

Πηκτικός Μηχανισμός στην Εμβρυϊκή Ζωή

Γεώργιος Μητσιάκος, Παντελής Ε. Μακρής

Β' Νεογνολογική Κλινική και Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο «Παπαγεωργίου», Θεσσαλονίκη.

Αλληλογραφία: Μητσιάκος Γεώργιος, Περιφερειακή Οδός, Νοσοκομείο «Παπαγεωργίου», ΤΚ 56403, Θεσσαλονίκη,
Τηλ. +302310693360
Fax: +302310991539
E-mail: mitsiakg@med.auth.gr, mga@otenet.gr

Περίληψη

Η αιμόσταση είναι μια εξελικτική και δυναμική διαδικασία που ξεκινά ενδομήτρια και σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης. Οι πρωτεΐνες της πήξης εκφράζονται νωρίς και ευρέως κατά την εμβρυϊκή και εμβρυϊκή περίοδο ανάπτυξης και εμφανίζονται ως ρυθμιστές της ιστικής εξέλιξης και διαφοροποίησης στα αρχικά στάδια της εξέλιξης. Η σχετική ισορροπία των διαφόρων προπηκτικών, ανασταλτικών και ινωδολυτικών πρωτεϊνών είναι μοναδική κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ενώ οι πρωτεΐνες πήξης ανιχνεύονται σε πολύ πρώιμα στάδια της κύησης και οι συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα ωριμάζουν με διαφορετικούς ρυθμούς. Παρ' όλα αυτά επιτυγχάνεται επαρκής εμβρυϊκή αιμοστατική ισορροπία.

Η αιμόσταση, στα υγιή έμβρυα και νεογνά, είναι εξαιρετικά αποτελεσματική, ενώ οι αιμορραγίες ή οι θρομβώσεις είναι σπάνιες κατά τη διάρκεια της κύησης και ακολούθως του φυσιολογικού τοκετού και αυτό παρ' ότι αρκετοί παράγοντες της πήξης στο πλάσμα των νεογνών βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση και με ελαττωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με τους ενήλικες.

Η μελέτη της εξέλιξης του μηχανισμού της αιμόστασης και των παραγόντων της πήξης που εμπλέκονται σε αυτήν από την ενδομήτριο ζωή βοηθάει στην αντιμετώπιση των προβλημάτων της σε οποιαδήποτε ηλικία και να εμφανιστούν.

Λέξεις κλειδιά: Έμβρυο, Αιμόσταση, Νεογνά, Αιμορροφιλία, Θρομβοφιλία.

Εισαγωγή

Η κατανόηση της φυσιολογίας της αιμόστασης στα νεογνά είναι ανεπαρκής, συγκριτικά με τους ενήλικες, λόγω των πολλαπλών επιπέδων αναφοράς σε σχέση με τις ημέρες ζωής, της συνεχιζόμενης ανάπτυξης των νεογνών, των τεχνικών δυσκολιών

στη λήψη δειγμάτων αίματος, των περιορισμών στην ποσότητα του δείγματος (απαιτούνται μικροτεχνικές) και του μεγάλου εύρους στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών αιμόστασης στο πλάσμα. Ωστόσο, ο έλεγχος του πηκτικού μηχανισμού αποδεικνύει ότι

η εμβρυϊκή και νεογνική λειτουργία της αιμόστασης είναι εξίσου αποτελεσματική ή και αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς ενήλικες και πάντως άκρως επαρκής.^{1,4}

Μελέτες σχετικές με την ανάπτυξη της αιμόστασης σε ανθρώπους και ζώα αναφέρουν ότι ενώ οι πρωτεΐνες πήξης μπορούν να ανιχνευθούν στο έμβρυο σε πολύ πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης, οι συγκεντρώσεις των διαφόρων πρωτεϊνών της στο πλάσμα ωριμάζουν με διαφορετικούς ρυθμούς, καταλήγοντας σε μια μοναδική εμβρυϊκή αιμοστατική ισορροπία. Παρ' όλην την προφανή ανεπάρκεια του πλάσματος σε ενεργείς πρωτεΐνες πήξης, η εμβρυϊκή αιμόσταση είναι εξαιρετικά αποτελεσματική, ενώ οι αιμορραγίες ή οι θρομβώσεις είναι σπάνιες κατά τη διάρκεια της κύησης και ακολούθως του φυσιολογικού τοκετού. Αντιθέτως, τα πάσχοντα νεογνά, ειδικά τα ασφυκτικά και τα εξαιρετικά πρόωρα (ιδιαιτέρως χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά -very low birth weight neonates-) συχνά εμφανίζουν σημεία αιμορραγίας και θρόμβωσης (ενδείξεις αιμορραγικής ή θρομβωτικής προδιάθεσης).

Η αντιμετώπιση των νεογνών με αιμορραγικές ή θρομβωτικές επιπλοκές παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα που δε συναντώνται στα μεγαλύτερα παιδιά και στους ενήλικες. Τα επίπεδα των περισσότερων πρωτεϊνών πήξης είναι χαμηλά κατά τη γέννηση, γεγονός που καθιστά τη διάγνωση των γενετικών και επίκτητων προβλημάτων αιμόστασης εξαιρετικά δυσχερή.^{1,5}

Η αιμόσταση του εμβρύου είναι δυναμική και εξελικτική διαδικασία, εξαρτώμενη από την ηλικία κύησης. Οι πρωτεΐνες της πήξης δεν διαπερνούν τον πλακούντα, (ωστόσο) εκφράζονται νωρίς κατά την εμβρυονική και εμβρυϊκή περίοδο ανάπτυξης. Έτσι μπορούν να ανιχνευτούν στο εμβρυϊκό πλάσμα ήδη από τη 10η εβδομάδα κύησης, αλλά ουσιαστικής αύξηση στην συγκέντρωσή τους δεν παρατηρείται μέχρι και το τέλος του τρίτου τριμήνου ενδομήτριας ζωής.

