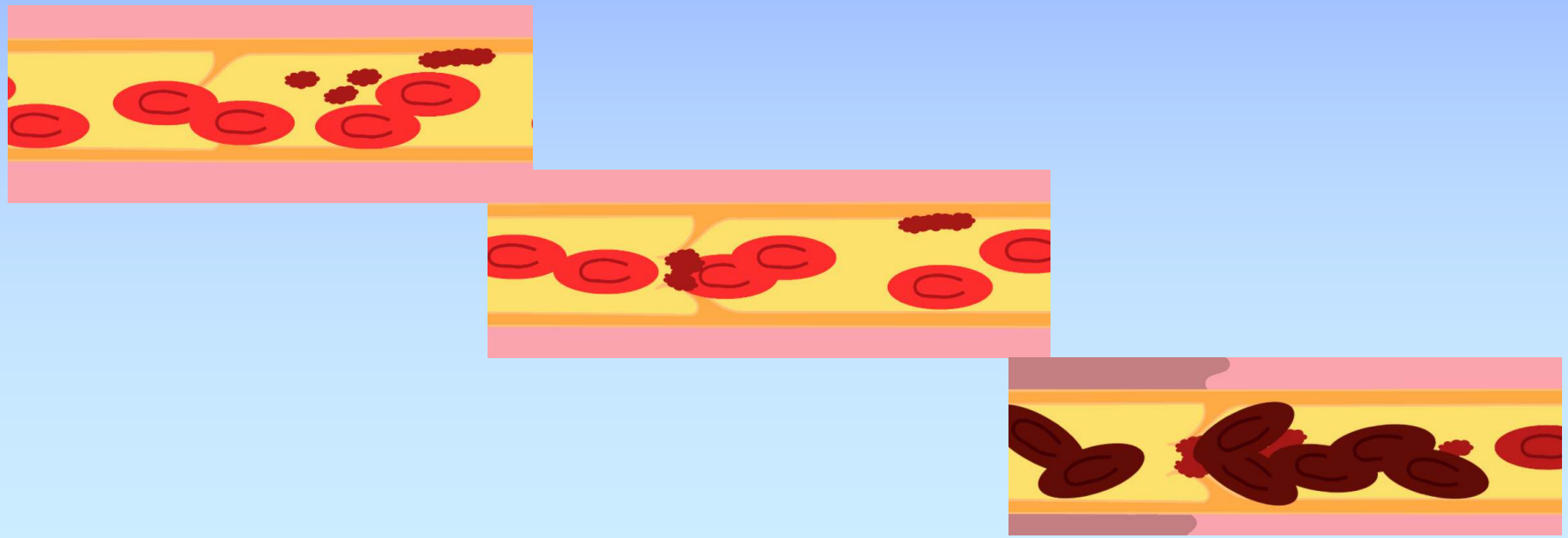
Vyšetření hemostázy

Prof. Pavel Maruna,
Pavel Burda,
Petr Maršálek
a kolektiv ÚPF 1.LF UK

Embolie je vmetení, zaklínění vmetku (embolu) v cévách vedoucí k jejich ucpání a následné nedokrevnosti (ischemii) příslušné části těla (mozek, plíce, končetina).
Embolizací rozumíme pohyb embolu z místa, kde vznikl, do oblasti, kterou ucpe.
Jako embolus může fungovat například **trombus** uvolněný do krevního řečiště, tuková či vzduchová bublinka, plodová voda nebo cizorodá částice v krevním řečišti.



I.
Fyziologie

Hemostáza

= je mechanismus umožňující udržení oběhu po poruše cévní stěny.

- Sestává z těchto fází:

1. **Klidová fáze – Udržování krve v tekutém stavu v cirkulaci.**

2. **Aktivační fáze - Zástava krvácení v místě poranění pomocí hemostatické zátky.**

3. **Fáze rekonstituce - rekanalizace - Zajišťuje odstranění hemostatické zátky na konci reparačních procesů.**

Hemostáza

Hemostáza je integrální součástí:

- **stresové reakce**
- **zánětlivé odpovědi**

Protektivní role ⋮ **Nespecifický obranný mechanismus.**

X

Patofyziologická role ⋮ **trombóza/embolie**

ateroskleróza

Hemostáza

- **Hemostáza jako fyziologický proces, musí být:**
  1. **Rychlá**
  2. **Správně lokalizována**
  3. **Reverzibilní**

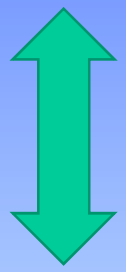
Nevhodná hemostáza:

- trombóza / embolie

- DIC (disseminated intra-vascular coagulation)

- krvácení

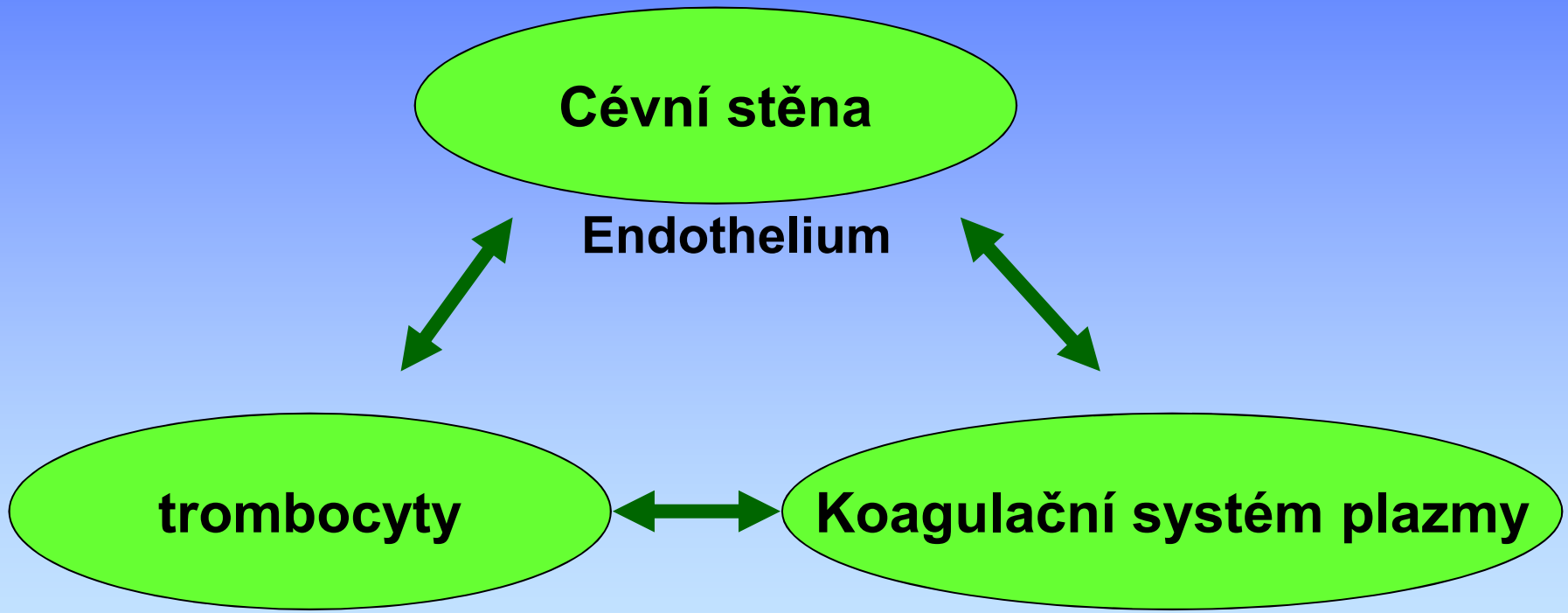
Hemostáza (zástava krvácení)



Hemokoagulace (srážení krve)
jeden z dějů hemostázy

- Základním principem je vytvoření fibrinové sítě, která zachytává erytrocyty, leukocyty a trombocyty z krevního řečiště a tvoří definitivní trombus!

Hemostáza

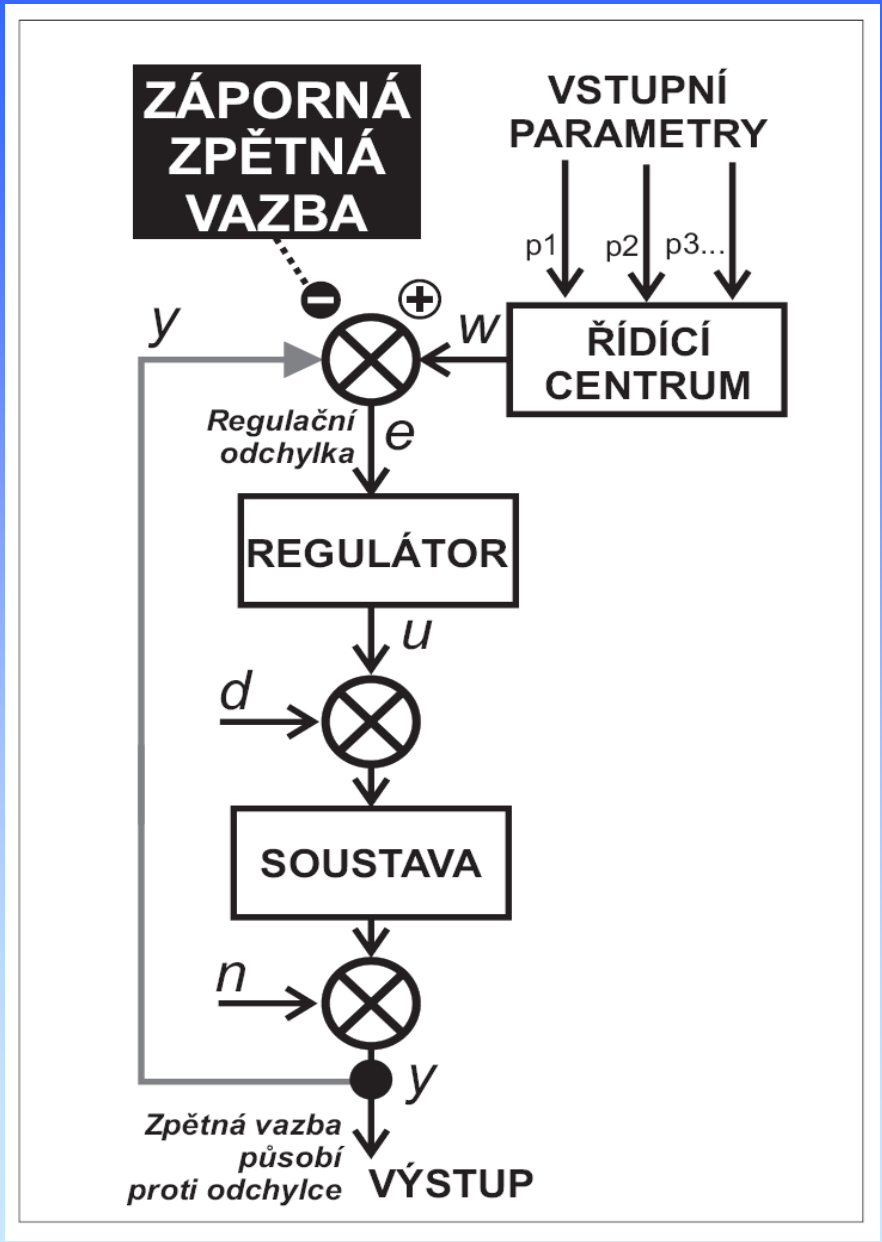

Cévní stěna
Endothelium
trombocyty
Koagulační systém plazmy

Obecné mechanismy, popis regulace

Negativní (záporná) zpětná vazba

y…regulovaná veličina, v/v
w…požadovaná hodnota
e…regulační odchylka/ signál
u…akční veličina
d,n…poruchové veličiny

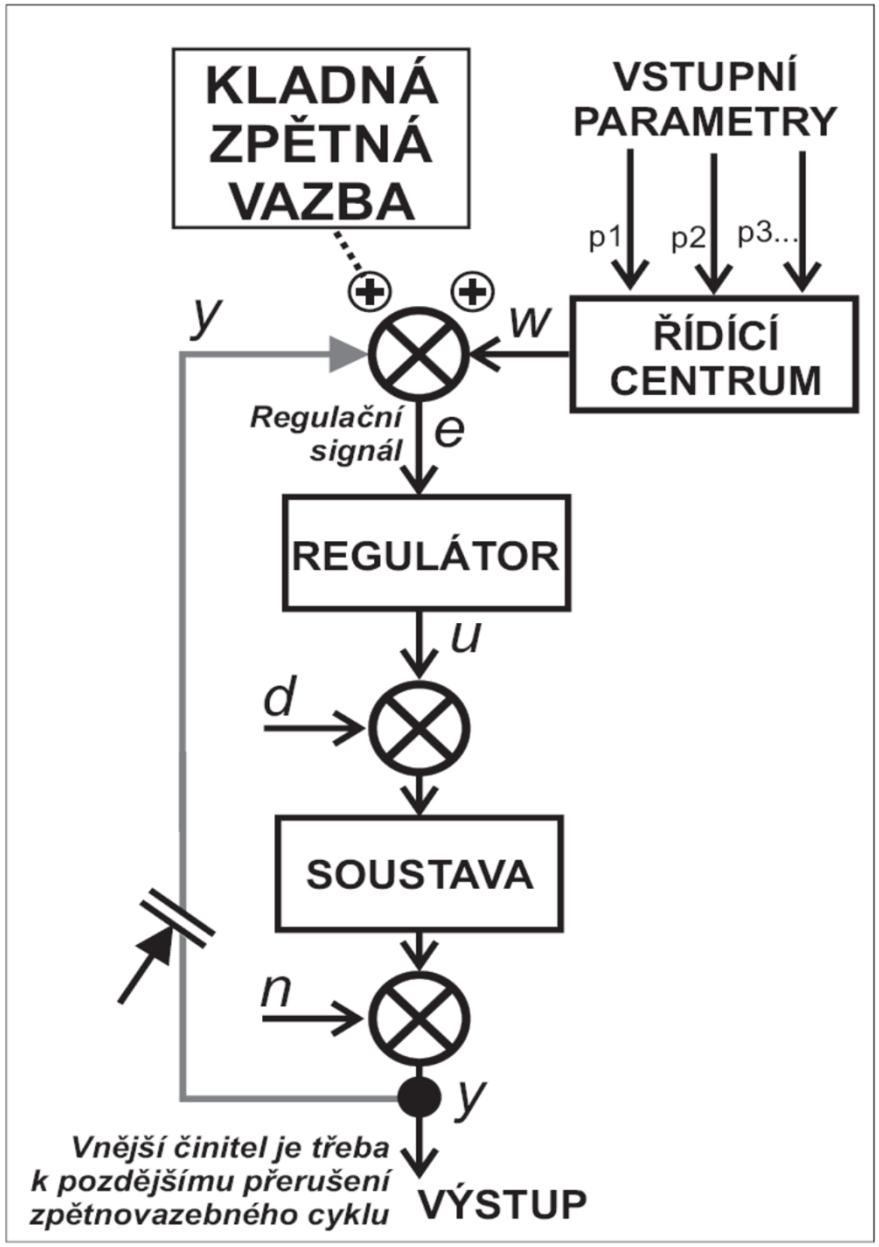
U **záporné** zpětné vazby regulační odchylka *e* použitá k regulaci vznikne **odečtením** akční veličiny
(-*y*) od požadované hodnoty (+*w*),
e = *w* - *y*.



