

1.5 Hemostasen – en översikt

Inledning

Uppgiften för alla koagulationsfaktorer och hämmare är främst att snabbt täppa till mindre hål och skador i cirkulationssystemet utan att hindra blodflödet mer än nödvändigt. Det är essentiellt att koagulation sker vid rätt tidpunkt, på rätt plats och i lagom omfattning. Under normala förhållanden är koagulationen en ytbunden process som äger rum på ytan av aktiverade trombocyter, skadade endotelceller eller subendoteliala strukturer. Hämmarsystemen och i viss mån även fibrinolytiska systemet begränsar koagulationen till skadestället och hindrar propagering i blodet och på frisk kärlvägg. Under läkningsprocessen löses blodkoaglet upp av det fibrinolytiska systemet, ett system som också innehåller hämmande faktorer för att förhindra för tidig upplösning av blodkoagel.

I begränsandet av blodförlust vid skada har även kärlväggsförändringar och flödesförhållanden stor betydelse – de två andra delarna av Virchows triad [49], se Kapitel 1.6.

Koagulationssystemet och fibrinolytiska systemet är enzymssystem som är uppbyggda som kaskader, där ett enzym aktiverar ett proenzym genom proteolytisk klyvning. Det bildade enzymet aktiverar i sin tur ett andra proenzym. I varje steg aktiveras allt fler molekyler, en förstärkningsreaktion [13,25]. Dessa enzymer är serinproteaser, benämnda efter att aminosyran serin finns i enzymets aktiva område (översikt i [21]). I slutet av kaskaden bildas enzymet trombin som har flera centrala funktioner i hemostasen. Trombin omvandlar det lösliga plasmaproteinet fibrinogen till en olöslig fibrinringel och aktiverar trombocyter [5,8]. Trombocyterna har en essentiell roll i hemostasen. Det är inte förenligt med fortsatt liv att sakna trombocyter eller protrombin. Om man efter provtagningen snabbt centrifugerar ned trombocyterna och de andra

blodcellerna och filtrerar plasman så kan den förvaras i plaströr utan att koagulera [10,34].

Initieringen av koagulationen

Tidigt beskrevs den så kallade interna vägen i vilken koagulation initieras av negativt laddad yta, t ex glas, som med hjälp av flera proteiner ger upphov till en aktivering av proenzymet faktor XII till det aktiva enzymet faktor XIIa, vilket i sin tur aktiverar XI till XIa som aktiverar faktor IX osv [18]. I slutänden bildas trombin som omvandlar fibrinogen till en olöslig fibrinigel. Så småningom fann man patienter som helt saknade faktor XII men ändå inte hade någon blödningsbenägenhet [36]. Däremot har patienter med faktor XI-brist vanligen en tämligen mild blödningsjukdom [37]. Det är fortfarande inte helt klarlagt vilka fysiologiska roller faktor XII har.

Den normala aktiveringsvägen vid en kärlskada är i stället att skadade endotelceller, subendoteliala strukturer och aktiverade monocyter kan exponera ett membranprotein, vävnadsfaktor (= tissue factor, TF), mot blodbanan [27,32] (översikt i [29]). Detta protein binder till sig faktor VIIa. Denna faktor finns normalt i cirka 1 procent i cirkulationen i sin aktiva form [28,30]. Fritt cirkulerande faktor VIIa kan inte aktivera faktor X. Komplexet TF-FVIIa kan däremot aktivera faktor X till Xa, som på ytan av aktiverade trombocyter tillsammans med kofaktorn faktor Va aktiverar protrombin till trombin [19,20]. TF-VIIa aktiverar också ytterligare faktor VII till VIIa och faktor IX till IXa. Komplexet TF-VIIa-FXa inaktiveras tämligen snabbt av ”tissue factor pathway inhibitor” (TFPI) [1,38].

Till skadestället adhererar samtidigt snabbt trombocyter. Trombocyterna kan binda till von Willebrandfaktor i subendotelet via ett specifikt receptorkomplex eller till kollagen via andra receptorer. Särskilt vid höga skjuvningskrafter har bindningen till von Willebrandfaktorn stor betydelse. Skjuvningskrafterna är höga i kapillärerna och i små artärer, särskilt om dessa är stenoserade. Aktiveringen av trombocyterna leder bl a till ändrad konformation av fibrinogenreceptorn, GpIIb/IIIa, så att

fibrinogen binds. Till en fibrinogenmolekyl kan ytterligare en trombocyt bindas, vilket leder till att trombocyterna aggregerar.

