

FIZIOLOGIA ECHILIBRULUI FLUIDO-COAGULANT

HEMOSTAZA (din grecescul **hayma-singe** si **stasis-oprire**) desemneaza oprirea hemoragiei survenita ca urmare a unei injurii vasculare. Ea se realizeaza prin mai multe mecanisme: vasoconstrictia vasului lezat, cresterea presiunii tisulare, formarea unui dop plachetar (trombus alb plachetar) in cazul hemoragiei capilare si coagularea propriu-zisa, cu formarea trombusului rosu de fibrina (cheagul de sange, alcatuit din retea de fibrina in ochiurile careia sint prinse elementele figurate ale singelui si serul).

Terminologic, se accepta denumirea diferita in functie de locul de formare: cheagul de sange defineste produsul final al coagularii format extravascular (exemplu: la nivel cutanat); pentru produsul final al coagularii intravascular sint acceptate ambele denumiri: cheag si trombus. Trombusii difera din punct de vedere al compozitiei, in functie de locul de formare: in circulatia arteriala ei contin mai multe trombocite, in timp ce in cea venoasa, trombusii contin in proportie mai mare fibrina.

Vasoconstrictia vasului lezat induce colabarea acestuia. Ea este indusa de substantele vasoconstrictoare: tromboxanul A₂ (TxA₂) si serotonina eliberate de trombocitele activate si de endotelina (ET-1), cel mai puternic vasoconstrictor fiziologic, eliberata de celulele endoteliale, ca efect al trombinei.

Presiunea tisulara crescuta ca urmare a edemului tisular contribuie la hemostaza, intrucit scade presiunea transmurala in vasul lezat si astfel scade raza acestuia, limitind extravazarea singelui.

Trombocitele (plachetele sanguine) detin un rol esential in mentinerea echilibrului fluido-coagulant.

In singele circulant al subiectul uman adult, ele se gasesc in numar de 150000-400000/mm³. Sint structuri celulare anucleate, discoidale, de mici dimensiuni (diametrul de 3-4microni), provenite din fragmentarea citoplasmei megakariocitului trombocitogen in maduva hematogena. Principala lor functie este aceea de a "**sigila**" bresele aparute in arborele vascular. Ele sint adaptate pentru **aderarea** la vasele lezate, **agregarea** intre ele si facilitarea aparitiei **trombinei**. Aceste functii contribuie la hemostaza prin formarea initiala a **dopului plachetar**, urmata de **consolidarea acestuia, ca urmare a interventiei trombinei, ce catalizeaza transformarea fibrinogenului in fibrina**.

In conditii fiziologice, trombocitele nu adera intre ele, la alte celule din singele circulant sau la celulele endoteliale. Acest lucru se datoreaza sarcinilor electronegative de pe suprafata membranelor trombocitare - **radicalii de acid sialic** si respectiv endoteliale - **proteoglicanii heparan sulfat**.

Un alt factor ce impiedica aderarea trombocitelor la endoteliul intact este actiunea prostacilinei (PGI₂), produsa de celulele endoteliale, un puternic inhibitor al functiilor trombocitare. Un alt produs al celulelor endoteliale cu efect inhibitor asupra functiilor plachetare este NO.

Aderarea si agregarea plachetelor este mediata de **receptorii membranari trombocitari**, proteine integrale membranare, ce apartin familiei **integrinelor**.

Acestia sint: **complexul GPIb/IX/V**, care asigura aderarea plachetara prin legarea de **factorul von Willebrand**; **receptorul GPIIb/IIIa**, proteina membranara Ca-dependenta specifica trombocitului, care mediaza **agregarea plachetara** prin legarea **fibrinogenului** si/sau a **factorului von Willebrand (FvW)**, acesta din urma existind in mod normal in plasma, unde este eliberat de celulele endoteliale si de megakariocite. Eliberarea sa din celulele endoteliale este stimulata de forte mari de forfecare, anumite citokine si hipoxie. Se gaseste si in **granulele α trombocitare**.

Exista si alti receptori pentru glicoproteine ce declanseaza aderarea plachetara: **GPIa/IIa**, **GPVI pentru colagen**, **GP1c/IIa pentru fibronectina si laminina**. Membrana trombocitara mai exprima receptori pentru **ADP**, **trombina**, **epinefrina**, **colagen**, **TxA₂**, **serotonina**, **vasopresina**, **PAF (factorul activator plachetar)** si **trombospondina**. Trombocitele activate exprima la suprafata membranei **P-selectina**, ce mediaza interactiunile cu leucocitele; exprima, de asemenea, si **ligandul CD40**, ce activeaza o suita de celule cu activitate pro-inflamatorie; trombocitele activate elibereaza **chemokine** si o forma solubila a **ligandului CD40**, initiind, astfel, o reactie inflamatorie.

In structura trombocitelor intra **microtubuli si microfilamente**. Microtubulii se gasesc sub membrana trombocitara, sint alcatuiti din **tubulina** si fac parte din citoscheletul plachetar, contribuind la contractia trombocitului activat. In strinsa asocierea cu acestia sint **microfilamentele** care contin **actina** si **miozina** care participa la emiterea de catre trombocitul activat a **pseudopodelor**.

Sistemul dens tubular/reticulul sarcoplasmic trombocitar reprezinta **rezervorul de calciu** al acestuia si totodata sediul **sintezei de prostaglandine si ciclooxigenaza**. **Sechestrarea Ca ionizat este posibila datorita calreticulinei**. Eliberarea Ca de la acest nivel necesita legarea de **inositol-1,4,5-trifosfat (IP3)**; AMPc impiedica eliberarea Ca, fie prin stimularea pomparii Ca in sistemul dens tubular, fie prin blocarea efectului IP3.

