

# Komórkowy model krzepnięcia

## Cell-based model of coagulation

Piotr Czupryński<sup>1</sup>, Marta Wawrzynowicz-Syczewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Novo Nordisk Pharma Sp. z o.o., Warszawa, Polska

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, Szczecin, Polska

**Summary:** The coagulation model has been modified several times since its first introduction in sixties as a waterfall or a cascade coagulation concept based on the adequate level of coagulation proteins. Then it evolved through the Y-shaped scheme when the intrinsic pathway of activation, initiated by factor XII, and extrinsic pathway initiated by the complex of factor VII and tissue factor (TF) converge into a common trunk at the level of activated factors V and X (prothrombinase complex). This model, recognized as binding for many years, does not explain, however, the complexity of coagulation *in vivo*. It has been recently shown that intrinsic and extrinsic pathways cannot operate independently, but initiate and propagate coagulation in a complementary fashion. It is now strongly suggested that the central role in hemostasis is played by the two sets of cells: TF-bearing cells and platelets, the latter being a key element of the coagulation process. The new hemostasis concept is called a cell-based model of coagulation, which occurs in three distinct but overlapping processes: initiation, amplification and propagation.

**Słowa kluczowe:** hemostaza • czynnik tkankowy • płytki krwi • wewnątrzpochodna droga aktywacji krzepnięcia • zewnątrzpochodna droga aktywacji krzepnięcia • komórkowy model krzepnięcia

**Key words:** hemostasis • tissue factor • platelets • intrinsic pathway • extrinsic pathway • cell-based model of coagulation

**Adres do korespondencji:** Marta Wawrzynowicz-Syczewska, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Arkońska 4, 71-455 Szczecin, Polska, e-mail: martaws@wp.pl

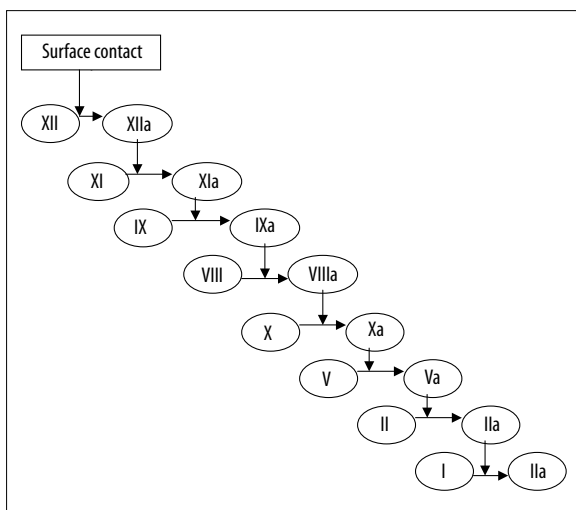
### Wstęp

Przyjęło się uważać za pewnik, iż przewlekłym chorobom wątroby towarzyszą istotne klinicznie zaburzenia pierwotnej hemostazy, krzepnięcia i fibrynolizy z uwagi na centralną rolę, jaką narząd ten pełni w produkcji czynników krzepnięcia, ich inhibitorów oraz większości składników układu fibrynolitycznego. Zakłada się, że w niewydolności wątroby, niezależnie od etiologii, pacjent przejawia tendencję do krwawień w związku z licznymi nieprawidłowościami laboratoryjnymi, towarzyszącymi upośledzonej syntezie wątrobowej. Tymczasem praktyka kliniczna wskazuje, że ani jawna skaza krwotoczna, ani krwawienia w czasie inwazyjnych procedur medycznych nie są zjawiskami częstymi u chorych z niedomogą funkcji wątroby. Oznacza to, że powszechnie stosowane w koagulologii testy laboratoryjne nie odzwierciedlają całej złożoności hemostazy *in vivo* oraz, że krzepnięcie nie jest procesem, który pierwotnie zależy od osoczowego poziomu białek tego układu [1]. Celem niniejszego artykułu jest przybliżenie czytelnikowi najnowszych poglądów na temat procesu krzepnięcia krwi, ponieważ na tym polu dokonał się w ostatnich latach znaczący postęp, zmieniający

zasadniczo nasze rozumienie fizjologii hemostazy i pozwalający na lepsze zrozumienie patofizjologii krzepnięcia w różnych stanach chorobowych.

