: Určení času srážení nativní žilní krve. Měřil se čas od okamžiku odběru až po srážení krve za standardních podmínek.

Fyziologické hodnoty: skleněná zkumavka (d = 1 cm): 4–9 minut (t = 37 °C)

- ❑ Krev se srazí a přemění na rosolovitou hmotu – **krevní koagulum**. To obsahuje agregáty destiček, nerozpustný fibrin a ostatní krevní buňky (erytrocyty, leukocyty) zachycené ve vláknech fibrinové sítě.
- ❑ V plastových a silikonovaných zkumavkách jsou srážecí časy delší. Pohybují se zhruba na dvojnásobku až trojnásobku časů získaných ve skleněných zkumavkách.

Doba krvácení

(Doba krvácivosti, krvácivost)

Princip: Určení času, při kterém dojde k zástavě krvácení při standardním vpichu – **Duke** (Duke, 1910), řezu: speciální lanceta – **Soulier** (Soulier a spol., 1952) nebo speciální řezné zařízení – **Ivy** (Ivy a spol., 1935). Pro objektivní posouzení se provádí vyšetření na dvou nezávislých místech v následných nebo současných časových intervalech.

Fyziologické hodnoty:

Duke	2–5 minut
Soulier	2–4,5 minuty
Ivy	3–8 minut

- ❑ Doba krvácení je rychlá orientační metoda, která nám poskytne první informaci o funkci krevních destiček. Je důležitá zejména tam, kde se podávají destičkové koncentráty – informuje o přijetí funkčních destiček příjemcem a o průkazu trombopatie.

Test konzumpce (spotřeby) protrombinu

Princip: Stanovuje se množství protrombinu v séru za určitou dobu po vysrážení krve za standardních podmínek. Vyšetření nepřímo ukazuje na aktivitu složek participujících se na vnitřní cestě aktivace přeměny protrombinu na trombin.

Fyziologické hodnoty: nad 30–45 sekund

- ❑ Při srážení normální krve se převážná část protrombinu mění na trombin. Zbytek protrombinu (10–20 %) zůstává v séru. Při poruchách, u kterých vážně tvorba koagulačně aktivního komplexu – protrombinázy, zůstane značná část protrombinu nespotřebována a zůstává v séru (hemofilie a trombocytopenie).
- ❑ Test se dnes již prakticky nepoužívá

Retrakce krevního koagula

Princip: po odběru nativní krve dochází nejprve k tvorbě krevní zátky, později k retrakci (smrštění) krevního koagula, při kterém se projevuje funkčnost kontraktilního systému krevních destiček. Dochází k vypuzení přebytečné tekutiny, jejíž objem se změří.

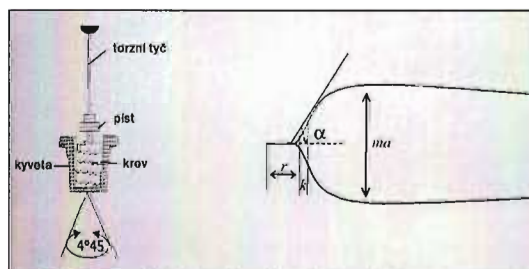
Fyziologické hodnoty: objem vytlačené tekutiny zaujímá 30–50 % objemu odebrané krve.

- ❑ Retrakce se vyšetřuje buď v krvi nebo v plazmě bohaté na krevní destičky – PRP (Platelet Rich Plasma).

Thromboelastografické vyšetření (Thromboelastograf – TEG)

Thromboelastograf byl vyvinut a použit Hartertem již v roce 1948 (Hartert, 1948). V poslední době došlo k renesanci a novému rozvoji této techniky, zejména v aplikaci na počítačové zpracování. Nejnovějším zástupcem těchto přístrojů je rotační thromboelastograf ROTEG.

Princip: ve speciálním přístroji – thromboelastografu dochází ke srážení krve nebo plazmy vyvolané přidáním iontů Ca^{2+} . Pomocí mechanického detekčního systému se měří změna elasticity během formace krevní sraženiny, tvořené mezi pístem a stěnou kyvety. Přístroj má výkyvné zrcadlo, které odráží světelný paprsek vysílaný světelným zdrojem. Zrcadélko je umístěno na pohyblivém pístu uloženém ve válečku. Neprojevuje-li se viskozita



Princip thromboelastografu

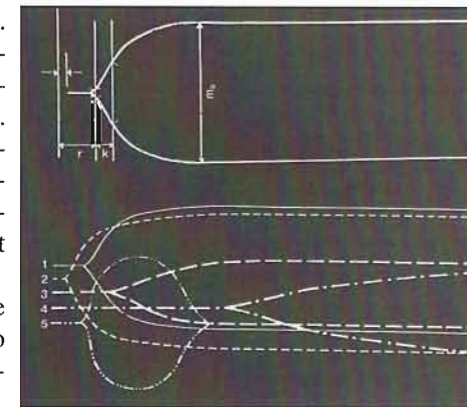
prostředí, kreslí zařízení jednodílnou čáru (paprsek se setkává v jednom místě) zvýšení viskozity má za následek rozdělení paprsků z obou výkyvů a kresbu křivky (Mallett a Cox, 1992).

Parametry TEG křivky

- r – startovací čas (čas, který uběhne od přidání vápníku po první známky formace krevní sraženiny)
- k – kinetika formace trombu
- m_a – maximální amplituda (zjišťuje pevnost a stabilitu krevní sraženiny)

Fyziologické hodnoty: normální křivka. Pomocí thromboelastografu lze proměřovat nesrážlivou krev, destičkami bohatou a na destičky chudou plazmu. Thromboelastograf zachycuje kvalitativní a kvantitativní údaje, které charakterizují tvorbu krevní sraženiny, její fyzikální pevnost a stabilitu a schopnost její retrakce (Spiess a spol., 1987).

Thromboelastograf velmi dobře popisuje stavy a některé defekty koagulačního systému (hypo- a hyperkoagulace, trombocytopenie, výrazná fibrinolýza aj.).



Příklady TEG křivek (1-normální, 2-hyperkoagulační, 3-trombocytopenická, 4-hemofilická, 5-fibrinolytická)

Fibrinolýza plné krve

Princip: po odběru nativní krve dochází nejprve k jejímu srážení později k retrakci krevního koagula. Nakonec dochází k projevům fibrinolytické aktivity a k rozpouštění krevní zátky.

Fyziologické hodnoty: fibrinolýza probíhá za fyziologických podmínek až po více než 4 hodinách. Diagnostický význam má zkrácení času nástupu fibrinolýzy, zejména pod hodnoty 30 minut.

Euglobulinová lýza

Euglobulinová lýza patří mezi globální testy fibrinolytického systému. Ukazuje na lytickou schopnost euglobulinové frakce (Collen, 1999).

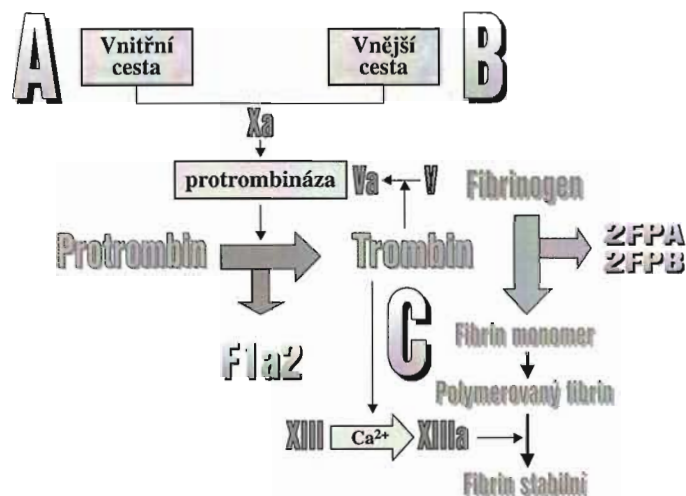
Princip: Speciálním postupem získaná bílkovinná frakce obsahující hlavně plazminogen se sráží ionty Ca^{2+} . Samovolně se aktivuje fibrinolytický proces, generuje se plazmin a dochází k pozvolnému rozpouštění (lýze) bílkovinné frakce.

Detekce: Mírou fibrinolytické aktivity je doba, která uplyne od okamžiku rekalcifikace plazmy do okamžiku, kdy je veškerá bílkovinná frakce rozpuštěna.

Fyziologické hodnoty: více než 180 minut.

3.3.2. Skupinové testy

SCHEMA AKTIVACE PLAZMATICKÝCH KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ



Tromboplastinový test

(Protrombinový test – PT, Quickův test)

Test zavedl v roce Armand Quick (Quick, 1935).

Sledovaný systém: vnější cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin (viz schéma část B). Zachycuje tyto složky koagulačního systému: faktory II, V, VII, X a fibrinogen.

Reakční směs: vyšetřovaná plasma

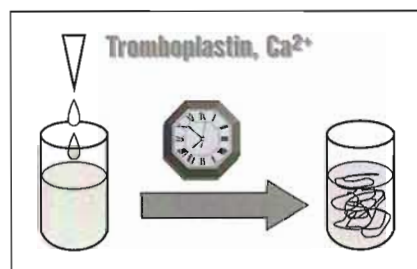
Startovací reagentie: kalciový tromboplastin (kalcium)

Hodnoty kontrolní plasmy: 12–15 sekund

Fyziologické hodnoty: Hodnota kontrolní plasmy $\pm 20 \%$



Armand Quick



Reagentie:

- ❑ **Rekombinantní PT reagentie** – obsahuje: rekombinantní tkáňový faktor, ionty Ca²⁺, fosfolipidy, pufr a stabilizátory.
- ❑ **Tkáňové tromboplastiny** – obsahují: relativně málo čištěný extrakt z tkání bohatý na tkáňový faktor (většinou z králíčího mozku nebo lidské placenty) a ionty Ca²⁺.

- ❑ **Kombinované tromboplastiny** – obsahují: tkáňový tromboplastin (např. z hovězího mozku ředěný ve fibrinogenové frakci (bohaté nebo chudé na F V), obvykle obsahují absorbovanou hovězí plazmu a ionty Ca²⁺. Tyto preparáty se většinou využívají při antikoagulační terapii.
- ❑ **WHO doporučuje používání tromboplastinů, jejichž ISI se blíží 1.** Tyto tromboplastiny mají většinou stejné charakteristiky, i když se nestanovuje INR.
- ❑ **Mnoho reagentů ke stanovení tromboplastinového času obsahuje činidlo neutralizující heparin – polybren (kvarterní polymerovaný amin).** Výsledek PT není pak odvislý na koncentraci heparinu.

Abnormální hodnoty PT se nachází:

- U vrozených nebo získaných nedostatečností faktorů II, V, VII, X a fibrinogenu
- Při orální antikoagulační léčbě
- Při nedostatku vitamínu K
- U jaterních nemocí (z poklesu faktorů protrombinového komplexu)
- Jsou-li přítomny autoprotilátky proti faktorům a lupus antikoagulans

APTT

(APTT – Aktivovaný parciální tromboplastinový test)

APTT zavedl do klinické praxe Proctor a Rapaport (Proctor a Rapaport, 1961).

Sledovaný systém: vnitřní cesta aktivace přeměny protrombinu na trombin (viz schéma část A). Zachycuje tyto složky koagulačního systému: faktory II, V, VIII, IX, X, XI, XII, fibrinogen, prekalkrein a HMWK.

Reakční směs: vyšetřovaná plasma, fosfolipid, aktivátor

Startovací reagentie: chlorid vápenatý

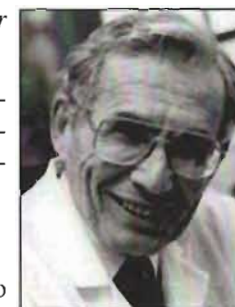
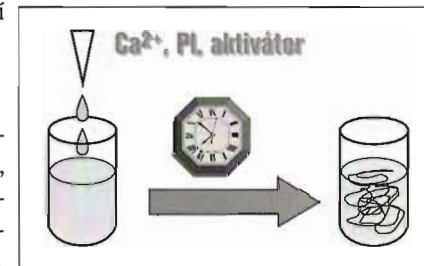
Hodnoty kontrolní plasmy: 28–42 sekund podle použitého systému (povrchový aktivátor + fosfolipid) např.:

- kefalín + kaolín: 36–42 sekund
- kefalín + silica: 30–36 sekund
- platelin: 28–34 sekund

Fyziologické hodnoty: Hodnota kontrolní plasmy $\pm 10 \%$

Reagentie:

- **Kontaktní aktivátory** – zahrnují: negativně nabitě povrchy, jako jsou kaolín, křemičitany, elagová kyselina, polyfenoly nebo sulfatidy (negativně nabitě sulfátované lipidy) kombinované s kaolínem.



Rapaport

- **Fosfolipidy** – zahrnují: syntetické fosfolipidy, fosfolipidy izolované ze zvířecích tkání (např. králičí mozek) nebo fosfolipidy z rostlin (např. soja). Obvykle se používají směsi různých fosfolipidů, které mají optimální složení a zastoupení hlavně fosfatidylserinu. Typ a koncentrace fosfolipidů je pro provedení testu důležitější, než negativně nabitě povrchy. Reagenční profil však určuje spíše kombinace obou složek společně s iontovou silou pufovacího systému a stabilizátory.
- Ca^{2+} – důležitou úlohu může hrát i molarita roztoku chloridu vápenatého.

Komerčně jsou vyráběny reagentie se zvýšenou citlivostí k:

- **Faktorům**
- **Lupus antikogulans (LA)**
- **Heparinu**

Odlišení mezi nedostatečností faktorů a inhibitory nebo LA

Je-li zvýšená hodnota APTT testu provede se směsný test s normální plasmou (1:1). Dojde-li k normalizaci času jedná se nejspíše o nedostatečnost některého z faktorů (snížená koncentrace nebo změna v molekule faktoru). Je-li čas APTT i po směsném testu abnormální může jít o přítomnost inhibitorů proti některému z faktorů vnitřní cesty aktivace přeměny protrombinu na trombin nebo o přítomnost protilátek typu lupus antikoagulans.

Abnormální hodnoty APTT:

- ☐ **Zkrácené časy:**
 - trombotické stavy
- ☐ **Prodloužené časy:**
 - vrozené nebo získané nedostatečnosti F VIII (mohou být i při deficienci vWF)
 - nedostatečnost faktorů IX, XI, případně i dalších, vyjma faktory VII a XIII
 - terapie nefrakcionovaným heparinem, hirudinem a aprotininem
 - dysfibrinogenemie nebo afibrinogenemie
- ☐ Čas APTT může být mírně prodloužen i v případech, kdy je nemocný léčen kumarinovými preparáty či nízkomolekulárními hepariny.
- ☐ APTT může být také využit ke sledování dysfunkce systému proteinu C. Používá se zde hadího jedu PROTAC, který je aktivátorem proteinu C. V testu se využívá dvou systémů bez a s přidáním PROTACu. Dostáváme tak dva rozdílné systémy a zjišťujeme poměr obou časů. Je-li systém proteinu C funkční, dostáváme výrazné prodloužení času APTT v případě, že je použit PROTAC. Citlivost tohoto uspořádání je velmi vysoká je-li přítomen Faktor V Leiden nebo při dysfunkci proteinu C (Bertina, 1999). Pro změny v molekule proteinu S a ostatní trombofilní mutace je citlivost snížena.

Trombinový test (TT)

(Trombin Cloting Time – TCT)

Trombinový test použil v r. 1957 Jim (Jim, 1957).

Trombinový test je jednoduchý screeningový test ke stanovení polymerace fibrinu. Slouží i jako kvalitativní test ke stanovení heparinu v plazmě. Test detekuje koncentraci fibrinogenu v plazmě a poruchu jeho molekuly, případně i přítomnost antitrombinu.

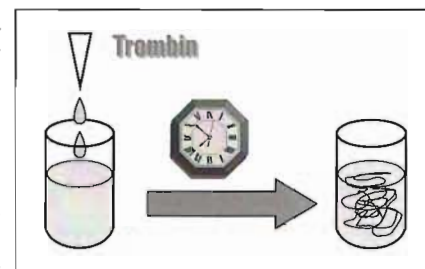
Sledovaný systém: přeměna fibrinogenu na fibrin a následná tvorba fibrinové zátky (viz schéma část C)

Reakční směs: vyšetřovaná plazma

Startovací reagentie: roztok trombinu

Hodnoty kontrolní plasmy: 14–16 sekund (hodnota je odvislá od koncentrace trombinu)

Fyziologické hodnoty: Hodnota kontrolní plasmy $\pm 20\%$



Abnormální hodnoty TT:

- ☐ **Prodloužené časy:**
 - V přítomnosti **heparinu**, dojde k rychlé neutralizaci přidaného trombinu antitrombinem a výrazně se prodlouží koagulační čas. Vliv heparinu je možné vyvážit protaminem sulfátem nebo roztokem toluidinové modři či polybrenem.
 - Prodloužené časy se také nachází v přítomnosti relativně **vysokých koncentrací degradačních produktů fibrinogenu/fibrinu** sledovaných při trombolytické léčbě, u DIC nebo u jaterních nemocí, případně u dysfibrinogenemie.
 - **Paraproteiny** na př. u nemocných s myelomem mohou také interferovat s tvorbou fibrinu a vést k prodloužení času TT.
- ☐ **Orální antikoagulancia** nemají vliv na hodnoty TT.
- ☐ Trombinový test **není vhodný k monitorování hladiny heparinu** při léčbě nefrakcionovaným heparinem a to pro jeho malou specifčnost, závislost testu na systému přeměny fibrinogenu na fibrin a pro velkou citlivost testu k heparinu (nepatrná koncentrace nefrakcionovaného heparinu vyvolá velké prodloužení času TT).

Reptilázový test

(Reptilase time, Batroxobin time)

Reptilázový test do klinické praxe zavedl Funk v roce 1971 (Funk a spol., 1971).

Batroxobin neboli reptiláza je trombinu podobná proteáza získaná z hadího jedu, která je schopna přeměnit fibrinogen na fibrin. Na rozdíl od trombinu reptiláza odštěpuje z molekuly fibrinogenu jen fibrinopeptid A a nemá aktivitu k dalším trombinovým substrátům, jako jsou faktory V a VIII. Reptiláza není ovlivněna antitrombinem, nefrakcionovaným heparinem a LMWH. Proto tento test může být prováděn i v přítomnosti těchto látek.

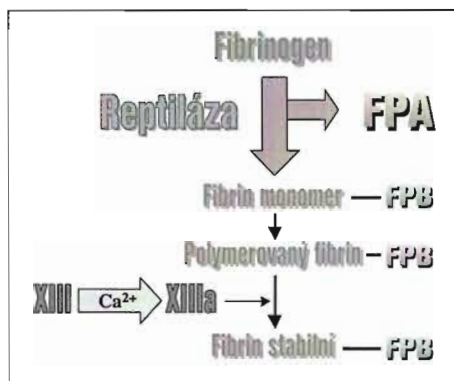
Sledovaný systém: přeměna fibrinogenu na fibrin. Výsledkem polymerace je des-A-fibrinová formace fibrinového vlákna.

Reakční směs: vyšetřovaná plazma

Startovací reagentie: roztok jedu hada Bothrops atrox (reptiláza)

Hodnoty kontrolní plazmy: 16–20 sek.

Fyziologické hodnoty: Hodnota kontrolní plazmy $\pm 20\%$. Výsledek testu není ovlivněn léčbou heparinem.



Abnormální hodnoty reptilázového testu:

❑ **Prodloužené časy:**

- U **afibrinogenémie** a v přítomnosti těžkých nedostatečností fibrinogenu
- Při **hyperfibrinolýze** (zvýšené hladiny FDP)

Aktivovaný koagulační čas

(Activated Cloting Time – ACT)

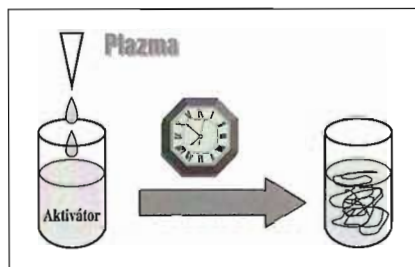
Metoda byla zavedena Hattersleyem v r. 1966 (Hattersley, 1966)

Aktivovaný koagulační čas je metoda podobná svým principem APTT. V testu se využívá kontaktních látek, jako jsou silica, celite nebo kaolin, ale bez přidání fosfolipidů a iontů Ca^{2+} . Kontaktní aktivátory jsou umístěny ve speciálních „cartriges“, které se používají k měření hodnot testu ve zvlášť k tomuto účelu uzpůsobených přístrojích. Po přidání vzorku do „cartriges“ se iniciuje srážecí proces a tvorba fibrinu je měřena elektromechanickými nebo optickými přístroji.

Sledovaný systém: přeměna fibrinogenu na fibrin

Reakční směs: vyšetřovaná plazma + aktivátor

Startovací reagentie: plazma



ACT je výrazně ovlivněn **nefrakcionovaným heparinem** (prodloužený čas je úměrný koncentraci heparinu). Test dále **ovlivňují tyto faktory:** nevyváženost koagulačních faktorů a inhibitorů, lýza destiček, zvýšená hemodiluce, hypotermie nemocných a jiné.

Test je závislý hlavně na kontaktní fázi a získané časy mohou mít značný rozptyl. Výhody tohoto testu jsou v jeho jednoduchém provedení a v použití přímo na klinickém pracovišti. ACT je využitelný jen pro nefrakcionovaný heparin. Citlivost k LMWH a hirudin je velmi nízká a proto test nelze použít ke sledování hladiny těchto substancí.

3.3.3. Specifické

Většina látek, které hrají podstatnou úlohu v diagnostice hemostatických procesů se vyšetřuje některou z uvedených metod. Sledují se většinou:

- ❑ **funkční charakteristiky dané látky:** koagulačními metodami a spektrofotometrickými metodami využívajícími chromogenních substrátů.
- ❑ **množství látky** (stanovení klotabilní bílkoviny nebo přítomnosti antigenu) – kvantitativní stanovení: ELISA, LIA

3.3.3.1. Metody ke stanovení fibrinogenu

Fibrinogen se chová v rámci koagulačního a fibrinolytického systému jako substrát. Metody, které se zaměřují na stanovení fibrinogenu sledují buď **schopnost jeho přeměny na fibrin** nebo sledují pouze **jeho množství** (přítomnost molekuly fibrinogenu).

- **Metoda podle Clause.** Fibrinogen se v této metodě stanovuje jako množství „klotabilní bílkoviny“. Jde o koagulační stanovení ředěné plazmy v nadbytku trombinu. Stanovení ovlivňují jak faktory, které působí na aktivní místo trombinu, tak i faktory mající vliv na polymerizaci fibrinu. Při použití vysokých koncentrací trombinu a při nízké koncentraci fibrinogenu (zhruba 10krát méně, než je fyziologická koncentrace fibrinogenu v plazmě) je gelační čas úměrný koncentraci fibrinogenu a nezávislý na množství trombinu.
- **Kinetické měření.** Některé optické koagulometry, využívající nefelometrickou nebo turbidimetrickou „end-point“ detekci odvozují koncentraci fibrinogenu v plazmě z **kinetického měření účinnosti protrombinového komplexu**. Celkové zvýšení turbidity systému je u těchto metod přímo úměrné koncentraci fibrinogenu jako klotabilní bílkoviny. Metoda velmi dobře koreluje s Clausovou metodou.
- **Kinetická turbidimetrie.** Metoda **kinetické turbidimetrie** využívá hadího jedu (Batroxobin – reptiláza). Batroxobin a jemu podobné zmijí enzymy nejsou inhibovány antitrombinem, neaktivují destičky a některé faktory (např. V, VIII, XI,

XIII). Metoda má vhodný měřicí rozsah, velmi dobrou přesnost a může být snadno prováděna v automatických měřicích systémech.

- **Imunochemické metody.** *Imunochemické metody* nejsou schopny odlišit mezi funkčním fibrinogenem a inaktivní nebo pozměněnou formou fibrinogenové molekuly. Tyto metody poskytují většinou vyšší hodnoty, než funkční testy. **ELISA testy** ke stanovení fibrinogenu nenalezly v rutinní praxi významné uplatnění.

Fyziologické hodnoty: 2–4 g/l. Hodnoty se mírně zvyšují s přibývajícím věkem.

Klinické použití: fyziologicky se zvýšené hladiny fibrinogenu nachází v průběhu těhotenství. Zvýšené hodnoty bývají u kuřáků, značně vyšší hodnoty (> 10 g/l) jsou u těžkých zánětů a trombóz. U některých arteriálních nemocí (např. IM) koresponduje zvýšená hladina fibrinogenu se zvýšenou viskozitou plazmy.

Některé léky, náhle přerušení kouření a fyzická aktivita mohou snížit hladinu fibrinogenu v plazmě. Pokud koncentrace fibrinogenu < než 0,5 g/l dochází většinou ke krvácivým projevům. Také *dysfibrinogenémie*, která je dnes poměrně častá se může manifestovat krvácivými projevy.

- ❑ Heparin podstatně neovlivňuje výsledek testu
- ❑ FDP většinou interferují s testem a mohou vést k falešně nízkým hodnotám fibrinogenu.

3.3.3.2. Funkční aktivita složek koagulačního a fibrinolytického systému

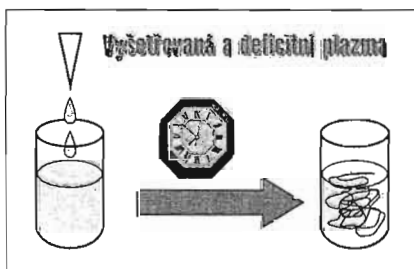
Ke stanovení funkční aktivity složek koagulačního a fibrinolytického systému byla vyvinuta celá řada metod, které využívají chromogenních substrátů, ale nejčastěji se využívá jednofázové koagulační metody na principu APTT nebo PT. Tyto metody lépe obráží funkčnost celého koagulačního systému (Tripodi a Manucci, 1996).

Jednofázové koagulační metody

Využívají se zejména ke stanovení aktivity faktorů plazmatického koagulačního systému.

Sledovaný systém: zjištění hladiny jednotlivého faktoru ve vnitřní nebo vnější cestě aktivace přeměny protrombinu na trombin v modifikaci PT nebo APTT testu. Těmito cestami se zjišťují:

- ◆ Faktory vnější cesty aktivace plazmatického systému – F II, V, VII, X
- ◆ Faktory vnitřní cesty aktivace plazmatického systému – F VIII, IX, XI, XII, prekalkrein a HMWK



Reakční směs: vyšetřovaná plazma ředěná deficitní plazmou (pro testovaný faktor) většinou v poměru 1:10.

Startovací reagentie: podle použitého systému (většinou ionty Ca^{2+}).

Hodnoty kontrolní plazmy: odlišné pro různé faktory

Fyziologické hodnoty: odlišné pro různé faktory

Deficitní plazma: neobsahuje vyšetřovaný faktor (faktor není zjistitelný použitou metodou) – ostatní faktory v této plazmě jsou v přebytku.

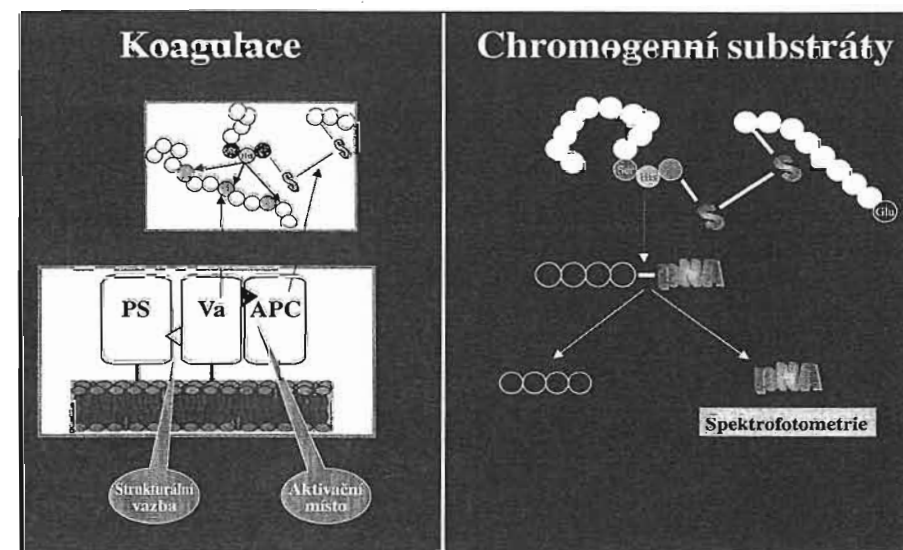
Metody s chromogenními substráty

Metody využívající chromogenní substráty se používají hlavně ke **zjištění funkčnosti serinových proteáz**. Tyto metody mají některé přednosti, ale i nedostatky v porovnání s koagulačními metodami:

Přednosti: poměrně snadné, jednoduché a přesné stanovení. Ke stanovení je možné použít větší ředění vzorku, které eliminuje některé problémy, zejména interferenci některých látek při koagulačních stanoveních (Lupus antikoagulans, FDP, nespecifický heparin).

Nevýhody: zjišťuje se schopnost katalytického místa serinové proteázy proteolyticky štěpit předem definovaný substrát na produkt. Štěpení probíhá v místě navázaného argininu na koncový chromofor. Metoda neřeší problematiku strukturálního uspořádání koagulačně aktivních komplexů. Z těchto důvodů se mohou v některých případech získat odlišné hodnoty od výsledků získaných koagulačními metodami (např. vyšší hodnoty v případě stanovení PIVKA faktorů)

KOAGULAČNÍ METODA A METODA CHROMOGENNÍCH SUBSTRÁTŮ



Ke stanovení se používají metody:

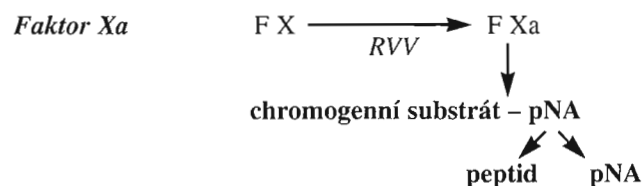
- **Přímé detekce**
- **Nepřímé detekce**

Využívá se většinou dvou až třístupňové metody.