Η σχετική ισορροπία των διαφόρων σταδίων της αιμόστασης μεταξύ του ενδοθηλίου των αγγείων, των αιμοπεταλίων και των παραγόντων που προάγουν ή αναστέλλουν την πήξη και την ινωδολύση είναι μοναδική κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η πλειοψηφία των εμβρυϊκών πρωτεϊνών είναι πανομοιότυπη με αυτές των ενηλίκων σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο με μερικές μόνον εξαιρέσεις, όπως το εμβρυϊκό ινωδογόνο, τον παράγοντα von Willebrand (vWF) και το πλασμινογόνο. Τα επίπεδα των δραστικών μορφών συγκεκριμένων παραγόντων είναι ελαττωμένα, ειδικά των βιταμινο-K

εξαρτώμενων παραγόντων (II, VII, IX, X, και των πρωτεϊνών C, S και Z).

Παρά τη μη ολοκλήρωσή της, η αιμόσταση στα φυσιολογικά έμβρυα και νεογνά θεωρείται ικανοποιητική αν και φαινομενικά παράδοξη (in vitro), όπως π.χ. ο χρόνος της ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated partial thromboplastin time-aPTT), ο χρόνος προθρομβίνης (prothrombin time-PT) και ο χρόνος θρομβίνης (thrombin time-TT) είναι γενικά παρατεταμένοι.

Η απουσία τιμών αναφοράς για το χρόνο προθρομβίνης (λόγω εθνικότητων, διαφορετικών ειδών δειγμάτων, διαφορετικών αντιδραστηρίων) εξομαλύνεται με τη χρήση του δείκτη INR (International Normalized Ratio). Ο INR υπολογίζεται από το λόγο PT ασθενούς/PT μάρτυρα υψωμένου στη δύναμη του διεθνούς δείκτη ευαισθησίας ISI (International Sensitivity Index). Με τη χρήση των INR και ISI οι διακυμάνσεις των τιμών μειώνονται και οι εξαγόμενοι λόγοι είναι ευκολότερα συγκρίσιμοι. Ανάλογη ρύθμιση δεν υπάρχει για τον aPTT, με αποτέλεσμα οι τιμές αναφοράς να διαφέρουν ανάλογα με τα αντιδραστήρια και το εργαστήριο.

A. Αναπτυξιακή έκφραση των πρωτεϊνών αιμόστασης

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών πήξης συντίθεται και εκκρίνεται από το ήπαρ και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου εκφράζονται πρόωρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών ανιχνεύθηκε η σύνθεση του vWF στα κύτταρα του πλακουντιακού επιθηλίου ήδη από την 4η εβδομάδα κύησης (EK), ενώ στον εμβρυϊκό μυελό των οστών και στους ιστούς από την 4η ως την 8η EK.^{6,7}

Η σύνθεση των πρωτεϊνών πήξης είναι η πιο ενεργός συνθετική διαδικασία του ήπατος⁸ μετά τη λευκοματίνη. Έτσι περί την 5η EK μπορεί να ανιχνευθούν στα εμβρυονικά ηπατοκύτταρα mRNA και πρωτεΐνες των παραγόντων πήξης VII, VIII, IX, X, ινωδογόνο, πρωτεΐνη C και αντιθρομβίνη.⁹ Περί τη 10η εμβρυϊκή εβδομάδα το mRNA των πρωτεϊνών πήξης ποικίλλει από 10% της φυσιολογικής συγκέντρωσης των ενηλίκων για τον παράγοντα IX ως 100% για τον παράγοντα X, με την πλειοψηφία των υπολοίπων παραγόντων να κυμαίνονται περί το 50%.⁹ Η έκφραση των εμβρυϊκών πρωτεϊνών πήξης ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο της μετάφρασης και δευτερευόντως στο επίπεδο της μεταγραφής.¹⁰ Οι συγκεντρώσεις του mRNA και των βιταμινο-K

εξαρωτώμενων πρωτεϊνών είναι υψηλές (υψηλότερες) στα ηπατοκύτταρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στο πλάσμα.

