

Lea Vuletić

ZAUSTAVLJANJE KRVARENJA – FIZIOLOŠKI MEHANIZMI

Nastavni tekst za studente Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2021.

Autorica

doc. dr. sc. Lea Vuletić, Katedra za fiziologiju Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Kao autorica ovoga nastavnog teksta jamčim da je riječ o originalnom i vlastitom autorskom djelu, koje je potpuno samostalno napisano, te da su dijelovi preuzeti iz drugih izvora jasno i nedvojbeno citiranjem naznačeni kao tuđa autorska djela. Isto tako jamčim da su navedene ilustracije originalne i da su moje autorsko djelo te da nema trećih osoba koje bi na njih polagale autorska prava.

Lektorica

Jasna Kufner, prof.

SADRŽAJ

1. UVOD	5
2. SUDIONICI HEMOSTAZE I NJIHOVE ULOGE U ZAUSTAVLJANJU KRVARENJA. 7	
2.1. Stijenke krvnih žila i hemostaza	7
2.2. Trombociti i hemostaza	10
2.3. Plazmatski čimbenici zgrušavanja	15
3. MEHANIZAM ZGRUŠAVANJA KRVI	21
3.1. Kaskadni koagulacijski model.....	21
3.2. Revidirani model koagulacijskoga procesa	25
3.3. Fibrinoliza.....	31
4. LITERATURA.....	33

Nastavni tekst pod naslovom „Zaustavljanje krvarenja – fiziološki mehanizmi“, autorice Lea Vuletić pozitivno je ocijenjen 5. listopada 2021. od strane Povjerenstva za vrednovanje nastavnog teksta u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Peroš, Katedra za farmakologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. doc. dr. sc. Ivan Zajc, Zavod za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
3. doc. dr. sc. Tomislav Kelava, Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

i kao takav ispunjava uvjete da postane nastavni materijal te se objavljuje na mrežnim stranicama Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za potrebe nastave iz predmeta Fiziologija.

1. UVOD

Da bi srčano-žilni sustav učinkovito ostvarivao svoje fiziološke zadaće, krv koja ga ispunjava i njime kontinuirano protječe ne smije ga napustiti i mora trajno biti u tekućemu stanju. Oba ta preduvjeta učinkovite cirkulacijske funkcije mogu biti narušena. Krv će se iz sustava gubiti prekine li se kontinuitet njegovih stijenki, a zgruša li se unutar krvnih žila, umanjit će se ili onemogućiti prokrvljivanje tkiva s potencijalno teškim, pa i smrtonosnim posljedicama.

Rizik od ozljede tkiva s posljedičnim krvarenjem moguće je umanjiti, ali nemoguće potpuno ukloniti, pa organizam raspolaže fiziološkim mehanizmima koji služe zaustavljanju krvarenja. Čimbenici koji taj proces omogućuju ugrađeni su i u stijenke krvnih žila i u sastav krvi, spremni aktivirati se i reagirati na ozljedu u najkraćem roku. Njihovom aktivacijom krv na mjestu ozljede izgubi obilježje tekućine, odnosno zgruša se, i tako stvori fizičku barijeru koja će spriječiti njezino daljnje istjecanje. Stvaranje krvnog ugruška jest dakle zaštitni mehanizam, nužan kad nastane ozljeda, ali prihvatljiv samo tada i samo na mjestu ozljede.

Ipak, krv se može zgrušati i unutar srčano-žilnoga sustava odnosno može doći do stvaranja tromba uz unutarnju stijenku srca ili krvnih žila. U normalnim okolnostima to se ne događa, no mnoga nasljedna ili stečena stanja i predisponirajući čimbenici mogu uzrokovati sklonost intravaskularnoj aktivaciji komponenata hemostatskoga sustava (1). Otkine li se tromb od mjesta na kojemu je nastao, naziva se embolusom. Nošen krvnom strujom, embolus može izazvati začepljenje udaljenih krvnih žila. Prirodna sposobnost zgrušavanja krvi može također biti smanjena – kako zbog patoloških uzroka tako i zbog primjene pojedinih lijekova – pa će takva stanja biti obilježena blažim ili težim stupnjem sklonosti krvarenju.

Isključe li se patološki uzroci, krvarenje nastupa kao posljedica ozljede ili izvođenja invazivnih medicinskih (kirurških) zahvata, pa tako i stomatoloških. Nazivom „hemostaza“ (grč. *haimóstasis*) označuje se fiziološki, prirodni proces zaustavljanja krvarenja, ali i medicinski postupci kojima se umanjuje i zaustavlja gubitak krvi, poput kompresije krvne žile koja krvlju opskrbljuje ozlijeđeni dio tijela ili pritiska na ranu.

Većinu zahvata koji se uobičajeno provode u stomatološkim ordinacijama prati mali gubitak krvi i krvarenje se zaustavlja spontano ili jednostavnim pomoćnim mjerama poput, primjerice, pritiska na ekstrakcijsku ranu zagrizom u sterilni tupfer nakon vađenja zuba. No stomatolozi se u svojoj praksi mogu koristiti dodatnim materijalima i metodama kojima nakon provedenoga zahvata potpomažu hemostatski proces. Takve se mjere uobičajeno primjenjuju u sklopu skrbi za pacijente koji uzimaju lijekove iz skupine oralnih antitrombotika. Ti lijekovi umanjuju rizik za razvoj tromboembolijskih stanja ometajući djelovanje komponenata hemostatskoga sustava. Zato, očekivano, uzimanje antitrombotika može otežati zaustavljanje krvarenja kad je to potrebno.

Svrha ovoga teksta jest dati sažet pregled zbivanja koja omogućuju zaustavljanje krvarenja nakon ozljede i dopuniti sadržaj koji na ovu temu donosi udžbenik iz predmeta Fiziologija za studente integriranoga preddiplomskog i diplomskog studija dentalne medicine (Arthur C. Guyton i John E. Hall. Medicinska fiziologija – udžbenik, 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2017.).

2. SUDIONICI HEMOSTAZE I NJIHOVE ULOGE U ZAUSTAVLJANJU KRVARENJA

Svrha aktivacije hemostatskoga sustava jest ograničiti gubitak krvi i, ako je moguće, zaustaviti krvarenje. U pojedinim situacijama, ovisno o načinu ozljeđivanja, mjestu i težini ozljede, fiziološki mehanizmi mogu biti nedostatni, zbog čega će zaustavljanje krvarenja zahtijevati primjenu mjera prve pomoći i/ili (hitno) bolničko zbrinjavanje.

Jednom aktiviran, hemostatski proces mora biti kontroliran. Drugim riječima, mora biti zaustavljen kad postigne cilj i ograničen samo na mjesto ozljede, odnosno na područje na kojemu je potreban. To se postiže međudjelovanjem mnogih sudionika, tj. odnosom aktivnosti tvari prokoagulantnog i antikoagulantnog učinka.

Tri su ključna sudionika fizioloških procesa kojima se zaustavlja krvarenje:

- stijenke krvnih žila
- trombociti i trombocitni faktori
- plazmatski čimbenici zgrušavanja (koagulacijske bjelancevine i kalcijevi ioni).

2.1. Stijenke krvnih žila i hemostaza

Neposredna je reakcija krvnih žila na ozljedu vazospazam, stezanje mišićnoga sloja žilne stijenke. Posredovano je živčanim refleksima, no potiču ga i podupiru i tvari koje se na mjestu ozljede oslobađaju iz okolnih stanica (oštećenoga tkiva) i aktiviranih trombocita. Smanjenjem žilnoga promjera i, posljedično, krvnoga protoka donekle se umanjuje i krvarenje. Međutim, žilne stijenke doprinose hemostazi i na drugi, još važniji način. Zbog ozljede krv dolazi u doticaj s vanjskim slojevima žilne stijenke i okolnim tkivnim elementima s kojima u normalnim okolnostima ne može ostvariti izravan kontakt. Za razliku od neoštećenoga

endotela, koji ima antikoagulantna svojstva, pojedine komponente subendotelnih slojeva djeluju kao pokretači hemostatskih zbivanja aktivacijom krvnih komponenata hemostatskoga sustava (trombocita i plazmatskih koagulacijskih bjelančevina). Prokoagulantnim sastavnicama žilne stijenke pripadaju ponajprije von Willebrandov faktor i kolagen, na koje se vežu trombociti, te tkivni faktor koji u interakciji s krvnim koagulacijskim faktorom VII započinje proces zgrušavanja krvi (2).

Von Willebrandov faktor velik je multimerni glikoprotein. Sintetiziraju ga endotelne stanice i pohranjuju u svoja citosolna zrnca zvana Weibel-Paladeova tjelešca. Iz njih ga izlučuju u izvanstanični prostor, zbog čega postaje dijelom subendotelne matriksa, ali i u krv, gdje djeluje kao nosač koagulacijskoga faktora VIII i štiti ga od prerane proteolitičke degradacije. Osim endotelne stanice, von Willebrandov faktor sintetiziraju i megakariociti, pa se nalazi u α -zrncima cirkulirajućih trombocita. Međutim, iz trombocita se oslobađa tek nakon njihove aktivacije te nakon oslobađanja potiče adheziju trombocita uz ozlijeđeno tkivo i njihovo međusobno povezivanje (3).

Tkivni faktor integralni je membranski glikoprotein. Kao što njegov naziv i upućuje, nalazi se ekstravaskularno, ugrađen u membrane stanica koje nisu sastavni dio krvi ili u doticaju s njom. Osobito je izražen u membranama fibroblasta adventicije krvnih žila, što je i razumljivo s obzirom na to da žilne stijenke omeđuju anatomske prostor koji krv ne bi smjela napuštati. U slučaju ozljede tkivni faktor veže krvni čimbenik zgrušavanja VII. Stvaranjem njihova kompleksa (usidrena na stanične površine s pomoću tkivnoga faktora) počinje koagulacijski proces koji vodi prema stvaranju fibrina (4, 5).

