

Uloga trombina u koagulacijskoj kaskadi

Kruško, Damir

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:198171>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-07**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Damir Kruško

Uloga trombina u koagulacijskoj kaskadi

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Damir Kruško

Uloga trombina u koagulacijskoj kaskadi

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Rebro, Klinika za unutarnje bolesti, pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Boban, dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./19.

POPIS I OBJAŠNENJE KORIŠTENIH KRATICA U RADU:

HNF-1 – hepatic nuclear factor 1

ER – endoplazmatski retikulum

TFPI – tissue factor pathway inhibitor - inhibitor puta tkivnog faktora

TAFI – thrombin activated fibrinolysis inhibitor- trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize

EGF – epidermal growth factor - epidermalni faktor rasta

PAR – protease activated receptor - proteaza aktivirani receptori

bp – base pairs - parova baza

Alu – nakupine 300 parova baza

mRNA – messenger ribonucleic acid - glasnička ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ:

SAŽETAK

SUMMARY

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. PRIJAŠNJI MODELI KASKADE KOAGULACIJE | 1 |
| 2. SINTEZA I STRUKTURA PROTROMBINA | 5 |
| 2.1. MOLEKULARNA BIOLOGIJA | 5 |
| 2.2. SINTEZA PROTROMBINA | 5 |
| 2.3. STRUKTURA PROTROMBINA | 6 |
| 3. AKTIVACIJA PROTROMBINA | 8 |
| 4. ULOGA TROMBINA U KOAGULACIJSKOJ KASKADI | 9 |
| 4.1. ODNOS TROMBINA I FIBRINOGENA | 9 |
| 4.1.1. STRUKTURA FIBRINOGENA | 9 |
| 4.1.2. AKTIVACIJA FIBRINOGENA U FIBRIN | 10 |
| 4.2. ODNOS TROMBINA I FAKTORA V | 10 |
| 4.2.1. STRUKTURA FAKTORA V | 10 |
| 4.2.2. AKTIVACIJA FAKTORA V | 11 |
| 4.3. ODNOS TROMBINA I FAKTORA VIII | 11 |
| 4.3.1. STRUKTURA FAKTORA VIII | 11 |
| 4.3.2. AKTIVACIJA FAKTORA VIII | 12 |
| 4.4. ODNOS TROMBINA I FAKTORA XI | 12 |
| 4.4.1. STRUKTURA FAKTORA XI | 12 |
| 4.4.2. AKTIVACIJA FAKTORA XI | 12 |
| 4.5. ODNOS TROMBINA I FAKTORA XIII | 13 |
| 4.5.1. STRUKTURA FAKTORA XIII | 13 |
| 4.5.2. AKTIVACIJA FAKTORA XIII | 14 |
| 4.6. ODNOS TROMBINA I TROMBOMODULINA | 14 |
| 4.6.1. STRUKTURA TROMBOMODULINA | 14 |
| 4.6.2. ULOGA TROMBOMODULINA U FUNKCIJI TROMBINA | 15 |
| 5. LIJEČENJE POREMEĆAJA ZGRUŠAVANJA | 16 |
| 5.1. POVEĆANA KOAGULABILNOSTI KRVI | 16 |

| | | |
|------------|---|----|
| 5.1.1. | ANTIKOAGULANSI | 16 |
| 5.1.1.1. | VARFARIN | 17 |
| 5.1.1.2. | ANTIKOAGULANSI KOJI NEIZRAVNO INHIBIRAJU TROMBIN | 17 |
| 5.1.1.2.1. | HEPARIN..... | 17 |
| 5.1.1.2.2. | DIREKTNI ORALNI INHIBITORI FAKTORA Xa | 18 |
| 5.1.1.3. | ANTIKOAGULANSI KOJI IZRAVNO INHIBIRAJU TROMBIN | 18 |
| 5.1.1.3.1. | LEPIRUDIN | 19 |
| 5.1.1.3.2. | DABIGATRAN | 19 |
| 5.2. | SMANJENA KOAGULABILNOSTI KRVI | 19 |
| 5.2.1. | LIJEČENJE STEČENIH STANJA SMANJENE KOAGULABILNOSTI KRVI | 20 |
| 5.2.2. | LIJEČENJE NASLJEDNIH STANJA SMANJENE KOAGULABILNOSTI KRVI | 20 |
| 5.2.2.1. | EMICIZUMAB | 21 |
| 5.2.2.2. | CONCIZUMAB..... | 21 |
| 5.2.2.3. | FITUSIRAN | 22 |
| 6. | ZAKLJUČAK..... | 23 |
| 7. | ZAHVALE..... | 24 |
| 8. | LITERATURA | 25 |
| 9. | ŽIVOTOPIS..... | 31 |

SAŽETAK

Naziv: Uloga trombina u koagulacijskoj kaskadi

Autor: Damir Kruško

Trombin je enzimski aktivan protein koji ima centralnu ulogu u procesu koagulacijske kaskade. Nastaje aktivacijom protrombina, plazmatskog proteina koji se sintetizira isključivo u jetri. U početku procesa koagulacijske kaskade, male količine trombina aktiviraju faktore V, VIII i XI koji pozitivnom povratnom spregom pospješuju dodatno generiranje trombina. Nagli skok aktiviranog trombina u kasnijoj fazi, pretvaranjem fibrinogena u fibrin posreduje stvaranje fibrinske mrežice i krvnog ugruška. Također, aktiviranjem faktora XIII pojačava čvrstoću fibrinske mrežice te sprječava njenu fibrinolitičku razgradnju plazminom. Vežanjem za trombomodulin, aktivira TAFI te dodatno stabilizira ugrušak. Također, trombin vežanjem za trombomodulin pokreće i sustav prirodnih antikoagulanasa aktivirajući protein C, te time sprječava nekontrolirano generiranje trombina. Stoga se i učinak kako antikoagulantnih tako i prokoagulantnih lijekova postiže pojačavanjem ili inhibicijom djelovanja trombina.

Ključne riječi: *trombin, protrombin, hemostaza, koagulacijska kaskada*

SUMMARY

Title: The role of thrombin in the coagulation cascade

Author: Damir Kruško

Thrombin is an enzyme that has a central role in a process of coagulation cascade. It is produced by the activation of prothrombin, a plasma protein that is synthesized exclusively in the liver. Small amounts of thrombin that are present at the beginning of the coagulation cascade, activate factors V, VIII and XI which promotes further thrombin generation through positive feedback. An abrupt jump in activated thrombin at a later stage, mediates the formation of the fibrin network and blood clot, by converting fibrinogen to fibrin. Through activation of factor XIII, thrombin enhances the strength of the fibrin network and prevents its fibrinolytic degradation by plasmin. In a complex with thrombomodulin it activates TAFI and further stabilizes the clot. Furthermore, thrombin activates protein C thus activating the system of natural anticoagulant, and therefore preventing the uncontrolled generation of thrombin. Finally, the activity of both anticoagulant and procoagulant drug is achieved by the inhibition or the enhancement of thrombin activity.