Poglądy na temat hemostazy ewoluowały przez lata. Pierwszy duży przełom w badaniu nad procesem krzepnięcia nastąpił w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to R.G. Macfarlane opublikował w „Nature” doniesienie, w którym przedstawił procesy krzepnięcia jako ciąg następujących po sobie reakcji proteolitycznych i nazwał go kaskadą krzepnięcia (Rycina 1) [2]. W tym samym czasie na łamach „Science” dwóch autorów, Earl W. Davie i Oscar D. Ratnoff, wysunęło podobną koncepcję, nazywając ją wodospadowym modelem krzepnięcia [3]. Oba te modele były ważnym konceptualnym osiągnięciem, przedstawiającym procesy krzepnięcia jako szereg reakcji proteolitycznych, mogących działać jak biologiczny wzmacniacz, co obecnie jest paradygmatem wielu procesów fizjologicznych.

Dalsze badania nad procesami krzepnięcia doprowadziły do powstania kaskadowego modelu krzepnięcia określanego mianem schematu Y, w którym wydzielono dwie

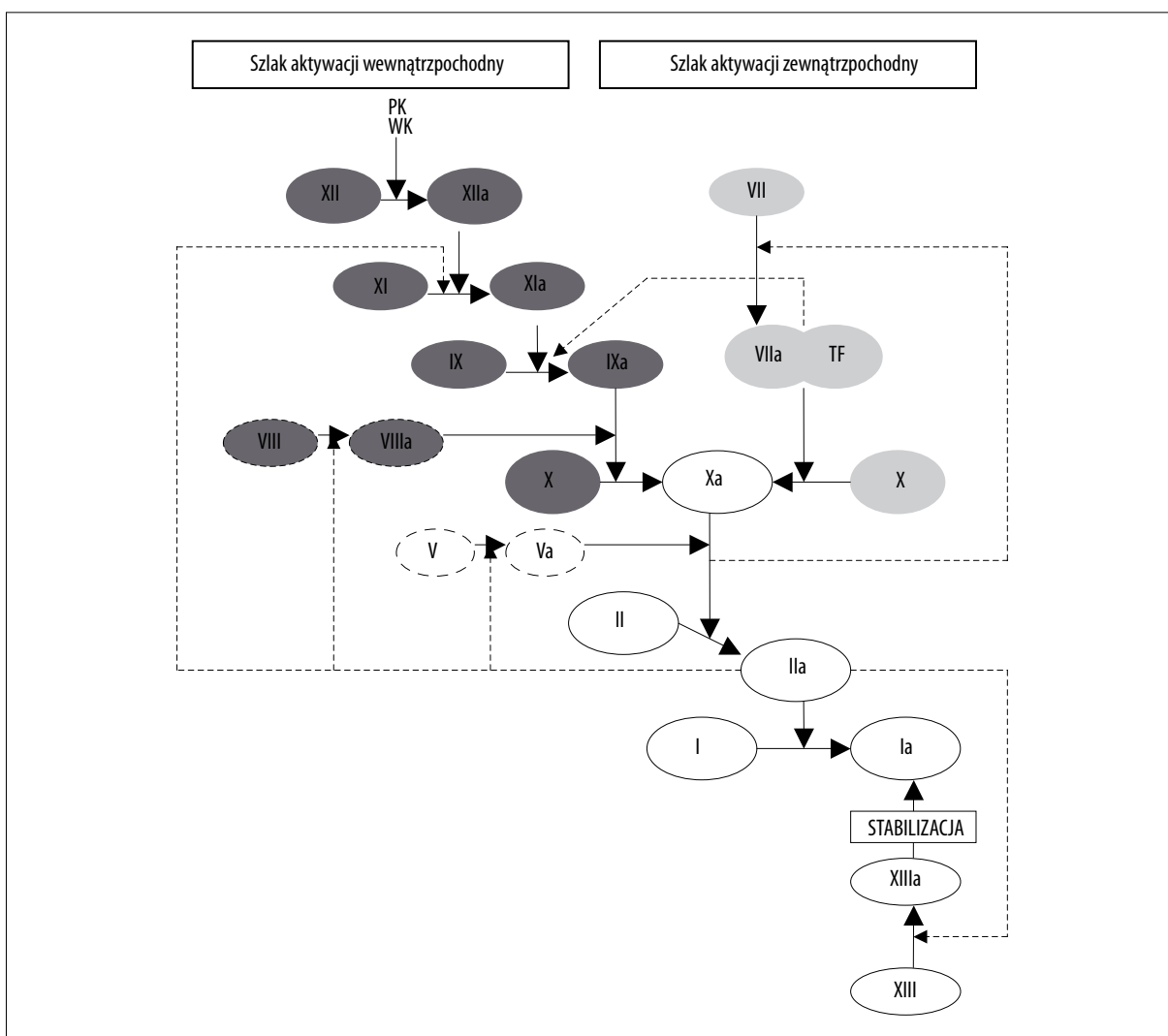


**Rycina 1.** Schemat kaskady krzepnięcia zaproponowany przez R.G. Macfarlane.

drogi aktywacji krzepnięcia, nazywając je zewnątrz- i wewnątrzpochodną drogą aktywacji. Droga zewnątrzpochodna

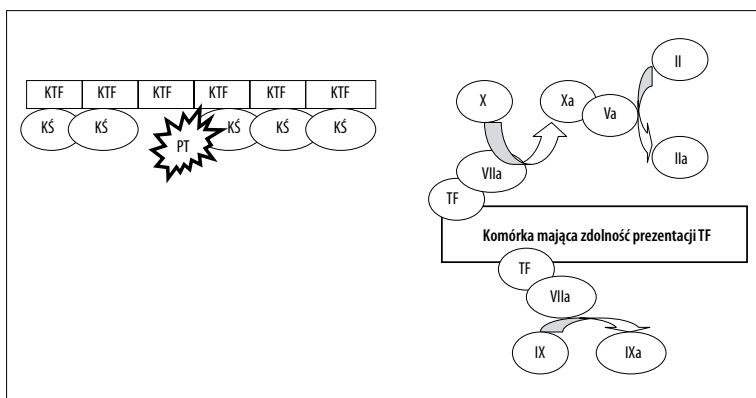
