

PRACA POGLĄDOWA – Review Article

BOŻENA SOKOŁOWSKA

Repetitorium z fizjologii hemostazy

The physiological function of hemostasis

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie
Kierownik: Prof. dr hab. Anna Dmoszyńska

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono podstawowe wiadomości dotyczące fizjologii hemostazy ze szczególnym uwzględnieniem nowej koncepcji kaskady krzepnięcia

SŁOWA KLUCZOWE: Hemostaza pierwotna – Kaskada krzepnięcia krwi – Fibrynoliza

SUMMARY

In this report the physiological function of hemostasis is described. Especially the newer concept of blood coagulation is presented.

KEY WORDS: Primary hemostasis – Coagulation – Fibrinolysis

Hemostaza to zespół procesów mających na celu utrzymanie krwi w stanie płynnym w łożysku naczyniowym, a w przypadku uszkodzenia naczynia zapobieganie wynaczynieniu poprzez utworzenie skrzepu początkowo płytkowego, a następnie fibrynowego.

Jest wiele mechanizmów zapewniających płynność krwi w łożysku naczyniowym. Są to między innymi:

- jednakowe, ujemne ładunki elektryczne śródbłonna i płytek krwi, co powoduje, że nieuszkodzone komórki śródbłonna i nieaktywne płytki krwi odpychają się;
- stałe wydzielanie przez komórki śródbłonna niewielkich ilości prostacykliny (PGI₂), która hamuje agregację płytek i powoduje rozszerzenie naczynia;
- odpowiednia zawartość 13-HODE(kwasu 13-hydroksyoktadekadienowego) w komórkach śródbłonna;
- wydzielanie EDRF (endothelial derived relaxing factor) przez śródbłonek w odpowiedzi na bodźce chemiczne np. trombina, ATP, adrenalina;
- pozostawanie czynników krzepnięcia w osoczu w postaci nieczynnych prekursorów, które dopiero w czasie trwania procesów hemostazy ulegają aktywacji;
- obecność naturalnych inhibitorów krzepnięcia.

Do wytworzenia skrzepu płytkowego prowadzą procesy **hemostazy pierwotnej płytkowo-naczyniowej**, do powstania fibryny – **procesy hemostazy wtórnej, osoczowej**. Podział ten ma jedynie znaczenie dydaktyczne, ułatwiające lepsze zrozumienie tych procesów. W organizmie zjawiska te toczą się praktycznie równocześnie i są ściśle ze sobą powiązane.

Hemostaza pierwotna

Komórki śródbłonia naczyniowego w stanie fizjologii wykazują areaktywność w stosunku do krwinek płytkowych, co warunkuje nietrombogenność śródbłonia naczyniowego.

Uszkodzenie bądź zaburzenia czynności śródbłonia wywołują szereg reakcji, których morfologicznym odpowiednikiem jest zmiana kształtu krwinek płytkowych a następnie ich adhezja i agregacja.

Na hemostazę pierwotną składają się następujące procesy:

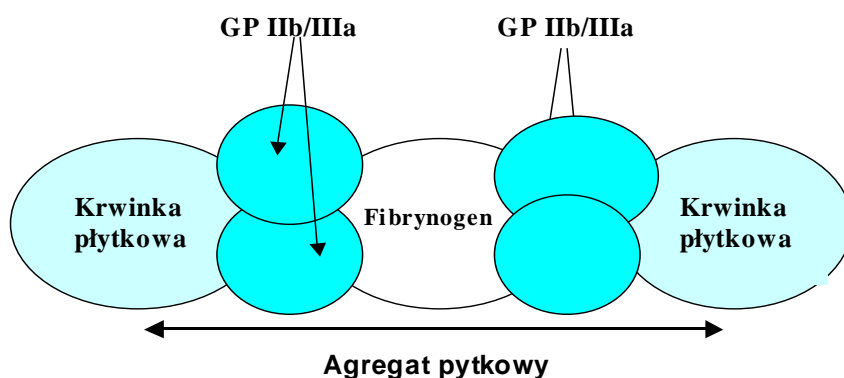
1. obkurczanie naczynia na skutek uszkodzenia jego ściany i wydzielania m.in. serotoniny,
2. adhezja krwinek płytkowych do odsłoniętych elementów podśródbłonia,
3. agregacja odwracalna krwinek płytkowych,
4. reakcja uwalniania,
5. agregacja nieodwracalna krwinek płytkowych.

