

6. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. i wsp.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, publikacja elektroniczna.
7. Kaufman D.S., Thomson J.A.: Human ES cells-haematopoiesis and transplantation strategies. *J Anat* 2002, 200, 243-8.
8. Klump H., Teichweyde N., Meyer C., Horn P.A.: Development of patient-specific hematopoietic stem and progenitor cell grafts from pluripotent stem cells, in vitro. *Curr Mol Med* 2013 Jun, 13(5), 815-20.
9. Koehl U., Zimmermann S., Esser R. i wsp.: Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002, 29, 927-30.
10. Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S.: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996, 87, 1-13.
11. Krzymański G., Wiktor-Jedrzejczak W.: Autologous bone-marrow-derived stromal fibroblastoid cells grown in vitro for the treatment of defects of mandibular bones. *Transplant Proc* 1996, 28, 3528-3530.
12. Kucia A., Reza R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006, 20, 857-69.
13. Medvinsky A., Dzierzak E.: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996, 86, 897-906.
14. Nowell P.C., Hungerford D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960, 132, 1197.
15. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007 Jul 19, 448(7151), 313-7.
16. Pilat S., Carotta S., Klump H.: Development of hematopoietic stem and progenitor cells from mouse embryonic stem cells, in vitro, supported by ectopic human HOXB4 expression. *Methods Mol Biol* 2013, 1029, 129-47.
17. Ratajczak J., Wysoczynski M., Zuba-Surma E., Wan W., Kucia M., Yoder M.C., Ratajczak M.Z.: Adult murine bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells differentiate into the hematopoietic lineage after coculture over OP9 stromal cells. *Exp Hematol* 2011 Feb, 39(2), 225-37.
18. Steidl U., Kronenwett R., Rohr U-P. i wsp.: Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood* 2002, 99, 2037-2044.
19. Till J.E., McCulloch E.A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse marrow. *Radiat Res* 1961, 14, 231-232.
20. Wiktor-Jedrzejczak W., Ahmed A., Szczylik C., Skelly R.R.: Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J Exp Med* 1982, 156, 1516-1527.
21. Wiktor-Jedrzejczak W., Bartocci A., Ferrante A.W. Jr i wsp.: Total absence of colony stimulating factor-1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 4828-4832.
22. Wiktor-Jedrzejczak W., Siekierzynski M., Szczylik C. i wsp.: Aplastic anemia with marrow defective in formation of fibroblastoid cell colonies in vitro. *Scand J Haematol* 1982, 28, 82-90.
23. Wiktor-Jedrzejczak W., Szczylik C., Gornas P. i wsp.: Different marrow cell number requirements for the hematopoietic colony formation and the cure of the W/Wv anemia. *Experientia* 1979, 35, 546-7.
24. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B. i wsp.: Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002, 99, 1745-1757.

Krystyna Zawilska*

Nazwą „hemostaza” określa się zespół procesów fizjologicznych, które zapewniają sprawne hamowanie krwawienia po przerwaniu ciągłości ściany naczyń krwionośnych, szczelność łoża naczyniowego i płynność krążącej krwi.

Rozróżnia się hemostazę pierwotną i wtórną. Pierwsza, odbywająca się w ciągu kilkunastu sekund, polega na skurczu uszkodzonego naczynia oraz przyleganiu (adhezji) i gromadzeniu się (agregacji) płytek krwi w miejscu uszkodzenia z wytworzeniem płytkowego czopu hemostatycznego. Uszkodzona ściana naczyniowa jest źródłem czynnika tkankowego (*tissue factor* – TF), zwanego dawniej tkankową tromboplastyną. Czynniki tkankowy inicjuje aktywację krzepnięcia krwi i w następstwie – umacnianie czopu płytkowego przez złogi fibryny. Proces ten, trwający kilka minut, jest nazywany hemostazą wtórną. Istnieje wiele mechanizmów lokalizujących czop hemostatyczny i ograniczających jego narastanie.

Zakrzep można uważać za czop hemostatyczny, który rozwijał się w sposób niedostatecznie kontrolowany lub w niewłaściwym miejscu. Rozpuszczanie fibryny przez enzym fibrynolityczny – plazminę, oraz usuwanie składników czopu hemostatycznego przez komórki żerne to wstępne warunki *restitutio ad integrum*.

Głównymi elementami hemostazy są: ściana naczyń krwionośnych, płytki krwi oraz układy krzepnięcia i fibrynolizy.

2.1. Płytki krwi

Płytki, najmniejsze bezjądrowe komórki krwi, są fragmentami cytoplazmy megakariocytów szpiku kostnego. W fazie spoczynkowej mają kształt dyskooidalny, średnicę $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ i objętość $7,6 \pm 4,85 \mu\text{m}^3$. Ich liczba u osób zdrowych wynosi 140-440 G/l ($140-440 \times 10^9/l$). Komórki te przeżywają od 8 do 12 dni i są usuwane z krwioobiegu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Około 30% całkowitej masy płytek znajduje się w śledzionie.

Proliferację i różnicowanie komórek prekursorowych układu płytkotwórczego oraz dojrzewanie megakariocytów aż do wytwarzania płytek reguluje trombopoetyna – glikoproteina (masa cząsteczkowa 36 kD) syntetyzowana w komórkach mięszu wątroby i – w małych ilościach – przez nerki. W mniejszym stopniu wytwarzanie płytek pobudza interleukina 11 (IL-11).

* Współautorem rozdziału w poprzednim wydaniu książki był pan prof. Stanisław Łopaciuk†.

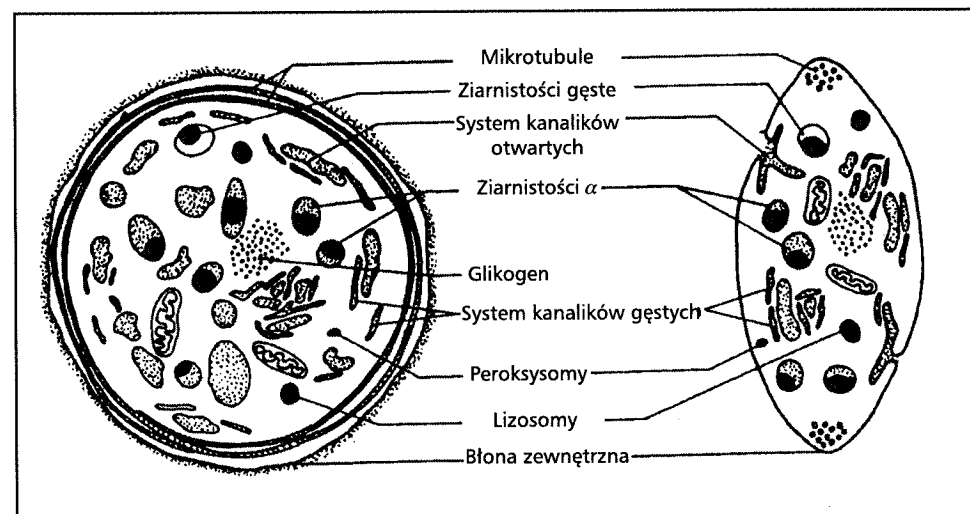
2.1.1. Budowa płytek

Płytką krwi jest oddzielona od otoczenia błoną komórkową i ma bogatą strukturę wewnętrzną. Błona komórkowa jest niewidoczna pod mikroskopem świetlnym. Natomiast na przekroju poprzecznym, w mikroskopie elektronowym widoczna jest w postaci dwóch ciemnych linii, przegrodzonych jasną przestrzenią. Zasadniczy zrąb błony komórkowej składa się z dwóch warstw fosfolipidów (zewnątrznej i wewnętrznej), w których są rozmieszczone glikolipidy, cholesterol i białka. Umieszczenie fosfolipidów w błonie jest asymetryczne. W warstwie wewnętrznej znajdują się głównie aminofosfolipidy, obdarzone ujemnym ładunkiem (np. fosfatydyloseryna) lub obojętne (np. fosfatydyloetanoloamina). Natomiast w warstwie zewnętrznej błony dominują obojętne lipidy cholinowe (np. fosfatydylocholina i sfingomielina). Wiele białek przechodzi przez obie warstwy błony, a końce ich cząsteczek mogą znajdować się po zewnętrznej i wewnętrznej stronie. Końce zewnętrzne wiążą się z oligosacharydami i wytwarzają glikoproteiny (GP). Takie białka są receptorami dla czynników aktywujących i hamujących funkcje płytek, zawierają kanały przepływu jonów i pełnią funkcję enzymów.

Błona komórkowa ma liczne wgłębienia skierowane ku cytoplazmie, tzw. układ otwartych kanalików, przez który wędrują poza płytkę składniki uwalniane z ziarnistości płytek. Błona ta stanowi rodzaj płynnej, dynamicznej struktury, pozwalającej na przemieszczanie poszczególnych elementów w zależności od stanu aktywności komórki. Jej powierzchnia pokryta jest amorficznym płaszczem (glikokaliksem), zawierającym zewnętrzne końce błonowych glikoprotein, glikolipidy i zaadsorbowane białka osocza. Reszty kwasu sialowego w białkach i lipidy nadają glikokaliksowi ujemny ładunek elektryczny.