Pozitivní (kladná) zpětná vazba

y…regulovaná veličina, v/v
w…požadovaná hodnota
e…regulační odchylka/ signál
u…akční veličina
d,n…poruchové veličiny

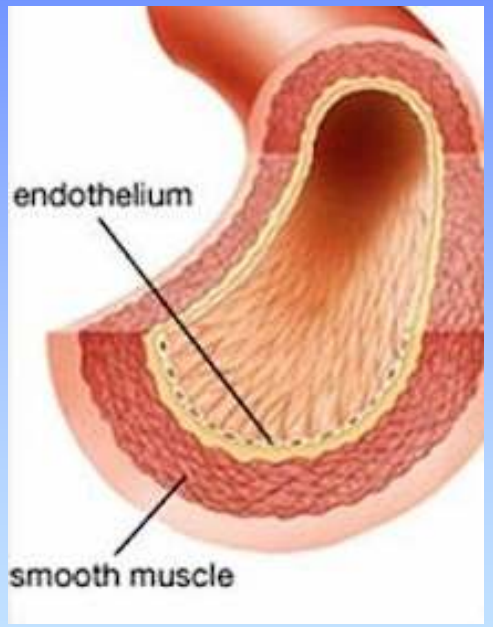
U **kladné** zpětné vazby regulační signál *e* vznikne **přičtením** akční veličiny (+*y*) k požadované hodnotě (+*w*), *e* = *w* + *y*.



Endotelium

Antitrombotické vlastnosti

- Pokrývá vysoce trombogenní bazální membránu.
- Neporušené endotelium neváže trombocyty (endotelium vylučuje PGI2 (prostaglandin) a NO, které vazbě zabraňují)
- ADPase brání agregaci trombocytů



Endotelium

Antitrombotické vlastnosti

Antikoagulační aktivity:

- Heparin-like molecules ... aktivují anti-thrombin III (inaktivuje aktivní proteázy)
- Thrombomodulin ... mění specificitu trombinu (aktivuje protein C, který inaktivuje faktor Va a VIIIa)
- tPA (tissue plasminogen activator) ... aktivuje fibrinolýzu skrze přeměny plasminogenu na plasmin

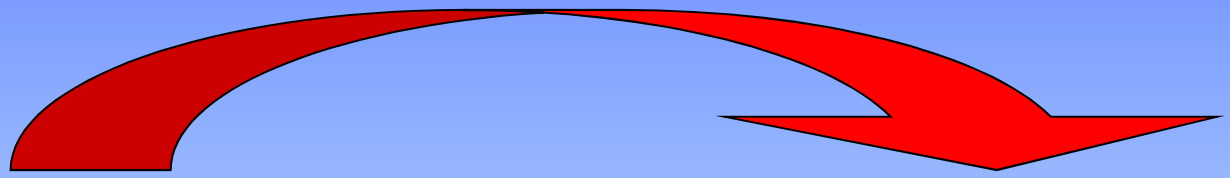
Endotelium

protrombotické vlastnosti

- syntéza von Willebrandova faktoru
- uvolnění „tkáňového faktoru“ (tissue factor)
- produkce PAI (plasminogen activator inhibitors)
- membránové fosfolipidy váží a usnadňují aktivaci srážecích faktorů skrze vytváření Ca2+ můstků

Endotelium

Poranění cévy

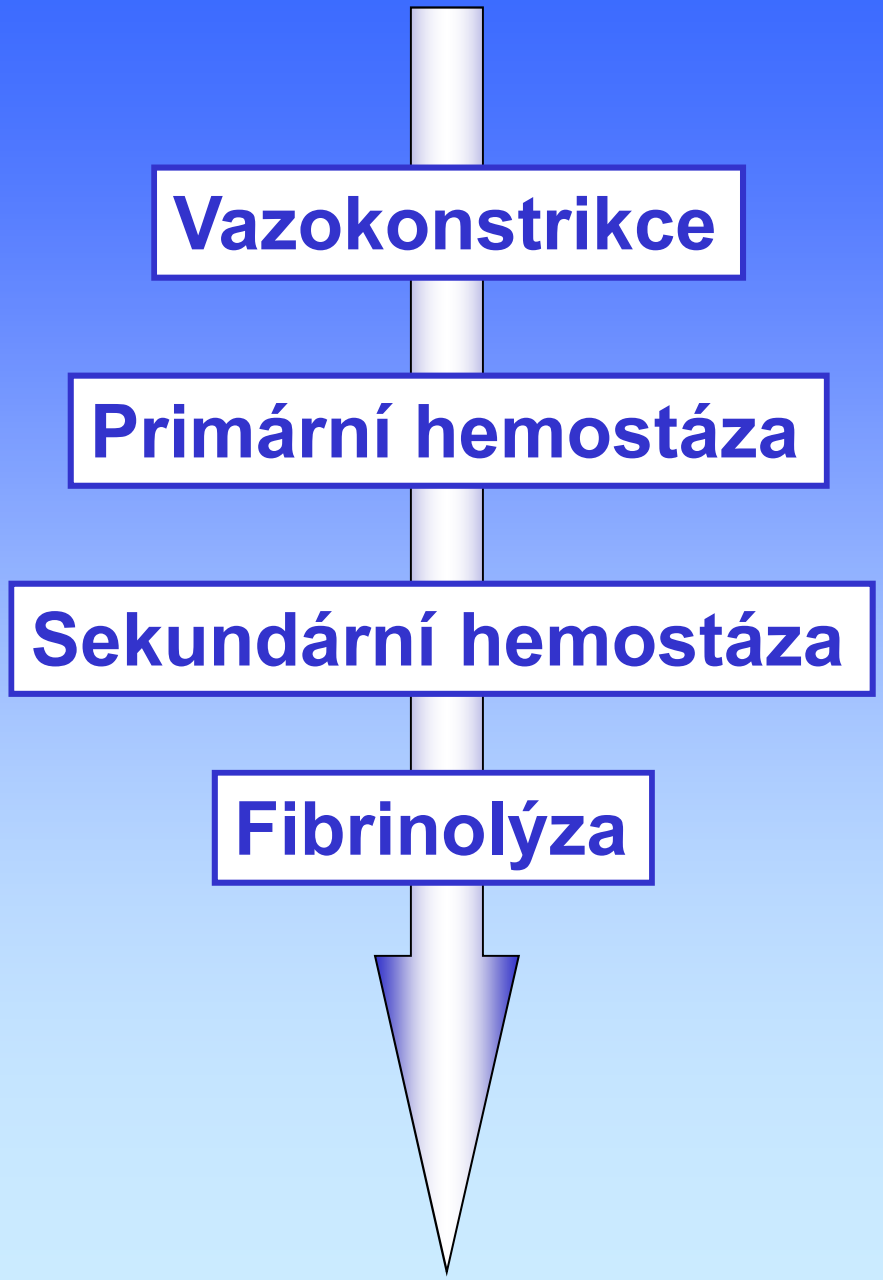


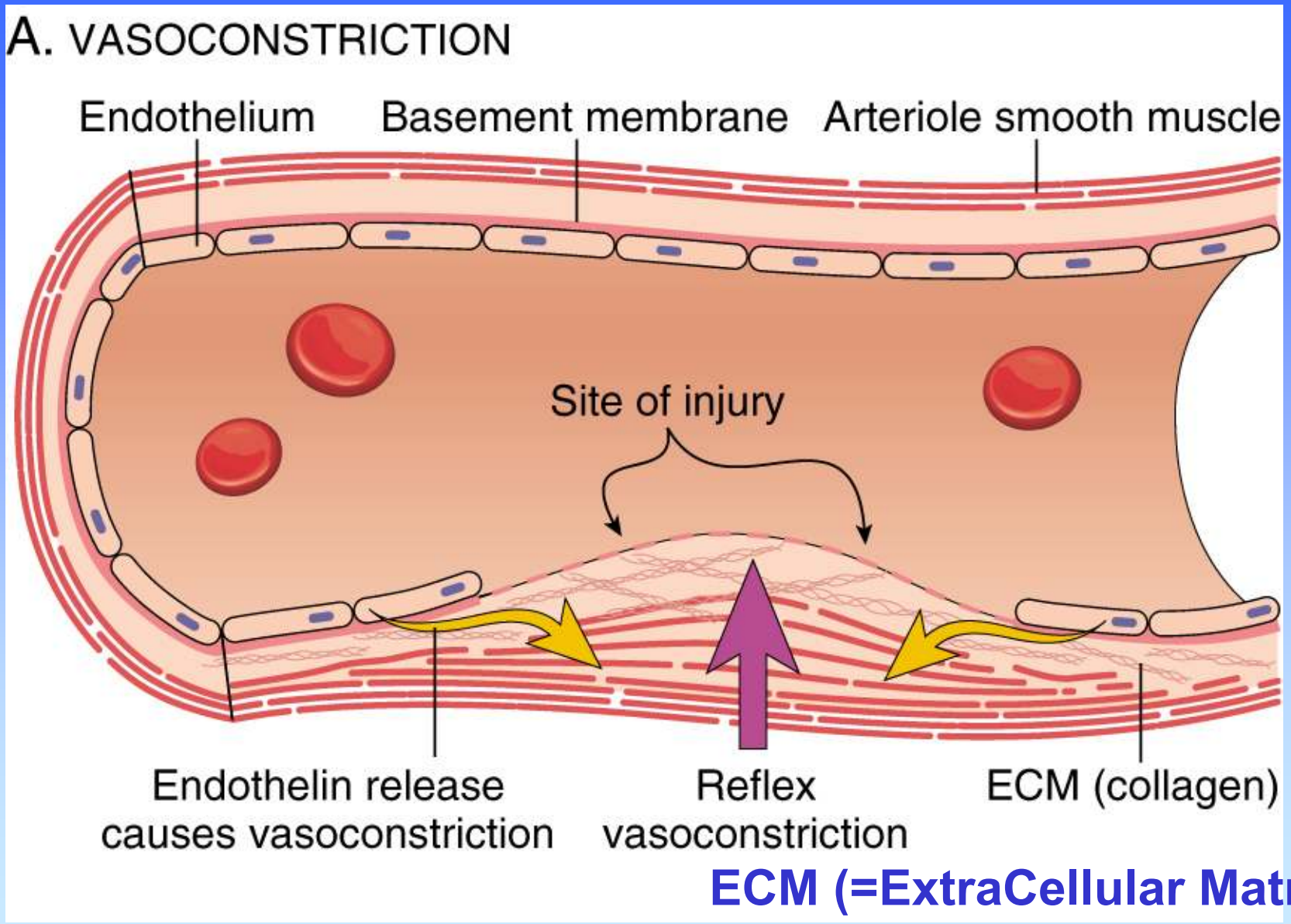
Antitrombogenní

(upřednostňuje tekutost krve)

Trombogenní

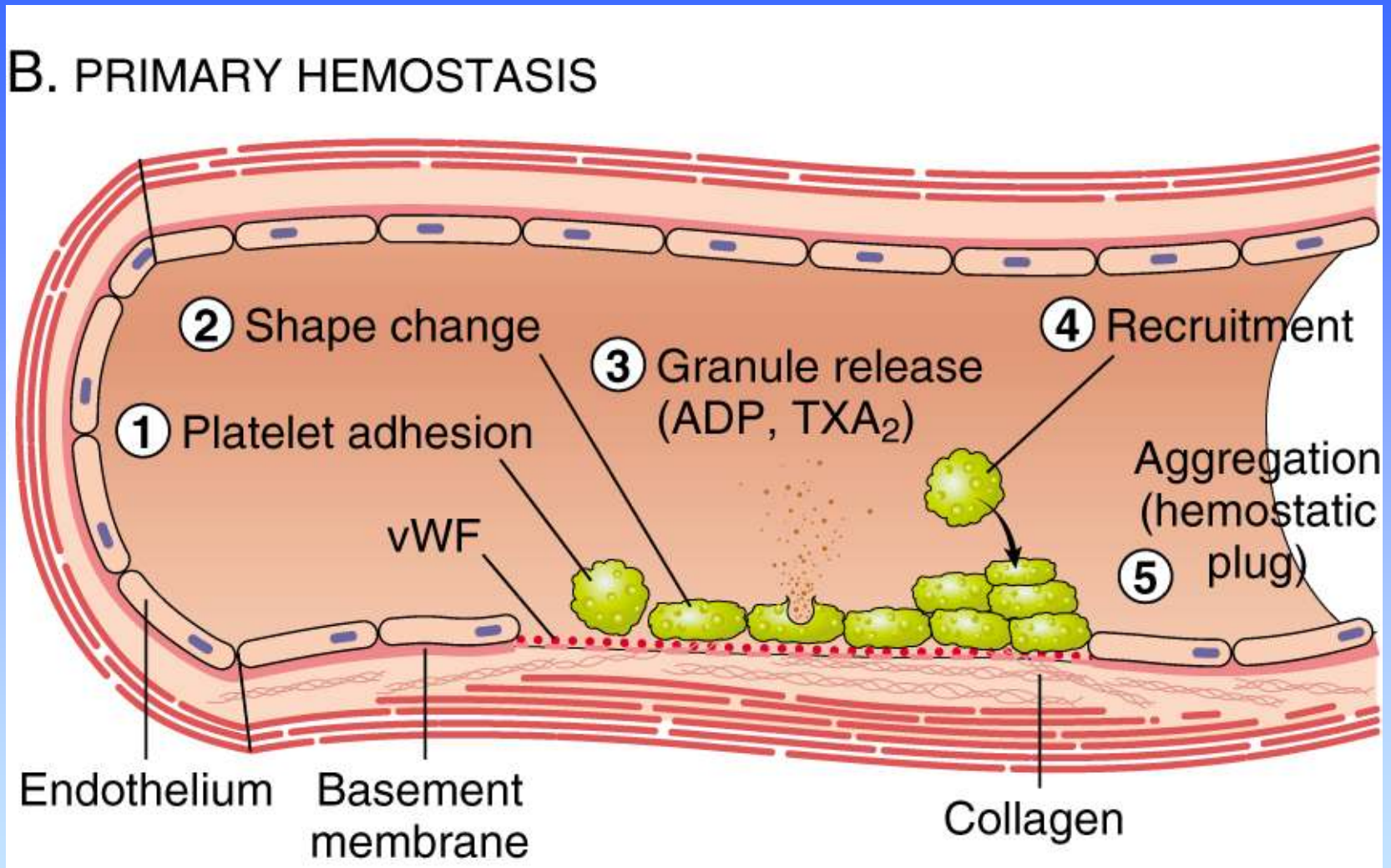
(vytváření zátky)