Ad. 1. Bezpośrednio po uszkodzeniu naczynia ulega obkurczeniu, mającemu na celu zmniejszenie rozmiarów uszkodzonej powierzchni. Proces ten odbywa się pod wpływem serotoniny pochodzącej początkowo z uszkodzonych erytrocytów, a następnie z wnętrza płytki, z ciałek gęstych.

Ad. 2. Z uszkodzonej komórki śródbłonia pochodzi czynnik von Willebranda. Jest on głównym kofaktorem adhezji płytek do podśródbłonkowej tkanki łącznej w warunkach szybkiego przepływu krwi, czyli w mikrokrażeniu. Czynnik von Willebranda łączy się z jednej strony ze specyficznym receptorem w podśródbłonie a z drugiej strony z receptorem płytkowym, przede wszystkim z glikoproteiną Ib. Natomiast w dużych naczyniach krwionośnych płytki bezpośrednio łączą się z elementami podśródbłonkowej tkanki łącznej tzn. z kolagenem, fibronektyną, lamininą, witronektyną.

Ad. 3. Agregacja płytek, czyli łączenie się płytek ze sobą zachodzi pod wpływem różnych agonistów, początkowo ADP-adenozynodwufosforanu, pochodzącego z uszkodzonych erytrocytów, następnie trombiny, kolagenu. Spoiwem w tym procesie są cząsteczki fibrynogenu łączące się z głównym receptorem na powierzchni sąsiednich płytek tzn. z kompleksem glikoprotein Ib/IIIa (GP Ib/IIIa).

Schemat agregacji płytek krwi



Ad. 4. Reakcja uwalniania I – czyli wydalenia zawartości ciałek gęstych (pod wpływem ADP i adrenaliny)

Reakcja uwalniania II – czyli wydalenie zawartości ziarnistości α (pod wpływem trombiny i kolagenu).

Ad. 5. Po uwolnieniu zawartości ziarnistości wewnątrzpłytkowych, agregacja płytek staje się nieodwracalna. Płytki zmieniają swój kształt z dyskooidalnego do nieforemnej komórki mającej liczne nibynóżki (pseudopodia), łączą się ze sobą szczelnie tworząc czop płytkowy, który może zamknąć światło przeciętych drobnych naczyń i w sposób prowizoryczny zahamować krwawienie. Czop hemostatyczny jest następnie wzmacniany włóknami fibryny, które powstają na drodze hemostazy wtórnej czyli osoczowej.

Zawartość ziarnistości wewnątrzpłytkowych

Ciałka gęste	Ziarnistości α	Peroksysomy
ADP ATP Jony Ca ²⁺ Serotonina	<p>Białka osoczowe Fibrynogen Fibronektyna, Czynnik V, trombospondyna, albuminy, kalikreina, PAI-1, n-PA</p> <p>Białka płytkowe multimeryna, czynnik płytkowy 4 (PF4) β-tromboglobulina, czynnik wzrostu pochodzący z płytek (PDGF – platelet derived growth factor)</p>	katalaza

Hemostaza osoczowa

Nazwy czynników krzepnięcia od I do IX przyjęto na posiedzeniu w Rzymie w roku 1957, nazwę czynnika X w Montreux w roku 1959, czynnika XII w roku 1964 w Wiesbaden. W roku 1964 z braku dowodów istnienia skreślono z listy czynnik VI a dopisano czynnik XIII. W ten sposób powstała lista 12 osoczowych czynników krzepnięcia obowiązująca do dzisiaj.

Na początku lat siedemdziesiątych niezależnie od siebie MacFarlane [1], Davie i Ratnoff [2] przedstawili krzepnięcie w postaci kaskady reakcji w której każdy z czynników jest aktywowany do formy enzymatycznie aktywnej. Aktywny czynnik krzepnięcia aktywuje kolejny, poprzez wywołanie jego częściowej proteolizy.