In trombocit exista depozite de glicogen, peroxizomi (ce reprezinta sediul β -oxidarii acizilor grasi, al sintezei de fosfolipide si al sintezei factorului activator plachetar PAF) si citeva mitocondrii mici, situate in apropierea membranei; ele sint sediul metabolismului oxidativ plachetar. De asemenea, trombocitul contine lizozomi cu continut bogat in hidrolaze acide.

In citoplasma trombocitului exista **granule** in care sint stocati diferiti compusi secretati de trombocitul activat, ei declansind si amplificind **agregarea plachetara**.

Granulele dense contin concentratii mari de **ADP**, **Ca**, **serotonina** si alte nucleotide.

Granulele α contin o serie de proteine secretate de trombocitul activat: **factorul 4 plachetar (antiheparina)**, **β tromboglobulina**, **factorul de crestere derivat din plachete (PDGF)**, **factorul V**, **FvW**,

fibrinogenul, kininogenul cu GM mare (HMWK), factorul XIII si variate glicoproteine importante pentru aderarea plachetara, cum sint trombospondina si fibronectina.

Trombocitele contin si un **sistem canalicular deschis**, ce reprezinta o retea complexa a invaginarilor membranei trombocitare cu aspect vacuolar, care cresc semnificativ suprafata trombocitului. Continutul granulelor trombocitare este eliberat prin acest sistem.

Cinetica trombocitara

Numarul trombocitelor circulante este mentinut constant datorita echilibrului dintre producerea lor la nivelul maduvei hematogene (MH) si distrugerea lor la nivel splenic. Durata medie de viata a trombocitului este de 10 zile. Aproximativ 2/3 din totalul trombocitelor se gasesc in singele circulant, restul de 1/3 fiind la nivel splenic.

La nivelul MH, megakariocitele se formeaza din **unitatile formatoare colonii pentru megakariocite (UFC-Meg)**, care deriva din **celulele stem pluripotente**.

Megakariocitele mature trombocitogene sint cele mai mari celule de la nivelul MH: au diametru de 40-60 μ si **nucleu multilobular, poliploid, continutul nuclear fiind 128N. Ele sint singurele celule poliploide normale din MH.** Acest lucru se datoreaza unui proces specific de maturare a megakariocitelor, denumit **endomitoză**, in timpul caruia are loc replicarea continua a ADN-ului celular, in absenta diviziunii nucleare si citoplasmatică.

Reglarea trombocitopoiezei. Trombopoietina (TPO) este principalul factor reglator al trombocitopoiezei. Este un hormon cu GM de 45-70-kDa.

Structural se aseamana in mare masura cu eritropoietina. Este produs la nivelul mai multor organe: ficat, rinichi, muschi scheletic si stroma maduvei hematogene (MH). In conditii fiziologice, cam jumătate din cantitatea totala de TPO e sintetizata la nivel hepatic, dar in conditii de trombocitopenie, MH creste substantial producerea sa. In vitro, acest hormon favorizeaza supravietuirea si proliferarea megakariocitelor, iar in vivo stimuleaza producerea de trombocite. De asemenea, exercita efecte asupra celulelor stem hematopoietice. Receptorul pentru TPO este un produs al protooncogenei c-Mpl si este membru al familiei receptorilor pentru citokine si hormoni, precum receptorii pentru eritropoietina, G-CSF, (factorul stimulator al coloniilor de granulocyte), hormonul de crestere, leptina, etc.

In reglarea trombocitopoiezei mai intervin citeva citokine: **IL-6, IL-11**, care stimuleaza producerea de TPO, **Factorul eliberat de celulele stem** (denumit si Factorul de crestere al mastocitelor, inrudit cu Factorul stimulator al coloniilor de macrofage) care stimuleaza dezvoltarea coloniilor megakariocitare cind este asociat cu alte citokine.

O chemokina (substanta cu efect chemotactic pentru leucocite) implicata in trombocitopoieza este **Factorul 1 derivat din celulele stromale (SDF-1)**, care amplifica efectul TPO in vitro.

Trombocitopoieza este inhibata de citiva factori: Transforming Growth Factor- β se gaseste in MH si in granulele α plachetare si blocheaza ciclul celular megakariocitar.

IFN- α si IFN- β inhiba megakariopoieza prin mecanisme variate, reprezentate in principal prin interferenta si blocarea cailor de semnalizare stimulatorie ale proliferarii celulare induse de citokine.

Functiile plachetare

Functia majora a trombocitelor este de a "sigila" bresele din sistemul vascular. In acest scop, ele vor adera la structurile subendoteliale expuse ca urmare a injuriei vasculare survenite, se vor activa si vor suferi agregare, pierzindu-si individualitatea (metamorfoza viscoasa) si formind trombusul alb plachetar. Ele declanseaza si coagularea, ce se finalizeaza prin formarea trombusului rosu.