Αυτό πιθανόν οφείλεται στη μειωμένη ενδοκυτταρική πρωτεϊνική σταθερότητα, στην αναποτελεσματική πρωτεϊνική σύνθεση και στην παραγωγή ασταθών πρωτεϊνών με αυξημένη κάθαρση ή μειωμένη πρωτεϊνική έκκριση από τα ηπατοκύτταρα. Η σχετική αύξηση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μπορεί να συνδέεται με τη μειωμένη βιταμινο-Κ εξαρωτώμενη καρβοξυλίωσή τους. Όλες αυτές οι ερμηνείες σχετίζονται κυρίως με την ανωριμότητα του ηπατικού κυττάρου.¹¹

Ο ιστικός παράγοντας (Tissue factor - TF) εκφράζεται ευρέως στα εκτοδερμικά και ενδοδερμικά κύτταρα με υψηλά επίπεδα μορφογενετικής δραστηριότητας κατά την πρώιμη οργανογένεση.¹² Υψηλά επίπεδα TF ανιχνεύονται σε νευροεπιθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε ιστούς που δεν εκφράζουν τον ιστικό παράγοντα κατά την ενήλικη ζωή, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών και του παγκρέατος.¹² Σε πειραματικά μοντέλα επίμυων η απομάκρυνση του TF οδηγεί σε θάνατο σε 10,5 ημέρες.^{13,14} Λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας του παράγοντα VII κατά την εμβρυονική και πρώιμη εμβρυϊκή ζωή, πιστεύεται ότι ο TF εξυπηρετεί κριτικό ρόλο, μάλλον, στην αύξηση και διαφοροποίηση των ιστών, παρά στη διαδικασία της πήξης.

Ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue factor pathway inhibitor-TFPI) συντίθεται και εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες δείχνουν ότι ο TFPI εκφράζεται ευρέως στους εμβρυϊκούς ιστούς από την 8η-24η εβδομάδα κύησης.¹⁵ Σε πειραματικά μοντέλα επίμυων με έλλειψη του TFPI σημειώνεται εμβρυϊκή θνησιμότητα στις 10,5 ημέρες, με ιστολογική απόδειξη καταπόνησης παραγόντων πήξης και εναπόθεση ινώδους.^{16,17}

Οι ινωδολυτικές πρωτεΐνες, όπως ο τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (Urokinase Plasminogen Activator, U-PA), ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tissue plasminogen activator - t-PA) και ο αναστολέας του PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) μπορεί να ανιχνευθούν στους οστεοβλάστες και χονδροβλάστες σε περιοχές με ενδοχονδρική οστεοποίηση και στα περισώληναριακά χονδροκύτταρα των επιφυσιακών κέντρων δευτερογενούς οστεοποίησης.¹⁸ Ο U-PA και ο PAI-1 εκφράζονται κυρίως στα μακρά οστά ρυθμίζοντας την ενδοχονδρική οστεοποίηση.¹⁸ Οι συγκεντρώσεις των t-PA, U-PA και PAI-1 είναι μειωμένες στο εμβρυϊκό πλάσμα.¹⁹

B. Η ανάπτυξη των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών πήξης στο εμβρυϊκό πλάσμα

Η δημιουργία θρόμβου αίματος μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη 10η - 11η εβδομάδα κύησης²⁰ και ο χρόνος δημιουργίας θρόμβου ολικού αίματος του εμβρύου είναι ίσος ή μικρότερος από αυτόν των ενηλίκων (αυξημένη διάθεση για θρόμβωση).²⁰ Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με την ινωδολυτική δραστηριότητα (αυξημένη ινωδόλυση).²¹ Η θρόμβωση και η θρομβόλυση (ινωδόλυση) φαίνεται να είναι αναπτυξιακά συνδεδεμένες.

Περί τη 12η - 15η ΕΚ, τα επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα V πλησιάζουν τα κατώτερα όρια του εύρους τιμών των ενηλίκων και το ίδιο συμβαίνει με τα επίπεδα του ινωδογόνου που ανέρχονται περίπου στα 100mg/dl, ενώ τα μέσα επίπεδα των παραγόντων VII και vWF ανευρίσκονται σαφώς ελαττωμένα (23% και 37% των φυσιολογικών τιμών αντίστοιχα).²¹⁻²³

Στα τελειόμηνα νεογνά αμέσως μετά τη γέννηση, τα μέσα επίπεδα των παραγόντων VII (?) και V είναι εντός των ορίων των φυσιολογικών τιμών των ενηλίκων, ενώ οι μέσες συγκεντρώσεις των vWF και της α2-μακροσφαιρίνης είναι ανώτερες από τα φυσιολογικά όρια. Οι παράγοντες II, IX, πρωτεΐνη C και η ελεύθερη ολική πρωτεΐνη S έχουν πολύ χαμηλή δραστηριότητα κατά τη γέννηση και αυξάνονται σταδιακά μετά τον τοκετό.¹⁻³ Το ελαττωμένο ποσοστό της πρωτεΐνης S αποδίδεται στα χαμηλά επίπεδα της δεσμευτικής πρωτεΐνης C4b στο έμβryo και το νεογνό.¹⁹

Η υπολειπόμενη έκφραση του ιστικού παράγοντα στα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα,^{24,25} σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα του, κυρίως, στο πλάσμα των προώρων νεογνών, οδηγούν στη μειωμένη ικανότητα παραγωγής θρομβίνης.²⁶

Η θρομβομοντουλίνη (thrombomodulin - TM), ένας επιφανειακός υποδοχέας των ενδοθηλιακών κυττάρων, λειτουργεί ως μεμβρανικός υποδοχέας της θρομβίνης με την οποία συνδέεται και σχηματίζει σύμπλεγμα που ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της διαλυτής TM είναι ανώτερα από τις φυσιολογικές τιμές των ενηλίκων, με τη μέγιστη τιμή στα 165mg/dl μεταξύ 23ης και 26ης εβδομάδας κύησης.²⁷ Οι συγκεντρώσεις της διαλυτής TM σταδιακά μειώνονται κατά τη διάρκεια του 3ου τριμήνου, τη βρεφική και την παιδική ηλικία και φτάνουν τα φυσιολογικά επίπεδα κατά την ενηλικίωση.