Osoczowe czynniki krzepnięcia krwi

Czynnik	Synonimy	Rola w krzepnięciu
I	Fibrynogen	Prekursor fibryny
II	Protrombina	Proenzym
III	Czynnik tkankowy	Kofaktor
IV	Jony Ca^{2+}	
V	Proakceleryna, czynnik chwiejny	Kofaktor
VII	Prokonwertyna, czynnik stały	Proenzym
VIII	Czynnik przeciwhemofilowy A, globulina antyhemofilowa	Kofaktor
IX	Czynnik przeciwhemofilowy B	Proenzym
X	Czynnik Stuarta	Proenzym
XI	Plasma thromboplastin antecedent (PTA)	Proenzym
XII	Czynnik Hagemana	Proenzym
XIII	Czynnik stabilizujący fibrynę	Proenzym

Krzepnięcie wg tej koncepcji odbywało się dwoma drogami:

- drogą zewnątrzpochodną zależną od czynnika tkankowego – TF (tissue factor);
- drogą wewnątrzpochodną, niezależną od czynnika tkankowego.

Wśród czynników krzepnięcia należy wyróżnić czynniki zespołu protrombiny:

- Należą do nich czynniki: II, VII, IX i X
- są syntetyzowane w wątrobie, przy udziale witaminy K, niezbędnej jako kofaktor w potranslacyjnej karboksylacji kwasu glutaminowego
- Zamiana reszt kwasu glutaminowego w reszty kwasu γ -glutaminowego umożliwia czynnikom zespołu protrombiny wiązanie jonów wapnia

Występowanie groźnych dla życia krwawień u chorych na hemofilię (A – niedobór czynnika VIII, B-niedobór czynnika IX) spowodowało, że badacze początkowo traktowali drogę wewnątrzpochodną jako główną drogę krzepnięcia. Drogę zewnątrzpochodną traktowali jako drogę wspomagającą. Pod koniec XX wieku pojawiły się wątpliwości, czy droga wewnątrzpochodna jest na pewno główną drogą aktywacji krzepnięcia.

Pewne dane przemawiały za tym, że rolę drogi głównej spełnia jednak droga zewnątrzpochodna, krótsza i bardziej efektywna [3].

Do powstania nowej koncepcji kaskady krzepnięcia przyczyniło się:

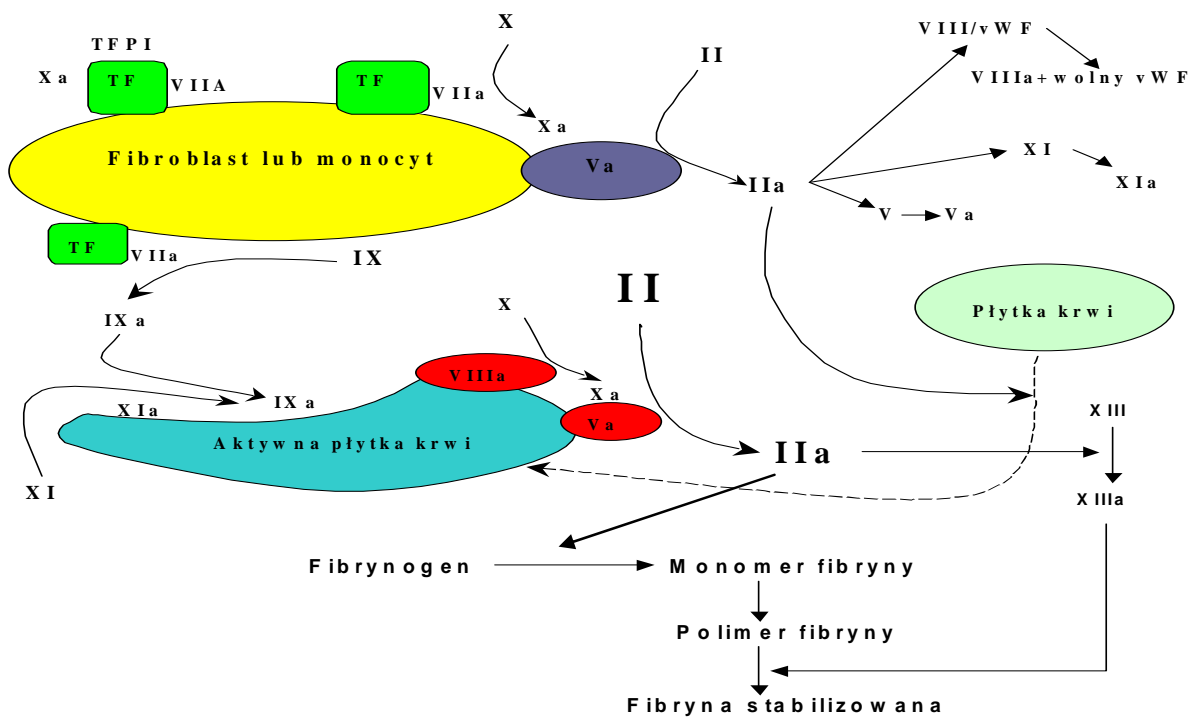
- dokładne poznanie struktury i roli inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia krwi – TFPI,
- w 1977 roku udowodniono, że kompleks czynnika VIIa i czynnika tkankowego: VIIa/TF w obecności jonów wapnia, oprócz czynnika X aktywuje również czynnik IX,
- aktywacja czynnika X za pomocą kompleksu cz. VIIa/TF jest szybsza niż aktywacja czynnika X poprzez kompleks cz. IXa/VIII,

