



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΣΤΗΝ
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Όνοματεπώνυμο Φοιτητή (και ΑΜ): ΒΑΛΕΝΤΙΝΑ ΙΩΑΝΝΑ
ΚΑΤΕΡΗ 62117024

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα (και Βαθμίδα ή Ιδιότητα):
ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES DIVISION:

MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION (Title) (Picture): ROLE OF RED BLOOD
CELLS ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS

STUDENT NAME (and CN): VALENTINA IOANNA
KATERI 62117024

NAME OF SUPERVISOR (and TITLE): CHARA
GEORGATZAKOY



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΣΤΗΝ ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής
συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή**

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε
επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

ΟΝΟΜΑ/ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ ΧΑΡΑ	Ακαδημαϊκή Υπότροφος	
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας – Αιμοδοσίας	
ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΑ	Καθηγήτρια	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Βαλεντίνα Ιωάννα Κατέρη του Σπυρίδων, με αριθμό μητρώου 62117024 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

**Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Ο/Η Δηλών/ούσα
Βαλεντίνα Ιωάννα Κατέρη

(Υπογραφή)

Β.Κατέρη

*** Χαρά Γεωργατζάκου Ακαδημαϊκή Υπότροφος**

(Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα)

** Σε εξαιρετικές περιπτώσεις και μετά από αιτιολόγηση και έγκριση του επιβλέποντα, προβλέπεται χρονικός περιορισμός πρόσβασης (embargo) 6-12 μήνες. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του I.A. (σελ. 6):*

https://www.uniwa.gr/wp-content/uploads/2021/01/%CE%A0%CE%BF%CE%BB%CE%B9%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%B5%CC%81%CF%82_%CE%99%CE%B4%CF%81%CF%85%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%85%CC%81_%CE%91%CF%80%CE%BF%CE%B8%CE%B5%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CC%81%CE%BF%CF%85_final.pdf

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1^ο : Ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων.....	
1.1 Ερυθροκύτταρο (RBC) και λειτουργία.....	4
1.2 Αιμοπετάλιο (PLT) και λειτουργία.....	9
Κεφάλαιο 2^ο : Συμμετοχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιμόσταση.....	
2.1 Μηχανισμός αιμόστασης.....	14
2.1.1 Παθοφυσιολογία (ο λόγος και ο μηχανισμός).....	14
2.1.2 Συμμετοχή ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	19
2.1.3 Αλληλεπίδραση ερυθρών αιμοσφαιρίων με αιμοπετάλια.....	22
2.2 Αλληλεπίδραση των RBC's με κυτταρικά και μοριακά συστατικά του αιμοστατικού μηχανισμού.....	25
2.2.1 Αγγειακό τείχος.....	25
2.2.2 Ινωδογόνο και ινώδες.....	26
2.2.3 Παράγοντας VIII και συντελεστής von Willebrand.....	28
2.3 Εργαστηριακή διερεύνηση της αιμόστασης.....	29
2.3.1 Χρόνος προθρομβίνης (PT).....	29
2.3.2 Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT).....	30
Κεφάλαιο 3^ο : Θρόμβωση: Επίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και χαρακτηριστικά.....	
3.1 Μηχανισμός θρόμβωσης.....	32
3.1.1 Παθοφυσιολογία (ο λόγος και ο μηχανισμός).....	32
3.1.2 Συμμετοχή ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	42
3.1.3 Επίδραση στα αιμοπετάλια.....	47
3.2 Αλληλεπίδραση των RBC's με αγγειακά κύτταρα κατά τη διάρκεια της θρομβογένεσης.....	50
3.2.1 Δημιουργία θρομβίνης.....	50
3.2.2 Αγγειακό τείχος.....	52
3.2.3 Ινωδογόνο και ινώδες.....	54
3.3 Κλινικές εκδηλώσεις διαταραχών θρόμβωσης.....	55
3.3.1 Μη φυσιολογικός αιματοκρίτης.....	55
3.3.2 Μη φυσιολογική ποιότητα και λειτουργία ερυθρών.....	57

Κεφάλαιο 4^ο: Ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές των ερυθρών που σχετίζονται με την αιμόσταση και την θρόμβωση

4.1 Ποσοτικές αλλαγές.....	59
4.1.1 Συγκέντρωση ερυθρών.....	59
4.1.2 Αποθήκευση ερυθρών.....	60
4.1.3 Μικροκυτίδια που προέχονται από τα ερυθρά.....	61
4.2 Ποιοτικές αλλαγές.....	63
4.2.1 Παραμόρφωση ερυθρών.....	63
4.2.2 Έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη.....	65
Συμπεράσματα.....	67
Περίληψη.....	68
Βιβλιογραφία.....	70

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Αιματολογία είναι ένας ιδιαίτερος κλάδος της ιατρικής επιστήμης που κύριο αντικείμενο έρευνας και μελέτης είναι το αίμα, τόσο στη φυσιολογική του, όσο και την παθολογική του κατάσταση. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες και ειδικότερα μετά την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου η ιατρική ειδικότητα της αιματολογίας έχει καταλάβει προνομιούχο θέση μεταξύ άλλων ειδικοτήτων.

Η εύκολη πρόσβαση στον αιμοποιητικό ιστό χωρίς ιδιαίτερα επεμβατικές μεθόδους συνέβαλε αποφασιστικά στην εις βάθος μελέτη πολλών σημαντικών θεμάτων της βιολογίας, φυσιολογίας και παθολογίας του αίματος. Η Αιματολογία μελετώντας την μορφολογία και φυσιολογία των κυττάρων του αίματος κατάφερε αφενός μεν να προσδιορίσει τον τόπο παραγωγής και καταστροφής των αιμοσφαιρίων, όσο επίσης, το σημαντικότερο, να προσδιορίσει αρκετό αριθμό νοσημάτων που έχουν ως αιτία διαταραχές των παραπάνω κυττάρων, ή ακόμα και στην αντιμετώπιση παθήσεων που συνοδεύονται από αιμορραγία.

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης και με τις διεργασίες της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης σχηματίζουν πληθυσμούς προγονικών κυττάρων, τα οποία "δεσμεύονται" να ακολουθήσουν τις κύριες κυτταρικές σειρές του μυελού των οστών, δηλαδή την ερυθρά, την κοκκιώδη και μονοκυτταρική, τη μεγακαρυοκυτταρική και τη λεμφική. Η λειτουργία της αιμοποίησης περιλαμβάνει το σύνολο των διεργασιών, οι οποίες συμβάλλουν στην παραγωγή όλων των επιμέρους κυττάρων, τη δέσμευση ορισμένων προγονικών κυττάρων προς συγκεκριμένη κατεύθυνση διαφοροποίησης, τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων και τελικά την διαφοροποίησή τους προς συγκεκριμένα ώριμα κύτταρα του αίματος.

Η γνώση της φυσιολογικής ομοιόστασης του ερυθρού αιμοσφαιρίου αποτελεί την βάση για την κατανόηση παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι οι αναιμίες, οι πολυκυτταραιμίες και οι λειτουργικές διαταραχές των ερυθροκυττάρων. Το ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο αποτελεί το προϊόν σύνθετων και διαδοχικών βημάτων διαφοροποίησης και ωρίμανσης του στελεχιαίου αιμοποιητικού κυττάρου. Η δέσμευση προς την ερυθρά σειρά προκαλεί προοδευτικά αυξανόμενη ευαισθησία στις δράσεις της ερυθροποιητίνης και

επίσης αφορά τον προγραμματισμό συγκεκριμένων γονιδίων των οποίων η έκφραση απαιτείται κατά την φάση ωρίμανσης.

Το 1658 ο Ολλανδός φυσιολόγος Jan Swammerdam ήταν ο πρώτος που παρατήρησε τα ερυθρά αιμοσφαίρια κάτω από ένα μικροσκόπιο, και το 1695, ο Antoni van Leeuwenhoek, επίσης ολλανδός, ήταν ο πρώτος που σχεδίασε μια απεικόνιση των "κόκκινων σωμάτων", όπως ονομάστηκαν. Δεν υπήρξαν άλλες ανακαλύψεις για τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέχρι το 1842, όπου ο Γάλλος γιατρός Alfred Donné ανακάλυψε τα αιμοπετάλια. Το επόμενο έτος τα λευκοκύτταρα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Gabriel Andral, Γάλλο καθηγητή ιατρικής και τον William Addison, Βρετανό γιατρό, ταυτόχρονα. Και οι δύο άνδρες πίστευαν ότι τόσο τα ερυθρά όσο και τα λευκά αιμοσφαίρια είχαν αλλοιωθεί σε ασθένειες. Με αυτές τις ανακαλύψεις, η αιματολογία, ένας νέος τομέας της ιατρικής, καθιερώθηκε. Παρόλο που ήταν διαθέσιμοι παράγοντες για τη χρώση ιστών και κυττάρων, σχεδόν καμία πρόοδος δεν έγινε στη γνώση σχετικά με τη μορφολογία των κυττάρων του αίματος μέχρι το 1879, όταν ο Paul Ehrlich δημοσίευσε την τεχνική του για τη χρώση μεμβρανών αίματος και τη μέθοδό του για τη διαφορική καταμέτρηση κυττάρων αίματος (Hajdu et al 2003).

Στην παρούσα μελέτη θα μας απασχολήσει τόσο ο «κρυφός», αλλά παρόλα αυτά ενεργός, ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και η συνεχόμενη αλληλεπίδρασή τους με τα αιμοπετάλια σε δύο πολύ σημαντικές διαδικασίες του οργανισμού μας, την πήξη του αίματος. Η πήξη είναι μια διαδικασία με την οποία το αίμα μετατρέπεται από υγρό σε γέλη, δημιουργώντας ένα θρόμβο. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να οδηγήσει σε αιμόσταση, η οποία αποτελεί το τέλος της απώλειας αίματος από ένα τραυματισμένο αιμοφόρο αγγείο και ακολουθείται από την επιδιόρθωση. Ο μηχανισμός της πήξης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση, πρόσφυση και συσώρευση αιμοπεταλίων, καθώς και εναπόθεση και ωρίμανση της ινικής. Η αιμόσταση, λοιπόν, είναι μια διαδικασία για την πρόληψη και τη διακοπή της αιμορραγίας, που σημαίνει ότι διατηρεί το αίμα μέσα σε ένα κατεστραμμένο αιμοφόρο αγγείο (το αντίθετο της αιμόστασης είναι η αιμορραγία) και είναι το πρώτο στάδιο επούλωσης πληγών. Η διαδικασία, δηλαδή αυτή περιλαμβάνει την πήξη του αίματος. Όταν κάποιος έρθει σε επαφή με το αντικείμενο της αιμόστασης θα παρατηρήσει πως τον κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία αυτή κατέχει το αιμοπετάλιο. Χρειάστηκαν αρκετές έρευνες και εργαστηριακές μελέτες για να αποδειχθεί πως το

ερυθρό αιμοσφαίριο συμμετέχει ενεργά στην φυσιολογική διαδικασία της αιμόστασης, αλληλεπιδρώντας πάντα με τα αιμοπετάλια. Ομοίως, ένα ερυθρό αιμοσφαίριο συμμετέχει με τον δικό του μοναδικό τρόπο και στην φυσιολογική διαδικασία της θρόμβωσης, όπου βοηθά στον σχηματισμό ενός θρόμβου αίματος μέσα σε ένα αιμοφόρο αγγείο, εμποδίζοντας τη ροή του αίματος μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Και σε αυτήν την διαδικασία κυρίαρχο ρόλο έχουν τα αιμοπετάλια, όμως μέσω διαφόρων μελετών και *in vivo* εργαστηριακών δοκιμών, το ερυθροκύτταρο πλέον αποτελεί έναν σημαντικό συμπράγοντα στην θρομβογένεση.

Για αρκετά χρόνια τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν αποτελούσαν μέρος της έρευνας για την κατανόηση των μηχανισμών των δύο αυτών διαδικασιών. Πλέον είναι ευρέως γνωστό πως όχι μόνο συμμετέχουν στους απλούς μηχανισμούς της αιμόστασης και της θρόμβωσης, αλλά ταυτόχρονα αλληλεπιδρούν με αρκετά κύτταρα του αίματος, καθώς και αγγειακά κύτταρα, που συμμετέχουν στον αιμοστατικό και θρομβωτικό μηχανισμό. Όσο περνούν τα χρόνια και η τεχνολογία εξελίσσεται, ερχόμαστε σε επαφή με περισσότερες, και πιο έμπιστες πηγές, που μας βοηθούν να κατανοήσουμε την διαδρομή που ακολουθεί ένα ερυθροκύτταρο κατά την διάρκεια των δύο αυτών μηχανισμών. Ερευνώντας κανείς μπορεί εύκολα να παρατηρήσει τις διάφορες αλλαγές που υφίστανται τα ερυθρά αιμοσφαίρια που σχετίζονται τόσο με την φυσιολογική αιμόσταση και θρόμβωση, όσο και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την λειτουργία τους. Ταυτόχρονα, έχουν αναπτυχθεί εργαστηριακές μέθοδοι, οι οποίες με την βοήθεια του ενεργού ρόλου του ερυθροκυττάρου, μας βοηθούν να κατανοήσουμε την κατάσταση ενός ασθενή που αντιμετωπίζει σημαντικά προβλήματα υγείας σχετιζόμενα με την διαταραγμένη λειτουργία της αιμόστασης και της θρόμβωσης. Θα μπορούσε κανείς να πει πως το ερυθροκύτταρο πλέον αποτελεί μέσο διερεύνησης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών σχετιζόμενων με τους μηχανισμούς αυτούς, καθώς είναι γνωστό πως εδώ και δεκαετίες ασθενείς που παρουσιάζουν παθολογική λειτουργία ερυθρών, όπως συμβαίνει στην πολυκυτταραιμία, διατρέχουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο θρόμβωσης. Τέλος, δεδομένων των αναδυόμενων στοιχείων ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, ενισχύεται η υπόθεση ότι η σύζευξη αντιθρομβωτικών και ινωδολυτικών παραγόντων με τα ερυθρά αιμοσφαίρια όχι μόνο θα ενίσχυε την ενδοαγγειακή διάρκεια ζωής (δηλ. Φαρμακοκινητικό πλεονέκτημα), αλλά θα διευκόλυε

την τοπική παράδοση, δραστηριότητα και κατανομή εντός των θρόμβων που γεννιούνται (δηλ. φαρμακοδυναμικό πλεονέκτημα).

