

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Dragica A. Vučelić

**Uporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima,
tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina
kod bolesnika sa alkoholnom cirozom**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

Dr. Dragica A. Vučelić

**A comparative evaluation of hemostasis system by standard
coagulation tests, thromboelastometry and thrombin generation
assay in patients with alcoholic cirrhosis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Ivo Elezović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor doktorske disertacije:

Prof. dr Rada Ješić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Akademik prof. dr Predrag Peško, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu – predsednik komisije
2. Prof. dr Dragan Tomić, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije
3. Prof. dr Milica Čolović, penzionisani profesor Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu – član komisije

Posvećeno uspomeni na majku Veru i oca Aleksandra,

čijim srcima sagledavam svet.

Koji pokazate da je skromnost vrhunska vrlina,

a dobrota smisao čovekovog života.



ZAHVALNA SAM

Bez pomoći i podrške tima saradnika izrada ove doktorske disertacije ne bi mogla biti ostvarena.

Pripala mi je privilegija i čast da mentorstvo za izradu doktorske disertacije bude u rukama doajena u oblasti hemostaze profesora Iva Elezovića. Od ideje do konačne realizacije, bilo je veliko zadovoljstvo savladavati prepreke i poteškoće u izuzetno lepoj atmosferi naše saradnje, prepunoj profesorove iskrene podrške, dobronamernosti i konstruktivnih putokaza i saveta, zbog čega osećam veliku zahvalnost i poštovanje prema profesoru Ivu Elezoviću.

Analiziranja poremećaja hemostaze u hroničnom oboljenju jetre vršena su ispitivanjem bolesnika lečenih od strane profesorke Rade Ješić. Respektujući potrebu da u našoj kliničkoj praksi poboljšamo hemostazeološko-transfuziološki dijagnostičko-terapijski pristup kod obolelih od ciroze, profesorica Rada Ješić je omogućila učešće bolesnika u ovom istraživanju. Veliko hvala i poštovanje profesorici Radi Ješić za čistu i bezrezervnu kolegijalnost i ostvarenu stručnu saradnju.

Dugogodišnja i svakodnevna plodonosna saradnja između Klinike za digestivnu hirurgiju i Centra za medicinsku biohemiju, Odeljenje Klinike za kardiohirurgiju je našla svojevrstu potvrdu u sprovođenju ovog istraživanja. U savršenoj organizovanosti i preciznosti, kolektiv Odeljenja za medicinsku biohemiju je obavio biohemijska ispitivanja, standardne testove hemostaze i test ispitivanja stvaranja trombina. Ovo istraživanje omogućilo je implementaciju i sticanje naših početnih saznanja o značaju testa ispitivanja stvaranja trombina. I najveća snaga samo je u drugima jaka, te sam ovaj veoma zahtevan deo puta prošla sa lakoćom, a oni su se ponašali kao da ništa ne čine.

Uspostavljanje referentnih vrednosti za test ispitivanja stvaranja trombina vršeno je iz uzoraka plazme dobrovoljnih davalaca krvi nakon dobijanja informisanog pristanka davalaca krvi i saglasnosti Etičkog komiteta Zavoda za transfuziju krvi Srbije, Beograd. Test euglobulinske fibrinolize izvođen je na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze sa Registrom urođenih koagulopatija, Zavod za transfuziju krvi Srbije, Beograd, čime je nastavljena višegodišnja izuzetno dobra i mnogo puta potvrđena saradnja između naših institucija.

Mnogo je lepo započeti radni dan kada vas dočeka skuvana kafa i rečenica: “Doktorica, šta mogu danas da uradim?” Svakodnevno, ovim rečima mene dočekuje draga saradnica Branka Klinčević. Dragocena je bila Brankina pomoć u koordinisanju neophodnih aktivnosti između institucija koje su učestvovala u ovom istraživanju. Bez Brankine požrtvovanosti, preciznosti, strpljivosti, ljubaznosti i dobrote, moj rad u ovom istraživanju bio bi mnogo, mnogo teži.

Na temelju odličnog bazičnog poznavanja medicinske nauke i svog briljantnog intelekta, doktorica Maja Životić je fascinantnom brzinom razumela poremećaje hemostaze u oboljenju jetre. Izuzetno cenim Majinu posvećenost temeljnoj i racionalnoj statističkoj obradi podataka i njene iskazane moralne vrednosti. Iznad svega, zahvalna sam na novom prijateljstvu koje se uselilo u moj život.

Od mog dolaska na Kliniku za digestivnu hirurgiju u atmosferi zdrave komunikacije poslovna saradnja sa doktorom Ivanom Palibrkom imala je karakter profesionalnosti i kolegijalnosti. I kada je bivao najumorniji, Ivan mi je više puta pokazao da na njega uvek mogu računati, i kada se radi o ličnim potrebama. Sa iskrenom podrškom, Ivan je bio među prvim zdravim ispitanicima zaposlenim na Klinici za digestivnu hirurgiju koji su sačinjavali kontrolnu grupu u ovom istraživanju. Značajna je bila Ivanova pomoć i u tehničkoj pripremi nekih priloga ove doktorske disertacije.

Mnogo mi je značila podrška dragih kolega i saradnika zaposlenih na Klinici za digestivnu hirurgiju koji su sa radošću podržali ovo istraživanje svojim ličnim učešćem u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika. Njihovi pozitivni osećaji uneli su veliku energiju u moj rad, na čemu sam im neizmerno zahvalna.

Zahvalna sam Gospodu za uzvišenost svog poziva i sve prilike i iskušenja koje mi je darovao.

Uporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima, tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom

SAŽETAK

Uvod. Brojni poremećaji hemostaze koji odlikuju hronično oboljenje jetre dugo su smatrani važnim kofaktorom u nastanku krvarenja. Smatralo se da standardni testovi hemostaze daju uvid u prirodu hemostatskog poremećaja i opseg hepatocelularnog oštećenja, kao i da se mogu direktno koristiti u predviđanju stepena rizika krvarenja u sklopu invazivnih procedura i hirurških intervencija. Međutim, pokazano je da standardni testovi hemostaze slabo koreliraju kako sa nastankom i trajanjem krvarenja u toku biopsije jetre i drugih invazivnih procedura tako i sa razvojem gastrointestinalnog i krvarenja u toku transplantacije jetre. Poslednjih godina prihvaćen je koncept rebalansirane hemostaze u hroničnom oboljenju jetre. Balans u sistemu hemostaze kod bolesnika sa cirozom ostvaruje se putem nekoliko mehanizama: povišen nivo adhezivnog proteina vWF (von Willebrand faktor), snižena aktivnost proteaze ADAMTS 13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif-13), deficit prirodnih antikoagulacionih proteina, povišen nivo faktora koagulacije VIII i snižen nivo antifibrinoliznih proteina. Do sada nisu ustanovljene standardizovane metode za kvantitativnu procenu ukupnog hemostatskog potencijala. Poslednjih godina povećan je interes za kliničku implementaciju globalnih testova hemostaze, kao što su test ispitivanja stvaranja trombina i tromboelastometrija. Test ispitivanja stvaranja trombina meri *in vitro* kapacitet plazme za stvaranje trombina (eng. ETP- endogenous thrombin potential). Tromboelastometrija ispituje efekat trombina na formiranje krvnog ugruška u celoj krvi.

Ciljevi. Ciljevi studije bili su ispitivanje: a) hemostatskog profila bolesnika sa alkoholnom cirozom standardnim i globalnim testovima hemostaze, b) korelacija između standardnih i globalnih testova, c) korelacija između tromboelastometrije i testa za ispitivanje stvaranja trombina, d) valjanosti tromboelastometrije za utvrđivanje kvalitativnog poremećaja fibrinogena, e) značaja tromboelastometrije u proceni aktivnosti sistema fibrinolize, f) korelacija globalnih testova sa indeksima oštećenja jetrine funkcije.

Materijal i metode. Ova studija obuhvatila je 60 bolesnika sa alkoholnom cirozom. Rezultati testiranja sistema hemostaze bolesnika sa alkoholnom cirozom analizirani su u odnosu na rezultate dobijene ispitivanjem kontrolnih grupa: 24 bolesnika sa holestaznom cirozom i 50 zdravih ispitanika. Stepem težine oboljenja jetre procenjivan je na osnovu Child Pugh skora (CPs). Sistem hemostaze analiziran je standardnim testovima hemostaze, nemodifikovanim

testom za ispitivanje stvaranja trombina i tromboelastometrijom. Uzorci krvi uzimani su neposredno nakon hospitalizacije bolesnika.

Rezultati. Hipokoagulabilnost je utvrđena kod većeg procenta bolesnika sa alkoholnom cirozom kada je ispitivanje sistema hemostaze vršeno standardnim testovima i ETP u poređenju sa tromboelastometrijom. Produžen PT, aPTT i TT izmereni su kod 96.7%, 83.3% i 48.3% bolesnika. Snižen broj trombocita utvrđen je kod 86.7%, a hipofibrinogenemija kod 15% bolesnika. U poređenju sa zdravim ispitanicima, bolesnici sa alkoholnom cirozom imali su značajno više vrednosti PT, aPTT i TT, niže vrednosti broja trombocita, nižu aktivnost faktora koagulacije II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII i antitrombina i proteina C, dok su nivoi faktora koagulacije VIII i vWF bili značajno viši ($p < 0.001$ za sve ispitivane parametre). Nije postojala značajna razlika u srednjim vrednostima fibrinogena između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

Testom ispitivanja stvaranja trombina kod većine bolesnika sa alkoholnom cirozom utvrđen je hipokoagulabilan koagulacioni profil. Prolongirana faza inicijacije koagulacionog procesa reprezentovana vremenom t-lag zabeležena je kod 36/60 (60%) bolesnika, dok su kod značajno većeg procenta bolesnika detektovani sniženi maksimalan kapacitet za stvaranje trombina (C_{max}) i ukupna količina stvorenog trombina (AUC). Naime, sniženi parametri C_{max} i AUC utvrđeni su kod 55/60 (91%) odnosno 49/60 (81.6%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. U poređenju sa zdravim ispitanicima, bolesnici sa alkoholnom cirozom imali su, s jedne strane, značajno više vrednosti parametra t-lag ($30.1 \pm 10.8s$ vs. $25.6 \pm 14.2s$, $p < 0.001$) i, s druge strane, značajno niže vrednosti parametara C_{max} ($68.3 \pm 28.2\%$ vs. $112.0 \pm 20.9\%$, $p < 0.001$) i AUC ($67.9 \pm 16.4\%$ vs. $98.3 \pm 10.9\%$, $p < 0.001$). Ukupna količina formiranog trombina korelirala je sa aktivnošću holinesteraze ($r = 0.610$; $p < 0.001$), kao i sa nivoima albumina ($r = 0.462$; $p < 0.001$) i ukupnog bilirubina ($r = -0.281$; $p = 0.031$).

Ispitivanjem sistema hemostaze tromboelastometrijom, hipokoagulabilnost reprezentovana sniženom maksimalnom čvrstoćom krvnog ugruška (eng. MCF: Maximum Clot Firmness) utvrđena je kod 20/60 (33.3%) bolesnika u spoljnjem putu i 25/60 (41.7%) bolesnika u unutaršnjem putu koagulacionog procesa. Bolesnici sa alkoholnom cirozom imali su niži hemostatski potencijal u odnosu na zdrave ispitanike, što je u spoljnjem putu koagulacije reprezentovano značajno višim vrednostima vremena formiranja krvnog ugruška [eng. CFT: Clot Formation Time (EXTEM-CFT: 116.6 ± 45.6 vs. $79.2 \pm 16.9s$; $p < 0.001$)] odnosno nižim vrednostima EXTEM-MCF (55.9 ± 8.9 vs. $66.2 \pm 4.0mm$; $p < 0.001$). U odnosu na biohemijsku funkciju jetre, utvrđena je slaba korelacija ($r = 0.272$; $p = 0.037$) između aktivnosti holinesteraze i tromboelastometrijskog parametra EXTEM-MCF.

Sa povećanjem težine ciroze, utvrđeno je značajno sniženje koncentracije fibrinogena i vrednosti FIBTEM-MCF, uz istovremenu prolongaciju TT ($p=0.002$). U svim CPs kategorijama, koncentracija fibrinogena značajno je korelirala sa FIBTEM-MCF ($r=0.77$, $r=0.72$, $r=0.74$; $p<0.001$), dok su međusobne korelacije drugih testova pokazale veliku varijabilnost. Prevalenca snižene vrednosti FIBTEM-MCF ($<9\text{mm}$) bila je značajno veća u uznapredovaloj bolesti ($p=0.027$), a najveća učestalost zabeležena je kod bolesnika u CPsC kategoriji [10/16 (62.5%)]. Među bolesnicima sa sniženim FIBTEM-MCF (13 sa alkoholnom i 3 sa holestaznom cirozom), 9 bolesnika imalo je sniženu koncentraciju fibrinogena. Kod preostalih 7 bolesnika (6 sa alkoholnom i 1 sa holestaznom cirozom), izmeren je normalan nivo fibrinogena, što ukazuje na prisustvo kvalitativnog poremećaja fibrinogena. odnosno poremećaja polimerizacije fibrina.

U tromboelastometrijskom ispitivanju, hiperfibrinoliza definisana povišenom vrednošću maksimalne lize krvnog ugruška (eng. ML: Maximum Lysis) $>15\%$ detektovana je kod 5 (8.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom ($n[\text{CPsB}]=1$; $n[\text{CPsC}]=4$). Prisustvo hiperfibrinolize značajno se razlikovalo između obolelih od alkoholne ciroze i zdrave populacije ($p=0.038$). Kod bolesnika sa hiperfibrinolizom, postojale su izuzetno jake korelacije između vrednosti EXTEM-ML, sa jedne strane, i vrednosti α_2 -IP i D-dimera, sa druge strane.

Zaključak. ETP može predstavljati pogodan test za procenu oštećenja sintetske funkcije jetre i stepena težine ciroze uzrokovane alkoholom. U odnosu na ETP, tromboelastometrija je funkcionalan test koji obezbeđuje dodatnu informaciju o maksimalnoj čvrstoći i stabilnosti krvnog ugruška, funkcionalnom statusu fibrinogena i aktivnosti sistema fibrinolize. FIBTEM je odgovarajući test kako za kvantitativno određivanje fibrinogena tako i za utvrđivanje kvalitativnih poremećaja fibrinogena. U prisustvu normalne koncentracije fibrinogena, snižena vrednost FIBTEM-MCF ukazuje na korisnost ovog testa u detektovanju poremećaja polimerizacije fibrina. Bolesnici sa alkoholnom cirozom mogu ispoljiti hiperfibrinolizu, koja se detektuje u tromboelastometrijskom testiranju. U hroničnom oboljenju jetre, potrebno je sprovesti kliničke studije u cilju određivanja valjanosti globalnih testova u predikciji krvarenja i praćenju efekata terapije.

Ključne reči: alkoholna ciroza, hemostatski potencijal, standardni testovi hemostaze, globalni testovi hemostaze

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

A comparative evaluation of hemostasis system by standard coagulation tests, thromboelastometry and thrombin generation assay in patients with alcoholic cirrhosis

ABSTRACT

Introduction. Diverse spectrum of hemostatic abnormalities in chronic liver disease has long been considered a key cofactor in the determination of bleeding. There was a solid belief that hemostatic screening profile, consisting of standard coagulation tests, may provide useful information regarding the nature of hemostatic impairment and the extend of the hepatocellular damage, and could be used for clinical decision making related to surgery and invasive procedure treatment approaches. However, it has been shown that the results of standard hemostasis tests are poorly correlated with the onset and duration of bleeding after liver biopsy and other potentially hemorrhagic procedures as well as the occurrence of gastrointestinal bleeding or bleeding during liver transplantation. In recent decades, the old dogma shift associated with the increased appreciation of the rebalanced hemostasis has led to the reevaluation of previously the widely accepted concept of a causal relationship between hemostasis abnormalities and bleeding complications in chronic liver disease. Restored balance in the hemostatic system in patients with cirrhosis is provided in several ways including: elevated levels of the platelet adhesive protein vWF, reduced activity of vWF-cleaving protease ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motif-13), deficiencies of naturally occurring anticoagulants, elevation of FVIII, and decrease of antifibrinolytics. There are no widely available and fully standardized methodologies for quantitative assessment of overall hemostasis potential within individual. There is a growing interest in using more global hemostatic assays such as thrombin generation assay and thromboelastometry. Thrombin generation assay measures the *in vitro* capacity of plasma to produce thrombin over time which has been termed endogenous thrombin potential (ETP). Thrombin generation assay differs from thromboelastometry. Instead of looking at the whole thrombin generation dynamics, thromboelastometry is dependent on thrombin generation measuring its effect on clot formation in whole blood.

Aims. The aims of the study were to investigate: a) hemostatic profile of patients with alcoholic cirrhosis using standard and global hemostasis tests, b) correlations of standard coagulation tests with global assays, c) correlations between thrombin generation assay and thromboelastometry, d) utility of thromboelastometry in detection of a qualitative fibrinogen disorder, e) relevance of thromboelastometry for evaluation of fibrinolytic system activity, f) correlations of global assays with liver impairment indexes.

Material and methods. Sixty patients with cirrhosis of an alcoholic aetiology were included. The results were evaluated in comparison with control groups: 24 patients with cholestatic cirrhosis and 50 healthy individuals. The degree of liver failure was assessed according to Child-Pugh score (CPs). Hemostasis was assessed using standard coagulation testing, unmodified thrombin generation assay and thromboelastometry. Blood samples were taken at admission.

Results. On the whole, we found a greater proportion of patients with alcoholic cirrhosis to be hypocoagulable when tested with standard tests and ETP compared to thromboelastometry. Prolonged PT, aPTT and TT were noted in 96.7%, 88.3% and 48.3% patients, respectively. Thrombocytopenia was observed in 86.7%, while fibrinogen was decreased in 15% patients. When compared with healthy subjects, patients with alcoholic cirrhosis had significantly prolonged PT, aPTT and TT, more reduced platelet count as well as levels of coagulation factors II, V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, antithrombin, protein C, and increased levels of factor VIII and vWF ($p < 0.001$ for all parameters). Difference for fibrinogen values wasn't observed between patients and controls.

In most patients, ETP parameters were consistent with the hypocoagulable profile. The majorities of patients were identified as having decreased peak of thrombin generation [Cmax: peak height ($n=55/60$)] and total amount of active thrombin formed [AUC: area under the curve ($n=49/60$)] as well as increased t-lag values ($n=39/60$). There was significance between ETP parameters in two groups ($p < 0.001$). The t-lag was higher in cirrhosis (30.1 ± 10.8 vs. 25.6 ± 14.2 s). Both Cmax and AUC were higher in healthy controls (112.0 ± 20.9 vs. 98.3 ± 10.9 ; 68.3 ± 28.2 vs. 67.9 ± 16.4 %). The AUC correlated with cholinesterase ($r=0.610$; $p < 0.001$), albumin ($r=0.462$; $p < 0.001$), and total bilirubin ($r=-0.281$; $p=0.031$). Using thromboelastometry, we found hypocoagulability represented by reduced MCF in 20/60 (33.3%) of patients in extrinsic (EXTEM), and 25/60 (41.7%) of patients in intrinsic (INTEM) activated test. In comparison to healthy controls, patients had significantly different thromboelastometric parameters. In patients, CFT (clot formation time) values were higher, whereas MCF values were lower (extrinsic test: 116.6 ± 45.6 vs. 79.2 ± 16.9 s; 55.9 ± 8.9 vs. 66.2 ± 4.0 mm; $p < 0.001$). There was a weak correlation ($r=0.272$; $p=0.037$) between cholinesterase activity and EXTEM-MCF.

With increased cirrhosis severity, fibrinogen and FIBTEM-MCF levels significantly declined ($p=0.002$), while TT was significantly prolonged ($p=0.002$). In all CPs groups, fibrinogen strongly correlated with FIBTEM-MCF ($r=0.77$, $r=0.72$, $r=0.74$; $p < 0.001$), while cross-correlations of other assays were highly variable. The prevalence of decreased FIBTEM-MCF

value (<9mm) was significantly higher in advanced CPs categories ($p=0.027$), whereby the highest prevalence was detected in patients with CPsC [10/16 (62.5%)]. Nine of the 16 patients (13 patients with alcoholic and 3 patients with cholestatic cirrhosis, respectively) with decreased FIBTEM-MCF values had also decreased fibrinogen levels, while in the remaining 7 patients (6 patients with alcoholic and 1 case with cholestatic cirrhosis, respectively) fibrinogen levels were within the reference range, indicating the presence of qualitatively altered fibrinogen detected by FIBTEM-MCF.

In thromboelastometry, hyperfibrinolysis defined with increased Maximum Lysis ($ML>15\%$) was detected in 5 (8.3%) patients with alcoholic cirrhosis ($n[CPsB]=1$; $n[CPsC]=4$). The presence of hyperfibrinolysis was significantly different in patients with alcoholic cirrhosis compared to healthy controls ($p=0.038$). In patients with hyperfibrinolysis, a strong correlations between EXTEM-ML with α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -IP) and D-dimer were observed.

Conclusion. ETP may be an additional alternative for estimating impairment of synthesis liver function and severity degree of cirrhosis caused by alcohol. Thromboelastometry as a functional assay is superior to ETP for investigating coagulopathy in cirrhosis as it provides supplemental informations such as maximum clot firmness and stability/fibrin polymerization/fibrinolysis activity, which cannot be derived from ETP. Thromboelastometric FIBTEM-MCF could be considered as a pertinent method for investigating quantitative fibrinogen status as well as diagnosis of fibrin polymerization disorders in cirrhotic patients. In patients with normal fibrinogen content of the blood, decreased clot firmness measured by FIBTEM test make the letter as a good candidate to assess for the presence of a qualitative fibrinogen disorder. Alcoholic cirrhosis may be associated with hyperfibrinolysis which can be detected by thromboelastometry. Further studies are needed to evaluate the usefulness of these assays in predicting bleeding complications in patients with chronic liver disease as well as in monitoring replacement treatment.

Key words: alcoholic cirrhosis, hemostatic potential, standard hemostasis tests, global hemostasis assays

Science field: Medicine

Specific science field: Haematology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. FIZIOLOŠKA HEMOSTAZA	1
1.1.1. Uloga endotela u hemostazi.....	1
1.1.2. Primarna hemostaza	4
1.1.3. Sekundarna hemostaza	8
1.1.4. Kontrolni mehanizmi stvaranja trombina.....	14
1.1.5. Sistem fibrinolize	17
1.2. POREMEĆAJI HEMOSTAZE U OBOLJENJU JETRE.....	20
1.2.1. Osnovna anatomska građa i funkcije jetre.....	20
1.2.2. Vaskularizacija jetre.....	21
1.2.3. Hemostazni profil u hroničnom oboljenju jetre	22
1.2.4. Uticaj poremećaja hemostaze i infekcije na nastanak krvarenja iz variksa jednjaka i želuca.....	31
1.2.5. Hiperkoagulabilnost u oboljenju jetre	33
1.3. REBALANSIRANA HEMOSTAZA U OBOLJENJU JETRE	35
1.3.1. Primarna hemostaza	36
1.3.2. Sekundarna hemostaza	37
1.3.3. Sistem fibrinolize	38
1.4. ALKOHOLNA BOLEST JETRE.....	38
1.4.1. Fizikalni nalaz.....	39
1.4.2. Laboratorijske karakteristike	39
1.4.3. Portna hipertenzija	41
1.4.4. Ascites	41
1.4.5. Hepatorenalni sindrom	42
1.4.6. Hepatična encefalopatija.....	43

1.4.7.	Endoskopska klasifikacija variksa jednjaka i želuca	44
1.5.	HOLESTAZNA BOLEST JETRE.....	45
1.5.1.	Primarna bilijarna ciroza	45
1.5.2.	Primarni sklerozirajući holangitis	47
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	48
3.	MATERIJAL I METODE	49
3.1.	KLINIČKA DIJAGNOZA	50
3.2.	INSTRUMENTI MERENJA	52
3.2.1.	UZIMANJE I PRIPREMANJE UZORAKA KRVI	52
3.2.2.	IZVOĐENJE TESTOVA	54
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	73
4.1.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	73
4.2.	ISPITIVANJE HEMOSTATSKOG PROFILA STANDARDNIM I GLOBALNIM TESTOVIMA HEMOSTAZE.....	75
4.2.1.	Standardni testovi hemostaze.....	75
4.2.2.	Ispitivanje stvaranja trombina ETP testom.....	82
4.2.3.	Ispitivanje globalne hemostaze metodom tromboelastometrije.....	85
4.3.	ODNOS STANDARDNIH I GLOBALNIH TESTOVA PRI PROCENI HEMOSTATSKOG PROFILA BOLESNIKA SA ALKOHOLNOM CIROZOM	90
4.3.1.	Faza inicijacije - spoljni put koagulacije	90
4.3.2.	Faza amplifikacije	91
4.3.3.	Faze propagacije i stabilizacije	92
4.4.	KORELACIJE IZMEĐU ETP TESTA I TROMBOELASTOMETRIJE.....	93
4.5.	ZNAČAJ GLOBALNIH TESTOVA HEMOSTAZE U PROCENI KOAGULABILNOSTI.....	95
4.5.1.	Korelacije fibrinogena, TT, trombocita i FIBTEM-MCF sa standardnim i globalnim testovima	95
4.5.2.	ODREĐIVANJE VALJANOSTI TT I FIBTEM-MCF U OTKRIVANJU HIPOFIBRINOGENEMIJE I DISFIBRINOGENEMIJE	98

4.5.3. DETEKCIJA HIPOFIBRINOGENEMIJE I/ILI DISFIBRINOGENEMIJE TEM [®] TESTOVIMA	107
4.5.4. UTICAJ TROMBOCITA I FIBRINOGENA NA VREDNOSTI PARAMETARA TROMBOELASTOMETRIJE	108
4.5.5. PARAMETRI TROMBOELASTOMETRIJE U PRISUSTVU I ODSUSTVU TEŠKE TROMBOCITOPENIJE	111
4.6. KORELACIJE GLOBALNIH TESTOVA HEMOSTAZE SA METABOLIČKOM I SINTETSKOM FUNKCIJOM JETRE.....	113
4.7. PROCENA AKTIVNOSTI SISTEMA FIBRINOLIZE STANDARDNIM TESTOVIMA I TROMBOELASTOMETRIJOM	114
4.7.1. Ispitivanje fibrinolizne aktivnosti standardnim testovima	114
4.7.2. Ispitivanje fibrinolizne aktivnosti tromboelastometrijom	116
4.7.3. Korelacije standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti sa parametrima tromboelastometrije.....	120
4.7.4. Korelacije broja trombocita i nivoa fibrinogena sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametrima tromboelastometrije.....	121
4.7.5. Korelacije sintetske i metaboličke funkcije jetre sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametrima tromboelastometrije.....	122
4.7.6. Laboratorijske i kliničke odlike bolesnika sa hiperfibrinolizom	123
4.7.7. Odnos standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara tromboelastometrije sa prisustvom ascitesa.....	126
4.7.8. Odnos standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara tromboelastometrije sa krvarenjem iz variksa	127
5. DISKUSIJA	129
5.1. Standardni testovi hemostaze.....	130
5.2. Globalni testovi hemostaze	132
5.2.1. Endogeni potencijal za stvaranje trombina.....	132
5.2.2. Tromboelastometrija	135
5.3. Odnos globalnih i standardnih testova pri proceni hemostatskog profila bolesnika sa alkoholnom cirozom	136

5.4.	Odnos hemostatskog potencijala bolesnika sa alkoholnom cirozom procenjenog globalnim testovima hemostaze sa indeksima oštećenja jetrine funkcije	139
5.5.	Poređenje hemostatskog profila između bolesnika sa alkoholnom iolestaznom cirozom.....	140
5.6.	Poređenje standardnih testova za procenu statusa fibrinogena sa maksimalnom čvrstoćom fibrinskog ugruška u FIBTEM testu	141
5.7.	Ispitivanje sistema fibrinolize standardnim testovima i tromboelastometrijom	147
6.	ZAKLJUČCI.....	154
7.	LITERATURA.....	157
8.	SPISAK SKRAĆENICA.....	185

1. UVOD

1.1. FIZIOLOŠKA HEMOSTAZA

Hemostaza spada među najznačajnije mehanizame homeostaze ljudskog organizma. Sistem hemostaze predstavlja neodvojivi deo ukupnog odgovora na povredu. Primarne funkcije sistema hemostaze su obezbeđivanje tečnog stanja u cirkulaciji i promptno zaustavljanje krvarenja na mestu oštećenja krvnog suda. Uspešno ostvarivanje osnovnih funkcija ovog složenog biološkog sistema zavisi od kompleksnih interakcija i dinamične ravnoteže između više komponenata: krvnih sudova, ćelijskih elemenata krvi, proteina sistema koagulacije i fibrinolize, kao i drugih molekula. Glavne ćelijske komponente sistema hemostaze su endotelne ćelije, trombociti, monociti i eritrociti. Glavne molekulske komponente sistema hemostaze su faktori koagulacije i inhibitori, faktori sistema fibrinolize (aktivatori i inhibitori), adhezivni proteini, intercelularni proteini, proteini akutne faze zapaljenskog odgovora, imunoglobulini, joni kalcijuma (Ca^{2+}), fosfolipidi, prostaglandini i određeni citokini. Koagulacioni proteini su neophodni učesnici odgovora sistema hemostaze na povredu, dok ćelije kontrolišu trajanje, intenzitet i lokalizaciju hemostatskih reakcija. Regulacija molekulskih i ćelijskih puteva sistema hemostaze determiniše jedan od tri ishoda: kontrolisana hemostaza, krvarenje ili tromboza. Sistem hemostaze prekoračuje granice vaskularnog sistema svojim direktnim učešćem u složenim mehanizmima zapaljenskih reakcija, procesima ćelijske proliferacije i obnove tkiva nakon povrede, autoimunskim procesima, rastu tumora i širenju metastaza. Zahvaljujući učešću u održavanju integralne biološke homeostaze ljudskog organizma, sistem hemostaze se smatra sveobuhvatnim vitalnim funkcionalnim sistemom¹⁻⁴.

Uzajamnim preciznim delovanjem između primarne hemostaze i sistema koagulacije i fibrinolize postiže se adekvatna hemostaza. Normalno funkcionisanje sistema hemostaze odlikuje delikatna ravnoteža između prohemostatskih i antihemostatskih procesa, zahvaljujući kojoj se prevenira kako krvarenje iz povređenih krvnih sudova tako i razvoj spontane tromboze^{1,5,6}.

1.1.1. Uloga endotela u hemostazi

Endotel obezbeđuje protektivnu površinu koja sprečava kontakt hemostatskih komponenata krvi i reaktivnih subendotelnih struktura. Antikoagulaciona svojstva endotela obezbeđuju

specifični ne-proteinski i proteinski mehanizmi. Specifični ne-proteinski mehanizmi su protok krvi i vaskularni integritet. Specifični proteinski mehanizmi su sistemske antitrombozne i profibrinolizne komponente koagulacionog i fibrinoliznog sistema⁷.

Specijalizovana uloga endotela u hemostazi ogleda se u lokalnoj regulaciji aktivnosti trombocita i komponenata sistema koagulacije i fibrinolize. Intaktan endotel ispoljava antiagregaciono, antikoagulaciono i profibrinolizno delovanje (Shema 1)⁸. Antitrombozna svojstva endotela ograničavaju intravaskularno širenje hemostatske reakcije indukovane povredom krvnog suda⁹

1.1.1.1. Regulacija aktivnosti trombocita

Endotelne ćelije onemogućavaju adheziju trombocita za zid krvnog suda zahvaljujući fizikalnim i biohemijskim karakteristikama. Negativno naelektrisana površina endotelnih ćelija odbija negativno naelektrisane trombocite. U fiziološkim uslovima, trombociti cirkulišu u bliskom kontaktu sa unutarnjom površinom krvnog suda i ne interreaguju sa površinom intaktnog endotela u odgovoru na agoniste zahvaljujući oslobađanju medijatora: azotni oksid (NO), prostaciklin (PGI₂-prostaglandin I₂) i ekto-adenozindifosfataza (ektoADP-aza)¹⁰⁻¹³.

1.1.1.2. Regulacija tromboznih faktora

Ravnoteža između prirodnih antitromboznih i indukovanih prokoagulacionih aktivnosti endotela prevashodno je regulisana kontrolnim mehanizmima stvaranja trombina. Trombin deluje prokoagulaciono, antikoagulaciono i antifibrinolizno u zavisnosti od faze procesa koagulacije zbog čega predstavlja jedinstvenu serinsku proteazu. U plazmi zdravih osoba prisutna je niska enzimaska aktivnost trombina uslovljena njegovim ograničenim stvaranjem koje je kontrolisano precizno regulisanim putevima^{10,14}. Pored vršenja uloge u održavanju vaskularnog integriteta endotelne ćelije dinamično blokiraju interakciju sistemskih koagulacionih komponenata sa subendotelnim elementima koji vrše aktivaciju puteva koagulacije⁴.

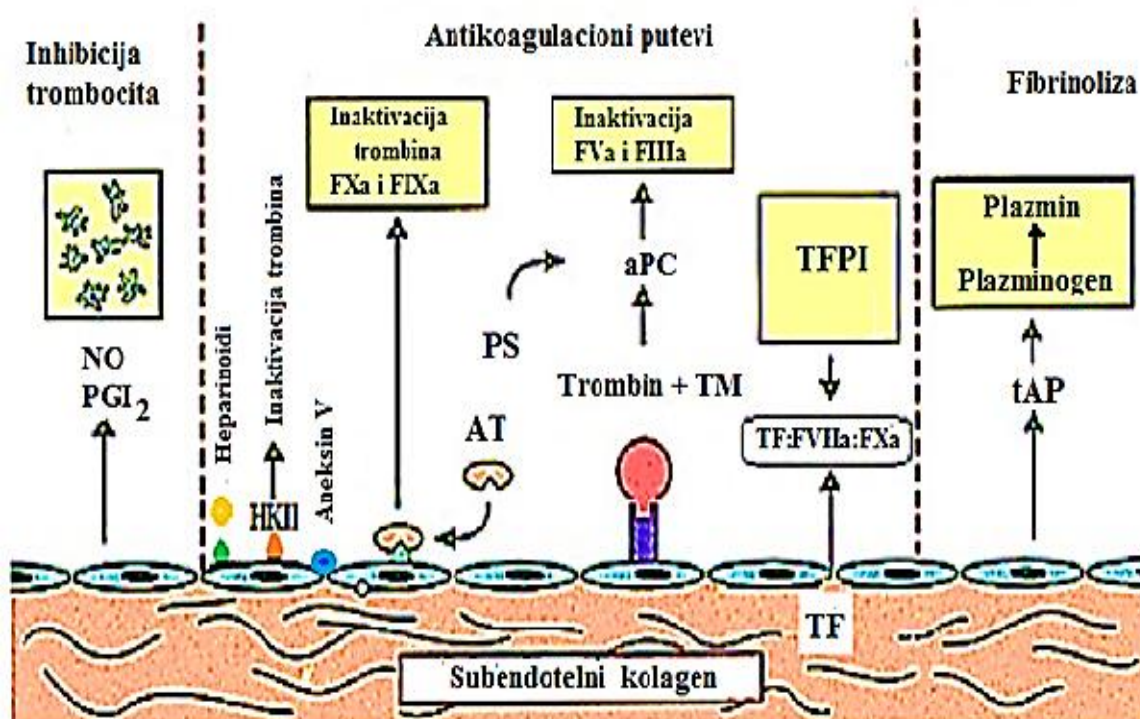
Na antikoagulacionoj strani, matriks koji okružuje endotel stvara *heparan sulfate* i *srodne glikozaminoglikane* koji su kofaktor u ispoljavanju aktivnosti antitrombina (AT). Heparan sulfat i srodni glikozaminoglikani povećavaju kinetiku inhibicije aktivnosti koagulacionih serinskih proteaza delovanjem AT (inhibicija trombina i aktiviranih faktora koagulacije (Fa) X i IX: FXa i FIXa). Subendotel sadrži *dermatan sulfate* koji pospešuju antitrombinsku aktivnost heparinskog kofaktora II (HKII)^{8,15,16}.

Endotel sprečava stvaranje trombina putem oslobađanja *inhibitora puta tkivnog faktora* (TFPI: *tissue factor pathway inhibitor*) koji se vezuje za FXa unutar kompleksa tkivni faktor

(TF)/VIIa/Xa i inhibira spoljnji put koagulacije. Endotelne ćelije su glavno mesto sinteze TFPI^{8,17,18}.

Endotelne ćelije eksprimiraju trombomodulin (TM) i endotelni receptor proteina C (ERPC) i sintetišu kofaktor protein S (PS). Vezivanje za TM inhibira delovanje trombina u aktivaciji trombocita, FV, FXIII i fibrinogena¹⁰. Vezivanjem za TM, trombin stiče sposobnost da aktivira antikoagulacioni put proteina C (PC). ERPC i PS regulišu aktivnost puta PC. Aktivirani PC (aPC) inhibira FVIIIa i FVa¹⁹⁻²¹.

Aneksin V se vezuje za površinu neaktiviranih i aktiviranih endotelnih ćelija. Aneksin V se vezuje visokim afinitetom za fosfolipide i inhibira prokoagulacione reakcije²². Heparinoidi (heparan sulfati, dermatan sulfati i srodni glikozaminoglikani), TFPI, TM i aneksin V ograničavaju intravaskularno širenje fibrina van granica hemostatskog ugruška⁹.



Shema 1. Antiagregaciono, antikoagulaciono i profibrinolizno delovanje endotela.

(reprodukovano i adaptirano uz saglasnost Iva Elezovića. Elezović I. Laboratorijska dijagnostika protromboznog stanja. U: Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze. 2008)

1.1.1.3. Regulacija komponenata sistema fibrinolize

Endotel ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti enzima sistema fibrinolize. Endotelne ćelije sekretuju aktivatore plazminogena. Tkivni aktivator plazminogena (tAP) je intravaskularni aktivator plazminogena. Plazminogen se konvertuje u plazmin (centralni enzim sistema fibrinolize) aktivacionim delovanjem tAP. U *in vitro* uslovima, pokazano je da aktivirane endotelne ćelije sintetišu urinarni aktivator plazminogena ili urokinazu (uAP). Na endotelnim ćelijama eksprimirani su receptori za vezivanje tAP i uAP^{23,24}. Endotelne ćelije proizvode jedan ili više inhibitora aktivatora plazminogena (PAI) koji vezuju tAP pri čemu se formiraju neaktivni kompleksi. U normalnoj plazmi, koncentracija konstituciono eksprimiranog PAI-1 premašuje koncentraciju tAP tako da je prisutna niska fibrinolizna aktivnost²³.

Zahvaljujući antitrombotičnim, antikoagulantnim i profibrinolitičnim delovanjima, intaktan endotel predstavlja aktivnu antitrombotičnu površinu koja omogućava transport plazmatskih i ćelijskih konstituenata kroz vaskulaturu. Narušavanje integriteta endotela (inflamacija, hidrodinamske sile smicanja) stvara protrombotičnu i antifibrinolitičnu površinu (gubitak protektivnih molekula, ekspresija adhezivnih molekula)²⁵.

* * * * *

U procesu spontanog zaustavljanja krvarenja iz povređenog krvnog suda trombociti su ključni učesnici svih faza procesa hemostaze: vaskularne, trombocitne i koagulacione. Hemostaza se postiže lokalizovanim prokoagulantnim reakcijama na površinama specifičnih ćelija^{1,3,26}.

1.1.2. Primarna hemostaza

Prvi događaj u kontroli krvarenja je formiranje *primarnog hemostatskog ugruška* na mestu oštećenja krvnog suda. Formiranje primarnog hemostatskog ugruška dešava se u vaskularnoj i trombocitnoj fazi hemostaze, što se naziva primarnom hemostazom¹. Brojne koordinisane interakcije između tkivnih komponenata, plazmatskih proteina i receptora na membrani trombocita učestvuju u inicijalnom zarastanju oštećenog područja krvnog suda^{1,26}.

Refleksna vazokonstrikcija nastaje za 10-30 sekundi i predstavlja lokalno indukovani fenomen. Vazokonstrikcija smanjuje ekstravaskularni gubitak krvi i usporava lokalni krvotok, stvarajući optimalne uslove za kontakt trombocita sa subendotelnom strukturom. Vazokonstrikciju pokreću direktno oštećenje glatkih mišićnih ćelija, faktori oslobođeni iz

endotelnih ćelija i refleksi inicirani lokalnim receptorima za bol (nervni refleksi simpatikusa)¹.

Narušavanje integriteta endotela uslovljava aktivaciju i programirane biohemijske promene endotelnih ćelija, što dovodi do transformacije antitromboznog u protrombozno stanje endotela. Aktivirani endotel eksprimira TF (tromboplastin, FIII) i izlaže subendotelno tkivo [kolagen, fibronektin, laminin, vitronektin, trombospondin, integrini, selektini, von Willebrandov faktor (vWF) i drugi adhezivni molekuli]. U kontaktu sa bogatim sadržajem subendotelnog tkiva trombociti menjaju morfologiju, adheriraju, agregiraju i oslobađaju sadržaj svojih granula^{10,26}.

1.1.2.1. Aktivacija trombocita

Na membrani trombocita konstituciono su ekspimirani brojni receptori za komponente ekstracelularnog matriksa i agoniste trombocita²⁷. Mirujući trombociti imaju lipidnu dvoslojnu membranu koja je asimetrična u pogledu distribucije fosfolipida. Negativno naelektrisani fosfolipidi (fosfatidilserin i fosfatidiletanolamin) smešteni su na unutarnoj strani lipidnog dvosloja. Neutralni lipidi (sfingomijelin i fosfatidilholin) smešteni su u spoljnjem sloju trombocitne membrane^{28,29}.

Trombociti se aktiviraju pri povredi krvnog suda u dodiru sa stranom površinom ili pod delovanjem aktivatora odnosno agonista [kolagen, trombin, ADP, tromboksan A₂ (TxA₂), epinefrin, faktor aktivacije trombocita (platelet activating factor: PAF), prostaglandini]. Aktivacija trombocita se sastoji u promeni bikonveksnog (diskoidnog) oblika, izlaganju negativno naelektrisanih fosfolipida, ekspresiji glikoproteinskih (GP) receptora i sekreciji sadržaja granula. Najmoćniji fiziološki aktivatori trombocita su kolagen i trombin. Aktivacija trombocita kolagenom i trombinom uslovljava mobilizaciju intracelularnog Ca²⁺ i redistribuciju membranskih fosfolipida, što ima za posledicu izlaganje fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina u spoljnjem sloju membrane. Izloženi negativno naelektrisani fosfolipidi kreiraju stanje trombocitne membrane koje je pogodno za formiranje kompleksa protrombinaza (membrana aktiviranih trombocita, Ca²⁺, FXa i FVa) u fazi propagacije procesa koagulacije^{1,27,29,30}.

Inicijalna adhezija trombocita

Kolagen i vWF su najvažniji subendotelni proteini za koje trombociti adheriraju²⁶. Među adhezivnim proteinima, vWF ima posebno važnu ulogu jer je istovremeno nesolubilna komponenta subendotelnog matriksa, cirkulišući plazmatski protein i protein alfa (α) granula trombocita koji se oslobađa iz aktiviranih trombocita. Plazmatski vWF ima ključnu ulogu u

inicijalnoj adheziji trombocita za povređeno mesto zida krvnog suda, jer se brzo i čvrsto vezuje za kolagen i, verovatno, za druge strukture matriksa (proteoglikani) i to na svim mestima na kojima je krv izložena povređenim tkivima³¹⁻⁴. vWF se postavlja kao most između trombocita i povređenog tkiva. Ovaj adhezivni protein poseduje vezujuća mesta za GPIb, GPIIb/IIIa i kolagene tip I, III i VI. Pri povredi krvnog suda vWF vezuje: a) kolagen izložen na mestu oštećenja zida krvnog suda i b) A1 domen vWF vezuje kompleks GPIb-V-IX na membrani trombocita. Kompleks GPIb-V-IX se sastoji od četiri transmembranske polipeptidne subjedinice: GPIb α i GPIb β spojeni disulfidnom vezom i nekovalentno vezani GPIIX i GPV. Vezujuće mesto za vWF smešteno je na GPIb α ^{27,35-8}.

Na membrani trombocita fiziološki receptori za kolagen su GPVI, GPIa/IIa (integrin $\alpha_2\beta_1$) i GP IV (CD36). Glavni receptor za kolagen je GPVI. Vezivanje kolagena za GPIa/IIa indukuje konformacione promene u ovom integrinu, koje povećavaju afinitet vezivanja trombocita za kolagen. Vezivanje trombocitnih receptora GPIa/IIa i GPVI za kolagen obezbeđuje stabilnu adheziju trombocita. Smatra se da GPIV ima modulatornu ulogu u ranoj fazi adhezije trombocita za kolagen i druge ligande. Stabilnoj adheziji trombocita doprinosi vezivanje fibronektina i integrina $\alpha_5\beta_1$ ^{22,27,37-40}. U čvrsto adheriranim trombocitima serija biohemijskih promena indukuje aktivaciju integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($\alpha_{IIb}\beta_3$), što omogućava interakcije visokog afiniteta sa adhezivnim proteinima (fibrinogen, vWF, fibronektin). Adhezija se dalje pojačava interakcijom drugih integrina/receptora sa lamininom i trombospondinom (TSP). Adhezivne interakcije su neophodne za formiranje stabilnih agregata aktiviranih trombocita i pospešenje rasta tromba³⁸⁻⁴⁰.

Adhezija trombocita *per se* potencira prokoagulacione odgovore trombocita. Trombociti adherirani za kolagen i aktivirani pomoću GPVI izlažu na spoljnoj površini prokoagulacione negativno naelektrisane fosfatidilserine, formiraju membranske mehuriće i konačno prokoagulacione mikrovezikule-mikropartikule. Tokom procesa preuređenja membrane trombociti dramatično menjaju oblik (poprimaju sferičan oblik) i izlažu brojne dugačke pseudopode, što olakšava pripojenje trombocita za subendotel. Adherirani trombociti se istežu na površini, a dodatni trombociti iz cirkulacije se pripajaju za adherirane trombocite i međusobno se spajaju. Prokoagulaciona transformacija trombocita se precizno odigrava na mestima gde je koagulacija poželjna (izložen subendotel)^{26,38}.

Postepena aktivacija trombocita

Adherirani trombociti lokalno oslobađaju solubilne agoniste (trombin, ADP, TxA₂) koji indukuju autokrinu ili parakrinu aktivaciju trombocita. Vezivanje agonista za specifične receptore stimuliše intracelularne signalne puteve koji indukuju mobilizaciju Ca²⁺ u

citoplazmu, što ima ključnu ulogu u aktivaciji integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, stvaranju TxA_2 , sekreciji granula i prokoagulacionoj funkciji trombocita^{27,38}.

Aktivacijom trombocita kolagenom i trombinom (*kolagenom i trombinom aktivirani trombociti*) formira se visoko aktivan inicijalni sloj prokoagulacionih trombocita na mestu oštećenja zida krvnog suda³. Na membrani trombocita nalaze se receptori umerenog i visokog afiniteta za vezivanje trombina. Proteazom aktivirani receptori 1 i 4 (Protease Activated Receptors 1 i 4: PAR1 i PAR4) su receptori umerenog afiniteta koji posreduju u delovanju trombina na trombocite. GPIb komponenta kompleksa GPIb-V-IX predstavlja receptor visokog afiniteta za vezivanje trombina. Smatra se da GPIb pojačava aktivaciju trombocita prethodno aktiviranih trombinom vezanim za PAR receptore i da je neophodan za ispoljavanje potpunih odgovora trombocita na delovanje trombina. Takođe, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vezuje trombin^{31,47,50}.

Kolagenom i trombinom indukovanu aktivaciju trombocita potencira ADP. ADP je uskladišten u trombocitnim tamnim granulama, a oslobađa se u toku aktivacije trombocita. ADP aktivira trombocite putem tri receptora: P2Y1, P2Y12 i P2X1. Aktivacija P2Y1 receptora ima ulogu u promeni oblika trombocita, agregaciji trombocita, produkciji TxA_2 , prokoagulacionoj aktivnosti, aktivaciji GPIIb/IIIa i adheziji fibrinogena za krvni ugrušak. Aktivacija P2Y12 receptora uzrokuje odgovore slične aktivaciji P2Y1 receptora. Dodatno, P2Y12 receptor ima važnu ulogu u potenciranju aktivacije trombocita delovanjem drugih fizioloških agonista: kolagen, vWF i TxA_2 ^{27,41}.

Smatra se da lipidni medijator TxA_2 ima ključnu ulogu u aktivaciji trombocita. TxA_2 pospešuje agregaciju trombocita povećanjem ekspresije GPIIb/IIIa. Delujući preko specifičnih receptora, TxA_2 pojačava aktivaciju trombocita mehanizmom pozitivne povratne sprege mobilizujući dodatne trombocite u rastući trombocitni ugrušak. Uz to, TxA_2 vrši funkciju vazokonstriktora^{27,42}.

Kateholamini imaju važnu ulogu u aktivaciji i agregaciji trombocita. U pogledu delovanja na aktivaciju trombocita, epinefrin ispoljava najsnažniji efekat. Mehanizam kojim epinefrin indukuje agregaciju trombocita nije poznat⁴³.

Ireverzibilna agregacija trombocita

Primarnu reverzibilnu agregaciju trombocita prati reakcija oslobađanja sadržaja trombocitnih granula [trombocitni faktor 4 (platelet factor 4 - PF4), beta tromboglobulin (β TG), serotonin, Ca^{2+}] delovanjem aktinskog citoskeleta. Reakcija oslobađanja sadržaja trombocitnih granula omogućava amplifikaciju aktivacije trombocita i kontrakciju glatkih mišićnih ćelija zida krvnog suda, što vodi ireverzibilnoj agregaciji trombocita i stvaranju trombocitnog tromba^{1,38}.

Ključnu ulogu u ireverzibilnoj agregaciji trombocita ima membranski receptor za fibrinogen (GPIIb/IIIa). Pri oštećenju zida krvnog suda GPIIb/IIIa na aktiviranim trombocitima postaje receptor visokog afiniteta za fibrinogen⁷. Vezivanje vWF za kompleks GPIb-V-IX indukuje konformacione promene u molekulama GPIIb/IIIa receptora koje uslovljavaju izlaganje vezujućih mesta za ligande: fibrinogen, vWF, fibronektin, trombospondin i vitronektin. U toku formiranja trombocitnog krvnog ugruška ovi proteini izgrađuju mostove između trombocita^{9,27}.

1.1.3. Sekundarna hemostaza

Trombocitni tromb je nedovoljno čvrst za uspostavljanje definitivne hemostaze. Trombocitno-fibrinski tromb potpuno zaustavlja isticanje krvi iz povređenog krvnog suda. Formiranje trombocitno-fibrinskog tromba obezbeđuje fibrin stvoren iz fibrinogena vezanog za površinu aktiviranih trombocita, što se ostvaruje u procesu koagulacije krvi. Vezivanjem faktora koagulacije za kataliznu fosfolipidnu površinu aktiviranih trombocita započinje lanac reakcija sekundarne hemostaze (koagulacija) isključivo na mestima oštećenja zida krvnog suda^{3,9}.

1.1.3.1. Inicijacija koagulacije

Faza inicijacije koagulacije je lokalizovana na ćelijama koje izlažu TF, koje se u fiziološkim uslovima nalaze ekstravaskularno. Nakon povrede ćelije koje ekspiriraju TF bivaju izložene cirkulišućoj krvi. TF je transmembranski glikoprotein konstituciono ekspiriran na subendotelnim fibroblastima i glatkim mišićnim ćelijama, ali i u drugim tkivima kao što su mozak, srce, bubrezi, testisi i placenta, što ukazuje na značaj ovog glikoproteina^{44,45}. Cirkulišuće mikropartikule oslobođene iz monocita, trombocita i drugih tipova ćelija ekspiriraju TF na svojoj površini⁴⁶. Osim u procesu koagulacije, TF ima važnu ulogu u inflamaciji, apoptozi, embrionalnom razvoju i migraciji ćelija^{47,48}. Interakcija između TF i FVIIa predstavlja ključni događaj u pokretanju stvaranja trombina. Biološka koncentracija slobodnog FVIIa u plazmi iznosi ~1-2% ukupne koncentracije. Nizak biološki nivo FVIIa u plazmi obezbeđuje pokretački kapacitet za stvaranje krvnog ugruška u toku inicijacije spoljnjeg puta koagulacije, a pre postizanja značajnog nivoa aktivacije drugih koagulacionih proteaza^{5,6}. Kompleks TF-FVIIa (*kompleks tenaza spoljnjeg puta koagulacije na fosfolipidnoj površini ćelija koje ekspiriraju TF*) katalizira aktivaciju malih količina FIX i FX (vitamin K zavisni makromolekularni supstrati proenzima) u aktivne enzime FIXa i FXa. *FIXa i FXa ostaju na površini aktiviranih ćelija ili disociraju u zavisnosti od stepena inhibicije*^{3,44,49}.

Na površini ćelija koje eksprimiraju kompleks TF-FVIIa mala količina inicijalno stvorenog FXa (*FXa proteaza spoljnog puta koagulacije*) dolazi u kontakt sa FVa³. S obzirom da je FVa odgovoran za većinu među-proteinskih interakcija i interakcija između proteina i membrana potrebnih za formiranje kompleksa protrombinaza, aktivacija zimogena FV predstavlja ključni regulatorni događaj. U fazi inicijacije FVa ima nekoliko izvorišta. Proces adhezije trombocita delimično aktivira trombocite i pospešuje sekreciju FV iz α granula i njegovu parcijalnu aktivaciju. FXa može aktivirati zimogen FV. Prokofaktor FV može se aktivirati u funkcionalni kofaktor delovanjem ne-koagulacionih proteaza, kao što su elastaze i katepsin G^{3,50}.

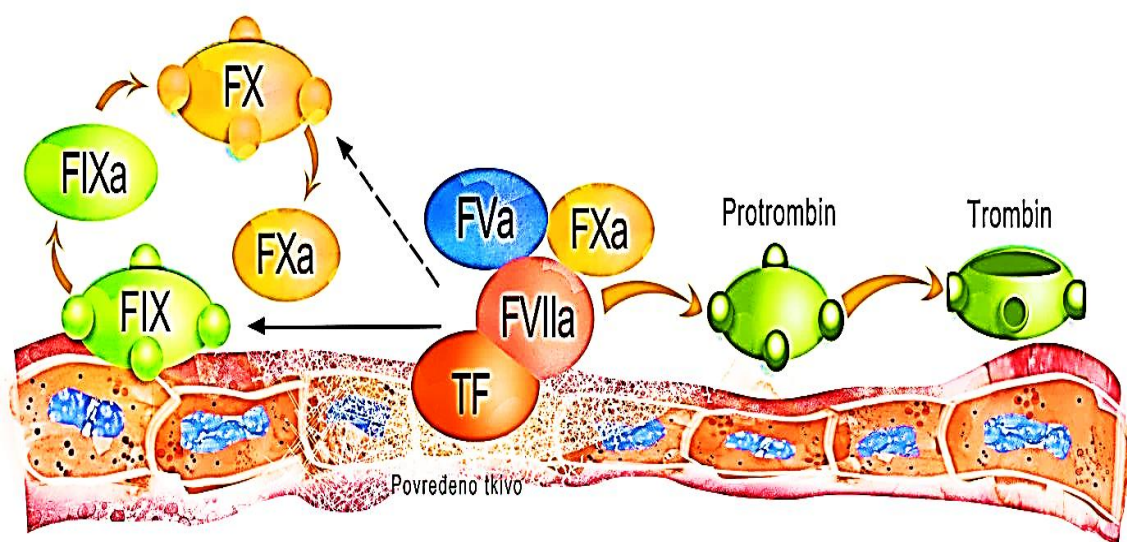
U prisustvu jona Ca²⁺, kompleks TF-FVIIa sa malom količinom FXa i FVa formira *kompleks protrombinaza spoljnog puta koagulacije*. Na ovom nivou aktivacije prokoagulacionog procesa susreću se spoljni i unutarnji put koagulacije. Delovanjem inicijalno stvorene protrombinaze stvara se mala količina trombina odnosno ~3-5% ukupne količine trombina koji se produkuje u toku procesa koagulacije. Ograničavajući faktor za stvaranje veće količine protrombinaze i trombina je mala količina FXa stvorenog u inicijalnoj fazi. U daljem toku procesa koagulacije inicijalno stvoren trombin amplifikuje sopstveno stvaranje^{3,5,6}.

Mehanizmi inhibicije u fazi inicijacije koagulacije

Prokoagulative odgovore pokrenute tkivnim faktorom na mestu vaskularnog oštećenja ograničavaju TFPI i AT. TFPI neutrališe FXa koji je vezan za kompleks TF-FVIIa. AT je slab inhibitor kompleksa TF-FVIIa. AT neutrališe inicijalno stvorene FXa i trombin. Glavno delovanje AT je suzbijanje stvaranja trombina i neutralisanje aktivnosti stvorenog trombina^{3,5,6}. AT inhibira FIXa mnogo sporije u odnosu na FXa, dok TFPI ne inhibira FIXa. Usled toga, disocirani FIXa može se vezati za obližnje trombocite i druge ćelijske površine. TFPI i AT inhibiraju FXa u plazmi i onemogućavaju njegov prelazak sa ćelija nosilaca TF na aktivirane trombocite. Prokoagulacioni proces se nastavlja kada nivo TF premaši inhibicioni potencijal TFPI i AT^{3,6}. Drugim rečima, FVIIa izviđa cirkulaciju u potrazi za mestima vaskularnog oštećenja odnosno mestima na kojima je izložen TF. Male količine FXa i trombina opominju na postojanje potencijalnog oštećenja krvnog suda. Ovu aktivnost nadgledaju prirodni inhibitori koji sprečavaju 'lažnu uzbunu' ili 'suviše oprežan odgovor'⁶.

Verovatno je da se u fiziološkim uslovima održava niska aktivnost puta TF u ekstravaskularnom prostoru. Koagulacioni proteini napuštaju vaskulaturu i prožimaju tkiva. U

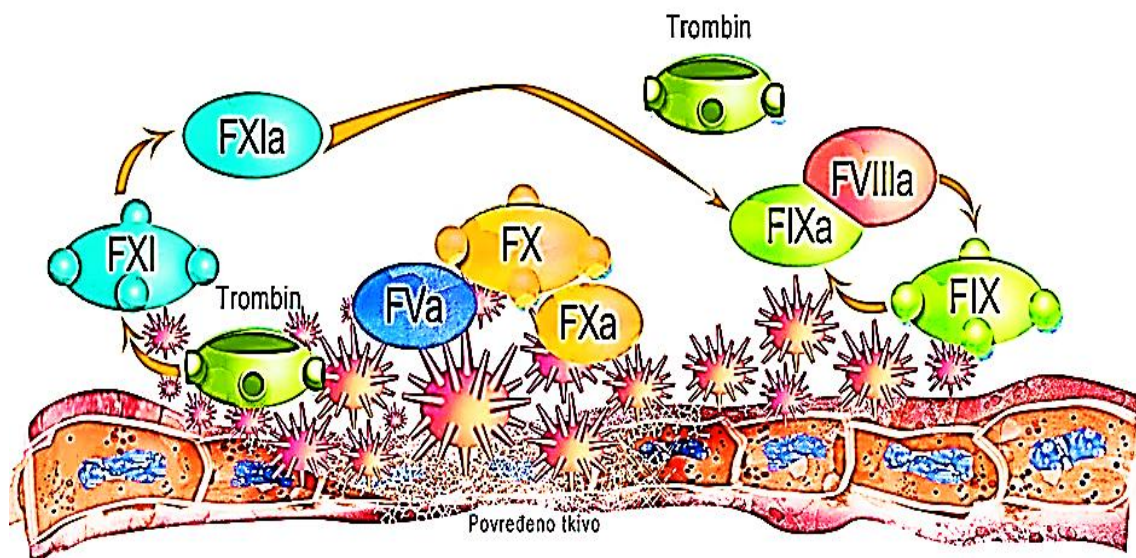
limfnim čvorovima utvrđeno je prisustvo koagulacionih proteina približno iste molekulske mase kao u krvi⁵¹. S obzirom da koagulacioni proteini prelaze u tkiva verovatno je da se FVII vezuje za TF i da se dešava aktivacija FX i FIX i u odsustvu oštećenja/povrede. Ova ideja je u saglasnosti sa nalazom niskog nivoa aktivacionih peptida koagulacionih faktora u krvi zdravih osoba^{52,53}. Fiziološko prisustvo niskog nivoa aktivacionih peptida koagulacionih proteaza u krvi naziva se 'bazalna koagulacija' ili 'prazan hod'⁵⁴. U fiziološkim uslovima ovaj proces ne dovodi do formiranja krvnih ugrušaka zato što trombociti i kompleksi vWF-FVIII ostaju unutar cirkulacije. Koagulacioni proces se nastavlja kada oštećenje vaskulature omogući prelazak trombocita i kompleksa vWF-FVIII u ekstravaskularna tkiva³.



Shema 2. Prikaz inicijacije procesa koagulacije.

1.1.3.2. Amplifikacija koagulacionog procesa

Mala količina trombina stvorenog u fazi inicijacije koagulacije ima ključnu ulogu u amplifikaciji prokoagulacionog odgovora (Shema 3)³. Vezivanje za adhezivne proteine subendotela lokalizuje trombocite u blizini ćelija nosilaca TF i omogućava njihovu dodatnu aktivaciju delovanjem trombina. *Trombin, inicijalno stvoren na ćelijama koje eksprimiraju TF, se premešta na obližnje trombocite i vezuje za receptor visokog afiniteta GPIa.* Ovaj glikoprotein služi kao postolje koje omogućava interakciju trombina sa supstratima na površini trombocita. Inicijalno stvoren trombin vrši nekoliko funkcija u spoljnjem putu koagulacije. Trombin aktivira trombocite, FV, FVIII i FXI i tako pokreće mehanizme koji dovode do amplifikacije koagulacionog procesa³.



Shema 3. Prikaz amplifikacije koagulacionog procesa.

Aktivacija trombocita

Dodatna aktivacija trombinom indukuje viši nivo prokoagulacione aktivnosti trombocita u odnosu na izolovano delovanje adhezivnih interakcija. Trombinom aktivirani trombociti imaju ključnu ulogu u kasnijim koagulacionim procesima delujući na nekoliko načina. Negativno naelektrisani fosfolipidi membrane trombocita omogućavaju nezavisno vezivanje supstrata (kompleks vWF-FVIII, FV, FXI, FX/FXa, FIXa, protrombin), što vodi povećanju njihove lokalne koncentracije i pozicioniranju za optimalnu aktivaciju. Vezivanje i aktivacija supstrata na fosfolipidnoj membrani olakšava formiranje funkcionalnih kompleksa između enzima (FIXa i FXa) i kofaktora (FVIIIa i FVa)^{5,6,55}.

Aktivacija FVIII, FV i FXI

Na trombinom aktiviranim trombocitima izlažu se vezujuća mesta za FXI (kompleks GPIb-V-IX) i kompleks vWF/FVIII (vezivanje nosećeg proteina vWF) nakon čega se FVIII oslobađa iz kompleksa sa vWF. Trombin aktivira FVIII u FVIIIa koji deluje kao kofaktor u aktivaciji FIX u FIXa. Trombin aktivira proenzim FV i obezbeđuje dodatnu količinu FVa koji je kofaktor u aktivaciji FX u FXa. Dakle, FVa i FVIIIa ubrzavaju aktivaciju protrombina delovanjem FXa i dalju aktivaciju FX delovanjem FIXa. Osim na fosfolipidnoj membrani trombocita, mehanizmom povratne sprege trombin aktivira FVIII i FV u plazmi. Zahvaljujući plazmatskoj aktivaciji kofaktori FVIIIa i FVa punim kapacitetom participiraju u reakcijama aktivacije koje se odigravaju na membrani trombocita^{3,5,6,56,57}.

Na površini aktiviranih trombocita, trombin aktivira FXI u FXIa. FXIa povećava stvaranje FIXa. Nakon inhibicije faze inicijacije plazmatskim inhibitorima, aktivacija FXI trombinom obezbeđuje dodatni prokoagulacioni stimulus. FXIa značajno doprinosi formiranju velike količine FXa u unutarnjem putu koagulacije^{3,5}.

Dodatno, trombinom aktiviran FXI inhibira lizu ugruška koja je posledica delovanja tAP i posledične kaskadne aktivacije procesa fibrinolize. Za maksimalnu inhibiciju fibrinolize dovoljna je mala količina FXIa (0.01% ukupne aktivacije). Pretežna aktivacija protrombina dešava se nakon formiranja fibrinskog ugruška, ali samo u prisustvu FXIa⁵⁸. Zbog toga, zaštita fibrinskog ugruška od razlaganja procesom fibrinolize zavisi od delovanja trombina koji se stvara u prisustvu FXIa u unutarnjem putu koagulacije. Stvoreni trombin povratno aktivira FXI. Inhibicioni efekat FXIa na fibrinolizu objašnjava zašto bolesnici sa deficitom FXI krvare iz tkiva sa visokom lokalnom fibrinoliznom aktivnošću⁵⁹.

U fazi amplifikacije trombin kontinuirano pojačava sopstveno stvaranje i postavlja koagulacioni proces na viši nivo pripremajući ga za eksplozivno stvaranje trombina, koje se odigrava u fazi propagacije koagulacionog procesa^{44,49}.

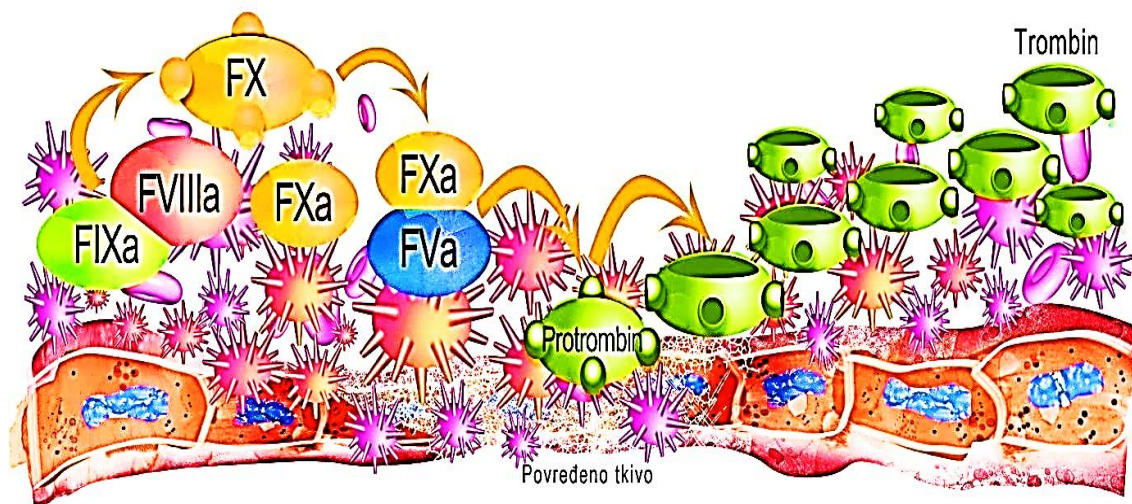
1.1.3.3. Propagacija koagulacionog procesa

Stvaranje dovoljne količine trombina koja je neophodna za formiranje stabilnog hemostatskog ugruška je ključna odlika faze propagacije koagulacionog procesa (Shema 4). Mobilizacijom velikog broja trombocita na mesto vaskularnog oštećenja obezbeđuje se površina za stvaranje velike količine trombina. U ovom procesu glavnu ulogu imaju: a) trombociti vezani za kolagen i aktivirani putem GPVI i b) trombociti vezani za fibrin unutar rastućeg ugruška i aktivirani trombinom. Trombociti obezbeđuju specifičnu prokoagulacionu fosfolipidnu površinu specijalizovanu za koordinisano efikasno formiranje enzimskih kompleksa *tenaza i protrombinaza*, koji ubrzavaju proces koagulacije i omogućavaju stvaranje velike količine trombina. Kompleksi tenaza i protrombinaza su efikasni aktivatori svojih supstrata sa kapacitetom konverzije nekoliko hiljada molekula supstrata u minuti, što ima za posledicu ogromno ubrzavanje stvaranja terminalne proteaze trombina^{3,5,26}.

U fazi propagacije velika količina trombina stvara se u unutarnjem putu koagulacije koji deluje na površini aktiviranih trombocita³.

U prisustvu jona Ca^{2+} , na fosfolipidnoj površini aktiviranih trombocita FVIIIa sa FIXa formira *kompleks tenaza unutarnjeg puta koagulacije*. Kompleks tenaza unutarnjeg puta koagulacije obezbeđuje najveću aktivnost FXa koja je neophodna za stvaranje velike količine trombina. FXa stvoren delovanjem tenaze naziva se *Xa proteaza unutarnjeg puta koagulacije*.

U prisustvu jona Ca^{2+} , na površini aktiviranih trombocita FXa sa FVa formira kompleks *protrombinaza*. Protrombinaza katalizuje konverziju protrombina u trombin. Stvaranje velike količine trombina (eksplozija trombina) na mestu povrede nadmašuje aktivnost inhibitorynih mehanizama^{2,5}.



Shema 4. Prikaz propagacije koagulacionog procesa.