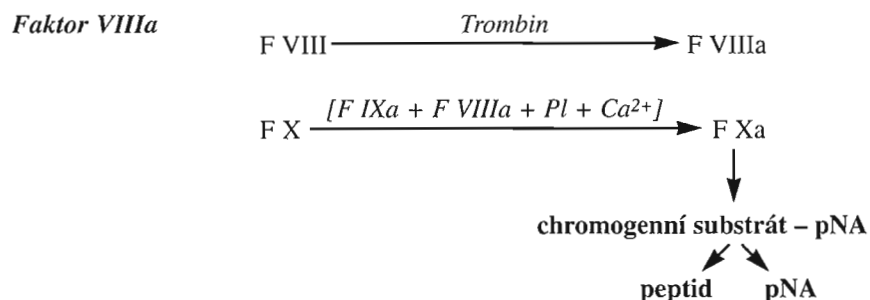
Metody přímé detekce

Složka, která se stanovuje se aktivuje a aktivovaná forma přímo štěpí příslušný chromogenní substrát na produkt a chromofor

■ Jednostupňová metoda

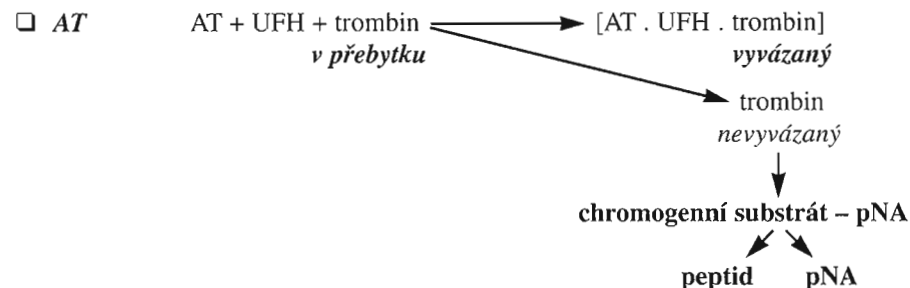


■ Dvoustupňová metoda



Metody nepřímé detekce

Složka, která se stanovuje se váže do komplexu s jinou aktivní složkou. Nevyvázaná část aktivní složky štěpí substrát na produkt.



3.3.3.3. Odlišení nedostatku faktorů od přítomnosti inhibitorů

Nedostatek faktorů může být způsoben vrozeným nebo získaným nedostatkem. Přítomnost inhibitorů (autoprotilátek) je jedním z případů získaného nedostatku. K odlišení, zda jde o přítomnost inhibitorů nebo nedostatku faktorů lze využít třech ředění vyšetřované plazmy s normální plazmou. Optimalizace testu se dosáhne inkubací plazem při 37 °C. U vzorku s nedostatkem faktorů se bude hodnota postupně se vzrůstajícím zastoupením normální plazmy, blížit hodnotě normální plazmy, kdežto v přítomnosti inhibitoru se hodnota nebude výrazněji měnit.

Stanovení titru inhibitoru

Titru inhibitorů se dá určit speciálními koagulačními testy jako jsou „Bethesda“, „Nijmegen“ nebo „Oxford“ metody. V tomto testu je normální plazma (nebo koncentrát plazmy) inkubován s různými ředěními vzorku nebo normální kontroly. Inhibitory inaktivují vyšetřovaný faktor v normální plazmě (nebo koncentrátu). Po 2 hodinové inkubaci při 37 °C se vypočte titr inhibitoru. Titr o hodnotě 1,0 je definován jako 50 % inhibice cílového faktoru v normální plazmě. Existují 2 typy inhibitorů:

- ◆ **inhibitor I typu** – vykazuje lineární inhibiční kinetiku
- ◆ **inhibitor II typu** – nelineární typ inhibiční kinetiky

Literatura

Bertina, R.: Molecular risk factors for thrombosis. Thromb. Haemost. 82, 1999, s. 601–609.

Collen, D.: The plasminogen (fibrinolysis system). Thromb. Haemost. 82, 1999, s. 259–270.

Duke, W. W.: The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. JAMA 55, 1910, s. 1185–1192.

Funk, C., Cmir, J., Herold, R., Straub, P. W.: Reptilase-R – a new reagent in blood coagulation. Br. J. Haematol. 21, 1971, č. 1, s. 43–52.

Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie einem neuen Untersuchungsverfahren. Klin. Wochenschr. 26, 1948, s. 577–583.

Hattersley, P. S.: Activated coagulation time of whole blood. JAMA 196, 1966, s. 436–440.

Ivy, A. C., Shapiro, P. F., Melnick, P.: The bleeding tendency in jaundice. Surg. Gynecol. Obstet. 60, 1935, s. 781–784.

Jim, R. T. S.: A study of plasma thrombin time. J. Lab. Clin. Med. 50, 1957, č. 1, s. 45–60.

Kolde, H. J.: Haemostasis – Physiology, Pathology, Diagnostics. Basel 2001, Pentapharm Ltd., s. 138

Lee, R. I., White, P. D.: A clinical study of the coagulation time of blood. Am. J. Med. Sci. 145, 1913, s. 495–503.

Mallett, S. V., Cox, D. J. A.: Thrombelastography. Br. J. Anesthesia 69, 1992, s. 307–313.

Proctor, R. R., Rapaport, S. I.: The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for the first stage plasma clotting factor deficiencies. Am. J. Path. 36, 1961, s. 212–219.

Quick, A. J.: On the relationship between complement and prothrombin in obstructive jaundice. J. Biol. Chem. 109, 1935, s. 73–74.

Soulier, J. P., Petit, P., Le Bolloch, A. G.: Syndromes hémorragiques mortels avec incoagulabilité totale par défibrination et avec fibrinolyse. II. A la suite d'un avortement par injection intro-utérine d'eau de Javel: problème des défibrinations en obstétrique et en gynécologie. Rev. hematol. 7, 1952, č. 1, s. 48–54.

Spiess, B. D. et al.: Thrombelastography as an indicator of post-cardiopulmonary bypass coagulopathies. 3, 1987, s. 25–30.

Tripodi, A. a Manucci, M.: Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. Clin. Chem. 42, 1996, s. 684–689.

4. PATOFYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

Hemostáza představuje jeden z mechanismů, které udržují integritu vnitřního prostředí. Za fyziologických poměrů hemostáza zajišťuje fluiditu krve v intaktním cévním řečišti a v případě poruchy kontinuity cévní stěny vede krevním srážením k zástavě krvácení. Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických činitelů zahrnujících systém koagulační, fibrinolytický a jejich aktivátory a inhibitory. Narušení hemostatické rovnováhy se může projevit jako:

- **krvácivý stav**
- **trombotický nebo trombofilní stav**

4.1. Krvácivé stavy

Krvácivé stavy jsou charakterizovány spontánními krvácivými projevy nebo krvácením, které je neúměrné stavům nebo podnětům, jež je vyvolaly. Krvácivé stavy vznikají narušením hemostatické rovnováhy v důsledku poruchy některého z hemostatických mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří:

- ◆ funkce krevních destiček
- ◆ funkce cévní stěny
- ◆ plazmatický koagulační systém
- ◆ fibrinolytický systém

Případně může jít o narušení dvou, tří nebo všech čtyř složek.

4.1.1. Krvácivé stavy z cévních příčin (purpury)

Normální **funkce cévní stěny** v hemostáze je výsledkem jednak neporušené struktury cévní stěny a jednak její metabolické aktivity, při které se tvoří řada hemostaticky aktivních látek. Povrch souvislé endoteliální výstelky je za fyziologických podmínek inertní ke krevním hemostatickým činitelům.

Selhání některých funkcí cévní složky může být příčinou krvácivých projevů. Zánětlivé a alergické změny drobných cév bývají příčinou zvýšené propustnosti cévní stěny. Dochází k pronikání krve do okolní tkáně. Většinou se jedná o stavy, které postihují celý organismus, často s orgánovou akcentací. Na kůži, případně na sliznicích jsou viditelné jasně červené drobné krevní výrony (petechie) s možnou alergickou reakcí okolní kůže nebo plošným podkožním krvácením (ekochymóza).

Purpury

Jde o skupinu krvácivých stavů, u kterých je patogenetickým mechanismem porucha interakce cévní stěny a krevních destiček. Projevují se nejčastěji kožním či slizničním krvácením a jejich závažnost je dána vyvolávající příčinou či lokalizací krvácení. Rozlišujeme poruchy cévní stěny:

- **vrozené** – vrozené purpury
- **získané** – získané purpury

4.1.1.1. Vrozené purpury

RANDUAVA-OSLEROVA-WEBEROVA PURPURA

Hereditární hemoragická teleangiektazie je autosomálně dominantní dědičné onemocnění, které je charakterizováno přítomností *teleangiektázií, tj. dysplázií pojivové složky stěn drobných cév*. U postižených se nachází cévní rozšířeniny a výdutě s významným ztenčením cévní stěny. Cévy v místě výdutě nejsou schopny vazokonstrikce a tím se ztěžuje tvorba destičkové zátky. V zeslabených místech cévy snadno praskají a dochází k obtížně zastavitelnému krvácení. *Krvácivé projevy vyplývají ze snížené odolnosti stěny cévní* a jsou četnější se stoupajícím věkem. Patogeneze lézí není známa. Byla popsána souvislost s haplotypem HLA A2Bw17.



Cévy u Randuovy-Oslerovy choroby

Onemocnění postihuje všechny rasy a obvykle se vyskytuje na rtech, buklí sliznici, kůži kolem úst a nosu. Může představovat pouze kosmetický defekt. Léze mají vzhled tmavě červených až fialových podélných či oválných skvrnek velikosti 0,5–3 mm. Polovina nemocných má známky krvácení do gastrointestinálního traktu a šestina má mikroskopickou hematurii. Asi u 15 % nemocných se tvoří plicní arteriovenózní spojky, které vedou k hypoxémii, pravolevému zkratu a často k embolizacím do mozku. Nemocní s plicní lokalizací teleangiektázií mají sekundární polyglobulii a paličkovité prsty. Jaterní lokalizace onemocnění vede k městnavé srdeční dekompenzaci a fibróze jater.

Průběh onemocnění: Po pubertě se objevují drobné, jasné červené uzlíčky na rtech, bradě, čele, tvářích, nose, na nosní sliznici a sliznici dutiny ústní, na bříškách prstů i jinde na těle. Bývají velikosti špendlíkové hlavičky (někdy více, jindy méně vyznačené). Uzlíčky jsou vlastně malé výdutě drobných cév (tepének, žilek a vlásečnic) vyvolané změnami cévní stěny.

Laboratorní nález: Vyšetření hemostázy – normální nález.

Léčba: Léčba je převážně podpůrná, kauzální léčba chybí. Prognóza je určena lokalizací léze, četností krvácení a je většinou dobrá. Opakovaná krvácení mohou vést k sideropenické anémii.

EHLERSŮV-DANLOSŮV SYNDROM

Ehlersův-Danlosův syndrom je vzácná vrozená příčina krvácení cévního původu, provázená změnami kůže a jizvením. Příčinou krvácení je abnormální struktura kolagenu stěny cévní a onemocnění je provázeno i destičkovými a koagulačními abnormalitami.

4.1.1.2. Získané purpury

HENOCHOVA-SCHÖNLEINOVA PURPURA

(Anafylaktoidní purpura, peliosis rheumatica)

Henochova-Schönleinova purpura je imunokomplexové onemocnění se zvýšenou permeabilitou kapilár a orgánovými projevy. Vyskytuje se nejčastěji v dětském věku a v dospívání. Výskyt v dospělosti však není výjimkou.

Postižení stěny cévní vzniká na podkladě vaskulitidy drobných cév a kapilár. Antigenní podněty vyvolávající vaskulitidu jsou nejčastěji infekční (β hemolytický streptokok, viry). Onemocnění má významný nefrologický nález s postižením glomerulárních cév.

Onemocnění začíná zpravidla 1–3 týdny po prodělané infekci hlavně horních dýchacích cest, ale může být i projevem alergie na léky či potraviny. Onemocnění se projevuje těmito příznaky:

- tvorbou petechií na končetinách (na extenzorové straně dolní končetiny a femorové straně horní končetiny)
- kolikovými bolestmi břicha, někdy krvácením do GIT
- bolestmi a otoky kloubů
- kompletním močovým syndromem s hematurií, proteinurií a válcí

Laboratorní nález: Test fragility kapilár je pozitivní

Léčba: Je kauzální – odstranění infekce, léku či alergenu

SKORBUT

Skorbut je získaná purpura vyvolaná zvýšenou lomivostí kapilár při dlouhodobém nedostatku či chybění vitamínu C v potravě. Vitamin C je kofaktor hydroxylace prolinu a lysinu s vlivem zhruba na jednu čtvrtinu aminokyselin ve struktuře kolagenu.

Onemocnění vede ke kožnímu a slizničnímu krvácení z dásní. Defekt kolagenu vede k zastavení růstu vlasů. Onemocnění se může vyskytnout u osob se zvláštními dietními pravidly, u starých a zanedbaných osob, alkoholiků, u osob v malnutrici a lidí vystavených extrémním podmínkám bez přísunu vitamínu C.

Laboratorní nález: Test fragility kapilár je pozitivní

Léčba: Podání vitamínu C má zpravidla okamžitý efekt, nutná je většinou i nutriční podpora.

STEROIDNÍ PURPURA

Kortikosteroidy mají vliv na syntézu kolagenu, tím že inhibují tvorbu mRNA (messenger RNA). Změny kolagenu se projevují i zvýšenou krvácivou tendencí zejména při postižení kolagenu stěny cévní a můžeme je vidět u Cushingova syndromu či po terapii kortikoidy.

Purpura simplex a purpura senilis patří mezi krvácivé stavy z cévních příčin, jsou klinicky nezávažné a vyskytují se především na končetinách u starých osob nebo jako následek nadměrného slunění či po terapii kortikoidy.

4.1.2. Krvácivé stavy z poruchy krevních destiček

Úloha krevních destiček v hemostáze je mnohostranná. Jsou nezbytné pro normální funkci cévní stěny, uplatňují se v procesu plazmatické koagulace a mají klíčovou úlohu v primární hemostáze. Funkce trombocytů je podmíněna některými strukturálně funkčními zvláštnostmi.

Nemoci krevních destiček mohou být vyvolány změnou počtu nebo funkce krevních destiček:

- ☐ snížení počtu – **trombocytopenie**
- ☐ zvýšení počtu – **trombocytóza, trombocytemie**
- ☐ funkční nedostatečnost – **trombocytopatie**

Jednotlivé stavy nelze přesně oddělit, může docházet k současným změnám jak počtu, tak i funkce krevních destiček.

V obou případech je tvorba primární hemostatické zátky narušena a koagulační odpověď je nedostatečná.

U trombocytopenií a trombocytopatií se vyskytují **krvácivé projevy**. Krvácení může být z různých orgánů:

- z **nosu** – *epistaxis*
- z **žaludku** – *hematemesis* (zvracení krve)
- z **střev** – z horní části GIT: *melena* (stolice černě zbarvená natrávenou krví)
– z dolní části GIT: *enteroragie* (přítomnost nenatrávené krve ve stolici)
- z **dělohy** – *metroragie*
- z **dásní**
- **kožní** – *petechie, ekchymózy, sufuze*

4.1.2.1. Trombocytopenie

O **trombocytopenii** mluvíme tehdy, je-li snížen počet trombocytů v určitém objemu krve většinou pod hodnotu $100 \cdot 10^9/l$. Rozlišují se trombocytopenie:

- **Vrozené (primární)** – pokles krevních destiček může být samostatnou primární chorobou z nejrůznějších příčin.
- **Získané (sekundární)** – vyskytují se jako druhotný projev různých patologických stavů.

Primární trombocytopenie mohou vznikat ze tří hlavních příčin:

- z **předčasného zániku trombocytů** – periferní (tvorba destiček ve dření je normální)

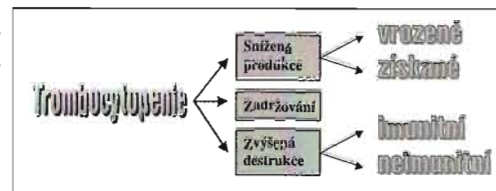
- ◆ vyšetření kostní dřeně: počet megakaryocytů normální nebo zvýšený
- ◆ přezívání destiček v obvodové krvi se zkracuje z těchto příčin:
 - zvýšená spotřeba destiček (koagulace)
 - rychlejší odbourávání destiček (obvodová krev, tkáň)

- z **nedostatečné produkce trombocytů** – centrální (snížení tvorby megakaryocytů v kostní dření a následné snížení destiček v cirkulaci)

- ◆ vyšetření kostní dřeně: počet megakaryocytů snížený

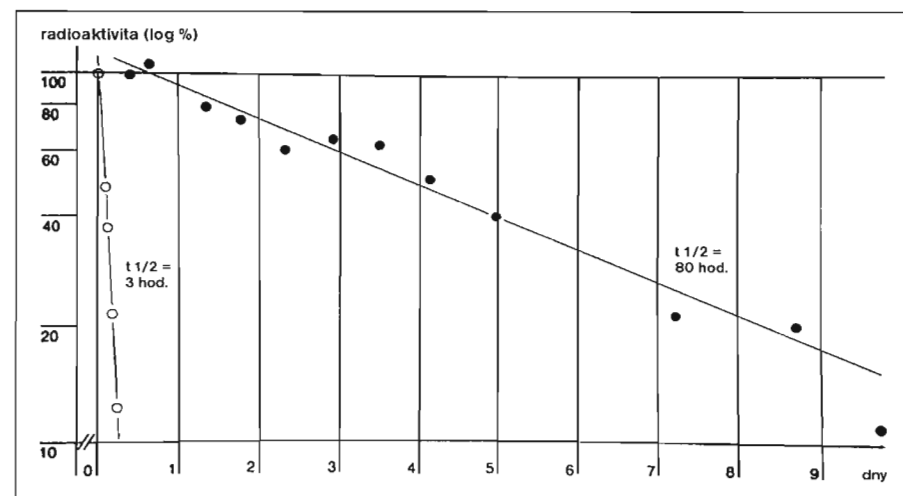
- ze **zadržování (sekvestrace) destiček**

- ◆ zvýšené hromadění destiček ve slezině (zvětšená slezina)



PŘEZÍVÁNÍ KREVŇÍCH DESTIČEK

(černá – normální stav), červená (těžká trombocytopenie)



Podle počtu destiček v obvodové krvi rozlišujeme trombocytopenii:

- **lehkou:** $90-130 \cdot 10^9/l$
- **středně těžkou:** $50-90 \cdot 10^9/l$
- **těžkou:** $< 50 \cdot 10^9/l$

Za normálních okolností krevní destičky kromě účasti v koagulačním procesu zajišťují i nepropustnost cévní stěny pro erytrocyty. Proto nejčastějším společným příznakem sníženého počtu krevních destiček bývá spontánní krvácení do kůže a ze sliznic (*ekchymosy*). Krvácení může nastat i po drobných úrazech.

Při krvácení do kůže se mohou vytvářet drobné tečkovité krevní výlevy – *petechie*. *Tvorba petechií je typická pro krvácivé projevy při poruše primární hemostázy*. Nacházíme je zejména v místech většího hydrostatického tlaku (dolní končetiny a pod.).

- *Ne každé snížení krevních destiček vede ke krvácení. I velmi výrazné trombocytopenie (méně než $20 \cdot 10^9/l$) mohou být bez krvácivých projevů. Rozdíly jsou velmi individuální, zřejmě se na nich podílí jak funkční stav destiček, tak i stav cévní složky.*

4.1.2.1.1. TROMBOCYTOPENIE Z NEDOSTATEČNÉ PRODUKCE TROMBOCYTŮ

VROZENÉ

Mohou být děděny jako autosomálně dominantní, nebo recesivní onemocnění často sdružené s dalšími anomáliemi. Mnohdy bývají součástí syndromu s jinými projevy (Fanconiho anémie, Mayova-Hegglinova a Aldrichova-Wiskottova anomálie).

TROMBOCYTOPENIE

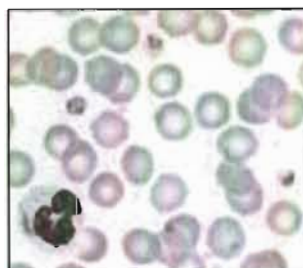
při anomálii May-Hegglinově

Anomálie Mayova-Heglinova je vrozená autosomálně dominantní porucha, u které jsou ovlivněny *neutrofily a krevní destičky*. Ačkoliv jsou neutrofily morfologicky abnormální jejich funkce je normální (May, 1909; Hegglin, 1945).

- **Příčina:** *porucha vyžrávání megakaryocytů* (hlavně porucha jejich fragmentace). *Snížený počet destiček je na úkor jejich velikosti.*

- **Laboratorní nález**

- **KO:**
 - přítomnost *obrovských trombocytů* (6–15 μm), větších než erytrocyty
 - Döhleho tělíska v granulocytech
- *Přežívání destiček:* normální

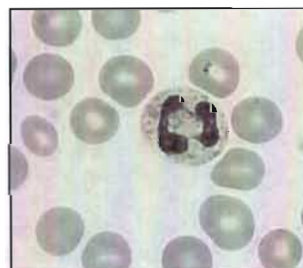


TROMBOCYTOPENIE

při syndromu Wiskottově-Aldrichově

Syndrom byl roku 1937 popsán Wiskottem, později Aldrichem (Wiskott, 1937; Aldrich a spol., 1954).

Syndrom Wiskottův-Aldrichův je vrozenou autoimunitní poruchou. Imunitní defekt ovlivňuje hlavně buněčnou imunitu, spíše než imunitu humorální.



- **Příčina:** *megakaryocyty produkují málo destiček a destičky jsou malé.*
- **Klinický obraz:** Trombocytopenie poměrně těžkého stupně, *postihuje hlavně chlapce*. Postižené děti trpí chronickým ekzémem a sníženou odolností vůči infekcím (organismus u tohoto syndromu produkuje protein, který tyto odezvy vyvolává).

ZÍSKANÉ

Mohou vznikat z různých příčin – infekce, chemikálie, léky, případně v důsledku jiného základního onemocnění.

- **Trombocytopenie z chemických a fyzikálních příčin.** Některé látky (*chlorotiazid, estrogeny, interferon, alkohol, cytostatika*) mohou pozvolna *toxicky působit na megakaryocyty a vyvolat tak trombocytopenii*. Některé léky působí toxicky jen na trombopoézu, jiné obecně na hematopoézu.

- **Trombocytopenie při virových infektech.** Viry mají přímý supresorový efekt na megakaryocytopoézu. Megakaryocyty mohou být sídlem replikace virů, což může vést k poruše jejich vyžrávání a následně k trombocytopenii. Poškození megakaryocytů a trombocytů zřejmě způsobují endotoxiny, případně splodiny metabolismu bakterií, případně prvků. Krvácivé projevy se dostaví jen při těžkém stupni trombocytopenie

- **Jiné příčiny vedoucí k potlačení megakaryocytopoézy:**

- *toxické poškození (toxické látky, jedy) – např. některé těžké kovy (Bi, Hg)*
- *zmnožení patologických buněčných kmenů (leukemie, metastázy)*
- *nedostatek kyseliny listové a vitamínu B₁₂ – vyvolá i poruchu DNA v dozrávání megakaryocytů (megaloblastové anémie)*

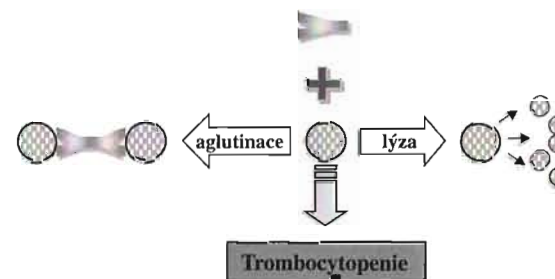
4.1.2.1.2. TROMBOCYTOPENIE ZE ZVÝŠENÉ DESTRUKCE TROMBOCYTŮ

Trombocytopenie imunitní povahy

Mohou být vyvolány:

- *autoprotilátkami*
- *aloprotilátkami*

PŘEDČASNÝ ZÁNİK KREVŇÍ DESTIČKY VYVOLANÝ PROTILÁTKOU



AUTOIMUNITNÍ PROTILÁTKY (AUTOPROTILÁTKY)

U těchto stavů dochází ke zvýšenému rozpadu krevních destiček v důsledku poškození membrány autoprotilátkami, či imunitními komplexy. Autoprotilátky mohou být zaměřeny proti destičkám, nebo cévní stěně (cévní stěna je destičkám antigeně příbuzná). Příčina může být buď známa nebo neznáma (Kelton, 1998):

a) Známá příčina tvorby protilátek

- ❑ Trombocytopenie vzniká ze známé příčiny: léky, těhotenství, autoimunitní choroby, AIDS, TKD. Stav označujeme jako *sekundární autoimunitní trombocytopenickou purpuru*

b) Neznámá příčina tvorby protilátek

- ❑ U tohoto onemocnění dochází ke zvýšenému rozpadu trombocytů z neznámé příčiny za spoluúčasti protilátek – *idiopatická trombocytopenická purpura (ITP)*.

IDIOPATICKÁ TROMBOCYTOPENICKÁ PURPURA – ITP

Synonyma: Autoimunitní trombocytopenická purpura, autoimunitní trombocytopenie, primární imunitní trombocytopenická purpura (George, 1996a).

Chorobu popsal Werlhof (Werlhof, 1734) a nazval ji „MORBUS MACULOSUS HAEMORHAGICUS“, později označována jako „MORBUS MACULOSUS WERLHOFFI“. Na nedostatek krevních destiček u této nemoci upozornil již Krauss. Dnes používaný název pochází od Franka z r. 1915 (Frank, 1915).

- **Definice:** ITP je izolovaná trombocytopenie způsobená protilátkami navázanými na membránu destiček.
- **Příčina:** nemocný z neznámých důvodů vytváří autoprotilátku proti vlastním trombocytům. Protílátka, která patří do podskupiny IgG₃ se váže na normální i pacientovy destičky, hlavně na jejich membránové glykoproteiny. Poškozené destičky s navázanou protilátkou jsou sekvestrovány slezinou a následně fagocytovány v MFS (George, 1996b).
- **Diagnostika ITP**

se zakládá na vylučování jiných příčin, protože žádný z dnes známých testů není dostatečně citlivý.

Rozlišujeme dvě formy ITP, které se liší etiopatogenezi a klinickým průběhem:

- ◆ akutní
- ◆ chronická

Akutní forma ITP

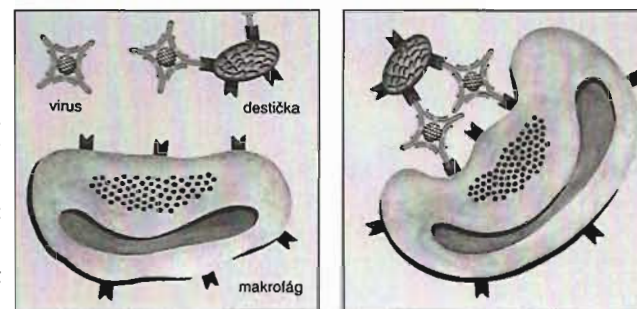
Vzniká náhle většinou navazuje na proběhlou virovou infekci a má prudký průběh s výraznými projevy krvácení. Onemocnění trvá několik dnů až měsíců. Někdy kon-



Petechie u ITP

čí vyléčením (spontánní remise), nebo se může opakovat. U části nemocných přechází do chronické podoby (Lichtin, 1996). Dochází většinou i k přímému poškození cévní stěny. Nachází se petechie, purpura, sufuze, krvácení ze sliznic, není splenomegalie.

Jedná se o chorobu z přítomnosti cirkulujících imunokomplexů. Antigenem bývá většinou virus, který vyvolal infekci. Imunokomplexy jsou vyvazovány na receptory krevních destiček a tyto agregáty jsou vychytávány v MFS.

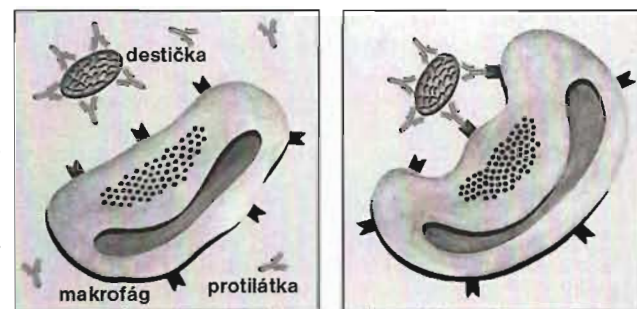


Akutní ITP – vznik imunokomplexů s krevními destičkami a jejich vyvázání makrofágy

- **Výskyt:** zejména u dětí mezi 2–6 rokem, 10 případů/100 000 dětí ročně. U dospělých se vyskytuje vzácně (Lichtin, 1996).

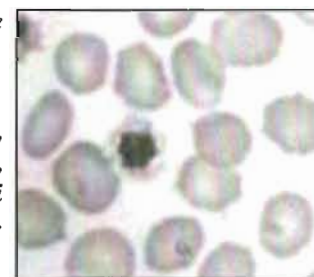
Chronická forma ITP

Krvácení bývá méně rozsáhlé a většinou neohrožuje život. Příčinou bývají autoprotilátky proti antigenům krevních destiček, které jsou pak vychytávány v MFS.



Chronická ITP – vychytávání protilátek vyvázaných na krevní destičky v MFS

- **Výskyt:** u dospělých ve věku 20–50 let, častěji se vyskytuje u žen
- **Laboratorní nález:**
 - ❑ KO: Normální morfologie červené krvinky, normální zastoupení a morfologie bílé krvinky, výrazná trombocytopenie s většími destičkami se spontánními krvácivými projevy při poklesu počtu pod $20 \cdot 10^9/l$.
 - ❑ Doba krvácení: prodloužena (až na hodnoty kolem 20 minut, někdy i delší)

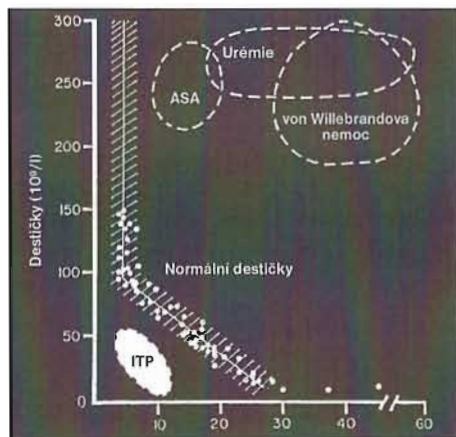


Chronická ITP – velké destičky

☐ *Přežívání destiček*: poločas méně než polovina normální doby, často jen několik hodin

☐ *Kostní dřev:* posun doleva v megakaryocytární řadě (zvýšený počet megakaryoblastů a promegakaryocytů na úkor vyzrálých forem)

- **Léčba:** *Potlačení tvorby protilátek imunosupresivy* (kortikoidy). Součástí léčby závažné trombocytopenie je i potlačení krvácivých projevů podáváním trombocytárních náplavů, nebo léků potlačujících krvácení (např. etamsylát).



Chronická ITP – zkrácené přežívání destiček

ALOIMUNITNÍ PROTILÁTKY (ALOPROTILÁTKY)

Aloimunitní trombocytopenie vznikají podobně jako aloimunitní hemolytické anémie v důsledku inkompatibility (nesouhlasnosti) destičkových antigenů:

- u příjemce a dárce
- u matky a plodu (novorozenecká trombocytopenická purpura)

Trombocytopenie neimunitní povahy

Trombocytopenie při chronickém onemocnění jater

Objevuje se zejména u cirhózy jater. U tohoto onemocnění dochází ke zmnožení vaziva v játrech – „tvrdnutí jater“. Při těchto stavech je ztížen průtok krve játry. Krev se hromadí ve slezině, kde dochází k odbourávání trombocytů.

4.1.2.1.3. TROMBOCYTOPENIE ZE ZVÝŠENÉ KONZUMPCE TROMBOCYTŮ

TROMBOTICKÁ TROMBOCYTOPENICKÁ PURPURA

TTP – syndrom Moschocowitzův (Mikroangiopahita trombotica)

První popis tohoto onemocnění od Eli Moschcowitze pochází z r. 1924. Autor mylně považoval zrnitý materiál v cévách za erytrocytární drť (Moschcowitz, 1924). Později se zjistilo, že jde o nález destičkových trombů.