Granula, innehållande bl a ADP som är en trombocytaktivator frisätts från trombocyterna. Från alfa-granula förflyttas P-selektin till ytan av trombocyten, ett membranprotein som hjälper trombocyten att binda till endotel och till vita blodkroppar (översikt i [9]). Den aktiverade trombocytytan innehåller också bindningsställen för faktor IX, X, XI samt kofaktorerna V och VIII (översikt i [45]). Den kraftigt aktiverade trombocyten kommer också att förflytta negativt laddade fosfolipider från insidan till utsidan av membranet [4] samt att avsnöra små, prokoagulativa membranfragment – så kallade mikroversiklar. Denna negativa ytladdning har betydelse, oklart hur stor, för bindningen av koagulationsfaktorer [23,31,41].

Flertalet av de proteiner i koagulationskaskaden (faktor II, VII, IX, X, protein C och S) som binder till membraner innehåller en post-ribosomalt modifierad aminosyra, γ -karboxylglutaminsyra [40]. Denna aminosyra har två negativa laddningar och binder kalciumjoner som har två positiva. Bindningen av kalcium är nödvändig för att dessa ska ha korrekt tredimensionell struktur och exponera en hydrofob del som binder till membran [42]. Kalcium bildar inte en jonbrygga mellan dessa faktorer och negativt laddade membran. Denna enzymatiska karboxylering kräver reducerad form av vitamin K. Vitamin K-antagonister, som t ex warfarin, blockerar vitamin K epoxidreduktas och därmed regenereringen av vitamin K, se vidare nedan.

Den första lilla mängden trombin som bildats förstärker koagulationen genom att vara en utomordentligt stark trombocytaktivator och också genom att aktivera kofaktorerna V och VIII samt faktor XI. Trombocyten granula innehåller också faktor XI. Protrombin underlättar bindningen av faktor XI till trombocytytan och på dessas yta aktiveras faktor XI i första hand av trombin, inte av faktor XIIa [44]. Till faktor XIa binds faktor IX och aktiveras till IXa. Faktor XIa som lämnar trombocytytan inaktiveras snabbt av protease nexin II, snabbast i närvaro av heparin eller heparansulfatglukosaminoglykaner på endotelcellsytan. Denna hämning bidrar till att begränsa koagulationens utbredning i

rummet. Patienter som saknar faktor VIII (hemofili A) eller IX (hemofili B) har en svår blödningsjukdom.

Förstärkningsfasen av koagulationen

Faktor IXa binder till specifika receptorer på trombocytytan i komplex med faktor VIIa och X, detta komplex kallas ofta tenaskomplexet. Faktor X aktiveras till Xa, som i sin tur på trombocytytan bildar ett komplex med kofaktorn faktor Va, som kallas för protrombinas-komplexet, och som aktiverar protrombin till trombin. Dessa komplex klyver sina substrat, faktor X respektive protrombin, på trombocytytan 100 000–1 000 000 gånger snabbare än vad faktor IX respektive X ensamma förmår. Bildat trombin aktiverar, i en positiv förstärkningskedja, mer faktor V, VIII, IX och XI samt fler trombocyter. På så vis bildas stora mängder trombin inuti koaglet. Detta trombin aktiverar proteinet trombinaktiverbar fibrinolysinhibitor (TAFI), som nedreglerar fibrinolysen och bidrar till att skydda koaglet mot alltför snabb upplösning [2]. När fibrinet bildas, dvs blodet koagulerar, har endast en liten del av protrombinet hunnit omvandlats till trombin.

Bildning av fibrin

Fibrinogen är ett plasmaprotein med molekylvikt 340 000. Koncentrationen är normalt cirka 2–4 g/L, men kan stiga kraftigt vid inflammatorisk reaktion. En mycket viktig funktion är att omvandlas till ett fibrinnätverk som utgör ”armeringen” i blodkoagel. Fibrinogenmolekylen är uppbyggd av två identiska halvorer som vardera består av tre polypeptidkedjor. Den tredimensionella strukturen består av en central E-domän i centrum av molekylen som innehåller alla peptidkedjornas aminoterminaler och i vardera änden av fibrinogenmolekylen finns två D-domäner.