Protrombinaza je ~300000 puta efikasnija u aktivaciji protrombina u odnosu na samostalnu aktivnost FXa. Eksplozija stvaranja trombina dovodi do konverzije molekula fibrinogena u monomere fibrinogena čijom se polimerizacijom formira fibrinski ugrušak. Za formiranje fibrina dovoljna je mala količina trombina odnosno <5% ukupne količine stvorenog trombina u procesu koagulacije. Trombin odvaja fibrinopeptide A i B iz fibrinogena (vezanog za GPIIb/IIIa) izlažući mesta prepoznavanja za polimerizaciju fibrinskih monomera u vlakna fibrina. Trombin se vezuje za fibrin i inkorporira u rastući hemostatski ugrušak⁵.

1.1.3.4. Stabilizacija hemostatskog ugruška

Aktivacija protrombina se nastavlja i u toku procesa formiranja fibrinske mreže. Nakon formiranja fibrinskih monomera trombin dostiže maksimalan nivo koji je dovoljan za aktivaciju transglutaminaze FXIII. Trombin aktivira kako plazmatski tetramer FXIII tako i trombocitni dimer FXIII. Polimeri fibrina su važan kofaktor u aktivaciji FXIII. FXIIIa vrši kovalentno ukršteno povezivanje solubilnih fibrinskih monomera u nesolubilne polimere fibrina, što dovodi do formiranja stabilne fibrinske mreže^{60,61}.

Aktivacija TAFI (thrombin activatable fibrinolytic inhibitor: trombinom aktiviran inhibitor fibrinolize) na nitima fibrina kompleksom trombin-TM je od ključnog značaja za formiranje potpuno stabilizovanog fibrinskog ugruška. Trombin difunduje do neoštećenih endotelnih ćelija i vezuje se za TM. TAFI je glikoprotein koji se sintetisuje u jetri, a nalazi se i u trombocitima. Aktiviran TAFI (TAFIa) je karboksipeptidaza B⁶². TAFIa uklanja karboksiterminalne rezidue lizina i arginina sa parcijalno razloženog fibrina. S obzirom da ove rezidue aminokiselina imaju ključnu ulogu u vezivanju i aktivaciji plazminogena, TAFIa inhibira vezivanje plazminogena za fibrin. Dakle, TAFIa inhibira fibrinolizu putem sprečavanja akumulacije plazminogena na površini ugruška i aktivacije glu-plazminogena u liz-plazminogen na nitima fibrina. TAFI kreira direktnu molekulsku vezu između sistema koagulacije i fibrinolize (Shema 5). Aktivacija TAFI trombinom suprimira prokoagulacionu aktivnost trombina. TAFIa obezbeđuje vezu između trombina i inhibicije fibrinolize, što može objasniti mehanizam koji leži u osnovi inhibicionog delovanja trombina na fibrinolizu^{3,63,64}. Pokazano je da je inhibicija fibrinolize delovanjem FXIa zavisna od TAFIa. Prisustvo FXIa doprinosi postizanju maksimalne aktivnosti trombina čime se povećava aktivacija TAFI i rezistencija ugruška na fibrinolizu. Ovaj put može imati određujuću ulogu za sudbinu fibrinskih ugrušaka. Aktivacija TAFI inhibira plazmin unutar koaguluma što je posebno značajno jer plazmin formiran unutar ugruška ima najveći uticaj na lizu koaguluma⁶⁵.

Ukratko: maksimalan nivo aktivnosti trombina koji se postiže nakon što je ugrušak formiran je važna determinanta rezistencije ugruška na fibrinolizu putem delovanja na aktivaciju TAFI. Delovanjem FXIa unutar koaguluma nastaje ~95% ukupne količine trombina stvorenog u procesu koagulacije. Formiranje stabilnog fibrinskog ugruška je završni događaj i jedino vidljivo fizičko ispoljavanje složenog biohemijskog procesa koagulacije^{1,3}.

Trombin učestvuje u procesu zarastanja rane. Trombin deluje direktno kao snažan faktor hemotakse i mitogeneze na glatke mišićne ćelije, fibroblaste, makrofage i endotelne ćelije i indirektno putem aktivacije trombocita i sekrecije faktora rasta⁹.

1.1.4. Kontrolni mehanizmi stvaranja trombina

Prokoagulacioni sistem je u ravnoteži sa antikoagulacionim sistemom (okončava hemostatske reakcije) i sistemom fibrinolize (razlaže formirane krvne ugruške). Ovaj balans omogućava obnovu oštećenog tkiva i ponovno uspostavljanje normalnog protoka krvi, uz istovremeno sprečavanje razvoja tromboze u lumenu krvnog suda³⁻⁶.

1.1.4.1. Antikoagulacioni sistem

Antikoagulacioni sistem se sastoji od nekoliko stehiometrijskih inhibitora proteaza i dinamičnog antikoagulacionog puta. Stehiometrijski inhibitori serinskih proteaza su TFPI, AT i HKII. Dinamičan inhibitor serinskih proteaza je put PC (trombin, TM, aPC, PS)^{69,108}.

Inhibitor puta tkivnog faktora - TFPI

TFPI α je glavni regulator faze inicijacije koagulacionog procesa⁵. Trombociti sadrže malu količinu TFPI. TFPI α se uglavnom sintetizira u endotelnim ćelijama. Heparin potencira oslobađanje TFPI α iz endotela^{17,18,66,67}. TFPI neutralizira FXa koji je vezan za kompleks TF-FVIIa, a potom inhibira kompleks TF-FVIIa i time dalju aktivaciju FX⁶⁸. Protein S je prevažno poznat kao kofaktor aPC u inaktivaciji FVa i FVIIIa, a manje kao stimulator inhibicije puta TF delovanjem TFPI α ⁶⁹. 'Direktna' antikoagulaciona aktivnost PS ogleda se u njegovom vezivanju za FXa i FVa i direktnoj inhibiciji FXa⁷⁰.

Antitrombin

AT je primarno inhibitor trombina. Drugi ciljni enzimi za inhibiciono delovanje AT su FIXa i FVIIa (spoljni put koagulacije), FXIa, FXIIa i sistem kalikrein-kininogen velike molekulske mase (unutarnji put koagulacije) i FXa (zajednički put koagulacije). Fiziološka aktivacija AT odvija se putem vezivanja za heparan sulfat proteoglikane (heparinoidi). Heparan sulfat proteoglikani su strukturalno slični sulfatisani polisaharidi, a nalaze u vaskularnom endotelu i matriksu gde ispoljavaju antikoagulacionu aktivnost⁷¹.

Heparinski kofaktor II

Leuserpin 2 je drugi naziv za HKII. HKII se sintetizira u jetri. HKII je homologan AT i drugim članovima familije serpina u odnosu na koje pokazuje ~30% homologije u amino kiselinim sekvencama. HKII ispoljava sličnost sa AT u odnosu na interakcije sa heparinom^{16,71}. Inhibicija koagulacije delovanjem HKII je ograničena na trombin. Dodatno, HKII inhibira katepsin G i himotripsin^{72,73}.

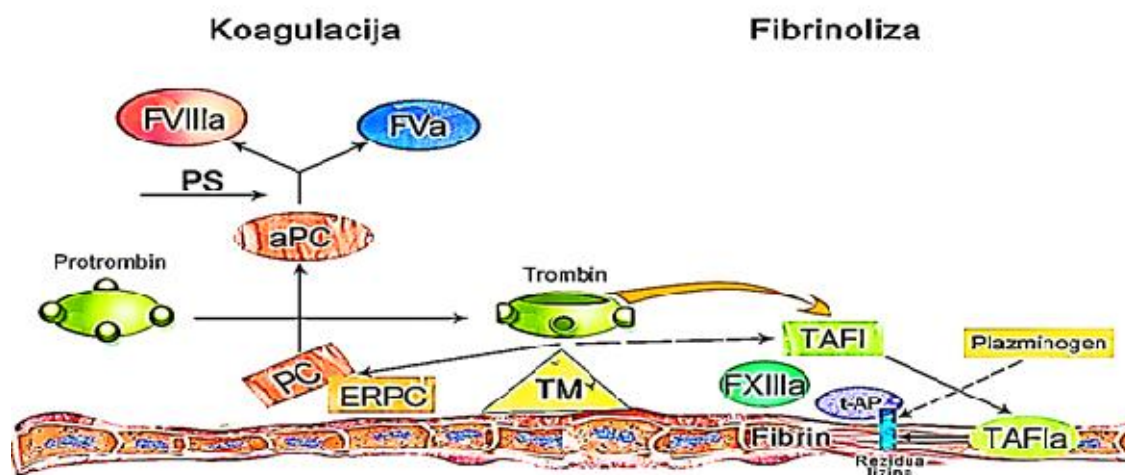
Put proteina C

Drugi nazivi za PC su *autoprotrombin IIa* i *faktor koagulacije XIV*⁷⁴. PC je strukturalno sličan drugim vitamin K zavisnim proteinima (FII, FVII, FIX, FX). PC se sintetizira u jetri kao neaktivan prekursor, ali je eksprimiran i na endotelu⁷⁵.

Kompleks trombin-trombomodulin

Trombomodulin je integralni membranski protein endotelnih ćelija koji vrši funkciju endotelnog receptora za trombin. U kompleksu sa TM, trombin više ne prepoznaje fibrinogen kao supstrat niti aktivira trombocite, FV i FVIII. TM konvertuje trombin u antikoagulacioni enzim. Kompleks trombin-TM katalizuje aktivaciju PC nakon njegovog vezivanja za ERPC

(Shema 5). U prisustvu fosfolipida i Ca^{2+} , PS stimuliše aktivnost PC^{9,75}. Put aPC obezbeđuje visoko efikasan i specifičan regulacioni mehanizam procesa koagulacije putem inhibicije FVa i FVIIIa. Antikoagulaciono delovanje dinamično aktiviranog puta aPC vezano je za ograničavanje faze propagacije koagulacionog procesa i predstavlja najznačajniji mehanizam negativne povratne sprege u procesu koagulacije⁵. Put aPC pospešuje fibrinolizu, verovatno vezivanjem i inhibicijom PAI⁷⁶. Uz to, redukovano stvaranje trombina delovanjem aPC vodi smanjenoj aktivaciji TAFI i povećanoj lizi ugruška. Ovi mehanizmi objašnjavaju profibrinolizni efekat aPC. Aktivnost aPC kontrolišu inhibitor PC (PAI-3; serpin izolovan iz urina gde formira kompleks sa urokinazom) i α_2 inhibitor proteinaze. Pored kontrole aktivnosti PC, PAI-3 snažno inhibira kompleks trombin-TM, što ukazuje da ovaj serpin ima ključnu ulogu u regulaciji antikoagulacionog puta PC. Aktivnost PS kontrolišu C4b-vezujući protein koji sa PS formira kompleks u kojem PS gubi aktivnost kofaktora^{9,77}.



Shema 5. Prikaz molekulskih veza između procesa koagulacije i fibrinolize.

S druge strane, TM konvertuje trombin u antifibrinolizni enzim usmeravajući ga ka aktivaciji TAFI, koji suprimira ulogu fibrina kao kofaktora u aktivaciji plazminogena. TM kreira direktnu molekulsku vezu između koagulacione i fibrinolizne kaskade tako da aktivacija koagulacije suprimira aktivnost fibrinolize. Dakle, koagulaciona i fibrinolizna kaskada su povezane preko trombina, TM i TAFIa. Put TAFIa je važan za održavanje odgovarajućeg balansa između taloženja i uklanjanja fibrina, štiteći vaskularni sistem od velikog gubitka krvi na mestu oštećenja i obezbeđujući održavanje tečnog stanja krvi na drugim mestima. AT inaktivira kompleks trombin-TM. Heparan sulfat je kofaktor u ispoljavanju aktivnosti AT^{9,63}.

1.1.5. Sistem fibrinolize

Sistem fibrinolize omogućava održavanje prolaznosti krvnih sudova. Procesom enzimske razgradnje fibrina sistem fibrinolize sprečava dostizanje kritičnih nivoa fibrinskih polimera i nastanak tromba ili vrši uklanjanje već stvorenih tromba. Koordinisanim delovanjem komponenata sistema fibrinolize ostvaruje se lokalizovana aktivacija fibrinolize na mestu taloženja fibrina sa ograničenim razlaganjem hemostatskog ugruška, što dovodi do rekanalizacije krvnog suda na mestu povrede. Stvaranje fibrina pokreće inicijalnu fazu procesa fibrinolize^{1,23,78,79}.

1.1.5.1. Komponente sistema fibrinolize

Većina enzima sistema fibrinolize su serinske proteaze. Glavni inhibitori enzimskih komponenata sistema fibrinolize pripadaju superfamiliji serpina⁸⁰ (Shema 6).

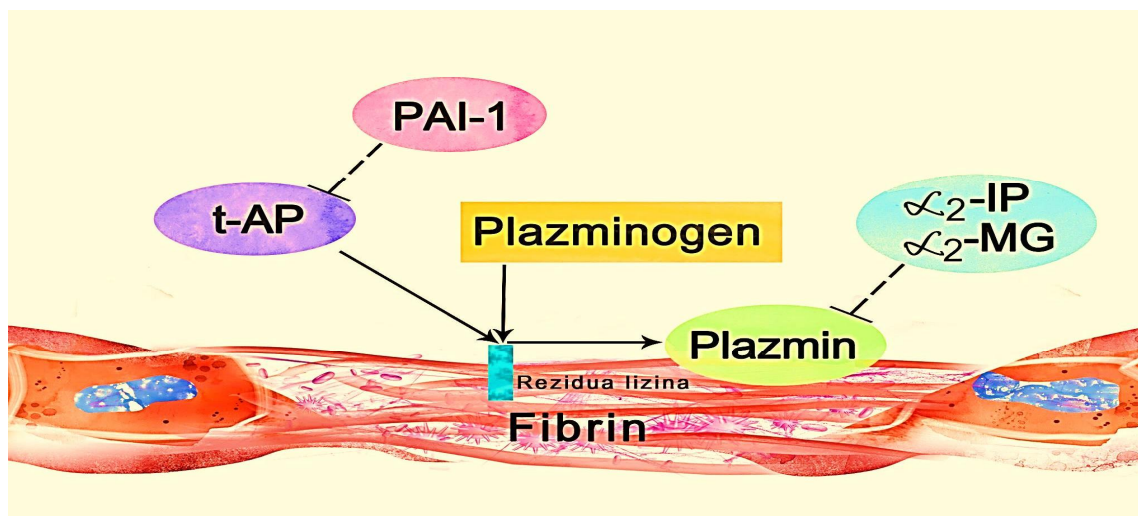
Plazmin je centralni enzim fibrinoliznog sistema, čija je glavna funkcija razgradnja fibrina. U plazmi, plazmin se nalazi u neaktivnom obliku kao proenzim plazminogen. **Plazminogen** je jednolančani glikoprotein koji se primarno sintetisuje u jetri. Nativni glikoproteinski lanac plazminogena ima amino-terminalnu glutaminsku kiselinu ('Glu-plazminogen'). Ograničenim proteoliznim delovanjem plazmina, Glu-plazminogen se konvertuje u modifikovane forme koje su poznate pod zajedničkim nazivom 'Liz-plazminogen' (plazminogen sa amino terminalnim lizinom). Liz-plazminogen je glavni supstrat za aktivatore plazminogena^{79,81}.

Aktivatori plazminogena primarno se sintetisuje u endotelnim ćelijama kao jednolančane forme. Aktivatore plazminogena sekretuju i druge ćelije: bubrežne epitelne ćelije, fibroblasti i monociti/makrofagi²³. **tAP** je glavni intravaskularni aktivator plazminogena²³. Aktivacija plazminogena u plazmin pod delovanjem tAP primarno je uključena u razlaganje fibrina u cirkulaciji⁸². Plazmin konvertuje jednolančanu u dvo-lančanu formu tAP. Obe forme tAP ispoljavaju ekvivalentnu enzimsku aktivnost kada su vezane za fibrin. U odsustvu fibrina, jednolančana forma tAP ispoljava slabiju aktivnost²³. Glavna uloga **uAP** je indukcija pericelularne proteolize u toku remodeliranja i obnove tkiva, učesće u funkcionisanju makrofaga, ovulaciji, implantaciji embriona i invaziji tumora^{1,83}.

Akcesorni aktivatori fibrinolize

Proteaze kontaktne faze aktivacije unutaršnjeg puta koagulacije (kalikrein, FXIa i FXIIa) mogu direktno aktivirati plazminogen. U normalnim uslovima, kalikrein, FXIa i FXIIa su odgovorni za 15% ukupne plazmatske aktivnosti plazmina²³. Membranska metaloproteaza matriksa tip1 (MT1-MMP: membrane type1 matrix metalloproteinase) ispoljava fibrinoliznu aktivnost u

odsustvu plazminogena⁸⁴. U *in vitro* uslovima pokazano je da su proteaze koje aktiviraju FVII, takođe, aktivatori jednolančanog plazminogena⁸⁵.



Shema 6. Opšti pregled sistema fibrinolize.

Aktivacija plazminogena u plazmin na nitima fibrina

Glavni supstrat plazmina je fibrin. Fibrin reguliše sopstvenu degradaciju vezivanjem za svoju površinu plazminogena i tAP. Putem lizin-vezujućih mesta, plazminogen i tAP se vezuju za pozitivno naelektrisane rezidue lizina koje su eksprimirane na površini fibrina. Konverzija plazminogena u plazmin odvija se putem pretežnog delovanja dvo-lančanog tAP^{6,23,78}. Trimolekulski kompleks fibrin/plazminogen/tAP konvertuje proenzim plazminogen u aktivan proteolizni enzim plazmin. Nevezan za fibrin ili za ćelijske receptore plazmin podleže brznoj inhibiciji. Inicijalno stvoren plazmin koji je vezan za fibrin kontinuirano izlaže karboksi-terminalne rezidue lizina i tako stimuliše sopstveno stvaranje. Putem izloženih lizin-vezujućih mesta, plazminogen i tAP nastavljaju da se vezuju za fibrin, što vodi povećanom stvaranju plazmina i uklanjanju fibrina. Plazminogen se vezuje za rezidue lizina unutar fibrina putem lizin-vezujućih mesta. S obzirom da plazmin razlaže fibrin hidrolizom peptidnog mosta u blizini rezidua lizina, stvaraju se karboksi-terminalne rezidue lizina. Plazminogen se vezuje većim afinitetom za karboksi-terminalne u odnosu na amino-terminalne rezidue lizina, što dalje ubrzava fibrinolizu putem stimulacije vezivanja plazminogena za fibrinski ugrušak koji je u procesu razlaganja⁸⁶. Plazmin razlaže niti fibrina na mnogim mestima, oslobađajući solubilne fibrin degradacione produkte (fdp)²³. Pored fibrinogena i fibrina, plazmin hidrolizuje i druge plazmatske proteine: FV, FVIII, komponente sistema komplementa, adrenokortikotropni hormon, hormon rasta i glukagon⁷⁹.

1.1.5.2. Regulacioni mehanizmi sistema fibrinolize

Inhibicija sistema fibrinolize odigrava se na nivou aktivacije plazminogena i na nivou plazmina.

Inhibitori aktivacije plazminogena

Najvažniji i najbrže delujući fiziološki inhibitor tAP i uAP je specifični **inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1)**. Drugi nazivi za PAI-1 su *endotelni inhibitor aktivatora plazminogena i serpin 1*. PAI-1 primarno sintetišu endotelne ćelije, ali i drugi tipovi ćelija (monociti, makrofagi, hepatociti, adipociti i trombociti). Klirens PAI-1 vrši se u jetri^{27,87,88,89}.

PAI-2 inhibira dvolančane tAP i uAP sa komparabilnom efikasnošću, ali je manje efikasan u inaktivaciji jednolančanih tAP i uAP. PAI-2 sintetišu vaskularne endotelne ćelije, leukociti (posebno monociti) i ćelije fibrosarkoma²³. Dodatnu inhibiciju aktivacije plazminogena obezbeđuje **TAFIa**. FXIIIa vrši ukršteno vezivanje α_2 -IP i TAFIa za rezidue lizina. Nakon aktivacije trombinom, TAFIa uklanja karboksi-terminalne rezidue lizina sa niti fibrina, sprečavajući vezivanje plazminogena i tAP i stvaranje plazmina. Indirektnim delovanjem, FXIIIa doprinosi većoj rezistentnosti fibrinskog ugruška na delovanje fibrinolize. Aktivacija FXIII i TAFI trombinom ima ključnu ulogu u formiranju potpuno stabilizovanog fibrinskog ugruška^{23,6,87}. C1 inhibitor može inhibirati tAP u plazmi²³.

Inhibitori plazmina

Inhibitori plazmina su α_2 -inhibitor plazmina (α_2 -IP; α_2 -antiplazmin) i α_2 -makroglobulin (α_2 -MG).

α_2 -IP je najznačajniji fiziološki inhibitor plazmina. α_2 -IP se sintetiše u jetri, a prisutan je i u α granulama trombocita. α_2 -IP ostvaruje inhibicionu aktivnost na tri načina: neposrednom i brzom inaktivacijom slobodnog plazmina, sprečavanjem vezivanja plazminogena za fibrin i unakrsnim vezivanjem sa lancima fibrinogena u toku koagulacije krvi. α_2 -IP brzo inaktivira slobodan plazmin. Plazmin vezan za fibrin je relativno zaštićen od inaktivacije zbog zauzetosti lizin-vezujućih mesta. S druge strane, TAFIa smanjuje zaštićenost plazmina putem uklanjanja plazmin-vezujućih rezidua lizina sa niti fibrina. Različiti tipovi ćelija (endotelne ćelije, monociti, makrofagi, neutrofil i neke tumorske ćelije) eksprimiraju površinske receptore za plazminogen i tAP i/ili uAP i na taj način lokalizuju fibrinoliznu aktivnost. Receptori ovih ćelija obezbeđuju specijalizovanu sredinu zaštićenu od delovanja cirkulišućih inhibitora²³.

α_2 -MG sintetišu endotelne ćelije i makrofagi, a nalazi se i u α granulama trombocita. α_2 -MG inhibira aktivnost plazmina sa 10% efikasnosti α_2 -IP²³. Pored plazmina, α_2 -MG inhibira trombin, FXa, FXIa, kalikrein, elastaze, kolagenaze, proteolizne enzime (bakterija, zmijskih

otrova, parazita, biljaka) i katepsin G neutrofila. S obzirom na prisustvo u endotelu i trombocitima, smatra se da α_2 -MG ima ulogu i u regulaciji aktivnosti proteoliznih enzima na ćelijskim membranama i zaštiti vaskularnog endotela od oštećenja delovanjem plazmatskih i ćelijskih proteaza u toku zapaljenskih i hemostatskih reakcija¹.

Histidinom bogat glikoprotein (HBG) učestvuje u regulaciji angiogeneze, klirensu imunskih kompleksa, koagulaciji i fibrinolizi. HBG ostvaruje aktivnost na nekoliko načina: vezuje se za lance heparan sulfata i kompetitivno inhibira heparinazu i razgradnju heparan sulfata, blokira interakciju između heparina i AT, ispoljava profibrinoliznu aktivnost putem stimulacije aktivacije plazminogena delovanjem tPA (pojačanje aktivacije ~100 puta)⁹⁰⁻⁶.

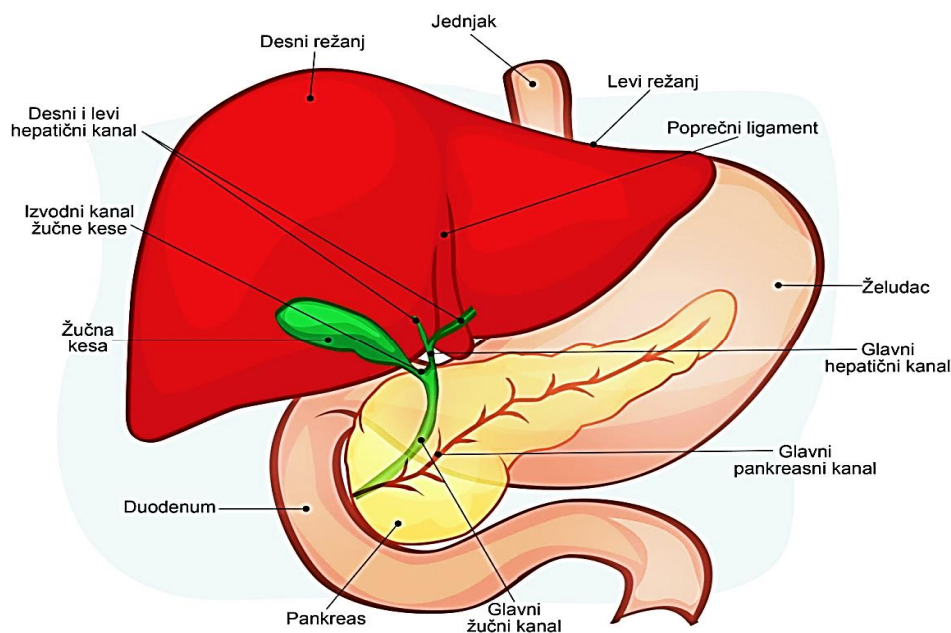
1.2. POREMEĆAJI HEMOSTAZE U OBOLJENJU JETRE

1.2.1. Osnovna anatomska građa i funkcije jetre

Jetra je najveći organ u ljudskom organizmu. Težina normalne jetre iznosi 1200-1500g, promer 20-23cm x 12-14cm x 10-12.5cm. Jetra čini 2-3% telesne mase odrasle osobe. Jetra je smeštena u desnom gornjem kvadrantu trbušne duplje. Obavija je visceralni peritoneum (Glisson-ova kapsula). Jetra se sastoji iz dva glavna i dva akcesorna lobusa. Gornja granica jetre nalazi se u nivou desnog IV međurebarnog prostora u medioklavikularnoj liniji, dok je donja granica nešto ispod ivice rebarnog luka. Gornja površina jetre je preko subfreničnog prostora i dijafragme u odnosu sa plućnom i srčanom maramicom/srcem, dok je donja površina jetre u kontaktu sa duodenumom, kolonom, desnim nadbubregom/bubregom, jednjakom i želucem. Kroz hilus jetre (vrata jetre) izlaze dva glavna žučna kanala koji se izvan jetre spajaju u glavni jetrin kanal (ductus hepaticus). Spajanjem glavnog jetrinog kanala sa kanalom koji izvodi žuč iz žučne kese (ductus cysticus) formira se sabirni žučni kanal ductus choledochus, koji dovodi žuč u dvanaestopalačno crevo. Ductus hepaticus i žučna kesa predstavljaju ekstrahepatične žučne puteve^{97,98}.

Jetra kao vitalan organ ima centralnu ulogu u: a) sintezi, skladištenju, metabolizmu i redistribuciji amino kiselina, proteina, ugljenih hidrata, lipida i vitamina, b) biotransformaciji endogenih supstanci, lekova i toksina, c) detoksikaciji, modifikaciji i ekskreciji egzogenih i endogenih supstanci, d) formiranju i sekreciji žuči, e) imunskom i inflamacionom odgovoru. Većinu navedenih funkcija vrše parenhimne ćelije (hepatociti) koje čine 70-80% svih ćelija jetre. Ne-parenhimne ćelije čine 20% jetrinih ćelija: Kupferove ćelije (makrofagi), stelatne

ćelije (fibroblasti), sinusoidalne endotelne ćelije, bilijarne epitelne ćelije (holangiociti), limfociti i ovalne ćelije (ćelije progenitori)^{98,99}.

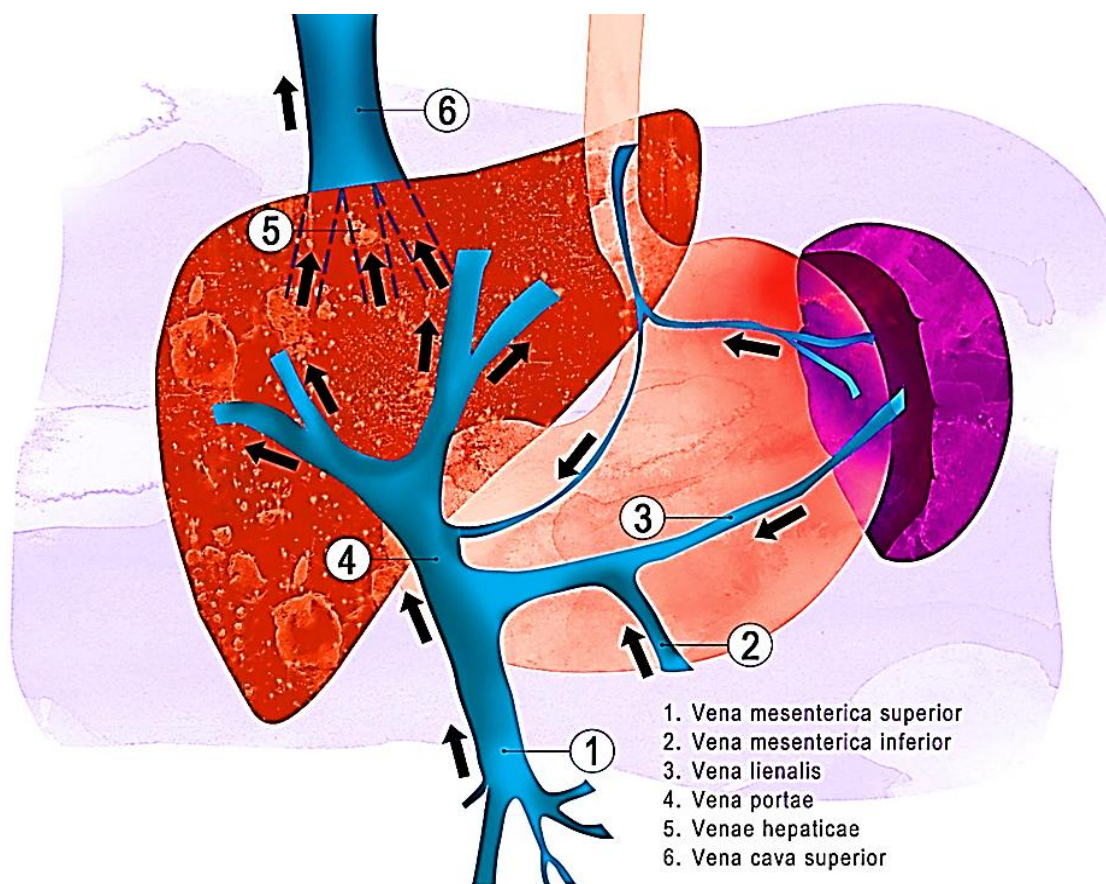


Shema 7. Prikaz anatomske lokalizacije i osnovne građe jetre.

1.2.2. Vaskularizacija jetre

Vaskularizacija jetre odražava složenost njenih funkcija. Jetra ima dva aferentna krvna sistema i jedan eferentni krvotok (Shema 8). Jetra prima krv iz hepatične arterije (25%) i vene porte (75%). Oko 25% srčanog protoka odvija se kroz jetru (1mL/g/min). Krv iz jetre se uliva u donju šuplju venu (v. cava inferior) preko tri glavne i mnogo manjih vena (vv. hepaticae)⁹⁸. Vena porte nastaje spajanjem slezinske vene (v. lienalis) i gornje mezenterične vene (v. mesenterica superior) iza glave pankreasa. Donja mezenterična vena (v. mesenterica inferior) dovodi krv iz leve polovine kolona i rektuma i spaja se sa lijenalnom venom pre njenog spoja sa gornjom mezenteričnom venom. Gornja mezenterična vena drenira krv iz tankog creva (jejunuma, ileuma), ascendentnog i transverzalnog kolona. Direktna pritoka vene porte je leva gastrična vena (v. coronari ventriculi), koja drenira želudac i ezofagogastrični prelaz. U hilusu jetre vena porte se deli na desnu i levu granu. Kod oko 10% populacije vena porte se grana na tri grane od kojih dve grane idu u desnu, a jedna u levu jetru. Zajednička arterija jetre (a. hepatica communis) snadbeva oksigenisanom krvlju jetru, pilorus želuca, duodenum i

pankreas. Zajednička arterija jetre polazi iz celijačnog stabla (truncus coeliacus) i iza pilorusa se račva na ushodnu granu za jetru (a. hepatica propria) i nishodnu granu za želudac i duodenum (a. gastroduodenalis). Cirkulacija kroz parenhim jetre (mikrocirkulacija jetre) obavlja se kroz fino grananje dovodnog krvnog sistema u sinusoidne, arteriole i kapilare i kroz odvod krvi iz sinusoida direktno u centralne, sublobulske i druge veće hepatične vene⁹⁸.



Shema 8. Prikaz vaskularizacije jetre.

1.2.3. Hemostazni profil u hroničnom oboljenju jetre

Jetra ima centralnu i kompleksnu ulogu u hemostazi. Jetra je jedino ili glavno mesto sinteze svih faktora koagulacije sa izuzetkom vWF koji se sintetiše u endotelnim ćelijama. Parenhimne ćelije jetre sintetišu fibrinogen (FI), protrombin (FII), FV, FVII, FIX, FX, FXI, FXII i FXIII. FVIII se uglavnom sintetiše u endotelnim ćelijama sinusoida jetre, a u manjem obimu u endotelu i ne-parenhimnim ćelijama bubrega, slezine, pluća i mozga. U jetri se

sintetišu regulacioni proteini koagulacionog sistema: AT, HKII, PC i PS. Sa izuzetkom tAP i PAI-1, jetra je mesto sinteze proteina sistema fibrinolize i njihovih inhibitora. Jetra proizvodi trombopoetin (faktor rasta megakariocitne loze). Mononuklearno fagocitni sistem (MFS) jetre uklanja iz cirkulacije aktivirane faktore koagulacije, aktivacione komplekse koagulacionog i fibrinoliznog sistema i degradacione produkte fibrinogena i fibrina (FDP/fdp)¹⁰⁰⁻⁹.

Oboljenje jetre odlikuju brojni i kompleksni poremećaji hemostaze kako u primarnoj hemostazi i koagulacionom sistemu tako i u antikoagulacionim putevima i fibrinoliznom sistemu (Tabela 1)¹¹⁰.

Tabela 1. Promene u sistemu hemostaze koje doprinose krvarenju (A) i suprotstavljaju se krvarenju (B).

A Promene koje inhibiraju hemostazu

Trombocitopenija
Poremećaj funkcije trombocita
Snižen hematokrit
Povećana produkcija NO i PGI₂
Snižena aktivnost FII, FV, FVII, FIX, FX i FXI
Deficit vitamina K
Disfibrinogenemija
Sniženi nivoi inhibitora plazmina, FXIII i TAFI
Povišen nivo tAP

B Promene koje pospešuju hemostazu

Povišen nivo vWF
Povišen nivo FVIII
Snižena aktivnost ADAMT13
Sniženi nivoi AT, PC, PS, HKII
Snižen nivo plazminogena

A. Promene koje inhibiraju hemostazu u hroničnom oboljenju jetre

Primarna hemostaza

Hronično oboljenje jetre odlikuje varijabilan stepen trombocitopenije i disfunkcije trombocita (trombocitopatija)¹¹¹. Trombocitopeniju uzrokuju: smanjena produkcija trombocita zbog smanjene sinteze trombopoetina, povećana sekvestracija trombocita u slezini (splenomegalija,

hipersplenizam) i povećana potrošnja trombocita uzrokovana intravaskularnom aktivacijom koagulacije^{112,113}. Moguća je uloga antitrombocitnih antitela u nastanku trombocitopenije¹¹⁴. Povećana produkcija NO i PGI₂ (endotelni inhibitori trombocita) doprinosi poremećaju aktivacije trombocita¹¹⁵. Trombocitopatija inhibira adheziju i agregaciju trombocita¹¹⁶⁻⁹. Disfunkcija endotela i vazodilatacija (posredovani endokannabinoidima i NO) i poremećaj subendotelno-trombocitnih interakcija doprinose poremećajima primarne hemostaze u oboljenju jetre¹²⁰.

Sekundarna hemostaza - sistem koagulacije

U hroničnom oboljenju jetre često su snižene aktivnosti FII, FV, FVII, FIX, FX i FXI. Vitamin K je ključni kofaktor u produkciji biološki aktivnih formi FII, FVII, FIX i FX. U prekursorima ovih faktora koagulacije, vitamin K pospešuje hepatičnu post-ribozomalnu konverziju određenih rezidua glutaminske kiseline u gama-karboksi glutaminsku kiselinu (γ -Glu). γ -Glu je neophodna za ispoljavanje funkcionalne aktivnosti vitamin K zavisnih faktora koagulacije, zahvaljujući sposobnosti vezivanja jona Ca²⁺ i fosfolipida. Deficit vitamin K zavisnih faktora koagulacije je posledica poremećaja γ karboksilacije glutaminske kiseline (deficit vitamina K ili poremećaj aktivnosti γ karboksilaze). Poremećaj u γ karboksilaciji uzrokuje sintezu inertnih prekursora FII, FVII, FIX i FX (proteini PIVKA - Protein Induced by Vitamin K Absence)^{1,114}.

Obzirom da je fibrinogen reaktant akutne faze zapaljenskog odgovora, koncentracija fibrinogena je normalna ili povišena u stabilnom hroničnom oboljenju jetre^{103,121}. Hipofibrinogenemija je prisutna kod bolesnika sa teškom hepatičnom insuficijencijom u dekompenzovanoj cirozi i akutnoj insuficijenciji jetre^{103,115}. U teškoj insuficijenciji jetre hipofibrinogenemija je posledica smanjene sinteze, ubranog klirensa i povećane potrošnje koja je uzrokovana intravaskularnom koagulacijom^{102,103,107,114,122}.

Disfibrinogenemija

Stečena disfibrinogenemija je odlika hroničnog oboljenja jetre^{103,123,124}. Disfibrinogenemija predstavlja kvalitativan poremećaj molekule fibrinogena prisutnog u plazmi ili trombocitima. Disfibrinogenemija ne zavisi od koncentracije fibrinogena, koja može biti snižena, normalna ili povišena¹²⁵. Ukazano je na povezanost između disfibrinogenemije i hepatocelularne regeneracije. Smatra se da je disfibrinogenemija rezultat re-ekspresije fetalnih gena koji kodiraju produkciju fetalnog fibrinogena u regenerisanim jetrinim ćelijama¹²⁶. Utvrđena je funkcionalna sličnost između kvalitativno izmenjenih molekula fibrinogena sa povišenim sadržajem sijalinske kiseline u cirozi i kod zdravog novorođenčeta^{127,128}. Bolesnici sa cirozom imaju 1.5 do 3.5 dodatnih rezidua sijalinske kiseline po molekuli fibrinogena¹²⁵. Slično

fetalnom fibrinogenu, povišen sadržaj sijalinske kiseline uzrok je stvaranja fibrinogena male molekulske mase sa kvalitativno izmenjenim α lancima^{103,129}.

Kod bolesnika sa hipersijalinizovanim fibrinogenom u plazmi je prisutna povišena aktivnost sijalil-transferaze, a u poljima hepatocelularne regeneracije visok sadržaj sijalinske kiseline. Na osnovu ovog nalaza postavljena je hipoteza prema kojoj se hipersijalinizacija fibrinogena i drugih proteina dešava kao posledica povišene aktivnosti sijalil-transferaze odnosno sadržaja sijalinske kiseline u poljima hepatocelularne regeneracije¹³⁰. To objašnjava visoku učestalost disfibrinogenemije u cirozi (značajna zastupljenost polja hepatocelularne regeneracije: kompenzatorna hiperplazija posredovana proliferacijom očuvanih hepatocita) i nisku učestalost u sekundarnom oboljenju jetre (metastatski karcinom: histološki se ne utvrđuje regeneracija jetrinog tkiva)^{123,131,132}. Green i sar.¹²⁴ su utvrdili poremećaj polimerizacije fibrinskih monomera uzrokovan disfibrinogenemijom kod 50% bolesnika sa cirozom, 47% bolesnika sa hroničnim aktivnim oboljenjem jetre, 66% bolesnika sa primarnim tumorom jetre i 100% bolesnika sa akutnom insuficijencijom jetre. Stečena disfibrinogenemija nije utvrđena kod bolesnika sa opstruktivnom žuticom i drugim oboljenjima jetre. Pokazano je da disfibrinogenemija odražava težinu hepatocelularnog oštećenja¹³³. Francis i Armstrong¹²³ su utvrdili disfibrinogenemiju kod 76% bolesnika sa cirozom, 78% bolesnika sa hroničnim aktivnim oboljenjem i 86% bolesnika sa akutnom insuficijencijom jetre. Značajno niža incidenca disfibrinogenemije utvrđena je u opstruktivnoj žutici (8%) i drugim oboljenjima jetre (4%).

Kod bolesnika sa cirozom, među poremećajima funkcije fibrinogena opisani su: ubrzan katabolizam, cirkulišući fibrinogen sa nedostajućim karboksi-terminalnim segmentom A α lanca i nemogućnost ukrštenog povezivanja α polimera^{134,135}. U uznapredovaloj alkoholnoj cirozi i hroničnom agresivnom hepatitisu opisana je ekscesivna fibrinoliza sa fragmentima fibrinogena u cirkulaciji^{125,136}. Disfibrinogenemiju odlikuju: produženo trombinsko vreme (TT), normalno oslobađanje fibrinopeptida A, poremećaj polimerizacije fibrina, normalne vrednosti aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (activated partial prothrombin time: aPTT) i protrombinskog vremena (prothrombin time: PT). Uklanjanje viška sijalinske kiseline neuraminidazom normalizuje funkciju fibrinogena^{103,125,129}.

Sistem fibrinolize

U oboljenju jetre mogući uzroci povišene fibrinolizne aktivnosti su povišena koncentracija tAP praćena normalnom/neznatno povišenom aktivnošću PAI-1 i smanjena sinteza inhibitora fibrinolize: α_2 -IP, TAFI, FXIII, HBG^{103,108-10}.

Povišen nivo tAP je posledica povećanog oslobađanja iz aktiviranog endotela i/ili smanjenog hepatičnog klirensa. Nivo PAI-I nije povišen u istom stepenu kao tAP izuzev u akutnoj insuficijenciji jetre kada je PAI-1 značajno povišen i može inhibirati fibrinolizu¹³⁷. Za razliku od bolesnika sa akutnom insuficijencijom jetre, odnos tAP i PAI-1 u hroničnom oboljenju jetre uslovljava stanje hiperfibrinolize¹³⁸.

Prema Lismanu i sar.¹³⁹, deficit TAFI nije udružen sa hiperfibrinolizom, verovatno zato što je redukcija pro-fibrinoliznih faktora balansirana paralelnom redukcijom anti-fibrinoliznih faktora. Prema Colucci i sar.¹⁴⁰, deficit TAFI je udružen sa povišenom fibrinoliznom aktivnošću kod bolesnika sa oboljenjem jetre. Objašnjenje za ove suprostavljene zaključke je upotreba različito dizajniranih testova za procenu balansa u fibrinoliznom sistemu.

Razvoju hiperfibrinolize doprinose ascitna tečnost (poseduje povišenu fibrinoliznu aktivnost) i povišeni FDP, koji dodatno inhibiraju stvaranje trombina i polimerizaciju fibrinskih monomera. Pokazano je da je povišen nivo D-dimera prediktor gastrointestinalnog krvarenja i da korelira sa stepenom ascitesa u insuficijenciji jetre^{100,103,109,139,141}.

Prisustvo povišene fibrinolizne aktivnosti u oboljenju jetre je kontroverzno, jer nije potvrđeno u svim studijama^{111,114}. Aktivnost fibrinoliznog sistema uglavnom je procenjivana na osnovu nivoa pojedinačnih komponenata i to pretežno upotrebom *in vitro* testova, kao što su vreme lize euglobulina i testovi za određivanje nivoa plazminogena, tAP, PAI-1, α_2 -IP i D-dimera. Hiperfibrinolizu odlikuju: skraćeno vreme lize euglobulina, sniženi nivoi plazminogena/PAI-1/ α_2 -IP, prisustvo FDP i povišeni nivoi tAP i D-dimera^{1,109,111,138}. Rezultati ovih testova ne odražavaju *in vivo* balans sistema fibrinolize čije funkcionisanje odlikuju kompleksne interakcije između aktivatora i anti-aktivatora, koje regulišu konverziju fibrinogena u fibrin¹³⁸.

B. Promene koje pospešuju hemostazu u hroničnom oboljenju jetre

U prohemostatskom sistemu, hemostazu pospešuju povišeni nivoi vWF i FVIII^{142,143}. Snižen nivo plazminogena odlikuje kako akutnu tako i hroničnu insuficijenciju jetrine funkcije¹¹⁴.

U antikoagulacionom sistemu, hemostazu pospešuju sniženi nivoi antikoagulacionih proteina: AT, HKII, PC, PS i moguće α_2 MG, proteina Z (PZ) i PZ zavisnog proteaznog inhibitora (ZPI)¹¹⁴.

PZ je vitamin K zavisan faktor koji je homologan sa drugim vitamin K zavisnim faktorima (FII, FVII, FIX, FX, PC, PS), ali samostalno ne ispoljava enzimsku aktivnost. PZ je izolovan iz humane plazme 1984. godine¹⁴⁴. PZ ispoljava regulacionu ulogu u procesu koagulacije. PZ deluje kao kofaktor u reakciji inhibicije FXa putem ZPI¹⁴⁵. ZPI je član superfamilije serpina,

prvi put opisan 1998. godine¹⁴⁶. U plazmi PZ cirkuliše u kompleksu sa ZPI. U prisustvu fosfolipida i jona Ca²⁺, PZ povećava ~1000 puta inhibiciju FXa delovanjem ZPI. ZPI inhibira FXIa nezavisno od kofaktorske aktivnosti PZ i prisustva fosfolipida i jona Ca²⁺. Moguća uloga deficita PZ i ZPI u nastanku arterijskih i venskih tromboznih oboljenja u humanoj patologiji intenzivno se istražuje^{145,147,148}.

Metaloproteaza ADAMTS13 (**A** **D**isintegrin **A**nd **M**etalloproteinase with **T**hrombo**S**pondin motif-**13**) specifično razlaže velike multimerne vWF. ADAMTS13 se pretežno sintetise u jetri. Transkript informacione ribonukleinske kiseline (iRNK) od 4.7kb primarno se nalazi u perisinusoidalnim ćelijama jetre, dok se transkript iRNK od 2.4kb nalazi u skeletnim mišićima, placenti, tumorskim ćelijskim linijama karcinoma kolona i malignog melanoma^{149,150}.

Aktivnost ADAMTS13 je snižena u cirozi. Deficit ADAMTS13 (posebno u prisustvu povišenih nivoa velikih multimera vWF) uslovljava povećano formiranje trombocitnih mikrotromba, što može uzrokovati sinusoidalne mikrocirkulatorne poremećaje i progresiju oštećenja jetre sa razvojem multiorganske insuficijencije^{151,152}. U uznapredovaloj cirozi pokazano je da je značajan disbalans između snižene aktivnosti ADAMTS13 i povišene produkcije velikih multimera vWF blisko povezan sa funkcionalnim kapacitetom jetre, hepatičnom encefalopatijom, hepatorenalnim sindromom i refraktornim ascitesom i da može biti koristan u predikciji dugotrajnog preživljavanja bolesnika sa cirozom^{152,153}. Zbog toga, kod nekih bolesnika krajnji stadijum dekompenzovane ciroze odražava stanje slično tromboznoj trombocitopenijskoj purpuri (TTP)¹⁵². Uz sekvestraciju trombocita u slezini koja je uzrokovana portnom hipertenzijom i hipersplenizmom¹⁵⁴⁻⁶, ovaj mehanizam može značajno doprineti razvoju trombocitopenije kod cirotičara. U cirozi, trombocitopenija je rebalansirana povećanom adhezijom i agregacijom trombocita koja je uzrokovana povišenim plazmatskim nivoima velikih multimera vWF i sniženom aktivnošću ADAMTS13¹⁵⁷. Primena trombocita može usloviti dalje oštećenje jetre i egzacerbaciju portalne i portopulmonalne hipertenzije¹⁵⁸.

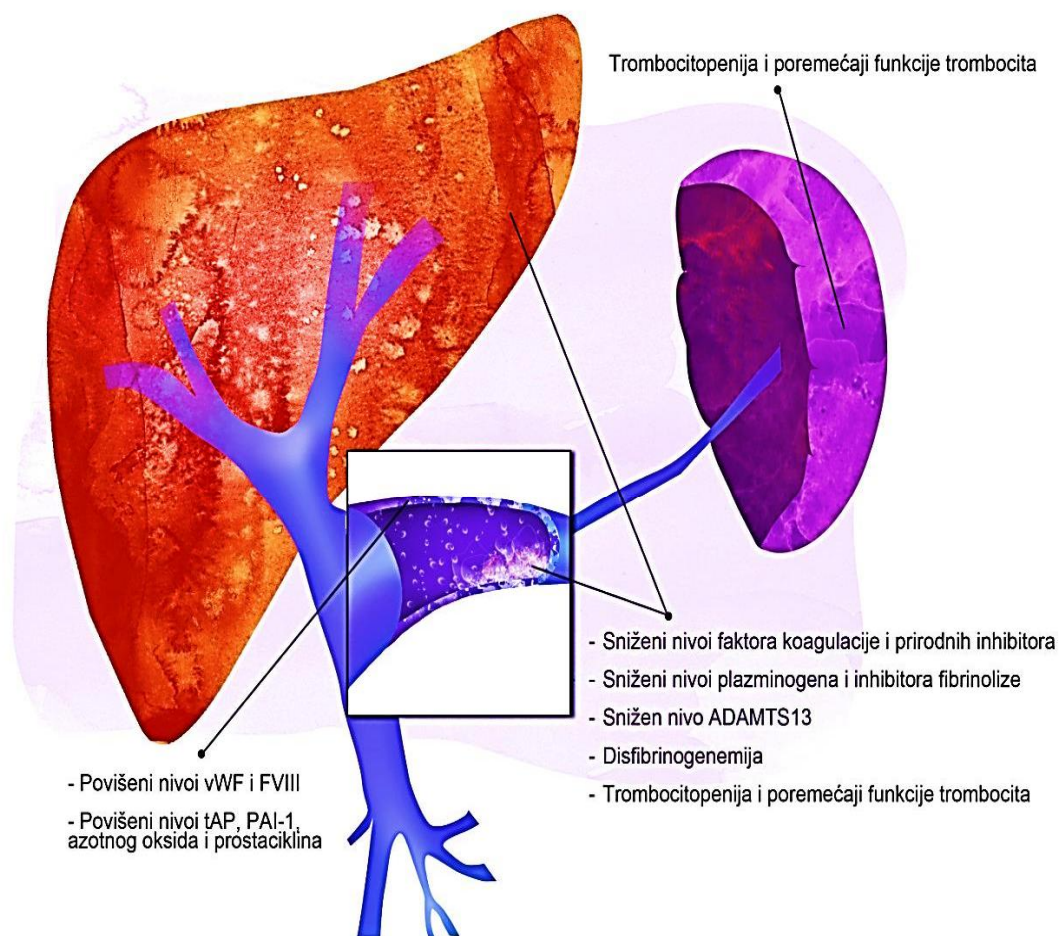
1.2.3.1. Mehanizmi poremećaja hemostaze u oboljenju jetre

Efekat oboljenja jetre na hemostazu je kompleksan. Mnogobrojne promene koje inhibiraju odnosno pospešuju hemostazu su pretežno posledica delovanja četiri mehanizma (Shema 9):

1. smanjen sintetski kapacitet jetre,
2. sistemska intravaskularna koagulacija,
3. sistemska aktivacija endotelnih ćelija,
4. povećana sekvestracija trombocita u uvećanoj slezini¹⁰⁷.

Smanjen sintetski kapacitet jetre uslovljava sniženje nivoa i poremećaj funkcije mnogih proteina direktno i indirektno uključenih u proces hemostaze: faktori koagulacije i njihovi inhibitori, plazminogen i inhibitori fibrinolize, trombopoetin, ADAMTS13¹⁰⁷.

Povišena aktivnost sistemske intravaskularne koagulacije uzrokuje povećanju potrošnju trombocita i hemostatskih faktora. Sistemska aktivacija endotelnih ćelija dovodi do povećane produkcije i oslobađanja u cirkulaciju prohemostatskih proteina vWF i FVIII, kao i tAP, PAI-1, NO i PGI₂. Splenomegalija i hipersplenizam uzrokuju povećanju sekvestraciju trombocita i doprinose nastanku trombocitopenije. Funkcionalni poremećaji trombocita i polimerizacije fibrina doprinose razvoju koagulopatije u cirozi¹¹⁰.



Shema 9. Mehanizmi poremećaja hemostaze u hroničnom oboljenju jetre.

1.2.3.2. Drugi uzroci poremećaja hemostaze u oboljenju jetre

Anemija

Anemija ispoljava antihemostatske efekte. Eritrociti moduliraju biohemijske i funkcionalne odgovore trombocita putem nekoliko proagregacionih mehanizama: sadrže ADP koji aktivira trombocite, aktiviraju trombocitnu ciklooksigenazu i povećavaju stvaranje TxA_2 , direktno povećavaju stvaranje trombina putem izlaganja prokoagulacionih fosfolipida¹⁵⁹⁻⁶¹. Dodatno, eritrociti ispoljavaju reološki efekat na marginaciju trombocita. U fiziološkim uslovima protok eritrocita je maksimalan u centru krvnog suda, čime se optimizuje interakcija trombocita sa endotelom i pospešuje hemostaza¹⁵⁹. Osim toga, eritrociti su efikasni čistači NO koji je snažan inhibitor trombocita. NO (oslobođen iz endotelnih ćelija) vezuje se za hemoglobin visokim afinitetom¹⁰¹.

Insuficijencija bubrega

Poremećaje hemostaze u oboljenju jetre pogoršavaju komplikacije osnovnog oboljenja. Bubrežna insuficijencija je česta komplikacija u odmaklom stadijumu oboljenja jetre. Bubrežna insuficijencija ispoljava antihemostatski efekat na nivou interakcije trombocita i krvnih sudova. Uzroci poremećaja trombocitno-endotelne interakcije su anemija, stečena trombocitopatija i povišena produkcija NO^{107,114,162}. Bubrežna insuficijencija je pozitivan prediktor intraoperativnog krvarenja i potrebe za transfundovanjem kod bolesnika podvrgnutih transplantaciji jetre^{163,164}.

Bakterijska infekcija

Bakterijska infekcija je čest koegzistirajući problem u cirozi¹¹⁴. U studiji koja je ispitala zdrave osobe kojima je intravenski primenjen faktor nekroze tumora (tumor necrosis factor-TNF) uočen je direktan aktivacioni efekat endotoksina na koagulacionu kaskadu¹⁶⁵. Ukazano je na povezanost između endotoksemije i stvaranja fragmenata protrombina i laboratorijskog profila sličnog diseminovanoj intravaskularnoj koagulaciji (DIK) u cirozi¹¹⁴. S druge strane, endotoksin može delovati inhibiciono na koagulaciju. Pokazano je da u cirozi endotoksin može inhibirati koagulaciju stimulacijom stvaranja endogenih heparinoida¹⁶⁶. Bakterijska infekcija povećava rizik za razvoj krvarenja kod bolesnika sa cirozom^{167,168}.

Diseminovana intravaskularna koagulacija

U oboljenju jetre česti laboratorijski poremećaji su: povišeni nivoi markera aktivacije trombocita, markera stvaranja trombina i fibrina i sekundarna fibrinoliza¹⁰⁷. Povišeni nivoi

aktivacionih markera koagulacije i fibrinolize prevashodno ukazuju na poremećen hepatični klirens, a ne na postojeću aktivaciju trombocita i sistema koagulacije i fibrinolize¹⁶⁹. Uz redukovanu masu hepatocita, smanjenom hepatičnom klirensu doprinosi smanjen protok krvi kroz obolelu jetru¹⁰⁷. Povišeni plazmatski nivoi navedenih aktivacionih markera mogu odražavati postojeću DIK niskog stepena sa sekundarno povišenom fibrinoliznom aktivnošću^{170,171}.

DIK u sklopu ciroze predstavlja diferencijalno dijagnostički problem u odnosu na poremećaje hemostaze koje odlikuju patološke vrednosti aPTT i PT, snižena koncentracija fibrinogena, povišeni fdp/D-dimer i trombocitopenija (*pseudo-DIK*)¹¹⁴. Prisustvo depozita fibrina u organima predstavlja tipičnu patohistološku karakteristiku DIK. Pokazano je da su depoziti fibrina u organima retki kod obolelih od ciroze¹⁷². Relativno stabilan broj trombocita i visok nivo FVIII razlikuje poremećaje hemostaze koji odlikuju cirozu od DIK u dekompenzovanoj cirozi¹⁷³. U saglasnosti sa laboratorijskim karakteristikama, u cirozi je odsutno tipično organsko oštećenje koje nastaje kao posledica intravaskularne koagulacije. Blaga forma mikrotromboze se može razviti u uslovima hiperkoagulabilnosti¹¹⁴.

Ubrzana intravaskularna koagulacija i fibrinoliza

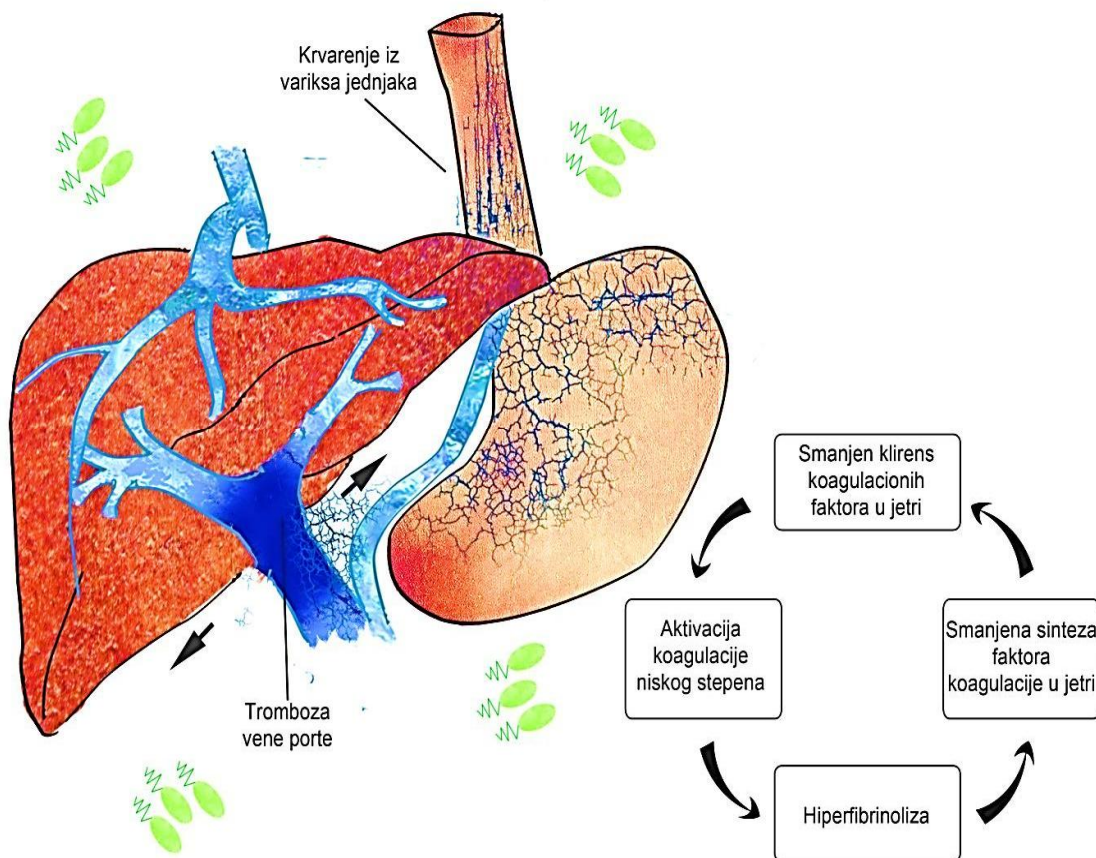
Izmenjen hemostazni profil u cirozi koji odlikuju povišeni nivoi senzitivnih markera koagulacione i fibrinolizne aktivnosti (fibrinopeptid A, protrombin fragment 1+2, D-dimer, visoko molekulski kompleksi fibrin/fibrinogen ili solubilni fibrin) naziva se 'ubrzana intravaskularna koagulacija i fibrinoliza' (*accelerated intravascular coagulation and fibrinolysis - AICF*). AICF je prisutna kod oko 30% cirotičara, pretežno onih sa umerenom i teškom insuficijencijom jetre i/ili ascitesom. AICF korelira sa sniženim nivoima AT, PC i PS. AICF nije opisana kod bolesnika sa kompenzovanom cirozom^{114,174,175}.

Smatra se da AICF nastaje kao posledica povećane degradacije formiranog fibrinskog ugruška delovanjem plazmina, koja nastaje zbog povišenog nivoa tAP i sniženog nivoa α_2 -IP, uz održavanje visoke lokalne koncentracije plazminogena na površini krvnog ugruška (uprkos njegovoj sniženoj ukupnoj produkciji). Disbalans fibrinoliznog sistema se pogoršava delovanjem dodatnog stresa (infekcija)¹¹⁴. U portnoj cirkulaciji prisutan je značajan stepen endotoksemije koja aktivira intravaskularnu koagulaciju zbog čega je moguće da je AICF važnija u sistemu vene porte nego u sistemskoj cirkulaciji^{100,103}.

1.2.4. Uticaj poremećaja hemostaze i infekcije na nastanak krvarenja iz variksa jednjaka i želuca

U proteklim decenijama lečenje krvarenja iz variksa jednjaka i želuca je značajno unapređeno uvođenjem novih hirurških, endoskopskih, farmakoloških i radioloških tehnika. Zahvaljujući novim terapijskim metodama mortalitet zbog krvarenja iz variksa jednjaka i želuca je smanjen sa 50% na 20-30%, ali je još uvek značajno visok. Krvarenje iz variksa je glavni uzrok smrtnog ishoda kod bolesnika sa cirozom¹⁷⁶⁻⁸.

Poremećaji hemostaze (smanjena sinteza i klirens faktora koagulacije u jetri, aktivacija koagulacije niskog stepena, hiperfibrinoliza) i infekcija povećavaju rizik za nastanak krvarenja iz variksa jednjaka i želuca kod obolelih od ciroze¹⁷⁵ (Shema 10).



Shema 10. Poremećaji hemostaze i infekcija u cirozi.

1.2.4.1. Hiperfibrinoliza i krvarenje iz variksa

Ukazano je na mogući prediktivni značaj hiperfibrinolize u nastanku gastrointestinalnog krvarenja u cirozi^{129,179}. Violi i sar.¹⁸⁰ su utvrdili povezanost između prisustva FDP i povećanog rizika za nastanak gastrointestinalnog krvarenja kod bolesnika sa cirozom u odmaklom stadijumu. Violi i sar.¹⁸¹ su uočili da su visoki nivoi D-dimera i tAP prediktori prve epizode krvarenja iz gornjih partija gastrointestinalnog trakta kod bolesnika sa portnom hipertenzijom.

Mehanizmi inhibicije primarne hemostaze i koagulacije delovanjem hiperfibrinolize

Hiperfibrinoliza uzrokuje: - poremećaj adhezije i agregacije trombocita putem razgradnje vWF i trombocitnih receptora za fibrinogen, - potrošnju faktora koagulacije i - inhibiciju polimerizacije fibrina¹⁷⁵. Efekti hiperfibrinolize na primarnu hemostazu i koagulaciju su posebno nepovoljni u slučaju ruptуре variksa jednjaka. U ovoj kliničkoj situaciji hiperfibrinoliza odlaže formiranje trombocitnih i trombocitno-fibrinskih ugrušaka i pospešuje razgradnju formiranih krvnih ugrušaka. Hiperfibrinoliza pojačava krvarenje iz variksa jednjaka i želuca i povećava rizik za razvoj rekurentnog krvarenja¹⁸².

1.2.4.2. Endotoksemija i krvarenje iz variksa

Bakterijska infekcija se često dijagnostikuje kod bolesnika sa cirozom i gastrointestinalnim krvarenjem. Prospektivnim ispitivanjem pokazano je da se bakterijska infekcija utvrđuje kod 22% ovih bolesnika unutar prvih 48 časova nakon hospitalizacije¹⁸³. Najčešći uzrok infekcije je lipopolisaharid spoljnog zida gram negativnih crevnih bakterija (endotoksin)¹⁷⁵. Endotoksin je snažan aktivator sistema koagulacije i fibrinolize. Kod bolesnika sa cirozom utvrđena je značajna korelacija između prisustva endotoksemije, s jedne strane, i protrombin F1+2 (marker stvaranja trombina) i D-dimera (marker aktivacije trombina i plazmina), s druge strane. Takođe, u endotoksemiji je utvrđena povećana ekspresija TF na monocitima koja značajno korelira sa aktivacijom koagulacije i stvaranjem trombina^{171,184}. Kod cirotičara sa endotoksemijom i niskim stepenom intravaskularne koagulacije pokazano je da sedmodnevna primena antibiotika dovodi do značajne i simultane redukcije endotoksemije, produkcije trombina i D-dimera, što nije uočeno kod bolesnika sa istim odlikama koji su lečeni standardnom terapijom¹⁷¹. Ovi podaci potkrepljuju hipotezu prema kojoj endotoksinom pokrenuta prekomerna ekspresija monocitnog TF uzrokuje aktivaciju koagulacije i hiperfibrinolizu¹⁷⁵.

U toku epizode bakterijske infekcije, kod cirotičara sa velikim variksima oslobađanje endotoksina u sistemsku cirkulaciju dovodi do daljeg povećanja portnog pritiska. Povećanje

pritiska u portnom krvotoku se dešava posredstvom prekomerne indukcije NO i PGI₂¹⁸⁵. Rezultati meta analize²⁶¹ su pokazali da profilaksna primena antibiotika kod bolesnika sa cirozom i gastrointestinalnim krvarenjem značajno povećava (9.1%) preživljavanje u toku devetnaest dana. Pokazano je da profilaksna primena antibiotika smanjuje rizik rekurentnog krvarenja kod bolesnika sa krvarećim variksima¹⁸⁷. Međutim, nije utvrđeno da li su prohemostatski efekti antibiotika posredovani poboljšanjem hemostaze, poboljšanjem hemodinamike ili delovanjem oba mehanizma¹⁰⁷.

1.2.5. Hiperkoagulabilnost u oboljenju jetre

Aspekt hiperkoagulabilnosti često se zanemaruje u oboljenju jetre. Dugo se smatralo da su oboleli od ciroze 'auto-antikoagulisani' i na taj način zaštićeni od tromboze. Ovaj stav se zasniva na laboratorijskim dokazima hipokoagulabilnosti (procenjeno na osnovu patoloških standardnih skrining testova hemostaze: aPTT i PT). Saglasno patološkim vrednostima standardnih testova hemostaze prihvaćen je koncept prema kojem su bolesnici sa cirozom pod povećanim rizikom za razvoj krvarenja u toku vršenja invazivnih procedura i masivnog krvarenja iz gastroezofagealnih variksa¹⁰⁷. Međutim, koagulopatija definisana patološkim vrednostima standardnih koagulacionih testova ne ukazuje na 'auto-antikoagulaciju' i ne odražava zaštitu od razvoja tromboznih komplikacija¹⁸⁸. Sve je više dokaza koji govore u prilog postojanja sklonosti zgrušavanju kod bolesnika sa stabilnom cirozom¹⁸⁹. Danas je poznato da se kod obolelih od ciroze intravaskularna aktivacija koagulacije dešava mnogo češće nego što se ranije smatralo¹⁹⁰. U populacionoj studiji Sogaard i sar.¹⁹¹ pokazano je da je u oboljenju jetre povećan rizik za razvoj venskog tromboembolizma u poređenju sa zdravim osobama. Mehanizmi razvoja venske tromboze u oboljenju jetre su: smanjena aktivnost antikoagulacionih puteva, usporen protok krvi (posledica staze) i poremećaj fibrinolize^{192,193}. Razvoju tromboze doprinosi izmenjena aktivnost fosfolipidne membrane trombocita, mada to nije dokazan mehanizam¹⁹⁰. Hemodinamske promene i oštećenje vaskulature koji odlikuju oboljenje jetre povećavaju rizik za razvoj tromboze^{115,194}.

U oboljenju jetre procenjena incidenca **perifernih tromboembolijskih komplikacija** (tromboza dubokih vena i embolija pluća) iznosi 0.5-1.9%¹⁹⁵⁻⁸.