Cytoplazma płytkowa zawiera czynnik krzepnięcia XIII i płytkopochodny czynnik wzrostowy komórek śródbłonnka (*platelet-derived endothelial cell growth factor* – PDECGF).

Wśród struktur wewnątrzkomórkowych płytki wyróżnia się podbłonowy system mikrotubuli, system kanalików gęstych i kilka rodzajów ziarnistości, w tym α -ziarnistości, ziarnistości elektronowo gęste δ (gęste ciała), lizosomy i peroksysomy (ryc. 2.1).



Ryc. 2.1. Schemat wewnętrznej struktury płytki krwi.

TABELA 2.1. Składniki ziarnistości wewnątrzpłytkowych

Rodzaj ziarnistości	Składniki
Ziarnistości α	Białka swoiste płytek: czynnik płytkowy 4, β -tromboglobulina
	Białka adhezyjne: fibronektyna, czynnik von Willebranda, trombospondyna, witronektyna
	Białka czynne w krzepnięciu krwi i fibrynolizie: fibrynogen, czynnik (cz.) V, cz. VIII, wielkocząsteczkowy kininogen (HMWK), cz. XI, inhibitor C1-esterazy, białko S, PAI-I, t-PA
	Mitogeny: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu śródbłonnka (VEGF), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β)
	Białka błony ziarnistości: P-selektyna, białko 33 (GMP-33), GP IIb-IIIa, GP Ib-IX, GP IV (CD36), GP V, CD9, osteonektyna, Rap Ib
Ziarnistości gęste δ	ADP, ATP, GDP, GTP, jony wapnia, jony magnezu, serotonina
	Fosfoinozytole, polifosforany
Lizosomy	Kwaśne hydrolazy
Peroksysomy	Katalaza

Mikrotubule składają się z dwóch rodzajów cząsteczek białka globularnego – tubuliny α i tubuliny β . Wraz z filamentami (włóknkami) aktywnymi i filamentami pośrednimi tworzą one tzw. cytoszkielet płytkowy, warunkujący utrzymywanie dyskooidalnego kształtu płytki i jego zmiany podczas aktywacji. Oprócz tych podstawowych struktur w skład cytoszkieletu wchodzi białka dodatkowe, które wpływają na procesy polimeryzacji mikrotubuli i włóknien lub łączą włóknka między sobą, a także białka motorowe, do których należy miozyna.

W układzie kanalików gęstych (*dense tubular system*) magazynowane są jony wapniowe i występują enzymy kierujące przemianami kwasu arachidonowego. Ziarnistości wewnątrzpłytkowe są miejscem magazynowania wielu składników biologicznie czynnych, które są uwalniane do otaczającego środowiska podczas aktywacji płytek (tab. 2.1). Uwalnianie do osocza swoistych białek płytkowych – czynnika płytkowego 4 (PF-4) i β -tromboglobuliny (β -TG) oraz przemieszczenie P-selektyny (CD62P, GMP-140) wraz z błonami α -ziarnistości na powierzchnię płytek jest uważane za wskaźnik aktywacji płytek *in vivo*. PF-4 i β -tromboglobulina są zdolne do zobojętniania heparyny. P-selektyna pośredniczy w przyleganiu aktywowanych płytek do leukocytów i T-limfocytów. Wiązanie się tej glikoproteiny z receptorami monocytów powoduje aktywację reakcji prozapalnych i prokrzepkowych, w tym ekspresję czynnika tkankowego. Płytki zawierają też lizosomy, mitochondria, peroksysomy, ziarna glikogenu i nieliczne struktury aparatu Golgiego.

Płytki pełnią dwie zasadnicze funkcje w hemostazie. Pierwszą z nich jest tworzenie hemostatycznych czopów płytkowych, które mogą zatykać drobne uszkodzenia w ścianach naczyń, a drugą funkcją jest udział w reakcjach krzepnięcia krwi. Istnieją dowody na to, że oprócz udziału w hemostazie płytki krwi odgrywają rolę w reakcjach zapalnych, miażdżycy i obronie przeciwbakteryjnej, stymulują angiogenezę, gojenie się ran, procesy regeneracyjne wątroby, mogą sprzyjać tworzeniu się przerzutów nowotworowych.

2.1.1.1. Glikoproteiny płytek obdarzone funkcją receptorową

W odpowiedziach na wpływ czynników pochodzących z otaczającego środowiska uczestniczą receptory obecne na powierzchni płytek. Pośredniczą one w oddziaływaniach płytek wzajemnie na siebie i na inne komórki oraz na składniki osocza i macierzy zewnątrzkomórkowej. Receptorami tymi są integralne glikoproteiny błon płytki lub ich kompleksy. Na podstawie szybkości wędrówki w elektroforezie nadano im symbole GP Ia, Ib, IIa, IIb itd. W ludzkich płytkach wykryto około 50 glikoprotein, lecz poznano znaczenie czynnościowe tylko nielicznych. Podobnie jak białka receptorowe innych komórek, glikoproteiny płytek należą do dużych rodzin integryn, białek bogatych w leucynę, selektyn, immunoglobulin, tetraspanin i serpentyn. Zidentyfikowano glikoproteiny płytek uczestniczące w adhezji do składników tkanki łącznej, aktywacji i agregacji (tab. 2.2).

Swoiste dla płytek są kompleksy GP IIb-IIIa i GP Ib-IX-V. Podobnie jak inne integryny, GP IIb-IIIa jest zależnym od jonów Ca^{2+} niekowalencyjnym dimerem. Cechą charakterystyczną integryn są zmiany zachodzące w funkcji receptorowej pod wpływem aktywacji komórki. W płytce spoczynkowej GP IIb-IIIa jest obecna i rozpoznawana przez przeciwciała na powierzchni, a także w błonach układu otwartych kanalików i ziarnistości. Glikoproteina IIb-IIIa jest receptorem dla fibrynogenu. Zdolność wiązania fibrynogenu płytka uzyskuje jednak dopiero po zmianach konformacji GP IIb-IIIa wywołanych przez wielu agonistów. Aktywacji płytek towarzyszy też ekspozycja większej liczby receptorów dla fibrynogenu dzięki przemieszczeniu GP IIb-IIIa z puli wewnątrzkomórkowej na powierzchnię. Utworzenie mostków fibrynogenowych między płytkami jest warunkiem powstania agregatu płytek, niezależnie od rodzaju agonisty. Czynnościowego znaczenia GP IIb-IIIa niewątpliwie dowodzi zachowanie płytek w trombastenii Glanzmanna. W ciężkich postaciach tej wrodzonej skazy krwotocznej płytki nie zawierają prawidłowej GP IIb-IIIa, nie agregują, nie wiążą fibrynogenu, a w α -ziarnistościach albo nie ma fibrynogenu, albo jego stężenie jest znikome.

Kompleks glikoprotein Ib-IX-V ma znaczenie w wiązaniu płytek do uszkodzonego śródbłonna lub warstwy podśródbłonkowej za pośrednictwem czynnika von Willebrandta (vWF). GP Ib składa się z dwóch łańcuchów (α i β), przy czym miejsce wiążące vWF znajduje się w wewnątrzkomórkowym odcinku łańcucha α . Do kompleksu GP Ib-IX dołączona jest inna glikoproteina bogata w leucynę – GP V. Podstawowa jednostka kompleksu składa się z dwóch cząsteczek GP Ib, dwóch cząsteczek GP IX i jednej cząsteczki GP V. W wyniku wiązania vWF z kompleksem GP Ib-IX-V jest inicjowana aktywacja płytek. Jednak do pełnej aktywacji i agregacji płytek konieczne jest wiązanie vWF także z drugim jego receptorem – GP IIb-IIIa. Niedobór lub brak GP Ib, GP IX i GP V jest przyczyną upośledzenia adhezji płytek w zespole Bernarda-Souliera.

Czynnościowym receptorem, za pośrednictwem którego trombina aktywuje płytki, są glikoproteiny należące do rodziny PAR (*protease-activated receptors*) – PAR-1 i PAR-2. Płytki mają trzy receptory dla ADP: P2Y₁, P2Y₁₂ i P2X₁. Pierwszy z nich jest niezbędny do pełnej aktywacji GP IIb-IIIa przez ADP, drugi łączy się z białkiem hamującym cyklazę adenylanową, a trzeci jest kanałem jonowym uczestniczącym w transporcie Ca^{2+} . Inne receptory płytkowe to m.in. receptor dla tromboksanu A₂ (TXA₂) i dla czynnika aktywującego płytki (*platelet activating factor* – PAF) lub nowo wykryty receptor CLEC-2.

Receptorami płytek krwi dla kolagenu, odgrywającymi ważną rolę w fizjologicznej hemostazie, jest integryna GP Ia/IIa oraz GP VI. Obecność obu tych receptorów jest niezbędna dla prawidłowej reakcji płytek na kolagen.