Aderarea plachetara este posibila ca urmare a expunerii receptorilor trombocitari la liganzi din matricea subendoteliala : **colagenul**, de care trombocitul adera prin receptorii GPIa/IIa si GPVI pentru colagen si **FvW**, de care trombocitul se leaga prin receptorii GPIb pentru FvW. Consecutiv aderarii, trombocitele se vor activa si integritatea de suprafata vor suferi modificari conformationale ce le vor creste afinitatea pentru liganzi, mai ales pentru fibrinogen si FvW, inclusiv pentru FvW care se ancoreaza de colagen in zona subendoteliala. Agregarea plachetara este declansata cind acesti liganzi se leaga simultan de receptorii situati pe 2 trombocite distincte, ceea ce stabilizeaza trombul plachetar format. Activarea plachetara duce la generarea de TxA2 provenit din metabolismul acidului arahidonic, sub actiunea ciclooxygenazei 1, eliberarea de ADP si serotonina, ce amplifica agregarea plachetara prin feed-back pozitiv ce asigura un raspuns hemostatic adecvat.

Receptorii trombocitari pentru ADP sint P2Y₁₂ si pot fi blocati de antagonistul specific, **clopidogrel (Plavix)**, cu efect de blocare a agregarii plachetare.

Aspirina blocheaza ciclooxygenaza 1 (COX-1), impiedicind aparitia TxA2 si avind, astfel, efect antiagregant plachetar.

Activarea plachetara induce modificarea formei trombocitului, care din disc devine sferic si completa reorganizare a citoscheletului si a membranei, cu formare de prelungiri initial lamelipode si apoi filopode. Activarea receptorilor plachetari si formarea complexelor receptor-ligand induce activarea fosfolipazei, care hidrolizeaza inozitol 4-5 difosfatul membranelor in inozitol-3-monofosfat (IP3) si diacilglicerol (DAG). IP3 se leaga de sistemul tubular dens si permite cresterea concentratiei Ca in trombocit, care favorizeaza formarea complexelor actina-miozina, aparitia prelungirilor plachetare si secretia agentilor trombocitari cu multiple functii.

Eliberarea prin secretie din trombocitul activat a unor agenti vasoactivi, mitogeni si a unor chemokine induce un raspuns inflamator. Prezenta P-selectinei la suprafata trombocitului activat si a celulelor endoteliale atrage leucocitele la sediul injuriei vasculare. Factori limitanti ai activarii si agregarii plachetare urmate de formarea trombusului plachetar sint fluxul de sange, sinteza de PGI₂ si NO de catre

celulele endoteliale, precum si eliberarea din endotelii si din limfocitele circulante a compusului CD39, care transforma ATP si ADP in AMP.

Alte functii plachetare. Trombocitele sunt implicate in apararea imuna. Ele exprima la suprafata membranei receptori pentru IgG si IgE si pot fi activate de complexe imune circulante. Sunt activate si de PAF eliberat de neutrofile, bazofile si macrofage. Totodata, sunt capabile de activitate citotoxica mediata de anticorpi si elibereaza mediatori importanti pentru reactiile de hipersensibilitate de tip II (transfuzii de sange incompatibil) si III (boala complexelor imune circulante). Trombocitele sunt capabile sa distruga paraziti (larve ale trematodului hepatic, *Toxoplasma gondii*), activitatea lor citotoxica fiind amplificata de terapia cu citokine (IFN γ si TNF α).

Formarea trombusului alb plachetar (hemostaza primara) si aparitia trombusului rosu, alcatuit din reseaua de fibrina (hemostaza secundara sau coagularea propriuzisa) sunt fenomene corelate, dar distincte, care se pot derula in paralel, dar si unul in absenta celuilalt. Trombocitele activate sunt implicate in coagulare, ele eliberand cantitati mici din factorii implicati in acest process, iar pe de alta parte, unii factori ai coagularii (fibrinogenul, trombina) sunt implicati in formarea dopului plachetar.

Clasic, se considera coagularea singelui ca fenomen ce se deruleaza pe doua cai, intrinseca si extrinseca.

Calea intrinseca este declansata de contactul singelui (a factorului de contact XII) cu o suprafata activatoare incarcata negativ. In laborator, aceasta suprafata poate fi sticla sau caolinul. In vivo, se presupune ca factorul activator este membrana trombocitului activat sau membrana bazala expusa ca urmare a lezarii endoteliului.

Calea extrinseca se declanseaza la contactul singelui cu **factorul tisular**, prezent pe membranele celulare din tesuturile lezate. Ambele cai converg spre o **cale finala comuna**, care culmineaza cu **generarea de trombina, aceasta clivind fibrinogenul solubil in fibrina insolubila, stabila; reseaua de fibrina alcatuiește trombusul rosu, definitiv, rezistent.**

In ambele cai, se produc reactii in lant de proteoliza limitata, controlata. Proteinele cascadei coagularii contin un peptid semnal, o propeptida, un domeniu asemnator factorului de crestere epidermal, un domeniu Kringle si un domeniu catalitic. Propeptida contine niste resturi de acid glutamic care sufera o γ -carboxilare in prezenta **vitaminei K**, proces esential pentru fixarea Ca, indispensabil coagularii. Domeniul catalitic este omolog cu alte serinproteaze, precum tripsina si chimotripsina.

In cascada caili intrinseci, contactul factorului XII cu o suprafata activatoare incarcata negativ il transforma pe acesta in factor XII activat, XIIa. Cofactorul factorului XII este kininogenul cu GM mare (HMWK), produs de trombocit, care ancoreaza factorul XII la membrana trombocitara. Factorul XIIa ancorat transforma prekalikreina (PK) in kalikreina, aceasta din urma, prin feed back pozitiv, amplificand conversia factorului XII in factor XIIa. In continuare, factorul XIIa scindeaza proteolitic factorul XI (Factorul antihemofilic C) la factorul XIa, care este ancorat la suprafata activatoare prin HMWK. Odata activat, factorul XIa scindeaza factorul IX (factorul antihemofilic B) la factorul IXa. Factorul VIII (Factorul

antihemofilic A) nu este proteaza; el circula legat de FvW, care il stabilizeaza. El este cofactor pentru factorul IXa. Activitatea factorului VIII este mult crescuta ca urmare a activarii sale de catre trombina sau de catre factorul Xa, prin feed back pozitiv. Factorii IXa si VIIIa, impreuna cu Ca (ce poate fi eliberat de trombocitele activate) si fosfolipidele incarcate negativ de pe suprafata membranelor activatoare alcatuiesc un complex denumit **tenaza**. Acesta converteste factorul X la factorul Xa, care are rol de proteaza.

