

ECHILIBRUL FLUIDO-COAGULANT

HEMOSTAZA ȘI FIBRINOLIZA - sunt două sisteme ce funcționează împreună însă în competiție antagonistă. Balanța dintre ele asigură echilibrul permanent, corectând dereglările infime în ambele sensuri.

Când dereglările sunt de mare amplitudine pot apare : sindroame hemoragipare (echimoze, gingivoragii, memometroragii) sindroame tromboembolice (flebite, tromboflebite, accident vasculare cerebrale, miocardice) sau sindroame mixte : coagularea intravasculara diseminata (CID).

Hemostaza este un proces biologic de protecție a organismului împotriva accidentelor hemoragice consecutive alterării sau lezării peretelui vascular.

Hemostaza fiziologică, spontană reprezintă ansamblul mecanismelor implicate în oprirea unei hemoragii consecutivă lezării vaselor micii și mijlocii. Se produce natural în fiecare organism, uneori neobservată, ducând la oprirea hemoragiilor mici interne și externe (epistaxis, gingivoragii, mici traumatisme). În afară de hemostaza spontană există și o multitudine de situații când sângerarea nu poate fi oprită decât prin intervenție medico chirurgicală și se adresează hemoragiilor din vasele mari - artere și vene.

Se poate realiza prin : administrare de medicamente și/sau manevre chirurgicale : comprimare, tamponare, garoul, ligatura, sutura vasculară, electrocuagularea, laserul.

Didactic hemostaza este prezentată în etape ce se succed, în realitate fenomenele sunt interdependente și suprapuse în timp.

1. *Timpul parietal* reprezintă ansamblul fenomenelor prin care lumenul vasului lezat se micșorează, reducând sau oprind hemoragia pentru moment.

2. *Timpul trombocitar* este reprezentat de formarea trombusului alb cu rol de a închide ferm vasul deja contractat.

3. *Timpul plasmatic* cuprinde ansamblul fenomenelor de coagulare ce se desfășoară în decurs de câteva minute de la producerea leziunii.

4. *Hemostaza definitivă* - apare după circa 7 zile, când după distrugerea trombusului de fibrină prin procesul de fibrinoliză, spațiile create sunt ocupate de fibroblaști cu rol de a închide vasul lezat.

Sistemul hemostatic normal limitează pierderea de sânge prin interacțiuni reglate precis care au loc între peretele vascular, plachete sanguine și proteinele plasmatice.

TROMBOCITELE, plachete sanguine

Trombocitele sunt fragmente citoplasmatic anucleate de megacariocite cu capacitatea unică de a adera la pereții vaselor lezate și de a forma agregate celulare cu rol în hemostaza primară dar și în celelalte faze.

Structură : plachetele sanguine au formă discoidă, diametrul de 3-4 μ m, grosime de 1 μ m și volum mediude 5,8 μ m³, care în contact cu suprafețe umectabile iau forme variate.

Principalele componente sunt :

A. *membrana celulară*

B. *sistemul tubular*

C. *sistemul dens tubular*

D. granule

E. sistem canalicular de comunicare

A. - membrana bilipidică, groasă de 70-90Å, cu structură proteo-lipidică conține importante sisteme enzimatic: adenilatciclază, fosfodiesterază, glicoziltransferază, ATP-ază ca și o serie de proteine contractile. Glicocalixul, situat pe fața externă a membranei conține molecule de adeziune la fibra de colagen și glicoproteine ce funcționează ca receptori de suprafață :

1. GP Ib/Ia - proteină transmembranară intrinsecă cu greutate moleculară de 140KD. Reprezintă locul de legare al FvW (legătură necesară pentru adeziunea plachetelor)
2. GP IIb - IIIa, complex proteic dependent de calciu, ce funcționează ca receptor pentru fibrinogen, necesar în agregare.

Tot la acest nivel au loc procese de interacțiune cu coagularea.

B.- sistemul tubular este reprezentat de microtubuli și microfilamente. Microtubulii, dispuși la periferia celulei, sunt compuși din α și β tubulină și participă la formarea citoscheletului și la contracția celulei stimulate.

Microfilamentele conțin actină, intervin în modificarea formei trombocitului activat: din disc se transformă în sferă cu multiple prelungiri (pseudopode)

C. – sistemul dens tubular este denumit datorită prezenței unui material amorf, electronodens. Este asociat celui canalicular deschis cu rol de reticul endoplasmatic. Sistemul leagă selectiv cationi bivalenți și servește ca rezervor de calciu al plachetelor, este locul de sinteză a ciclooxigenazei și prostaglandinelor.

D. - granulele sunt situate în zona centrală cu rol predominant secretor. Ele pot fi :

1. Dense (particule electrono-dense) conțin concentrații înalte de ADP, calciu, serotonină și alte nucleotide. *Ele inițiază agregarea.*

2. α , în număr de 2-20 pe trombocit de formă rotundă cu diametrul de 0,1-0,4 μ , înmagazinează o varietate de proteine secretate de trombocitul activat : factorul 4 plachetar, β tromboglobulina, PDGF, fibrinogen, factor V, FvW și *variate GP necesare în adeziune ca fibronectina și agregare ca trombospondina*

PDGF (factorul de creștere derivat plachetar), stimulează proliferarea fibrelor musculare netede și a fibroblaștilor din peretele vascular, favorizând vindecarea rănilor.

E. – sistemul canalicular de comunicare reprezintă invaginări ale membranei de suprafață ce seamănă cu niște vacuole ce măresc suprafața plachetară. Permite patrunderea intracelulară a unor constituenți plasmatici. Conținutul granular al trombocitului activat este eliberat prin acest sistem. Se realizează o structură spongioasă și o suprafață de contact cu plasma sanguină, mai mare.

Trombopoieza

Are loc în *măduva roșie hematogenă* din celula stem. Compartimentul medular uman conține 1% din celulele seriei megacariocitare aflate în diverse stadii.

Prin transformare blastică se generează *celule stem megacariopoietice poliploide* din care evoluează în 4-5 zile : megacarioblastul (1-5%), promegacariocit (22%), megacariocitul granular (60-70%) și megacariocitul trombocitar (3-17%).

Megacariocitul eliberat în circulație *emite numeroase prelungiri citoplasmatic* care se angajează în lumenul sinusoidelor medulare și cu ocazia unui flux sanguin intens, șoc mecanic sau chimic își fragmentează prelungirile eliberând plachetele în sânge (2000-7000 plachete). Maturizarea trombocitelor are loc în sânge. Trombocitele din sangele periferic sunt anucleate, discoide cu diametrul de 2-3 μ m, număr variabil 160-450x10 la puterea a

9/1 (160000-450000mm³). Durata de viață este estimată la 9-12zile (10), turnover-ul zilnic plachetar fiind în jur de 40000mm³/zi, ceea ce înseamnă că aproximativ 10-20% din plachetele circulante sunt reînnoite zilnic. Pot fi consumate în primele ore de viață în procesul de hemostază, în primele 1-4ore. În condiții fiziologice există un echilibru între producție și distrugere ce determină un număr adecvat de plachete în sângele periferic prin *mecanisme de feedback*.

Reglarea rapidă se realizează prin mobilizarea rezervelor intrasplenice, unde sunt depozitate 1/3 din plachetele circulante (sunt mai ales cele tinere, active în hemostază)

- *La individul normal* : 2/3 din plachete se află în circulația generală

- *La subiecții cu splenectomie* : 100% plachete în circulația generală

- *La subiecții cu splenomegalie* : aproximativ 90% din plachete sunt în splină.

Cât există în circulație, *mărimea și diametrul plachetelor scad* datorită pierderii de membrană ceulară și de granule α prin cicluri repetate de agregare reversibilă în circulație. Prezența în circulație de fragmente mici de plachete, numit *praf plachetar*, sugerează un proces de autodistrucție în circulație.

Reglarea tardivă se efectuează prin mecanisme complexe, durează 3-5 zile, implicați fiind: *Factorii stimulatori* :

Acțiunea TPO asupra celulei stem necesită prezența de citokine : IL 3, IL6 iar IL11 potențează efectele TPO asupra cel progenitoare.

IL1, IL3, sunt pentru coloniile granulo-monocitare (CSF- GM), IL6, IL7, IL11, eritropoietina (EPO) și trombopoietina (TPO) accelerează producția de plachete și-și potențează reciproc efectul. TPO este factorul hormonal specific liniei megacariocitare cu rol în maturarea și producția de megacariociții trombocitari. TPO este produsă de ficat, rinichi, muschiul neted, măduvă osoasă și chiar celule endoteliale și fibroblaști. În circulație se fixează pe receptori specifici de la nivelul trombocitelor circulante după care este imediat inactivată.

Când scade numărul de trombocite, crește cantitatea de TPO circulantă.

Când crește numărul de trombocite are loc fixarea excesivă a TPO cu reducerea efectelor sale asupra trombocitopoiezei.

Sursele principale pentru factorii stimulatorii îl reprezintă : limfocitul T, monocitele, celulele renale. În cazul anemiilor severe, inflamații conice când se eliberează citokine apare frecvent trombocitoza.

Factorii inhibitori sunt TGF β (factorul de creștere transformant β) factorul plachetar 4 eliberat din granulele α inhibă formarea coloniilor megacariocitare, interferonul și IL4 inhibă megacariopoieza.

Rolul funcțional al plachetelor :

1. *Intervin în menținerea integrității endoteliului vascular* împiedicând apariția microhemoragiilor spontane sau provocate prin microtraumatisme. Funcția este dovedită prin creșterea fragilității vasculare ori de câte ori numărul plachetelor scade și de numărul mai mic de plachete în sângele venos decât în cel arterial, prin reținerea acestora în teritoriul microcirculației. Ele se fixează de membrana bazală în zona joncțiunii dintre celulele endoteliale, când are loc o vasodilatație intensă. Plachetele au aceeași antigenitate cu celulele endoteliale. Producții ai sistemului de coagulare cresc permeabilitatea vasculară și acționează ca agenți chemotactici pentru celulele fagocitare. Produc factorii de creștere care stimulează multiplicarea și dezvoltarea celulei endoteliale și a musculaturii netede din vase.

2. *Funcție de transport* : constă în captarea și vehicularea unor constituenți plasmatici cu rol în aglutinare : serotonină (5-HT), catecolamine (CA)

3. *Rol în inflamație*, prin eliberarea de prostaglandine, catecolamine, 5-HT, enzime lizozomale care vor contribui la constituirea și evoluția procesului inflamator.

4. *Funcție de apărare* : sunt capabile să aglutineze și să fagociteze particule stăine, complexe Ag-Ac, iar enzimele proteolitice din granule vor contribui la procesul inflamator. Prinde microbi în cheagul de sange iar produși ai sistemului de coagulare cresc permeabilitatea vasculara și acționează ca agenți chemotactici pentru celulele fagocitare. Alte elemente ale sistemului de coagulare sunt direct antimicrobiene :

- β lizina produsă de trombocit în faza de coagulare poate provoca liza bacteriilor gram pozitiv, acționează ca detergent cationic.

-Bacteriile patogene secretă coagulaza și streptokinaza

5. *Rol în reglarea fibrinolizei*. La niv suprafeței trombocitului are loc interacțiunea dintre plasminogen și activarea acestuia. În cursul secreției plachetare se eliberează PAI1 (inhibitor al activatorului plasminogenului)

5. *Rol în hemostază*, funcție esențială, se realizează prin existența factorilor plachetari (F)

F1 = accelerina (identică cu FV plasmatic)

F2 = cu rol de accelerator al acțiunii trombinei

F3 = fosfolipid din membrana plachetară, echivalent FIII (lecitină)

F4 = antiheparina, neutralizează local acțiunea anticoagulantă a heparinei. Efect chemotactic pentru neutrofile și monocite

F5 = serotonină cu rol vasoconstrictor

F6 = fibrinogenul plachetar, amplifică agregarea plachetară

F7 = trombostenina cu rol în retracția cheagului, participă la modificarea formei trombocitului activat și a secreției plachetare. Proteină contractilă cu proprietăți ATP-azice din familia actinelor intră în structura scheletului

F8 = antifibrinolizina plachetară cu rol de antiplasmină

F9 = factorul stabilizator al fibrinei, consolidează cheagul de fibrină.