Tkivni faktor – pokoja crtica više

Nedostatak ili nedostatna funkcija tkivnoga faktora nisu utvrđeni kod čovjeka. Istraživanja na životinjskim modelima otkrivaju da je razlog tomu nespojivost takva stanja sa životom (smrt nastupa već u embrionalnom stadiju razvoja) (6). S druge strane, u različitim patološkim stanjima izražaj tkivnoga faktora može biti prekomjeran, a moguća je i njegova ekspresija u stanicama koje ga inače ne izražavaju, poput endotelnih stanica i monocita. Ekspresiju tkivnoga faktora u membranama tih stanica mogu inducirati bakterijski endotoksini, hipoksični uvjeti te neki upalni medijatori. Kao cirkulirajući nositelji tkivnoga faktora mogu djelovati i tzv. mikročestice ili mikrovezikule, sićušni fragmenti staničnih membrana otpušteni iz aktiviranih ili apoptotičnih stanica čija prokoagulantna svojstva pojačava sadržaj anionskih fosfolipida. I stanice mnogih zloćudnih tumora konstitucijski izražavaju visoke razine tkivnoga faktora i s pomoću citokina koje otpuštaju induciraju njegovu ekspresiju u endotelnim stanicama, monocitima i makrofagima. S jedne strane, izražaj tkivnoga faktora na lokalnim makrofagima i posljedična aktivacija koagulacijskoga mehanizma sa stvaranjem fibrina uza sâm tumor mogu se interpretirati kao (vrlo jednostavan) pokušaj organizma da ograniči tumor i njegovo širenje. No, s druge strane, smatra se kako ta pojava, bilo izravno bilo neizravno, povećava rizik od tromboze, tromboembolije i kronične diseminirane intravaskularne koagulacije kod oboljelih od malignih bolesti (Trousseauov sindrom) te, moguće, utječe na (brži) tumorski rast, angiogenezu i metastaziranje (5, 7, 8).



Prisutnost membranskih čestica koje sadržavaju tkivni faktor utvrđena je i u slini (9). Zbog toga, kao i zbog sadržaja komponenata antikoagulantnoga djelovanja (10), slina na hemostatske procese u usnoj šupljini u određenoj mjeri može utjecati i dodatnim mehanizmima izuzev nespecifičnoga efekta razrjeđenja krvi pri ozljedi oralnih tkiva.

2.2. Trombociti i hemostaza

Trombociti ili krvne pločice su maleni diskoidni stanični elementi (2 – 3 μm u promjeru, volumena od oko 10 fL) koji nastaju otkidanjem djelića citoplazme megakariocita, velikih prekursornih stanica u koštanoj srži. Trombociti nisu prave stanice, nemaju jezgru, a time ni sposobnost sinteze novih enzima. Njihov je životni vijek u krvnoj struji samo od osam do deset dana, pa ih je nužno kontinuirano proizvoditi kako bi se njihova koncentracija održavala stabilnom. Vrijednosti unutar raspona od 150 do 400 x 10⁹ trombocita po litri krvi smatraju se urednim nalazom. U normalnim okolnostima u krvi cirkuliraju kao inaktivne pločice, ne pričvršćuju se uz endotel i ne povezuju s drugim krvnim stanicama ili međusobno. No dogodi li se ozljeda, adherirat će uz ozlijeđeno tkivo vežući se za subendotelne bjelancevine (kolagen, von Willebrandov faktor, fibronektin, laminin) i pritom se aktivirati. Aktivacija im omogućuje da različitim mehanizmima pridonesu zaustavljanju krvarenja (11).

Jedan od najvažnijih posrednika inicijalne trombocitne adhezije jest glikoproteinski transmembranski kompleks GPIb-IX-V, drugi najzastupljeniji receptorski kompleks u membrani trombocita (u membranu pojedine stanice ugrađeno ih je od 25 000 do 35 000). S njegovom podjedinicom GPIb α povezuje se von Willebrandov faktor pričvršćen uz subendotelni kolagen. Povezivanje von Willebrandova faktora s trombocitnim receptorima olakšavaju njegove konformacijske promjene uzrokovane smičnim silama koje proizvodi istjecanje krvi. Istodobnim se povezivanjem multimernih molekula von Willebrandova faktora u mrežolike strukture dodatno olakšava izvlačenje trombocita iz krvi. Tako se omogućuje brzo prijanjanje trombocita uz ozlijeđeno tkivo u početnim fazama hemostaze. Trombociti se uz kolagen pričvršćuju i izravno, s pomoću drugih membranskih receptora, osobito glikoproteinskoga kompleksa GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) i GPVI. Vezanje trombocita uz tkivne komponente ujedno pokreće unutarstanične signalne putove koji omogućuju njihovu daljnju aktivaciju (12, 13).

Aktivacijom se trombociti izrazito mijenjaju, i morfološki i funkcijski. Remodeliranjem citoskeleta i puštanjem prstolikih izdanaka (lamelipodija i filopodija) preobražavaju se u

razgranate stanice, što pospješuje i njihovo prijanjanje uz ozlijeđeno tkivo i međusobno povezivanje (agregaciju). Ti procesi uzrokuju stvaranje tzv. trombocitnog čepa (rane, ali nedovoljno snažne barijere kojom se nastoji fizički zapriječiti krvarenje). Povećanje membranske površine uzrokovano promjenom oblika olakšava i intenzivnu sekrecijsku aktivnost (11): aktivirani trombociti otpuštaju bioaktivne tvari pohranjene u citosolnim α -zrcima (cinkovi ioni, fibrinogen, von Willebrandov faktor, faktori V i XIII, protrombin, kininogen velike molekulske mase i dr.) i gustim zrcima (kationi, osobito kalcijevi i kalijevi ioni, polifosfati, adeninski nukleotidi, bioaktivni amini poput serotonina i histamina i dr.) ili ih sintetiziraju *de novo*, poput prostaglandina i tromboksana A₂ (14). Učinci kojima te tvari pridonose zaustavljanju krvarenja uključuju:

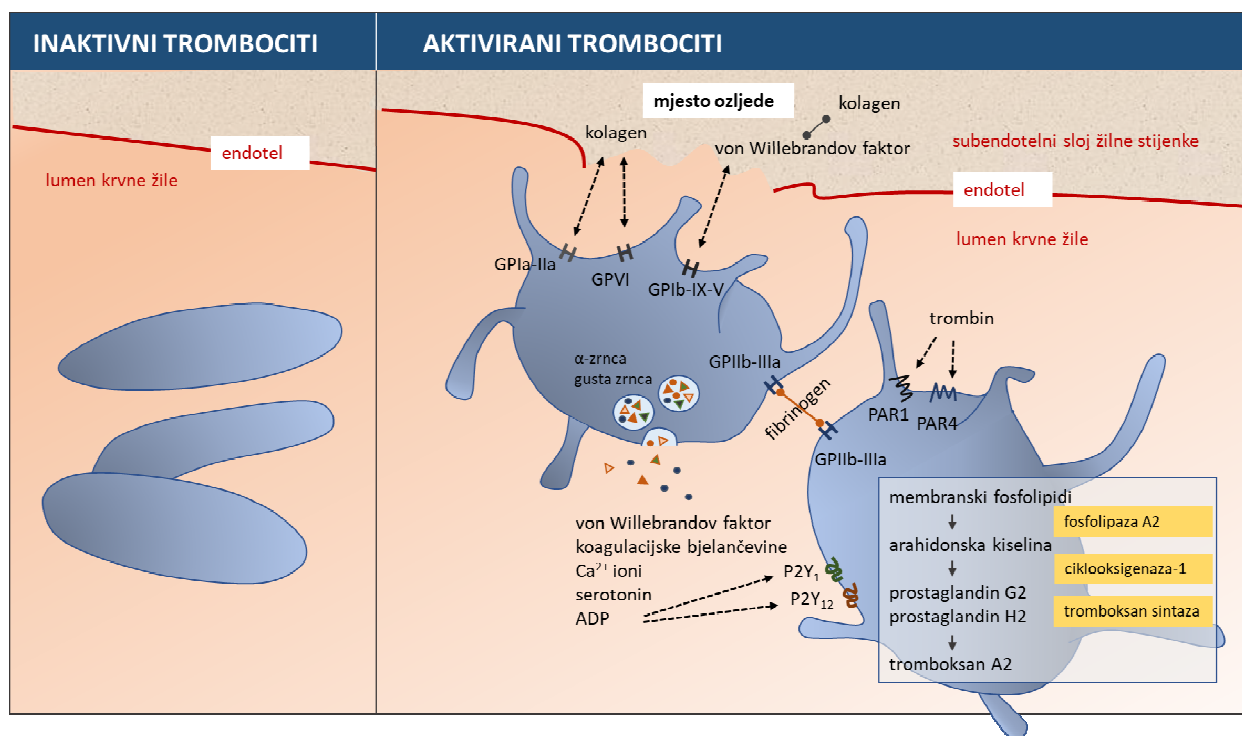
- podržavanje vazokonstrikcije (tromboksan A₂, serotonin)
- privlačenje trombocita na mjesto ozljede (tromboksan A₂, ADP)
- poticanje međusobnoga povezivanja trombocita na mjestu ozljede, odnosno poticanje njihove agregacije (tromboksan A₂, ADP, von Willebrandov faktor, fibrinogen)
- sudjelovanje u koagulacijskim procesima (kalcijevi ioni, fibrinogen, čimbenici zgrušavanja V, XI, XIII).