- czynnik X musi być aktywowany za pomocą dwóch mechanizmów, tzn. poprzez kompleks czynnika VIIa/TF oraz kompleks cz. IXa/VIII, ponieważ TFPI uniemożliwia stałą aktywację czynnika X przez kompleks czynnika VIIa/TF.

Nowa koncepcja kaskady krzepnięcia krwi [4]

- Momentem inicjującym krzepnięcie jest ekspozycja czynnika tkankowego na powierzchni monocytów lub fibroblastów.
- Czynnik tkankowy w kompleksie z czynnikiem VII aktywuje czynnik X. Proces ten jest pierwszym etapem drogi zewnątrzpochodnej, nazywanej obecnie również **fazą inicjacji**.
- Aktywny czynnik X w kompleksie z czynnikiem V i jonami wapnia aktywuje protrombinę do trombiny.
- Powstają niewielkie ilości trombiny, za mało do utworzenia stabilnej fibryny ale wystarczające do : rozdzielenia kompleksu czynnika VIII z czynnikiem von Willebranda, aktywacji płytek, aktywacji kolejnej porcji czynnika V oraz utworzenia aktywnego czynnika XI.

Schemat krzepnięcia krwi [4]



VIII/vWF - kompleks czynnika VIII z czynnikiem von Willebranda
 TFPI - inhibitor drogi zależnej od czynnika tkankowego
 a - czynniki aktywne
 TF - czynnik tkankowy

Tak więc procesy składające się na fazę inicjacji spełniają rolę procesów przygotowawczych

Większa ilość trombiny powodująca przejście fibrynogeny w fibrynę powstaje na drodze wewnątrzpochodnej nazywanej obecnie również **fazą wzmocnienia**.

- Droga ta jest uruchamiana w wyniku aktywacji czynnika IX przez kompleks cz. VII/TF. Czynnik IXa na powierzchni aktywowanych płytek tworzy kompleks (tzw. tenazę) z fosfolipidami błony płytkowej, cz. VIIIa i cz. X.

- W kompleksie tym aktywowany jest czynnik X do Xa. Czynnik Xa z kolei tworzy kolejny kompleks (tzw. protrombinazę) z cz. Va i protrombiną, w którym powstaje trombina.
- Poza przemianą fibrynogenu w fibrynę, trombina aktywuje cz. XIII-stabilizujący skrzep, dzięki któremu rozpuszczalna fibryna przyjmuje postać fibryny stabilizowanej.
- Powstała fibryna wzmacnia hemostatyczny czop płytkowy i powstaje skrzep. Tak więc powstanie skrzepu odbywa się dzięki współdziałaniu płytek i obu dróg krzepnięcia. Na schemacie przedstawiono aktualnie obowiązujący schemat krzepnięcia krwi.

Według nowej koncepcji kaskady krzepnięcia fizjologicznym aktywatorem czynnika XI nie jest jak uważano dotychczas wyłącznie cz. XIIa, lecz także trombina powstała na drodze zewnątrzpochodnej krzepnięcia czyli w fazie inicjacji.

Tłumaczy to znaną od dawna obserwację kliniczną, że niedobór czynnika XII (anomalia Hagemana) nie powoduje powikłań krwotocznych. Czynnik XII odgrywa bowiem większą rolę w inicjowaniu procesu fibrynolizy. Potwierdza to przypadek Johna Hagemana (od którego nazwiska pochodzi nazwa czynnika XII), który zmarł z powodu zawału serca.