Trombocitele mai conțin : antitrombina II și III pentru a controla coagularea, ADP, prostaglandine și tromboxani cu rol în agregarea plachetară, β tromboglobulina cu rolul de a inhiba prostaciclina I₂ (PCI₂) endotelială, cu efect procoagulant, trombospondina participă la transformarea agregării reversibile în ireversibilă. Calmodulina este activator al kinazei F7 iar prostaglandina F1 (PGF₁) și F2 au rolul de stimulare a fibrei musculare netede, prostaciclina F (PC F) stimulează permeabilitatea capilară.

Toții factorii conținuți de plachete intervin în hemostaza primară, secundară și fibrinoliză. În prima etapă participă la oprirea sângerării prin formarea dopului hemostatic plachetar, în a doua etapă contribuie la stabilizarea dopului hemostatic prin contribuția la formarea fibrinei. Suprafața trombocitului furnizează zona de activare pentru factorii coagulării. Intervine de asemenea în retracția cheagului și repararea leziunii vasculare cu participarea : TGF și PDGF

HEMOSTAZA SPONTANĂ, FIZIOLOGICĂ

Poate fi :

1. *Hemostaza primară*, imediată, apare în 2-3 min, este mai puțin eficace și formează dopul plachetar. Se desfășoară cu participarea vaselor afectate și a plachetelor sanguine, de aceea este numit *timp vasculo-plachetar*

2. Hemostaza secundară, are doi timpii : timpul plasmatic care poate dura 4-9 minute și timpul trombodinamic, începe la 30 minute și poate ajunge la 10-20 ore. Hemostaza secundară cuprinde reacțiile sistemului de coagulare plasmatic ce duce la formarea de fibrină, cu rolul de a consolida cheagul.

Între hemostaza primară și secundară există o relație strânsă : activarea plachetelor accelerează coagularea iar producția coagulării – *tombina* induce activarea plachetelor.

Timpul parietal (faza vasculo-endotelială)

Rolul peretelui vascular, redus până nu de mult, numai la mecanismele vasoconstricției este în realitate mai complex, peretele intervenind atât prin celulele endoteliale cât și prin structurile subendoteliale : colagen, celule musculare netede în procesul hemostazei.

Celula endotelială este considerată astăzi o unitate perfectă anatomică și funcțională, cu configurație antigenică proprie. Are un diametru de 50μm și o grosime de 3μm. Între două celule endoteliale vecine există un complex joncțional care este foarte strâns la nivelul sistemului vascular cerebral sau lax în vasele din rinichi, măduva osoasă și splină. Celula endotelială prezintă trei fațete : una vasculară (luminală), netrombogenă o fațetă adezivă spre membrana bazală și fațeta coezivă de joncțiune cu cealaltă celulă endotelială. În condiții de agresiune, la suprafața celulei endoteliale sunt exprimate mai multe tipuri de molecule de adeziune : imunglobuline de suprafață, integrine și selectinele. Pe lângă funcția importantă de barieră de permeabilitate celula endotelială are capacitatea de a secreta factorul Willebrand (vWF), prostaciclina (PC)I, fibronectinul tisular, IL8 și un material asemănător tipului IV de colagen. La suprafața celulei există o protează, trombomodulina pe care se atașează trombina circulantă și care servește ca loc de atașare a proteinei C. Eliberează factorul tisular cu rol în coagularea pe cale extrinsecă. Când se produce o lezare a integrității peretelui vascular, dispare bariera endotelială și sângele extravazează cu ușurință în țesuturile din jur. Postlezional la nivelul vaselor mici, au loc 2 mecanisme : **1) Vasoconstricția reflexă a vasului lezat prin :**

a. mecanism miogen realizat direct prin contractia fibrelor musculare netede la care se adaugă *reflexul de axon*. Apare la aplicarea unui stimul nociv pe tegument, {caracterizat prin triada Lewis ; hiperemie, edem, papula}. Prin stimularea receptorilor dureroși (10-30s) ce implică fibre nervoase algoreceptoare de tip IV (reflexul de axon Bayliss), iar ca efectori fibre musculare netede vasculare.

c.mecanism reflex cu participarea fibrelor sistemului nervos vegetativ simpatic care se distribuie arteriolelor și sfincterelor precapilare .

Vasoconstricția activă variază ca durată și intensitate în funcție de particularitățile reactive ale vaselor. Astfel la nivelul arteriolelor periferice calibrul vasului poate fi redus până la aproximativ 30% din diametrul inițial iar durata reacției variază de la câteva minute până la 80-120 minute.

d. mecanism umoral : este întreținut de substanțe cu acțiune vasoconstrictoare : serotonină din plachete, catecolamine din atmosfera periplachetara, derivati ai acidului arahidronic - tromboxan A2, endotelina, acetilcolină (care pe vasul lezat produce vasoconstricție) eliberate de vasul lezat și de trombocite. Fibrinopeptidul B desprins de pe molecula de fibrinogen sub acțiunea trombinei are capacitatea de a induce contracția musculaturii netede direct sau indirect.

SCOP : scade debitul sanguin, scade viteza sângelui, cu marginația plachetară, acumularea precursorilor de coagulare activați la locul de formare a agregatului

trombocitar, permițând ca reacțiile enzimatiche locale să se dezvolte și favorizează hemostaza secundară.

2) **Vasodilatație în țesuturile învecinate** prin NO, PCI₂, histamina, având drept efect devierea sângelui din zona lezată spre vasele dilatate.

Reducerea lumenului vasului este favorizată și de acțiunea mecanică, compresivă a edemului ce se dezvoltă la locul leziunii.

Fenomenul de vasoconstricție reduce dimensiunea breșei vasculare dar nu este suficient pentru a realiza oprirea definitivă a sângerării decât când vasul este foarte mic. Devine necesară intervenția promptă a trombocitelor.

Există sindroame hemoragice → **Purpura vasculare**. Sunt afectate vasele mici. Se caracterizează prin hemoragii mici și medii cu apariția de petesii și purpuri. Teste de laborator : Timpul de sângerare se prelungeste, Teste de fragilitate vasculară pozitive, Timpul de coagulare și numărul de trombocite sunt normale.

Timpul trombocitar

Trombocitul, „*piticul morfologic, gigantul fiziologic*”, nu aderă la endoteliu normal, circulă prin fața peretelui vascular supraveghind integritatea lui. Trombocitele sunt încărcate cu sarcini electrice negative care nu le permit atașarea de celula endotelială intactă încărcată negativ. La locul de leziune, zona denudată de endoteliu prin sarcinile pozitive inițiază un fenomen electrostatic de cuplare, trombocitele își pastrează integritatea lor morfologică. Se inițiază hemostaza prin : aderare – adeziune, activare - secreție, agregare, aglutinare.

Aderarea (adeziunea), se realizează prin *receptorii specifici de pe trombocite*, clasa integrine, ce recunosc liganzi de pe alte celule, fibre de colagen denudate.

ADP, eliberat din celulele lezate favorizează aderarea. Aderarea plăcuțelor sanguine de zonele subendoteliale necesită prezența *factorului Willebrand*. FvW, macromoleculă plasmatică este secretată de celulele endoteliale și megacariocit, în condiții de hipoxie, stres de forfecare, prezența citokinelor. Prezintă 2 situsuri de legare : 1) pentru fibra de colagen și 2) pentru GPIb/Ia de pe suprafața plăcuțelor nestimulate.

Rolul FvW este de punte între trombocit și colagenul denudat. Astfel trombocitul rămâne atașat de peretele vascular.

GPIb/Ia (GPIb-IX) → complex de glicoproteine, un heterotrimer numit glicocalicina format din 2 componente : GPIb este heterodimer format din lanțul α și β .

Lanțul α lung, implicat în aderare, capatul extern aminoterminal este situsul de legare pt FvW iar segmentul intracitoplasmatic este în legătură cu enzimele trombocitului. Lanțul β are rol structural, menține configurația spațială a lanțului α . GPIa este receptor pentru FXI (Rosenthal).

În urma legării FvW la receptorii colagenului apar modificări conformationale ce se transmit lanțului α a GP Ib și apoi la GPIa care se activează și fixează FXI plasmatic. Se declanșează cascada coagularii pe cale intrinsecă. Lanțul α activat prin segmentul său intracitoplasmatic activează fosfolipaza A și C. (PLA₂ și PLC)

Lipsa FvW se manifestă prin insuficientă adezivitate, se corectează cu plasmă normală și este cunoscută în patologie ca boala lui Willebrand. Boala a fost descrisă în 1926 de von Willebrand la o serie de familii, în insulele din Marea Baltică. Este cel mai frecvent sindrom hemoragic ereditar, un caz la 800-1000 indivizi sănătoși. Modul de transmitere este autosomal dominant, gena implicată fiind situată pe cromozomul 12.

Functii : 1) favoriz. adeziunea, 2) este purtatorul plasmatic pentru FVIII : 1 molecula de FVIII cu 1000 subunitati de FvW. În plasmă FvW se cuplează cu FVIII al coagulării.

Se modifica TS → prelungit dar testele de coagulare sunt normale (TQ = N, PTT = N), Scade concentratia plasmatica → Val N =10mg/L

Clinic : sangerarii spontane la nivelul mucoaselor mai rar la niv tegumentelor.

Aderarea deficitară a trombocitelor de zona subendotelială se observă și în sindromul Bernard Soulier din cauza lipsei GPIb din membrana plachetară.

Alți receptorii plachetari implicați în adeziune la subendoteliu sunt 2 receptori pentru fibra de colagen, glicoproteina Ia-IIa și GP VI. Legarea colagenului de GPVI determină interacțiunea cu receptorul FcR γ de pe plachete, care este fosforilat și transmite semnale de activare la alte plachete. In schimb adeziunea este stabilizată de FvW.

Există și glicoproteina Ic-IIa care se leagă de fibronectinul secretat de celula endoteliala care se lipește de factorul von Willebrand și îi mărește capacitatea de aderare. R IIIb pentru trombospondină, PAR1 și PAR4 pentru trombina.

Fibronectina are proprietatea de a lega proteinele fibroase ca fibrina și colagenul (fibra – fibră, nectere – a lega). Este o glicoproteină cu greutate moleculară de 450000 daltoni, sintetizată de endoteliile vasculare, macrofagele peritoneale, fibroblaști și se găsește în plasmă, lichidul extracelular, țesutul conjunctiv, pe majoritatea membranelor bazale și a suprafețelor celulare. Interacțiunea dintre fibronectină, fibrină, colagen și structurile suprafețelor celulare explică rolul pe care îl joacă în *adeziune, răspândirea și locomoția celulară*.

Component special al membranei granulare, *P selectina* este o proteină prezentă pe suprafața internă a membranei granulelor α . După activare, membrana granulelor α fuzionează cu membrana de suprafață iar proteina este expusă pe suprafața externă a trombocitului și servește ca *marker de activare plachetară*. P selectina leagă selectina L (aderare leucocitară), permițând astfel marginația și diapeteza

În trombocit există o abundență de enzime, glicoziltransferaze (receptorii de aderare) care recunosc receptorii de pe colagen - CD4.

Activarea - se datorează *interacțiunii ligant-receptor*, ca și în alte celule activarea plachetară și secreția sunt reglate prin modificări ale nivelului de nucleotide ciclice, a influxului de calciu, hidrolizei fosfolipidelor membranare și fosforilării proteinelor intracelulare.

Activatorii puternici, sunt fibra de colagen, trombina, complexul Ag-Ac, trombospondina, fibronectina și substanțe eliberate la locul leziunii, *inductori mai slabi* : ADP, ATP, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina.

Activarea poate fi: 1. *extrinsecă (startul)* 2. *autoactivarea*.