Κεφάλαιο 1^ο : Ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων

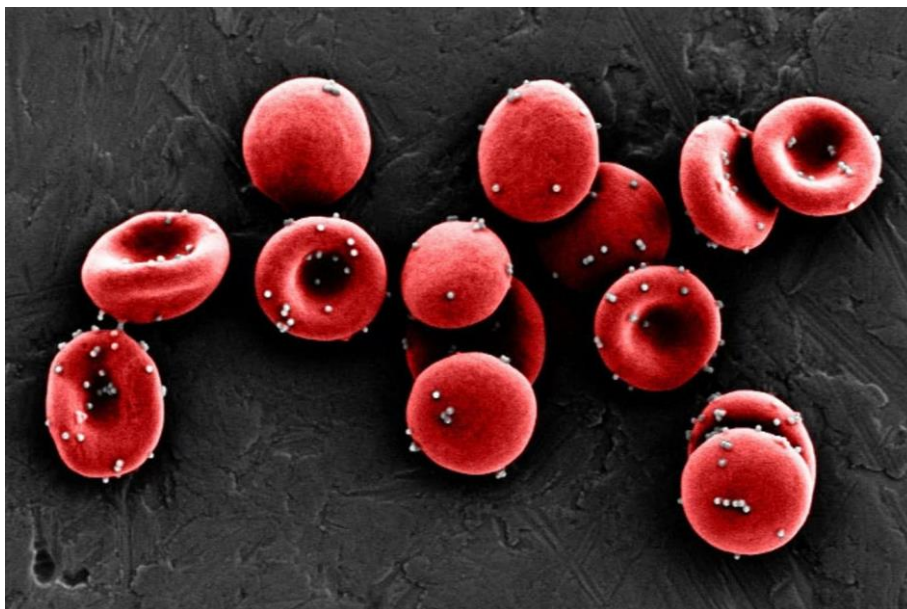
1.1 Ερυθροκύτταρο (RBC) και λειτουργία

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ή αλλιώς ερυθροκύτταρα, είναι δισκοειδείς δίσκοι που είναι κρίσιμοι για την αέρια ανταλλαγή. Το ερυθρό είναι κύτταρο με υψηλή εξειδίκευση, που έχει ως αποστολή την ιστική ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων, δηλαδή του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα. Η λειτουργία αυτή του ερυθρού επιτυγχάνεται μέσω της αιμοσφαιρίνης, η οποία αποτελεί την κυριότερη πρωτεΐνη του πρωτοπλάσματός του. Συγκεκριμένα η αιμοσφαιρίνη αποτελεί το 95% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ενώ το υπόλοιπο 5% περιλαμβάνει τα ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας (Ford J. 2012).

Το ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο έχει μοναδικές μηχανικές ιδιότητες που του επιτρέπουν να αντέχει στις πολύ υψηλές πιέσεις στις οποίες υπόκειται κατά τη διάρκεια διαδρομών εκατοντάδων χιλιομέτρων εντός των αγγείων. Το δισκοειδές αμφίκυκλο σχήμα του ερυθροκυττάρου εξυπηρετεί με τον καλύτερο τρόπο τη λειτουργία του: Η αναλογία επιφάνειας προς όγκου σε αυτό το σχήμα πλησιάζει τη μεγαλύτερη δυνατή τιμή, γεγονός που εξυπηρετεί τη μεταφορά αερίων. Επιπλέον ο αμφίκυκλος δίσκος παρουσιάζει μεγαλύτερη παραμορφωσιμότητα σε σχέση με τη σφαίρα και έτσι το ερυθρό αιμοσφαίριο μπορεί να ανταπεξέλθει στις αλλαγές του σχήματος του, που είναι απαραίτητες για την βέλτιστη μετακίνηση του εντός της μικροκυκλοφορίας (Skogerboe KJ et al, 1992). Όταν το ερυθρό αιμοσφαίριο

κινείται στα μικρά αγγεία η επιφάνεια του αμφίκιουλου δίσκου προσανατολίζεται προς την κατεύθυνση ροής. Η προπορευόμενη επιφάνεια γίνεται οξεία και η επιφάνεια που έπεται γίνεται αμβλεία. Έτσι το σχήμα του μοιάζει με αυτό του αλεξίπτωτου ή της τορπίλης. Η παραμόρφωση αυτή των ερυθροκυττάρων επιτρέπει την διέλευση τους από αγγεία με μέγιστη διάμετρο περίπου 4μm.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των ερυθροκυττάρων είναι η μακρά διάρκεια ζωής τους (120 μέρες), λαμβάνοντας υπόψη ότι πρόκειται για απυρρηνα κύτταρα με ένδεια οργανιδίων απαραίτητων για τη λειτουργία και επιβίωση των περισσότερων κυτταρικών τύπων. Έτσι το ερυθρό αιμοσφαίριο δεν έχει πυρήνα, δεν έχει μιτοχόνδρια και κατά συνέπεια δεν μπορεί να προβεί σε οξειδωτικό μεταβολισμό, δεν έχει ριβοσωμάτια για αναγέννηση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οι μεταβολικές του δραστηριότητες είναι περιορισμένες μη επαρκώντας για *de novo* σύνθεση λιπιδίων (Εικ.1). Η ικανότητα επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο εχθρικό περιβάλλον της μικροκυκλοφορίας οφείλεται στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης του, στις μεταβολικές οδούς για εξοικονόμηση ενέργειας και στην διατήρηση της αιμοσφαιρίνης σε διαλύτη μορφή (Laosombat V et al, 2010).



Εικόνα 1: Ερυθρό αιμοσφαίριο (Klinken et al, 2002)

Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι υπεύθυνη για πολλές από τις φυσιολογικές λειτουργίες και μηχανικές ιδιότητες του. Η διατήρηση του φυσιολογικού αμφίκιουλου δισκοειδούς σχήματος και της αναστρέψιμης παραμορφωσιμότητάς του καθορίζεται από την λιπιδιακή σύσταση της μεμβρανικής διπλοστιβάδας, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-λιπιδίων, την πρωτεϊνική σύσταση του μεμβρανικού σκελετού και τις αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών του, την ενυδάτωση, ιοντική σύσταση και ισορροπία του εσωτερικού περιβάλλοντος και την συγκέντρωση και διαλυτότητα της αιμοσφαιρίνης. Άλλες σημαντικές λειτουργίες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι η μεταφορά ουσιών, η αντιγονικότητα και η μεταβίβαση σήματος. Ελλείμματα στα συστατικά της δομής της μεμβράνης είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε διαταραχή της λειτουργικότητας του ερυθρού αιμοσφαιρίου με συνέπεια την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων (Gelderman MP et al, 2010). Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη περιλαμβάνει την λιπιδιακή διπλοστιβάδα, εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες και μεμβρανικό σκελετό. Είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και διφωσφολιπιδίων και αποτελείται κατά 52% από πρωτεΐνες, 40% λιπίδια και 8% υδατάνθρακες. Στην εσωτερική επιφάνεια της στιβάδας βρίσκεται πρωτεϊνικό δίκτυο, ο μεμβρανικός σκελετός, ενώ στην εξωτερική επιφάνεια της βρίσκονται οι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται μέσω γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλης. Η λιπιδιακή διπλοστιβάδα περιέχει κατά 95% μη εστεροποιημένη χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Τα υπόλοιπα λιπίδια είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκολιπίδια. Η χοληστερόλη επηρεάζει το μέγεθος της επιφάνειας του ερυθροκυττάρου και ευθύνεται για την παθητική διαπερατότητα της μεμβράνης σε κατιόντα. Φαίνεται ότι η χοληστερόλη της μεμβράνης βρίσκεται σε συνεχή ισορροπία με τη χοληστερόλη του πλάσματος (Bosman GJ. 2016). Αύξηση της αναλογίας χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων στην μεμβράνη μειώνει την ρευστότητά της.

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη περιέχει ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες που ενέχονται στην μεταγωγή σήματος και στη μεταφορά ουσιών. Οι ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις γλυκοφορίνες και την πρωτεΐνη ζώνη 3 ή ανιοντικό ανταλλαγέα. Η εξωτερική περιοχή των μεμβρανικών γλυκοφορινών είναι γλυκοζυλιωμένη και φέρει ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Στην κυκλοφορία, τα ερυθροκύτταρα απωθούνται μεταξύ τους, λόγω του ισχυρού αρνητικού φορτίου που προσδίδουν στην εξωτερική επιφάνεια τους οι καρβοξυλικές ομάδες του σιαλικού οξέος που βρίσκεται προσδεμένο στις γλυκοφορίνες. Η γλυκοφορίνη C και η ζώνη 3 είναι σημαντικές για την πρόσδεση του μεμβρανικού σκελετού στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (B. Bull et al, 1995).

Λειτουργία

Τα ερυθροκύτταρα, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, έχουν ως κύρια λειτουργία τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και την παραλαβή από εκεί διοξειδίου του άνθρακα για μεταφορά στους πνεύμονες. Υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος αυτής της ανταλλαγής αερίων είναι μία πρωτεΐνη, η αιμοσφαιρίνη. Το κύριο μόριο αιμοσφαιρίνης του ενήλικου (HbA) έχει MW 68.000 και αποτελείται από δύο άλφα και δύο βήτα πολυπεπτιδικές αλυσίδες ($\alpha_2\beta_2$), καθεμία με τη δική της ομάδα αίμης. Στον ενήλικο άνθρωπο, υπάρχουν επίσης μικρές ποσότητες HbF ($\alpha_2\gamma_2$) και HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αρχικά σχηματίζονται οι πρωτοεμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες Gower 1 (ζ_2, ϵ_2), Portland (ζ_2, γ_2) και Gower 2 (α_2, ϵ_2)· κατόπιν, επικρατεί η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF. Υπάρχουν 2 είδη αλυσίδας (Aγ, Gγ), τα οποία διακρίνονται με βάση το αμινοξύ που βρίσκεται στη θέση 136 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (αλανίνη ή γλυκίνη αντιστοίχως) (P. Quesenberry 1986) (Εικ. 2).

Η σύνθεση της αίμης πραγματοποιείται κυρίως στα μιτοχόνδρια με μία σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που αρχίζουν από τα υποστρώματα γλυκίνη και ηλεκτρουλοσυνένζυμο A. Οι σφαιρινικές αλυσίδες συναθροίζονται στα πολυριβοσωμάτια. Τα δύο τρίτα του συνόλου της αιμοσφαιρίνης του ερυθροκυττάρου συντίθεται στα στάδια των ερυθροβλαστών, ενώ το υπόλοιπο στο στάδιο του ερυθροκυττάρου.

Καθώς το μόριο της αιμοσφαιρίνης προσλαμβάνει και απελευθερώνει οξυγόνο, οι επιμέρους αλυσίδες σφαιρίνης μετακινούνται η μία πάνω στην άλλη. Όταν απελευθερώνεται οξυγόνο, οι β αλυσίδες απομακρύνονται η μία από την άλλη. Στο θύλακα που δημιουργείται μπορεί να εισέλθει ένας μεταβολίτης της γλυκολυτικής οδού, το 2-3 διφωσφογλυκερινικό οξύ. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια να ελαττώνεται η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο και να βελτιώνεται η απόδοση του οξυγόνου στους ιστούς. Επιπλέον, ευθύνεται για τη σιγμοειδή μορφή της καμπύλης διάστασης του οξυγόνου (M.J. Koury et al, 1987).

Για να είναι επιτυχής η ανταλλαγή των αερίων, το εύκαμπτο, αμφίκυκλο ερυθροκύτταρο διαμέτρου 8 μm πρέπει να περάσει από την μικροκυκλοφορία όπου η διάμετρος των τριχοειδών είναι μόλις 3.5 μm, να διατηρήσει την αιμοσφαιρίνη σε ανηγμένη κατάσταση και να διατηρήσει ωσμωτική ισορροπία παρά το γεγονός ότι η μεμβράνη του εμφανίζει εγγενή τάση διαρροής και η ωσμωτική πίεσή του είναι περίπου πενταπλάσια εκείνης του πλάσματος. Καθώς δεν διαθέτει μιτοχόνδρια, επομένως ούτε και τα ένζυμα που απαιτούνται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση ώστε να προσποριστεί την ενέργεια ATP που απαιτείται για την διατήρηση του όγκου, του σχήματος και της ευκαμπτότητάς του, το ώριμο ερυθροκύτταρο εξαρτάται από την γλυκολυτική οδό. Μπορεί επίσης να παράγει αναγωγική ισχύ είτε από την γλυκολυτική οδό με τη μορφή ανηγμένου νικοτιναμιδο-αδενινο νουκλεοτιδίου, είτε από το παρακύκλωμα των φωσφορικών πεντοζών ως ανηγμένο νικοτιναμιδο-αδενινο φωσφοδινουκλεοτίδιο (R.G. Kendall 2001). Στη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη τα ιόντα σιδήρου βρίσκονται σε δισθενή κατάσταση. Οι αναγωγάσες της αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιούν NADH ή NADPH ώστε να αναγάγουν τη μεθαιμοσφαιρίνη (η οποία περιέχει άτομα τρισθενούς σιδήρου), η οποία φυσιολογικά βρίσκεται σε ποσοστό <1% κατά τη διάρκεια της ζωής του ερυθροκυττάρου. Η ανεπάρκεια της NADH-αναγωγάσης της μεθαιμοσφαιρίνης οδηγεί σε κυάνωση, με ποσοστό μεθαιμοσφαιρίνης έως 30% και επακόλουθη αποξυγόνωση της αιμοσφαιρίνης.