Key words: thrombin, prothrombin, hemostasis, coagulation cascade

1. UVOD

Zgrušavanje krvi dobro je balansiran sistem koji sudjeluje u zaustavljanju krvarenja - hemostazi. Unutar tog sistema nalazi se velik broj tvari koje djeluju na proces zgrušavanja krvi. Neke tvari pospješuju koagulaciju pa se zovu prokoagulancije, a druge je sprječavaju pa se zovu antikoagulancije. Kada taj sistem djeluje onako kako treba, antikoagulantne tvari prevladavaju i održavaju krv u tekućem stanju unutar krvnih žila. Oštećenjem krvne žile, u području ozljede se aktiviraju prokoagulantne tvari i nadjačaju djelovanje antikoagulantnih pa se na tom mjestu stvara ugrušak. Proces aktiviranja prokoagulantnih tvari i stvaranje ugruška, naziva se koagulacijska kaskada, a sastoji se od niza biokemijskih zbivanja čiji je cilj stvaranje kompleksa aktiviranih tvari koje se zajednički zovu – aktivator protrombina. Aktivator protrombina pospješuje pretvorbu protrombina u trombin, koji svojim enzimatskim djelovanjem pretvara fibrinogen u fibrinske niti koje umrežuju trombocite, krvne stanice i plazmu, stvarajući ugrušak. Pretvorba protrombina u trombin je, na taj način, ključno zbivanje pri konačnoj formaciji samog ugruška.

1.1. PRIJAŠNJI MODELI KASKADE KOAGULACIJE

Kompleksnost hemostaze i koagulacije krvi vidljiva je i u mnogobrojnom promjenama koje su modeli koagulacije prolazili kroz povijest. Počeci razumijevanja molekularnih mehanizama javljaju se krajem šezdesetih godina prošloga stoljeća kada se po prvi puta i javlja ideja kaskadnih reakcija, pri kojima svaki prethodni faktor aktivira idući sve dok ne dođe do velikog skoka u proizvodnji trombina(1,2).

Narednih godina, utvrdilo se da su određeni prokoagulantni faktori zapravo kofaktori te da ne posjeduju enzimatsku aktivnost. Također, procesi unutar kaskade

podijeljeni su na vanjski i unutarnji put. Vanjski put započinje oštećenjem stijenke krvne žile i kontaktom tkivnog faktora sa cirkulirajućim faktorom VII, pri čemu se on aktivira. Nastaje kompleks tkivni faktor-faktor VIIa koji potom enzimatski aktivira faktor X. Unutarnji put, s druge strane, ne zahtijeva oštećenje kompletne stijenke krvne žile, već je dovoljno oštećenje endotela i kontakt krvi s endotelnim kolagenom. Takvo oštećenje uzrokuje aktivaciju trombocita te promjenu konformacije faktora XII i prelazak u njegov aktivni oblik. Faktor XIIa enzimatski aktivira faktor XI u čemu sudjeluju još i kininogen velike molekularne mase te prekalikrein. Faktor XIa aktivira faktor IX, koji potom, zajedno sa faktorom VIIIa, trombocitnim fosfolipidima i trombocitnim faktorom 3, aktivira faktor X. Oba puta završavaju aktivacijom faktora X koji i onda u kompleksu s faktorom Va djeluje kao aktivator protrombina (Xa-Va). Ovaj model s velikom preciznošću pokazuje cjelokupnu strukturu koagulacijskog procesa kao niz proteolitičkih reakcija.

Daljnijim i preciznijim istraživanjima, otkriveno je da kompleks tkivni faktor-faktor VIIa aktivira, uz faktor X, i faktor IX koji se smatrao dijelom unutarnjeg puta(3). Uz to, dokazano je da je glavni pokretač hemostaze in vivo nastanak kompleksa tkivni faktor – faktor VIIa na mjestu ozljede kako to biva u vanjskom putu(4,5). Krvarenja kao posljedica nedostatka faktora VIII i IX, stoga su se pripisivala poremećaju vanjskog puta iako su se oba faktora smatrala dijelom unutarnjeg puta(6). Sva ta otkrića, ukazivala su da vanjski i unutarnji put koagulacije ni u kojem slučaju nisu dva odvojena puta, već da se radi o istovremenoj aktivaciji i međudjelovanju oba puta. Također, prepoznata je i lokalizacija cijelog procesa na membranama stanica, kao i sama uloga staničnih membrana u cjelokupnom procesu.

1.2. SADAŠNJI MODEL KASKADE KOAGULACIJE

Boljim razumijevanjem procesa koagulacije unutar same hemostaze, predstavljen je i novi model koagulacije u kojem je prepoznata ključna uloga stanica i staničnih membrana.

Prema tome početak ili inicijacijska faza procesa koagulacije započinje na površini stanica koje sadrže tkivni faktor - transmembranski protein prisutan na gotovo svim stanicama izvan krvožilnog sustava. Prekidom kontinuiteta endotela krvne žile, slobodnocirkulirajući plazmatski faktor VII dolazi u kontakt sa stanicama koje na svojoj površini imaju tkivni faktor te se čvrsto za njega veže. Slijedi njegova proteolitička aktivacija i nastanak kompleksa tkivni faktor-faktor VIIa koji aktivira faktor X i faktor IX. Faktor Xa koji ostane na površini stanice može aktivirati faktor V te u kompleksu s njim generirati male količine trombina. S druge strane, faktor Xa koji difundira dalje od stanice biva inaktiviran od strane TFPI (inhibitor puta tkivnog faktora) što pomaže lokalizaciju samog procesa. Osim faktora VII, oštećenje stijenke krvnih žila omogućuje kontakt te prijanjanje trombocita na ekstravaskularni matriks, pri čemu se oni djelomično aktiviraju.

Slijedi amplifikacijska faza u kojoj male količine trombina koje su nastale u inicijacijskoj fazi, završavaju aktivaciju trombocita preko PAR receptora, ali i lokalno aktiviraju faktore V, VIII i XI. Aktivirani trombociti na površinu svojih membrana potom izbacuju djelomično aktivirani faktor V, čiju konačnu aktivaciju posreduje trombin ili faktor Xa. Dio trombina ostane vezan na trombocitima preko ne-PAR receptora te hvata i aktivira cirkulirajući faktor VIII koji se u plazmi nalazi u kompleksu sa von

Willebrandovim faktorom (vWF). Faktor VIIIa otpušta vWF te ostaje vezan na površinu aktiviranog trombocita. Aktivirani faktor IXa veže se potom na faktor VIIIa na površini trombocita te skupa čine tenaza kompleks (faktor VIIIa-faktor IXa).