Plasmaproteinet fibrinogen omvandlas till olösligt fibrin i tre steg. Trombin klyver av delar av fibrinogenmolekylen, fibrinmonomerer bildas som sedan polymeriserar till olösligt fibrin [6,7,46].

Fibrinet stabiliseras genom att det, under inverkan av koagulationsfaktor XIIIa, bildas kovalenta bindningar. Faktor XIII aktiveras till XIIIa av trombin. Bildningen av kovalenta bindningar mellan kedjorna i D-domänerna i fibrinet skapar unika strukturer som inte finns i fibrinogenmolekylen eller nedbrytningsprodukter av fibrinogen [24]. Dessa D-domäner är praktiskt taget identiska med fragment D, som bildas vid nedbrytningen av fibrin (se nedan).

Hämmningsmekanismer för koagulationen

Trombin som bildas på trombocytytan är inte bundet till densamma utan diffunderar ut i blodet. När trombinet når intakt endotel så binder det till ett membranprotein, trombomodulin, till vilket också koagulationshämmaren protein C binds och aktiveras. På friskt endotel blir det prokoagulant enzymet trombin antikoagulant. Aktivt protein C, APC, bromsar koagulationen genom att, tillsammans med sin kofaktor protein S, inaktivera kofaktorerna Va och VIIIa genom proteolytiska klyvningar (översikt i [17]) [16,39,43].

Patienter som har mutationen faktor V Leiden har fått aminosyran arginin i position 506, som är det första klyvningsstället för APC, bytt till glycin vilket gör att inaktiveringen av faktor Va och, på ett indirekt sätt, även faktor VIIIa går långsammare än normalt. Denna defekt benämns också ofta APC-resistens, som dock egentligen är ett vidare begrepp [3,12].

Tämligen ovanligt förekommer ärftlig brist på protein C och S. På friskt endotel finns också heparinliknande molekyler som binder plasma-proteinet antitrombin och kraftfullt effektiviserar antitrombins inaktiverande komplexbildning med trombin och faktor Xa. Ärftlig brist på antitrombin är sällsynt, typ I med sänkt proteinnivå förekommer alltid i heterozygot form med koncentrationer cirka hälften av de normala, och är förenad med en starkt ökad risk för venös tromboembolism. En mildare form, typ II, beror på defekt i heparinbindande site och fångas inte med vanlig rutinanalys av antitrombin [15,22].

Nedbrytning av fibrin

Fibrinolytiska systemet börjar lösa upp bildat fibrin så snart något fibrin bildats (översikt i [11]). Redan då koaglet bildas binder plasmaproteinet plasminogen till fibrintrådarna och kan, på ytan av fibrinet, aktiveras av vävnadsplasminogenaktivatorn (t-PA) till enzymatiskt aktivt plasmin [35]. t-PA frisätts från depåer i endotelet av en mängd olika stimuli, t ex venös stas. Frisatt t-PA kan bindas till fibrin, inaktiveras genom att bindas till en specifik hämmare i plasma (plasminogenaktivatorhämmare 1, PAI-1) eller tas upp i levern [48]. En annan nyligen beskriven hämmare är TAFI ("thrombin activatable fibrinolytic inhibitor"), som även utgör en länk mellan koagulations- och fibrinolyssystemet.

Plasminet som bildas ur plasminogen på fibrinytan klyver först av karboxyterminala delar från α -kedjorna och sedan de aminoterminala delarna av β -kedjorna. I stället för fragment D, som bildas vid plasminmedierad nedbrytning av fibrinogen, bildas en kovalent sammanbunden dimer av fragment D, "fibrin D-dimer", som en av slutprodukterna [26].

Vid fibrinolys *in vivo* förekommer fibrinfragment av många storlekar i cirkulationen, vanligtvis dominerar mycket stora fragment. Fibrin är således en kraftfull aktivator av den t-PA-medierade aktiveringen av plasminogen till plasmin och deltar självt i initieringen av fibrinolysen som leder till nedbrytning av fibrinet. När plasmin lämnar koaglet och kommer ut i blodet hämmas det effektivt av antiplasmin, men så länge det är bundet till fibrin är det oåtkomligt för antiplasmin [47].