TABELA 2.2. Główne glikoproteiny błon płytek krwi uczestniczące w adhezji, aktywacji i agregacji płytek

Glikoproteiny	Liczba kopii na płytce	Ligand	Funkcja
Integryny			
GP IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/CD61)	80 000*	Fibrynogen, czynnik von Willebrandta, fibronektyna, witronektyna, trombospondyna	Agregacja
GP Ia-IIa (VLA-2, $\alpha_v\beta_1$, CD49b/CD29)	1000	Kolagen	Adhezja
GP Ic-IIa ($\alpha_c\beta_1$, CD49e/CD29)	1000	Fibronektyna	Adhezja
GP Ic-IIa (VLA-6, $\alpha_6\beta_1$, CD49f/CD29)	1000	Laminina	Adhezja
$\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61)	100	Witronektyna, czynnik von Willebrandta, fibrynogen, fibronektyna, trombospondyna	Adhezja
Bogate w leucynę			
GP Ib-IX-V (CD42)	25 000	Czynnik von Willebrandta, trombina, P-selektyna	Adhezja
Serpiny			
PAR-1	1800	Trombina	Aktywacja
PAR-4		Trombina	Aktywacja
P2Y ₁ i P2Y ₁₂		ADP	Aktywacja
Immunoglobuliny			
GP VI		Kolagen	Adhezja

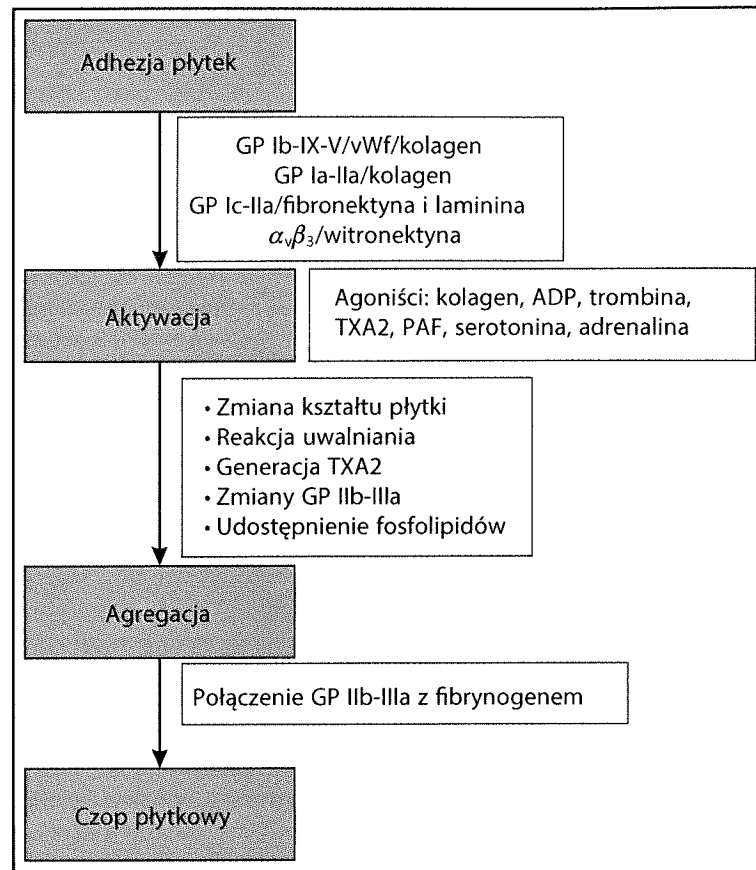
* Na powierzchni płytki spoczynkowej, dodatkowo 20 000-40 000 kopii znajduje się w błonach układu otwartych kanalików i α -ziarnistości.

Opisano wiele polimorfizmów glikoprotein płytkowych, które wywierają wpływ na czynność płytek, a także na ich immunogenność.

2.1.2. Udział płytek w hemostazie pierwotnej

Kolejne fazy tworzenia i narastania czopu hemostaticznego to adhezja płytek do warstwy podśródbłonkowej, aktywacja płytek, w przebiegu której następuje zmiana ich kształtu z dyskooidalnego do nieforemnej komórki mającej liczne nibynóżki (pseudopodia), reakcja uwalniania składników α -ziarnistości, gęstych ciałek i lizosomów (*release reaction*), generacja tromboksanu A₂ (TXA₂), zwiększenie liczby i funkcji receptorowej GP IIb-IIIa, udostępnienie fosfolipidów na powierzchni płytek dla reakcji krzepnięcia krwi oraz agregacja (ryc. 2.2). Tak utworzony czop płytkowy jest następnie wzmacniany włóknami fibryny.

Płytki za pośrednictwem swoich receptorów mogą ulegać adhezji do wielu składników podśródbłonkowej tkanki łącznej, w tym do kolagenu, fibronektyny, lamininy i witronektyny. Na adhezję płytek istotny wpływ mają warunki reologiczne. W warunkach przepływu krwi typowych dla dużych naczyń krwionośnych, czyli przy niskim module ścinania (*low shear rate*), płytki wiążą się bezpośrednio do wspomnianych białek tkanki łącznej. Natomiast przy wysokim module ścinania (*high shear rate*), charakteryzującym przepływ krwi w drobnych naczyniach, niezbędnym spoiwem między płytkami i białkami macierzy pozakomórkowej jest



Ryc. 2.2. Przebieg hemostazy pierwotnej (komórkowej).

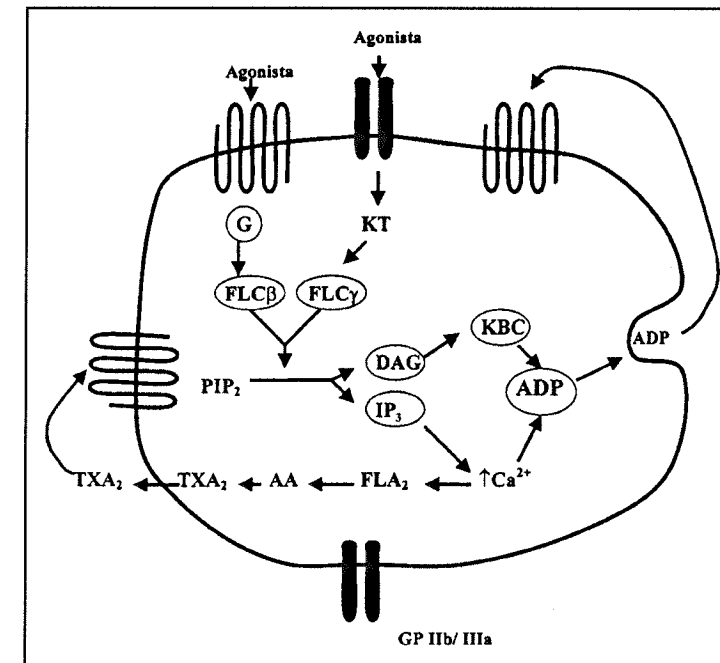
czynnik von Willebranda. Wiadomo, że obecny w osoczu vWF nie agreguje płytek. Przypuszcza się, że przyłączenie tego czynnika do warstwy podśródbłonkowej i warunki wysokiego modułu ścinania wywołują takie zmiany w konfiguracji vWF, które umożliwiają jego wiązanie z kompleksem GP Ib-IX-V na powierzchni płytek. Istotne znaczenie ma także interakcja GP Iba ze śródbłonkową selektyną P (CD62), odpowiedzialna za „toczenie” się płytek na powierzchni śródbłonka.

Aktywacja płytek następuje w wyniku ich adhezji do podśródbłonkowej tkanki łącznej oraz pod wpływem różnorodnych substancji zwanych agonistami. *In vivo* aktywację płytek inicjują przede wszystkim: trombina (najsilniejszy fizjologiczny agonista płytkowy), kolagen, adrenalina, czynnik aktywujący płytki (PAF) i ADP. Do dalszej aktywacji i agregacji przyczyniają się substancje uwalniane z samych płytek: ADP, tromboksan A₂ i serotonina. PAF jest fosfolipidem uwalnianym z pobudzonych leukocytów i komórek śródbłonka.