1.2.5.1. Tromboza vene porte

Tromboza vene porte (TVP) komplikuje klinički tok ciroze. Incidenca TVP u cirozi znosi 10-20%¹⁹⁹. TVP pogoršava cirkulaciju u sistemu vene porte putem okluzije gornje mezenterične vene i povećava rizik za razvoj infarkta creva i gastrointestinalnog krvarenja¹⁷⁵. Hemodinamske promene uzrokovane portnom hipertenzijom (smanjen protok u veni porte)

predstavljaju najvažniji mehanizam razvoja TVP²⁰⁰. Snižena aktivnost prirodnih antikoagulacionih proteina i disfunkcija endotela (smanjen vaskularni tonus) doprinose razvoju tromboze. Smatra se da je endotoksemija čest mehanizam razvoja TVP, sistemske hiperfibrinolize i gastrointestinalnog krvarenja^{114,200,201}. Violi i sar.²⁰¹ su utvrdili značajno viši stepen endotoksemije i više vrednosti protrombin F1+2 u portalnoj u poređenju sa perifernom cirkulacijom, što ukazuje na postojanje protromboznog stanja u portalnoj cirkulaciji kod obolelih od ciroze. Poređenjem periferne cirkulacije između bolesnika i kontrolne populacije utvrđen je viši stepen endotoksemije i stvaranja trombina kod obolelih, što se objašnjava prelaskom endotoksina u perifernu cirkulaciju porto-sistemske šantom. Ovi podaci ukazuju da endotoksemija ima značajnu ulogu u aktivaciji koagulacije kako u portalnoj tako i u sistemske cirkulaciji. Fimognari i sar.²⁰² su utvrdili prisustvo TVP kod 33/136 (24%) bolesnika sa cirozom. Kod bolesnika bez TVP, aktivnost FVIII se povećava srazmerno težini oštećenja jetrine funkcije (u kategoriji Child-Pugh-C izmerena je najviša aktivnost FVIII). Kod bolesnika sa TVP, utvrđena je povišena vrednost D-dimera i snižena aktivnost FVIII, što je u saglasnosti sa potrošnjom FVIII u procesu tromboze. Pokazano je da se normalne vrednosti FVIII i D- dimera mogu koristiti kao pouzdan dijagnostički marker za isključenje TVP kod bolesnika sa umerenom i teškom cirozom. Prethodno postojeća hiperkoagulabilnost uzrokovana urođenom trombofilijom (genski polimorfizmi: FV Leiden, protrombin G20210A, metilentetrahidrofolat reduktaza C677T) i antifosfolipidnim sindromom (lupus antikoagulans, antikardiolipinska antitela) povećava rizik za razvoj TVP kod bolesnika sa cirozom^{199,203,204}.

Pored TVP, druge makrovaskularne tromboze (tromboza mezenterične i hepatične vene) razvijaju se kod bolesnika sa uznapredovalom cirozom. Dugo se smatralo da je tromboza hepatične arterije nakon transplantacije jetre prevashodno hirurška komplikacija. Poslednjih godina ukazano je na ulogu hiperkoagulabilnosti u razvoju tromboze hepatične arterije^{205,206}.

U hroničnom oboljenju jetre, hiperkoagulabilnost je povezana sa progresijom bolesti i razvojem fibroze, progresijom infekcije uzrokovane virusom hepatitisa tip C i razvojem ciroze masne jetre ne-alkoholne etiologije²⁰⁷⁻⁹.

1.2.5.2. Okultni intrahepatični trombozni procesi

Okultni intrahepatični trombozni procesi su mogući faktor koji doprinosi progresiji stabilne ciroze u dekompenzovanu hepatičnu atrofiju. Progresija fibroze je posledica lokalne ishemije u procesu parenhimske ekstinkcije. Aktivacija stelatnih ćelija trombinom doprinosi progresiji bolesti²⁰⁹⁻¹². U animalnim modelima akutne i hronične insuficijencije jetre postignuto je

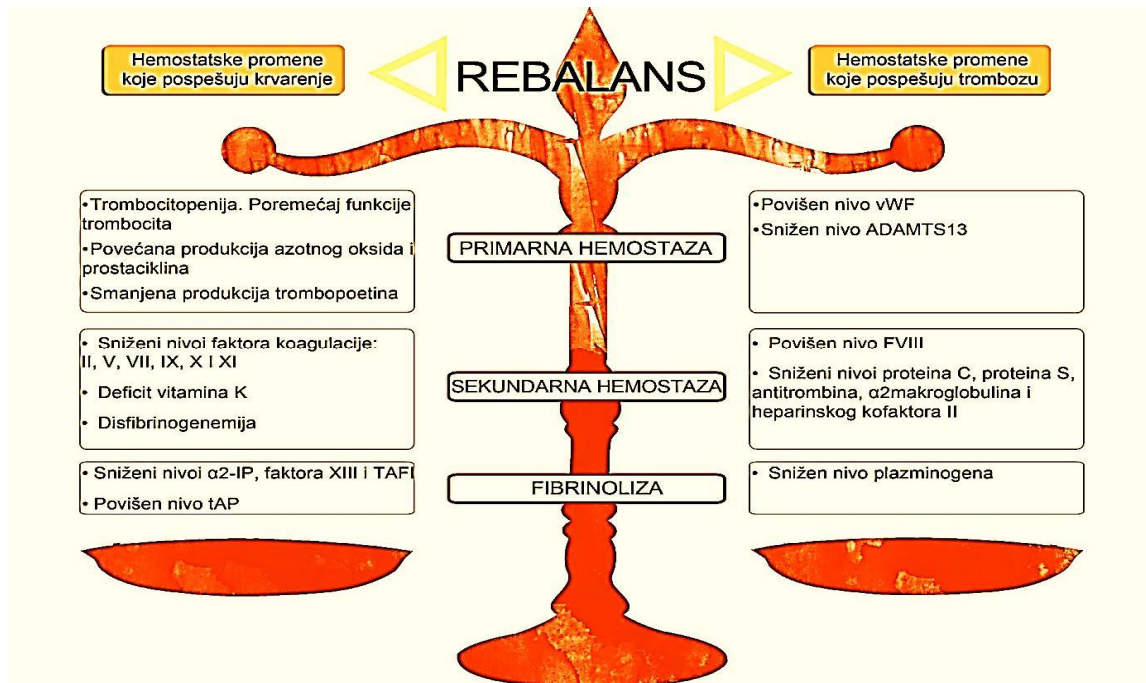
usporavanje progresije bolesti primenom antikoagulanasa ili genskom ablacijom ključnih komponenata sistema hemostaze^{211,213,214}. Plućne mikrotromboze predstavljaju mogući patogenezni mehanizam razvoja portopulmonalne hipertenzije²¹⁵. Oboljenje jetre uzrokovano virusom hepatitisa tip C ima blažu formu kod hemofiličara u poređenju sa ne-hemofiličarima²¹⁶. Optimalna dijagnostika i lečenje ovih poremećaja nisu definisani¹¹⁴.

1.3. REBALANSIRANA HEMOSTAZA U OBOLJENJU JETRE

Danas se smatra suviše pojednostavljenim shvatanje prema kojem se u hroničnom oboljenju jetre nastanak krvarenja pripisuje trombocitopeniji, sniženim aktivnostima faktora koagulacije i inhibitora fibrinolize, a razvoj tromboze sniženim aktivnostima prirodnih inhibitora koagulacije (AT, PC, PS). U udžbenicima i drugoj literaturi, hronično oboljenje jetre opisuje se kao prototip stečenih poremećaja hemostaze koji klinički odlikuje sklonost krvarenju zbog smanjenog prokoagulacionog potencijala. U savremenoj literaturi sve je više podataka koji predstavljaju izazov za ovu paradigmu. Uprkos činjenici da bolesnici sa cirozom često imaju patološke standardne testove hemostaze (ukazuju na hipokoagulabilno stanje) i da neretko krvare iz gastrointestinalnog trakta, nije dokazana pouzdanost nijednog standardnog koagulacionog testa u proceni rizika krvarenja kod obolelih^{100,102,111,114,189}.

Prema savremenom shvatanju, sklonost krvarenju zbog poremećaja hemostaze u hroničnom oboljenju jetre je pre mit nego realnost¹⁸². Brojni dokazi govore u prilog relativno nestabilnog 'normalnog' hemostaznog balansa u hroničnom oboljenju jetre. Istovremeni poremećaji u prohemostaznim i antihemostaznim procesima uslovljavaju rebalansirano stanje u sistemu hemostaze obolelih. Rebalansirani sistem hemostaze u hroničnom oboljenju jetre nije stabilan kao kod zdravih osoba. Ravnoteža u sistemu hemostaze može se narušiti u pravcu razvoja krvarenja odnosno tromboze, posebno kada je oboljenje jetre udruženo sa drugim patološkim stanjima. Redukovan potencijal na oba kraja hemostatskog 'balansa' uzrokovan je sniženim nivoima većine proteina sistema hemostaze, što objašnjava nestabilnu ravnotežu^{100,107,114,217}.

Kod bolesnika sa hroničnim oboljenjem jetre istovremene promene u prohemostatskim i antihemostatskim putevima uslovljavaju 'rebalans' u sistemu hemostaze. Rebalans se dešava na nivou primarne hemostaze, sekundarne hemostaze i sistema fibrinolize (Shema 11).



Shema 11. Prikaz rebalansirane hemostaze u hroničnom oboljenju jetre.

1.3.1. Primarna hemostaza

Prema ranijem shvatanju odmakli stadijum hroničnog oboljenja jetre odlikuje značajan poremećaj primarne hemostaze uzrokovan trombocitopenijom i trombocitopatijom. Podaci o postojanju poremećaja funkcije trombocita u oboljenju jetre nisu konzistentni^{189,218}.

Najstariji *in vivo* test za procenu funkcije trombocita je *vreme krvarenja*. Dugo se smatralo da vreme krvarenja predstavlja globalan test za procenu primarne hemostaze. Vreme krvarenja je produženo kod 40% bolesnika sa cirozom, što je u saglasnosti sa varijabilnim stepenom trombocitopenije i trombocitopatije kod obolelih. Moguće je da vreme krvarenja odražava i poremećaj u vazokonstrukciji^{219,220}. Kod cirotičara primena DDAVP (1-deamino-8-D-arginine vasopressin; dezmopresin) uzrokuje trostruko do petostruko povećanje vWF i FVIII i skraćenje vremena krvarenja^{221,222}. Pokazano je da dezmopresin ne redukuje krvarenje iz variksa jednjaka kod obolelih od ciroze i da nema uticaj na obim krvarenja i količinu transfundovanih hemoprodukata kod bolesnika podvrgnutih hepatektomiji. Rutinsko izvođenje vremena krvarenja je napušteno zbog nepouzdanosti procene rizika za razvoj gastrointestinalnog krvarenja i krvarenja u toku hepatektomije na osnovu vrednosti ovog testa²²³⁻⁵. Ispitivanjem funkcije trombocita u uslovima protoka Lisman i sar.²²⁶ su utvrdili postojanje adekvatne funkcije trombocita u serumu bolesnika sa cirozom. Ovo istraživanje

dovelo je u pitanje objektivno postojanje poremećaja primarne hemostaze u hroničnom oboljenju jetre.

vWF i ADAMTS13

U trombocitopeničnim uslovima ciroze adhezija trombocita stimulisana je visokim sadržajem vWF, što je pokazano u *in vitro* eksperimentima ispitivanjem adhezije trombocita za trombogene površine korišćenjem cirkulišuće krvi¹⁴³. Pored povišenog nivoa vWF, snižena aktivnost ADAMTS13 predstavlja mehanizam koji pospešuje adheziju trombocita u cirozi²²⁷. Deficit ADAMTS13 u cirozi može imati za posledicu povišeno stvaranje trombina. Za ovu hipotezu potrebna je naučna potvrda¹⁰⁷.

1.3.2. Sekundarna hemostaza

Balansirani hemostazni potencijal koji odlikuje cirozu posledica je istovremene redukcije prokoagulacionih i prirodnih antikoagulacionih proteina^{107,114,217}.

FVIII

Aktivnost FVIII je povišena u cirozi^{100,103,110,143}. S obzirom na utvrđeno prisustvo protrombin F1+2 u cirozi, verovatna je uloga FVIII u stvaranju trombina^{228,229}.

Put PC

Tripodi i sar.²²⁹ su prvi ukazali da se stvaranje trombina kod bolesnika sa cirozom ne razlikuje u odnosu na zdrave ispitanike. Ovi istraživači su ispitivali koagulacionu fazu testom endogenog potencijala za stvaranje trombina, uz dodatak TM. Modifikacija testa dodatkom TM omogućava aktivaciju puta PC. Rezultati ove studije pokazali su da je u odsustvu TM smanjeno stvaranje trombina, što je u skladu sa sniženom aktivnošću FII (protrombin) u cirozi. U prisustvu TM, snižena aktivnost FII balansirana je sniženom aktivnošću PC. Pokazano je da je PC snižen u višem obimu u odnosu na FII. Rezultati ove studije ukazuju da snižena aktivnost faktora koagulacije nema dominantnu ulogu u nastanku krvarenja kod bolesnika sa cirozom i mogu objasniti relativno malu kliničku efikasnost rekombinantnog aktiviranog faktora VII (rFVIIa) u kontroli krvarenja iz variksa jednjaka^{230,231}. Izmeren u prisustvu TM, nivo PC u cirozi jetre komparabilan je sa aktivnošću PC u kongenitalnom deficitu. Uz to, postoji značajna rezistencija na inhibiciono delovanje TM²¹⁷.

AT, HKII, α_2 MG

U odsustvu krvarenja koje je uzrokovano portnom hipertenzijom i posledičnim hemodinamskim promenama, snižena aktivnost antikoagulacionih mehanizama (AT, HKII i α_2 MG) u cirozi uspostavlja koagulacioni balans i adekvatnu hemostazu^{100,107,114}.

1.3.3. Sistem fibrinolize

U akutnoj i hroničnoj insuficijenciji jetre, sistem fibrinolize je balansiran istovremenim sniženjem plazminogena i antifibrinoliznih proteina (α_2 -IP, TAFI, FXIII), uz povišen nivo tAP¹⁰⁷. U pogledu postojanja fibrinoliznog balansa literaturni podaci nisu usaglašeni^{139,140}.

1.4. ALKOHOLNA BOLEST JETRE

Alkoholna bolest jetre (ABJ) predstavlja najstariju formu oboljenja jetre poznatu čovečanstvu. Podaci ukazuju da su fermentisana pića korišćena u nekom obliku još u neolitskom dobu (8000 godina p.n.e.) i shodno tome postojalo je oboljenje jetre uzrokovano alkoholom²³². Alkohol je glavni uzrok oboljenja jetre u celom svetu. Rizik za razvoj ciroze povećava se sa konzumiranjem alkoholnih pića u količini >60-80g/dan za muškarace odnosno >20g/dan za žene u trajanju ≥ 10 godina. Ciroza se razvija kod manje od 10% osoba koje konzumiraju alkoholna pića u količini većoj od 120g/dan²³³. U poređenju sa muškarcima, žene su dvostruko senzitivnije na alkoholom uzrokovanu hepatotoksičnost i razvijaju teži stepen ABJ nakon konzumiranja manjih količina alkohola u kraćem vremenskom periodu²³⁴. ABJ obuhvata spektar oštećenja tkiva²³⁴. ABJ je histološki klasifikovana u tri evolutivne faze: masna jetra (steatoza jetre), alkoholni hepatitis i hronični hepatitis sa fibrozom odnosno cirozom. Masna jetra i alkoholni hepatitis su reverzibilne promene nakon prekida unosa alkohola, dok alkoholna ciroza predstavlja ireverzibilno oštećenje jetre^{234,234}. **Kompenzovana ciroza** se manifestuje nespecifičnim simptomima: mučnina, gubitak apetita i telesne težine, slabost, malaksalost, osećaj iscrpljenosti i, moguće, asimptomatski ezofagealni i gastrični variksi i osteoporoza (posledica malapsorpcije vitamina D i deficita kalcijuma)²³⁶. **Dekompenzovanu cirozu** odlikuje razvoj simptomatskih komplikacija: ikterus sluznica i kože (jetrina insuficijencija), ascites, krvarenje iz variksa, hepatična encefalopatija (portna hipertenzija), spontani bakterijski peritonitis (SBP), hepatorenalni sindrom (HRS), hepatopulmonalni sindrom i portopulmonalna hipertenzija. Česti klinički simptomi i znaci su: ikterus sluznica (tipično sklere) i kože, svrab, gastrointestinalno krvarenje (hematemeza, melena), koagulopatija, povećan obim abdomena, otok donjih ekstremiteta i izmenjen mentalni status. Navedeni klinički simptomi i znaci su posledica oštećenja hepatocelularne funkcije, a manifestuju se nezavisno od prisustva odnosno odsustva fizičke opstrukcije koja nastaje kao posledica ciroze. S obzirom da su jetrini enzimi uključeni u metabolizam lekova, kod bolesnika sa poremećajem sinteze jetrinih enzima prisutna je povećana senzitivnost na lekove sa povećanim rizikom za razvoj toksičnih efekata lekova²³⁶⁻⁹.

1.4.1. Fizikalni nalaz

Opšta inspekcija: malnutricija, gubitak mišićne mase, ikterus sluznica i kože, otok donjih ekstremiteta, kožni hematomi, grub tremor, sladunjav oštar dah (fetor hepaticus), Dipitrenova kontraktura (fibrozna degeneracija fascije dlana koju odlikuje savijanje prsta ka dlanu, uz nemogućnost ispravljanja prsta; na površini dlana, najčešće u projekciji četvrtog prsta, javlja se zadebljanje u vidu podkožnog čvora i trake; nekada zahvata dva ili tri prsta), simetrična periferna neuropatija, bilateralna hipertrofija parotidne žlezde²⁴⁰.

Periferna stigmata uznapredovale ciroze: 'spider nevusi' [tačkaste crvene mrlje iz kojih se šire krvni sudovi (teleangiektazije) lokalizovane na licu, vratu, gornjem toraksu i grudnom košu], palmarni eritem, feminizacija (ginekomastija, atrofija testisa)²⁴¹.

Pregled abdomena: hepatomegalija, splenomegalija, ascites, vaskularne kolaterale prednjeg abdominalnog zida (caput medusae: distendirane i proširene paraumbilikalne vene)²⁴¹.

Procena mentalnog statusa: konfuzija, dezorijentacija, sopor, koma²³⁶.

1.4.2. Laboratorijske karakteristike

Nijedan laboratorijski test nije specifičan za ABJ. Tipična laboratorijska karakteristika svih formi ABJ je povišena vrednost ezima koji ukazuju na hepatocelularno oštećenje. Povišena vrednost aspartat aminotransferaze (AST) ima senzitivnost 50% i specifičnost 82% za konzumiranje alkohola u količini >50g/dan. Povišena vrednost alaninaminotransferaze (ALT) ima senzitivnost 35% i specifičnost 86% za konzumiranje alkohola u količini >50g/dan²⁴¹. Vrednost AST je veća od vrednosti ALT. Aktivnosti AST i ALT ne premašuju sedmostruku vrednost u odnosu na gornju referentnu vrednost²⁴². Odnos AST/ALT veći od 2 odlikuje ABJ (razlika u odnosu na virusni i autoimunski hepatitis)^{233,240}. S obzirom da je enzimaska aktivnost gama-glutamil transpeptidaze (γ -GT) indukovana alkoholom, povišena aktivnost enzima γ -GT je rani znak ABJ. Aktivnost γ -GT je veća u ABJ u odnosu na druga oboljenja jetre. Povećanje aktivnosti γ -GT ima senzitivnost 69-73% i specifičnost 65-80% za ekscisivno konzumiranje alkohola. Insuficijenciju jetrine funkcije u uznapredovalojoj cirozi odlikuju hipoalbuminemija, hiperbilirubinemija i produženo PT^{240,243}.

U Tabeli 2 prikazane su tipične laboratorijske karakteristike ABJ²⁴³.

U teškoj insuficijenciji jetre ukupni bilirubin je povišen na račun povećanja nekonjugovanog bilirubina zbog poremećaja svih funkcija hepatocita u metabolizmu žučnih boja: preuzimanje, konjugacija i ekskrecija bilirubina²⁴⁴.

Tabela 2. Tipične laboratorijske karakteristike ABJ.

SERUMSKI ENZIMI	AST >>> ALT (<300U/L) Alkalna fosfataza i γ glutamil transpeptidaza: varijabilan stepen elevacije
METABOLIČKI POREMEĆAJI	Hiperglikemija, hipertrigliceridemija, hiperurikemija
POREMEĆAJI ELEKTROLITA	Sniženi: kalijum, magnezijum, fosfor
TESTOVI FUNKCIJE JETRE	Serumski albumin, bilirubin i PT: obično normalni u odsustvu značajnog oštećenja jetre
HEMATOLOŠKI POREMEĆAJI	Blaga anemija (obično makrocitna) Trombociti (normalni do značajno sniženi) Leukociti (povišeni) Leukemoidna reakcija udružena sa alkoholnim hepatitisom

Nekoliko ne-hepatičnih laboratorijskih poremećaja mogu indirektno ukazati na dijagnozu ABJ. Povišena srednja zapremina eritrocita >100fL ima malu senzitivnost (27-52%), ali značajnu specifičnost (85-91%) za konzumiranje alkohola u količini >50g/dan²⁴³. Makrocitna anemija je posledica direktnog toksičnog delovanja alkohola na kostnu srž i malnutricije, koja uzrokuje deficit folata i vitamina B₁₂. Razvoju anemije u ABJ doprinose akutni i hronični gubitak krvi iz gastrointestinalnog trakta i hipersplenizam. Trombocitopenija je posledica splenomegalije i toksičnog delovanja alkohola na kostnu srž. ABJ odlikuju: - povišene vrednosti feritina i zasićenja transferina, - povišeni nivoi serumskih imunoglobulina (Ig), posebno IgA (posledica nespecifične stimulacije MFS)^{244,245}. Transferin deficijentan u ugljenimhidratima (TDU) pokazuje senzitivnost 58-69% i specifičnost 82-92% za postojeću i skorašnju upotrebu alkohola. Kod bolesnika koji konzumiraju alkohol u količini >10g/dan postoji pozitivna korelacija između TDU i konzumiranja alkohola. Kod mladih muškaraca koji konzumiraju alkohol u količini >60g/dan, TDU je superiorniji marker u odnosu na γ GT i srednju zapreminu eritrocita u detekciji prekomerne upotrebe alkohola, što je od značaja u situacijama negativne anamneze. TDU nije u širokoj kliničkoj primeni. Povišen nivo alkohola u krvi >0.1% sa visokom verovatnoćom ukazuje na abuzus alkohola²⁴³.

Kod bolesnika sa pozitivnom anamnezom o dugotrajnom konzumiranju alkoholnih pića u velikoj količini na dijagnozu ABJ ukazuju: odnos povišenih vrednosti AST/ALT>2, vrednost ukupnog bilirubina >86 μ mol/L (5mg/dL), produžen PT/INR i neutrofilija u prisustvu ascitesa i infekcije (peritonitis, pneumonija)^{246,247}.

1.4.3. Portna hipertenzija

Portna hipertenzija je klinički sindrom definisan povećanjem gradijenta venskog pritiska u sistemu vene porte $>5\text{mmHg}$. Ciroza je najčešći uzrok portne hipertenzije u zapadnom svetu. U cirozi, portna hipertenzija predstavlja kombinaciju povećanja intrahepatičnog vaskularnog otpora i povećanja protoka kroz splanični krvotok. Povećanje intrahepatičnog otpora na nivou mikrocirkulacije posledica je poremećaja u arhitekturi jetre koji su uslovljeni razvojem fibroze, regenerativnih nodula i kolagenskih depozita (postsinusoidalna intrahepatična opstrukcija). Povećanju intrahepatičnog pritiska doprinosi dinamička komponenta koja se ogleda u vazokonstrukciji portnih venula (delovanje endogenih vazokonstriktora: noradrenalin, endotelin I, angiotenzin II, leukotrijeni, TxA_2). U cirozi, dinamička komponenta odgovorna je za oko 30% intrahepatičnog vaskularnog otpora^{248,249}. Portnu hipertenziju odlikuju povećanje minutnog volumena srca i splanična i sistemska vazodilatacija sa smanjenjem sistemskog vaskularnog otpora, što ima za posledicu stanje hiperdinamske cirkulacije²⁴⁹.

Portna hipertenzija je uzrok većine komplikacija ciroze: variksi ezofagusa (90% bolesnika), ascites (73% bolesnika), hipersplenizam (48% bolesnika), hepatična encefalopatija (39% bolesnika) i HRS (12% bolesnika)²⁵⁰.

Prirodna dekompresija hipertenzivne portne vene dešava se preusmeravanjem (šantovanjem) do 90% portnog protoka u sistemsku cirkulaciju kroz portosistemske kolaterale. Kolateralni krvni sudovi se razvijaju na specifičnim mestima: ezofagogastrični spoj, rektum, zid abdomena (umbilikalna regija). Varikozno proširenje vena formira se kada gradijent hepatičnog venskog pritiska (GHVP) premaši 10mmHg , a krvarenje iz variksa se razvija kada GHVP premaši 12mmHg . Ruptura variksa se dešava kada istezanje premaši elastični kapacitet zida varikozno izmenjenog krvnog suda²⁴⁸.

Klinička obrada bolesnika sa portnom hipertenzijom obuhvata: 1. definisanje uzroka portne hipertenzije; 2. procenu funkcionalne rezerve jetre; 3. vizualizaciju portnog stabla i procenu stanja hemodinamike u portnom sistemu; 4. lokalizovanje izvora gastrointestinalnog krvarenja²⁵¹.

1.4.4. Ascites

Ascites predstavlja patološko nakupljanje tečnosti u peritonealnoj duplji. Ascites se razvija kod uznapredovale ciroze i u prisustvu teške portne hipertenzije. U cirozi, ascites je posledica kombinacije poremećaja bubrežne funkcije i portne i splanične cirkulacije^{98,249}. Ascites primarno nastaje zbog nemogućnosti ekskrecije adekvatne količine natrijuma urinom, što

dovodi do pozitivnog balansa natrijuma. Kod bolesnika sa cirozom, bubrežna retencija natrijuma je sekundarna pojava do čijeg razvoja dovodi splanhična arterijska vazodilatacija. To uzrokuje smanjenje efektivnog arterijskog volumena krvi sa aktivacijom arterijskih i kardiopulmonalnih receptora i homeostatske aktivacije vazokonstriktora i sistema za retenciju natrijuma (nervni sistem simpatikusa i renin-angiotenzin-aldosteron sistem). Bubrežna retencija natrijuma dovodi do ekspanzije ekstracelularnog volumena i formiranja ascitesa i edema²³⁹. Razvoju ascitesa doprinose sniženje onkotskog pritiska plazme, povećano stvaranje limfe i povišen pritisak u limfnom sistemu. Polovina bolesnika sa cirozom razvija ascites tokom 10 godina, a više od 50% njih umire tokom 2 godine²⁵⁰. Internacionalni ascites klub usvojio je preporuku gradacije ascitesa: gradus 1: blagi ascites koji se registruje samo ultrasonografijom, gradus 2: umereni ascites koji se manifestuje umerenom simetričnom distenzijom abdomena, gradus 3: veliki ascites sa značajnom abdominalnom distenzijom²⁵². Pre započinjanja terapije, u cilju isključenja drugih uzroka ascitesa neophodno je vršenje dijagnostičke abdominalne punkcije (paracenteza) sa analizom ascitne tečnosti. Kada dijagnoza ciroze nije klinički jasna neophodno je diferencijalno dijagnostički razlučiti ascites koji je posledica portne hipertenzije od drugih etiologija ascitesa. Za etiološku diferencijalnu dijagnozu ascitesa koristi se vrednost serum-ascites-albumin gradijenta (SAAG). Ascites se pripisuje portnoj hipertenziji sa 97% pouzdanosti ako je $SAAG \geq 1.1g/dL$ (11g/L). Koncentracija proteina u ascitnoj tečnosti određuje se radi procene rizika razvoja SBP. Bolesnici sa koncentracijom proteina u ascitnoj tečnosti $<15g/L$ su pod povećanim rizikom za razvoj SBP (najznačajnija komplikacija ciroze sa ascitesom koju odlikuju groznica, abdominalni bol i leukocitoza). Broj neutrofila se određuje u cilju isključenja postojanja SBP²³⁹. Krajnji stadijumi ascitesa su refraktorni ascites, HRS i SBP²⁴⁹. Prema kriterijumima Internacionalnog ascites kluba, refraktorni ascites se definiše kao 'ascites koji nije moguće mobilisati ili kao rani rekurentni ascites koji se ne može prevenirati medikamentoznom terapijom'²⁵³.

1.4.5. Hepatorenalni sindrom

HRS predstavlja krajnji stadijum smanjene bubrežne perfuzije kod bolesnika koji imaju uznapredovalu bolest jetre, cirozu, teški alkoholni hepatitis ili metastatske tumore. HRS se manifestuje smanjenjem bubrežnog krvotoka (oligurija), retencijom natrijuma i vode, progresivnim povećanjem koncentracije kreatinina u plazmi i pojavom azotemije. HRS se razvija kod 18-39% bolesnika sa cirozom i ascitesom u toku 5 godina²⁴⁹.

1.4.6. Hepatična encefalopatija

Hepatična ili portokavna encefalopatija je neuropsihijatrijski sindrom koji nastaje kao posledica oštećenja metaboličke funkcije jetre i povećanog portnog pritiska sa portosistemskim tokom krvi, koji zaobilazi jetru. Smatra se da su uzročnici ovog sindroma produkti koji nastaju u digestivnom traktu, a koji se metabolišu u jetri. Amonijak je najčešće opisivani neurotoksin koji uzrokuje encefalopatiju. Amonijak nastaje u crevima iz belančevina hrane. Amonijak se iz creva apsorbuje u portni krvotok i dospeva u jetru gde se metaboliše u ureu i glutamin. Drugi mogući etiološki faktori hepatične encefalopatije su γ -aminobuterna kiselina, endogeni benzodiazepini, neurotoksične masne kiseline kratkog lanca, triptofan, merkaptani, fenoli i endogeni opijati. U cirotičnoj jetri se ne odvija detoksikacija toksičnih materija koje se apsorbuju iz creva. Toksične supstance putem brojnih kolaterala dospevaju u sistemsku cirkulaciju, prolaze krvno-moždanu barijeru i ispoljavaju inhibicioni uticaj na moždanu aktivnost (egzogeno hepatična encefalopatija)^{249,254,255}.

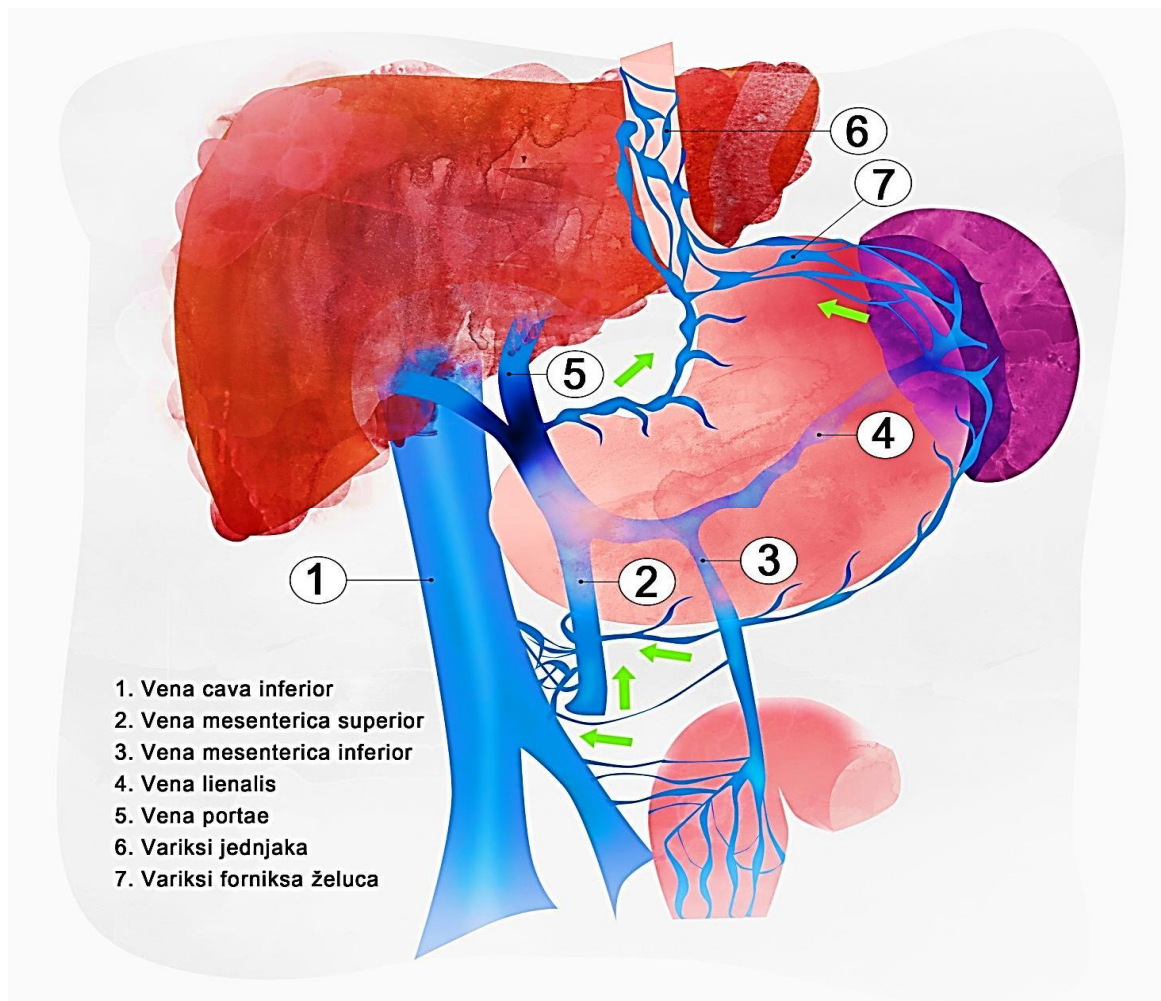
Obzirom da kliničke manifestacije hepatične encefalopatije nisu specifične, dijagnoza se postavlja nakon isključenja drugih uzroka moždanog oštećenja. U laboratorijskim analizama utvrđuje se porast azotnih materija (urea, kreatinin, mokraćna kiselina) i amonijaka. Hepatična encefalopatija se klinički manifestuje spektrom psihoneuroloških poremećaja. Psihički poremećaji su: zbunjenost, poremećaj sna i promene raspoloženja, ponašanja, intelekta, ličnosti i stanja svesti (somnia, dezorijentacija, sopor, koma). Neurološki poremećaji su: promene u govoru (isprekidan, nejasan, nepovezan), rigidnost ekstremiteta, pojačanje dubokih refleksa, midrijaza, grubi tremor (flapping tremor, asterixis, liver flap)²⁵⁴⁻⁶. Evolutivni stadijumi hepatične encefalopatije u odnosu na poremećaje mentalnog statusa, stanja svesti i neuromišićne poremećaje^{257,258}:

1. *Stadijum I (prodromalni stadijum: izmenjeno opšte stanje, promena ličnosti, oštećenje mentalne funkcije):* zbunjenost, konfuznost, smanjena moć rasuđivanja, potištenost, usporenost/euforičnost, ukočenost mišića, smetnje govora, izmenjen rukopis.
2. *Stadijum II (preteća koma):* smanjena psihomotorna aktivnost, dremljivost, promene u elektroencefalogramu (bilateralni spori talasi), grubi lepršavi tremor zglobova šaka.
3. *Stadijum III (stupor):* znaci depresije centralnog nervnog sistema, orijentisanost u vremenu i prostoru je nesigurna ili izostaje, pospanost, otežano uspostavljanje ili nemogućnost uspostavljanja kontakta sa bolesnikom.
4. *Stadijum IV (koma):* izostanak reakcije na bolne nadražaje, ugašenost refleksa, gubitak svesti.

1.4.7. Endoskopska klasifikacija variksa jednjaka i želuca

Venski sistem jednjaka čine dva spleta: vene u zidu jednjaka (submukozne vene) i vene oko jednjaka (periezofagealne vene) koje su povezane spojničnim (komunikantnim) venama. Periezofagealne vene predstavljaju komunikaciju sistema vene porte i sistema gornje šuplje vene. Smanjen protok i povišen pritisak u sistemu vene porte uzrokuju šantovanje dela krvi preko spojničnih vena (leva gastrična vena, slezinske vene, kratke gastrične vene) u sliv gornje šuplje vene. Kod bolesnika sa portnom hipertenzijom submukozna venska mreža jednjaka i želuca funkcioniše kao portokavalni kolateralni put. Zbog povišenog pritiska u periezofagealnim venama dolazi do širenja spojničnih vena i varikoznog proširenja submukoznog venskog plexusa jednjaka (Shema 12). Povišen pritisak krvi u varikozno proširenoj submukoznoj veni istanjenog zida, hiperaciditet, refluksom uzrokovano hemijsko oštećenje sluznice/zida variksa i mehanička trauma uzrokovana prolaskom bolusa hrane stvaraju uslove za leziju zida varikozno proširenih vena i posledično krvarenje. Krvarenje iz varikozno proširenih vena često je obilno, teško ga je kontrolisati i potencijalno je opasno po život. Kod bolesnika sa cirozom mortalitet iznosi 40-70% kod prvog krvarenja iz variksa²⁵¹.

Kod bolesnika sa portnom hipertenzijom prevalenca variksa jednjaka kreće se u rasponu 5-35%, a verovatnoća krvarenja u dvogodišnjem periodu iznosi 25%. Konsenzusom je prihvaćeno da klasifikacija variksa jednjaka treba da bude što jednostavnija odnosno u dva stepena. Na osnovu kvantitativne procene veličine, variksi jednjaka klasifikovani su na velike i male. Variksi dijametra većeg od 5mm klasifikuju se kao veliki, a variksi dijametra manjeg od 5mm kao mali. Na osnovu semikvantitativne morfološke procene, variksi jednjaka su klasifikovani na male (gradus 1), srednje (gradus 2) i velike (gradus 3). Mali variksi su variksi koji su blago elevirani iznad nivoa neizmenjene sluznice jednjaka, variksi srednje veličine predstavljaju tortuozne vene koje opstruiraju do jedne trećine lumena jednjaka, a veliki variksi predstavljaju tortuozne vene koje opstruiraju više od trećine lumena jednjaka. Preporuke koje se odnose na skrining i lečenje variksa jednjaka iste su za varikse srednje veličine i velike varikse. Prevalenca variksa želuca značajno je manja u odnosu na varikse jednjaka. Veliki variksi fundusa želuca su variksi dijametra preko 10mm, srednji dijametra 5-10mm, a mali dijametra ispod 5mm. Rizik za razvoj krvavljenja u direktnoj je korelaciji sa veličinom variksa. Gastroezofagealni variksi (GOV) predstavljaju ekstenziju variksa jednjaka u želudac i gradirani su u dva stepena. Tip 1 (GOV1) su variksi koji se nastavljaju na varikse jednjaka i šire se distalno duž male krivine želuca. Tip 2 (GOV2) su variksi koji se šire na fundus želuca i obično su značajno veći u odnosu na varikse duž male krivine želuca²⁵⁹.



Shema 12. Prikaz variksa jednjaka i želuca u portnoj hipertenziji.

1.5. HOLESTAZNA BOLEST JETRE

1.5.1. Primarna bilijarna ciroza

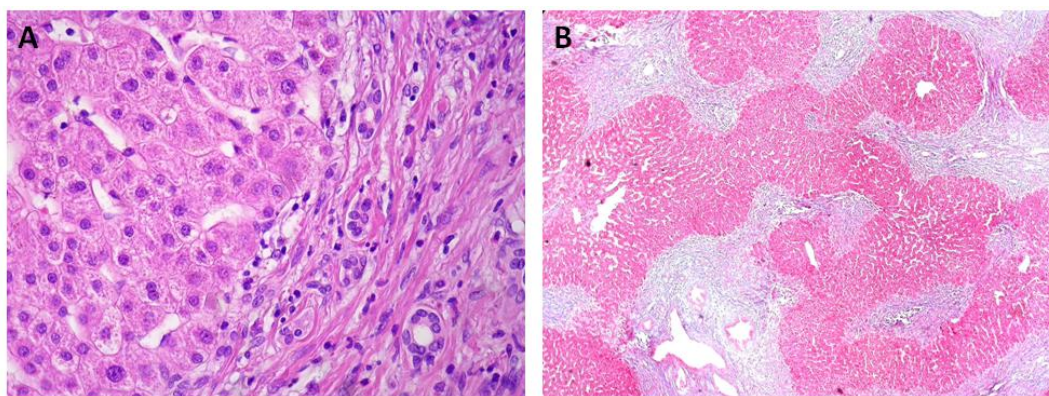
Primarna bilijarna ciroza (PBC) je hronična progresivna inflamaciona bolest jetre (primarno posredovana T limfocitima) nepoznate etiologije. PBC je holestazno oboljenje koje odlikuje progresivna, ireverzibilna, nesupurativna destrukcija intrahepatičnih žučnih kanala (mali interlobularni i septalni žučni kanali) koja uzrokuje fibrozu, cirozu i jetrinu insuficijenciju (Slika 1). PBC se razvija u 4 stadijuma: stadijum I: inflamaciona nesupurativna destrukcija septalnih i interlobularnih žučnih kanala; fokalna obliteracija žučnih kanala je patognomonična za PBC i poznata je pod nazivom *'floridna lezija žučnih kanala'*; stadijum II: periportalno širenje inflamacije (holangitis, formiranje granuloma, proliferacija žučnih

kanala); stadijum III: septalna fibroza, duktopenija (redukcija žučnih kanala definisana gubitkom >50% interlobularnih žučnih kanala) sa posledičnomolestazom i povećanjem depozita bakra u periportalnim i paraseptalnim hepatocitima; stadijum 4: bilijarna ciroza²⁶⁰.

Kliničku sliku PBC odlikuje niz imunski posredovanih simptoma i fenomena, što ukazuje na autoimunsku prirodu bolesti. Poput drugih autoimunskih bolesti, PBC afektuje žene u preko 90% slučajeva. PBC je udružena sa različitim ekstrahepatičnim autoimunskim sindromima u 84% slučajeva^{260,261}. Kliničku sliku PBC odlikuju: slabost, pruritus, hepatomegalija, splenomegalija, ikterus, hiperpigmentacija, ksantelazma (subkutani depoziti holesterola), steatoreja, osteopenija i osteoporoza, komplikacije ciroze i portne hipertenzije (ascites, krvarenje iz variksa jednjaka i želuca, hepatična encefalopatija)²⁶⁰.

Osnovne biohemijske karakteristike PBC su: povišena aktivnost serumske alkalne fosfataze (AF) i serumske γ GT, blago povećanje nivoa transaminaza (AST i ALT), hiperbilirubinemija, hiperholesterolemija, značajno povećanje IgM i pozitivna anti-mitohondrijalna antitela (AMA) usmerena protiv E2 subjediniice piruvat dehidrogenaze²⁶¹.

Dijagnoza PBC postavlja se na osnovu kliničke slike i dva od tri kriterijuma: 1. povišeni biohemijski markeri holestaze: AF i γ GT duže od šest meseci; 2. pozitivna AMA (seropozitivnost nije specifična za PBC, senzitivnost 98%); 3. histološke karakteristike tkiva jetre dobijenog biopsijom. U dijagnostičkom postupku neophodno je isključiti promene u ekstrahepatičnim žučnim putevima, te je indikovana endoskopska retrogradna holangiopankreatografija (ERCP) i/ili MR holangiopankreatografija (MRCP)^{262,263}. Prema preporukama EASL (European Association for the Study of the Liver - Evropsko udruženje za ispitivanje bolesti jetre) u dijagnostičkom postupku nije neophodno vršiti biopsiju jetre²⁶².

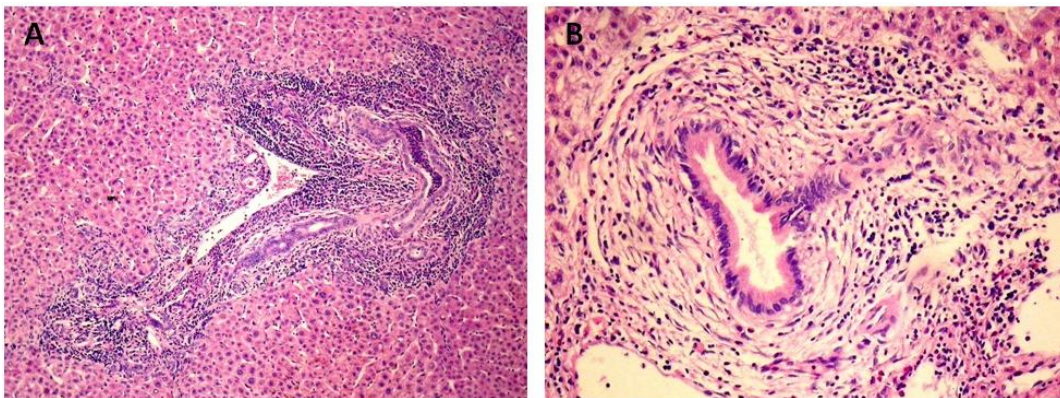


Slika 1. Primarna bilijarna ciroza (PBC). A) picameal nekroza i duktalna hiperplazija; B) precirotični stadijum.

1.5.2. Primarni sklerozirajući holangitis

Primarni sklerozirajući holangitis (PSC) je hronično oboljenje jetre koje odlikuje progresivna destrukcija velikih intrahepatičnih i ekstrahepatičnih žučnih kanala (Slika 2). Pretežno afektuje muškarce. Postoji značajna udruženost PSC sa ulceroznim kolitisom (50-75%), holangiokarcinomom (10-20%) i kolorektalnim karcinomom (9%)²⁶¹.

Dijagnoza PSC postavlja se na osnovu kliničke slike i: - povišenih vrednosti tipičnih biohemijskih markera holestaze (bilirubin, AF, γ GT) u odsustvu drugog uzroka/objašnjenja; - holangiografskog dokaza postojanja striktura intrahepatičnih i ekstrahepatičnih žučnih puteva; - histološke karakteristike tkiva jetre dobijenog biopsijom (prstenasta fibroza oko žučnih kanala, koja nije prisutna kod svih bolesnika); - isključenja drugih holestaznih bolesti jetre. Za razliku od PBC, u serumu nisu prisutni specifični imunski markeri (AMA). Kod većine obolelih (do 80%) u serumu se detektuju atipična antineutrofilna citoplazmatska autoantitela (xANCA) koja nisu specifična za PSC (identifikuju se i kod obolelih od ulceroznog kolitisa u odsustvu PSC)^{261,264}.



Slika 2. Primarni sklerozirajući holangitis (PSC). A) duktalna limfocitna infiltracija;
B) periduktalna onion-skin fibroza.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Definirati hemostatski profil bolesnika sa alkoholnom cirozom i kontrolnih grupa (zdravi ispitanici i bolesnici sa holestaznom cirozom) na osnovu rezultata standardnih testova hemostaze.
2. Ispitati globalnu hemostazu testom za ispitivanje stvaranja trombina i metodom tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i kontrolnih grupa.
3. Ispitati korelacije između standardnih i globalnih testova hemostaze.
4. Ispitati korelacije između testa za ispitivanje stvaranja trombina i tromboelastometrije.
5. Utvrditi značaj globalnih testova hemostaze u proceni stepena koagulabilnosti.
6. Ispitati valjanost tromboelastometrije za utvrđivanje poremećaja polimerizacije fibrina uzrokovanog kvalitativnom disfunkcijom fibrinogena.
7. Utvrditi značaj tromboelastometrije u proceni aktivnosti sistema fibrinolize.
8. Ispitati korelacije globalnih testova hemostaze sa parametrima metaboličke i sintetske funkcije jetre odnosno sa indeksima oštećenja jetrine funkcije.

3. MATERIJAL I METODE

Tip studije

Izvedena je studija preseka za koju je je dobijena saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije, Beograd.

Mesto i period istraživanja

Izvođenje studije je realizovano u Kliničkom centru Srbije: Klinika za digestivnu hirurgiju u saradnji sa Klinikom za gastroenterologiju i hepatologiju i Centrom za medicinsku biohemiju, Odeljenje Klinike za kardiohirurgiju. Period istraživanja trajao je od aprila 2011. do juna 2013. godine.

Ispitanici

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 60 bolesnika sa alkoholnom cirozom, 57 osoba muškog pola i 3 ženskog pola. Svi bolesnici su lečeni hospitalno na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinički centar Srbije, Beograd.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje

U istraživanje su uključeni bolesnici sa alkoholnom cirozom, koji su hospitalizovani u fazi pogoršanja osnovne bolesti i ispoljavanja neke od njenih komplikacija (krvarenje iz variksa jednjaka i želuca, melena, ascites, encefalopatija, splenomegalija/hipersplenizam, tromboza, hepatorenalni sindrom) ili radi daljeg ispitivanja.

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja

- ciroza udružena sa intrahepatičnim i ekstrahepatičnim malignim oboljenjem;
- prethodna transplantacija jetre ili šant operacija;
- upotreba lekova koji utiču na hemostazu;
- poremećaj hemostaze koji nije vezan za oboljenje jetre;
- urođeno stanje trombofilije;
- ciroza udružena sa virusnim hepatitisom;
- ciroza udružena sa metaboličkim oboljenjem jetre;
- postoperativni period.

Kontrolne grupe ispitanika

Kontrolne grupe ispitanika su se sastojale od 24 bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre [primarna bilijarna ciroza (n=16; 15 osoba ženskog pola i jedan muškarac) i primarni sklerozirajući holangitis (n=8; 4 osobe muškog i ženskog pola)] i 50 zdravih osoba dobrovoljaca, 17 osoba muškog pola i 33 ženskog pola. Bolesnici sa holestaznim oboljenjem jetre lečeni su hospitalno ili ambulantno na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju. Zdravi ispitanici su odabrani među zdravstvenim radnicima zaposlenim na Klinici za digestivnu hirurgiju. Svi zdravi ispitanici imali su negativnu anamnezu u pogledu postojanja hematološkog, hepatičnog i drugih oboljenja, kao i u pogledu uzimanja lekova koji deluju na hemostazu.

Nakon detaljnog pismenog i usmenog informisanja o ciljevima studije od svih ispitanika dobijena je pisana saglasnost za učešće u studiji. Za bolesnike sa poremećajem stanja svesti pisana saglasnost dobijena je od njihovih bliskih srodnika.

3.1. KLINIČKA DIJAGNOZA

Inicijalna dijagnostička obrada podrazumevala je anamnezu i fizikalni pregled, uz detaljno razmatranje svih podataka značajnih za dijagnostikovanje ciroze, portne hipertenzije i eventualnih komplikacija portne hipertenzije (krvarenje, tromboza portne vene).

Klinička dijagnoza ciroze

Klinička dijagnoza ciroze postavljena je na osnovu potvrđenog podatka o dugotrajnom konzumiranju alkohola u količini ≥ 80 g/dnevno za muškarce i >40 g/dnevno za žene, kliničke slike, fizikalnog nalaza, patoloških vrednosti biohemijskih i hematoloških parametara koji ukazuju na leziju jetre, radiografskog (imaging metode: ultrasonografija, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonanca) i endoskopskih ispitivanja. Radiografsko ispitivanje sprovedeno je prvenstveno u cilju isključenja drugih uzroka patoloških vrednosti laboratorijskih testova (opstruktivna bilijarna patologija, infiltrativne i neoplastične bolesti)^{234,236-8}. Patohistološka dijagnoza nije postavljena kod bolesnika kod kojih je biopsija jetre procenjena kao kontraindikovana zbog patoloških vrednosti standardnih testova koagulacije.

Veličina i izgled jetre procenjivani su na osnovu ultrazvučnog i MDCT (multislajnsni skener, kompjuterizovana tomografija) pregleda.

Dijagnostikovanje prisustva tromboze vene porte zasnivalo se na nalazu doppler ultrazvučnog pregleda i/ili MDCT angiografije portnog sistema.

Svi pacijenti podvrgnuti su gornjoj fleksibilnoj endoskopiji. Za procenu tipa variksa jednjaka korišćen je endoskopski sistem gradiranja baziran na semikvantitativnoj morfološkoj proceni. Mali variksi su variksi koji su blago elevirani iznad nivoa neizmenjene sluznice jednjaka, variksi srednje veličine predstavljaju tortuozne vene koje opstruiraju do jedne trećine lumena jednjaka, a veliki variksi predstavljaju tortuozne vene koje opstruiraju više od trećine lumena jednjaka. Prisustvo tačkastog krvavljenja na mukozi koja pokriva varikse (*'cherry red spot'*), takođe, notirano je u okviru opisa i klasifikacije variksa.

Hipertenzivna gastropatija dijagnostikovana je na osnovu standardnog endoskopskog kriterijuma koji podrazumeva prisustvo fine retikularne mreže koja ograničava zone rozikaste sluznice. Retikularna mreža daje sluznici izgled mozaika koji podseća na kožu zmiје (*'snake-skin appearance'*).

Gastrični variksi su gradirani u odnosu na istovremeno prisustvo i variksa jednjaka: izolovani gastrični variksi (IGV) ili gastroezofagealni variksi (GOV). Endoskopskim pregledom verifikovano je i eventualno prisustvo uzroka za nevariksno krvarenje (gastrični ili duodenalni ulkus).

Određivanje stepena težine ciroze

Stepen težine oštećenja jetrine funkcije ocenjivan je na osnovu Child-Turcotte-Pugh klasifikacije. Child i Turcotte²⁶⁵ 1964. godine dizajnirali su skor u cilju procene rizika/ishoda hirurškog lečenja kod bolesnika sa cirozom i portnom hipertenzijom, koji se podvrgavaju portokavalnom šantu i transsekciji ezofagusa. Pugh i sar.²⁶⁶ 1973. godine modifikovali su Child-Turcotte scoring sistem tako što su zamenili kriterijum nutricionog statusa sa protrombinskim vremenom (PT ili INR) i svaku varijablu označili skorom 1-3. Na osnovu Child-Turcotte-Pugh skora, stepen jetrine insuficijencije klasifikuje se u tri stadijuma: A, B i C. Child-Turcotte-Pugh skor (u daljem tekstu Child-Pugh skor - CPs) obuhvata pet indikatora jetrine insuficijencije: dva biohemijska parametra (serumski nivoi bilirubina i albumina), jedan hematološki parametar (vrednost PT/INR) i dva klinička parametra (prisustvo/odsustvo ascitesa i klinički manifestne hepatične encefalopatije). Svaka varijabla se boduje sa 1, 2 i 3, a bod 3 korelira sa najtežim stepenom oštećenja jetrine funkcije (Tabela 3). Prisustvo hepatične encefalopatije određivano je klinički. Bolesnici su gradirani u stadijume I do IV^{257,25}.

Tabela 3. Child-Pugh skor.

Varijabla	1 bod	2 boda	3 boda	jedinice
Bilirubin (<i>ukupni</i>)	<34 (<2)	34-50 (2-3)	>50 (>3)	μmol/l (mg/dL)
Serumski albumin	>35	28-35	<28	g/L
INR	<1.7	1.71-2.20	>2.20	<i>nema</i>
Ascites	Nema	Reaguje na diuretike	Refraktorni	<i>nema</i>
Hepatična encefalopatija	Nema	Stadijum I-II (reaguje na lekove)	Stadijum III-IV (ne reaguje na lekove)	<i>nema</i>

Tabela 4. Tumačenje Child-Pugh skora.

Bodovi	Stadijum	Stepen oštećenja jetrine funkcije
5-6	A	Kompenzovana bolest
7-9	B	Značajno funkcionalno oštećenje (umereno teška ciroza)
10-15	C	Dekompenzovana bolest (teška ciroza)

Zbir bodova varijabli svrstava oboljenje jetre u jednu od tri kategorije: Child-Pugh stadijume A (5-6 poena), B (7-9 poena) i C (10-15 poena).

3.2. INSTRUMENTI MERENJA

Kod svih ispitanika vršena su ispitivanja sistema hemostaze standardnim i globalnim testovima hemostaze, biohemijske analize i određivanje parametara krvne slike i brzine sedimentacije.

3.2.1. UZIMANJE I PRIPREMANJE UZORAKA KRVI

Uzorci periferne venske krvi uzimani su nakon dobijanja informisanog pristanka bolesnika ili njihovih bliskih srodnika (za bolesnike sa poremećajem stanja svesti) i zdravih ispitanika.

Uzorci periferne venske krvi uzimani su neposredno nakon hospitalizacije bolesnika. Kod svih ispitanika, uzorci krvi uzimani su u jednom aktu.

Uzorci krvi dobijeni su punkcijom vene kubitalne regije prema NCCLS standardima (National Committee for Clinical Laboratory Standards²⁶⁷ (sada: CLSI-Clinical Laboratory Institute Standards; International, interdisciplinary, non-profit, standards developing, educational organization). Venepunkcija se izvodi uz minimalno oštećenje tkiva da bi se izbegla staza odnosno aktivacija trombocita, sistema koagulacije i fibrinolize. Sadržaj epruvete se pažljivo izmeša okretanjem epruvete naniže tri puta.

Korišćene su vakuum epruvete BD Vacutainer[®] (Becton Dickinson, BD-Plymouth, UK) sa odgovarajućim antikoagulansima i to:

- za određivanje parametara krvne slike plastične epruvete sa 3.6mg K₂EDTA (BD Vacutainer[®] Plastic K₂EDTA tube);
- za određivanje brzine sedimentacije eritrocita staklene epruvete za sedimentaciju sa 0.109 mol/L rastvorom natrijum citrata (BD Vacutainer[®] Glass Seditainer[™] tube);
- za izvođenje testova hemostaze plastične epruvete sa 0.109mol/L rastvorom natrijum citrata pH 7.4 (BD Vacutainer[®] Plus citrate tube). Odnos krvi i antikoagulansa je 9:1 (4.5mL krvi:0.5mL antikoagulansa);
- za određivanje biohemijskih parametara plastične epruvete bez aditiva (BD Vacutainer[®] Plastic serum tube).

Za izvođenje standardnih testova hemostaze i testa za ispitivanje stvaranja trombina korišćeni su uzorci plazme siromašne trombocitima (<10x10⁹/L). Unutar jednog časa od uzimanja, uzorci krvi centrifugirani su na 2000g 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja izdvojena je plazma siromašna trombocitima. Testiranje je vršeno unutar 60 minuta nakon dobijanja plazme siromašne trombocitima, sa izuzetkom testiranja faktora koagulacije i izvođenja testa za ispitivanje stvaranja trombina. Za testiranje faktora koagulacije i izvođenje testa za ispitivanje stvaranja trombina izdvojeni uzorci plazme su alikvotirani i zamrznuti na -70⁰C do izvođenja analiza. Uzorci plazme odmrzavani su na 37⁰C/5min, a testiranje je vršeno unutar jednog časa od odmrzavanja.

Za izvođenje tromboelastometrijskog testiranja korišćeni su uzorci citratne cele krvi. Metoda tromboelastometrije izvođena je unutar 1-2 časa nakon uzimanja uzoraka krvi.

Koncentracije biohemijskih parametara određivane su u serumu neposredno nakon centrifugiranja uzoraka krvi na 1500g 10 minuta na sobnoj temperaturi.

3.2.2. IZVOĐENJE TESTOVA

3.2.2.1. Određivanje kompletne krvne slike i biohemijskih parametara

Kompletna krvna slika

Parametri kompletne krvne slike (koncentracija hemoglobina, hematokritna vrednost i broj trombocita) određivani su upotrebom automatizovanog hematološkog analizatora Coulter® HmX (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Određivanje broja leukocita, eritrocita i trombocita zasniva se na Coulter-ovom principu impedance. Hematokritna vrednost se izračunava iz formule $Hct (L/L) = MCV (fL) \times \text{broj eritrocita} (10^{12}/L)$, gde je MCV (mean corpuscular volume) prosečna zapremina eritrocita. Koncentracija hemoglobina je određivana spektrofotometrijski, modifikovanom cijanmethemoglobinskom metodom (reagens bez cijanida, sa natrijum lauril sulfatom).

Brzina sedimentacije

Brzina sedimentacije određivana je modifikovanom Westergreen metodom.

Biohemijski parametri

Biohemijski parametri određivani su korišćenjem komercijalnih reagenasa i standardnih spektrofotometrijskih i imunoturbidimetrijskih metoda upotrebom automatizovanog biohemijskog analizatora Olympus/Beckman Coulter AU680 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Albumin

Princip određivanja koncentracije albumina u serumu zasniva se na formiranju obojenog kompleksa albumina sa bromkrezol zelenim (BCG). Apsorbancija albumin-BCG kompleksa se meri bihromatski (600/800nm) i proporcionalna je koncentraciji albumina u uzorku. Referentne vrednosti: 34-55g/L.

Ukupan bilirubin

Stabilizirana diazonijum so, 3,5-dihlorfenildiazonijum tetrafluoroborat (DPD), reaguje direktno sa konjugovanim bilirubinom, a sa nekonjugovanim bilirubinom u prisustvu akceleratora (kofein i surfaktant), i nastaje azobilirubin. Apsorbancija na 540nm je proporcionalna koncentraciji ukupnog bilirubina. Posebno se meri i slepa proba uzorka da bi se smanjio uticaj endogenih interferencija u uzorku seruma. Referentne vrednosti: <20.5 $\mu\text{mol/L}$.

Direktan bilirubin

Stabilizirana diazonijum so -DPD reaguje direktno sa direktnim (konjugovanim) bilirubinom u kiseljoj sredini i nastaje azobilirubin. Apsorbancija na 570nm je proporcionalna koncentraciji direktnog bilirubina u uzorku. Referentne vrednosti: <3.4 μ mol/L.

Aspartat aminotransferaza

Metoda određivanja aktivnosti AST zasniva se na preporukama Međunarodne federacije za kliničku hemiju (IFCC: The International Federation of Clinical Chemistry). AST katalizuje transaminaciju aspartata i 2-oksoglutarata, pri čemu nastaju L-glutamat i oksalacetat. Oksalacetat se redukuje u L-malat u prisustvu malat-dehidrogenaze (MDH), dok se NADH simultano konvertuje u NAD⁺. Smanjenje apsorbancije zbog gubitka NADH se meri na 340 nm i proporcionalno je aktivnosti AST u uzorku. Endogeni piruvat se uklanja reakcijom LDH (laktat dehidrogenaza) u toku inkubacije. Referentne vrednosti: <37U/L.

Alanin aminotransferaza

Metoda određivanja aktivnosti ALT zasniva se na preporukama IFCC. ALT prenosi amino grupu sa alanina na 2-oksoglutarat, pri čemu nastaju piruvat i glutamat. Piruvat ulazi u reakciju sa NADH koju katalizuje LDH u kojoj nastaju laktat i NAD⁺. Smanjenje apsorbancije zbog gubitka NADH se meri na 340nm i proporcionalno je aktivnosti ALT u uzorku. Referentne vrednosti: <41U/L.

Gama-glutamyltransferaza

Metoda određivanja aktivnosti γ GT zasniva se na preporukama IFCC. γ GT katalizuje transfer γ -glutamil grupe sa substrata, γ -glutamyl-3-karboksi-4-nitroanilida, na glicilglicin, pri čemu nastaje 5-amino-2-nitrobenzoat. Promena apsorbancije na 410/480nm posledica je formiranja 5-amino-2-nitrobenzoata i direktno je proporcionalna aktivnosti γ GT u uzorku. Referentne vrednosti: muškarci <55U/L; žene <38U/L.

Holinesteraza

Metoda određivanja aktivnosti holinesteraze (HE) zasniva se na preporukama Nemačkog društva za kliničku hemiju (GSCC: German Society for Clinical Chemistry, 1994). Holinesteraza katalizuje hidrolizu butirilholina u butirat i tioholin. Tioholin redukuje žuti heksacijanoferat (III) u bezbojni heksacijanoferat (II). Smanjenje apsorbancije na 410nm direktno je proporcionalno aktivnosti HE u uzorku. Referentne vrednosti: 3900-11500U/L.

C-reaktivni protein

Latex imunoturbidimetrijska metoda za određivanje C reaktivnog proteina (CRP) zasniva se na specifičnoj reakciji anti-humani CRP antitela sa CRP-om iz uzorka pri čemu nastaju nesolubilni agregati. Apsorbancija ovih agregata je proporcionalna koncentraciji CRP u uzorku. Referentne vrednosti: <10mmol/L.

3.2.2.2. Standardni testovi hemostaze

Standardni testovi hemostaze određivani su koagulometrijski, imunoturbidimetrijski i spektrofotometrijski. Testiranja su izvođena korišćenjem automatizovanog koagulometra BCS[®]XP (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) i komercijalnih reagenasa.

U uzorcima plazme vršena se sledeća testiranja: PT-INR (International Normalized Ratio), aPTT, trombinsko vreme (TT), aktivnosti faktora koagulacije: I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, vWF, prirodni inhibitori koagulacije: AT i PC, D-dimer i komponente sistema fibrinolize: plazminogen, PAI-1, α_2 -IP.

Protrombinsko vreme

PT je određivano koagulometrijski prema Quick-u korišćenjem reagensa Thromborel[®] S (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Metoda se zasniva na započinjanju procesa koagulacije inkubacijom plazme sa optimalnom količinom tromboplastina i kalcijuma, posle čega se meri vreme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška. Referentne vrednosti: 10.4-13.0s.

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

aPTT je određivano koagulometrijski korišćenjem reagensa Pathromtin[®] SL (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Metoda podrazumeva inkubaciju plazme sa optimalnom količinom fosfolipida i površinskog aktivatora, koja vodi ka aktivaciji faktora unutarnjeg puta koagulacije. Koagulacioni proces se započinje dodatkom jona kalcijuma i potom se meri vreme stvaranja ugruška. Referentne vrednosti: 26-37s.

Trombinsko vreme

TT je određivano koagulometrijski korišćenjem reagensa BC Thrombin[®] (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Princip metode podrazumeva da standardna

koncentracija trombina konvertuje plazmatski fibrinogen u fibrin, pri čemu se stvara ugrušak. Meri se vreme potrebno za stvaranje ugruška. Referentne vrednosti: 14-21s.

Fibrinogen

Fibrinogen je određivan koagulometrijski modifikovanom metodom po Clauss-u korišćenjem reagensa Multifibren® U (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Metoda se zasniva na aktiviranju koagulacije u prisustvu velikog viška trombina, u kom slučaju vreme koagulacije u velikoj meri zavisi od količine fibrinogena u uzorku. Referentne vrednosti: 1.8-4.0g/L.

Faktori koagulacije II, V, VII i X

Aktivnosti faktora koagulacije II, V, VII i X određivane su koagulometrijski metodom zasnovanom na produženju PT korišćenjem deficitarnih plazmi i reagensa za određivanje PT (Thromborel® S). Princip metode zasniva se na tome da u plazmi koja je deficitarna u bilo kom od faktora spoljnog puta koagulacije dolazi do produženja PT. Faktor deficitarna plazma koristi se za potvrdu deficitarnosti faktora i za identifikaciju i kvantifikaciju deficitarnog faktora u plazmi pacijenta. U smeši deficitarne plazme i plazme pacijenta određuje se PT, a rezultati se interpretiraju korišćenjem referentne krive koja je dobijena određivanjem razblaženja standardne humane plazme. Plazma pacijenta koja je deficitarna u specifičnom faktoru ne može da se prilagodi odsustvu faktora u faktor deficitarnoj plazmi, zbog čega se dobija produženo PT. Referentne vrednosti: FII 70-120% od normale, FV 70-140% od normale, FVII 70-120% od normale, FX 70-120% od normale.

Faktori koagulacije VIII, IX, XI i XII

Aktivnosti faktora koagulacije VIII, IX, XI i XII određivane su koagulometrijski metodom zasnovanom na produženju aPTT korišćenjem deficitarnih plazmi i reagensa za određivanje aPTT (Pathromtin® SL). Princip metode zasniva se na tome da u plazmi koja je deficitarna u bilo kom od faktora unutarnjeg puta koagulacije dolazi do produženja aPTT. Faktor deficitarna plazma koristi se za potvrdu deficitarnosti faktora i za identifikaciju i kvantifikaciju deficitarnog faktora u plazmi pacijenta. U smeši deficitarne plazme i plazme pacijenta određuje se aPTT, a rezultati se interpretiraju korišćenjem referentne krive koja je dobijena određivanjem razblaženja standardne humane plazme. Plazma pacijenta koja je deficitarna u specifičnom faktoru ne može da se prilagodi odsustvu faktora u faktor deficitarnoj plazmi, zbog čega se dobija produženo aPTT. Referentne vrednosti: FVIII 70-

150% od normale, FIX 70-120% od normale, FXI 70-120% od normale, FXII 70-150% od normale.

Faktor koagulacije XIII

Aktivnost FXIII određivana je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom® F XIII (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Metoda se zasniva na unakrsnom vezivanju specifičnog supstrata (peptida) za glicin etil ester, u prisustvu aktiviranog FXIII (FXIIIa) nastalog dejstvom trombina na FXIII iz uzorka, pri čemu se oslobađa amonijak. Pri tome, sprečava se da stvoreni fibrin dejstvom trombina na endogeni fibrinogen formira ugrušak dejstvom agregacionog inhibirajućeg peptida. Oslobođeni amonijak određuje se u paralelnoj enzimskoj reakciji transaminacije α -ketoglutarata u prisustvu NADH, gde pod dejstvom glutamat dehidrogenaze nastaje NAD i glutamat. Smanjenje NADH meri se praćenjem apsorbancije na 340nm. Referentne vrednosti: 70-140% od normale.

Antigen von Willebrand-ovog faktora

Antigen von Willebrand-ovog faktora (vWFAg) određivan je imunoturbidimetrijski korišćenjem reagensa vWFAg® (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Metoda se zasniva na reakciji aglutinacije lateks čestica sa imobilisanim antitelima na antigen vWF, do koje dolazi kada se mešaju sa uzorcima koji sadrže vWFAg. Aglutinacija se detektuje povećanjem turbiditeta koji je proporcionalan nivou antigena koji se nalazi u uzorku. Referentne vrednosti: 50-160% od normale.

Antitrombin

Funkcionalna aktivnost AT u plazmi određivana je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom® Antithrombin III (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). AT iz uzorka se konvertuje heparinom do neposrednog inhibitora koji inaktivira prisutan trombin. Preostala količina trombina određuje se kinetičkim testom u kome ostatak trombina razgrađuje supstrat Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA, čime nastaje obojeni razgradni proizvod kome se meri povećanje apsorbancije na 405nm. Referentne vrednosti: 79-112% od normale.