- ☐ Trombotická trombocytopenická purpura je závažné onemocnění s postižením četných orgánů, které neléčené vede ke smrti.
- ☐ Při TTP jde o generalizované postižení cirkulace krve.

- **Příčina:** na tomto onemocnění se patogeneticky podílí deficit metaloproteinázy, která štěpí multimery vWF (ADAMTS 13), který může být buď vrozený nebo získaný. Do krevního oběhu jsou uvolňovány z Weibel-Paladeho tělísek cévních endotelií **nadměrně aktivní multimery** (vysoce polymerizované agregáty) von Willebrandova faktoru (Ruggeri a spol., 1983). Tyto multimery jsou pravděpodobně štěpeny na různé fragmenty, z nichž fragment o MW 176 kDa je aktivátorem destičkového povrchového integrinu GP IIb/IIIa. Vznikající destičkové agregáty jsou důsledkem této aktivace. K tvorbě trombů dochází po nastartování banálními virovými atakami.
- **Výskyt:** postihuje spíše mladší věkové kategorie

● **Klinický obraz:**

- ☐ Horečka
- ☐ Mikroangiopatická hemolytická anémie
- ☐ Trombocytopenická purpura
- ☐ Proměnlivá neurologická symptomatologie
- ☐ Renální selhání

- **Klinická interpretace:** TTP může vzniknout ve spojitosti s virózou nebo obecně s infekčním onemocněním, malignitou, chirurgickými výkony, těhotenstvím, některými léky a s očkováním.

- **Léčba:** Dříve to bylo smrtelné onemocnění. Léčba musí být okamžitá a jejím základním předpokladem je provedení vysokoobjemové plazmaferézy a podání čerstvě mražené plazmy. U poruchy vyvolané inhibitory se pokládá za vhodné podávání kortikoidů.

- ☐ *Oproti TTP bývá DIK nastartován vážnou poruchou narušující fluidokoagulační rovnováhu. Jde zejména o nemoci vedoucí k destrukci tkání – např. rozpadající se tumory, septický stav a jiné).*

HEMOLYTICKO-UREMICKÝ SYNDROM

HUS – syndrom Gasserův

- **Výskyt:** Na rozdíl od TTP se nachází nejčastěji u dětí do 1 roku. Může se vyskytovat i v dospělosti, u žen v těhotenství (Gasser a spol., 1955).
- **Příčina:** pravděpodobně vlivem cirkulujících imunitních komplexů a aktivovaného komplementu dochází u těchto stavů k poškození kapilár (mikroangiopatie) a dále k poškození regulačních mechanismů primární hemostázy a koagulace.

V ledvinách se tvoří agregáty krevních destiček, které poškozují ledviny, následně dochází k jejich selhání. V mikrocirkulaci dochází k aktivaci krevního srážení, vytváří se tromby a prohlubují se změny vnitřního povrchu cév. Na takto změněném endoteliálním povrchu dochází k hemolýze erytrocytů. Z naruše-

ných erytrocytů jsou vyplavovány koagulačně aktivní látky, které dále rozvíjejí poruchu krevního srážení.

Další možnou vyvolávající příčinou může být i nedostatečná produkce prostacyklinu v cévní stěně.

- **Klinický obraz:** selhání ledvin, trombocytopenie a hemolytická anémie
- **Laboratorní nález**
 - **KO:** zvýšený nález schistocytů
- **Léčba:** Prostá infúze plasmy (pravděpodobně dochází ke stimulaci tvorby prostacyklinu v cévní stěně).
- **Trombocytopenie při DIK:** Dochází k aktivaci nitrocévního srážení krve. Krevní destičky se shlukují – vznikají mikrotromby. V kostní dřeni nestačí tvorba destiček kompenzovat jejich zvýšenou spotřebu.

4.1.2.1.4. TROMBOCYTOPENIE ZE ZTRÁT TROMBOCYTŮ

Trombocytopenie po masivní transfúzi nebo výměně krve

Při rychlé náhradě krve, u které během 24 hodin dodáme množství krve odpovídající objemu krve nemocného, může dojít k trombocytopenii, protože v převedené skladované krvi není dostatečný počet trombocytů.

- *Má-li kostní dřev dostatečnou kapacitu dochází spíše k trombocytóze.*

Trombocytopenie při mimotělním oběhu

U mimotělního oběhu krve (např. při operacích srdce, cytoferézách, plasmaferézách) dochází v mimotělním oběhu ke snížení teploty krve až na hodnoty kolem 25 °C. Pod tuto teplotu mohou krevní destičky spontánně adherovat nebo agregovat.

Trombocytopenie při splenomegalii

Je-li přítomná splenomegalie (zvětšená slezina) dochází zpravidla ke zvýšenému skladování destiček ve slezině (v některých případech může být ve slezině uloženo až 90 % všech destiček). V obvodové krvi vzniká trombocytopenie.

HEPARINEM INDUKOVANÁ TROMBOCYTOPENIE (HIT)

Nejde o onemocnění, ale o stav vyvolaný v průběhu léčby heparinem

- **Výskyt:** u 0,5–5 % všech pacientů léčených nefrakcionovaným heparinem (Warkentin a spol., 1995). Dnes se používá většinou nízkomolekulární heparin (LMWH), u kterého k této poruše prakticky nedochází.

Rozlišujeme 2 typy HIT:

- **HIT I:** (asi u 10 %) *prostá interakce heparinu s trombocyty – lehký aglutinační efekt.* Jde o benigní, klinicky nevýznamnou trombocytopenii, která se objeví

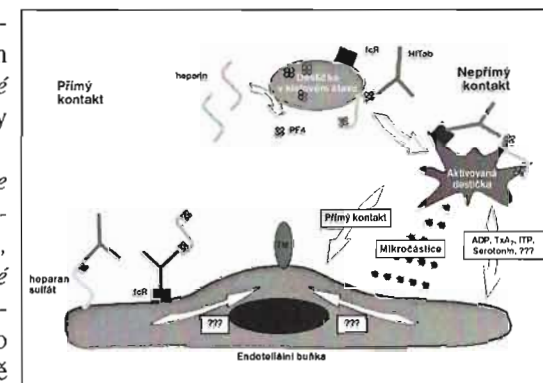
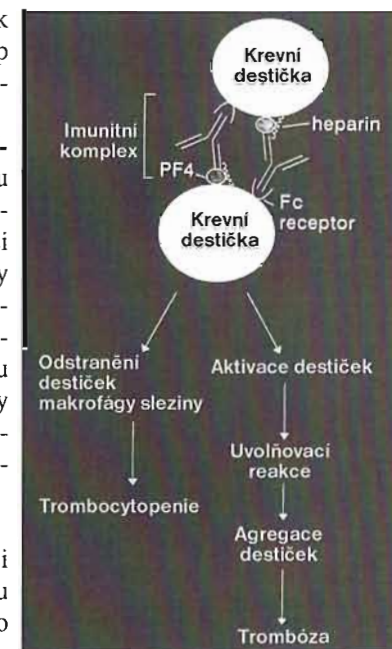
během prvních dnů léčby. Počet destiček většinou neklesá pod $100 \cdot 10^9/l$. HIT typ I může podle některých autorů přejít plynule v typ II (Greinacher, 1995).

- **Příčina:** trombocytopenie vzniká jako *následek neimunitních reakcí*. K poklesu trombocytů dochází pravděpodobně přímým působením heparinu na agregaci krevních destiček. Heparin se nespecificky naváže na trombocyty v závislosti na molekulové hmotnosti heparinu a stupni sulfatace. Proagregačním efektem heparinu jsou z α -granulí destiček uvolňovány proteiny schopné vázat heparin (zejména PF4), které se váží na heparin navázaný na trombocytech.

- **HIT II (HITT – HIT s trombózou):** (asi u 0,5–5 %). Jde o vzácnou, ale závažnou komplikaci heparinové terapie, která přímo ohrožuje život nemocného. Kolem 7.–15. dne léčby především nefrakcionovaným heparinem dochází k *výrazné trombocytopenii* pod hodnoty $100 \cdot 10^9/l$, případně i méně.

- **Příčina:** trombocytopenie je vyvolána produkcí autoprotilátek typu IgM, IgG₂ a IgA, které jsou cíleně zaměřené k vyvázání PF4. Trombogenní mechanismy těchto autoprotilátek nejsou plně objasněny. V přítomnosti heparinu se protilátky (Ab) váží

do komplexu [Heparin . PF4 . Ab] – vznikají *imunitní komplexy, které vyvolávají aktivaci a agregaci krevních destiček. Komplexy PF4 s heparinem představují hlavní antigen. Tyto velké komplexy mohou vázat několik protilátek a vznikají tak imunitní komplexy, které aktivují destičky cestou jejich receptorů pro Fc fragment imunoglobulinu.* Stejně komplexy se vytvářejí na endoteliálních buňkách, což má za následek jejich poškození – *aktivace endotelu.*



Mechanismy vedoucí k poškození endotelu u HIT

Předpokládá se, že u postižených se jedná o genetickou odchylku destičkového faktoru (PF4), při které dochází k záměně aminokyseliny v pozici 131. Běžně je v proteinovém řetězci faktoru na tomto místě Arg, kdežto u faktoru s genetickou odchylkou His. Tato záměna výrazně zvyšuje riziko HIT. Homozygot má oba Arg záměněné za His, takže incidence HIT je u něj velmi vysoká.

Při interakci hraje podstatnou úlohu nejen vazba na PF4, ale i na chemokiny uvolněné společně s PF4 (např. interleukin 8 nebo neutrofily aktivující peptid 2). Uplatňuje se úloha imunitního systému.

PF4 může tvořit mono až tetramer. Tetramer PF4 je „ideální“ pro tvorbu imunitních komplexů. Několik tetramerů PF4 váže 1 molekulu glykosaminoglykanu – GAG (část řetězce heparinu).

Vyvolání imunitní reakce ovlivňuje:

- délka GAG řetězců
- doba expozice pacienta.
- PF4 může být nahrazen i jiným proteinem vázajícím heparin.

• Laboratorní hodnoty:

❑ **HIT I:** trombocyty < 150 a > než 100.10⁹/l. Po vysazení heparinu se velmi rychle počet destiček upraví na normální hodnoty. Tento stav nevyžaduje následnou léčbu a nemocní nemají významnější klinické následky.

❑ **HIT II:** trombocyty < než 100, někdy méně než 60.10⁹/l.

- **Léčba HIT II:** Úplné vysazení heparinu (nebezpečné mohou být i preparáty LMWH). Místo heparinu se jako antikoagulancia podávají hirudin nebo danaparoid. V akutní fázi onemocnění není vhodné podávat preparáty kumarinového typu.

❑ Soudí se na zkříženou reakci s heparansulfátem nebo glykosaminoglykanem a poškození endoteliálních buněk je pravděpodobným vysvětlením neobvyklé lokalizace trombotických komplikací. Není jasné proč dochází k trombózám ve velkých a středně velkých arteriích spíše než v arteriolách.

❑ Zvláště nemocní s trombotickými komplikacemi dostávající heparin mají „hyperagregabilní“ trombocyty, které snadno vytvářejí „shluky“ in vitro.

4.1.2.2. Trombocytopatie

U trombocytopatií je počet destiček většinou normální (případně lehce snížený nebo i zvýšený), ale je u nich narušena ultrastruktura destiček nebo je změněná jejich funkce či metabolismus.

Funkční poruchy destiček mohou být:

- ❑ vrozené
- ❑ získané

4.1.2.2.1. VROZENÉ TROMBOCYTOPATIE

Vrozené trombocytopatie jsou velmi vzácné. Většinou se projevují krvácivými syndromy: kožní a slizniční krvácení, krvácení po malých poraněních. Vrozené trombocytopatie bývají spojovány s poruchou:

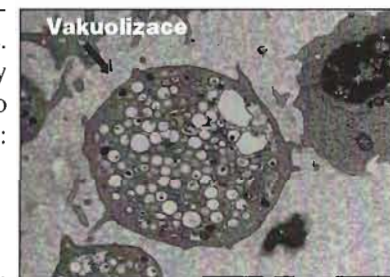
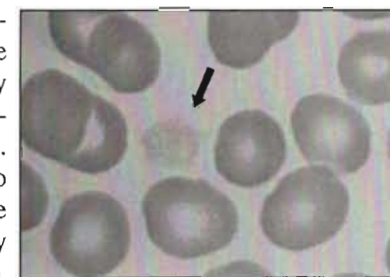
1. membrány krevní destičky (hlavně membránových glykoproteinů).

- tromboastenien Glanzmannova-Naegeliho
- syndrom Bernard-Soulierův

2. skladovacích granulí

- ◆ **porucha skladovacího poolu (storage pool deficiency).** Densní granula obsahující serotonin a ADP buď chybí zcela nebo se vyskytují jen sporadicky. Chybí sekundární vlna agregace po ADP.
- ◆ **syndrom šedých destiček (gray platelet syndrome).** Byl poprvé popsán v roce 1971. Klinicky může být přítomno krvácení.

- **Příčina:** α-granula destiček buď chybí zcela nebo se vyskytují jen sporadicky. Může jít i o kombinovanou poruchu. Destičky mají méně než 15 % normálního obsahu α-granulí, získávají tím šedavé zabarvení. Proto se tento syndrom někdy označuje jako **syndrom „šedých destiček“**. Dochází ke zkrácení doby přežívání destiček, destičky mají narušenou strukturu a chybí GP Ia a Ib. V nátěru se nachází velké, špatně obarvitelné destičky a je přítomna trombocytopenie. Ve dřeni nacházíme šedé megakaryocyty s výraznou vakuolizací (tvar švýcarského sýru) a bývá fibróza. Do této skupiny patří:
 - ❑ Heřmanského-Pudlákův syndrom
 - ❑ syndrom šedých destiček



Velké destičky bez granulí a s vakuolizací

3. enzymových aktivit

- chybění nebo funkční nedostatečnost **cyklooxygenázy**
- chybění nebo funkční nedostatečnost **tromboxansyntetázy**

4. mobilizace nitrobuněčného vápníku. Porucha cesty, kterou se stimuluje uvolnění nitrobuněčného vápníku, případně cest, které reagují na jeho zvýšenou hladinu uvnitř buňky (poruchy aktivace a stimulace kontraktilního aparátu)

5. snížení nebo chybění odpovědi na TXA₂. Jde o poruchy receptoru pro TXA₂,

neprobíhá jeho navázání na destičky a nedochází k následné stimulaci dalších destiček – neprobíhá agregační impuls zprostředkovaný TXA₂.

6. **uvolňovací reakce.** Destičky obsahují všechny typy granulí s dostatečnou výbavou jednotlivých složek v nich zastoupených. *Neprobíhá stimulace, která směřuje k uvolnění obsahu granulí* (poruchy receptorů, nebo stimulačních mechanismů).

1. Poruchy membrány

GLANZMANNOVA-NAEGELIHO TROMBOASTENIE

Porucha byla popsána r. 1918 Glanzmannem (Glanzmann, 1918).

Jde o poměrně řídké se vyskytující autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Dochází při něm k poruše tvorby destičkové zátky.

- **Příčina:** Defekt komplexu membránových glykoproteinů IIb/IIIa, který vede k narušení agregace destiček po ADP, kolagenu, arachidonové kyselině a trombinu.

Rozlišujeme 3 typy poruch:

- **Typ I** – úplné chybění komplexu GP IIb/IIIa. V α-granulích destiček je velmi nízká koncentrace fibrinogenu. Je porušena agregace i retrakce
- **Typ II** – snížený počet těchto glykoproteinů (10–20 %). Hladina fibrinogenu v destičkách je jen lehce snížena, retrakce koagula je jen mírně narušena.
- **Typ III** – fyziologické množství GP, ale porušena je jeho funkce.

● Laboratorní nález:

- **KO:** MPV normální
- **Doba krvácení:** prodloužena
- **Retrakce krevního a plasmatického koagula:** snižena
- **Adhezivita destiček:** narušena
- **Agregace destiček:** po stimulaci ADP odpověď chybí

BERNARDŮV-SOULIERŮV SYNDROM

Bernard a Soulier v r. 1948 popsali vrozený autosomálně recesivní krvácivý stav charakterizovaný prodlouženou dobou krvácivosti, středně těžkou trombocytopenií a přítomností neobvykle velkých trombocytů s porušenou funkcí (Bernard a Soulier, 1948).

Kráčivé projevy se vyskytují zejména v dětství a zahrnují především slizniční a kožní krvácení. U tohoto syndromu jde o poruchu tvorby primární hemostatické zátky – *neprobíhá adheze krevních destiček.*

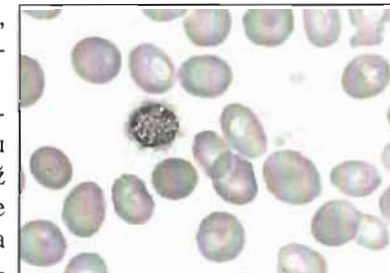
- **Příčina:** defekt glykoproteinového komplexu [GPIb-V-IX] spojený s mutací v genu složky GPIb, která je patologicky změněna. Komplex je receptorem pro vWF

a je složen ze 4 podjednotek GP (GP Ibα, GP Ibβ, GP IXa, GP V). Tento komplex se buď netvoří, nebo je přítomen, ale není funkční. Primární příčinou je přestavba genu pro GPIb, které vede ke snížení jeho množství. Dále se nachází i morfologické abnormality krevních destiček (Lopéy, 1994).

Adheze, která je výsledkem interakce komplexu [Gp Ib-V-IX] a von Willebrandova faktoru neprobíhá. Defekt tohoto komplexu je rovněž příčinou neschopnosti destiček agregovat v přítomnosti ristocetinu. Agregace po stimulaci ostatními stimulačními látkami probíhá normálně (Modderman a spol., 1992).

● Laboratorní nález:

- **KO:** Počet destiček – většinou snížen, MPV – velké abnormální destičky (makrotrombocytóza)
- **Krevní nátěr:** nachází se dystrofické destičky s velkými vakuolami, které jsou nápadné svou velikostí (průměr až 20 μm) a nahromaděním granulí ve středu trombocytu (vzniká dojem jádra – destičky připomínají lymfocyty). Atypické destičky obsahují 2–4násobné množství proteinů a jsou v celkovém počtu trombocytů zastoupeny 30–40 % (Roth, 1991).
- **Doba krvácení:** prodloužena
- **Adhezivita destiček:** narušena
- **Přežívání destiček:** zkrácené
- **Agregace trombocytů:**
 - ADP – normální křivka
 - Epinefrin – normální křivka
 - Ristocetin – agregační křivka chybí nebo je patologická. Agregace s ristocetinem je totiž závislá na interakci komplexu [GP Ib.V.IX] s vWF (Ruggeri a spol., 1983).



2. Poruchy skladovacích granulí

HEŘMANSKÉHO-PUDLÁKŮV SYNDROM

Syndrom byl r. 1959 popsán Heřmanským a Pudlákem u dvou nemocných. Je sdružen s albinismem.

- **Příčina:** na rozdíl od tromboastenie probíhá adhezivita a primární agregace destiček normálně – chybí však druhá agregační vlna po stimulaci ADP, protože **destičky nejsou schopné uvolňovat ADP z denzních granulí.** Tvorba destičkové zátky probíhá nedostatečně. Rozlišují se dva typy této poruchy:
 - nedostatek destičkového ADP
 - porucha uvolňování ADP z granulí

- **Laboratorní nález:**

Doba krvácení: prodloužena

Agregace destiček: chybí druhá agregační vlna při stimulaci ADP

4.1.2.2.2. ZÍSKANÉ TROMBOCYTOPATIE

Získané trombocytopatie vznikají sekundárně jako *důsledek základní poruchy, která ovlivňuje funkci krevní destičky*. Jsou podstatně častějším nálezem, než vrozené formy. Krvácivé projevy nebývají výrazné a většinou není ani nutná léčba.

Trombocytopatie u myeloproliferativních onemocnění

- **Příčina:** u některých nemocí, které mají vliv na krvetvorbu se mohou tvořit poškozené nebo nefunkční krevní destičky.

Trombocytopatie u lymfoproliferativních onemocnění

- **Příčina:** některé nemoci produkují patologické bílkoviny, které se následně mohou vázat na membránu krevní destičky. Může docházet k poškození membrány, eventuálně sterické zábraně, která neumožní krevní destičce plně rozvinout svůj funkční potenciál.

Trombocytopatie při anémii

- **Příčina:** toxické látky a metabolické splodiny vznikající např. při urémii ovlivňují funkci krevních destiček

Poléková trombocytopatie

- **Příčina:** účinkem některých léků dochází k utlumení, nebo poškození funkce krevní destičky. Mezi tyto léky se řadí: *cytostatika, vysoké dávky antibiotik, antipyretika (aspirin), analgetika*
- **Klinické projevy:** drobná krvácení s tvorbou petechií a výraznější krvácení např. po úrazech.

4.1.2.3. Trombocytóza, trombocytemie

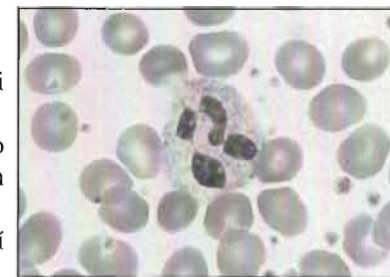
Trombocytóza a trombocytemie jsou stavy, u kterých se nachází zvýšené počty krevních destiček v obvodové krvi.

4.1.2.3.1. TROMBOCYTÓZA

U **trombocytózy** jde o *sekundární* zvýšení počtu krevních destiček (obvykle na hodnoty $400\text{--}600 \cdot 10^9/\text{l}$, ale mohou se pohybovat až kolem $1\,000 \cdot 10^9/\text{l}$). V kostní dřeni se většinou nachází zvýšený počet megakaryocytů.

Trombocytózy se vyskytují:

- u infekcí nebo zánětlivých onemocnění
- po splenektomii – nedochází k sekvestraci destiček ve slezině
- při krvácení – v období 48–96 hodin po masivním krvácení vzrůstá počet krevních destiček
- při fyzické námaze a psychickém vypětí – přechodné zvýšení
- u nádorů – Hodgkinova choroba



Trombocytóza v periferní krvi

- **Léčba:** většinou není nutná, po odstranění nebo léčbě prvotní příčiny trombocytóza vymizí.

4.1.2.3.2. TROMBOCYTEMIE

U **trombocytemie** jde o *trvalé* zvýšení počtu trombocytů (většinou na hodnoty $600\text{--}1\,000 \cdot 10^9/\text{l}$, někdy i vyšší) vyvolané myeloproliferativním procesem. Trombocytemie se vyskytuje:

- u chronické myeloidní leukémie (zejména v počátku onemocnění)
- u pravé polycytémie
- u esenciální trombocytemie – přetrvává nadprodukce trombocytů

☐ *Bližší o této problematice viz „Laboratorní hematologie v přehledu II – Ultrastruktura, funkce, fyziologie a patofyziologie krevních buněk“ (kapitola: Myeloproliferativní stavy).*

4.1.3. Koagulopatie

Úloha plazmatického koagulačního systému

Výsledkem aktivace **plazmatických koagulačních faktorů** je vytvoření stabilního fibrinu. Fibrin vytváří fibrinovou síť na trombocytární matici, kterou tím zpevňuje. Vznik stabilního fibrinu je výsledkem vzájemného působení koagulačních plazmatických proteinů. **Přirozené inhibitory koagulace** slouží ke zpomalení nebo zastavení koagulačního procesu, lokalizaci cévního poškození a chrání nepoškozené cévy proti trombóze. Snížené zastoupení nebo případné abnormality v molekulách některých složek mohou vést ke **koagulopatii**.

Koagulopatie jsou krvácivé stavy, u kterých je příčinou krvácení snížená koncentrace nebo aktivita plazmatických koagulačních faktorů. Mají většinou typický klinický obraz, projevují se spontánním krvácením především do tkání a kůže a tvoří se hematomy či sufúze.

Stupeň krvácení závisí většinou na poklesu koagulační aktivity faktoru. Při výraz-

ném poklesu dochází k těžkým krvácivým projevům, jinak bývají krvácivé projevy mírnější povahy, často se projeví pouze při chirurgickém výkonu nebo poranění.

Diagnóza se stanoví přímým vyšetřením hladiny faktorů. Při terapii se většinou podávají krevní deriváty.

Koagulopatie se nachází při:

- nedostatku, či chybění jednoho nebo několika hemokoagulačních faktorů
 - při výskytu koagulačních faktorů s odlišnou molekulární stavbou
 - při zvýšených hladinách inhibitorů
- ☐ Stupeň krvácení závisí většinou na poklesu koagulační aktivity faktoru. Při výrazném poklesu dochází k těžkým spontánním krvácivým projevům, jinak bývají krvácivé projevy (podle hladiny koagulační aktivity faktoru) mírnější povahy, často se projeví pouze při chirurgickém zákroku, nebo poranění.
- ☐ Diagnóza se stanoví přímým vyšetřením hladiny faktoru. Při léčbě se většinou podávají krevní deriváty.

Rozlišujeme koagulopatie:

- ☐ vrozené
- ☐ získané

4.1.3.1. Vrozené koagulopatie

Vrozená absence většiny koagulačních faktorů je spojena s krvácením. Pouze nedostatek nebo funkční defekt prekalikreinu a F XII nebývá spojen s klinicky nápadným krvácením a dokonce se projeví predispozice k trombóze.

VROZENÉ DEFEKTY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ JSOU POMĚRNĚ VZÁCNÉ A TÝKAJÍ SE VĚTŠINOU JEN JEDNOHO FAKTORU.

Z vrozených koagulopatií jsou nejčastější **hemofilie A a B**, které představují zhruba 95 % všech vrozených krvácivých stavů plazmatického původu (hemofilie A 85 %, B 10–12 %).

4.1.3.1.1. HEMOFILIE

Odvozeno od řeckých slov *haima* – krev, *filia* – náchylnost, jinak řečeno „náchylnost ke krvácení“.

Hemofilii jako diagnostickou jednotku poprvé popsal americký lékař Otto v roce 1803 (Thompson a Chen, 1993). Hemofilie je nevyléčitelné onemocnění, které provází lidstvo již od jeho ranného vývoje. První zmínku o hemofilii nacházíme již v 5. století po Kristu v babylonském talmudu (Cahill a spol., 1997). Ve středověku pak zejména šlechtické rody, u kterých docházelo k minimálnímu mísení populace, trpěly touto chorobou.

Zajímavý je příběh britské královské rodiny začínající královnou Viktorií (1819–1901) jako přenašečkou a zasahující další evropské královské rodiny. Královna měla jednoho hemofilického syna a jeho dcera rovněž jednoho hemofilického syna. Dvě dcery královny Viktorie byly přenašečkami a měly hemofilické syny a vnuky. Pravnuk královny Viktorie, syn ruského cara Mikuláše II, carevič Alexej trpěl těžkou hemofií. Hemofiliky a přenašečky z rodu královny Viktorie má mezi svými bezprostředními předky i současný španělský král Juan Carlos.



Britská královská rodina
(ve středu královna Viktorie)

Hemofilie se vyskytuje po celém světě, nebyla zjištěna rasová závislost. Ještě ve 40. letech našeho století byla průměrná doba života hemofiliků 16,5 roku a byli nemocí těžce invalidizováni. Prognóza hemofilie se začala měnit k lepšímu v 50. letech minulého století, kdy byly zahájeny první pokusy s léčbou plasmou a později s koncentráty F VIII a F IX, zvláště pak v 60. a 70. letech, kdy začala průmyslová výroba těchto preparátů.

Od roku 1952, kdy byla zjištěna podstata hemofilie rozlišujeme:

- ☐ **hemofilii A** (vrozený nedostatek nebo funkční nedostatečnost F VIII)
- ☐ **hemofilii B** (vrozený nedostatek nebo funkční nedostatečnost F IX)

Klinická manifestace

Klinické projevy hemofilie A i B jsou téměř totožné. Obě onemocnění jsou charakterizována zejména spontánními, opakovanými a protrahovanými krvácivými stavy. Bez správně volené léčby vede krvácení do kloubů a svalů ke vzniku degenerativních kloubních změn tzv. progresivní artropatii a k oslabení (atrofii) svalstva zejména končetinového.

S krvácivými příhodami se setkáme u těžkého hemofilika nejčastěji už v prvním roce života. Do tří let věku se obvykle projeví kloubní krvácení. Kolísání hladin koagulačních faktorů u hemofiliků je běžné. Mezi faktory, které mohou ovlivnit tendenci ke krvácení může patřit i emoční a fyzický stres. Děti krvácejí méně než dospělí. Krvácení z pupečníku nebo mozkové krvácení bezprostředně po narození jsou známkou velmi nízké hladiny faktoru VIII.

Hemofilické defekty

Hemofilie se klasifikuje podle zbytkové aktivity defektního koagulačního faktoru na hemofilii lehkého, středního a těžkého stupně:

- **těžké formy** (F VIII < 1 %, F IX < 2 %)

Při těžkém hemofilickém defektu je hemostáza nedostatečná i při nepatrných

úrazech a poraněních. Postižení jedinci trpí krvácením do kloubů, svalů, gastrointestinálního traktu a centrálního nervového systému.

- **střední formy (F VIII: 1–5 %, F IX: 2–6 %)**

Středně těžké formy se projevují klinicky méně častým spontánním krvácením

- **lehké formy (F VIII: 5–25 %, F IX: > 6 %)**

U lehčích případů se projevuje zvýšená pohotovost ke krvácení jen po těžkých poraněních a úrazech, popř. po operačních zásazích, např. po extrakcích zubů.

- Z celkového množství nemocných s hemofilii jich přibližně 50 % trpí hemofilii středního až těžkého stupně, která vyžaduje léčbu několikrát ročně až několikrát měsíčně. U těžkých hemofiliků se onemocnění objevuje již v raném dětství, většinou do 1 roku života. Středně těžký stupeň se objevuje v časném období dětského věku. Lehčí stupeň se objevuje většinou až po traumatu.
- Prognóza zejména u těžkých forem není příznivá, dochází ke krvácení. Nejčastější je intrakraniální krvácení – jedna třetina všech úmrtí (Hemophilia, 1997). Dalšími oblastmi vzniku maligního krvácení je hltan a břišní dutina.

Genetický základ hemofilie

Hemofilie A i B jsou choroby s gonozomálně recesivním typem dědičnosti vázané na pohlavní chromozóm 23 a to na chromozóm X.

- Geny pro faktory VIII a IX jsou uloženy na vzdálenějším konci delšího raménka chromozómu X v pásech Xq28a a Xq27.1 (Scharer a spol., 1999). Gen pro F IX je lokalizován na dlouhém raménku X chromozómu, zatímco gen pro F VIII je umístěn blíže k teloměře chromozómu X.
- **Žena: XX** – zdědí-li žena defektní chromozóm je jeden chromozóm z páru nefunkční (X), ale druhý (X) stačí pokrýt potřebu F VIII – **ženy jsou přenašečkami** a chorobou samy netrpí.
- **Muž: XY** – zdědí-li muž defektní chromozóm (X), nemůže produkovat F VIII anebo jej produkuje v menší míře – **rozvine se hemofilie**.