Fibrynoliza

- Główną rolą jaką odgrywa fibrynoliza w hemostazie to rozpuszczanie śródnacyniowych złogów i utrzymanie drożności naczyń.
- Fizjologicznie odbywa się ona na powierzchni skrzepu.
- Obecność silnych inhibitorów osoczowych, zapobiega uogólnieniu tego procesu. Jedynym wyjątkiem jest leczenie fibrynolityczne prowadzące do planowej fibrynolizy uogólnionej.
- Głównym enzymem biorącym udział w procesie fibrynolizy jest **plazmina**.
- Prekursorem plazminy jest plazminogen, syntetyzowany w wątrobie.

Do aktywacji plazminogenu dochodzi różnymi sposobami, ale wszystkie aktywatory działają poprzez rozerwanie wiązania peptydowego pomiędzy arginina (Arg⁵⁶⁰) i walina (Val⁵⁶¹), doprowadzając do utworzenia dwułańcuchowej struktury plazminy. Aktywatory plazminogenu podzielono na:

- aktywatory endogenne, powodujące aktywację plazminogenu szlakiem wewnątrzpochodnym. Należą do nich: czynnik Hagemana (XII) i kalikreina;
- aktywatory egzogenne, pochodzące z tkanek, aktywujące fibrynolizę szlakiem zewnątrzpochodnym. Należą do nich: t-PA (tkankowy aktywator plazminogenu) i u-PA (aktywator typu moczowego, czyli urokinaza);
- aktywatory heterologiczne, do których należą streptokinaza, stafylokinaza, proteazy zawarte w granulocytach, komórkach białaczkowych oraz jadach węży.

Fibrynoliza jest hamowana przez inhibitory aktywacji plazminogenu i inhibitory plazminy.

- Dwa główne inhibitory aktywatorów plazminogenu to: **PAI-I i PAI-II**.
- PAI-I jest białkiem syntetyzowanym w komórkach wątroby, śródbłonna naczyń, mięśni gładkich i w megakariocytach. Inhibitor ten jest uwalniany z komórek śródbłonna do osocza w postaci aktywnej, wiąże i inaktywuje t-PA i urokinazę, nie tworzy natomiast kompleksu z prourokinazą.
- Niewielka ilość, około 10% PAI-I jest uwalniany do osocza z płytek krwi.
- Drugi inhibitor PAI-II wykryto w łożysku i osoczu kobiet ciężarnych. Jest wytwarzany przez monocyty i makrofagi. Szybciej inaktywuje urokinazę niż t-PA.

Do innych inhibitorów fibrynolizy należą:

- inhibitor C1 –esterazy
- lipoproteina (a)
- trombospondyna

- inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną **TAFI** (thrombin activable fibrinolysis inhibitor).

TAFI przekształca się w postać aktywną pod wpływem trombiny i plazminy. Związanie trombiny z trombomoduliną około 1000 przyspiesza aktywację TAFI. TAFI dokonuje częściowej proteolizy fibryny, przez co osłabia jej aktywność jako kofaktora plazminogenu i w ten sposób hamuje fibrynolizę.

Plazmina

- jest proteazą serynową która trawi; fibrynę, fibrynogen, czynniki XII, V i VIII, czynnik von Willebranda oraz glikoproteiny powierzchni płytek.
- W wyniku jej działania z fibrynogenu powstają produkty jego degradacji: fragment X, Y i dwa fragmenty D.
- Fragment X jako jedyny jest wykrzepiany przez trombinę.
- W wyniku proteolizy fibryny powstają podobne produkty rozpadu jak w przypadku proteolizy fibrynogenu. Rozpad fibryny stabilizowanej (tzn. powstałej pod wpływem czynnika XIII) powoduje utworzenie podwójnego fragmentu D (D dimer), w którym dwa fragmenty D połączone są wiązaniem krzyżowym.

Reasumując :

- po uszkodzeniu naczynia w ciągu 3–5 minut dochodzi do powstania czopu płytkowego, który w sposób prowizoryczny hamuje krwawienie.
- W ciągu 5–10 minut dochodzi do utworzenia fibryny stabilizowanej, która wzmacnia czop płytkowy i przekształca go w skrzep. Dzięki tym procesom niewielkie krwawienie może zostać opanowane.
- Przywrócenie drożności naczynia odbywa się dzięki fibrynolizie, która w ciągu 48–72 godzin doprowadza do rozpuszczenia nadmiaru skrzepliny.