aktywowana jest przez kompleks czynnika VIIa i czynnika tkankowego TF (tissue factor), a droga wewnątrzpochodna – przez aktywację czynnika XII przy udziale prekalikreiny (PK) i wielkocząsteczkowego kininogenu (WK). Drogi te zbiegają się we wspólny szlak na poziomie kompleksu protrombinazy Xa/Va (Rycina 2). Jednocześnie zaobserwowano, że kompleksy krzepnięcia potrzebują do swej aktywacji jonów wapnia i fosfolipidów. Z braku innych koncepcji, które mogłyby właściwie opisywać zjawiska koagulologiczne, zachodzące *in vivo*, model procesu krzepnięcia w kształcie litery Y przyjęto za fizjologiczny i wprowadzono do podręczników [4].

Kolejne lata badań przyniosły informacje pokazujące ograniczenia modelu Y jako fizjologicznego modelu krzepnięcia. Zaobserwowano, że pacjenci z niedoborem początkowych czynników drogi wewnątrzpochodnej, takich jak czynnik XII, PK i WK mimo, iż mają przedłużony czas kaolinowo-kefalinowy (APTT), nie wykazują tendencji do krwawień, natomiast niedobór czynnika VIII bądź IX, przy zachowanym sprawnym szlaku zewnątrzpochodnym, wiąże się z dużym ryzykiem powikłań krwotocznych. Podobnie, chorzy z niedoborem czynnika VII znajdują się w grupie poważnego ryzyka krwawień, pomimo że szlak wewnątrzpochodny pozostaje nietknięty. Te obserwacje pozwoliły wykazać, że