ADP se iz aktiviranih trombocita oslobađa degranulacijom iz gustih zrnaca u kojima je pohranjen u visokoj koncentraciji. Djeluje kao agonist trombocitnih membranskih receptora P₂Y₁ i P₂Y₁₂ s pomoću kojih pojačava već pokrenuti odgovor trombocita, promjene njihova oblika i agregaciju. Agregacija inducirana ADP-om zahtijeva koaktivaciju obaju receptora. Djelujući s pomoću P₂Y₁₂, ADP pojačava agregaciju koja je potaknuta drugim agonistima, poput tromboksana A₂ i serotonina, te sudjeluje u izlaganju fosfatidilserina na površinu aktiviranih trombocita (značenje te pojave opisano je u nastavku ovoga odsječka) (15). ADP s pomoću P₂Y₁₂ sudjeluje i u signalnim mehanizmima povezanim s aktivacijom trombocitnoga glikoproteinskog kompleksa GPIIb-IIIa (receptor α IIB β 3). To je integrin specifičan za trombocitne membrane i njihov najzastupljeniji transmembranski protein (80 000 do 100 000 kopija ugrađeno je u membranu svake stanice. Aktiviran, služi kao receptor

za von Willebrandov faktor i osobito za fibrinogen. Vezanjem za ove receptore fibrinogen vrši ulogu posrednika trombocitne agregacije (16).

Tromboksan A₂ djeluje kao jedan od važnih medijatora pozitivne povratne sprege u procesima aktivacije trombocita i ujedno kao snažan vazokonstriktor. Sintetizira se iz arahidonske kiseline, polinezasićene masne kiseline prisutne u sastavu fosfolipida staničnih membrana (put sinteze tromboksana A₂ prikazan je na slici 1.). Tromboksan A₂ ima kratak poluvijek, od samo 30-ak sekundi, pa su njegovi učinci ograničeni na mjesto na kojemu nastaje. Djelujući autokrino i parakrino s pomoću trombocitnih TP receptora (od engl. *thromboxane prostanoid receptor*), aktivira unutarstanične signalne putove kojima potiče reorganizaciju citoskeleta i promjene oblika trombocita, degranulaciju te aktivaciju membranskih glikoproteina pridonoseći tako daljnjem nakupljanju trombocita na mjestu ozljede (17).

Osim što međusobnim povezivanjem i stvaranjem agregata nastoje fizički premostiti oštećenje žilne stijenke, trombociti sudjeluju u stvaranju i stabilizaciji krvnog ugruška. To čine otpuštanjem pojedinih koagulacijskih čimbenika iz svojih citosolnih zrnaca i izražajem receptora kojima aktivirane koagulacijske bjelančevine pričvršćuju na svoju površinu. Vezanju koagulacijskih bjelančevina na površine trombocita pridonose i promjene u raspodjeli membranskih fosfolipida nakon njihove aktivacije. Najvažnije lipidne sastavnice trombocitne membrane su fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin, sfingomijelin i kolesterol. U stanju mirovanja fosfatidilserin, anionski fosfolipid, nalazi se u unutarnjemu (citoplazmatskom) sloju membranskoga lipidnog dvosloja, što uz površinski glikokaliks pridonosi antikoagulantnim značajkama inaktivnih trombocita. Međutim, u aktiviranim trombocitima fosfatidilserin i fosfatidiletanolamin premještaju se u vanjski sloj membrane, što joj daje izrazito prokoagulantna svojstva, odnosno pretvara vanjsku trombocitnu površinu u optimalnu podlogu za prijanjanje koagulacijskih faktora, njihovo združivanje u aktivne komplekse i napredovanje koagulacijskoga procesa (18).



Slika 1. Prikaz morfoloških razlika između inaktivnih i aktiviranih trombocita. Na ilustraciji aktiviranih trombocita prikazan je i dio trombocitnih receptora koji posreduju njihovu adheziju uz tkivne komponente te međusobno povezivanje (agregaciju). Naveden je i dio bioaktivnih tvari koje se iz aktiviranih trombocita oslobađaju degranulacijom te put sinteze tromboksana A2.

Trombociti – pokoja crtica više

U usporedbi s drugim vrstama stanica veći dio stanične mase trombocita zbog njihove male veličine otpada na membranu. Svojstva stanične membrane, zajedno s unutarstaničnim zrcima u kojima skladište velik broj funkcionalno raznolikih tvari, temeljne su odrednice specifičnoga staničnog identiteta trombocita i omogućuju im ostvarivanje njihove glavne fiziološke uloge – sudjelovanje u zaustavljanju krvarenja. Međutim, trombociti izražavaju i membranske receptore za koje nije utvrđena uloga u hemostazi, već posreduju druge, još nedovoljno poznate funkcije povezane s upalom i imunskim reakcijama (19). Također, trombociti nakon izvršene hemostatske zadaće nastavljaju sudjelovati u procesima cijeljenja izlučivanjem citokina, čimbenika rasta i tvari s proangiogenim učinkom. Zato se trombocitni koncentracije, biomaterijali koji se dobivaju iz pacijentove krvi (trombocitima obogaćena plazma, trombocitima obogaćen fibrin), široko primjenjuju u dentalnoj medicini, osobito u oralnoj kirurgiji i parodontologiji (20).

Činjenica da je normalna koncentracija trombocita u krvi znatno viša od koncentracije koja je dostatna za uobičajeno zaustavljanje ili sprječavanje krvarenja također se može obrazložiti dodatnim fiziološkim funkcijama trombocita. Takvima se smatra i kontinuirano podržavanje žilnog integriteta konstitutivnim površinskim izražajem ili otpuštanjem tvari koje imaju trofične učinke na endotelne stanice, poput moždanoga neurotrofnog čimbenika, epidermalnoga faktora rasta, angiopoetina i vaskularnoga endotelnog faktora rasta A. Ako se koncentracija trombocita u krvi smanji ispod kritičnih vrijednosti (od 20 000 do 10 000/mm³), smanjuje se i doprinos trombocita održanju stabilnosti i integriteta međustaničnih spojeva, pa zbog slabljenja veza između endotelnih stanica, osobito postkapilarnih venula, eritrociti prelaze u ekstravaskularni prostor što se klinički manifestira petehijama, sitnim točkastim purpurnocrvenim kožnim i mukoznim promjenama nalik na osip (17, 21, 22).

2.3. Plazmatski čimbenici zgrušavanja

Osim trombocita, krvnim komponentama koje omogućuju zgrušavanje pripada i skupina plazmatskih bjelančevina koje većinom potječu iz jetre, a koje se zbog svoje funkcije nazivaju „koagulacijskim čimbenicima“. Mnoge od njih otkrivene su 40-ih i ranih 50-ih godina 20. stoljeća proučavanjem konkretnih bolesnika i članova njihovih obitelji obilježenih više ili manje izraženom sklonošću krvarenju kod kojih se podležeći defekt koagulacije nije mogao uklopiti u dotadašnje spoznaje o koagulacijskom mehanizmu (23). Usporedan razvoj novih testova pridonosio je točnom utvrđivanju uzroka poremećaja zgrušavanja. S druge strane, potpunije razumijevanje koagulacijskog procesa pridonosilo je razvoju i unaprjeđenju laboratorijske metodologije. Tehnološki razvoj i razvoj metodologije u području hematologije općenito su, osim što su otvarali nove mogućnosti u znanstvenom radu i dijagnostici, znatno pridonijeli poboljšanju liječenja i većoj sigurnosti terapijskih postupaka kod pacijenata s hemoragijskom dijatezom (24).

Koagulacijski se čimbenici prema dogovornoj nomenklaturi označuju rimskim brojkama. Neki od njih poznatiji su po nazivu koji su u vrijeme kad su otkriveni dobili prema bolesniku kojemu je utvrđen nedostatak (nedovoljna aktivnost) toga – do tada nepoznatoga – faktora.

Prvi koagulacijski faktor nazvan prema pacijentu bio je Christmasov faktor. Naziv je dobio 1952. prema Stephenu Christmasu, tada petogodišnjaku kojemu je tri godine prije dijagnosticirana hemofilija. Iako je do tada već bilo primijećeno kako hemofilija nije homogeni poremećaj, dr. Rosemary Biggs i prof. Robert Gwyn Macfarlane analizama uzoraka dječakove krvi potvrdili su da Christmasova bolest doista nije „klasična“ hemofilija uzrokovana nedostatkom antihemofilijškoga globulina (poslije označenoga rimskom brojkom VIII), već nedostatnom aktivnošću drugoga serumskog sastojka koji su nazvali Christmasov faktor (poslije označen rimskom brojkom IX). Još iste godine i drugi su istraživači objavili slična zapažanja, pri čemu je skupina oko Paula Aggelera, opisujući slučaj 16-godišnjaka sa simptomima klasične hemofilije, ali s defektom koagulacije različitim od očekivanoga, novootkriveni faktor istovjetan Christmasovom nazvala „komponentom plazmatskoga tromboplastina“ (25).

Treći i najrjeđi tip hemofilije (hemofilija C), obilježen blažom kliničkom slikom od one koju izaziva deficijencija faktora VIII (hemofilija A) ili IX (hemofilija B), opisan je godinu dana poslije, 1953., i uzročno povezan s nedostatkom faktora nazvanoga „preteča plazmatskoga tromboplastina“. Tomu je faktoru poslije dodijeljena rimska brojka XI. Bolest se očituje produljenim krvarenjem nakon kirurških zahvata ili ozljeda, bez hemartroza (spontanih krvarenja u zglobove) i krvarenja u mišiće tipičnih za klasičnu hemofiliju. Za razliku od hemofilije A i B čije je nasljeđivanje vezano uz spolni X-kromosom, defektni gen za faktor XI se nasljeđuje autosomno recesivno pa se bolest jednako često pojavljuje u muškaraca i žena.