Γ. Πρωτεΐνες πήξης εμβρυϊκού τύπου

Οι πρωτεΐνες του εμβρυϊκού αιμοστατικού συστήματος αρχικά είναι ποσοτικά μειωμένες, με ελαττωμένα επίπεδα δραστηριότητας, επιτυγχάνοντας όμως μοναδική ισορροπία αιμοστατικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, κατά τη γέννηση οι παράγοντες της πήξης εμφανίζουν μεγαλύτερο ρυθμό κάθαρσης, συγκρινόμενο με τις αντίστοιχες τιμές των ενηλίκων (!) (ο ρυθμός κάθαρσης είναι διάφορος). Μερικές πρωτεΐνες επιδεικνύουν μοναδική δομή και λειτουργία και η πλειοψηφία αυτών των διαφορών μπορεί να συσχετισθεί με μεταβολές στη μεταμεταφραστική επεξεργασία, παρά στην ύπαρξη ιδιαίτερων γονιδίων που τις κωδικοποιούν.

Οι βιταμινο-Κ εξαρτώμενοι παράγοντες είναι η πιο εκτεταμένα μελετημένη ομάδα παραγόντων πήξης στα νεογνά, αντανakλώντας την κλινική σημασία της στην αιμορραγική νόσο των νεογνών.

Ο πλακουντιακός φραγμός διατηρεί μια σημαντική διαφορά στα εμβρυϊκά επίπεδα βιταμίνης Κ με τιμές περίπου στο 10% των μητρικών επιπέδων.^{28,29} Η διαφορά αυξάνεται κατά το τέλος της κύησης με αποτέλεσμα τα αποθέματα βιταμίνης Κ να είναι μειωμένα στο έμβρυο. Φαίνεται ότι η καθημερινή χορήγηση 10 mg βιταμίνης Κ από του στόματος στην έγκυο από την 36η εβδομάδα κύησης, πιθανώς, εμποδίζει την ανάπτυξη ανεπάρκειας βιταμίνης Κ στο νεογνό.³⁰ Εξάλλου, λόγω του ότι η βιταμίνη Κ *in vitro* αποδείχθηκε ότι προάγει τις DNA μεταλλάξεις, ενισχύεται η άποψη ότι ο τελικός σκοπός της ανεπάρκειας βιταμίνης Κ είναι η παρεμπόδιση των χρωμοσωμικών μεταλλάξεων στα ταχέως αναπτυσσόμενα εμβρυϊκά κύτταρα.^{31,32}

Οι δυναμικοί μηχανισμοί ανάπτυξης προκαλούν μείωση της παραγωγής παραγόντων πήξης. Έχουν μετρηθεί mRNA μόρια για τους παράγοντες VII, VIII, IX, X, το ινωδογόνο και την πρωτεΐνη C στα ηπατοκύτταρα εμβρύων ηλικίας 5-10 εβδομάδων κύησης όπως και στους ενήλικες. Τα μεταγραφικά μόρια είναι όμοια σε έμβρυα και ενήλικες. Επίσης, η ακολουθία νουκλεοτιδίων στο mRNA των παραγόντων IX και X είναι πανομοιότυπη με αυτή των ενηλίκων. Εντούτοις, παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά την έκφραση του mRNA στα διάφορα επίπεδα ανάπτυξης. Ανάλογες συγκεντρώσεις mRNA της προθρομβίνης έχουν βρεθεί στο ήπαρ νεογνών και ενήλικων κονίλων.

Κατά τη διάρκεια της μετα-μεταφραστικής επεξεργασίας οι παράγοντες II, VII, IX, X, πρωτεΐνη C, S και Z υπόκεινται, μέσω της βιταμίνης Κ, γ-καρβοξυλίωση στα 9-12 γ-καρβοξυγλουταμινικά αμινο-

ξέα (glu) τα οποία βρίσκονται εντός της αμινοτελικής περιοχής (45 πρώτα αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης). Η μετατροπή αυτή με την προσθήκη ενός καρβοξυλίου στη γ-θέση του μορίου των βιταμινο-Κ εξαρτημένων πρωτεϊνών μετατρέπει αυτούς τους παράγοντες από μη δραστικούς πηκτικά σε δραστικούς.

Οι βιταμινο-Κ-εξαρτώμενες πρωτεΐνες, κατά το μέσον της κύησης, πετυχαίνουν συγκέντρωση πλάσματος 10-30% των φυσιολογικών επιπέδων και το διατηρούν μέχρι και λίγο πριν τον τοκετό.¹⁹ Τα επίπεδα τους αυξάνονται σιγά σιγά μετά τη γέννηση σε άμεση συνάρτηση με την προοδευτική ωρίμανση του ηπατικού κυττάρου.^{1,2,11} Τα φυσιολογικά επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα IX επιτυγχάνονται μετά τον 9ο μήνα ζωής, καθιστώντας δύσκολη τη διάγνωση της ήπιας ανεπάρκειας του παράγοντα IX κατά τη νεογνική περίοδο. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης C και της προθρομβίνης παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα και μόνο μετά την εφηβεία αγγίζουν τα φυσιολογικά επίπεδα των ενηλίκων.