Ženy jsou přenašečkami onemocnění a mohou mít ojediněle zvýšenou tendenci ke krvácení při nízké koncentraci F VIII a IX. Pro diagnostiku hemofilie má zásadní význam rodinná anamnéza, přesto je asi 30 % nemocných s deficitem F VIII bez pozitivní rodinné anamnézy (sporadické hemofilie).

Některé možné kombinace

- **Otec: hemofilik (XY), matka: zdravá (XX).** Synové nejsou hemofilici. Dcery samy nekrvácí, ale přenáší onemocnění na polovinu svých synů (stanou se hemofiliky) a na polovinu svých dcer (stanou se přenašečkami – přenáší hemofilii stejně jako jejich matky) – rodí se zdraví synové a přenašečky.

- **Otec: zdravý (XY), matka: přenašečka (XX).** Rodí se polovina zdravých synů a dcer a polovina synů jsou hemofilici a polovina dcer jsou přenašečkami.

- **Otec: hemofilik (XY), matka: přenašečka (XX).** Vzácná kombinace, většinou k ní nedochází vzhledem k nedoporučení početí v takovýchto případech.

Léčba: Během posledních 20–30 let se léčba pacientů změnila. Možnosti léčby se rozšiřovaly od použití čerstvě zmražené plazmy (ČZP), kryoprecipitátu, přes vysoce purifikované plasmatické koncentráty faktorů (VIII a IX) až k rekombinantním formám. Díky této účinné léčbě se prodloužila délka života pacientů na průměr v populaci. U těžkých hemofiliků se v dětství používá preventivní léčba koncentráty faktorů. Náhradou postižených kloubů můžeme dále zlepšit kvalitu života těchto nemocných.

Inhibitor u pacientů s hemofilii

Potenciálním rizikem náhrady koagulačního faktoru je **tvorba alloprotilátů (inhibitoru)**. Tato komplikace se vyskytuje u 7–8 % nemocných s hemofilii A a u 2–5 % nemocných s hemofilii B (Scharer a spol., 1999). Jedná se většinou o **protilátky typu IgG**. Imunologický mechanismus potencující tvorbu inhibitoru nebyl dosud nalezen (Shapiro a Rajagopalan, 1996). Léčba pacientů s přítomností inhibitoru je obtížnější, neboť tradiční léčba náhradou koagulačního faktoru je částečně nebo zcela neúčinná. Hladiny inhibitoru jsou kvantifikovány pomocí mezinárodně standardizované jednotky – **Bethesda Unit (BU)**. Výpočet titru je prováděn v BU (Kasper a spol., 1975). 1 BU/ml plazmy vyjadřuje 50 % zbytkové aktivity F VIII nebo IX po dvouhodinové inkubaci při 37 °C. Hladina inhibitorů u většiny nemocných výrazně kolísá, často až k nulovým hodnotám. Při nové léčbě se vždy rychle zvyšuje.

- Inhibitor se vzácně může objevit i u nehomofilických pacientů. Mluvíme pak o tzv. **získaném inhibitoru**. Získaný inhibitor je stav, při němž se u doposud hemostaticky normálních osob vyvine tvorba inhibitoru koagulačních faktorů (většinou spíše auto-, než alloprotilátů). Objevuje se jen v několika málo případech/milion obyvatel. 10 % nemocných se získaným inhibitorem umírá v průběhu 1 roku (Hay, 1998). Příčinu vzniku získaného inhibitoru se podaří odhalit asi u 50 % nemocných. Přibližně ve 20 % případů trpí pacienti autoimunitním onemocněním nebo systémovým onemocněním pojiva, v 7 % se nachází maligní onemocnění, u 6 % nemocných nastává vývin inhibitoru v souvislosti s probíhající farmakoterapií a u dalších 7 % se vyvine získaný inhibitor po porodu (Green a Lechner, 1981).

Nemocní s hemofilii by měli být sledováni v centrech pro hemofiliky, ve kterých je možná dokonalá diagnostika i odpovídající terapie.

KAŽDÝ HEMOFILIK BY MĚL NOSIT U SEBE PRŮKAZ S OZNAČENÍM KREVŇÍ SKUPINY A DOPORUČENÝM LÉČEBNÝM POSTUPEM!

HEMOFILIE A

Jde o dědičnou chorobu s recesivním typem dědičnosti, vázanou na pohlavní chromosom 23. *Gen pro F VIII obsahuje 186 kb (kilobází), jde o poměrně dlouhý gen a nezbytná genetická informace je obsažena v 9 exonech (Scharrer a spol., 1999).*

Příčina onemocnění:

- ☐ Vrozený nedostatek F VIII – **hemofilie A –**
- ☐ Funkční porucha F VIII – **hemofilie A +**

Rozlišení hemofilie A – a A +

- *Hemofilie A – (hladiny F VIII:C a F VIII:Ag jsou sníženy)*
- *Hemofilie A + (hladina F VIII:C je snížena a hladina F VIII:Ag je normální)*

Výskyt: 1 případ na 10 000–20 000 obyvatel (WFH, 1999)

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas (při poklesu F VIII pod 25 %)*
- *Srážlivost krve: prodloužený čas (asi u 30 % vyšetřovaných)*
- *F VIII:C (funkční koagulační složka molekuly faktoru VIII) – snížená hladina*
- *F VIII:Ag (molekula F VIII posuzovaná jako antigen) – snížená (A–) nebo normální hladina (A +)*
- ☐ *Hladina faktorů zůstává během života přibližně na stejné úrovni (po substituční léčbě časem klesne na hodnotu před léčbou).*

Léčba: Léčba hemofilie je substituční (nahrazuje se pokles F VIII) a podpůrná. K výpočtu potřebné dávky faktoru se používá jednotka koagulačního faktoru, která je definována jako množství faktoru obsaženého v jednom ml čerstvé plazmy.

Substituce se provádí:

- **čištěným koncentrátem F VIII**
- **rekombinantním faktorem VIII** (vyloučení přenosu infekčního nebo parazitárního agens)
- ☐ *F VIII má krátký biologický poločas (8–12 hodin), proto je nutné dávky opakovat, hlavně při perzistujícím krvácení.*

HEMOFILIE B

Označovaná také jako Christmasova choroba podle prvního známého pacienta s tímto typem hemofilie (Biggs a spol., 1952). *Gen pro faktor IX má celkem 34 kb a nezbytná genetická informace je obsažena v 8 exonech (Giannelli a spol., 1997).*

Příznaky u hemofilie B jsou podobné jako u hemofilie A (Cahil a spol., 1997). Krvácení může být stejně závažné, záleží na tíži hemofilie (Thompson a Chen, 1993).

Příčina onemocnění: u hemofilie B chybí koagulační aktivita faktoru IX.

Výskyt: 4–5krát méně častý, než hemofilie A (1 případ na 50 000–100 000 obyvatel).

Klinický obraz je podobný jako u hemofilie A, ale závažnost krvácivých projevů je menší. V dospělosti se četnost krvácivých epizod zmenšuje

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *F IX: snížená hladina*

Léčba: Léčba je podobná jako u hemofilie A. Podávají se přípravky s dostatkem chybějícího faktoru.

4.1.3.1.2. VON WILLEBRANDOVA NEMOC

VON WILLEBRANDOVA CHOROBA

První případ nemoci byl popsán von Willebrandem v r. 1926 na Alandských ostrovech. Von Willebrandova nemoc (vWch) je autosomálně dědičné onemocnění, které postihuje obě pohlaví, ale častěji ženy. Nepatří mezi čisté koagulopatie. Stav je rovněž provázen krvácivými projevy. Pro toto onemocnění je typické krvácení slizniční (z nosu – epistaxis). V případě těžkého defektu (při současném snížení F VIII) se přidruží i krvácení typická pro hemofilii. U žen bývá silné menstruační krvácení (*dívka u které byla choroba poprvé popsána vykrvácela při první menstruaci*).

Výskyt: vWch je nejčastěji se vyskytující vrozené krvácivé onemocnění. Zjišťuje se u 1,5 až 3,5 případů /1 000 obyvatel, většinou bez klinických projevů. Významnější krvácení asi u 125 případů/1 milion obyvatel, z toho léčbu vyžaduje něco kolem 6,5–13 případů/milion. Těžký typ vWch je poměrně vzácný 0,5–3 případy/milion.

Příčina onemocnění: Příčinou onemocnění je defekt (kvantitativní, funkční) adhezivního glykoproteinu – von Willebrandova faktoru (vWF), při kterém dochází k poruše funkce krevních destiček (nejde tedy o poruchu krevních destiček). Je **narušena funkce vWF v primární hemostáze a to jak adheze, tak i agregace krevních destiček**. Sekundárně dochází ke **snížení schopnosti vWF vázat koagulační faktor VIII**. Podle stupně snížení hladiny vWF a změny jeho molekuly se může měnit charakter a průběh onemocnění.

Typy von Willebrandovi nemoci

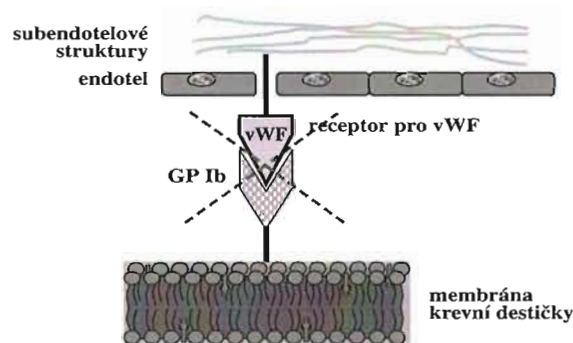
Krvácivé projevy u této nemoci odvisí od tíže postižení vWF a na jeho schop-

nosti vázat a udržet F VIII. Onemocnění je buď autosomálně dominantní nebo recesivní. Podle snížení koncentrace vWF v plazmě a defektu jeho molekuly rozlišujeme celkem 3 typy von Willebrandovi nemoci:

- **Typ I** (kvantitativní defekt) – je nejčastější, autozomálně dominantně dědičný (60–80 % všech vWch). Jde hlavně o *sníženou hladinu vWF bez patrnějších změn ve strukturách multimerů*. Dle relativního zastoupení multimerů jej dělíme na podtypy Ia a Ib.
- **Typ II** (kvalitativní defekt) – *funkční nedostatečnost velkých multimerů*. Dědičnost je dominantní i recesivní. Rozlišujeme 4 podtypy těchto multimerů IIa, IIb, IIc, IId:
 - Krvácivé projevy u subtypu IIa mohou připomínat krvácení u těžkého typu I.
 - U IIb jsou zachovány velké multimery v destičkách.
 - Subtyp IIc je charakterizován funkční nedostatečností velkých multimerů v plazmě i destičkách.
- **Typ III** (těžký kvantitativní defekt) – vyskytuje se jen zřídka a je nejtěžší. Je charakterizovaný *absencí multimerů vWF*. Nachází se u něj i kloubní krvácení.

Podle stupně snížení hladiny vWF a změny jeho molekuly se může měnit charakter a průběh onemocnění.

Patofyziologická klasifikace von Willebrandovi nemoci (Sadler, 1994) bere v úvahu patofyziologii defektu (typ mutace vWF) a dělí se rovněž na 3 typy.



Klinické projevy

- ☐ Slizniční krvácení (*krvácení z nosu, dásní, po extrakci zubu*)
- ☐ Kožní (*hematomy, petechie*)
- ☐ Krvácení při poranění (*obtížně stavitelné*)
- ☐ Krvácení typická pro hemofiliky (*vyvolaná v tomto případě sníženou schopností vWF vázat F VIII*)

Laboratorní nález

- **APTT:** prodloužený čas
- **Krvácivost:** prodloužený čas

- **Testy zaměřené na detekci vWF:** FVIII, RiCo (ristocetin kofaktor), RIPA (agregace po ristocetinu), vWF:Ag, multimery vWF – patologické hodnoty

Léčba: Léčba je závislá na typu vW nemoci a klinických projevech krvácení. Podává se koncentrát s obsahem vWF. Prognóza je při zvládnutí krvácivých komplikací dobrá.

Biologický poločas vWF je 6–8 hodin.

Získaná von Willebrandova nemoc

Získaný von Willebrandův syndrom je vzácné získané onemocnění, svými projevy a obrazem podobné vrozené vW nemoci, ale s negativní rodinnou a osobní anamnézou krvácivé choroby. Poprvé byl tento syndrom popsán v r. 1968 u nemocného se systémovým Lupus erythematodes. Jde buď o sníženou tvorbu nebo přítomnost protilátek proti vWF.

Příčina získané von Willebrandovy nemoci:

- **zvýšená proteolýza** (myeloproliferativní stavy),
- **zvýšená spotřeba vWF**, či jeho **vyvázání na povrch maligních buněk**
- **tvorba protilátek** (nejčastěji typu IgG), které:
 - vyvolají funkční poruchu vWF
 - zapříčiní vychytávání vWF a tím snižují aktivitu FVIIIIRCo
 - váží se na vWF a urychlí jeho odstraňování z cirkulace.

Laboratorní testy mají obdobné hodnoty jako u vrozené vWch.

Získaná forma von Willebrandovy choroby se nachází především u:

- Autoimunitních onemocnění (SLE, hypotyreóza, sklerodermie)
- Nádorových onemocnění (myeloproliferativní a lymfoproliferativní onemocnění, solidní tumory)
- Kardiovaskulárního onemocnění (aortální stenóza, prolaps mitrální chlopně)
- Angiodysplázie v GIT

Výskyt: nejčastěji jsou postiženi lidé starší 60 let, více muži než ženy (3:2). Děti jsou postiženy jen výjimečně.

Léčba: Většinou se léčí základní onemocnění a případné akutní krvácení

Pseudo von Willebrandova nemoc (Destičkový typ vWch)

Tato forma je zapříčiněna *defektem GP Ib/IX. Změněný GP váže multimery vWF a tím dochází k jejich rychlému odstranění z plazmy a ke zvýšené spotřebě destiček*. Vzniká lehká trombocytopenie a v obvodové krvi se nachází velké destičky. Laboratorní nález je prakticky totožný s typem IIb u vWch.

4.1.3.1.3. DEFEKTY OSTATNÍCH FAKTORŮ

Jsou to *velmi vzácné, většinou autozomálně recesivně dědičné choroby*. Stupeň krvácení závisí na stupni poklesu koagulační aktivity faktoru. Při výrazném pokle-

su aktivity jsou nemocní postiženi těžkými krvácivými projevy. Při vyšších aktivitách většinou krvácivé projevy chybí nebo jsou jen velmi mírné. Přesnou diagnózu lze stanovit jen cíleným vyšetřením jednotlivých faktorů. Kauzální léčba neexistuje, ke zmírnění projevů onemocnění se podávají koncentráty daného faktoru.

DEFEKTY FIBRINOGENU

Defekty fibrinogenu

- Chybění funkčního fibrinogenu (afibrinogenémie)
- Snížená hladina fibrinogenu v plasmě (hypofibrinogenémie)
- Pozměněná funkce molekuly fibrinogenu (dysfibrinogenémie).

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *PT: prodloužený čas*
- *TT: prodloužený čas*
- *Fibrinogen: snížená hladina, nebo chybí*

□ *U afibrinogenémií nemůžeme koagulační čas zachytit (netvoří se fibrinové vlákno).*

Léčba: přípravky lidského fibrinogenu nebo čerstvě zmraženou plasmou (ČZP).

Vrozená afibrinogenémie

Je velmi vzácné onemocnění, které zejména v mladším věku končí fatálně. Obvykle i rodiče postiženého dítěte mají sníženou hladinu fibrinogenu.

Dysfibrinogenémie

Hladina fibrinogenu (jako bílkoviny) je většinou normální, ale jeho funkce v hemostáze je pozměněna. Byly popsány již více než dvě desítky variant molekuly fibrinogenu (označují se podle měst, kde byly poprvé zjištěny – Baltimore, Paris, Oslo a jiné).

DEFEKT F II

Jde o autosomálně recesivní vrozené onemocnění s poruchou molekuly protrombinu (pokles pod 40 %).

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *PT: prodloužený čas*
- *Protrombin: snížená hladina*

DEFEKT F V

Jde o autosomálně recesivní vrozené onemocnění z nedostatku F V (pokles pod 15 %).

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *PT: prodloužený čas*
- *FV: snížená hladina*

DEFEKT F VII

Jde o autosomálně recesivní vrozené onemocnění z nedostatku F VII (pokles pod 10 %). Objevuje se zde náchylnost ke krvácení ze sliznic. Vyskytuje se v podobě krvácení z nosu, u žen jako nadměrné menstruační krvácení.

Laboratorní nález

- *PT: prodloužený čas*
- *FVII: snížená hladina*

DEFEKT F X

Jde o autosomálně recesivní dědičné onemocnění z nedostatku F X (pokles pod 10 %).

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *PT: prodloužený čas*
- *FX: snížená hladina*

DEFEKT F XI

Byl dříve některými autory nesprávně nazýván hemofilie C. Objevuje se velmi zřídka. Na rozdíl od hemofilie A se vyskytuje jak u mužů, tak i u žen a to hlavně u semitské populace.

Jde o autosomálně recesivní vrozené onemocnění z nedostatku F XI. Krvácivé projevy jsou mírného stupně, choroba postihuje i ženy a je značně geograficky i rasově omezená. V našich podmínkách se prakticky nevyskytuje.

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *F XI: snížená hladina*

Léčba: podávání čerstvé plasmy

DEFEKT F XII

Nedochází k projevům zvýšené krvácivosti, neboť krevní destičky mohou aktivovat F XI přímo na svém povrchu. Tyto stavy nevyžadují léčbu.

Laboratorní nález

- *APTT: prodloužený čas*
- *Test konzumpce protrombinu: zkrácený čas*
- *F XII: snížená hladina*

VROZENÝ DEFEKT F XIII

Jde o autosomálně recesivní dědičné onemocnění z nedostatku F XIII – projevuje se jen u homozygotů (pokles hladiny F XIII pod 3 %). Krvácení se objevuje opožděně (až po 24 hodinách). Heterozygoti nebývají většinou výrazně poškozeni jen v ojedinělých případech se u žen mohou objevit spontánní potraty. Podle toho, které podjednotky jsou narušeny dělí se na 3 typy:

- Typ I – kombinovaný deficit podjednotek A i B
- Typ II – chybí podjednotka A
- Typ III – chybí podjednotka B

Příčina onemocnění: Nestabilizované fibrinové koagulum podléhá odbourávání plasminem dříve, než dojde k zahojení rány. Dochází k rozpadu rány a ke komplikovanému hojení.

Laboratorní nález

- F XIII: snížená hladina
- Ostatní koagulační testy bývají normální.

Léčba: převody koncentráty F XIII

4.1.3.2. Získané koagulopatie

NA ROZDÍL OD VROZENÝCH SE ZÍSKANÉ KOAGULOPATIE VYZNAČUJÍ SNÍŽENÍM NE JEDNOHO, ALE ZPRAVIDLA CELÉ SKUPINY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ.

Získané koagulopatie provázejí poruchy jaterních funkcí, poruchy střevní resorpce, poruchy transportu žluče nebo některé otravy. Jsou častější než koagulopatie vrozené. U těchto stavů je možné vhodnou léčbou základního onemocnění dosáhnout u většiny nemocných vymizení příznaků koagulopatie.

PŘÍČINY ZÍSKANÝCH KOAGULOPATIÍ



4.1.3.2.1. PORUCHY RESORBCE A VYUŽITÍ VITAMINU K

Poruchy resorbce a využití vitamínu K vedou k nedostatečné syntéze koagulačních faktorů závislých na vitamínu K. K vitamín se podílí na tvorbě faktorů II, VII, IX, XI tím, že zprostředkuje karboxylaci glutamové kyseliny v γ -oblasti. Nedostatečná syntéza faktorů závislých na vitamínu K v jaterní buňce může být nejčastěji způsobena:

- Destrukci nebo jiným poškozením jaterní buňky
- Poruchou transportu K vitamínu při obstrukční žloutence
- Poruchou resorpce K vitamínu ve střevě

❑ **Vitamin K** člověk získává jednak z potravy, jednak jako produkt své normální bakteriální střevní flóry. Ke vstřebávání vitamínu K z obou zdrojů je potřebná přítomnost žluči a zdravá střevní sliznice. Proto se při delším trvání poruchy vstřebávání vitamínu K (onemocnění žlučníku a tenkého střeva) může objevit koagulopatie ze snížené syntézy koagulačních faktorů i při zdravých játrech. Při nedostatku vitamínu K v potravě zpravidla koagulopatie nevzniká, protože vitamin K je normálně syntetizován bakteriální střevní flórou. K avitaminóze může dojít, je-li současně potlačena tvorba vitamínu K ve střevě (antibiotika, sulfoamidy).

Látky závislé na vitamínu K jsou přítomny v celé řadě tkání – kosti, ledviny, pankreas, plíce, placenta. Nejlépe prostudovány jsou plazmatické koagulační faktory závislé na vitamínu K.

❑ Při postižení jaterní buňky (např. hepatocelulární ikterus) není transport K vitamínu k jaterní buňce narušen, jaterní buňka jej však nedovede využít a dochází k poklesu na vitamínu K závislých koagulačních faktorů.

Kromě faktorů vznikajících v jaterní buňce za přítomnosti vitamínu K se může při onemocnění jater snížit i hladina faktorů, které vitamin K při své syntéze nevyžadují (F V, VIII, fibrinogen a jiné). Příčinou poklesu je jejich zvýšená spotřeba v procesu chorobné aktivace srážení krve při pokročilém a těžkém onemocnění jater.

Laboratorní nález

- APTT: prodloužený čas
- PT: prodloužený čas

Léčba: U krvácivého stavu provázejícího těžká hepatocelulární postižení, kdy je nutná rychlá úprava hladin koagulačních faktorů, je výhodnější substituce koagulačních faktorů transfúzními přípravky (ČZP, koncentrát faktorů protrombinového komplexu). U maloabsorpčního syndromu a biliárního ikteru se podává K vitamín (Kanavit). Vzhledem k biologickému poločasu na vitamínu K závislých faktorů lze očekávat úpravu faktorů protrombinového komplexu za 12–24 hodin.

4.1.3.2.2. AUTOIMUNITNÍ A ALOIMUNITNÍ KOAGULOPATIE

U některých onemocnění většinou interního charakteru, mohou někteří jedinci vytvořit protilátku proti některému z vlastních koagulačních faktorů. Mluvíme pak o přítomnosti *cirkulujícího antikoagulans*.

Předpokládáme, že cirkulující antikoagulancia vznikají převážně mechanizmy imunologickými, většinou však neznáme přesný mechanismus jejich vzniku.

Jako cirkulující antikoagulancia se označují látky proteinové povahy, vesměs imunoglobuliny třídy IgG, které omezují funkční schopnost koagulačních faktorů. Nejvíce se vyskytují u nemocných se systémovým onemocněním pojiva, u myelomu a u lymfoproliferativních chorob. Inhibiční účinek může být namířen proti kterémukoliv koagulačnímu faktoru. Historicky nejznámějším je cirkulující antikoagulans proti faktoru VIII:C – vzniká *stav získané hemofilie A*.

Rovněž nemocný s vrozeným defektem např. hemofilik A může při opakovaných trasfúzích vytvořit protilátku proti F VIII jiného jedince. V tomto případě jde o koagulopatii získanou *aloimunizací*.

Nemocní v přítomnosti těchto imunoglobulinů mají krvácivé projevy různé intenzity, od snadné tvorby modřin, až po krvácení, které se objevuje po chirurgických výkonech.

Laboratorní nález

- *APTT*: prodloužený čas
- *PT*: prodloužený čas
- *TT*: prodloužený čas

Léčba: Tato skupina autoimunitních koagulopatií velmi špatně odpovídá na substituční léčbu. Protilátky vyvazují příslušný funkční faktor a jeho hladina v plazmě se snižuje:

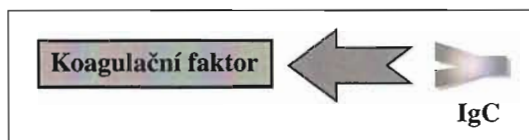
Přidaný faktor + protilátka → **[faktor . protilátka]**
Komplex je následně vyváznán MFS

Terapie je závislá na koncentraci inhibitoru. Při spontánním vymizení inhibitoru není léčba nutná, jinak se využívá plazmaferézy a imunosupresivní terapie. Při inhibici faktoru VIII se dnes nejčastěji podává F VIIa.

4.1.3.2.3. OSTATNÍ ZÍSKANÉ PORUCHY KOAGULACE

Krvácivý stav může nastat při předávkování antikoagulancii kumarinového typu nebo při otravách některými jedy. Krvácivé stavy může vyvolat i předávkování heparinem.

Blíže o kumarinových preparátech a heparinu viz kapitola: Antitrombotická léčba.



4.1.3.2.4. KRVÁCIVÉ STAVY Z JINÝCH PŘÍČIN

Konzumpční koagulopatie

(*Difusní intravaskulární srážení, Diseminovaná intravaskulární koagulace – DIK, diseminovaná intravaskulární formace fibrinu – DIFF, Disseminated intravascular coagulation – DIC*)

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIK) představuje získanou koagulační poruchu, při které dochází k významné aktivaci hemostázy s tvorbou nitrocévních mikrotrombů, spotřebě koagulačních faktorů, aktivaci sekundární fibrinolýzy a tendenci ke krvácení nebo významnému klinickému krvácení.

DIK se projevuje:

- *poklesem řady koagulačních faktorů a krevních destiček* z důvodu jejich zvýšené spotřeby. Nejcitlivěji reagují krevní destičky, sníží se jejich počet.
- *uvolněním velkého množství trombinu*, který štěpí fibrinogen. V krvi s pak objevují volné monomery fibrinu, které lze in vitro prokázat jejich precipitací s etanolem.
- *poklesem plazmatické hladiny, případně inaktivací inhibitorů krevního srážení*
- *aktivací fibrinolýzy*

Příčina onemocnění: Nadměrná spotřeba krevních destiček a plasmatických koagulačních faktorů po dobu chorobné aktivace hemostázy. *Aktivace bývá vyvolána záněty, rozpadem tkáně, poruchou krevního oběhu.*

Syndrom DIK je doprovodným jevem závažných stavů v řadě lékařských oborů. Klinicky může být němý, většinou se setkáváme s těžkými krvácivými nebo trombotickými projevy, často s obojím současně. Zejména u nemocných v šokovém stavu působí DIK nepříznivě svými patofyziologickými mechanismy na rozvoj krvácivého stavu se současnou blokádu mikrocirkulace a blokádu retikuloendoteliálního systému.

Diseminovaná intravaskulární koagulace patří k poměrně častým poruchám hemostázy. Vzniká nejčastěji při:

- *těžkých infekčních onemocněních různých orgánů* (sepsy – endotoxiny). Poškození cévní výstelky drobných cév v nemocných orgánech vede k aktivaci srážení krve v těchto cévách a ke vzniku mikrotrombů. Masivní vznik mikrotrombů je příčinou nadměrné spotřeby koagulačních činitelů.
- *uvolnění velkého množství tkáňového faktoru do krevního oběhu*. Příčinou bývá chorobný rozpad velkého množství buněk (při leukémii a při nádorových onemocněních, zadržovaný potrat a jiné).
- *uvolnění velkého množství fosfolipidů* (hemolýza). Po narušení buněčných a nitrobuněčných membrán dojde k uvolnění velkého množství fosfolipidů.

V průběhu DIK rozlišují někteří autoři 3 stádia:

- Hyperkoagulační
- Hypokoagulační
- Aktivace fibrinolýzy

Hyperkoagulační stádium

Klinické projevy: nemocný nemusí mít žádné potíže, mohou se objevit **mikrotrombózy orgánů, ale i velké trombózy a embólie**.

Laboratorní nález:

- APTT, TT, PT v normě (APTT může být i zkrácen)
- Trombocyty, fibrinogen: v normě, nebo lehce sníženy
- Fibrinové monomery: pozitivní
- AT: hladina pozvolna klesá

AT: pokles
F-M: +

Hypokoagulační stádium

Klinické projevy: objevují se **krvácivé projevy v důsledku zvýšené spotřeby faktorů**.

Laboratorní nález:

- APTT: prodloužen
- PT: prodloužen
- TT: prodloužen
- Fibrinogen: snížen
- Trombocyty: sníženy
- Fibrinové monomery a FDP: pozitivní test
- AT: snížen
- Faktory: sníženy

AT: snížen
F-M: +
APTT: prodloužen
PT: prodloužen
TT: prodloužen
Fbg: snížen
Plt: snížený počet

Léčba: substituce, heparin

Aktivace fibrinolýzy

Aktivace fibrinolytického systému je součástí rozvinuté DIK

Klinické projevy: následkem aktivace koagulace, v důsledku porušení zpětnovazebných a koagulačních mechanismů, dojde k nekontrolované fibrinolýze. Vyčerpají se všechny faktory a krev ztrácí schopnost se srážet – **těžké krvácivé projevy**

Laboratorní nález: většina testů neměřitelná

Léčba: antifibrinolytika

Neměřitelné
hodnoty testů

Antitrombinová aktivita, jejíž úlohou je vyvážení aktivního enzymu trombinu (zejména působení antitrombinu) se může postupně vyčerpávat. FDP naopak svým antipolymeračním účinkem mohou poruchu hemostázy zhoršovat.

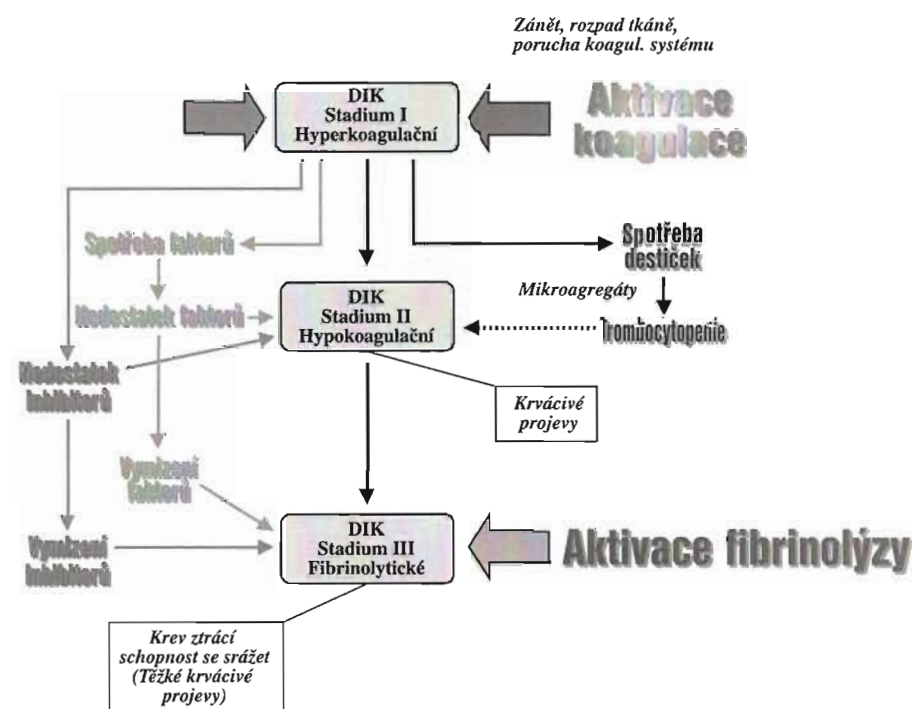
Po dobu aktivace nitrocévního srážení krve je úlohou **aktivovaného fibrinolytického systému** vzniklé tromby odbourat. Je-li jich mnoho, může se tento systém rovněž vyčerpávat.