Faktor X, otkriven sredinom 50-ih godina prošloga stoljeća, inicijalno je dobio naziv prema dvoje pacijenata s kongenitalnom sklonošću krvarenju, Rufusu Stuartu (Sjeverna Karolina, SAD) i Audrey Prower (Velika Britanija). Rufus Stuart patio je od učestalih epistaksa (krvarenja iz nosa), stvaranja podljeva i hemartroza. Cijela njegova obitelj, u kojoj su i drugi članovi pokazivali sklonost krvarenju varijabilne težine, detaljno je proučena. Analiza obiteljskoga stabla, u kojemu je bilo i brakova između srodnika (Stuartov otac bio je sin najstarije sestre njegove majke) pokazala je autosomno recesivni obrazac nasljeđivanja. Težina kliničke slike ovisna je o razini aktivnosti faktora X, koja je kod homozigota obično manja od 10 % osnovne aktivnosti, a katkad i vrlo niska, manja od 1 %, i stoga praćena izraženom sklonošću krvarenju. Heterozigoti mogu očitovati blažu kliničku sliku. Rasvjetljavanju uzroka Stuartova poremećaja koagulacije, za koji se prvotno pretpostavilo da je riječ o kongenitalnoj hipoprokonvertinemiji (deficijenciji faktora VII), pridonio je opis slučaja Audrey Prower. Kod nje, u to doba djevojke u ranim dvadesetim godinama, među najistaknutijim znakovima poremećaja koagulacije bilo je produljeno krvarenje nakon vađenja zubā (23, 25).

Za razliku od Christmasova i Stuart-Prowerova faktora, otkriće ostalih važnih plazmatskih hemostatskih bjelančevina koje nose naziv (i) prema pacijentima kod kojih je utvrđena njihova deficijencija (Hagemanov, Fletcherov i Fitzgeraldov faktor) bilo je, zapravo, slučajno; slučajno zbog toga što ništa u kliničkoj slici ili u osobnoj i obiteljskoj anamnezi tih pacijenata nije upućivalo na poremećaj koagulacije.

Slučaj Johna Hagemana opisan je 1955. Rutinsko testiranje provedeno radi potrebnoga kirurškog zahvata pokazalo je izrazito produljeno vrijeme zgrušavanja. No anamnestički podaci o prethodnim kirurškim zahvatima (tonzilektomija, vađenje zuba) nisu upućivali na probleme sa zaustavljanjem krvarenja. Laboratorijske analize provedene da bi se riješila ta zagonetka potvrdile su postojanje do tada nepoznatoga koagulacijskog faktora koji je nazvan Hagemanov faktor i poslije označen rimskom brojkom XII. Pomalo paradoksalno, John Hageman umro je od plućne embolije koja se razvila kao komplikacija frakture zdjelice uzrokovane padom s ljestava.

Na sličan je način, rutinskim testiranjem krvi provedenim prije kirurškoga zahvata, 1963. utvrđen i poremećaj koagulacije bez kliničkoga očitovanja kod 11-godišnje djevojčice iz obitelji Fletcher. Jednake rezultate pokazalo je naknadno testiranje krvi njezine braće i sestara. Poslije je utvrđeno da je taj faktor identičan plazmatskomu prekalkineinu.

Fitzgeraldov faktor otkriven je 1973. kod Allena Fitzgeralda, starijega čovjeka kod kojega je abnormalan rezultat laboratorijskoga testiranja koagulacije utvrđen kad je primljen u bolnicu radi zbrinjavanja ozljeda zadobivenih vatrenim oružjem. Taj je faktor naknadno prepoznat kao kininogen velike molekulske mase (25).

Budući da je između 30-ih i sredine 50-ih godina 20. stoljeća opisan niz novih koagulacijskih čimbenika i da se pritom događalo da različite istraživačke skupine istomu faktoru koji su analizirale daju različite nazive smatrajući ga do tada neotkrivenim, 1954. osnovan je međunarodni odbor stručnjaka koji je predložio sustav označivanja koagulacijskih čimbenika rimskim brojkama kako bi se zadovoljila očita potreba za ujednačenom nomenklaturom hemostatskih faktora. Na nekoliko sastanaka toga odbora prema definiranim je kriterijima čimbenicima zgrušavanja dodijeljena numerička oznaka prema redoslijedu njihova otkrića. Brojke od I do IV dodijeljene su čimbenicima zgrušavanja obuhvaćenima klasičnom teorijom koagulacije, postavljenom početkom 20. stoljeća, koja je obuhvaćala četiri do tada prepoznata sudionika koagulacijskog procesa: tkivni faktor iz oštećenoga tkiva (u to vrijeme nazvan trombokinazom), protrombin, fibrinogen i kalcijeve ione. Posljednji koagulacijski faktor koji je označen rimskom brojkom bio je faktor stabilizacije fibrina. Otkriven je 1948., a 1963. dodijeljena mu je brojka XIII. To je jedini koagulacijski faktor koji se naziva i prema

znanstvenicima koji su utvrdili njegovo postojanje, Kálmánu Lakiju i Lászlu Lórándu. Njegova je deficijencija izrazito rijetka. Ne remeti stvaranje ugruška, ali onemogućuje njegovu stabilizaciju, što se također može očitovati otežanim zaustavljanjem krvarenja.

Fletcherov i Fitzgeraldov faktor nisu uključeni u sustav označivanja koagulacijskih faktora rimskim brojkama, no ubrajaju se u plazmatske sastavnice koje pripadaju hemostatskomu sustavu (25).

Pregled sastavnica hemostatskoga sustava s pripadajućom rimskom brojkom i istožnačnicama koje su se upotrebljavale ili se još upotrebljavaju za pojedini faktor dan je u tablici 1.

Tablica 1. Pregled sastavnica hemostatskoga sustava

Faktor	Istožnačnice
I	fibrinogen
II	protrombin
III	tkivni faktor, tromboplastin, tkivni tromboplastin, trombokinaza
IV	kalcijevi ioni
V	proakcelerin, labilni faktor, akceleratorski globulin
VII	serumski akcelerator pretvorbe protrombina, stabilni faktor, prokonvertin
VIII	antihemofilijski faktor, antihemofilijski globulin, antihemofilijski faktor A
IX	Christmasov faktor, komponenta plazmatskoga tromboplastina, antihemofilijski faktor B
X	Stuart-Prowerov faktor
XI	preteča plazmatskoga tromboplastina, antihemofilijski faktor C
XII	Hagemanov faktor
XIII	faktor stabilizacije fibrina, Laki-Lórándov faktor
prekalikrein	Fletcherov faktor
kininogen velike molekulske mase	Fitzgeraldov faktor

U godinama u kojima su se čimbenici zgrušavanja uvrštavali u sustav označivanja rimskim brojkama brojka VI bila je povezana s faktorom nazvanim „akcelerin“. No taj je čimbenik prepoznat kao aktivni oblik faktora V i stoga isključen iz ove nomenklature budući da je dogovorno bilo određeno da se aktivne forme koagulacijskih faktora neće označivati zasebnim rimskim brojkama. Aktivni oblici označuju se dodatkom maloga slova „a“ iza naziva (brojke) koagulacijskoga čimbenika.

Uz izlistane čimbenike normalnu zgrušavanju krvi uvelike pridonose i von Willebrandov faktor, prokoagulantni anionski fosfolipidi i receptori na površini membrana aktiviranih trombocita te topljive i membranske bjelancevine čija aktivnost ograničava prokoagulantna zbivanja i tako pridonosi kontroli zgrušavanja. One uključuju antitrombin, protein C i protein S te trombomodulin.

Nazivi „tkivni faktor“ i „tromboplastin“ – jesu li doista istoznačni?

Tkivni faktor, glikoprotein ugrađen u membrane stanica koje normalno nisu u doticaju s krvlju, također je uvršten u harmoniziranu nomenklaturu hemostatskih čimbenika, gdje mu je dodijeljena rimska brojka III. Razlog tomu jest njegova važnost u klasičnoj teoriji koagulacije, koju je 1905. postavio Paul Morawitz. Ta je teorija o mehanizmu zgrušavanja krvi uključivala samo četiri čimbenika – trombokinazu iz oštećenoga tkiva, protrombin, fibrinogen i kalcijeve ione – i znatno je utjecala na daljnja istraživanja u tome području idućih 50-ak godina.

I prije nego što je klasična teorija koagulacije postavljena, znalo se da „tkivni sok“ ili tkivni ekstrakt sadržava tvar koja može potaknuti koagulaciju budući da je primijećeno kako njegovo injiciranje u cirkulacijski sustav eksperimentalnih životinja izaziva smrtonosno intravaskularno zgrušavanje. Za taj je sastojak Morawitz u svojoj teoriji koagulacije prvi put upotrijebio naziv „trombokinaza“. Taj naziv upućuje na vjerovanje kako je funkcijski riječ o

enzimu koji u prisutnosti kalcijevih iona prevodi protrombin u trombin (26). Osim tkiva iz kojega se oslobađa nakon ozljede, Morawitz je izvorom trombokinaze smatrao i trombocite i leukocite. Nekoliko godina poslije za isti je supstrat upotrijebljen naziv „tkivni tromboplastin“, a 30-ih godina prošloga stoljeća i naziv „tkivni faktor“. Iako je rano prepoznato kako tkivni ekstrakt koji pokreće koagulaciju uključuje proteinsku i fosfolipidnu komponentu, tek je 70-ih i 80-ih godina 20. stoljeća postalo moguće pročitati njegovu proteinsku sastavnicu i klonirati njezin gen, što je izrazito ubrzalo istraživanja toga proteina i regulacije njegove ekspresije (6, 27).