Activarea și secreția plachetara sunt reglate prin fixarea FvW la GP Ib/Ia. Se activeaza enzimele plachetare PLA 2 și PLC.

1) **PLA 2 activă** mediază sinteza de acid arahidonic din fosfolipidele membranei trombocitului pe calea ciclooxygenazei și sub acțiunea tromboxansintetazei formează tromboxan A₂ (TxA₂) și prostaglandine (PG) : **factorii de activare, aderare, agregare** și Prostaciclina (PC) : **factorii antiagreganți și vasodilatatori**.

TxA₂ mobilizează calciu din depozite și activează proteinkinaza C (PKC)

Pe calea lipooxygenazei acidul arahidonic convertit în acidul 5-hidroperoxieicosatetraenoic se ajunge la leucotriene

2) **PLC** activează cascada fosfatidilinozitolilor cu formare de inozitoltrifosfat (IP₃) și diacilglicerol (DAG), rol esențial în metabolismul plachetar. IP₃ determină mobilizarea calciului din depozite și stimulează fosforilarea lanțurilor usoare de miozina care interacționează cu actina formându-se pseudopode iar DAG activează PKC.

TxA₂ se sintetizează în plăcuțele sanguine, PGE₂ și F_{2α} se sintetizează atât în plăcuțe cât și în endoteliu. Ajunse în plasmă determină vasoconstricție și agregare plachetară. Agregarea plachetară este indusă de continuarea influxului de calciu și hidrolizei fosfatidilinozitolului precum și de scăderea AMPc intraplachetar prin inhibarea adenilciclazei de către TxA₂.

Prostaciclina se sintetizează mai ales în endoteliu, este unul dintre cei mai puternici agenți antiagreganți. Activează adenilciclaza cu creșterea AMPc plachetar și scade calciu, împiedicând astfel agregarea. În plus celulele endoteliale au pe suprafață o ectoADP-aza care hidrolizează agonistul plachetar adenosindifosfat (ADP) și îi limitează efectele.

Eliberarea TxA₂ de către plachetele sanguine în imediată apropiere a leziunii vasului de sânge favorizează formarea coagulului pe când formarea prostaciclina în zona învecinată peretelui vascular împiedică expansiunea cheagului.

Antiinflamatoriile nesteroidiene și aspirina inhibă ciclooxigenaza, lăsând calea de formare a leucotrienelor intactă. (În doze mici 300-600mg/zi aspirina permite formarea de prostaciclina cu rol antiagregant)

Leucotrienele sunt mediatorii răspunsurilor alergice și inflamatori, determină creșterea permeabilității capilare, efecte chemotactice pozitive pentru neutrofile și eozinofile, bronhoconstricție. Dilatația capilară reprezintă factorul determinant al congestiei și modificărilor de permeabilitate generatoare de edem local.

Reactivitatea plachetară la inductori este crescută și de excesul de colesterol din bistratul lipidic al membranei celulare, de aceea în dislipidemii se produc sindroame trombotice.

Tromboxanii și prostaglandinele stimulează aparatul contractil al trombocitului rezultând

Reacția de eliberare I

După activare plachetele eliberează conținutul granulelor în plasmă. Din lizozomi se eliberează endoglicozidaze și enzime de degradare a heparinei. Din granulele dense se eliberează calciu, serotonină, histamina și ADP. Din granulele *α* se eliberează FvW, fibronectina, trombospondina, factorul de creștere derivate plachetar (PDGF), factorul 4 plachetar ce leagă heparina, FV, FI, FVIII.

Activarea PKC determină modificări conformationale la nivelul GP IIb-IIIa implicați în agregare.

Reacția de eliberare este indusă de scăderea AMPc și creșterea concentrației de calciu sub acțiunea trombinei, ADP TxA₂. Clinic : *Inhibarea receptorilor trombocitari pentru ADP (P₂γ₁₂) și a căilor de semnalizare dependente de acestea constituie principiul terapiei anticoagulante cu clopidogrel (Plavix) și triclopidin (Ticlid).*

Reacția de eliberare este inhibată de creșterea de AMPc și scăderea calciului prin : activarea adenilciclazei de către prostaciclina I₂ (PCI₂), iar inhibarea fosfodiesterazei (enzima implicată în scindarea AMPc) de către dipiridamol este folosit în terapie.

Sindromul plachetar cenusiu se datorează absentei granulatilor : trombocitele au dimensiuni crescute, lipsesc granulatile iar în circulație există o ușoară trombocitopenie. Absența granulatilor explică deficitul de aderență și agregare plachetară ca și afectarea cascadei coagulării pe cale intrinsecă.

Agregarea - asociere intercelulară. Plachetele sanguine au capacitatea de a adera între ele, astfel pe suprafața lezată, pe plachetele aderate inițial se atașează noi straturi de

plachete, procesul de agregare fiind favorizat de eliberarea de ADP, calciu și trombină. Acțiunea agregantă a ADP-ului este atât de puternică, încât a fost denumit de Hovig „hormon agregant”, rolul său este de a se lega de receptorii purinergici – P2Y₁₂ care activați schimbă conformația complexului GPIIb-IIIa înainte de agregare pe suprafața trombocitului trebuie să se atașeze fibrinogenul plachetar (proteină adezivă) prin intermediul lanțului δ. Trombocitul eliberează din granulele alfa, trombospondina care se fixează la nivelul glicoproteinelor IIB-IIIa de pe suprafața plăcuțelor și de fibrinogen. GP IIB-IIIa este în contact cu PKC – fragmentul IIB și transmite modificări conformaționale GP IIIa care se află la nivelul unui pseudopod și astfel leagă fibrinogenul circulant. Se vor crea astfel punți de macromoleculă între trombocite.

În trombostenie, boala Glanzmann, receptorii GP IIB și GP IIIa fie că lipsesc, fie au defecte funcționale.

Urmează momentul *agregării trombocitare* care inițial este reversibil ; plachetele aglutinate pot deveni nucleu de aglutinare pentru alte trombocite dar trombocitele pot să se separe fie spontan fie sub forțe mecanice slabe. Se petrece tot timpul în organism, produce deseori accidente ischemice tranzitorii (AIT) și sunt determinate de scăderea vitezei de circulație a sângelui Trombusul format rămâne permeabil, sângele continuă să traverseze acest agregat lax de-a lungul unor canalicule înguste. Urmează o fază de remisiune în cursul căreia plachetele suferă un proces contractil cu eliberare de ADP și calciu din granulele dense și formarea de pseudopode, se declanșează contracția filamentelor de actinomiozină. În același timp ionii de calciu eliberați activează fosfolipaza A₂ din membrana trombocitului, care determină desprinderea acidului arahidonic din fosfatidilcolina membranei cu formarea de TxA₂, PG și PC. *TPα și TPβ sunt receptori pentru TxA.* (și în această etapă se produc tromboxani, prostaglandine)

Urmează *agregarea ireversibilă*, (trombocitele nu mai pot fi separate) în urma căreia se produce impermeabilizarea trombusului și metamorfoza vâscoasă plachetară.

În afară de ADP agent potent al agregării, adsorbția fibrinogenului din plasmă și declanșarea coagulării există și alte mecanisme agregante precum formarea de endoperoxizi sau este condiționată de factorul de activare plachetar (PAF, secretat de macrofag) cu rol de modelator al agregării. *Trombina* generată prin reacții biochimice la suprafața plachetelor sanguine amplifică agregarea și eliberarea conținutului granular. *Este inductor al metamorfozei vascoase.*

Agglutinarea – metamorfoza vâscoasă plachetară, constă dintr-o serie de modificări morfologice și biochimice, în urma cărora se eliberează a serie de substanțe ce intervin în etapele următoare ale hemostazei. Trombi dispar ca entități distincte, formând un conglomerat, *cheagul alb hemostatic*, impermeabil, care asigură oprirea temporară a hemoragiei și declanșează procesul de coagulare.

Modificările morfologice constau din transformarea lor, din forma discoidală în forma sferică, se umflă cu apă, 25% față de normal, pseudopodele fuzionează, dispar microtubulii și membranele, transformându-se într-o masă vâscoasă neomogenă. Se produce degranularea plachetelor cu eliberarea de FI, FV, calciu, noradrenalina, serotonina, ADP, prostaglandine E₂, etc. Celulele lezate din regiunea pericapilară eliberează tromboplastina care difuzează spre trombusul lax **declansand C pe cale extrinseca.**

Trombina generată va acționa asupra plachetelor din trombus rezultând hiperpermeabilizarea membranei cu patrunderea calciului în trombocit și activarea ATP-

azei trombocitare. Modificarile biochimice constau în intensificarea metabolismului glicolitic și energetic trombocitar, cu degradare și resinteză de ATP, degradarea ADP cu formare de AMPc și activarea enzimelor lizozomale și a trombosteninei care polimerizează devenind filamentoasă rezultând = *Reactia de eliberare II (release reaction II)*

Se modifică orientarea lipoproteinelor de pe suprafața plachetelor, realizând *suprafețe rugoase care determină activarea FXII plachetar* ce inițiază cascada coagulării pe cale intrinsecă.

Un număr mic de trombocite rămân nedistruse și vor interveni în orientarea filamentelor de fibrină și rețracția cheagului.

În urma acestui val de agregare și secreție se formează o masă amorfă din resturile de trombocite, care se mulează cu ușurință la nivelul breșei vasculare pe care o acoperă.

Acest dop este eficient cât durează fenomenul de vasoconstricție. Odată cu fluxul, acesta este antrenat în circulație pentru că nu este suficient ancorat la peretele vascular. *Ancorarea este consolidată de apariția rețelei de fibrină.*

Se încheie astfel hemostaza primară din care rezultă trombusul alb plachetar, eficient pentru leziunile mici vasculare. Schema hemostazei descrise este valabilă pentru arteriole, venule ce sunt prevăzute cu musculatură.

Hemostaza în capilare se produce prin constricția sfincterului precapilar sau rețracția elastică a vasului. Vasoconstricția lipsește sau este redusă când secționarea peretelui vascular se face aproape paralel cu axul vasului.

Cheagul alb plachetar este friabil, poate fi mobilizat de forța proprie a curentului sanguin.

Teste pentru explorarea hemostazei primare

Alterările cantitative sau calitative ale trombocitelor pot genera sindroame hemoragice cu manifestări clinice foarte variate, unele cu o evoluție și un prognostic benign, altele severe, chiar letale.

Numărul de trombocite, este determinat în camera de numărare, obligatoriu rezultatul este completat cu examinarea frotiului de sânge periferic. Valori normale: 150000 - 400000mm³, când numărul este scăzut sub 100000mm³ se utilizează termenul de trombocitopenie iar la 10000mm³ se însoțește de hemoragii spontane. Creșterea peste 700000mm³ favoriză apariția trombozelor intravasculare. Numărarea trombocitelor se efectuează manual sau automat.

Pentru aspectul morfologic se cercetează frotiul de sânge pe anticoagulant. Se măsoară și volumul plachetar (MPV) care crește în boli asociate cu turnover plachetar crescut și scade în cazul bolilor cu producție scăzută de plachete. Există și alte metode de diagnostic pentru: agregabilitate plachetară = stimularea cu ADP. Pentru aderare plachetară se utilizează testul Salzman: trecerea cu debit constant a sângelui venos printr-o coloană de perle de sticlă și determinarea numărului de trombocite înainte și după trecere, dozarea FvW.

În trombocitopenii există tendință crescută la sângerări spontane cu apariția de hemoragii cutanate (peteșii, echimoze) și mucoase (epistaxis, gingivoragii). Se datorează hipoplaziei medulare (radiații, medicamente, toxice), în distrucții accelerate imun, în splenomegalie neoplazică, infecții, inflamații.

În trombocitoza apare risc crescut de fenomene trombotice în efort fizic, la femeii în perioada de ovulație și lăuziei. Patologic : după intervenții chirurgicale majore, în procese infecțioase și neoplazice, anemii hemolitice, splenectomii, sindroame mieloproliferative.