Metoder för behandlingskontroll vid antikoagulantia

Aktiverad partiell tromboplastintid

Aktiverad partiell tromboplastintid (APTT) mäter faktorer i den interna vägen, XII, XI, X, IX, VIII, V, protrombin och fibrinogen. De första faktorerna i kaskaden XII och XI har störst effekt på den koagulationstiden. Patienter med mild hemofili kan ha normal APTT. Analysen har optimerats av tillverkarna för att kontrollera behandling med heparin och inte för att påvisa ärftliga blödningsjukdomar. Reagenset består av

fosfolipider och en aktivator, kiselkorn eller elagsyra. Plasmaprovet och reagenset får reagera några minuter så att kontaktaktiveringen bildar faktor XIIa ur provets innehåll av faktor XII. Därefter rekalcifieras provet och koagulationstiden mätes.

Analysens namn kommer av att man tyckte att tromboplastinet var partiellt eftersom det inte innehåller vävnadsfaktor. Tyvärr har olika fabrikat av APTT-reagens stora skillnader i känslighet för heparin, vilket gör att den infusionshastighet med heparin som behövs för att öka APTT 2–3 gånger startvärdet blir beroende av vilket reagens laboratoriet använder. APTT-resultaten är dessutom i viss mån också instrumentberoende.

Protrombinkomplex

Protrombinkomplex (PK, PT) används främst för att kontrollera behandling med vitamin K-antagonister som warfarin. Resultat beror av provets innehåll av de K-vitaminberoende faktorerna II, VII, och X men inte IX. På grund av den höga halten av vävnadsfaktor direktaktiverar faktor VIIa faktor X, utan medverkan av faktorerna VIII och IX. I Norden används en metodgrupp som bygger på en metod av Owren och kallas därför Owrenmetoden, också kallat metoder med kombinerat tromboplastin. Reagensen innehåller tromboplastin från kaninhjärna (fosfolipider med vävnadsfaktor), bristplasma ur vilken de vitamin K-beroende faktorerna borttagits samt kalcium. Resultaten uttrycks numera inte längre i procent utan som internationell normaliserad ratio (INR) [14].

För att kunna jämföra resultat erhållna med alla typer av reagens med olika känslighet för antikoagulantia har man infört ett internationellt referensreagens mot vilket alla tillverkningssatser av reagens kalibrerats indirekt via flera sekundära referensreagens. Därvid uttrycks resultaten som den kvot (patientplasmans koagulationstid/normal koagulationstid) man skulle erhållit om man använt det primära referensreagenset med hjälp av en korrektionsfaktor, ”International Sensitivity Index (ISI)”. $INR = ISI \times \log(\text{koagulationstid patientprov}/\text{normal koagulationstid})$. ISI bör bestämmas för varje tillverkningssets av reagens och instrument [33].

Korrelationen mellan olika fabrikat av Owenreagens och olika instrument är mycket god och man kan förvänta sig att ett patientprov får samma INR-värde oavsett vilket laboratorium som utför analysen. Skillnader av praktisk betydelse har endast observerats i sällsynta fall och då i inställningsfasen och vid överbehandling. Dessa skillnader beror främst på att olika fabrikat har olika känslighet för faktor VII, den faktor som har kortast halveringstid. Större skillnader kan ses vid jämförelse med den äldre metodvarianten trombotest som har bovin tromboplastin och en lägre spädning av plasmaprovet.

Utanför Norden används främst Quick-metoder, också kallade metoder med enkelt tromboplastin. Reagensen innehåller tromboplastin, humant eller från kanin, och kalcium. Resultaten beror på provets innehåll av faktorerna II, VII och X samt dessutom av faktor V och fibrinogen. Faktor V är instabil, vilket gör att provets hållbarhet är kort. Fibrinogen är en akutfasreaktant och koncentrationen kan stiga flera gånger vid inflammatorisk reaktion. Lupus antikoagulans ger upphov till falskt förhöjda värden, vilket är orsaken till att högre INR-värden för patienter med lupus antikoagulans internationellt rekommenderas. Detta förhållande gäller inte Owenmetoden. Korrelationerna mellan olika Quick-reagens är mindre goda och resultaten är dessutom instrumentberoende.