Naziv „tkivni faktor“ danas se ponajprije odnosi na glikoprotein staničnih membrana koji djeluje kao receptor za faktor VII i s njime stvara kompleks ključan u inicijaciji koagulacijskoga procesa *in vivo*. Naziv „tromboplastin“ ima šire značenje, uz tkivni faktor obuhvaća i fosfolipidnu komponentu koja je povezana s aktivacijom i funkcijom tkivnoga faktora u hemostatskim procesima. Ponajprije se upotrebljava za označivanje laboratorijskih reagensa, tkivnih ekstrakata životinjskoga ili ljudskog podrijetla (osobito mozga, pluća ili posteljice) ili pripremljenih kombiniranjem rekombinantnoga tkivnog faktora i sintetskih fosfolipida koji se rabe u testiranju brzine zgrušavanja uzoraka krvi. Naziv „parcijalni tromboplastin“ odnosi se na reagense koji sadržavaju lipide, ali ne i tkivni faktor. Naziv „trombokinaza“ zastario je i zavaravajući (jer sugerira enzimsku aktivnost), pa ga ne bi trebalo upotrebljavati kao istoznačnicu za faktor III.

Tijekom koagulacijskoga procesa nekoliko proteinskih čimbenika zgrušavanja, do tada inaktivnih plazmatskih serinskih proteaza, postaje aktivnim proteolitičkim enzimima. Drugi faktori sami nemaju enzimске aktivnosti, već nakon aktivacije imaju ulogu kofaktora, odnosno stabiliziraju i pojačavaju aktivnost koagulacijskih čimbenika koji djeluju kao enzimi. Krajnji je cilj koagulacijskoga procesa cijepanjem plazmatskoga proteina fibrinogena omogućiti stvaranje mreže netopljivih fibrinskih niti koja će ojačati strukturu trombocitnoga čepa i, obuhvaćajući ostale komponente krvi, stvoriti stabilan ugrušak koji će zatvoriti ranu, spriječiti krvarenje i stvoriti uvjete za cijeljenje.

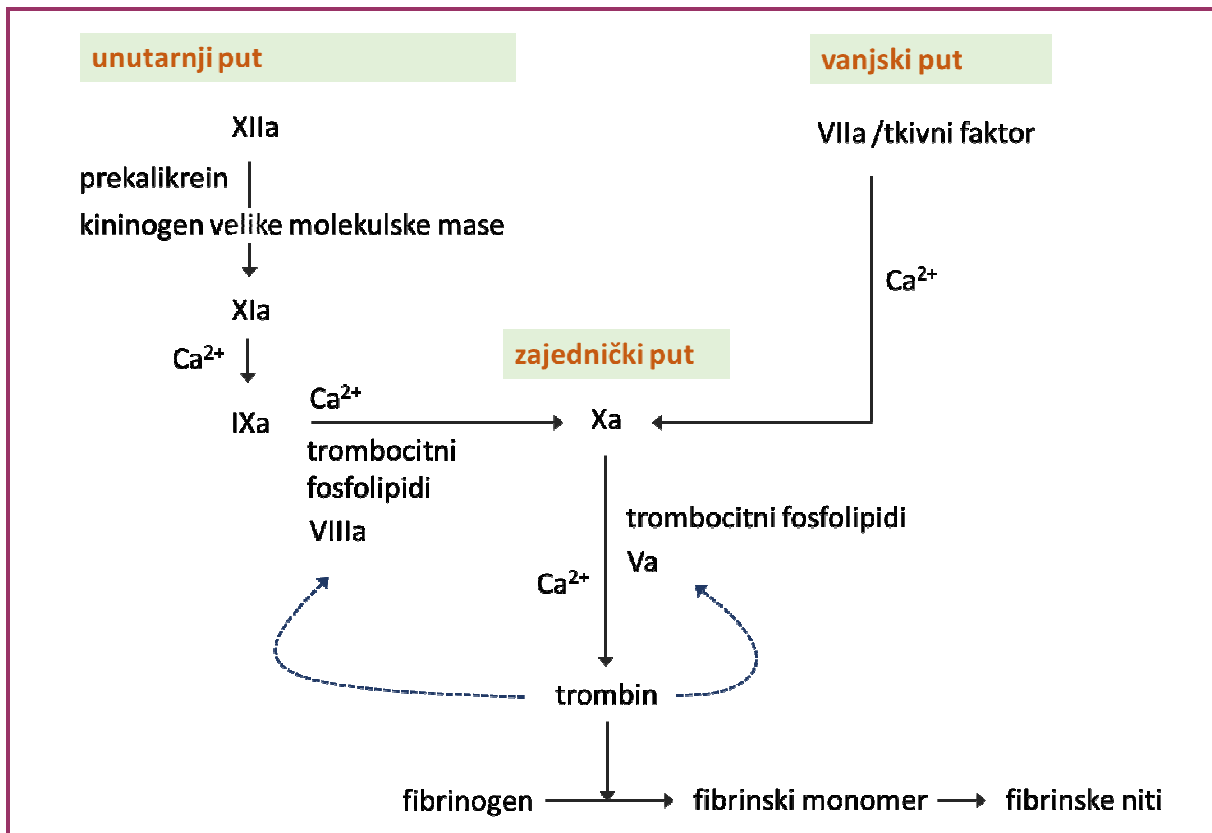
3. MEHANIZAM ZGRUŠAVANJA KRV

Zgrušavanje krvi najprije će biti opisano u sklopu koncepta koagulacijske kaskade, koji razlikuje vanjski i unutarnji put zgrušavanja. Predstavljen 1964., taj je koncept znatno unaprijedio dotadašnje razumijevanje mehanizma zgrušavanja. S vremenom je, očekivano, dopunjen i modificiran spoznajama do kojih se došlo daljnjim istraživanjima.

3.1. Kaskadni koagulacijski model

Prema kaskadnome modelu koagulacije ili modelu slapa (slika 2.), zgrušavanje krvi može se pokrenuti na dva načina: vanjskim i unutarnjim putom. Vanjski put naziva se vanjskim zbog toga što uključuje i sudionike koji se obično ne nalaze u unutaržilnome prostoru, odnosno uključuje tkivni faktor. S druge strane, unutarnji put koagulacije započinju i u njemu sudjeluju samo krvne komponente. Oba puta vode prema aktivaciji faktora X koji u sastavu tzv. kompleksa protrombinaze ili kompleksa protrombinskoga aktivatora proteolitički prevodi protrombin u trombin. Stoga se dio koagulacijskoga procesa koji se događa nakon aktivacije faktora X naziva „zajedničkim putom zgrušavanja“.

Prema modelu enzimske kaskade, krv se zgrušava u nekoliko etapa. U svakoj od njih inaktivni koagulacijski protein plazme (proenzim) podlegne djelomičnoj proteolizi zbog koje postane enzimski aktivan pa može nastaviti niz aktivacijskih koraka koji vode prema stvaranju trombina. Trombin također djeluje kao enzim koji katalizira odcjepljenje četiriju kratkih peptida (fibrinopeptida A i B) iz molekule fibrinogena čime nastaju fibrinski monomeri. Njihovom spontanom neenzimskom polimerizacijom i bočnim povezivanjem formiraju se netopljive fibrinske niti, osnova trodimenzionalne fibrinske mrežice ugruška. Trombinom aktiviran faktor XIII potom posreduje kovalentno povezivanje fibrinskih polimera, što omogućuje stabilizaciju ugruška i pridonosi njegovoj čvrstoći (28–31).



Slika 2. Kaskadni model koagulacijskoga procesa ili model slapa.

Nužan preduvjet za učinkovitost proteolitičkih procesa su raspoloživost i djelotvornost onih čimbenika zgrušavanja koji vrše funkciju kofaktora. Krv tako ne može normalno koagulirati bez djelotvornih kofaktora VIIIa i Va koji tijekom zgrušavanja stvaraju komplekse s aktiviranim enzimskim faktorima IX odnosno X (32). Ulogu kofaktora imaju i kalcijevi ioni prijeko potrebni u gotovo svim koracima koagulacijske kaskade za vezanje koagulacijskih bjelančevina uz membranske fosfolipide i aktivaciju enzima. Zbog toga je zgrušavanje uzorka krvi lako spriječiti dodatkom citratnih ili oksalatnih iona koji će vezati kalcijeve ione i tako blokirati njihovu biološku aktivnost.

Iako sami ne djeluju kao enzimi, djelotvorni kofaktori koagulacijskoga procesa nužni su za njegov normalni tijek i intenzitet. Bez njihove regulacijske uloge, enzimski koagulacijski faktori ne mogu postići svoju punu djelotvornost. Hemofilija A ili klasična hemofilija česta je nasljedna bolest iz skupine hemoragijskih dijateza uzrokovana kongenitalnim manjkom ili disfunkcionalnošću kofaktora VIII. Budući da se radi o X-vezanom recesivnom nasljeđivanju, defekt gena klinički će se očitovati prvenstveno kod muških potomaka. Temeljno je obilježje bolesti sklonost krvarenju, no kliničke manifestacije ovise o razini biološke aktivnosti faktora VIII. Blagi oblici mogu ostati neprepoznati sve do odrasle dobi kad na poremećaj koagulacije upozori produljeno krvarenje nakon ozljede ili kirurškoga zahvata (poput vađenja zuba). Teži oblici bolesti očituju se već u ranijoj životnoj dobi krvarenjima koja mogu nastupiti nakon posve neznatnih ozljeda ili spontano, bez prepoznatljiva uzroka. Najčešća su lokacija veliki zglobovi i mišići, što dugoročno može izazvati ireverzibilna oštećenja s ograničenjem pokretljivosti. No krvarenja mogu zahvatiti bilo koji sustav, uključujući probavni trakt i središnji živčani sustav, te stoga potencijalno i ugroziti život (33). Nasljedna nedostatnost kofaktora V očituje se sličnim simptomima, pa se bolest koju uzrokuje naziva „parahemofilija“. Za razliku od klasične hemofilije, parahemofilija je vrlo rijetka (32).