Timpul de sângerare . Măsurarea acestui timp a fost introdusă de Duke în 1911. Când este efectuat în condiții standard rămâne cel mai fidel test pentru estimarea funcțională a trombocitului. TS normal este de 2-4 minute. Metoda Ivy = 4-10 minute.

Există o corelație directă între numărul de trombocite și TS, atunci când plachetele sanguine sunt funcțional normale. Până la o valoare de 100000mm³, TS este normal, sub această cifră există o alungire progresivă și proporțională ajungând valoarea TS la 30 de minute când trombocitele scad la 10000 mm³ iar sub această valoare, TS se prelungește la o oră. În cazurile cu alterări funcționale, TS nu se mai corelează cu numărul de trombocite. În boala von Willebrand se constată creșterea TS iar numărul de trombocite este în limitele normalului.

Timpul de sângerare (TS) explorează global hemostaza primară, defect de număr (trombocitopenii) și calitate a trombocitului (trombocitopatii- alterării funcționale ale trombocitului ca în maladia Glazman, boala Bernard Soulier, deficit de alți factorii conținuți de trombocit), în boala Willebrand. Se alungeste în vasculopatii.

Testul este discutabil pentru că standardizarea este dificilă, inconstant modificat în anomalii de vas, scade cu vârsta, nu există corelație între TS și pierderii de sânge intravisceral.

Teste de fragilitate vasculară : *Proba ventuzei și Testul Rumpell-Leed*

Proba ventuzei de compresiune a unei suprafețe cutanate: aplicând o presiune negativă cu ajutorul unei palnii de sticlă sau a ventuzei conectate la o pompă aspiratoare și a manometrului cu mercur. Se determină momentul de apariție și numărul de petesii aparute ca rezultat al decompresiunii. Rezistența capilară normală – nu apar petesii până la o decompresiune de 20-25mmHg la adult și 30mmHg la copil

Testul Rumpel Leed apreciază clinic rezistența mecanică a capilarelor prin aplicarea unei presiunii pozitive cu manseta tensiometrului. În mod normal nu apar petesii, apariția lor semnifică vasculopatii (purpura vasculare) și afecțiuni plachetare (purpura trombocitare)

HEMOSTAZA DEFINITIVĂ

La start odată cu cea primară, are : un timp plasmatic, coagularea sângelui și un timp trombotic, reajustarea cheagului.

Coagularea se realizează prin transformarea unei proteine plasmatice , fibrinogenul din stare solubilă în fibrină insolubilă, organizată în rețea, constituind armătura cheagului.

Timpul plasmatic cuprinde trei faze : 1) *Formarea protrombinei = complexul activator al protrombinei* 2) *Formarea trombinei* 3) *Formarea fibrinei*

Procesul coagulării sângelui este extrem de complex fiind consecința interacțiunii unui număr mare de factori, dintre care unii se găsesc preformați în plasmă și se activează în timpul coagulării iar alții sunt eliberați din elementele figurate ale sângelui în special plachete, iar în cazul leziunilor tisulare intervin și factori eliberați din diversele țesuturi lezate. Factorii implicați sunt : 1) plachetari, 2) tisulari, 3) plasmatici

Majoritatea sunt sintetizați în ficat. În plasmă sunt inactivi. Nomenclatura lor este în raport cu cronologia apariției și nu cu ordinea intervenției în cascada coagulării.

Factorii plachetari sunt reprezentați de *factorii de coagulare conținuți de plachete* : FI, FV, FvW, HMWK (kininogenul cu GM mare), FVIII.

Interacțiunea dintre cascada coagulării și plachetele sanguine se realizează prin faptul că trombocitul determină o suprafață încărcată negativ ce facilitează activarea FXII de kaliceină și HNWK. Tot trombocitul leagă și FXa iar receptor este FVa. FvW stabilizează activitatea coagulantă a FVIII.

Factorii plasmatici ai coagulării

Din 1962, la propunerea lui Wright, s-a generalizat folosirea unei nomenclaturi standardizate, utilizând cifre romane. În această nomenclatură nu există factorul VI, iar factorii sunt descriși sub formă inactivă de precursori. Starea activă este indicată prin adăugarea literei a.

Factorul I – fibrinogenul, este o glicoproteină de fază acută, cu o greutate moleculară mare de 340000 daltoni. În mod normal, datorită dimensiunilor mari, nu stăbate endoteliul vascular decât în cantitate mică iar spațiul interstițial nu coagulează. Când crește permeabilitatea capilară fenomenul are loc. Se sintetizează în ficat (în afecțiunile hepatice scade FI), în macrofag și megacariocit. Sinteza este mai activă la vârste înaintate și coronarieni. Concentrația plasmatică : 250-500mg/dl, crește odată cu creșterea FvW și FVIII. Scăderea sub 50mg/dl determină apariția de tulburări hemoragice. Sub acțiunea enzimatică a trombinei, legăturile arginin-glicină sunt acilate eliberându-se fibrinopeptidele A și B, monomerii astfel izolați generează fibrina (au și rol important vasoconstrictor local). Se consumă în timpul coagulării, iar în sindroamele fibrinolitice acute (CID) fibrinolizina îl consumă aproape în totalitate.

Factorul II – protrombina, glicoproteină cu greutate moleculară de 68000 daltoni, se produce în ficat în prezența vitaminei K, cofactor al carboxilazei cu rol în construirea unor receptori pentru calciu. *Protrombina, FVII, IX, X*, câștigă activitate biologică prin carboxilarea resturilor glutamice din moleculă → grupări γcarboxilglutamice, ceea ce le permite să fixeze calciu. Protrombina fără receptorii pentru calciu nu poate fi transformată în trombină. Se consumă în totalitate, iar în ser nu trebuie să existe decât maxim 10% prorombină reziduală (15ng/dl). Fiind proteină instabilă se scindează în prezența calciului și a protrombin-activatorilor generând trombina - FIIa cu GM 35000 daltoni. Trombina este considerată enzima centrală a coagulării și dotată cu proprietăți autocatalitice. Activează FI, FV, FVIII, FXI, FXIII, PrC și trombocitele. Stimulează ATIII, participa astfel la formarea în paralel a unui sistem anticoagulant endogen pentru ca ATIII inhiba factorii Xa și IIa.

Activarea protrombinei se desfășoară cu viteză maximă la suprafața plachetelor „stimulate”, care expun la exteriorul membranei fosfolipide acide (fosfatidilserina), care în mod normal se află pe suprafața internă a membranei plachetare.

Pe suprafața membranei trombocitului se prinde FVa care câștigă proprietatea de a fixa protrombina și FXa prin intermediul calciului. Atât protrombina cât și FXa se ancorează pe suprafața placulelor sanguine stimulate prin două cai : prin intermediul ionilor de calciu, gruparea carboxilglutamică se cuplează cu fosfolipidele plachetare iar printr-o alta zonă moleculară, se leagă de FVa de pe membrana. În asociere cu factorii de pe membrană, FXa scindează rapid protrombina în cele 2 fragmente purtătoare a zonelor de legătură cu fosfolipidele și cu FVa. Ca urmare, trombina cu greutate moleculară de 35000 daltoni se desprinde de pe suprafața plachetară. Trombina se află în circulație în cantități mici, ea este inactivată de antitrombină. Se poate folosi ca hemostatic local sub formă de pulbere pe plaga sângerândă, are acțiune coagulantă puternică : 1mg de trombină

coagulează 100ml sânge în 10secunde. Poate fi folosită și pentru oprirea hemoragiilor din cavități

Factorul III – tromboplastina tisulară, este o glicoproteina membranara sintetizată extrahepatic in cantitati mari de catre muschi, oase, endotelii vasculare, eritrocite dar și în fracția microzomală a creierului, fibroblastii de la nivelul plămânului, in cantitati crescute la nivelul placentei si celule miocardice.

Este component celular ce intra in contact cu sangele numai prin leziune tisulara si se etaleaza spre lumenul vascular ca urmare a stimulării acestuia de catre citokine : IL1 factorul de necroza tumorală (TNF). Este *receptor pentru FVIIa, inițiază coagularea pe cale extrinsecă*

Factorul IV- reprezentat de ionii de calciu. Sunt indispensabili pentru coagulare cu câteva excepții. Faza inițială de activare a FXII și XI și aderarea plachetară nu necesită prezența calciului. Nu există sindroame hemoragipare prin deficit de calciu.

Factorul V- proaccelerina, FVla – accelerina, Ac-globulină, este o β globulină, fără activitate proteazică, cu rol de cofactor activator al altor proteaze. Sintetizată de ficat, independent de vitamina K, cu greutate moleculară de 290000 daltoni, în concentrație de 0,7mg/dl, se consumă în procesul coagulării. Este implicată în calea comună si este cofactor pentru FXa. Deficitul de FV determină parahemofilie (Owen). Este activată de trombină, degradată de proteina C.

Factorul VII – autotrombina I, accelerator al conversiei protrombinei serice (SPCA) glicoproteină cu greutate moleculară de 56000 daltoni Se sintetizează în ficat în prezența vitaminei K, concentrația plasmatică este de 0,1mg/dl. Nu se consumă, se regăsește în serul din cheag, și după 24 ore. Participă la activarea FX pe cale extrinsecă.

Deficitul de FVII lungește timpul Quick. (TQ - timpul de protrombină TP = 12-15sec) este un test ce explorează ramura comună și calea extrinsecă a coagulării. TQ este diferit de timpul de consum al protrombinei, test ce măsoară activitatea individuală a protrombinei. Semnificația TQ crescut înseamnă deficit de FVII dar și de FX, FV, FII, FI. Deficitul de FVII determină *sindromul Alexander, pseudohemofilie*.

În hemofilie TQ și TS sunt normale, se modifică timpul de coagulare, care este mult crescut.

Factorul VIII - globulina antihemofilică A (AHF), este o glicoproteină labilă, sintetizată de endoteliile vasculare, hepatocit Se degradează prin conservare și se consumă în procesul de coagulare (în ser nu se regăsește). Activitatea biologică depinde de cuplarea cu FvW sub formă de complex macromolecular prin legături necovalente. Componenta complexului macromolecular cu acțiune procoagulantă poartă numele de factorul VIIIc. Are rolul de (1)*cofactor enzimatic ce activează FX*. Orice leziune vasculară duce la fixarea complexului FvW-FVIII la substraturile subendoteliale, iar prin intermediul acestui complex, (2)*plachetele sanguine aderă la structuri*. Deficitul sau anomaliile structurale ale factorului VIII determină un sindrom hemoragipar sever care apare la copii de sex masculin și este dependentă de transmiterea unei gene anormale legată de coromozomul X. Termenul de hemofilie a fost introdus de Schönlein în 1839, deși boala era cunoscută din antichitate. Manifestările clinice sunt hemoragii spontane în articulații, mușchi și retroperitoneal cu echimoze și hematoame subcutane și intramusculare, hematurie spontană, hemoragii gastrointestinale și cerebrale. Caracteristic → hemartroze cu sinovită, fibroză articulară și anchiloză

Diagnosticul clinic al bolii este susținut și de examene de laborator ; timpul de coagulare și timpul de activare parțială a tromboplastinei (PTT) sunt prelungite, iar TS, TQ și numărul de trombocite sunt normale. Administrarea de plasmă proaspătă corectează acești timpi. Astăzi pacientul beneficiază și de tratament cu pulbere liofilizată de factor VIII ceea ce îi ușurează suferința.

Factorul IX - globulina antihemofilică B (BHF/Factorul Christmas), se sintetizează în ficat în prezența vitaminei K, cu o greutate moleculară de 55000 daltoni și o concentrație plasmatică de 0,5-0,7 mg/dl. Nu se consumă în timpul coagulării și este un factor stabil, fiind prezent în ser. Se activează printr-un fenomen de scindare proteolitică. Absența sa produce hemofilia B. În 1952, dr. Rosemary Biggs a descris această formă de hemofilie și a denumit-o după numele pacientului Stefan Craciun. Beneficiază de tratament numai cu sânge proaspăt sau plasma cu cantități crescute în complex de protrombina (sub aspect liofilizat). Se face sub supraveghere medicală și asociat cu administrare de heparină.