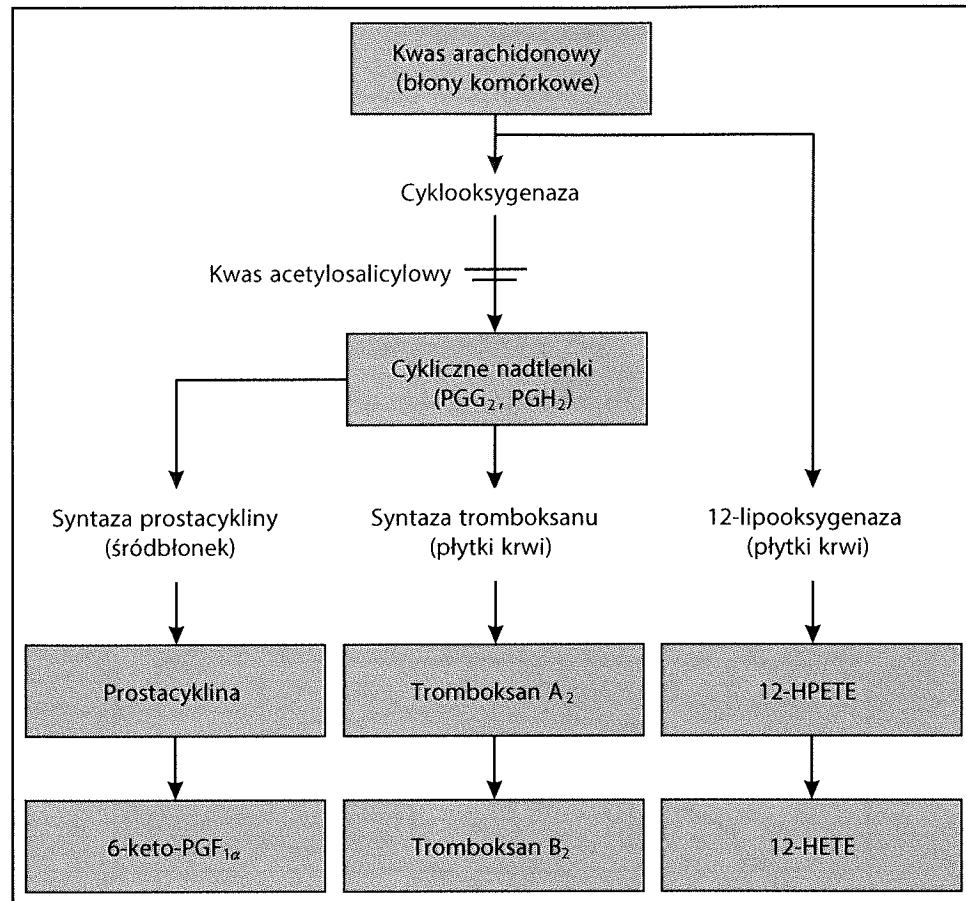
2.1.3. Mechanizmy aktywacji płytek

Adhezja płytek krwi do kolagenu i innych białek podśródbłonkowej tkanki łącznej, podobnie jak wiązania agonistów z receptorami na błonie płytkowej, uruchamia wewnątrzkomórkowe systemy przesyłania sygnałów aktywujących. Płytki przechodzą wówczas ze stanu spoczynku w stan aktywny, co we wczesnej fazie można stwierdzić, obserwując zmianę ich kształtu z dyskooidalnego w nieregularny z licznymi pseudopodiami. W zaktywowanych płytkach dochodzi do zmian architektury cytoszkieletu i do translokacji białek. Zmiany te umożliwiają uwolnienie substancji biologicznie aktywnych z ziarnistości wewnątrzpłytkowych, agregację płytek i ich udział w retrakcji skrzepu.

Niektóre receptory płytkowe (np. receptory trombiny) są sprzężone z białkami G. Pobudzenie receptora prowadzi do aktywacji fosfolipazy C β . Receptory reagujące z białkami adhezyjnymi (np. integryny) przesyłają natomiast sygnały przy udziale kinaz tyrozynowych (np. kinazy Syk), które po uczynieniu przez receptor aktywują fosfolipazę C γ . Fosfolipazy C β i C γ hydrolizują difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₂) do trifosforanu inozytolu (IP₃) oraz diacyloglicerolu (ryc. 2.3). Oba produkty są wtórnymi przekaźnikami sygnału. Trifosforan inozytolu powoduje uwolnienie Ca²⁺ z układu kanalików gęstych do cytozolu. Jony wapnia wychwytywane są przez kalmodulinę, a następnie uaktywniają wiele enzymów, w tym fosfolipazę A₂. Pojawienie się diacyloglicerolu przyczynia się do aktywacji kinazy białkowej C, co ma istotne



Ryc. 2.3. Schemat aktywacji płytek przez agonistów. Receptory płytkowe reprezentowane są przez glikoproteiny zawierające 7 domen transbłonowych (serpiny) i integryny (w tym GP IIb/IIIa). G – białko G; KT – kinaza tyrozynowa; FLC β – fosfolipaza C β ; FLC γ – fosfolipaza C γ ; PIP₂ – difosforan fosfatydyloinozytolu; DAG – diacyloglicerol; IP₃ – trifosforan inozytolu; KBC – kinaza białkowa C; ADP – adenosynodifosforan; AA – kwas arachidonowy; FLA₂ – fosfolipaza A₂; TXA₂ – tromboksan A₂.



Ryc. 2.4. Metabolizm kwasu arachidonowego. 6-keto-PGF_{1α} – prostaglandyna 6-keto-F_{1α}; 12-HPETE – kwas 12-hydroperoksyekoizotetraenowy; 12-HETE – kwas 12-hydroekoizotetraenowy.

znaczenie dla fosforylacji białek cytoszkieletu i jej następstw, w tym uwalniania ADP z ziarnistości gęstych poza płytkę.

W czasie aktywacji płytek uruchamiana jest także kaskada kwasu arachidonowego. Stężenie tego kwasu w płytkach jest znikome, lecz w czasie aktywacji może on być uwalniany z fosfolipidów błonowych (głównie z fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy) na drodze dwóch mechanizmów: albo bezpośrednio przez działanie fosfolipazy A₂, albo przez kolejne działanie fosfolipazy C i lipazy diacyloglicerolu. Główny szlak przemian kwasu arachidonowego (AA) w płytce prowadzi do wytwarzania tromboksanu A₂ (TXA₂). Inicjuje je cyklooksygenaza – enzym hamowany przez kwas acetylosalicylowy i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne (ryc. 2.4). Cyklooksygenaza przekształca AA w wewnętrzne cykliczne nadtlarki prostaglandynowe PGG₂ i PGH₂. Z nich, w zależności od enzymatycznego wyposażenia komórki, powstają: w płytkach krwi – tromboksan (TXA₂), a w śródbłonku naczyń – głównie prostacyklina. Zarówno TXA₂, jak i PGG₂ oraz PGH₂ powodują skurcz naczyń i agregują płytki. Tromboksan A₂ jest niestabilny i szybko przekształcany w nieczynny TXB₂. Czas półtrwa-

nia TXA₂ wynosi około 30 s. W ludzkich płytkach znacznie mniej wydajne są przemiany kwasu arachidonowego inicjowane przez 12-lipooksygenazę. Ich główny produkt – kwas 12-hydroksyeikoizotetraenowy (HETE) – hamuje agregację płytek, lecz jest w dużej mierze przekazywany z płytek do dalszych przemian w leukocytach. Należy dodać, że oprócz konstytutywnej cyklooksygenazy, występującej zawsze w płytkach krwi (COX-1), istnieje druga izoforma tego enzymu – COX-2. Pojawia się ona (głównie w monocytach/makrofagach i komórkach śródbłonna) podczas procesów zapalnych, wyindukowana przez endotoksynę lub cytokiny prozapalne (TNF, IL-1). Aktywność COX-2 jest odpowiedzialna za wytwarzanie znacznych ilości prostaglandyn wywołujących objawy zapalenia.

Krytyczną rolę w odpowiedzi na czynniki hamujące hemostaticzne funkcje płytek przypisuje się układowi cyklazy adenylanowej. Aktywacja tego enzymu za pośrednictwem receptora w błonie płytki i związanych z nim białek G powoduje zwiększenie śródkomórkowego stężenia cyklicznego AMP (cAMP). Zjawisko to jest uznawane za główny mechanizm działania prostacykliny i jej analogów.

2.1.4. Udział płytek w krzepnięciu krwi

Płytki dostarczają fosfolipidów, na których z olbrzymią wydajnością zachodzą reakcje krzepnięcia krwi. Taką prokoagulacyjną aktywność mają fosfolipidy obdarzone ujemnym ładunkiem, fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina. W spoczynkowych płytkach nie są one dostępne dla czynników krzepnięcia, gdyż – podobnie jak w innych komórkach – są zlokalizowane w wewnętrznej warstwie błony komórkowej. Pod wpływem czynników aktywujących (np. trombiny lub kolagenu) z udziałem skramblazy zachodzi ich przemieszczanie na powierzchnię płytek. Związki te tworzą na powierzchni płytek kompleksy z czynnikami krzepnięcia IXa-VIIIa-X (tenaza) oraz z czynnikami Va-Xa (protrombinaza), które biorą udział w procesie powstawania trombiny. Istotne znaczenie w aktywacji krzepnięcia przypisuje się również tworzeniu i odszczepianiu od aktywowanych płytek tzw. mikrocząstek (*microparticles*) – kulistych fragmentów błony wielkości 0,1-1 μm. Mikrocząstki zawierają m.in. integryny płytkowe, selektynę P oraz fosfatydyloserynę, mają zdolność wiązania się ze śródbłonkiem i aktywacji krzepnięcia, nawet na nieuszkodzonej ścianie naczyniowej. Uwalniany z ziarnistości α czynnik V jest wiązany do powierzchni aktywowanych płytek i ma stanowić receptor dla czynnika X. Dużą rolę przypisuje się także uwalnianemu z ziarnistości α czynnikowi VIII, którego lokalne stężenie może w wyniku aktywacji płytek znacznie wzrastać. Substancje wewnętrznpłytkowe uwalniane podczas aktywacji płytek (P-selektyna i CD40L) mogą nasilać generację trombiny poprzez stymulację syntezy TF w monocytach i komórkach śródbłonna.