Εάν δεν χορηγηθεί βιταμίνη Κ στο νεογνό αμέσως μετά τον τοκετό, τότε η πιθανότητα να εκδηλώσει αιμορραγία είναι 1 % και μάλιστα αυτή μπορεί να είναι απειλητική και για τη ζωή του, όπως όταν πρόκειται για ενδοκράνια αιμορραγία ή αιμορραγία από το γαστρεντερικό σύστημα 1/10.000.⁴ Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με την αποκλειστική σίτιση των νεογνών με μητρικό γάλα (το οποίο είναι πτωχό σε βιταμίνη Κ). Αντίθετα, η χορήγηση εξανθρωποποιημένου-εμπλουτισμένου γάλατος (που είναι πλούσιο σε βιταμίνη Κ) προφυλάσσει από την αιμορραγική νόσο των νεογνών.¹¹

Όταν η βιταμίνη Κ είναι ανεπαρκής ή αναστέλλεται από τη βαρφαρίνη, τα επίπεδα αντιγόνων πλάσματος των βιταμινο-Κ εξαρτώμενων πρωτεϊνών είναι μετρίως μειωμένα, ενώ οι λειτουργικές τους δραστηριότητες είναι σημαντικά ελαττωμένες.

Η χορήγηση στις εγκύους συγκεκριμένων αντιεπιληπτικών φαρμάκων αυξάνει τον κίνδυνο ανεπάρκειας βιταμίνης Κ στο έμβρυο και το νεογνό.

Η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη, το βαλπροϊκό οξύ και η καρβαμαζεπίνη μειώνουν τα εμβρυϊκά και νεογνικά επίπεδα βιταμίνης Κ, ενώ αυξάνουν τη συχνότητα ανίχνευσης μη-καρβοξυλιωμένων βιταμινο-Κ-εξαρτώμενων πρωτεϊνών.³³ Σπάνια είναι δυνατόν η εμβρυϊκή ή η νεογνική αιμορραγία να είναι αποτέλεσμα χρήσης αυτών των φαρμάκων κατά την εγκυμοσύνη. Επιπρόσθετα, η μη επαρκής καρβοξυλίωση των πρωτεϊνών πήξης μπορεί να συμβεί στον κύκλο των αναγωγασών του ήπατος, λόγω ηπατικής ανωριμότητας ή δυσλειτουργίας.

Τέλος, ο παρατεταμένος aPTT των πρώτων μηνών ζωής σε μεγάλο ποσοστό οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα των παραγόντων επαφής.³⁴ Αντίθετα, τα επίπεδα του ινωδογόνου, των παραγόντων V, VIII, XIII και του vWF στο πλάσμα δεν είναι μειωμένα κατά τη γέννηση.^{1,2} Επίσης τα επίπεδα του ινωδογόνου συνεχίζουν να αυξάνονται μετά τη γέννηση,³⁵ ενώ τα επίπεδα του vWF και των πολυμερών υψηλού μοριακού βάρους είναι αυξημένα κατά τη γέννηση και το πρώτο τρίμηνο ζωής.^{1,2}

Σημαντική, τελικά, είναι και η αυξημένη κάθαρση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Έχει βρεθεί ότι η κάθαρση του ινωδογόνου είναι αυξημένη στα πρόωρα νεογέννητα με ή χωρίς Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ΣΑΔ). Ο αυξημένος μεταβολικός ρυθμός των βάσεων, ίσως είναι και ο λόγος της επιταχυμένης κάθαρσης των πρωτεϊνών.

Δ. Ινωδογόνο

Την 27η εβδομάδα της κύησης, η συγκέντρωση του ινωδογόνου είναι παρόμοια με την συγκέντρωση των ενηλίκων.³⁶ Ο χρόνος θρομβίνης είναι ήπια παρατεταμένος κατά τη γέννηση και φτάνει τις τιμές ενηλίκων κατά την 3η εβδομάδα ζωής.³⁷ Έχει αναφερθεί πως το εμβρυϊκό ινωδογόνο περιέχει αυξημένο σιαλικό οξύ, διπλάσιο φωσφόρο, μικρότερο μήκος ινιδίων μεταξύ των τμημάτων, λεπτότερα ινίδια και μειωμένη N-τελική αλανίνη στη Αα αλυσίδα, σε σχέση με το ινωδογόνο κατά την ενήλικη ζωή.³⁷⁻⁴⁰ Εντούτοις, η συνεισφορά αυτών των μοριακών διαφορών στην παραλλαγμένη λειτουργία του εμβρυϊκού ινωδογόνου είναι αμφιλεγόμενη.

Ε. Πλασμινογόνο

Το εμβρυϊκό πλασμινογόνο περιέχει αυξημένο σιαλικό οξύ, όμοια με το ινωδογόνο και εμφανίζει μειωμένο ρυθμό και βαθμό ενεργοποίησης προς την πλασμίνη.^{41,42} Εντούτοις, η συνολική θρομβόλυση είναι επιταχυμένη στο πλάσμα λόγω του ότι η εμβρυϊκή πλασμίνη εμφανίζει καθυστερημένη απενεργοποίηση από την α2-αντιπλασμίνη.⁴³⁻⁴⁵

ΣΤ. Παράγοντας Willebrand (von Willebrand Factor, vWF)

Ο παράγοντας vWF στα έμβρυα κυκλοφορεί ως ετερογενής πληθυσμός πολυμερών μοριακού βάρους 200-6.000 KDa, σε αντίθεση με τα πολυμερή των ενηλίκων ενδοθηλιακών κυττάρων που φθά-