Declansarea cascadei caii extrinseci se datoreaza contactului factorului plasmatic VII cu o proteina de membrana integrala, denumit factorul tisular (tromboplastina tisulara sau factorul III), care este exprimat de celule ne-vasculare si care este receptor pentru factorul VII. La aparitia unei brese vasculare, factorul VII intra in contact cu factorul tisular si este activat ne-proteolitic de acesta, devenind factorul VIIa. Factorul VIIa, factorul tisular si Ca formeaza un complex analog tenazei, care scindeaza proteolitic factorul X la factorul Xa. Legarea factorului X de acest complex impiedica disocierea factorului VIIa de factorul tisular. O descoperire importanta o constituie activarea de catre complexul factor tisular-factor VIIa nu numai a factorului X, ci si a factorului IX.

In cazul prezentei unui focar inflamator, factorul tisular poate fi exprimat de monocitele circulante si de endotelii, ceea ce favorizeaza declansarea coagularii, asa cum se intimpla in septicemii.

Calea comuna debuteaza odata cu aparitia factorului Xa pe una dintre cele doua cai descrise. Ea consta in formarea complexului denumit **protrombinaza**, format din factorul Xa, factorul Va, Ca si fosfolipidele incarcate negativ. Factorul V este activat de trombina dar si de factorul Xa, in faza initiala a coagularii.

Complexul **protrombinaza** actioneaza proteolitic asupra **protrombinei circulante**, pe care o transforma in **trombina**. Aceasta este proteaza cheie a cascade coagularii, care are multiple actiuni: principal sa actiune este de a cataliza **proteoliza fibrinogenului**. Acesta este un dimer ai carui monomer sint alcatuiti din 3 tipuri de lanturi: $A\alpha$, $B\beta$ si γ . Prin clivarea lantului $A\alpha$ ea elibereaza fibrinopeptidul A, iar prin clivarea lantului $B\beta$, elibereaza fibrinopeptidul B, ceea ce duce la formarea **monomerilor de fibrina**, inca solubili. Ei polimerizeaza spontan, formind un **gel de polimeri de fibrina**, in care sint prinse elementele figurate ale singelui. In timpul polimerizarii, o serie de proteine plasmatice se ancoreaza de retea in curs de formare: fibronectina, trombospondina, FvW. Trombina activeaza **factorul XIII**, care devine factor XIIIa, care mediaza formarea de legaturi covalente intre lanturile polimerilor de fibrina, ceea ce duce la aparitia **retelei de fibrina stabila**, care este si mai putin solubila comparativ cu fibrina.

Fibrina actioneaza ca "antitrombina I", prin sechestrarea trombinei in trombusul in curs de formare si de asemenea prin blocarea activitatii catalitice a trombinei legate de fibrina.

Trombina intervine prin mecanism de feedback pozitiv, catalizind formarea de trombina noua din protrombina si activind factorii VIII si V, care devin factorii VIIIa si Va. Ea activeaza proteolitic si factorul XI. Intervine in activarea prin scindare a unei game variate de receptori exprimati la suprafata mai multor tipuri de celule din peretii vaselor sange. Este unul dintre cei mai puternici activatori plachetari in vivo, stimulind agregarea plachetara si favorizind interactiunile trombocit-leucocit in sediul injuriei

vasculare, prin medierea eliberării din endotelii a FvW și a P-selectinei; stimulează eliberarea din endotelii a NO, PGI₂, ADP, a activatorului plasminogenului tisular, a factorului activator plachetar (PAF), producerea de chemokine, ciclooxygenaza și prostaglandine. Trombina joacă un rol crucial nu numai în coagulare, dar și în răspunsul inflamator și proliferativ asociat lezării vasculare, așa cum se întâmplă în ateroscleroza și cancer.

Modelul coagularii în cascada rămâne util pentru a explica modul în care secvențele acestea se derulează *in vitro*, în condițiile în care se lucrează cu plasmă recoltată pe anticoagulant (chelator de Ca) și în condiții statice, în care fluidul nu interacționează cu peretele vascular sau cu suprafețele celulare. Acest model clasic sugerează ca cele două cai se desfășoară independent și redundant, fapt contrazis de datele observate în clinică: deficite ale componentelor inițiale ale cailor intrinseci (FXII, HMWK, PK) induc prelungirea importantă a timpului aPTT, dar nu se manifestă clinic ca tendință de sîngerare. Deficitul de factor XI are manifestări clinice variate, tendința la sîngerare fiind absentă la unii pacienți. În schimb, deficitul de factori VIII și IX se manifestă prin sîngerări importante, deși testele de laborator indică derularea normală a coagularii pe calea extrinsecă. Similar, deficitul de factor VII se manifestă clinic prin sîngerări severe, deși testele indică derularea normală a coagularii pe calea intrinsecă. Așadar, datele clinice argumentează împotriva ideii ca cele două sisteme acționează ca furnizoare independente de FXa. Modelul actual este cel care ia în considerare participarea esențială a celulelor în derularea coagularii, mai exact a suprafețelor celulelor implicate. Dintre factorii coagularii, factorul tisular este singurul permanent atașat la suprafața membranei. Alți factori ai coagularii conțin reziduuri de acid glutamic carboxilate de vitamina K, care le permit atașarea de fosfolipidele membranare încărcate negativ, mediată de Ca. Membranele celulelor activate sau lezate (plachete expuse acțiunii activatorilor sau celule ce suferă apoptoză) expun pe versantul extern al membranei fosfatidilserina (PS) și fosfatidiletanolamina (PE), ceea ce transformă suprafața membranei într-un suport cu rol pro-coagulant.