Protein C

Funkcionalno aktivan PC određivan je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom® Protein C (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). PC iz uzorka pacijenta aktivira se specifičnim aktivatorom iz zmijskog otrova. Nastali PC_a određuje se kinetičkim testom tako što se na 405nm meri povećanje apsorbancije p-nitroanilina (proizvod

razgradnje supstrata HD-Nva-CHA-Lys-pNA nastao delovanjem PC_a). Referentne vrednosti: 70-140% od normale.

Plazminogen

Biološka aktivnost plazminogena određivana je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom[®] Plasminogen (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Plazminogen iz uzorka formira kompleks sa streptokinazom u kivetu. Koncentracija ovog kompleksa određuje se kinetičkom metodom merenjem na 405nm povećanja apsorbancije p-nitroanilina (proizvod razgradnje supstrata HD-Nva-CHA-Lys-pNA nastao delovanjem formiranog kompleksa). Referentne vrednosti: 70-140% od normale.

Inhibitor aktivatora plazminogena-1

Aktivnost PAI-1 određivana je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom[®] PAI (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). PAI iz uzorka deaktivira prisutnu urokinazu u sastavu reagensa. Preostala aktivnost urokinaze određuje se konverzijom plazminogena u plazmin. Aktivnost nastalog plazmina određuje se kinetički, merenjem na 405nm povećanja apsorbancije p-nitroanilina (proizvod razgradnje supstrata HD-Nva-CHA-Lys-pNA nastao delovanjem plazmina). Referentne vrednosti: 0.3-3.5U/mL.

α₂-inhibitor plazmina

Biološki aktivan α₂-IP (α₂-antiplazmin) određivan je spektrofotometrijski korišćenjem reagensa Berichrom[®] α₂-antiplasmin (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). α₂-IP iz uzorka deaktivira prisutan plazmin. Rezidualna količina plazmina određuje se kinetičkim testom tako što se na 405nm meri povećanje apsorbancije p-nitroanilina (proizvod razgradnje supstrata HD-Nva-CHA-Lys-pNA nastao delovanjem ostatka plazmina). Referentne vrednosti: 70-120% od normale.

D-dimer

D-dimer određivan je imunoturbidimetrijski korišćenjem reagensa Innovance[®] D-DIMER (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Polistirenske partikule kovalentno povezane sa monoklonskim antitelima (8D3) aglutiniraju kada se mešaju sa uzorcima koji sadrže D-dimer. Ukršteno povezan region ima stereosimetričnu strukturu, što uslovljava da se epitop za monoklonsko antitelo pojavljuje dva puta. Ovo ima za posledicu da je jedno antitelo dovoljno da započne reakciju aglutinacije koja se detektuje turbidimetrijski, povećanjem turbiditeta. Referentna vrednost: <0.5mg/L FEU.

Referentne vrednosti za sve određivane parametre su definisane od strane proizvođača i verifikovane na lokalnoj referentnoj populaciji u Centru za medicinsku biohemiju, Odeljenje Klinike za kardiohirurgiju, Klinički centar Srbije, gde su analize urađene.

Euglobulinska fibrinoliza

Euglobulinska fibrinoliza izvođena je standardnom metodom po Buckell-u²⁶⁸.

Reagensi:

1. 1%-ni rastvor sirćetne kiseline,
2. rastvor borata (reagens),
3. CaCl₂ M40,
4. destilovana voda.

Izvođenje testa:

U epruvetu od 20mL dodaju se: 9ml destilovane vode, 0.5mL citratne plazme i 0.1mL 1% sirćetne kiseline (da bi se dobio pH 5.3). Epruveta se ostavi 30 minuta na 4⁰C da bi se staložila euglobulinska frakcija plazme, a zatim se centrifugira 5 minuta na 3000 obrtaja/minuti. Tečnost iznad taloga se odbaci, a epruveta se suši postavljanjem u obrnutom položaju na filtracionu hartiju. Talog se rastvara u 0.5mL rastvora borata. Epruveta se stavi u vodeno kupatilo na 37⁰C u trajanju 3 minuta, a zatim se doda 0.5mL CaCl₂. Zabeleži se vreme zgrušavanja, a potom se u vremenskim razmacima od 30 minuta posmatra i beleži vreme lize koaguluma. Pri kraju lize, epruveta se posmatra u vremenskim razmacima od 5 minuta. Normalno vreme lize euglobulina (VLE) je duže od 2 časa.

Test euglobulinske fibrinolize izvođen je na Odeljenju za ispitivanje poremećaja hemostaze sa Registrom urođenih koagulopatija, Zavod za transfuziju krvi Srbije, Beograd.

3.2.2.3. Globalni testovi hemostaze

Sistem hemostaze ispitivan je korišćenjem dva globalna testa: tromboelastometrija i test ispitivanja stvaranja trombina. Tromboelastometrija pripada tzv. viskoelastičnim testovima, jer se zasniva na merenju viskoelastičnih svojstava cele krvi. Viskoelastični testovi mere promene u elastičnim svojstvima cele krvi u toku procesa formiranja i fibrinolizne razgradnje krvnog ugruška. U testovima ispitivanja stvaranja trombina, u uzorcima plazme (plazma bogata trombocitima ili plazma siromašna trombocitima) ispituje se brzina stvaranja i merni opseg trombina formiranog nakon stimulacije koagulationog procesa tkivnim faktorom.

Testovi za ispitivanje stvaranja trombina na indirektan način procenjuju formiranje krvnog ugruška korišćenjem stvaranja trombina kao surogata²⁶⁹. Test za ispitivanje stvaranja trombina kvantifikuje stvaranje trombina, dok tromboelastometrija zavisi od stvaranja trombina odnosno meri efekat trombina na formiranje krvnog ugruška²⁷⁰.

3.2.2.3.1. Tromboelastometrija

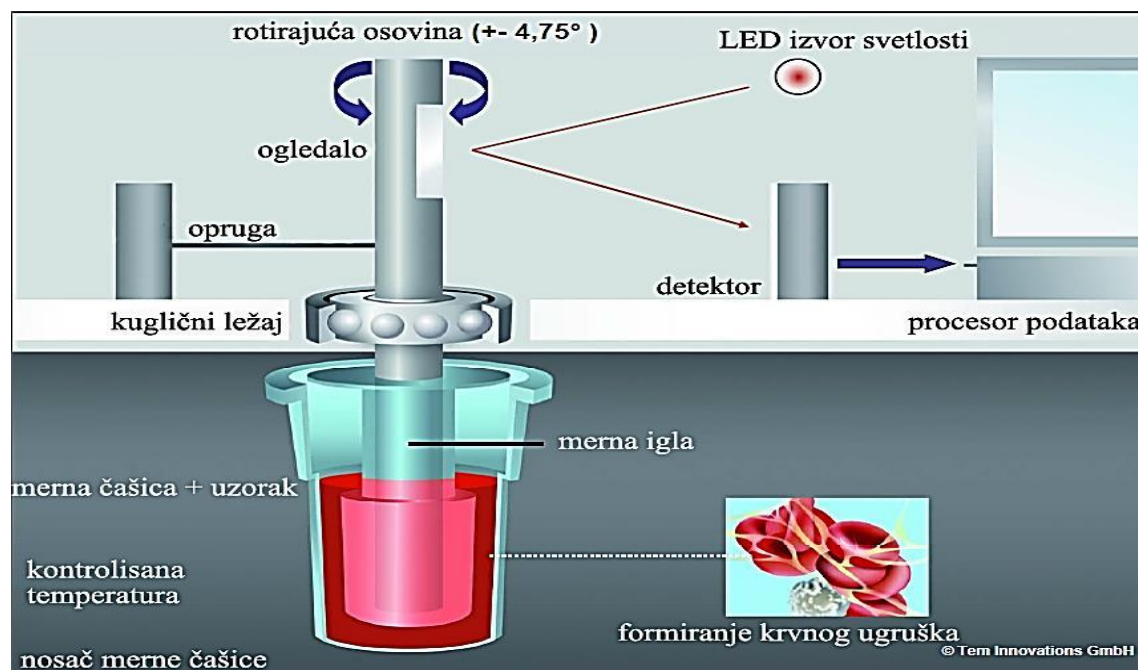
Tromboelastometrija (TEM[®] International GmbH, Munich, Germany) je metoda koja se zasniva na principima klasične tromboelastografije. Hartert je 1944. godine na Hiedelberg univerzitetu uspostavio metodu klasične tromboelastografije. Terminom tromboelastografija je označena skica ocrтана merenjem viskoelastičnih promena koje se dešavaju u toku polimerizacije fibrina²⁷¹. Klasična tromboelastografija se dugo koristila samo kao istraživačka metoda u specijalizovanim hematološkim laboratorijama zbog komplikovanog izvođenja, osetljivosti na pokrete i vibracije, kao i smetnji pri merenju i greškama u dobijenim rezultatima. Calatzis i Fritzsche²⁷² su 1996. godine implementirali metodu rotacione tromboelastografije (ROTEG) kao varijantu klasične tromboelastografije. Naziv metode je promenjen u rotaciona tromboelastometrija - ROTEM[®] 2003. godine²⁷³.



Slika 3. Prikaz TEM[®] analizatora.

Tromboelastometrija koristi optičko-mehanički operativni sistem sa manjom osetljivošću prema mehaničkom stresu, vibracijama i pomeranju u odnosu klasičnu tromboelastografiju. TEM[®] analizator je mali portabilan instrument (Slika 1), što omogućava izvođenje metode izvan specijalizovanih hematoloških laboratorija. Upotreba elektronske pipete i kompjuterizovane operativne procedure i analize podataka čini metodu jednostavnom za

upotrebu i pogodnom za izvođenje kako u hematološkim laboratorijama tako i u operacionim salama i ustanovama za urgentno zbrinjavanje obolelih i povređenih pacijenata²⁷⁴⁻⁹.



Shema 13. Prikaz principa tromboelastometrije (*reprodukovano uz saglasnost TEM[®] International GmbH, Munich, Germany*).

U TEM[®] kompjuterizovanom analizatoru (Shema 13) merna plastična igla dijametara 6mm, fiksirana na vrhu rotirajuće osovine, se uranja u uzorak krvi/aktivator koagulacije u cilindričnoj mernoj čašici dijametara 8mm smeštenoj u držaču (postavljaju se u merni kanal). Merne čašice za uzorke krvi su stacionarne. Rotacija se pokreće motorom koji je pomoću elastične opruge povezan sa osovinom. Precizan sistem kugličnih ležajeva (dva kuglična ležaja postavljena sa obe strane gornjeg kraja osovine) usmerava rotaciju osovine. Osovina permanentno oscilira naizmenično levo i desno pod uglom od $\pm 4.75^{\circ}$ (10 ciklusa/min). Tačna pozicija osovine odnosno merne igle se detektuje refleksijom svetlosti pomoću malog ogledala (dioda kao izvor svetlosti i optički sensor), koje je pričvršćeno za gornji kraj osovine. U odsustvu zgrušavanja krvi ne dolazi do stvaranja prepreke u rotaciji. Napredovanjem koagulacije (formiranja krvnog ugruška) u uzorku (pripajanje ugruška za mernu iglu i površinu merne čašice) gubi se elasticitet, što ograničava rotaciju osovine odnosno merne igle. Optički detektor beleži rotaciju osovine u vremenu. Podaci se automatski analiziraju kompjuterizovanim operativnim sistemom. Rotacija merne igle se konvertuje u amplitudu koja se na ekranu prikazuje kao merna kriva - tromboelastogram (TEM). Stabilizacija merne

igle pomoću sistema kugličnih ležajeva i optičko-mehanički metod detekcije obezbeđuju dobru zaštitu od uticaja vibracija i mehaničkog stresa, što omogućava korišćenje TEM[®] sistema kao mobilnog aparata^{272,273,277,280}.

TEM[®] meri viskoelastična svojstva krvi odnosno kinetiku formiranja krvnog ugruška, kao i čvrstoću i stabilnost ugruška. Kinetika formiranja krvnog ugruška determiniše kvantitativnu dovoljnost faktora neophodnih za formiranje ugruška. Snaga i stabilnost krvnog ugruška definišu sposobnost ugruška da obezbedi definitivnu hemostazu. TEM[®] ispituje hemostazu kao kompletan dinamičan proces, pružajući sliku svih faza procesa hemostaze (koagulacija i fibrinoliza). TEM[®] ukazuje na ravnotežu odnosno neravnotežu u sistemu hemostaze, ističući sva područja manjka ili viška hemostaznih činilaca^{277,281,282}.

TEM[®] testovi

Ispitivanje hemostaze vrši se u uzorku citratne cele krvi (300µL) na temperaturi 37⁰C prema uputstvu proizvođača²⁷³⁻⁹. TEM[®] operativni sistem ima 4 nezavisna kanala, što omogućava da se istovremeno izvode 4 testa (EXTEM, INTEM, FIBTEM, APTM ili HEPTM). U složenim poremećajima hemostaze, upotrebom različitih testova, odnosno aktivirajućih i inhibirajućih reagenasa, i određivanjem/upoređivanjem različitih kinetičkih parametara može se steći uvid u prirodu kompleksnog hemostatskog poremećaja^{273,279}. Za izvođenje TEM[®] testova koristi se set standardnih reagenasa (TEM[®] International GmbH, Munich, Germany). Sve faze procesa pipetiranja vrše se na standardizovan način na osnovu automatizovanog elektronskog programa^{273,277}.

Skrining TEM[®] testovi

Osnovni skrining testovi su EXTEM test (spoljni put koagulacije) i INTEM test (unutarnji put koagulacije). Skrining testovi daju opštu informaciju o statusu sistema hemostaze. Rekalifikacija uzorka cele krvi (300µL) vrši se pomoću 20µL 0.2mol/L CaCl₂ (STARTEM reagens). U rekalifikovani uzorak cele krvi dodaju se aktivatori koagulacije (20µL): tkivni faktor zečjeg mozga (EXTEM reagens) za spoljni put koagulacije odnosno fosfolipidi zečjeg mozga i elagijska kiselina (INTEM reagens) za unutarnji put koagulacije.

EXTEM test pokazuje senzitivnost za deficit faktora koagulacije (spoljni put), doprinos trombocita čvrstoći krvnog ugruška, nivo fibrinogena/polimerizaciju fibrina, deficit FXIII i hiperfibrinolizu.

INTEM test pokazuje senzitivnost za deficit faktora koagulacije (unutarnji put), antikoagulaciono delovanje (heparin, inhibitori trombina), doprinos trombocita čvrstoći krvnog ugruška, nivo fibrinogena/polimerizaciju fibrina, deficit FXIII i hiperfibrinolizu.

EXTEM i INTEM testovi pokazuju malu senzitivnost za blagi deficit faktora koagulacije, a nisu senzitivni za poremećaje u primarnoj hemostazi, poremećaj funkcije trombocita i delovanje inhibitora trombocita (npr. aspirin).

Dodatni TEM[®] testovi

Ispitivanje sistema hemostaze proširuje se izvođenjem dodatnih testova: FIBTEM, APTEM i HEPTEM.

U FIBTEM testu koagulacija se aktivira EXTEM reagensom. Dodavanje snažnog inhibitora trombocita (supstanca citohalazin D, FIBTEM reagens) omogućava kvantitativnu/kvalitativnu analizu statusa fibrinogena/polimerizacije fibrina, s obzirom da je čvrstoća krvnog ugruška u FIBTEM testu nezavisna od broja/funkcije trombocita. Poređenje maksimalne čvrstoće krvnog ugruška u EXTEM i FIBTEM testovima omogućava diferencijaciju između deficita fibrinogena/poremećaja polimerizacije fibrina i trombocitopenije/trombocitopatije (u FIBTEM testu temogram reprezentuje samo fibrinsku komponentu krvnog ugruška). Razlika u čvrstoći krvnog ugruška izmerena u EXTEM i FIBTEM testovima predstavlja indirektnu meru za doprinos trombocita čvrstoći krvnog ugruška^{273,277,283}.

U APTEM testu koagulacija se aktivira EXTEM reagensom. Dodavanjem antifibrinolitika aprotinina (APTEM reagens) blokira se hiperfibrinoliza. Poređenje parametara EXTEM i APTEM testova omogućava kvantitativnu procenu fibrinolizne aktivnosti. Značajna normalizacija parametara u APTEM testu (egzogeno delovanje antifibrinolitika) u poređenju sa EXTEM testom ukazuje na hiperfibrinolizu/doprinos hiperfibrinolize kompleksnom poremećaju hemostaze^{273,279}.

Svi TEM[®] testovi u kojima se koagulacija aktivira spoljnjim putem (EXTEM, FIBTEM, APTEM) su heparin nesenzitivni zahvaljujući prisustvu inhibitora heparina u EXTEM reagensu, koji inhibira visoke doze heparina (do 6U/mL krvi)^{273,277}.

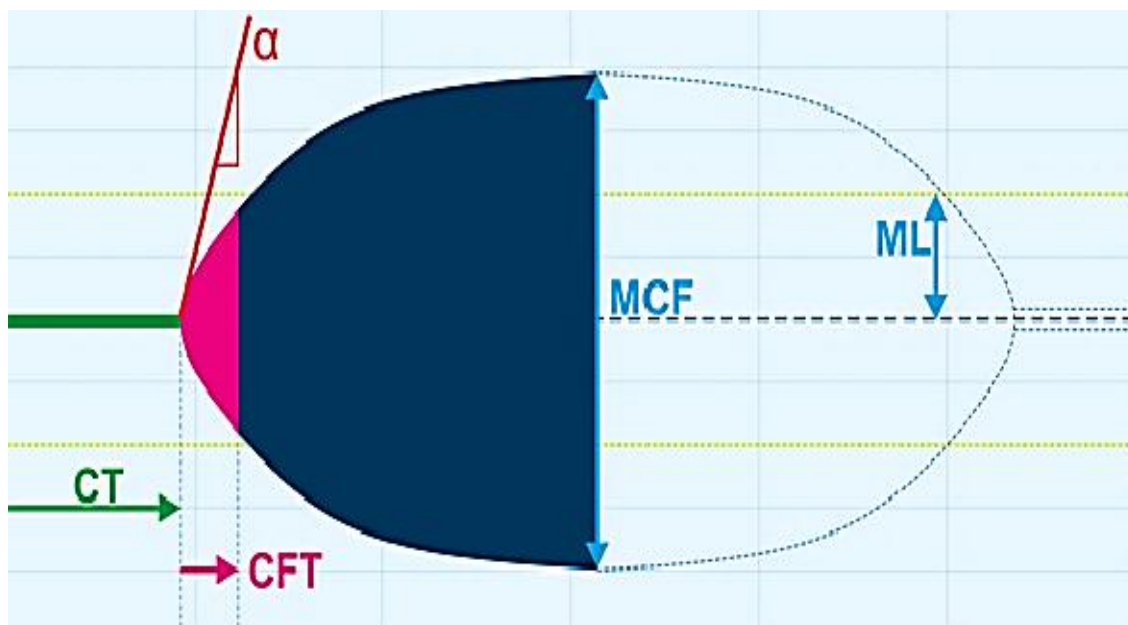
U HEPTEM testu koagulacija se aktivira INTEM reagensom. Dodavanjem heparinaze (HEPTEM reagens) neutrališe se efekat heparina. Poređenje parametara INTEM i HEPTEM testova omogućava potvrdu prisustva heparina u uzorku krvi. Značajna normalizacija vremena koagulacije u HEPTEM testu u poređenju sa INTEM testom omogućava potvrdu efekata heparina (endogenih ili egzogenih). Takođe, HEPTEM test je senzitivn za poremećaje u koagulacionom potencijalu^{273,277}.

Parametri TEM[®] testiranja

Rezultati TEM[®] testiranja prikazuju se grafički i numerički. Rotacija merne igle se konvertuje u amplitudu koja se prikazuje kao merna kriva-tromboelastogram (Shema 14). Numerički odnosno kinetički parametri (Tabela 5) se izvode matematičkom analizom tromboelastograma pomoću kompjuterizovane operativne procedure²⁷³.

Različiti kvantitativni parametri tromboelastograma reprezentuju različita fiziološka zbivanja u toku celokupnog procesa hemostaze, koja su izdejstvovana posredstvom interakcija trombocita, koagulacionih faktora i inhibitora, fibrinogena i sistema fibrinolize. Tromboelastogram opisuje dinamiku formiranja krvnog ugruška (vreme početnog formiranja ugruška, propagacija koagulacionog procesa), obim/čvrstoću/elasticitet krvnog ugruška tokom svih faza procesa koagulacije. Uz to, tromboelastogram opisuje kasniju fazu procesa fibrinolize i obezbeđuje informaciju o stabilnosti krvnog ugruška nakon ispoljavanja fibrinolizne aktivnosti. Obzirom da se testiranje vrši u uzorku cele krvi i neposredno nakon uzimanja istog, tromboelastometrijsko odslikavanje faza procesa hemostaze je blisko njihovom dinamičnom odigravanju u *in vivo* uslovima.

Čvrstoća krvnog ugruška prikazana je na y osi, a vreme reakcije prikazano je na x osi tromboelastograma^{269,284}.



Shema 14. Grafički prikaz osnovnih parametara normalnog tromboelastograma.

U rutinskoj kliničkoj praksi analiziraju se sledeći parametri tromboelastograma^{273,277,279,285}:

1. Vreme koagulacije (eng. Clotting Time: CT)

CT odlikava vreme od aktivacije koagulacije do početnog stvaranja krvnog ugruška odnosno do postizanja čvrstoće krvnog ugruška veličine 2mm. CT reprezentuje količinu inicijalno stvorenog trombina. U funkcionalnom smislu CT se odnosi na aktivnost faktora koagulacije i njihovih inhibitora. Produžen CT je posledica deficita faktora koagulacije, teške hipofibrinogenemije, hiperfibrinolize i prisustva heparina. Skraćen CT je posledica hiperkoagulabilnosti.

2. Vreme formiranja krvnog ugruška (eng. Clot Formation Time: CFT)

CFT odlikava vreme koje je potrebno za postizanje čvrstoće krvnog ugruška veličine 20mm (povećanje amplitude od 2mm na 20mm). CFT dinamično odražava napredovanje koagulacionog procesa. CFT reprezentuje inicijalnu polimerizaciju fibrina. U funkcionalnom smislu CFT reprezentuje interakciju između fibrinogena i trombocita i koncentraciju/aktivnost koagulacionih faktora/inhibitora.

3. Ugao alfa (α ugao)

α ugao predstavlja ugao između horizontalne srednje linije i tangente koja dodiruje koagulacijsku krivu u tački u kojoj je postignuta čvrstoća krvnog ugruška veličine 2mm. α ugao reflektuje veličinu i polimerizaciju krvnog ugruška u jedinici vremena, a reprezentuje (kao i CFT) kvantitativni/kvalitativni status i interakciju između fibrinogena i trombocita.

4. Maksimalna čvrstoća krvnog ugruška (eng. Maximum Clot Firmness: MCF)

MCF predstavlja maksimalnu amplitudu koja se postiže tokom testiranja nezavisno od proteklog vremena odnosno konačan rezultat koagulacionog procesa. MCF je posledica čvrste agregacije trombocita i formiranja stabilne fibrinske mreže. MCF odlikava apsolutnu čvrstoću (postignuta u toku faza amplifikacije i propagacije koagulacionog procesa) i stabilnost fibrinskog ugruška. U EXTEM i INTEM testovima, MCF je direktno u funkciji nivoa fibrinogena/polimerizacije fibrina i broja/funkcije trombocita. Takođe, MCF odražava aktivnost faktora koagulacije (uključujući FXIII) i proces fibrinolize. Maksimalna čvrstoća krvnog ugruška se postiže za 20-30 minuta. Nakon postizanja maksimalne čvrstoće krvnog ugruška naknadno smanjenje amplitude ukazuje na aktivnost procesa fibrinolize. U FIBTEM testu MCF reprezentuje koncentraciju i funkcionalnu aktivnost fibrinogena.

5. Maksimalna liza (eng. Maximum Lysis: ML)

ML predstavlja maksimalnu fibrinoliznu aktivnost koja se ispoljava u toku analize (30-60 minuta nakon CT). ML označava odnos između najniže amplitude nakon postizanja MCF i

MCF (procenat preostale čvrstoće krvnog ugruška). U EXTEM i INTEM testovima, ML predstavlja procenat lize krvnog ugruška u odnosu na MCF na kraju merenja. Za utvrđivanje kasne hiperfibrinolize trajanje testiranja iznosi do 60 minuta.

Referentne vrednosti za TEM[®] testove

Referentne vrednosti za TEM[®] testove prethodno su utvrđene multicentričnim istraživanjem²⁸² i validirane su ispitivanjem 50 uzoraka ispitanika odabranih u lokalnoj referentnoj populaciji (Tabela 5). Izvođenje TEM[®] analiza vršeno je na Klinici za digestivnu hirurgiju, Klinički centar Srbije. TEM[®] analizator je kontrolisan upotrebom kontrolnog seruma (ROTROL[®], TEM[®] International GmbH, Munich, Germany).

Tabela 5. Prikaz TEM[®] referentnih vrednosti.

TEM [®] parametri	CT (s)	CFT (s)	α (°)	A10 (mm)	MCF (mm)	ML (%)
EXTEM	38-79	34-159	63-83	43-65	50-72	0-15
INTEM	100-240	30-110	70-83	44-66	50-72	0-15
FIBTEM ^a	-			7-23	9-25	
APTEM ^b	38-79	34-159	63-83	43-65	50-72	
HEPTEM ^c	100-240	30-110	70-83		50-72	0-15

^aMCF_{FIBTEM} <8-9mm = deficit fibrinogena ili poremećaj polimerizacije fibrina.

MCF_{FIBTEM} >24mm = povećana koncentracija fibrinogena.

Normalan MCF_{FIBTEM} u prisustvu sniženog MCF_{EXTEM} ukazuje na trombocitopeniju i/ili trombocitopatiju.

^bSkraćenje CT ili povećanje CFT/MCF u APTEM testu u poređenju sa EXTEM testom ukazuje na hiperfibrinolizu.

^cSkraćenje CT u HEPTEM testu u poređenju sa INTEM testom ukazuje na prisustvo/efekat heparina. Ukoliko je bolesnik tretiran heparinom, a razlika između vrednosti parametra CT u INTEM i HEPTEM testovima je veoma mala ili ne postoji, moguće je postojanje deficita antitrombina, što predstavlja jedan od najčešćih uzroka rezistencije na heparin²⁷⁷.

3.2.2.3.2. Test za ispitivanje stvaranja trombina

Trombin je finalni produkt i ključni enzim u koagulacionom sistemu. Testom ispitivanja stvaranja trombina meri se celokupan potencijal plazme za stvaranje trombina. Test ispitivanja stvaranja trombina predstavlja aktivan test koji reprezentuje individualni koagulacioni kapacitet za stvaranje trombina^{286,287}.

Hemker-ova grupa²⁸⁸⁻⁹³ na Maastricht univerzitetu (University of Maastricht - Dutch university-Netherlands) uspostavila je kalibrisanu automatizovanu metodu za merenje stvaranja trombina u plazmi. Hemker-ova grupa imala je za cilj da razvije jednostavnu metodu za kvantifikaciju kontinuiranog i dinamičnog procesa stvaranja trombina u prisustvu fibrinogena/fibrina nakon stimulacije koagulacionog procesa tkivnim faktorom.

U testu ispitivanja stvaranja trombina, proces formiranja trombina pokreće se dodavanjem aktivatora koagulacije rekalcifikovanoj plazmi u prisustvu fosfolipida, što uzrokuje razlaganje hromogenog ili fluorogenog supstrata stvorenim trombinom. Hromogena metoda se izvodi u defibrinisanoj plazmi, dok se fluorogena metoda može izvoditi u plazmi bogatoj trombocitima i plazmi siromašnoj trombocitima^{291,294}. Opisana je i fluorogena metoda za ispitivanje stvaranja trombina u celoj krvi²⁹⁵.

Endogeni potencijal za stvaranje trombina trombina

ETP (eng. ETP-endogenous thrombin potential) predstavlja globalan funkcionalni test za određivanje endogenog potencijala za stvaranje trombina u citratnoj plazmi siromašnoj trombocitima. ETP odražava ukupnu količinu stvorenog trombina u funkciji vremena^{286,288-93}.

ETP je određivan spektrofotometrijski u uzorcima citratne plazme siromašne trombocitima korišćenjem komercijalnog Innovance[®] ETP testa (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Marburg, Germany). Innovance[®] ETP test izvođen je na automatizovanom BCS[®]XP koagulometru sa ugrađenim softverskim sistemom (BCS[®] XP System/ BCS[®] System). Ovaj sistem koristi matematički algoritam za automatsku korekciju vrednosti ETP u odnosu na aktivnost α_2 -makroglobulina vezanog za trombin (korigovane vrednosti se obeležavaju sa ETP cal; eng.cal - calculated).

Sastav reagenasa

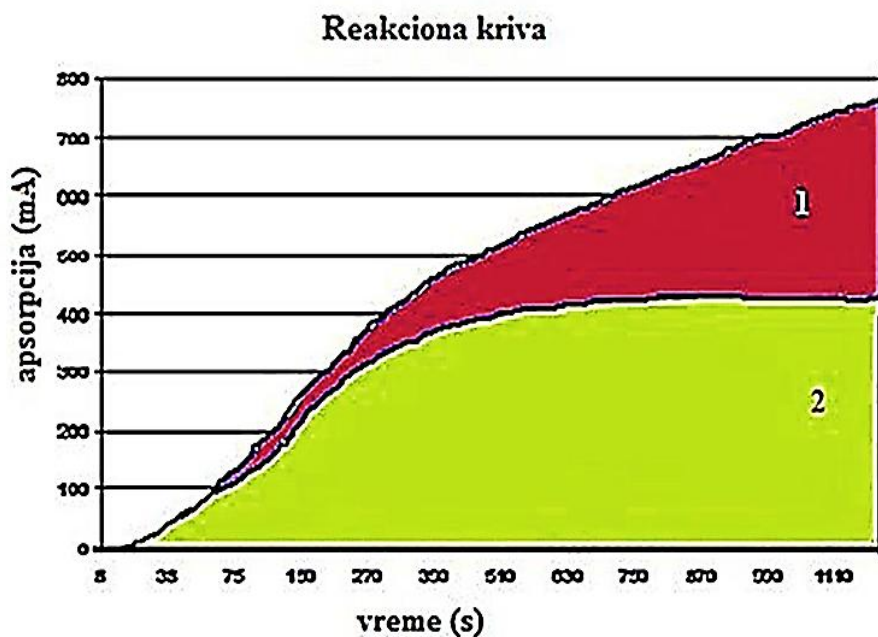
1. Sastav Innovance[®] ETP reagenasa: hromogeni supstrat (oko 6.5mmol/L), inhibitor polimerizacije fibrina, soli i stabilizatori u vodenom rastvoru;
2. Rastvor Innovance[®] ETP: 250mmol/L vodeni rastvor CaCl₂;
3. Innovance[®] ETP pufer: Tris-HCL u vodenom rastvoru.

Dodatna priprema Innovance[®] ETP komponenata nije potrebna.

Princip metode

U odsustvu trombomodulina, inkubacija rekalcifikovane plazme sa humanim rekombinantnim tkivnim faktorom, fosfolipidima (Dade® Innovin® reagens) i kalcijum hloridom dovodi do aktivacije koagulacije i formiranja trombina. Stvaranje trombina i njegova sledstvena inaktivacija registruju se kinetičkim praćenjem konverzije sintetičkog supstrata (specifični sporo-reagujući hromogeni supstrat H- β -Ala-Gly-Arg-pNA) delovanjem formiranog trombina na talasnoj dužini 405nm u funkciji vremena (Dijagram 1, kriva 1). Inhibitor polimerizacije fibrina sprečava interferenciju fibrina sa optičkom detekcijom hromofora.

Matematički algoritam je primenjen za korekciju reakcione krive konverzije supstrata za aktivnost trombina vezanog za α_2 -makroglobulin koji nema poznatu biološku aktivnost, ali je sposoban da razgradi malu količinu hromogenog supstrata. Aktivnost trombina vezanog za α_2 -makroglobulin se oduzima od krive konverzije supstrata (Dijagram 1, kriva 2).



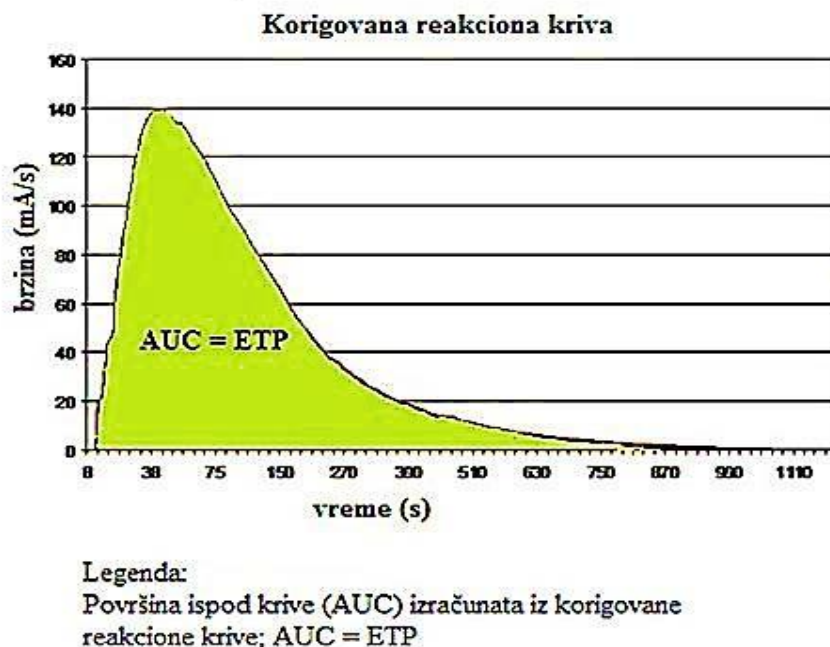
Legenda:

1. Aktivnost trombina (trombin + trombin u kompleksu sa α_2 makroglobulinom)
2. Korekcija reakcione krive za aktivnost trombina vezanog za α_2 makroglobulin

Dijagram 1. Prikaz krive konverzije supstrata (kriva 1) i krive konverzije supstrata korigovane za aktivnost trombina vezanog za α_2 -makroglobulin (kriva 2).

Korigovana reakciona kriva

Korigovana reakciona kriva korespondira sa aktivnošću slobodnog trombina. Formiranje prve derivacije korigovane krive konverzije supstrata korespondira sa krivom stvaranja trombina (Dijagram 2). Polje ispod krive (area under the curve-AUC) se označava kao endogeni potencijal za stvaranje trombina (ETP). Alternativno, ETP se može izvesti iz korigovane krive konverzije supstrata (napredovanje signala korespondira sa AUC).



Dijagram 2. Prikaz krive stvaranja trombina (prva derivacija korigovane krive konverzije supstrata).

Parametri merenja ETP

Korišćenjem BCS[®] XP koagulometra, merenje ETP parametara vrši se automatski. Klasična normalna kriva stvaranja trombina naziva se trombogram. Trombogram ima izgled talasa koji daje informaciju o nekoliko specifičnih parametara (Dijagram 3)²⁹⁵:

1. Vreme lag (eng. lag time: t-lag)

t-lag označava vreme od početka reakcije koagulacije do početka stvaranja trombina. t-lag je ekvivalent vremenu koagulacije. t-lag reprezentuje fazu inicijacije koagulacionog procesa.

2. Vreme do maksimalnog stvaranja trombina (eng. time to peak thrombin: t-max)

t-max označava vreme proteklo od inicijalnog stvaranja trombina do postizanja maksimalnog stvaranja trombina.

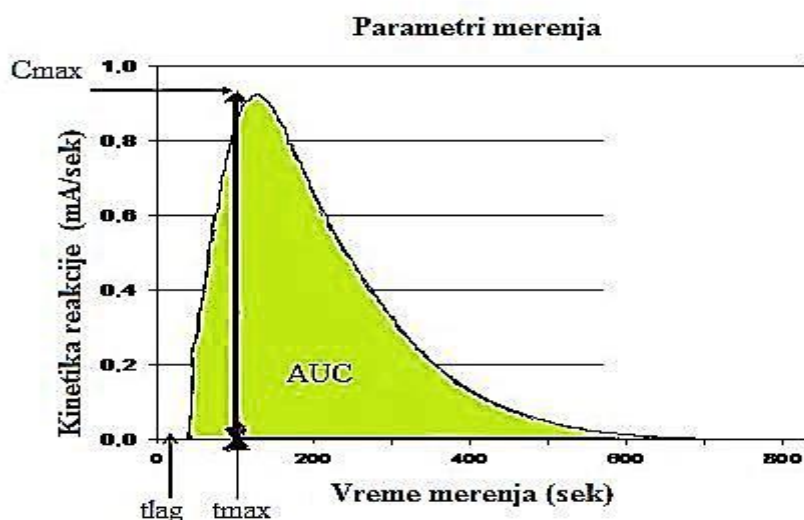
3. Maksimalno stvaranje trombina (eng. peak height ili Cmax)

Cmax reprezentuje maksimalan kapacitet za stvaranje trombina. Cmax odražava maksimalnu aktivnost protrombinaze u fazi propagacije koagulacionog procesa.

4. Ukupno stvoren i aktivan trombin (eng. area under the thrombin formation curve: AUC)

AUC reprezentuje ukupnu količinu supstrata koji se konvertuje delovanjem trombina, odnosno AUC odražava ukupnu količinu formiranog aktivnog trombina.

Poremećaje krive stvaranja trombina odlikuju²⁸⁴: 1. produženo ili skraćeno t-lag; 2. sniženo ili povišeno Cmax; 3. snižena ili povišena AUC.



Legenda:

t-lag: faza inicijacije koagulacije

t-max: vreme do postizanja maksimalne koncentracije trombina

Cmax: maksimalna koncentracija trombina

AUC: mera ukupno stvorenog trombina

Dijagram 3. Prikaz glavnih parametara normalne krive stvaranja trombina.

Referentne vrednosti ETP parametara uspostavljene su u Centru za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije. Testiran je 41 uzorak plazme dobrovoljnih davalaca krvi nakon dobijanja informisanog pristanka davalaca krvi i saglasnosti Etičkog komiteta Zavoda za transfuziju krvi Srbije, Beograd (Tabela 6). ETP test je izvođen u Centru za medicinsku biohemiju, Odeljenje Klinike za kardiohirurgiju, Klinički centar Srbije.

Tabela 6. Prikaz referentnih vrednosti ETP parametara.

REFERENTNE VREDNOSTI			
t-lag (s)		t-max (s)	
donji limit	gornji limit	donji limit	gornji limit
17	26	46	93

REFERENTNE VREDNOSTI (% normalne vrednosti)			
AUC-ETP		Cmax	
donji limit	gornji limit	donji limit	gornji limit
82	125	102	144

STATISTIČKA ANALIZA

Za analizu podataka korišćene se deskriptivne statističke metode, metode za testiranje hipoteza i metode za ocenu povezanosti. Od deskriptivnih metoda upotrebljeni su: grupisanje, tabeliranje, grafičko prikazivanje podataka, mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi iskazani u procentima. Od statističkih metoda za ispitivanje normalnosti raspodele numeričkih varijabli korišćeni su Shapiro–Wilk i Kolmogorov–Smirnov testovi. Vrednosti skewness i kurtosis su razmotrene pre donošenja odluke o primeni parametarskih ili neparametarskih testova za ispitivanje razlike među grupama. Stoga, za ispitivanje razlike između dve grupe korišćeni su Studentov T-test (parametarski) ili Mann-Whitney U test (neparametarski). ANOVA je korišćena za ispitivanje razlike između više grupa ukoliko je značajnost Levene's testa homogenosti varijanse $p > 0.050$, a u suprotnom primenjeni su Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testovi. Od metoda za ocenu značajnosti povezanosti upotrebljeni su koeficijenti korelacije (Pearson-ova parametarska korelacija ili Spearman-ova neparametarska korelacija).

Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0.05. Statistička analiza podataka urađena je uz pomoć statističkog paketa SPSS (ver.20).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

Ispitivanjem je obuhvaćeno 60 bolesnika sa alkoholnom cirozom, 24 bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre [primarna bilijarna ciroza (n=16; 15 osoba ženskog pola i jedan muškarac) i primarni sklerozirajući holangitis (n=8; 4 osobe muškog i ženskog pola)] i 50 zdravih ispitanika. Prosečna starost ispitivanih grupa i distribucija prema polu prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Demografske karakteristike ispitivanih grupa.

		ALKOHOLNA CIROZA [n=60]	HOLESTAZNA CIROZA [n=24]	ZDRAVA POPULACIJA [n=50]
<i>Starost</i>		54±11 (29-79)	54±14 (22-83)	36±8 (20-58)
<i>Pol</i>	<i>muški</i>	57 (95%)	5 (20%)	17 (34%)
	<i>ženski</i>	3 (5%)	19 (80%)	33 (66%)

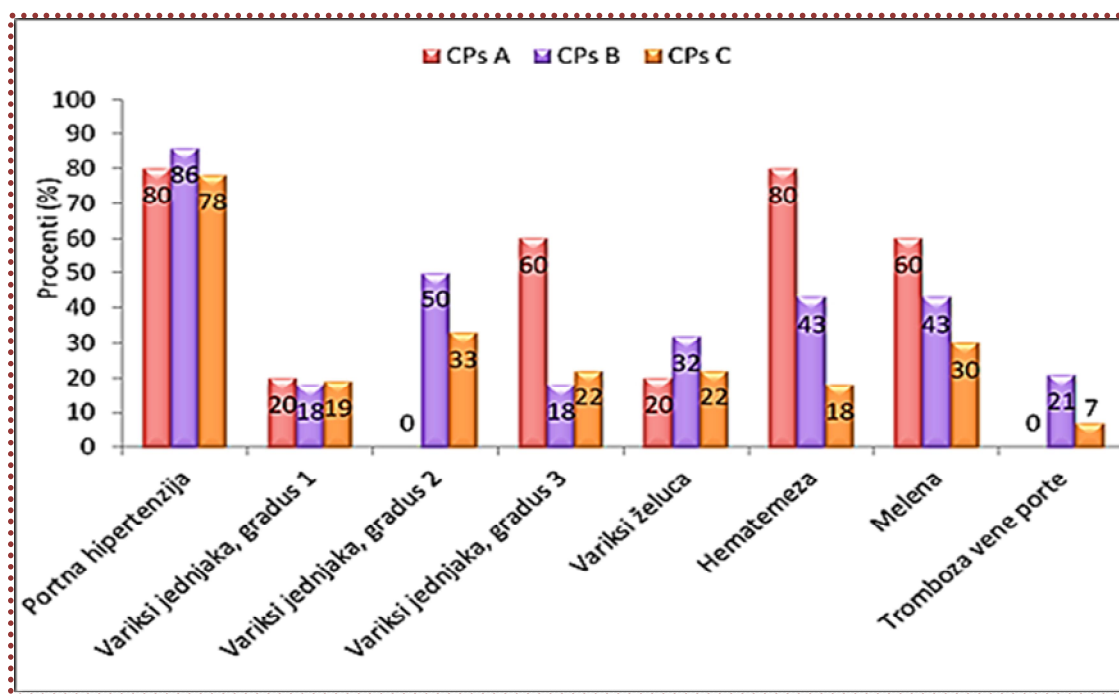
U Tabeli 8 prikazani su učestalost i prosečne vrednosti varijabli Child-Pugh skora u odnosu na stadijume kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. U odnosu na stepen oštećenja jetrine funkcije, bolesnici su klasifikovani u stadijum A (n=5; blago oštećenje), stadijum B (n=28; umereno oštećenje) i stadijum C (n=27; ozbiljno oštećenje, dekompenzovana bolest).

Tabela 8. Distribucija bolesnika sa alkoholnom cirozom prema stadijumima Child-Pugh skora, učestalost i prosečne vrednosti varijabli u odnosu na stadijume Child-Pugh skora.

		CHILD-PUGH SKOR		
<i>VARIJABLE</i>		<i>A [n=5]</i>	<i>B [n=28]</i>	<i>C [n=27]</i>
<i>Ascites</i>	<i>prisutan</i>	1/5 (20%)	14/28 (50%)	24/27 (89%)
<i>Encefalopatija</i>	<i>prisutna</i>	0/5	12/28 (43%)	23/27 (85%)
<i>Ukupni bilirubin</i>	<i>Prosek ± SD</i>	19.6±6.2	56.9±61.6	69.4±34.9
	<i>Medijana (opseg)</i>	19.3 (12.4-26.6)	40.2 (8.6-308)	64.7 (4.4-142.4)
<i>Albumin</i>	<i>Prosek ± SD</i>	37±3.7	28.5±3.6	22.6±4.9
	<i>Medijana (opseg)</i>	36 (32-42)	29 (21-36)	23 (11-32)
<i>INR</i>	<i>Prosek ± SD</i>	1.10±0.14	1.39±0.20	1.76±0.48
	<i>Medijana (opseg)</i>	1.10 (0.93-1.32)	1.42 (0.98-1.78)	1.80 (1.13-2.98)

Ascites i encefalopatija bili su najzastupljeniji u kategoriji bolesnika sa najtežim oštećenjem jetrine funkcije. Prosečne vrednosti ukupnog bilirubina i INR značajno su se povećavale sa progresijom alkoholne ciroze. S druge strane, zabeleženo je značajno opadanje vrednosti albumina sa porastom težine oštećenja jetre.

Na Grafikonu 1 prikazana je učestalost portne hipertenzije, variksa jednjaka i želuca, hemoragijskih komplikacija i tromboze vene porte u odnosu na stadijume Child-Pugh skora kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.



Grafikon 1. Učestalost komplikacija alkoholne ciroze prema stadijumima Child-Pugh skora.

Portna hipertenzija je dijagnostikovana kod 49/60 bolesnika sa alkoholnom cirozom. Primećeno je da je učestalost melene i hematemeze bila najveća u CPsA stadijumu. Istovremeno ispoljavanje hematemeze i melene je zabeleženo kod 16/60 bolesnika sa ABJ, pri čemu su 3 bolesnika svrstana u stadijum CPsA, 10 bolesnika u stadijum CPsB i 3 bolesnika u stadijum CPsC. Istovremeno ispoljavanje tromboze vene porte i hemoragijskih komplikacija (hematemeza i melena) uočeno je kod 3 bolesnika, koja su svrstana u stadijum CPsB.

Tromboza vene porte je dijagnostikovana kod 8/60 bolesnika. Samo 14.6% bolesnika sa portnom hipertenzijom je razvilo trombozu vene porte. Međutim, tromboza vene porte je dijagnostikovana i kod 10.5% bolesnika u odsustvu portne hipertenzije. Utvrđeno je da se učestalost javljanja tromboze vene porte ne razlikuje značajno između bolesnika sa i bez

portne hipertenzije (Fišerov test, $p=0.505$). Takođe, nije bilo značajne razlike u prosečnim vrednostima AT, PC, FXII, FVIII i vWF između bolesnika sa i bez tromboze vene porte (Tabela 9).

Tabela 9. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti AT, PC, FXII, FVIII i vWF u odnosu na prisustvo tromboze vene porte.

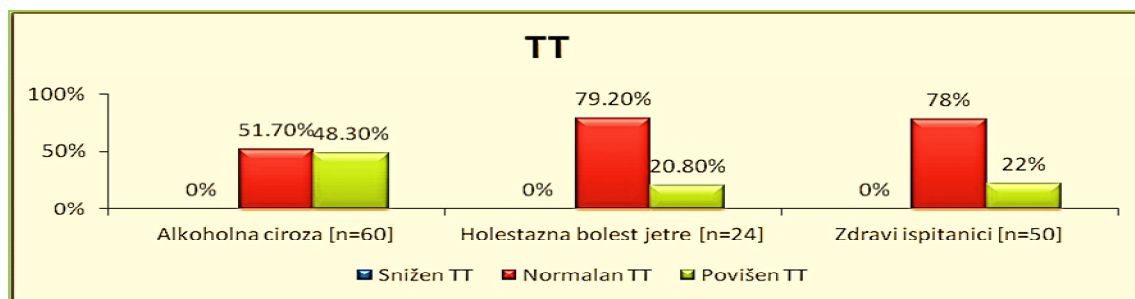
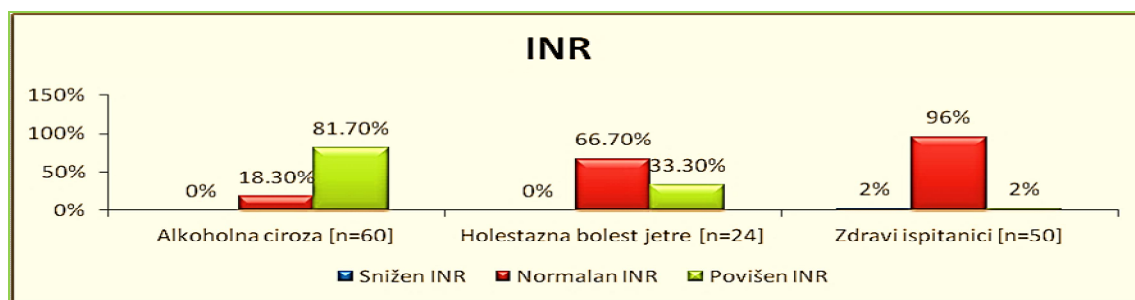
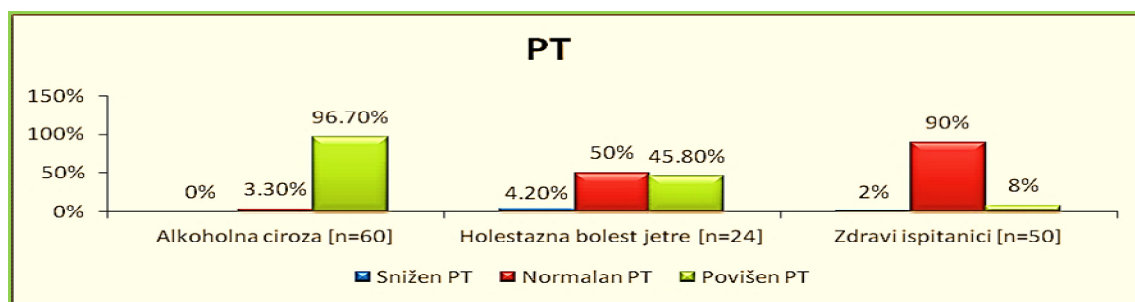
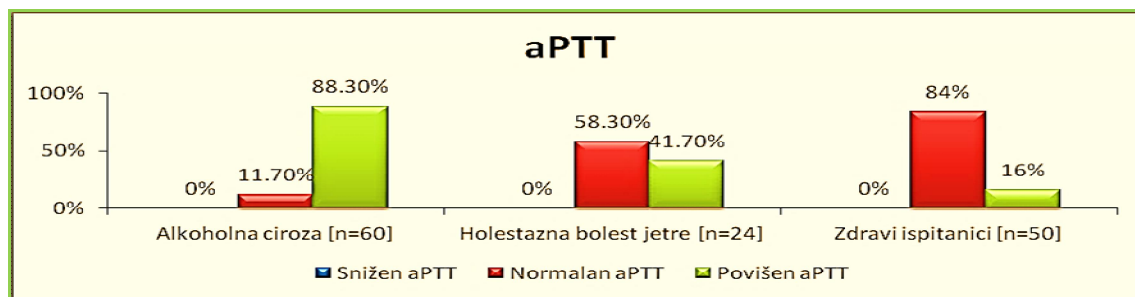
TROMBOZA VENE PORTE			
	<i>prisutna</i>	<i>odsutna</i>	<i>p</i>
<i>AT</i>	56.0±19.9	52.3±25.3	0.695
	57.5 (23.0-80.0)	43.5 (14.0-125.0)	
<i>PC</i>	53.0±19.7	47.1±27.2	0.563
	51.0 (29.0-87.0)	37.5 (13.0-150.0)	
<i>FXII</i>	82.5±53.4	71.5±27.2	0.833
	65.5 (52-213)	68.5 (33-146)	
<i>FVIII</i>	192.8±144.2	184.8±79.7	0.779
	194.5 (24-478)	151 (76-453)	
<i>vWF</i>	385.4±107.5	365.1±148.3	0.722
	371.7 (261-599)	344.5 (123-599)	

4.2. ISPITIVANJE HEMOSTATSKOG PROFILA STANDARDNIM I GLOBALNIM TESTOVIMA HEMOSTAZE

4.2.1. Standardni testovi hemostaze

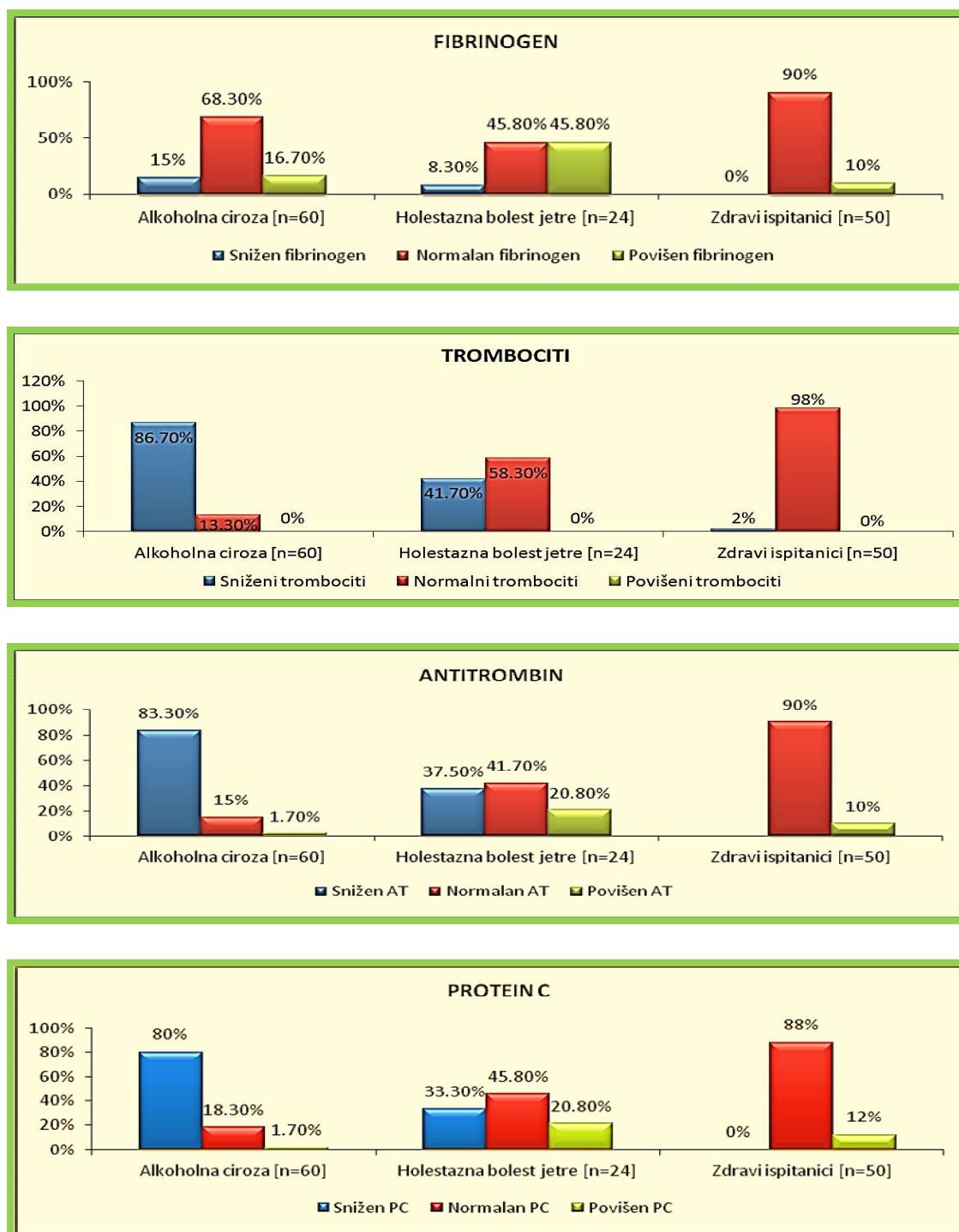
Posmatrano u odnosu na referentne vrednosti ispitivanih standardnih skrining testova hemostaze, utvrđeno je da su se povišene vrednosti aPTT znatno češće javljale kod bolesnika sa alkoholnom (53/60; 88.3%) i holestaznom cirozom (10/24; 41.7%) u poređenju sa zdravim ispitanicima ($p<0.001$; $p=0.002$; respektivno). Iako su povišene vrednosti aPTT zabeležene kod većeg procenta bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike sa holestaznom cirozom, razlika nije bila statistički značajna ($p=0.064$). Produžen PT izmeren je kod 58/60 (96.7%) bolesnika sa alkoholnom cirozom i kod oko polovine bolesnika sa holestaznom cirozom. Poređenjem vrednosti PT između grupa bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom, kao i njihovim poređenjem u odnosu na zdrave ispitanike utvrđena je statistički značajna razlika ($p<0.001$; za sve poređene grupe). Među poređenim grupama ispitanika, sličan trend zabeležen je za vrednosti INR ($p<0.001$). Najveća učestalost produženog TT je, takođe, zabeležena kod bolesnika sa alkoholnom cirozom (29/60; 48.3%), ali je visok

procenat patoloških vrednosti zabeležen i kod bolesnika sa holestaznom cirozom (5/24; 20.8%) i zdravih ispitanika (11/50; 22%). U skladu sa tim, statistički značajna razlika dobijena je poređenjem grupe bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike sa holestaznom cirozom ($p=0.021$) i zdrave ispitanike (0.004). Distribucija učestalosti patoloških vrednosti navedenih parametara prikazana je na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti skrining testova hemostaze kod tri grupe ispitanika.

Distribucije vrednosti fibrinogena, trombocita i prirodnih antikoagulacionih proteina (antitrombin, protein C) prikazane su na Grafikonu 3.



Grafikon 3. Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti fibrinogena, trombocita i prirodnih antikoagulacionih proteina kod ispitivanih grupa.

Fibrinogen

Normalna koncentracija fibrinogena izmerena je kod većine zdravih ispitanika [45/50 (90%)], 41/60 (68.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom i 11/24 (45.8%) bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. Snižena vrednost fibrinogena izmerena je kod 9 (15%) bolesnika sa alkoholnom cirozom i 2 (8.3%) bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. Povišena vrednost fibrinogena izmerena je kod 10/60 (16.7%) bolesnika sa alkoholnom cirozom, 11/24 (45.8%) bolesnika sa holestaznom cirozom, ali i kod 5/50 (10%) zdravih ispitanika. Utvrđeno je da su se povišene vrednosti fibrinogena znatno češće javljale kod bolesnika sa holestaznom cirozom kako u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom ($p=0.012$) tako i u odnosu na zdravu populaciju ($p=0.009$). S druge strane, nije uočena značajnost razlike u prosečnim vrednostima fibrinogena između grupe bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika ($p=0.393$). Prisustvo hiperfibrinogenemije kod visokog procenta bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre može ukazivati na doprinos fibrinogena pojavi hiperkoagulabilnosti u ovoj etiologiji ciroze, odnosno na postojanje različitog hemostatskog potencijala u cirozama različite etiologije.

Trombociti

Najveći procenat bolesnika sa alkoholnom cirozom imao je snižene vrednosti broja trombocita [52/60 (86.7%)]. S druge strane, manje od polovine bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre imalo je trombocitopeniju [10/24 (41.7%)]. Utvrđena je visoka statistička značajnost razlike u prosečnim vrednostima broja trombocita ($p<0.001$) između grupa bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom. Samo kod jednog zdravog ispitanika (2%) izmeren je snižen broj trombocita. Kod zdravih ispitanika, prosečan broj trombocita visoko značajno ($p<0.001$) se razlikovao u odnosu na obe etiologije ciroze.

Antikoagulacioni proteini: antitrombin i protein C

U pogledu učestalosti patoloških vrednosti prirodnih antikoagulacionih proteina (AT i PC), nije bilo značajne razlike između obolelih od holestazne ciroze i zdravih ispitanika. Važno je primetiti da je visok procenat obolelih od holestazne ciroze [5/24 (20.8%)] imao povišene vrednosti (suprafiziološke) oba antikoagulaciona proteina. Snižena aktivnost AT izmerena je kod visokog procenta bolesnika sa alkoholnom cirozom [50/60 (83.3%)], ali i kod 9 (37.5%) bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. Snižena aktivnost PC izmerena je kod 48 (80%) bolesnika sa alkoholnom cirozom i 8 (33.3%) bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. Bolesnici sa alkoholnom cirozom imali su značajno niže prosečne vrednosti AT i PC kako u odnosu na bolesnike sa holestaznom cirozom tako i u odnosu na zdrave ispitanike ($p<0.001$).

Poređenjem prosečnih vrednosti skrining testova hemostaze između ispitivanih grupa, utvrđeno je da su iste bile značajno više kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike sa holestaznim oboljenjem jetre i zdrave ispitanike. Vrednosti broja trombocita i antikoagulacionih proteina bile su značajno niže kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Razlika između prosečnih vrednosti skrining testova nije uočena poređenjem bolesnika sa holestaznom cirozom u odnosu na zdrave ispitanike, ali su vrednosti trombocita i PC ipak bile značajno niže, a prosečne vrednosti fibrinogena bile su značajno više u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 10).

Tabela 10. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti skrining testova hemostaze, fibrinogena, trombocita i prirodnih antikoagulacionih proteina kod bolesnika sa alkoholnom/holestaznom cirozom i zdravih ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
aPTT	35.2±7.9 33.1 (23-61.8)	29.9±3.8 28.6 (24-38)	27.4±2.6 26.5 (22.1-36.3)	0.001*	<0.001*	0.198
PT	17.9±4.6 17.2 (11.2-34.9)	13.4±2.4 12.5 (10.1-19)	11.9±0.9 11.8 (10.3-14.3)	<0.001*	<0.001*	0.170
INR	1.5±0.4 1.5 (0.9-2.9)	1.1±0.2 1.0 (0.9-1.6)	0.9±0.1 1.0 (0.8-1.3)	<0.001*	<0.001*	0.174
TT	22.7±6.4 20.7 (15.4-46.9)	19.4±2.4 19.4 (16.4-27.9)	19.2±2.4 18.6 (15.9-25.9)	0.010*	<0.001*	0.987
Trombo- citi	103.2±61.2 79 (31-315)	188.5±74.1 204.5 (84-346)	241.2±54.6 232 (129-376)	<0.001*	<0.001*	0.002*
Fibrino- gen	3.1±1.3 3 (1.1-7)	3.9±1.6 3.8 (1.5-7.4)	3.2±0.6 3.1 (2-4.8)	0.021*	0.998	0.029*
AT	52.7±24.7 45 (14-125)	88.3±26.7 91.5 (44-125)	99.5±8.8 99.5 (83-125)	<0.001*	<0.001*	0.079
PC	47.6±26.4 42 (13-150)	89.6±40.4 89 (34-150)	111.6±18.5 110.5 (83-150)	<0.001*	<0.001*	0.004*

p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.

Primećene su i razlike u prosečnim vrednostima standardnih testova hemostaze u odnosu na težinu ciroze alkoholne etiologije (Tabela 11).

Tabela 11. Distribucija prosečnih vrednosti standardnih testova hemostaze, faktora koagulacije i prirodnih antikoagulacionih proteina kod zdravih ispitanika i bolesnika.

	ZDRAVI ISPITANICI	HOLESTAZNA CIROZA	ALKOHOLNA CIROZA PREMA CHILD-PUGH SKORU		
	[n=50]	[n=50]	A [n=5]	B [n=28]	C [n=27]
aPTT	34.1±3.8 (28.0-39.5)	29.9±3.8 (24-38)	35.4±6.6 (27.4-43.5)	44.0±6.8 (28.6-57.2)	55.5±14.3 (32.6-86.6)
PT	11.9±0.9 (10.8-11.3)	13.4±2.4 (10.1-19)	13.3±0.9 (12.2-14.5)	16.4±2.0 (11.2-21.0)	20.6±5.6 (13.3-34.9)
Trombociti	229.9±31.8 (184-288)	188.5±74.1 (84-346)	76.2±32.8 (34-114)	114.9±73.7 (39-315)	100±48.2 (31-254)
Fibrinogen	3.0±0.6 (2.0-3.7)	3.9±1.6 (1.5-7.4)	4.0±0.8 (3.3-5.0)	3.4±1.3 (1.7-7.0)	2.8±1.4 (1.1-6.6)
FII	128.1±14.0 (101-154)	94±33.5 (46-146)	99.5±19.0 (79-125)	69.1±23.4 (33-123)	50.1±22.8 (17-112)
FV	102.8±12.8 (82-125)	103.5±42.1 (36-169)	98.2±30.2 (65-136)	65.8±25.5 (30-129)	49.2±29.3 (14-134)
VII	109.1±11.4 (90-129)	85.1±34.6 (27-139)	91.0±30.8 (66-135)	53.7±26.0 (20-111)	48.6±35.8 (7-181)
FVIII	97.7±26.3 (47-152)	185±65.6 (103-331)	244.2±147.0 (119-453)	159.6±60.7 (38-278)	205.7±100.5 (24-478)
FIX	100.9±13.5 (80-120)	94.2±25.6 (42-140)	119.5±29.2 (79-146)	75.5±23.9 (43-150)	66.1±9.3 (29-153)
FX	101.8±12.6 (82-121)	94.4±29.1 (46-143)	103.0±23.3 (80-132)	73.2±20.6 (43-136)	63.8±29.8 (25-137)
FXI	98.4±11.4 97 (71-112)	97.2±36.4 (42-166)	107.0±23.1 (74-128)	72.3±25.8 (37-142)	55.6±39.4 (18-207)
FXII	105.1±12.9 (85-129)	100.3±38.3 (47-213)	116.2±32.6 (79-146)	76.8±20.0 (37-123)	61.6±35.6 (33-213)
FXIII	104.7±13.9 (80-131)	115.2±36.6 (46-155)	101.2±25.3 (83-138)	89±31.6 (40-155)	66.1±28.8 (30-141)
vWF	117.5±39.0 (56-197)	275.4±135.2 (116-599)	333.7±119.8 (177-469)	332.5±133.2 (123-599)	401.1±146.5 (200-599)
AT	101.5±.2 (92-120)	88.3±26.7 (44-125)	88.0±3.9 (84-93)	58.7±23.9 (23-125)	41.8±21.0 (14-88)
PC	118.5±21.1 (83-150)	89.6±40.4 (34-150)	84.8±21.7 (53-102)	52.6±26.7 (22-150)	36.7±21.1 (13-86)

Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih aktivnosti faktora koagulacije među ispitanicima prikazana je u Tabeli 12.

Tabela 12. Distribucija učestalosti aktivnosti faktora koagulacije kod svih ispitanika.

FAKTOR	AKTIVNOST	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
Fibrinogen	<i>Snižena</i>	9 (15%)	2 (8.3%)	0	0.012*	0.393	0.009*
	<i>Normalna</i>	41 (68.3%)	11 (45.8%)	45 (90%)			
	<i>Povišena</i>	10 (16.7%)	11 (45.8%)	5 (10%)			
FII	<i>Snižena</i>	38 (63.3%)	9 (37.5%)	0	0.006*	<0.001*	0.002*
	<i>Normalna</i>	20 (33.3%)	8 (33.3%)	20 (40%)			
	<i>Povišena</i>	2 (3.3%)	7 (29.2%)	30 (60%)			
FV	<i>Snižena</i>	38 (63.3%)	6 (25%)	1 (2%)	<0.001*	<0.001*	0.280
	<i>Normalna</i>	22 (36.7%)	12 (50%)	39 (78%)			
	<i>Povišena</i>	0	6 (25%)	10 (20%)			
FVII	<i>Snižena</i>	47 (78.3%)	8 (33.3%)	2 (4%)	<0.001*	<0.001*	0.103
	<i>Normalna</i>	11 (18.3%)	10 (41.7%)	37 (74%)			
	<i>Povišena</i>	2 (3.3%)	6 (25%)	11 (22%)			
FVIII	<i>Snižena</i>	2 (3.3%)	0	2 (4%)	0.186	<0.001*	<0.001*
	<i>Normalna</i>	27 (45%)	8 (33.3%)	46 (92%)			
	<i>Povišena</i>	31 (51.7%)	16 (66.7%)	2 (4%)			
FIX	<i>Snižena</i>	33 (55%)	3 (12.5%)	4 (8%)	0.001*	<0.001*	0.678
	<i>Normalna</i>	22 (36.7%)	17 (70.8%)	39 (78%)			
	<i>Povišena</i>	5 (8.3%)	4 (16.7%)	7 (14%)			
FX	<i>Snižena</i>	32 (53.3%)	5 (20.8%)	1 (2%)	0.002*	<0.001*	0.283
	<i>Normalna</i>	24 (40%)	13 (54.2%)	38 (76%)			
	<i>Povišena</i>	4 (6.7%)	6 (25%)	11 (22%)			
FXI	<i>Snižena</i>	41 (68.3%)	7 (29.2%)	2 (4%)	0.001*	<0.001*	0.210
	<i>Normalna</i>	15 (25%)	11 (45.8%)	38 (76%)			
	<i>Povišena</i>	4 (6.7%)	6 (25%)	10 (20%)			
FXII	<i>Snižena</i>	35 (58.3%)	6 (25%)	2 (4%)	0.004*	<0.001*	0.392
	<i>Normalna</i>	24 (40%)	16 (66.7%)	47 (94%)			
	<i>Povišena</i>	1 (1.7%)	2 (8.3%)	1 (2%)			
FXIII	<i>Snižena</i>	26 (43.3%)	4 (16.7%)	0	0.001*	<0.001*	0.094
	<i>Normalna</i>	31 (51.7%)	11 (45.8%)	26 (52%)			
	<i>Povišena</i>	3 (5%)	9 (37.5%)	24 (48%)			
VWF	<i>Snižena</i>	0	0	0	0.033*	<0.001*	<0.001*
	<i>Normalna</i>	2 (3.3%)	4 (16.7%)	39 (78%)			
	<i>Povišena</i>	58 (96.7%)	20 (83.3%)	11 (22%)			

p1 - (alkoholna vs. holestazna); *p2* - (alkoholna vs. zdrava); *p3* - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.