Το παρακύκλωμα Rapaport-Luebering ρυθμίζει τη συγκέντρωση του 2,3-DPG, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την απελευθέρωση οξυγόνου από το τετραμερές μόριο της αιμοσφαιρίνης. Επειδή το ώριμο ερυθροκύτταρο αδυνατεί να αντικαταστήσει τα ένζυμα του, με το πέρασμα του χρόνου παρατηρείται σταδιακή

επιδείνωση του μεταβολισμού και ελάττωση της βιωσιμότητάς του. Μετά από μέση παραμονή στην κυκλοφορία περίπου 120 ημερών και αφού, όπως υπολογίζεται, έχουν διανύσει ένα “αγγειακό ταξίδι” περίπου 300 μιλίων, τα ηλικιωμένα ερυθροκύτταρα καταστρέφονται εξωαγγειακά από μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (Klinken et al, 2002).



Εικόνα 2: Η δομή της αιμοσφαιρίνης (Baskurt et al, 2003)

1.2 Αιμοπετάλιο (PLT) και λειτουργία

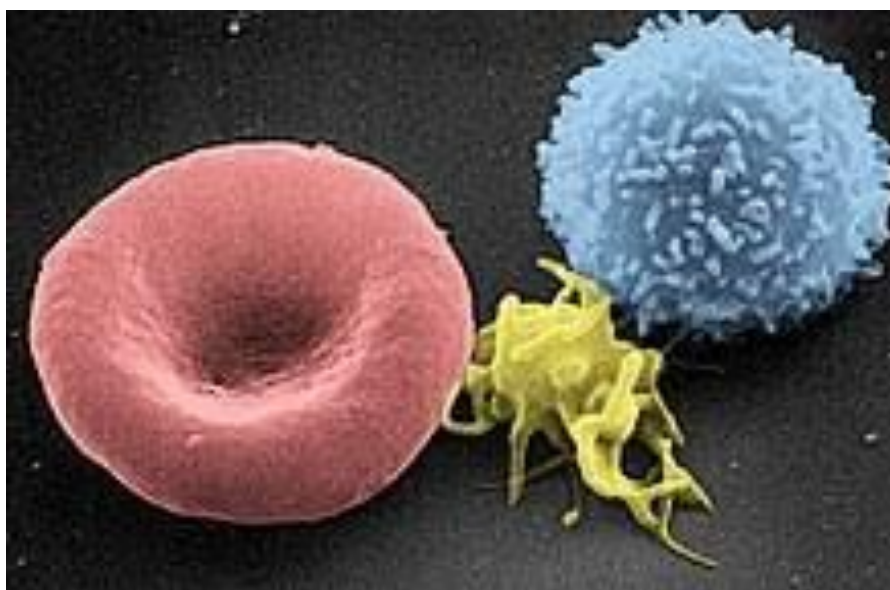
Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα και ο κύριος ρόλος τους είναι να εξασφαλίζουν την αιμόσταση, δηλαδή την ακεραιότητα των αγγείων του αίματος και την ταχεία διακοπή της αιμορραγίας σε περίπτωση τραυματισμού των αγγείων. Τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα που οφείλεται στον εσωτερικό σκελετό τους, ο οποίος αποτελείται από πολυμερή τουμπουλίνης, σπεκτρίνης και ακτίνης, καθώς και από τις συνοδές τους πρωτεΐνες (Εικ.3). Τα πολυμερή τουμπουλίνης είναι ετεροδιμερή από τις α και β ισομορφές τουμπουλίνης, τα οποία συναθροίζονται σε μεγάλα πολυμερή που καλούνται μικροσωληνίσκοι.

Κάθε μικροσωληνίσκος είναι μία κυκλική κατασκευή που έχει διάμετρο 25 nm και είναι τοποθετημένος στην περιφέρεια του ώριμου αιμοπεταλίου (Fox JE. 1993). Όπως αποδείχθηκε από πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια που δεν είχαν τη δυνατότητα να συνθέτουν επαρκείς ποσότητες τουμπουλίνης, οι μικροσωληνίσκοι είναι αποκλειστικά υπεύθυνοι για το δισκοειδές σχήμα των αιμοπεταλίων. Η εσωτερική επιφάνεια του δικτύου των μικροσωληνίσκων υποστηρίζεται από ένα πυκνό πλέγμα σπεκτρίνης. Τα μόρια της σπεκτρίνης είναι διπολικά τετραμερή, μήκους 200 nm το καθένα, που διαπλέκονται με γέφυρες ακτίνης, ώστε να σχηματίσουν ένα δίκτυο (Gachet C. 2001). Οι γέφυρες ακτίνης, με την σειρά τους, αποτελούνται από ινίδια ακτίνης που πηγάζουν από το κυτταρόπλασμα και σχηματίζουν γέφυρες με τα ακανθώδη άκρα τους. Πολλά από αυτά τα άκρα είναι συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη αδουσίνη, η οποία τα οδηγεί προς την κατεύθυνση της σπεκτρίνης. Το άλλο άκρο των ινιδίων της ακτίνης, προς το εσωτερικό του κυτταροπλάσματος, ενώνεται μέσω μορίων της φιλαμίνης Α, με την α-άλυσο του υποδοχέα του παράγοντα von Willebrand. Η δομή του σκελετού των ώριμων αιμοπεταλίων καθορίζεται στο επίπεδο των «προαιμοπεταλίων» των μεγακαρυοκυττάρων (Monroe DM et al, 2002).

Μέσα στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων έχουν ταυτοποιηθεί δύο είδη κοκκίων: τα «άλφα» και τα «πυκνά» ενώ ανιχνευτεί και μεγάλος αριθμός λυσοσωμάτων. Τα α-κοκκία περιέχουν ποικίλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων πήξης, μορίων προσκόλλησης καθώς και αυξητικών παραγόντων. Τα α-κοκκία σχηματικά αποτελούνται από: [1] μία έκκεντρη, διαυγή ζώνη που περιέχει διαφόρους μικροσωληνίσκους που σχετίζονται με τον παράγοντα von Willebrand, ενώ εκεί ανευρίσκονται και η πρωτεΐνη μουλτιμερίνη και ο παράγοντας V. [2] ένα πυκνό «πυρηνοειδές» που περιέχει τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF-4) και τη β-θρομβοσφαιρίνη, και [3] μία ενδιάμεση ζώνη, όπου υπάρχουν περισσότερες διαλυτές πρωτεΐνες των α-κοκκίων (Clemetson KJ. 1995). Η μεμβράνη των α-κοκκίων χρησιμεύει ως αποθήκη για την Ρ-σελεκτίνη (μία πρωτεΐνη της έσω στιβάδας που μετατοπίζεται στο εξωτερικό του κυττάρου μετά την ενεργοποίησή του και τη συμμετοχή του στην διαδικασία πήξης. Τα πυκνά κοκκία ονομάζονται έτσι, επειδή κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζουν μία αυξημένη πυκνότητα ηλεκτρονίων, όταν

μικροσκοπούνται ολικά παρασκευάσματα. Τα κοκκία είναι ιδιαίτερα οσμόφιλα και περιέχουν σεροτονίνη, ATP και ADP, καθώς και ασβέστιο και πυροφωσφορικό οξύ. Το ADP των πυκνών κοκκίων εξωκυτταρώνεται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και συμβάλλει στην ενεργοποίηση περισσότερων αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων P2. Κάτι αντίστοιχο έχει προταθεί και για το ATP, παρόλο που τα πειραματικά δεδομένα δεν έχουν ακόμη επιτρέψει την διασαφήνιση του ρόλου του ATP των αιμοπεταλίων (Holme PA et al, 1997). Η σεροτονίνη δεν συντίθεται από τα αιμοπετάλια, αλλά προσλαμβάνεται από το πλάσμα και αποθηκεύεται στα πυκνά κοκκία. Απελευθερώνεται ξανά μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και δρα στους 5HT₂ υποδοχείς, ως αγωνιστής ενεργοποίησης. Ο ρόλος του πυροφωσφορικού οξέος μέχρι και σήμερα δεν είναι γνωστός, ενώ τέλος ο ρόλος των λυσοσωμικών κοκκίων φαίνεται να συνιστάται στην έναρξη της διαδικασίας εξωκύττωσης του περιεχομένου των λοιπών κοκκίων (Leiderman, K. Et al, 2010).

Μετά την έναρξη της διαδικασίας της πήξης, τα αιμοπεταλιακά κοκκία απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο πλάσμα του αίματος, μέσω καναλιών που ανοίγονται από το κυτταρόπλασμα προς την επιφάνεια του αιμοπεταλίου. Με αυτόν τον τρόπο αλλάζει το μικροπεριβάλλον των αιμοπεταλίων προς όφελος της πήξης, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας σταθερός θρόμβος.



Εικόνα 3: Το αιμοπετάλιο (Jurk et al, 2005)

Λειτουργία

Η βασική φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η ταχεία διακοπή της αιμορραγίας σε περίπτωση τραυματισμού των αγγείων, κάτι που επιτυγχάνεται με την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμού και το σχηματισμό θρόμβου. Κεντρικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει το ADP το οποίο προωθεί την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Οι υποδοχείς του ADP στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων ανήκουν στην οικογένεια των P2 υποδοχέων που αποτελείται από δύο τάξεις: τον P2X συζευγμένο με διαύλους κατιόντων και τους P2Y συζευγμένους με πρωτεΐνη G. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί στα θηλαστικά επτά P2X υποδοχείς και οκτώ P2Y (Eckstein et al, 1991). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρεις υποδοχείς: ο P2X₁ διαύλων κατιόντων, που ενεργοποιείται από το ATP, και δύο υποδοχείς πρωτεΐνης G, ο P2Y₁ και ο P2Y₁₂, που και οι δύο ενεργοποιούνται από το ADP. Πάντως, εκτός από τους υποδοχείς της οικογένειας P2, τα αιμοπετάλια φέρουν στην μεμβράνη τους και πλήθος άλλων υποδοχέων, το σύνολο των οποίων συμμετέχει στην ενεργοποίηση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων με τελικό σκοπό την δημιουργία θρόμβου.

Οι βασικές αρχές ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων έχουν ως εξής: Στα αγγεία η ενδοθηλιακή στιβάδα λειτουργεί αντιθρομβωτικά, αφενός με το να διαχωρίζει το αίμα από το υπενδοθηλιακό δίκτυο πρωτεϊνών αφετέρου με το να συνθέτει και να εκκρίνει προστακυκλίνη και νιτρικό οξύ (Crowl et al, 2010). Αυτά τα δύο αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την ικανότητά τους να αυξάνουν το cAMP και το cGMP αντίστοιχα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν επίσης στην αυλική τους επιφάνεια το CD39, το οποίο είναι ένα ένζυμο που μετατρέπει το ATP σε ADP και τελικά σε AMP, με αποτέλεσμα να εξαφανίζει το ATP/ADP από το τοίχωμα των αγγείων και να αποτρέπει την αντίδραση με τα αιμοπετάλια. Αντίθετα, σε καταστροφή του τοιχώματος των αγγείων, τα αιμοπετάλια καταρχήν ωθούνται προς το τοίχωμα των αγγείων από τα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια. Εκεί ανιχνεύουν την εκτεθειμένη υπενδοθηλιακή στιβάδα με τις περιεχόμενες θρομβογενικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ξεκινά η ανάδραση της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb των αιμοπεταλίων, μιας υπομονάδας πλούσιας σε λευκίνη του συμπλέγματος του GPIIb-V-IX, με τον παράγοντα του von Willebrand, μιας μεγάλης πολυμερούς πρωτεΐνης που

βρίσκεται στις υπενδοθηλιακές ίνες κολλαγόνου. Αυτή η πρώτη ανάδραση είναι αναστρέψιμη και επιτρέπει στα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια να επιβραδυνθούν και να ωθηθούν περαιτέρω προς το τοίχωμα του τραυματισμένου αγγείου. Στη συνέχεια γίνεται η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων μέσω της σύνδεσης του κολλαγόνου στους πολυάριθμους υποδοχείς του στα αιμοπετάλι, συμπεριλαμβανομένης της $\alpha_2\beta_1$ ιντεγκρίνης και του υποδοχέα GPVI, καθώς επίσης και με την πρόσδεση του vWF στην $\text{a11b}\beta_3$ ιντεγκρίνη (Skorzewski et al, 2013). Συγχρόνως, επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση και η διέγερση περισσότερων αιμοπεταλίων μέσω πολλαπλών αγωνιστών, όπως το κολλαγόνο που δημιουργείται από ιστικούς παράγοντες από το τραυματισμένο αγγείο, και η θρομβοξάνη A2. Τέλος, παράλληλα με τα παραπάνω, απελευθερώνονται και μεγάλα ποσά ADP και ATP, τα οποία είναι αποθηκευμένα στα κοκκία των αιμοπεταλίων μαζί με σεροτονίνη και ασβέστιο, και όλα μαζί δρουν στους P2 υποδοχείς. Οι P2 υποδοχείς είναι αυτοί που τελικά δρουν καταλυτικά στην ενίσχυση του σήματος ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και επιτρέπουν την ταχεία συσσωμάτωσή τους στην περιοχή της βλάβης (Jurk et al, 2005).