Factorul X - Stuart-Prower, autoprotrombina C, este o glicoproteină cu greutate moleculară de 55000 daltoni. Se sintetizează în ficat în prezența vitaminei K. Este un factor stabil, nu se consumă. Se activează prin scindare proteolitică. Serul și plasma conservată corectează deficitul, în deficit de FX – TQ, PTT sunt prelungite.

Factorul XI – antihemofilic C, precursorul tromboplastinei plasmatice (PTA), Rosenthal, este o glicoproteină cu greutate moleculară de 160000 daltoni. Se sintetizează în ficat, independent de vitamina K. Nu se consumă în procesul coagulării, este un factor stabil. Participă în faza activării de contact – produsul activării de contact (PAC)

Are situsuri de legare pentru HNWK, FXIIa, trombina, plachete – GPIa (IX). Are rol amplificator prin legarea de receptorul trombocitului activat în generarea de trombina.

Hemofilia C, deficit sever de FXI nu conduce la hemoragii comparabile cu cele din deficitul de FVIII sau IX → hemofilia A/B deoarece există o activitate tenazică suficientă pentru activarea FX și implică în generarea de trombina.

Factorul XII - Hageman sau factorul de contact. Glicoproteină cu greutate moleculară de 80000 daltoni, se sintetizează în ficat. Porțiunea amino-terminală a FXII (GM de 52000D) are rol de fixare pe suprafețele electronegative (colagenul subendotelial și trombocitele activate) iar cea carboxiterminală (de 28000D) are rol enzimatic. Activarea FXII declanșează lanțul de reacții ce duce la coagularea sângelui. Scindarea kalicreinei și/sau plasminei este realizată de fragmentul FXIIa, iar când scindarea este realizată de fragmentul FXIIβ rezultă fracția C1(a complementului).

FXIIa declanșează și procesul de fibrinoliză, activează fracțiunea C1 a complementului și sistemul kininoformator. Lipsa FXII nu produce sindroame hemoragice dar prelungeste timpul de coagulare. (Sângele recoltat în vase de sticlă nu coagulează în timp normal)

Factorul XIII - factorul stabilizator al fibrinei (FSF) sau Laki-Lorand. Se găsește în plasmă și în plachete (F9). În plasmă, FXIII este constituit din două lanțuri polipeptidice *a* și *b*, cu greutate moleculară de 320000 D. Lanțul *b* servește la protejarea lanțului *a* în plasmă. Plachetele sanguine, placenta, uterul, prostata, ficatul conțin numai lanțul *a*. Fixarea ionilor de calciu de lanțul *a* determină detașarea lui de lanțul *b* și modificări conformaționale care eliberează zona activă. Prin activare, FXIII devine transglutaminază având ca substrat de acțiune: fibrina, α₂ antiplasma, fibronectina. Este activat de trombină, Ca și FXa. Acționează pe cheagul de fibrină proaspăt și instabil consolidându-l. Are rol și în procesul de cicatrizare prin stimularea fibroblastilor

Deficitul de FXIII prelungeste timpul de sangerare, iar deficiențele de FXIII sunt cauza sângerărilor întârziate dintr-o plagă.

Prekalikreina - factorul Fletcher, are greutatea moleculară de 90000 daltoni, se produce în ficat. La bolnavii cu ciroză hepatică concentrația sa plasmatică scade. În plasmă este asociată cu kininogenul cu greutate moleculară mare (HMWK). Transformarea prekalikreinei în kalikreină o produce FXIIa, iar kalikreina la rândul ei accelerează prin feedback pozitiv activarea factorului Hageman.

FXIIa scindeaza PK la kalikreina care amplifica activarea FXII dar si formarea bradikininei (face parte din grupul kininelor plasmaticice cu rol vasodilatator si de crestere a permeabilitatii vasculare) din HMWK

HMWK - factorul Fitzgerald, de 120000 daltoni, are o zona centrala intens pozitiva care se leaga de colagenul denudat. Se elibereaza situsurile de legare pentru factorul XI si kalikreina în vecinătatea factorului XII adsorbit si el pe suprafete electonegative. Initial pe colagenul expus se ataseaza FXII si HMWK.

Deficitul de FXII, PK si HMWK cresc timpul partial de tromboplastina (aPTT) dar in vivo nu produce sangerarii la pacientii cu acest deficit.

Kininogenul cu GM mică de 50000-60000D nu participă la coagulare din el rezulta lizilbradikinina.

Factorii consumați complet în coagulare : FI, FV, FVIII

Factorii care nu se consumă și se găsesc în ser : FVII, FIX, FX

Factori tranzitori ai coagulării. Au durată de viață scurtă, nu se află în mod normal în plasmă. Când iau naștere, întră într-un sistem de reacții în care fie se consumă fie se inactivează.

PAC (produsul activării de contact) este rezultatul combinării între FXII și FXI atunci când FXII s-a activat. Activarea se face lent și progresiv iar in prezenta kalikreinei si a kininogenului cu masa moleculara mare procesul devine exploziv.

PiI (produsul intermediar I) poate avea origine : 1) *intrinsecă*, rezultă din combinarea FIXa cu FVIII în prezența F3 si calciu sau 2) *extrinsecă*, produsul combinării FIII cu FVII. *Rol : Pi I activează FX.*

PiII (produsul intermediar II) rezultă din combinarea FXa cu un fosfolipid. PiII împreună cu FVa si calciu formează *protrombinaza* care va cliva protrombina rezultând *trombină, enzima de bază a coagulării.*

Factorii cuagularii sunt serinproteaze, enzime care acționeaza prin separarea proteinelor excepție factorul VIII și factorul V care sunt glicoproteine iar factorul XIII este transglutaminază.

DINAMICA COAGULĂRII

Schema clasică a coagulării îi aparține lui Morawitz (1904) care consideră că în coagulare intervine trombokinaza care ulterior este numită tromboplastină care acționează în prezența calciului asupra protrombinei dând naștere la trombină, enzimă ce transformă fibrinogenul în fibrină. După anul 1943 când mai mulți cercetătorii au descoperit numeroși alți factori care intervin în coagulare, s-au emis diferite ipoteze ; cea a cascadei enzimatice a lui MacFarlane (1964) și teoria autocatalitică a lui Seegers (1958). Schema coagularii a pornit de la observația că sângele recoltat într-un recipient de sticlă, în 6-10 minute își pierde fluiditatea și se transformă într-o masă gelatinoasă care nu-și modifică forma la înclinarea vasului si ca adăugând sângelui o emulsie tisulară, coagularea se produce rapid, în 12-15 secunde. Diferența de timp în care se desfășoară

coagularea fără sucuri tisulare și coagularea în contact cu țesuturile, a dus la descrierea a două mecanisme de inițiere a acesteia. După Rappaport (1968), coagularea ar evolua în trei stadii principale :

- I. stadiul de formare a activatorului protrombinei - protrombinaza
- II. stadiul de activare a protrombinei
- III. stadiul de formare a fibrinei

Pentru activarea și **formarea protrombinazei** sunt două căi : *intrinsecă* și *extrinsecă* deosebite după originea sanguină sau tisulară a factorilor de start.

Activarea coagulării prin mecanisme intrinseci

Mecanismul de formare al activatorului protrombinei sau inițierea coagulării pe cale intrinsecă, începe prin modificări traumatice ale elementelor figurate, contactul cu suprafețele rugoase, umede sau fibrele de collagen. Mecanismul intrinsec de activare necesită exclusiv prezența factorilor plasmatici și plachetari. Procesul inițiat continuă apoi printr-o serie de reacții în cascadă :

1. Formarea PAC

2. Formarea Pi I al căii intrinseci

3. Activarea FX ,confluență majoră și formarea protrombinazei

1.PAC, începe cu activarea FXII, de contact sau Hageman, la contactul cu suprafețele rugoase. Activarea este lentă până la fixarea prekalikreinei pe suprafețele rugoase și transformarea ei în kalikreină de FXIIa, apoi procesul devine exploziv. Această fază nu necesită calciu. FXIIa determină activarea FXI, proces intensificat de prezența kininogenului cu greutate moleculară mare (HMWK) cu rol de caraus. FXIa, reprezintă molecula centrală a produsului activării de contact. PAC se produce la suprafața plachetelor sanguine și acționează asupra FIX pe care-l activează în prezența calciului. Mecanism alternativ pentru activarea FXI, imprecis detaliat (sa nu oitem legatura GPIb/Ia cu FXI), poate explica de ce pacienții cu deficit de FXII, HMWK sau prekalikreină au hemostaza aparent normală (uneorii aPTT poate fi prelungit) și nu prezintă sângerări.

2.Pi I intrinsec,(tenaza) este format ca urmare a acțiunii FIXa asupra FVIII pe care-l activează, formând împreună un ansamblu plurimolecular(*FIXa - FVIIIa*) la suprafața plăcuțelor agregate. Agregatul absoarbe F3 plachetar, un fosfolipid, eliberat de lezarea trombocitelor aderente la collagen sau suprafețe modificate. Pi I intrinsec este rezultatul combinării dintre : FIXa, FVIIIa, F3 și Ca.

3. Activarea FX de catre PiI intrinsec Din acest moment treptele cascadei intrinseci devin identice cu cele ale căii extrinseci. *FXa* împreună cu un *factor fosfolipidic* plachetar sau tisular formează *Pi II* care in asociere cu FV și calciu, alcătuiesc complexul numit activatorul protrombinei sau *protrombinaza*. *Calea intrinsecă prin produsul activării de contact* are rol minor pentru formarea cascadei coagulării pentru că deficitul de FXII, HMWK, prekalikreina nu prezintă tulburării de sangerare. Au rol important în inflamație. Celelalte etape au importanța în amplificarea cascadei coagulării

Activarea coagulării pe cale extrinsecă

Procesul este inițiat de momentul când un perete vascular este traumatizat sau diverse țesuturi extravasculare lezate vin în contact cu sângele. Aceasta va determina o succesiune de reacții :

1. Activarea FVII

2. Formarea Pi I al căii extrinseci

3. Confluența majoră

1. *FVII*, este unicul factor plasmatic ce se autocatalizează spontan în doze mici, în lipsa sângerării. Nu poate declanșa coagularea, doar intervine în mecanismul de control ce inhibă cascada. Calea *FVII* este activă permanent și are rol major pentru coagulare în condiții bazale, ceea ce pare intrinsec să fie principalul mod de inițiere a cascadei coagulare. Când se produce o leziune (sânge-țesut), se eliberează *FIII*, lipoproteină ubcuitară prezentă în membranele tisulare care determină activarea *FVII*. Aceste mici cantități de *FVIIa* declanșează momentul doi.

2. Tromboplastina tisulară, *FVIIa* și ionii de calciu alcătuiesc *Pi I extrinsic*. Calea factor tisular – factor *VII*, este un proces rapid : 10-15secunde, datorită existenței preformării de *FVII* și tromboplastină.

3. *Confluența majoră*. Urmează să se înțeleagă de ce dacă activarea *FX* este o cale comună în procesul coagulării, deficitul de factorii antihemofilici, determină sindroame hemoragice severe, chiar dacă rămâne intactă calea extrinsecă. *FX* este activat prin proteazele generate în cele două reacții majore ; 1) de *FIXa* împreună cu *FVIIIa* și de 2) *FIII-FVIIa*. Separat, atât *FIX* și *X* se pot activa direct de către complexul *FIII- FVIIa* generat pe cale extrinsecă.

Complexul tisular - FVIIa activează FIX și FX. Activarea lor permite legătura între coagulare pe cale extrinsecă și intrinsecă.