Läkemedelseffekter på hemostas

Cyklooxygenhämmare

Den i särklass mest använda trombocythämmaren är acetylsalicylsyra (ASA) som hämmar enzymet cyklooxygenas irreversibelt. Enzymet nybildas inte i trombocyterna, som till skillnad från endotelcellerna saknar cellkärna. Därigenom hämmas av en dos ASA-bildningen tromboxan A₂ i trombocyterna längre tid än bildningen av endotelcellernas prostacyclin. Tromboxan A₂ är kärlsammandragande och trombocytaktiverande, prostacyclin har motsatta effekter.

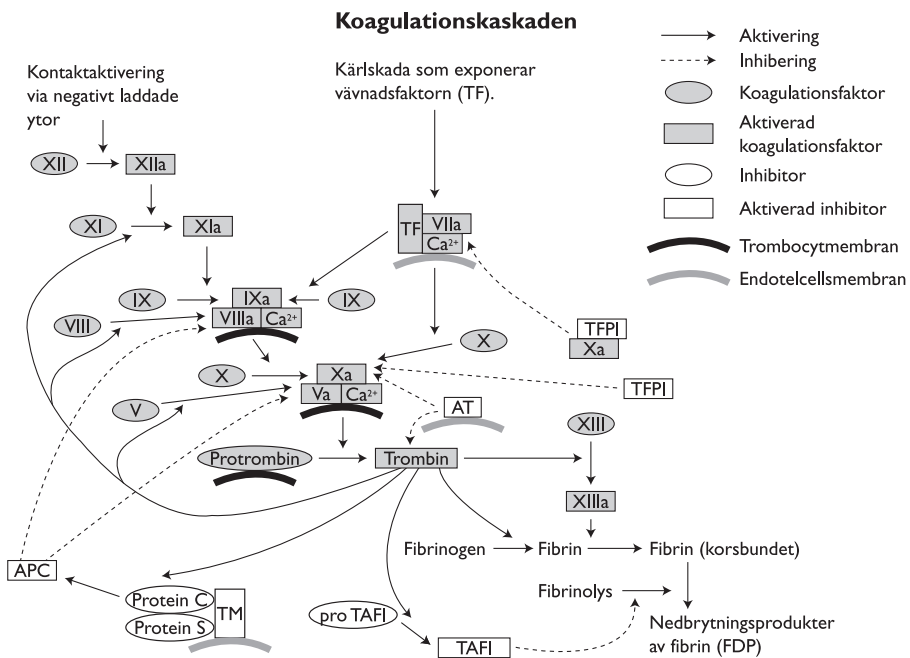
Heparin och lågmolekylära hepariner

Heparin verkar genom att underlätta antitrombinets hämning av koagulationskaskaden, främst genom att hämma trombin och faktor Xa. Lågmolekylära hepariner har främst effekt på Xa. Fyra preparat finns registrerade i Sverige (se Kapitel 2.1). En syntetisk pentasackarid har nyligen registrerats på indikationen förebyggande av postoperativ trombos, effekten är i likhet med lågmolekylära hepariner beroende av patientens antitrombin och selektivt riktad mot Xa.

Antivitamin K-läkemedel

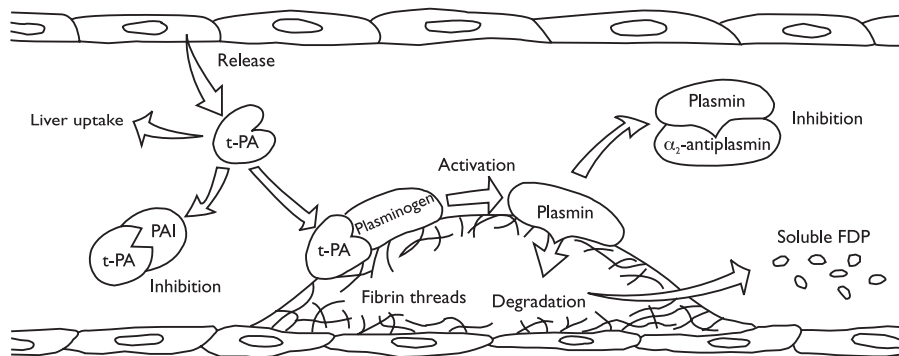
Det i Sverige helt dominerande antivitamin K (AVK) läkemedlet är warfarin, som verkar genom att hämma regenereringen av vitamin K vid syntesen av de vitamin K-beroende koagulationsfaktorerna protrombin, VII, IX och X. Vitamin K-antagonister utövar sin verkan genom att motverka vitamin K₁ (phytonadion). Detta sker genom att vitamin K₁ epoxidreduktas hämmas. Detta enzym har till uppgift att regenerera vitamin K₁ från vitamin K₁ epoxid, som uppstår när koagulationsfaktorerna II, VII, IX och X samt koagulationshämmarna protein C och protein S genomgår posttranslaterisk gammakarboxylering för att bli funktionella och kunna binda till fosfolipidytter via en hydrofob yta som exponeras med hjälp av kalciumjoner.