Un alt factor cu profunde implicații în controlul hemostazei este reprezentat de microparticulele provenite din diferite celule: celule endoteliale, trombocite și monocite, iar în anumite boli, provenite din eritrocite și/sau granulocite. Nivelul microparticulelor circulante crește în boli precum diabetul zaharat, septicemii și afecțiuni cardiovasculare, ceea ce duce la tulburări ale hemostazei. Microparticulele conțin proteine de suprafață similare cu cele prezente pe membrana celulelor de origine – FvW pentru cele provenite din celule endoteliale, P-selectina pentru cele de origine plachetară, factorul tisular pentru cele de origine monocitară. Toate aceste proteine pot participa la reacțiile coagularii, mai ales atunci cînd microparticulele expun o membrană pro-coagulantă.

Modelul celular al generării fibrinei

Toate datele și observațiile actuale indică drept unic factor relevant ca inițiator *in vivo* al coagularii - factorul tisular. Acest model include contribuția unor suprafețe membranare celulare în generarea fibrinei.

Faza de initiere se deruleaza extravascular, pe suprafata unei celule purtatoare de factor tisular si este declansata cind o injurie vasculara permite contactul singelui circulant cu aceasta suprafata, pe care se formeaza complexul FT-FVIIa. Acesta activeaza mici cantitati de factor IX si X, iar factorul Xa activeaza factorul V, care activat devine Va, co-factor pentru Xa, de care se leaga si formeaza protrombina. Aceasta scindeaza protrombina, generind mici cantitati de trombina. Aceasta difuzeaza la distanta de suprafata activatoare, inspre plachete.

Faza de amplificare. Micile cantitati de trombina formate activeaza trombocitele, ale caror suprafete membranare devin pro-coagulante; trombocitele elibereaza granulele cu bogat continut in factori ai coagularii si in agonisti ce amplifica activarea trombocitara. Ca eliberat favorizeaza legarea factorilor coagularii de suprafata membranara plachetara activata. Trombina activeaza FXI si FV la suprafata trombocitelor si cliveaza FvW de FVIII (care circula legate in plasma), astfel, FvW amplifica aderarea si agregarea plachetare, iar FVIII devine activat sub actiunea trombinei.

Faza de propagare. Se deruleaza la suprafata trombocitelor activate, la nivelul careia, prezenta liganzilor induce interactiuni intre trombocite ce favorizeaza agregarea plachetara. FIXa (generat in faza de initiere) se leaga de FVIIIa, (generat in faza de amplificare) la suprafata trombocitelor si formeaza tenaza caili intrinseci, ceea ce duce la aparitia rapida de FXa. Acesta se leaga de FVa (generat de trombina in faza de amplificare) si scindeaza protrombina in trombina, care va scinda fibrinogenul in fibrina. Monomerii de fibrina polimerizeaza spontan, iar fibrina devina stabile sub actiunea FXIII, activat de trombina.

Modelul celular defineste mai bine parametrii necesari pentru generarea unei cantitati adecvate de trombina. Astfel, pentru finalizarea coagularii, trombina trebuie sa apara direct pe suprafata trombocitelor activate, nu doar pe suprafetele celulare purtatoare de factor tisular. Acest model sugereaza ca cele doua cai clasice, intrinseca si extrinseca reprezinta de fapt sisteme de generare a FXa ce se deruleaza pe suprafete celulare diferite.

Controlul hemostazei este realizat de un sistem complex de substante anticoagulante ce au ca principal sursa **celula endoteliala**. Aceasta transforma PGH₂- prostaglandina derivata din metabolizarea acidului arahidonic sub actiunea ciclooxygenazei 1 (COX-1) - in **prostaciclina (PGI₂)**. PGI₂ are efect vasodilatator si antiagregant plachetar, impiedicind astfel, coagularea. Endoteliile produc si **NO** care inhiba aderarea si agregarea plachetare. Alti factori cu efect anticoagulant eliberati de endotelii sint:

1.**Inhibitorul caili factorului tisular (ICFT)** este glicozilfosfatidilinozitol (GPI) legat de membrana celulelor endoteliale, unde asigura o suprafata antitrombotica. El se leaga de complexul factor tisular-FVIIa-Ca si blocheaza activitatea proteazica a factorului VII.

2.**Antitrombina III (ATIII)** este o proteina plasmatica ce se leaga de - si inhiba FIXa, FXa, trombina, FXIa si FXIIa, proces amplificat de heparansulfat si heparina. Heparansulfatul este prezent la suprafata majoritatii celulelor, inclusiv pe celulele endoteliale. **Heparina** este eliberata de bazofile si mastocite. In prezenta heparinei, ATIII blocheaza activitatea complexului factor tisular-FVIIa.