Nastanak tenaza kompleksa označava početak propagacijske faze. Kompleks faktor VIIIa-faktor IXa na površini trombocita aktivira faktor X koji onda sa faktorom Va čini protrombinaza kompleks čija je funkcija aktivacija velike količine trombina potrebne za stvaranje fibrina i daljnju regulaciju koagulacije(7).

Trombin se tako stvara u dva vala. Prvi put u malim količinama na površini stanica s tkivnim faktorom za vrijeme inicijacijske faze, a drugi put u velikim količinama kao posljedica rada protrombinaza kompleksa u propagacijskoj fazi.

2. SINTEZA I STRUKTURA PROTROMBINA

Trombin je koagulacijski faktor koji nastaje proteolitičkim cijepanjem neaktivnog prekursorskog oblika – protrombina. Protrombin, zajedno sa faktorom VII, IX i X te proteinom C, pripada u skupinu koagulacijskih faktora ovisnih o vitaminu K.

2.1. MOLEKULARNA BIOLOGIJA

Gen za protrombin u potpunosti je sekvenciran i veličine je 21 kilobaza. Nalazi se blizu centromere kromosoma 11, a čine ga 14 egzona međusobno odvojenih sa 13 introna. Egzoni veličinom variraju između 25 i 315 bp, dok introni variraju između 84 i 9447 bp te tako čine 90% samog gena. Također, na nekoliko mjesta u intronima nalaze se nakupine i do 30 ponavljanja Alu elemenata, čija funkcija nije poznata(8). Na 5' kraju gena, nalazi se promotorska regija te dva ili više pojačivača. Promotor gena za protrombin sadrži, u duljini 3 – 38 bp uzvodno od početnog metionina, više područja na kojima transkripcija može započeti. Ipak, najčešće mjesto početka translacije nalazi se na paru baza – 31. Slijed između – 887 bp i – 875 bp je vežuće mjesto za HNF-1, protein koji vezanjem za DNA regulira ciljanu ekspresiju gena za protrombin isključivo u jetri.

2.2. SINTEZA PROTROMBINA

Protrombin je u jetri sintetiziran zajedno sa amino-terminalnom signalnom sekvencom čija je uloga usmjeravanje protrombina u endoplazmatski retikulum. Signalna sekvenca praćena je aminokiselinskim propeptidom koji se sastoji od 19-25 aminokiselina te ima ulogu u posttranslacijskoj modifikaciji protrombina. Naime, propeptid bude prepoznat od enzima γ -glutamil karboksilaza koji onda katalizira karboksilaciju bočnih lanaca glutaminskih kiselina (Glu) u γ -karboksiglutamat (Gla) na

amino-kraju molekule protrombina. Za svoju normalnu funkciju, tom enzimu je potreban vitamin K kao kofaktor, pri čemu vitamin K hidrokinon prelazi u oksidirani oblik vitamin K 2,3 epoksid. Translokacijom u endoplazmatski retikulum, signalnu sekvencu protrombina ukloni mikrosomalna signalna peptidaza. Konačno, nakon karboksilacije, odcijepi se i propeptid te se novonastali, zreli protein, izlučuje.

2.3. STRUKTURA PROTROMBINA

Kao i ostali koagulacijski faktori ovisni o vitaminu K, protrombin je zimogen koji se primarno sintetizira u jetri. U plazmi cirkulira kao jednodijelni proteinski lanac relativne molekularne mase otprilike 72000 i poluživotom od 60 sati(9).

Na svome amino-kraju sadrži Gla domenu (aminokiseline 1 – 46), tako nazvanu zbog deset γ -karboksiglutamata koje sadrži u svom aminokiselinskom nizu, na mjestima – 6, – 7, – 14, – 16, – 19, – 20, –25, – 26, – 29 i – 32. Gla domena, uz posredstvo kalcija, omogućuje interakciju protrombina sa lipidnim membranama. Vežanje kalcija za Gla domenu dovodi do konformacijske promjene trodimenzionalne strukture same domene, pri čemu bočne skupine aminokiselina tvore hidrofobno područje koje se vrlo lako umetne u fosfolipidnu membranu.

Gla domenu slijede dvije kringle domene, Kringle-1 (aminokiseline 65 – 143) te Kringle-2 (aminokiseline 170 – 248). Pojedinačna kringle domena sadrži 3 disulfidne veze u svojoj strukturi, koje omogućuju njen specifičan prostorni izgled. Uloga krlingle domena je vežanje drugih proteina, kao što su različiti aktivatori (protrombinaza kompleks), substrati, kofaktori ili receptori.

Domena na karboksi-kraju ima aktivnost serinske proteaze te se sastoji od A lanca (aminokiseline 285 – 320), te katalitičkog B lanca (aminokiseline 321 – 579).

3. AKTIVACIJA PROTROMBINA

Protrombin je enzimatski neaktivan te njegovu pretvorbu u enzimatski aktivni trombin posreduje protrombinaza kompleks (kompleks faktora Xa/Va), proteolitičkim cijepanjem aminokiselinskog lanca protrombina na dva mjesta. Ako se prvo pocijepa na mjestu – 271, Gla domena te obje kringle domene, odvajaju se od ostataka lanca pri čemu nastaju protrombin fragment 1.2 te inaktivni jednodijelni aminokiselinski lanac pretrombin-2. Daljnim cijepanjem na mjestu – 320, od pretrombina-2 nastaje trombin sastavljen od dva lanca, lanac A i katalitički B lanac, međusobno povezana disulfidnom vezom. Ovakav slijed cijepanja, događa se na površini trombocita(10). Na drugim površinama te sintetičkim fosfolipidima, prvotno se pocijepa mjesto – 320, pri čemu nastaje međuprodukt meizotrombin sastavljen od spojednog fragmenta 1.2 sa lancem A, koji su disulfidnom vezom povezani sa katalitičkim lancem B. Slijedi cijepanje na mjestu – 271 pri čemu opet nastaje fragment 1.2 te trombin(11).

4. ULOGA TROMBINA U KOAGULACIJSKOJ KASKADI

Trombin, kao faktor zgrušavanja, ima višestruku ulogu u procesu hemostaze. Kao što je već spomenuto, trombin posjeduje proteolitičku enzimatsku aktivnost kojom ostvaruje svoju prokoagulantnu ulogu, ponajprije cijepajući fibrinogen u fibrin. Uz to, svoju prokoagulantnu aktivnost pokazuje sudjelujući i u pozitivnoj povratnoj sprezi pri stvaranju ugruška - aktivirajući trombocite te faktore zgrušavanja V, VIII, XI i XIII.