Eftersom vitamin K-antagonister inte påverkar redan funktionella, cirkulerande koagulationsfaktorer utan endast dem som syntetiseras, kommer effekten efter påbörjad behandling att dröja tills de förstnämnda kataboliserats, vilket vanligtvis tar 4–5 dygn. Det har därför i allmänhet ansetts olämpligt att ge dessa medel som akutbehandling vid djup ventrombos eller lungemboli, där heparinerna utgör standard, utan att i stället utnyttja dem som sekundärprofylax. Detta motiveras framför allt av den perorala administrationen, som hittills inte varit användbar för andra koagulationshämmare.



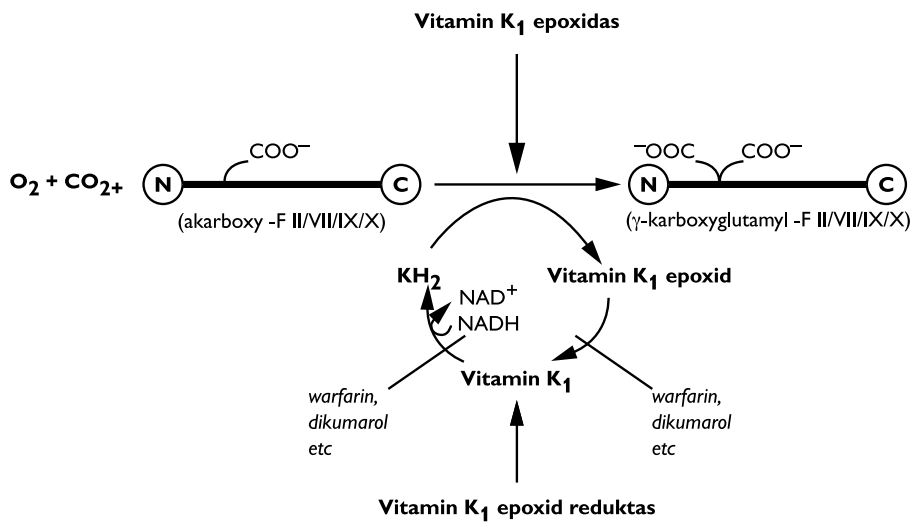
Bilden (modifierad) är hämtad från doktorsavhandlingen "Real-time analysis of blood coagulation and fibrinolysis. New rheological and optical sensing techniques for diagnosis of haemostatic disorders", Linköping University Medical Dissertations No.663, 2001, med tillstånd av författaren Kenny Hansson.

Figur 1 Koagulationskaskaden (TAFI = trombinaktiverbar fibrinolysinhibitor, AT = antrombin, TFPI = hämmare av vävnadsfaktoraktiverad koagulation (tissue factor pathway inhibitor), TM = trombomodulin, APC = aktiverat protein C).



The Fibrinolytic enzyme system
Reproduced by courtesy of Björn Wiman

Figur 2 Fibrinolysen.



Figur 3 K-vitamincykeln och bildningen av γ -karboxyglutaminsyra.

Referenser

1. Abildgaard U, Sandset PM, Andersson TR, et al. The inhibitor of F VIIa in plasma measured with a sensitive chromogenic substrate assay: comparison with antithrombin, protein C and heparin cofactor II in a clinical material. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1988;115: 274-7.
2. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
3. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
4. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* 1996;5:480-7.
5. Blomback B, Blomback M, Hessel B, Iwanaga S. Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature* 1967;215:1445-8.
6. Blomback B, Blomback M, Henschen A, et al. N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Nature* 1968;218:130-4.
7. Blomback B, Blomback M. The molecular structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1972;202:77-97.
8. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, et al. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res* 1994;75:521-38.
9. Boon GD. An overview of hemostasis. *Toxicol Pathol* 1993;21:170-9.
10. Bachli E. History of tissue factor. *Br J Haematol* 2000;110:248-55.
11. Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 1999;82:259-70.
12. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1004-8.
13. Davie RO. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145: 1310-2.
14. Egberg N, Hillarp A, Johnsson H, et al. [Coordinated Swedish transfer is recommended during 1999. Prothrombin complex measurement should be indicated as a quota, not percent]. *Läkartidningen* 1999;96:2489-91.
15. Egeberg O. On the natural blood coagulation inhibitor system. Investigations of inhibitor factors based on antithrombin deficient blood. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;14:473-89.
16. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:2249-52.
17. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987;235: 1348-52.