Κεφάλαιο 2^ο : Αιμόσταση: Επίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και χαρακτηριστικά

2.1 Μηχανισμός της αιμόστασης

2.1.1 Παθοφυσιολογία (ο λόγος και ο μηχανισμός)

Η διατήρηση της ρευστότητας του αίματος στο αγγειακό σύστημα είναι μια σημαντική φυσιολογική ανθρώπινη διαδικασία. Ο όρος «αιμόσταση» αναφέρεται στη φυσιολογική απόκριση των αιμοφόρων αγγείων σε τραυματισμό σχηματίζοντας θρόμβο για να περιορίσει την αιμορραγία. Η θρόμβωση είναι ο παθολογικός σχηματισμός θρόμβου αίματος που συμβαίνει όταν η αιμόσταση υπερδραστηριοποιείται χωρίς αιμορραγία («αιμόσταση σε λάθος μέρος»). (Coleman RW et al, 2001). Τα βασικά συστατικά της ρευστότητας, της αιμόστασης και της θρόμβωσης είναι η ροή αίματος που παράγεται από τον καρδιακό κύκλο, το αγγειακό ενδοθήλιο και το ίδιο το αίμα. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει καλή ισορροπία μεταξύ της υπερπηκτικής κατάστασης στο κυκλοφορούν αίμα και της παθολογικής κατάστασης της πήξης (πήξη) (Rasche et al, 2001) .

Η ακεραιότητα του αγγειακού τοιχώματος είναι προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων και για τη διατήρηση μιας μη θρομβωτικής κατάστασης. Όταν διαταράσσεται η συνέχεια του αγγειακού ενδοθηλίου, τα αιμοπετάλια και το ινώδες σφραγίζουν τη βλάβη και το ινωδολυτικό σύστημα διαλύει τον θρόμβο αίματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που σχηματίζουν μια μονοστιβάδα που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, συνθέτουν και απελευθερώνουν ενεργοποιητές και αναστολείς της συσώρευσης αιμοπεταλίων, της πήξης του αίματος και της ινωδολύσης και έτσι παίζουν ενεργό ρόλο στη ρύθμιση αυτών των συστημάτων παρέχοντας τόσο προπηκτικές όσο και αντιπηκτικές ουσίες. Ο τραυματισμός του τοιχώματος των αγγείων εκθέτει την

υποενδοθηλιακή μήτρα και τις ίνες κολλαγόνου στο αίμα που ρέει. Τα αιμοπετάλια που κυκλοφορούν προσκολλώνται σε αυτές τις δομές και προκαλούν διακοπή της ροής του αίματος. Τόσο το υποενδοθηλιακό όσο και το κυκλοφορούν vWF παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσφυση των αιμοπεταλίων στα σημεία τραυματισμού, ιδιαίτερα στην αρτηριακή κυκλοφορία, όπου οι διατμητικές δυνάμεις ενεργοποιούν διαμορφωτικά το vWF. Τα προσκολλημένα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσλαμβάνουν επιπλέον αιμοπετάλια από το ρέον αίμα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται μέσω δευτερευόντων βρόγχων ενίσχυσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συσσωματώματος αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δικτύου ινώδους που παρέχει μια μήτρα για τη μετανάστευση των κυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι την επούλωση των πληγών (Rajendran et al, 2003).

Το αγγειακό ενδοθήλιο είναι μια μονοστιβάδα κυττάρων που καλύπτει ολόκληρο το καρδιαγγειακό σύστημα, στρατηγικά τοποθετημένη στη διεπαφή μεταξύ αίματος και ιστού. Παρέχει ένα προστατευτικό φράγμα που χωρίζει το αίμα από τα πολύ ενεργά στοιχεία στο βαθύ στρώμα του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων (Wu KK et al, 1996). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτίθενται σε μια ποικιλία βιοχημικών και βιομηχανικών ερεθισμάτων. Η διαπίστωση ότι συγκεκριμένες ρευστές μηχανικές δυνάμεις, συμπεριλαμβανομένης της διατμητικής τάσης, επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του ενδοθηλίου, παρείχε ένα πλαίσιο για μια μηχανιστική κατανόηση των διεργασιών που εξαρτώνται από τη ροή στην αιμόσταση και τη θρόμβωση (Tropper JN et al, 1999). Τα ανενεργά αιμοπετάλια συνήθως κυκλοφορούν σε στενή επαφή με το ενδοθήλιο. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια δεν προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή μεταξύ τους, ούτε συνδέονται με πρωτεΐνες πρόσφυσης που υπάρχουν στο περιβάλλον πλάσμα. Όταν εμφανίζονται προσωρινές δυσλειτουργίες του αγγειακού τοιχώματος που σχετίζονται με την αποβολή ενδοθηλιακών κυττάρων, η "πιθανή" ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του αγγειακού συστήματος. Οι επιδράσεις των προστατευτικών ενδοθηλιακών παραγόντων, των αναστολέων του συστήματος πήξης και της αραίωσης του ρέοντος αίματος

μπορούν να αποτρέψουν την υπερβολική ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού (Rasche et al, 2001).

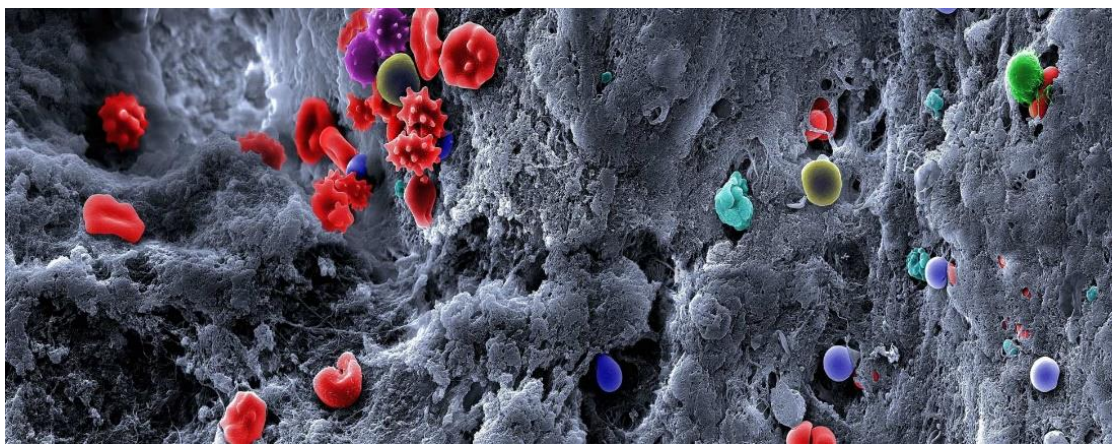
Φυσιολογία αιμόστασης

Η αιμόσταση (από τα ελληνικά: *aima*, στάση αίματος, διακοπή) ορίζεται ως η διακοπή της αιμορραγίας και απαιτεί την ταχεία αλληλεπίδραση μιας σειράς στενά ρυθμιζόμενων διαδικασιών. Αυτά καταλήγουν στην παραγωγή ενός εντοπισμένου θρόμβου στο σημείο του τραυματισμού του αγγείου, συνήθως μέσα σε δευτερόλεπτα έως λεπτά. Η διαταραχή του αγγειακού ενδοθηλίου ενεργοποιεί αυτήν την αλληλεπίδραση φυσιολογικών διεργασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν σχηματισμό ενός αρχικού βύσματος αιμοπεταλίων (πρωτοπαθής αιμόσταση), ενεργοποίηση της πήξης για σχηματισμό πλέγματος ινώδους (δευτερογενής αιμόσταση), ινωδόλυση και επιδιόρθωση αγγείων (Palta S et al. 2014).

Είναι μια περίπλοκη διαδικασία που απαιτεί την αλληλεπίδραση πολλαπλών φυσιολογικών οδών. Οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σφραγίσουν τα κατεστραμμένα αιμοφόρα αγγεία με εντοπισμένο σχηματισμό θρόμβων αποτρέποντας σημαντική αιμορραγία. Μόλις αποκατασταθεί η ακεραιότητα των αγγείων, εμφανίζεται διάσπαση θρόμβων και αποκαθίσταται η φυσιολογική αιμόσταση (Εικ. 4). Θρομβοαιμορραγική ανισορροπία μπορεί να εμφανιστεί στην περιεγχειρητική περίοδο ή κατά τη διάρκεια κρίσιμης ασθένειας, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης, αιμορραγίας ή σε ορισμένες περιπτώσεις και των δύο. Επομένως, η κατανόηση των φυσιολογικών διεργασιών είναι σημαντική, καθώς: 1) μας επιτρέπει να εντοπίσουμε στόχους για τη θεραπευτική ρύθμιση της αιμορραγίας και της θρόμβωσης, 2) πολλά φάρμακα που συναντώνται συχνά μεταβάλλουν τις φυσιολογικές αιμοστατικές οδούς και είναι σημαντικό να αναγνωριστούν οι επιδράσεις τους και 3) επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση των δυναμικών εξετάσεων αιμόστασης και πήξης (Sira et al, 2016).

Η αιμοστατική οδός είναι μια αυστηρά ρυθμισμένη διαδικασία που μπορεί να διασφαλίσει ότι η ροή του αίματος διατηρείται υπό φυσιολογικές φυσιολογικές συνθήκες και επίσης βοηθά στην πρόληψη μαζικής απώλειας αίματος μετά από

αγγειακό τραυματισμό. Η φυσιολογική απόκριση αιμόστασης εξαρτάται από τη στενά συνδεδεμένη αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων (ενδοθηλιακών κυττάρων) στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων και των παραγόντων πήξης. Αν και ένας αποτελεσματικός και γρήγορος μηχανισμός αιμόστασης είναι απαραίτητος για την επιβίωση, είναι εξίσου σημαντικό να ελέγχεται αυστηρά αυτός ο μηχανισμός για να αποφευχθεί η ανώμαλη θρόμβωση. Επομένως, η φυσιολογική αιμόσταση βασίζεται στη λεπτή ισορροπία των διαδικασιών προ-θρόμβωσης και αντιπηκτικής (Zaidi et al, 2019).



Εικόνα 4: Φυσιολογική αιμόσταση (Sira et al, 2016)

Κατανοώντας τον μηχανισμό της φυσιολογικής αιμόστασης

Οι θρόμβοι αίματος που σχηματίζονται από αιμορραγία από τραυματισμένα αιμοφόρα αγγεία προκαλούνται από μια σειρά σύνθετων κυτταρικών και βιοχημικών συμβάντων. Εάν δεν προσαρμοστεί, θα αυξήσει τον κίνδυνο θρόμβωσης ή αιμορραγίας. Ομοίως, η αιμοστατική ρύθμιση της ανάπτυξης και του μεγέθους του θρόμβου ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από μια σειρά αντιπηκτικών "σημείων ελέγχου" που ασκούν την ανασταλτική τους δράση σε διάφορα στάδια θρόμβωσης. Παρόλο που τα βασικά συστατικά των πρωτεϊνών του πλάσματος που απαιτούνται για την αιμόσταση είναι τώρα βασικά διευκρινισμένα και τα μοριακά γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβων αίματος είναι επίσης καλά κατανοητά, μια πληρέστερη εκτίμηση της σημασίας, της θέσης και της ρύθμισης

κάθε διαδικασίας αιμόστασης παραμένει συνεχής έρευνα σε έναν τομέα (O'Donnell et al, 2019).

Η διαδικασία της αιμόστασης χωρίζεται παραδοσιακά σε δύο μέρη: η πρωτογενής αιμόσταση αποτελείται κυρίως από αιμοπετάλια και η δευτερογενής αιμόσταση σχετίζεται κυρίως με το σχηματισμό ινώδους ή την πήξη του αίματος μέσω εξωτερικών ή εσωτερικών οδών (MacFarlane 1964). Αν και αυτό το μοντέλο είναι ακόμα πολύτιμο για την εργαστηριακή διάγνωση μη φυσιολογικής αιμόστασης, βασίστηκε πρόσφατα στην (1) ανακάλυψη του TFPI (Raparport 1989), (2) παράγοντα ενεργοποίησης θρομβίνης XI (Naito and Fujikawa 1991), (3) η ανακάλυψη μιας ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτογενών και δευτερογενών αιμοστατικών διεργασιών και (4) η αντίληψη ότι οι ιστοί μπορούν να μεταφερθούν μέσω του αίματος (Giesen et al, 1999).

Το αρχικό μοντέλο για την πήξη, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1960, προτείνει ότι η πήξη θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί από μία από τις δύο κύριες ανεξάρτητες οδούς που ονομάζονται αντίστοιχα «εξωτερικό» και «εσωτερικό» μονοπάτι (Davie & Ratnoff, 1964). Η έναρξη της εξωτερικής οδού απαιτούσε έκθεση πλάσματος σε παράγοντα ιστού (TF, επίσης γνωστή ως θρομβοπλαστίνη, παράγοντας πήξης III ή CD142), ο οποίος είναι συνήθως εξωτερικός στο αίμα σε εξωαγγειακούς ιστούς (Wilcox et al, 1989). Από την άλλη μεριά, η ενδογενής οδός ενεργοποίησης της πήξης βασίζεται μόνο σε παράγοντες οι οποίοι φυσιολογικά υπάρχουν στο αίμα και ενεργοποιείται όταν το πλάσμα έρθει σε επαφή με μια ποικιλία τεχνητών επιφανειών (συμπεριλαμβανομένων της καολίνης, του μικροποιημένου πυριτίου ή του ελαγικού οξέος) *in vitro*. Σύμφωνα με το μοντέλο καταρράκτη, μόλις ενεργοποιηθεί η πήξη από οποιαδήποτε από αυτές τις ανεξάρτητες οδούς, μεμονωμένοι παράγοντες πήξης ενεργοποιούνται διαδοχικά σε έναν καταρράκτη ενίσχυσης ή «καταρράκτη» (Macfarlane 1964). Ουσιαστικά, τα κυκλοφορούντα ανενεργά προένζυμα ή ζυμογόνα (τα οποία αποτελούν παράγοντες πήξης) ενεργοποιούνται ειδικά μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης από έναν ενεργοποιημένο παράγοντα πήξης, την πρωτεάση σερίνης. Αυτή η ενεργοποίηση στη συνέχεια προχωράει σταδιακά προς τα κάτω στον καταρράκτη, οδηγώντας τελικά σε παραγωγή θρομβίνης και σχηματισμό διασταυρωμένου ινώδους.