4.2.2. Ispitivanje stvaranja trombina ETP testom

Ispitivanja obuhvaćena ETP testom prikazana su u Tabeli 13 i na Grafikonu 4.

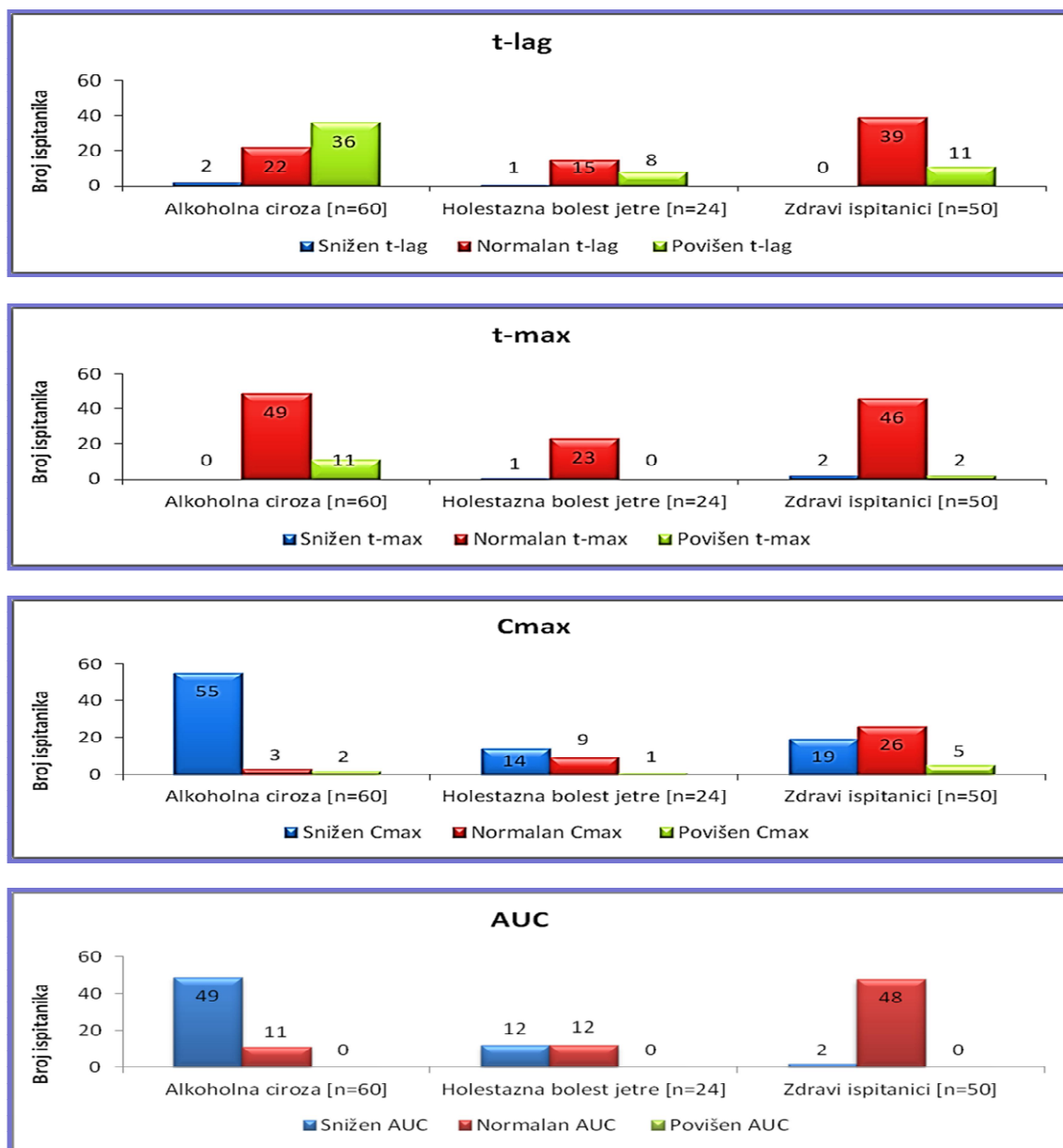
Tabela 13. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti parametara ETP testa kod bolesnika sa alkoholnom/holestaznom cirozom i zdravih ispitanika.

ETP	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
t-lag	30.1±10.8	24.8±3.5	25.6±14.2	0.035*	<0.001*	0.073
	28 (12-68)	25 (17-30)	23 (19-118)			
t-max	78.3±18.3	68.3±12.7	69.4±13.5	0.060	0.025*	0.866
	70.5 (55-122)	67 (44-89)	66 (41-109)			
Cmax	68.3±28.2	99.1±24.9	112.0±20.9	<0.001*	<0.001*	0.020*
	63.5 (28-210)	101 (66-158)	108 (80-168)			
AUC	67.9±16.4	87.2±16.6	98.3±10.9	<0.001*	<0.001*	0.001*
	66 (35-114)	82 (65-115)	97 (80-119)			

*p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.*

Uočeno je da su prosečne vrednosti t-lag, Cmax i AUC bile značajno niže kod ispitanika sa alkoholnom cirozom u odnosu na obe kontrolne grupe. Značajno niža prosečna vrednost t-max izmerena je kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u poređenju sa vrednostima zabeleženim kod bolesnika sa holestaznom cirozom, ali u odnosu na zdrave ispitanike nije bilo značajne razlike (Tabela 13). Ispitivanjem odstupanja vrednosti parametara ETP testa u odnosu na referentne vrednosti istih pokazano je da su odstupanja značajno zastupljenija kod bolesnika sa alkoholnom cirozom ($p < 0.001$). Povišene vrednosti t-lag i t-max zabeležene su kod 36 (60%) odnosno 11 (18.3%) bolesnika, dok su snižene vrednosti Cmax i AUC izmerene kod 55 (91.7%) odnosno 49 (81.7%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. U grupi bolesnika sa holestaznom cirozom izmerene su sledeće vrednosti parametara ETP testa: povišena vrednost t-lag kod 8 (33.3%), snižene vrednosti Cmax i AUC kod 14 (58.3%) odnosno 12 (50%) bolesnika. Uzimajući u obzir povišenu vrednost t-lag kod 11 (22%) odnosno sniženu vrednost Cmax kod 19 (38%) zdravih ispitanika, kao i činjenicu da je vrednost t-max bila u opsegu referentnih vrednosti kod velikog procenta bolesnika sa alkoholnom cirozom (Grafikon 4), može se pretpostaviti da je AUC specifičniji parametar za procenu potencijala za stvaranje

trombina ETP testom kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Ispitivanjem ETP testom, kod samo 2 (3.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom utvrđen je hiperkoagulabilan hemostatski profil i to u odnosu na povišenu vrednost Cmax (Grafikon 4). Ova dva bolesnika nisu razvila trombozu vene porte. S druge strane, kod osam bolesnika koji su imali trombozu vene porte izmerene su normalne vrednosti Cmax i AUC.



Grafikon 4. Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti t-lag, t-max, Cmax i AUC kod ispitivanih grupa.

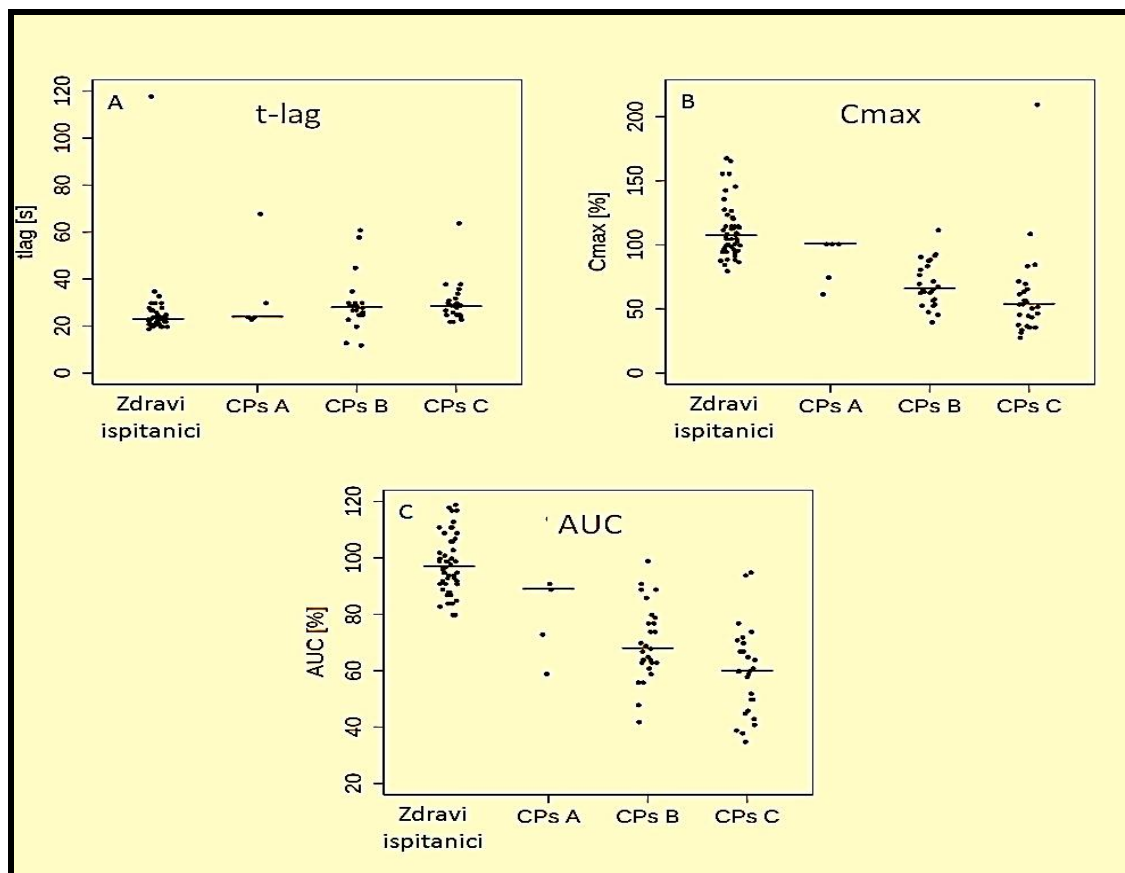
Parametri ETP testa u odnosu na stadijum alkoholne ciroze

Na Grafikonu 5 prikazane su prosečne vrednosti t-lag, Cmax i AUC u odnosu na CPs kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

Postojala je blaga tendencija porasta prosečnih vrednosti t-lag sa porastom CPs, ali nije uočena statistički značajna razlika ($p=0.313$).

U odnosu na težinu alkoholne ciroze procenjene prema CPs primećeno je da prosečne vrednosti Cmax gradacijski opadaju sa progresijom bolesti [CPsA: 101% (62-101%); CPsB: 66% (40-112%); CPsC: 54% (28-210%)]. Trend gradacijskog opadanja prosečnih vrednosti sa povećanjem CPs zabeležen je i za vrednosti AUC [CPsA: 89% (59-114%); CPsB: 69% (42-99%); CPsC: 60% (35-95%)].

Među stadijumima CPs uočena je statistički značajna razlika samo u pogledu AUC parametra, ali bez značajne razlike između CPsA i CPsB stadijuma (CPsA vs. CPsB, $p=0.107$; CPsA vs. CPsC, $p=0.003$; CPsB vs. CPsC, $p=0.037$).



Grafikon 5. Vrednosti (A) t-lag, (B) Cmax i (C) AUC unutar kategorija Child-Pugh skora u poređenju sa zdravim ispitanicima. Horizontalna linija predstavlja medijanu.

4.2.3. Ispitivanje globalne hemostaze metodom tromboelastometrije

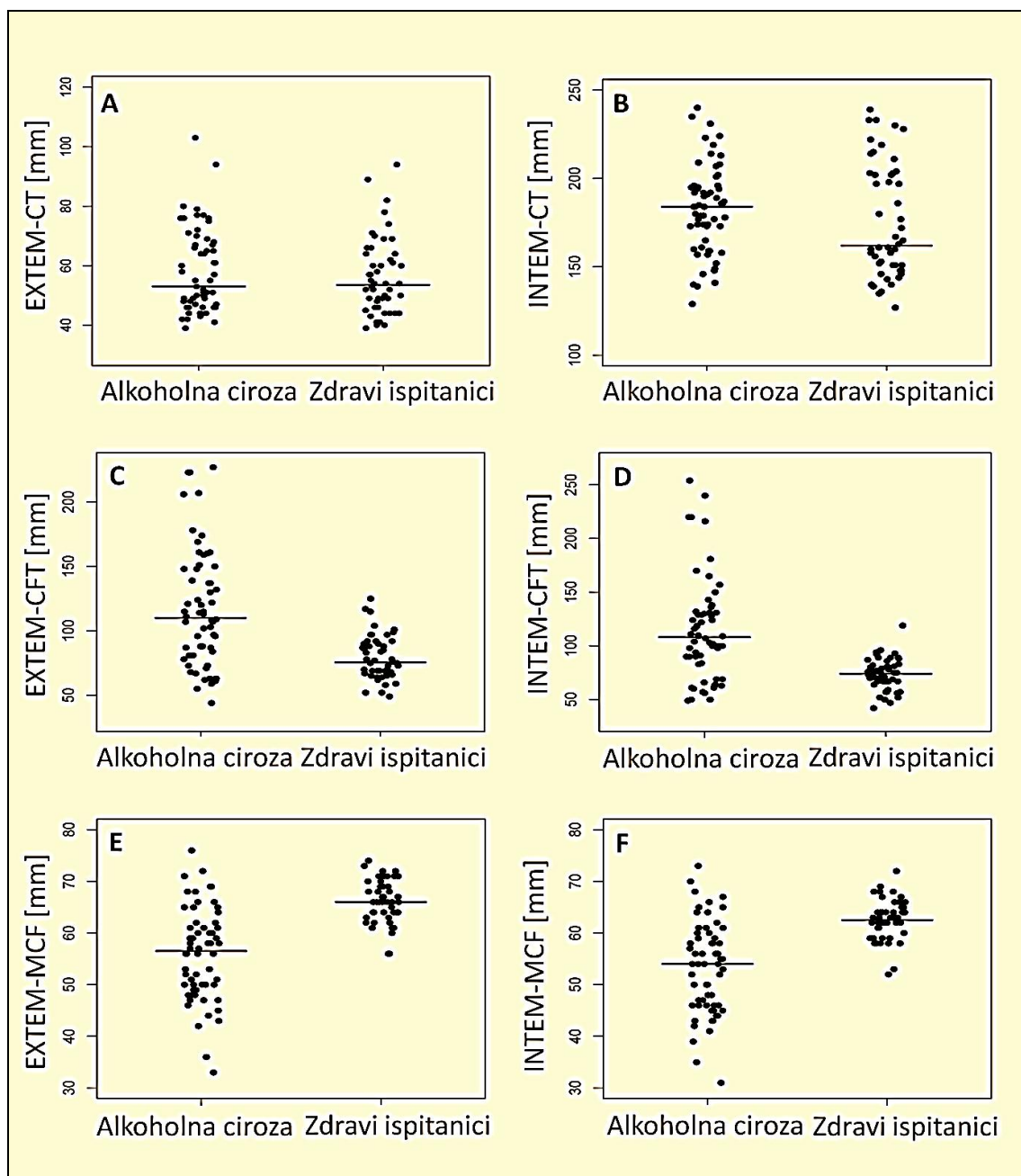
Prosečne vrednosti parametara tromboelastometrije kod bolesnika sa cirozom alkoholne i holestazne etiologije i zdravih ispitanika prikazane su u Tabeli 14.

Tabela 14. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti parametara tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom/holestaznom cirozom i zdravih ispitanika.

TEM®	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
CT	64±48.6	60.3±13.6	55.0±12.9	0.397	0.368	0.127
EXTEM	54 (39-419)	57 (36-91)	53.5 (39-94)			
CT	182.8±25.0	162.8±17.7	175.7±31.9	0.001*	0.152	0.285
INTEM	184 (129-240)	161.5 (132-206)	162 (127-239)			
CFT	116.6±45.6	80.3±36.0	79.2±16.9	<0.001*	<0.001*	0.171
EXTEM	110 (44-227)	68 (38-174)	75.5 (49-125)			
CFT	113.9±47.6	79.3±36.6	73.6±14.5	0.001*	<0.001*	0.377
INTEM	108 (49-254)	67 (43-175)	74 (42-119)			
α	69.7±7.4	75.3±6.4	74.6±3.3	<0.001*	0.001*	0.045*
EXTEM	72 (53-81)	77 (57-83)	75 (67-80)			
α	70.5±5.8	74.6±5.9	75.1±2.9	0.002*	<0.001*	0.285
INTEM	71 (55-80)	77 (60-81)	75 (67-81)			
MCF	55.9±8.9	65.5±9.0	66.2±4.0	<0.001*	<0.001*	0.547
EXTEM	56.5 (33-76)	67.5 (43-79)	66 (56-74)			
MCF	53.2±8.9	61.8±8.4	62.4±3.8	<0.001*	<0.001*	0.417
INTEM	54 (31-73)	65 (41-74)	62.5 (52-72)			
MCF	16.6±9.1	19.9±7.8	16.7±3.5	0.031*	0.354	0.033*
FIBTEM	15 (3-61)	20 (7-43)	17 (10-24)			

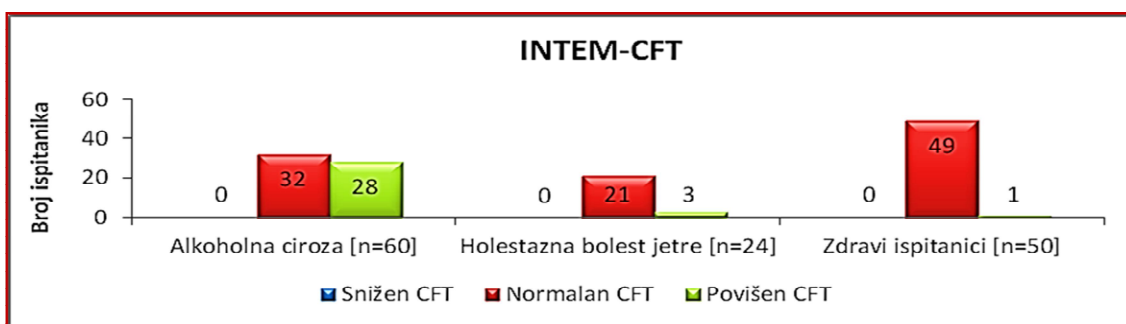
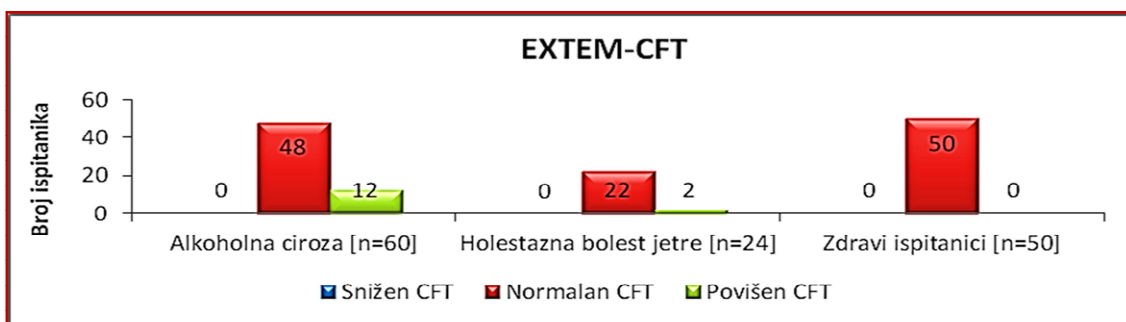
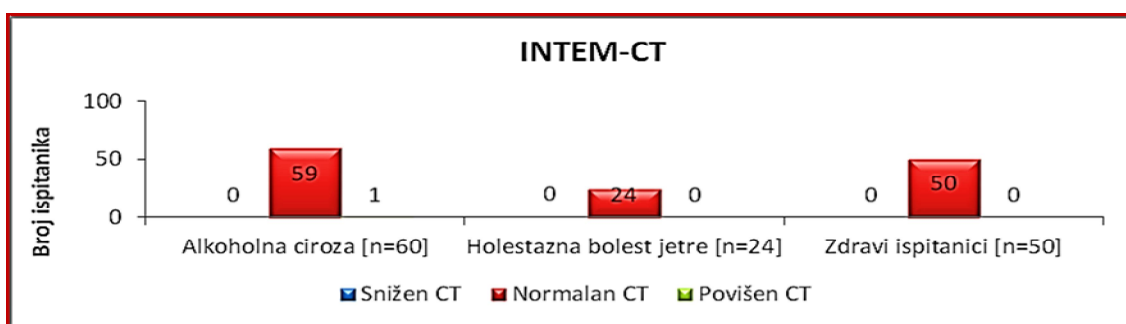
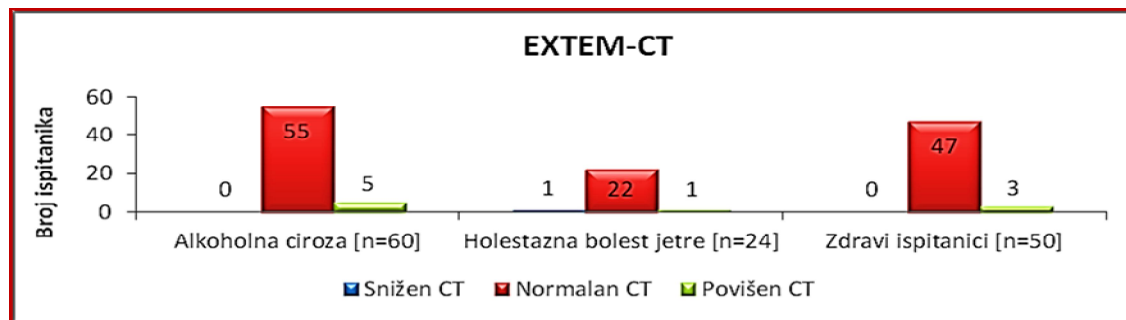
p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.

Na Grafikonu 6 ilustrovane su vrednosti CT, CFT i MCF u EXTEM i INTEM testovima kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u poređenju sa zdravim ispitanicima.



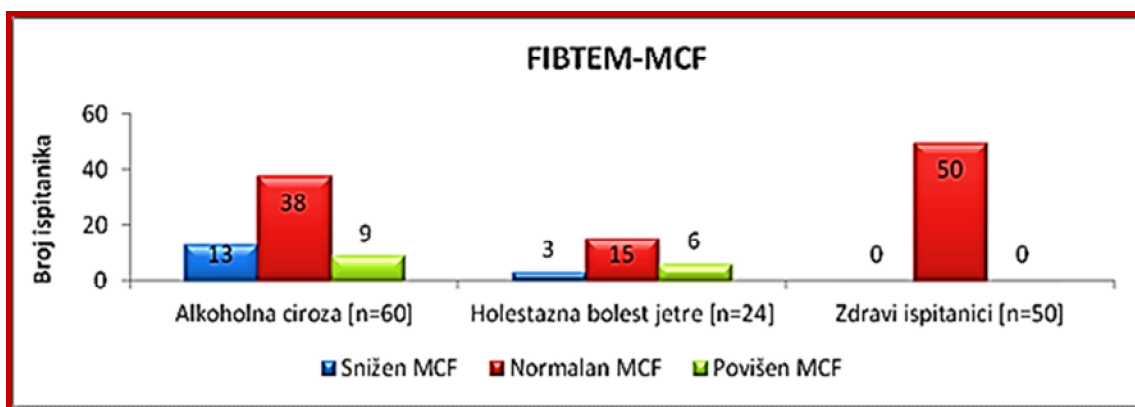
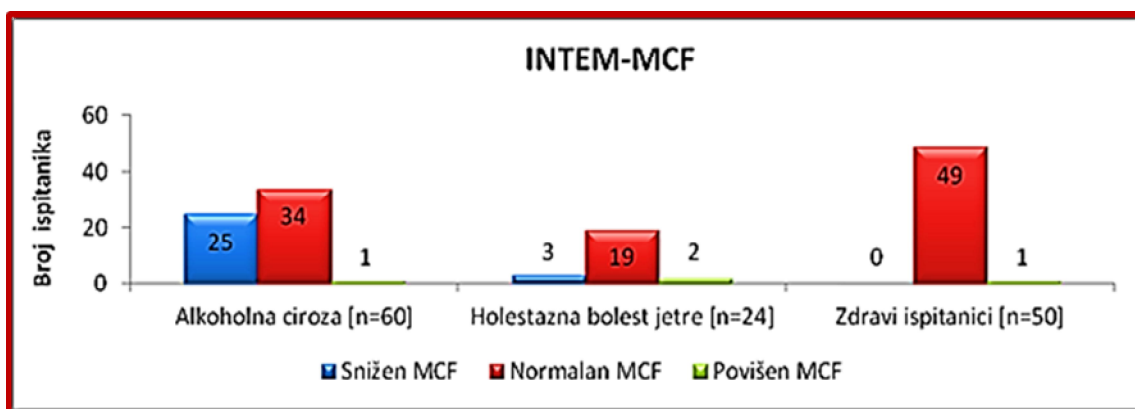
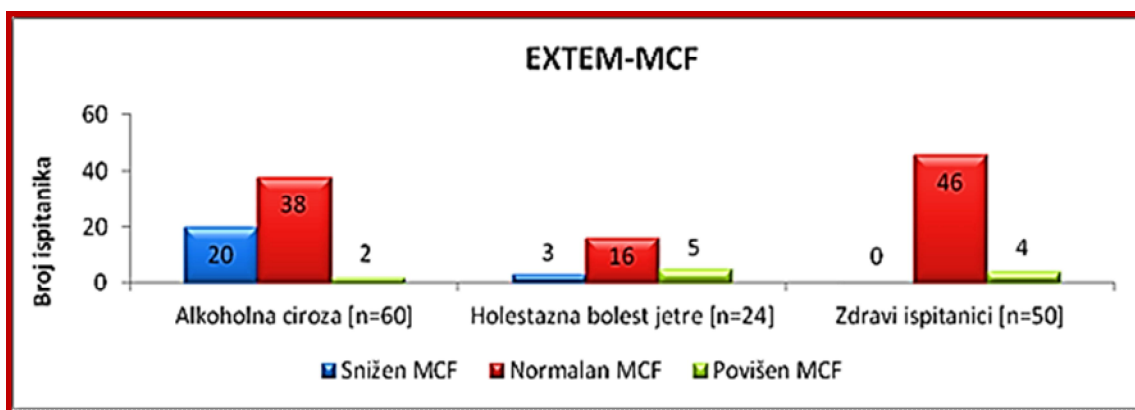
Grafikon 6. Vrednosti CT (A-B), CFT (C-D) i MCF (E-F) u EXTEM i INTEM testovima kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika. Horizontalna linija predstavlja medijanu.

Distribucija ispitanika u odnosu na referentne vrednosti tromboelastometrijskih parametara CT i CFT prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 7. Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti CT i CFT izmerenih u EXTEM i INTEM testovima kod ispitivanih grupa.

Distribucija ispitanika u odnosu na MCF vrednosti, koje su izmerene u EXTEM, INTEM i FIBTEM testovima prikazana je na Grafikonu 8.



Grafikon 8. Distribucija učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti MCF izmerenih u EXTEM, INTEM i FIBTEM testovima kod ispitivanih grupa.

Parametri tromboelastometrije u odnosu na stadijum težine alkoholne ciroze

Prosečne vrednosti TEM[®] parametara i učestalosti njihovih patoloških vrednosti nisu se značajno razlikovale u odnosu na težinu alkoholnog oboljenja jetre (Tabela 15).

Tabela 15. Distribucija medijana i opsega vrednosti parametara TEM[®] i učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti istih kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na CPs.

TEM [®]		CHILD PUGH SKOR			P
		A [n=5]	B [n=28]	C [n=27]	
EXTEM-CT	Medijana (opseg)	55 (46-80)	49 (39-103)	63 (42-94)	0.323
	Snižen	0	0	0	0.620
	Normalan	4 (80%)	26 (92.9%)	25 (92.6%)	
	Povišen	1 (20%)	2 (7.1%)	2 (7.4%)	
INTEM-CT	Medijana (opseg)	186 (140-231)	179 (146-219)	192 (129-240)	0.114
	Snižen	0	0	0	0.543
	Normalan	5 (100%)	28 (100%)	26 (96.3%)	
	Povišen	0	0	1 (3.7%)	
EXTEM-CFT	Medijana (opseg)	120 (78-227)	108 (44-207)	110 (61-223)	0.686
	Snižen	0	0	0	0.923
	Normalan	4 (80%)	23 (82.1%)	21 (77.8%)	
	Povišen	1 (20%)	5 (17.9%)	6 (22.2%)	
INTEM-CFT	Medijana (opseg)	124 (63-254)	103 (49-220)	110 (61-240)	0.340
	Snižen	0	0	0	0.538
	Normalan	2 (40%)	17 (60.7%)	13 (48.1%)	
	Povišen	3 (60%)	11 (39.3%)	14 (51.9%)	
EXTEM-MCF	Medijana (opseg)	56 (42-69)	57 (43-76)	55 (33-68)	0.228
	Snižen	2 (40%)	7 (25%)	11 (40.7%)	0.293
	Normalan	3 (60%)	19 (67.9%)	16 (59.3%)	
	Povišen	0	2 (7.1%)	0	
INTEM-MCF	Medijana (opseg)	54 (39-64)	55 (41-73)	52 (31-67)	0.205
	Snižen	2 (40%)	9 (32.1%)	14 (51.9%)	0.286
	Normalan	3 (60%)	18 (64.3%)	13 (48.1%)	
	Povišen	0	1 (3.6%)	0	
FIBTEM-MCF	Medijana (opseg)	15 (14-27)	16 (7-40)	15 (3-61)	0.260
	Snižen	0	4 (14.3%)	9 (33.3%)	0.128
	Normalan	3 (60%)	21 (75%)	14 (51.9%)	
	Povišen	2 (40%)	3 (10.7%)	4 (14.8%)	

4.3. ODNOS STANDARDNIH I GLOBALNIH TESTOVA PRI PROCENI HEMOSTATSKOG PROFILA BOLESNIKA SA ALKOHOLNOM CIROZOM

4.3.1. Faza inicijacije - spoljnji put koagulacije

U Tabeli 16 prikazane su korelacije standardnih testova sa parametrima globalnih testova, koji odražavaju fazu inicijacije koagulacionog procesa.

Tabela 16. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između EXTEM-CT, t-lag i PT/INR/aktivnosti faktora koagulacije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]		ZDRAVI ISPITANICI [n=50]	
	EXTEM- CT	t-lag	EXTEM- CT	t-lag
PT	0.041 (0.636)	0.462 (<0.001*)	-0.063 (0.662)	0.337 (0.021*)
INR	-0.062 (0.474)	0.522 (<0.001*)	-0.370 (0.008*)	0.487 (0.001*)
FII	-0.093 (0.287)	-0.385 (<0.001*)	-0.216 (0.132)	-0.022 (0.886)
FV	0.070 (0.426)	-0.504 (<0.001*)	0.378 (0.007*)	-0.385 (0.008*)
FVII	-0.154 (0.077)	-0.360 (<0.001*)	-0.255 (0.074)	0.095 (0.526)
FIX	-0.081 (0.540)	-0.124 (0.375)	-0.295 (0.162)	0.230 (0.358)
FX	-0.050 (0.564)	-0.362 (<0.001*)	0.103 (0.477)	-0.023 (0.877)

*- statistički značajna povezanost

Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom nije postojala povezanost EXTEM-CT ni sa jednim od ispitivanih parametara. Sa izuzetkom FIX, statistički značajna negativna osrednja povezanost postojala je između t-lag i većine prokoagulacionih faktora koji učestvuju u fazi inicijacije koagulacionog procesa. Pozitivna osrednja povezanost postojala je između t-lag i PT/INR. Povezanost t-lag sa PT i ispitanim faktorima koagulacije je u skladu sa prihvaćenim konceptom inicijacije koagulacionog procesa kompleksom tenaza spoljnjeg puta koagulacije.

4.3.2. Faza amplifikacije

U Tabeli 17 prikazane su korelacije standardnih testova sa parametrima globalnih testova, koji odražavaju fazu amplifikacije koagulacionog procesa.

Tabela 17. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između EXTEM-CFT, INTEM-CFT, t-max i standardnih testova hemostaze/aktivnosti faktora koagulacije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]			ZDRAVI ISPITANICI [n=50]		
	EXTEM-CFT	INTEM-CFT	t-max	EXTEM-CFT	INTEM-CFT	t-max
aPTT	0.328 (0.010*)	0.249 (0.055)	0.057 (0.680)	0.259 (0.070)	0.385 (0.006*)	-0.029 (0.844)
Trombociti	-0.606 (<0.001*)	-0.695 (<0.001*)	-0.229 (0.096)	-0.621 (<0.001*)	-0.466 (0.001*)	0.046 (0.761)
Fibrinogen	-0.470 (<0.001*)	-0.434 (0.001*)	-0.179 (0.195)	-0.497 (<0.001*)	-0.502 (<0.001*)	0.203 (0.171)
FII	-0.312 (0.016*)	-0.266 (0.042*)	-0.118 (0.400)	-0.203 (0.157)	-0.001 (0.993)	0.072 (0.633)
FXI	-0.369 (0.004*)	-0.327 (0.012*)	-0.112 (0.423)	-0.285 (0.045*)	-0.326 (0.021*)	-0.016 (0.917)
FIX	-0.350 (0.007*)	-0.286 (0.028*)	-0.127 (0.366)	-0.280 (0.049*)	-0.235 (0.100)	0.046 (0.760)
FVIII	-0.138 (0.297)	-0.203 (0.124)	-0.110 (0.434)	-0.324 (0.023*)	-0.144 (0.322)	0.028 (0.851)
FV	-0.232 (0.077)	-0.183 (0.166)	-0.264 (0.057)	-0.368 (0.008*)	-0.449 (0.001*)	-0.314 (0.031*)
FX	-0.360 (0.005*)	-0.329 (0.011*)	-0.225 (0.105)	-0.267 (0.061)	-0.327 (0.021*)	-0.016 (0.913)

*- statistički značajna povezanost

Najbolje korelacije uočene su između, s jedne strane, trombocita i fibrinogena i, s druge strane, tromboelastometrijskog parametra CFT kako u spoljnjem tako i u unutarnjem putu koagulacije. U odnosu na faktore koagulacije, nije uočena korelacija između parametra CFT i aktivnosti FV i FVIII.

Nije uočena korelacija između parametra t-max ETP testa i standardnih testova hemostaze.

4.3.3. Faze propagacije i stabilizacije

U Tabeli 18 prikazane su korelacije standardnih testova sa globalnim testovima u fazama propagacije i stabilizacije koagulacionog procesa.

Tabela 18. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između EXTEM-MCF, INTEM-MCF, Cmax i AUC sa standardnim testovima hemostaze i faktorima koagulacije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

STANDARDNI TESTOVI	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]				ZDRAVI ISPITANICI [n=50]			
	EXTEM MCF	INTEM MCF	Cmax	AUC	EXTEM MCF	INTEM MCF	Cmax	AUC
aPTT	-0.370 (0.004*)	-0.386 (0.002*)	-0.141 (0.288)	-0.739 (<0.001*)	-0.369 (0.008*)	-0.395 (0.004*)	-0.257 (0.071)	-0.142 (0.324)
Trombociti	0.693 (<0.001*)	0.718 (<0.001*)	0.349 (0.007*)	0.644 (<0.001*)	0.542 (<0.001*)	0.451 (0.001)	0.289 (0.042*)	0.413 (0.003*)
Fibrinogen	0.594 (<0.001*)	0.576 (<0.001*)	0.406 (0.001*)	0.356 (<0.001*)	0.494 (<0.001*)	0.491 (<0.001*)	0.064 (0.661)	0.078 (0.593)
FII	0.477 (<0.001*)	0.492 (0.001*)	0.438 (0.001*)	0.822 (<0.001*)	0.064 (0.658)	0.018 (0.903)	0.120 (0.407)	0.447 (0.001*)
FX	0.466 (<0.001*)	0.437 (0.001*)	0.254 (0.054)	0.665 (<0.001*)	0.242 (0.091)	0.240 (0.093)	0.151 (0.296)	0.232 (0.105)
FV	0.389 (0.002*)	0.362 (0.005*)	0.317 (0.015*)	0.692 (<0.001*)	0.356 (0.011*)	0.317 (0.025*)	0.529 (<0.001*)	0.319 (0.024*)
FIX	0.466 (<0.001*)	0.423 (0.001*)	0.428 (0.001*)	0.634 (<0.001*)	0.139 (0.335)	0.080 (0.580)	-0.005 (0.973)	0.304 (0.032*)
FVIII	0.179 (0.174)	0.211 (0.109)	0.159 (0.233)	0.048 (0.722)	0.182 (0.211)	0.074 (0.612)	0.264 (0.067)	0.332 (0.020*)
FXI	0.453 (<0.001*)	0.435 (0.001*)	0.587 (<0.001*)	0.542 (<0.001*)	0.167 (0.245)	0.165 (0.252)	0.214 (0.135)	0.077 (0.595)
FXIII	0.571 (<0.001*)	0.519 (<0.001*)	0.417 (0.001*)	0.554 (<0.001*)	0.082 (0.571)	0.132 (0.362)	0.357 (0.011*)	0.052 (0.719)

*- statistički značajna povezanost

Protrombin (FII) je najbolje korelirao sa ukupnom količinom stvorenog trombina reprezentovanom AUC parametrom ETP testa. Parametar Cmax ETP testa je najjače pozitivno korelirao sa FXI, što može ukazivati na ulogu FXI kao 'pojačivača' prokoagulacionih odgovora. Uočena je korelacija Cmax sa FXII (r=0.595; p<0.001) i sa FVII (r=0.438; p=0.001) – nije prikazano u tabeli. U tromboelastometriji, glavni prediktori parametra MCF bili su broj trombocita i koncentracija fibrinogena kako u spoljnjem tako i u unutarnjem putu koagulacije.

4.4. KORELACIJE IZMEĐU ETP TESTA I TROMBOELASTOMETRIJE

Ispitivan je uticaj maksimalne koncentracije trombina stvorene u toku procesa koagulacije i ukupne količine stvorenog trombina (mereno ETP testom) na formiranje, strukturu i stabilnost hemostatskog ugruška (mereno tromboelastometrijom). U Tabeli 19 prikazane su korelacije između parametara tromboelastometrije i ETP testa.

Tabela 19. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između testa za ispitivanje stvaranja trombina i tromboelastometrije kod tri grupe ispitanika.

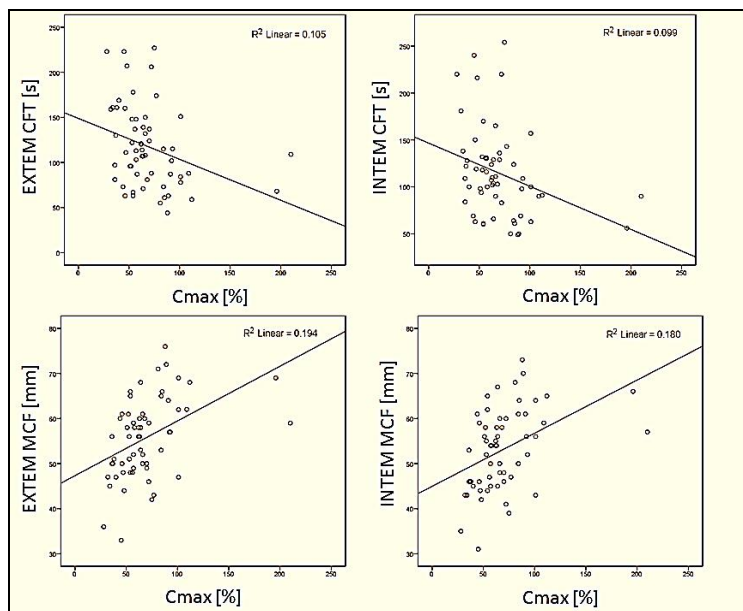
TEM®	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]		HOLESTAZNA CIROZA [n=24]		ZDRAVI ISPITANICI [n=50]	
	Cmax	AUC	Cmax	AUC	Cmax	AUC
EXTEM	-0.363	-0.509	-0.510	-0.455	-0.443	-0.400
CFT	(0.005*)	(<0.001*)	(0.015*)	(0.033*)	(0.001*)	(0.004*)
INTEM	-0.350	-0.466	-0.541	-0.420	-0.489	-0.121
CFT	(0.007*)	(<0.001*)	(0.009*)	(0.052)	(<0.001*)	(0.403)
EXTEM	0.683	0.608	0.614	0.484	0.451	0.303
MCF	(<0.001*)	(<0.001*)	(0.002*)	(0.022*)	(<0.001*)	(0.032*)
INTEM	0.631	0.545	0.556	0.423	0.398	0.196
MCF	(<0.001*)	(<0.001*)	(0.007*)	(0.050)	(0.001*)	(0.172)

Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom utvrđene su značajne pozitivne korelacije parametra MCF sa Cmax i AUC u spoljnjem i unutarnjem putu koagulacije, pri čemu je najjača povezanost uočena za Cmax u spoljnjem putu koagulacije (EXTEM-MCF). Takođe, u zdravoj populaciji Cmax u odnosu na AUC pokazao je bolju korelaciju sa parametrom MCF u spoljnjem putu koagulacije. Pokazano je da je maksimalna koncentracija formiranog trombina glavna determinanta stabilnosti i čvrstoće definitivnog hemostatskog ugruška u spoljnjem putu koagulacije. Drugim rečima, sa porastom Cmax i AUC povećava se čvrstoća i stabilnost krvnog ugruška. S druge strane, sa padom Cmax i AUC usporava se formiranje krvnog ugruška (produženje CFT) i umanjuje se čvrstoća definitivnog hemostatskog ugruška.

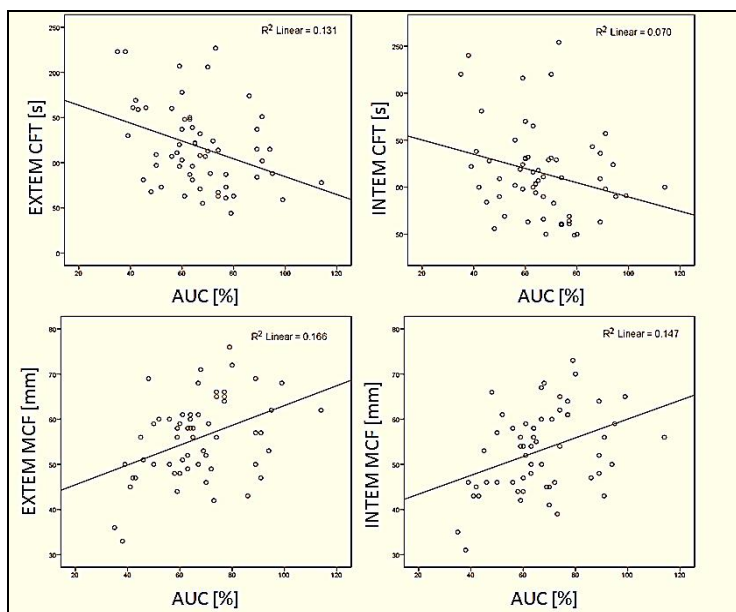
* * * * *

Grafički prikaz negativnog trenda korelacije Cmax sa CFT kod bolesnika sa alkoholnom cirozom može se jasno uočiti na Grafikonu 9. Takođe, prikazan je i pozitivan trend korelacije Cmax i MCF. Uočena je jača korelacija Cmax sa MCF u odnosu na CFT.

Na Grafikonu 10 prikazane su korelacije AUC sa CFT i MCF i njihovi smerovi korelacije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Takođe, jača korelacija Cmax uočena je sa MCF u odnosu na CFT.



Grafikon 9. Korelacije Cmax sa CFT i MCF u EXTEM i INTEM testovima kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.



Grafikon 10. Korelacije AUC sa CFT i MCF u EXTEM i INTEM testovima kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

4.5. ZNAČAJ GLOBALNIH TESTOVA HEMOSTAZE U PROCENI KOAGULABILNOSTI

4.5.1. Korelacije fibrinogena, TT, trombocita i FIBTEM-MCF sa standardnim i globalnim testovima

U Tabeli 20 prikazane su korelacije fibrinogena sa trombinskim vremenom i parametrima tromboelastometrije.

Fibrinogen je korelirao sa svim analiziranim parametrima tromboelastometrije u ispitivanim grupama. Najbolje korelacije uočene su u odnosu na FIBTEM-MCF.

Za razliku od bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika, nije uočena korelacija fibrinogena sa TT kod bolesnika sa holestaznom cirozom.

Tabela 20. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između fibrinogena i parametara tromboelastometrije i TT kod tri grupe ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]	HOLESTAZNA CIROZA [n=24]	ZDRAVI ISPITANICI [n=50]
	Fibrinogen	Fibrinogen	Fibrinogen
TT	-0.461 (<0.001*)	-0.388 (0.061)	-0.325 (0.021*)
EXTEM CFT	-0.451 (<0.001*)	-0.692 (<0.001*)	-0.479 (<0.001*)
INTEM CFT	-0.434 (0.001*)	-0.762 (<0.001*)	-0.502 (<0.001*)
EXTEM MCF	0.565 (<0.001*)	0.768 (<0.001*)	0.494 (<0.001*)
INTEM MCF	0.557 (<0.001*)	0.700 (<0.001*)	0.491 (<0.001*)
FIBTEM MCF	0.746 (<0.001*)	0.802 (<0.001*)	0.592 (<0.001*)

U Tabeli 21 prikazane su korelacije TT sa parametrima tromboelastometrije u svim ispitivanim grupama.

TT je različito korelirao sa analiziranim parametrima u grupama ispitanika. U zdravoj populaciji i kod bolesnika sa alkoholnom cirozom najbolja korelacija TT dobijena je u odnosu na INTEM-CFT.

Tabela 21. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između TT i parametara tromboelastometrije u ispitivanim grupama.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]	HOLESTAZNA CIROZA [n=24]	ZDRAVI ISPITANICI [n=50]
TEM[®]	TT	TT	TT
EXTEM CFT	0.190 (0.149)	0.198 (0.353)	0.254 (0.076)
INTEM CFT	0.277 (0.034*)	0.281 (0.183)	0.620 (<0.001*)
EXTEM MCF	-0.308 (0.017*)	-0.247 (0.244)	-0.393 (0.005*)
INTEM MCF	-0.364 (0.005*)	-0.192 (0.370)	-0.456 (0.001*)
FIBTEM MCF	-0.323 (0.013*)	-0.230 (0.279)	-0.156 (0.280)

U Tabeli 22 prikazane su korelacije između broja trombocita i tromboelastometrijskog parametra MCF u spoljnjem i unutarnjem putu koagulacije. U ispitivanim testovima, trombociti su korelirali sa parametrom MCF kod svih ispitanika.

U Tabeli 23 prikazane su korelacije FIBTEM-MCF sa standardnim testovima hemostaze. FIBTEM-MCF je najjače korelirao sa fibrinogenom kod svih ispitanika. Kod obe grupe bolesnika uočene su korelacije FIBTEM-MCF sa većim brojem parametara u odnosu na zdravu populaciju.

Tabela 22. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između broja trombocita i MCF u ispitivanim grupama.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]	HOLESTAZNA CIROZA [n=24]	ZDRAVI ISPITANICI [n=50]
TEM®	Trombociti	Trombociti	Trombociti
EXTEM	0.641 (<0.001*)	0.706 (<0.001*)	0.542 (<0.001*)
MCF			
INTEM	0.691 (<0.001*)	0.729 (<0.001*)	0.451 (0.001*)
MCF			

Tabela 23. Koeficijent korelacije i značajnost korelacije (p) između FIBTEM-MCF i standardnih testova u ispitivanim grupama.

	ALKOHOLNA CIROZA [n=60]	HOLESTAZNA CIROZA [n=24]	ZDRAVI ISPITANICI [n=50]
STANDARDNI TESTOVI	MCF FIBTEM	MCF FIBTEM	MCF FIBTEM
aPTT	-0.437 (<0.001*)	-0.241 (0.258)	-0.394 (0.005*)
Fibrinogen	0.746 (<0.001*)	0.802 (<0.001*)	0.529 (<0.001*)
FII	0.596 (<0.001*)	0.399 (0.059)	0.193 (0.180)
FV	0.399 (0.002*)	0.443 (0.030*)	0.268 (0.060)
FVII	0.517 (<0.001*)	0.464 (0.023*)	0.047 (0.747)
FVIII	0.112 (0.400)	-0.423 (0.040*)	0.207 (0.153)
FIX	0.562 (<0.001*)	0.430 (0.036*)	0.133 (0.356)
FX	0.578 (<0.001*)	0.448 (0.028*)	0.151 (0.296)
FXI	0.490 (<0.001*)	0.322 (0.125)	0.165 (0.252)
FXII	0.447 (<0.001*)	0.466 (0.022*)	0.248 (0.082)
FXIII	0.382 (0.003*)	0.380 (0.067)	0.119 (0.411)
vWF	0.088 (0.507)	-0.350 (0.093)	0.225 (0.120)
D-dimer	-0.197 (0.135)	-0.406 (0.049*)	0.449 (<0.001*)

4.5.2. ODREĐIVANJE VALJANOSTI TT I FIBTEM-MCF U OTKRIVANJU HIPOFIBRINOGENEMIJE I DISFIBRINOGENEMIJE

Kruskal-Wallis test korišćen je za ispitivanje značajnosti razlike u distribuciji učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF i TT među bolesnicima sa alkoholnom cirozom, koji su podeljeni u tri podgrupe u odnosu na referentne vrednosti koncentracije fibrinogena izmerene Clauss-ovim testom. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 24.

Naknadno testiranjem Mann-Whitney U testom utvrđeno je da između bolesnika sa sniženom i onih sa normalnom koncentracijom fibrinogena postoji značajna razlika u distribuciji učestalosti normalnih, sniženih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF ($p=0.002$) i TT ($p=0.048$).

Tabela 24. Distribucija bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom u odnosu na referentne vrednosti fibrinogena, FIBTEM-MCF i TT.

		FIBRINOGEN [g/L]			<i>p</i>	
		<1.8	1.8-4.0	>4.0		
ALKOHOLNA CIROZA	FIBTEM MCF	<i>Snižen</i>	7 (53.8%)	6 (46.2%)	<0.001*	
		<i>Normalan</i>	2 (5.3%)	33 (86.8%)		3 (7.9%)
		<i>Povišen</i>	0	2 (22.2%)		7 (77.8%)
	TT	<i>Snižen</i>	0	0	0	0.011*
		<i>Normalan</i>	1 (3.2%)	22 (71.0%)	8 (25.8%)	
		<i>Povišen</i>	8 (27.6%)	19 (65.5%)	2 (6.9%)	
HOLESTAZNA CIROZA	FIBTEM MCF	<i>Snižen</i>	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0.002*	
		<i>Normalan</i>	0	10 (66.7%)		5 (33.3%)
		<i>Povišen</i>	0	0		6 (100%)
	TT	<i>Snižen</i>	0	0	0	0.583
		<i>Normalan</i>	1 (5.3%)	9 (47.4%)	9 (47.4%)	
		<i>Povišen</i>	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	

Snižena vrednost fibrinogena izmerena je kod samo 9 (15%) bolesnika sa alkoholnom i 2 (8.3%) bolesnika sa holestaznom cirozom. Sa povećanjem težine ciroze, zabeleženo je postepeno smanjenje srednjih vrednosti fibrinogena (CPsA 4.1 ± 1.1 ; CPsB 3.3 ± 1.3 ; CPsC 2.7 ± 1.3 ; $p=0.002^*$).

Najveća učestalost produženog TT zabeležena je kod bolesnika sa alkoholnom cirozom (29/60; 48.3%), dok je 5/24 (20.8%) bolesnika sa holestaznom cirozom i 11/50 (22%) zdravih ispitanika imalo produžen TT (Grafikon 2). Srednja vrednost TT bila je značajno viša kod bolesnika sa alkoholnom cirozom ($22.7 \pm 6.4s$) u poređenju sa bolesnicima sa holestaznom cirozom ($19.4 \pm 2.4s$, $p < 0.05$) i zdravim ispitanicima ($19.2 \pm 2.4s$, $p < 0.001$), dok nije utvrđena razlika između bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika (Tabela 10). Bolesnici sa dekompenzovanom cirozom (CPsC) imali su značajno više vrednosti TT u poređenju sa bolesnicima koji su pripadali stadijumima CPsA i CPsB (CPsA 18.9 ± 2.6 ; CPsB 21.6 ± 4.8 ; CPsC 24.4 ± 7.4 ; $p = 0.002^*$). Normalna vrednost TT izmerena je kod 1/9 bolesnika, koji su imali sniženu koncentraciju fibrinogena.

Među bolesnicima kojima je izmeren produžen TT, 27.6% (8/29) imalo je snižen fibrinogen (Tabela 25), ali je čak 65.5% (19/29) imalo normalnu, a 6.9% (2/29) bolesnika imalo je povišenu koncentraciju fibrinogena.

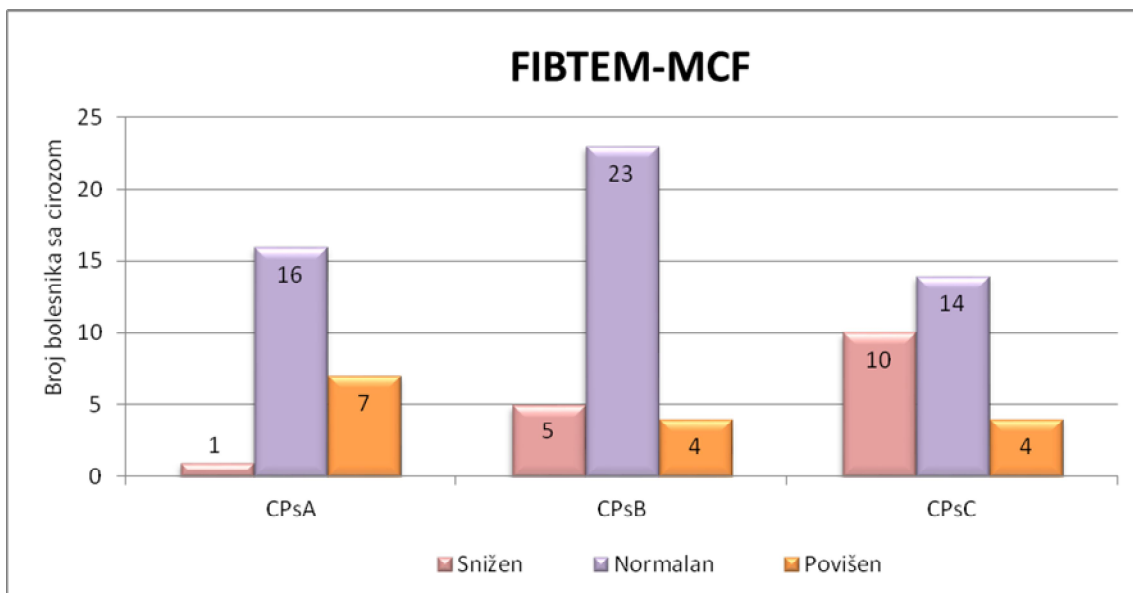
4.5.2.1. Ispitivanje statusa fibrinogena tromboelastometrijom

Odnos sa težinom alkoholne ciroze procenjene prema Child-Pugh skor

Snižena vrednost FIBTEM-MCF izmerena je kod 13 (21.7%) bolesnika sa alkoholnom i 3 (12.5%) bolesnika sa holestaznom cirozom. Prosečna vrednost FIBTEM-MCF nije se značajno razlikovala ($p = 0.354$) između bolesnika sa alkoholnom cirozom (16.6 ± 9.1) i zdravih ispitanika (16.7 ± 3.5). Bolesnici sa holestaznom cirozom imali su značajno više ($p < 0.05$) prosečne vrednosti FIBTEM-MCF (19.9 ± 7.8) u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom i zdrave ispitanike.

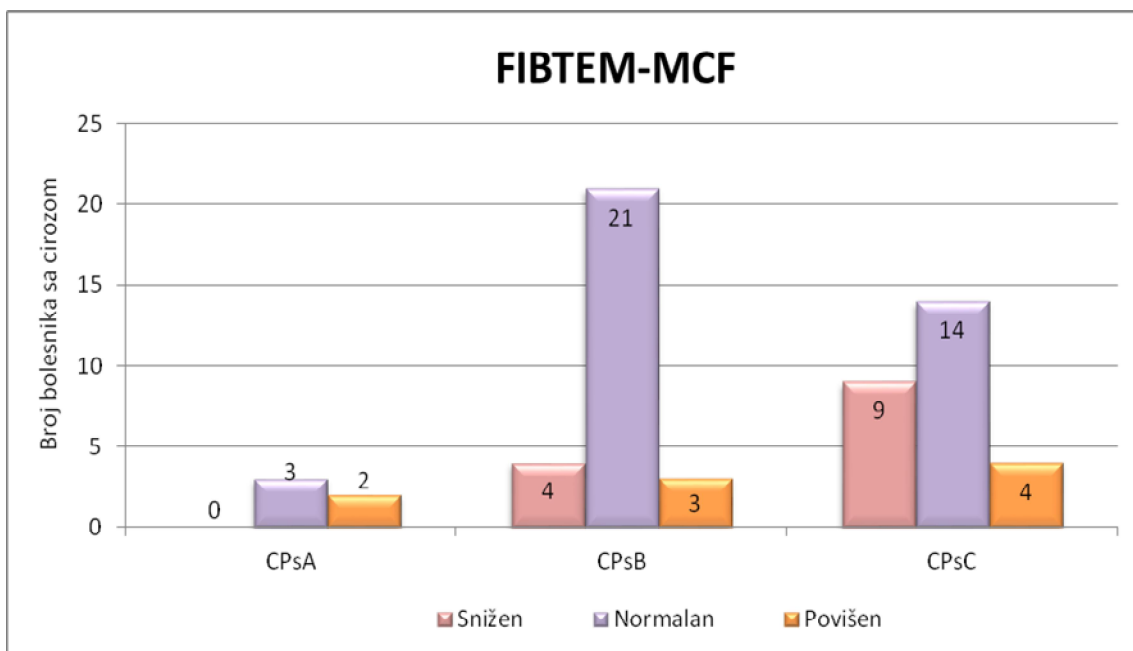
Na Grafikonu 11 prikazana je distribucija sniženih, normalnih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF kod bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom klasifikovanih prema Child-Pugh skor.

Iako nisu pokazane značajne razlike u prosečnim vrednostima FIBTEM-MCF u odnosu na Child-Pugh skor (Tabela 15), kod obe grupe bolesnika sa cirozom (alkoholna i holestazna) postajala je tendencija porasta učestalosti sniženih vrednosti FIBTEM-MCF sa porastom težine oboljenja jetre, kao što je prikazano na Grafikonu 11. Najveća prevalenca ($p = 0.027$) sniženih vrednosti FIBTEM-MCF zabeležena je u stadijumu CPsC (10/16; 62.5%). S druge strane, prevalenca povišenih vrednosti FIBTEM-MCF bila je najveća u stadijumu CPsA kojem su uglavnom pripadali bolesnici sa holestaznom cirozom (7/15, 46.7%).



Grafikon 11. Distribucija sniženih, normalnih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF kod bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom klasifikovanih prema Child-Pugh skor. CPsA n=24, CPsB n=32, CPsC n=28.

Na Grafikonu 12 prikazani su samo bolesnici sa alkoholnom cirozom i distribucija sniženih, normalnih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF u odnosu na Child-Pugh skor.

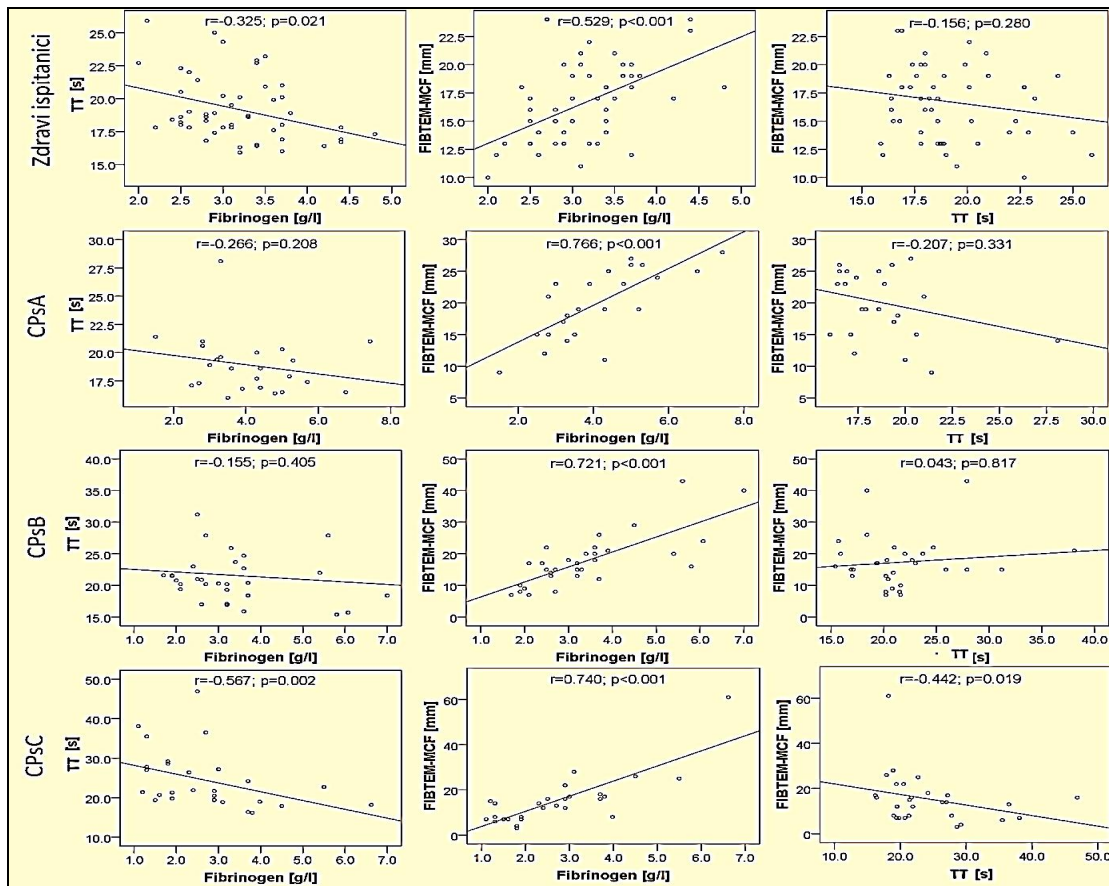


Grafikon 12. Prikaz učestalosti sniženih, normalnih i povišenih vrednosti FIBTEM-MCF u odnosu na Child-Pugh skor kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

Korelacije između tri metode za procenu statusa fibrinogena kod zdravih ispitanika i bolesnika klasifikovanih u tri stadijuma težine ciroze prema Child-Pugh skor

Korelacije tri testa za procenu statusa fibrinogena grafički su prikazane na Grafikonu 13.

Poređenjem tri testa za određivanje fibrinogena, pokazano je da nivo fibrinogena izmeren Clauss-ovom metodom najjače korelira sa FIBTEM-MCF u svim stadijumima Child-Pugh skora kod bolesnika. Kod zdravih ispitanika, fibrinogen je osrednje korelirao sa TT i nešto jače sa FIBTEM-MCF. Uprkos negativnom trendu korelacije, TT nije korelirao sa FIBTEM-MCF kod zdravih ispitanika. Odsustvo korelacija između TT sa fibrinogenom i FIBTEM-MCF kod bolesnika klasifikovanih u stadijume CPsA i CPsB može se pripisati ekstremnim varijacijama vrednosti TT, koje nisu pratile trend korelacija zabeležen kod zdravih ispitanika. Samo kod bolesnika koji su pripadali stadijumu CPsC zabeležena je slaba korelacija između TT, fibrinogena i FIBTEM-MCF. Ovi nalazi mogu ukazivati na uticaj mnogobrojnih faktora, nezavisnih od funkcionalnog fibrinogena, na regulaciju stepena prolongacije TT.



Grafikon 13. Korelacije fibrinogena, TT i FIBTEM-MCF kod zdravih ispitanika i bolesnika klasifikovanih u tri stadijuma prema Child-Pugh skor.

Značaj FIBTEM-MCF u detektovanju kvalitativnog poremećaja fibrinogena

S obzirom da je u svim ispitivanim grupama koncentracija fibrinogena jako korelirala sa vrednošću FIBTEM-MCF, može se pretpostaviti da je FIBTEM-MCF pouzdan marker za relevantnu ilustraciju sadržaja fibrinogena u krvi. U skladu sa tim, prosečna vrednost FIBTEM-MCF nije se značajno razlikovala između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika, što ukazuje da FIBTEM-MCF nije koristan parametar za razlikovanje bolesnika od zdravih osoba.

Uzimajući u obzir činjenicu da se prednost FIBTEM-MCF odnosi na sposobnost ispitivanja aktivnosti polimerizacije fibrina, kao i da je nedostatak TT uticaj mnogobrojnih faktora na vrednost istog, ispitivana je prevalenca patoloških vrednosti ovih testova u odnosu na referentne vrednosti fibrinogena kod bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom (Tabela 25).

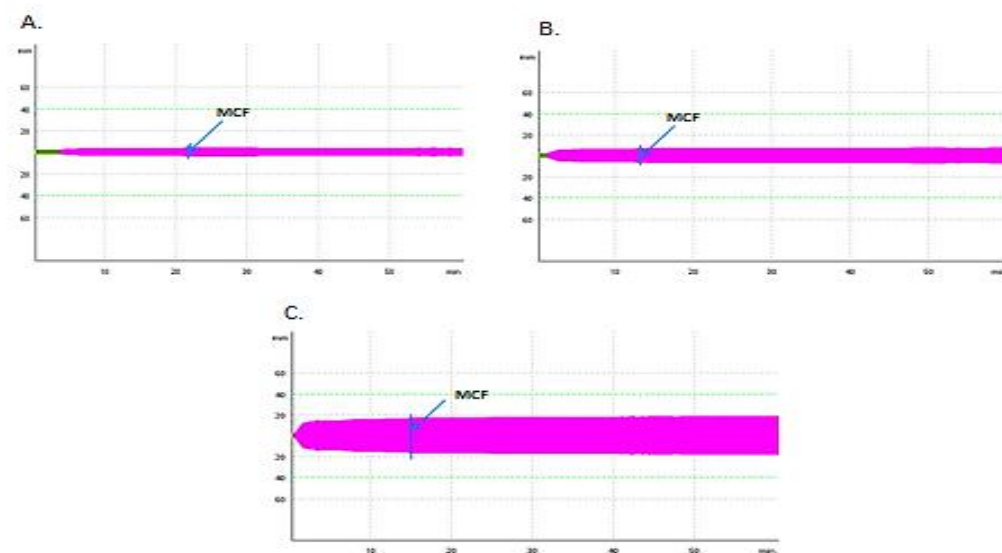
Tabela 25. Prikaz patoloških vrednosti FIBTEM-MCF i TT kod bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom.

Fibrinogen	Vrednosti	<1.8g/L	1.8-4.0g/L	>4.0g/L	p
FIBTEM MCF	Snižen	9 (56.2%)	7 (43.8%)	0	<0.001
	Normalan	2 (3.8%)	43 (81.1%)	8 (15.1%)	
	Povišen	0	2 (13.3%)	13 (86.7%)	
TT	Normalan	2 (4.0%)	31 (62.0%)	17 (34.0%)	0.003
	Produžen	9 (26.5%)	21 (61.8%)	4 (11.8%)	

Među 34 bolesnika sa produženim TT, samo 26.5% imalo je sniženu koncentraciju fibrinogena, dok je 11.8% imalo hiperfibrinogenemiju.

Među 16 bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF, 56.2% imalo je i snižen fibrinogen. Kod preostalih 7 bolesnika (6 sa alkoholnom i 1 sa holestaznom cirozom; 4/7 su klasifikovani u CPsB stadijum i 3/7 su pripadali CPsC stadijumu) izmerena koncentracija fibrinogena bila je u referentnom opsegu. Dobijeni rezultat ukazuje na moguće prisustvo kvalitativnog poremećaja fibrinogena odnosno disfibrinogenemije kod 7 bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF, u prisustvu normalne koncentracije fibrinogena. Drugim rečima, dobijeni rezultat ukazuje na valjanost tromboelastometrije za otkrivanje poremećaja polimerizacije fibrina. U odsustvu tromboelastometrijskog ispitivanja može se pretpostaviti dijagnostički propust kod ovih 7 bolesnika.

Na Grafikonu 14 prikazan je iregularan FIBTEM-MCF profil kod dva bolesnika sa alkoholnom cirozom kod kojih je izmerena normalna koncentracija fibrinogena i normalan FIBTEM-MCF kod jednog zdravog ispitanika.