Koncept koagulacijskoga mehanizma s podjelom na unutarnji i vanjski put zgrušavanja koji konvergiraju prema aktivaciji faktora X prikladan je model za interpretiranje rezultata temeljnih (globalnih) laboratorijskih koagulacijskih testova.

Test kojim se utvrđuje vrijeme potrebno da se plazma dobivena centrifugiranjem citrirane krvi zgruša nakon dodatka reagensa koji sadržava rekombinantni tkivni faktor, fosfolipide i kalcijeve ione naziva se „protrombinsko vrijeme“ (PV). Budući da se zgrušavanje pokreće aktivacijom vanjskoga puta, PV će biti produljeno ako nedostaju faktori VII, X, V, protrombin i fibrinogen.

Test kojim se utvrđuje vrijeme zgrušavanja nakon pokretanja koagulacije unutarnjim mehanizmom naziva se „aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme“ (APTV). Citrirana

plazma inkubira se s reagensom koji sadržava optimalne količine fosfolipida i kontaktnoga aktivatora poput fino raspršenih čestica kaolina ili elaginske kiseline, koji služe okupljanju i aktivaciji plazmatskoga faktora XII uza sudjelovanje kininogena velike molekulske mase i prekalikreina. Nakon dodavanja kalcijevih iona uzorak krvi zgruša se slijedom reakcija unutarnjega puta, pa će APTV biti produljeno u slučaju nedostatka faktora XII, XI, IX, VIII, X, V, protrombina i fibrinogena (5, 34).

Kako se vidi iz navedenoga, rezultati obaju testova bit će produljeni u slučaju nedjelotvornosti jednoga ili više faktora koji pripadaju zajedničkome putu zgrušavanja (X, V, protrombin i fibrinogen).

Kaskadni model koagulacije pogodan je za razumijevanje koagulacijskoga procesa *in vitro* (sekvencijske konverzije zimogena u aktivne enzime u laboratorijskim uvjetima) i interpretaciju rezultata navedenih koagulacijskih testova. Međutim, taj model ipak potpuno ne zrcali ono što se doista događa na mjestu ozljede, *in vivo*, i ne može odgovoriti na pitanja koja se nameću iz nekoliko kliničkih zapažanja.

Testira li se koagulacija na uzorcima krvi osoba s deficijencijom faktora koji pripadaju unutarnjemu putu zgrušavanja, utvrdit će se produljenje APTV-a uz normalan nalaz PV-a. Međutim, ovisno o tome koji faktor unutarnjega puta nedostaje, te osobe mogu imati posve različitu kliničku sliku. Tako se nasljedna deficijencija tzv. kontaktnih faktora (XII, prekalikreina i kininogena velike molekulske mase) ne očituje sklonošću produljenom krvarenju. Nedostatnosti ostalih faktora unutarnjega puta, faktora XI, IX i VIII, bit će praćene otežanom hemostazom i sklonošću krvarenju, tj. bit će uzrok hemofilije C, B odnosno A.

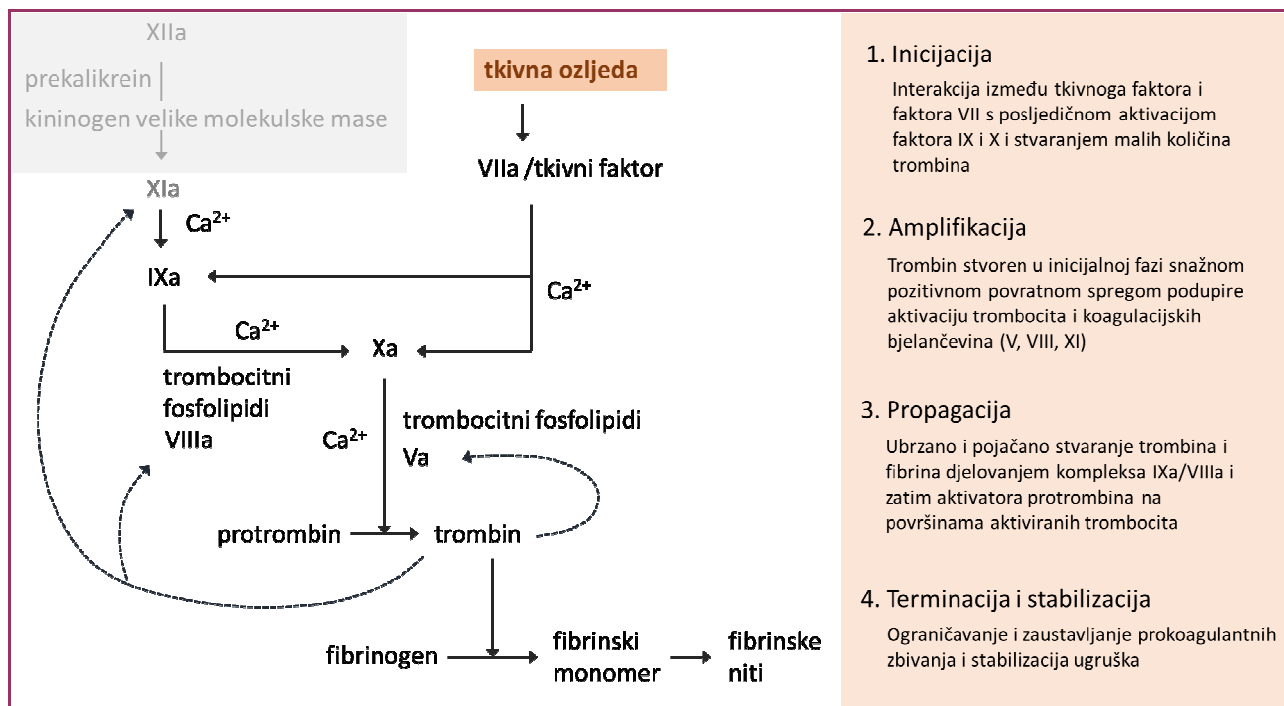
Kaskadni model koagulacije ne može pružiti objašnjenje za ta zapažanja. S jedne strane, ostaje nejasno zbog čega nedostatnosti kontaktnih faktora nisu praćene sklonošću krvarenju, a, s druge strane, može se postaviti pitanje zbog čega je zaustavljanje krvarenja kod oboljelih od hemofilije otežano ako imaju neoštećen vanjski put zgrušavanja (čije uredno funkcioniranje potvrđuje normalan nalaz PV-a). Kad bi unutarnji i vanjski put koagulacije *in vivo* djelovali kao dva usporedna i samostalna koagulacijska mehanizma, tada bi, hipotetski, jedan drugoga mogli zamijeniti, odnosno neoštećen vanjski put kod oboljelih od hemofilije trebao bi moći kompenzirati postojeći deficit unutarnjega puta i osigurati normalnu hemostazu. Međutim, klinička slika bolesti pokazuje da to nije moguće (7).

Opisana zapažanja sugeriraju da dominantnu ulogu u započinjanju koagulacije nakon ozljede ima vanjski put, no on ne može stvoriti ugrušak bez unutarnjega. Stoga je zgrušavanje krvi, zapravo, jedinstven fiziološki proces za koji je, da bi bio učinkovit, prijeko potrebna djelotvornost gotovo svih koagulacijskih čimbenika. Činjenica da faktori XII, prekalikrein i kininogen velike molekulske mase nemaju neizostavnu ulogu u hemostatskom procesu upućuje na to da se aktivacija unutarnjega puta zgrušavanja *in vivo* ostvaruje na „nižoj“ razini, mehanizmom koji povezuje vanjski s unutarnjim putem zaobilazeći kontaktne čimbenike.

3.2. Revidirani model koagulacijskoga procesa

Stjecanje novih spoznaja o koagulacijskim čimbenicima i njihovim interakcijama tijekom koagulacijskoga procesa revidiralo je kaskadnu teoriju zgrušavanja krvi. Revidirani model stvaranje ugruška opisuje u nekoliko faza koje se jedna na drugu nadovezuju i osobitu pozornost u kontroli hemostaze pridaje staničnim površinama, ponajprije stanicama koje u membrani izražavaju tkivni faktor i površinama aktiviranih trombocita koji se nakupljaju i zadržavaju na mjestu ozljede. Izmijenjene membranske površine pružaju podlogu za pričvršćenje i kolokalizaciju (združivanje) koagulacijskih enzima i njihovih kofaktora, što je preduvjet njihove optimalne aktivnosti.

Stadiji zgrušavanja krvi uključuju začetak procesa (fazu inicijacije), pojačanje (amplifikaciju) i napredovanje (propagaciju) te završetak prokoagulantnih zbivanja (terminaciju) i stabilizaciju ugruška (slika 3.) (29).



Slika 3. Revidirani model koagulacijskoga procesa koji zaustavljanje krvarenja promatra kao jedinstven proces u kojemu sudjeluju gotovo svi prepoznati koagulacijski čimbenici (uključujući i stanične elemente).

Ključnu ulogu u započinjanju koagulacije *in vivo* ima tkivni faktor. Kao što je već navedeno, tkivni faktor osobito je obilno zastupljen u membranama stanica subendotelnih slojeva žilne stijenke pa krv s njim dolazi u kontakt nakon ozljede endotelne barijere. Funkcijski se može promatrati kao receptor koji veže prokoagulantne bjelančevine upravo na mjestu na kojemu je koagulacijski proces i potreban. Tkivni faktor veže plazmatski faktor VII (ili VIIa, jer za razliku od drugih serinskih proteaza faktor VII u malom udjelu cirkulira krvlju i u aktivnom obliku) s visokim afinitetom nakon čega dolazi do njegove aktivacije (ograničenom se proteolizom prevodi u aktivan proteolitički enzim) i znatno pojačava njegovu proteaznu djelotvornost (vrši funkciju enzimskog kofaktora). Kompleks VIIa/tkivni faktor zatim aktivira faktor X zbog čega se, zajedno s membranskim fosfolipidima i kalcijevim ionima, naziva i „vanjskim kompleksom tenaze“ (od engl. *ten* za brojku X uz dodatak sufiksa -aza). Međutim, osim faktora X, kompleks VIIa/tkivni faktor aktivira i faktor IX. Tim otkrićem otkriven je i most koji *in vivo* povezuje vanjski i unutarnji put kaskadnoga koagulacijskoga modela (5).