2.2. Układ krzepnięcia krwi

Istotę krzepnięcia krwi stanowi przejście rozpuszczalnego białka osocza – fibrynogeny – w sieć przestrzenną fibryny pod wpływem trombiny. W procesie tym bierze udział kilkanaście różnych czynników, w tym 12 białek osocza, jedno białko integralne błon komórkowych, fosfolipidy błon komórkowych i jony wapnia. Mechanizmy krzepnięcia są ściśle powiązane z hemostazą płytkową. Główną rolą fibryny jest wzmocnienie czopu płytkowego.

2.2.1. Czynniki krzepnięcia

W międzynarodowej nomenklaturze cyframi rzymskimi oznaczono dziesięć czynników krzepnięcia (tab. 2.3). Kolejność numeracji jest przypadkowa. Do czynników nieobjętych numeracją należą prekalikreina i wielkocząsteczkowy kininogen. Oba białka, poza udziałem w krzepnięciu krwi, są składnikami układu kininotwórczego osocza i układu renina-angiotensyna. Nazwy, takie jak np. czynnik Christmasy lub czynnik Hagemana, pochodzą od nazwisk pierwszych pacjentów, u których wykryto wrodzony niedobór.

Czynnik tkankowy (*tissue factor* – TF) jest glikoproteiną stanowiącą integralny składnik błon wielu komórek podściółkowej tkanki łącznej oraz błony środkowej i przydanki naczyń, z wyjątkiem błon płytek krwi. Jest on komórkowym receptorem dla czynnika VII. Prawidłowe komórki śródbłonka nie zawierają TF. Dopiero ich pobudzenie, np. przez endotoksyny i prozapalne cytokiny, powoduje ekspresję TF.

Czynniki krzepnięcia o charakterze białek osocza można podzielić na trzy grupy: 1) czynniki zespołu protrombiny – II, VII, IX i X; 2) czynniki wrażliwe na trombinę – I, V, VIII i XIII;

TABELA 2.3. Charakterystyka osoczowych czynników krzepnięcia

Czynnik	Masa cząsteczkowa (kD)	Chromosom	Gen (kb)	Stężenie w osoczu (mg/l)	Czynność
Fibrynogen (czynnik I)	340	4q26-q28		3000	Prekursor fibryny
Protrombina (czynnik II)	72	11p11-q12	21	100	Proenzym
Czynnik V (proakceleryna)	330	1q21-25	7	5-10	Kofaktor
Czynnik VII (prokonwertyna)	50	13q34	13	0,5	Proenzym
Czynnik VIII (globulina antyhemofilowa A)	330	q28	185	0,1	Kofaktor
Czynnik IX (czynnik Christmasy, globulina antyhemofilowa B)	56	q26-27.3	34	5	Proenzym
Czynnik X (czynnik Stuarta)	56	13q34	22	8-10	Proenzym
Czynnik XI (<i>PTA-plasma thromboplastin antecedent</i>)	160	15	23	5	Proenzym
Czynnik XII (czynnik Hagemana)	80	5	12	30	Proenzym
Czynnik XIII	320			60	Stabilizacja fibryny
Czynnik tkankowy (TF)	45	1pter-p12	12	0,1	Kofaktor
Czynnik von Willebranda (vWF)	225 x n	12pter-p12	175	10	Adhezja płytek krwi, wiązanie cz. VIII

ⁿ Liczba podjednostek o masie cząsteczkowej 225 000 ulegających multimeryzacji.

3) czynniki kontaktu – XI, XII, prekalikreina i wielkocząsteczkowy kininogen. Czynniki zespołu protrombiny są syntetyzowane w komórkach miększu wątroby przy udziale witaminy K, która jest niezbędna w ostatnim etapie ich biosyntezy jako kofaktor potranslacyjnej karboksylacji kwasu glutaminowego w cząsteczce białek prekursorowych. W wyniku tej reakcji następuje zmiana kilkunastu reszt kwasu glutaminowego w reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego. Obecność tego ostatniego aminokwasu w N-końcowym fragmencie cząsteczki białka determinuje zdolność protrombiny i innych czynników zespołu protrombiny do wiązania jonów wapnia, zaś wiązanie jonów wapnia jest koniecznym warunkiem tworzenia kompleksów tych czynników z fosfolipidami, aktywatorem i kofaktorem.

Fosfolipidy błon komórkowych i płytek krwi są niezbędne do prawidłowego przebiegu krzepnięcia krwi, ale nie zyskały miana czynników krzepnięcia. Poza listą tych czynników jest także czynnik von Willebranda. Jego synteza odbywa się w komórkach śródbłonka i megakariocytach. Czynnik ten występuje w osoczu i w płytkach krwi w postaci multimerów różnej wielkości. Najmniejsze z nich to dimery zbudowane z dwóch podjednostek vWF o masie cząsteczkowej 500 kD, zaś największe składają się z około 40 dimerów, a ich masa cząsteczkowa wynosi 20 000 kD. Rola vWF w hemostazie jest podwójna: z jednej strony ułatwia on adhezję płytek do podściółkowej tkanki łącznej w warunkach szybkiego przepływu krwi, a z drugiej – tworząc kompleks z czynnikiem VIII w stosunku 50-100:1 (monomery vWF:monomer czynnika VIII), ochrania ten czynnik we krwi przed proteolityczną degradacją.

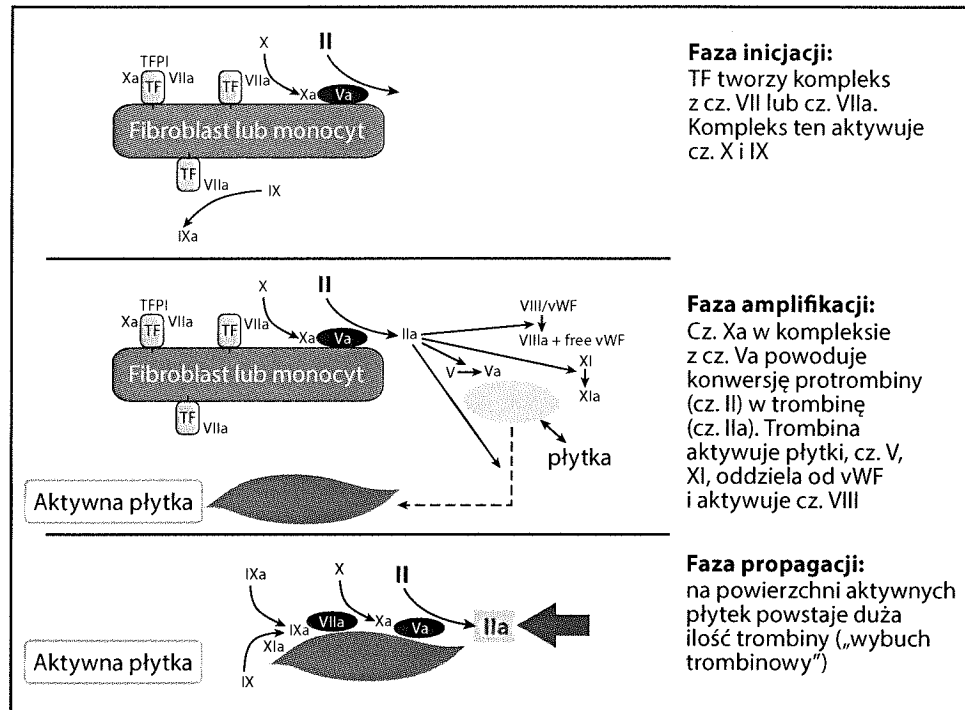
Poznano już sekwencję aminokwasów i przestrzenną strukturę czynników krzepnięcia. Scharakteryzowano też geny kontrolujące syntezę tych białek. Czynniki VIII i IX są wytwarzane pod kontrolą genów zlokalizowanych w chromosomie X, natomiast geny pozostałych czynników krzepnięcia zajmują miejsce w autosomach. Wiele białkowych czynników krzepnięcia otrzymano na drodze rekombinacji genetycznej. Wiedzę o fizjologicznym znaczeniu poszczególnych składników układu krzepnięcia zaczęto czerpać nie tylko z rzadkich przypadków ich odosobnionych wrodzonych niedoborów, lecz także z modeli transgenicznych zwierząt pozbawionych genu dla białka, którego rolę pragnie się poznać.

2.2.2. Aktywacja krzepnięcia

Protrombina, czynniki VII, IX, X, XI, XII i prekalikreina występują w osoczu w postaci zymogenów proteaz serynowych. Ich przekształcenie w aktywne proteazy odbywa się w układzie wieloenzymatycznym, przy czym każdy zymogen jest substratem dla poprzednio zaktywowanego enzymu, a każdy enzym jest produktem tej reakcji. W każdym ogniwie następuje zwielokrotnienie liczby aktywnych cząsteczek substratu. Dlatego też krzepnięcie krwi ma charakter reakcji „kaskadowej” lub „wodospadowej”.