Η ενεργοποίηση της πήξης είναι πιο αποτελεσματική στην κυτταρική επιφάνεια παρά στο διάλυμα. Μόλις ενεργοποιηθεί ο πλήρης καταρράκτης υποβοήθησης πήξης, θα παραμείνει στο σημείο τραυματισμού για να αποφευχθούν διάχυτες θρομβωτικές επιπλοκές, κάτι που είναι προφανώς ζωτικής σημασίας. Αυτές οι δύο παρατηρήσεις υποστηρίζουν το λεγόμενο μοντέλο αιμόστασης με βάση τα κύτταρα (Monroe & Hoffman, 2006). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, διαφορετικά κύτταρα παίζουν έναν συγκεκριμένο ρόλο στο σχηματισμό αιμόστασης στο σώμα, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρία διαφορετικά αλλά αλληλεπικαλυπτόμενα στάδια, που ονομάζονται στάδια έναρξης, επέκτασης και πολλαπλασιασμού (Monroe et al, 1994).

2.1.2 Συμμετοχή ερυθρών αιμοσφαιρίων

Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει ευαίσθητη εργαστηριακή δοκιμή για τον προσδιορισμό των πιθανών επιπτώσεων των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιμόσταση. Για τον προσδιορισμό της σχετικής συμβολής των διαφόρων συστατικών της αιμόστασης, μετρούνται συμβατικές δοκιμασίες πήξης όπως ο χρόνος αιμορραγίας, ο χρόνος προθρομβίνης (PT), ο aPTT, η συγκέντρωση του ινωδογόνου και ο αριθμός των αιμοπεταλίων. Ο περιορισμός αυτών των τόσο κλασικών δοκιμών είναι ότι παρέχονται πληροφορίες μόνο για τα επίπεδα του παράγοντα πήξης του πλάσματος, αλλά όχι για τον πιθανό φυσιολογικό ρόλο άλλων κυτταρικών στοιχείων όπως τα είναι ερυθρά αιμοσφαίρια. Βέβαια το αν η μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων με διαφορές στο χρόνο αποθήκευσης έχει παρόμοια αποτελέσματα στην αιμόσταση είναι ακόμη ασαφές. Είναι γνωστό ότι οι διαδικασίες αποθήκευσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς και της αποθήκευσής τους σε τράπεζες αίματος, έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα και στα χαρακτηριστικά ροής των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων (Roeloffzen et al, 2010).

Μία πρώιμη θεωρία αναφέρει πως σε ασθενείς με αναιμία ο χρόνος αιμορραγίας παρατάθηκε ανεξάρτητα από τον αριθμό των αιμοπεταλίων (Duke WW 1910).

Μετά από αρκετές έρευνες βρέθηκε μια γενικότερη συσχέτιση μεταξύ χαμηλού αιματοκρίτη και παρατεταμένων χρόνων αιμορραγίας, συμπεριλαμβανομένης της διόρθωσης των αιμοστατικών παραμέτρων με μετάγγιση αίματος (Hellem AJ et al, 1961). Έχει διαπιστωθεί πως πολλές διαταραχές αιμορραγίας μπορούν να αντιμετωπιστούν με αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων παρά τα χαμηλά ή κανονικά επίπεδα αιμοπεταλίων (Kroll MH et al, 2015). Οι πιο γνωστές επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην πήξη *in vivo* είναι ρεολογικές, οι οποίες περιλαμβάνουν στρωτή διάτμηση με περιθώριο αιμοπεταλίων συσσωμάτωση και παραμόρφωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επιπλέον, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αλληλεπιδρούν άμεσα και έμμεσα με ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια, τα οποία μπορεί να εμπλέκονται σε θρόμβωση. Τόσο η ακαμψία των ερυθροκυττάρων όσο και ο βαθμός στον οποίο σχηματίζουν μια προπηκτική επιφάνεια για να παράγουν θρομβίνη μέσω της έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και στην αιμόσταση (Rasche et al, 2001).

Μπορεί η αιμοστατική επίδραση των αιμοπεταλίων είναι γνωστή από τότε που αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Duke το 1910, ο πιθανός ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όμως, στην αιμόσταση αναγνωρίστηκε πολύ αργότερα. Έκτοτε, οι μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιούνται για τη διακοπή της ουραιμικής αιμορραγίας, όχι όμως τόσο συχνά για την πρόληψη ή διακοπή της αιμορραγίας σε ασθενείς με θρομβοπενία ή αναιμία. Πλέον είναι γνωστό πως τα ερυθρά παρέχουν μια επιτυχημένη εναλλακτική λύση έναντι της χρήσης αιμοπεταλίων, καθώς και μια άλλη γνώμη έχει τεκμηριώσει τη χρήση της μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων για τον έλεγχο της αιμορραγίας (Ho et al, 1998).

Πιο συγκεκριμένα τα MP's που προέρχονται από ερυθροκύτταρα που μεταγγίζονται με αποθηκευμένα ερυθρά ή σχηματίζονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με αιμόλυση έχουν ισχυρή προπηκτική ικανότητα μαζί με προθρομβωτικές επιδράσεις της εξωκυττάριας αιμοσφαιρίνης και του αίματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αλληλεπιδρούν άμεσα με το ινώδες (ινωδογόνο) και επηρεάζουν τη δομή, τις μηχανικές ιδιότητες και τη λυτική αντίσταση των θρόμβων (Reiner AP et al, 2001). Τα αποτελέσματα στη συστολή θρόμβων καταδεικνύουν τον τρόπο με τον οποίο οι συσσωματωμένοι θρόμβοι

σχηματίζουν ένα αδιαπέραστο φράγμα από συσσωματωμένα πολυεδρικά ερυθρά αιμοσφαίρια (πολυεδρικά κύτταρα) σημαντικά για την αιμόσταση και την επούλωση πληγών και για την αποκατάσταση της ροής μετά από αποφρακτικούς θρόμβους. Συνεπώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να έχουν διπλό ρόλο, συμβάλλοντας τόσο στην αναχαίτιση της αιμορραγίας, αλλά ταυτόχρονα και στη θρόμβωση με διάφορους τρόπους.

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τον σχεδιασμό συσκευών για επιφανειακή (τοπική) αιμόσταση, τα μοριακά και κυτταρικά γεγονότα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του συστήματος πήξης που συμβαίνουν όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με ξένα υλικά γίνεται όλο και καλύτερα κατανοητό. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το πώς συμπεριφέρονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια όταν οι επαφές αίματος έρχονται σε επαφή με την εξωτερική τους επιφάνεια. Τρεις αλληλένδετες διεργασίες έχουν αναγνωρισθεί: (1) η χημική και φυσική προσρόφηση των πρωτεϊνών του πλάσματος στην ξένη επιφάνεια για τον σχηματισμό στρώματος «Vroman» (Vroman, 1964) · (2) ο κύκλος εργασιών του εσωτερικού καταρράκτη πήξης στη διεπαφή ξένου υλικού (Ratnoff and Rosenblum, 1958; Vroman et al, 1980) · και (3) η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Barr, 1941, Scarborough et al, 1969). Η έμφαση αυτών των διαδικασιών αποτελεί σημαντική βάση για τον ορθολογικό σχεδιασμό προϊόντων για επιφανειακή (τοπική) αιμόσταση, με βάση πάντα και την βοήθεια των ερυθροκυττάρων.

Αν και τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν εξελιχθεί φαινομενικά ως μη θρομβογόνα, αυτά τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να συμβάλουν σε ένα θρομβογόνο περιβάλλον. Συνθήκες όπως το άγχος (Armstrong et al., 1995; Bozzo et al., 1995), η αποθήκευση (Saniabadi et al, 1987) και η β-θαλασσαιμία μείζονος σημασίας, έχουν ταυτοποιηθεί όπου τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Επίσης, η πλήρης ή μερική λύση των ερυθρών μπορεί να απελευθερώσει ADP που προκαλεί ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, αιμοσφαιρίνη που προκαλεί τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες και απομάκρυνση νιτρικού οξειδίου (Gladwin et al, 2004 Herold, 2003, Sampei et al, 2005). Η συμβολή των διαδικασιών που σχετίζονται με τα ερυθρά αιμοσφαίρια στην τοπική αιμόσταση δεν έχει αναγνωρισθεί σε μεγάλο βαθμό. Παρόλα αυτά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η διαφορική ικανότητα

διαφόρων υλικών να δεσμεύουν και να μεταβάλλουν τη μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην τεχνητή επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με το αίμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα στο σχεδιασμό συσκευών για επιφανειακή αιμόσταση. Είναι γεγονός πως πλέον υπάρχει ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων που αποδεικνύουν ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμμετέχουν στην αιμόσταση. Η συμβολή των ερυθρών αιμοσφαιρίων έγινε πιο εμφανής με τη χρήση νεότερων τεχνολογιών που διερευνούν τις αντιδράσεις πήξης σε περιβάλλον πλήρους αίματος σε αντίθεση με τις ιστορικές αναλύσεις των αντιδράσεων στο πλάσμα (Skewis LR et al, 2014). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην αιμόσταση μέσω πολλαπλών μηχανισμών που εξαρτώνται από τις βιομηχανικές τους ιδιότητες, την κατανομή των συστατικών του αίματος εντός του αγγειακού αυλού, τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, τη συναρμολόγηση των παραγόντων πήξης και την απελευθέρωση των προπηκτικών σηματοδοτικών ενώσεων. Η στόχευση του ερυθροκυττάρου παρέχει την ευκαιρία ανάπτυξης νέων προσεγγίσεων στην αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη θεραπεία που ενισχύουν την αναλογία οφέλους/κινδύνου των υπάρχοντων φαρμάκων και την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τον μετριασμό της συμβολής των ερυθρών σε θρόμβωση και άλλες ενδοαγγειακές παθολογίες (Brummel-Ziedins KE et al, 2014).

2.1.3 Επιδράσεις στα αιμοπετάλια

Εκτός από τη συγκέντρωση κυτταρικών στοιχείων στο αίμα, οι ρεολογικές τους ιδιότητες είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της ρευστότητας του αίματος. Δηλαδή, η διαταραχή των γραμμών ροής εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση των κυττάρων του αίματος αλλά και από τη συμπεριφορά αυτών των κυττάρων υπό δυνάμεις διάτμησης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας αυτής της επίδρασης, με αυτά τα κύτταρα να εμφανίζουν μια πολύ ιδιαίτερη ρεολογική συμπεριφορά. Τα κανονικά ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα με μεγάλη ικανότητα παραμόρφωσης και τείνουν να προσανατολίζονται

με τα ρεύματα ροής, ειδικά αν οι δυνάμεις διάτμησης είναι αρκετά υψηλές για να παραμορφώσουν ελαφρώς αυτά τα κύτταρα, όπως στην δεδομένη περίπτωση τα αιμοπετάλια (Lowe et al, 1994).

Τόσο η παραμορφωσιμότητα όσο και η συσσωμάτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ρεολογικές παράμετροι που μπορούν να επηρεαστούν από παθοφυσιολογικές διεργασίες. Η φυσιολογική ρεολογική συμπεριφορά του ερυθροκυττάρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διατήρηση ενός κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος και τη διατήρηση της μεταβολικής λειτουργικότητας. Η αποτυχία αυτών των συνθηκών μπορεί να οδηγήσει σε αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη επιδείνωση της ρεολογικής συμπεριφοράς των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Έτσι, τόσο οι τοπικές όσο και οι συστηματικές διαταραχές της ομοιόστασης έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ρεολογικές αλλοιώσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αυτά με την σειρά τους να επηρεάσουν την φυσιολογική αλληλεπίδραση τους με τα αιμοπετάλια (Merrill EW 1969). Όσον αφορά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της αιμοδυναμικής, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν το ιξώδες του αίματος, επηρεάζοντας την κατανομή των διαλυμένων ουσιών και των αιμοπεταλίων στον αυλό του αγγείου και προάγοντας την διαταραγμένη ροή υπό ορισμένες ρεολογικές συνθήκες, για παράδειγμα σε σημεία διακλάδωσης των αγγείων, καμπυλότητες και τοπικές αλλαγές στο σχήμα του αυλού (Vahidkhaah K et al, 2013). Η αυξημένη αξονική μετανάστευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε υψηλότερο αιματοκρίτη οδηγεί τα αιμοπετάλια και τα μικρά σωματίδια όπως οι λιποπρωτεΐνες και τα εξωσώματα προς τα αγγειακά τοιχώματα (Samokhin GP et al, 1984). Η μειωμένη παραμορφωσιμότητα του ερυθροκυττάρου που προκύπτει από κυτταροσκελετικές ανωμαλίες μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να διασχίζουν τη μικροκυκλοφορία διατηρώντας παράλληλα την φυσιολογική φυσιολογική αγγειακή αντίσταση και ενισχύει τη μεταφορά αιμοπεταλίων προς το ενδοθήλιο. Σύμφωνα με αυτό, οι παρεμβάσεις που αυξάνουν την παραμορφωσιμότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Ο ρεολογικός αντίκτυπος των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο πλήρες αίμα μπορεί επίσης να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C με τρόπο που εξαρτάται από τον ρυθμό διάτμησης (Kaul DK et al, 2008). Υπολογιστικά μοντέλα έχουν

αναπτυχθεί για να περιγράψουν το περίπλοκο ρεολογικό περιβάλλον ολόκληρου του αίματος σε διάφορα περιβάλλοντα ροής και να προβλέψουν πώς αυτά επηρεάζουν τον αντίκτυπο των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην εναπόθεση αιμοπεταλίων (Aarts PA et al, 1984).