Există în plasmă proteine inhibitoare ale coagulării, *ICFT= TEPI* (extrinsec inhibitor pathway) care blochează activitatea complexului tisular-*FVIIa*. Coagularea inițiată pe calea extrinsecă, prin *TEPI* se va bloca, **iar elementele căii intrinseci devin reglatori dominanți ai generării de trombină.**

Activarea inițială a *FIX* de către *TF-VIIa* compensează deficiențele în factorii *FXII* și *FXI*, când aceste apar și explică de ce pacienții deficitari în *FXII* sunt asimptomatici iar pacienții cu deficit de *FXI* au diateze hemoragice ușoare.

În schimb inhibiția ulterioară a complexului *TF-VIIa* de către *TEPI* determină ca activarea susținută a *FX* de către *FIXa* și *FVIIIa* să fie critice pentru hemostaza normală atunci când există deficit de factorii antihemofilici *A* și *B*

Formarea trombinei

Protombina în prezența protrombinazei indiferent de origine se transformă în trombină. Procesul are loc la suprafața plachetelor sanguine stimulate în prezența calciului. Protrombinaza activă are trei situsuri ; *FXa*, *FVa* și calciu. Pe suprafața membranei plachetare se prinde *FVa* care câștigă proprietatea de a fixa în același timp și protombina cât și *FXa*. Atât protombina cât și *FXa* se ancorează pe suprafața plăcuțelor simulate pe două căi : prin intermediul ionilor de calciu și prin *FVa*. *FXa* poate elibera trombină doar după legarea ambelor brațe cu *FVa* și *Ca*. Ca urmare trombină se desprinde de pe suprafața plachetară. Trombină prin receptorii *GPIs*, determină eliberarea trombospondinei din plachete urmând agregarea ireversibilă.

Trombină activează prin mecanism de feedback : degranularea și agregarea plachetară, *FXIII*, *FXI*, *FVIII*, *FV*, *F3* proteina *C* reactivă, iar în doze mari inhibă. Procesul durează 2-10 secunde Acțiunea ei este limitată la nivelul de coagulare prin diferite mecanisme inhibitorii.

Formarea fibrinei

Stadiul III sau faza fibrinoformării. Are loc în trei etape : *proteolitică, polimerizare și stabilizare*. 1) Sub acțiunea proteolitică a trombinei, fibrinogenul este scindat în

fibrinopeptide A, B și monomerii de fibrină. Fibrinopeptidele A și B au greutate moleculară de 2000 daltoni și sunt puternic încărcate electronegativ. Cât sunt prezente în molecula de fibrinogen nu permit polimerizarea, prin respingere electrostatică.

2) Urmează polimerizarea spontană a monomerilor de fibrină, întâi în sens longitudinal apoi în sens transversal. Inițial polimerizarea are loc prin legături laxe de hidrogen. Rețeaua formată este instabilă iar în ochiurile rețelei sunt captate eritrocite. Procesul durează 1-2 secunde. 3) Urmează transformarea fibrinei solubile, dezintegrabilă în fibrină insolubilă sub acțiunea FXIII, a factorului 3 trombocitar, calciului și a trombinei. Prin activare FXIII, devine transglutaminază și catalizează formarea de legături încrucisate între grupările γ glutamil din structura unei catene polimer formate anterior și o grupare amino a unui rest de lizina aparținând altei catene.

Sub acțiunea FXIIIa se fixează pe fibrina stabilizată *fibronectina și inhibitorul α_2 al plasminei*. Fibronectina o dată activată, prinde fibrele de fibrină de cele de colagen, favorizând pătrunderea fibroblaștilor și cicatrizarea plăgilor.

Timul trombdinamic

Această etapă a hemostazei este alcătuită din succesiunea a două procese : 1) sinereză și 2) retracția cheagului. *În ambele procese se eliberează ser*. Sinereza este un proces nespecific care durează aproximativ 90 de minute de la formarea cheagului. Este un fenomen de reorganizare spontană fără consum de energie. Volumul cheagului scade cu 15-20% și nu duce la o contracție crescută a cheagului. Cheagul gelatinos din momentul coagulării în urma retracției, se separă într-o parte solidă și un lichid numit ser, plasmă lipsită de fibrinogen și o parte din factorii coagulării. *Rol important în acest proces îl au plachetele sanguine ce emit pseudopode și eliberează F7*. Retracția cheagului este un proces activ, necesită ATP, energie furnizată de plachetele sanguine pentru contracția filamentelor de trombostenină ce sunt ancorate de filamentele de fibrină. Trombostenină (F7) se contractă producând o mișcare în sens longitudinal al fibrinei rezultând o creștere a densității cheagului. Volumul scade cu încă 60% din cel inițial, expulzând mult ser. Procesul începe la 30 de minute după coagulare și durează 24 ore. *Cheagul este protejat de fibrinoliza precoce de F8 plachetar*.

CONTROLUL COAGULĂRII

Se cunoaște că în sânge și în țesuturi au fost evidențiate mai mult de 50 de substanțe care influențează și induc coagularea sanguină. O parte dintre acestea sunt procoagulante iar o altă parte sunt anticoagulante. În mod normal echilibrul dintre ele previne coagularea intravasculară a sângelui. În afara acestor substanțe, o serie de alte procese controlează fenomenul. Fluxul sanguin contribuie prin efectele sale mecanice la fragmentarea fibrinei care ulterior este distrusă. Îndepărtarea factorilor activați din zona lezată, contribuie la delimitarea procesului și totodată factorii coagulării, activați în circulație sunt în permanență metabolizați și inactivați la nivel de ficat, plămân, sistem reticulo-endotelial. Netezimea endoteliului vascular și stratul monomolecular de proteine încărcate negativ, adsorbite pe suprafața endotelială, glicocalixul, respinge plachetele și reprezintă factor important de prevenție a sistemului intrinsec.

Paracrin : prostaciclina I₂ cu rol vasodilatator și antiagregant (eliberată de endoteliu stimulează proteina G trombocitară care la rândul ei activează adenilatciclaza și inhibă activarea plachetară), NO eliberat local inhibă adeziunea și agregarea trombocitară.

Dintre elementele inhibitorii naturale cele mai multe inhibă trombina dar există și alte substanțe cu rol anticoagulant.

Dintre inhibitorii naturali *fac parte proteina Z-ZPI, TEPI, antitrombine*

Proteina Z face parte din clasa serinproteaze inhibitorii, produsă de ficat cu o GM de 72000D, mediază adeziunea trombinei la fosfolipide și stimulează degradarea FX de ZPI (related protease inhibitor). ZPI degradează FX în prezența proteinei Z și FXI

ICFT = TEPI , (inhibitorul căii mediate tisular) limitează acțiunea complexului : factorului tisular - FVIIa și a FXa. Circulă în plasmă sub formă de complexe cu LDL, HDL, VLDL, formează complexe și cu antitrombinele (AT)

Antitrombinele plasmatice, sunt mai multe dar cunoscute sunt AT : I, II, III și IV.

AT I este reprezentată de filamentele de fibrină. Trombina se adsorbă pe fibrină în proporție de 85-90% încă în timpul formării cheagului și nu permite extinderea coagulării peste limitele leziunii.

AT II, alfa2 macroglobulină, inhibă 25% din trombina liberă formată, formând împreună cu ea un complex ireversibil. Procesul are loc în prezența fibrinogenului și a heparinei.

AT III, o alfa2 globulină, cu o greutate moleculară de 65000 daltoni, reacționează lent cu trombina, factorii XIa, Xa, IXa, plasmina și kalikreina. Se sintetizează în ficat, de aceea concentrația ei scade în afecțiunile hepatice dar și în timpul tratamentului cu estrogeni și în perioada gravidității. Terapia cu cortisol mărește sinteza de AT III. Concentrația plasmatică este de 150μg/ml, când scade favorizează apariția trombozelor/embolismului. În prezența *heparinei, cofactor sau a altor substanțe heparin-like*, reacția AT III cu trombina devine explozivă, instantanee (se accelerează de 1000 ori).

HEPARINA este secretată de mastocitele bazofile, localizate în țesuturile conjunctive pericapilare din întregul organism și are structură de ester mucoitinsulfuric, proteoglican foarte acid. Heparina fixată de lizina din molecula AT III, induce modificări conformaționale ale moleculei de antitrombină, care prin restul argininic descoperit se leagă cu zona activă serinică a trombinei. Pe lângă efectul antitrombinic , heparina împiedică activarea FX, crește negativitatea pereților vasculari și activează lipaza plasmatică. Se utilizează în tratamentul aterosclerozei (ATS). Eficacitatea terapiei cu heparină, este imediată și durează 3-4 ore, și depinde de prezența AT III. Persoanele la care lipsește AT III nu răspund la terapia cu heparină. Injectarea unor cantități relativ mici, de aproximativ 0,5 mg/kg/corp determină creșterea timpului de coagulare a sângelui de la o valoare normală de 6 minute la 30 de minute. Heparina injectată este distrusă de o enzimă din circulație care poartă numele de heparinază. Administrarea îndelungată de heparină inhibă secreția de aldosteron iar un tratament ce depășește un an, duce la osteoporoză.

AT III , are efect de protecție a heparinei împotriva F4 plachetar, rol antitromboplastinic prin inhibarea factorilor : IXa, , Xa, funcționează ca antifibrinolizină.

Deficitul de AT III congenital se manifestă prin episoade trombotice, iar la homozigoți este letal intrauterin. Deficitul dobândit se întâlnește în ciroze hepatice, sindroame nefrotice. Consumul crescut de AT III apare după intervenții chirurgicale mari. În coagularea intravasculară diseminată (CID) scade AT III prin consum crescut datorită neutralizării unor cantități de trombină în exces, precum și pierderilor din compartimentul intravascular (datorită creșterii permeabilității capilare) și sintezei deficitare de factorii, datorită leziunii hepatice toxice. AT III fixează 75% din trombina liberă în plasmă.

AT IV sunt complexe de molecule ce rezultă din fibrinoliză ; *produși de degradare a fibrinei (FDP)*. Din liza cheagului rezultă fragmente polipeptidice cu efect antitrombinic și antiagregant. Rețeaua de fibrină se fragmentează în fg. X, Y și D. Fragmentele Y sunt rupte în D și E (din fibrinoliză rezultă fragmentele X, Y, D, E = FDP). Fragmentele D și E inhibă polimerizarea fibrinei și agregarea trombocitelor. Fragmentul E are rolul de a bloca glicoproteinele IIb-IIIa.

ANTITRIPSINA alfa1 inhibă trombina, FXIa și plasmina. Bolnavii cu lipsă congenitală de antitripsină alfa1 fac emfizem pulmonar sau ciroză hepatică dar nu prezintă tendință la tromboze.

COFACTORUL II AL HEPARINEI (HC-II) este o glicoproteina de 64000D, cu capacitatea de a inhiba trombina prin formarea unui complex echimolar cu aceasta :

HC-II inhibă acțiunea trombinei asupra fibrinogenului dar și asupra trombocitului inhibând agregarea și secreția.

HC-II, NU inhibă FXa, FIXa, FXIa sau plasmina dar inhibă chemotripsina.

Sistemul anticoagulant al proteinei C include două proteine plasmatiche C cu GM de 62000D și S cu GM de 69000D și o proteină din membrana celulelor endoteliale vasculare numită trombomodulină. Proteinele C și S sunt sintetizate în ficat, dependent de vitamina K, nu se consumă în coagulare. *Activarea proteinei C are loc sub acțiunea trombinei, reacție accelerată de trombomodulină, eliberată de endoteliul lezat.*

Trombomodulina cu o GM de 74000D, formează cu trombina un complex echimolar care în prezența Ca scindează proteina C. Reacția decurge optim când Pr. C este fixată la rândul său prin porțiunea sa gamacarboxilglutamică (CGL) și a Ca de suprafața membranei endoteliale, favorizând întâlnirea dintre trombina și Pr. C

Trombomodulina inhibă activitatea procoagulantă a trombinei

Pentru a-și exercita acțiunea anticoagulantă, *proteina C necesită prezența proteinei S, a ionilor de calciu și a unei fracții fosfolipidice*. Acest complex inactivează FVa și FVIIIa, iar în cadrul fibrinolizei produce activarea plasminogenului în plasmină. Acționând asupra FVa fixat pe plachetele sanguine stimulate, determină pierderea receptorului pentru factorul Xa.