νουν τα 20.000 KDa. Μετά την έκκριση στο πλάσμα, αυτά τα υπερμεγέθη μοριακά πολυμερή (ultra large molecular weight multimers - ULvWF) κατατέμνονται από μια μεταλλοπρωτεΐνη, την πρωτεΐνη ADAMTS-13. Ο vWF βρίσκεται ως ULvWF πολυμερή στο εμβρυϊκό πλάσμα ως τη 35η εβδομάδα κύησης και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη κατάτμηση που ακολουθεί την έκκριση του από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η δε μετατροπή του στην ενήλικη μορφή γίνεται περί την 8η εβδομάδα ζωής.⁴⁶ Ο εμβρυϊκός vWF επιδεικνύει αυξημένη εναπόθεση αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο υπό συνθήκες αυξημένης ροής αίματος, ενώ προκαλεί μείωση του χρόνου ροής (bleeding time) και συνεισφέρει στην αυξημένη προδιάθεση σε αρτηριακή θρόμβωση.⁴⁷

Ζ. Αιμοπετάλια

Κατά την ενδομήτριο ζωή ο αριθμός των αιμοπεταλίων ακολουθεί γραμμική συσχέτιση με την πρόοδο της κύησης⁴⁸ και για αυτό το λόγο τα πρόωρα νεογνά έχουν χαμηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων σε σχέση με τα τελειόμηνα⁴⁹ πάντα όμως μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια (150.000-450.000/μL). Τα αιμοπετάλια βρίσκονται στην κυκλοφορία του εμβρυϊκού πλάσματος περί την 11η εβδομάδα κύησης,⁵⁰ ο όγκος τους είναι αυξημένος και ο αριθμός τους αυξάνει γρήγορα και φτάνει τα φυσιολογικά όρια περί την 20η εβδομάδα κύησης.^{1,35,50} Το εμβρυϊκό πλάσμα περιέχει αυξημένη συγκέντρωση θρομβοποιητίνης.^{51,52}

Ο χρόνος ροής είναι μειωμένος στα τελειόμηνα και φυσιολογικός στα πρόωρα νεογνά χωρίς προβλήματα.⁵³ Ο σχετικά αυξημένος αιματοκρίτης των τελειομένων μαζί με τα ULvWF πολυμερή ερμηνεύουν τον μικρότερο χρόνο ροής.

Υποδοχείς στα εμβρυϊκά αιμοπετάλια μπορεί να ανιχνευθούν και είναι ισότιμοι με αυτούς των ενηλίκων, περί την 12-16η εβδομάδα κύησης, με εξαίρεση τους υποδοχείς επινεφρίνης που εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια υποδοχέα.⁵⁴⁻⁵⁶ Η γλυκοπρωτεΐνη Gp-Ib (GP-Ib) εμφανίζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων από τη 18η μέχρι την 26η εβδομάδα της κύησης σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι κατά την ενήλικη ζωή.⁵⁷ Το ίδιο ισχύει και για την GPIIb-IIIa.⁵⁷

Η μείωση των διαύλων ασβεστίου στα εμβρυϊκά αιμοπετάλια πιστεύεται ότι είναι η αιτιολογία της καθυστερημένης αλλαγής του σχήματος τους και της απελευθέρωσης τους σε απάντηση των διεγερ-

τών.⁵⁸ Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της ζωής τα αιμοπετάλια έχουν γενικά μειωμένη λειτουργικότητα και αποκαθίσταται την 5η με 9η ημέρα ζωής.⁴⁸ Τα υγιή τελειομένα νεογνά εμφανίζουν επαρκή αιμοπεταλιακή λειτουργία, ενώ σπάνια παρατηρούνται εκχυμώσεις και πετέχειες ως επακόλουθο του stress των ωδινών και του κολπικού τοκετού, σε αντίθεση με τα πρόωρα νεογνά.

Η κατανόηση της ανάπτυξης της αιμόστασης, στην ευρεία της έννοια, βελτιώνει την πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία των προβλημάτων αιμόστασης στα νεογνά και αναμφίβολα εισάγει νέες προοπτικές στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αιμορραγικών και θρομβωτικών επιπλοκών για όλες τις ηλικίες.

Development of Hemostasis in the Human Embryonic-Fetal Life

George Mitsiakos, Pantelis E. Makris

2nd Dept of Neonatal Clinic, Aristotle University of Thessaloniki, General Hospital «Papageorgiou», Thessaloniki, Greece

Corresponding: Mitsiakos George
B' NICU and Neonatology Department of Aristotle University of Thessaloniki, G.P.N. Papageorgiou, Ring Road Nea Efkarpia, T.K. 56403 Thessaloniki, Greece.
Tel: +302310693360
Fax: +302310991539
E-mail: mitsiakg@med.auth.gr, mga@otenet.gr

Summary

Haemostasis is a dynamic and evolutionary procedure that begins antenatally and depends on the gestational age. Despite the evolutionary nature of haemostasis, it is considered as “physiologic” in healthy fetuses and neonates. Coagulant proteins are expressed early in embryonic and fetal period (life) and they participate in the evolution and differentiation of the tissues during the primary stages of development. The balance between pro-coagulant, inhibitors and fibrinolytic proteins is unique during fetal development.