Grafikon 14. Snižen FIBTEM-MCF (A) FIB-MCF=3mm; fibrinogen=1.8g/L (B) FIB-MCF=7mm; fibrinogen=2.1g/L, kod dva bolesnika sa alkoholnom cirozom. Normalan FIBTEM-MCF kod zdravog ispitanika (C) FIB-MCF=18mm; fibrinogen=2.5g/L.

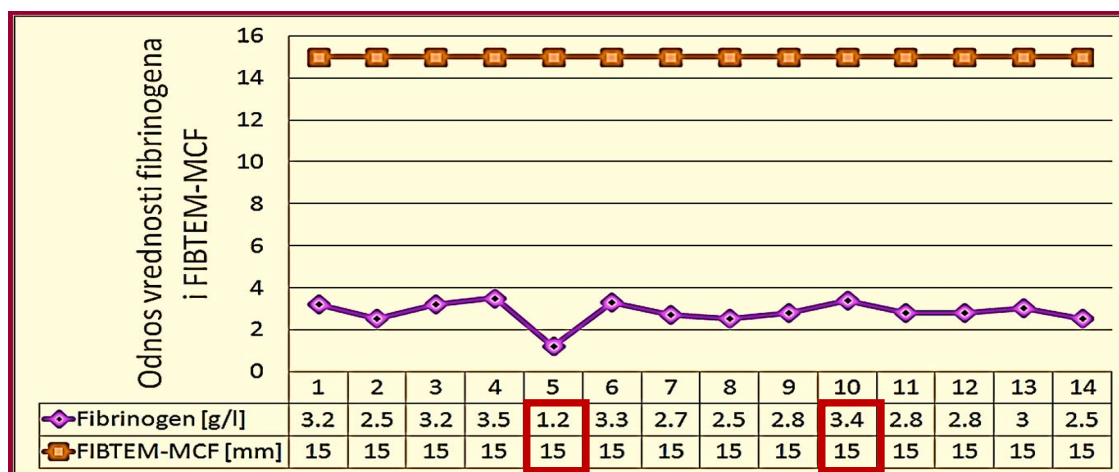
Varijabilnost odnosa vrednosti fibrinogena i FIBTEM-MCF

Ispitivanjem bolesnika na individualnom nivou, pokazano je da čvrstoća fibrinskog ugruška u tromboelastometrijskom FIBTEM testu nije uvek u direktnom odnosu sa koncentracijom fibrinogena izmerenog Clauss-ovom metodom.

U podgrupi bolesnika sa alkoholnom cirozom kod kojih je utvrđena kako normalna koncentracija fibrinogena tako i normalan FIBTEM-MCF, zapaženo je da neki bolesnici sa istom funkcionalnom kompetentnošću polimerizacije fibrina imaju različite koncentracije fibrinogena. S druge strane, neki bolesnici sa sličnim/identičnim koncentracijama fibrinogena mogu imati normalnu odnosno redukovanu čvrstoću fibrinskog ugruška.

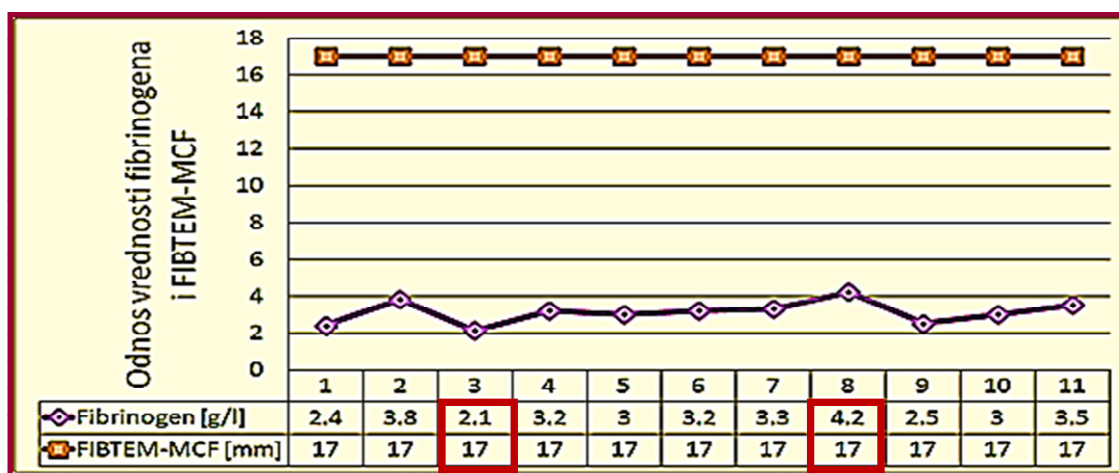
Na Grafikonu 15 prikazano je 14 bolesnika sa vrednošću FIBTEM-MCF=15mm kod kojih je izmerena koncentracija fibrinogena u opsegu 1.2-3.4g/L. Kod ovih bolesnika aktivnost FXIII bila je u opsegu 51-155%. Samo kod tri bolesnika zabeležena je snižena aktivnost FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 3, 5 i 8: 69%, 56%, 51%, respektivno), dok je kod dva

bolesnika registrovana povišena aktivnost FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 11 i 12: 155% i 146%, respektivno).



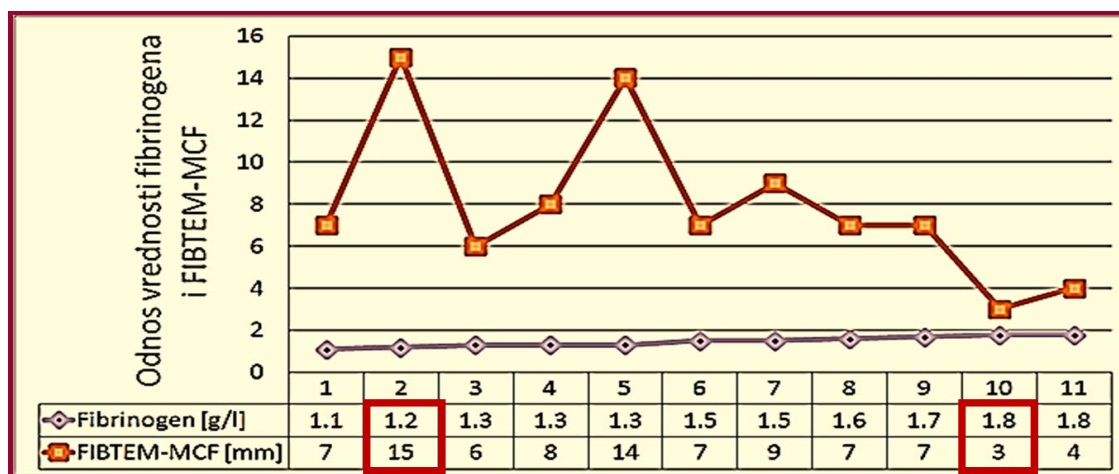
Grafikon 15. Prikaz bolesnika sa vrednošću FIBTEM-MCF=15mm i vrednosti fibrinogena kod istih.

Na Grafikonu 16 prikazano je 11 bolesnika sa vrednošću FIBTEM-MCF=17mm kod kojih je izmerena koncentracija fibrinogena u opsegu 2.1- 4.2g/L. Kod ovih bolesnika aktivnost FXIII izmerena je u opsegu 55-155%. Samo kod dva bolesnika zabeležena je snižena aktivnost FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 2 i 3: 58% i 55%, respektivno), dok je kod 5 bolesnika registrovana povišena aktivnost FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 4, 7, 8, 9 i 10: 151%, 150%, 152%, 148% i 155%, respektivno).



Grafikon 16. Prikaz bolesnika sa vrednošću FIBTEM-MCF=17 mm i vrednosti fibrinogena kod istih.

Na Grafikonu 17 prikazano je 9 bolesnika sa sniženom i 2 bolesnika sa graničnom (1.8g/L) koncentracijom fibrinogena i vrednosti FIBTEM-MCF kod istih. Raspon vrednosti FIBTEM-MCF iznosio je 3-15mm, što ukazuje na visoku varijabilnost maksimalne čvrstoće fibrinskog ugruška u prisustvu približno istih koncentracija fibrinogena. Kod ovih bolesnika aktivnost FXIII izmerena je u opsegu 30-75%. Samo dva bolesnika nisu imala sniženu aktivnost FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 6 i 7: 70% i 75%).



Grafikon 17. Prikaz vrednosti FIBTEM-MCF kod bolesnika sa sniženim i graničnim koncentracijama fibrinogena.

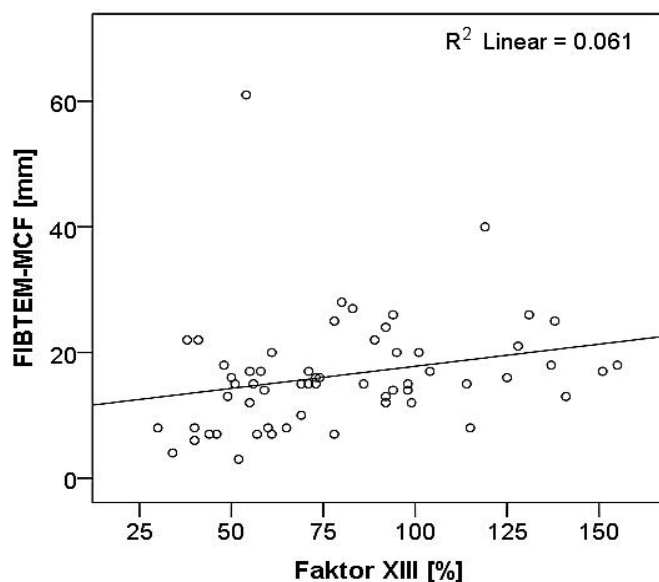
Uticaj FXIII na čvrstoću krvnog ugruška u FIBTEM testu

U FIBTEM testu dodatkom inhibitora citohalazina D blokirana je jedino prokoagulaciona aktivnost trombocita. Stoga, teoretski na čvrstoću krvnog ugruška u FIBTEM testu mogu uticati i drugi celularni i plazmatski faktori.

S obzirom da FXIII ima značajnu ulogu u postizanju definitivne stabilnosti ugruška, u ovoj studiji vršeno je ispitivanje uticaja aktivnosti FXIII na čvrstoću fibrinskog ugruška u FIBTEM testu kod svih bolesnika sa alkoholnom cirozom. Dodatno, vršeno je poređenje prosečnih aktivnosti FXIII između podgrupa bolesnika sa i bez disfibrinogenemije.

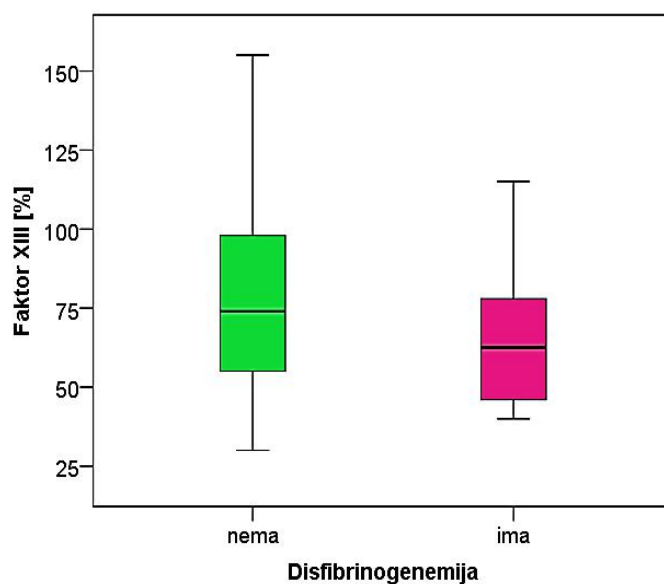
Utvrđena je osrednja pozitivna korelacija aktivnosti FXIII sa FIBTEM-MCF ($r=0.382$; $p=0.003$).

Na Grafikonu 18 prikazana je korelacija aktivnosti FXIII sa FIBTEM-MCF kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.



Grafikon 18. Prikaz korelacije aktivnosti FXIII sa FIBTEM-MCF kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

Bolesnici sa disfibrinogenemijom imali su prosečno niže vrednosti FXIII (67.33 ± 27.01) u odnosu na bolesnike bez disfibrinogenemije (81.26 ± 32.30), ali razlika nije bila statistički značajna ($p=0.314$) (Grafikon 19).



Grafikon 19. Prikaz aktivnosti FXIII u odnosu na prisustvo/odsustvo disfibrinogenemije.

4.5.3. DETEKCIJA HIPOFIBRINOGENEMIJE I/ILI DISFIBRINOGENEMIJE TEM[®] TESTOVIMA

Vršeno je ispitivanje kombinovanog uticaja trombocita i fibrinogena na formiranje krvnog ugruška tokom napredovanja procesa koagulacije u spoljnjem i unutarnjem putu, reprezentovano parametrima CFT i MCF. Izolovan uticaj fibrinogena na formiranje krvnog ugruška ispitan je poređenje navedenih parametara sa FIBTEM-MCF.

Hipofibrinogenemija detektovana FIBTEM testom, otkrivena je parametrom EXTEM-CFT u 69.2% slučajeva (od ukupno 13 bolesnika koji su imali snižen FIBTEM, 9 bolesnika imalo je povišen EXTEM-CFT).

S druge strane, INTEM-CFT i EXTEM-MCF detektovali su hipofibrinogenemiju kod čak 11/13 bolesnika, tj. u 84.6% slučajeva. Parametar INTEM-MCF detektovao je hipofibrinogenemiju kod svih 13 bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF (100%).

Međutim, visoka senzitivnost ova tri testa u detekciji hipofibrinogenemije praćena je izuzetno niskom specifičnošću (EXTEM-MCF 55%, INTEM-CFT 39.3% i INTEM-MCF 52%). To ukazuje da je samo kod navedenog procenta ispitanika (55%, 39.3%, 52%) hipo-/disfibrinogenemija bila uzrok patoloških vrednosti tromboelastometrijskih parametara.

U svim ostalim slučajevima patološke vrednosti tromboelastometrijskih testova bile su rezultat poremećaja trombocita.

Stoga je EXTEM-CFT bio značajno specifičniji u detekciji hipofibrinogenemije, jer je kod 75% bolesnika bio produžen zbog hipofibrinogenemije. U preostalih 25% (s obzirom da je FIBTEM-MCF bio normalan) povišene vrednosti EXTEM-CFT bile su, verovatno, rezultat poremećaja trombocita.

S druge strane, snižen fibrinogen nije uvek bio praćen sniženim vrednostima FIBTEM-MCF. Uprkos sniženom fibrinogenu, 22.2% bolesnika imalo je zadovoljavajući hemostatski odgovor.

Važna činjenica je da je 14.6% bolesnika sa koncentracijom fibrinogena u normalnom opsegu imalo snižen FIBTEM-MCF, što ukazuje na postojanje poremećaja polimerizacije fibrina (Tabela 26).

Tabela 26. Distribucija bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na referentne vrednosti broja trombocita, koncentracije fibrinogena, vrednosti FIBTEM-MCF i parametara skrining TEM[®] testova.

		FIBTEM-MCF			
		SNIŽENA VREDNOST	NORMALNA VREDNOST	POVIŠENA VREDNOST	<i>p</i>
EXTEM- CFT	<i>Snižen</i>	0	0	0	<0.001*
	<i>Normalan</i>	4 (8.3%)	35 (72.9%)	9 (18.8%)	
	<i>Povišen</i>	9 (75%)	3 (25%)	0	
INTEM- CFT	<i>Snižen</i>	0	0	0	0.002*
	<i>Normalan</i>	2 (6.2%)	22 (68.8%)	8 (25%)	
	<i>Povišen</i>	11 (39.3%)	16 (57.1%)	1 (3.6%)	
EXTEM- MCF	<i>Snižen</i>	11 (55%)	9 (45%)	0	<0.001*
	<i>Normalan</i>	2 (5.3%)	28 (73.7%)	8 (21%)	
	<i>Povišen</i>	0	1 (50%)	1 (50%)	
INTEM- MCF	<i>Snižen</i>	13 (52%)	11 (44%)	1 (4%)	<0.001*
	<i>Normalan</i>	0	27 (79.4%)	7 (20.6%)	
	<i>Povišen</i>	0	0	1	
Trombociti	<i>Snižen</i>	13 (25%)	34 (65.4%)	5 (9.6%)	<0.008*
	<i>Normalan</i>	0	4 (50%)	4 (50%)	
	<i>Povišen</i>	0	0	0	
Fibrinogen	<i>Snižen</i>	7 (77.8%)	2 (22.2%)	0	<0.001*
	<i>Normalan</i>	6 (14.6%)	33 (80.5%)	2 (4.9%)	
	<i>Povišen</i>	0	3 (30%)	7 (70%)	

4.5.4. UTICAJ TROMBOCITA I FIBRINOGENA NA VREDNOSTI PARAMETARA TROMBOELASTOMETRIJE

Svi bolesnici sa alkoholnom cirozom koji su imali pruduženu vrednost CFT u tromboelastometrijskim testovima EXTEM i INTEM i sniženu vrednost MCF u testovima EXTEM, INTEM i FIBTEM istovremeno su imali broj trombocita ispod referentnih vrednosti, dok to nije bio slučaj sa koncentracijom fibrinogena (Tabela 27).

Tabela 27. Distribucija bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na referentne vrednosti CFT i MCF i poređenje sa referentnim vrednostima broja trombocita i nivoa fibrinogena.

		TROMBOCITI			FIBRINOGEN	
		SNIŽENI	NORMALNI	SNIŽEN	NORMALAN	POVIŠEN
EXTEM- CFT	<i>Snižen</i>	0	0	0	0	0
	<i>Normalan</i>	40 (83.3%)	8 (16.7%)	4 (8.3%)	34 (70.8%)	10 (20.8%)
	<i>Povišen</i>	12 (100%)	0	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0
INTEM- CFT	<i>Snižen</i>	0	0	0	0	0
	<i>Normalan</i>	24 (75%)	8 (25%)	3 (9.4%)	20 (62.5%)	9 (28.1%)
	<i>Povišen</i>	28 (100%)	0	6 (21.4%)	21 (75%)	1 (3.6%)
EXTEM- MCF	<i>Snižen</i>	20 (100%)	0	7 (35%)	13 (65%)	0
	<i>Normalan</i>	32 (84.2%)	6 (15.8%)	2 (5.3%)	28 (73.7%)	8 (21.1%)
	<i>Povišen</i>	0	2 (100%)	0	0	2 (100%)
INTEM- MCF	<i>Snižen</i>	25 (100%)	0	7 (28%)	17 (68%)	1 (4%)
	<i>Normalan</i>	27 (79.4%)	7 (20.6%)	2 (5.9%)	24 (70.6%)	8 (23.5%)
	<i>Povišen</i>	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)
FIBTEM- MCF	<i>Snižen</i>	13 (100%)	0	7 (53.8%)	6 (46.2%)	0
	<i>Normalan</i>	34 (89.5%)	4 (10.5%)	2 (5.3%)	33 (86.8%)	3 (7.9%)
	<i>Povišen</i>	5 (55.6%)	4 (44.4%)	0	2 (22.2%)	7 (77.8%)

Kod bolesnika sa patološkim vrednostima parametara CFT i MCF (produžen CFT i snižen MCF), verovatnoća prisustva trombocitopenije iznosi 100%. Međutim, nisu svi pacijenti sa trombocitopenijom imali patološke vrednosti parametara CFT i MCF. Patološki TEM[®] parametri izmereni su samo kod manjeg procenta bolesnika sa trombocitopenijom. Drugim rečima, veći procenat bolesnika sa trombocitopenijom imao je normalne parametre u tromboelastometrijskim testovima.

U Tabeli 28 prikazani su bolesnici koji su istovremeno imali trombocitopeniju i normalne vrednosti TEM[®] parametara. Bolesnici su podeljeni u odnosu na koncentraciju fibrinogena (snižena, normalna, povišena).

Tabela 28. Prikaz koncentracije fibrinogena kod bolesnika sa trombocitopenijom i normalnim vrednostima TEM[®] parametara.

	TEM [®] parametri	FIBRINOGEN			Ukupan broj bolesnika sa trombocitopenijom i normalnim vrednostima TEM [®] parametara
		SNIŽEN	NORMALAN	POVIŠEN	
NORMALNE VREDNOSTI	EXTEM- CFT	4	30	6	40
	INTEM- CFT	3	16	5	24
	EXTEM- MCF	2	24	6	32
	INTEM- MCF	2	20	5	27
	FIBTEM- MCF	2	31	1	34

Veći procenat bolesnika sa trombocitopenijom (n=52) imao je normalne vrednosti parametara CFT i MCF u tromboelastometrijskim skrining testovima: EXTEM-CFT (n=40), INTEM-CFT (n=24), EXTEM-MCF (n=32), INTEM-MCF (n=27).

Uzimajući u obzir činjenicu da je većina ovih bolesnika imala normalnu odnosno povišenu koncentraciju fibrinogena, može se pretpostaviti da je trombocitopenija kompenzovana hiperfibrinogenemijom.

Drugim rečima, pri formiranju krvnog ugruška dobra funkcionalna aktivnost fibrinogena može kompenzovati antihemostatski uticaj sniženog broja trombocita.

4.5.5. PARAMETRI TROMBOELASTOMETRIJE U PRISUSTVU I ODSUSTVU TEŠKE TROMBOCITOPENIJE

Ispitivani su parametri tromboelastometrije kod bolesnika sa teškom trombocitopenijom (definisana brojem trombocita ispod $50 \times 10^9/L$) i bolesnika sa brojem trombocita iznad $50 \times 10^9/L$ (Tabela 29).

Tabela 29. Parametri tromboelastometrije kod bolesnika sa brojem trombocita ispod i iznad $50 \times 10^9/L$.

PARAMETRI TEM [®]	BROJ TROMBOCITA		p
	< $50 \times 10^9/L$	> $50 \times 10^9/L$	
EXTEM-CFT	snižen	0	0.086
	normalan	6 (12.5%)	
	povišen	4 (33.3%)	
INTEM-CFT	snižen	0	0.108
	normalan	3 (9.4%)	
	povišen	7 (25%)	
EXTEM-MCF	snižen	5 (25%)	0.195
	normalan	5 (13.2%)	
	povišen	0	
INTEM-MCF	snižen	7 (28%)	0.047*
	normalan	3 (8.8%)	
	povišen	0	

Nije uočena značajna razlika u učestalostima patoloških vrednosti ispitivanih parametara TEM[®] između bolesnika sa teškom trombocitopenijom i bolesnika sa brojem trombocita $>50 \times 10^9/L$. Kod bolesnika sa brojem trombocita $>50 \times 10^9/L$ zabeležena je visoka učestalost patoloških vrednosti ispitivanih parametara TEM[®]. Takođe, između bolesnika sa teškom trombocitopenijom i bolesnika sa brojem trombocita $>50 \times 10^9/L$ razlika nije bila statistički značajna u pogledu učestalosti normalnih vrednosti ispitivanih parametara, jer je i visok procenat bolesnika sa teškom trombocitopenijom imao parametre TEM[®] u referentnim granicama.

Jedina uočena statistička razlika odnosila se na rezultat koji je pokazao da je značajno manji procenat bolesnika sa normalnim INTEM-MCF imao tešku trombocitopeniju (svega 3/34 bolesnika sa normalnim INTEM-MCF, tj. 8.8%).

Uzimajući u obzir činjenicu da na ispitivane tromboelastometrijske parametre utiče i koncentracija fibrinogena, analizirana je raspodela bolesnika sa teškom trombocitopenijom (n=10) u odnosu na referentne vrednosti koncentracije fibrinogena i parametara TEM[®] (Tabela 30).

Tabela 30. Raspodela bolesnika sa teškom trombocitopenijom (n=10) u odnosu na referentne vrednosti koncentracije fibrinogena i parametara TEM[®].

PARAMETRI TEM [®]		FIBRINOGEN KOD BOLESNIKA SA TEŠKOM TROMBOCITOPENIJOM [n=10]		
		SNIŽEN	NORMALAN	POVIŠEN
EXTEM-CFT	snižen			
	normalan		4	2
	povišen	1	3	
INTEM-CFT	snižen			
	normalan		2	1
	povišen	1	5	1
EXTEM-MCF	snižen	1	4	
	normalan		3	2
	povišen			
INTEM-MCF	snižen	1	5	1
	normalan		2	1
	povišen			

Istovremeno prisustvo teške trombocitopenije i hiperfibrinogenemije uočeno je samo kod dva bolesnika. Oba bolesnika imala su normalne vrednosti parametara CFT i MCF u spoljnjem putu koagulacije (EXTEM test). Može se pretpostaviti postojanje kompenzatorne aktivnosti hiperfibrinogenemije u odnosu na tešku trombocitopeniju, koja u nekim slučajevima rezultuje normalnim vrednostima parametara TEM[®].

Kod jednog od ova dva bolesnika, izmerene su normalne vrednosti parametara CFT i MCF u unutarnjem putu koagulacije (INTEM test). U prisustvu hiperfibrinogenemije, kod drugog bolesnika zabeležene su patološke vrednosti parametara TEM[®].

Dobijeni rezultati ukazuju da teška trombocitopenija nema značajno različit uticaj na pojavu patoloških vrednosti parametara TEM[®] u odnosu na trombocitopeniju definisanu brojem trombocita $>50 \times 10^9/L$.

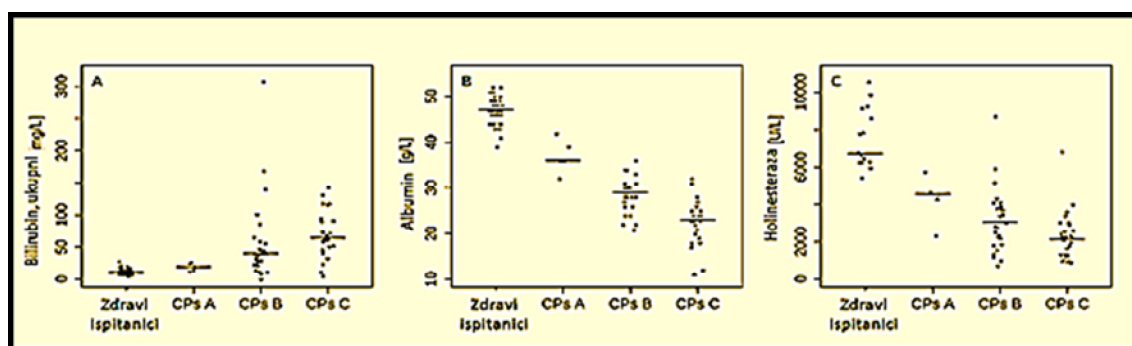
4.6. KORELACIJE GLOBALNIH TESTOVA HEMOSTAZE SA METABOLIČKOM I SINTETSKOM FUNKCIJOM JETRE

Parametri metaboličke i sintetske funkcije jetre u odnosu na Child-Pugh skor prikazani su u Tabeli 31. Uočen je značajan porast ukupnog bilirubina sa porastom težine oštećenja jetre, kao i značajano niže vrednosti parametara sintetske funkcije jetre (albumin i holinesteraza) kod većih stadijuma CP skora.

Tabela 31. Parametri metaboličke i sintetske funkcije jetre kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na Child-Pugh skor.

Varijable (referentni opseg)	CHILD PUGH SKOR			p	
	A	B	C		
Ukupni bilirubin (<20.5µmol/L)	Medijana (opseg)	19.3 (12.4-26.6)	40.2 (8.6-308)	64.7 (4.4-142.4)	0.001*
	normalan	3 (33.3%)	4 (44.4%)	2 (22.2%)	0.011*
	povišen	2 (3.9%)	24 (47.1%)	25 (49%)	
Albumin (34-55g/L)	Medijana (opseg)	36 (32-42)	29 (21-36)	23 (11-32)	<0.001*
	snižen	1 (1.8%)	27 (49.1%)	27 (49.1%)	<0.001*
	normalan	4 (80%)	1 (20%)	0	
Holinesteraza (3900-11500U/L)	Medijana (opseg)	4554 (2346-5762)	3068 (734-8697)	2145 (910-6826)	0.003*
	snižena	1 (2.1%)	21 (44.7%)	25 (53.2%)	0.001*
	normalna	4 (30.8%)	7 (53.8%)	2 (15.4%)	

Vrednosti ukupnog bilirubina, albumina i holinesteraze u odnosu na Child-Pugh skor kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika prikazane su na Grafikonu 20.



Grafikon 20. Vrednosti (A) bilirubina, (B) albumina i (C) holinesteraze unutar kategorija Child-Pugh skora kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u poređenju sa zdravim ispitanicima. Horizontalna linija predstavlja medijanu.

Obzirom da su parametri ETP pokazali značajnu razliku u odnosu na kategorije Child-Pugh skora (Grafikon 5), analizirane su korelacije Cmax i AUC sa ukupnim bilirubinom, albuminom i holinesterazom. Uočena je umerena korelacija holinesteraze sa Cmax ($r=0.348$; $p=0.007$) i jaka korelacija sa AUC ($r=0.610$; $p<0.001$). Albumin je pokazao umerenu korelaciju ($r=0.462$; $p<0.001$) sa AUC, dok je uočena slaba korelacija između ukupnog bilirubina i AUC ($r=-0.281$; $p=0.031$). Među svim parametrima tromboelastometrije, jedino je uočena slaba korelacija ($r=0.272$; $p=0.037$) između EXTEM-MCF i holinesteraze. Sveukupno, parametri ETP su pokazali značajne korelacije sa parametrima metaboličke i sintetske funkcije jetre.

4.7. PROCENA AKTIVNOSTI SISTEMA FIBRINOLIZE STANDARDNIM TESTOVIMA I TROMBOELASTOMETRIJOM

4.7.1. Ispitivanje fibrinolizne aktivnosti standardnim testovima

Prosečne vrednosti standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod ispitivanih grupa prikazane su u Tabeli 32.

Vreme lize euglobulina (VLE) kod svih ispitanika imalo je normalnu vrednost (>120 min), te dalje nije prikazivano.

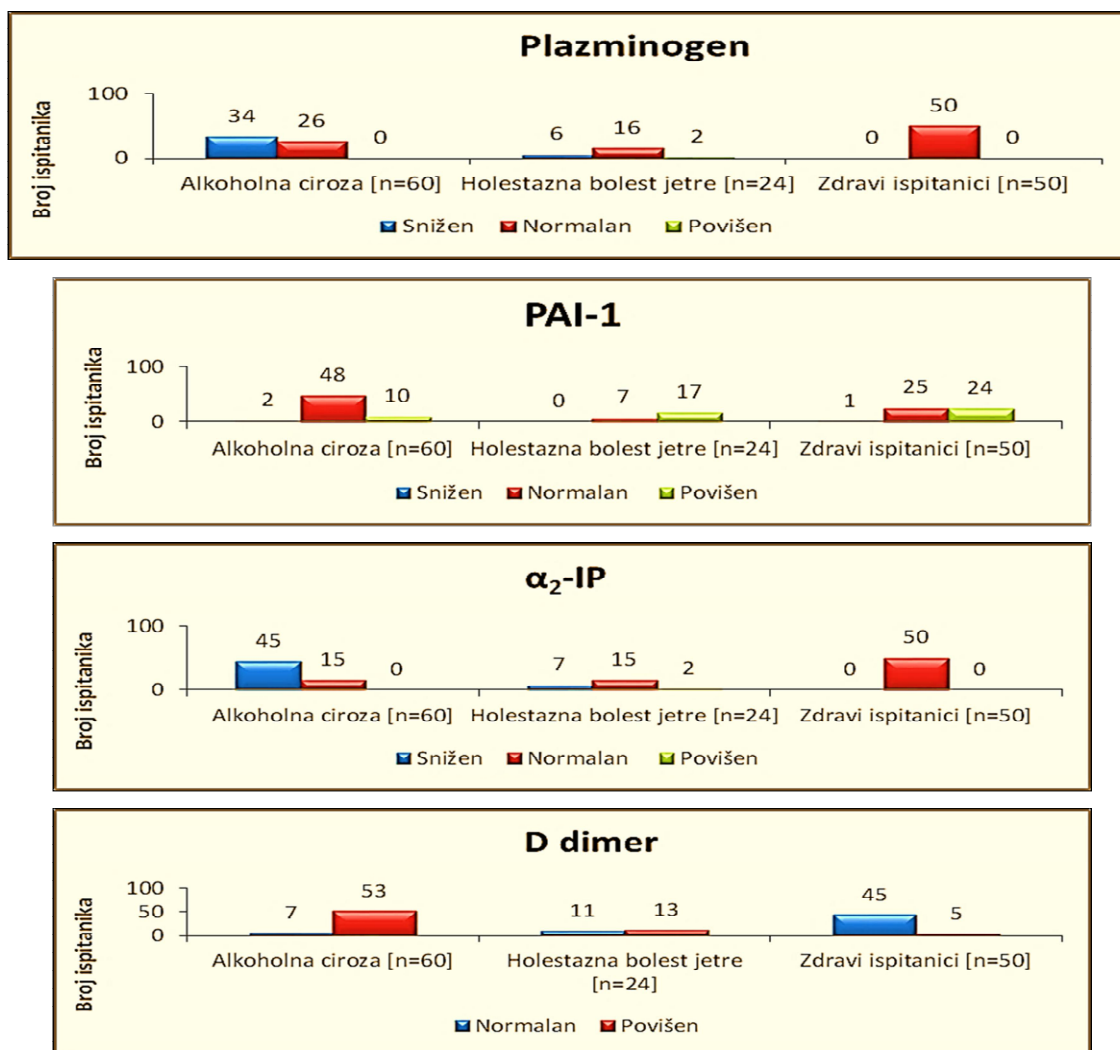
Tabela 32. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod ispitivanih grupa.

	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
Plazminogen	65.8±22.8 61 (24-112)	96.4±34.1 100 (45-152)	104.9±12.9 102 (82-134)	<0.001*	<0.001*	0.963
PAI-1	2.6±1.2 2.6 (0-6.1)	4.1±1.1 4.1 (2.4-6.1)	3.4±1.1 3.7 (0-5.5)	<0.001*	0.004*	0.017*
α₂-IP	59.9±17.5 60 (9-107)	81.7±23.8 84.5 (43-120)	95.3±9.9 93 (74-116)	<0.001*	<0.001*	0.138
D-dimer	4.3±4.7 2.6 (0.26-24.42)	1.2±1.1 0.7 (0.28-4.24)	0.29±0.13 0.24 (0.17-0.61)	<0.001*	<0.001*	<0.001*

*p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.*

Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom svi ispitivani standardni testovi za procenu fibrinolizne aktivnosti bili su značajno različiti u odnosu na kontrolne grupe. Izmerene prosečne vrednosti plazminogena, PAI-1 i α_2 -IP bile su značajno niže ($p < 0.001$) kod bolesnika sa alkoholnom cirozom kako u odnosu na obolele od holestazne ciroze tako i u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane, prosečne vrednosti D-dimera bile su značajno više ($p < 0.001$) kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u poređenju sa obe kontrolne grupe.

Prosečne vrednosti PAI-1 i α_2 -IP nisu se značajno razlikovale između bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika. Distribucija sniženih, normalnih i povišenih vrednosti ispitivanih standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod bolesnika i zdravih ispitanika prikazana je na Grafikonu 21.



Grafikon 21. Distribucija sniženih, normalnih i povišenih vrednosti plazminogena, PAI-1, α_2 -IP i D-dimera kod ispitivanih grupa.

Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom uočeno je značajno opadanje prosečnih vrednosti plazminogena i značajan porast prosečnih vrednosti D-dimera sa povećanjem oštećenja funkcije jetre (Tabela 33).

Tabela 33. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na kategorije Child-Pugh skora.

	CHILD PUGH SKOR			p
	A	B	C	
Plazminogen	87.8±14.0	73.6±20.9	55.1±20.5	0.001*
	84 (76-112)	73 (43-112)	49.5 (24-106)	
PAI-1	2.9±0.7	2.5±0.8	2.5±1.5	0.268
	3 (2-3.7)	2.4 (0-3.7)	2.4 (0.1-6.1)	
α₂-IP	75.8±7.1	61.5±15.8	55.4±18.9	0.010
	71 (70-84)	63 (28-107)	54 (9-93)	
D-dimer	0.79±0.92	3.36±3.11	5.97±5.78	0.002*
	0.42 (0.26-2.43)	1.65 (0.33-11.03)	4.24 (0.70-24.42)	

* -postoji statistički značajna razlika.

4.7.2. Ispitivanje fibrinolizne aktivnosti tromboelastometrijom

Prosečne vrednosti maksimalne fibrinolizne aktivnosti izmerene tromboelastometrijom (parametar ML) kod ispitivanih grupa prikazane su u Tabeli 34.

Tabela 34. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti parametra ML u EXTEM i INTEM testovima kod ispitivanih grupa.

	ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
EXTEM	7.9±4.8	6.7±3.2	4.9±2.9	0.493	0.002*	0.042*
ML	7 (1-22)	7 (0-13)	5 (0-11)			
INTEM	7±4.2	6.4±2.6	5.7±3.2	0.756	0.160	0.387
ML	6 (0-20)	6 (0-12)	6 (0-12)			

p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.

Procenat lize krvnog ugruška u odnosu na MCF na kraju merenja (parametar ML) u INTEM testu nije se značajno razlikovao među ispitivanim grupama.

U EXTEM testu uočena je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima parametra ML kako između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika tako i između bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika.

U Tabeli 35 prikazana je distribucija normalnih i povišenih vrednosti parametra ML kod ispitivanih grupa.

Tabela 35. Distribucija normalnih i povišenih vrednosti parametra ML kod ispitivanih grupa.

		ALKOHOLNA CIROZA	HOLESTAZNA CIROZA	ZDRAVA POPULACIJA	p1	p2	p3
EXTEM ML	Normalna [0-15%]	55 (91.7%)	24 (100.0%)	50 (100.0%)	0.147	0.038*	1.000
	Povišena [>15%]	5 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
INTEM ML	Normalna [0-15%]	58 (96.7%)	24 (100.0%)	50 (100.0%)	0.368	0.195	1.000
	Povišena [>15%]	2 (3.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			

*p1 - (alkoholna vs. holestazna); p2 - (alkoholna vs. zdrava); p3 - (holestazna vs. zdrava); *- postoji statistički značajna razlika.*

U spoljnjem putu koagulacije, hiperfibrinoliza reprezentovana povišenom vrednošću parametra ML detektovana je kod 5 (8.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. Kod bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika nije uočena povišena fibrinolizna aktivnost. Prisustvo hiperfibrinolize značajno se razlikovalo između obolelih od alkoholne ciroze i zdrave populacije. Iako je hiperfibrinoliza utvrđena kod 2 (3.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom u unutarnjem putu koagulacije nije postojala značajnost razlike među ispitivanim grupama.

U Tabeli 36 prikazane su korelacije između prosečnih vrednosti parametara CT, MCF i ML u EXTEM i APTEM testovima u svim ispitivanim grupama. Nije uočena statistički značajna razlika ni kod jedne od ispitivanih grupa.

Tabela 36. Korelacije parametara TEM[®] određenih u EXTEM i APTEM testovima kod bolesnika i zdravih ispitanika.

		Alkoholna ciroza		p	Holestazna ciroza		p	Zdrava populacija		p
		EXTEM	APTEM		EXTEM	APTEM		EXTEM	APTEM	
CT		58.2±14.1 53 (39-103)	57.6±19.3 50 (31-112)	0.863	60.3±13.6 57 (36-91)	60.8±16.9 60.5 (35-106)	0.911	55.9±12.9 53.5 (39-94)	58.1±16.0 55.5 (32-116)	0.468
	MCF	56.1±8.9 57 (33-76)	58.3±16.2 57.5 (33-181)	0.354	65.5±9.0 67.5 (43-79)	65.2±8.4 67.5 (43-79)	0.882	66.2±4.0 66 (56-74)	65.9±3.8 67 (55-73)	0.685
ML		7.9±4.8 7 (1-22)	6.6±4.7 5.5 (0-23)	0.133	6.7±3.2 7 (0-13)	6.1±2.6 6 (0-11)	0.457	4.9±2.9 5 (0-11)	4.4±2.8 4 (0-11)	0.371

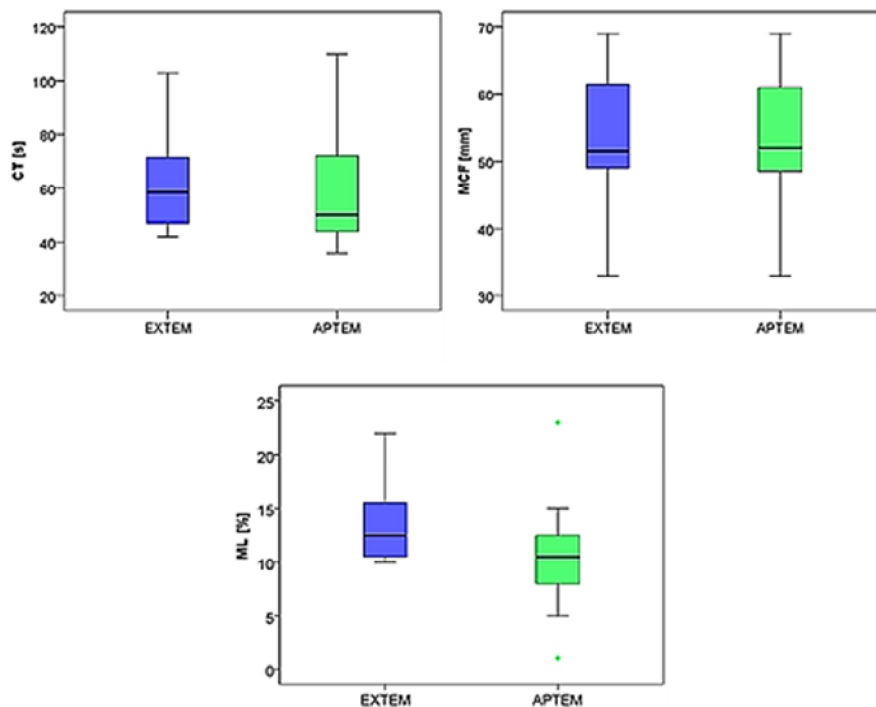
Ispitivana je podgrupa bolesnika (n=20) sa alkoholnom cirozom selektovana na osnovu vrednosti $ML \geq 10\%$ u EXTEM testu. Hipotetički navedena vrednost ML može ukazivati na tendenciju razvoja hiperfibrinolize. Kod 20 bolesnika sa alkoholnom cirozom kod kojih je izmerena vrednost $ML \geq 10\%$, analizirano je da li postoji razlika u prosečnim vrednostima parametara CT, MCF i ML u EXTEM i APTEM testovima (Tabela 37).

Tabela 37. Distribucija prosečnih vrednosti parametara CT, MCF i ML u EXTEM i APTEM testovima kod 20 bolesnika sa alkoholnom cirozom i vrednošću $EXTEM-ML \geq 10\%$.

	EXTEM	APTEM	p
CT [s]	61.35±17.254	59.20±20.938	0.795
MCF [mm]	54.25± 8.771	54.05±8.793	0.943
ML [%]	13.40±3.299	10.40±4.500	0.021*

Vrednosti parametara CT i MCF nisu se značajno razlikovale u EXTEM i APTEM testovima, ali su prosečne vrednosti ML bile značajno niže u APTEM testu u odnosu na vrednosti u EXTEM testu, što ukazuje na postojanje povišene fibrinolizne aktivnosti kod nekih bolesnika.

Na Grafikonu 22 ilustrovane su promene vrednosti CT, MCF i ML u APTEM testu u odnosu na vrednosti istih parametara u EXTEM testu kod 20 bolesnika sa vrednošću EXTEM-ML \geq 10%.



Grafikon 22. Uporedni prikaz vrednosti parametara CT, MCF i ML u EXTEM i APTEM testovima kod 20 bolesnika sa vrednošću EXTEM-ML \geq 10%. Horizontalna linija predstavlja medijanu.

Daljim ispitivanjem utvrđeno je da je fibrinolizna aktivnost inhibirana u APTEM testu (APTEM-ML $<$ 10%) kod 7/20 bolesnika sa vrednostima EXTEM-ML \geq 10%, što može ukazivati na postojanje hiperfibrinolize kod ovih bolesnika. Distribucija ovih 7 bolesnika u odnosu na Child-Pugh skor bila je: n[CPsA]=1; n[CPsB]=3; n[CPsC]=3.

Kod preostalih 13/20 bolesnika nije uočena inhibicija fibrinolizne aktivnosti u APTEM testu, što može ukazivati na uticaj drugih faktora na vrednost ML.

4.7.3. Korelacije standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti sa parametrima tromboelastometrije

U Tabeli 38 prikazane su korelacije standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti sa parametrima tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

Uočeno je da jedino parametar MCF korelira sa sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti (sa izuzetkom D-dimera) kako u EXTEM tako i u INTEM testu.

Tabela 38. Korelacije standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti sa parametrima tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

	EXTEM			INTEM		
	CT	MCF	ML	CT	MCF	ML
Plazminogen	-0.147 (0.272)	0.451 (<0.001*)	-0.106 (0.424)	-0.145 (0.272)	0.449 (<0.001*)	-0.112 (0.400)
PAI-1	0.047 (0.726)	0.386 (0.003*)	-0.015 (0.912)	-0.164 (0.219)	0.359 (0.006*)	0.027 (0.841)
α_2 -IP	-0.006 (0.964)	0.360 (0.005*)	-0.243 (0.066)	-0.097 (0.470)	0.364 (0.005*)	-0.091 (0.498)
D-dimer	0.215 (0.106)	-0.113 (0.396)	0.101 (0.447)	-0.145 (0.274)	-0.083 (0.534)	-0.036 (0.784)

4.7.4. Korelacije broja trombocita i nivoa fibrinogena sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametrima tromboelastometrije

U Tabeli 39 prikazane su korelacije broja trombocita i koncentracije fibrinogena sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametrima tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

U odnosu na ispitivane standardne testove za procenu fibrinolizne aktivnosti, trombociti nisu korelirali ni sa jednim od ispitivanih testova kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Nasuprot trombocitima, pokazano je da koncentracija fibrinogena značajno pozitivno korelira sa vrednostima plazminogena, PAI-1 i α_2 -IP, što je pokazatelj uticaja sintetske funkcije jetre.

U odnosu na parametre tromboelastometrije, značajna pozitivna korelacija utvrđena je između broja trombocita odnosno koncentracije fibrinogena i maksimalne čvrstoće krvnog ugruška kako u spoljnjem tako i u unutarnjem putu koagulacije.

Povezanost između maksimalne lize krvnog ugruška izmerene u tromboelastometrijskom testiranju i broja trombocita odnosno koncentracije fibrinogena nije uočena.

Tabela 39. Korelacije broja trombocita i koncentracije fibrinogena sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametarima tromboelastometrije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA		ZDRAVA POPULACIJA	
	Trombociti	Fibrinogen	Trombociti	Fibrinogen
Plazminogen	0.121 (0.361)	0.636 (<0.001*)	0.187 (0.193)	0.377 (0.007*)
PAI-1	0.193 (0.147)	0.530 (<0.001*)	0.235 (0.101)	0.177 (0.219)
α_2-IP	0.119 (0.373)	0.588 (<0.001*)	0.393 (0.005*)	0.133 (0.358)
D-dimer	0.189 (0.152)	-0.168 (0.202)	0.060 (0.683)	0.475 (0.001*)
EXTEM-CT	0.034 (0.798)	-0.016 (0.905)	0.116 (0.422)	-0.053 (0.716)
EXTEM-MCF	0.641 (<0.001*)	0.565 (<0.001*)	0.542 (<0.001*)	0.494 (<0.001*)
EXTEM-ML	0.034 (0.794)	-0.027 (0.836)	0.081 (0.576)	0.201 (0.162)
INTEM-CT	-0.401 (0.002*)	-0.245 (0.060)	-0.127 (0.379)	-0.142 (0.324)
INTEM-MCF	0.691 (<0.001*)	0.557 (<0.001*)	0.451 (0.001*)	0.491 (<0.001*)
INTEM-ML	-0.034 (0.796)	0.060 (0.650)	0.161 (0.263)	0.194.178)

4.7.5. Korelacije sintetske i metaboličke funkcije jetre sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i parametrima tromboelastometrije

U Tabeli 40 prikazane su korelacije parametara sintetske i metaboličke funkcije jetre u odnosu na ispitivane standardne testove za procenu fibrinolizne aktivnosti i maksimalnu lizu krvnog ugruška izmerenu u tromboelastometrijskom testiranju.

Uočeno je da aktivnost holinesteraze značajno korelira sa svim ispitivanim standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti.

Utvrđena je značajna korelacija između vrednosti albumina, sa jedne strane, i plazminogena, α_2 -IP i D-dimera, sa druge strane.

Bilirubin je korelirao samo sa plazminogenom i α_2 -IP. Nijedan od ispitivanih parametara sintetske i metaboličke funkcije jetre nije korelirao sa maksimalnom lizom krvnog ugruška izmerenom u tromboelastometrijskom testiranju.

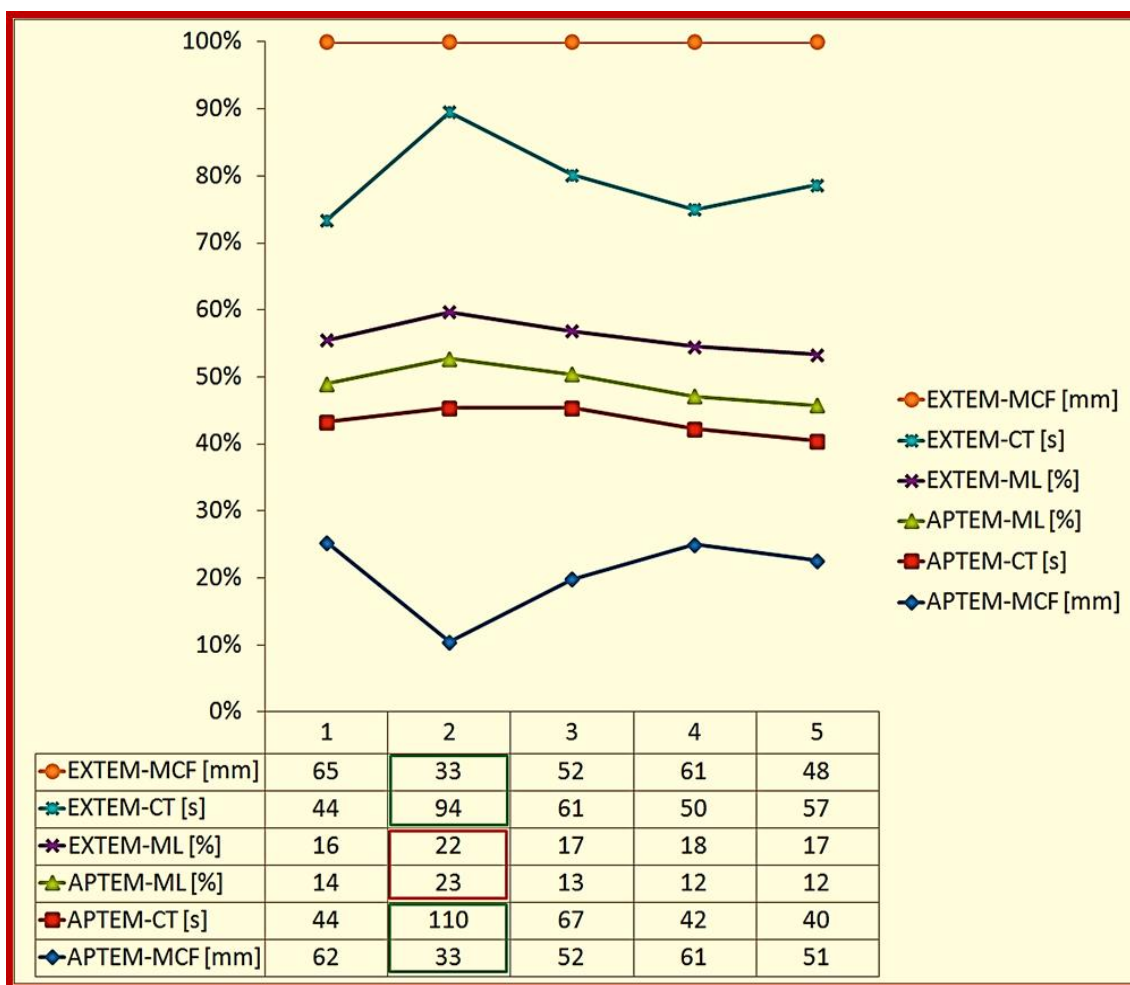
Tabela 40. Korelacije parametara sintetske i metaboličke funkcije jetre sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti i ML kod bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

	ALKOHOLNA CIROZA			ZDRAVA POPULACIJA		
	Holinesteraza	Albumin	Bilirubin	Holinesteraza	Albumin	Bilirubin
Plazminogen	0.467 (<0.001*)	0.569 (<0.001*)	-0.434 (0.001*)	0.452 (0.079)	0.124 (0.389)	-0.021 (0.883)
PAI-1	0.422 (0.001*)	0.204 (0.124)	-0.245 (0.064)	0.138 (0.611)	-0.149 (0.303)	0.319 (0.024*)
α_2-IP	0.500 (<0.001*)	0.468 (<0.001*)	-0.516 (<0.001*)	0.171 (0.526)	-0.016 (0.913)	0.138 (0.340)
D-dimer	-0.443 (0.001*)	-0.444 (<0.001*)	0.106 (0.426)	-0.055 (0.838)	0.314 (0.028)	-0.221 (0.128)
EXTEM-ML	-0.127 (0.339)	-0.124 (0.343)	0.153 (0.242)	0.147 (0.587)	0.214 (0.135)	0.207 (0.148)
INTEM-ML	-0.086 (0.516)	-0.034 (0.798)	0.170 (0.194)	0.191 (0.478)	0.088 (0.541)	0.095 (0.511)

4.7.6. Laboratorijske i kliničke odlike bolesnika sa hiperfibrinolizom

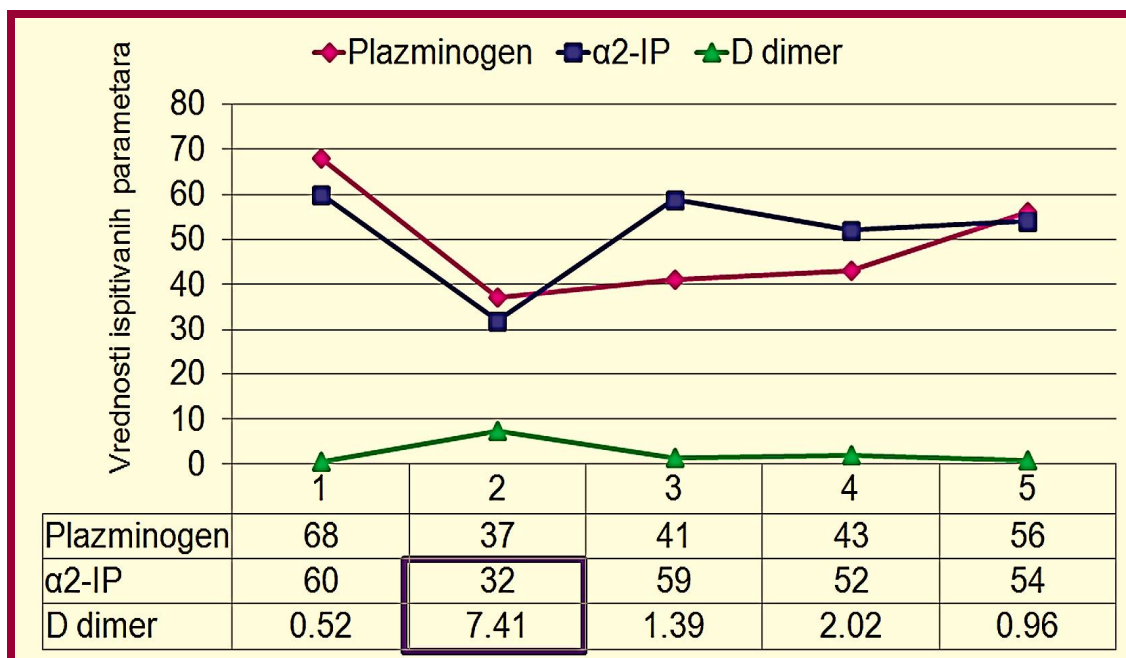
Hiperfibrinoliza definisana vrednošću EXTEM-ML>15% utvrđena je kod 5 bolesnika sa alkoholnom cirozom (n[CPsB]=1; n[CPsC]=4). Kod 4/5 bolesnika hiperfibrinoliza je potvrđena u APTEM testu (n[CPsB]=1; n[CPsC]=3). Kod svih 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom zabeležene su snižene vrednosti plazminogena i α_2 -IP i povišene vrednosti D-dimera, dok su izmerene normalne vrednosti PAI-1.

Na Grafikonu 23 prikazane su vrednosti parametara tromboelastometrije kod 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom definisanom vrednošću EXTEM-ML>15%. Hiperfibrinoliza nije potvrđena u APTEM testu kod bolesnika pod rednim brojem 2, ali su kod istog bolesnika zabeležene izrazito snižene vrednosti MCF odnosno produžene vrednosti CT u EXTEM testu.



Grafikon 23. Uporedni prikaz vrednosti parametara tromboelastometrije kod bolesnika sa hiperfibrinolizom.

Na Grafikonu 24 prikazane su vrednosti standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod bolesnika sa hiperfibrinolizom definisanom vrednošću EXTEM-ML>15%. Primećeno je da je vrednost D-dimera bila najviša kod bolesnika (bolesnik pod rednim brojem 2) kod kojeg hiperfibrinoliza nije potvrđena u APTEM testu. Povišena vrednost D-dimera može ukazivati na smanjenu detoksikacionu sposobnost jetre i prisustvo ascitne tečnosti.



Grafikon 24. Uporedni prikaz vrednosti standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti kod bolesnika sa hiperfibrinolizom.

U Tabeli 41 prikazane su kliničke odlike bolesnika sa hiperfibrinolizom definisanom vrednošću EXTEM-ML>15%.

Prikazane kliničke odlike se odnose na prisustvo/odsustvo portne hipertenzije/krvarenja iz variksa i na prisustvo/odsustvo tromboze vene porte.

Bolesnik pod rednim brojem 2 nije ispoljio krvarenje iz variksa, ali je imao ascites. S obzirom da trombozne komplikacije nisu klinički manifestovane, moguće je da je ascites doprineo porastu D-dimera kod ovog bolesnika.

Tabela 41. Kliničke manifestacije kod bolesnika sa hiperfibrinolizom.

Kliničke manifestacije	REDNI BROJ BOLESNIKA SA HIPERFIBRINOLIZOM [CHILD PUGH SKOR]				
	1 [CPsB]	2 [CPsC]	3 [CPsC]	4 [CPsC]	5 [CPsC]
Portna hipertenzija	+	+	+	-	+
Variksi jednjaka	+	+	+	-	+
Variksi želuca	-	-	-	-	-
Krvarenje iz variksa	+	-	+	-	+
Ascites	-	+	-	+	-
Tromboza vene porte	-	-	-	-	-

Ispitivanjem svih bolesnika sa alkoholnom cirozom (n=60) pokazano je da EXTEM-ML ne korelira sa standardnim testovima za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti (Tabela 38). Kod 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom postojala je izuzetno jaka korelacija između vrednosti EXTEM-ML, sa jedne strane, i vrednosti α_2 -IP i D-dimera, sa druge strane (Tabela 42).

Tabela 42. Korelacije standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti sa EXTEM-ML kod 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom.

	Plazminogen	PAI-1	α_2 -IP	D-dimer
EXTEM-ML	-0.821 (0.089)	0.316 (0.684)	-0.975 (0.005*)	0.975 (0.005*)

U saglasnosti sa rezultatima ispitivanja svih bolesnika sa alkoholnom cirozom (Tabela 39), u ovoj podgrupi bolesnika nisu utvrđene korelacije između vrednosti EXTEM-ML, sa jedne strane, i broja trombocita ($r=-0.526$, $p=0.362$) i koncentracije fibrinogena ($r=-0.205$, $p=0.741$), sa druge strane. U saglasnosti sa rezultatima ispitivanja svih bolesnika sa alkoholnom cirozom (Tabela 40), parametri sintetske i metaboličke funkcije jetre nisu korelirali sa vrednošću EXTEM-ML u ovoj podgrupi bolesnika (Tabela 43).

Tabela 43. Korelacije parametara sintetske i metaboličke finkcije jetre sa EXTEM-ML kod 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom.

	Holinesteraza	Albumin	Ukupan bilirubin
EXTEM-ML	-0.359 (0.553)	-0.821 (0.089)	0.462 (0.434)

4.7.7. Odnos standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara tromboelastometrije sa prisustvom ascitesa

U poređenju sa bolesnicima kod kojih nije bilo ascitesa, kod bolesnika koji su imali ascites zabeležene su značajno niže vrednosti plazminogena, PAI-1, α_2 -IP i MCF u EXTEM i INTEM testovima, kao i značajno povišene vrednosti EXTEM-ML i D-dimera (renalna insuficijencija, zastoj tečnosti) (Tabela 44).

Tabela 44. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara TEM[®] u odnosu na prisustvo ascitesa kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

	ASCITES		p
	Prisutan	Odsutan	
Plazminogen	62.4±22.9	93.9±25.9	<0.001*
	52 (24-106)	96 (41-152)	
PAI-1	2.6±1.4	3.3±1.1	0.012*
	2.6 (0.1-6.1)	3.4 (0.0-6.1)	
α_2-IP	57.9±18.3	83.2±20.8	<0.001*
	58 (9-93)	87 (28-120)	
D-dimer	5.6±5.2	1.0±1.6	<0.001*
	4.0 (0.4-24.4)	0.4 (0.2-8.1)	
EXTEM-CT	59.0±15.4	59.0±13.5	0.518
	53 (39-103)	56 (36-94)	
EXTEM-MCF	55.9±9.3	63.2±8.4	<0.001*
	58 (33-76)	66 (42-76)	
EXTEM-ML	7.9±4.9	6.4±3.4	0.005*
	7 (2-22)	6 (0-17)	
INTEM-CT	180.9±22.9	166.3±24.1	0.163
	184 (129-235)	161 (127-240)	
INTEM-MCF	53.6±9.5	59.6±8.1	<0.001*
	54 (31-73)	62 (39-73)	
INTEM-ML	7.1±4.2	6.5±2.9	0.061
	7 (0-20)	6 (0-12)	

4.7.8. Odnos standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara tromboelastometrije sa krvarenjem iz variksa

U poređenju sa bolesnicima koji nisu ispoljili krvarenje, kod bolesnika koji su imali manifestno krvarenje iz variksa jednjaka i/ili želuca zabeležene su značajno niže vrednosti plazminogena, α_2 -IP i MCF u EXTEM i INTEM testovima, kao i značajno povišen D-dimer. Nije uočena značajna razlika u odnosu na maksimalnu lizu krvnog ugruška izmerenu u tromboelastometrijskom testiranju između bolesnika sa/bez krvarenja iz variksa (Tabela 45).

Tabela 45. Distribucija prosečnih vrednosti, medijana i opsega vrednosti standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i parametara TEM[®] u odnosu na prisustvo krvarenja iz variksa kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.

	KRVARENJE IZ VARIKSA JEDNJAKA I/ILI ŽELUCA		p
	Prisutno [n=28]	Odsutno [n=32]	
Plazminogen	71.1±23.9	87.3±29.5	<0.001*
	73 (33-112)	91 (24-152)	
PAI-1	2.9±1.2	3.2±1.3	0.141
	2.9 (0.6-6.1)	3.4 (0.0-6.1)	
α_2-IP	64.1±16.5	78.1±24.0	<0.001*
	61 (24-107)	84.5 (9-120)	
D-dimer	4.9±5.6	1.8±2.9	<0.001*
	3.3 (0.3-24.4)	0.5 (0.2-19.3)	
EXTEM-CT	59.8±14.5	58.8±14.0	0.446
	57 (42-103)	55 (36-94)	
EXTEM-MCF	57.6±9.1	61.8±9.3	0.002*
	56 (42-76)	65 (33-76)	
EXTEM-ML	7.5±4.9	6.7±3.6	0.106
	6 (1-17)	6.5 (0-22)	
INTEM-CT	182.9±29.0	167.4±22.0	0.128
	184 (129-240)	163.5 (127-219)	
INTEM-MCF	54.8±9.4	58.5±8.8	0.005*
	54 (39-73)	61 (31-73)	
INTEM-ML	5.2±3.5	7.2±3.2	0.738
	5 (0-12)	7 (0-20)	

4.7.7.1./4.7.8.1. Učestalost ascitesa i krvarenja iz variksa kod bolesnika suspektnih na prisustvo povišene aktivnosti fibrinoliznog sistema

U podgrupi bolesnika (n=20) sa alkoholnom cirozom selektovanih na osnovu vrednosti EXTEM-ML \geq 10% kod 7/20 bolesnika utvrđeno je da je fibrinolizna aktivnost inhibirana u APTEM testu (APTEM-ML<10%), što se smatra potvrdom postojanja povišene aktivnosti fibrinoliznog sistema.

Učestalosti ascitesa i krvarenja iz variksa kod bolesnika sa vrednošću EXTEM-ML \geq 10% prikazane su u Tabeli 46.

Utvrđeno je da nije postojala značajna povezanost između povišene fibrinolizne aktivnosti sa pojavom ascitesa i krvarenja iz variksa, jer su se ove komplikacije javljale u velikom procentu i kod bolesnika bez detektovane/suspektne povišene fibrinolizne aktivnosti.

Tabela 46. Učestalost ascitesa i krvarenja iz variksa kod bolesnika sa alkoholnom cirozom suspektnih na prisustvo povišene aktivnosti fibrinoliznog sistema.

		Suspektna povišena aktivnost fibrinoliznog sistema		p
		Prisutna [n=7]	Odsutna [n=13]	
Ascites	nema	1	4	0.613
	ima	6	9	
Krvarenje iz variksa jednjaka i/ili želuca	nema	2	7	0.374
	ima	5	6	

5. DISKUSIJA

Koagulacija se zasniva na kompleksnim interakcijama između ćelija i plazmatskih faktora sa složenim amplifikacionim i inhibicionim povratnim mehanizmima. Termin 'hemostaza' najbolje opisuje složene interakcije u ovom sistemu, naglašavajući osetljiv ekvilibrijum između prokoagulacionih i antikoagulacionih puteva, kao i između fibrinoliznih i antifibrinoliznih mehanizama¹⁵⁷.

Snižena aktivnost većine prokoagulacionih faktora i trombocitopenija predstavljaju glavne poremećaje hemostaze koji odlikuju hronično oboljenje jetre. Zbog toga, smatralo se da je hronično oboljenje jetre prototip stečene koagulopatije, koja je definisana vrednošću $INR > 1.5$ ^{157,296,297}. Ova definicija odražava centralnu ulogu jetre u hemostazi¹⁵⁷.

Bolesnici sa hroničnim oboljenjem jetre često imaju patološke standardne testove hemostaze i neretko krvare iz gastrointestinalnog trakta. Poremećaji hemostaze dugo su smatrani važnim kofaktorom u nastanku krvarenja. Bogata literatura svedoči o korisnosti testova hemostaze u predikciji krvarenja i kliničkoj evaluaciji hemostatskih lekova primenjenih u prevenciji i kontroli krvarenja²⁹⁸. Uobičajena je praksa rutinskog izvođenja standardnih skrining testova hemostaze (PT, aPTT, TT) kod bolesnika sa hroničnim oboljenjem jetre. Ova ustaljena praksa kreirala je paradigmu na osnovu koje su publikovani klinički vodiči sa preporukama specifičnih nivoa laboratorijskih parametara kao ciljeva za korekciju²⁹⁹. Uprkos nedostatku dokaza, vrednosti standardnih koagulacionih testova direktno se koriste u predviđanju stepena rizika krvarenja. Bolesnici sa patološkim testovima tretiraju se plazmom i prokoagulacionim agensima u cilju korekcije vrednosti laboratorijskih testova i prevencije krvarenja prilikom vršenja biopsije jetre i drugih invazivnih/hirurških procedura ili zaustavljanja krvarenja iz gastrointestinalnog trakta^{111,296}. Jedan od razloga zbog kojih je starija literatura konzistentna u pogledu gledišta o smanjenom koagulacionom i povećanom fibrinoliznom potencijalu kod ovih bolesnika delimično se može objasniti nedovoljnom inkorporiranošću antikoagulacionih i profibrinoliznih puteva u korišćenim metodologijama¹¹⁰.

Poslednjih godina ukazano je na postojanje rebalansirane hemostaze u cirozi, koja je posledica istovremenih poremećaja u prohemostatskim i antihemostatskim procesima. Rebalansirani sistem hemostaze može se lako narušiti u pravcu razvoja krvarenja odnosno tromboze, posebno kada je oboljenje jetre udruženo sa drugim patološkim stanjima^{107,111}.