Proteina S are rol de cofactor. În plasmă circulă liberă în proporție de 40% și legată de fracția C4b a complementului în procent de 60%. În infecțiile acute fracția legată a proteinei S crește, diminuând fracția liberă, ceea ce favorizează apariția de tromboze. Întreruperea procesului de activare a proteinei C are loc prin internalizarea complex trombină-trombomodulină de pe suprafața celulară și degradarea trombinei intracelular iar trombomodulina reapare la suprafața celulei.

Scăderea nivelului de antitrombină sau sistemul proteină C și S sau forme anormale a acestora determină stări de hipercoagulabilitate și pretrombotice. Frecvent se întâlnește un defect ereditar asociat cu hipercoagulabilitate datorat unei forme a factorului V (Leiden) rezistent la inhibiția proteinei C. Între 20-50% din pacienți cu tromboembolism venos neexplicabil au acest defect.

Coagularea poate fi inhibată în vivo prin : *inhibitori naturali* de tipul hirudina - saliva lipitorilor sau *inhibitori naturali patologici*. Se produc prin mecanism imunologic prin apariția de antifactori VIII, IX, la hemofilici A și B ca urmare a unui număr mare de transfuzii pe o perioadă lungă de timp. Există și antifactori împotriva tromboplastinei tisulare, FXI, XII, XIII (rar). Dintre *inhibitorii artificiali* : *antivitamina K* (warfarina,

dicumarolul, acenocumarolul) derivat de cumarină inhibă ciclul de regenerare la nivel hepatic a vitaminei K de fapt enzima implicată, vitamina K epoxid reductaza (VKORC) Se utilizează în tratamentul trombozelor, infarct miocardic, profilactic.

In vitro, coagularea poate fi inhibată cu substanțe ce fixează ionii de calciu ; citrat de sodiu, de amoniu sau de potasiu, oxalați, EDTA. Ionul citrat se combină cu ionul de calciu din sânge formând un compus neionizat, iar lipsa calciului ionic previne coagularea. Pentru organism mult mai avantajos este de a folosi citrați, oxalații sunt toxici. Ionul citrat după injectare este îndepărtat din sânge în câteva minute de către ficat, unde este folosit fie ca sursă de energie , fie transformat în glucoză.

Recoltarea sângelui se face în eprubete siliconate sau parafinate care împiedică activarea factorului XII, prelungind timpul de coagulare a sângelui până la o oră (normal TC este 6-8 minute , atunci când recoltarea se face în eprubete obișnuite).

TROBOFILIA - Anomalie a coagularii ce crește riscul de tromboza prin hipercoagulabilitate. Factorii implicați :

1) Se datorează mutațiilor ce codifică gene ale factorilor coagularii :

Factorul V (Leiden), protrombina, antitrombina III, proteina C și S

2) Cea mai recentă gena MTHFR, implicată în metabolismul homocisteinei (aminoacid care se formează prin demetilarea intracelulară a metioninei, redusă rapid de vitamina B).

În sânge determină obstrucția și distrugerea vaselor de sânge. S-a demonstrat că hiperhomocistinemia determină ateroscleroza (ATS) și cheaguri de sânge în vene .

{val N = 13mol/l, (13-60mol/l =risc crescut, 60-100mol/l = f gtav)}

3) Deficit de vitamina B6, B12, acid folic,

4) Cea mai frecventă trombofilie dobândită se datorează existenței de autoanticorpi care atacă peretele vascular = Ac fosfolipidici. Au fost evidențiați la gravide cu antecedente multiple de avorturi spontane. Incidenta : 5-10% în Europa. Studiile au arătat că există o rată crescută de avort în funcție de grupa sanguină : I/O → nu prezintă iar celelalte grupe au de 2-4 ori risc crescut.

EXPLORAREA COAGULĂRII

Există mai multe teste standardizate pentru determinarea *timpului de coagulare a sângelui (TC)*. Cea mai veche și răspândită este recoltarea sângelui într-o eprubetă de sticlă și înclinarea ei din 30 în 30 secunde până sângele coagulează. Această metodă se numește TC, Lee-White, cu o durată normală de 6-10 minute. TC se mai poate determina prin metoda lamelor. Se aplică o picătură de sânge pe o lamă de sticlă și se acoperă, punând-o într-o cutie Petri. Se pornește cronometrul și când picătura nu se mai deformează, se oprește cronometrul. Valorii normale prin această metodă 6-8 minute.

Sistemul intrinsec, se determină în ansamblu prin determinarea *timpului de coagulare, TC* și/sau *timpul de recalificare a plasmei (sau timpul Howell)*. TH are valoare normală de 60-120 secunde și estimează atât coagularea globală dar și funcția trombocitelor. Este util în monitorizarea terapiei cu heparina *Timpul de cefalină sau PTT (parțial tromboplastinic time)*, unde F3 plachetar este înlocuit cu cefalină, așa încât se explorează componentele căii intrinseci. Are o valoare de 70-110 secunde. *APTT, timp parțial de tromboplastină activat*, cu o valoare normală de 30-40 secunde, test în care activarea FXII este controlată prin adaos de caolin.

Testul generării de tromboplastina (TGT) cu o valoare normală de 8-12 secunde, poate determina tipul de hemofilie, deficitul de FXI și XII și anticoagulanți circulanți

Sistemul extrinsic, se utilizează *Timpul de protrombina (PT)* sau *TQ* cu o valoare de 10-15 secunde.

Explorarea etapelor coagulării : În explorarea **fazei de precoagulare** mai ales în cazul absenței factorilor antihemofilici se utilizează *timpul de consum al protrombinei, TCP* cu valori normale 30-40 secunde. Când se scurtează se datorează unui proces de coagulare defectuos cu remanenta de protrombina : valorii scăzute în : deficit de FXII, X, V și factori hemofilici : VIII, IX, XI, dar și în trombocitopenii/patii.

La hemofilici acest timp se modifică întrucât formarea protrombinazei este defectuoasă , în ser rămân cantități mari de fibrinogen, în schimb TS este normal. Algoritm de interpretare ; TCP scăzut și PTT normal semnifică tulburare plachetară, TCP scăzut și PTT prelungit semnifică deficit al sistemului intrinsec

Trombinoformarea : timpul de protrombină (TP) = TQ (INR/PTR) → 12-15secunde. Evaluează factorii II, V, VII, X, trombina, fibrina primară sau prezenta anticoagulantilor naturali (antitrombine, inhibitori ai polimerizării fibrinogenului) sau medicamentosi (heparina, cumarinice). Se poate exprima în sec sau ca indice de protrombină (IP) ;

$IP = (TQ_{\text{martor}}/TQ_{\text{pacient}}) \times 100$. IP= 85-100%

International Normalised Ratio → INR, expresia standardizată a TQ. PTR =timp protrombina pacient/ timp martor

$INR = (TQ_{\text{pacient}}/TQ_{\text{martor}}) \times ISI$. ISI reprezintă indice de sensibilitate al tromboplastinei folosite în laborator. Valorii normale 0,8 – 1,2

Folosit în monitorizarea tratamentelor cronice cu anticoagulante orale. Exemple de val țintă : terapia tromboembolismului pulmonar : INR 3-4, profilaxia trombozei la pacienții cu fibrilație atrială (FA), INR = 2-3

Aprecierea transformării fibrinogenului în fibrină se face prin *timpul de trombină, TT* cu valoare normală de 20-30 secunde.

În stări de hipercoagulabilitate și când heparina fiziologică scade TT se scurtează. În hipocoagulabilitate și hipo/afibrinogenii se prelungeste.

Timpul de reptilază, dozarea fibrinogenului plasmatic completează tabloul paraclinic de diagnostic.

Metode de explorare a timpului trombodinamic. Investighează și hemostaza primară, depinde de și de activitatea trombocitelor : se recoltează 5ml sange în baie de apă la 37C și se apreciază retractia cheagului la 2 și 24h. Cantitatea de ser expulzat normal este de 30% la 2ore și 45% după 24ore. Varianta : *se apreciază retractia cheagului pe lama*: necesar pentru apariția unei picături de ser pe lama cu o picătură de sange : normal în 30minute

TULBURĂRILE DE COAGULARE

Tulburările de hipocoagulabilitate, sunt mai rare, aici fiind încadrate hemofilia A și B, boala Willebrand. Dintre cele dobândite sunt diatezele hemoragice prin deficit de vit. K în urma disfuncțiilor hepatice, apariția autoanticorpilor pentru factorii coagulării.

Tulburările de hipercoagulabilitate sunt trombozele asociate cu embolie. Există o hipercoagulabilitate primară cauzată de : rezistența la proteina C, deficiență la Pr.C sau/și Pr S, deficiență de ATIII, hiperprotrombinemia.

În patologii sunt identificate unele grupe de pacienți cu risc crescut la tromboembolie ; 1) imobilizați excesiv după intervenții chirurgicale, 2) cu insuficiență cardiacă congestivă cronică, 3) ateroscleroză, 4) neoplazie, 5) sarcină.

Trombozele sunt favorizate de creșterea vâscozității sângelui, modificarea structurii vasului în ateroscleroză, infecții ale peretelui vascular, traumatisme vasculare. Staza sanguină, hipoxia, determină apariția suprafețelor rugoase și acumularea factorilor coagulării. Coagularea sanguină nu este uniformă în organism. Compoziția cheagului depinde de locul leziunii. În vene datorită debitului sanguin lent, se favorizează apariția de cheaguri bogate în fibrină și eritrocite cu puține plachete. Se numesc trombi roșii, au terminații friabile, se formează la nivelul membrelor inferioare și embolizează în circulația pulmonară. Ca simptomatologie : durere, tumefacție, eritem local și dispnee, durere toracică, palpitații, colaps, soc circulator. Mecanisme : stază sanguină la nivel venos cu acumulare de factori ai coagulării. Deficit de interacțiune ai factorilor inhibitori cu cei activați . Eliberare de factori tisulari de către cel tumoral

Dimpotrivă, cheagurile formate în artere în condițiile unui debit mare, sunt compuse predominant din plachete și au relativ puțină fibrină. Apar prin lezarea endoteliului vascular și se amplifică aderarea/agregarea plachetară. Cauze : ateroscleroza (ATS), diabet zaharat (DZ), fumat, hiper/dislipidemie. Trombii albi se dislocă ușor și embolizează la distanță, ajungând în circulația cerebrală, retiniană, unde pot duce la disfuncții neurologice pasagere (atac ischemic tranzitor – AIT), orbire monoculară temporară (amauroză fugace) sau accident vascular cerebral (AVC) cu sechele. Majoritatea episoadelor de infarct miocardic sunt determinate de trombi formați după ruptura plăci aterosclerotice în arterele coronare.

Cheagul hemostatic care reprezintă un răspuns fiziologic la o agresiune vasculară este similar trombusului patologic. Tromboza a fost descrisă drept coagularea care se produce unde sau când nu trebuie.

FIBRINOLIZA, liza cheagului

Proces independent de hemostază, deși acțiunea sa se desfășoară în stânsă corelație.

Fibrinoliza care are drept scop reducerea dimensiunii trombusului la diametrul bresei vasculare prevenind astfel obstrucția lumenului, reprezintă desfacerea enzimatică a fibrinei în fragmente ce nu mai sunt capabile să mențină o rețea. *Enzima implicată este plasmina*. Procesul începe din centrul cheagului, iar la periferie sunt inhibitori fibrinolizei. Din acest proces rezultă *repermeabilizarea vasului de sânge*.

Rolul procesului de fibrinoliză este de a menține permeabilitatea vaselor, tubilor renali, curăță focarele postinflamatorii, controlează concentrația plasmatică a factorilor coagulării, distruge fibrina, FII, FV, FVIII, FXII când este în cantitate crescută. În cantități mici reglează concentrația lor ca și fracțiunii ale complementului, ACTH.