Također, trombin uz pomoć kofaktora trombomodulina, aktivira enzim sličan prokarboksipeptidazi B (TAFI). Taj enzim potom uklanja lizinske ostatke na karboksikraju plazmina, čime smanjuje njegovo vezanje na fibrin, što dovodi do inhibicije fibrinolize posredovane plazminom.

Uz prokoagulantni, trombin ima i antikoagulantni učinak. Vezanje za kofaktor trombomodulin na endotelnim stanicama, omogućuje mu proteolitičko cijepanje i aktiviranje proteina C. Aktivirani protein C potom, proteolitički inaktivira faktore Va i VIIIa, čime se njihova uloga u aktivaciji trombina privodi kraju.

4.1. ODNOS TROMBINA I FIBRINOGENA

4.1.1. STRUKTURA FIBRINOGENA

Fibrinogen je dimerni glikoprotein velike relativne molekularne mase ($M_r = 340000$), a stvara se u stanicama jetre, kao i protrombin. Svaki dimer sastoji se od tri međusobno isprepletana polipeptidna lanca: $A\alpha$, $B\beta$ i γ , čiji amino-krajevi, zajedno s amino-krajevima drugog dimera, čine centralnu - E domenu fibrinogena. Unutar E domene, amino-krajevi svih šest polipeptidnih lanaca međusobno su povezani trima

disulfidnim vezama koje spajaju dva dimera u cjelinu(12). Karboksi-terminalni krajevi B β i γ lanca pojedinog dimera, čine po jednu D domenu fibrinogena(13).

4.1.2. AKTIVACIJA FIBRINOGENA U FIBRIN

Aktivacija i pretvorba fibrinogena u fibrin započinje vezanjem trombina na centralnu domenu fibrinogena(14). Nakon vezanja, trombin enzimatski cijepa amino-krajeve polipeptidnih lanaca A α i B β koji se nalaze u centralnoj domeni. Cijepanjem A α lanaca na mjestu Arg16-Gly17, dva fibrinopeptida A odcjepljuju se od ostatka A α lanaca, a cijepanjem B β lanaca na mjestu Arg14-Gly15, odvajaju se i dva fibrinopeptida B. U konačnici, nastaje monomer fibrina koja se sastoji od dvije D domene i jedne E domene kojoj nedostaju po jedan A i jedan B lanac svakog dimera(15). Odcjepljivanje fibrinopeptida, otkriva na E domeni dva vezna mjesta koja su komplementarna veznim mjestima na domenama D drugih fibrinskih monomera(16)(17). Komplementarna vezna mjesta spontano se spajaju pri čemu nastaju protofibrili koji daljnjim rastom i granjanjem te međusobnim povezivanjem, čine čvrstu vlaknastu mrežu.

4.2. ODNOS TROMBINA I FAKTORA V

4.2.1. STRUKTURA FAKTORA V

Faktor V homologan je faktoru VIII po svom aminokiselinskom slijedu te strukturi i poretku proteinskih domena. Također, sličan im je put unutarstanične obrade u Golgijevom tijelu i endoplazmatskom retikulumu, zbog čega različiti poremećaji enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi, dovode do istovremenog manjka oba faktora. Faktor V je veliki glikoprotein relativne molekularne mase 330000. Sastoji se od 6 domena koje su povezane u slijed A1-A2-B-A3-C1-C2. C2 domena omogućuje vezanje faktora V za

lipidne membrane(18), dok je B domena zadužena za vezanje trombina te samim time i aktivaciju faktora V.

4.2.2. AKTIVACIJA FAKTORA V

Faktor V cirkulira u plazmi kao jednolančana molekula. Oko 20% cirkulirajućeg faktora V nalazi se u trombocitima, gdje ga cijepaju i aktiviraju trombocitne proteaze. Ostatak se nalazi u plazmi, gdje ga pocijepa trombin i to na mjestima Arg709 i Arg1545, koji se nalaze unutar B domene. Pri cijepanju nastaje dvolančana heterodimerna molekula – faktor Va, koja se sastoji od teškog lanca (domene A1-A2) nekovalentno povezanog kalcijevim ionima sa lakim lancem (domene A3-C1-C2). Faktor Va zajedno s faktorom Xa čini protrombinaza kompleks koji pretvara protrombin u trombin (pozitivna povratna sprega).

4.3. ODNOS TROMBINA I FAKTORA VIII

4.3.1. STRUKTURA FAKTORA VIII

Faktor VIII je po građi sličan faktoru V te se također sastoji od slijeda domena A1-A2-B-A3-C1-C2. Ipak, sličnost koja je prisutna u A i C domenama oba faktora ne očituje se u B domenama, koje se uvelike razlikuju. Sintetizira se primarno u jetri, a u cirkulaciju se izlučuju kao heterogena skupina djelomice pocijepanih oblika posljedično različitom mjestu cijepanja B domene. U cirkulaciji se nalazi u kompleksu nekovalentno vezan za vWF. Posttranslacijska sulfatacija tirozinskih ostataka na mjestima 346, 718, 719, 723, 1664 te 1680 pospješuje vezanje faktora VIII za vWF, ali i za trombin koji ga aktivira.

4.3.2. AKTIVACIJA FAKTORA VIII

Faktor VIII mogu aktivirati ponajprije trombin, ali i faktor Xa. Trombin se veže na faktor VIII preko svoje anion-vežuće regije te cijepa polipeptidni lanac faktora VIII na mjestima Arg372, Arg740 te Arg1689. Samo vezanje trombina te aktivaciju faktora VIII pospješuju kiseli ostaci na kraju A2 domene za koje se veže anion-vežuća regija trombina(19). Nastaje heterotrimerna molekula – VIIIa, koja se sastoji od domene A1 i domene A2, nekovalentno vezane sa lakim lancem A3-C1-C2 pomoću kalcijevih iona. Aktivacija dovodi i do promjene konfiguracije te oslobađanje vWF od faktora VIII. VIIIa zajedno sa faktorom IXa čini tenaza kompleks, čija je uloga aktivacija faktora X.

4.4. ODNOS TROMBINA I FAKTORA XI

4.4.1. STRUKTURA FAKTORA XI

Faktor XI je zimogen, prekursor serinske proteaze. U cirkulaciji se nalazi u kompleksu sa neenzimatskim kofaktorom - kininogen velike molekularne mase (HK). Proizvodi se u jetri kao cjelovit lanac, dok se u plazmi nalazi kao homodimer povezan disulfidnom vezom. Svaka podjedinica ima molekularnu masu od otprilike 80000 te u svome lancu sadrži četiri ponavljanja strukturalnog motiva nazvanog 'apple domena'. Svaka apple domena ima 90-91 aminokiselinu u svojoj strukturi, koje se u tom obliku održavaju trima disulfidnim vezama. Različite apple domene služe kao vezna mjesta za HK, protrombin, trombocite, faktor IX, trombin te faktor XIIa.