NAJWAŻNIEJSZE ETAPY PRAWDŁOWEJ HEMOSTAZY

Endogenne inhibitory krzepnięcia krwi

- Płynność krwi w łożysku naczyniowym zapewniają m.in. naturalne inhibitory krzepnięcia krwi.
- Najważniejsze z nich to: antytrombina (AT), układ antykoagulacyjny białka C i inhibitor drogi zależnej od czynnika tkankowego (TFPI-tissue factor pathway inhibitor).

Antytrombina(AT): jest odpowiedzialna za 75% aktywności antykoagulacyjnej osocza. Jest głównym inhibitorem trombiny (czynnika IIa) i czynnika Xa, ale unieczynnia też czynniki XIIa, XIa, plazminę i kalikreinę, składową C1 komplementu. AT jest glikoproteiną syntetyzowaną w wątrobie, komórkach śródbłonna naczyń i prawdopodobnie w megakariocytach. Aktywność antykoagulacyjna wzrasta 1000-krotnie w obecności heparyny. W warunkach fizjologii rolę heparyny spełnia siarczan heparanu zlokalizowany na powierzchni komórek śródbłonna naczyń.

Białko C-jest witamino-K zależną glikoproteiną, produkowaną w wątrobie. Najważniejszym fizjologicznym aktywatorem białka C jest trombina. Kofaktorem tej reakcji jest zlokalizowana na powierzchni śródbłonna trombomodulina. Aktywowane białko C w obecności białka S powoduje wybiórczą proteolizę czynnika Va, VIIIa i PAI.

Inhibitor drogi zależnej od czynnika tkankowego (TFPI) [5]

- TFPI jest białkiem syntetyzowanym w komórkach wątroby, śródbłonna naczyń i w megakariocytach.
- Krąży w osoczu głównie w postaci związanej z lipoproteinami: 50% w połączeniu z LDL i VLDL, 40–45% z HDL. 5–10% występuje w postaci wolnej, a niewielka ilość jest
- prawdopodobnie związana z glikoproteinami znajdującymi się na powierzchni śródbłonna naczyń.
- Heparyna powoduje 2–8 krotny wzrost zawartości TFPI w osoczu, wydaje się, że dzięki puli TFPI związanej z glikozaminoglikanami.

- Inaktywacja fazy inicjacji odbywa się dwuetapowo. TFPI łączy się początkowo z czynnikiem Xa, inaktywując go oraz dokonując zmiany konformacyjnej swojej cząsteczki. Następnie łączy się z czynnikiem VIIa tworzącym kompleks z czynnikiem tkankowym [5].

Przeciwwkrzepowe działanie komórek śródbłónka naczyń

- Komórki śródbłónka naczyń wydzielają wiele substancji, które mogą hamować najważniejsze etapy prawidłowej hemostazy.
- Prostacyklina i tlenek azotu hamują adhezję i agregację krwinek płytkowych. Trombomodulina wspólnie z trombiną aktywuje układ antykoagulacyjny białka C.
- Ponadto na powierzchni komórek śródbłónka znajdują się naturalne glikozaminoglikany, przede wszystkim siarczan heparanu mający działanie antykoagulacyjne.
- Poza hamowaniem krzepnięcia śródbłónek nasila fibryinolizę poprzez uwalnianie aktywatorów plazminogenu: t-PA i u-PA.
- Wszystkie te substancje zapewniają nietrombogenicność zdrowym komórkom śródbłónka.

Przeciwwkrzepowe działanie płytek

- wynika z obecności w ziarnistościach wewnątrzpłytkowych urokinazowego aktywatora plazminogenu: u-PA.

PIŚMIENNICTWO

1. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism ,and its function as a biochemical amplifier. Nature 1964; **202**: 498-499.
2. 2.Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 1964; **145**: 1310-1312.
3. Rapaport SI, Rao VM. The tissue factor pathway :How it become a “Prima Ballerina “.Thrombosis and Haemostasis 1995; **74**(1): 7-17.
4. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concept of blood coagulation. Haemophilia 1998; **4**: 331-334.
5. Kłoczko J. Inhibitor drogi zależnej od czynnika tkankowego. Acta Haematologica Polonica 1997; **28**: 30-32.

Pozostałe piśmiennictwo znajduje się u autora publikacji.

Praca wpłynęła do Redakcji 21.04.2010 r. i została zakwalifikowana do druku 21.04.2010 r.

Adres Autora:

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie
20-081 Lublin
ul. Staszica 11
Tel. (81) 5345496
email: besokolowska @o2.pl