DIK může postupně procházet všemi stádii, ale může mít i akutní průběh a projev se ihned krvácivým stavem s prakticky nesrážlivou krví. Diagnóza DIK musí být stanovena rychle, a proto všechny testy, které se k diagnostice DIK používají musí mít povahu statimových testů.

LABORATORNÍ TESTY, KTERÉ SE POUŽÍVAJÍ U DIK JSOU TESTY ZAMĚŘENÉ NA ZJIŠTĚNÍ AKTIVAČNÍHO PŮSOBNÍ TROMBINU A PLAZMINU.

Léčba: Terapie DIK je dána určitou strategií a podle klinických druhů a fází onemocnění je možno volit u jednotlivých nemocných individuální taktiku, pokud jde o množství a rychlost podávaných přípravků, délku a intenzitu terapie. Intenzitu terapie ovlivňuje mohutnost krvácivého stavu a orgánové dysfunkce. Kauzální princip v léčbě DIK musí být zachován, což v praxi představuje širokou škálu léčebných opatření.

VÝVOJ DIK



Krvácivé stavy z aktivace primární fibrinolýzy

Fibrinolytický systém plní řadu fyziologických funkcí, nejdůležitější z nich je štěpení fibrinu proteolytickým enzymem plazminem, který vzniká aktivací plazminogenu. Fibrinolytický systém udržuje v rovnováze inhibitory plazminu, které snižují i riziko degradace systémového fibrinogenu. Při fibrinolýze vznikají štěpné produkty (FDP), které mohou rovněž inhibovat koagulaci. Výraznější aktivace fibrinolytického systému může vést rovněž ke krvácivým projevům.

Krvácivé fibrinolytické stavy se zvýšené fibrinolýzy

Jde o krvácivé stavy vyvolané zvýšenou fibrinolytickou aktivitou bez předchozí intravaskulární tvorby fibrinu. Vyskytují se poměrně vzácně. Dochází při nich k aktivaci plazminového systému a lýze fibrinogenu. Dále dochází k významnému vyplavení aktivátoru plazminogenu a současně je utlumen antiplazminový systém. Projeví se proteolytický efekt plazminu na fibrinogen a ostatní proteinové koagulační faktory. Může jít i o vrozený nedostatek inhibitorů plazminu.

Klinické projevy: aktivace primární fibrinolýzy provází nádorová onemocnění prostaty, pankreatu, plic a stavy po operaci těchto nádorů. Onemocnění se projevuje kožním i slizničním krvácením. Vyskytují se převážně sufúze a hematomy, nebývají přítomny petechie, protože nebývá trombocytopenie.

Laboratorní nálezy

- *Fibrinogen:* snížen
- *FDP:* zvýšená hladina v plazmě
- *Euglobulinová fibrinolýza:* zkrácený čas

Vzhledem ke zvýšené lýze proteinových koagulačních faktorů plazminem jsou prodloužené časy APTT a PT a bývá snížena hladina antitrombinu.

Léčba: Po odlišení DIK jsou u tohoto onemocnění základním lékem antifibrinolytika. Hemoterapie nebývá většinou nutná.

Literatura

Aldrich, R. A., Steinberg, A. G., Campbell, D. C.: Pedigree demonstrating a sex linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 13, 1954, s. 133.

Bernard, J., Soulier, J. P.: Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragipare congénitale. *Sem. Hôp. Paris* 24, 1948, s. 3217.

Biggs, R. et al.: Christmas Disease. *B. M. J.* 2, 1952, s. 1378–1388.

Cahill, M.R., Colvin, B. T.: Haemophilia. *Postgrad. Med. J.* 73, 1997, s. 201–206.

Frank, E.: Die essentielle Thrombopenie (Konstitutionelle Purpura-Pseudo-Hämophilie). I. Klinisches Bild. II. Pathogenese. *Berlin. Klin. Wochenschr.* 52, 1915, s. 454–458 (I.), 490–494 (II.).

Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenmann, R. E., Oechslin, R.: Hämolytisch-urämische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 85, 1955, č. 38/39, s. 905–909.

George, J. N.: Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Practice Guideline. (ASH): *Blood* 88, 1996(a), s. 3–40.

George, J. N.: Diagnosis, clinical course and management of ITP. *Current Opinion. Hematol.* 3, 1996(b), s. 335–346.

Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S. et al.: Hemophilia B: Database of point mutations and short additions and deletions. 7th edition. *Nucleic Acid Res.* 25, 1997, s. 133.

Glanzmann, E.: Hereditäre hämorrhagische Thromboasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen. *Jahrb. Kinderheilk* 88, 1918, s. 1–42, 113–114.

Greinacher, A.: Antigen generation in heparin – induced thrombocytopenia: The nonimmunologic type and the immunologic type are closely linked in their pathogenesis. *Semin. Thromb. Haemost.*, 21, 1995, č.1, s. 106–116.

Green, D., Lechner, K. A.: A survey of 215 non-haemophilic patients with inhibitors to factor VIII. *Thromb. Haemost.* 45, 1981, s. 200–203.

Hay, C. R.: Acquired Haemophilia. *Baillière's Clinical Haematology* 11, 1998, č. 2, s. 287 – 303.

Hegglin, R.: Gleichzeitige Konstitutionelle Veränderungen an Neutrophilen und Thrombozyten. *Helv. Med. Acta* 12, 1945, s. 439–440.

Hemophilia. First Edition 1997, ed. New York: Chapman and Hall Medical, 1997.

Kasper, C. K., Aledort, L., Arosen, D., Counts, R., Edson, J. R. et al.: Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 1975, č. 2, s. 612.

Kelton, J. G.: Autoimmune Thrombocytopenia. *Educational Semin. ISH-EHA Congress Amsterdam* 1998, s. 1–7.

Lichtin, A.: The ITP Practice Guideline. *Blood* 88, 1996, s. 1–2.

Lopéy, J. A.: The platelet glycoprotein Ib–IX complex. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 5, 1994, s. 97

May, R.: Leukocyten einschließen. *Kasuistische Mitteilung. Deutsches Arch. Klin. Med.* 96, 1909, s. 1–6.

Modderman, P. W., Admiraal, L. G., Sonnenberg, A., von der Borne, A. E.: Glykoproteins V and Ib–IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 1992, s. 364

Moscowitz, E.: Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc. N.Y. Pathol. Soc.* 24, 1924, s. 21–23.

Roth, G. J.: Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine – rich glykoproteins. *Blood* 77, 1991, s. 5

Ruggeri, Z. M., Marco, L. D., Gatti, L., Bader, R., Montgomery, R. R.: **Platelets have than one binding site for von Willebrand factor.** J. Clin. Invest 72, 1983, s. 1983

Sadler, J. E.: **A revised clasification of von Willebrand Disease.** Thromb. Haemost. 71, 1994, č. 4, s. 520–525.

Shapiro, S. S., Rajagopalan, V.: **Hemorrhagic disorders associated with circulating inhibitors.** In: Ratnof, O. D. Forbes, C. D. editors. Disorders of Hemostasis, New York, W.B. Saunders Company, 1996, s. 208–225.

Scharrer, I., Bray, G. L., Neutzing, O.: **Incidence of inhibitors in hemophilia A patients – a review of recent studies of recombinant and plasma – derived factor VIII concentrates.** Haemophilia 5, 1999, č. 3, s. 145–154.

Thompson, R., Chen, S. H.: **Characterization of factor IX defects in hemophilia B patients.** Methods Enzymol. 222, 1993, s. 143

Warkentin, T. E., Levine, M. N., Hirsch, J. et al.: **Heparin – induced trombocytopenia in patients treated with low-molecular – weight heparin or unfractionated heparin.** N. Engl. J. Med. 332, 1995, s. 1330–1335.

Werthof, P. G.: **Cautiones medicae de limitandis laudibus et uituperiis morborum et remediorum.** Hannoverac: Sumtibus Haeredum Nicolai Foersteri, 1734.

Wiskott, A.: **Familiarer, angeborener Morbus Werlhofi?** Monatsschr. Kinderheilkd. 68, 1937, s. 212–216.

WFH – World federation of Hemophilia: **Global Survey on Hemophilia 1999.** World Federation of Hemophilia, Montreal, Quebec, Canada 1999

4.2. Trombotické a trombofilní stavy

*Motto: Plížilo se to pozvolna, hlouběji a hlouběji . . .
doprava – doleva – daleko a široko
– se sténáním prokleté duše;
k mému srdci plíživým krokem tygra.
E. A. Poe: Jáma a kyvadlo*

4.2.1. Trombotické stavy

Trombotické stavy jsou chorobné stavy, charakterizované příhodami nitrocévního srážení (trombózami). Představují opak stavů krvácivých, u kterých se hemostatická rovnováha narušuje opačným směrem.

Obecně jejich příčina pravděpodobně tkví:

- V poškození cévní stěny
- V poruše hemodynamiky
- Ve složení a funkci krve
 - ◆ V poruše destičkových funkcí
 - ◆ V narušení plazmatického koagulačního systému včetně inhibitorů
 - ◆ V narušení fibrinolytických mechanismů



□ *Tuto triádu příčin možného narušení hemodynamiky, které mohou vést k tromboze postuloval Virchow již v roce 1856 (Virchow, 1856).*

U těchto stavů nacházíme v krevním oběhu aktivované formy činitelů hemostázy a může docházet ke vzniku drobných, či větších **trombů**. Trombotický stav může provázet řadu cévních onemocnění a ve svém konečném důsledku může být příčinou **tromboembolické příhody**, to je stavu, při kterém dojde k uvolnění trombu a následnému ucpání některé z důležitých cév uvolněným trombem – **embolem** (Alving, 1996).



Trombus

Z nejzávažnějších je to infarkt myokardu, způsobený většinou ucpáním věnčitých tepen trombem, plicní embolie a náhlá cévní příhoda mozková (ictus). Patří sem i trombózy žil, hlavně končetinových (Tabernero a spol., 1991).

- ❑ *Poprvé popsal diagnózu úplného uzávěru věnčité tepny v první polovině 19. století Quian.*

Cévní onemocnění je dnes nejčastější příčinou úmrtí v civilizovaných zemích. Koronární trombóza, plicní embolie a onemocnění periferních cév tvoří polovinu všech úmrtí.

- ❑ *Podpora integrity cévní stěny vyžaduje normální funkci jak cévního endotelu, tak cirkulujících destiček (Frenette a spol., 1998). Ačkoli **endotelové buňky** nemají za normálních okolností trombogenní povrch mohou se stát **prokoagulačními za určitých okolností**. Např. při stimulaci endotoxinem, interleukinem 1 (IL-1) nebo tumor nekrotizujícím faktorem (TNF- α). Endotelové buňky syntetizují tkáňový faktor a ostatní prokoagulační proteiny, které mohou vyvolat trombózu u pacientů s chronickými zánětlivými procesy.*
- ❑ ***Stimulované endotelové buňky také odhalují různé adhezivní molekuly.** Mezi ně patří selektiny uvolněné adhezivní interakcí mezi leukocyty, destičkami a endotelem (Frenette a spol., 1998). **P-selektin** je skladován ve Weibel-Paladeho tělískách endotelových buněk a v α -granulích krevních destiček (Kansas, 1996; Tedder, 1995; Bevilacqua a spol., 1987).*

Hemostáza se může aktivovat v místě:

- poškození cévní stěny
- stagnujícího krevního proudu

a) poškození cévní stěny

Aterosklerotická cévní stěna (odtržený endotel, vyklenutý a popraskaný aterosklerotický plát a pod.) **stimuluje krevní destičky**. Dochází k jejich aktivaci a adhezí a současně k aktivaci zevního systému koagulační kaskády TF uvolněným z destabilizovaného plátu (Toshi a spol., 1997; Fernandez – Ortiz a spol., 1994, Badimon a spol., 1999). Po změně konformace membránových glykoproteinů krevní destičky dochází k agregaci trombocytů s následnou tvorbou **nástěnného trombu**. Stabilita trombu je dána obsahem fibrinu, který je úměrný intenzitě aktivace koagulačního systému. Nástěnné tromby ve velkých tepnách, přisedlé k defektní stěně a vystavené rychlému toku okolní krve, jsou zdrojem embolů s převažujícím obsahem agregovaných trombocytů, s krystaly cholesterolu a ateromatózní drti (Topol a spol., 1997).

K prevenci arteriálních trombóz se s výhodou využívá **léčby antiagregační**.

b) stagnující krevní proud

V místech **krevní stagnace** je naopak převažujícím mechanismem vzniku trombózy **hemokoagulace**. Proti ní zaměřujeme **léčbu antikoagulační**.

Stagnační tromby, bohaté na fibrin a erytrocyty, pocházejí naopak spíše ze srd-

ce, případně ze stagnačních městků v žilách dolních končetin a pánve. Embolizují do mozku buď z levého srdce, nebo vzácně z žil velkého oběhu v případě otevřeného foramen ovale. Vzniklá koagula setrvávají po určitou dobu v místě svého vzniku, podle hemodynamických okolností se však mohou posléze uvolnit a odcestovat s proudem krve jako **emboly** (Rodgers, 1998).

Z těchto pohledů rozlišujeme trombózy:

- **žilní** – jsou velmi úzce spjaty s hyperkoagulačními stavy. Při žilní trombóze dominuje především krevní stáza a hyperkoagulace v plazmatickém systému.
- **arteriální** – při arteriální trombóze se uplatňuje především poškození endotelu a zvýšená agregabilita krevních destiček (Alving, 1993).

Z tohoto odlišného pohledu na oba systémy vyplývá i **léčebná prevence těchto stavů:**

- v **žilním** systému – nefrakcionovaný a nízkomolekulární heparin, kumariny
- v **arteriálním** řečišti – acetylsalicylová kyselina (Acetyl Salicylic Acid – ASA) a další inhibitory destičkových funkcí.



4.2.1.1. Venózní trombózy

V klinické praxi jsou žilní tromboembolické komplikace daleko častější než krvácivé stavy.

Příčiny vzniku venózní trombózy

- **snížená hladina inhibitorů krevního srážení.** Jde hlavně o inhibitory plazmatického koagulačního systému. Inhibitory fibrinolýzy hrají méně významnou úlohu (Heijboer a spol., 1990).
- **únik tkáňového faktoru** do krevního oběhu (např. u chirurgických výkonů) může vyvolat vznik trombu do pravého srdce a odtud do plic je potom příčinou plicní embolie.
- **zpomalení cirkulace krve** žilním řečištěm může přispět k aktivaci nitrocévního srážení krve.
- **hluboké a rozsáhlé poškození krevních kapilár**
- **rozpad cévního endotelu** vyvolaný bakteriemi, či jinými toxiny vede k silnému podnětu ke spuštění hemostatické reakce, při které vznikají mikrotromby v cévním řečišti.

Trombotická mikroangiopatie má za následek přerušení cirkulace v postižené oblasti s eventuálním postupným odumřením okolní tkáně. Vznikají-li tromby v kapilárách u většího počtu tkání a orgánů, hovoříme o **DIK**.

Získané rizikové faktory venózní trombózy

- Věk nad 45 let
- Obezita
- Velké operace a operace ortopedické
- Poranění (včetně popálenin)
- Imobilizace
- Nádorová onemocnění
- Tromboembolická nemoc (TEN) v anamnéze
- Varixy
- Kouření
- Hormonální léčba
- Těhotenství



První zmínka o případu venózní trombózy v písemnictví



Venózní trombus

4.2.1.2. Arteriální trombózy

Při vzniku **arteriální trombózy** byla **stěžejní úloha připisována aterosmatózním změnám stěny cévní**. Tyto patologické procesy směřující k trombóze se rozvíjejí většinou až ve druhé polovině života.

Stadia aterosklerotického procesu

- ◆ **zvýšené vystavení stěny cévy chemickým nebo biologickým vlivům.**

- z **chemických vlivů** přispívají k poškození endotelu: vyšší hladina LDL a homocysteinu, tabákový kouř, nedostatek kyslíku v organismu.
- z **biologických vlivů** postihuje endotel cytomegalovirus a některé další infekce.
- Dalšími příčinami bývají **mechanická poškození endotelu**.

- ◆ **porucha funkce a poškození endotelu.** V tomto stádiu se zhorší možnost rozšířit průsvit cévy (relaxace) a zvýší se přilnavost endotelových buněk.

- ◆ **vznik pěnových buněk z monocytů a makrofágů a tvorba aterosklerotického plátu.** Důsledkem tohoto jevu je sklon k vazokonstrikci cév, k tvorbě destičkové krevní sraženiny (trombu) a konečně k proniknutí zánětlivých buněk do cévní stěny.

- ◆ **porušení stability a prasknutí plátu**

Tvorba trombu na roztrženém aterosklerotickém plátu představuje hlavní patogenetický mechanismus vzniku akutních koronárních syndromů – infarktu myokardu (IM) a anginy pectoris:

- ☐ **IM** je důsledkem úplného uzavěru koronární arterie
- ☐ **angina pectoris** je převážně způsobena tvorbou trombu na cévní stěně s neúplným uzavěrem koronární arterie. Dochází k zúžení průsvitu arterie, ne k jejímu uzavěru.

Metabolicky velmi aktivní pláty se vyznačují značnou aktivitou polymorfonukleárních leukocytů a monocytů. **Nejčastěji praskají měkké pláty s tenkým krytem, které jsou bohaté na lipidy a makrofágy.**



Tvorba trombu na aterosklerotickém plátu

Na vzniku koronární trombózy se podílí interakce cirkulujících elementů, především monocytů a krevních destiček. Aktivované monocyty po stimulaci P-selektinem exprimují TF, řadu cytokinů a matrixové metaloproteinázy. Metaloproteinázy štěpí kolagen v kryptu plátu a vyplavují TF do cévního řečiště (*Demers a spol., 1992*). Kromě uvolňování z ateromatózního plátu je TF produkován též aktivovanými krevními elementy. **TF pak hraje klíčovou roli při vzniku koronárního trombu:**

1. Vytvoření komplexu [TF . VIIa]
2. Aktivace F X na Xa
3. Tvorba komplexu [TFPI . Xa]
4. Inaktivace komplexu [TF . VIIa] komplexem [TFPI . Xa] za vzniku tetramerního komplexu [TF . VIIa . TFPI . Xa]

Tento komplex je reverzibilní a **poměr mezi jeho genezí a uvolňováním jednotlivých složek určuje aktuální stav protrombotických a antitrombotických pochodů.**

- ❑ *Ve studiích bylo prokázáno, že heparin snižuje produkci TF in vitro a současně vyvolá pokles prokoagulační aktivity monocytů.*

Mechanismus vzniku tepenného trombu

Mechanismus vzniku trombu v tepenném řečišti je odlišný od tvorby hemostatické zátky. Vznik arteriálního trombu probíhá následovně:

1. **adheze** destiček
2. **aktivace a kontrakce** destiček
3. **adherence** k rozpoznaným tromboaktivním substrátům poškozené části arteriální cévní stěny (např. vWF, vlákna kolagenu, fibronectin, vitronectin, laminin)
4. **rozprostranění** destiček na poškozeném cévním povrchu
5. **agregace** dalších přilehlých destiček
6. **aktivace koagulační kaskády** s tvorbou fibrinu
7. vznik **bílého trombu** tvořeného převážně krevními destičkami – překrývá vrstvy nejbližší k poškozené cévní stěně
8. vychytávání erytrocytů, neutrofilů a ojedinelé monocytů v dalších vrstvách vznikajícího **červeného trombu**.



Úloha krevních destiček při vzniku arteriální trombózy

Krevní destičky se uplatňují nejen při samotném vzniku arteriální trombózy, ale podílejí se také na zánětlivých změnách, které probíhají v koronárním plátu. Při poškození cévní



Řez tepnou s drobnými agregáty destiček (šipky)

stěny dochází k adhezi krevních destiček na místa s chybějící endoteliální výstelkou. Vrstva adherentních destiček v místě poškození představuje v zásadě jednu ze složek, které se snaží zajistit reparativní proces. V tomto procesu dochází k obnově průtoku cévní stěnou. Záleží pak na rovnováze proagregačních a protiagregačních mechanismů, zda tento děj přestoupí do tvorby destičkového trombu.

Aktivace krevních destiček může probíhat dvojí cestou:

- **Zvýšení střížných sil v intaktní endoteliální vrstvě** – v důsledku vazokonstrikce nebo při vzniku významné koronární stenózy. Tento pochod je zprostředkován vWF a GP Ib/IX a GP IIb/IIIa.
- **Reparativní proces** – zprostředkován vazbou vWF na GP Ib/IX/V nebo vazbou na kolagen.

Nejsilnější aktivátory cirkulujících neaktivních destiček jsou ateromatózní **lipidové části plátu, kolagen, trombin a cirkulující katecholaminy**. Další aktivátor destiček – **ADP** je uvolňován jednak z hemolyzovaných červených krvinek a jednak ze samotných krevních destiček. Uvolněný **serotonin a tromboxan A₂** podporují další agregaci destiček a navíc i koronární vazokonstrikci. Dochází k aktivaci destičkové **proteinkinázy C** a prostřednictvím aktivace cesty cyklooxygenázy i k expozici destičkových fibrinogenových receptorů – glykoproteinového komplexu **GP IIb/IIIa**.

- ❑ *Na povrchu krevní destičky jsou receptory pro adhezivní proteiny. Ze skupiny integrinů jsou to především GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP Ic/IIa, fibronectinový a vitronectinový receptor. Na klidové destičce je přítomen i receptor pro vWF (GP Ib), který zprostředkovává adhezi destiček k obnaženým subendoteliálním vrstvám.*
- ❑ *Důležitým receptorem na aktivovaných krevních destičkách je glykoprotein IIb/IIIa, který je receptorem pro fibrinogen, fibronectin, vWF, vitronectin a trombospondin. Fibrinogen má dvě místa, kterými rozeznává receptor GP IIb/IIIa a proto může zprostředkovat interakce dvou destiček mezi sebou a je základním mechanismem vedoucím k agregaci destiček.*
- ❑ *Zcela zásadní roli při vzniku tepenného trombu hraje i proteolytický enzym trombin. Jak již bylo uvedeno, je jedním z hlavních aktivátorů destiček a navíc tím, že odštěpuje z fibrinogenu fibrinopeptidy A a B se podílí na tvorbě nerozpustného fibrinu. Vytvořená vlákna fibrinu zpevňují destičkový trombus.*

4.2.1.3. Laboratorní markery trombogeneze a trombofilie

Zavedení nových vyšetřovacích metod pro stanovení molekulových markerů podstatně ovlivnilo možnosti v diagnostice a prevenci trombogeneze a trombofilie. Molekulové markery jsou molekuly nejčastěji na bázi proteinů. Umožňují v mnohých případech stanovit změny hemostatických mechanismů in vivo.

Molekulové markery popisují fyziologii a patofyziologii hemostázy:

- Při dysfunkci endotelu – **endotelové markery** (vWF, trombomodulin, solubilní TF, TFPI, adhezivní proteiny: E-selektin, ICAM-1, VCAM-1). Endotelové markery slouží k odlišení časně endotelové dysfunkce (aktivace endotelu) od jeho pozdějšího závažnějšího poškození. vWF byl původně zaveden jako marker poškození endotelu, v současnosti je spíše považován za známku chronické aktivace endotelu. Zvýšené hladiny trombomodulinu a TFPI jsou známkami výraznějšího poškození endotelu. Zvýšené hladiny TFPI se nachází při vaskulopatiích v souvislosti s poškozením povrchových endoteliálních proteoglykanů. Vzhledem k tomu, že jeho hladina se mění v závislosti na hyperlipidémii je vhodnější vyšetřovat antigen volného TFPI. Hladina solubilního TF má klinický vztah k různým vaskulopatiím a indukci endotelové exprese TF zánětlivými látkami in vitro. tPA je považován též za endotelový marker, protože je tvořen a uskladněn v endotelu v granulích odlišných od Weibel-Paladeho (WP) tělísek.
- Při aktivaci krevních destiček – **markery krevních destiček** (povrchové antigeny, a dále PF4, β -TG, TXA₂). Trombocytové markery jsou proteiny uskladněné v α -granulích krevních destiček a jsou uvolňovány z krevních destiček při jejich aktivaci. Výhodou těchto parametrů je, že odráží stav aktivace destiček in vivo.
- Při aktivaci koagulačních procesů – **markery aktivace koagulace** (stanovují se aktivační peptidy plasmatických faktorů nebo komplexy faktorů s inhibitory – F I + 2, TAT komplexy, fibrinopeptid A, aktivační peptidy faktorů IX a X, fibrinové monomery, F VIIa)
- Při aktivaci fibrinolýzy – **markery aktivované fibrinolýzy** (FDP, D-diméry, PAP komplexy – [plasmin.antiplasmin], celková fibrinolytická aktivita).

4.2.2. Trombofilní stavy

(**Trombofilie** z řeckého „*thrombophilia*“ – je predispozice ke vzniku trombóz, podobně jako hemofilie z řeckého „*haemophilia*“ je predispozicí ke vzniku krvácivých stavů.)

V posledních letech se podařilo prokázat u celé poloviny nemocných s tromboembolickou nemocí **vrozenou poruchu v regulaci procesu krevního srážení**, která způsobuje zvýšené riziko této nemoci. Tyto stavy se objevují zejména u **jedinců mladšího věku (pod 40 let) a často mají charakter rodinného onemocnění**.

TROMBOFILIE JE Tedy VROZENÁ NEBO ZÍSKANÁ PORUCHA HEMOSTATICKÉHO MECHANISMU, KTERÁ JE PRAVDĚPODOBNOU PŘÍČINOU ZVÝŠENÉ TENDENCE K TROMBÓZE.

Rozlišujeme trombofilní stavy:

- ☐ **vrozené (kongenitální)**
- ☐ **získané (sekundární)**

4.2.2.1. Vrozené (kongenitální) trombofilní stavy

Během posledních 30 let bylo zjištěno celkem 7 genetických faktorů spojovaných se zvýšeným rizikem venózní trombózy a nachází se další:

- **Dysfibrinogenémie:** byla popsána Beckem a spolupracovníky v roce 1965 (Beck a spol., 1965). Od té doby bylo zjištěno celkem 15 různých mutací genů fibrinogenu α , β a γ , které vedou k syndromu dysfibrinogenémie. Nejznámější je mutace β -fibrinogenu (455 G→A), při které dochází ke zvýšení hladiny fibrinogenu v plazmě, zvýšení viskozity krve a plazmy a ke zvýšené agregaci erytrocytů.
- **Rezistence na aktivovaný protein C (APC-R):** jde o genetické defekty spojované s jednobodovou mutací genu, který generuje faktor V (Bertina a spol., 1994). APC rezistence byla poprvé popsána v roce 1993 Dahlbäckem (Svenson a Dahlbäck, 1994).
- **Deficience antitrombinu** byla poprvé oznámena Egebergem v roce 1964 (Egeberg, 1967). Je to autosomálně dominantní porucha u heterozygotů. Podle kvantity, aktivity a schopnosti vázat heparin se dělí na 3 typy. Defekt se projevuje hlavně trombózami hlubokých žil, většinou dolních končetin a plicní embolií. První projevy se objevují v pubertě, u žen v období těhotenství.
- **Deficience proteinu C** byla poprvé popsána v roce 1981 Griffinem a spol. (Griffin a spol., 1981). Projevuje se již v dětství jako závažná predispozice. Jedná se o geneticky velmi různorodé onemocnění, u kterého známe více než 160 mutací genu proteinu C (Reitsma a spol., 1995). Klinickým výrazem poruchy systému proteinu C bývají žilní, ale i arteriální trombózy (Engesser a spol., 1987). Zvláštním syndromem je purpura fulminans novorozenců u homozygotů a tzv. kumarinové nekrózy při zavádění léčby perorálními antikoagulanty (Devine a Brigden, 1996).
- **Deficience proteinu S** byla poprvé popsána Compem a spol. v roce 1984 (Comp a spol., 1984). Také u proteinu S je známo kolem 70 mutací genu (Aiach a spol., 1995).
- **Mutace protrombinu** spojená s 20210 A alelou protrombinového genu – F II 20 210. Byla poprvé popsána v roce 1996 Poortem a spol. (Poort a spol., 1996).
- **Homocystein** – nachází se hyperhomocystémie, která je charakterizována zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi.
- **Některé další polymorfismy vedoucí k arteriální nebo venózní trombóze:**
 - **GP Ia** – mutace v genu se záměnou C 807 T. Zvyšuje se riziko infarktu myokardu zejména u mladých jedinců.
 - **TFPI** – mutace v genu se záměnou C 536 T. Zvyšuje se riziko venózní trombózy mutace v **TM a EPCR** (endotelový receptor pro PC)
 - **PAI 1** – mutace v genu se záměnou 4G/5G. Může zvyšovat riziko dvěma různými mechanismy:
 - ◆ Depozita fibrinu tvořící základ aterosklerotických plátů spolu s vysokou lokální koncentrací PAI 1 podporují tvorbu aterosklerotických plaků.

- ♦ Mechanismus u infarktu myokardu je odlišný. Trombóza vzniká v místě ruptury aterosklerotického plátu. Zvýšené koncentrace PAI zřejmě způsobují koronární trombózu vyvoláním protrombotického stavu.

Prevalence u jednotlivých rizikových faktorů trombofilie:

	Prevalence trombofilie
FV-Leiden (Svenson a Dahlbäck, 1994)	20–50 %
defekty proteinu C (Griffin a spol., 1993)	2–5 %
defekty antitrombinu (Demers a spol., 1992)	2–4 %
defekty proteinu S (Engesser a spol., 1987)	2–5 %
antifosfolipidový syndrom (Devine a Brigden, 1996)	2–3 %
deficience fibrinogenu	1 %
abnormality fibrinolýzy*	10–15 %
defekt protrombinu spojený s jednobodovou mutací alely A20210 protrombinového genu	15–20 %
hyperhomocystémie (> než 18,5 mmol/l)	7–10 %
neznámé faktory	3–5 %

* patří k nim abnormality plazminogenu, t-PA, nebo PAI

4.2.2.1.1. REZISTENCE NA AKTIVOVANÝ PROTEIN C (APC-R)

Rezistence na aktivovaný protein C představuje **nedostatečnou nebo vůbec žádnou odpověď na aktivovaný protein C**. Popisuje tedy odolnost koagulačního systému vůči inhibičnímu vlivu proteinu C na koagulačně aktivní faktory Va a VIIIa (Poort a spol., 1996).