4.4.2. AKTIVACIJA FAKTORA XI

Faktor XI mogu aktivirati trombin na površini aktiviranih trombocita, faktor XIIa te XIa u prisustvu polianiona(20)(21). U sva tri slučaja, pretvorba u faktor XIa, zahtijeva proteolitičko cijepanje obje domene na mjestu Arg369-Ile370. Trombin se veže na faktor

XI preko svog pozitivno nabijenog anion vežućeg mjesta. Pri aktivaciji trombinom, prvo nastaje $\frac{1}{2}$ -XIa oblik sa jednim aktiviranim dimerom, a kasnije se aktivira i druga podjedinica te nastane faktor XIa(22). Svaka podjedinica sadrži teški lanac sa apple domenama te laki lanac koji sadrži katalitičku domenu. Oba lanca su zadužena za vezanje i aktivaciju faktora IX, za što je još potreban i kalcij(23).

4.5. ODNOS TROMBINA I FAKTORA XIII

4.5.1. STRUKTURA FAKTORA XIII

Faktor XIII je glikoprotein relativne molekularne mase od 320000 te se u plazmi se nalazi kao tetramer sastavljen od uparenih A i B podjedinica (A₂B₂). A podjedinica ima 731 aminokiselinu u svom lancu ($M_r = 83000$) i ima enzimatsku aktivnost, a najviše se sintetizira u stanicama koštane srži. B podjedinica ima 641 aminokiselinu u svom lancu ($M_r = 76500$), sintetizira se u jetri, a služi kao protein koji veže i prenosi podjedinicu A u plazmi. U plazmi se B podjedinica nalazi u molarnom suvišku nad A podjedinicom, tako da su sve A podjedinice vezane za B podjedinice. Dio B podjedinica nalazi se i slobodan u cirkulaciji. Osim u cirkulaciji, faktor XIII se nalazi i u trombocitima (sintetiziran u megakariocitima)(24) te monocitima/makrofagima(25). Tamo se sintetizira kao dimer sastavljen od dvije A podjedinice bez B podjedinica.

4.5.2. AKTIVACIJA FAKTORA XIII

Plazmatski faktor XIII je protransglutaminaza koja prelazi u svoj enzimatski aktivni oblik - XIIIa djelovanjem trombina, a uz prisustvo kalcija(26). Trombin cijepa A lanac na mjestu Arg37-Gly38 pri čemu se oslobađa aktivacijski peptid (Mr = 4500). Taj proces dovodi do disocijacije A i B podjedinice te otkrivanje aktivnog mjesta na podjedinici A. S druge strane, trombocitni faktor XIII ne zahtijeva proteolitičko cijepanje za svoju aktivaciju. Povećanjem intracitoplazmatske koncentracije kalcija za vrijeme aktivacije trombocita, slobodna podjedinica A prelazi u svoju aktivnu konfiguraciju. Glavna uloga faktora XIIIa je poprečno spajanje α -lanaca i γ -lanaca fibrina peptidnim vezama, pri čemu dolazi do stabilizacije fibrinskog čepa i adekvatne hemostaze. Također, faktor XIIIa štiti fibrin od fibrinolize plazminom, tako što poprečno povezuje fibrin za α 2-antiplazmin(27).

4.6. ODNOS TROMBINA I TROMBOMODULINA

4.6.1. STRUKTURA TROMBOMODULINA

Trombomodulin je transmembranski protein (Mr = 78000) te je stanični kofaktor trombina. Sastoji se od pet strukturalnih regija. Na amino-kraju nalazi se regija sastavljena od dvije domene nalik na lektin-domenu, pri čemu prva ima ulogu u upali(28). Slijedi regija sastavljena od šest domena nalik epidermalnom faktoru rasta (EGF). Četvrta, peta i šesta EGF-nalik domena, zadužene su za vezanje trombina te aktivaciju C-proteina. Treća regija bogata je serinom i treoninom, a na mjestu Ser492, za serin je vezan kondroitin sulfat koji pospješuje antiokoagulantnu aktivnost trombomodulina(29). Četvrtu regiju čini transmembranski lanac od 23 aminokiseline na kojeg se nastavlja peta regija - citoplazmatski rep.

4.6.2. ULOGA TROMBOMODULINA U FUNKCIJI TROMBINA

Vežanjem trombina za trombomodulin na membranama endotelnih stanica, aktivnost trombina ostaje lokalizirana na sami endotel. Također, zbog konformacijske promjene koja nastaje vežanjem za trombomodulin, trombin više ne može cijepati fibrinogen niti aktivirati faktore V, VIII ili XIII te proteazom aktivirane receptore (PAR-1 i PAR-3) na membrani endotelnih stanice i trombocita. S druge strane, povećava se sposobnost trombina da aktivira protein-C koji ima antikoagulantnu aktivnost. Na taj način, trombomodulin prevodi prokoagulantnu aktivnost trombina u antikoagulantnu.

Kompleks trombin-trombomodulin također ubrzava aktivaciju plazmatske prokarboksipeptidaze B (TAFI), koja ima ulogu u sprječavanju fibrinolize. Uklanjanjem lizinskih ostataka na karboksi-kraju plazmina, TAFI smanjuje vežanje plazmina na fibrin i smanjuje plazminom posredovanu fibrinolizu(30).

5. LIJEČENJE POREMEĆAJA ZGRUŠAVANJA

Fiziološka funkcija sinteze protrombina, održavanje normalne cirkulirajuće koncentracije protrombina u krvi te pretvorbe protrombina u trombin, može biti narušena u raznim bolestima. Povećana sinteza protrombina te njegova pretvorba u trombin mogu dovesti do pojačane koagulabilnosti krvi sa posljedičnim stvaranjem krvnih ugrušaka, začepljenjem krvnih žila i poremećajem cirkulacije. S druge strane, smanjenje sinteze protrombina kao i poremećaji aktivacije protrombina, dovode do povećane sklonosti krvarenju te otežanog zaustavljanja krvarenja.