3.Trombomodulina este un produs glicozaminoglican al celulelor endoteliale. Ea poate fixa trombina circulanta, cu care formeaza un complex, eliminand-o din circulatie si inhibind astfel coagularea. Trombomodulina poate fixa si Proteina C.

4.Proteina C se leaga de trombomodulina din complexul trombina – trombomodulina si apoi este **activata de trombina (Ca)**. In forma sa activata, impreuna cu co-factorul sau, Proteina S, inactiveaza factorii Va si VIIIa, inhibind coagularea.

5.Proteina S are activitate anticoagulanta, fiind co-factorul Proteinei C.

6.Complexul Proteina Z/Inhibitorul dependent de proteina Z (ZPI). Proteina Z este o glicoproteina plasmatica vitamina K-dependenta, lipsita de activitate proteazica; ea circula legata de inhibitorul dependent de proteina Z. Acest inhibitor, o proteaza din clasa serpinelor, inhiba activitatea factorilor Xa si XIa. Asocierea Proteinei Z la ZPI amplifica de 1000 de ori inactivarea FXa, dar nu este necesara pentru inactivarea FXIa. Asemnator altor serpene, ZPI activeaza ca substrat “suicidar” pentru tinta sa, fiind inactivat la rindul sau de FXa si FXIa.

Actiunea celulelor Kupffer hepatice de indepartare din circulatie a factorilor de coagulare activati are de asemenea rol anticoagulant.

Explorarea in clinica a hemostazei

Hemostaza primara este explorata in clinica prin **numaratoarea de trombocite, testul fragilitatii capilare Rumpel-Leed si prin timpul de singerare TS.**

Numaratoarea de trombocite. Un numar de trombocite > 100.000 asigura o hemostaza primara in limite normale, cu un TS normal si absenta hemoragiilor clinic manifeste. In trombocitopenii (scaderea numarului de trombocite in singele circulant), severitatea manifestarilor clinice este direct proportional cu severitatea trombocitopeniei. In trombocitopeniile sub $20000/\text{mm}^3$, sau chiar sub $10000/\text{mm}^3$, TS este mult prelungit (30 minute-ore) si apar spontan hemoragii cutanate (purpura) si/sau hemoragii interne (intracerebrale, digestive). Orice trombocitopenie sub $100000/\text{mm}^3$ necesita efectuarea frotiului de singe periferic pentru cercetarea morfologiei si a modului de dispersie a trombocitelor (isolate, grupate). In cazul confirmarii trombocitopeniei, este obligatorie efectuarea punctiei medulare, pentru evaluarea prezentei megakariocitelor si a stadiului lor de maturare. Medulograma normal evidentiaza 1-2% megakariocite trombocitogene.

Testul fragilitatii capilare Rumpel Leed este o modalitate de a aprecia in clinica rezistenta mecanica a capilarelor sanguine prin aplicarea unei presiuni negative (ventuza) sau pozitive (manseta tensiometrului sau garou elastic, cea mai frecvent utilizata metoda) si observarea numarului de petesii (hemoragii cutanate punctiforme) aparute ca urmare a efracției capilarelor pe suprafata unui cerc cu diametrul de 2cm, dupa aplicarea presiunii timp de 5 minute. Acest test poate fi modificat in purpura vasculara, cu

etiopatogenie multipla si in purpura trombocitara, cu etiopatogenie si manifestari clinico-evolutive foarte variate.

Testul nu este modificat in majoritatea tulburarilor coagularii.

Timpul de singerare (TS) permite evaluarea in ansamblu a hemostazei primare si este utilizat de rutina inaintea interventiilor chirurgicale si pentru monitorizarea tratamentului antiagregant plachetar. Alungirea duratei TS este sugestiva pentru trombocitopenii. De asemenea, TS este alungit in trombocitopatii: alterari functionale ale trombocitelor, asa cum se intimpla in boli congenitale, precum trombostenia Glanzman, in care apar alterari calitative/cantitative ale GP IIb/IIIa, in boala Bernard-Soulier, caracterizata de anomalii cantitative/calitative ale GP Ib, in afectiuni ereditare, precum boala von Willebrand, caracterizata de anomalia FvW sau in trombocitopatii dobindite (in uremie).

Hemostaza secundara

Timpul de coagulare (TC) exploreaza calea intrinseca a coagularii (activarea de contact). Este un test putin sensibil, care poate fi normal la indivizi cu deficit moderat al coagularii. Alungirea TC nu indica ce faza a coagularii este afectata (comuna, intrinseca), nici factorul deficitar. TC prelungit se poate datora unui deficit de factori implicati in calea comuna (X, V, II, I) sau in calea intrinseca (VIII – hemofilia A, IX – hemofilia B, XI – hemofilia C, XII), unui deficit plachetar (trombocitopenie, trombocitopatie) sau prezentei unui inhibitor al coagularii (administrarea de heparina, derivati cumarinici, ca warfarina care blocheaza efectele vitaminei K la nivel hepatic si astfel blocheaza activitatea factorilor coagularii II, VII, IX, X), sau prezentei de anticorpi anti-FVIII.

PTT si aPTT exploreaza calea intrinseca a coagularii. Alungirea lor se datoreaza deficitelor congenitale sau dobindite ale factorilor coagularii implicati in calea intrinseca si comuna, **dar nu si ale F XIII**. Acestea pot fi hemofilii, deficit de vitamina K, afectiuni hepatice, hipofibrinogenemii, boala von Willebrand, coagularea intravasculara diseminata (CID).

Valori scazute ale PTT si aPTT se pot inregistra la debutul coagularii diseminate intravasculare si in cancerele cu metastaze.