Vrozená APC-R může být vyvolána:

- **jednobodovou mutací genu pro koagulační faktor V** (Leidenská mutace, Cambridge mutace) 90–95 % případů
- **postižením dnes neznámým defektem** 5 – 10 % případů

FAKTOR V-LEIDEN

(Factor V-Leiden mutation (F-V-LM))

Mutace vznikla asi před 20–30 tisíci lety, pravděpodobně již po oddělení asijské populace (proto se u asijské populace prakticky nevyskytuje). U evropské populace se vyskytuje u 3–5 % jedinců (Topol, 1997).

Geneticky se u postižených nachází mutace faktoru V (Bertina, 1997). Jde o **bodovou mutaci v exonu 10 genu**

F V	Ser-Leu-Asp-Arg-Gly-Ile-Gln...
F V Leiden	Ser-Leu-Asp-Gln-Gly-Ile-Gln...

kódujícím **F V**, kde v pořadí nukleotidů **dochází k záměně G za A** (G 1691 A). Vzniklý triplet kóduje v proteinu (F V) v pozici 506 místo aminokyseliny argininu (Arg), glutamin (Gln):

F V Q 506 (Leiden)

C A A

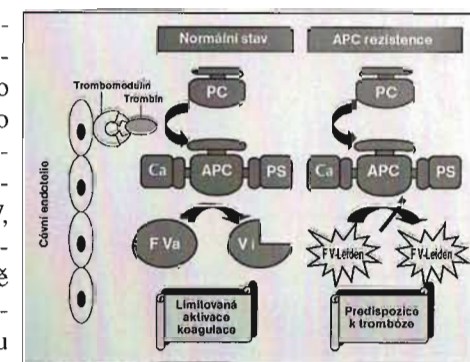
Arp – Gln – Gly

F V

C G A

Arp – Arg – Gly

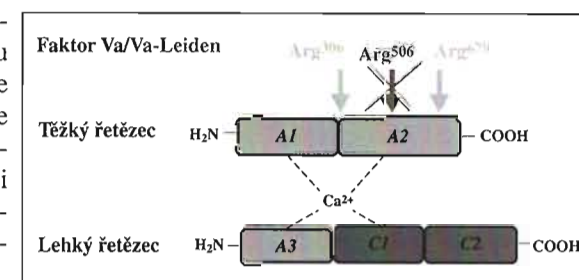
U Leidenské mutace je snížený inhibiční vliv APC na aktivovaný koagulační systém dán výskytem patologického faktoru Va (faktor Va-Leiden). Tento faktor má normální prokoagulační aktivitu, ale nedá se proteolyticky štěpit aktivovaným proteinem C. Varianta F V, která má v pozici 506 místo aminokyseliny argininu glutamin má výrazně sníženou kofaktorovou aktivitu a inaktivace faktorů Va a VIIIa v systému [APC . PS . Ca²⁺ . PI] je velmi pomalá:



Účinek FV a FV Leiden v systému Proteinu C

Arg⁵⁰⁶ → Gln → F Va R506Q

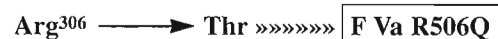
Vlivem této mutace neprobíhá v systému proteinu C štěpení těžkého řetězce faktoru Va. Faktor zůstává ve své aktivované podobě, nedochází k jeho inaktivaci a může se podílet v komplexu protrombinázy na zvyšování hladiny trombinu.



CAMBRIDGE MUTACE

(Faktor V-Cambridge)

V tomto případě jde o jednobodovou mutaci faktoru V (Williamson a spol., 1998), který má v pozici 306 místo aminokyseliny argininu (Arg) aminokyselinu threonin (Thr):



Výskyt: asi u 2–3 % mutací faktoru V

Vliv APC-R na funkci aktivovaného proteinu C

Protože se sníží rychlost štěpení faktoru Va vlivem APC, dochází jen pozvolna k jeho inaktivaci (*Badimon a Badimon, 1996*). To zvyšuje stabilitu protrombinového komplexu a může dojít k rozvinutí hyperkoagulačního stavu a k riziku trombózy.

- ☐ *Vrozená rezistence na aktivovaný protein C je hlavním rizikovým faktorem pro vznik venózní trombózy (Bertina, 1997). Byla zjištěna u 20–60 % nemocných touto chorobou a u 2–7 % jedinců běžné populace. Homozygoti mají vyšší riziko vzniku trombózy než heterozygoti, u kterých je 50 % F V s normální skladbou aminokyselin.*

Získaná APC-R

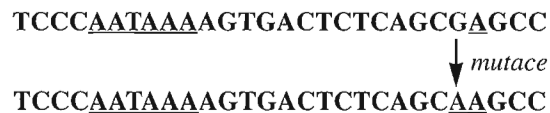
Získaná APC-R nastává v důsledku stavů, které způsobují dysbalanci mezi prokoagulačními a antikoagulačními proteiny hemostázy ovlivňující reakce používaných laboratorních vyšetření (zvýšení hladiny F VIII, zánět, těhotenství, hormonální antikoncepce, antikoagulační léčba, lupus antikoagulans, defekty proteinu C a S). Získaná APC-R je provázena stejným rizikem vzniku trombózy a klinické projevy se podobají klasické APC-R.

Laboratorní stanovení APC – R

- ◆ Funkční testy (koagulační, chromogenní substráty)
- ◆ Vyšetření genotypu

4.2.2.1.2. DEFEKT 20210 A ALELY PROTROMBINU (FII 20210)

Tento defekt byl poprvé popsán Poortem a spol. v roce 1996 (*Poort a spol., 1996*). Jde o polymorfismus genu pro tvorbu protrombinu v 5. exonu, spojený s vysokou hladinou protrombinu. Podobně jako APC-R je i tento defekt vyvolán jednobodovou mutací. Defekt je spojený se záměnou G za A v pozici 20210 protrombinového genu (G 20210 A).



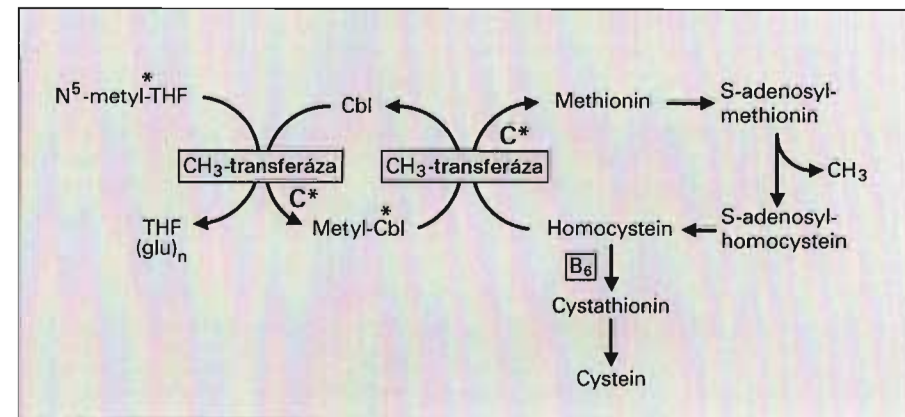
4.2.2.1.3. HYPERHOMOCYSTEINÉMIE

Porucha spojená s homocysteinem se projevuje zvýšenou hladinou homocysteinu v krvi – **hyperhomocystémií**. Je vyvolána genetickou mutací některého enzymu cyklu methioninu, nejčastěji **5,10 methylenetetrahydrofolát reduktázou**.

Homocystein je metabolit degradace methioninu. Za normálních okolností může být metylován zpětně na methionin enzymem *methioninsyntázou*. V metabolismu homocysteinu hrají významnou roli 3 enzymy:

- **Cystathionin-β-syntáza (CBS)**
- **Methionin-syntáza (MS)**
- **5,10 methylenetetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)**

CYKLUS METHIONINU



Fyziologické meze homocysteinu:		< 30 let	4,6–8,1 μmol/l
		30 – 59 let	ženy: 4,5–7,9 μmol/l
			muži: 6,3–11,2 μmol/l
		> 59 let	5,8–11,9 μmol/l

Hyperhomocysteinemie může být:

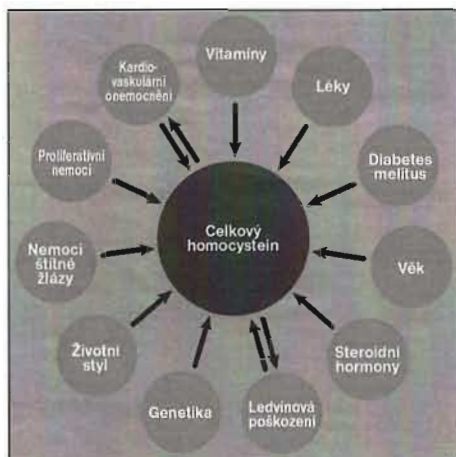
- ☐ *vrozená*
- ☐ *získaná*

Vrozená hyperhomocystemie je vyvolána většinou přítomností mutované termolabilní formy MTHFR. **Mutace** spočívá v záměně v genu generujícím tento enzym (C 677 T). Z metabolismu homocysteinu vyplývá, že hyperhomocysteinemie může být způsobena:

- a) **deficitem nebo sníženou aktivitou některých enzymů** – většinou MTHFR a v méně případech defekty enzymu cystathion-β-syntázy
- b) **deficitem vitaminů** – vitaminy skupiny B jsou kofaktory těchto enzymů (kyselina listová, vitaminy B₆, a B₁₂).

❑ **Homozygotní defekty** jsou spojovány s těžkou hyperhomocysteinémií a jsou doprovázeny řadou defektů (neurologických a psychických a časnou chorobou cév, včetně TEN). U **heterozygotů** se objevuje lehká až středně těžká forma hyperhomocystémie

❑ **Hyperhomocystémie** je nezávislým rizikovým faktorem cévních chorob. Ukazuje se, že by mohla být i rizikovým faktorem pro žilní trombózy. Mechanismy, kterými se hyperhomocystémie podílí na atero, či trombogenezi nejsou dostatečně známy. Předpokládá se poškození endotelu, proliferace buněk hladkého svalstva a zesílení intimy. Hyperhomocystémie se projevuje jako rizikový faktor hlavně u mladších lidí.



Stavy a léky, které ovlivňují homocystémii

4.2.2.2. Získané trombofilní stavy

4.2.2.2.1. ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM (APS)

Antifosfolipidový syndrom (APS – Anti Phospholipide Syndrome) je charakterizován přítomností venózních i arteriálních trombóz v mikrocirkulaci, předčasně ukončených těhotenství a trombocytopenie v přítomnosti antifosfolipidových protilátek. Tyto látky tím, že vyřazují fosfolipidy ze hry v rámci koagulačních procesů významně a různým způsobem zasahují do procesu krevního srážení a výsledkem tohoto působení bývá zpravidla **trombofilie**.

U APS se vytváří protilátky proti negativně nabitým fosfolipidovým povrchům, proteinům vázajícím fosfolipidy nebo proteinům (kofaktorům) v případě, že fosfolipidy nejsou přítomny.

Mechanismy účinku

V případě APS se předpokládá několik mechanismů účinku antifosfolipidových protilátek:

- ◆ APA se napojují na fosfolipidové složky protrombinového komplexu koagulační kaskády, tím vzniká hyperkoagulační stav.
- ◆ APA **zabraňují uvolňování kyseliny arachidonové z endotelu** krevních cév, což vede ke snížení tvorby prostacyklinu jako přirozeně se vyskytující antikoagulační složky, zvýší se agregace destiček a dochází k následné trombóze.

- ◆ APA zvyšují možnost trombózy **inhibicí účinku prekalikreinu** a následné poškození fibrinové „clearance“.
- ◆ APA **inhibují působení trombomodulinu** při aktivaci proteinu C trombinem, a tím se ztrácí zpětnovazebná inhibice koagulace.
- ◆ **Přímé poškození trombocytů** protilátkami typu *Lupus anticoagulans*, což vede ke zvýšení jejich adhezivní schopnosti a následně k trombóze.

Poměrně vzácný je tzv. **katastrofický APS**, u kterého dochází v důsledku nezvládnutelné trombofilní tendence k akutnímu stavu s obrazem multiorgánového selhání.

Laboratorní diagnostika: Je založena na kombinaci koagulačních laboratorních testů závislých na fosfolipidech a ELISA testech.

Klinická interpretace: Tvorba protilátek může být vyvolána léky, bakteriální a virovou infekcí. Velmi často se APS zjišťuje u nemocných s revmatickým onemocněním.

Léčba: Hlavními klinickými komplikacemi spojenými s přítomností APA jsou vasculární okluze, opakovaný spontánní potrat a trombocytopenie. Snahou je co nejrychleji odhalit diagnózu a snížit koagulační potenciál, aby se co nejrychleji eliminovala rizika spojená s tímto syndromem. K léčbě se používá kortikosteroidů (prednison), orální antikoagulační léčba, antiagregační léky nebo heparin.

❑ *Není jisté, zda APA pouze doprovází různá onemocnění, nebo zda mají s různými patologickými stavy příčinnou souvislost. Příčina tvorby APA je komplexní, je pravděpodobně následkem poruchy imunitního systému. Nejsou zatím známy mechanismy, kterými tyto protilátky vyvolávají hyperkoagulační stav a trombózu.*

Předpokládá se účast v inhibici uvolňování kyseliny arachidonové z membrány endotelu a následné snížení produkce prostacyklinu. Literární prameny se zmiňují o tom, že APA pravděpodobně pozitivně ovlivňují syntézu destičkového aktivního faktoru – PAF (platelet activating factor), který následně zesiluje agregaci krevních destiček. Další cílovou strukturou APA by mohly být membránové fosfolipidy u krevních destiček primárně lokalizované na vnitřním povrchu membrány, které se po jejich předchozí aktivaci nebo poškození dostávají na vnější povrch. Jako jiná možnost působení APA se popisuje zesílení adheze krevních destiček společně s uvolněním prokoagulačního faktoru a tromboxanu.

Na kauzální účast APA při vzniku trombu ukazuje i modelový pokus, kdy bylo u experimentálního zvířete vyvoláno standardním způsobem poškození femorální artérie. Po infúzi APA tříd IgG, IgM i IgA byl pozorován dramatický nárůst trombu i doby jeho trvání.

4.2.2.3. Sekundární (přidružené) trombofilní stavy

Sekundární trombofilní stavy se objevují v patobiologických situacích, mezi něž patří např. gravidita, nebo jsou následkem známého patologického procesu (hepatopatie, nefrotický syndrom, DÍK rozličné genexe).

Literatura

Aiach, M., Gandrille, S., Emmerich, J.: A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C, protein S. *Thromb. Haemost.* 74, 1995, s. 81–89.

Alving, B. M.: The hypercoagulable states. *Hosp. Pract.* 28, 1993, č. 2, s. 109–114.

Comp, P. C., Nixon, R. R., Cooper, M. R., Esmon, C. T.: Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.* 74, 1984, s. 2082–2088.

Badimon, L., Badimon, J. J.: Interaction of platelet activation and coagulation. In: Fuster, V., Topol, E. J., eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 1996, s. 639–656.

Badimon, J. J., Lettino, M., Toshi, V. et al.: Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99, 1999, s. 1780–1787.

Beck, E. A., Charache, P., Jackson, D. P.: A new inherited coagulation disorder caused by abnormal fibrinogen (fibrinogen Baltimore). *Nature* 208, 1965, s. 143–145.

Bertina, L., Koeleman, B. P., Koster, T., Rosendall, F. R., Driven, R. J., de Ronde, H. et al.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369, 1994, s. 64–67.

Bertina, R. M.: Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin. Chem.* 43, 1997, č. 9, s. 1678–1683.

Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L. et al.: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Prac. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1987, s. 9238.

Demers, C., Ginsberg, J. S., Hirsh, J. et al.: Thrombosis in antithrombin III deficient persons: reports of large kindred and literature review. *Ann. Intern. Med.* 116, 1992, č. 9, s. 754–761.

Devine, D. V., Brigden, M. L.: The antiphospholipid syndrome: When does the presence of antiphospholipid antibodies require therapy? *Postgrad. Med.* 99, 1996, č. 6, s. 105–108.

Egeberg, O.: Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 13, 1967, s. 516–530.

Engesser, L., Broekmans, A. W., Briet, E. et al.: Hereditary protein S deficiency: clinical manifestations. *Ann. Intern. Med.* 106, 1987, č. 5, s. 677–682.

Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., et al.: Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequence of plaque rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23, 1994, s. 1562–1569.

Frenette, P. S., Moyana, C., Hartwell, D. W., Lowe, J. B., Hynes, R. O. and Wagner, D. D.: Platelet – endothelial interaction in inflamed mesenteric venules. *Blood*, 91, 1998, č. 4, s. 1318–1324.

Griffin, G. H., Evatt, B., Zimmerman, T. S., Kleis, A. J., Wideman, C.: Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.* 68, 1981, s. 1370–1373.

Griffin, J. H., Evatt, B., Wideman, C. et al.: Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 82, 1993, č. 7, s. 1989 – 1993.

Heijboer, H., Brandjes, D. P., Buller, H. R. et al.: Deficiencies of coagulation – inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep vein thrombosis. *N. Engl. Med.* 323, 1990, č. 22, s. 1512–1516.

Kansas, G. S.: Selections and next ligands: Current concepts and controversies. *Blood* 88, 1996, s. 3259.

Poort, S. R., Rosendall, F. R., Reitsma, P. H., Bertina, R. M.: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88, 1996, s. 3698–3703.

Reitsma, P. H., Bernardi, F., Doig, R. G., Gandrille, S., Greengard, J. S., Ireland, H. et al.: Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb. Haemost.* 73, 1995, s. 876–889.

Rodgers, G.: Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *Faseb. J.* 2, 1998, s. 116.

Svenson, P. J., Dahlbäck, B.: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 330, 1994, č. 8, s. 517–522.

Taberner, M. D., Tomas, J. F., Alberca, I. et al.: Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am. J. Hematol.*, 36, 1991, č. 4, s. 249–254.

Tedder, T. F.: The selectins: Vascular adhesion molecules. *Faseb. J.* 9, 1995, s. 866.

Topol, J. E. et al.: For the EPIC Investigator Group. Long-term protection from myocardial ischemic events in a randomized trial of brief integrin blockade with percutaneous coronary intervention. *JAMA* 278, 1997, s. 479–484.

Toshi, V., Gallo, R., Lettino, M., et al.: Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 1997, s. 594–599.

Virchow, R.: *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin*. Frankfurt 1856. Meidinger & Sohn Co.

Williamson, D., Brown, K., Luddington, R. et al.: Factor V Cambridge: A New mutation (306: Arg–Thr) associated with resistance to activated Protein C. *Blood* 91, 1998, č. 4, s. 1140–1144.

4.3. Antitrombotická léčba

Hemostatické mechanismy jsou fyziologickým procesem. Za určitých podmínek je aktivace hemostatických mechanismů nežádoucí a život ohrožující a je potřeba její aktivitu tlumit. K inhibici primární hemostázy jsou k dispozici protideštičkové léky a ke tlumení sekundární hemostázy antikoagulanty. Spontánní fibrinolýzu fibrinového trombu, spočívající v aktivaci plazminogenu na plazmin, je možné terapeuticky potencovat podáním t-PA nebo lze přímo podat přirozená fibrinolytika, či jejich analoga (Bultas a Karetová, 2004).

Léčebné zákroky u projevů trombogeneze vychází z toho, že podaná účinná látka může:

- zabránit zvětšování trombu, případně rozpustí jeho fibrinovou složku
- zamezit dalšímu shlukování trombocytů
- snížit hyperkoagulabilitu systému

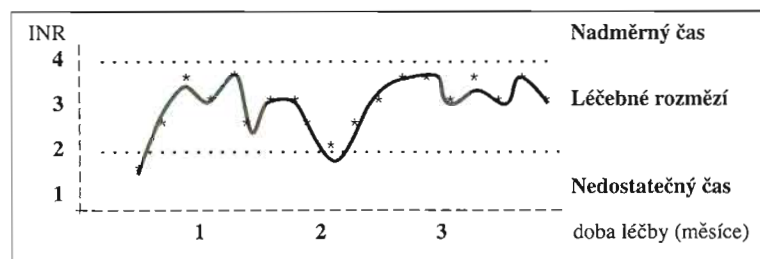


Rozlišujeme antitrombotickou léčbu:

- ☐ antikoagulační
- ☐ trombolytickou
- ☐ antiagregační

4.3.1. Monitorování léčby

Laboratorní hodnoty použitých testů by se během antitrombotické léčby měly pohybovat v léčebném rozmezí. Jsou-li nižší (nedostatečný čas) je nemocný ohrožen **tromboembolickými příhodami**, jsou-li naopak vyšší (nadměrný čas) je nemocný ohrožen **krvácivými komplikacemi**. V dolní části je uveden příklad monitorování léčby kumariny pomocí protrombinového testu:



4.3.2. Antikoagulační léčba

Antikoagulační léčba zabraňuje vzniku trombu, tím že brání genezi trombinu a následně přeměně fibrinogenu na fibrin. Antikoagulační léčbou se potlačuje aktivace koagulačních faktorů tím, že se jednak brání vzniku plně hodnotných faktorů (*preparáty kumarinového typu*) nebo se potencuje účinek antitrombinu k nepřímému vyvázání trombinu (*nefrakcionovaný heparin*), či k vyvázání aktivovaného F Xa (*frakcionovaný heparin*). Sníženou tvorbou nebo vyvazováním trombinu z koagulačního děje se výrazně omezuje i riziko aktivace trombocytárního systému.



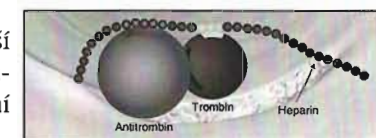
Hlavním záměrem antikoagulační léčby je co nejrychlejší dosažení stabilní účinné léčebné dávky, udržení této dávky v terapeutických mezích a vyloučení významnějšího předávkování antikoagulačním působkem.

Inhibice koagulace lze dosáhnout řadou způsobů:

- **Inhibice iniciální fáze koagulace**
 - inhibitory TF (TFPI)
 - inhibitory ostatních koagulačních faktorů
- **Zamezením přeměny protrombinu na trombin**
 - inhibitory F IXa
 - inhibitory F Xa
- **Blokádou účinku trombinu**
 - přímé inhibitory
 - nepřímé inhibitory: blokuji trombin zprostředkovaně zvýšením účinku antitrombinu (UFH, LMWH)
- **Posílení přirozené antikoagulační odpovědi organismu**
 - rekombinantní fyziologické proteiny s antikoagulační aktivitou (rekombinantní protein C, rekombinantní trombomodulin). Tyto faktory stimulují přirozenou antikoagulační schopnost organismu.
- **Potlačení geneze faktorů závislých na vitaminu K**
 - antagonisté vitaminu K (kumarinové preparáty)

4.3.2.1. Nepřímé inhibitory trombinu

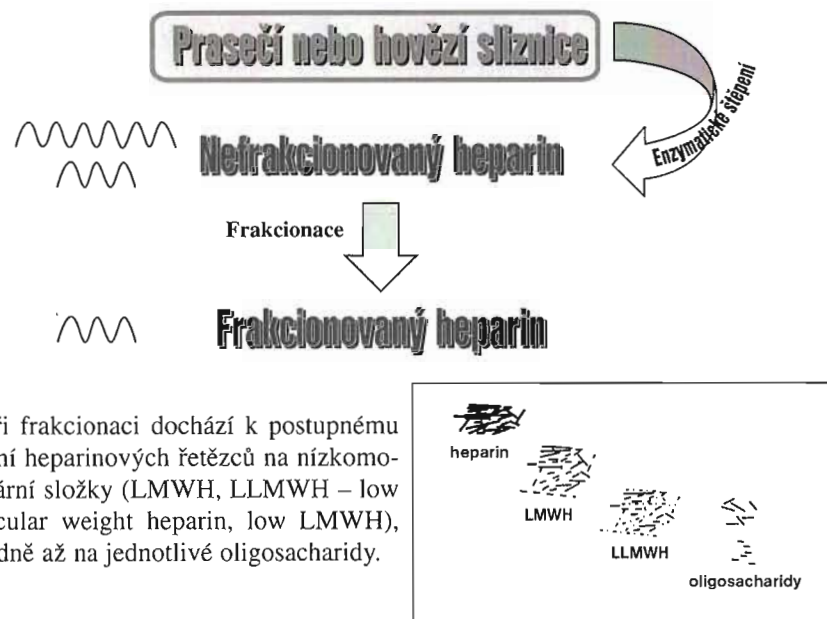
Nepřímé inhibitory trombinu vyžadují další substanci, která jim umožní připojit se k molekule trombinu. Mezi látky, které usnadňují připojení inhibitoru k molekule trombinu patří heparin.



Heparin byl objeven Mc Leanem v roce 1916 (*McLean, 1916*). Je to přirozený mukopolysacharid s výraznějším zastoupením síry (polysulfonovaný glykosamoglykan). Jako anionický polysacharid obsahuje zbytky kyseliny uronové. Tvoří se v lidských tkáních, hlavně v játrech, plicích a ve střevě. Samotný heparin má minimální antikoagulační účinky. Antikoagulační účinek heparinu je zprostředkován 2 cestami:

- **Antitrombinem** – viz kapitola „Systémy inhibitorů hemostázy“
 - **TFPI** – uvolňuje TFPI (dochází k inhibici dimerního komplexu [FVIIa . TF])
- ❑ V systému hemostázy **nepotencuje heparin pouze inhibici aktivovaných koagulačních faktorů, ale ovlivňuje také primární hemostázu, endotel a fibrinolýzu**. Je známo, že určitá část heparinu se spotřebuje k nezbytné saturaci endotelu. Heparin se současně váže na různé látky a buněčné systémy, které spolupůsobí v hemostáze. Důležitá je schopnost heparinu vázat se na granulocyty, lymfocyty a makrofágy, což se projevuje zejména u zánětlivých stavů. Heparin je schopen se vázat i na různé makromolekulární látky v organismu, jako jsou lipoproteiny, enzymy a léky.
- ❑ Při podávání heparinu je známa celá řada **lékových interakcí**, které je nutno při této léčbě brát v úvahu, ovlivnění potravinami není známo.

Heparin se získává **frakcionováním enzymatickým štěpením** prasečí nebo hovězí sliznice.



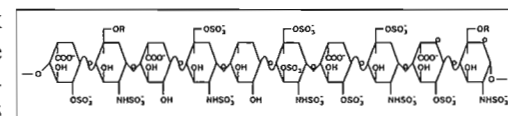
Rozlišujeme 2 druhy heparinů:

Název:	Označení:	MW:	Monitorování léčby:
nefrakcionovaný heparin	UFH	3–40 tisíc Da	APTT
nízkomolekulární heparin	LMWH	4,5–6 tisíc Da	aktivita Anti Xa

Nefrakcionovaný heparin

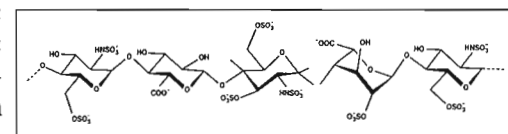
(Unfractionated heparin – UFH)

Nefrakcionovaný heparin, tak jak je využíván v klinické praxi, je heterogenní směs polysacharidových řetězců různé molekulové hmotnosti v rozmezí od 3 000 do 40 000 daltonů. Obsahuje průměrně 45 monosacharidových jednotek.



Část řetězce UFH

Jen asi **jedna třetina řetězců UFH obsahuje pentasacharidovou sekvenci**, která se váže na antitrombin.



Pentasacharidová sekvence

Jinou sekvencí se pak váže na trombin v poměru 1 : 1. UFH může potencovat účinek AT i k jiným serinovým proteázám (např. inhibice F Xa). V těchto případech se váže svou pentasacharidovou sekvencí k AT, ale neváže se k F Xa.

UFH dále snižuje produkci TF in vitro (stericky omezuje jeho expozici na monocytech). I přes tyto jeho výhodné vlastnosti má jeho praktické využití několik závažných nedostatků:

- **Dlouhé molekuly UFH se nepředvídatelně váží na řadu proteinů přítomných v plazmě, dále na destičky, buňky endotelu a makrofágy** (Andersson a spol., 1979). Výsledkem těchto interakcí je výrazná variabilita antikoagulačního účinku s nutností častého monitorování a úpravy dávkování.
- Jedním z **proteinů inhibujících účinek heparinu je PF4**. Prasklý aterosklerotický plát s aktivovanými trombocyty, které uvolňují PF4 tak může být paradoxně místem, které je vůči antikoagulačnímu účinku heparinu rezistentní.
- Další podstatnou nevýhodou UFH je jeho **neschopnost inaktivovat trombin vázaný na fibrin**, což může vést k nepříjemné reaktivaci koagulačního procesu po náhlém přerušení terapie (rebound fenomen).

Pro rychlost svého účinku se hodí heparin spíše k ošetření akutních stavů při vzniku cévní příhody. Heparin se aplikuje parenterálně, jeho účinek lze ověřovat pomocí APTT.

Nízkomolekulární heparin

(Low molecular weight heparin – LMWH)

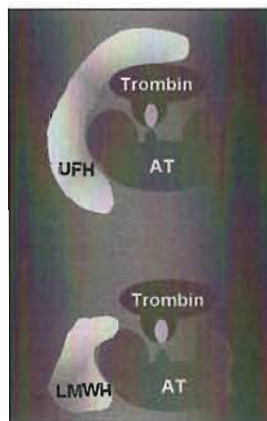
Nízkomolekulární hepariny jsou heterogenní směsí kratších heparinových řetězců, které vznikají chemickou nebo enzymatickou depolymerací UFH. Jejich prů-

měrná molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 4 500–6 000 Daltonů. Není to jen délka řetězce, kterou se výchozí a konečný produkt depolymerace odlišují. Při depolymeraci dochází k modifikaci monosacharidových jednotek v místech štěpení a k tvorbě nových koncových skupin. Výsledkem je různá biologická aktivita konečných produktů, které se pak vzájemně liší schopností vázat trombin, uvolňovat TFPI, vázat se na heparinový kofaktor II, uvolňovat PAI-1 a ovlivňovat adhezi destiček. Rozdílné jsou i farmakokinetické vlastnosti a jejich inaktivace protaminem.

U LMWH je podobně jako u UFH antikoagulační účinek podmíněn potlačením tvorby trombinu. LMWH velmi účinně potencuje v přítomnosti AT inhibici faktoru Xa. Vazba pentasacharidové sekvence LMWH na antitrombin mění konformaci molekuly a usnadní vazbu F Xa k této molekule. Dojde k výraznému zesílení inhibičního efektu a ke snížení produkce trombinu, zatímco aktivace ostatními mechanismy je v tomto případě zachována.

Kratší heparinové řetězce, které obsahují méně než 18 monosacharidových jednotek, kterých je ve směsi 50–75 %, nejsou schopné vázat AT i trombin současně a proto trombin neinhibují. Z těchto důvodů je inaktivace trombinu 4 x menší než inaktivace faktoru Xa. Inaktivace F Xa je zachována a to i v případě, že je tento vyvázan na fosfolipidovou membránu krevních destiček. Inaktivace F Xa zpomalí koagulační proces již v jeho rané fázi aktivace.

Rozdíl mezi UFH a LMWH



Krátké heparinové řetězce LMWH jsou ve srovnání s UFH:

- v mnohem menší míře vázány na plazmatické bílkoviny a buněčné povrchy, proto mají **delší plazmatický poločas**.
- LMWH jsou také **méně vázány na destičky a k PF4**. Tím se vysvětluje nižší incidence heparinem indukované trombocytopenie v porovnání s UFH.
- Ale ani léčba LMWH není optimální, terapie neovlivní trombin vázaný fibrinem.