Factorii fibrinolizei

Substratul este fibrina, enzima implicată plasmina, provenită din *plasminogen*. β glicoproteină, cu greutate moleculară de 93000 daltoni, se sintetizează în ficat și în țesutului cu risc crescut embolic.

Există un plasminogen nativ ce conține acid glutamic în zona amino-terminală și un plasminogen derivat din primul care prin scindare dă naștere la o moleculă mai mică cu lizina în zona amino-terminală. *Lizina reprezintă zona prin care plasminogenul se atașează pe filamentele de fibrină*. Transformarea proenzimei în enzimă activă, nu necesită calciu și se face prin intermediul a doi activatori :1) *intrinseci - plasmatici (cale indirectă)* și 2) *extrinseci - tisulari (cale directă)*,3) *factori exogeni - streptokinaza*

Calea intrinsecă. Sub acțiunea *lizokinazelor* eliberate în plasmă din endotelii, se activează : FXIIa, FXIa, catecolaminele, vasopresină, kalicreina care devin *activatori* și transformă plasminogenul în plasmină.

Calea extrinsecă. Se desfășoară sub acțiunea activatorilor direcți, *fibrinolizokinaze* din endotelii, țesuturi și organe cu nivel crescut de activator ; uter, tiroida prostata, pancreasul, plămânu. Este numit și *activatorul tisular al plasminogenului (tPA)*. *Celula endotelială de care s-a atașat trombina prin intermediul trombomodulinei va secreta tPA* Al doilea activator izolat este *urokinaza, (u-PA)* de la nivelul celulelor epiteliale ale tubilor renali. Ei acționează direct asupra plasminogenului pe care îl transformă în plasmină.

Activatori exogeni : streptokinaza folosită în liza cheagului în infarct miocardic ac(IM ac) sau/si APSAC (acyl-plasminogen-complex) ei acționează direct asupra plasminogenului pe care îl transformă în plasmină.

Activatorul tisular al plasminogenului tPA, este constituit dintr-un singur lanț polipeptidic cu greutate moleculară variabilă, în funcție de organ, în jur de 70000 daltoni. Sub acțiunea plasminei sau după fixarea de fibrină se scindează în 2 porțiuni, legate printr-o punte disulfidică, ambele fiind active. Pentru a-și putea manifesta efectul, *tPA* necesită prezența unui cofactor: *fibrina* (cel mai eficient). Eliberarea tPA în circulație se face sub influența : stazei venoase, vasodilatației, ischemiei, efortului fizic, anxietății și a unor substanțe vasoactive de tipul ; adrenalină, histamina, acid nicotinic, proteina C.

În efortul fizic se produce o cantitate crescută de tPA, dar nu se produce plasmină deoarece nu există fibrină. tPA coexistă cu plasminogenul în plasma normală fără să interacționeze, ambele au afinitate pentru filamentele de fibrină la suprafața cărora tPA inițiază transformarea plasminogenului în plasmină.

tPA se elimină o dată cu secrețiile exocrine ale glandelor lacrimale, salivare, mamare și determină activarea plasminogenului în canalele excretoare, împiedicând astfel formarea de coaguli de fibrină, prevenind obstrucția conductelor. Bogăția peretelui uterin în tPA, explică de ce sângele menstrual nu coagulează.

Urokinaza, o serinprotează, se află în urină cu rol de menținere a permeabilității căilor intra și extrarenale. *Streptokinaza*, provenită din streptococii βhemolitici nu este o protează însă se fixează pe molecula de plasminogen pe care o deformează în așa măsură încât devine autocatalitică. UK și SK sunt capabile să activeze plasminogenul circulant nelegat de filamentele de fibrină.

Acțiunea plasminei pe fibrină are efect macroscopic, dispariția cheagului. Mecanismul îl reprezintă digestia proteolitică a fibrinei în peptide cu moleculă mică și proprietăți anticoagulante, ce sunt eliminate de sistemul monocito-macrofag. Fibrinoliza îndeplinește rol important în îndepărtarea unor coaguli minuscule din vasele periferice și în vindecarea plăgilor. Topirea fibrinei favorizează pătrunderea fibroblaștilor și refacerea continuității țesuturilor.

Etapale fibrinolizei

1). Activarea plasminogenului se realizează prin intermediul activatorilor tisulari, plasmatici, a urokinazei și streptokinazei

Mecanism : t-PA eliberat de endoteliul vascular se fixează pe cheagul de fibrina prin intermediul situsurilor de legare pentru lizina. În același timp are loc fixarea plasminogenului pe suprafața rețelei de fibrina chiar în timpul formării acesteia.

Pe suprafața rețelei de fibrina atât activatorul cât și plasminogenul suferă modificări care facilitează interacțiunea lor și formarea plasminei active care rămâne fixată pe cheag exercitându-și efectul. Plasmina este o proteină bicatenară cu lanțuri peptidice inegale legate prin punții disulfidice. Lanțul greu conține situsurile de legare pentru lizina.

Urmează 2). degradarea fibrinei în fragmentele : X, Y, D, E. După îndepărtarea peptidelor mici de la capatul carboxi-terminal al lanțurilor α vor rezulta fragmente mari anticoagulante sub influența trombinei, iar îndepărtarea altor fragmente peptidice din lanțurile β , vor forma fragmentul X coagulabil. Din fragmentul X : Y și D. Din fragmentul Y rezulta fragmentele D și E.

3). Inactivarea plasminei.

După degradarea fibrinei, plasmina rămasă în circulație se combină rapid cu inhibitorii naturali : (1) *inhibitorii activatorului plasminogenului (PAI)* inhibă tPA și UK. Sunt PAI1, permanent și PAI 2, tranzitoriu, apare în ultimul trimestru de sarcină. Sunt produse de granulele α plachetare, endotelii, glande exocrine, hepatocit, fibroblasti. S-a izolat și PAI3 a cărui activitate este potentată de prezența heparinei. Dintre inhibitorii sintetici : AMCHA (acidul transaminometilciclohexancarbazolic), EAC (acid epsilonaminocaproic) (2) *Inhibitorii plasminei* sunt ; $\alpha 2$ *antiplasmina*, blochează situsurile active ale plasminei și adsorbția plasminogenului pe fibrină, inhibă formarea fibrinei legate cu factorul XIIIa. La bolnavii cu ciroză hepatică concentrația de $\alpha 2$ antiplasmina scade, intensificându-se fibrinoliza cu tendință la hemoragii severe.

$\alpha 2$ *macroglobulina* (sintetizată în ficat), acționează pe complexul $\alpha 2$ antiplasmina - plasmina

$\alpha 2$ *antitripsina*, $\alpha 1$ *antitripsina*, F 8 (*antifibrinolizina*) intervin când s-a epuizat antiplasmina, au acțiune lentă.

Fibrinoliza fiziologică Tromboliza sau mecanism fibrinolitic, se desfășoară strict local fără răsunet general. Acțiunea litică a plasminei se exercită numai pe trombul proaspăt format. Pe măsură ce fibrina îmbătrânește, câștigă rezistență la plasmină. În același timp fixarea $\alpha 2$ antiplasminei și a FXIIIa reduce susceptibilitatea fibrinei față de plasmină.

Tromboliza, crește în efortul fizic, acidoză, hipoxie, stress, unele alergii, în infecții bacteriene, traumatisme. Tromboliza scade în sarcină, menopauză și la nou-născut

Când se depășește granița fiziologică se exacerbează tot sistemul litic prin activarea plasminogenului în circulație cu hiperplasminemie care depășește posibilitățile de neutralizare ale sistemului antifibrinolitic.

Fibrinoliza patologică

Produce hemoragie prin fibrinoliză acută. Activarea fibrinolizei se produce în infecții bacteriene evoluante, postoperator, insuficiența hepatică, accidente, stări emoționale intense, electrocutare, șoc. Macfarlane în timpul bombardamentelor din cel de al doilea război mondial, a descris la persoanele sănătoase, o intensificare a fibrinolizei. Hipoxia prin secreția activatorilor de către endoteliile vasculare și adrenalina prin mecanism periferic determină activarea generală a fibrinolizei. Profesorul I.Baciu de la Cluj a obținut prin hipoxie ischemică a extremității cefalice a unui câine, activarea fibrinolizei

Apare ca o consecință a *activării crescute a sistemului fibrinolitic* urmare a **coagulării intravasculare diseminate (CID)**.

CID este o coagulopatie de consum caracterizată prin generarea în circulație a unor mari cantități de trombină care determină : *activarea primară a coagularii* cu formarea difuză de trombi în vasele mici cu consum de trombocite (trombocitopenie). Obstrucția micilor

vase periferice diminuează aprovizionarea cu oxigen și substanțe nutritive ceea ce exacerbează starea de șoc. Factorii coagulării și plachetele sanguine scad în circulație și se activează sistemul fibrinolitic.

Ca urmare, apar paradoxale hemoragii spontane în tegumente, cianoză, sângerării.

Teste de laborator modificate : prelungirea PTT, TP crescute și hipo/afibrinogenie.

Activarea secundară a fibrinolizei prin : activarea plasminogenului în plasmină.

Plasmina acționează asupra fibrinei rezultând produsii de degradare ai fibrinei (PDF) de tip D și E. Se inhibă funcția plachetară astfel : timpul de sangerare se prelungeste, se inhibă și polimerizarea fibrinei ceea ce determină prelungirea timpului de trombină.

Etiologie : Lez endoteliale care activează coagularea pe cale intrinsecă. Infecții severe cu generare de toxine bacteriene + stază capilară + hipoxemie și acidoză.

Pot fi implicați virusul herpetic, gripal, septicemii cu Gram, fungii sau prezența în circulație a complexelor Ag-Ac

Distrucții tisulare în urma unor mari traumatisme cu eliberare de *mari cantități de tromboplastină*, se activează coagularea pe cale extrinsecă. Are loc în sindroame obstetricale, chirurgicale, tesuturi ischemice din infarctul miocardic, șoc, pancreatita acută, neoplasme metastatice, hemolize intravasculare, ciroză hepatică, venin șarpe,

Fibrinoliza scăzută prezintă risc crescut de tromboză cu consecințele ei : accident vascular trombotic (AVC), infarct, cangrene. Se întâlnește frecvent în obezitate și insulinorezistență.

Explorarea fibrinolizei se apreciază prin *timpul de liză al cheagului euglobulinic (TLCE)* care are valoarea normală de 60 minute. Este indicat pentru evaluarea fibrinolizei și monitorizarea terapiei cu streptokinază sau urokinază. Când are o valoare mai mică se apreciază ca fibrinoliza cheagului este patologică.

Timpul de trombină (TT) = 20-30 secunde. Timpul de reptilază (similară trombinei, coagulează fibrinogenul și este insensibilă la anticoagulanți)

Dozarea fibrinogenului plasmatic : 200-500mg/dl. Când scade sub 100mg/dl determină prelungirea TQ, PTT, TT.

Scade în hepatopatii, leucoze, fibrinolize primare și secundare, malnutriție, deficit congenital de fibrinogen, etc. Crește în infecții, hemopatii maligne, colagenoze, sarcină, accident vascular cerebral, infarct miocardic acut, traumatisme, etc.

Evidențierea produsilor de degradare ai fibrinei (PDF). Normal PDF pot fi de tipul monomeri < 10mcg/ml și dimeri < 250mcg/ml

Dimerii D sunt markeri specifici pentru fibrinoliză la nivel seric : un rezultat D dimer normal, exclude în > 95% din cazuri prezența unei tromboze active.

Un rezultat D dimer pozitiv nu va confirma întodeauna prezența trombilor deoarece există și alți factori : infecții, inflamații în care valoarea D dimer crește, de aceea sunt necesare și alte investigații suplimentare în funcție de simptomatologie.

Cresc PDF în CID, fibrinoliza primară, ciroza hepatică, tumori, tromboze venoase periferice, etc.

Trombolastografia, metoda grafică de apreciere a fibrinolizei.