Vazokonstrikce
Primární hemostáza
Sekundární hemostáza
Fibrinolýza

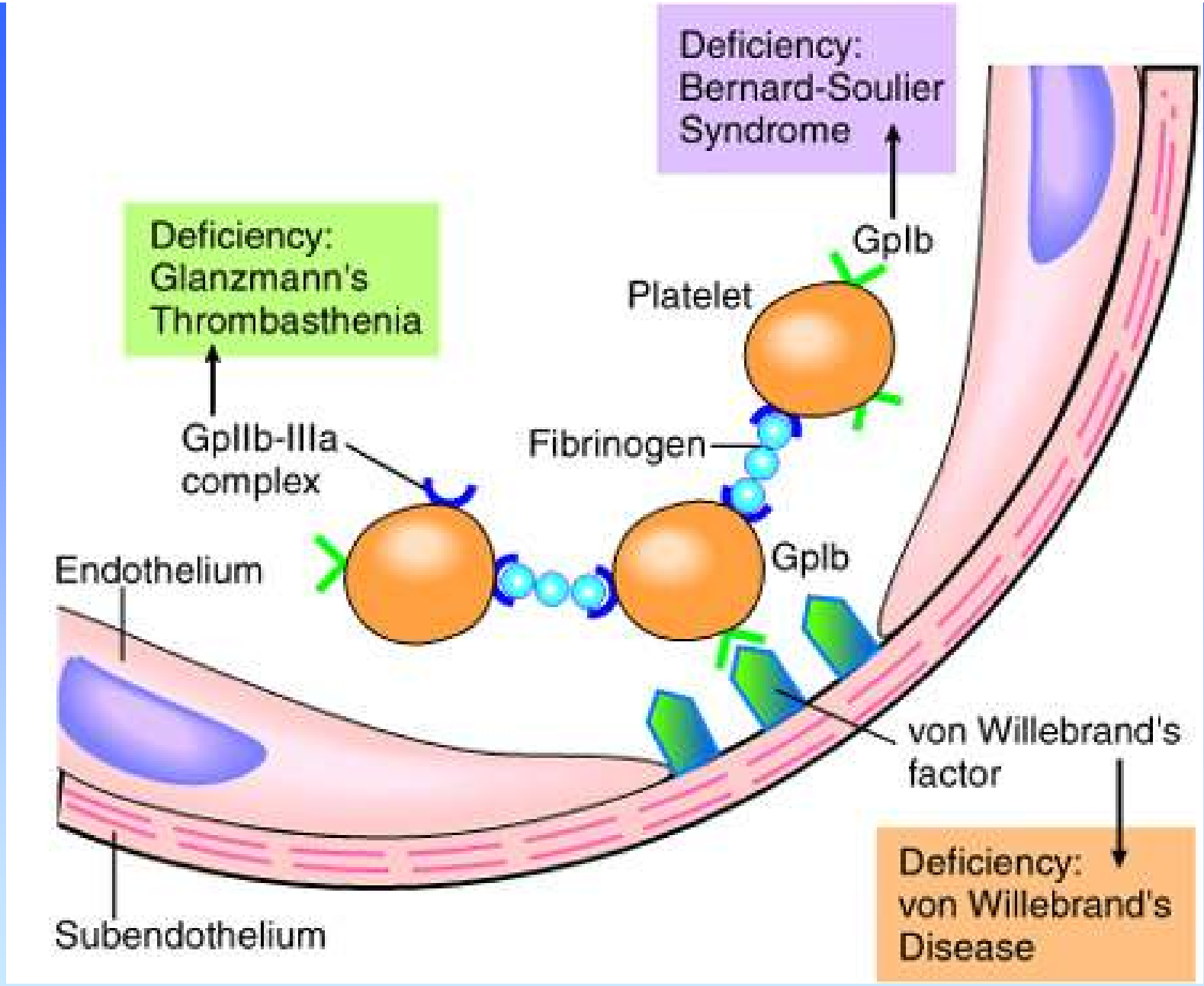


ECM (=ExtraCellular Matrix)

Vazokonstrikce: endothelin-1 (ET-1), tromboxan A2 (obojí z end), adrenalin, noradrenalin, serotonin, prostaglandiny



TXA2 (thromboxane A2, lipid)



Gp – G-protein coupled receptors

C. SECONDARY HEMOSTASIS

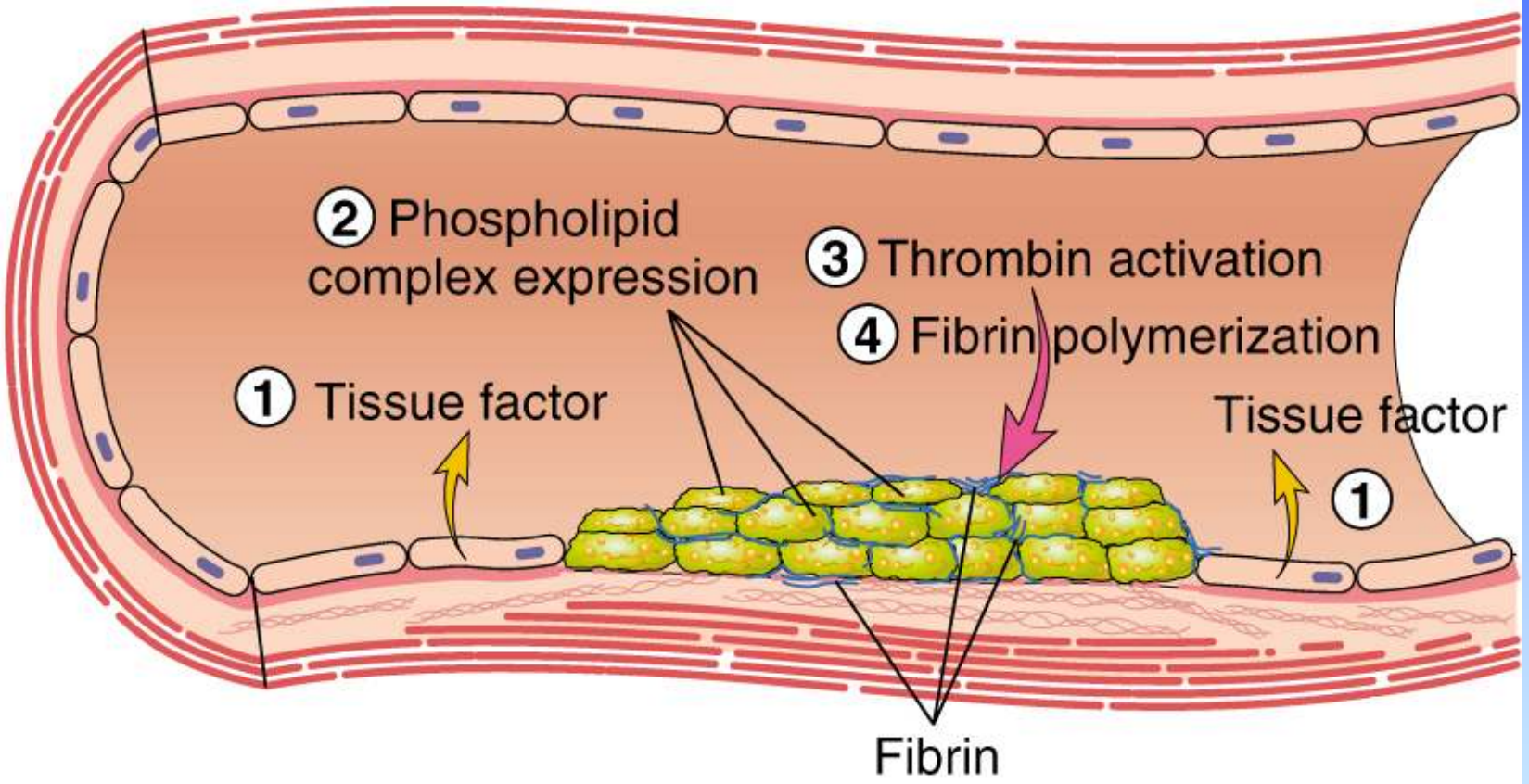
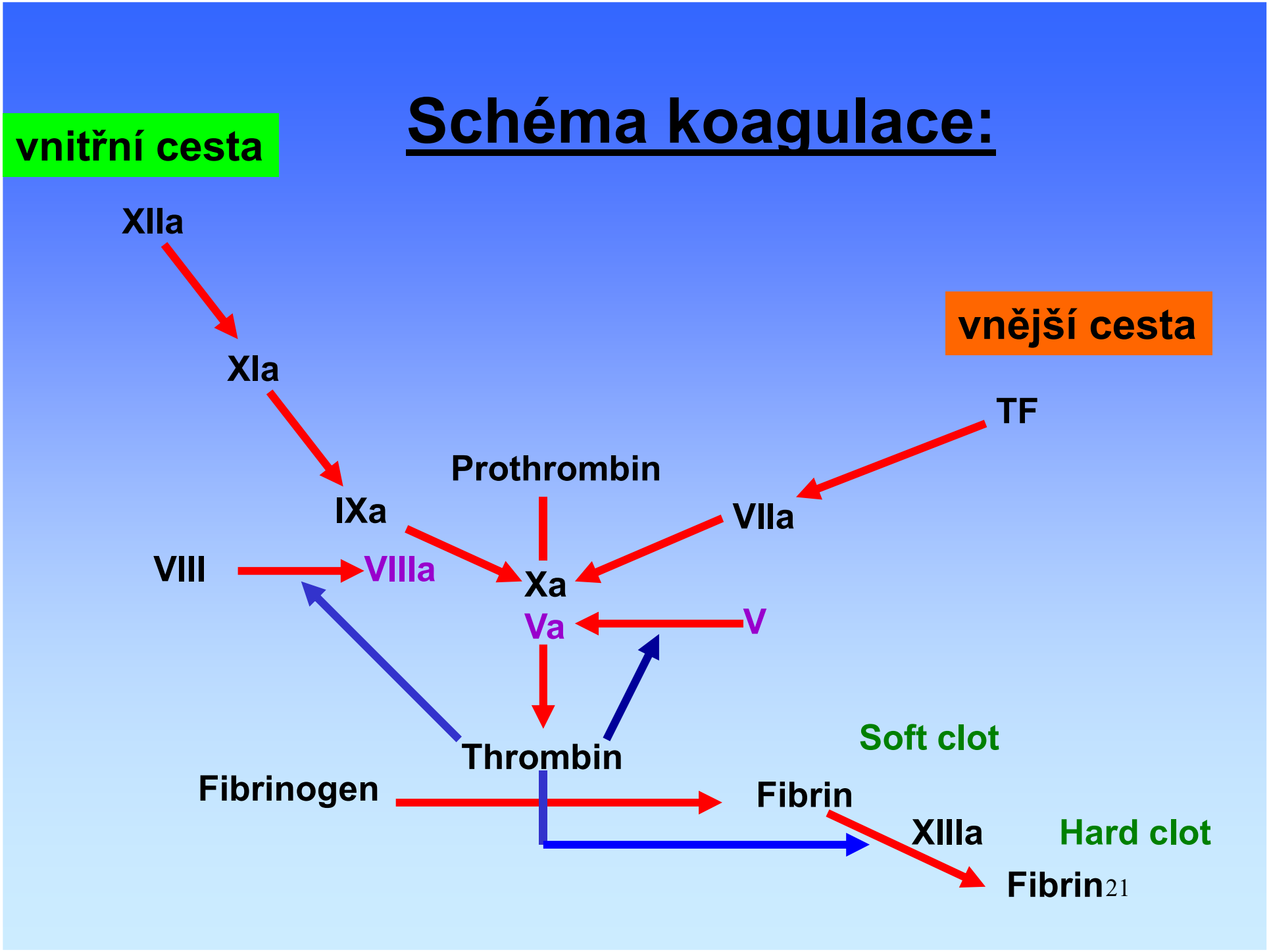
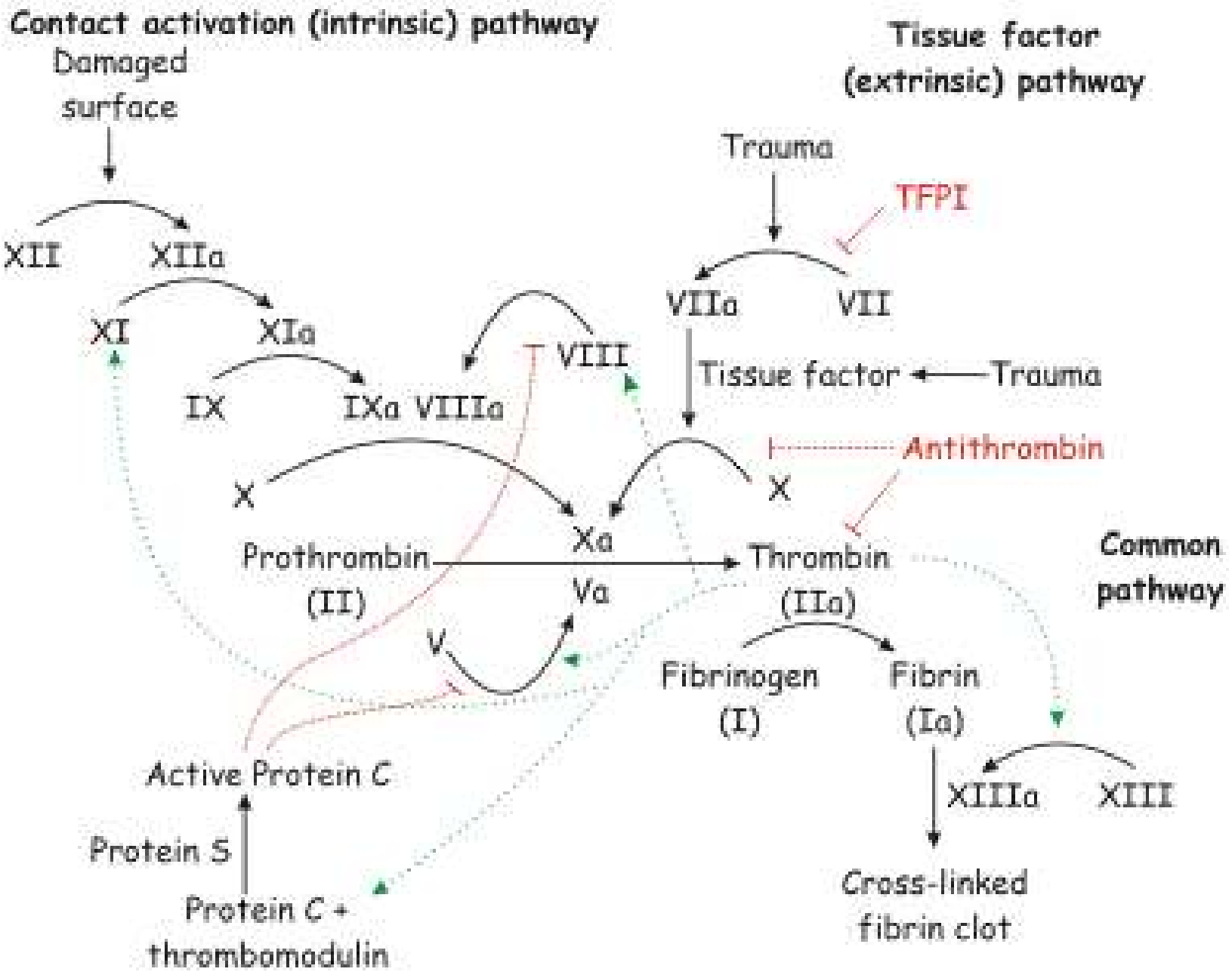
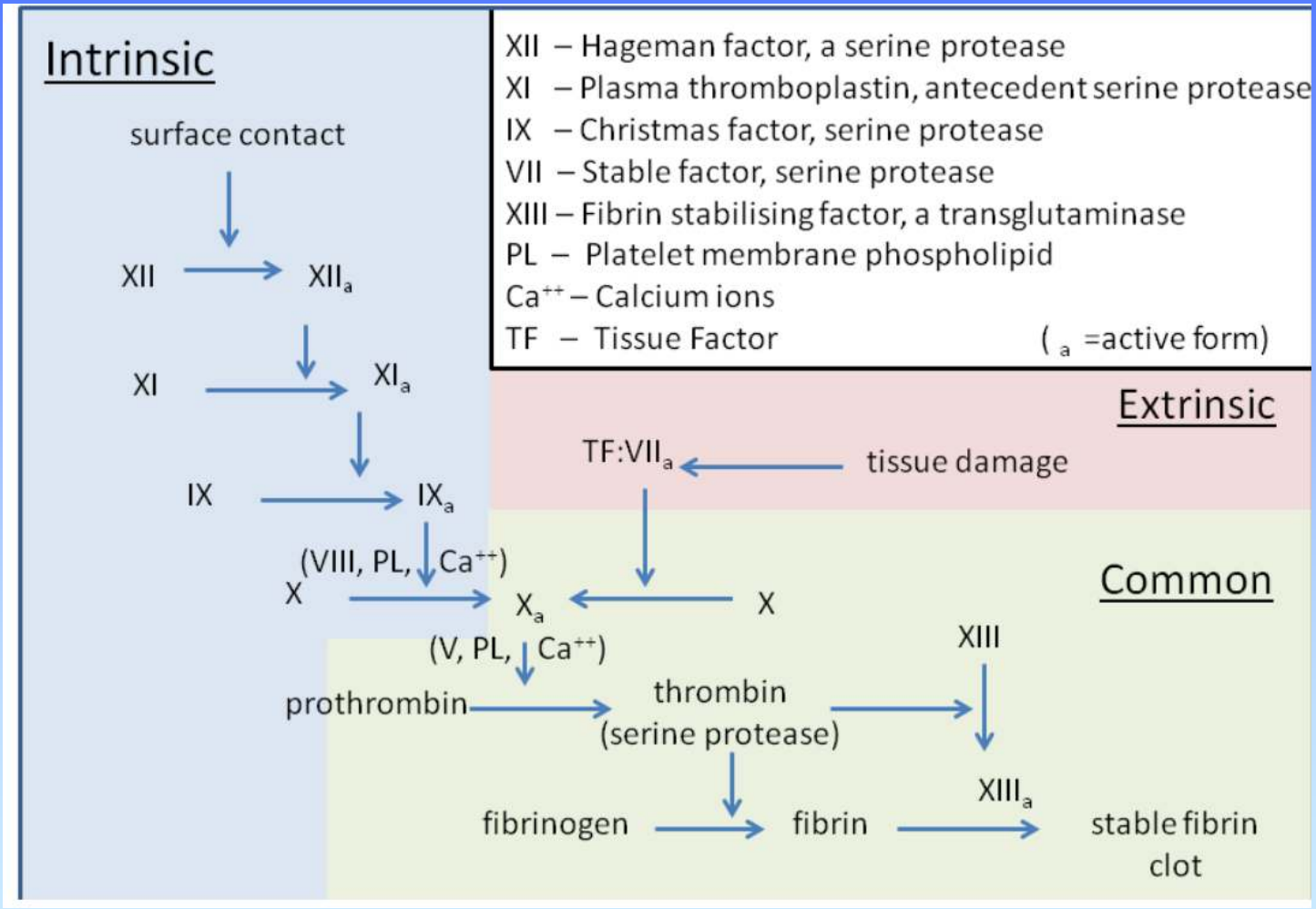