5.1. POVEĆANA KOAGULABILNOSTI KRVI

Mnogobrojna patološka stanja mogu dovesti do povećane koagulabilnosti krvi - trombofilije. Obično se radi o stečenim bolestima ili stanjima koje dovode do pojačane koagulabilnosti krvi, kao što su fibrilacija atrijske, umjetni srčani zalisci, opsežni kirurški zahvati s dugim oporavkom, zloćudne bolesti itd. Uzrok mogu biti i nasljedni poremećaji u kojih dolazi do kvantitativnih ili kvalitativnih promjena prirodnog antikoagulantnog sustava. Razne mutacije mogu dovesti do manjka endogenih antikoagulantnih molekula – antitrombina, proteina C, proteina S. Također, mutacije mogu pojačavati prokoagulantnu aktivnost povećavajući koncentracije faktora V ili protrombina.

5.1.1. ANTIKOAGULANSI

Antikoagulansi su skupina lijekova koja se koristi za liječenje tromboza – patoloških stanja povećane koagulabilnosti krvi. Njihovo antitrombotičko djelovanje, temelji se na izravnoj i neizravnoj inhibiciji trombina.

5.1.1.1. VARFARIN

Varfarin je kumarinski antikoagulant, koji sprječava redukciju inaktivnog vitamin K 2,3 epoksida natrag u oksidirani aktivni oblik - vitamin K hidrokinon. Oksidirani oblik vitamina K je nužan kofaktor enzimatskoj posttranslacijskoj γ -karboksilaciji glutaminskih ostataka na protrombinu te faktorima VII, IX i X i proteinu C. Nedostatkom vitamin K hidrokinona, nastaju nepotpune molekule faktora koagulacije koje su biološki neaktivne.

5.1.1.2. ANTIKOAGULANSI KOJI NEIZRAVNO INHIBIRAJU TROMBIN

U ovu skupinu lijekova spadaju nefrakcionirani heparin, niskomolekularni heparini, fondaparinuks, te direktni oralni inhibitori faktora X, rivaroksaban, apiksaban i edoksaban. Svoj učinak temelje na interakciji s antitrombinom koji inhibira koagulacijske proteaze, posebice trombin te faktore IXa i Xa, tvoreći s njima stabilne komplekse.

5.1.1.2.1. HEPARIN

Nefrakcionirani heparin je heterogena smjesa sulfatnih polisaharida ($M_r = 5000$ do 30000), čiji biološki učinak ovisi o endogenom antikoagulansu antitrombinu. Uloga antitrombina je inaktivacija aktiviranih koagulacijskih faktora, uključujući trombin te faktore X, IX, XI i XII što dovodi do usporavanja generiranja krvnog ugruška i sprječavanja njegove prekomjerne sinteze.

Dodatkom heparina, proces inaktivacije faktora antitrombinom ubrza se i do tisuću puta. Vežanje heparina za antitrombin pentasaharidnom sekvencom uzrokuje promjenu konformacije antitrombina i otkrivanje aktivnih mjesta, što omogućuje ubrzane interakcije antitrombina s proteazama - aktiviranim koagulacijskim faktorima i njihovu inaktivaciju. Heparin funkcionira kao kofaktor u reakcijama između antitrombina i

proteaza, a da se pri tome ne troši. Nastankom kompleksa antitrombin-proteaza, proteaza se inaktivira, a heparin se nepromijenjen oslobađa te dalje reagira s drugim molekulama antitrombina. Također inhibira nastanak trombina vežući se i inaktivirajući faktor Xa.

Niskomolekularni heparini su soli kratkih lanaca heparina, koji se dobiju frakcioniranjem i depolimerizacijom heparina. Kao i nefrakcionirani heparin sadrže pentasaharidnu sekvencu koja može inhibirati faktor Xa, dok nemaju učinak na inaktivaciju trombina, jer im nedostaje dugački lanac na koji bi se istovremeno vezali i antitrombin i trombin.

5.1.1.2.2. DIREKTNI ORALNI INHIBITORI FAKTORA Xa

Rivaroksaban je visokospecifični, direktni inhibitor faktora Xa. Reverzibilnim vezanjem za faktor Xa, rivaroksaban onemogućuje njegovu aktivnost u inicijacijskoj fazi koagulacijskog procesa. Samim time, onemogućena je i aktivacija protrombina u trombin te nastavak koagulacijske kaskade.

Slično djelovanje ima i apiksaban, koji uz inhibiciju slobodnog faktora Xa, inhibira i njegovu aktivnost unutar protrombinaza kompleksa. Rezultat je također gašenje inicijacijske faze i nedovoljna sinteza trombina(31).

5.1.1.3. ANTIKOAGULANSI KOJI IZRAVNO INHIBIRAJU TROMBIN

Ova skupina lijekova svoje antikoagulantno djelovanje temelji na izravnom vezanju za aktivno mjesto trombina te inhibiciji njegovih učinaka. Mogu se primjeniti parenteralno – lepirudin ili oralno – dabigatran.

5.1.1.3.1. LEPIRUDIN

Leprudin je rekombinantni protein sintetiziran po uzoru na hirudin – specifični ireverzibilni inhibitor trombina iz sline pijavica. Aktivnost mu ne ovisi o antitrombinu pa može inaktivirati i trombin vezan za fibrin u ugrušku. Glavna indikacija za primjenu je tromboza u bolesnika koji je zbog primjene heparina dobio heparinom induciranu trombocitopeniju(32).

5.1.1.3.2. DABIGATRAN

Dabigatran je sintetički antikoagulant koji vezanjem za aktivno mjesto trombina, dovodi do inhibicije njegove aktivnosti. Ima vrlo predvidljivi antikoagulantni odgovor zbog čega ne zahtijeva redovitu kontrolu koagulacije. Danas se koristi u prevenciji tromboemboličkih incidenata nakon težih kirurških operacija, za prevenciju tromboembolije i infarkta posljedično atrijskoj fibrilaciji, te za liječenje i profilaksu recidiva dubokih venskih tromboza(33). Dabigatran također dovodi do povećanja rezgradnje već nastalog tromba, inhibirajući trombinom posredovanu aktivaciju plazmatske prokarboksipeptidaze B(34).

5.2. SMANJENA KOAGULABILNOSTI KRVI

Uzrokom smanjenoj koagulabilnosti krvi, a time i pojačane sklonosti krvarenju, mogu biti razna stečena i nasljeđena stanja i bolesti. Od stečenih uzroka, najčešće se radi o bolestima jetre koje posljedično dovode do zatajenja funkcije jetre i nedovoljne sinteze plazmatskih faktora zgrušavanja. Smanjen unos vitamina K i posljedična hipovitaminoza K ometaju normalnu γ -karboksilaciji glutaminskih ostataka pojedinih faktora zgrušavanja, zbog čega oni ne mogu vršiti svoju funkciju u hemostazi. Razne autoimune bolesti na pojedine faktore koagulacije dovode do njihovog manjka i

poremećaja koagulacijske kaskade. Nasljedne bolesti odnose se na razne mutacije gena zaduženih za sintezu koagulacijskih faktora. Poremećena sinteza rezultira smanjenom aktivnošću pojedinog faktora zgrušavanja ili potpunim izostankom njegove funkcije. Najčešći nasljedni poremećaji koji dovode do smanjene koagulabilnosti krvi su hemofilija A (manjak faktora VIII) i B (manjak faktora IX), te Von Willebrandova bolest (manjak vWF), dok se nasljedni manjak ostalih koagulacijskih faktora javlja mnogo rijede. Sva navedena stanja i bolesti u konačnici dovode do smanjene pretvorbe protrombina u trombin i posljedičnog krvarenja.