The study of the haemostatic mechanism evolution and factors that are involved in the procedure during the intrauterine, or neonatal life are very helpful in enabling us to manage the problems of haemostasis that could emerge in any age.

Key words: fetus, haemostasis, neonate, thrombophilia, haemophilia.

Βιβλιογραφία

1. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70(1):165-172.
2. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers P. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72(5):1651-1657.
3. Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990 Spring;12(1):95-104
4. Manco-Johnson MJ. Development of hemostasis in the fetus. *Thromb Res.* 2005; 115Suppl1:55-63.
5. Michael D. Williams, Elizabeth A. Chalmers, Brenda E. S. Gibson. GUIDELINE The investigation and management of neonatal haemostasis and thrombosis. *British Journal of Haematology* 2002; 119(2):295-309.
6. Travis PA, Bovill EG, Hamill B, Tindle B. Detection of factor VIII von Willebrand Factor in endothelial cells in first-trimester fetuses. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:40-2.
7. Tuddenham EGD, Shearn SAM, Peake IR, Giddings JC, Blood AL. Tissue localization and synthesis of factor-VIII-related antigen in the human foetus. *Brit J Haematol* 1974;26:669-77.
8. Kawamoto S, Matsumoto Y, Miuno K, Okubo K, Matsubara K. Expression profiles of active genes in human and mouse livers. *Gene* 1996;174:151-8.
9. Hassan HJ, Leonardi A, Chelucci C, Matii G, Macioce G, Buerriero R, et al. Blood coagulation factors in human embryonic-fetal development: preferential expression of the FVII/tissue factor pathway. *Blood* 1990;76:1158-64.
10. Malhotra K, Luehrsen KR, Costello LL, Raich TJ, Sim K, Foltz L, et al. Identification of differentially expressed mRNAs in human liver across gestation. *Nucleic Acids Research* 1999;27:839-47.
11. Μακρής Π. Ε. Αιμόσταση-Παθολογία. Εκδότης Παντελής Ε Μακρής, Θεσσαλονίκη 1997.
12. Luther T, Flossel C, Mackman N, Bierhaus A, Kasper

- M, Albrecht S, et al. Tissue factor expression during human and mouse development. *Am J Pathol* 1996;149:101-13.
13. Bugge TH, Xiao Q, Konbrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton M, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor The cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6258-63.
 14. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze Jr GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996;88:1583-7.
 15. Edstrom CS, Calhoun DA, Christensen RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in human fetal and placental tissues. *Early Hum Dev* 2000;59:77-84.
 16. Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze Jr GJ. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* 1997;90:944-51.
 17. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, and Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996;383:73-5.
 18. Hackel C, Radig K, Rose I, Roessner A. The urokinase plasminogen activator (u-PA) and its inhibitor (PAI-1) in embryo-fetal bone formation in the human: an immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 1995;192:363-8.
 19. Reverdiau-Moalic P, Gruel Y, Delahousse B, Rupin A, Huart MC, Body G, Leroy J. Comparative study of the fibrinolytic system in human fetuses and in pregnant women. *Thromb Res* 1991;61:489-99.
 20. Bleyer WA, Hakami N, Shepard TH. The development of hemostasis in the human fetus and newborn infant. *J Pediatr* 1971;79:838-53.
 21. Ekelund H, Hedner U, Astedt B. Fibrinolysis in human fetuses. *Acta Paediatr Scan* 1970;59:369.
 22. Heikinheimo R. Coagulation studies with fetal blood. *Biol Neonate* 1964;7:319.
 23. Holmberg L, Henriksson P, Ekelund H, stedt B. Coagulation in the human fetus. *J Pediatr* 1974;85:860-4.
 24. Rivers RP, Hathaway WE. Studies on tissue factor activity and production by leukocytes of human umbilical cord and adult origin. *Pediatr Res* 1975;9:167-71.
 25. Grabowski EF, Carter CA, Tsukurov O, Conroy N, Hsu CY, Abbott W, et al. Comparison of human umbilical vein and adult saphenous vein endothelial cells: implications for newborn hemostasis and for models of endothelial cell function. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:266-8.
 26. Streif W, Paes B, Berry L, Andrew M, Andreasen RB, Chan AK. Influence of exogenous factor VIIa on thrombin generation in plasma of full term and preterm newborns. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:349-57.
 27. Menashi S, Arousseau MH, Gozin D, Daffos F, D'angelo A, Forestier F, Boffa MC. High levels of circulating thrombomodulin in human fetuses and children. *Thromb Haemost* 1999;81:906-9.
 28. Shearer MJ, Rahim S, Barkhan P, Stimmler L. Plasma vitamin K1 in mothers and their newborn babies. *Lancet* 1982;2(8296):460-3.
 29. Murray NA, Watts TL, Roberts IA. Endogenous thrombopoietin levels and effect of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte precursors in term and preterm babies. *Pediatr Res* 1998:148-51.
 30. Cornelissen M, Steegers-Theunissen R, Kollee L, Eskes T, Motohara K, Monnens L. Supplementation of vitamin K in pregnant women receiving anticonvulsant therapy prevents neonatal vitamin K deficiency. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:884-8.
 31. Webster WS, Vaghef H, Ryan B, Dencker L, Hellman B. Measurement of DNA damage by the comet assay in rat embryos grown in media containing high concentrations of vitamin K(1). *Toxicol In Vitro* 2000;14:95-9.
 32. Cornelius M, Steegers-Theunissen R, Kollee L, Eskes T, Vogels-Mentink G, Motohara K, De Abreu R, Monnens L. Increased incidence of neonatal vitamin K deficiency resulting from maternal anticonvulsant therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:923-8.
 33. Zipursky A, Jaber HM. The haematology of bacterial infection in newborn infants. *Clin Haematol* 1978;7(1):175-93
 34. Andrew M, Karpatkin M. A simple screening test for evaluating prolonged partial thromboplastin times in newborn infants. *J Pediatr* 1982;101(4):610-2
 35. Hathaway WE, Bonnar J. Hemostatic Disorders of the Pregnant Woman and Newborn Infant. New York, NY: Elsevier Science Publishing Company; 1987.p. 57-75.
 36. Muller M, Burchard W. Fibrinogen-fibrin transformation. Part III. Particularities for foetal fibrinogen. *Thromb Res* 1981;24:339-46.
 37. Hasegawa N, Sasaki S. A deficiency in A alpha chain's N-terminal alanine residue as a major cause of the slow coagulation of fetal fibrinogen. *Thromb Res* 1989;54:595-602.
 38. Francis JL, Armstrong DJ. Sialic acid and enzymatic desialation of cord blood fibrinogen. *Haemostasis* 1982;11:223-8.
 39. Galanakis DK, Martinez J, McDevitt C, Miller F. Human fetal fibrinogen: its characteristics of delayed fibrin formation, high sialic acid and AP peptide content are more marked in preterm than in term samples. *Ann NY Acad Sci* 1983;408:640-3.
 40. Benavent A, Estelles A, Aznar J, Martinez-Sales V, Gilabert J, Fornas E. Dysfunctional plasminogen in full