Schéma koagulace:




Contact activation (intrinsic) pathway
Damaged surface
XII
XIIa
XI
XIa
IX
IXa VIIIa
VIII
X
Xa
Va
Prothrombin (II)
Thrombin (IIa)
V
Fibrinogen (I)
Fibrin (Ia)
XIIIa
XIII
Cross-linked fibrin clot
Active Protein C
Protein S
Protein C + thrombomodulin
Tissue factor (extrinsic) pathway
Trauma
TFPI
VIIa
VII
Tissue factor
Trauma
Antithrombin
X
Common pathway

Koagulační kaskáda



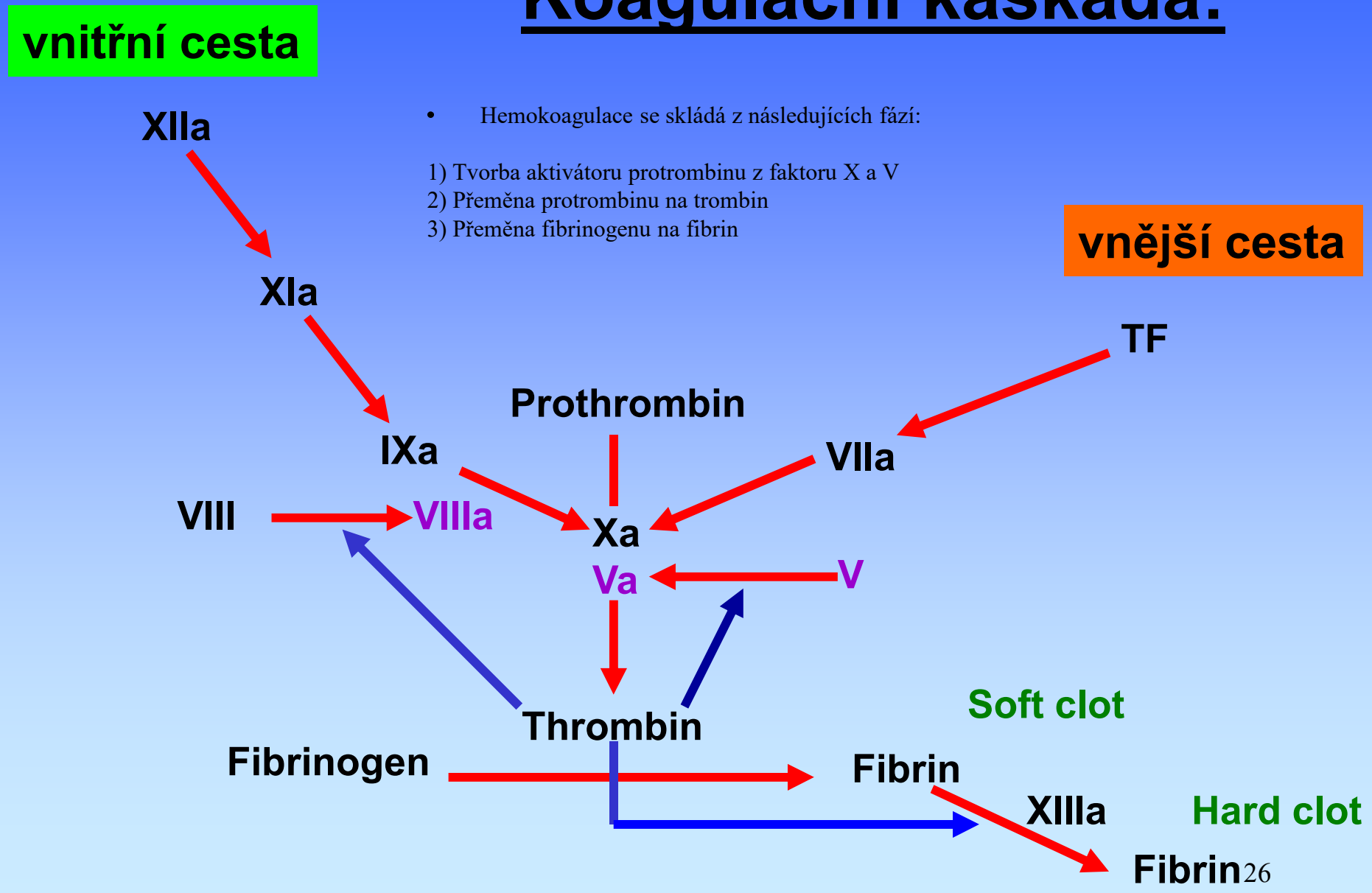
Koagulace:

- kaskáda enzymatických reakcí (amplifikace signálu)
- účast několika serinových proteáz většinou tvořených v játrech
- vyžaduje vitamin K a Ca^{2+} (např. 2, 7, 9, 10, C, S)
- 3 proteinové kofaktory (nikoliv enzymy)
- reverzibilní proces (skrze produkce PLASMINU)

Koagulační faktory, viz též poločasy rozpadu v cirkulaci

Factor	Name	Molecular Weight	Plasma concentration (µg/ml)	Required for hemostasis (% of normal)	Vit K dependency	Natural source
I	Fibrinogen	330,000	3000	30	No	Liver
II	Prothrombin	72,000	100	40	Yes	Liver
III	Tissue factor		--		No	Tissue
IV	Calcium ion		--	--	No	Plasma
V	Proaccelerin	300,000	10	10-15	No	Liver
VII	Proconvertin	50,000	0,5	5-10	Yes	Liver
VIII	Antihemophilic	300,000	0,1	10-40	No	RES
IX	Thromboplastin	56,000	5	10-40	Yes	Liver
X	F. Stuart	56,000	10	10-15	Yes	Liver
XI	Prethromboplastin	160,000	5	20-30	No	Liver
XII	F. Hageman	76,000	30	0	No	Liver
XIII	Fibrin stabilizing	320,000	30	1-5	No	Liver
vWF	Von Willebrand	140,000			No	Endothelium
Prot C					Yes	Liver
PKLK	Prekallikrein	82,000	40	0		
HMWK	HMW Kallikrein	108,000	100	0		

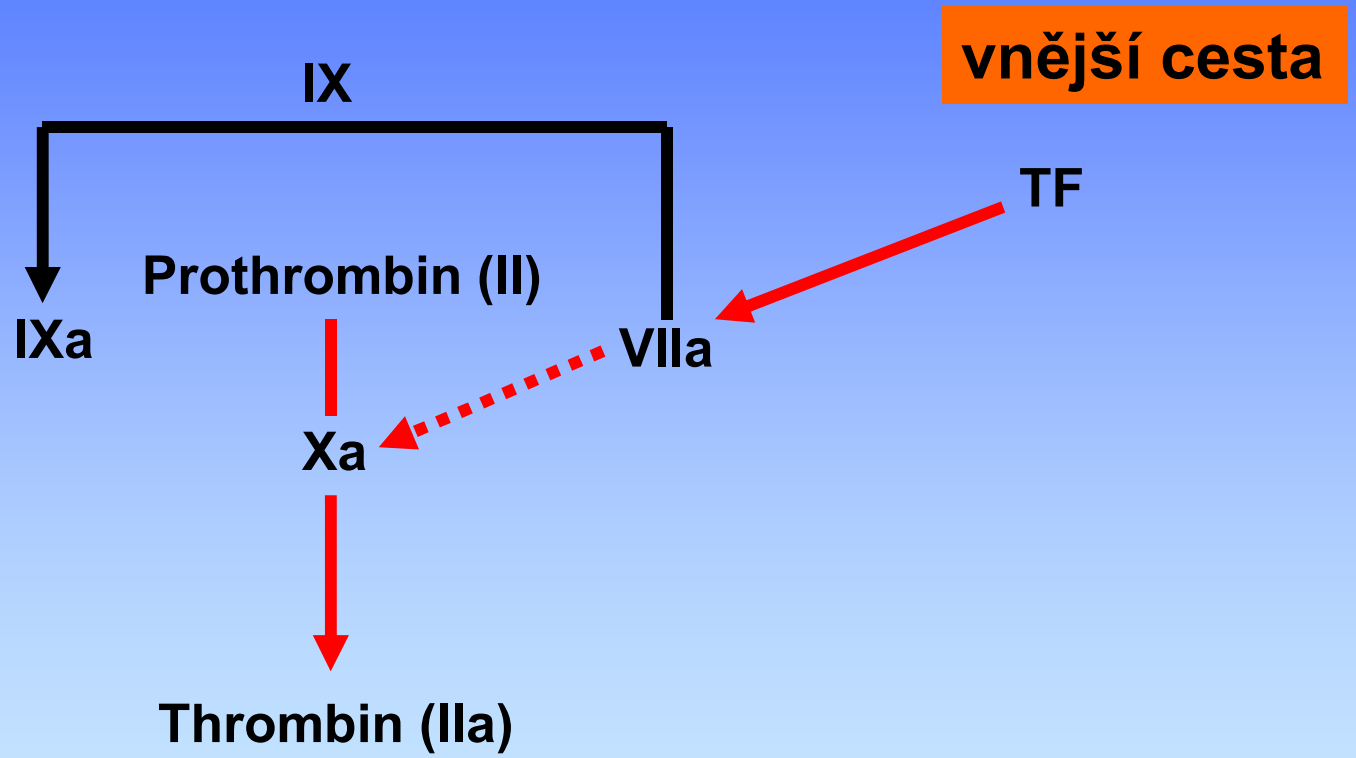
Koagulační kaskáda:



- Hemokoagulace se skládá z následujících fází:

1) Tvorba aktivátoru protrombinu z faktoru X a V
2) Přeměna protrombinu na trombin
3) Přeměna fibrinogenu na fibrin

Tissue factor pathway

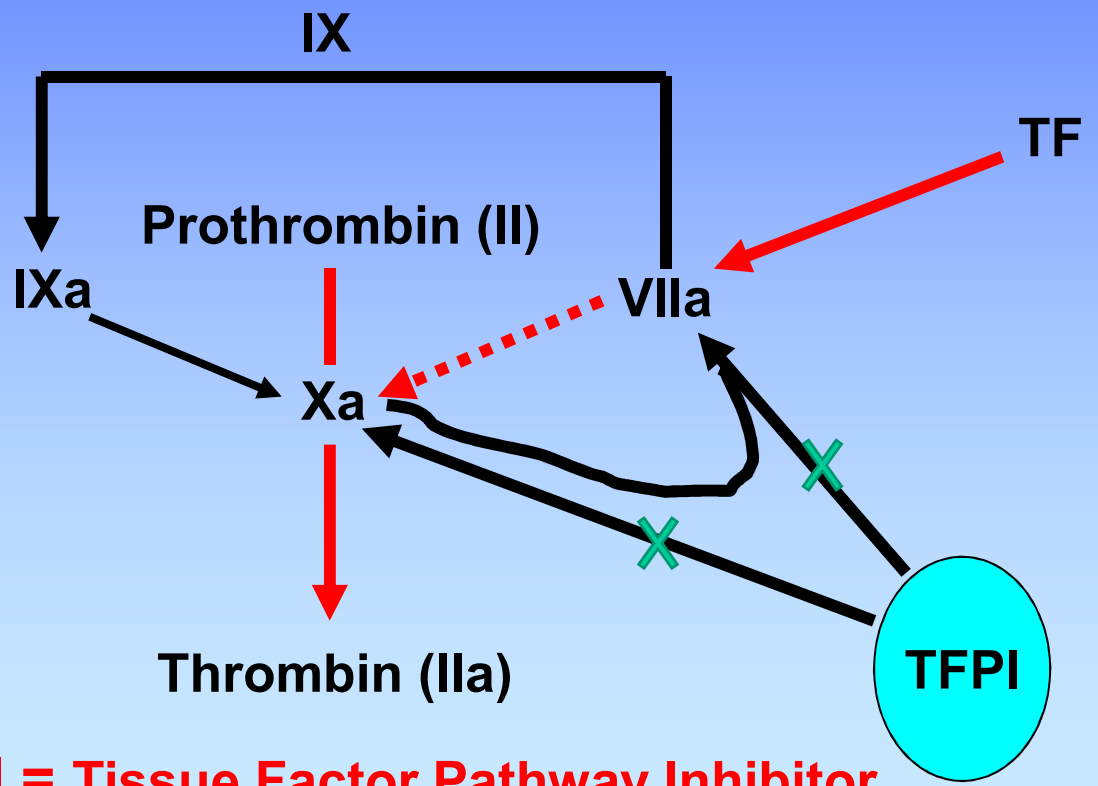


Nově objeveno: Produkce faktoru IXa jež propojuje vnější (extrinsic) a vnitřní (intrinsic) cestu

TFPI: proteázový inhibitor, 34 a 41 kD izoformy, v plazmě

Aktivita:
- **přímá inhibice Xa**
- **inhibice komplexu VIIa-TF**

~10% přítomno v trombocytech (je též v endotheliu)

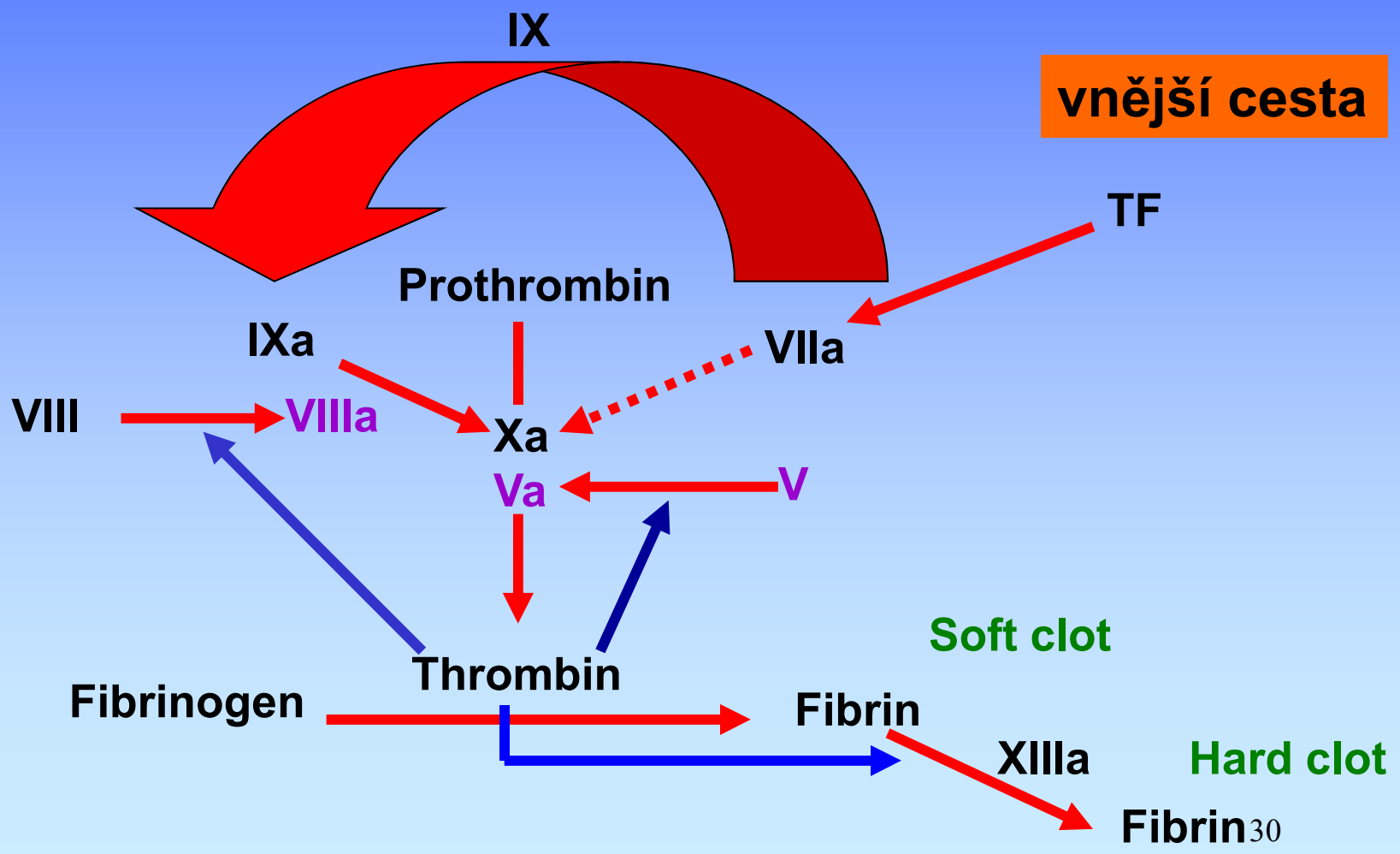


Nově: TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor
... inhibice Xa a VIIa

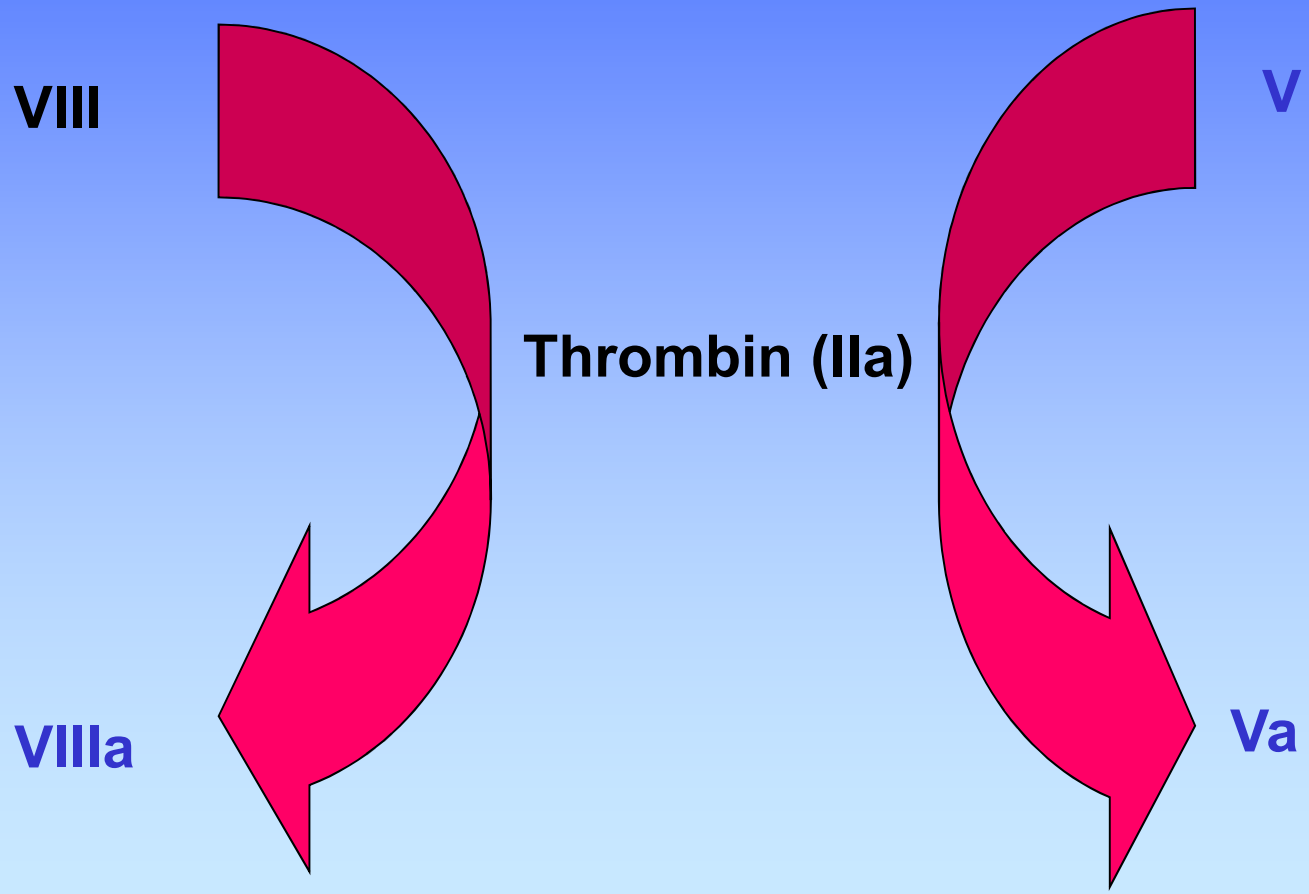
Kaskáda Tissue factor pathway:

- VIIa se tvoří vazbou VII k TF
- VIIa aktivuje X na Xa
- Xa konvertuje malé množství protrombinu (II) na trombin (IIa); tento trombin je využit k tvorbě malého množství VIIIa a Va
- Při vzrůstající koncentraci TF-VIIa-Xa-trombin zasáhne TFPI a inaktivuje tento komplex zabráněním další tvorby trombinu!
- IXa společně s VIIIa produkují Xa; tento Xa s Va produkují nový trombin; tento trombin produkuje více VIIIa a Va a tak dostaneme zásoby trombinu a fibrinu.

Tissue factor pathway



Tissue factor pathway

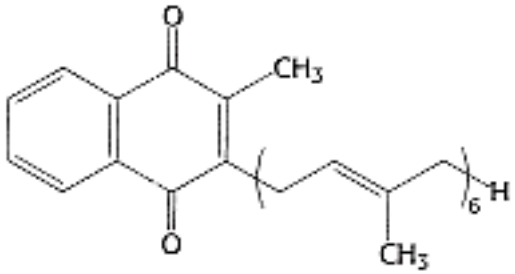


Role vitamínu K

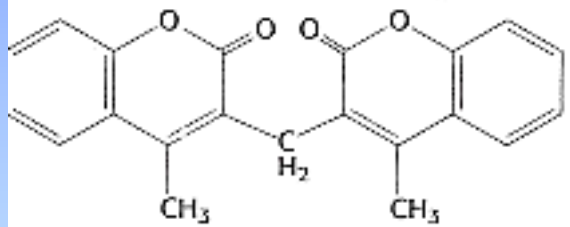
- faktory II, VII, IX, X a proteiny C a S vyžadují post-translační modifikaci předcházející jejich aktivaci

- tato PTM vyžaduje vitamin K!