Wyróżniono dwa szlaki aktywacji krzepnięcia: szlak wewnątrzpochodny i szlak zewnątrzpochodny. Podział ten ułatwia interpretację wyników badań laboratoryjnych. Dla szlaku wewnątrzpochodnego mechanizmem zapłonowym jest aktywacja czynnika XII w kontakcie z obcą powierzchnią, np. ze szkłem lub celitem, a *in vivo* – z kolagenem. Obecnie uważa się, że kluczową rolę w inicjowaniu krzepnięcia *in vivo* odgrywa szlak czynnika tkankowego, zwany dawniej szlakiem zewnątrzpochodnym. Szlak wewnątrzpochodny może odgrywać rolę w propagacji zakrzepów tętnicznych.

„Kaskada” krzepnięcia krwi zostaje uruchomiona w momencie pojawienia się czynnika tkankowego we krwi w wyniku uszkodzenia lub aktywacji komórek śródbłonka naczyniowego (ryc. 2.5). Czynnik tkankowy tworzy kompleks z czynnikiem VII lub czynnikiem VIIa. Główną funkcją kompleksu TF-VIIa związanego z powierzchnią komórek jest konwersja czynnika X



Ryc. 2.5. Aktualny schemat krzepnięcia krwi *in vivo*. TF – czynnik tkankowy; vWF – czynnik von Willebranda; TFPI (tissue factor pathway inhibitor) – inhibitor zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Czynniki aktywne oznaczono literą a.

w czynnik Xa i czynnika IX w IXa. Czynnik Xa powstający na powierzchni komórek (np. monocytów i fibroblastów), zawierających TF i fosfolipidy, tworzy kompleks ze swoim kofaktorem – czynnikiem Va, po czym powoduje zmianę protrombiny w trombinę (faza „inicjacji” krzepnięcia). Po utworzeniu małej ilości trombiny kompleks TF-VIIa-Xa jest szybko inaktywowany przez swoisty inhibitor zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia – TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Ilość trombiny powstającej drogą zewnątrzpochodną na tym etapie aktywacji krzepnięcia jest za mała, aby spowodować utworzenie stabilnej fibryny, ale wystarczająca do aktywacji płytek krwi, oddzielenia czynnika VIII od czynnika von Willebranda, aktywacji czynników V i VIII oraz czynnika XI (faza „amplifikacji”). Dzięki tym procesom małe ilości trombiny uruchamiają generację dużych, wystarczających dla zapewnienia sprawnej hemostazy ilości tego białka (faza „propagacji” krzepnięcia).

Czynnik IXa, powstający pod wpływem kompleksu TF-VIIa na powierzchni aktywowanych płytek tworzy kompleks (tzw. tenazę) z fosfolipidami oraz czynnikami VIIIa i X, w którym aktywowany jest czynnik X. Następnie czynnik Xa na powierzchni płytkowych fosfolipidów tworzy kompleks (tzw. protrombinazę) z czynnikiem Va i protrombiną. W kompleksie tym powstaje trombina w dużym stężeniu pozwalającym na utworzenie stabilnej fibryny. Fizjologicznym aktywatorem czynnika XI nie jest czynnik XIIa, lecz trombina utworzona na szlaku zewnątrzpochodnego krzepnięcia. Ten pogląd pozwala tłumaczyć do niedawna niezrozu-

miałe, ale zgodne obserwacje, że głębokie niedobory czynnika XII, prekalkineiny i wielkocząsteczkowego kininogenu nie powodują skazy krwotocznej.

Należy podkreślić, że aktywacja krzepnięcia nie przebiega fizjologicznie ze znaczącą szybkością w fazie płynnej osocza, lecz zachodzi na powierzchni komórek. Na fosfolipidach aktywnych płytek krwi, monocytów, fibroblastów, mikrocząstek pochodzących z płytek krwi, megakariocytów, komórek śródbłonna, leukocytów, a także zmienionych komórek śródbłonna tworzenie trombiny zachodzi znacznie szybciej, niż wtedy, gdy wolne czynniki krzepnięcia reagują ze sobą w roztworze. W uproszczeniu aktywację krzepnięcia krwi można zatem przedstawić jako proces powstawania czterech kompleksów enzymatycznych: tenazy zewnątrzpochodnej (TF-VIIa-X), kompleksu aktywacyjnego czynnika IX (TF-VIIa-IX), tenazy wewnętrznej (VIIIa-IXa-X) i protrombinazy (Va-Xa-II).

Ostatnią fazę krzepnięcia stanowi przejście fibrynogenu w sieć przestrzenną fibryny. Fibrynogen składa się z dwóch symetrycznych podjednostek połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Trombina odszczepia od fibryny dwie pary drobnych peptydów, zwanych fibrynopeptydami A i B. Pozostały fragment wielkocząsteczkowy, tzw. monomer fibryny, w fizjologicznych warunkach polimeryzuje w sieć fibryny. Kończącym etapem jest stabilizacja polimeru fibryny. Katalizatorem tej reakcji jest czynnik XIII, który pod wpływem trombiny i w obecności jonów wapnia nabiera właściwości transglutaminazy. Czynnik XIIIa wprowadza kowalencyjne wiązania krzyżowe między sąsiadujące ze sobą monomery fibryny.

2.2.3. Endogenne inhibitory krzepnięcia

W utrzymaniu płynności krążącej krwi istotną rolę odgrywają naturalne inhibitory krzepnięcia. Największe znaczenie przypisuje się antytrombinie (AT), układowi inhibitorowemu białka C i inhibitorowi zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia (TFPI).

AT należy do dużej rodziny serpin – białek inaktywujących proteazy serynowe. Białko to wiąże w stechiometryczny kompleks i unieczynnia trombinę, a także aktywowane czynniki X, IX, XI i XII, wielkocząsteczkowy kininogen (HMWK) oraz czynnik VIIa związany z TF. Heparyna zwiększa około 1000 razy szybkość inaktywacji trombiny przez AT, którą dawniej nazywano kofaktorem heparyny (choć w istocie to heparyna jest kofaktorem AT). W cząsteczce AT znajdują się dwa miejsca reaktywne: jedno niezbędne dla wiązania heparyny, a drugie – do interakcji z trombiną. Po przyłączeniu heparyny dochodzi do zmian w konformacji przestrzennej AT, które powodują większą dostępność miejsca wiążącego trombinę. Scharakteryzowano swoisty inhibitor samej tylko trombiny – kofaktor heparyny II, który także jest serpiną. Neutralizację trombiny przez ten inhibitor przyspieszają siarczan dermatanu i heparyna. Inhibitorami trombiny i niektórych innych proteaz krzepnięcia są α_2 -makroglobulina, α_1 -antytrypsyna i inhibitor C1-esterazy.

Pojawienie się trombiny we krwi uruchamia układ antykoagulacyjny białka C, w skład którego poza białkiem C wchodzi: trombomodulina (TM) – białko receptorowe śródbłonna naczyniowego dla trombiny, śródbłonkowy receptor dla białka C (endothelial cell protein C receptor – EPCR) i białko S. Podobnie jak czynniki zespołu protrombiny, białko C i białko S wymagają witaminy K dla swej ostatecznej syntezy. Pierwszą reakcją tego układu jest wiązanie trombiny z TM na powierzchni śródbłonna. Po przyłączeniu do TM trombina traci zdolność wykrzepiania fibrynogenu oraz aktywacji innych czynników i płytek, natomiast szybko aktywuje białko C w proteazę serynową. EPCR występuje głównie w śródbłonku dużych naczyń. Wiązanie białka C do tego receptora może następować zarówno przy obecności, jak i braku TM. Kompleks białko C-EPCR jest szybciej aktywowany przez trombinę związaną z TM niż

wolne białko C. Aktywowane białko C hamuje proces krzepnięcia, inaktywując czynniki Va i VIIa poprzez częściową ich proteolizę. Inhibitorem aktywowanego białka C jest *PCI-protein C inhibitor*, który unieczynnia aktywowane białko C, a także hamuje kompleks trombina-TM, aktywujący białko C.

TFPI jest białkiem występującym w ludzkim osoczu, głównie w formie związanej z lipoproteinami. Jego zawartość w osoczu wzrasta kilkakrotnie po wstrzyknięciu heparyny (zarówno niefrakcjonowanej, jak i drobnocząsteczkowej), która uwalnia TFPI z puli związanej z glikozaminoglikanami na powierzchni śródbłonna. W obecności czynnika Xa inhibitor ten wiąże i inaktywuje kompleks TF-VIIa. Właściwości głównych inhibitorów krzepnięcia zestawiono w tabeli 2.4.

Do listy naturalnych inhibitorów krzepnięcia należy również inhibitor proteaz zależny od białka Z. Inhibitor ten przy udziale białka Z inaktywuje czynnik Xa związany z fosfolipidami. Białko Z, wytwarzane w hepatocytach przy udziale witaminy K, wykazuje duże podobieństwo strukturalne do czynników zespołu protrombiny.