5.2.1. LIJEČENJE STEČENIH STANJA SMANJENE KOAGULABILNOSTI KRVI

Liječenje stečenih stanja ponajprije obuhvaća liječenje osnovne bolesti koja je dovela do poremećaja koagulacijske kaskade. Nedostatak faktora zgrušavanja liječi se nadomjesnim liječenjem faktora koji nedostaje ili davanjem pripravaka krvi koji sadrže više faktora, kao što su svježe smrznuta plazma ili koncentrat protrombinskog kompleksa.

5.2.2. LIJEČENJE NASLJEDNIH STANJA SMANJENE KOAGULABILNOSTI KRVI

Mutacije pojedinih gena dovode do poremećaja sinteze pojedinih faktora zgrušavanja krvi te prekida koagulacijske kaskade s posljedičnim izostankom pretvorbe protrombina u trombin. Liječenje nasljednih stanja smanjene koagulabilnosti krvi prvenstveno se temelji na nadomjesku faktora zgrušavanja krvi koji bolesniku nedostaje. Profilaktičkim liječenjem se pokušava trajno održavati razina faktora dostatna da spriječi nastanak spontanog krvarenja. Zbog kratkog poluživota faktora zgrušavanja, takvo liječenje zahtijeva česte infuzije, do čak tri do četiri puta tjedno(35,36). Također, infuzije koncentrata faktora, dobivenog bilo iz plazme ili rekombinantnom tehnikom,

moгу potaknuti stvaranje protutijela koja će inhibirati njegovu aktivnost, čime se gubi terapijska učinkovitost koncentrata. Danas se stoga u terapiji hemofilije koriste i specifična protutijela koja korigiraju poremećaj koagulacije djelujući izravno ili neizravno na trombin.

5.2.2.1. EMICIZUMAB

Emicizumab je humanizirano asimetrično bispecifično monoklonalno protutijelo s kofaktorskom aktivnošću faktora VIIIa(37). Bispecifičnost emicizumaba očituje se njegovom mogućnošću istovremenog vezivanja faktora IXa te faktora X, što omogućuje faktorom IXa posredovanu aktivaciju faktora X. Za taj proces je inače potrebna kofaktorska aktivnost faktora VIIIa, kojeg u hemofiliji A nema. Na taj način, emicizumab u bolesnika koji boluju od hemofilije A uspješno zamjenjuje nepostojeću biološku aktivnost faktora VIII(38,39). Također je djelotvoran u bolesnika s hemofilijom A i prisutnim inhibitorima.

5.2.2.2. CONCIZUMAB

Humanizirano je monoklonsko protutijelo koje se koristi u liječenju hemofilija. Visoko je specifično za TFPI (inhibitor puta tkivnog faktora) te svojim vezanjem inhibira njegovu aktivnost. Glavna uloga TFPI u koagulaciji je regulacija inicijacijske faze samog procesa. Vezanjem za faktor Xa s jednom domenom te za kompleks tkivni faktor-faktor VIIa drugom domenom, TFPI dovodi do gašenja inicijacijske faze te posljedično do inhibicije aktivacije protrombina. Proces koagulacije se u zdravih osoba potom nastavlja putem kompleksa faktor VIIIa-faktor IXa. U hemofilijara, s druge strane, taj je proces onemogućen zbog nedostatka faktora VIII ili faktora IX. Inhibicijom TFPI, concizumab omogućava nesmetanu proizvodnju faktora Xa te kompleksa tkivni faktor-faktor VIIa pri

ozljedi tkiva, što rezultira nastavkom zajedničkog puta koagulacije. U konačnici, generira se dovoljna količina trombina unatoč nedostatku faktora VIII ili faktora IX(40). Concizumab se stoga može koristiti u liječenju hemofilije A i B, te u bolesnika s prisutnim inhibitorima.

5.2.2.3. FITUSIRAN

Fitusiran je lijek koji veže mRNA gena za antitrombin u stanicama jetre te ometa njegovu translaciju. Interferirajući s RNA, onemogućuje normalnu gensku ekspresiju i sintezu antitrombina što dovodi do pada plazmatskih koncentracija antitrombina i izostanka njegove funkcije. Posljedično dolazi do porasta koncentracije trombina i drugih faktora koagulacije koje antitrombin inaktivira, što povećava hemostatsku sposobnost same krvi. Osim kod hemofilija, pretkliničke studije su pokazale da fitusiran poboljšava generiranje trombina i kod bolesti nedostataka drugih koagulacijskih faktora i to faktora V, VI i X(41).

6. ZAKLJUČAK

Trombin je ključan enzim u samome početku, ali i samome kraju procesa koagulacijske kaskade. Njegove višestruke uloge važne su za nastanak same koagulacijske kaskade, formiranje i očuvanje krvnog ugruška, ali i regulaciju te sprječavanje prevelike aktivacije trombina. Na taj način trombin omogućuje uspješnu hemostazu pri oštećenju krvne žile sa posljedičnim krvarenjem. Različita bolesna stanja ukazuju na važnost precizne regulacije aktivacije trombina. Stoga, svako stanje popraćeno pretjeranom aktivacijom trombina vodi u tromboze, a svaki manjak aktivacije vodi u opsežna krvarenja koja ne odgovaraju stupnju ozljede.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Boban, dr.med., na ukazanom povjerenju i strpljivosti te znanju i savjetima kojima je pomogla u pisanju ovog diplomskog rada.

Velike zahvale mojim roditeljima, Mileni i Himzi, na podršci tokom moga studija. Hvala i mojoj braći Karlu i Enisu, kao i sestri Jeleni, te zetu Marku i nevesti Anđeli. Veliko hvala i mojim malim nećacima Luki, Riti i Kali.

Hvala i mojim kolegama i kolegicama, prijateljicama i prijateljima na svim trenucima zbog kojih će mi moje studiranje ostati u lijepom sjećanju.