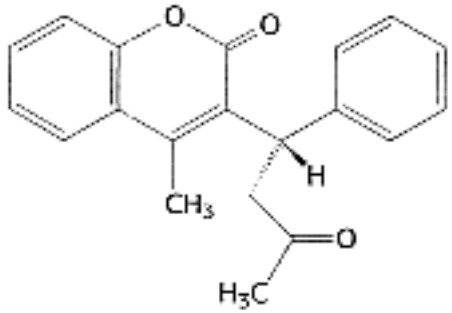
- tato PTM zahrnuje připojení COO^- ke zbytkům Glu ve struktuře srážecích faktorů (vytvoří se gamma-carboxy glutamates)



Vitamin K

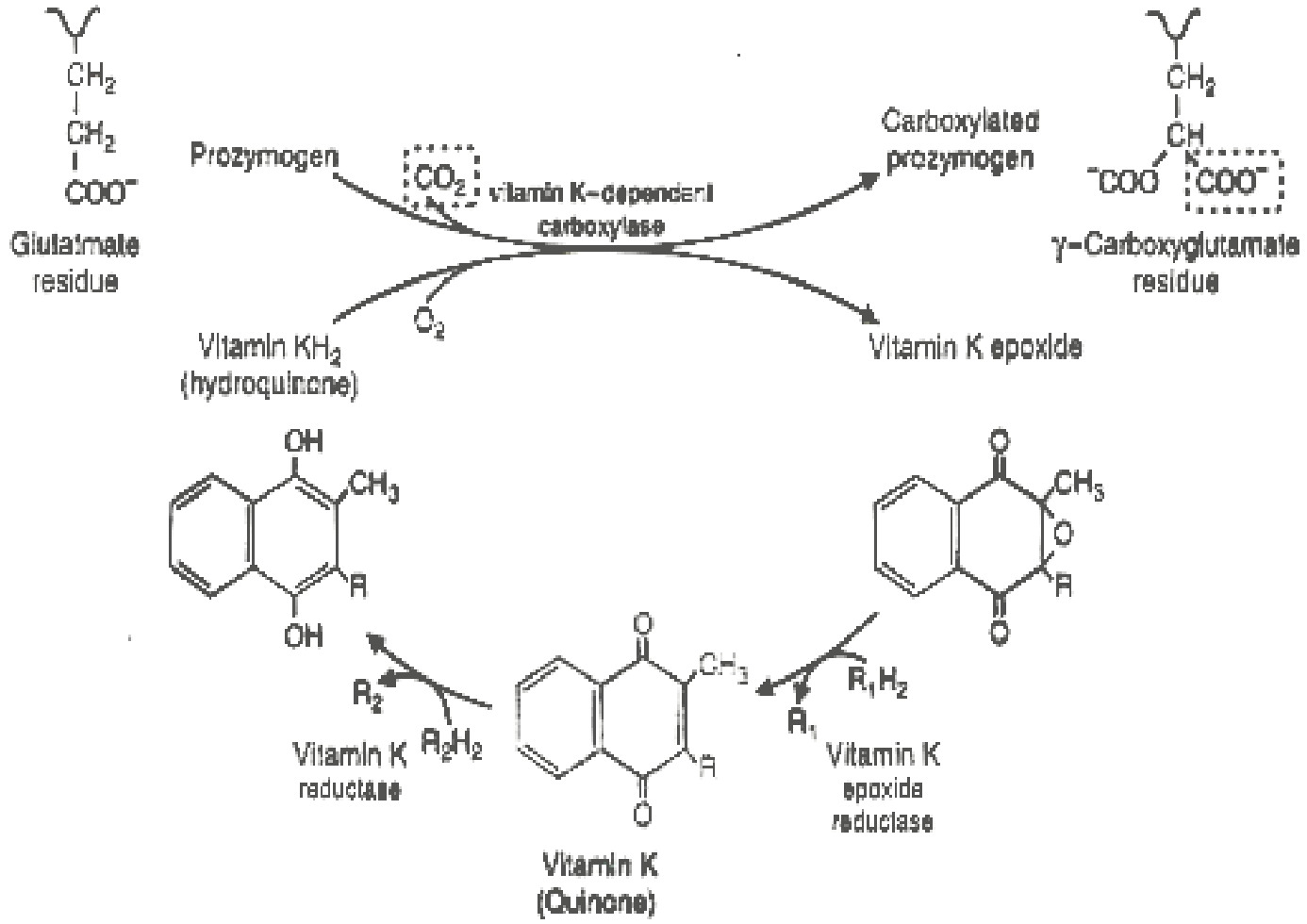


Dicoumarol



Warfarin

Role vitamínu K

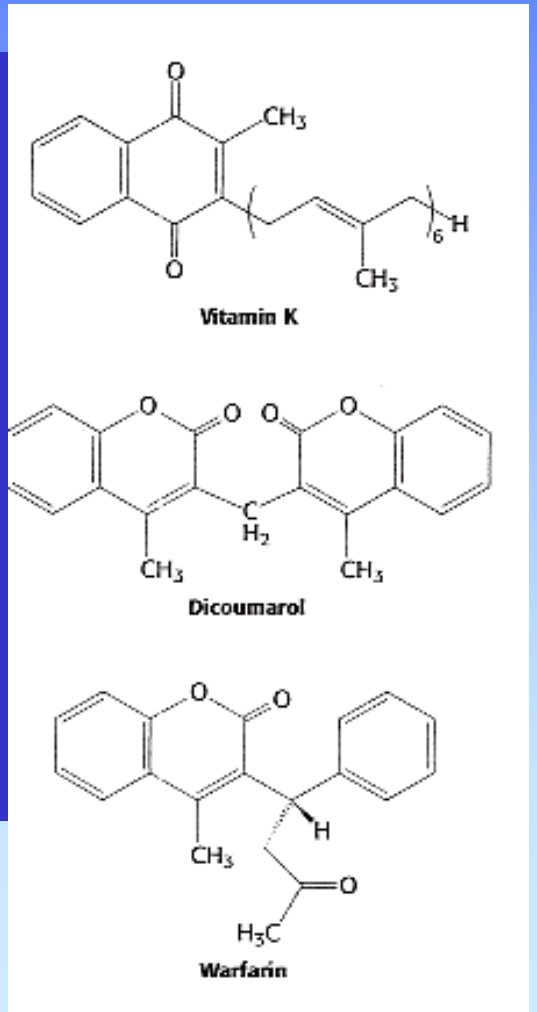


Fyziologická inhibice koagulace

- **Antithrombin III**
  - **SERPIN (**serine protease inhibitors)
- **Aktivované Proteiny C a S**
  - **skrze proteolýzu Inaktivují Va a VIIIa**
  - **mutace: Factor V Leiden (APC resistance)**
- **Thrombomodulin**
  - **váže se na trombin**
  - **snižuje schopnost tvorby fibrinu**
  - **zvyšuje schopnost aktivovat Protein C**

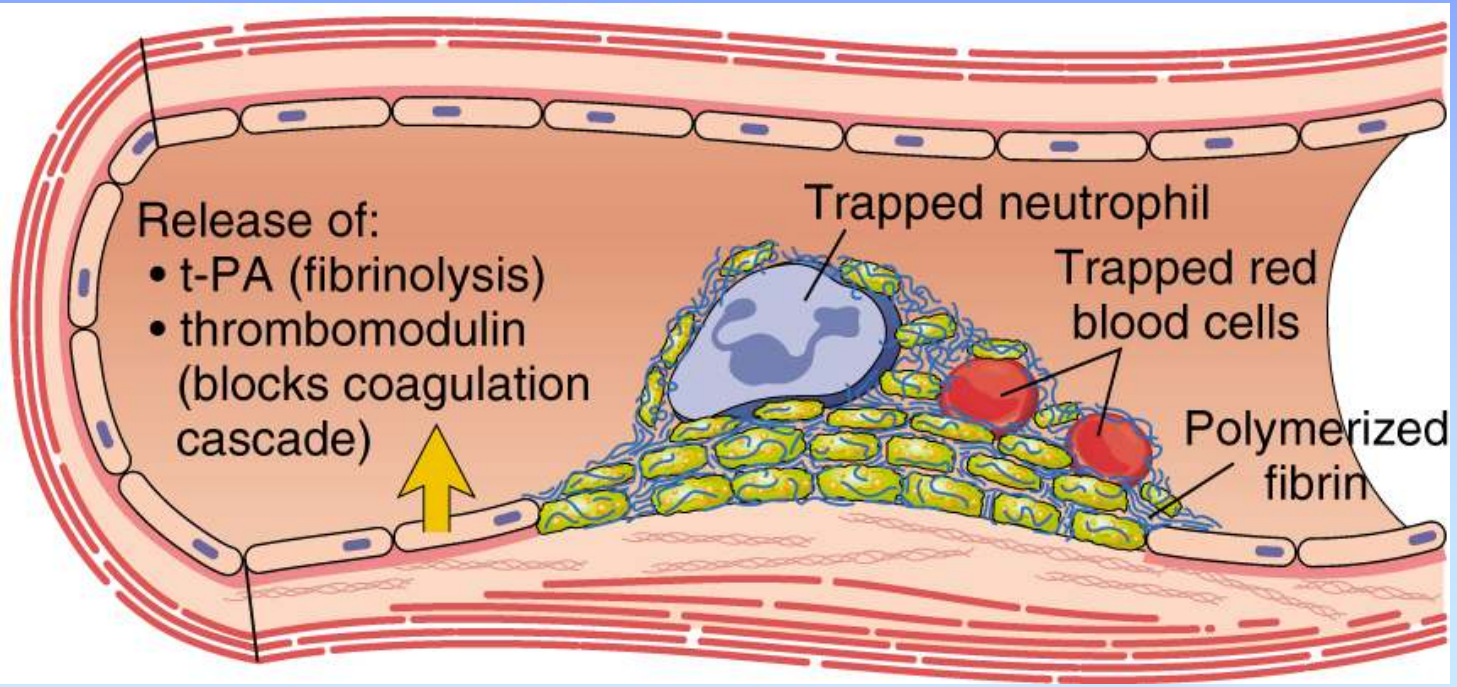
Nefyziologická inhibice koagulace

- **Antagonisté Vitaminu K**
  (in vivo only)
- **Ca chelators**
  (in vitro only)
  - EDTA
  - Citrate
  - Oxalate
- **Heparin**
  (in vivo and in vitro)

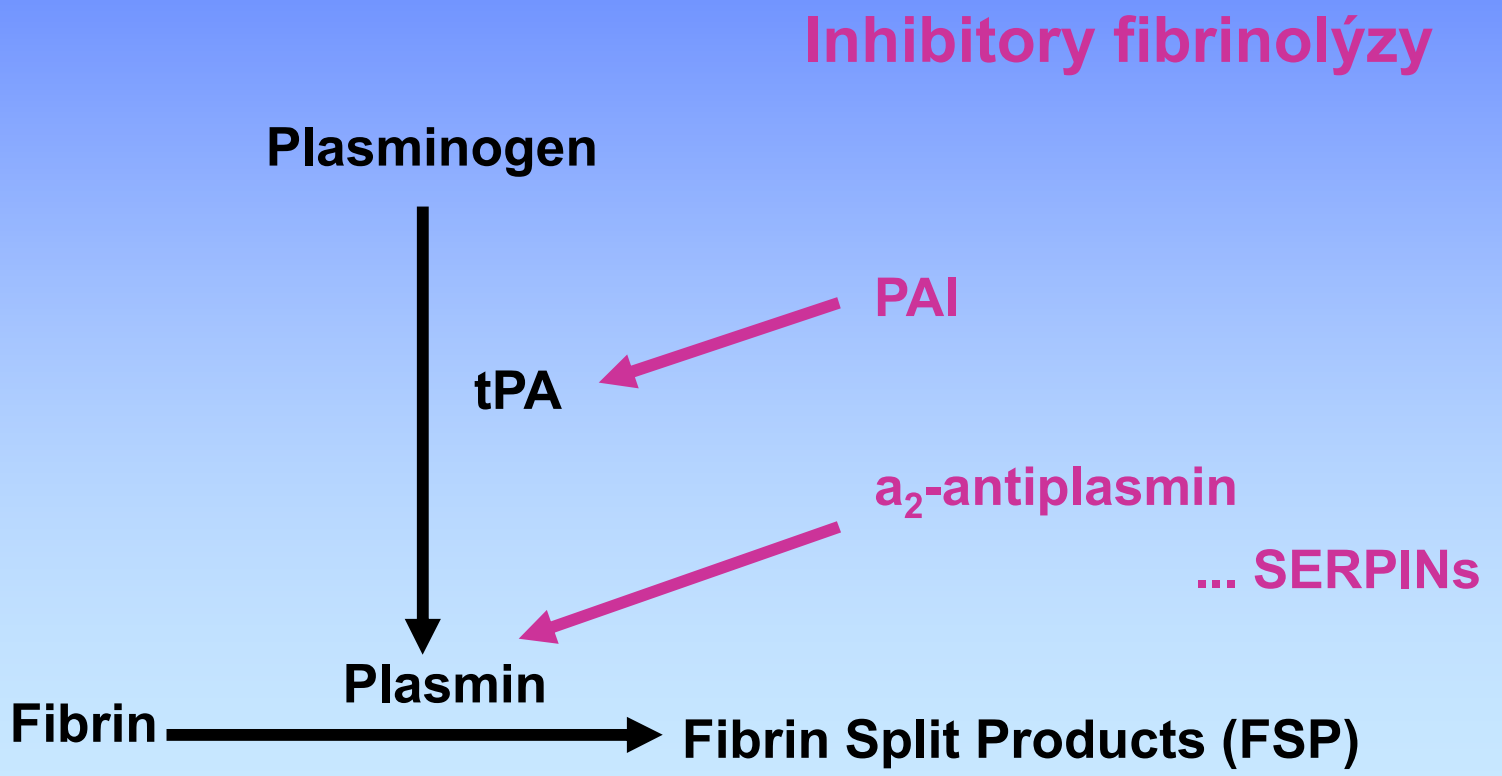


Fibrinolýza:

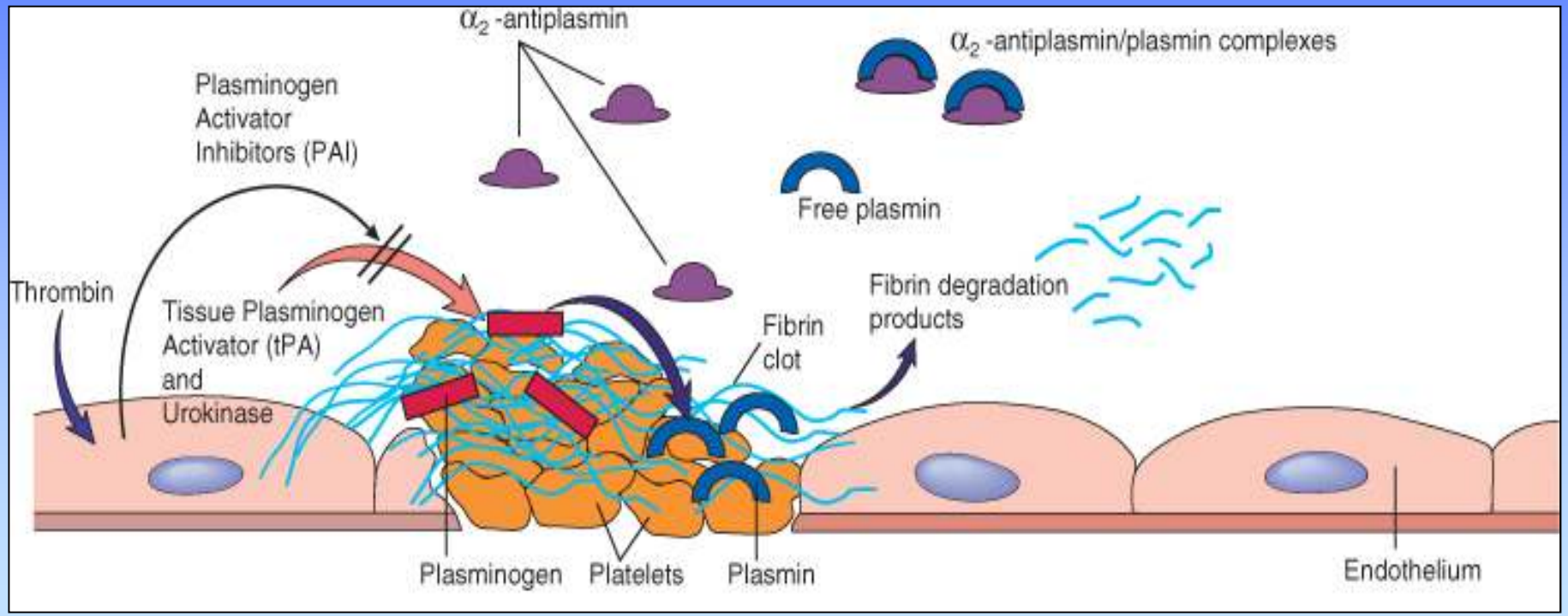
... odstranění zátky



Fibrinolýza:

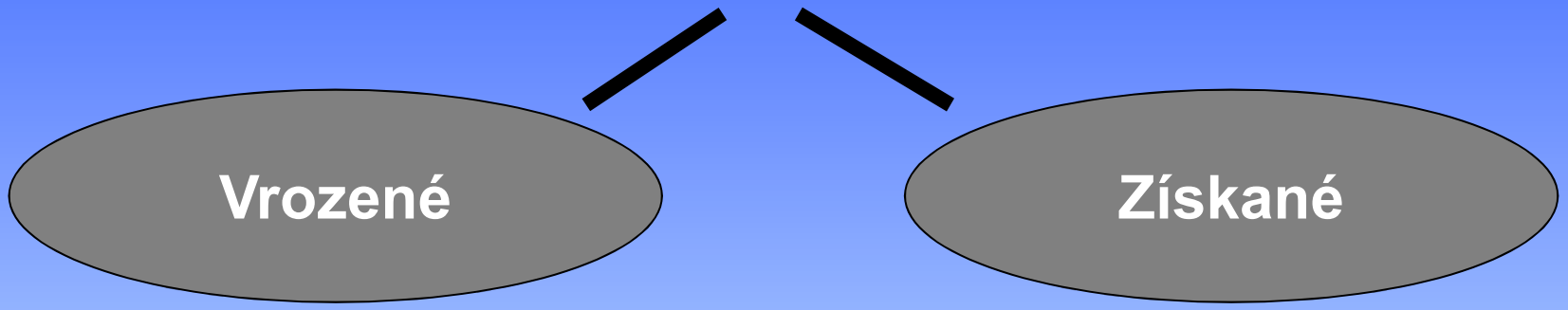


Fibrinolýza



II.
Patofyzilogie

Koagulopatie



Hemophilia A ... f VIII
Hemophilia B ... f IX
Hemophilia C ... f XI
Dys- / A- fibrinogenemia
F V defic. (parahemophilia)
F XIII defic.
APC resistance

Liver proteosynthesis
Vitamin K defic.
- obstructive icterus
- intestin. resorption
Anticoagulant therapy
- Dicumarol
- Heparin

Vaskulopatie

Vrozené

Mb. Rendu-Osler-Weber

= hereditary hemorrhagic teleangiectasia
AD, TGFbeta1 rec.

Ehlers-Danlos Sy.

= defects in collagen synthesis

Získané

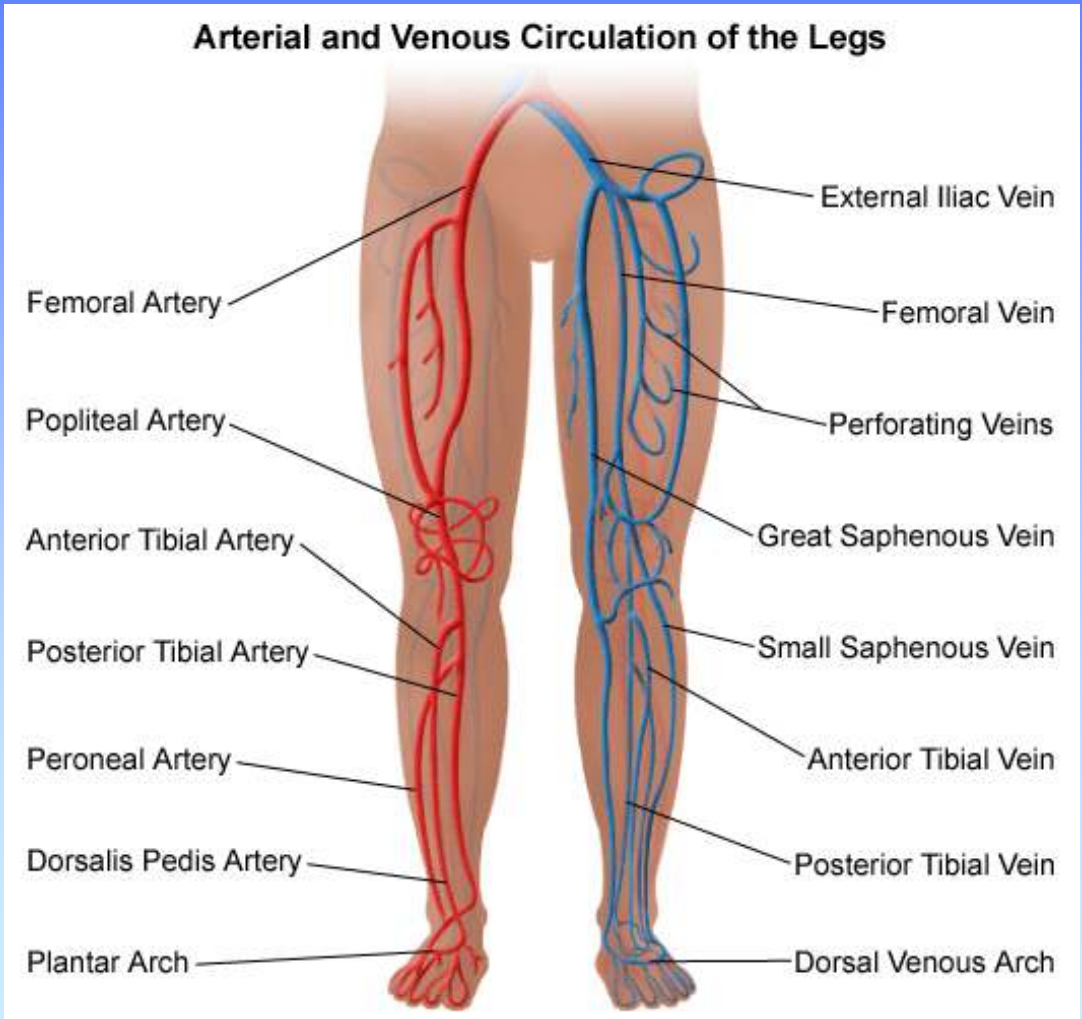
Purpura Henoch-Schönlein
Scorbut
Steroid purpura
Purpura simplex and senilis

Rizikové faktory a příklady žilních uzávěrů

Rizikové faktory vzniku žilní trombózy:
-útlak cévy zvnějšku (např. trombóza hlubokých žil levé dolní končetiny je cca 3x častější než pravé dolní končetiny…. Proč?)
-hyperviskozita (dehydratace, polyglobulie, leukémie, hyperfibrinogenémie aj.)
-městnání krve v žilním systému (deficientní chlopně žil, útlak žil zvnějšku)
-imobilita
-obezita
-nadměrná aktivace sekundární hemostázy (např. u infekcí, zánětů, malignit, v těhotenství)
-samostatnou kapitolou jsou vrozené trombofilní stavy.

Příklady žilních uzávěrů:
-**flebotrombóza** DK= trombóza **hlubokých** žil dolních končetin
-**tromboflebitida** DK= trombóza **povrchových** žil dolních končetin
-**plicní trombembolismus**
-**trombóza viscerálních žil** (např. trombóza vrátnicové žíly, trombóza jaterních žil: tzv. **Budd-Chiariho syndrom**)
-**Trousseauův příznak** (migrující tromboflebitida u nádorových onemocnění)
-samostatnou kapitolou jsou žilní uzávěry u **chronických hemolytických anémií** a **klonálních poruch krvetvorby** (MPN, PNH)

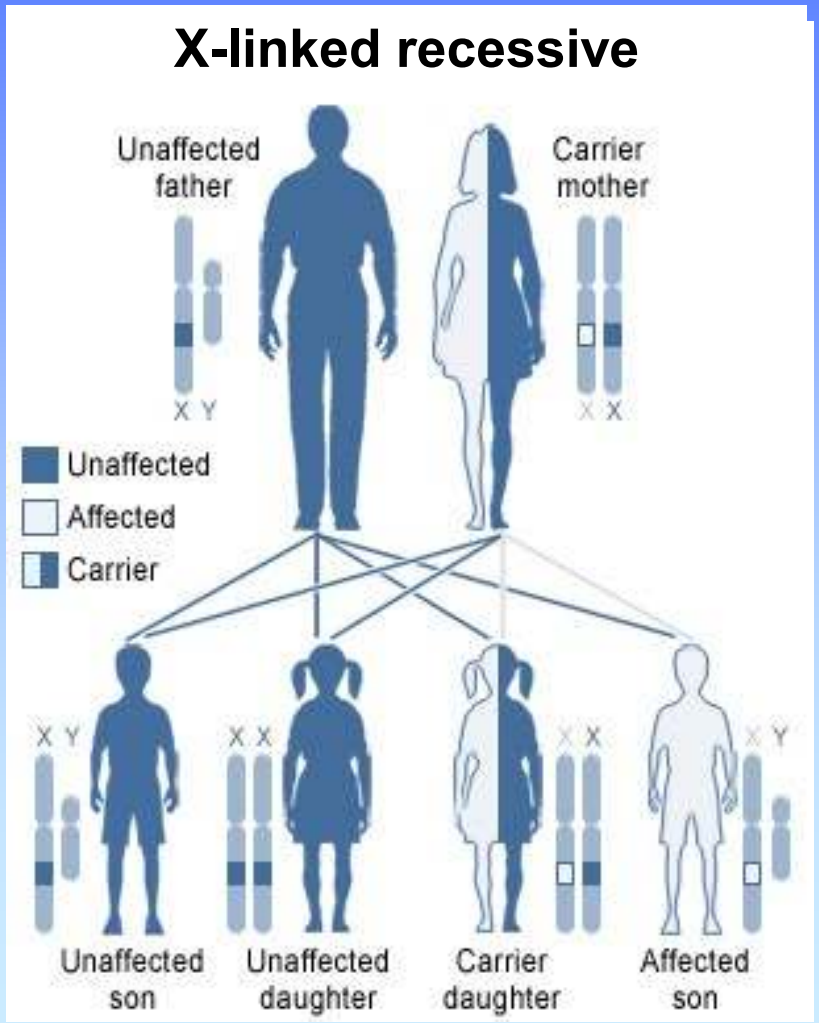
Trombóza hlubokých žil levé dolní končetiny vzniká circa 3x častěji než trombóza pravé dolní končetiny. Příčina: anatomické křížení femorální tepny a žíly.



Genetic examination

Hemophilia A

1 : 10 000



Britská KrálovnaViktorie

Přenašečka hemofilie A
měla 9 dětí a rozšířila tuto de novo
mutaci do mnoha urozených rodů Evropy

X-vázaná

porucha,

pravnuk

Carevič Alexej

nemocný hemofilií A

Ruský car Mikuláš II

Klinické manifestace:

Hemofilie

Rozsáhlá hemorrhagie již po drobném poranění
Arteriální hemorrhagie
Sekundární artropatie

Klinické manifestace:

Trombocytopenie

- aplasie, MDS, pokročilá fáze myeloproliferativních onemocnění
- Poléková trombocytopenie – útlum KD nebo vznik protilátek

- Petechia (drobné krvácení vyvolané rozpadem kapilárních cév, zažloutlé okolí = degradace hemoglobinu, typické pro poruchy primární hemostázy)
- Pigmentace
- Splývání petechií = purpura

Klinické manifestace:

Henoch-Schonleinova purpura

Vaskulitida dětského věku s postižením drobných cév; často po infekcích nebo jako alergická reakce (štípnutí hmyzem, alergeny v jídle, chlad), zánět způsobený IgA (nálezy – hromadění na postižených místech) + aktivace komplementu, postihuje častěji chlapce. Cévy kůže, kloubů, ledvin, trávícího ústrojí – projevuje se purpurou resp. exantémem (80 %) – hmatná purpura, nejčastěji na hýždích a dolních končetinách, artritidou a bolestí kloubů – obvykle dočasnou, otokem měkkých tkání rukou, nohou, šourku, okultním krvácením do střev s kolikou, proteinurií a hematurií

Klinické manifestace:
Von Willebrandova nemoc

- jedno z nejčastějších vrozených onemocnění srážlivosti krve
- 1 z 1000 (ženy stejně často jako muže)
- převážně jde ale o lehká onemocnění bez závažnějších klinických projevů

Autozomálně dominantně dědičná **mutace genu kódujícího množství, funkčnost a strukturu vWF** → porušení funkce destiček, neschopnost vázat plazmatický faktor VIII

vWF nepatří mezi plazmatické faktory → nejedná se o koagulopatii!

- narušeno srážení krve – časté krvácení z nosu (epistaxe), zvýšená tvorba modřin, silnější menstruační krvácení, může být krev v moči a ve stolici, u těžkých forem krvácení do kloubů.