Proces koagulacije se odvija kroz tri preklapajuće faze: inicijacija (na ćelijama koje izlažu TF), amplifikacija (aktivacija trombocita i kofaktora obezbeđuje uslove za stvaranje velike količine trombina) i propagacija (stvaranje velike količine trombina na površini aktiviranih

trombocita)³⁰⁰. Standardni testovi hemostaze nisu odgovarajući za procenu koagulacionog balansa zato što su dizajnirani za parcijalno ispitivanje hemostaze. Standardni testovi ispituju hemostazu u uzorcima plazme iz kojih su odstranjeni trombociti i druge ćelije. Ovi testovi ne kvantifikuju ukupno stvoreni i neutralizovani trombin, već ispituju samo ranu fazu formiranja krvnog ugruška. Drugim rečima, standardnim testovima meri se samo mala količina trombina koja je potrebna za formiranje inicijalnog krvnog ugruška. Konverzija fibrinogena u fibrin (zgrušavanje plazme) počinje nakon stvaranja do 5% ukupnog trombina, tako da standardni testovi ne detektuju preostalih 95% stvorenog trombina odnosno ne ispituju faze amplifikacije i propagacije koagulacionog procesa. Nadalje, standardni testovi se izvode u odsustvu TM. Put aPC, glavnog antikoagulacionog mehanizma inhibicije stvaranja trombina *in vivo*, nedovoljno se reflektuje ovim testovima zato što vremenski interval u toku kojeg se ispituje koagulacija nije dovoljan za značajnu aktivaciju PC. S obzirom da nisu senzitivni za antikoagulacione proteine, standardni testovi ne kvantifikuju balans između prohemostatskih i antihemostatskih procesa^{111,189,229,298}.

Uprkos činjenici da sve veći broj laboratorijskih dokaza i kliničkih iskustava potkrepljuje koncept rebalansirane hemostaze u cirozi i ukazuje na malu vrednost standardnih testova u predikciji perioperativnog krvarenja, ispitivanje sistema hemostaze globalnim testovima nije uvršteno u rutinsku kliničku praksu. Shodno tome, terapijske odluke se i dalje oslanjaju na rezultate standardnih testova hemostaze odnosno na preporuke vodiča koje se zasnivaju na ovim rezultatima.

Glavni cilj ove studije bio je analiziranje kompleksnih poremećaja hemostaze i ukupnog hemostatskog potencijala korišćenjem standardnih i globalnih testova hemostaze, kao i ispitivanje odnosa ovih testova pri proceni hemostatskog profila bolesnika sa alkoholnom cirozom. Rezultati testiranja sistema hemostaze bolesnika sa alkoholnom cirozom analizirani su u odnosu na rezultate dobijene testiranjem bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre i zdravih osoba. U ovoj studiji analiziran je i odnos hemostatskog potencijala bolesnika sa alkoholnom cirozom procenjenog globalnim testovima hemostaze sa indeksima oštećenja jetrine funkcije.

5.1. Standardni testovi hemostaze

Kod većine bolesnika sa alkoholnom cirozom, vrednosti standardnih koagulacionih testova ukazale su na smanjen hemostatski potencijal odnosno hipokoagulabilnost. Produžen PT, aPTT i TT izmereni su kod 58/60 (96.7%), 53/60 (88.3%) i 29/60 (48.3%) bolesnika. Snižene

aktivnosti faktora koagulacije detektovane su kod značajnog procenta bolesnika: FII (63.3%), FV (63.3%), FVII (78.3%), FIX (55%), FX (53.3%), FXI (68.3%), FXII (58.3%) i FXIII (43.3%). U poređenju sa zdravim ispitanicima utvrđena je značajna razlika prosečnih vrednosti u odnosu na sve ispitivane testove ($p < 0.001$). Značajnost razlike u prosečnim vrednostima ispitivanih parametara postojala je i između različitih etiologija ciroze. Snižen broj trombocita utvrđen je kod 52/60 (86.7%) bolesnika, pri čemu su srednje vrednosti bile značajno niže kako u odnosu na zdrave ispitanike tako i u odnosu na bolesnike saolestaznom cirozom ($p < 0.001$). Može se zaključiti da je prosečan broj trombocita snižen kod bolesnika sa alkoholnom cirozom, dok većina bolesnika saolestaznom cirozom ima normalan broj trombocita, ali značajno niži u odnosu na zdravu populaciju. Hipofibrinogenemija je utvrđena kod 9/60 (15%) obolelih. S druge strane, većina bolesnika sa alkoholnom iolestaznom cirozom imala je normalne i povišene aktivnosti FVIII i vWF. Prosečne aktivnosti FVIII i vWF značajno su se razlikovale između bolesnika i zdravih ispitanika ($p < 0.001$). Povišene aktivnosti FVIII i vWF izmerene su kod 31/60 (51.7%) i 58/60 (96.7%) bolesnika sa alkoholnom cirozom, odnosno kod 20/24 (83.3%) i 16/60 (66.7%) bolesnika saolestaznom cirozom.

U odnosu na antikoagulative puteve, utvrđene su očekujuće snižene vrednosti prirodnih antikoagulacionih proteina. Sniženu vrednost AT imalo je 50/60 (83.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom utvrđena je značajno niža prosečna vrednost AT u odnosu na bolesnike saolestaznom cirozom i zdrave ispitanike (52.7 ± 24.7 , 88.3 ± 26.7 , 99.5 ± 8.8 ; $p < 0.001$), dok nije postojala značajna razlika između bolesnika saolestaznom cirozom i zdravih ispitanika. Sniženu vrednost PC imalo je 48/60 (80%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. Prosečna vrednost PC bila je značajno niža kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u odnosu na bolesnike saolestaznom cirozom (47.6 ± 26.4 vs. 89.6 ± 40.4 ; $p < 0.001$) i zdrave ispitanike (47.6 ± 26.4 vs. 111.6 ± 18.5 ; $p < 0.001$). Bolesnici saolestaznom cirozom imali su značajno niže vrednosti PC u odnosu na zdrave osobe ($p = 0.004$).

Dobijeni rezultati govore u prilog rebalansirane hemostaze u hroničnom oboljenju jetre i u saglasnosti su sa drugim literaturnim podacima^{107,114,217}.

Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom, sa povećanjem stepena oštećenja jetrine funkcije (procenjeno Child-Pugh skorom) zabeleženo je, s jedne strane, povećanje prosečnih vrednosti aPTT i PT i, s druge strane, sniženje aktivnosti faktora koagulacije I, II, V, VII, IX, X, XI, XII i XIII. Najviša prosečna aktivnost vWF izmerena je kod bolesnika sa najtežim oštećenjem jetrine funkcije (CPsC:CPsA:CPsB= 401.1 ± 146.5 : 333.7 ± 119.8 : 332.5 ± 133.2). Istovremeno,

najniže prosečne vrednosti antikoagulacionih proteina (AT i PC) izmerene su kod bolesnika u stadijumu CPsC. Uočen je trend postepenog snižavanja aktivnosti AT i PC sa povećanjem težine oboljenja jetre. Nasuprot vWF, najviša aktivnost FVIII izmerena je kod bolesnika u stadijumu CPsA (244.2±147.0), potom CPsC (205.7±100.5) i CPsB (159.6±60.7). Prema literaturnim podacima, aktivnost FVIII povećava se sa pogoršanjem jetrine funkcije i najviša je u CPsC stadijumu (prosečno 200%)^{217,296}.

5.2. Globalni testovi hemostaze

Uprkos velikom progresu koji je učinjen u razumevanju poremećaja hemostaze kod bolesnika sa oboljenjem jetre, još uvek ima malo literaturnih podataka o primenljivosti globalnih testova u homogenoj grupi bolesnika sa alkoholnom cirozom. Do sada, nisu vršena međusobna poređenja rezultata globalnih testova hemostaze u ovoj kategoriji bolesnika. U ovoj studiji ispitivan je koagulacioni profil bolesnika sa cirozom i zdravih ispitanika korišćenjem testa za ispitivanje stvaranja trombina i tromboelastometrije. Glavni cilj ispitivanja bio je poređenje stepena koagulopatije kod bolesnika sa alkoholnom cirozom na osnovu procene nemodifikovanim testom za ispitivanje stvaranja trombina (ETP) i tromboelastometrijom. Dodatno, globalni testovi su korelirani sa standardnim koagulacionim testovima. Nadalje, ispitivana je korelacija rezultata globalnih testova sa kliničkim fenotipom bolesnika i sintetskom i metaboličkom funkcijom jetre. Savremeni testovi za merenje stvaranja trombina, koji se zasnivaju na kompjuterizovanom osmatranju endogenog potencijala za stvaranje trombina i kontinuiranoj vizualizaciji putem trombograma, ne koriste se kao rutinski testovi. Tromboelastometrija se koristi u rutinskoj kliničkoj praksi za procenu sistema hemostaze u različitim kliničkim situacijama i izvan specijalizovanih hematoloških laboratorija.

5.2.1. Endogeni potencijal za stvaranje trombina

U ovoj studiji, ETP parametri su ispitivani u uzorcima plazme siromašne trombocitima korišćenjem komercijalno dostupnog testa Innovance[®]. U ETP testu koagulacija se aktivira rekombinantnim tkivnim faktorom i fosfolipidima u odsustvu trombomodulina.

Slično rezultatima standardnih koagulacionih testova, testom ispitivanja stvaranja trombina utvrđen je hipokoagulabilan hemostatski profil odnosno smanjen potencijal za stvaranje trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Prolongirana faza inicijacije koagulacionog procesa reprezentovana vremenom t-lag zabeležena je kod 36/60 (60%) bolesnika, dok su kod značajno većeg procenta bolesnika detektovani sniženi maksimalan kapacitet za stvaranje

trombina i ukupna količina stvorenog trombina. Naime, snižene vrednosti Cmax i AUC utvrđene su kod 55/60 (91%) odnosno 49/60 (81.6%) bolesnika sa alkoholnom cirozom. Sa povećanjem težine oboljenja jetre uočeno je postepeno sniženje vrednosti Cmax i AUC, što ukazuje na povećanje stepena hipokoagulabilnosti kod bolesnika sa težim oštećenjem jetrine funkcije. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u vrednostima ovih parametara između bolesnika koji su pripadali kategorijama CPsA i CPsB.

U poređenju sa zdravim ispitanicima bolesnici sa alkoholnom cirozom imali su, s jedne strane, značajno više vrednosti t-lag ($30.1 \pm 10.8s$ vs. $25.6 \pm 14.2s$, $p < 0.001$) i, s druge strane, značajno niže vrednosti Cmax ($68.3 \pm 28.2\%$ vs. $112.0 \pm 20.9\%$, $p < 0.001$) i AUC ($67.9 \pm 16.4\%$ vs. $98.3 \pm 10.9\%$, $p < 0.001$). Ova opservacija nije u saglasnosti sa savremenim navodima u literaturi^{217,229,296,301,302}. Moguće objašnjenje za utvrđeno smanjeno stvaranje trombina kod naših bolesnika u odnosu na zdravu kontrolu je odsustvo trombomodulina u ETP testu. Tripodi i sar.²²⁹ su pokazali da dodatkom trombomodulina u testiranju rezultati ispitivanja ukazuju da bolesnici i zdravi ispitanici stvaraju komparabilnu količinu trombina. U ovim eksperimentalnim uslovima PC je u potpunosti aktiviran i koagulacija je rebalansirana zbog istovremenog smanjenja prokoagulacionih i antikoagulacionih proteina.

U studiji koja je ispitivala heterogenu grupu bolesnika sa različitim uzrocima ciroze, Gatt i sar.³⁰¹ izveli su iste zaključke u odnosu na potencijal za stvaranje trombina kod obolelih i zdravih ispitanika. Nasuprot Tripodi i sar.²²⁹, Gatt i sar.³⁰¹ su vršili ispitivanje nemodifikovanim testom za stvaranje trombina (bez trombomodulina) i utvrdili da samo 8.2% bolesnika ima snižene nivoe ETP parametara, što je značajno manje u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Moguće objašnjenje za utvrđen ne-afektovan potencijal za stvaranje trombina kod većine bolesnika ispitivanih u studiji Gatt i sar.³⁰¹ je razlika u metodologiji i selekciji bolesnika u odnosu na ovu studiju. Naime, Gatt i sar.³⁰¹ su ispitivali heterogenu grupu bolesnika bez dodatnog ispitivanja mogućih razlika u koagulacionom kapacitetu među podgrupama bolesnika sa različitim etiologijama ciroze. Zbog poznatog kompleksnog uticaja različitih patoloških stanja na sistem hemostaze, u ovoj studiji nisu ispitivani bolesnici sa cirozom drugih etiologija, kao ni bolesnici sa malignim oboljenjem (hiperkoagulabilno stanje je odlika holestazne ciroze i malignog oboljenja jetre).

Šta više, modifikovanim testom za stvaranje trombina sa dodatkom nefiziološkog aktivatora PC (Protac-komercijalno dostupan ekstrakt zmijskog otrova) Gatt i sar.³⁰¹ su utvrdili prokoagulacioni profil u plazmi bolesnika sa cirozom, odnosno značajno više vrednosti ukupnog trombina kod bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike. U skladu sa dobijenim rezultatima, autori su definisali heperkoagulabilan profil koagulopatije udružene sa cirozom.

U studiji koja je ispitivala heterogenu grupu bolesnika sa cirozom različitih etiologija, Kleinegris i sar.³⁰² su ispitivali koagulacioni status merenjem stvorenog trombina bez dodatka trombomodulina u korišćenom testu. Kleinegris i sar.³⁰² su utvrdili protrombozno stanje u plazmi bolesnika, što nije u saglasnosti sa zapažanjem Tripodi i sar.²²⁹. Ovi suprostavljeni rezultati su objašnjeni delovanjem različitih koncentracija fosfolipida, koje su korišćene u testovima za merenje stvorenog trombina (4 μ M naspram 0.5 μ M). U ovoj studiji, značajno veći broj bolesnika je imao teško oštećenje jetrine funkcije u poređenju sa bolesnicima koji su ispitivani u studiji Kleinegris i sar.³⁰². Naime, u ovoj studiji 28 bolesnika je klasifikovano u CPsB i 27 bolesnika u CPsC kliničke kategorije. U studiji Kleinegris i sar.³⁰² većina bolesnika (n=52) je imala kompenzovanu bolest, 15 bolesnika je klasifikovano u CPsB i samo 6 bolesnika u CPsC kategorije.

Nadalje, Kleinegris i sar.³⁰² su zapazili da je redukcija stvaranja trombina dodatkom trombomodulina oslabljena kod bolesnika sa težim stadijumom oboljenja jetre, što doprinosi hiperkoagulabilnosti kod ovih bolesnika. U nedostatku specifičnog razloga kao objašnjenja za povišeno stvaranje trombina u cirozi, potencijal za hiperkoagulabilnost (prokoagulacioni disbalans) protumačen je postojanjem 'parcijalne rezistencije' na aktivator PC (rezistencija na *in vitro* antikoagulaciono delovanje trombomodulina) u skladu sa značajno sniženom aktivnošću PC kod cirotičara^{296,301,302}.

Uz to, povišena aktivnost FVIII može uzrokovati rezistenciju aktiviranog PC. Povišena aktivnost FVIII (prokoagulacioni put) u kombinaciji sa sniženom aktivnošću PC (antikoagulacioni put) tipično odlikuju cirozu^{296,301}. Dodatno, ukazano je da se stepen rezistencije na trombomodulin ili Protac povećava sa povećanjem težine oštećenja jetrine funkcije i da je u direktnoj korelaciji sa aktivnošću FVIII odnosno u inverznoj korelaciji sa aktivnošću PC. Uporedo sa pogoršanjem jetrine funkcije povećava se aktivnost FVIII. U najtežoj formi ciroze (CPsC), srednja aktivnost FVIII iznosi 200%. Istovremeno, sniženje aktivnosti PC dostiže srednju vrednost od 40% u istoj kategoriji bolesnika. U skladu sa tim, odnos FVIII:PC preporučen je kao *indeks prokoagulacionog disbalansa*^{217,296}. Takođe, ukazano je da snižena aktivnost FV (aktiviran FV deluje kao kofaktor aktiviranom PC u inaktivaciji FVIII) može predstavljati razlog za rezistenciju na aktivator PC³⁰¹. Međutim, još uvek nije pokazano da *in vitro* utvrđena hiperkoagulabilnost odražava stanje koagulabilnosti *in vivo*²⁹⁶.

U ovoj studiji, hiperkoagulabilnost reprezentovana povišenom vrednošću maksimalnog kapaciteta za stvaranje trombina (Cmax) utvrđena je samo kod dva bolesnika sa teškom formom ciroze (CPsC). Klinički, kod ovih bolesnika nije dijagnostikovana tromboza vene

porte i druge trombozne komplikacije. S druge strane, kod nijednog bolesnika sa dijagnostikovanom trombozom vene porte (n=8) nije utvrđen povišen endogeni potencijal za stvaranje trombina.

5.2.2. Tromboelastometrija

Ispitivanjem sistema hemostaze metodom tromboelastometrije, u ovoj studiji je pokazano da bolesnici sa alkoholnom cirozom prosečno imaju niži hemostatski potencijal u odnosu na zdrave ispitanike, što je reprezentovano značajno višim vrednostima CFT odnosno nižim vrednostima MCF ($p < 0.001$). Za razliku od standardnih testova i ETP, ispitivanjem na individualnom nivou normalan hemostatski potencijal utvrđen je kod više od polovine bolesnika sa alkoholnom cirozom. Kod većine ostalih bolesnika ispitivanje je ukazalo na hipokoagulabilan hemostatski profil (produžen CFT kod 12/60 i 28/60 odnosno snižen MCF kod 20/60 i 25/60 bolesnika u EXTEM i INTEM testovima).

Sa povećanjem težine oboljenja jetre povećavala se učestalost hipokoagulabilnosti. Procenjeno na osnovu vrednosti MCF u EXTEM testu (marker za snižen hemostatski potencijal), hipokoagulabilnost je bila najzastupljenija kod bolesnika sa najtežim stepenom oštećenja jetrine funkcije [CPsC 11/20 (55%)], potom kod bolesnika sa umereno teškom cirozom [CPsB7/20 (35%)], dok su dva hipokoagulabilna bolesnika imala kompenzovanu bolest (CPsA). U INTEM testu dobijeni su slični rezultati (CPsA, 2/25-8%; CPsB, 9/25-36%; CPsC, 14/25-56%). Hiperkoagulabilnost u spoljnjem odnosno unutarnjem putu koagulacije utvrđena je kod dva odnosno jednog bolesnika sa umereno teškom cirozom (CPsB).

Moguće objašnjenje za veću učestalost hipokoagulabilnosti u unutarnjem u odnosu na spoljni put koagulacije je delovanje cirkulišućih endogenih heparinoida, čiji je uticaj na koagulacioni balans blokiran inhibitorom heparina u EXTEM testu. Pretpostavljeno je da endogeni heparinoidi doprinose poremećaju hemostaze kod onih cirotičara kod kojih bolest komplikuju portna hipertenzija, disfunkcija endotela i bakterijska infekcija^{166,219}.

U ovoj studiji utvrđena je dobra korelacija broja trombocita i koncentracije fibrinogena sa vremenom potrebnim za formiranje krvnog ugruška i sa maksimalnom čvrstoćom krvnog ugruška (CFT i MCF; $p < 0.001$). Obzirom da se srednja vrednost koncentracije fibrinogena nije značajno razlikovala između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika, ovi nalazi ukazuju na ključnu ulogu trombocita u determinisanju čvrstoće krvnog ugruška. Drugim rečima, faktori koagulacije su od manjeg značaja u odnosu na trombocite u formiranju krvnog ugruška kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Rezultati dobijeni u ovoj

studiji u saglasnosti su sa rezultatima Tripodi i sar.³⁰³, koji su metodom tromboelastometrije ispitivali koagulopatiju kod 51 bolesnika sa stabilnom cirozom. Rezultati obe studije potkrepljuju gledište prema kojem bolesnici sa stabilnom cirozom stvaraju normalnu količinu trombina u prisustvu dovoljnog broja trombocita. Kod bolesnika sa cirozom, pokazano je da broj trombocita oko $60 \times 10^9/L$ u plazmi bogatoj trombocitima obezbeđuje formiranje trombina, koje je ekvivalentno količini stvorenog trombina na nivou donjeg limita normalnog opsega kod zdravih osoba³⁰⁴.

U ovoj studiji ispitivana je razlika u vremenu formiranja i čvrstoći krvnog ugruška između bolesnika sa teškom trombocitopenijom, koja je definisana brojem trombocita $< 50 \times 10^9/L$, i bolesnika sa brojem trombocita $> 50 \times 10^9/L$. S jedne strane, visok procenat bolesnika sa brojem trombocita $> 50 \times 10^9/L$ imao je snižene vrednosti parametra MCF i, s druge strane, nisu svi bolesnici sa teškom trombocitopenijom imali afektovano vreme formiranja krvnog ugruška. Od 20 bolesnika sa sniženim EXTEM-MCF, 15 (75%) bolesnika imalo je broj trombocita $> 50 \times 10^9/L$, a samo kod 5 (25%) bolesnika utvrđena je teška trombocitopenija. Drugim rečima, definisanje teške trombocitopenije u odnosu na cut-off broja trombocita $< 50 \times 10^9/L$ ne daje korisnu kliničku informaciju o funkcionalnom potencijalu za stvaranje krvnog ugruška. Ovi nalazi ukazuju na ulogu aktivnosti i interakcija faktora koagulacije i drugih proteina u složenim procesima hemostaze i posledični uticaj na rezultate globalnih testova hemostaze.

5.3. Odnos globalnih i standardnih testova pri proceni hemostatskog profila bolesnika sa alkoholnom cirozom

Proces zgrušavanja se podudara sa prelaskom faze inicijacije u faze amplifikacije i propagacije koagulacione reakcije. Koagulacione faze su međusobno isprepletene, a količina stvorenog trombina determiniše efektivnost koagulacije. Struktura i stabilnost fibrinskog ugruška odražavaju efektivnost koagulacionog procesa. Obzirom da se količina trombina konstantno menja u toku procesa formiranja krvnog ugruška, konačna struktura fibrinskog hemostatskog ugruška je kompleksna funkcija modela stvaranja trombina^{3,5,60}.

U ovoj studiji ispitivan je uticaj maksimalne koncentracije trombina stvorene u toku procesa koagulacije i ukupne količine stvorenog trombina (mereno ETP testom) na strukturu i stabilnost definitivnog hemostatskog ugruška (mereno tromboelastometrijom). Utvrđene su značajne korelacije kako za Cmax tako i za AUC sa MCF pri čemu su najjače korelacije

zabeležene za EXTEM-MCF ($r=0.683$ i $r=0.608$; $p<0.001$). Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da je maksimalna koncentracija formiranog trombina glavna determinanta stabilnosti i čvrstoće definitivnog hemostatskog ugruška u spoljnjem putu koagulacije. Ovaj zaključak je izveden na osnovu zapažene bolje korelacije C_{max} sa MCF u odnosu na AUC kako kod bolesnika sa alkoholnom cirozom tako i kod zdravih ispitanika.

Ispitivanjem odnosa između aktivnosti faktora koagulacije i globalnih testova, za većinu koagulacionih proteaza zabeležene su bolje korelacije sa ETP parametrima u odnosu na MCF. Kod bolesnika sa alkoholnom cirozom, C_{max} je najjače korelirao sa FXII ($r=0.595$; $p<0.001$), FXI ($r=0.587$; $p<0.001$) i FVII ($r=0.438$; $p=0.001$), dok je korelacija sa trombocitima bila slaba ($r=0.349$; $p=0.007$). Ovi nalazi mogu ukazivati na pretpostavljenu ulogu reakcije kontaktne aktivacije u povećanju stvaranja trombina³⁰⁵, kao i na ulogu FXI kao 'booster' mehanizma (pojačivač) za stvaranje trombina u prokoagulacionim odgovorima⁵. U skladu sa pretpostavljenim rezultatom, protrombin (FII) je bio najznačajniji prediktor ukupne količine stvorenog trombina ($r=0.822$; $p<0.001$), a potom FV ($r=0.692$; $p<0.001$) i FX ($r=0.665$; $p<0.001$). U odnosu na C_{max} , zabeležena je bolja korelacija AUC sa trombocitima ($r=0.644$; $p<0.001$ vs. 0.349 ; $p=0.007$) i slabija sa fibrinogenom ($r=0.356$; $p<0.001$ vs. $r=0.406$; $p=0.001$).

Mada su trombociti od ključnog značaja za formiranje primarnog hemostatskog ugruška, stabilan definitivni trombocitno-fibrinski ugrušak ne može se formirati bez adekvatnog nivoa faktora koagulacije. Širok opseg aktivnosti faktora koagulacije je kompatibilan sa normalnom hemostatskom funkcijom, ali i u prisustvu normalnih nivoa faktora koagulacije varijacije u aktivnosti proteaza mogu uticati na brzinu i opseg stvaranja trombina. Efekat faktora koagulacije na stvaranje trombina je kompleksan. Varijacije u aktivnosti faktora koagulacije koji učestvuju u formiranju kompleksa tenaza (FVIII, FIX i FXI) primarno utiču na brzinu i maksimalnu koncentraciju stvorenog trombina, ali imaju mali uticaj na ukupnu količinu produkovanog trombina³⁰⁶. U eksperimentalnom sistemu ćelijskog modela koagulacije pokazano je da snižena aktivnost faktora koagulacije VIII, IX i XI $<50\%$ rezultuje u umerenom smanjenju stvaranja trombina, dok snižena aktivnost $<10-20\%$ ima za posledicu dramatično smanjenje stvaranja trombina³⁰⁷. Varijacije u aktivnosti FX imaju mali uticaj na stvaranje trombina, ukoliko deficit FX nije kombinovan sa deficitom drugih faktora koagulacije. Trombogram pokazuje odsustvo stvaranja trombina u slučaju nedostatka FX. Stvaranje trombina je smanjeno u prisustvu aktivnosti FX u opsegu $1-5\%$. Aktivnost $FX \geq 10\%$ normalizuje parametre trombograma. Varijacije u aktivnosti FV pokazuju minimalan efekat na sve parametre trombograma kod osoba sa normalnim brojem/funkcijom trombocita.

Zahvaljujući prisustvu FV u trombocitima, neutrališe se efekat sniženog plazmatskog FV^{306,307}. Uticaj aktivnosti protrombina na stvaranje trombina značajno se razlikuje u odnosu na druge faktore koagulacije. Brzina stvaranja, maksimalna aktivnost i ukupna količina produkovanog trombina linearno su proporcionalni aktivnosti protrombina³⁰⁶. Brzina stvaranja i maksimalna aktivnost trombina koja se postiže tokom formiranja krvnog ugruška značajno utiču na strukturu i stabilnost definitivnog fibrinskog ugruška³⁰⁸. To znači da svaka varijacija u funkcionalnoj aktivnosti protrombina može uticati na hemostatsku efikasnost definitivnog krvnog ugruška³⁰⁷. S druge strane, suprafiziološka aktivnost protrombina uzrokuje povećanje brzine stvaranja i ukupne količine produkovanog trombina. Pokazano je da povišena aktivnost protrombina korelira sa povećanim rizikom za razvoj arterijskih i venskih tromboza³⁰⁹. Snižena aktivnost protrombina je parametar koji najpreciznije ukazuje na efikasnost antikoagulacije kumadinom³¹⁰.

Razlike u korelacijama ispitivanih globalnih testova sa standardnim testovima hemostaze koje su opisane u ovoj studiji naglašavaju činjenicu da su ETP i tromboelastometrija različite metode koje odlikuju drugačiji principi merenja. ETP i tromboelastometrija određuju različita fizička svojstva krvnog ugruška u nejednakim uslovima (centrifugirana plazma odnosno cela krv). ETP meri *in vitro* kapacitet plazme za produkciju trombina. Tromboelastometrija predstavlja viskoelastičnu metodu koja omogućava odmeravanje interaktivnog dinamičnog procesa hemostaze u celoj krvi blisko odigravanju u *in vivo* uslovima. Tromboelastometrija ispituje sveobuhvatno formiranje krvnog ugruška uzimajući u razmatranje većinu aspekata procesa hemostaze, kao što su krvne ćelije (posebno trombociti), faktori koagulacije i inhibitori i proces fibrinolize. Zahvaljujući navedenim svojstvima tromboelastometrija odražava ukupan elasticitet definitivnog hemostatskog ugruška. Tromboelastometrija zavisi od stvaranja trombina i meri njegov efekat na formiranje krvnog ugruška^{279,286,287}.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju na prednost tromboelastometrije u odnosu na ETP, koja se ogleda u obezbeđivanju dodatne informacije o maksimalnoj čvrstoći i stabilnosti krvnog ugruška. Ova prednost tromboelastometrije u odnosu na ETP omogućava kliničku primenljivost metode kao funkcionalnog testa.

5.4. Odnos hemostatskog potencijala bolesnika sa alkoholnom cirozom procenjenog globalnim testovima hemostaze sa indeksima oštećenja jetrine funkcije

U ovoj studiji procenjivana je metabolička i sintetska funkcija jetre u odnosu na stepen težine ciroze i vršeno je ispitivanje korelacija biohemijske funkcije jetre sa globalnim testovima. Sa povećanjem težine oboljenja jetre zabeleženo je povećanje ukupnog bilirubina i sniženje nivoa/aktivnosti albumina i holinesteraze. Nasuprot zapažanju Tripodi i sar.³⁰³, u ovoj studiji nije utvrđena korelacija tromboelastometrijskih parametara CFT i MCF sa težinom oboljenja jetre. U studiji Tripodi i sar.³⁰³, CFT, MCF i PT-INR značajno su korelirali sa Child-Pugh i MELD (Model for End-Stage Liver Disease) skorom. Autori su postulirali MCF kao dobar indeks težine ciroze, koji je uporediv sa PT. U sadašnjoj praksi, PT je sastavni deo MELD skora koji predstavlja osnovu za sastavljanje liste bolesnika sa prioritetom za transplantaciju jetre³¹¹. U tom pogledu valjanost PT dovedena je u pitanje na temelju nepouzdanosti odnosno neuporedivih rezultata dobijenih u različitim laboratorijama u kojima je PT određivan drugačijim mernim sistemima. Ukazano je na neophodnost zamene PT, kao parametra za definisanje indeksa preživljavanja, odgovarajućim pouzdanijim testom³¹². To potkrepljuje ranije stavove prema kojima su rezultati PT izraženi kao INR validni za praćenje oralne antikoagulacione terapije antagonistima vitamina K, ali ne i za procenu hemostatskog potencijala bolesnika sa hroničnim oboljenjem jetre^{313,314}.

Obzirom da su se kod naših ispitanika ETP parametri značajno razlikovali među bolesnicima u različitim CPs kategorijama, analizirane su korelacije parametara Cmax i AUC sa aktivnošću holinesteraze i nivoima ukupnog bilirubina i albumina. ETP parametri su korelirali sa svim ispitivanim biohemijskim varijablama. Bolje korelacije su zabeležene za parametar AUC u odnosu na parametar Cmax. Aktivnost holinesteraze je korelirala sa oba ispitivana parametra, dok su za nivoe albumina i bilirubina zabeležene korelacije samo sa AUC ($r=0.462$; $p<0.001$ i $r=-0.281$; $p=0.031$). Među ispitivanim biohemijskim parametrima, najjača korelacija ($r=0.610$; $p<0.001$) je dobijena za aktivnost holinesteraze u odnosu na AUC.

Saglasno korelacijama TEM[®] parametara sa stepenom težine ciroze, nisu utvrđene korelacije parametara CFT i MCF sa nivoima albumina i ukupnog bilirubina. Zabeležena je slaba korelacija ($r=0.272$; $p=0.037$) između aktivnosti holinesteraze i EXTEM-MCF.

Na osnovu zabeleženog odnosa između ETP parametara i sintetske funkcije jetre, odnosno stepena težine ciroze, u ovoj studiji postavljena je hipoteza o mogućoj primenljivosti ETP

testa kao potencijalnog indikatora težine ciroze. Pri postavljanju navedene hipoteze uzeta je u obzir činjenica da parametri Cmax i AUC reprezentuju faze koagulacionog procesa koje se odvijaju nakon krajnje opservacione tačke standardnih testova. Literaturni podaci o sličnom ispitivanju kod cirotičara nedostaju.

5.5. Poređenje hemostatskog profila između bolesnika sa alkoholnom i holestaznom cirozom

U ovoj studiji vršeno je poređenje hemostatskog profila među bolesnicima sa alkoholnom i holestaznom cirozom. Utvrđene su statistički značajne razlike među etiologijama ciroze kako u pogledu standardnih tako i u pogledu globalnih testova. Kod bolesnika sa PBC i PSC utvrđene su značajno više srednje vrednosti aktivnosti većine faktora koagulacije (FI, FII, FV, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII) sa posledično nižim vrednostima aPTT, PT i TT u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom [$p < 0.001$ za sve ispitivane parametre sa izuzetkom fibrinogena ($p = 0.021$) i TT ($p = 0.010$)]. Aktivnost FVIII nije se značajno razlikovala između etiologija ciroze, dok je zabeležena značajno viša srednja aktivnost vWF kod bolesnika sa alkoholnom cirozom ($p = 0.003$). U grupi bolesnika sa holestaznom cirozom antikoagulacioni proteini AT i PC pokazali su bolju očuvanost, a zabeležene su i više srednje vrednosti broja trombocita ($p < 0.001$). Holestaznu cirozu predominantno je odlikovala normalna maksimalna čvrstoća hemostatskog ugruška u osnovnim testovima tromboelastometrije (66.7% i 79.2%), koja se nije značajno razlikovala u poređenju sa zdravim ispitanicima, ali je bila značajno viša u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom ($p < 0.001$). U testu ispitivanja stvaranja trombina, bolesnici sa holestaznim oboljenjem jetre imali su značajno više vrednosti maksimalne koncentracije i ukupne količine stvorenog trombina u poređenju sa bolesnicima sa alkoholnom cirozom ($p < 0.001$).

Ranije je ukazano da je hemostaza drugačije afektovana u holestaznom u odnosu na neholestazno oboljenje jetre. U poređenju sa cirozama druge etiologije, pokazano je da u odmaklom stadijumu bolesti PBC i PSC imaju očuvaniju hemostazu koju odlikuje viša aktivnost faktora koagulacije, niži stepen hiperfibrinolize i stabilan broj trombocita. Hemostazni profil kod bolesnika sa PBC i PSC ukazuje na relativnu očuvanost sintetske funkcije jetre. Uočene su klinički značajne razlike u pogledu sklonosti krvarenju, preživljavanju nakon krvarenja iz variksa jednjaka i potrebi za transfundovanjem u toku transplantacije jetre kod bolesnika sa hroničnim holestaznim oboljenjem jetre u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom i cirozom drugih etiologija³¹⁵⁻⁸. Ispitivanjem sistema

hemostaze tromboelastografijom zapaženo je da PBC i PSC odlikuje hiperkoagulabilan hemostazni profil za razliku od parenhimnog oboljenja jetre³¹⁹. Verovatno je da u holestaznom oboljenju autoimunski mehanizam indukuje hronično inflamaciono stanje, što uzrokuje povećanu stimulaciju jetre delovanjem proinflamacionih citokina i povećanje nivoa proteina akutne faze zapaljenskog odgovora³¹⁷.

U holestaznom oboljenju jetre, značajna sistemska inflamaciona aktivnost doprinosi hiperfibrinogenemiji i aktivaciji trombocita^{317,320}. U ovoj studiji, najviša prosečna aktivnost fibrinogena izmerena je kod bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre i značajno se razlikovala kako u odnosu na bolesnike sa alkoholnom cirozom ($p < 0.05$) tako i odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0.05$). Povišena koncentracija fibrinogena izmerena je kod 45.8% bolesnika sa holestaznom odnosno 16.7% bolesnika sa alkoholnom cirozom. U holestaznom oboljenju jetre, hiperkoagulabilnost se primarno objašnjava hiperaktivacijom trombocita, uprkos njihovom umereno sniženom broju, što nije odlika alkoholne ciroze³²⁰. U ovoj studiji, prosečan broj trombocita u holestaznom oboljenju jetre iznosio je $188.5 \pm 74.1 \times 10^9/L$ (84-346), a u alkoholnoj cirozi $103.2 \pm 61.2 \times 10^9/L$ (31-315); $p < 0.001$.

5.6. Poređenje standardnih testova za procenu statusa fibrinogena sa maksimalnom čvrstoćom fibrinskog ugruška u FIBTEM testu

U ovoj studiji³²¹ vršeno je komparativno ispitivanje maksimalne čvrstoće fibrinskog ugruška u tromboelastometrijskom FIBTEM testu i standardnih testova za procenjivanje statusa fibrinogena (metoda po Clauss-u i TT). Status fibrinogena ispitivan je i u odnosu na težinu alkoholne i holestazne ciroze. Potencijalna primenljivost maksimalne čvrstoće krvnog ugruška u FIBTEM testu za određivanje kvalitativnih poremećaja fibrinogena bila je u središtu ispitivanja, s obzirom da, do sada, nisu vršena slična ispitivanja u cirozi.

Metodom po Clauss-u, snižena koncentracija fibrinogena izmerena je kod 9/60 (15%) bolesnika sa alkoholnom i 2/24 (8.3%) bolesnika sa holestaznom cirozom. Nije postojala značajna razlika u srednjim vrednostima fibrinogena između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika. Najveća učestalost produženog TT zabeležena je u alkoholnoj cirozi [29/60 (48.3%)] i značajno se razlikovala u odnosu na zdrave ispitanike ($p < 0.001$) i bolesnike sa holestaznom cirozom [5/24 (20.8%), $p = 0.010$], dok nije uočena razlika između bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre i zdravih ispitanika. S druge strane, snižena vrednost FIBTEM-MCF detektovana je kod 13/60 (21.7%) bolesnika sa alkoholnom cirozom

i 3/24 (12.5%) bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. Analogno fibrinogenu, nije utvrđena razlika u srednjim vrednostima FIBTEM-MCF između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika.

Sa povećanjem težine ciroze, utvrđeno je sniženje koncentracije fibrinogena i vrednosti FIBTEM-MCF, uz istovremenu prolongaciju TT. Najniže vrednosti fibrinogena odnosno najviše vrednosti TT izmerene su kod bolesnika koji su pripadali CPsC kategoriji ($p=0.002$). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracije fibrinogena i TT u kategorijama CPsA i CPsC utvrđena je statistički značajna razlika, što ukazuje da težina ciroze obrnuto korelira sa koncentracijom fibrinogena i direktno sa vrednostima TT. Uprkos tendenciji postepenog snižavanja vrednosti FIBTEM-MCF sa povećanjem stepena težine ciroze, nije utvrđena statistički značajna razlika između CPs kategorija. Međutim, prevalenca snižene vrednosti FIBTEM-MCF ($<9\text{mm}$) bila je značajno veća u uznapredovaloj bolesti ($p=0.027$). Od ukupno 16 bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF (alkoholna i holestazna ciroza), 10 (62.5%) pripadalo je CPsC kategoriji. S druge strane, prevalenca povišene vrednosti FIBTEM-MCF bila je najveća u CPsA kategoriji (7/15, 46.7%), kojoj su pretežno pripadali bolesnici sa holestaznom cirozom. Saglasno najvišoj prosečnoj koncentraciji fibrinogena kod bolesnika sa holestaznom cirozom, srednja vrednost FIBTEM-MCF u ovoj grupi bolesnika bila je značajno viša u poređenju sa bolesnicima sa alkoholnom cirozom ($p=0.031$) i zdravim ispitanicima ($p=0.033$).

U ovoj studiji³²¹, koncentracija fibrinogena izmerena metodom po Clauss-u značajno je korelirala sa FIBTEM-MCF u svim ispitivanim grupama ($r=0.774$, $r=0.802$, $r=0.592$; $p<0.001$), pri čemu je najbolja korelacija uočena kod bolesnika sa holestaznim oboljenjem jetre. U svim stadijumima ciroze zabeležena je korelacija između koncentracije fibrinogena i FIBTEM-MCF. Ovi rezultati mogu ukazivati na pouzdanost FIBTEM-MCF kao markera za određivanje sadržaja fibrinogena u krvi odnosno na njegovu komparabilnost sa metodom po Clauss-u u pogledu kvantifikacije fibrinogena.

S druge strane, pokazano je da kod bolesnika koncentracija fibrinogena slabo korelira sa TT i to samo kod onih sa najtežim stadijumom alkoholne ciroze. Podudarno, samo kod bolesnika u CPsC kategoriji alkoholne ciroze zabeležena je slaba korelacija između TT i FIBTEM-MCF ($r=0.442$, $p=0.019$). U kontrolnoj grupi zdravih ispitanika uočena je slaba korelacija između koncentracije fibrinogena i vrednosti TT ($r=0.325$, $p=0.021$). Uprkos negativnom trendu, korelacija između TT i FIBTEM-MCF nije zabeležena kod zdravih ispitanika.

Odsustvo korelacije između standardnih testova (metoda po Clauss-u i TT) je ranije opisano kod bolesnika sa cirozom³²². U prisustvu normalne koncentracije fibrinogena pokazano je da

je molekul fibrinogena pretežno sastavljen od frakcija niske molekulske težine. Ove frakcije su koagulabilne, ali značajno produžavaju TT.

Odsustvo korelacija koje je uočeno između TT i FIBTEM-MCF kod zdravih ispitanika i obolelih u kategorijama CPsA i CPsB može odražavati uticaj mnogobrojnih faktora na prolongaciju TT nezavisno od snižene koncentracije fibrinogena. Trombinsko vreme odražava konverziju fibrinogena u fibrin, poremećaj oslobađanja fibrinopeptida, smanjenu polimerizaciju monomera fibrinogena, ali pokazuje senzitivnost na disfibrinogenemiju, prisustvo fibrinogen/fibrin degradacionih produkata ili inhibitora koji mogu biti prisutni u plazmi. Pokazano je da senzitivnost različitih testova za određivanje fibrinogena varira u odnosu na ove faktore³²³.

U prisustvu normalne koncentracije fibrinogena i normalne maksimalne čvrstoće krvnog ugruška u FIBTEM testu, u ovoj studiji³²¹ produžen TT izmeren je kod 21 bolesnika sa alkoholnom cirozom. S druge strane, normalna vrednost TT detektovana je kod 2 od 11 slučajeva sa sniženom koncentracijom fibrinogena. Ovi rezultati ilustruju uticaj dugih faktora na regulaciju stepena prolongacije TT. U ovoj studiji ispitivana je prevalenca tromboze vene porte u odnosu na CPs kategorije, pri čemu je utvrđeno prisustvo tromboze kod bolesnika u kategorijama CPsB (n=6) i CPsC (n=2). Bolesnici sa trombozom u CPsB kategoriji imali su višu vrednost D-dimera (5.0 ± 5.6 ; opseg: 0.3-13.8; cut off $< 0.5 \text{ mg/L FEU}$) u odnosu na bolesnike sa trombozom u CPsC kategoriji (1.1 ± 0.8 ; opseg: 0.7-2.2). Pretpostavljena je uloga D-dimera kao jedno od mogućih objašnjenja za promenu trenda korelacije između TT i FIBTEM-MCF (negativan trend u kontroli) u CPsB kategoriji (pozitivan trend).

Uzimajući u obzir navedene nedostatke TT i činjenicu da je FIBTEM-MCF dizajniran za opservaciju aktivnosti polimerizacije fibrina, u ovoj studiji je ispitivana prevalenca patoloških vrednosti ovih testova u odnosu na referentne vrednosti koncentracije fibrinogena. U podgrupi bolesnika sa sniženom vrednošću FIBTEM-MCF [n=16; 13/60 (21.7%) sa alkoholnom cirozom i 3/24 (12.5%) sa holestaznim oboljenjem], normalnu vrednost fibrinogena (1.9-3.98 g/L) imalo je 7 bolesnika (6 sa alkoholnom cirozom i 1 sa holestaznim oboljenjem). Ovi bolesnici su pripadali kategorijama CPsB (n=4) i CPsC (n=3). Dobijeni rezultati ukazuju na diskrepanciju između normalne koncentracije fibrinogena i smanjene čvrstoće fibrinskog ugruška kod nekih bolesnika. Drugim rečima, kapacitet za polimerizaciju fibrina nije uvek u direktnoj korelaciji sa koncentracijom fibrinogena. Kod bolesnika sa normalnom koncentracijom fibrinogena snižen FIBTEM-MCF može ukazivati na kvalitativan poremećaj fibrinogena, obzirom da je formiranje krvnog ugruška u ovom testu uglavnom rezultat konverzije fibrinogena u fibrin. U odsustvu FIBTEM-MCF analize može se pretpostaviti

dijagnostički propust u detektovanju kvalitativnog poremećaja fibrinogena kod ovih 7 bolesnika (poremećaj polimerizacije fibrinogena/fibrina ili disfibrinogenemija).

U rezultatima (Grafikon 14) prikazan je FIBTEM-MCF profil kod dva bolesnika sa alkoholnom cirozom kod kojih je izmerena koncentracija fibrinogena iznad kritične vrednosti (>1g/L; 1.8g/L i 2.1g/L), a maksimalna čvrstoća krvnog ugruška ispod donjeg limita (<9mm; 3mm i 7mm). Na istom grafikonu prikazan je i očekivani FIBTEM-MCF profil kod bolesnika sa normalnom koncentracijom fibrinogena (MCF=18mm, koncentracija fibrinogena=2.5g/L). Obzirom da je polimerizacija fibrina od ključnog značaja za obezbeđivanje adekvatnog hemostatskog odgovora, ne-dijagnostikovanje kvalitativnog poremećaja fibrinogena je od posebnog značaja za bolesnike koji se podvrgavaju invazivnim procedurama i hirurškim intervencijama. Prikazane snižene vrednosti FIBTEM-MCF, ali ne i fibrinogena, ukazuju da su ovi bolesnici kandidati za preventivnu primenu koncentrata fibrinogena/krioprecipitata pre vršenja invazivne/hirurške procedure zbog prisutnog rizika za brz razvoj nekontrolisanog krvarenja, koji je posebno visok kod bolesnika sa vrednošću MCF=3mm.

S druge strane, u ovoj studiji snižena vrednost FIBTEM-MCF utvrđena je kod 9 od 11 bolesnika (n=9 sa alkoholnom i n=2 sa holestaznom cirozom) sa sniženom koncentracijom fibrinogena. Kod 2 bolesnika sa sniženom koncentracijom fibrinogena (1.2g/L i 1.3g/L) detektovana je normalna vrednost FIBTEM-MCF (15mm i 14mm). Ovaj rezultat ukazuje da se kod nekih bolesnika normalna čvrstoća krvnog ugruška postiže u prisustvu snižene koncentracije fibrinogena, što može odražavati dovoljnost kritične koncentracije fibrinogena (1g/L) pod uslovom funkcionalne kompetentnosti molekule fibrinogena.

Opisane diskrepancije između ispitivanih testova odražavaju činjenicu da su standardni testovi metode koje se razlikuju kako međusobno tako i u odnosu na tromboelastometriju. Princip merenja se razlikuje u metodama po Clauss-u i TT. U TT testu citratnoj plazmi se dodaje standardna koncentracija trombina, dok se u Clauss-ovom testu dodaje visoka koncentracija trombina. U standardnim plazmatskim testovima, formiranje fibrinskog ugruška detektuje se nakon što je u procesu koagulacije produkovano 3-5% ukupnog trombina. To znači da se kasnije hemostatske reakcije ili mogući poremećaji u procesu hemostaze ne opserviraju. Tromboelastometrija dinamično ispituje celokupan proces hemostaze u uzorku cele krvi i meri efekat trombina na formiranje krvnog ugruška. FIBTEM test meri funkcionalnu stabilnost polimerizacije fibrina u celoj krvi^{270,322-4}.

U savremenoj literaturi nedostaju podaci o ispitivanju FIBTEM-MCF kod bolesnika sa cirozom. U studiji koja je ispitivala 51 bolesnika sa cirozom različitih etiologija, Tripodi i sar.³⁰³ su zaključili da FIBTEM-MCF nije koristan marker za razlikovanje bolesnika od

zdravih osoba. Posmatrano uopšteno ovaj zaključak nije u suprotnosti sa nalazom u ovoj studiji³²¹. Međutim, Tripodi i sar.³⁰³ nisu fokusirali istraživanje na FIBTEM testu odnosno nisu vršili dalje ispitivanje odnosa standardnog merenja fibrinogena i čvrstoće krvnog ugruška u podgrupi bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF [8/51 (16%) naspram 16/84 (19%) u ovoj studiji].

Za razliku od metode po Clauss-u, teoretski na čvrstoću krvnog ugruška u FIBTEM testu mogu uticati i drugi celularni i plazmatski faktori^{325,326}. Naime, u FIBTEM testu dodatkom inhibitora citohalazina D blokirana je jedino prokoagulaciona aktivnost trombocita^{273,277,283}.

S obzirom da FXIII ima značajnu ulogu u postizanju stabilnosti ugruška, u ovoj studiji vršeno je ispitivanje uticaja aktivnosti FXIII na čvrstoću fibrinskog ugruška u FIBTEM testu kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. Utvrđena je osrednja pozitivna korelacija aktivnosti FXIII sa FIBTEM-MCF ($r=0.382$; $p=0.003$). Dobijeni rezultat ukazuje na potrebu razmatranja terapijske primene FXIII kod krvarećih bolesnika sa sniženim FIBTEM-MCF, ukoliko se primenom fibrinogena (koncentrat fibrinogena ili krioprecipitat) ne postigne očekujući terapijski odgovor. Doza fibrinogena se može kalkulirati na osnovu ciljnog povećanja FIBTEM-MCF. Na primer, primena koncentrata fibrinogena u dozi 50mg/kg (ekvivalentno 15-20 jedinica krioprecipitata; jedna jedinica krioprecipitata sadrži 150-250mg fibrinogena) povećava FIBTEM-MCF za 8mm. U našoj kliničkoj praksi nadoknada fibrinogena sprovodi se primenom krioprecipitata u čiji sastav ulazi i FXIII. U ovoj studiji, bolesnici sa disfibrinogenemijom imali su prosečno niže vrednosti FXIII (67.33 ± 27.01) u odnosu na bolesnike bez disfibrinogenemije (81.26 ± 32.30), ali razlika nije bila statistički značajna ($p=0.314$). Literaturni podaci ukazuju da FXIII ima minimalan doprinos u formiranju definitivnog ugruška i osetljivosti na fibrinolizu (*in vitro* model hemodilucije)³²⁷. Prema Jambor i sar.³²⁸, na čvrstoću fibrinskog ugruška u FIBTEM testu utiče aktivnost FXIII < 25%.

U ovoj studiji, u podgrupi bolesnika sa alkoholnom cirozom zapaženo je da neki bolesnici sa istom funkcionalnom kompetentnošću polimerizacije fibrina imaju različite koncentracije fibrinogena. Na Grafikonu 15 prikazano je 14 bolesnika sa vrednošću FIBTEM-MCF=15mm kod kojih je izmerena koncentracija fibrinogena u opsegu 1.2-3.4g/L. Kod ovih bolesnika vrednosti FXIII bile su u opsegu 51-155%. Samo kod tri bolesnika zabeležene su snižene vrednosti FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 3, 5 i 8: 69%, 56%, 51%, respektivno), dok su kod dva bolesnika registrovane povišene vrednosti FXIII (bolesnici pod rednim brojevima 11 i 12: 155% i 146%, respektivno). U prisustvu snižene koncentracije fibrinogena (1.2g/L), kod bolesnika pod rednim brojem 5 postignuta je normalna čvrstoća/stabilnost fibrinskog ugruška i pored snižene aktivnosti FXIII (56%), što govori u prilog funkcionalne

kompetentnosti molekule fibrinogena. S druge strane, suprafiziološka aktivnost FXIII izmerena kod bolesnika pod rednim brojevima 11 i 12 (u prisustvu normalne koncentracije fibrinogena: 2.8g/L) nije usloвила višu vrednost FIBTEM-MCF u odnosu na očekivanu (u odsustvu funkcionalnog poremećaja molekule fibrinogena).

Sumirajući rezultate dobijene u ovoj studiji, može se zaključiti da je viskoelastično merenje fibrinskog ugruška FIBTEM testom prikladno za procenu statusa fibrinogena kod cirotičara, što je reprezentovano dobrom korelacijom između metode po Clauss-u i FIBTEM testa. Uzimajući u obzir nedostatak korelacija između testova (Clauss i TT, TT i FIBTEM), rezultati pokazuju da ove metode nisu komparabilne, posebno zbog činjenice da vrednost TT odražava uticaj mnogobrojnih faktora. Diskrepancija između normalne koncentracije fibrinogena i snižene maksimalne čvrstoće krvnog ugruška kod nekih bolesnika može ukazivati na prisustvo poremećaja polimerizacije fibrina. U nekim slučajevima poremećaj polimerizacije fibrina može odražavati prisustvo disfibrinogenemije, ali bez određivanja antigena fibrinogena nije moguće sa sigurnošću izvesti takav zaključak. U ovoj studiji nije vršeno određivanje antigena fibrinogena, što predstavlja glavni nedostatak u procenjivanju statusa fibrinogena. Paralelno određivanje antigena i aktivnosti fibrinogena može dati dobru procenu stepena poremećaja polimerizacije fibrina i/ili prisustva disfibrinogenemije³²¹.

Uzimajući u obzir raznolikost poremećaja fibrinogena u cirozi, viskoelastično merenje maksimalne čvrstoće krvnog ugruška predstavlja pogodnu metodu, posebno u situacijama sa visokim kliničkim prioritetom kao što su preoperativna procena statusa fibrinogena, manifestno krvarenje i praćenje polimerizacionog potencijala fibrina nakon izvršene hirurške intervencije^{277,285}. Dodatno, poznato je da metoda po Clauss-u može arteficialno dati lažno pozitivne rezultate kod bolesnika koji primaju koloidne plazma ekspandere, što može odložiti ili isključiti supstituciju fibrinogenom kod krvarećih bolesnika^{329,330}. Od posebne važnosti je individualizovan pristup u proceni statusa fibrinogena kod cirotičara, obzirom da poremećaji fibrinogena variraju kvantitativno i kvalitativno i teško ih je dijagnostikovati standardnim testovima. Ove činjenice nalažu potrebu za odgovarajućim terapijskim pristupom u svakom pojedinačnom slučaju.

U situaciji klinički značajnog krvarenja kod bolesnika sa teškom jetrinom disfunkcijom, kada svi aspekti poremećaja hemostaze mogu koegzistirati, FIBTEM test može omogućiti brzu i pouzdanu detekciju hipofibrinogenemije i poremećaja polimerizacije fibrina^{277,285}. Zajedno sa ostalim testovima tromboelastometrije FIBTEM-MCF omogućava diferencijalnu dijagnozu patomehanizama koagulopatije i ciljanu terapiju^{277,279,281}. Adekvatna količina funkcionalnog fibrinogena je potrebna i za obezbeđivanje rezistencije krvnog ugruška na fibrinolizu i

postizanje optimalnog terapijskog efekta hemostatskih lekova (antifibrinolitici, koncentrat protrombinskog kompleksa, rFVIIa, trombociti)^{329,330}. Uz to, čvrsto i postojano polimerizovan fibrin može kompenzovati za snižen broj trombocita, što je pokazano u različitim kliničkim situacijama^{331,332}. U eksperimentalnom modelu teške trombocitopenije i nekontrolisanog krvarenja kod svinja pokazano je da primena fibrinogena dovodi do značajnog poboljšanja čvrstoće krvnog ugruška, smanjenja krvarenja i boljeg preživljavanja nakon traume jetre u poređenju sa transfuzijom trombocita ili placebo³³³. Takođe, pokazano je da povećanje koncentracije fibrinogena antagonizuje efekat antiagregacionih lekova (klopidogrel)³³¹.

U ovoj studiji, trombocitopenija je bila prisutna kod svih bolesnika sa alkoholnom cirozom koji su imali produžen CFT odnosno snižen MCF, dok je hipofibrinogenemija detektovana kod nekih slučajeva. Interesantno, trombocitopenija je bila prisutna kod 40/48 bolesnika sa normalnim EXTEM-CFT, dok je kod 34 odnosno 10 bolesnika detektovana normalna odnosno povišena koncentracija fibrinogena. Istovremeno, trombocitopeniju su imala 32/38 bolesnika sa normalnom vrednošću EXTEM-MCF, dok je normalna i povišena koncentracija fibrinogena izmerena kod 28 odnosno 8 slučajeva. Ovo opažanje može ukazivati na dominantnu ulogu odnosno kompenzatornu sposobnost funkcionalne polimerizacije fibrina u odnosu na snižen broj trombocita u postizanju normalne čvrstoće krvnog ugruška.

Opravdano je izvođenje specifično dizajniranih kliničkih studija koje bi evaluirale kritične vrednosti FIBTEM-MCF kao prediktora krvarenja kod cirotičara (koji se podvrgavaju hirurškim intervencijama i biopsiji jetre) i poredile kliničke varijable kod bolesnika kod kojih su terapijske odluke sprovedene na osnovu rezultata tromboelastometrijskog analiziranja odnosno FIBTEM testa.

5.7. Ispitivanje sistema fibrinolize standardnim testovima i tromboelastometrijom

Mali broj studija sproveden je sa ciljem analiziranja fibrinoliznog sistema u cirozi. Ispitivanja su sprovedena merenjem pojedinačnih komponenata sistema fibrinolize, testovima ispitivanja lize ugruška u plazmi i novijim testovima ispitivanja globalnog fibrinoliznog kapaciteta u celoj krvi. Aktivnost sistema fibrinolize zavisi od balansa profibrinoliznih i antifibrinoliznih faktora, ali i od balansa različitih prokoagulacionih i antikoagulacionih faktora koji, između ostalog, regulišu aktivaciju TAFI. Zbog toga, status fibrinoliznog sistema nije moguće objektivno proceniti određivanjem nivoa pojedinačnih komponenata ovog sistema³³⁴.

Savremena literatura nije usaglašena u pogledu postojanja hiperfibrinolize u cirozi. Utvrđeno je da je u cirozi smanjenje antifibrinoliznih faktora kompenzovano istovremenom redukcijom profibrinoliznih faktora. Balans u fibrinoliznom sistemu se ostvaruje na nivou aktivacije plazminogena (između tAP i PAI-1) i na nivou plazmina (između plazminogena/plazmina i α_2 -IP)^{137,139,335}.

Lisman i sar.¹³⁹ osporavaju postojanje hiperfibrinolize u cirozi. Ovi autori su utvrdili da je u cirozi značajno snižen glavni regulator sistema fibrinolize (TAFI), koji se sintetise u jetri. Lisman i sar.¹³⁹ nisu utvrdili povišenu fibrinolizna aktivnost u testu ispitivanja lize ugruška u plazmi (*plazmatski sistem lize ugruška*). Odsustvo hiperfibrinolize objašnjeno je značajno sniženom aktivnošću AT u prisustvu relativno velike količine trombina. Povišen opseg aktivacije trombinom kompenzuje redukovani nivo TAFI. Profibrinolizni potencijal u cirozi nadvladava antifibrinolizno delovanje TAFI. Dodatno, veća količina trombina može pospešiti fibrinolizu putem fenomena '*sa koagulacijom udruženo povećanje fibrinolize*', koji se zasniva na inaktivaciji PAI-1 zavisnoj od trombina³³⁶.

S obzirom da se *plazmatski sistem lize ugruška* smatra boljim testom u odnosu na starije testove ispitivanja sistema fibrinolize, rezultati ove studije su doveli u pitanje postojanje hiperfibrinolize u cirozi. Na osnovu zapažanja o odsustvu povišene fibrinolizne aktivnosti u cirozi, postavljena je hipoteza o rebalansiranom sistemu fibrinolize¹⁰⁷. Colucci i sar.¹⁴⁰ potvrdili su postojanje sniženog TAFI u cirozi, ali su u sličnom plazmatskom testu lize ugruška utvrdili povišen fibrinolizni potencijal. Nejasan je razlog za diskrepanciju u rezultatima navedenih studija, ali je moguće da su suprostavljeni zaključci uslovljeni razlikama u metodologiji i selekciji bolesnika³⁰².

Nedostatak *plazmatskog sistema lize ugruška* je relativno visoka koncentracija (25ngmL^{-1}) egzogenog tAP koji se dodaje za indukciju lize ugruška, što uslovljava manju senzitivnost testa za balans endogenih nivoa tAP i PAI-1 u cirkulaciji³³⁴. *Test za određivanje globalnog fibrinoliznog potencijala u celoj krvi* u potpunosti zavisi od endogenih nivoa tAP i PAI-1. Test se izvodi u uslovima koji su bolje prilagođeni *in vivo* miljeu cirkulišuće krvi (prisustvo trombocita i drugih krvnih ćelija)³³⁷.

Uporednim korišćenjem globalnih i standardnih testova (*plazmatski sistem lize ugruška*, globalni test za utvrđivanje fibrinoliznog potencijala u celoj krvi, određivanje pojedinačnih komponenata sistema fibrinolize), Rijken i sar.³³⁴ ispitivali su sistem fibrinolize kod 75 bolesnika sa cirozom različite etiologije i težine bolesti (CPSA=34; CPsB=28; CPsC=13). Utvrđen je snižen nivo fibrinogena, AT, plazminogena, α_2 -IP i TAFI, uz značajno povišenu aktivnost/antigen tAP (smanjen klirens u endotelnim i parenhimnim ćelijama jetre; verovatan

uticaj urokinaze, koja je povišena u cirozi³³⁸⁻⁴⁰). Zapažene su korelacije između vrednosti svih ispitivanih parametara sa težinom oboljenja jetre. Nije utvrđena značajna promena aktivnosti PAI-1. U plazmatskom sistemu lize ugruška, hiperfibrinoliza se definiše kao aktivnost fibrinolize ispod najniže VLU (vreme lize ugruška; skraćuje se sa povećanjem aktivnosti fibrinolize) vrednosti u kontrolnoj grupi. Hiperfibrinoliza je detektovana kod 40% bolesnika: 21% CPsA, 52% CPsB i 67% CPsC. U globalnom testu za utvrđivanje fibrinoliznog potencijala u celoj krvi, hiperfibrinoliza je definisana kao aktivnost fibrinolize sa vrednošću GFK (globalan fibrinolizni kapacitet; povećava se sa intenzitetom fibrinolize) iznad njegove najveće vrednosti u kontrolnoj grupi. Hiperfibrinoliza je detektovana kod 43% bolesnika: 29% CPsA, 50% CPsB i 62% CPsC. Pozitivna korelacija između GFK i tAP bila je jača kod bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na ključnu ulogu povišene aktivnosti tAP u nastanku hiperfibrinolize. Kod bolesnika, GFK je jako negativno korelirao sa aktivnošću PAI-1. Negativna korelacija sa GFK ukazuje na uzročnu ulogu PAI-1 u razvoju hiperfibrinolize, s obzirom da ciroza ne utiče na PAI-1. U navedenoj studiji³³⁴, rezultati dva globalna testa nisu korelirali u kontrolnoj grupi, dok su umereno korelirali kod bolesnika. U oba globalna testa, hiperfibrinoliza je detektovana kod 25% bolesnika. Među ispitanicima kod kojih nije detektovana hiperfibrinoliza nalazila su se tri teško obolela bolesnika klasifikovana u kategoriju CPsC. Kod dva bolesnika (kriptogena i ciroza uzrokovana virusnim hepatitisom tip C) odsustvo hiperfibrinolize objašnjeno je veoma visokim nivoima PAI-1 (visok nivo PAI-1 nije tipičan za cirozu, ali se ponekad utvrđuje) i u skladu sa tim sniženom aktivnošću tAP. Rezultati studije Rijken i sar.³³⁴ u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim testiranjem 14 bolesnika sa cirozom korišćenjem komercijalno dostupnog testa za ispitivanje globalnog fibrinoliznog potencijala u citratnoj plazmi³⁴¹.

Nasuprot rezultatima studija Colucci i sar.¹⁴⁰ i Rijken i sar.³³⁴, u modifikovanom tAP-ROTEM testu (EXTEM sa dodatkom tAP) Kleinegris i sar.³⁰² utvrdili su da je kod bolesnika sa cirozom neizmenjena rezistencija na lizu ugruška odnosno da ne postoji povišen fibrinolizni potencijal. Nije utvrđena značajna razlika u rezistenciji ugruška između bolesnika i kontrolne grupe, kao niti među bolesnicima koji su pripadali kategorijama CPsA, CPsB i CPsC. Razlike u metodologiji i/ili razlike u selekciji ispitanika su verovatno objašnjenje za nepodudarnost u dobijenim rezultatima navedenih studija³³⁴. Nedostatak tAP-ROTEM metode je visoka koncentracija egzogenog tAP [(175ng/mL); dodaje se radi postizanja potpune lize ugruška]. Obzirom da je hiperfibrinoliza u cirozi uglavnom uzrokovana povišenom plazmatskom koncentracijom tAP, efekti tAP ne mogu se proceniti testom tAP-

ROTEM^{114,342}. Modifikovanim tAP-ROTEM testom dobija se informacija o rezistenciji ugruška na fibrinolizu, a ne procenjuje se fibrinolizni potencijal³⁰².

Klinički značaj hiperfibrinolize u oboljenju jetre u smislu povezanosti na razvojem krvarenja nije jasan^{302,334}.

Standardnim testovima, u ovoj studiji fibrinolizna aktivnost procenjavana je na osnovu VLE, vrednosti D-dimera i pojedinačnih komponenata ovog sistema: plazminogen, PAI-1, α_2 -IP. Hiperfibrinoliza je definisana kao aktivnost fibrinolize sa skraćenim VLE, sniženim nivoima plazminogena, PAI-1 i α_2 -IP ispod njihovih najnižih referentnih vrednosti i povišenom vrednošću D-dimera. Kod svih bolesnika izmereno je normalno VLE, što govori u prilog normalne odnosno balansirane aktivnosti sistema fibrinolize u cirozi. U grupi bolesnika sa alkoholnom cirozom snižena vrednost plazminogena utvrđena je kod 34/60 (56.7%). Snižena vrednost α_2 -IP utvrđena je kod 45/60 (75%), dok je snižena vrednost PAI-1 izmerena samo kod 2/60 (3.3%) bolesnika. Kod 48/60 (80%) bolesnika izmerena je normalna aktivnost PAI-1, dok je povišena aktivnost detektovana kod 10/60 (16.7%) bolesnika. Povišen D-dimer izmeren je kod 53/60 (88.3%) bolesnika. Za sve ispitivane parametre utvrđena je značajna razlika u odnosu na kontrolne grupe. Izmerene prosečne vrednosti plazminogena, PAI-1 i α_2 -IP bile su značajno niže ($p < 0.001$), dok su prosečne vrednosti D-dimera bile značajno više ($p < 0.001$) kod bolesnika sa alkoholnom cirozom u poređenju sa obe kontrolne grupe.

Kod obolelih od alkoholne ciroze uočeno je značajno opadanje prosečnih vrednosti plazminogena (CPsA 87.8 ± 14.0 , CPsB 73.6 ± 20.9 , CPsC 55.1 ± 20.5 ; $p = 0.001$), kao i značajan porast prosečnih vrednosti D-dimera (CPsA 0.79 ± 0.92 , CPsB 3.36 ± 3.11 , CPsC 5.97 ± 5.78 ; $p = 0.002$) sa povećanjem oštećenja funkcije jetre.

Metodom tromboelastometrije dijagnoza hiperfibrinolize postavlja se na osnovu značajne redukcije maksimalne čvrstoće krvnog ugruška odnosno maksimalne amplitude TEM[®] grafičkog prikaza u skrining testovima. Redukcija maksimalne čvrstoće krvnog ugruška odražava različit stepen razlaganja fibrinskog ugruška nakon njegovog potpunog formiranja. Numerički parameter koji opisuje razlaganje fibrinskog ugruška je maksimalna liza (ML izražena u procentima). Za potvrdu hiperfibrinolize koristi se APTM test u kojem je koagulacija aktivirana tkivnim faktorom (kao u EXTEM testu), ali je fibrinoliza inhibirana dodatkom antifibrinolitika aprotinina. Ukoliko je prisutna hiperfibrinoliza liza ugruška utvrđuje se u EXTEM i INTEM testovima ($ML > 15\%$), dok je odsutna u APTM testu. Za potvrdu hiperfibrinolize vrši se poređenje EXTEM i APTM testova, jer u oba testa koagulacija je aktivirana spoljnjim putem³⁴³.

U ovoj studiji, prosečne vrednosti procenta lize krvnog ugruška u odnosu na MCF na kraju merenja (parametar ML u EXTEM testu) statistički značajno su se razlikovale kako između bolesnika sa alkoholnom cirozom i zdravih ispitanika ($p=0.002$) tako i između bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika ($p=0.042$).

U spoljnjem putu koagulacije hiperfibrinoliza definisana povišenom vrednošću parametra $ML>15\%$ detektovana je kod 5 (8.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom ($n[CPsB]=1$; $n[CPsC]=4$). Kod bolesnika sa holestaznom cirozom i zdravih ispitanika uočeno je odsustvo povišene fibrinolizne aktivnosti. U skladu sa tim, prisustvo hiperfibrinolize značajno se razlikovalo između obolelih od alkoholne ciroze i zdrave populacije ($p=0.038$). Iako je hiperfibrinoliza utvrđena u unutarnjem putu koagulacije kod 2 (3.3%) bolesnika sa alkoholnom cirozom nije postojala značajnost razlike među ispitivanim grupama.

Kako se hiperfibrinoliza detektovana u EXTEM testu potvrđuje APTEM testom (skraćenje CT, povećanje MCF, redukcija ML) korelirane su vrednosti navedenih parametara izmerenih u EXTEM i APTEM testovima u svim ispitivanim grupama. Mada je kod bolesnika sa alkoholnom cirozom ($n=60$) uočeno skraćenje CT (58.2 ± 14.1 vs. 57.6 ± 19.3), povećanje MCF (56.1 ± 8.9 vs. 58.3 ± 16.2) i redukcija ML (7.9 ± 4.8 vs. 6.6 ± 4.7) u APTEM testu nije utvrđena statistička značajnost razlike između vrednosti parametara izmerenih u navedenim testovima.