CID este o tulburare trombohemoragica in care singerarea difuza in multiple sedii este semnul clinic major, dar evenimentele fiziopatologice initiale sint de natura trombotica. Trebuie considerata un fenomen secundar, a carui cauza declansatoare trebuie gasita, in vederea unei terapii adecvate. Conditiiile in care se declanseaza CID pot fi de cauza infectioasa (septicemii cu germeni Gram negativi, soc toxico-septic), obstetricala (dezlipire de placentă, embolie cu lichid amniotic, sarcina oprita in evolutie cu retentia fatului mort in uter), vasculara (anevrisme, tumori vasculare gigante – hemangioame), hematologica (hemoliza masiva intravasculara de diverse cauze) sau traumatica.

In CID, datele de laborator indica urmatoarele modificari: trombocitopenie cu prelungirea TS, prelungirea PTT, a timpului de protrombina Quick, a timpului de trombina, cresterea produsilor de

degradare a fibrinei, anemie hemolitică microcitară (datorată efectului traumatic al trombilor formați în vasele mici asupra hematiilor).

PTT și aPTT nu se modifică în sindroame hemoragice de cauză plachetară.

Timpul de protrombina (PT, prothrombin time) sau Timpul Quick este un model de coagulare extrinsecă in vitro și are cea mai scurtă durată, comparativ TC, PTT și aPTT (12-15 secunde). Alungirea sa indică un deficit al factorilor coagularii implicați în caile comune (X, V, II, I) și extrinsecă (VII) sau prezența de anticoagulante naturale (antitrombine, inhibitori ai polimerizării fibrinogenului) sau medicamente anticoagulante (heparina, cumarinice). El este alungit și în afecțiunile hepatice și în deficitul de vitamina K.

INR (International Normalized Ratio – raport normalizat internațional) este raportul ($\frac{PT_{\text{masurat}}}{media\ PT\ \text{martor}}^{ISI}$); PT măsurat este normalizat la valoarea mărtoarelor sănătoși, valoare ce reprezintă media geometrică a PT de la un anumit număr de indivizi sănătoși; ISI (International sensitivity index) este un parametru de standardizare a tromboplastinelor folosite și reprezintă panta de calibrare a relației PT măsurat la pacient și media PT mărtoare.

Exprimarea PT ca INR este un instrument util în monitorizarea pacienților ce urmează terapie anticoagulantă. La subiecții sănătoși, valoarea INR este 0,9-1,1. Pentru pacienții cu risc de tromboze venoase profunde se recomandă terapia anticoagulantă până la valori ale INR de 1,5-2, pentru cei cu tromboze venoase profunde manifeste se recomandă menținerea INR la valoarea 2-3, ca și în cazul pacienților cu fibrilație atrială și risc de tromboembolism pulmonar; în cazul pacienților cu proteze valvulare mecanice și la cei cu tromboembolism pulmonar INR este indicată valoarea INR de 3-4,5.

Timpul de trombina (TT) măsoară timpul necesar formării fibrinei. Este alungit la pacienții ce fac tratament cu heparina și la cei cu anomalii cantitative (hipofibrinogenemie) sau calitative ale fibrinogenului. Este scurtat la pacienții cu hipercoagulabilitate datorată scăderii heparinei fiziologice.

Fibrinogenul plasmatic are valori normale de 200-400mg/dL. Valori scăzute se asociază cu stări de hipocoagulabilitate, întâlnite în: malnutriție, afecțiuni hepatice, deficit congenital de fibrinogen, prezența de fibrinolizine, coagulopatia de consum. Niveluri crescute apar în inflamații/infecții acute (fibrinogenul este o proteină de fază acută), sarcină, traumatisme, accident vascular cerebral, infarct miocardic acut, neoplazii, arteriopatii periferice, etc.

Teste de evaluare a inhibitorilor coagularii.

Dozarea antitrombinei plasmatice. Valori scăzute se întâlnesc în tromboembolismul venos idiopatic, în coagulopatia intravasculară diseminată (CID) și în timpul terapiei cu heparina.

Dozarea proteinelor C și S plasmatice. Valori scăzute se întâlnesc la pacienții cu tromboembolism venos idiopatic și în coagulopatia intravasculară diseminată.

Fibrinoliza. După formarea trombusului roșu, definitiv, are loc **retractia cheagului**, ca urmare a interacțiunii dintre filamentele de actina și miozina trombocitare și consecutiv contractiei prelungirilor trombocitelor activate, prinse în ochiurile rețelei de fibrina. Astfel se elimină **serul** și crește rezistența trombusului format, prin compactarea fibrelor de fibrina. Urmează lizarea cheagului format, prin procesul de fibrinoliza (tromboliza), ca urmare a activării **plasminogenului** și formării **plasminei**. **Activatorii plasminogenului sunt cel tisular și cel de tip urokinaza.**

Plasminogenul este precursorul plasminei. El este cu o glicoproteina plasmatică cu un singur lanț și cu GM mare, sintetizată la nivel hepatic. **Activatorul tisular al plasminogenului (APT)** este o protează serică ce are drept sursă **celulele endoteliale**. El se fixează la substrat prin cele două domenii kringle. Apariția fibrinei ca urmare a fibrinolizei realizată de plasmă accelerează transformarea plasminogenului în plasmă.

Activatorul plasminogenului de tip urokinaza (APU) este prezent în plasmă fie ca proteina cu lanț unic, fie ca produsul cu 2 lanțuri al unui clivaj. El scindează zimogenul plasminogen în plasmă activă proteazică. El poate realiza scindarea plasminogenului numai după ce se leagă de un receptor specific celular, denumit **receptorul activatorului plasminogenului de tip urokinazic (RAPU)**.