Hlavní předností nízkomolekulárních heparinů je poměrně dobrá předvídatelnost účinku a lepší snášenlivost.

Pentasacharidy

Pentasacharidy, zprostředkovaně přes antitrombin selektivně blokuji F Xa. Jsou to syntetické látky, analoga pentasacharidové sekvence heparinu, které zprostředkují interakci s AT a vznik trimerního komplexu. Jedná se o krátký řetězec obsahující sekvenci **5 monosacharidů**.

Výhoda: jednoduché dávkování, dlouhá doba účinku, který je dobře snášen a je předvídatelný.

Nevýhody: není známo antidotum.

4.3.2.2. Přímé inhibitory trombinu

Přímé inhibitory trombinu inhibují trombin tak, že se váží přímo na jeho molekulu bez působení další zprostředkující látky.



Hirudin

V roce 1884 objevil J. B. Haycraft antikoagulační aktivitu u pijavice lékařské – *Hirudo medicinalis*.

Hirudiny jsou známy jako nejsilnější inhibitory trombinu. Hirudin tvoří s trombinem dimerní komplex [hirudin . trombin]. Takto vyvázaný trombin ztrácí své proteolytické schopnosti a to jak v hemostatických procesech, tak i mimo ně. Léčebný antikoagulační účinek hirudinu je srovnatelný s LMWH.

Hirudin ovlivňuje některé pochody v lidském organismu:

◆ v krvi:

- formaci koagula – přeměnu fibrinogenu na fibrin, aktivaci F XIII
- aktivaci faktorů V a VIII
- trombocyty – inhibuje jejich agregaci, uvolňovací reakci a syntézu TXA₂
- leukocyty – inhibuje produkci cytokinů
- makrofágy – inhibuje chemotaxi

◆ v cévní stěně

- endotelové buňky – inhibuje syntézu a uvolňování prostacyklínu, EDRF, t-PA, endotelinu, TF, inhibuje aktivaci proteinu C
- fibroblasty – inhibuje jejich proliferaci
- hladké svaly – inhibuje jejich kontrakci a mitogenezi
- srdeční sval – inhibuje pozitivní inotropismus

◆ mimo to hirudin:

- ovlivňuje nádorové buňky – inhibuje jejich adhezi, tvorbu metastáz a růst buněk
- ovlivňuje neuróny – inhibuje regulaci růstu
- tvorbou komplexu [hirudin . trombin] vyřazuje ze hry antitrombin

Využití hirudinu v diagnostice

- Stanovení trombinu a protrombinu
- Odlišení trombinu od ostatních plazmatických proteáz
- Testování trombinem indukovaných buněk a funkcí krvinek
- Stabilizace krve (může sloužit jako antikoagulans)

Nekovalentní inhibitory trombinu

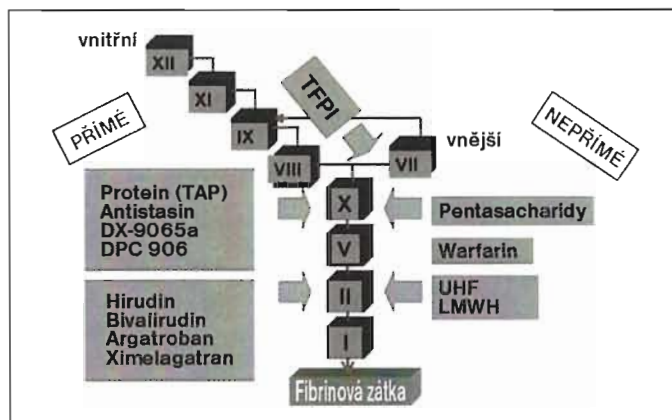
- MEGALATRA (XIMELAGATRA). Tyto látky jsou účinné i perorálně.

Výhody: není nutné monitorování léčby a neváže další plazmatické proteiny – lze s výhodou využít při léčbě heparinem indukované trombocytopenie.

Nevýhody: není známo specifické antidotum.

Kovalentní inhibitory trombinu

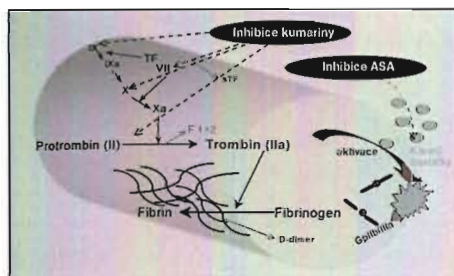
- syntetické tripeptidy, které se váží na aktivní místo trombinu



Přímé a nepřímé inhibitory trombinu a faktoru Xa

4.3.2.3. Potlačení geneze faktorů závislých na vitaminu K

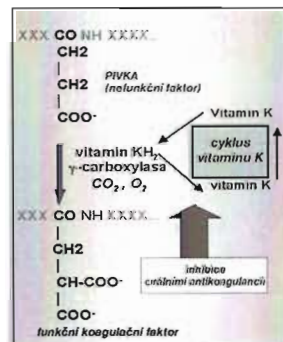
Mezi antagonisty vitamínu K patří preparáty kumarinu. Tyto látky snižují jaterní syntézu faktorů závislých na vitamínu K (bližší viz kapitola plazmatické koagulační faktory). Ustáleného stavu plazmatických hladin preparátů kumarinového typu se docílí teprve po několika dnech od zahájení léčby, účinek léčby je možné monitorovat protrombinovým testem.



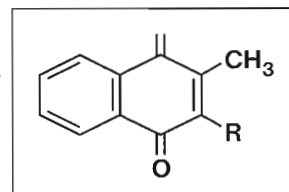
Kumarinové preparáty a jejich účinek na hemostázu

Účinek dikumarinů

Vitamin K je nezbytný k syntéze koagulačních faktorů závislých na vitamínu K. Jedná se zejména o faktory II, VII, IX, X, protein C a S v játrech. Deriváty kumarinu a indandionu mají strukturální podobnost s vitamínem K a omezují jeho účinek při gama-karboxylaci glutamové části koagulačních faktorů (klesá nejdříve hladina faktoru VII, pak X, IX a nakonec protrombinu). Jejich účinkem vznikají faktory, které nemají plnou fyziologickou funkci při vazbě na fosfolipidovou matrix – tzv. PIVKA faktory (PIVKA = Protein Induced by Vitamin K Antagonist).



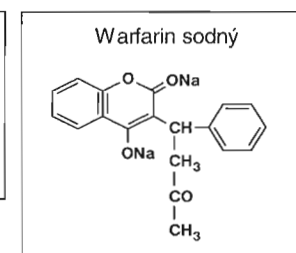
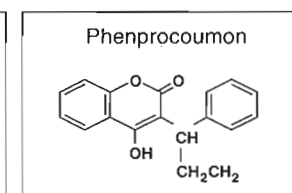
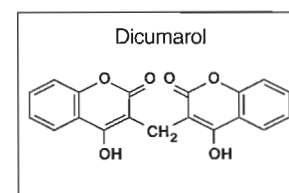
❑ *Vitamin K1 je obsažen v chloroplastech zelených rostlin. Proto se u nemocných léčených dikumariny nedoporučuje pít bylinných odvarů, neboť dochází ke zmírnění antikoagulačních účinků dikumarinů. Rozšířeno bylo hlavně pít kopřivového čaje.*



Strukturní vzorec vitamínu K

Podle terapeutického účinku dělíme dikumariny na:

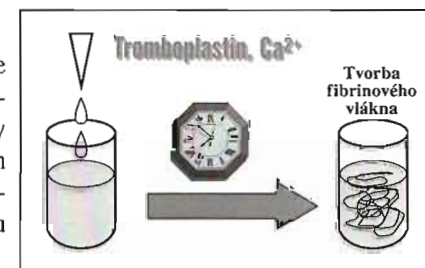
- preparáty s **krátkým biologickým poločasem** (2–8) hodin – dříve hojně používané preparáty *Pelentan*, *Pelentanettae*.
- preparáty s **delším biologickým poločasem** (2–5) dnů – *Warfarin*, *Coumadin*, *Marcumar*.



4.3.2.4. Monitorování antikoagulační léčby kumariny

Protrombinový test

Test zachycuje vnější cestu aktivace koagulačního děje, při kterém přeměna fibrinogenu na fibrin není ovlivněna faktory XII, XI, IX, VIII a fosfolipidy krevních destiček. Test je startován přidáním kalciového tromboplastinu (směs tromboplastinu a iontů Ca^{2+}).



INR a ISI

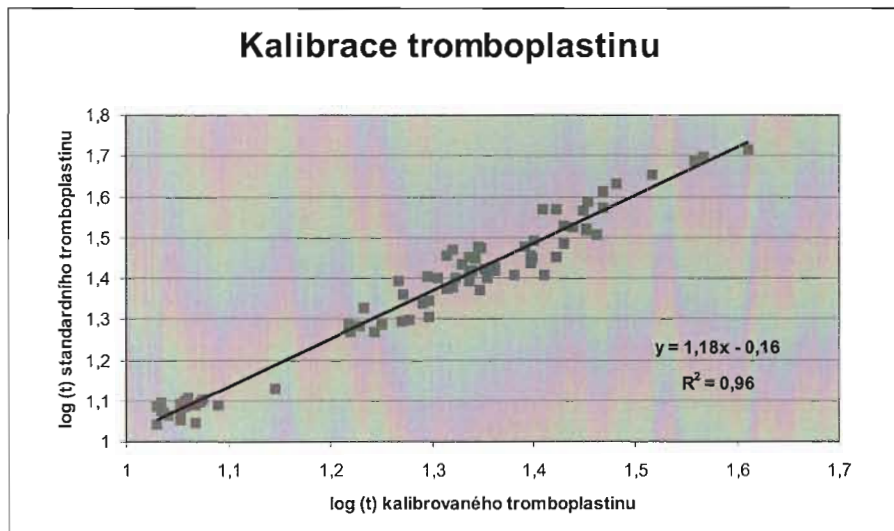
Po doporučení ICSH (Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii) a WHO byl v r. 1982 zaveden pro vyjádření tromboplastinového testu:

Mezinárodní normalizovaný poměr – INR (International Normalized Ratio)

Výsledek laboratoře je vyjádřen poměrem tromboplastinového času nemocného (t_p) a času směsné kontrolní plasmy (t_N). Podle rozhodnutí WHO jsou laboratorní výsledky vyjadřovány v **mezinárodních normalizovaných poměrech – INR**. Tento způsob je jednotný v celém světě.

INR vyjadřuje poměr t_P/t_N získaný s tromboplastinem BCT 67/40 (referenční re-agencie WHO od r. 1978, lidský tromboplastin uložený v lyofilizované formě v kapalném dusíku). U ostatních tromboplastinů se zjišťuje pomocí kalibrace.

INDEX CITLIVOSTI – ISI (International Sensitivity Index)



Index citlivosti – ISI udává směrnici používaného tromboplastinu, která byla získána porovnáním referenčního tromboplastinu s tromboplastinem kalibrováním.

Hodnota INR pro daný vzorek a aktuální tromboplastin se vypočte ze vztahu:

$$INR = \left[\frac{t_P}{t_N} \right]^{ISI}$$

ISI – hodnota indexu citlivosti použitého tromboplastinu
 t_P, t_N – časy pacienta a normálu (kontroly)

Fyziologické rozmezí INR: neléčení 0,8–1,2
 léčení (přihlíží se k diagnóze)

4.3.2.5. Monitorování antikoagulační léčby preparáty heparinu

Monitorování léčby heparinem představuje stále velký problém. Dosud není k dispozici test, který by odrazil antitrombotické působení heparinu u nemocného.

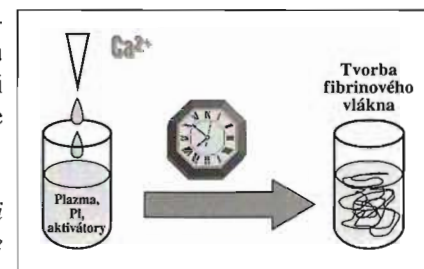
Příčiny jsou jednak v polyvalentním účinku heparinu a dále v testu samotném. Během léčby je důležité zajistit vyváženou hladinu nefrakcionovaného heparinu, která je schopna udržovat efektivní hypokoagulační stav a současně neohrozí pacienta krvácením.

Monitorování léčby nefrakcionovaným heparinem (UFH)

Nižší léčebné dávky nefrakcionovaného heparinu se sledují pomocí aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (APTT). U těchto dávek se předpokládá, že koagulační čas tohoto testu je přímo úměrný hladině heparinu v plazmě nemocného.

Aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)

APTT popisuje hlavně vnitřní cestu koagulačního děje. V přítomnosti fosfolipidů krevních destiček a po kontaktní aktivaci plasmy chudé na destičky se test startuje přidáním chloridu vápenatého.



- ☐ **Heparin** má poněkud odlišné vlastnosti v systému *in vivo* a *in vitro*, ke kterým je nutné během monitorování přihlížet. V systému *in vivo* je heparin z části vyvazován PF4 uvolněným z krevních destiček. Dále je nutné brát odlišnou účast v systému antitrombinové a anti Xa aktivity. K antikoagulačnímu efektu přispívají i některé další fyziologické faktory jako je tělesná hmotnost, plasmatické proteiny (zejména v době zánětu), cirkadiální rytmus. Toto vše souhrnně přispívá k citlivosti reagentů v případě vyhodnocení terapeutického účinku heparinu v systému APTT.
- ☐ V některých případech zejména tam, kde dochází k výraznějšímu vyvazování heparinu na plasmatické proteiny, může docházet k tomu, že dávky a hladiny APTT nekorelují. V takových případech je vhodné sledovat hladinu heparinu v plazmě jinými metodami (např. chromogenní metodou).
- ☐ Během monitorování hladin heparinu, zejména při **antikoagulační terapii žilní trombózy** může docházet k následujícím problémům:
 1. Jde o **akutní stav**, který je provázen vzestupem bílkovin rané fáze, které souteží s AT o vazbu na UFH. Jedná se zejména o tyto složeny: vitronectin, na histidin bohatý glykoprotein – HRG (histidin rich glycoprotein), PF4.
 2. **Pokles AT** – při poklesu pod 50 % může docházet k tzv. „heparinové rezistenci“ – tj. nedostatku AT, při kterém nedochází ke vzniku ternárního komplexu [AT . trombin . heparin]. Zjišťují se kratší časy APTT, než by odpovídalo dané léčbě. V těchto případech je nutné podat intravenózní AT.
 3. **Zvýšené hladiny F VIII a fibrinogenu** (vyvolané akutním stavem). Dochází ke zkrácení časů APTT i při terapeutických dávkách heparinu, díky zvýšené

aktivitě FVIII a zvýšeným hladinám fibrinogenu. Hovoříme o tzv. „nepravé heparinové rezistenci“.

4. Dochází k prodloužení APTT a to:

- **extrémně:** při deficitu F XII a faktorů kontaktní fáze (plná korekce po přidání normální plazmy).
- **méně výrazně:** v přítomnosti protilátek typu LA (nedojde ke korekci).

Při heparinizaci krve u mimotělních oběhů se využívá vysokých dávek heparinu, které nejsou měřitelné APTT. V těchto případech se léčba heparinem monitoruje pomocí aktivovaného koagulačního testu – ACT.

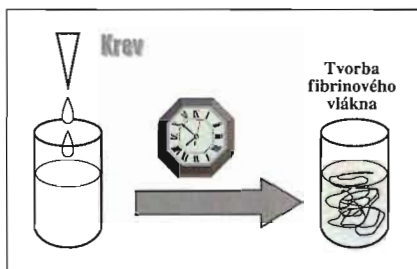
Aktivovaný koagulační test

(Activated Clotting Time – ACT)

ACT je metoda zavedená v r. 1966 Hattersleyem a podobná svým principem APTT, ale provádí se na rozdíl od APTT přímo s krví. Metoda využívá kontaktních látek, jako jsou silica, celite nebo kaolin, ale bez přidání fosfolipidů. Kontaktní aktivátory jsou umístěny ve speciálních „cartriges“, které jsou uzpůsobeny k měření ACT pomocí zvláště k tomuto účelu uzpůsobených přístrojů. Po přidání vzorku do „cartriges“ se iniciuje kontaktní fáze srážecího procesu a tvorba fibrinu je měřena mechanickými nebo optickými přístroji.

❑ Silica, celite, kaolin jsou různé formy jemně drcených křemičitanů s velkými kontaktními povrchy

- Sledovaný systém: přeměna fibrinogenu na fibrin
- Reakční směs: vyšetřovaná krev + aktivátory
- Startovací reagentie: krev
- Časy kontrolní plazmy: 120–180 s
- Terapeutické hodnoty: 300–600 s



ACT je výrazně ovlivněn hladinou heparinu (prodloužený čas je úměrný koncentraci heparinu). Test dále ovlivňují tyto faktory: nevyváženost aktivovaných koagulačních faktorů a inhibitorů, lýza destiček, zvýšená hemodiluce, hypotermie nemocných a jiné.

Test je závislý hlavně na kontaktní fázi a získané časy mohou mít značný rozptyl. Výhody tohoto testu jsou v jeho jednoduchém provedení a v použití přímo na klinickém pracovišti ke kontrole heparinové dávky. **ACT je využitelný jen pro nefrakcionovaný heparin, který je podáván ve vysokých dávkách při mimotělovém oběhu**, tak jak je tomu při hrudní chirurgii nebo u dialýzy. APTT nelze v těchto pří-

pádech použit, protože monitoruje nižší hladiny heparinu. Citlivost k LMWH a hirudinu je velmi nízká a proto test nelze využít ke sledování hladiny těchto přípravků.

Monitorování léčby LMWH

LMWH jsou hepariny vyrobené řízenou enzymatickou frakcionací. Mají proto přibližně strukturovanou délku polysacharidového řetězce a z toho vyplývá, že mají i lépe definovatelnou molekulovou hmotnost. Nízkomolekulární hepariny vykazují, vzhledem ke své struktuře (nedostatek sacharidových jednotek pro vznik komplexu [AT . LMWH. trombin]), méně interakcí s trombinem a **přednostně inaktivují F Xa**.

Na základě těchto skutečností je účinnost nízkomolekulárních heparinů předvídatelnější, než účinnost UFH. Navíc LMWH mají nižší afinitu k endotelu, plazmatickým bílkovinám, makrofágům a destičkám.

Na podkladě anti Xa aktivity nízkomolekulárních frakcí heparinu je založen princip jeho stanovení v plazmě. Nízkomolekulární heparin tvoří s antitrombinem dimerní komplex [AT . LMWH], který vyvazuje v nadbytku dodané definované množství čistého F Xa. Zbytkové množství F Xa lze měřit koagulačně nebo metodou chromogenních substrátů. Pokles faktoru Xa je nepřímě úměrný koncentraci LMWH.

S testem neinterferují FDP a zvýšené hladiny F VIII. Tyto složky výrazně ovlivňují APTT a ACT.

Terapeutické hodnoty: 0,3–0,7 anti Xa U/ml

V PRAXI SE VĚTŠINOU OBEJDEME BEZ LABORATORNÍ KONTROLY!

4.3.2.6. Monitorování léčby hirudinem

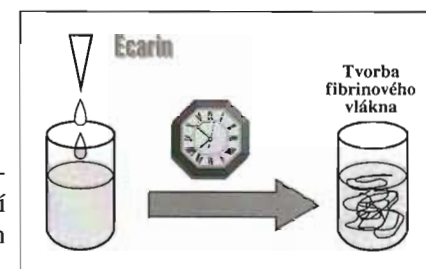
Když vyloučíme APTT, který je v případě hirudinu spojen s řadou problémů, zbývá několik testů, kterými lze přesně stanovit hladinu hirudinu v plazmě (např. chromogenní metoda, ELISA a j.). V praxi se však nejčastěji používá **ecarinový test**.

Stanovení hladiny hirudinu

(Ecarinový test,
Ecarin Clotting Test – ECT)

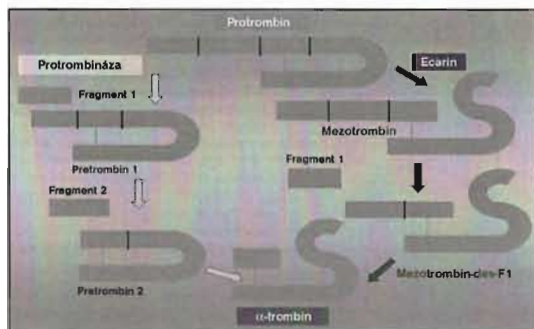
Ecarinový test byl publikován Novakem a Buchou v roce 1996 (Novak a Bucha, 1996).

- Sledovaný systém: po aktivaci koagulačního systému ecarinem dochází k přeměně protrombinu na trombin a následně fibrinogenu na fibrin.



- *Reakční směs*: vyšetřovaná plasma
- *Startovací reagentie*: ecarin

❑ **Ecarin** je metaloproteáza z jedu hada *Echis carinatus*, který aktivuje přeměnu protrombinu na trombin v prostředí nezávislém na fosfolipidech a Ca^{2+} .



Rozdíl mezi účinkem protrombinázy a Ecarinu

Při reakci se nejprve tvoří mezotrombin, který je rychle inaktivován ecarinem na mezotrombin-des-F1, jež spontánně přechází na α -trombin. Trombin pak vyvolá přeměnu fibrinogenu na fibrin. Heparin neovlivňuje výsledek testu. ECT může být vyšetřen v plné krvi nebo plazmě.

Protrombinázou vyvolaný koagulační test (Prothrombinase induced clotting test – PiCT)

PiCT je nový test vyvinutý Calatzisem v r. 2000, který je možné použít k monitorování všech typů heparinů a inhibitorů trombinu, jako je hirudin.

Test je založen na aktivaci plazmy enzymem jedu Russelovy zmije, který aktivuje pouze F V (RVV-Va). V přítomnosti fosfolipidů, Ca^{2+} a přidaného F Xa dojde k tvorbě protrombinázy na povrchu aktivovaných destiček. Po určité době inkubace se nastartuje tvorba trombinu, která vede k následné přeměně fibrinogenu na fibrin.

4.3.3. Trombolytická léčba

Trombolytická léčba je vedle chirurgické léčby jedinou aktivní metodou léčby trombózy. Úspěšnost trombolytické léčby odvisí na časném začátku (Marder a Sherry, 1988). **Trombolytika aktivují fibrinolytické vlastnosti krve zejména v oblasti trombu.** Aktivace probíhá při účasti endogenních nebo exogenních aktivátorů plazminogenu. Cílem trombolytické léčby je zprůchodnění tepny nebo žíly, bypasu či dialyzačního zkratu. Důsledkem včasné úpravy cirkulačních poměrů je zlepšení funkce postiženého orgánu či končetiny, a tím snížení mortality (úmrtnosti).

4.3.3.1. Mechanismus trombolýzy

Vznik trombu je výsledkem interakcí mezi aktivními složkami krve, endotelem a případně subendotelovými strukturami. Během srážení krve dochází k navázání asi 4 % plazminogenu na fibrinová vlákna. Fibrinová depozita jsou součástí trombu

a tím se plasminogen dostává do vnitřních struktur trombu. Po aktivaci srážecího procesu dochází ke zvýšení koncentrace trombinu, který uvolní t-PA z endotelových buněk. Rovněž při vazokonstrikci se může uvolnit určité množství tkáňového aktivátoru plazminogenu. Ten se váže na fibrin a společně s plasminogenem vzniká trimerní komplex [plasminogen . fibrin . t-PA]. Komplex zahájí přeměnu plazminogenu na plasmin, který způsobí lýzu fibrinu uvnitř trombu. Alfa₂ antiplasmin neinhibuje komplex [plasmin . fibrin], takže fibrinolýza uvnitř trombu může volně probíhat.

4.3.3.2. Trombolytika

Trombolytika jsou látky, které vyvolávají přeměnu plazminogenu na plasmin a tím aktivují fibrinolytický proces.

Ideální trombolytikum by mělo být:

- ◆ specifické ke štěpení fibrinu
- ◆ s rychlým nástupem fibrinolytické aktivity
- ◆ s dlouhým plazmatickým poločasem
- ◆ nemělo by být antigenní

Všechny požadavky zatím nesplňuje žádné z trombolytik užívaných v klinice. Při rozhodování o výběru některého z dostupných preparátů je třeba posuzovat jeho vlastnosti s ohledem na okolnosti, za nichž bude použito.

Trombolytika dělíme na:

- Přímá trombolytika
- Nepřímá trombolytika

❑ Dříve se používalo dělení podle účinnosti a historického vývoje na léky I.–III. generace.

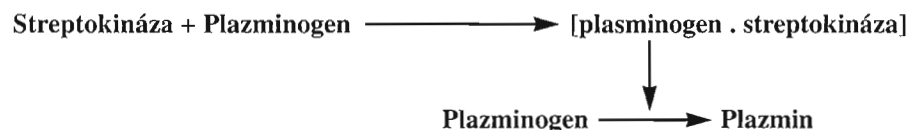
4.3.3.3. Nepřímá trombolytika

Streptokináza, streptáza

Je to **neenzymový protein o MW 47 000 produkováný určitými typy β -hemolytických streptokoků.** Streptokináza nemá vlastní proteolytickou aktivitu a **aktivuje fibrinolytický systém nepřímo.** Má vysokou afinitu k plazminogenu, s nímž v poměru 1 : 1 vytváří komplex [plasminogen . streptokináza], který je účinným aktivátorem plazminogenu. Takto prostorově uspořádaný komplex pak štěpí plasminogen volný i vázaný v trombu na plasmin. Předpokladem jeho účinnosti je dostatečné množství volného plazminogenu. Plazmatický poločas je udáván v rozmezí od 18 do 30 min.

Streptokináza obsahuje 2 komponenty:

- **rychlá složka** (biologický poločas 18 minut) – vazba na protilátky
- **pomalá složka** (biologický poločas 83 minut) – odráží systémovou clearance



Nevýhody:

- **cizorodá látka** – působí jako antigen. Indukuje tvorbu neutralizačních protilátek, které limitují možnost opakovaného podání (od 5 dnů do 1 roku). Dnes existují výhradně purifikované formy streptokinázy a přesně definovanou MW, bez příměsí balastních látek.
- **odbourává i fibrinogen** a nemocný je ohrožen krvácením.

Při klinickém podávání musí být nejprve **nasycen bolus protilátek** vůči streptokináze (*tzv. antistreptolysinů*). Tato hodnota je u každého jedince jiná a kolísá mezi 25 000–3 000 000 jednotek. Proto se v klinické praxi mohou vyskytnout případy, kdy stejná dávka trombolytika je u jedné osoby účinná a u druhé způsobuje systémový lytický stav. **Zvýšení titru protilátek proti streptokináze po její aplikaci znemožňuje většinou opakované podání u stejného nemocného.**

Antistreptáza, anistreptáza

(APSAC – Anisolated Plasminogen Streptokinase Activator Complex)

APSAC je **komplex streptokinázy a lidského plazminogenu, jehož aktivní centrum je reverzibilně inaktivováno acylací**. V plazmě je acylová skupina hydrolyzována a katalytická aktivita se obnoví. V nízkých dávkách nutných k dosažení reperfuze obdobně jako u streptokinázy může docházet k depleci fibrinogenu a s tím spojených krvácivých komplikací. Těž se mohou vyskytovat alergické reakce a hypotenze.

Plazmatický poločas je 70 minut (50–90 min.). Molekulová hmotnost je 131 kDa.

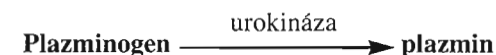
Urokináza

Mc Farlane a Pilling popsali fibrinolytickou aktivitu normální moči již v 50. letech minulého století.

Urokináza je **enzym tvořený epitelálními buňkami močového traktu**. Vyskytuje se v moči zdravých lidí, ze které se také připravuje. **Plasminogen aktivuje na rozdíl od streptokinázy přímo**, což usnadňuje řízení některých léčebných postupů. Urokináza nepůsobí lytický jen na fibrin. Plazmatický poločas je průměrně 15 min. (10–30 min.).

Biochemicky jde o polypeptid existující ve dvou formách:

- urokináza s MW 54 000, H-UK: **vyšší** fibrinolytická aktivita
- urokináza s MW 33 000, L-UK: **nižší** fibrinolytická aktivita



Výhody:

- **není antigenní**, nevyvolává tvorbu protilátek, takže léčba není doprovázena alergickými komplikacemi a může být kdykoliv opakována.

4.3.3.4. Přímá trombolytika

Tkáňový aktivátor plazminogenu

(t-PA – Tissue Plasminogen Activator)

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA), je syntetizován endotelálními buňkami a ke klinickému užití je získáván rekombinantní DNA technologií (rekombinantní: rt-PA). Struktura jeho molekuly má **vazebné místo pro fibrin** (NH₂-terminální řetězec) a **katalytické místo**, které konvertuje plasminogen na plazmin (*Mark a spol., 1995*). Biologický poločas < 10 minut.

Vyskytuje se ve dvou formách:

- jednořetězcová altepláza (single chain tissue: sct-PA)
- dvouřetězcová altepláza (two chain tissue: tct-PA),

t-PA se s vysokou afinitou, zejména ve vnitřních strukturách trombu, specificky váže na fibrin. Vzniká komplex [fibrin . t-PA], který indukuje přeměnu plazminogenu na plazmin.

Teoretický předpoklad snížení krvácivých komplikací nebyl při praktickém užití potvrzen. Krátký plazmatický poločas, 4–6 minut, umožňuje časně provádění invazivních výkonů. Molekulová hmotnost je 68–72 kDa.

Výhody:

- Protože je humánním enzymem, **neindukuje antigenní odpověď**.

Jiná trombolytika

V praxi se dnes používají další trombolytika, jako je např. **retepláza** (single-chain urokinase plasminogen activator: scu-PA), **prourokináza** (PUK) a **staphylokináza** (STA-r, rekombinantní).

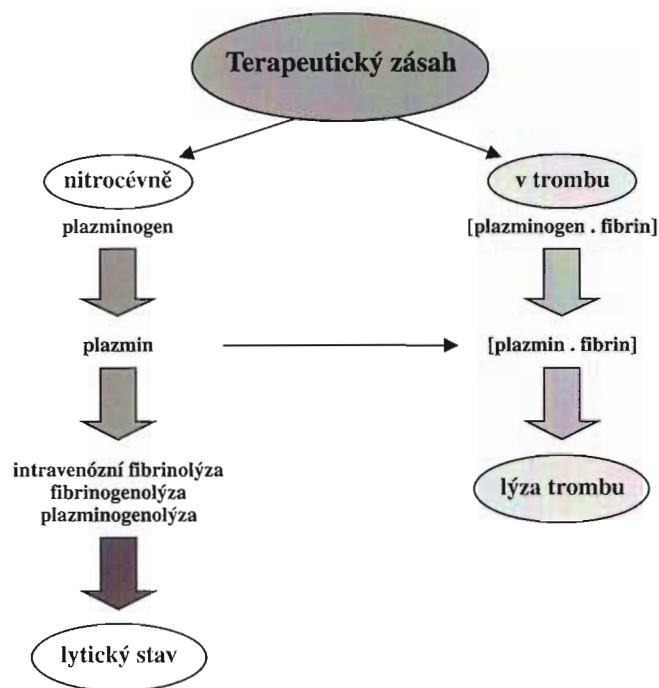
Vlastnosti nově vyvíjených trombolitik:

- jednoznačná specifita pro fibrin

- omezené krvácivé komplikace
- vyšší % rekanalizací
- opakovaná aplikace

NEJSÍRŠÍHO UŽITÍ DOZNALA STREPTOKINÁZA. NEVÝHODOU TÉTO LÉČBY JE POMĚRNĚ DLOUHÁ DOBA PŘETRVÁVÁNÍ ANTIGENNÍCH PRODUKTŮ. TUTO NEVÝHODU LZE ELIMINOVAT NÁSLEDNÝM POUŽITÍM t-PA NEBO UROKINÁZY.