**Rycina 2.** Schemat Y kaskady krzepnięcia.





**Rycina 3.** Faza inicjacji krzepnięcia. W fazie tej dochodzi do adhezji płytek w miejscu uszkodzenia śródbłonka naczyniowego i pierwszych zmian konformacyjnych w błonie komórkowej płytki krwi. W wyniku tych procesów z ziarnistości alfa płytek krwi zostaje uwolniony częściowo aktywny V czynnik krzepnięcia, na komórkach zdolnych do prezentacji TF zostaje wyprodukowana niewielka ilość trombiny, umożliwiającą rozpoczęcie fazy amplifikacji, oraz aktywny czynnik IXa, który weźmie udział w reakcjach fazy propagacji. KS – komórki śródbłonka, Pt – płytki krwi, KTF – komórki mające zdolność prezentacji czynnika tkankowego (TF – tissue factor).

*in vivo* zewnątrz- i wewnątrzpochodna droga krzepnięcia nie mogą działać niezależnie [5,6]. Dało to w latach dziesięćdziesiątych ubiegłego stulecia grupie badaczy z zespołu Dougalda M. Monroe i Maureane Hoffman podstawy do wysunięcia hipotezy, że kluczem do zrozumienia procesu krzepnięcia jest uzupełnienie dotychczas obowiązującego modelu o udział komórek, niezbędnych w sprawnym kierowaniu hemostazą *in vivo*. Kolejne badania nad modelem hemostazy, opartym na kluczowej roli komórek, pozwoliły wspomnianym autorom przedstawić koncepcję, iż procesy hemostazy zachodzą w odrębnych, ale nakładających się na siebie etapach, wymagających udziału dwóch typów komórek o różnych własnościach pro- i antykoagulacyjnych: płytek krwi oraz komórek, na których zachodzi ekspresja czynnika tkankowego TF i komórek śródbłonka naczyniowego. Płytki krwi i komórki mające zdolność ekspresji TF uczestniczą w reakcjach prokoagulacyjnych, natomiast komórki śródbłonka naczyniowego podtrzymują właściwości przeciwkrzepliwie ścian naczynia. Zasadniczą rolę regulacyjną tego procesu przypisano odseparowaniu od siebie tych dwóch typów komórek do czasu przerwania ciągłości śródbłonka naczyniowego i – w następstwie urazu – do uruchomienia požądanej aktywacji krzepnięcia. Zaproponowany przez Monroe i Hoffman model nazwano komórkowym modelem krzepnięcia i wyróżniono w nim trzy fazy: fazę inicjacji, amplifikacji i propagacji [5,6].

### Faza inicjacji krzepnięcia

Faza ta rozgrywa się na powierzchni komórek posiadających zdolność do ekspresji TF, który jest receptorem i kofaktorem dla czynnika VII. Komórki te w normalnych warunkach znajdują się poza układem naczyniowym. Po przerwaniu ciągłości śródbłonka naczynia krwionośnego dochodzi do odsłonięcia TF na komórkach warstwy podśródbłonkowej. Pierwszą reakcją krzepnięcia jest formowanie się kompleksu TF/FVIIa. Kompleks TF/FVIIa aktywuje przejście niewielkich ilości czynników X i IX w ich aktywne formy Xa i IXa. Aktywne Xa i IXa, powstałe na komórkach z ekspresją TF, mają odmienną funkcję w inicjacji procesu krzepnięcia. Czynnik Xa wiąże się ze swoim kofaktorem, czynnikiem Va, pochodzącym z ziarnistości alfa płytek krwi, które uległy częściowej aktywacji w procesie adhezji do uszkodzonego śródbłonka naczyniowego. Kompleks Xa/Va, zwany kompleksem protrombinazy, powstały na komórkach mających zdolność ekspresji TF, generuje niewielkie ilości trombiny (Rycina 3). W przeciwieństwie do tego, czynnik IXa, aktywowany przez kompleks TF/VIIa nie działa na powierzchni komórek z ekspresją TF i bezpośrednio nie uczestniczy

w inicjacji krzepnięcia, ale dyfunduje do okolicznych płytek krwi i łączy się ze swoistym receptorem płytkowym, następnie tworzy kompleks z czynnikiem VIIIa (IXa/VIIIa) zwany kompleksem tenazy i aktywuje czynnik X bezpośrednio na powierzchni płytek. Należy podkreślić, że dyfuzja czynnika IXa jest możliwa, ponieważ jego ekspresja nie ulega zahamowaniu przez tzw. inhibitor szlaku TF (TFPI), a antytrombina (AT) łączy się z czynnikiem IXa dużo wolniej niż z czynnikiem Xa. Tymczasem czynnik Xa po oddzieleniu się od komórki mającej zdolność prezentacji TF w fazie płynnej jest natychmiast hamowany przez TFPI oraz przez AT, co pozwala na jego działanie jedynie na powierzchni tych komórek, na których powstaje.