Η προσκόλληση των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων στα αιμοπετάλια, καθώς και στα ουδετερόφιλα και το ινώδες έχει επίσης παρατηρηθεί υπό χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης των φλεβών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων μέσω βιομηχανικών δυνάμεων, ζευγαρώματος υποδοχέα -συνδέτη και διαλυτών δευτερογενών αγγελιοφόρων αυξάνουν την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων και προδιαθέτουν σε θρόμβωση (Bravo MC et al, 2014). Η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων ενισχύεται με την απομάκρυνση του αναστολέα των αιμοπεταλίων νιτρικού οξειδίου (NO) από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, από αργινάση που απελευθερώνεται από αιμολυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια που μειώνει την L-αργινίνη, ένα υπόστρωμα για την παραγωγή NO και από το ADP, το οποίο επίσης απελευθερώνεται από ή αλλιώς κατεστραμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (Adams Y et al, 2014). Η ενδοκυτταρική σύνδεση μεσολαβείται εν μέρει μέσω της ιντεγκρίνης αιμοπεταλίων ανβ3 και ICAM4. Υπό συνθήκες ροής που μιμούνται τους ρυθμούς διάτμησης των φλεβών, έχουν παρατηρηθεί αλληλεπιδράσεις RBC -αιμοπεταλίων που περιλαμβάνουν γλυκοπρωτεΐνη Ib. Οι αλληλεπιδράσεις ερυθρών αιμοπεταλίων μπορεί να έχουν μη εκτιμημένες κλινικές επιπτώσεις (Helms CC et al, 2013). Για παράδειγμα σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε περιπτώσεις ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, η μετάγγιση ερυθρών αιμοπεταλίων αύξησε την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων όπως μετρήθηκε με τη συσσωματόμετρο μετάδοσης φωτός που προκαλείται από ADP και τα ερυθρά αιμοσφαίρια μείωσαν την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στην ασπιρίνη ακόμη και όταν αναστέλλεται η σύνθεση της θρομβοξάνης A2.

2.2 Αλληλεπιδράσεις των ερυθρών με κυτταρικά και μοριακά συστατικά του αιμοστατικού μηχανισμού

2.2.1 Τοίχος αγγείου

Η αλληλεπίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με το ενδοθήλιο υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ελάχιστη, αλλά μπορεί τα ερυθρά να εμφανίσουν συγκολλητικές ιδιότητες όταν αυτά και/ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται παθολογικές διαταραχές, με αποτέλεσμα την απόφραξη της μικροαγγείωσης, που συχνά σχετίζεται με θρομβωτικές καταστάσεις. Η αυξημένη προσκόλληση ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ενδοθήλιο μεσολαβείται από έναν αριθμό συγκολλητικών μορίων, όπως είναι τα VCAM-1, α4β1, Lu/BCAM, ICAM-4, κ.λπ. (Du VX et al, 2014). Εκτός από την αλληλεπίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορούν επίσης να εκτεθούν και να συνδεθούν με την υποενδοθηλιακή μήτρα όταν το ενδοθήλιο έχει υποστεί βλάβη. Η συγκολλητική αλληλεπίδραση ερυθρών -ενδοθηλίου που προκαλεί απόφραξη μικρών αγγείων έχει αποδειχθεί πως προκαλεί μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως φλεβική απόφραξη αμφιβληστροειδούς, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη και εγκεφαλικό επεισόδιο. Η προσκόλληση των ερυθρών στο ενδοθήλιο στην απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς μεσολαβείται από την συμμετοχή της φωσφατιδυλοσερίνης που εκτίθεται στην επιφάνεια των ερυθρών και του ενδοθηλιακού υποδοχέα της φωσφατιδυλοσερίνης (Wautier MP et al, 2011). Η προσκόλληση αυτή ακολουθούμενη από χρονικά εξαρτώμενες αλλοιώσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνει την ικανότητα των ερυθρών να δεσμεύονται στο ενδοθήλιο και να σχηματίζουν μικροσυσσωματώματα που επηρεάζουν σημαντικά τη ροή του αίματος στη μικροαγγείωση. Σε ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα αγγειακής βλάβης που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια για θρόμβωση χρησιμοποιώντας $FeCl_3$, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποδείχθηκαν ότι ήταν τα πρώτα κύτταρα που προσκολλήθηκαν στο χημικά τραυματισμένο ενδοθήλιο, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση είναι ένα τεχνούργημα του $FeCl_3$ (Barr JD et al, 2013). Έχει αποδειχθεί πρόσφατα πως η δυσλειτουργία ή

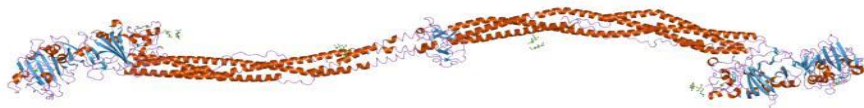
η απώλεια του CD59, μιας προστατευτικής γλυκοπρωτεΐνης που εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλέγματος το οποίο εξαρτάται από το συμπλήρωμα μεμβρανικών συμπτωμάτων, είναι ένας κύριος αρτηριακός προθρομβωτικός παράγοντας στην παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία. Για να μετριάσει, λοιπόν, τις συνέπειες της μαζικής αιμόλυσης κάτω από αυτή την παθολογική κατάσταση, το CD59 μειώνει τη βλάβη του ενδοθηλίου και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς και τη συσσωμάτωσή τους με λευκοκύτταρα που υπερβάλλουν την αγγειακή απόφραξη (Weisel et al 2019).

2.2.2 Ινωδογόνο και ινώδες

Η ποιότητα του θρόμβου επηρεάζεται σε ένα μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα και τα συστατικά που προέρχονται από τα κύτταρα που υπάρχουν στο σημείο τραυματισμού (Morel O et al, 2006). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν μη αναγνωρισμένες επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και των εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (NETs) στο σχηματισμό, τη δομή και τη σταθερότητα του ινώδους (Εικ. 5).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπάρχουν στους αιμοστατικούς και θρομβωτικούς θρόμβους, αλλά η ικανότητά τους να επηρεάζουν τον σχηματισμό ή τη λειτουργία αυτών δεν είναι σαφής. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να υποστηρίξουν τη δημιουργία θρομβίνης και ως εκ τούτου να μεταβάλλουν την προπηκτική δραστηριότητα στη θέση σχηματισμού θρόμβων. Η παρουσία ερυθρών κατά τον σχηματισμό θρόμβων αυξάνει επίσης την ετερογένεια του ινώδους δικτύου, αλλά το αν τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν (Ibrahim HA et al, 2014) ή μειώνουν το πάχος των ινών δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Μόλις βρεθούν στον θρόμβο, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταβάλλουν τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του θρόμβου και, καθώς μειώνουν την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου, αυξάνουν την αντίσταση των θρόμβων στην ινωδόλυση, μεταξύ ινώδους και της κυτταρικής επιφάνειας της ιντεγκρίνης (Silvain J et al, 2011). Αυτό είναι σύμφωνο με παρατηρήσεις που υποδηλώνουν ότι το ινώδες (ινωδογόνο) συνδέεται με τα ερυθρά αιμοσφαίρια

μέσω μορίου που μοιάζει με β3 στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, (Reimers RC et al, 1984) παρόλο που ούτε η θέση σύνδεσης στο ινώδες ούτε ο πιθανός υποδοχέας των ερυθρών έχουν αναγνωρισθεί. Μελέτες για συσσωρευμένους θρόμβους ολικού αίματος δείχνουν βαθιά συμπίεση των εμβρυϊκών αιμοσφαιρίων σε δομές που ονομάζονται πολυεδροκύτταρα (Kattula et al, 2017). Επειδή το ινωδογόνο και το ινώδες μοιράζονται θέσεις σύνδεσης με την ιντεγκρίνη αIIbβ3 (Chung DW et al, 1984), η ιδιαιτερότητα της σύνδεσης του ινωδογόνου με τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να είναι παρόμοια με τις αλληλεπιδράσεις ερυθρών -ινώδους σε θρόμβους αίματος. Επιπλέον, η κατακράτηση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε φλεβικούς θρόμβους σε χαμηλή ταχύτητα ροής και στάση μπορεί να μεσολαβείται από την αλληλεπίδρασή τους με τον παράγοντα von Willebrand που βρίσκεται είτε στο ινώδες είτε σε κάποια άλλη επιφάνεια (Fornace AJ Jr et al 1984). Η κατανόηση της μοριακής φύσης του ερυθροκυτταάρου που συνδέεται με το ινωδογόνο και το ινώδες είναι σημαντική επειδή η πρόληψη και/ή η διακοπή αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να είναι ένας νέος αντιθρομβωτικός θεραπευτικός στόχος παρόμοιος με τις αλληλεπιδράσεις ινώδους-αιμοπεταλίων.



Εικόνα 5: Η δομή του ινωδογόνου (Kattula et al, 2017)

2.2.3 Παράγοντας VIII και συντελεστής von Willebrand

Ένας καθόλου μελετημένος και υποτιμημένος μηχανισμός των επιδράσεων των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιμορραγία και τη θρόμβωση είναι η διαμόρφωση των επιπέδων του παράγοντα von Willebrand και του παράγοντα VIII στο αίμα, που σχετίζεται με το σύστημα ομάδων αίματος ABO (Jenkins PV et al, 2006). Σε άτομα που έχουν αντιγόνα A και B, οι συγκεντρώσεις του παράγοντα VIII και, ιδιαίτερα, του παράγοντα von Willebrand είναι σημαντικά υψηλότερες από ό, τι στα άτομα της ομάδας O. Αυτή η διαφορά έχει αποδοθεί στη μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών που διεγείρονται από τα αντιγόνα A και B μέσω άγνωστου μηχανισμού (Franchini M et al 2014). Πιθανώς, η έκταση της γλυκοζυλίωσης θα μπορούσε να καθορίσει τον ρυθμό κάθαρσης του παράγοντα VIII και του παράγοντα von Willebrand, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αποβολή σε άτομα ομάδας αίματος O (Casari C et al, 2013). Τα υψηλότερα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand (και σε μικρότερο βαθμό του παράγοντα VIII) θα μπορούσαν να υπογραμμίσουν τη σχέση μεταξύ της ομάδας αίματος ABO και του κινδύνου θρόμβωσης ή αιμορραγίας (Franchini M et al, 2016). Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα ιστο-αίματος ABO είναι ένας σημαντικός καθοριστής των επιπέδων πλάσματος του παράγοντα VIII και του παράγοντα vonWillebrand. Τα άτομα ομάδας αίματος O έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα πλασμιδίων και των δύο γλυκοπρωτεϊνών. Αυτή η συσχέτιση έχει κλινική σημασία. Χαμηλά επίπεδα πλάσματος είτε του FVIII είτε του vWF έχουν αποδειχθεί ως αιτίες υπερβολικής αιμορραγίας. Αντιστρόφως, υπάρχουν αποδείξεις ότι τα αυξημένα επίπεδα FVIII ± vWF μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για ισχαιμική καρδιακή νόσο και φλεβική θρομβοεμβολική νόσο. Παρά την καλά τεκμηριωμένη σχέση μεταξύ της ομάδας αίματος ABO και των επιπέδων FVIII ± vWF, ο υποκείμενος μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Θεωρητικά, λοιπόν, η ομάδα αίματος ABO μπορεί να μεταβάλλει το ρυθμό σύνθεσης ή έκκρισης του wWF εντός ενδοθηλιακών κυττάρων (O' donnell et al, 2001).

2.3 Εργαστηριακή διερεύνηση της αιμόστασης

2.3.1 Χρόνος προθρομβίνης (PT)

Ο χρόνος προθρομβίνης (PT) αντιπροσωπεύει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τεστ πήξης και εισήχθη για πρώτη φορά σε χρήση από τον Dr Armand Quick και τους συνεργάτες του το 1935.¹ Το PT είναι μια δοκιμή διαλογής ενός σταδίου που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του παράγοντα ιστού (TF) και της κοινής διαδρομής πήξης και έτσι επηρεάζεται από τη δραστηριότητα των παραγόντων πήξης II (FII), V (FV), VII (FVII), X (FX) και ινωδογόνου (Dorgalaleh A et al, 2018). Η δοκιμή μετρά τον χρόνο (σε δευτερόλεπτα) που απαιτείται για το σχηματισμό θρόμβων. Το κλασικό μοντέλο πήξης, όπως αντικατοπτρίζεται από τον καταρράκτη πήξης, προτάθηκε για πρώτη φορά επιστημονικά τη δεκαετία του 1960 και χωρίστηκε σε δύο οδούς, το ένα αντανάκλαται από την ενεργοποίηση του παράγοντα ιστού του FVII (PT) και το άλλο αντανάκλα την ενεργοποίηση του μονοπατιού επαφής (APTT, ενεργοποιημένος μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης). Αυτές οι οδοί συγκλίνουν σε ένα κοινό μονοπάτι, συνδέονται μέσω της παραγωγής θρομβίνης από το σύμπλεγμα προθρομβινάσης και της μετατροπής του ινωδογόνου σε ινώδες μέσω θρομβίνης (Dorgalaleh et al, 2021).