18. Griffin JH. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:1998-2002.
19. Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995;86:1794-801.
20. Kjalke M, Monroe DM, Hoffman M, et al. Active site-inactivated factors VIIa, Xa, and IXa inhibit individual steps in a cell-based model of tissue factor-initiated coagulation. *Thromb Haemost* 1998;80:578-84.
21. Kraut J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:331-58.
22. Lane DA, Kunz G, Olds RJ, Thein SL. Molecular genetics of antithrombin deficiency. *Blood Rev* 1996;10:59-74.
23. London F, Ahmad SS, Walsh PN. Annexin V inhibition of factor IXa-catalyzed factor X activation on human platelets and on negatively-charged phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1996;35:16886-97.
24. Lorand L, Chenoweth D, Gray A. Titration of the acceptor cross-linking sites in fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 1972;202:155-71.
25. Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964;202:498-9.
26. Marder VJ, Matchett MO, Sherry S. Detection of serum fibrinogen and fibrin degradation products. Comparison of six techniques using purified products and application in clinical studies. *Am J Med* 1971;51:71-82.
27. Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, et al. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest* 1993;91:2253-9.
28. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993;81:734-44.
29. Nemerson Y, Bach R. Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb* 1982;6:237-61.
30. Nemerson Y. Regulation of the initiation of coagulation by factor VII. *Haemostasis* 1983;13:150-5.
31. Nesheim ME, Furmaniak-Kazmierczak E, Henin C, Cote G. On the existence of platelet receptors for factor V(a) and factor VIII(a). *Thromb Haemost* 1993;70:80-6.
32. 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;74:5260-4.
33. Poller L, Hirsch J. Laboratory monitoring of anticoagulants. In: Poller L, Hirsch J, editors. *Oral anticoagulants*. New York: Arnold; 1996. p. 49-64.
34. Ramstrom S, Ranby M, Lindahl TL. The role of platelets in blood coagulation-effects of platelet agonists and GPIIb/IIIa inhibitors studied by free oscillation rheometry. *Thromb Res* 2002;105:165-72.

35. Ranby M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* 1982;704:461-9.
36. Ratnoff CJ. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 1955;34:602-13.
37. Rosenthal R. Properties of plasma thromboplastin antecedent (PTA) in relation to blood coagulation. *J Lab Clin Med* 1955;45:123-9.
38. Sandset PM, Abildgaard U. Extrinsic pathway inhibitor – the key to feedback control of blood coagulation initiated by tissue thromboplastin. *Haemostasis* 1991;21:219-39.
39. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976;251:355-63.
40. Stenflo J, Suttie JW. Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu Rev Biochem* 1977;46:157-72.
41. Sumner WT, Monroe DM, Hoffman M. Variability in platelet procoagulant activity in healthy volunteers. *Thromb Res* 1996;81:533-43.
42. Sunnerhagen M, Drakenberg T, Forsen S, Stenflo J. Effect of Ca²⁺ on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. *Haemostasis* 1996;26:45-53.
43. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981;256:11128-31.
44. Walsh PN. Platelets and factor XI bypass the contact system of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999;82:234-42.
45. Walsh PN. Roles of platelets and factor XI in the initiation of blood coagulation by thrombin. *Thromb Haemost* 2001;86:75-82.
46. Weisel JW, Stauffacher CV, Bullitt E, Cohen C. A model for fibrinogen: domains and sequence. *Science* 1985;230:1388-91.
47. Wiman B, Collen D. On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem* 1979;254:9291-7.
48. Wiman B, Mellbring G, Ranby M. Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay. *Clin Chim Acta* 1983;127:279-88.
49. Virchow R. Ein Vortrag über die Thrombose vom Jahre. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin* 1856:478-81.