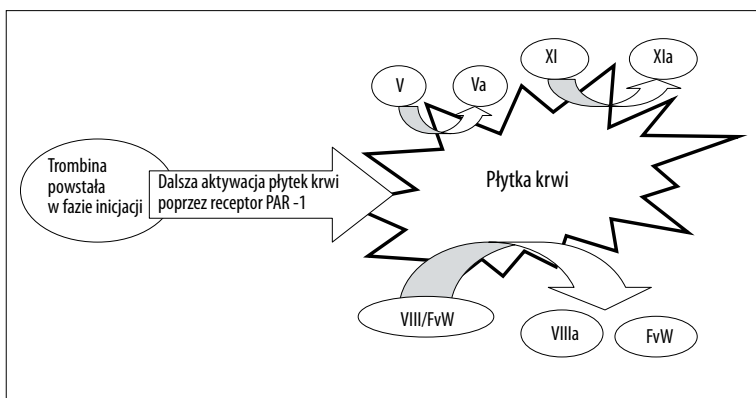
Należy podkreślić, że około 1–2% cząsteczek czynnika VII i innych białek krzepnięcia znajduje się w krwiobiegu w postaci aktywnej i może przenikać do przestrzeni pozanaczyniowej [7]. Jest to tak zwane „krzepnięcie podstawowe”. Nie prowadzi to do tworzenia skrzepu, ponieważ do tego procesu potrzebne jest uszkodzenie śródbłonka naczyniowego oraz przemieszczenie płytek krwi, czynnika VIII oraz czynnika von Willebranda (vWF) poza światło naczyń.

### Faza amplifikacji krzepnięcia

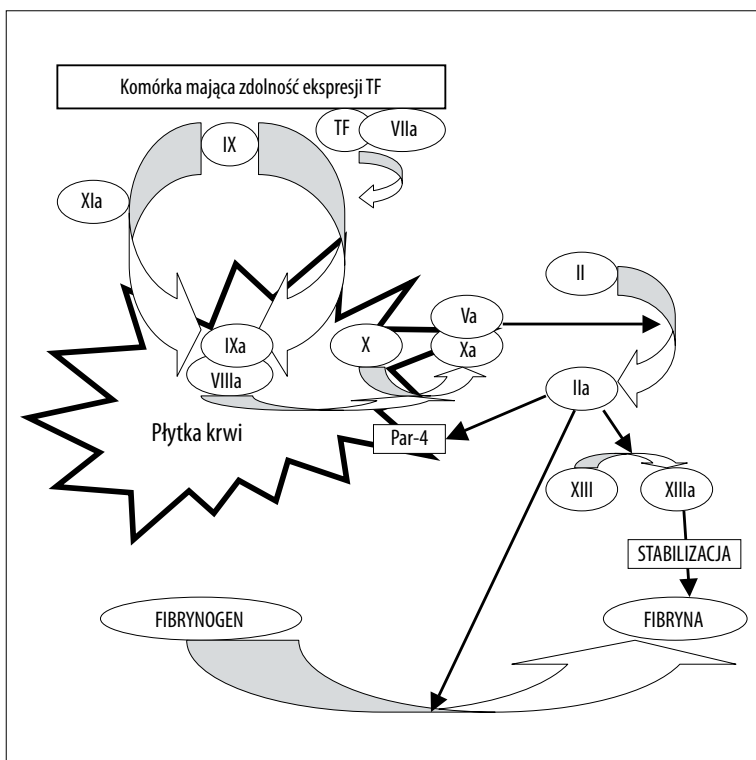
Niewielka ilość trombiny, powstała w fazie inicjacji na powierzchni komórek z ekspresją TF, ma kilka funkcji. Po pierwsze, dodatkowo stymuluje płytki krwi za pośrednictwem receptora PAR-1, wzmacniając ich aktywację, która została zapoczątkowana w procesie adhezji. Po drugie, aktywuje czynniki V, VIII i XI na powierzchni płytek krwi. Trombina jest również odpowiedzialna za rozszczepienie vWF i czynnika VIII w procesie aktywacji, co ułatwia adhezję płytek do warstwy podśródbłonkowej – mechanizm ten jest szczególnie ważny w naczyniach o szybkim przepływie krwi. Pod koniec fazy amplifikacji wszystko jest przygotowane do etapu propagacji, w którym trombina jest produkowana na masową skalę na powierzchni płytek krwi (Rycina 4).