SCHÉMA PŮSOBNÍ SOUČASNÝCH TROMBOLYTIK



Indikace k použití trombolytik

- arteriální a žilní uzávěry (infarkt myokardu, periferní arteriální uzávěry)
- plicní embolie
- hluboké žilní trombózy

Nežádoucí účinky trombolytické léčby

- **krvácivé komplikace** – krvácení bývá závislé na dávce a způsobu aplikace
- **alergické reakce** – nejčastěji se vyskytují při aplikaci streptokinázy

4.3.3.5. Monitorování trombolytické léčby

□ Jednorázové podání trombolytika

Indikace: infarkt myokardu do 6 hodin od vypuknutí obtíží (retrosternální bolesti)

Léčba: Jednorázová dávka trombolytika (streptáza 1–1,5 milionu jednotek + hydrokortison)

Monitorování: neprovádí se

□ Kontinuální podávání trombolytika

Indikace: arteriální a žilní uzávěry, plicní embolie

Léčba: kontinuální dávkování trombolytika (streptáza 3–5 milionu jednotek + hydrokortison)

Monitorování: **trombinový test**

Léčebné rozmezí: 30–90 sekund

- *Hydrokortison má zabránit alergické reakci*

4.3.4. Antiagregační léčba

Přijdou-li krevní destičky během cirkulace do styku s obnaženým kolagenem v subendoteliální vrstvě cévní stěny v důsledku ruptury aterosklerotického plátu, dochází v tomto místě k jejich adhezi. Záleží na rovnováze proagregačních a antiagregačních mechanismů, zda tento děj přestoupí do *tvorby destičkového trombu* (Vojáček, 2002).



V současnosti dostupné protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou **zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování**. Indikace protideštičkové léčby vyplývá především z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze.

Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček (Badimon a Badimon, 1996). Aktivace krevních destiček nabízí vzhledem k počtu zúčastněným faktorů několik úrovní, ve kterých je možno farmakologicky zasáhnout a léčbu je možné kombinovat.

Trombocyty je možné inhibovat ve fázi adheze, aktivace nebo agregace, popřípadě můžeme potencovat jejich stabilitu:

- **Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix**
 - blokátory GP Ib/IIa
 - antagonisté vWF

■ **Blokáda aktivačních cest a cyklů**

- inhibitory COX (cyklus kyseliny arachidonové)
- antagonisté TXA₂
- blokáda ADP cesty
- blokáda trombinového receptoru

■ **Stabilizace krevních destiček**

- zvýšení destičkové cAMP a cGMP

■ **Blokáda agregace krevních destiček – blokátory GP IIb/IIIa**

- fragmenty monoklonálních protilátek
- syntetické peptidové inhibitory GP IIb/IIIa
- nepeptidové inhibitory GP IIb/IIIa (fibany)

4.3.4.1. Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix

Ve fázi adheze lze inhibovat vazbu na obnažená kolagenní vlákna buď na úrovni destičkových receptorů nebo blokádu vWF, který tuto vazbu zprostředkuje.

- **blokátory GP IIb/IIIa:** zkouší se **blokáda kyselinou aurinkarboxylovou**, heterogenní směsí **polykarboxylových polymerů** nebo **proteiny izolovanými z jedu Bothrops jararaca**.
- **antagonisté vWF:** používají se **nefunkční fragmenty vWF**, které obsazují vazebná místa. Blokáda na tomto místě zabrzdí vazbu trombocytů na obnažená kolagenní vlákna, zabrání jejich adhezi, aktivaci a pozdější agregaci.

4.3.4.2. Blokáda aktivačních cest a cyklů

4.3.4.2.1. BLOKÁDA ENZYMŮ CYKLU KYSELINY ARACHIDONOVÉ (TVORBA TXA₂)

Blokace acetylsalicylovou kyselinou (ASA)

Antiagregační účinek ASA je dán interferencí s biosyntézou cyklických prostanoidů v cyklu kyseliny arachidonové (Awtry a Loscalzo, 2000). ASA vyvolá **nevratnou inhibici cyklooxygenázy** a následné potlačení syntézy tromboxanu A₂ a dalších prostaglandinů (Hilmerová a Filipovský, 2004). ASA je poměrně rychle deacetylována játry – plazmatický poločas je asi 20 minut.

V roce 1991 byly zjištěny 2 izoformy cyklooxygenázy: COX-1 a COX-2 (Samama a Elalamy, 2000). COX-1 se nachází v krevních destičkách, kdežto COX-2 hlavně v monocitech a makrofázích, ve kterých se tvoří „de novo“. Obě izoformy cyklooxygenázy

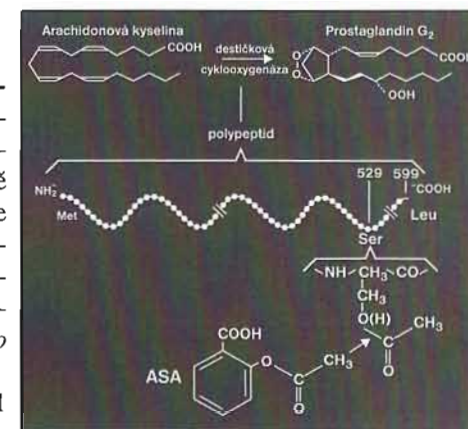


zy jsou membránově vázané enzymy, které tvoří úzký a dlouhý hydrofobní kanál, do kterého vstupuje kyselina arachidonová uvolněná z poškozené membrány. Enzymy katalyzují přeměnu této kyseliny na prostaglandiny. COX-1 vzniká expresí genu o velikosti 22 kB na chromosomu 2 nebo 9, kdežto COX-2 je kódován genem o velikosti 8,3 kB lokalizovaným na chromosomu 1. Bílkovinné řetězce obou cyklogenáz mají stejnou molekulovou hmotnost (72 kDa) a vykazují 63 % homologii v sekvenci aminokyselin (Vane a spol., 1998).

ASA je 50–100krát účinnějším inhibitorem destičkové COX-1, než monocytární COX-2. Přestože plazmatický poločas ASA je poměrně krátký, stačí za tuto dobu inhibovat prakticky všechny destičky. Navíc se předpokládá, že ASA inaktivuje COX i v relativně zralých megakaryocytech, ve kterých jsou již přítomny zárodky krevních destiček (Awtry a Loscalzo, 2000). Inhibice je nevratná a vzhledem k tomu, že destičky nedokáží COX syntetizovat, přetrvává po celou dobu biologického života trombocytu (10–12 dní). V současné době se používá terapeutické dávky ASA v rozmezí 50–100 mg za den. Tato léčba by měla zajistit účinnou blokaci syntézy tromboxanu A₂, aniž by současně blokovala endoteliální produkci PGI₂.

Účinek ASA na krevní destičky a endotelové buňky:

- Ireverzibilně **acetyluje cyklooxygenázu (COX-1)** v cyklu kyseliny arachidonové. Molekulární mechanismus této inhibice spočívá v blokádě COX kanálu v důsledku acetylace hydroxylové skupiny serinového rezidua v místě Ser⁵²⁹. Tím je zabráněno přístupu substrátu ke katalytickému místu enzymu (Patrono a spol., 2001).
- Ireverzibilně inaktivuje COX-1 v **krevních destičkách**, tím zamezuje arachidonové kyselině se vázat částí své molekuly ke COX-1 (Samama a Elalamy, 2000).
- **Acetyluje COX-1 v endotelových buňkách** a zamezuje tak následné konverzi arachidonové kyseliny na výrazné vazodilatátory, zejména na prostacyklin PGI₂.

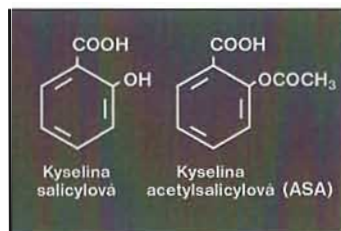


Acetylace serinového rezidua COX-1

- ❑ **COX-1 (prostaglandin H syntáza: PGHS-1)** je exprimována mnoha tkáněmi a buňkami, zahrnující krevní destičky, endotelové buňky, buňky střevní sliznice a jiné.
- ❑ **Inhibiční vliv ASA k COX-1 je závislý na dávce.** Jednorázová dávka 160 mg ASA nebo denní dávka 30–50 mg ASA po dobu 7–10 dnů by měla plně inhibovat destičkovou COX-1.

- ❑ V některých zemích se využívá **inhibice triflusalem**, který podobně jako ASA blokuje cyklooxygenázu. Výhodou je, že inhibice je omezena na cyklooxygenázu krevních destiček a cyklooxygenáza endotelií není ovlivněna. **Syntéza prosta-cyklinu je tak plně zachována.**

- ❑ **Acetylsalicylová kyselina:** již Hippokrates používal 400 let před Kristem jako analgetikum a antipyretikum odvar z vrbové kůry, který obsahuje salicin – název odvozen od latinského názvu vrby – *Salix* (Dalen, 1991). Italský chemik Raffael Piria vyluhoval z extraktu vrbové kůry kyselinu salicylovou (McKee a spol., 2002). V roce 1897 syntetizoval Felix Hoffmann kyselinu acetylsalicylovou (Samama a Elalamy, 2000). Vliv Acetylsalicylové kyseliny na krevní destičky publikoval v roce 1967 Morris.



Existuje fenomen, který se nazývá „**rezistence na ASA**“. O tomto jevu lze hovořit buď z klinického pohledu – jako o selhání protektivního účinku ASA před trombotickou komplikací, nebo ji lze definovat laboratorně – jako neschopnost způsobit in vitro prokazatelnou inhibici destičkových funkcí (Hilmerová a Filipovský, 2004).

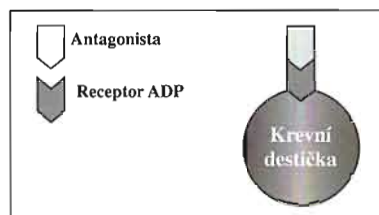
Blokace tromboxansyntetázy

Využívá se imidazolových přípravků (např. VAPIPROST nebo RIDOGREL). Jedná se o kombinované blokátory receptorů TXA_2 a tromboxansyntetázy.

4.3.4.2.2. BLOKÁDA MEMBRÁNOVÝCH RECEPTORŮ KREVŇÍCH DESTIČEK

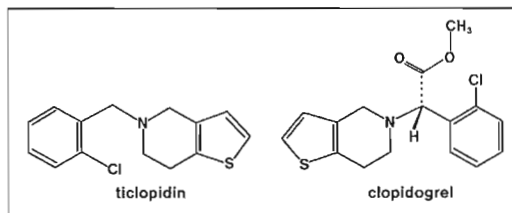
Selektivní inhibitory

- **Receptory ADP:** ADP je vylučovaný z denzních granulí destiček a z aktivovaného cévního subendotelu



TICLOPIDIN A CLOPIDOGREL jsou thienopyrimidinové deriváty, které ireversibilně blokují receptory aktivace destiček pro ADP typu $P2Y_1$. Jiné cesty aktivace zůstávají neovlivněny.

Destičky nemocných, kteří užívají tyto léky nejsou schopné agregovat po stimulaci ADP, ale



zachovávají si schopnost změny tvaru po přidání ADP. Blokáda receptorů $P2Y_1$ není schopna inhibovat všechny ADP receptory aktivace destiček. Je snaha najít inhibitory receptorů $P2Y_{AD}$.

- **Receptory trombinu:** používají se
 - **Blokátory trombinových destičkových receptorů PAR-1:** jejich účinek je založen na principu protilátek proti vlastnímu receptoru.
 - **Trombostatin:** jedná se o degradační oligopeptidový produkt bradykininu o 5 aminokyselinách, který se váže přímo na aktivní místo receptoru.

Komplexní inhibitory

Jsou léčiva s komplexním působením.

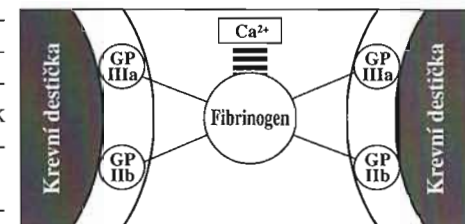
- **Anagrelid:** inhibuje aktivaci po řadě podnětů (ADP, trombin, kyselina arachidonová, kolagen a j.). Po dlouhodobém podávání se může objevit trombocytopenie.

4.3.4.3. Blokáda agregace krevních destiček – blokátory GP IIb/IIIa

4.3.4.3.1. BLOKÁTORY RECEPTORŮ GP IIb/IIIa

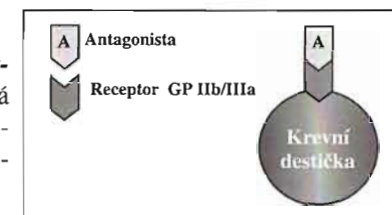
Inhibitory glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa zasahují v místě konečného a společného bodu všech cest vedoucích k aktivaci krevních destiček a v důsledku toho blokují agregaci destiček, která je vyvolána všemi agonisty.

Inhibitory blokují připojení fibrinogenu k receptoru IIb/IIIa na krevních destičkách tím, že obsadí receptorové místo na konformačně změněné molekule GP IIb/IIIa.



Blokátory GP IIb/IIIa blokují spojování destiček přes můstky Ca^{2+} a fibrinogen

- **Inhibitory na bázi monoklonální protilátky:** ABCIXIMAB (chimerická myší/lidská monoklonální protilátka blokující nespecificky sterickou zábranou destičkový receptor GP IIb/IIIa)



- ❑ ABCIXIMAB blokuje i vitronektinový receptor ($\alpha_v\beta_3$) endotelií, buněk hladkého svalu a destiček a váže se i na $\alpha_{II}\beta_2$ (Mac-1) receptor monocytů, neutrofilů a NK buněk (natural killer cells).

- **Inhibitory s malou molekulou** – Tyto látky napodobují RGD sekvenci aminokyselin fibrinogenu a váží se specificky na receptor krevních destiček IIb/IIIa.

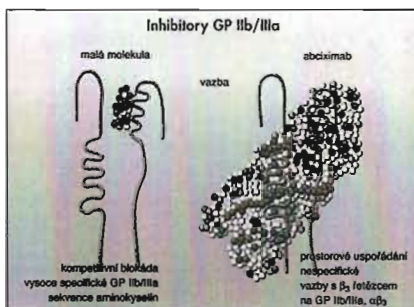
Rozlišujeme tyto nízkomolekulární látky:

- **Peptidové inhibitory**

- **EPTIFIBATID**: cyklický heptapeptid odvozený z hadího jedu pygmejového chřestýše. Má nahrazen Lys za Arg. Jedná se tedy o sekvenci KGD, která napodobuje RGD sekvenci a váže se s vysokou afinitou na GP IIb/IIIa.

- **Nepeptidové inhibitory**

- **TIROFIBAN**: nepeptidový derivát tyrosinu
- **LAMIFIBAN**



INHIBITORY GP RECEPTORŮ JSOU V SOUČASNÉ DOBĚ NEJÚČINNĚJŠÍMI PROTIDESTIČKOVÝMI LÉKY.

4.3.4.3.2. BLOKÁTORY AKTIVÁTORU AGREGACE KREV. DESTIČEK – TROMBINU

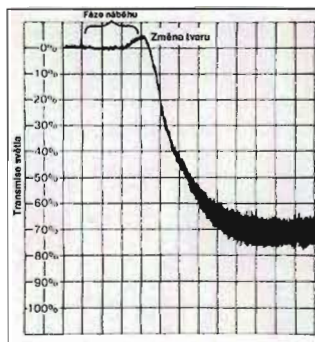
■ **Nízkomolekulární hepariny – LMWH**: v přítomnosti AT potencují jeho účinek na aktivovaný faktor Xa a tím snižují produkci aktivátoru krevních destiček – trombinu. Aktivace destiček ostatními mechanismy zůstává zachována (Vojáček, 2003).

4.3.4.4. Monitorování antiagregační léčby

4.3.4.4.1. SLEDOVÁNÍ INHIBICE AGREGAČNÍ KŘIVKY STIMULOVANÉ KOLAGENEM

Zjistí se hodnota agregace křivky po stimulaci kolagenem před zahájením léčby a následně se tato hodnota sleduje po celou dobu léčby přibližně v měsíčních intervalech

Léčebné rozmezí: 15–30 % maxima křivky před léčbou.

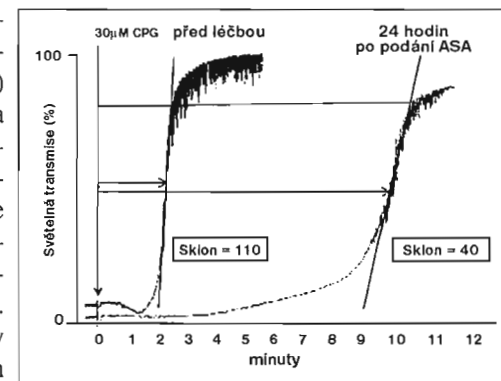


Agregační křivka po kolagenu

4.3.4.4.2. SLEDOVÁNÍ INHIBICE AGREGAČNÍ KŘIVKY STIMULOVANÉ KATIONICKÝM PROPYL GALÁTEM

Sleduje se agregace křivka po stimulaci kationickým propylgalátem (CPG). Stanovení probíhá v optickém agregometru za použití destičkami bohaté (PRP) a chudé

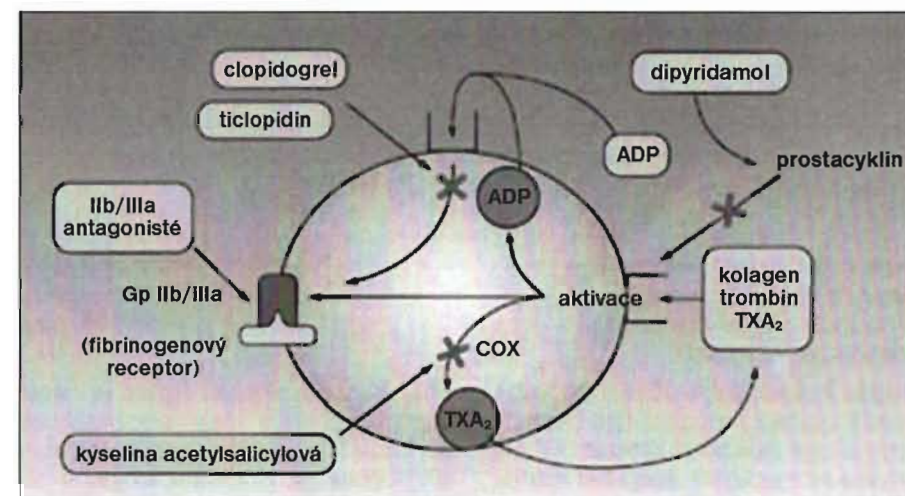
(PPP) plasmu. Měří se výška maximální amplitudy (ma), rychlost náběhu agregace křivky (ms-slope) a doba potřebná k dosažení 50 % ma (T50). Je-li to možné změřit se agregace odpověď před podáním protidestičkové terapie (ASA) a pak se provádí pravidelná měření v průběhu terapie, dokud se nedosáhne optimálního snížení hodnoty slope. Kontroly po dosažení této hodnoty je potom možné provádět v delších časových intervalech.



Agregace s propylgalátem – křivka před (vlevo) a po podání ASA (vpravo)

- Heparin do hodnoty 4,0 IU/ml nemá vliv na výsledek vyšetření.
- Počty destiček pod $100 \cdot 10^9/l$ mohou významně ovlivnit výsledek testu.
- Nelze stanovit vzorky s chylózní, ikterickou a hemolytickou plazmou.

PROTIDESTIČKOVÁ LÉČBA – MECHANISMY ÚČINKU



Literatura

Andersson, L. O., Borrowcliffe, T. W., Holmer, E., et al.: **Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma.** Thromb. Res. 115, 1979, s. 531–541.

Awtry, H. A. a Loscalzo, J.: **Aspirin.** Circulation, 101, 2000, s. 1206–1218.

Badimon, L. a Badimon, J. J.: **Interaction of platelet activation and coagulation.** In: Fuster, V., Topol, E. J., eds. Atherosclerosis and coronary artery disease. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 1996, s. 639–656.

Bultas, J. a Karetová, D.: **Léčba trombotických stavů – kde jsme a kam se ubíráme.** Remedia 14, 2004, č.2, s. 182–200.

Dalen, J. E.: **An apple a day or an aspirin a day.** Arch. Intern. Med. 151, 1991, s. 1066–1069.

Hilmerová, J. a Filipovský, J.: **Klinický význam aspirinové rezistence.** Vnitř. Lék., 50, 2004, č. 6, s. 462–469.

Marder, V.J. a Sherry, S.: **Thrombolytic therapy: Current status (2).** New Engl. Med. 318, 1988, s. 1512–1520.

Mark, D. B. et al.: **Effectiveness of thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator as compared with streptokinase for acute myocardial infarction.** New Engl. J. Med. 332, 1995, s. 1418–1424.

McKee, S. A., Sane, D. C., Dellargyris, E. N.: **Aspirin resistance in cardiovascular diseases: A review of prevalence, mechanisms and clinical significance.** Thromb. Haemost. 88, 2002, s. 711–715.

McLean, J.: **The thromboplastic action of cephalin.** Am. J. Physiol. 41, 1916, s. 250–257.

Novak, J. a Bucha, S.: **Ecarin test.** Semin. Thrombos. Haemostas. 22, 1996, s. 197–202.

Patrono, C., Collier, B., Dalen, J. E. et al.: **Platelet – Active Drugs. The relationship among dose, effectiveness and side effects.** Chest 119, 2001, s. 39–63.

Samama, M.M. a Elalamy, I.: **Aspirine et hémostase.** Rev. Méd. Interne 21, 2000, Suppl. 1, s. 27 – 34.

Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M.: **Cyklooxygenases 1 a 2.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38, 1998, s. 97–120.

Vojáček, J.: **Inhibitory destičkových glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa.** Remedia 13, 2003, č.2, s. 84–92.

Vojáček, J., Malý, M., Hraboš, V. et al.: **Hladina tkáňového faktoru, inhibitoru tkáňového faktoru a solubilního P-selektinu u nemocných s akutním koronárním syndromem.** Cor. Vasa 44, 2002, s. 148–151.

Seznam zkratek

AA	aminokyselina
ACLA	antikardiolipinové protilátky
ADP	adenosindifosfát
ACT	aktivovaný koagulační čas (activated coagulation time)
AP	aktivační peptid
APA	antifolipidové protilátky
APC	aktivovaný protein C
APC-R	rezistence na aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
ASA	acetylsalicylová kyselina (aspirin)
AT	antitrombin
BM	bazální membrána
BU	Bethesda jednotky, (Bethesda Unit)
C-1 INH	C1-inhibitor
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	nomenklatura CD znaků
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CML	chronická myeloidní leukémie
COX	cyklooxygenáza
CPG	kationický propylgalát
ČZP	čerstvě zamražená plazma
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECT	ekarinový test (ecarin clotting test)
EID	elektroimunodifuze
ELISA	enzymimunoanalýza
EPCR	endoteliální receptor proteinu C
F I-XIII	faktory plazmatického koagulačního systému
Fc	fragment imunoglobulinu
FDP	fibrin/fibrinogen degradační produkty
F 1+2	fragmenty 1+2
FPA a FPB	fibrinopeptidy A a B
GIT	gastrointestinální trakt
Gla	oblast zahrnující gama-karboxylovou skupinu glutamové kyseliny
GP	glykoproteiny
HC II	heparinový kofaktor II
HDL, LDL, VDL	frakce lipoproteinů
HEP	heparin
HIT-I a II	heparinem indukovaná trombocytopenie
HMW	vysokomolekulární složka (Heavy Molecular Weight)
HMWK	vysokomolekulární kininogen
HUS	hemolytickoureimický syndrom
ICHs	ischemická choroba srdeční
IL 1	interleukin 1
IM	infarkt myokardu

INR	mezinárodní normalizovaný poměr u antikoagulační léčby (international normalized ratio)
ISI	index citlivosti tromboplastinu
ITP	idiopatická trombocytopenická purpura
LA	Lupus antikoagulans
LIA	světelná nebo laserová imunoanalýza
LMWH	nízkomolekulární heparin (low molecular weight heparin)
MFS	monocytomakrofágový systém
MTHFR	methyilentetrahydrofolát reduktáza
MW	molekulová hmotnost (molecular weight)
UFH	nefrakcionovaný heparin
PAI-1	inhibitor aktivátorů plazminogenu
PAP	plasmin-antiplasmin komplex
PAR-1	proteolytický aktivovaný receptor
PC	jednořetězcový plazmatický glykoprotein
PCI	inhibitor aktivovaného proteinu C
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGI₂	prostacyklin
PIVKA	neaktivní koagulační faktory
PI	fosfolipidová matrix
PPP	plazma chudá na destičky (platelet poor plasma)
PRP	plazma bohatá na destičky (platelet rich plasma)
PS	protein S
PT	protrombinový test (quick test)
RIA	radioimunoanalýza
RiCo	ristocetin kofaktor
RIPA	agregace stimulovaná ristocetinem
RNA	ribonukleová kyselina
RVVT	Test s jedem Russelovy zmije
SLE	systémový lupus erythematodes
TAT	trypsin-antitrypsin komplex
TAFI	trypsinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TEG	thrombelastogram
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TG	tromboglobulin
TM	trombomodulin
TNF	tumor nekrotizující faktor
TKD	transplantace kostní dřeně
t-PA	tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator)
TT	trypsinový test (thrombin test)
TTP	trombotická trombocytopenická purpura (thrombotic thrombocytopenic purpura)
TX A2	tromboxan A2
u-Pa	urokináza
vWF	von Willebrandův faktor

Rejstřík

A

afibrinogémie 146
 agregační křivky 230
 aktivátory 131
 – t-PA 90, 75, 78
 – urokináza 75, 77
 anagrelid 229
 anémie
 – vrozené 158
 antiplasmin 115–116
 antifosfolipidový syndrom 200, 204
 angina pectoris 195
 antigen 129, 134, 135
 anistreptáza 221
 antitrombin 91, 99, 100, 210
 antitrypsin 124, 111

B

blokátory
 – GP Ib/IIa 226
 – GP IIb/IIIa 229
 buňky
 – endotelové 22–23

C

cévní stěna 19, 28
 – aterosklerotická 192
 cévy 13, 21
 cytometrie 136
 C4-b BP 100

D

destičky 196
 – adheze 196
 – agregace 196
 – aktivace 197
 dikumarin 214
 dysfibrinogémie 180
 D-dimery 82

E

endotel 13, 22–23

F

faktory koagulační 29, 39, 50, 53–62, 200
 fáze koagulace
 – iniciační 63
 – amplifikační 68, 69
 – propagační 69–72
 fibrin 70–72, 94–95
 – monomer 59
 – nerozpustný 60
 – polymerovaný 59
 fibrinogen 48, 70, 94, 180
 fibrinolýza 96
 – aktivace 96
 FDP 81

G

glykoproteiny 36
 glykosaminoglykany 20

H

hemofilie 172, 174, 176
 hemokoagulace 27, 72
 hemostáza 26–28, 32–33, 35, 37, 131, 192
 – fetální 27
 – neonatální 27
 – primární 22–24
 heparin 212
 – nefrakcionovaný 211
 – nízkomolekulární 211
 heparinový kofaktor II 91, 92
 hirudin 213, 219
 homocystein 203
 hyperfibrinolýza 96
 hyperhomocysteinémie 203–204
 hypofibrinolýza 96

I

inhibitor 83, 98–99, 116–118, 123–125, 151, 175, 209, 213, 229–230
 – tkáňového faktoru 102
 ITP 209

K

kalcium 41
kapiláry 15–16
kardiolipin 125
kininy 64
kininogen 64
koagulace 184
– aloimunitní 184
– komplexy 32–34
– konzumpční 185
– vnější systém 55
– vnitřní systém 56–58
koagulopatie 171, 172
koagulometry 125–127, 137
kofaktory 44
kuniny 99

L

léčba
– antiagregační 192, 225, 230
– antikoagulační 184, 192, 209
– antitrombotická 208
– monitorování 208, 219
– trombolytická 220, 193
leukocyty 36
lupus antikoagulans 113, 125–126

M

makroglobulin 122–123
markery 197
– aktivace koagulace 198
– aktivované fibrinolýzy 198
– krevních destiček 198
– molekulové 198
– trombogeneze a trombofilie 197
metody
– koagulační 119
– gelifikační 124
– imunochemické 123, 134, 148
– spektrofotometrické 132
– zákalové 131
mutace
– Cambridge 174
– Leidská 173
– MTHFR 175
– protrombinu 175

N

nemoc
– von Willebrandova 177, 179

P

plazmin 91, 92–93
plazminogen 87–89, 91–93
proteáza 41
protein C 105–111, 99
protein S 111–112
protilátky
– antifosfolipidové 125
– antikardiolipinové 128
protrombin 49, 65, 69
protrombináza 69
purpury 153–155, 162
– vrozené 154
– získané 155

R

radioimunoanalýza 135
receptory ADP 228
rezistence na aktivovaný protein C 200

S

serpiny 98
stavy
– trombofilní 171
– trombotické 163–166
streptokináza 221, 222
syndrom
– antifosfolipidový 176
– Bernard-Soulier 168
– hemolyticko-uremický 163
– Heřmanského Pudlákův 169

T

TAFI 105–109
tenáza
– vnější 67
– vnitřní 67
tepénky 15
tepny 15
test
– ACT 134, 146, 191

– APTT 131, 132, 19
– fibrinolýza 130
– konzumpce protrombinu 128
– krvácivost 128
– Lee-White 128
– na hirudin 192
– protrombinový (Quick) 130
– reptilázový 134
– retrakce 129
– thromboelastograf 129
– trombinový 133
tkáňový faktor 38–40, 64, 65, 66, 68
trombin 49–50, 65, 72, 2329
trombocytémie 170–171
trombocytóza 170–171
trombocytopatie 166–168, 170
trombocytopenie 156, 158, 159, 161, 164
trombofilie 197
trombomodulin 113
trombolytika 221, 223, 225

trombospondin 18
trombózy 194–195
– arteriální 166–168
– venózní 166
TTP 211
turbidimetrie 132

V

vazodilatace 21
vazokonstrikce 21
vlásečnice 16–17
vitamin K 183, 214
vitronectin 31

Ž

žilky 18
žíly 18