Plasmă este o serin - protează care poate descompune atât fibrinogenul, cât și fibrina. Fixarea plasminei pe fibrina se face prin ancorarea plasminei de resturile de lizină ale fibrinei. Plasmă scindează prin proteoliză fibrina stabilă în produsele ei de degradare. Ea poate scinda și activatorul tisular al plasminogenului, între domeniile kringle ale acestuia și secvențele proteazice. Plasmă îndeplinește și alte roluri: ea activează anumite metaloproteaze ale matrixului extracelular, enzime implicate în remodelarea tisulară. Poate iniția și angiogeneza (formarea de noi vase de sânge), prin inducerea eliberării de citokine care inițiază proliferarea și migrarea celulelor endoteliale.

Plasmă, împreună cu enzime eliberate din celulele lezate, transformă la nivel tisular **prokalikreina în kalikreina**. Kalikreina tisulară acționează asupra **kininogenului cu greutate moleculară mică (LMWK)**, din care rezultă **lizin-bradikinină (kalidina)**, asemănătoare bradikininei rezultate ca urmare a activării FXII. (FXIIa acționează asupra **prekalikreinei, cu formarea kalikreinei circulante; aceasta desprinde bradikinină din kininogenul cu greutate moleculară mare – HMWK**). Ambele kinine sunt puternic vasoactive, cresc permeabilitatea vasculară și participă la apariția focarului inflamator.

Reglarea fibrinolizei

Sistemul cardiovascular detine mecanisme de control al fibrinolizei, atât pentru amplificarea acesteia, cât și pentru inhibarea ei. Nivelul plasmatic al activatorului tisular al plasminogenului este crescut de catecolamine și de bradikinină. Activitatea acestuia este inhibată de doi inhibitori denumiți **serpine: inhibitorul 1 al activatorului plasminogenului (IAP-1) și inhibitorul 2 al activatorului plasminogenului (IAP-2)**. IAP-1 este produs în principal de celulele endoteliale și are activitate inhibitorie atât asupra activatorului tisular al plasminogenului, cât și asupra activatorului plasminogenului de tip urokinazic.

IAP-2 inhiba in principal APU. Nivelul sau creste in sarcina, fiind produs de placenta, ceea ce creste riscul de tromboza.

Proteina C activata inhiba IAP-1 si IAP-2, favorizind fibrinoliza.

Singurul inhibitor al plasmei este **α 2-antiplasmina (α 2-AP)**, care este secretata in principal la nivel hepatic si renal. Plasmina nelegata de fibrina, libera, este rapid inactivata de α 2-AP. Efectul inhibitor este mult redus atunci cind plasmina este atasata de reziduurile de lizina ale fibrinei.

Explorarea in clinica a fibrinolizei

Timpul de fibrinoliza (Timpul de liza a euglobulinei) evalueaza fibrinoliza si permite monitorizarea terapiei cu streptokinaza/urokinaza, care convertesc plasminogenul in plasmina. Fibrinoliza cheagului de sange normal de catre plasma pacientului in mai putin de o ora este patologica.

Stabilitatea cheagului de fibrina in uree scade in fibrinoliza intense si in cazul deficitului de factor XIII.

Activitatea plasminogenului este scazuta la rarii pacienti cu trombembolism idiopatic. Testul este util pentru monitorizarea nivelurilor de plasminogen la pacientilor cu CID si pentru monitorizarea pacientilor ce urmeaza terapie fibrinolitica.

Dozarea dimerilor D plasmatici este realizata prin teste imunologice. Ei rezulta ca urmare a proteolizei lanturilor de fibrina, sub actiunea plasmei. In mod normal ei sint absentii in plasma. Niveluri crescute sint intilnite in afectiuni asociate cu hipercoagularea sau in cazul fibrinolizei excesive.

MEDICATIA ANTITROMBOTICA

Cuprinde mai multe clase de medicamente: **antagonisti ai vitaminei K, grupul heparinei, antiagregante plachetare, enzime, inhibitori directi ai trombinei, inhibitori directi ai FXa.**

1. Antagonistii competitivi ai vitaminei K. Sint anticoagulante cumarinice care inhiba sinteza hepatica a factorilor coagulării II, VII, IX si X si a inhibitorilor coagulării: proteina C si proteina S. Prelungiesc TP si sint evaluate ca efect terapeutic prin INR. Exemple: Denumire Comerciala- sintrom, trombostop.

2. Grupul heparinei cuprinde heparine nefractionate (standard), heparine cu GM mica si heparinoizi. Heparinele cu GM mica au durata lunga de actiune.

Actiunea acestei clase este antitrombinica. Exemplu: clexan (Denumire Comuna Internationala-DCI - enoxaparinum), fraxiparin (DCI-nadroparinum).

3. Antiagregante plachetare. Acidul acetilsalicic blocheaza COX-1 si impiedica formarea de TXA₂. Tienopiridinele (clopidogrel-exemplu plavix) blocheaza receptorii trombocitari pentru ADP.

4.Enzimele sint produsi sintetici care transforma plasminogenul in plasmına.

5.Inhibitori directi ai trombinei – DCI - desirudinum, argatroban;

6.Inhibitori directi ai FXa - DCI - rivaroxabanum, apixaban.

7.Alte antitrombotice. DCI-defibrotide: scade nivelul de inhibitor al activarii plasminogenului 1.