### Faza propagacji krzepnięcia

Areną reakcji zachodzących w fazie propagacji jest aktywowana płytka krwi. Aktywowany w czasie fazy inicjacji IXa wiąże



**Rycina 4.** Faza amplifikacji krzepnięcia. W fazie tej dochodzi do dalszej aktywacji płytek krwi i produkcji kolejnych czynników krzepnięcia. Czynniki von Willebranda uwolniony z kompleksu VIII/FvW ułatwia dalsze procesy adhezji płytek. FvW – czynnik von Willebranda.



**Rycina 5.** Faza propagacji krzepnięcia. W fazie tej powstają duże ilości trombiny umożliwiające wytworzenie nici fibrynowej z fibrynogenu. Nic fibrynowa jest stabilizowana przez czynnik XIIIa, aktywowany przez trombinę. Wysokie stężenia trombiny dodatkowo aktywują płytkę krwi poprzez receptory PAR-4, które prawdopodobnie odpowiadają za całkowitą degranulację płytek.

się z aktywowanym VIIIa. Powstały kompleks tenazy (IXa/VIIIa), pozwala na powierzchni płytek wytworzyć duże ilości aktywnego Xa z osocowego X, który łącząc się z Va tworzy kompleks protrombinazy (Xa/Va). Powstałe duże ilości kompleksu protrombinazy powodują przejście ogromnych ilości protrombiny w trombinę (reakcja ta jest często nazywana wybuchem trombinowym) (Rycina 5). Duże ilości trombiny, wytworzone w fazie propagacji, powodują szybką konwersję fibrynogenu w fibrynę, której polimery tworzą sieć fibrynową, zwaną skrzepem. Sieć fibrynowa stabilizowana jest przez aktywny czynnik XIIIa, dodatkowo aktywowany przez trombinę. Innym zadaniem trombiny w stabilizowaniu skrzepu jest aktywacja TAFI (inhibitora fibrylizacji aktywowanego trombiną), co chroni skrzep przed proteolizą, a także rozszczepienie receptora PAR-4 wysokimi stężeniami trombiny, co może odgrywać rolę w pełnej degranulacji aktywowanych płytek i retrakcji skrzepu.

Wiedza o kluczowej roli płytek w generacji dużej ilości trombiny i stabilizacji skrzepu stale pogłębia się. Wydaje się, że

istnieje kilka odmiennych populacji aktywowanych płytek, które różnią się siłą adhezji i reakcji na sygnały prokrzepowe w zależności od zapotrzebowania na rozmiar skrzepiny. Ponadto komórkowy model krzepnięcia, pomimo że przedstawiony jako kilka odrębnych faz, jest integralnym ciągiem zdarzeń, wzajemnie na siebie oddziałujących. Porównując to z modelem Y, można stwierdzić, że szlak zewnątrzprochodny (kompleks VIIa/TF we współpracy z kompleksem Xa/Va) ma miejsce na komórkach z ekspresją TF, co zapewnia inicjację i amplifikację krzepnięcia. Szlak wewnętrzprochodny zachodzi na aktywowanych płytkach krwi i prowadzi do wytworzenia ogromnej ilości trombiny, która powoduje polimeryzację fibryny i stabilizację skrzepu.