Faktori IXa i VIIIa vežu se na površine aktiviranih trombocita pričvršćenih uz komponente ozlijeđenoga tkiva i povezanih međusobno. Usidreni na staničnim membranama, faktor IXa i kofaktor VIIIa (zajedno s trombocitnim fosfolipidima i kalcijevim ionima) tvore „unutarnji kompleks tenaze“ koji aktivira faktor X. Aktivirani faktor X s kofaktorom Va tvori kompleks protrombinaze. Faktor Xa njegova je enzimskom komponenta koja omogućuje proteolitičko odcepljenje trombina iz protrombina. Dakle, izravnom ili neizravnom (s pomoću aktiviranoga faktora IX) aktivacijom faktora X, aktivacijski kompleks VIIa/tkivni faktor ima ključnu, nezamjenjivu ulogu u inicijalnoj fazi zgrušavanja, odnosno u početnom stvaranju trombina. Količina trombina stvorenoga u toj fazi koagulacije vrlo je mala, nedovoljna za stvaranje ugruška, no ključna za nastavak procesa, jer su i tako male količine dostatne da povratnim aktivacijskim učincima snažno pojačaju intenzitet koagulacijskoga procesa i daljnje stvaranje trombina i, na kraju, fibrina.

Trombin nastao u inicijalnoj fazi s pomoću trombocitnih GPIIb-IX-V te PAR1 i PAR4 (prema engl. *protease-activated receptor*) receptora izravno pridonosi aktivaciji i nakupljanju trombocita. Potiče otpuštanje faktora V iz njihovih α -zrnaca koji se, kao i drugi aktivirani koagulacijski faktori i protrombin, vežu uz trombocitnu membranu. Pospješuje odvajanje faktora VIII od von Willebrandova faktora i njegovu konverziju u aktivni oblik koji se u prisutnosti kalcijevih iona veže uz receptore na površini aktiviranih trombocita gdje tvori kompleks s IXa. Zbog tih učinaka trombina u nastavku koagulacijskoga procesa površine aktiviranih trombocita postaju ključno mjesto daljnje ubrzane aktivacije faktora X.

Trombin aktivira i faktor XI u prisutnosti kininogena velike molekulske mase, anionskih površina te, izgledno, uz doprinos anionskih polifosfata koje otpuštaju trombociti iz svojih gustih zrnaca. Tako osigurava alternativni put aktivacije toga faktora koji je neovisan o faktoru XII. Taj učinak potencijalno objašnjava zbog čega osobe s deficijencijom kontaktnih faktora nemaju znakova hemoragijske diateze, a osobe s izraženijim nedostatkom faktora XI pokazuju sklonost krvarenju (krvarenje je uglavnom inducirano traumom ili kirurškim zahvatom te više izraženo u tkivima s višom fibrinolitičkom aktivnošću, poput orofarinksa, nazofarinksa i mokraćnoga trakta). Aktivacija faktora XI trombinom još je jedno otkriće koje potvrđuje da faktori koji pripadaju unutarnjem putu ne tvore zaseban usporedni put aktivacije koagulacijskoga procesa *in vivo*, već su dio jedinstvenoga procesa zgrušavanja započetoga aktivacijom vanjskoga puta.

Zbog opisanih povratnih učinaka trombina i okolnosti da kompleks IXa/VIIIa od 50 do 100 puta brže prevodi faktor X u njegov aktivni oblik od kompleksa VIIa/tkivni faktor, kompleks IXa/VIIIa ima ključnu ulogu u amplifikacijskoj i propagacijskoj fazi zgrušavanja. Nakon intenziviranja koagulacije važnost aktivacijskoga mehanizma kompleksom VIIa/tkivni faktor umanjuje se, čemu može pridonijeti i djelovanje jednoga od prirodnih proteinskih antikoagulansa koji su uključeni u kontrolu zgrušavanja, inhibitora puta tkivnoga faktora (TFPI, prema engl. *tissue factor pathway inhibitor*).

Završna faza koagulacije obilježena je ograničavanjem prokoagulantne aktivnosti, stabilizacijom i stezanjem ugruška. Kontrola prokoagulantnih zbivanja nužna je kako bi se ograničili širenje ugruška i okluzija žila. Uza spomenuti TFPI, koji otpuštaju endotelne stanice, antikoagulantni učinak ima i niz topljivih čimbenika podrijetlom iz jetre, protein C, protein S i antitrombin. Endotelne stanice izražavaju receptore visokog afiniteta za trombin i njegove inhibitore, čime pridonose ograničavanju aktivnosti trombina na mjesto ozljede (na mjesto gdje se i stvara) te njegovoj brznoj inaktivaciji. Antitrombin veže i inaktivira trombin, no suprimira aktivnost i drugih koagulacijskih proteaza, uključujući faktore IXa, Xa, XIa i XIIa. I sâm trombin izuzev prokoagulantnog djelovanja ima neizravne antikoagulantne učinke. Vezan uz transmembranski protein trombomodulin na površini endotelnih stanica djeluje aktivacijski na protein C. Aktivirani protein C, uz protein S kao kofaktor, proteolitički inaktivira prokoagulantne kofaktore Va i VIIIa. Protein S služi i kao kofaktor za TFPI višestruko potičući njime posredovanu inaktivaciju faktora Xa (7, 18, 27, 29).

Revidirani model koagulacijskog procesa pruža prihvatljivo objašnjenje zbog čega vanjski put zgrušavanja u sklopu klasičnoga koncepta koagulacijske kaskade kod oboljelih od hemofilije A ili B ne može kompenzirati nedostatak aktivnosti faktora unutarnjega puta VIII ili IX. Klinička slika hemofilije podcrtava važnost faktora Xa stvorenoga kompleksom unutarnje tenaze (IXa/VIIIa) na trombocitnim površinama. Kod tih bolesnika inicijalna su faza zgrušavanja i doprinos trombina nakupljanju trombocita na mjestu ozljede relativno normalni,

no izostaje propagacijska faza, obilježena intenzivnim stvaranjem trombina na membranama aktiviranih trombocita. Aktivacija faktora X ostaje ograničena na površine stanica koje izražavaju tkivni faktor i zbog toga nedostatna. Antitrombin i TFPI brzo i učinkovito inaktiviraju slobodan aktivni faktor X. To u normalnim okolnostima pridonosi lokaliziranju koagulacijskoga procesa, no kod hemofilije bi se moglo promatrati kao pojava koja dodatno ograničava stvaranje trombina samo na površine stanica koje izražavaju tkivni faktor jer onemogućuje premještanje Xa na membrane trombocita na kojima bi u kompleksu s Va mogao pridonijeti većem stvaranju trombina i tako, hipotetski, makar ublažiti nedostatnost funkcije IXa/VIIIa (faktor Xa u sastavu kompleksa protrombinaze zaštićen je od inhibicijskoga utjecaja TFPI) (7).

Kao moguće objašnjenje zbog čega osobe s hemofilijom A ili B imaju tendenciju krvarenja u mišiće i zglobove navode se razlike u distribuciji tkivnoga faktora u različitim tkivima. Naime, osim u vanjskim slojevima stijenki krvnih žila, tkivni faktor konstitutivno je izražen i u nekim drugim tkivima, osobito astrocitima moždanoga tkiva, kardiomiocitima, bubrežnim glomerulima, posteljici, epitelnim stanicama pluća, sluznici probavnoga sustava te u epidermisu. No u tkivima poput skeletnih mišića i sinovijalnih ovojnica njegova je ekspresija vrlo mala. U takvim je okolnostima moguće da je doprinos kompleksa IXa/VIIIa u aktivaciji faktora X još značajniji u usporedbi s tkivima u kojima je raspoloživost tkivnoga faktora veća (4, 5).

Mehanizmi djelovanja peroralnih antitrombotika

Najčešći razlog produljenoga i/ili otežanog zaustavljanja krvarenja kod stomatoloških pacijenata jest uzimanje lijekova iz skupine antitrombotika radi liječenja i prevencije tromboembolijskih stanja. Utječući na stvaranje ili aktivnost fizioloških sudionika hemostaze, ti lijekovi interferiraju i s normalnim hemostatskim procesima, zbog čega više ili manje otežavaju zaustavljanje krvarenja.

Antiagregacijski ili antitrombocitni lijekovi inhibiraju agregaciju trombocita. Mehanizmi njihova djelovanja uključuju inhibiciju ciklooksigenaze-1 i time sinteze tromboksana A₂ (acetilsalicilna kiselina), sprječavanje aktivacijskoga utjecaja ADP-a s pomoću receptora P₂Y₁₂ (klopidogrel, prasugrel, tikagrelor) te sprječavanje vezanja fibrinogena, von Willebrandova faktora i drugih adhezivnih liganada na receptore GPIIb/IIIa (eptifibatid).