- term newborn-study of active site of plasmin. *Thromb Haemost* 1984;51:67-70.
41. Ries M. Molecular and functional properties of fetal plasminogen and its possible influence on clot lysis in the neonatal period. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:247-52.
 42. Ries M, Klinge J, Rauch R, Trusen B, Zenker M, Keuper H, Harms D. In vitro fibrinolysis after adding low doses of plasminogen activator and plasmin generation with and without oxidative inactivation of plasmin inhibitors in newborns and adults. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:346-51.
 43. Smith AA, Jacobson LJ, Miller BI, et al. A new euglobulin clot lysis assay for global fibrinolysis. *Thromb Res* 2003;112:329-37.
 44. Ries M, Zenker M, Gaffney PJ. Differences between neonates and adults in the urokinase- plasminogen activator (u-PA) pathway of the fibrinolytic system. *Thromb Res* 2000;100:341-51.
 45. Katz JA, Moake JL, McPherson PD, Weinstein MJ, Moise KJ, Carpenter RJ, Sala DJ. Relationship between human development and disappearance of unusually large von Willebrand factor multimers from plasma. *Blood* 1989;73:1851-8.
 46. Sell EJ, Corrigan JJ Jr. Platelet counts, fibrinogen concentrations, and factor V and factor VIII levels in healthy infants according to gestational age. *J Pediatr* 1973;82(6):1028-32.
 47. Shenkman B, Linder N, Savion N, Tamarin I, Dardik R, Kennet G, German B, Varon D. Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions: the role of plasma von Willebrand factor. *Pediatr Res* 1999;45:270-5.
 48. Del Vecchio A, Sola MC. Performing and interpreting the bleeding time in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol*. 2000;27(3):643-54.
 49. Aballi AJ, Puapondh Y, Desposito F. Platelet counts in thriving premature infants. *Pediatrics* 1968;42(4):685-9.
 50. Bleyer WA, Hakami N, Shepard TH. The development of hemostasis in the human fetus and newborn infant. *J Pediatr* 1971;79:838-53.
 51. Murray NA, Watts TL, Roberts IA. Endogenous thrombopoietin levels and effect of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte precursors in term and preterm babies. *Pediatr Res* 1998:148-51.
 52. Jilma-Stahlawetz P, Homoncik M, Jilma B, Folman CC, von dem Borne AD, Beraschek G, Deutinger J, Ulm B, Wppel W, Panzer S. High levels of reticulated platelets and thrombopoietin characterize fetal thrombopoiesis. *Br J Haematol* 2001;112:466-8.
 53. Feusner JH. Normal and abnormal bleeding times in neonates and young children utilizing a fully standardized template technic. *Am J Clin Pathol* 1980;74(1):73-7.
 54. Israels SJ, Cheang T, McMillan-Ward EM, Cheang M. Evaluation of primary hemostasis in neonates with a new in vitro platelet function analyzer. *J Pediatrics* 2000;138:116-9.
 55. Meher-Homji NJ, Montemagno R, Thilaganathan B, Nicolaides KH. Platelet size and glycoprotein Ib and II-Ia expression in normal fetal and maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:791-6.
 56. Jones CR, McCabe R, Hamilton CA, Reid JL. Maternal and fetal platelet responses and adrenoceptor binding characteristics. *Thromb Haemost* 1985;53:95-8.
 57. Gruel Y, Boizard B, Daffos F, Forestier F, Caen J, Wautier JL. Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood* 1986;68:488-92.
 58. Gelman B, Setty Y, Chen D, Amin-Hanjani S, Stuart MJ. Impaired mobilization of intracellular calcium in neonatal platelets. *Pediatr Res*. 1996;39:692-696.