Klinické manifestace:

F XIII deficience

- krvácení
- tvorba keloidu

Keloid neboli keloidní jizva je nekontrolované zmnožení kolagenních součástí kůže.

Klinické manifestace:

Hluboká žilní trombóza

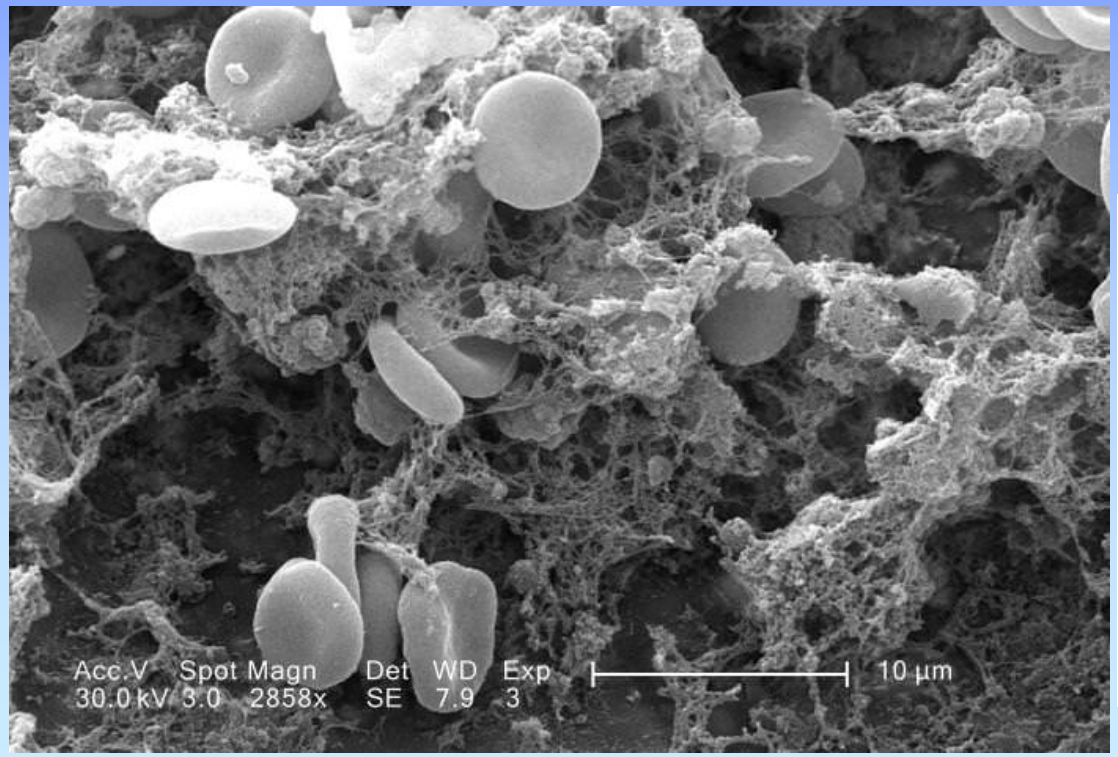
Pulmonární embolizace

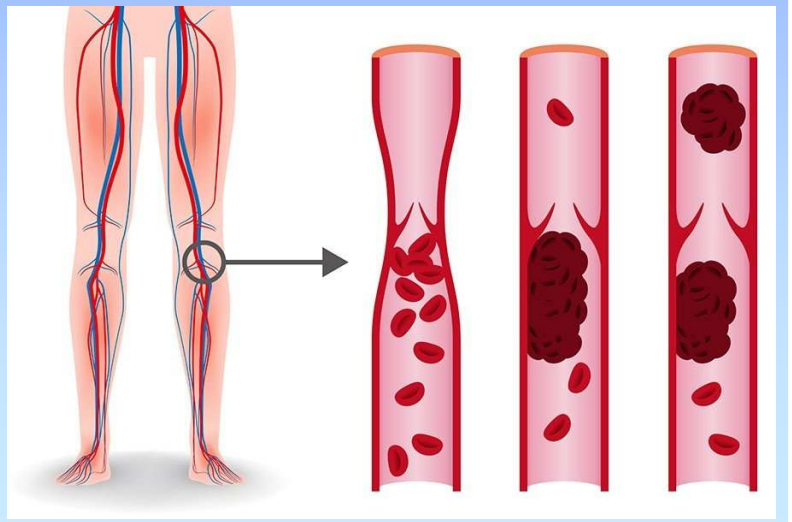
Klinické manifestace:

Diseminovaná intravaskulární koagulace

Leidenská mutace – trombofilní stavy

Klinické manifestace:





III.
Diagnostika, monitorování

Koagulační hemoanalyzátory

Sysmex CA-7000

Amax Destiny Plus

Standardní testy ve VFN:

Quick time, INR	0,8 - 1,2
Act.Part.Thromb.Time	27-35 s
Thrombin time	12 - 14 s
Fibrinogen	2 - 4 g/l
Antithrombin III	> 70%
Ethanol test	neg.
D-dimers (FDP)	neg.

Diagnóza	Plt	Duke	APTT	Quick	TT
Thrombocytopenia	↓	↑	N	N	N
Hemophilia A	N	N	↑	N	N
Hemophilia B	N	N	↑	N	N
Hemophilia C	N	N	↑	N	N
vWd	N	↑	N / ↑	N	N

Vyšetření krevní srážlivosti:

Protrombinový (Quickův) test:

- test funkčnosti vnější a společné cesty
- rychlost přeměny protrombin-trombin vlivem tromboplastinu (=TF)

-provedení: dekalcifikovaná plazma+tromboplastin+Ca2+ a měří se čas vzniku fibrinové sraženiny (12-15s)

-výsledky: uvádí se jako INR (*international normalized ratio*, mezinárodní normalizovaný poměr), tedy poměrem naměřeného času pacienta a normální hodnoty kontrolní plazmy.

- Prodloužení: terapie warfarinem, heparinem, nedostatek vit. K, porucha jaterní proteosyntézy, konsumpční koagulopatie – DIC

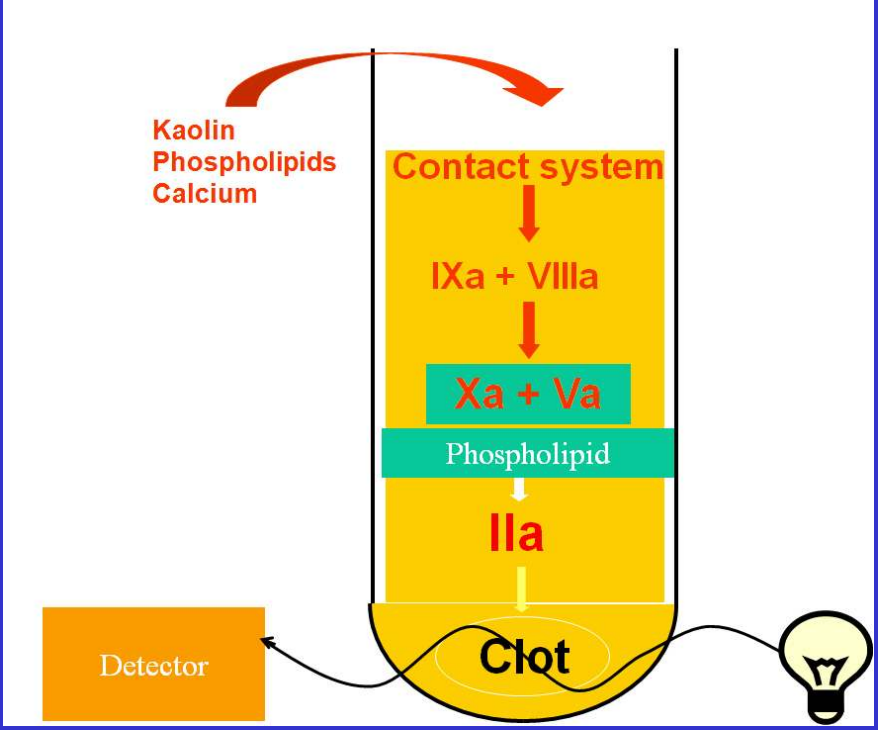
Vyšetření krevní srážlivosti:

APTT, Activated partial thromboplastin time

-test vnitřní a společné cesty hemokoagulace

- rychlost vzniku fibrinové sraženiny (28-40s)

- provedení: dekalcifikovaná plazma + kaolin-kefalinový komplex (aktivuje faktor X) + Ca2+



Prodloužení: hemofilie A B C, terapie warfarinem, heparinem, vWillebrandova ch. , konsumpční koagulopatie – DIC

Kaolin zde představuje záporně nabitý povrch aktivující vnitřní cestu a kefalin funguje jako **parciální tromboplastin** (nemá nic společného s tkáňovým tromboplastinem!), t.j. vlastně náhražka **destičkového fosfolipidu**, nutného k aktivaci **faktoru X.**

Vyšetření krevní srážlivosti:

Thrombin Time (TT)

- Po centrifugaci vzorku se získá plazma chudá na trombocyty, ze které se provádí vlastní vyšetření.
- TT postihuje třetí fázi koagulace, tj. štěpení fibrinogenu trombinem.
- přidáním standartního množství enzymu trombinu k testované plazmě dochází k přeměně fibrinogenu na fibrin

Norma: 12 - 14 s

Prodloužení::

↓↓ Fibrinogen (akutní fáze DIC)
přítomnost antitrombinu
fibrinolýza

využití: DIC
monitoring fibrinolytické terapie

Vyšetření krevní srážlivosti:

Lee-White(ův) test

- minimální klinické využití, pouze orientační ověření koagulace
- princip: spontánní aktivace vnitřní koagulační kaskády *in vitro*
- měří se srážlivost v celé krvi (normální je 5-15min při RT)

Vyšetření krevní srážlivosti:

Hladina fibrinogenu, (Fbg)

- normální hladina v plazmě je 2 - 4 g /l

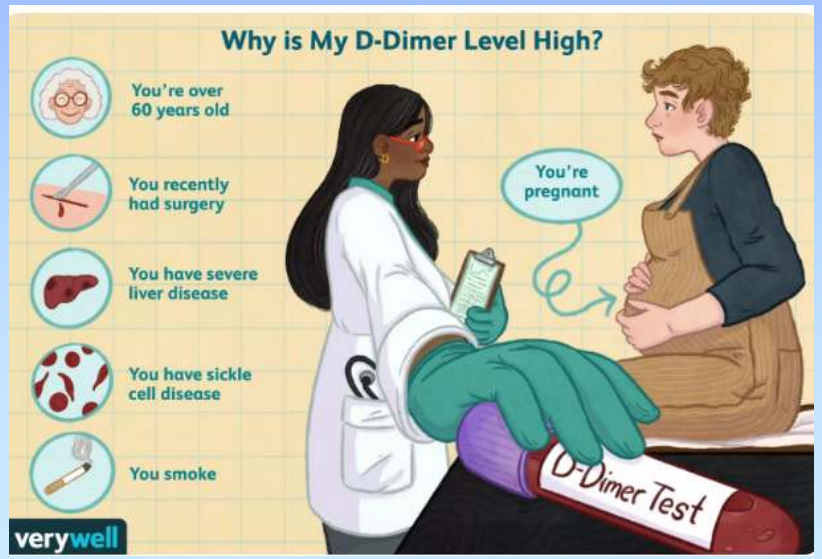
- zvýšení: zánět, diabetes mellitus II, kouření
- snížení: nízká syntéza (vrozená či jinak snížená funkce jater)

Hypofibrinogenemia
Dysfibrinogenemia

Vyšetření krevní srážlivosti:

FDP (Celkové degradační produkty fibrinu)

- FDP (fibrinové degradační produkty) a D-dimery jsou specifické pro stabilizovaný fibrin
- použití zejména při podezření na tromboembolii



D-dimer je fragment proteinu, který vzniká, když enzym plazmin odbourává fibrinovou sraženinu stabilizovanou příčnými vazbami

Vyšetření koncentrace D-dimerů je laboratorní koagulační test, který se používá pro zjištění a monitorování hyperkoagulačních stavů

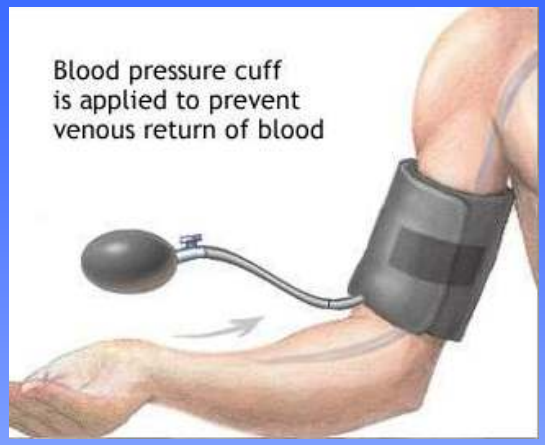
Vyšetření krevní srážlivosti:

Duke(ův) test

- Duke, 1910
- vyšetření doby krvácivosti (vpich do ušního lalůčku), cca. do 5min
- ukazuje počet a funkčnost trombocytů nic moc víc

Prodloužení: málo destiček, vW nemoc

Vyšetření krevní srážlivosti:



Rumpel – Leede(ův) test

- ke zjištění dostatečného množství destiček a fragility kapilár

- sleduje se počet petechií na předloktí (4 x 4 cm) po tlaku na oblast (10,5 kPa, 10 min.) či podtlaku (Brown, 1949)

> 5 petechií ... vysoká fragilita kapilár
(e.g. hereditary purpura Weber-Rendu-Osler)

Diagnóza	Plt	Duke	APTT	Quick	TT
Thrombocytopenia	↓	↑	N	N	N
Hemophilia A	N	N	↑	N	N
Hemophilia B	N	N	↑	N	N
Hemophilia C	N	N	↑	N	N
vWd	N	↑	N / ↑	N	N

Diagnóza	Plt	Duke	APTT	Quick	TT
F V defic.	N	N	↑	↑	N
F II defic.	N	N	↑	N	N
F VII defic.	N	N	N	↑	N
Warfarin / vit. K def.	N	N	↑	↑	N
Heparin i. v.	N	N / ↑	↑	N / ↑	↑
Heparin s. c.	N	N	N	N	N
DIC 1st stage	↓	+	↑	↑	N
DIC 2nd stage	↓↓	-	↑↑↑	↑↑↑	↑↑