Kumarinski antikoagulansi (varfarin) djeluju kao antagonisti vitamina K. Naime, vitamin K prijeko je potreban u sintezi djelotvornih koagulacijskih faktora II, VII, IX i X te antikoagulantnih proteina C i S. U reduciranom obliku sudjeluje u posttranslacijskoj enzimskoj γ -karboksilaciji glutaminskih ostataka navedenih bjelančevina, reakciji koja je nužna za njihovu biološku aktivnost u koagulacijskom procesu. Omogućuje im vezanje kalcijevih iona, a u skladu s time i ostvarivanje prirodnih uloga kalcijevih iona u kontroli konformacije i funkcije tih bjelančevina i njihova povezivanja s anionskim fosfolipidima membrana aktiviranih trombocita i drugih stanica koje sudjeluju u hemostatskim procesima. Reducirani vitamin K se pri karboksilaciji koagulacijskih bjelančevina prevodi (oksidira) u vitamin K epoksid. U reducirani, a time i aktivni oblik vraća se djelovanjem epoksid reduktaze vitamina K. Kumarinski antikoagulansi inhibiraju redukciju vitamina K i vitamin K epoksida generirajući tako, na staničnoj razini, stanje deficijencije toga vitamina (35).

Iako imaju niz prednosti pred kumarinskim antikoagulansima, ni oni antikoagulansi koji prema mehanizmu djelovanja pripadaju skupini izravnih inhibitora trombina (dabigatran) ili izravnih inhibitora faktora Xa (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) ne mogu prevenirati razvoj tromboze bez popratnoga povišenog rizika od krvarenja. U razvoju novih, sigurnijih antitrombotika pozornost istraživača stoga je usmjerena prema onim čimbenicima koji sudjeluju u razvoju tromba, ali koji nemaju važn(ij)u ulogu u fiziološkoj hemostazi. Riječ je ponajprije o istraživanjima terapijskoga potencijala inhibicije sinteze ili supresije aktivnosti faktora XII i faktora XI (5, 36–39).

3.3. Fibrinoliza

Zgrušavanje ima zadaću ograničiti i zaustaviti gubitak krvi, no nastali ugrušak nije trajno rješenje, nego samo brz način zaštitnoga djelovanja u slučaju ozljede i pretpostavka za procese cijeljenja. Osim toga, još je tijekom hemostatskih procesa potrebno kontrolirati stvaranje fibrina, a time i veličinu i širenje ugruška, kako bi se koagulacijski proces ograničio samo na mjesto ozljede i spriječila okluzija krvnih žila. Stoga je fibrinoliza, enzimska razgradnja fibrina, i fiziološka komponenta samoga hemostatskog procesa i proces koji se događa nakon što je krvarenje uspješno zaustavljeno sa svrhom postupnoga, kontroliranog rastvaranja ugruška.

Fibrinoliza se, baš kao i koagulacija, kontrolira interakcijama među nizom aktivatora, inhibitora, kofaktora i staničnih receptora. Glavni je fibrinolitički enzim plazmin. Krvlju cirkulira u inaktivnome obliku, kao plazminogen, a sintetizira se u jetri. Aktivira ga tkivni aktivator plazminogena koji stvaraju i otpuštaju endotelne stanice pod utjecajem mnogih podražaja, uključujući trombin, bradikinin, adrenalin te smično naprezanje. Sâm fibrin djeluje kao kofaktor u aktivaciji plazminogena. Fibrin veže plazminogen lokalizirajući ga tako na mjesto na kojemu je potreban, ali veže i tkivni aktivator plazminogena ujedno pojačavajući njegov katalitički učinak i pretvorbu plazminogena u plazmin. Plazmin cijepanjem fibrina oslobađa topljive razgradne produkte, no istodobno „otvara“ i nova vezna mjesta (lizinske ostatke) za plazminogen, podupirući njegovo vezanje, aktivaciju i nastavak fibrinolitičkoga procesa. Traneksamična kiselina (derivat aminokiseline lizin) koja se upotrebljava i kao pomoćno sredstvo u kontroli krvarenja kod stomatoloških pacijenata s nasljednim ili stečenim poremećajima zgrušavanja, svoje antifibrinolitičke učinke ostvaruje kompetitivnim vezanjem za plazminogen, onemogućujući tako njegovo vezanje uz fibrin i druge proteine i aktivaciju u plazmin, te dijelom i izravnom inaktivacijom plazmina.

Plazminogen, osim tkivnoga aktivatora plazminogena kao primarnoga posrednika njegove pretvorbe u plazmin, mogu aktivirati i urokinaza, a u nekim uvjetima i faktori zgrušavanja XIIa, XIa te kalikrein.

Kao inhibitor stvaranja plazmina djeluje niz tvari, uključujući i sâm trombin. Trombin u kompleksu s trombomodulinom aktivira enzim zvan „inhibitor fibrinolize aktiviran trombinom“ (TAFI, prema engl. *thrombin- activatable fibrinolysis inhibitor*). TAFI uklanja lizinske ostatke na fibrinu na koje se veže plazminogen umanjujući tako stvaranje plazmina, pridonoseći stabilnosti ugruška i uravnoteženju koagulacije i fibrinolize (sprječavanju prerane razgradnje ugruška). Fibrinolizu kontroliraju i inhibitor aktivatora plazminogena tip 1 i tip 2 te inhibitori samoga plazmina (inhibitor plazmina ili $\alpha 2$ -antiplazmin) (40, 41).

Plazmin ne razgrađuje samo fibrin već proteolitički djeluje i na niz drugih supstrata. Za plazmin su, kao i za druge sudionike hemostatskoga procesa, utvrđene i uloge povezane s upalom i imunosnim zbivanjima, što potvrđuje povezanost između koagulacije i naknadnih zbivanja u ozlijeđenom tkivu kao dijela obrambenih mehanizama domaćina, ali koji mogu biti dio i patofizioloških mehanizama bolesti (41, 42).

4. LITERATURA

1. Banfić Lj. Smjernice za dijagnozu, liječenje i sprječavanje venske tromboze. *Cardiol Croat.* 2016;11(9):351-74.
2. Brass LF, Newman DK, Wannemacher KM, Zhu L, Stalker TJ. Signal transduction during platelet plug formation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 3th ed. London: Academic Press; 2012. pp. 367-98.
3. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. Von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood.* 2015;125(13):2019-28.
4. Butenas S. Tissue factor structure and function. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:964862.
5. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-36.
6. Grover SP, Mackman N. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(4):709-25.
7. Ferreira CN, de Oliveira Sousa M, Dusse LMS, das Graças Carvalho M. A cell-based model of coagulation and its implications. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):416-21.
8. Shustova ON, Antonova OA, Golubeva NV. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2017;28(5):373-82.
9. Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood.* 2011;117(11):3172-80.
10. Virtanen OJ, Sirén V, Multanen J, Färkkilä M, Leivo I, Vaheri A, et al. Plasminogen activators and their inhibitors in human saliva and salivary gland tissue. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):22-6.
11. Thomas SG. The structure of resting and activated platelets. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 47-77.
12. Li R. The glycoprotein Ib-IX-V complex. 10 Ch. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 193-211.
13. Lancellotti S, Sacco M, Basso M, De Cristofaro R. Mechanochemistry of von Willebrand factor. *Biomol Concepts.* 2019;10(1):194-208.

14. Flaumenhaft R, Sharda A. Platelet secretion. In: Michelson AD, editor. Platelets. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 349-70.
15. Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal*. 2011;7(3):293-303.
16. Bledzka K, Qin J, Plow EF. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. In: Michelson AD, editor. Platelets. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 227-41.
17. Ornelas A, Zacharias-Millward N, Menter DG. Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):289-303.
18. Smith SA, Morrissey JH. Interactions between platelets and the coagulation system. In: Michelson AD, editor. Platelets. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 393-400.
19. Eriksson O, Mohlin C, Nilsson B, Ekdahl KN. The human platelet as an innate immune cell: interactions between activated platelets and the complement system. *Front Immunol*. 2019;10:1590.
20. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1913-27.
21. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Michelson AD, editor. Platelets. 4th ed. London: Academic Press; 2019. pp. 169-92.
22. Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med*. 2008;359(12):1261-70.
23. Girolami A, Cosi E, Sambado L, Girolami B, Randi ML. Complex history of the discovery and characterization of congenital factor X deficiency. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(4):359-65.
24. Saito H, Matsushita T, Kojima T. Historical perspective and future direction of coagulation research. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:352-63.
25. Giangrande PLF. Six characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors. *Br J Haematol*. 2003;121(5):703-12.
26. Bächli E. History of tissue factor. *Br J Haematol*. 2000;110(2):248-55.
27. Mann KG, Krudysz-Amblo J, Butenas S. Tissue factor controversies. *Thromb Res*. 2012;129 Suppl 2:S5-S7.

28. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija – udžbenik. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. pp. 483-93.
29. Riddel Jr. JP, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007;24(3):123-31.
30. Undas A, Ariëns RAS. Fibrin clot structure and function. A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(12):e88-99.
31. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem.* 2017;82:405-56.
32. Bos MHA, Camire RM. Blood coagulation factors V and VIII: molecular mechanisms of procofactor activation. *J Coagul Disord.* 2010;2(2):19-27.
33. Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet.* 2003;361(9371):1801-9.
34. Brinkman HJM. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thromb J.* 2015;13:9.
35. Dowd P, Ham SW, Naganathan S, Hershline R. The mechanism of action of vitamin K. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:419-40.
36. Bane Jr. CE, Gailani D. Factor XI as a target for antithrombotic therapy. *Drug Discov Today.* 2014;19(9):1454-58.
37. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2015;372(3):232-40.
38. ten Cate H. Challenging the anticoagulant paradigm? *J Thromb Haemost.* 2016;14:134-6.
39. Tillman BF, Gruber A, McCarty OJT, Gailani D. Plasma contact factors as therapeutic targets. *Blood Rev.* 2018;32(6):433-48.
40. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2005;129(3):307-21.
41. Levy JH, Koster A, Quinones QJ, Milling TJ, Key NS. Antifibrinolytic therapy and perioperative considerations. *Anesthesiology.* 2018;128(3):657-70.
42. Schoenmakers SHHF, Reitsma PH, C Spek A. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;34(1):30-7.