TABELA 2.4. Charakterystyka głównych endogennych inhibitorów krzepnięcia

	Cechy charakterystyczne	Masa cząsteczkowa (kD)	Stężenie w osoczu (mg/l)	Główne miejsce syntezy	Chromosom
Antytrombina	Wiąże heparynę i siarczan heparanu, unieczynnia trombinę i aktywne cz. krzepnięcia: X, IX, XI, XII, wysokocząsteczkowy kininogen, kompleks TF-VIIa	58	150	Wątroba	1q23-q25
Kofaktor heparynowy II	Wiąże heparynę, siarczan heparanu i siarczan dermatynu, neutralizuje trombinę	66	70	Wątroba	22q11
Białko C	Po aktywacji unieczynnia cz. Va i VIIa	62	4	Wątroba (zależność od witaminy K)	2q13-q14
Białko S	Wiąże się z C4BP układu dopełniacza, w postaci wolnej kofaktor białka C	75	26	Wątroba (zależność od witaminy K)	3q11.2
Inhibitor zewnętrzno-pochodnego szlaku krzepnięcia (TFPI)	W osoczu związany z lipoproteinami, hamuje cz. Xa, VIIa	34	0,1	Śródbłonek	2q31-32.1
Białko Z w kompleksie z inhibitorem proteaz – PZPI	Inaktywuje cz. Xa	62	2,9 (w kompleksie z PZPI)	Wątroba (zależność od witaminy K)	13q34

Skutki uczynnienia krzepnięcia są ograniczone także przez rozcieńczenie aktywowanych czynników krzepnięcia i aktywowanych płytek w krążącej krwi oraz w wyniku oczyszczenia krwi z tych produktów przez układ siateczkowo-śródbłonkowy.

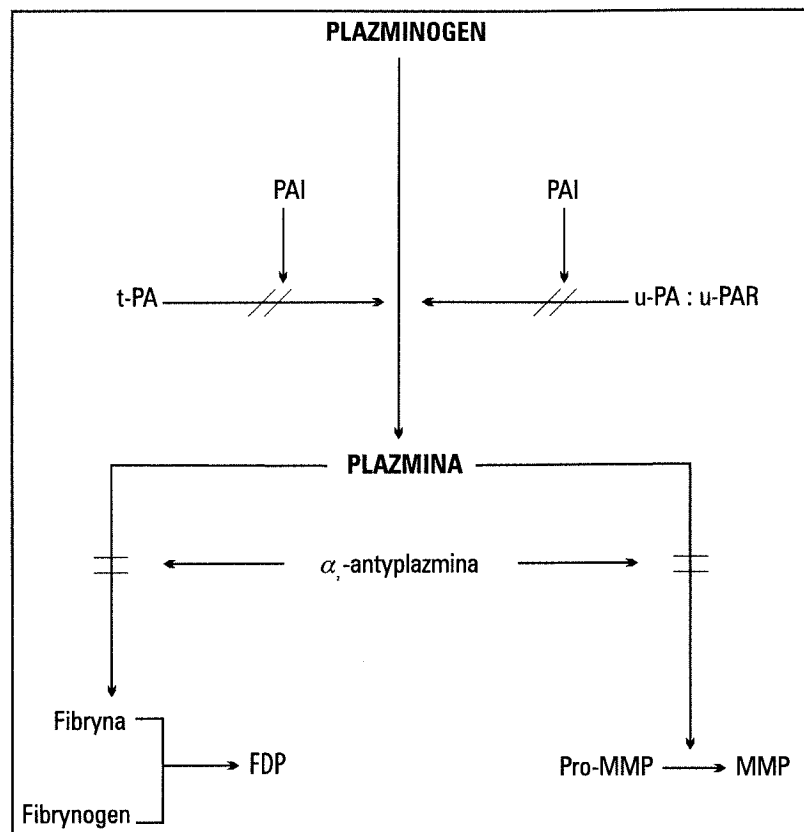
2.3. Fibrynoliza

Fibrynoliza, czyli rozpuszczenie zakrzepu, może zachodzić pod wpływem enzymów proteolitycznych osocza i komórek. Enzym fibrynolityczny osocza – plazmina, powstaje z nieczynnego proenzymu – plazminogenu (ryc. 2.6). Przekształcenie plazminogenu w plazminę następuje przy udziale tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) lub aktywatora typu urokinazy (u-PA). u-PA wiąże się ze swoistym receptorem na powierzchni komórek (u-PAR) i aktywuje związany z komórkami plazminogen. Oba aktywatory są syntetyzowane w postaci jednołańcuchowych prekursorów: t-PA – głównie w komórkach śródbłonna naczyń, u-PA – w wielu różnych komórkach i narządach, w tym w nerkach. Drogą ograniczonej proteolizy przez kalikreinę lub plazminę aktywatory te są przekształcane w formy dwułańcuchowe. Szybkość aktywacji plazminogenu zwiększa się 200-400-krotnie, gdy białko to i t-PA są przyłączone do fibryny. Pewną zdolność do aktywacji plazminogenu mają kalikreina i czynnik XIIa. Streptokinaza i stafylokinaza – białka wytwarzane przez paciorkowce i gronkowce, są potężnymi egzogennymi aktywatorami fibrynolizy. Oba białka tworzą z plazminogenem kompleksy o właściwościach aktywatorów plazminogenu.

Wyróżnia się dwa główne inhibitory aktywatorów plazminogenu – PAI-1 i PAI-2. Pierwszy jest białkiem wytwarzanym w komórkach śródbłonna wątroby i megakariocytach. Jest uwalniany ze śródbłonna i jeżeli napotka t-PA lub u-PA, wiąże je i inaktywuje. PAI-1 nie tworzy natomiast kompleksu z jednołańcuchowym u-PA (prourokinazą). PAI-2 występuje w łożysku, monocytach, makrofagach i prawdopodobnie w innych typach komórek. Inhibitor ten aktywuje szybciej u-PA niż t-PA. Głównym osoczym inhibitorem plazminy jest α_2 -antypłazmina. Inhibitor ten z dużą szybkością tworzy z plazminą kompleks stechiometryczny. Po wyczerpaniu się α_2 -antypłazminy, pojawiająca się we krwi plazmina jest zobojętniana przez α_2 -makroglobulinę. Właściwości głównych składników układu fibrynolitycznego zestawiono w tabeli 2.5.

Inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) hamuje fibrylizę poprzez odszczepianie C-końcowych reszt lizyny (i arginy) z fibryny. Od dawna wiadomo, że C-końcowe reszty lizyny w fibrynie są niezbędne do wiązania plazminogenu i t-PA. Należy dodać, że plazminę hamuje wiele egzogennych inhibitorów, takich jak inhibitor sojowy tripsyny i stosowana w leczeniu aprotynina. Lek antyfibrynolityczny – kwas traneksamowy – hamuje przyłączanie plazminogenu do fibryny poprzez blokowanie w cząsteczce plazminogenu miejsc wiążących lizynę.

Aktywacja plazminogenu pod wpływem t-PA ma znaczenie przede wszystkim w rozpuszczaniu fibryny i tym samym – w utrzymywaniu drożności naczyń krwionośnych. Plazmina tworząca się przy udziale u-PA związanego ze swoim receptorem na powierzchni komórek powoduje przekształcenie nieczynnych metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (pro-MMP) w aktywne metaloproteinazy (MMP), które degradują składniki macierzy. Z tego względu u-PA przypisuje się ważną rolę w przebudowie tkanek i migracji komórek, czyli takich procesach, jak angiogeneza, gojenie ran oraz wzrost nowotworów i tworzenie przerzutów.



Ryc. 2.6. Układ fibrynolityczny. t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA – aktywator plazminogenu typu urokinazy; u-PAR – receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazy; PAI – inhibitor aktywatora plazminogenu; FDP – produkty degradacji fibrynogenu i fibryny; Pro-MMP – nieczynne metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej; MMP – aktywne metaloproteinazy.

W czasie trawienia fibryny i fibrynogenu powstają produkty degradacji (*fibrinogen/fibrin degradation products* – FDP), które są oznaczone jako fragmenty X, Y, D i E.

Podczas trawienia fibryny stabilizowanej przez czynnik XIII zamiast fragmentu D powstaje D-dimer, w którym dwie cząsteczki połączone są wiązaniami krzyżowymi γ - γ . Jego okres półtrwania wynosi ~8 godz., jest usuwany z osocza przez układ siateczkowo-śródbłonkowy i przez nerki. Podwyższone stężenie D-dimeru we krwi, będące wynikiem degradacji zwiększonej ilości fibryny, może pośrednio świadczyć o istnieniu procesów zakrzepowych w organizmie.