8. LITERATURA

1. Lichtman M, Spivak J, Boxer L, Shattil S, Henderson E. Commentary on and reprint of McFarlane RG, An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifiers, in *Nature* (1964) 202:498–499. In: *Hematology*. 2000.
2. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* (80-). 1964;
3. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;
4. Nemerson Y, Esnouf MP. Activation of a proteolytic system by a membrane lipoprotein: mechanism of action of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;
5. Nemerson Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol*. 1992;
6. Repke D, Gemmell CH, Guha A, Turitto VT, Broze GJ, Nemerson Y. Hemophilia as a defect of the tissue factor pathway of blood coagulation: Effect of factors VIII and IX on factor X activation in a continuous-flow reactor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;
7. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001.

8. Friezner Degen SJ, Davie EW. Nucleotide Sequence of the Gene for Human Prothrombin. *Biochemistry*. 1987;
9. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood*. 1999;
10. Haynes LM, Bouchard BA, Tracy PB, Mann KG. Prothrombin activation by platelet-associated prothrombinase proceeds through the prethrombin-2 pathway via a concerted mechanism. *J Biol Chem*. 2012;
11. Tans G, Janssen-Claessen T, Hemker HC, Zwaal RFA, Rosing J. Meizothrombin formation during factor Xa-catalyzed prothrombin activation: Formation in a purified system and in plasma. *J Biol Chem*. 1991;
12. Blombäck B. The N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Br J Haematol*. 1969;
13. Doolittle RF. Determining the crystal structure of fibrinogen. *J Thromb Haemost*. 2004;
14. Vali Z, Scheraga HA. Localization of the Binding Site on Fibrin for the Secondary Binding Site of Thrombin. *Biochemistry*. 1988;
15. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem*. 2017;
16. Olexa SA, Budzynski AZ. Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;
17. Kaczmarek E, McDonagh J. Thrombin binding to the A alpha-, B beta-, and

- gamma-chains of fibrinogen and to their remnants contained in fragment E. *J Biol Chem.* 1988;
18. Ortel TL, Quinn-Allen MA, Keller FG, Peterson JA, Larocca D, Kane WH. Localization of functionally important epitopes within the second C-type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras. *J Biol Chem.* 1994;
 19. Newell JL, Fay PJ. Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *Biochemistry.* 2008;
 20. Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood.* 2011;
 21. Geng Y, Verhamme IM, Smith SB, Sun M fu, Matafonov A, Cheng Q, et al. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation. *Blood.* 2013;
 22. Smith SB, Verhamme IM, Sun MF, Bock PE, Gailani D. Characterization of novel forms of coagulation factor XIa: Independence of factor XIa subunits in factor IX activation. *J Biol Chem.* 2008;
 23. Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun M fu, Cheng Q, Dickeson SK, et al. An update on factor XI structure and function. *Thrombosis Research.* 2018.
 24. McDonagh J, McDonagh RP, Delâge JM, Wagner RH. Factor XIII in human plasma and platelets. *J Clin Invest.* 1969;
 25. Henriksson P, Becker S, Lynch G, MacDonagh J. Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages. *J Clin Invest.* 1985;

26. Gupta S, Biswas A, Akhter MS, Krettler C, Reinhart C, Dodt J, et al. Revisiting the mechanism of coagulation factor XIII activation and regulation from a structure/functional perspective. *Scientific Reports*. 2016.
27. Sakata Y, Aoki N. Cross-linking of α 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *J Clin Invest*. 1980;
28. C. Greenlee-Wacker M, D. Galvan M, S. Bohlson S. CD93: Recent Advances and Implications in Disease. *Curr Drug Targets*. 2012;
29. Parkinson JF, Vlahos CJ, Yan SCB, Bang NU. Recombinant human thrombomodulin. Regulation of cofactor activity and anticoagulant function by a glycosaminoglycan side chain. *Biochem J*. 1992;
30. Loghmani H, Conway EM. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood*. 2018;
31. Samama MM. The mechanism of action of rivaroxaban - An oral, direct Factor Xa inhibitor - Compared with other anticoagulants. *Thrombosis Research*. 2011.
32. Gajra A, Husain J, Smith A. Lepirudin in the management of heparin-induced thrombocytopenia. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2008.
33. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009;
34. Ammollo CT, Semeraro F, Incampo F, Semeraro N, Colucci M. Dabigatran enhances clot susceptibility to fibrinolysis by mechanisms dependent on and independent of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*.

- 2010;
35. Berntorp E, Dolan G, Hay C, Linari S, Santagostino E, Tosetto A, et al. European retrospective study of real-life haemophilia treatment. *Haemophilia*. 2017;
 36. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. Prepared by the treatment guidelines working group, on behalf of the World Federation of Hemophilia (WFH). *Haemophilia*. 2013;
 37. Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, et al. Identification and Multidimensional Optimization of an Asymmetric Bispecific IgG Antibody Mimicking the Function of Factor VIII Cofactor Activity. *PLoS One*. 2013;
 38. Kitazawa T, Shima M. Emicizumab, a humanized bispecific antibody to coagulation factors IXa and X with a factor VIIIa-cofactor activity. *International Journal of Hematology*. 2018;
 39. Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA. Emicizumab: Review of the literature and critical appraisal. *Haemophilia*. 2019.
 40. Eichler H, Angchaisuksiri P, Kavakli K, Knoebl P, Windyga J, Jiménez-Yuste V, et al. Concizumab restores thrombin generation potential in patients with haemophilia: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling results of concizumab phase 1/1b data. *Haemophilia*. 2019;
 41. Machin N, Ragni M V. An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin

for the treatment of hemophilia A and B. Journal of Blood Medicine. 2018.

42. Hall John E, Guyton Arthur C, Medicinska fiziologija.

Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 451-61.

43. Katzung Bertram G, Masters Susan B, Trevor Anthony J, Temeljna i klinička

Farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 587-602.

44. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, Patofiziologija knjiga prva.

Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 841-51.

45. Lichtman Marshall A, Beutler E, Kipps Thomas J, Seligsohn U, Kaushansky K,

Prchal Josef T, Williams Hematology 7th ed. McGraw Hill Education; 2006.

str. 1665-93.

9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17. veljače 1991. godine u općoj bolnici u Zadru. Osnovnu školu sam do 3. razreda pohađao na otoku Silba, a završio je u Zadru. Srednju medicinsku školu, smijer medicinska sestra/medicinski tehničar, završio sam u Zadru 2009. godine te nakon toga obavio pripravnički staž i položio stručni ispit. 2011. godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Na fakultetu sam kroz dvije godine aktivno sudjelovao u projektima EMSA-e (European medical students' association) Zagreb. Za sudjelovanje u projektu "Medicinari Velikog Srca" primio sam 2018. godine Rektorovu nagradu.