Među bolesnicima sa detektovanom hiperfibrinolizom (EXTEM- $ML>15\%$), kod 4/5 bolesnika hiperfibrinoliza je potvrđena u APTEM testu ($n[CPsB]=1$; $n[CPsC]=3$). U prisustvu normalne vrednosti PAI-1, kod svih 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom zabeležene su snižene vrednosti plazminogena i α_2 -IP i povišena vrednost D-dimera. Primećeno je da je vrednost D-dimera bila najviša kod bolesnika kod kojeg hiperfibrinoliza nije potvrđena u APTEM testu. Kod istog bolesnika izmerena je najniža vrednost MCF, odnosno najviša vrednost CT u poređenju sa preostala 4 bolesnika sa hiperfibrinolizom. Ovakav nalaz kod bolesnika sa nepotvrđenom hiperfibrinolizom u APTEM testu upućuje na verovatnost učinjene tehničke greške pri izvođenju ovog testa. Kod bolesnika sa hiperfibrinolizom, postojale su izuzetno jake korelacije između vrednosti EXTEM-ML, sa jedne strane, i vrednosti α_2 -IP i D-dimera, sa druge strane.

Razvoju hiperfibrinolize doprinose ascitna tečnost (poseduje povišenu fibrinoliznu aktivnost) i prisustvo fibrinogen/fibrin degradacionih produkta (dodatno inhibiraju stvaranje trombina i polimerizaciju fibrinskih monomera). Pokazano je da povišen nivo D-dimera korelira sa stepenom ascitosa u insuficijenciji jetre i da je pozitivan prediktor gastrointestinalnog krvarenja^{100,103,109,139,141}.

U ovoj studiji vršena je analiza standardnih testova za ispitivanje fibrinolizne aktivnosti i ML izmerene u tromboelastometrijskom testiranju u odnosu na prisustvo/odsustvo ascitesa kod bolesnika sa alkoholnom cirozom. U poređenju sa bolesnicima bez ascitesa (n=21), kod bolesnika sa ascitesom (n=39) izmerene su značajno niže vrednosti plazminogena (93.9 ± 25.9 vs. 62.4 ± 22.9 ; $p < 0.001$), PAI-1 (3.3 ± 1.1 vs. 2.6 ± 1.4 ; $p = 0.012$) i α_2 -IP (83.2 ± 20.8 vs. 57.9 ± 18.3 ; $p < 0.001$), kao i značajno povišen D-dimer (1.0 ± 1.6 vs. 5.6 ± 5.2 ; $p < 0.001$; $p < 0.001$). Poređenjem sa bolesnicima bez ascitesa, kod bolesnika sa ascitesom u tromboelastometrijskom merenju zabeleženi su značajno niža vrednost EXTEM-MCF (55.9 ± 9.3 vs. 63.2 ± 8.4 ; $p < 0.001$) i značajno povišena vrednost EXTEM-ML [6.4 ± 3.4 vs. 7.9 ± 4.9 ; $p = 0.005$]. Može se zaključiti da je prisustvo ascitesa doprinelo povišenoj aktivnosti sistema fibrinolize kod ispitivanih bolesnika sa alkoholnom cirozom.

Među bolesnicima sa detektovanom hiperfibrinolizom (EXTEM-ML > 15%) 2 bolesnika imala su ascites, a vrednost D-dimera kod svih bolesnika iznosila je 0.52-7.41 mg/L FEU (normalna vrednost < 0.5 mg/L FEU). Ascites je bio prisutan kod bolesnika kod kojeg hiperfibrinoliza nije potvrđena u APTEM testu (Grafikon 23, redni broj 2).

U poređenju sa bolesnicima koji nisu ispoljili krvarenje (n=32), kod bolesnika koji su imali krvarenje iz variksa jednjaka i/ili želuca (n=28) zabeležene su značajno niže vrednosti plazminogena, α_2 -IP i i značajno povišen D-dimer ($p < 0.001$ za sve ispitivane parametre). U tromboelastometrijskom ispitivanju, kod bolesnika sa ispoljenim krvarenjem iz variksa zabeležene su značajno niže vrednosti EXTEM-MCF (57.6 ± 9.1 vs. 61.8 ± 9.3 ; $p = 0.002$) i INTEM-MCF (54.8 ± 9.4 vs. 58.5 ± 8.8 ; $p = 0.005$). U ovoj studiji nije utvrđena povezanost između vrednosti ML i krvarenja iz variksa. Među bolesnicima sa detektovanom hiperfibrinolizom (EXTEM-ML > 15%) 3 bolesnika manifestovala su krvarenje iz variksa.

Iako je hiperfibrinoliza definisana vrednošću ML > 15%, među bolesnicima sa alkoholnom cirozom selektovana je podgrupa bolesnika (n=20) kod kojih je izmerena vrednost ML $\geq 10\%$ u EXTEM testu. Hipotetički vrednost ML $\geq 10\%$ može ukazivati na tendenciju razvoja hiperfibrinolize. U ovoj podgrupi bolesnika analizirana je značajnost razlike između prosečnih vrednosti parametara CT, MCF i ML u EXTEM i APTEM testovima. Pokazano je da su prosečne vrednosti ML značajno niže u APTEM testu u odnosu na vrednosti u EXTEM testu (13.40 ± 3.299 vs. 10.40 ± 4.500 ; $p = 0.021$), što može ukazivati na postojanje povišene aktivnosti fibrinoliznog sistema kod nekih bolesnika.

Daljim ispitivanjem ove podgrupe bolesnika utvrđena je inhibicija fibrinolizne aktivnosti u APTEM testu (APTEM-ML < 10%) kod 7/20 (35%) slučajeva, što može ukazivati na postojanje hiperfibrinolize kod ovih bolesnika. Distribucija ovih 7 bolesnika u odnosu na

Child-Pugh skor bila je: n[CPsA]=1; n[CPsB]=3; n[CPsC]=3. Kod preostalih 13/20 bolesnika nije uočena inhibicija fibrinolizne aktivnosti u APTEM testu, što ukazuje na mogući uticaj drugih faktora na vrednost ML.

U ovoj studiji, kod 60 bolesnika sa alkoholnom cirozom nije uočena povezanost između parametra ML i standardnih testova za procenu fibrinolizne aktivnosti, ali je kod 5 bolesnika sa hiperfibrinolizom (EXTEM-ML>15%) uočena korelacija α_2 -IP i D-dimera sa ML.

Analizom korelacija parametara sintetske i metaboličke funkcije jetre sa standardnim testovima za procenu fibrinolizne aktivnosti, uočeno je da aktivnost holinesteraze značajno korelira sa svim ispitivanim testovima (pozitivna korelacija u odnosu na plazminogen, PAI-1 i α_2 -IP; negativna korelacija u odnosu na D-dimer). Slični rezultati dobijeni su za albumin, sa izuzetkom PAI-1. Zabeležena je značajna korelacija između ukupnog bilirubina, s jedne strane, i plazminogena i α_2 -IP, s druge strane. Nijedan od ispitivanih parametara sintetske i metaboličke funkcije jetre nije korelirao sa maksimalnom lizom krvnog ugruška koja je izmerena u tromboelastometrijskom testiranju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovoj studiji doneti su sledeći zaključci:

1. U alkoholnoj cirozi hemostaza je rebalansirana istovremenim sniženjem aktivnosti prokoagulacionih i antikoagulacionih faktora.
2. Step en istovremene redukcije aktivnosti antikoagulacionih i većine prokoagulacionih proteina povećava se sa povećanjem težine oštećenja jetrine funkcije.
3. Većina bolesnika sa alkoholnom cirozom ima povišenu aktivnost vWF, koja se povećava srazmerno stepenu težine ciroze.
4. Aktivnost FVIII je povišena kod više od polovine bolesnika sa alkoholnom cirozom.
5. Standardni skrining testovi hemostaze ukazuju na hipokoagulabilnost kod većine bolesnika sa alkoholnom cirozom.
6. Standardni skrining testovi hemostaze ne odlikavaju rebalansirani hemostatski potencijal u alkoholnoj cirozi i nisu pogodni za realnu procenu koagulabilnosti.
7. Testom ispitivanja endogenog potencijala za stvaranje trombina utvrđuje se hipokoagulabilan hemostatski profil kod većine bolesnika sa alkoholnom cirozom.
8. Smanjenje endogenog potencijala za stvaranje trombina je proporcionalno težini oštećenja jetrine funkcije.
9. Aktivnost protrombina je najznačajniji prediktor ukupne količine endogeno formiranog trombina.
10. Test ispitivanja endogenog stvaranja trombina može se razmatrati kao potencijalni kandidat za procenu oštećenja sintetske funkcije jetre i stepena težine alkoholne ciroze.

11. Metodom tromboelastometrije utvrđuje se normokoagulabilnost kod više od polovine bolesnika sa alkoholnom cirozom.
12. U tromboelastometrijskom merenju učestalost hipokoagulabilnosti u alkoholnoj cirozi povećava se sa povećanjem težine oboljenja jetre.
13. Broj trombocita i koncentracija fibrinogena su najznačajniji prediktori vremena potrebnog za formiranje maksimalne čvrstoće krvnog ugruška.
14. Maksimalna koncentracija trombina (C_{max}) je glavna determinanta maksimalne čvrstoće i stabilnosti definitivnog hemostatskog ugruška (tromboelastometrijski parametar MCF) u spoljnjem putu koagulacije.
15. Kapacitet za polimerizaciju fibrina nije uvek u direktnoj korelaciji sa koncentracijom fibrinogena.
16. FIBTEM je odgovarajući test za procenu statusa fibrinogena, uključujući utvrđivanje kvalitativnih poremećaja molekule fibrinogena.
17. U prisustvu normalne koncentracije fibrinogena, snižena vrednost FIBTEM-MCF ukazuje na postojanje kvalitativnog poremećaja fibrinogena.
18. Funkcionalna polimerizacija fibrina ispoljava kompenzatornu sposobnost u odnosu na snižen broj trombocita pri formiranju krvnog ugruška.
19. Alkoholnu cirozu odlikuje povišena aktivnost sistema fibrinolize koja se može detektovati tromboelastometrijom.
20. Prisustvo ascitesa doprinosi povišenoj aktivnosti sistema fibrinolize kod bolesnika sa alkoholnom cirozom.
21. Tromboelastometrija je klinički koristan funkcionalan test za analiziranje sistema hemostaze kod bolesnika sa alkoholnom cirozom, jer obezbeđuje informacije o

maksimalnoj čvrstoći i stabilnosti krvnog ugruška, funkcionalnom statusu fibrinogena i prisustvu povišene aktivnosti fibrinoliznog sistema.

22. Zahvaljujući definisanju specifičnih hemostatskih poremećaja, tromboelastometrija omogućava ciljano korigovanje istih. To je od posebnog značaja za krvareće bolesnike sa portnom hipertenzijom i hemostatsku pripremu bolesnika planiranih za izvođenje biopsije jetre i hirurških procedura. Prednost tromboelastometrije ogleda se i u mogućnosti neposrednog i pouzdanog praćenja postignutih hemostatskih efekata primenjene terapije.

7. LITERATURA

- ¹Stefanović S. Hematologija. Beograd: Medicinska knjiga, 1989.
- ²Bombeli T, Spahn DR. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *BJA* 2004;93:275-87.
- ³Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:41-8.
- ⁴Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circ Res* 2001;89:117–24.
- ⁵Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:17-25.
- ⁶Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009;108:1433-6.
- ⁷Aird WC. Endothelium. In: *Consultative Hemostasis and Thrombosis*. Kitchen CS, Alving BM, Kessler CM, editors. Saunders 2007. p. 35-43.
- ⁸Elezović I. Laboratorijska dijagnostika protromboznog stanja. U: *Laboratorijska dijagnostika poremećaja hemostaze*. Beograd, Interlab, 2008:23-35.
- ⁹Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder VJ. Overview of hemostasis. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p 3-17.
- ¹⁰Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
- ¹¹Majerus PW. Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest* 1983;72:1521-5.
- ¹²Schafer AI. Vascular endothelium: In defense of blood fluidity. *J Clin Invest* 1997;99:1143-4.
- ¹³Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997;99:1351-60.
- ¹⁴Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984;74:1-6.

- ¹⁵Marcum JA, Rosenberg RD. Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue. *Biochemistry* 1984;23:1730-7.
- ¹⁶Tollefsen DM, Pestka CA. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* 1985;66:769-74.
- ¹⁷Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74:90-3.
- ¹⁸Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP. Cultured normal human hepatocyte do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8869-73.
- ¹⁹Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol* 1995;6:259-68.
- ²⁰Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa D-J, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996;271:17491-8.
- ²¹Stern D, Brett J, Nawroth P. Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol* 1986;102:1971-8.
- ²²van Heerde WL, Poort S, van't Veer C, Reutelingsperger CP, de Groot PG. Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding to endothelial cell-mediated thrombin formation. *Biochem J* 1994;302:305-12.
- ²³Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *BJH* 2005;129:307-21.
- ²⁴Levin EG, Luskuoff DJ. Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *J Cell Biol* 1982;94:631-6.
- ²⁵Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med* 1996;47:315-31.
- ²⁶Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med* 2005;257:209-23.
- ²⁷FitzGerald GA, Moran N. Molecular mechanisms of platelet activation and inhibition. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p 1517-27.
- ²⁸Schroit AJ, Zwaal RF. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelets membranes. *Biochem Biophys Acta* 1991;1071:313-29.

- ²⁹Bavers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochem Biophys Acta* 1983;736:57-66.
- ³⁰Zhao J, Zhao Q, Wiedmer T, Sims PJ. Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. *J Biol Chem* 1998;273:6603-6.
- ³¹Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986;46:185-90.
- ³²Ruggeri ZM, Mannucci PM, Federici AB, Lombardi R, Zimmerman TS. Multimeric composition of Factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand's disease subtypes. *Blood* 1982;59:1272-8.
- ³³Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *NEJM* 1982;307:1432-5.
- ³⁴Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vitro proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-34.
- ³⁵Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, Sadler JE. Binding of platelets glycoprotein Ib alpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004;101:10578-83.
- ³⁶Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001;86:178-88.
- ³⁷Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001;86:189-97.
- ³⁸Jackson SP. Adhesion and activation mechanisms supporting the hemostatic and prothrombotic function of platelets. *Nature Medicine* 2011;17:1423-36.
- ³⁹Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996;88:1525-41.
- ⁴⁰Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-97.

- ⁴¹Dorsam RT, Tuluc M, Kunapuli P. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets. *JTH* 2004;2:804-12.
- ⁴²Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg⁶⁰ to Leu mutation. *J Clin Invest* 1996;97:949-56.
- ⁴³Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W. Mechanism of Epinephrine-Induced Platelet Aggregation. *Hypertension* 1998;31:603-7.
- ⁴⁴Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *NEJM* 2008;359:938-9.
- ⁴⁵Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Hemost.* 1997;78:759-64.
- ⁴⁶Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 2007;109:5242-50.
- ⁴⁷Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signalling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:47-56.
- ⁴⁸Broze GJ. Binding of human factor VII and VIIa to monocytes. *J Clin Invest* 1982;70:526-35.
- ⁴⁹Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:1-11.
- ⁵⁰Allen DH, Tracy PB. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J Biol Chem* 1995;270:1408-15.
- ⁵¹Miller GJ, Howarth DJ, Attfield JC, Cooke CJ, Nanjee MN, Olszewski WL, et al. Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph. *Thromb Haemost* 2000;83:427-32.
- ⁵²Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Bednarek MA, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Detection of factor X activation in humans. *Blood* 1989;74:20007-15.
- ⁵³Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* 1990;76:731-6.
- ⁵⁴Jesty J, Beltrami E, Willems G. Mathematical analysis of a proteolytic positive feedback loop: Dependence of lag time and enzyme yields on the initial conditions and kinetic parameters. *Biochemistry* 1993;32:6266-74.
- ⁵⁵Alberio L, Dale GL. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signaling pathways. *Eur J Clin Invest* 1999;29:1066-76.

- ⁵⁶Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005;106:2605-12.
- ⁵⁷Monkovic DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* 1990;265:17132-40.
- ⁵⁸von dem Borne PAK, Meijers JCM, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 1995;86:3035-42.
- ⁵⁹Asakai R, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U. Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *NEJM* 1991;325:153-8.
- ⁶⁰Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *JTH* 2003;1:1504-14.
- ⁶¹Hornyak TJ, Shafer JA. Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry* 1992;31:423-9.
- ⁶²Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* 1991;266:21833-8.
- ⁶³Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003;124:33S-39S.
- ⁶⁴Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolysis cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603-8.
- ⁶⁵von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim ME, Bouma BN. Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *J Clin Invest* 1997;99:2323-7.
- ⁶⁶Zhang J, Piro O, Lu L, Broze GJ Jr.. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003;108:623-7.
- ⁶⁷Jesty J, Lorenz A, Rodriguez J, Wun TC. Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1996;87:2301-7.
- ⁶⁸Ndonwil M, Tuleyl EA, Broze GJ Jr. The Kunitz-3 domain of TFPI- α is required for protein S-dependent enhancement of factor Xa inhibition. *Blood* 2010;116:1344-51.
- ⁶⁹Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3106-11.

- ⁷⁰Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2728-32.
- ⁷¹Bock SC. Antithrombin III and heparin cofactor II. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001.p.322-34.
- ⁷²Parker K, Tollefsen DM. The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. *J Biol Chem* 1985;260:3501-5.
- ⁷³Church F, Noyes C, Griffith M. Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6431-4.
- ⁷⁴Mather T, Oganessyan V, Hof P, Huber R, Foundling S, Esmon C, et al. "The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C". *EMBO J* 1996;15:6822-31.
- ⁷⁵Esmon CT. Protein C, protein S and thrombomodulin. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p.335-54.
- ⁷⁶Esmon NL, Owen WC, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982;257:859-64.
- ⁷⁷Greenberg DL, Davie EW. Blood coagulation factors: their complementary DNAs, genes, and expression. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p 21-58.
- ⁷⁸Hedner U, Hirsh J, Marder VJ. Therapy with antifibrinolytic agents. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p 795-813.
- ⁷⁹Francis CW, Marder VJ. Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p. 975-1002.
- ⁸⁰Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000;407:923-6.
- ⁸¹Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 2005;93:647-54.

- ⁸²Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991;78:3114-24.
- ⁸³Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 1993;15:105-11.
- ⁸⁴Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998;95:365-7.
- ⁸⁵Romisch J, Vermohlen S, Feussner A, Stohr H. The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* 1999;29:292-9.
- ⁸⁶Wang W, Boffa M, Bajzar L, Walker J, Nesheim M. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273:27176-81.
- ⁸⁷Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *JTH* 2009;7:5-14.
- ⁸⁸Ny T, Sawdev M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ. Cloning of sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:6776-80.
- ⁸⁹Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. *J Clin Invest* 1996;97:37-46.
- ⁹⁰Jones AL, Hulett MD, Parish CR. Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol Cell Biol* 2005;83:106-18.
- ⁹¹Freeman C, Parish CR. A rapid quantitative assay for the detection of mammalian heparanase activity. *Biochem J* 1997;325:229-37.
- ⁹²Leung L, Saigo K, Grant D. Heparin binds to human monocytes and modulates their procoagulant activities and secretory phenotypes. Effects of histidine-rich glycoprotein. *Blood* 1989;73:177-84.
- ⁹³Lijnen HR, van Hoef B, Collen D. Interaction of heparin with histidine-rich glycoprotein and with antithrombin III. *Thromb Haemost* 1983;50:560-62.
- ⁹⁴Lijnen HR, Van Hoef B, Collen D. Histidine-rich glycoprotein modulates the anticoagulant activity of heparin in human plasma. *Thromb Haemost* 1984;51:266-8.

- ⁹⁵Leung LL. Interaction of histidine-rich glycoprotein with fibrinogen and fibrin. *J Clin Invest* 1986;77:1305-11.
- ⁹⁶Borza DB, Morgan WT. Acceleration of plasminogen activation by tissue plasminogen activator on surface-bound histidine-proline-rich glycoprotein. *J Biol Chem* 1997;272:5718-26.
- ⁹⁷Galun D. Klinički i prognostički značaj biomarkera jetre kod velikih i ponovljenih, radiofrekventnih resekcija jetre. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet. Beograd, 2009.
- ⁹⁸Milićević M, Bulajić P. Hirurgija jetre. U: *Hirurgija za studente medicine: Urednik: Maksimović ŽV. CIBID 2008; s. 279-305.*
- ⁹⁹Palibrk I. Prediktivna vrednost lidokainskog testa u planiranju hirurškog lečenja oboljenja jetre. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet. Beograd, 2011.
- ¹⁰⁰Senzolo M, Burroughs AK. Hemostatic alterations in liver disease and liver transplantation. In: *Consultative Hemostasis and Thrombosis*. Kitchen CS, Alving BM, Kessler CM, editors. Saunders 2007. p 647-59.
- ¹⁰¹Joist JH & George JN. Hemostatic abnormalities in liver and renal disease. In: *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001.p 955-73.
- ¹⁰²Lisman T, Leebeek FW, de Groot PG. Haemostatic abnormalities in patients with liver disease. *J Hepatol* 2002;37:280-7.
- ¹⁰³Plata A, Gutkowski K, Hartleb M. Coagulopathy in liver disease. *Adv Med Sci* 2010;55:16-21.
- ¹⁰⁴Ferro D, Quintarelli C, Lattuada A, Leo R, Alessandroni M, Mannucci PM, et al. High plasma levels of von Willebrand factor as a marker of endothelial perturbation in cirrhosis: Relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1996;23:1377-83.
- ¹⁰⁵Kelly DA, Summerfield JA. Hemostasis in liver disease. *Semin Liver Dis* 1987;7:182-91.
- ¹⁰⁶Hollestelle MJ, Thinnes T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo. A closer look. *Thromb Haemost* 2001;86:855-61.
- ¹⁰⁷Lisman T, Porte RJ. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood* 2010;116:878-85.

- ¹⁰⁸Rapaport SI. Coagulation problems in liver disease. *Blood Coagul Fibrinol* 2000;11:569-74.
- ¹⁰⁹Hu KQ, Yu AS, Tiyyagura L, Redeker AG, Reynolds TB. Hyperfibrinolytic activity in hospitalized cirrhotic patients in a referral liver unit. *Am Jour Gastroenterol* 2001;96:1581-6.
- ¹¹⁰Lisman T, Leebeek FWG. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Dig Surg* 2007;24:250-8.
- ¹¹¹Tripodi A, Primignani M, Mannucci PM. Abnormalities of hemostasis and bleeding in chronic liver disease: the paradigm is challenged. *Intern Emerg Med* 2010; 5:7-12.
- ¹¹²Witters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F, et al. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:1017-29.
- ¹¹³Bakker CM, Knot EA, Stibbe J, Wilson JH. Disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1992;15:330-5.
- ¹¹⁴Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, Macik BG, Northup PG, Reddy KR, et al. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology* 2006;44:1039-46.
- ¹¹⁵Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001;89:273-93.
- ¹¹⁶Ordinas A, Escolar G, Cirera I, Vinas M, Cobo F, Bosch J, et al. Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions. *Hepatology* 1996;24:1137-42.
- ¹¹⁷Ballard HS, Marcus AJ. Platelet aggregation in portal cirrhosis. *Arch Intern Med* 1976;136:316-9.
- ¹¹⁸Laffi G, La Villa G, Pinzani M, Ciabattini G, Patrignani P, Mannelli M, et al. Altered renal and platelet arachidonic acid metabolism in cirrhosis. *Gastroenterology* 1986;90:274-82.
- ¹¹⁹Laffi G, Marra F, Gresele P, Romagnoli P, Palermo A, Bartolini O et al. Evidence for a storage pool defect in platelets from cirrhotic patients with defective aggregation. *Gastroenterology* 1992;103:641-6.
- ¹²⁰Langer DA, Shah VH. Nitric oxide and portal hypertension: Interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 2006;44:209-16.
- ¹²¹Whicher JT, Dieppe PA. Acute phase proteins. *Clin Immunol Allerg* 1985;5:425-46.

- ¹²²Senzolo M, Burra P, Cholongitas E, Burroughs AK. New insights into coagulopathy of liver disease and liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2006;12:7725-36.
- ¹²³Francis JL, Armstrong DJ. Acquired dysfibrinogenemia in liver disease. *J Clin Pathol* 1982;35:667-72.
- ¹²⁴Green G, Thomson JM, Dymock IW, Poller L. Abnormal fibrin polymerisation in liver disease. *BJH* 1976;34:427-39.
- ¹²⁵Mc Donagh J. Dysfibrinogenemia and other disorders of fibrinogen structure or function. In: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Colmon RW, Hirsh J, Morder VJ, Clowes AW, George JN, editors. Lipincot Williams & Wilkins, 2001. p 855-92.
- ¹²⁶Barr RD, Allardyce M, Brunt PW, McPhie JL. Dysfibrinogenemia and liver cell growth. *J Clin Pathol* 1978;31:89-92.
- ¹²⁷Kenneth C Robbins. Fibrinolytic disorders. In: Hematology, A Problem Oriented Approach. Samuel Gross & Stuart Roath, editors. William & Wilkins 1996. p.627-54.
- ¹²⁸Barr RD. Fetal fibrinogen: fact or fancy? *Biomedicine* 1978;28:245-8.
- ¹²⁹Francis RB Jr., Feinstein DI. Clinical significance of accelerated fibrinolysis in liver disease. *Haemostasis* 1984;14:460-5.
- ¹³⁰Palascak JE, Martinez J. Dysfibrinogenemia associated with liver disease. *J Clin Invest* 1977;60:89-95.
- ¹³¹Serafini-Cessi F. Sialyltransferase activity in regenerating rat liver. *Biochem J* 1977;166:381-6.
- ¹³²Popper H. Liver disease-morphological considerations. *Am J Med* 1954;16:98-117.
- ¹³³Green G, Poller L, Thomson JM, Dymock IW. Association of abnormal fibrin polymerization with severe liver disease. *Gut* 1977;18:909-12.
- ¹³⁴Weinstein MJ, Deykin D. Quantitative abnormality of an A alpha chain molecular weight form in the fibrinogen of cirrhotic patients. *BJH* 1978;40:617.
- ¹³⁵Clark RD, Gazzard BG, Lewis ML, Flute PT, Williams R. Fibrinogen metabolism in acute hepatitis and active chronic hepatitis. *BJH* 1975;30:95-102.
- ¹³⁶Lipinski B, Lipinska I, Nowak A, Gurewich V. Abnormal fibrinogen heterogeneity and fibrinolytic activity in advanced liver disease. *J Lab Clin Med* 1977;90:187-94.

- ¹³⁷Leebeek FWG, Kluft C, Maeda EAR, DeMaat MPM, Wilson JHP. A shift in balance between profibrinolytic and antifibrinolytic factors causes enhanced fibrinolysis in cirrhosis. *Gastroenterology* 1991;101:1382-90.
- ¹³⁸Violi F. Association between prolonged bleeding time and gastrointestinal hemorrhage in 102 patients with liver cirrhosis: results of a retrospective study. *Haematologica* 1994;79:61-5.
- ¹³⁹Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, Bouma BN, Meijers JC, Janssen HL, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* 2001;121:131-9.
- ¹⁴⁰Colucci M, Binetti BM, Branca MG, Clerici C, Morelli A, Semeraro N, et al. Deficiency of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in cirrhosis is associated with increased plasma fibrinolysis. *Hepatology* 2003;38:230-7.
- ¹⁴¹Agarwal S, Joyner KA Jr., Swaim MW. Ascites fluid as a possible origin for hyperfibrinolysis in advanced liver disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3218-24.
- ¹⁴²Lisman T, Bongers T, Adelmeijer J, Janssen HL, de Maat MP, de Groot PG, et al. Elevated levels of von Willebrand factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology* 2006;44:53-61.
- ¹⁴³Hollestelle MJ, Geertzen HGM, Straatsburg IH, van Gulik TM, van Mourik JA. Factor VIII expression in liver disease. *Thromb Haemost* 2004;91:267-75.
- ¹⁴⁴Broze GJ, Miletich JP. Human Protein Z. *J Clin Invest* 1984;73:933-8.
- ¹⁴⁵Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:8-13.
- ¹⁴⁶Han X, Fiehler R, Broze GJ. Isolation of protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9250-5.
- ¹⁴⁷Han X, Fiehler R, Broze GJ. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000;96:3049-55.
- ¹⁴⁸Huang X, Yan Y, Tu Y, Gatti J, Broze GJ Jr., Zhou A, et al. Structural basis for catalytic activation of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) by protein Z. *Blood* 2012;120:1726-33.
- ¹⁴⁹Gerritsen EH, Robles R, Lämmle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001;98:1654-61.

- ¹⁵⁰Fujikawa K, Suzuki H, McMillen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001;98:1662-6.
- ¹⁵¹Pereboom IT, Adelmeijer J, van Leeuwen Y, Hendriks HG, Porte RJ, Lisman T. Development of a severe von Willebrand factor/ADAMTS13 dysbalance during orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2009;9:1189-96.
- ¹⁵²Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Determination of ADAMTS13 and its clinical significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis. *Int J Hepatol* 2011;2011:759047.
- ¹⁵³Takaya H, Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Matsuyama T, Kato S, et al. ADAMTS13 activity may predict the cumulative survival of patients with liver cirrhosis in comparison with the Child- Turcotte-Pugh score and the Model for End-Stage Liver Disease score. *Hepatol Res* 2012;42:459-72.
- ¹⁵⁴Al-Busafi SA, McNabb-Baltar J, Farag A, Hilzenrat N. Clinical manifestations of portal hypertension. *Int J Hepatol* 2012;2012:203794.
- ¹⁵⁵Bhavsar MS, Vora HB, Khiria LS, Giriappa VH. Portal hypertension: effect of early splenic artery ligation on platelets count during splenectomy. *Saudi J Gastroenterol* 2012;18:380-3.
- ¹⁵⁶Kedia S, Goyal R, Mangla V, Kumar A, S S, Das P, et al. Splenectomy in cirrhosis with hypersplenism: improvement in cytopenias, Child's status and institution of specific treatment for hepatitis C with success. *Ann Hepatol* 2012;11:921-9.
- ¹⁵⁷Schaden E, Saner FH, Görlinger K. Coagulation pattern in critical liver dysfunction. *Curr Opin Crit Care* 2013;19:142-8.
- ¹⁵⁸Elias JE, Mackie I, Eapen CE, Chu P, Shaw JC, Elias E. Porto-pulmonary hypertension exacerbated by platelet transfusion in a patient with ADAMTS13 deficiency. *J Hepatol* 2013;58:827-30.
- ¹⁵⁹Hardy JF, de Moerloose P, Sammama M. Massive transfusion and coagulopathy: pathophysiology and implications for clinical management. *Can J Anesth* 2006;53:40-58.
- ¹⁶⁰Valles J, Santos MT, Aznar J, Martinez M, Moscardo A, Pinon M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down- regulation by aspirin ex vivo. *Blood* 2002;99:3978-84.

- ¹⁶¹Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991;87:571-80.
- ¹⁶²Noris M, Remuzzi G. Uremic bleeding closing the circle after 30 years of controversies? *Blood* 1999;94:2569-74.
- ¹⁶³Hendriks HG, van der Meer J, Klompmaker IJ, Choudhury N, Hagenaars JA, Porte RJ, et al. Blood loss in orthotopic liver transplantation: a retrospective analysis of transfusion requirements and the effects of autotransfusion of cell saver blood in 164 consecutive patients. *Blood Coagul Fibrinol* 2000;11:87-93.
- ¹⁶⁴Mc Cluskey SA, Karkouti K, Wijeyesundera DN, Kakizawa K, Ghannam M, Hamdy A, et al. Derivation of a risk index for the prediction of massive blood transfusion in liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1584-93.
- ¹⁶⁵van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJH, et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *NEJM* 1990;322:1622-7.
- ¹⁶⁶Montalto P, Vlachogiannakos J, Cox DJ, Pastacaldi S, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in liver cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *J Hepatol* 2002;37:463-70.
- ¹⁶⁷Goulis J, Armonis A, Patch D, Sabin C, Greenslade L, Burroughs AK. Bacterial infection is independently associated with failure to control bleeding in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1998;27:1207-12.
- ¹⁶⁸Vivas S, Rodriguez M, Palacio MA, Linares A, Alonso JL, Rodrigo L. Presence of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients is independently associated with early mortality and failure to control bleeding. *Dig Dis Sci* 2001;46:2752-7.
- ¹⁶⁹Hughes RD, Lane DA, Ireland H, Langley PG, Gimson AE, Williams R. Fibrinogen derivatives and platelet activation products in acute and chronic liver disease. *Clin Sci (Lond)* 1985;68:701-7.
- ¹⁷⁰Bakker CM, Knot EA, Stibbe J, Wilson JH. Disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1992;15:330-5.
- ¹⁷¹Violi F, Ferro D, Basili S, Saliola M, Quintarelli C, Alessandri C, et al. Association between low-grade disseminated intravascular coagulation and endotoxemia in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1995;109:531-9.

- ¹⁷²Oka K, Tanaka K. Intravascular coagulation in autopsy cases with liver diseases. *Thromb Haemost* 1979;42:564-70.
- ¹⁷³Ben Ari Z, Osman E, Hutton RA, Burroughs AK. Disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. Fact or fiction? *Am J Gastroenterol* 1999;94:2977-82.
- ¹⁷⁴Joist JH. AICF and DIC in liver cirrhosis: expression of a hypercoagulable state. *Am J Gastroenterol* 1999;94:9801-3.
- ¹⁷⁵Basili S, Raparelli V, Violi F. The coagulopathy of chronic liver disease: Is there a causal relationship with bleeding? Yes. *E Jour Intern Med* 2010;21:62-4.
- ¹⁷⁶El-Serag HB, Everhart JE. Improved survival after variceal bleeding over an 11-year period in the Department of Veterans Affairs. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3566-73.
- ¹⁷⁷Mc Cormick PA, O'Keefe CO. Improving prognosis following a first variceal haemorrhage over four decades. *Gut* 2001;49:682-5.
- ¹⁷⁸Chalasanani N, Kahi C, Francois F, Pinto A, Marathe A, Bini EJ, et al. Improved patient survival after acute variceal bleeding: a multicenter, cohort study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:653-9.
- ¹⁷⁹Bertaglia E, Belmonte P, Vertolli U, Azzurro M, Martines D. Bleeding in cirrhotic patients: a precipitating factor due to intravascular coagulation or to hepatic failure? *Haemostasis* 1983;13:328-34.
- ¹⁸⁰Violi F, Ferro D, Basili S, Quintarelli C, Saliola M, Alessandri C, et al. Hyperfibrinolysis increases the risk of gastrointestinal hemorrhage in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 1992;15:672-6.
- ¹⁸¹Violi F, Basili S, Ferro D, Quintarelli C, Alessandri C, Cordova C. Association between high values of D-dimer and tissue-plasminogen activator activity and first gastrointestinal bleeding in cirrhotic patients. *CALC Group. Thromb Haemost* 1996;76:177-83.
- ¹⁸²Bosch J, Reverter JC. The coagulopathy of cirrhosis: myth or reality? *Hepatology* 2005;41:434-5.
- ¹⁸³Bernard B, Cadranet JF, Valla D, Escolano S, Jarlier V, Opolon P. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108:1828-34.
- ¹⁸⁴Saliola M, Lorenzet R, Ferro D, Basili S, Caroselli C, SantoAD, et al. Enhanced expression of monocyte tissue factor in patients with liver cirrhosis. *Gut* 1998;43:428-32.

- ¹⁸⁵Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet* 1999;353:139-42.
- ¹⁸⁶Bernard B, Grangé JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 1999;29:1655-61.
- ¹⁸⁷Hou MC, Lin HC, Liu TT, Kuo BI, Lee FY, Chang FY, et al. Antibiotic prophylaxis after endoscopic therapy prevents rebleeding in acute variceal hemorrhage: a randomized trial. *Hepatology* 2004;39:746-53.
- ¹⁸⁸Castelino DJ, Salem HH. Natural anticoagulant and the liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:77-83.
- ¹⁸⁹Northup PG, Caldwell SH. New concept of coagulation and bleeding in liver disease. *Intern Emerg Med* 2010;5:3-6.
- ¹⁹⁰Northup PG, Sundaram V, Fallon MB, Reddy KR, Balogun RA, Sanyal Aj, et al. Coagulation in liver disease group. Hypercoagulation and thrombophilia in liver disease. *JTH* 2008;6:2-9.
- ¹⁹¹Sogaard KK, Horvath-Puho E, Gronbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sorensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case control study. *Am J Gastroenterol* 2009;104:96-101.
- ¹⁹²Sacerdoti D, Merkel C, Bolognesi M, Amodio P, Angeli P, Gatta A. Hepatic arterial resistance in cirrhosis with and without portal vein thrombosis: relationship with portal hemodynamics. *Gastroenterology* 1995;108:1152-8.
- ¹⁹³Stein SF, Harker LA. Kinetic and functional studies of platelets, fibrinogen, and plasminogen in patients with hepatic cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1982;99:217-30.
- ¹⁹⁴La Villa G, Gentilini P. Hemodynamic alterations in liver cirrhosis. *Mol Aspects Med* 2008;29:112-8.
- ¹⁹⁵Senzolo M, Sartori MT, Lisman T. Should we give thromboprophylaxis to patients with liver cirrhosis and coagulopathy? *HPB (Oxford)* 2009;11:459-64.
- ¹⁹⁶Northup PG, McMahon MM, Ruhl AP, Altschuler SE, Volk-Bednarz A, Caldwell SH, et al. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thromboembolism. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1524-8.

- ¹⁹⁷Gulley D, Teal E, Suvannasankha A, Chalasani N, Liangpunsakul S. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in cirrhosis patients. *Dig Dis Sci* 2008;53:3012-17.
- ¹⁹⁸Garcia-Fuster MJ, Abdilla N, Fabia MJ, Fernandez C, Oliver V, Forner MJ. Venous thromboembolism and liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100:259-62.
- ¹⁹⁹Violi F, Ferro D, Basili S, D'Angelo A, Mazzola G, Quintarelli C, et al. Relation between lupus anticoagulant and splanchnic venous thrombosis in cirrhosis of the liver. *BMJ* 1994;309:239-40.
- ²⁰⁰Zocco MA, Di Stasio E, De Cristofaro R, Novi M, Ainora ME, Ponziani F, et al. Thrombotic risk factors in patients with liver cirrhosis: correlation with MELD scoring system and portal vein thrombosis development. *J Hepatol* 2009;5:682-9.
- ²⁰¹Violi F, Ferro D, Basili S, Lionetti R, Rossi E, Merli M, et al. Ongoing prothrombotic state in the portal circulation of cirrhotic patients. *Thromb Haemost* 1997;77:44-7.
- ²⁰²Fimognari FL, De Santis A, Piccheri C, Moscatelli R, Gigliotti F, Vestri A, et al. Evaluation of D-dimer and factor VIII in cirrhotic patients with asymptomatic portal venous thrombosis. *J Lab Clin Med* 2005;146:238-43.
- ²⁰³Prieto J, Yuste JR, Beloqui O, Civeira MP, Riezu JJ, Aguirre B, et al. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C: implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996;23:199-204.
- ²⁰⁴Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Margaglione M, Manguso F, Iannaccone L, et al. Risk factors and clinical presentation of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004;40:736-41.
- ²⁰⁵Lisman T, Porte RJ. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation: more than just a surgical complication? *Transpl Int* 2009;22:162-4.
- ²⁰⁶Vivarelli M, La Barba G, Cucchetti A, Lauro A, Del Gaudio M, Ravaioli M, et al. Can antiplatelet prophylaxis reduce the incidence of hepatic artery thrombosis after liver transplantation? *Liver Transpl* 2007;13:651-4.
- ²⁰⁷Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcore EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in developments of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995;21:1238-47.
- ²⁰⁸Poujol-Robert A, Rosmorduc O, Serfaty L, Coulet F, Poupon R, Robert A. Genetic and acquired thrombotic factors in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2004;99:527-31.

- ²⁰⁹Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004;24:99-106.
- ²¹⁰Hillenbrand P, Parbhoo SP, Jedrychowski A, Sherlock S. Significance of intravascular coagulation and fibrinolysis in acute hepatic failure. *Gut* 1974;15:83-8.
- ²¹¹Anstee QM, Goldin RD, Wright M, Martinelli A, Cox R, Thursz MR. Coagulation status modulates murine hepatic fibrogenesis: implications for the development of novel therapies. *JTH* 2008;6:1336-43.
- ²¹²Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, Cubel G, Haurie V, Petibois C, et al. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:226-35.
- ²¹³Duplantier JG, Dubuisson L, Senant N, Freyburger G, Laurendeau I, Herbert JM, et al. A role for thrombin in liver fibrosis. *Gut* 2004;53:1682-7.
- ²¹⁴Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, et al. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007;46:286-94.
- ²¹⁵Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Primary pulmonary hypertension: a pathological study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* 1970;42:1163-84.
- ²¹⁶Assy N, Pettigrew N, Lee SS, Chaudhary RK, Johnston J, Minuk GY. Are chronic hepatitis C viral infections more benign in patients with hemophilia? *Am J Gastroenterol* 2007;102:1672-6.
- ²¹⁷Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs. anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:2105-11.
- ²¹⁸Younger HM, Hadoke PW, Dillon JF, Hayes PC. Platelet function in cirrhosis and the role of humoral factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:989-92.
- ²¹⁹Violi F, Leo R, Vezza E, Basili S, Cordova C, Balsano F. Bleeding time in patients with cirrhosis: relation with degree of liver failure and clotting abnormalities. C.A.L.C. Group. Coagulation Abnormalities in Cirrhosis Study Group. *J Hepatol* 1994;20:531-6.
- ²²⁰Laffi G, Marra F. Complications of cirrhosis: Is the endothelium guilty? *J Hepatol* 1999;30:532-5.

- ²²¹Burroughs AK, Matthews K, Qadiri M, Thomas N, Kernoff P, Tuddenham E, et al. Desmopressin and bleeding time in patients with cirrhosis. *BMJ* 1985;291:1377-81.
- ²²²Mannucci PM, Vicente V, Vianello L, Cattaneo M, Alberca I, Coccato MP, et al. Controlled trial of desmopressin in liver cirrhosis and other conditions associated with a prolonged bleeding time. *Blood* 1986; 67:1148-53.
- ²²³de Franchis R, Arcidiacono PG, Carpinelli L, Andreoni B, Cestari L, Brunati S, et al. Randomized controlled trial of desmopressin plus terlipressin vs. terlipressin alone for the treatment of acute variceal hemorrhage in cirrhotic patients: a multicenter, double-blind study. *New Italian Endoscopic Club. Hepatology* 1993;18:1102-7.
- ²²⁴Wong AU, Irwin MG, Hui TW, Fung SK, Ma ES. Desmopressin does not decrease blood loss and transfusion requirements in patients undergoing hepatectomy. *Can J Anaesth* 2003;50:14-20.
- ²²⁵Basili S, Ferro D, Leo R, Juliano L, Alessandri C, Cordova C, et al. Bleeding time does not predict gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis. The CALC group. Coagulation abnormalities in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1996;24:574-80.
- ²²⁶Lisman T, Adelmeijer J, de Groot PG, Janssen HL, Leebeek FW. No evidence for an intrinsic platelet defect in patients with liver cirrhosis – studies under flow conditions. *JTH* 2006;4:2070-2.
- ²²⁷Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*.2001;98:2730-5.
- ²²⁸O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan MA. Marked elevation of thrombin generation in patients with elevated FVIII:C and venous thromboembolism. *BJH* 2001;115:687-91.
- ²²⁹Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzangia M, Primignani M, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology* 2005;41:553-8.
- ²³⁰Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, D'Amico G, Albillos A, Gonzalez Abraldes J, et al. European Study Group on rFVIIa in UGI Haemorrhage. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology* 2004;127:1123-30.

- ²³¹Lodge JP, Jonas S, Jones RM, Olausson M, Mir-Pallardo J, Soefelt S, et al. rFVIIa OLT Study Group. Efficacy and safety of repeated perioperative doses of recombinant factor VIIa in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:973-9.
- ²³²Patrick CH. *Alcohol, Culture, and Society*. Durham, NC: Duke University Press; 1952.
- ²³³Niederau C. Alcoholic hepatitis. In: *Hepatology. A Clinical Textbook*. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin Ch, Wedemeyer H, editors. Flying Publisher 2010; p. 467-86.
- ²³⁴O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, and the Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology* 2010;51:307-28.
- ²³⁵Mac Sween RN, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1986;6:221-32.
- ²³⁶Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician* 2006;74:756-62.
- ²³⁷Sobhonslidsuk A, Silpakit C, Kongsakon R, Satitpornkul P, Srietch C. Chronic liver disease questionnaire: translation and validation in Thais. *World J Gastroenterol* 2004;10:1954-7.
- ²³⁸Adachi M, Brenner DA. Clinical syndromes of alcoholic liver disease. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 2005;23:255-63.
- ²³⁹European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:397-417.
- ²⁴⁰European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2012;57:399-420.
- ²⁴¹Bell H, Tallaksen C, Try K, Haug E. Carbohydrate deficient transferrin and other markers of high alcohol consumption: A study of 502 patients admitted consecutively to a medical department. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1103-8.
- ²⁴²Cohen J, Kaplan M. The SGOT/SGPT ratio-an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979;24:835-8.
- ²⁴³McCullough AJ, Barry O' Connor JF. Alcoholic liver disease: proposed recommendations for the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2022-36.

- ²⁴⁴Mueller S. Noninvasive assessment of patients with alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2013;2:68-71.
- ²⁴⁵Kalsi J, Delacroix DL, Hodgson HJ. IgA in alcoholic cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1983;52:499-504.
- ²⁴⁶Lucey M, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *NEJM* 2009;360:2758-69.
- ²⁴⁷Conigrave K, Davies P, Haber P, Whitfield J. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 2003; 98:31-43.
- ²⁴⁸Sanyal AJ, Bosch J, Blei A, Arroyo V. Portal hypertension and its complications. *Gastroenterology* 2008;134:1715-28.
- ²⁴⁹Mirković D, Mitrović M, Jovanović M. Portnosistemiški šant u lečenju portne hipertenzije. *Vojnosanit Pregled* 2010;67:321-8.
- ²⁵⁰Blei AT. Portal hypertension and its complications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:275-82.
- ²⁵¹Peško P, Bjelović M. Variksi jednjaka. U: *Hirurgija za studente medicine: Urednik: Maksimović ŽV. CIBID* 2008; s.167-207.
- ²⁵²Grabau CM, Crago SF, Hoff LK. Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis. *Hepatology* 2004; 40:484–8.
- ²⁵³Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology* 1996;23:164-76.
- ²⁵⁴Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy-definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716-21.
- ²⁵⁵Patel D, McPhail MJ, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD. Hepatic encephalopathy. *Br J Hosp Med* 2012;73:79-85.
- ²⁵⁶Bajaj JS. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:537-47.
- ²⁵⁷Conn HO, Lieberthal MM. *The hepatic coma syndromes and lactulose*. Baltimore: Williams & Wilkins;1979. p.46–84.

- ²⁵⁸Häuser W, Schnur M, Steder-Neukamm U, Muthny FA, Grandt D. Validation of the German version of the Chronic Liver Disease Questionnaire. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:599-606.
- ²⁵⁹Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey WD. Practice Guidelines Committee of American Association for Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2086-102.
- ²⁶⁰Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003;362:53-61.
- ²⁶¹Strassburg CP. Autoimmune liver diseases: AIH, PBC and PSC. In: *Hepatology. A Clinical Textbook*. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin Ch, Wedemeyer H, editors. Flying Publisher 2010; p. 467-86.
- ²⁶²European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;51:237-67.
- ²⁶³Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000;31:1005-13.
- ²⁶⁴Abdalian R, Heathcote EJ. Sclerosing cholangitis: a focus on secondary causes. *Hepatology* 2006;44:1063-74.
- ²⁶⁵Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: *The liver and portal hypertension*. Edited by Child CG. Philadelphia: Saunders 1964;50-64.
- ²⁶⁶Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:648-52.
- ²⁶⁷NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, Approved Guideline-fourth edition, NCCLS Document H3-A4. Wayne, PA: NCCLS;1998.
- ²⁶⁸Buckell M. The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity. *J Clin Path* 1958;11:403-5.
- ²⁶⁹Young G, Sorensen B, Dargaud Y, Negrier C, Brummel-Ziedinis K, Key NS. Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood* 2013;121:1944-50.
- ²⁷⁰Barrowcliffe TW, Cattaneo M, Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, et al. New approaches for measuring coagulation. *Haemophilia* 2006;12:76-81.
- ²⁷¹Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thromboelastographie, einem Untersuchungsverfahren. *Kin Wochenschr* 1948;26:577-83.

- ²⁷²Calatzis A, Fritzsche P, Calatzis A, Kling M, Hipp R, Sternberger A. A comparison of the technical principle of the roTEG coagulation analyser and conventional thromboelastographic systems. *Ann Hematol* 1996;72:142-6.
- ²⁷³Pentapharm GmbH. ROTEM® delta. Whole blood haemostasis system using thromboelastometry. User Manual 1.05.01.03 EN 2007.
- ²⁷⁴Innerhofer P, Streif W, Kuhbacher G, Fries D. Monitoring of Perioperative Dilutional Coagulopathy Using the ROTEM® Analyzer: Basic Principles and Clinical Examples. *Transfus Med Hemother* 2004;31:244-9.
- ²⁷⁵Luddington RJ. Thromboelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haem* 2005;27:81-90.
- ²⁷⁶Spiel AO, Mayr FB, Firbas C, Quehenberger P, Jilma B. Validation of rotation thromboelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *JTH* 2006;4:411-6.
- ²⁷⁷Görlinger K, Jambor C, Hanke AA, Dirkmann D, Adamzik M, Hartmann M, et al. Perioperative coagulation management and control of platelet transfusion by point-of-care platelet function analysis. *Transf Med Hemother* 2007;34:396-411.
- ²⁷⁸Hanecke P, Klouche M. Thromboelastography Today: Practicability and analytical power. *Transfus Med Hemother* 2007;34:421-8.
- ²⁷⁹Kozek-Langenecker S. Management of massive operative blood loss. *Minerva Anesthesiol* 2007;73:401-15.
- ²⁸⁰Lang T, von Depka M. Possibilities and limitations of thromboelastometry/graphy. *Hämostaseologie* 2006;23:520-9.
- ²⁸¹Coakley M, Reddy K, Mackie I, Mallet S. Transfusion Triggers in Orthotopic Liver Transplantation: A Comparison of the Thromboelastometry Analyzer, the Thromboelastogram and Conventional Coagulation Tests. *J Cardiovasc and Vasc Anaesth* 2006;20:548-53.
- ²⁸²Lang T, Bauters A, Potzsch B, von Pape KW, Kolde HJ, Lakner M. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrinol* 2005;16:301-10.
- ²⁸³Lang T, Toller W, Gutl M, Mahia E, Metzler H, Rehak P, et al. Different effects of abciximab and cytochalasin D on cloth strength in thromboelastography. *JTH* 2004;2:147-53.

- ²⁸⁴Lee C, Berntorp E, Hoots K, Sorensen B, Young G. Global laboratory assays in hemophilia. In: Lee C, Berntorp E, Hoots K, editors. Textbook of Hemophilia. 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010. p. 263-8.
- ²⁸⁵Vucelic D, Miljic P, Antonijevic N, Milicevic M. The role of rotational thromboelastometry in real time assessment of haemostasis in surgical setting. *Srp Arh Celok Lek* 2010;138:43-9.
- ²⁸⁶Nair SC, Dargaud Y, Chitlurs M, Srivastava A. Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010;16:85-92.
- ²⁸⁷van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *BJH* 2008;142:889-903.
- ²⁸⁸Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986;56:9-17.
- ²⁸⁹Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993;70:617-24.
- ²⁹⁰Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 1995;74:134-8.
- ²⁹¹Hemker HC, Giesen PL, Ramjee MK, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000;83:589-91.
- ²⁹²Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:249-53.
- ²⁹³Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
- ²⁹⁴Ramjee MK. The use of fluorogenic substrates to monitor thrombin generation for the analysis of plasma and whole blood coagulation. *Anal Biochem* 2000;277:11-8.
- ²⁹⁵Tappenden KA, Gallimore MJ, Evans G, Mackie IJ, Jones DW. Thrombin generation: a comparison of assays using platelet-poor and -rich plasma and whole blood samples from healthy controls and patients with a history of venous thromboembolism. *BJH* 2007;139:106-12.

- ²⁹⁶Tripodi A, Anstee QM, Sogard KK, Primignani M, Valla DC. Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences. *JTH* 2011;17:13-23.
- ²⁹⁷Giannini EG, Savarino V. Thrombocytopenia in liver disease. *Curr Opin Hematol* 2008;15:473-80.
- ²⁹⁸Mannucci PM. Abnormal hemostasis tests and bleeding in chronic liver disease: are they related? No. *JTH* 2006;4:721-3.
- ²⁹⁹Grant A, Neuberger J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *British Society of Gastroenterology. Gut* 1999;45:IV1–IV11.
- ³⁰⁰Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65.
- ³⁰¹Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, Tuddenham EG, Makris M, Burroughs AK. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *JTH* 2010;8:1994-2000.
- ³⁰²Kleinegris MC, Bos MH, Roest M, Henskens Y, Ten Cate-Hoek A, Van Deursen C, et al. Cirrhosis patients have a coagulopathy that is associated with decreased clot formation capacity. *JTH* 2014;12:1647-57.
- ³⁰³Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Viscardi Y, Dell'Era A, Fabris FM, Mannucci PM. The coagulopathy of cirrhosis assessed by thromboelastometry and its correlation with conventional coagulation parameters. *Thromb Res* 2009;124:132-6.
- ³⁰⁴Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Clerici M, Dell'Era A, Fabris A, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology* 2006;44:440-5.
- ³⁰⁵Dargaud Y, Luddington R, Baglin TP. Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated thrombography at low-concentration tissue factor. *JTH* 2006;4:1160-1.
- ³⁰⁶Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *JTH* 2004;2:402-13.
- ³⁰⁷Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:41-8.

- ³⁰⁸Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003;101:3008-13.
- ³⁰⁹Poort S, Rosendaal F, Bertina R. A common genetic variant in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
- ³¹⁰Furie B, Liebman HA, Blanchard RA, Coleman MS, Kruger SF, Furie BC. Comparison of the native prothrombin antigen and the prothrombin time for monitoring oral anticoagulant therapy. *Blood* 1984;64:445-51.
- ³¹¹Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor liver. *Gastroenterology* 2003;124:91-6.
- ³¹²Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C. Specific laboratory methodologies achieve higher model for endstage liver disease (MELD) scores for patients listed for liver transplantation. *Liver Transpl* 2004;10:995-1000.
- ³¹³Robert A, Chazouilleres O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio. *Hepatology* 1996;24:1392-4.
- ³¹⁴Kovacs MJ, Wong A, MacKinnon K, Weir K, Keeney M, Boyle E, et al. Assessment of the validity of the INR system for patients with liver impairment. *Thromb Haemost* 1994;71:727-30.
- ³¹⁵Ritter DM, Owen CA Jr, Bowie EJ, Rettke SR, Cole TL, Taswell HF, et al. Evaluation of preoperative haematology-coagulation screening in liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1989;64:216-23.
- ³¹⁶Gores GJ, Wiesner RH, Dickson ER, Zinsmeister AR, Jorgensen RA, Langworthy A. Prospective evaluation of esophageal varices in primary biliary cirrhosis: development, natural history, and influence on survival. *Gastroenterology* 1989;96:1552-9.
- ³¹⁷Segal H, Cottam S, Potter D, Hunt BJ. Coagulation and fibrinolysis in primary biliary cirrhosis compared with other liver disease and during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997;25:683-8.
- ³¹⁸Palareti G, Legnani C, Maccaferri M, Gozzetti G, Mazziotti A, Martinelli G, et al. Coagulation and fibrinolysis in orthotopic liver transplantation: role of the recipients disease and use of antithrombin III concentrates. *Haemostasis* 1991;21:68-76.

- ³¹⁹Ben-Ari Z, Panagou M, Patch D, Bates S, Osman E, Pasi J, et al. Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis evaluated by thromboelastography. *J Hepatol* 1997;26:554-9.
- ³²⁰Pihusch R, Rank A, Göhring P, Pihusch M, Hiller E, Beuers U. Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease. *J Hepatol* 2002;37:548-55.
- ³²¹Vucelic D, Jesic R, Jovicic S, Zivotic M, Grubor N, Trajkovic G, et al. Comparison of standard fibrinogen measurement with fibrin clot firmness assessed by thromboelastometry in patients with cirrhosis. *Thromb Res* 2015;135:1124-30.
- ³²²Braunstein KM, Kinard HB, Hepfer TW, Craig WR, Eurenus K. Regulation of the thrombin time in cirrhosis. *Thromb Res* 1976;9:301-17.
- ³²³Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on fibrinogen assays. *BJH* 2003;121:396-404.
- ³²⁴Solomon C, Sørensen B, Hochleitner G, Kashuk J, Ranucci M, Schöchl H. Comparison of whole blood fibrin-based clot tests in thrombelastography and thromboelastometry. *Anesth Analg* 2012;114:721-30.
- ³²⁵Nielsen VG, Gurley WQ Jr., Burch TM. The impact of factor XIII on coagulation kinetics and clot strength determined by thromboelastography. *Anesth Analg* 2004;99:120-3.
- ³²⁶Solomon C, Rahe-Meyer N, Schöchl H, Ranucci M, Gørlinger K. Effect of haematocrit on fibrin-based clot firmness in the FIBTEM test. *Blood Transfus* 2013;11:412-8.
- ³²⁷Shenkman B, Livnat T, Lubetsky A, Tamarin I, Budnik I, Einav Y, et al. The in vitro effect of fibrinogen, factor XIII and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor on clot formation and susceptibility to tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis in hemodilution model. *Blood Coagul Fibrinol* 2012;23:370-8.
- ³²⁸Jämbor C, Reul V, Schnider TW, Degiacomi P, Metzner H, Korte WC. In vitro inhibition of FXIII retards clot formation, reduces clot firmness, and increases fibrinolytic effects in whole blood. *Anesth Analg* 2009;109:1023-8.
- ³²⁹Saner FH, Gieseler RK, Akiz H, Canbay A, Gørlinger K. Delicate balance of bleeding and thrombosis in end-stage liver disease and liver transplantation. *Digestion* 2013;88:135-44.

- ³³⁰Fenger-Eriksen C, Lindberg-Larsen M, Christensen AQ, Ingersley J, Sorensen B. Fibrinogen concentrate substitution therapy in patients with massive haemorrhage and low plasma fibrinogen concentrations. *BJA* 2008;101:769-73.
- ³³¹Li YF, Spencer FA, Becker RC. Comparative efficacy of fibrinogen and platelet supplementation on the in vitro reversibility of competitive glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb/beta3) receptor-directed platelet inhibition. *Am Heart J* 2001;142:204-10.
- ³³²Fries D, Martini WZ. Role of fibrinogen in trauma-induced coagulopathy. *BJA* 2010;105:116-21.
- ³³³Velik-Salchner C, Haas T, Innerhofer P, Streif W, Nussbaumer W, Klingler A, et al. The effect of fibrinogen concentrate on thrombocytopenia. *JTH* 2007;5:1019-25.
- ³³⁴Rijken DC, Kock EL, Guimaraes AH, Talens S, Murad SD, Janssen HL, et al. Evidence for an enhanced fibrinolytic capacity in cirrhosis as measured with two different global fibrinolysis tests. *JTH* 2012;10:2116-22.
- ³³⁵Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
- ³³⁶Urano T, Castellino FJ, Ihara H, Suzuki Y, Ohta M, Suzuki K, et al. Activated protein C attenuates coagulation-associated over-expression of fibrinolytic activity by suppressing the thrombin-dependent inactivation of PAI-1. *JTH* 2003;1:2615-20.
- ³³⁷Rijken DC, Hoegee-de Nobel E, Jie AF, Atsma DE, Schalijs MJ, Nieuwenhuizen W. Development of a new test for the global fibrinolytic capacity in whole blood. *JTH* 2008;6:151-7.
- ³³⁸Huber K, Kirchheimer JC, Korninger C, Binder BR. Hepatic synthesis and clearance of components of the fibrinolytic system in healthy volunteers and in patients with different stages of liver cirrhosis. *Thromb Res* 1991;62:491-500.
- ³³⁹Noorman F, Braat EA, Rijken DC. Degradation of tissue-type plasminogen activator by human monocyte-derived macrophages is mediated by the mannose receptor and by the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 1995;86:3421-7.
- ³⁴⁰Booth NA, Anderson JA, Bennett B. Plasminogen activators in alcoholic cirrhosis: demonstration of increased tissue type and urokinase type activator. *J Clin Pathol* 1984;37:772-7.
- ³⁴¹Aytac S, Turkay C, Bavbek N, Kosar A. Hemostasis and global fibrinolytic capacity in chronic liver disease. *Blood Coagul Fibrinol* 2007;18:623-6.

³⁴²Ferguson JW, Helmy A, Ludiam C, Webb DJ, Hayes PC, Newby DC. Hyperfibrinolysis in alcoholic cirrhosis: relative plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. *Thromb Res* 2008;121:675-80.

³⁴³Schöchl H, Frietsch T, Pavelka M, Jämbor C. Hyperfibrinolysis after major trauma: differential diagnosis of lysis patterns and prognostic value of thromboelastometry. *J Trauma* 2009;67:125-31.

8. SPISAK SKRAĆENICA

a: aktiviran

ABJ: alkoholna bolest jetre

ADP: adenzin difosfat

ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motif-13):
specifična metaloproteaza von Willebrandovog faktora

Ag: antigen

α : alfa

α_2 -IP: alfa₂ inhibitor plazmina (alfa₂ antiplazmin)

α_2 -MG: alfa₂ makroglobulin

AF: alkalna fosfataza

AICF: accelerated intravascular coagulation and fibrinolysis-ubrzanu intravaskularnu koagulaciju i fibrinolizu

ALT: alanin aminotransferaza

AMA: antimitohondrijalna antitela

ANCA: antinuklearna citoplazmatska autoantitela

aPC: aktivirani protein C

aPTT: aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

AST: aspartat aminotransferaza

AT: antitrombin

AUC: area under the thrombin formation curve-ukupno stvoreni aktivni trombin

β : beta

BCG: bromkrezol zeleno

Ca: kalcijum

CaCl₂: kalcijum hlorid

CFT: clot formation time-vreme formiranja krvnog ugruška

Cmax: maksimalan kapacitet za stvaranje trombina

CPs: Child-Pugh skor

CRP: C reaktivni protein

CT: clotting time-vreme koagulacije (faza inicijacije koagulacionog procesa)

DDAVP: 1-deamino-8-D-arginine vasopressin; desmopresin

DIK: diseminovana intravaskularna koagulacija

DPD: 3.5-dihlorfenildiazonijum tetrafluoroborat

EASL: European Association for the Study of the Liver-Evropsko udruženje za ispitivanje bolesti jetre

ERPC: endotelni receptor proteina C

ETP: endogeni potencijal za stvaranje trombina

F: faktor koagulacije

Fa: aktivirani faktor koagulacije

FDP/fdp: fibrinogen/fibrin degradacioni produkti

fL: femtolitar

γ: gama

γ-GT: gama glutamil transferaza

GHVP: gradijent hepatičnog venskog pritiska

Glu: glutaminska kiselina

GOV: gastroezofagealni variksi

GP: glikoprotein

g: gram

GSCC: Nemačko društvo za kliničku hemiju

HBG: histidinom bogat glikoprotein

Hct: hematokritna vrednost

HE: holinesteraza

HKII: heparinski kofaktor II

HRS: hepatorenalni sindrom

IFCC: Međunarodna federacija za kliničku hemiju

Ig: imunoglobulin

IGV: izolovani variksi želuca

INR: International Normalized Ratio

IPZ: inhibitor proteina Z

iRNK: informaciona ribonukleinska kiselina

L: litar

LDH: laktat dehidrogenaza

MCV: mean corpuscular volume-srednja zapremina eritrocita

MCF: maximum clot firmness-maksimalna čvrstoća krvnog ugruška

MDCT: multislajсни skener, kompjuterizovana tomografija

MDH: maltat dehidrogenaza

MFS: mononuklearnofagocitni sistem

ML: maximum lysis-maksimalna liza krvnog ugruška

MRCP: MR holangiopankreatografija

MT1-MMP: membrane type1 matrix metalloproteinase-membranska metaloproteaza matriksa tip1

NAD: nikotin amid dinukleotid

NADPH: nikotin amid adenin dinukleotid fosfat

nm: nanometar

NO: azotni oksid

PAI: inhibitor aktivatora plazminogena

PAR: proteazom aktiviran receptor

PAF: platelet activating factor-faktor aktivacije trombocita

PBC: primarna bilijarna ciroza

PC: protein C

PDGF: platelet-derived growth factor-faktor rasta oslobođen iz trombocita

PF4: platelet activating factor 4-trombocitni faktor 4

PGI₂: prostaglandin I₂, prostaciklin

PIVKA: Protein Induced by Vitamin K Absence-proteini indukovani nedostatkom vitamina K

PS: protein S

PSC: primarni sklerozirajući holangitis

PT: protrombinsko vreme

PZ: protein Z

rFVIIa: rekombinantni aktivirani faktor VII

RNK: ribonukleinska kiselina

SAAG: serum-ascites-albumin gradijent

SBP: spontani bakterijski peritonitis

TAFI: thrombin activatable fibrinolytic inhibitor-trombinom aktiviran inhibitor fibrinolize

tAP: tkivni aktivator plazminogena

TDU: transferin deficijentan u ugljenim hidratima

TEM: tromboelastogram

TF: tkivni faktor, tromboplastin

TFPI: tissue factor pathway inhibitor-inhibitor puta tkivnog faktora

TxA₂: tromboksan A₂

t-lag: vreme od početka reakcije koagulacije do početnog stvaranja trombina - faza inicijacije

TM: trombomodulin
t-max: vreme do maksimalnog stvaranja trombina
TNF: tumor necrosis factor, faktor nekroze tumora
TSP: trombospondin
TT: trombinsko vreme
TTP: trombozna trombocitopenijska purpura
TVP: tromboza vene porte
uPA: urinarni aktivator plazminogena ili urokinaza
VLE: vreme lize euglobulina
vWF: von Willebrand-ov faktor
vWF_{Ag}: antigen von Willebrand-ovog faktora

BIOGRAFIJA

Dr Dragica Vučelić je rođena u Podgorici 08.12.1962. godine. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Podgorici. Na Medicinskom fakultetu u Sarajevu diplomirala je 1988. godine. Opšti lekarski staž obavila je u Kliničkom centru Podgorica, a državni ispit položila je u Beogradu 1989. godine. Obavljala je poslove lekara opšte medicine u Podgorici u trajanju tri godine. Specijalizaciju iz transfuziologije započela je u Kliničkom centru Podgorica 1993. godine, a nastavila je u Zavodu za transfuziju krvi Srbije, Beograd. Specijalistički ispit iz transfuziologije položila je 1996. godine u Beogradu. Od 1996.-2004. godine radila je u Zavodu za transfuziju krvi Srbije, Beograd. Od maja 2004. godine zaposlena je na Klinici za digestivnu hirurgiju, Klinički centar Srbije, gde obavlja poslove kliničkog transfuziologa. Učestvovala je u lečenju bolesnika sa tromboznom trombocitopenijskom purpurom i hemolizno uremijskim sindromom, vršeći terapijske izmene plazme na Odeljenju za urgentnu hematologiju Kliničkog centra Srbije. Edukovana je o tromboelastografiji u Kopenhagenu 2006. godine. Veći deo profesionalne karijere provela je na razvoju i implementaciji kliničke transfuzione medicine. Sada je šef Kabineta za transfuziju na Klinici za digestivnu hirurgiju, Klinički centar Srbije.

Zvanje primarijus stekla je 2009. godine. Usmeni magistarski ispit iz imunologije položila je 2010. godine. Magistarsku tezu pod naslovom "Značaj određivanja koncentracije ADAMTS13 i inhibitora na ADAMTS13 u plazmi bolesnika sa tromboznom trombocitopenijskom purpurom", smer: imunologija, odbranila je 2010. godine, mentor: prof. dr Nada Suvajđžić Vuković.

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 28. maja 2013. godine dalo je saglasnost za izradu doktorske disertacije dr Dragici Vučelić na predlog teme: "Uporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima, tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom", uža naučna oblast: hematologija. Za mentora doktorske disertacije imenovan je prof. dr Ivo Elezović. Za komentora doktorske disertacije imenovana je prof. Dr Rada Ješić.

Autor je 20 radova i 3 monografije. Koautor je 17 radova i poglavlja u knjizi. Na stručnim sastancima i internacionalnim skupovima prezentovala je radove iz oblasti kliničke transfuziologije i hemostaze. Član je Srpskog lekarskog društva, Internacionalnog društva za trombozu i hemostazu, Dunavske lige i stručnog tima Akademije za kontinuiranu medicinsku edukaciju. Recenzent je u časopisu Bilten za transfuziologiju. Znanje engleskog jezika.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Dragica Vučelić

broj upisa _____

Izjavljujem


da je doktorska disertacija pod naslovom

„Usporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima, tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.10.2015.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dragica Vučelić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Uporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima, tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom“

Mentor Prof. dr Ivo Elezović

Potpisani Dragica Vučelić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.10.2015.



Vučelić Dragica

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Upporedno ispitivanje sistema hemostaze standardnim testovima, tromboelastometrijom i testom ispitivanja stvaranja trombina kod bolesnika sa alkoholnom cirozom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

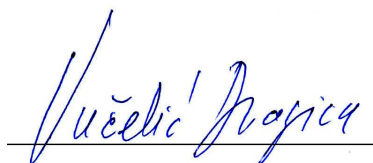
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 01.10.2015.



Vučević Miroslav