Από την εισαγωγή του συστήματος INR του WHO, οι μετρήσεις του PT που γίνονταν με το χέρι αντικαταστάθηκαν σχεδόν καθολικά με αυτοματοποιημένες μεθόδους. Η συνιστώμενη βαθμονόμηση του Διεθνούς Δείκτη Ευαισθησίας του ΠΟΥ (ISI) που προέρχεται από χειροκίνητες δοκιμές PT δεν είναι πλέον εφικτή στα περισσότερα κέντρα. Στις βαθμονομήσεις του WHO ISI, όλα τα δείγματα αίματος ελέγχονται παράλληλα με την τοπική μέθοδο χρησιμοποιώντας τη χειροκίνητη τεχνική PT και το διεθνές σκεύασμα αναφοράς θρομβοπλαστίνης (IRP). Επιπλέον, ακόμη και αν γίνει επιτυχώς, το χειροκίνητο ISI μπορεί να αλλάξει πολύ με τα πηκτικά (D'Angelo A et al, 1989, Poller L et al, 1998) και το ISI χειροκίνητης βαθμονόμησης μπορεί να μην είναι σχετικό. Για να ξεπεραστεί αυτό, ορισμένοι κατασκευαστές παρέχουν μια σειρά ISI για διαφορετικά πηκτικά όταν χρησιμοποιούνται με τις θρομβοπλαστίνες

τους («σύστημα ISI»), αλλά οι επιπτώσεις στο INR μεμονωμένων πηκτόμετρων ακόμη και από τον ίδιο κατασκευαστή ποικίλλουν (Poller L et al, 2010). Η τιμή PT κάθε πιστοποιημένου πλάσματος προσδιορίζεται σύμφωνα με το αντιδραστήριο και το πηκτικό του κάθε εργαστηρίου και απεικονίζεται σε λογαριθμικό χαρτί έναντι του προσδιορισμένου INR για κάθε κιτρικό πλάσμα. Μια άλλη μέθοδος είναι η χρήση εμπορικού πλάσματος με καθορισμένη τιμή INR. Σε αυτή τη διαδικασία, το INR αρκετών εμπορικών δειγμάτων πλάσματος καθορίζεται με τη συνιστώμενη μέθοδο του ΠΟΥ ή άλλες εναλλακτικές μεθόδους (Poller L et al, 2011).

Για τον εργαστηριακό προσδιορισμό του INR συνιστάται να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρία πιστοποιημένα πλάσματα, που καλύπτουν τη θεραπευτική δόση του INR που κυμαίνεται από 1,5 έως 4,5, για την επαλήθευση της ISI. Για ορισμένα από αυτά τα εμπορικά πλάσματα, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ένα μόνο INR για όλα τα πηκτικά. Πριν χρησιμοποιηθούν αυτά τα πλάσματα, θα πρέπει ο εργαστηριακός να διαβάσει και να κατανοήσει τις οδηγίες για αυτά τα αντιδραστήρια για να ελέγξει με αυτόν τον τρόπο τη δυνατότητα χρήσης αυτών των πλάσματος για το δικό του σύστημα δοκιμής (συνδυασμένο σύνολο αντιδραστήριου και πηκτικό). Εάν οριστεί νέο εργαστηριακό ISI ή δημιουργηθεί νέα γραμμή βαθμονόμησης για PT/INR, το σύστημα δοκιμών πρέπει να επικυρωθεί πριν από την αναφορά των αποτελεσμάτων του ασθενούς (Dorgalaleh et al, 2021).

2.3.2 Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνη (aPTT)

Ο μερικός χρόνος θρομβοπλαστίνης (PTT) που χρησιμοποιείται ως συνολικό μέτρο του εσωτερικού συστήματος πήξης, είναι το πιο συνηθισμένο τεστ πήξης που χρησιμοποιείται σε εργαστήρια ρουτίνας εκτός από τον χρόνο προθρομβίνης. Οι κύριες λειτουργίες της δοκιμής είναι:

1. έλεγχος εγγενών ελαττωμάτων πήξης.
2. έλεγχος της χορήγησης ηπαρίνης.
3. έλεγχος της στοματικής αντιπηκτικής αγωγής.

Πολλά διαφορετικά παρασκευάσματα φωσφολιπιδίου ανθρώπινης, ζωικής και φυτικής προέλευσης χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια ΡΤΤ. Για την κάλυψη της ανάγκης για προετοιμασία αναφοράς για τη δοκιμή ΡΤΤ, μια μεγάλη παρτίδα φωσφολιπιδικού υλικού ανθρώπινης εγκεφαλικής προέλευσης, με την ονομασία 71/25, ετοιμάστηκε στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς (Ηνωμένο Βασίλειο) σε λυοφιλοποιημένη μορφή το 1971 και προτάθηκε ως προσωρινό διεθνές υλικό αναφοράς (Poller et al, 1980). Υπάρχουν αρκετές κλινικές ρυθμίσεις και συνθήκες ασθενούς όπου η κατάσταση πήξης ενός ασθενούς πρέπει να είναι γνωστή, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης ασθενών που αιμορραγούν, πριν από επεμβατικές διαδικασίες και πριν από την έναρξη αντιθρομβωτικών φαρμάκων (Stainsby D et al, 2000). Τρεις κοινές κλινικές καταστάσεις μπορούν να διαφοροποιηθούν: επίκτητη ή συγγενής ανεπάρκεια ενός παράγοντα, ανεπάρκεια εξαρτώμενης από βιταμίνη Κ (μειωμένη δραστηριότητα των παραγόντων II, VII, X και IX) και ανεπάρκεια όλων των παραγόντων που παρατηρείται σε αιμορραγικούς ασθενείς (Niederdockl et al, 2016). Το συγκεκριμένο τεστ αντικατοπτρίζει μεταβολές σε διάφορους βαθμούς στο ινωδογόνο, την προθρομβίνη, τον παράγοντα V, τον παράγοντα VIII, τον παράγοντα X, τον παράγοντα XI, τον παράγοντα XII, άλλους παράγοντες επαφής και κυκλοφορούντα αντιπηκτικά που επηρεάζουν τον εγγενή μηχανισμό πήξης. Οι αναφορές σχετικά με τη χρήση του τεστ ΡΤΤ μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές ομάδες (Babson A L & Babson S R 1974)

Ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τον εντοπισμό ποσοτικών και ποιοτικών ανωμαλιών στις εγγενείς και κοινές οδούς πήξης, την παρακολούθηση της αντιπηκτικής θεραπείας με μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη και τον εντοπισμό αναστολέων της πήξης του αίματος, ο πιο κοινός από τους οποίους είναι το αντιπηκτικό λύκου. Ενώ οι σύντομες τιμές ΑΡΤΤ έχουν παραβλεφθεί κατά το παρελθόν, πρόσφατα στοιχεία από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι αυτά μπορεί να σχετίζονται με υπερπηκτικότητα. Παρόλο που η κλινική σημασία δεν έχει ακόμη καθοριστεί με σαφήνεια, η υπερπηκτικότητα που ανιχνεύεται από ένα συντομευμένο ΑΡΤΤ φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με έναν σημαντικό κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής ανεξάρτητα από άλλες μεταβλητές όπως η ομάδα αίματος, η παρουσία

κληρονομικής θρομβοφιλίας και τα επίπεδα του παράγοντα VIII. Αυτό το νέο εύρημα υποδηλώνει πως αυτή η παραδοσιακή, απλή και φθηνή δοκιμή θα μπορούσε να έχει ανανεώσει τη χρησιμότητα μαζί με τις παραδοσιακές θρομβοφιλικές δοκιμές στην αξιολόγηση του φλεβικού θρομβοεμβολικού κινδύνου. Επιπλέον, η ανάλυση κυματομορφής APTT παρέχει επίσης αυξανόμενα αποδεικτικά στοιχεία για πρόσθετη χρησιμότητα, ιδίως για τον εντοπισμό σηψαιμίας και διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση (ιδιαίτερα όταν αυτό μπορεί να επιδεινώσει την πρόγνωση), για παρακολούθηση της θεραπείας σε ασθενείς με αναστολείς και ως διαγνωστική βοήθεια για τον εντοπισμό ασθενών με αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Συνολικά, τέτοια αναδυόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το APTT είναι είτε ένα παλιό δόγμα που εμφανίζει νέα κόλπα είτε αλλιώς μπορεί να περιγράψει ένα νέο δόγμα για ένα παλιό εργαστηριακό τέχνασμα (Lippi et al, 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Επίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και χαρακτηριστικά

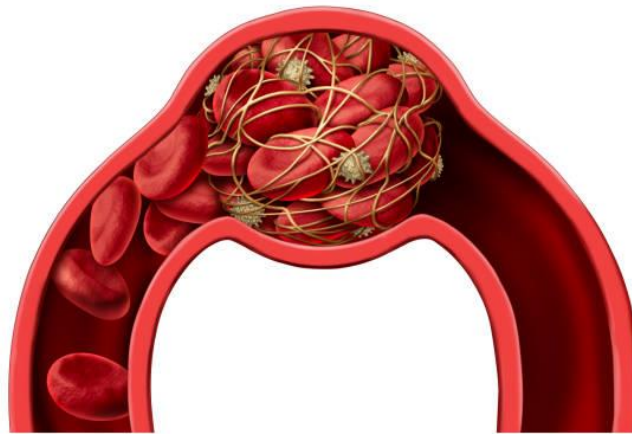
3.1 Μηχανισμός θρόμβωσης

3.1.1 Παθοφυσιολογία (ο λόγος και ο μηχανισμός)

Ως θρόμβωση ορίζεται η δημιουργία ενός σταθερού θρόμβου ινικής ή/και αιμοπεταλίων, που έρχεται σε άμεση σχέση με το αγγειακό τοίχωμα και αποφράσσει μερικά ή ολικά μία φλέβα ή αρτηρία. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της θρόμβωσης στο φλεβικό και στο αρτηριακό σκέλος της κυκλοφορίας

παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Η φλεβική θρόμβωση είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού της φλεβικής στάσης με την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης, τοπικής ή γενικευμένης (υπερπηκτικότητα), που έχει ως αποτέλεσμα την τοπική παραγωγή θρομβίνης (Εικ. 6). Εμφανής ενδοθηλιακή βλάβη δεν ανευρίσκεται συνήθως στο σημείο της προσκόλλησης του θρόμβου, αλλά και ο πειραματικός τραυματισμός της φλέβας είναι ασθενές θρομβογόνο ερέθισμα. Ο φλεβικός θρόμβος, που αναπτύσσεται και επεκτείνεται ταχέως, αποτελείται κυρίως από ινώδες και ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ η συμμετοχή των αιμοπεταλίων είναι μάλλον περιορισμένη. Η αρτηριακή θρόμβωση αναπτύσσεται πάνω σε ενδοθηλιακή βλάβη και κυρίως σε επιπεπλεγμένη αθηροσκληρωτική πλάκα, που περιέχει εστία, στην οποία προσκολλώνται τα αιμοπετάλια και ενεργοποιείται ο αιμοστατικός μηχανισμός. Η αρτηριακή θρόμβωση συμβάλλει ουσιαστικά στην επέκταση και την εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής βλάβης και είναι συχνά υπεύθυνη για τις κλινικές εκδηλώσεις της. Οι παράγοντες κινδύνου της αρτηριακής θρόμβωσης είναι, με ελάχιστες εξαιρέσεις, κοινοί με τους παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. Δηλαδή, ασκούν ταυτοχρόνως αθηρογόνο και θρομβογόνο δράση (ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ, ΠΦΚΑ. "ΝΔ ΣΧΙΖΑΣ.") Η παθογένεση της αρτηριακής θρόμβωσης περιλαμβάνει την αθηροσκήρυνση, τη ρήξη της πλάκας και τη βλάβη του ενδοθηλίου που αποκαλύπτει και άρα φέρνει σε επαφή με το αίμα, το κολλαγόνο και τον ιστικό παράγοντα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου. Παράγοντες που εκλύονται από τα αιμοπετάλια όπως ο PDGF (platelet derived growth factor), επάγουν στη συνέχεια τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών των αρτηριών. Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης αρτηριακής θρόμβωσης είναι η ηλικία, η αρτηριακή πίεση, η αυξημένη χοληστερίνη, η παθολογική ανοχή γλυκόζης, το κάπνισμα και οι ανωμαλίες του ηλεκτροκαρδιογραφήματος. Στην παθογένεση της φλεβικής θρόμβωσης παραμένει σε ισχύ η τριάδα που περιέγραψε ο Virchow: διαταραχή της ροής του αίματος, διαταραχή των συστατικών που συμμετέχουν στο μηχανισμό της πήξης και βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων. Η συμβολή καθενός από τους πιο πάνω παράγοντες είναι διαφορετική σε κάθε αγγειακό υπόστρωμα. Έτσι, στην αρτηριακή θρόμβωση προεξάρχει η βλάβη του αγγείου, ενώ στη φλεβική, η στάση και η υπερπηκτικότητα του αίματος. Τα τελευταία χρόνια η

Θρόμβωση θεωρείται πλέον ως το τυπικό παράδειγμα πολυγονιδιακής / πολυπαραγοντικής νόσου. Η εμφάνιση της θρόμβωσης είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πολλαπλών παραγόντων κινδύνου τόσο γενετικών, όσο και επίκτητων (Πολίτη, Μαριάννα. "ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ." (2015)). Η θρόμβωση εκδηλώνεται ως μια ασθένεια πολλαπλών αιτιών στα παιδιά. Στη σπάνια περίπτωση θρόμβωσης σε παιδιά, υπάρχουν συχνά ταυτόχρονα διάφοροι επίκτητοι και γενετικοί παράγοντες κινδύνου. Όχι μόνο είναι σπάνιο να βρεθούν παιδιά με θρόμβωση χωρίς κανένα παράγοντα κινδύνου, αλλά πολλά έχουν τρεις ή τέσσερις παράγοντες κινδύνου. Στο 25-30% των παιδιών με θρόμβωση, έχουν αναφερθεί ανεπάρκειες της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S ή της αντιθρομβίνης, αλλά η θρόμβωση δεν αναπτύχθηκε έως ότου υπήρχαν άλλοι παράγοντες κινδύνου, όπως ενδοφλέβιες γραμμές ή σοβαρή ασθένεια (Rosendaal et al 1999).