Regulacja procesu krzepnięcia odbywa się na wielu poziomach:

- TFPI i AT – kontrolują fazę inicjacji, uniemożliwiając swobodne przemieszczanie się Xa z komórek mających zdolność ekspresji TF na aktywowane płytki krwi oraz inaktywując kompleks TF/VIIa;



- trombina powstała w fazie inicjacji kontroluje dalszą aktywację płytek wiążąc się z receptorem PAR-1, kontroluje aktywację czynnika XI, który jest wzmacniaczem reakcji powstawania kompleksu tenazy w fazie propagacji, kontroluje aktywację kompleksu VIII/vWF, w wyniku której dochodzi do powstania VIIIa i wolnego vWF, który umożliwia i wzmacnia dalsze procesy adhezji;
- trombina powstała w fazie propagacji prowadzi do dalszej aktywacji płytek krwi, aktywuje czynnik XIII do XIIIa, który jest stabilizatorem nici fibrynowej oraz aktywuje TAFI – inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną.

Za ograniczenie powstawania skrzepu do miejsca zranienia naczynia odpowiada również układ białka C, który jest aktywowany po połączeniu się trombiny z trombomoduliną (białkowy receptor śródbłonka naczyniowego dla trombiny). Kompleks trombina/trombomodulina aktywuje białko C, które inaktywuje FVIIIa i FVa, wygaszając produkcję trombiny, a kofaktorem tej reakcji jest białko S.

Dalsze procesy ograniczające krzepnięcie do miejsca uszkodzenia to mechanizmy przeciwzakrzepowe, którymi dysponuje śródbłonek naczyniowy, układ fibrynolizy i procesy regeneracyjne naczyń, które w konsekwencji prowadzą do odtworzenia prawidłowych struktur naczynia i usunięcia skrzepu.

Z powyższych rozważań wynika, że rutynowo stosowane w koagulologii badania laboratoryjne, takie jak czas i wskaźnik protrombinowy, czas kaolinowo-kefalinowy, poziom fibrynogeny, czas trombinowy, poziom niektórych czynników krzepnięcia, jedynie w ograniczonym zakresie odzwierciedlają złożone procesy hemostazy i jako wskaźniki ryzyka krwawienia powinny być interpretowane z dużą ostrożnością. W uproszczeniu można powiedzieć, że powyższe parametry obrazują jedynie osoczowy poziom czynników krzepnięcia i mogą wskazywać na niedobór jednego lub kilku z nich, natomiast nie mówią nic o ryzyku powikłań krwotocznych, ponieważ nie uwzględniają udziału komórek w procesach hemostazy, ani proporcji pomiędzy układem pro- i antykoagulacyjnym. Przykładem są chorzy z marskością wątroby, którzy wykazują niedobór wielu prozakrzepowych czynników krzepnięcia, ale równolegle również niedobór białka C, TFPI i antytrombiny, i w praktyce niezbyt często krwawią podczas inwazyjnych procedur medycznych. W przeciwieństwie do chorych z upośledzoną syntezą wątrobową, pacjenci z zupełnie prawidłowym wyjściowym koagulogramem mogą doświadczyć ciężkich powikłań krwotocznych z drobnymi wkluciami czy zranieniami z powodu rozwinięcia się u nich tak zwanej koagulopatii nabytej (ze zużycia, w wyniku kwasicy, wyziębienia, nasilonej fibrynolizy), zupełnie nieprzewidywalnej na podstawie rutynowych badań laboratoryjnych.

## Piśmiennictwo:

1. Tripoldi A: Hemostasis abnormalities in liver cirrhosis: myth or reality? *Polskie Archiwum Medycyny Wewn*, 2008; 118: 445–47
2. Macfarlane RG: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 1964; 202: 498–99
3. Davie EW, Ratnoff OD: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 1964; 145: 1310–11
4. Osterud B, Rapaport SI: Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci*, 1977; 74: 5260–64
5. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol/Oncol Clin N Am* 2007; 21: 1–11
6. Monroe DM, Hoffman M: What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25: 2463–69
7. Miller GJ, Howarth DJ, Attfield JC i wsp.: Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph. *Thromb Haemost* 2000; 83: 427–32