Podobnie jak krzepnięcie krwi, także fibrynoliza zachodzi w warunkach fizjologicznych głównie na powierzchniach, a tylko w patologii, w warunkach krańcowych lub w czasie leczenia trombolitycznego – w fazie płynnej osocza. Receptory dla plazminogenu i u-PA oraz aneksynę II, która wiąże plazminogen i t-PA, wykryto na powierzchni różnych komórek, w tym na komórkach śródbłonka naczyń. Oprócz tych receptorów, które można nazwać receptorami aktywującymi, istnieją także receptory odpowiedzialne za usuwanie składowych fibryno-

TABELA 2.5. Charakterystyka głównych składników układu fibrynolitycznego

Składnik	Masa cząsteczkowa (kD)	Stężenie w osoczu (mg/l)	Główne miejsce syntezy	Funkcja
Plazminogen	92	140-200	Wątroba	Proenzym
Plazmina	85	–		Proteaza
t-PA	72	0,005	Śródbłonek	Aktywator Plg
u-PA	54	0,008	Śródbłonek, nerki	Aktywator Plg
u-PAR	55-60			Receptor u-PA
PAI-1	52	0,02	Śródbłonek, megakariocyty	Inhibitor PA
PAI-2	60	< 0,005	Łożysko, M/M	Inhibitor PA
α_2 -AP	70	70	Nerki, wątroba	Inhibitor Plm

Objaśnienia: t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA – aktywator plazminogenu typu urokinazy; u-PAR – receptor u-PA; PAI-1 – inhibitor 1 aktywatora plazminogenu; PAI-2 – inhibitor 2 aktywatora plazminogenu; α_2 -AP – α_2 -antypłazmina; Plg – plazminogen; Plm – plazmina; M/M – monocyty/makrofagi.

lizy z krążącej krwi. Wychwytywanie t-PA i u-PA przez receptory wątrobowe jest prawdopodobnie główną przyczyną zaledwie kilkuminutowego okresu ich półtrwania w krwiobiegu.

2.4. Ściana naczyń krwionośnych

W hemostazie uczestniczy głównie *intima* – błona wewnętrzna ściany naczyniowej utworzona z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka oraz podśródbłonkowej tkanki łącznej. Zwróconą do światła naczyń powierzchnię komórek śródbłonka pokrywa glikokaliks – mieszanina glikozaminoglikanów i glikolipidów. Około 80% tych glikozaminoglikanów stanowi siarczan heparanu mający właściwości antykoagulacyjne.

Prawidłowy śródbłonek naczyń krwionośnych jest uważany za jedyną fizjologiczną powierzchnię, która nie tylko nie jest trombogenna, lecz dysponuje czynnym potencjałem przeciwwakrzepowym. Składają się na niego:

1. Uwalnianie prostacykliny i tlenku azotu (NO), które hamują adhezję i agregację płytek, a nawet mogą powodować rozproszenie już powstałych agregatów.
2. Ekspresja powierzchniowa ektonukleotydaz – enzymów rozkładających ADP do adenyzy, która hamuje agregację płytek.
3. Obecność na powierzchni komórek śródbłonka naturalnych glikozaminoglikanów glikokaliksu, obdarzonych antykoagulacyjną aktywnością.
4. Obecność na powierzchni komórek śródbłonka trombomoduliny, która wiążąc trombinę, inicjuje antykoagulacyjne działanie układu białka C.
5. Uwalnianie tkankowego aktywatora fibrynolizy, co umożliwia rozpuszczenie fibryny.

Do powierzchni komórek śródbłonka mogą być związane białka aktywne w krzepnięciu i fibrynolizie. Należą do nich czynniki IX i X, trombina, TFPI, plazminogen, t-PA, u-PA i plazmina. W komórkach śródbłonka zachodzi katabolizm oraz inaktywacja amin katecholowych i serotoniny.

W stanach patologicznych może dochodzić do upośledzenia przeciwzakrzepowych właściwości śródbłonna. Endotoksyny i prozapalne cytokiny (IL-1 i TNF) wywołują w komórkach śródbłonna syntezę i ekspresję powierzchniową TF, uwalniają z tych komórek czynnik aktywujący płytki (PAF), czynnik von Willebranda oraz PAI, tłumią ekspresję trombomoduliny oraz syntezę i uwalnianie t-PA. Wymienione powyżej mediatory stanu zapalnego powodują ekspozycję selektyn i integryn – białek uczestniczących we wzajemnej adhezji komórek – na powierzchni komórek śródbłonna, leukocytów i płytek. Śródbłonek może ulegać uszkodzeniu także w hiperhomocysteinemii, pod wpływem lipoprotein niskiej gęstości (*low-density lipoprotein* – LDL) lub kompleksów immunologicznych. Zjawiska te odgrywają istotną rolę w ograniczaniu drożności mikrokrążenia przez zlepy płytkowe, leukocytowo-płytkowe i w powstawaniu mnogich mikrozakrzepów w przebiegu procesów zapalnych.

Zalecane piśmiennictwo

1. Bennett J.S.: Overview of megakaryocyte and platelet biology. [W:] Marder V.J. i wsp. (red.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013, 341-348.
2. Bouwens E.A.M., Stavenuiter F., Mosnier L.O.: Mechanism of anticoagulant and cytoprotective actions of protein C pathway. *Thromb Haemost* 2013, 11, 242-253.
3. Chung D.W., Xu W., Davie E.W.: The blood coagulation factors and inhibitors: their primary structure, complementary DNAs, genes and expression. [W:] Marder V.J. i wsp. (red.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013; 110-145.
4. Huntington J.A.: Thrombin inhibition by the serpins. *Thromb Haemost* 2013, 11, 254-264.
5. Krisinger M.J., Conway M.: Role of the endothelium in hemostasis. [W:] Marder V.J. i wsp. (red.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013, 569-578.
6. Ozaki Y., Suzuki-Inoue K., Inoue O.: Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GpIb-IX-V, and CLEC-2. *Thromb Haemost* 2013, 11, 330-339.
7. Walsh P.N.: The role of platelets in blood coagulation. [W:] Marder V.J. i wsp. (red.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013, 468-474.
8. White G.C. i wsp.: Overview of basic coagulation and fibrinolysis. [W:] Marder V.J. i wsp. (red.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2013, 103-109.

NIEDOBORY ODPORNOŚCI (WRODZONE I NABYTE)

Jacek Roliński

Niedoborami odporności nazywamy stany chorobowe związane z częściową lub całkowitą niewydolnością układu odpornościowego. W niedoborach odporności zmniejszona odpowiedź organizmu (lub jej brak) na antygeny przejawia się najczęściej w postaci długotrwałych, nawracających zakażeń o nietypowym przebiegu lub rzadziej autoimmunizacji. W praktyce lekarskiej obserwujemy chorych skarżących się na nawracające zakażenia o ciężkim przebiegu, które nie ustępują pomimo intensywnej antybiotykoterapii. Może to być jeden z pierwszych objawów niewydolności układu odpornościowego.

Niedobory odporności stanowią trudny problem diagnostyczny i z uwagi na brak odpowiednich standardów postępowania są zbyt rzadko rozpoznawane. Należy pamiętać, że diagnostyka zakażeń (wykrycie rodzaju drobnoustroju, który je wywołuje) u chorych z niedoborami odporności może być utrudniona ze względu na brak lub obecność w niewielkim stężeniu swoistych przeciwciał, wykorzystywanych w diagnostyce zakażeń. Istnieje również możliwość występowania fałszywie ujemnych wyników badań serologicznych. Brak lub zmniejszenie swoistych odczynów serologicznych w przebiegu niedoborów odporności wynika z osłabionej odpowiedzi limfocytów na antygeny drobnoustrojów.

Ważnym elementem postępowania diagnostycznego jest wywiad dotyczący chorób przebytych i obecności podobnych objawów u krewnych. Na przykład częste i ciężkie zakażenia u noworodka do 3. miesiąca życia sugerują zaburzenia dotyczące limfocytów T, granulocytów lub układu dopełniacza, natomiast małe jest prawdopodobieństwo niedoboru przeciwciał, które w tym okresie życia pochodzą od matki i są obecne w ustroju dziecka. Objawy selektywnego niedoboru immunoglobuliny IgA rzadko pojawiają się przed 18. miesiącem życia. Dokładne prześledzenie rozwoju dziecka (mała masa urodzeniowa, zaburzenia wzrostu, długotrwałe gojenie się kikuta pępowiny), ciężki przebieg zakażeń w dzieciństwie (np. ospa wietrzna, odra), zaburzenia odporności lub przedwczesne zgony u krewnych mogą sugerować konieczność diagnostyki w kierunku niedoborów odporności. Chorzy z zaburzeniami odporności powinni być kierowani do specjalisty (immunologa klinicznego) celem wczesnego zdiagnozowania choroby i rozpoczęcia leczenia, co pozwoli zapobiec lub zahamować rozwój trwałych zmian związanych z przewlekłymi zakażeniami. Zakażenia u pacjentów z zaburzeniami odporności najczęściej dotyczą górnych dróg oddechowych, układu moczowego, przewodu pokarmowego i skóry. U chorych z zaburzeniami odporności stwierdza się także zwiększoną zapadalność na nowotwory złośliwe. Typowym przykładem jest zwiększona, w porównaniu z osobami zdrowymi, zapadalność na chłoniaki złośliwe u chorych na AIDS.