Εικόνα 6: Δημιουργία θρόμβου (<http://stocksnap.io/>)

Φλεβική Θρόμβωση

Οι παράγοντες κινδύνου που αφορούν την φλεβική θρόμβωση διαφέρουν από εκείνους της αρτηριακής αγγειακής νόσου. Με βάση τα τελευταία 5 χρόνια, η γνώση σχετικά με την αιτιολογία της φλεβικής θρόμβωσης έχει προχωρήσει λόγω

της ανακάλυψης διαφόρων παραγόντων που συμβάλλουν στην επίπτωση της θρόμβωσης, ιδιαίτερα του ρόλου των ανωμαλιών πήξης. Αυτές οι ανωμαλίες είναι συχνές στον γενικό πληθυσμό και ως εκ τούτου θα εμφανίζονται ταυτόχρονα σε ορισμένα άτομα. Οι επακόλουθες αλληλεπιδράσεις γονιδίου-γονιδίου και γονιδίου-περιβάλλοντος μεταξύ παραγόντων κινδύνου είναι το κλειδί για την κατανόηση του γιατί ένα συγκεκριμένο άτομο αναπτύσσει θρόμβωση σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο (Rosendaal et al, 1999) Η φλεβική θρόμβωση συμβαίνει συνήθως ως θρόμβωση εν τω βάθει φλέβας του ποδιού ή πνευμονική εμβολή, με συχνότητα που εξαρτάται από την ηλικία από ένα έως τρία άτομα ανά 1000 ανά έτος (Naess IA et al, 2007). Το ποσοστό περιστατικών-θνησιμότητας υπερβαίνει το 5%, που προκαλείται κυρίως από πνευμονική εμβολή. Και τα δύο φύλα πλήττονται εξίσου από μια πρώτη φλεβική θρόμβωση, αλλά ο κίνδυνος υποτροπής θρόμβωσης είναι υψηλότερος στους άνδρες από ό, τι στις γυναίκες (Kyrle PA et al, 2004). Το 1965, ο Egeberg (Egeberg O. 1965) εντόπισε το πρώτο ελάττωμα που οδήγησε στη θρομβοφιλία, όταν περιέγραψε μια οικογένεια με κληρονομική ανεπάρκεια αντιθρομβίνης. Το 1969, αναφέρθηκε ότι η ομάδα ABO σχετίζεται με τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης (Jick H et al, 1969). Οι ανεπάρκειες της πρωτεΐνης C και της πρωτεΐνης S αναγνωρίστηκαν ως αιτίες κληρονομικής θρομβοφιλίας στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Griffin JH et al, 1981). Στη δεκαετία του 1990, ο παράγοντας V Leiden και η προθρομβίνη 20210A ανακαλύφθηκαν (Bertina RM et al, 1994). Ενώ οι ανεπάρκειες των φυσικών αντιπηκτικών μπορεί να θεωρηθούν ισχυροί παράγοντες κινδύνου (αυξημένοι κίνδυνοι 5 έως δέκα φορές) και FV Leiden και προθρομβίνη 20210A ως μέτριοι παράγοντες κινδύνου (αύξηση κινδύνου 2 έως 5 φορές) (Rosendaal et al 2009). Το 1856, ο Virchow ισχυρίστηκε ότι η βλάβη του τοιχώματος του αγγείου, οι μεταβολές στη ροή και η υπερπηκτικότητα του αίματος είναι οι κύριες αιτίες του σχηματισμού θρόμβων. Αυτή η παθοφυσιολογική έννοια ισχύει ακόμη και σήμερα. Οι φλεβικοί θρόμβοι σχηματίζονται στο περιβάλλον χαμηλής ροής και χαμηλής τάσης διάτμησης και αποτελούνται κυρίως από κλώνους ινώδους, ερυθρά αιμοσφαίρια και λίγα αιμοπετάλια. Συνήθως, οι θρόμβοι σχηματίζονται στους θύλακες των φλεβών και εκτείνονται στις εγγύς φλέβες (Nicolaidis AN et al, 1971). Η αυξημένη φλεβική και τριχοειδής πίεση μετά το σχηματισμό θρόμβου αυξάνει

τον ρυθμό διήθησης των τριχοειδών, με αποτέλεσμα οίδημα. Στο 50% των ασθενών, η απόφραξη της φλεβικής εκροής υποχωρεί εντός 3 μηνών με λύση ερυθρών (Killewich LA et al 1989). Οι ασθενείς με πρώιμο οίδημα είναι πιθανότερο να έχουν υπολειμματική θρόμβωση, ενώ το όψιμο οίδημα σχετίζεται με βαλβική ανικανότητα (Kyrie et al 2005).

Αλληλεπίδραση γονιδίου-γονιδίου

Ο υψηλός κίνδυνος θρόμβωσης που σχετίζεται με το συνδυασμό ανεπάρκειας πρωτεΐνης C και του παράγοντα V Leiden είναι ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης γονιδίου-γονιδίου. Παρόμοια ευρήματα έχουν τεκμηριωθεί για οικογένειες με ανεπάρκεια πρωτεΐνης S, (Zöller B et al, 1995) ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, και προθρομβίνη 20210^A (Van Boven HH et al, 1996). Ο παράγοντας V Leiden είναι συχνός σε αυτές τις οικογένειες και εκείνοι με συνδυασμό ελλείψεων έχουν υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης. Ένας ειδικός τύπος αλληλεπίδρασης γονιδίου-γονιδίου υπάρχει στην ομόζυγη νόσο. Η ανεπάρκεια ομοζυγώδους πρωτεΐνης C και πρωτεΐνης S είναι σπάνιες αλλά καταστροφικές διαταραχές, με σοβαρή θρόμβωση (purpura fulminans) να εμφανίζεται λίγο μετά τη γέννηση (Makris M et al, 1997). Η έλλειψη ομόζυγων αντιθρομβίνης μπορεί να μην είναι συμβατή με τη ζωή. Οι ομόζυγοι ασθενείς είναι σπάνιοι και συνήθως είναι αποτέλεσμα της συνάφειας. Οι ομόζυγοι φορείς του παράγοντα V Leiden είναι πιο συνηθισμένοι (1 ανά 5000 άτομα). Ο θρομβωτικός κίνδυνος για άτομα ομόζυγο για τον παράγοντα V Leiden είναι υψηλός (80πλάσιος έναντι των μη φορέων), αλλά όχι τόσο υψηλός όσο για τα άτομα με ομόζυγες ανεπάρκειες των αναστολέων της πήξης: οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμφανίζουν θρόμβωση έως την ενηλικίωση και μπορεί να παραμείνουν χωρίς συμπτώματα έως τα γηρατειά (Rosendaal FR et al, 1995). Αυτή η κατάσταση φαίνεται επίσης να ισχύει για τους ομόζυγους φορείς προθρομβίνης 20210A (Koster T et al, 1995) την εξήγηση για την απουσία. Πολύ αυξημένος κίνδυνος, σε σύγκριση με αυτόν για ομόζυγες ανεπάρκειες των αναστολέων πήξης, είναι ότι αυτές είναι μεταλλάξεις που οδηγούν σε κέρδος και όχι απώλεια λειτουργίας.

Αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος

Δεδομένου ότι ορισμένες από τις πρόσφατα ανακαλυφθείσες γενετικές ανωμαλίες είναι συχνές, όπως και πολλοί παράγοντες κινδύνου που αποκτήθηκαν, οι κοινές επιπτώσεις τέτοιων παραγόντων στον κίνδυνο θρόμβωσης απαιτούν έρευνα. Σαφείς ενδείξεις συνεργιστικών επιδράσεων προέρχονται από μελέτες σε θρομβοφιλικές οικογένειες, όπου εντοπίστηκαν υψηλοί κίνδυνοι κατά την εγκυμοσύνη και τη λοχεία, και κατά τη διάρκεια της χρήσης από του στόματος αντισυλληπτικών, για γυναίκες με ανεπάρκειες πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S ή αντιθρομβίνης (Freiderich PW et al, 1996). Σε πολλές σειρές μη επιλεγμένων γυναικών με θρόμβωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ο παράγοντας V Leiden ήταν πιο συχνός από ό, τι στον γενικό πληθυσμό. Η συχνότητα του παράγοντα V Leiden μεταξύ αυτών των γυναικών διέφερε ευρέως μεταξύ των μελετών, από 8% στη Σκωτία έως 50-60 % στη Σουηδία, (Bokarewa MI et al, 1996) που αντικατοπτρίζει εν μέρει τις γεωγραφικές διαφορές στην επικράτηση του παράγοντα V Leiden στον πληθυσμό. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ένα σημαντικό μέρος της σχετιζόμενης με την εγκυμοσύνη θρόμβωσης προκύπτει από ταυτόχρονες ανωμαλίες στο αιμοστατικό σύστημα. Μεταξύ των μη επιλεγμένων ασθενών, έχει αποδειχθεί συνεργική επίδραση για τον παράγοντα V Leiden και χρήση αντισυλληπτικών από το στόμα: ο εκτιμώμενος βασικός κίνδυνος θρόμβωσης για άτομα που δεν είναι φορείς και που δεν χρησιμοποιούν αντισυλληπτικά από του στόματος ήταν 0,8 ανά 10.000 άτομα ετησίως. Ο ετήσιος κίνδυνος για γυναίκες με παράγοντα V Leiden που δεν χρησιμοποίησαν αντισυλληπτικά από του στόματος ήταν 5,7 ανά 10.000 άτομα (σχετικός κίνδυνος 6,9), για τις γυναίκες που χρησιμοποίησαν αντισυλληπτικά από το στόμα αλλά δεν έφεραν τον παράγοντα V Leiden ήταν 3,0 ανά 10.000 γυναίκες (σχετικός κίνδυνος 3,7), και για τις γυναίκες με τον παράγοντα V Leiden που χρησιμοποίησαν αντισυλληπτικά από το στόμα ήταν 28,5 ανά 10 000 άτομα (σχετικός κίνδυνος 34,7) (McColl MD et al 1997). Για θρόμβωση εγκεφαλικού κόλπου, έχει αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης για θρομβόφιλα ελαττώματα. Ο συνδυασμός της ανεπάρκειας πρωτεΐνης C, του παράγοντα V Leiden ή της προθρομβίνης 20210A

και της χρήσης από του στόματος αντισυλληπτικού οδήγησε σε αυξημένο κίνδυνο 30 φορές έως 150 φορές, σε σύγκριση με τις γυναίκες που δεν χρησιμοποίησαν αντισυλληπτικά από του στόματος και δεν είχαν τέτοιο ελάττωμα. Αυτοί οι συνδυασμένοι κίνδυνοι είναι πολύ υψηλότεροι από τον ατομικό κίνδυνο που προκύπτει από τη χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών ή από θρομβοφιλικό ελάττωμα (deBruin SF et al, 1998). Για πολλούς συνδυασμούς παραγόντων κινδύνου, δεν υπάρχουν αξιόπιστες εκτιμήσεις κινδύνου και τα συμπεράσματα γίνονται με βάση μόνο μία ή μερικές μελέτες. Για τις πιο συνηθισμένες ανωμαλίες πήξης και για συνδυασμένους επίκτητους παράγοντες κινδύνου (αλληλεπίδραση περιβάλλοντος-περιβάλλοντος), πιθανό να υπάρχουν αποτελέσματα προσεχώς (Rosendaal et al, 1999).

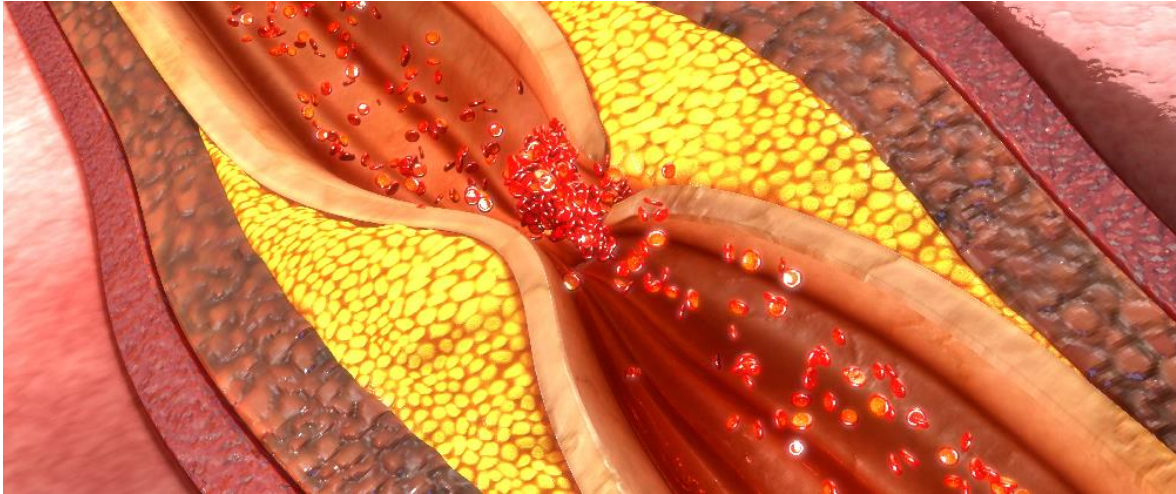
Η βαθιά φλεβική θρόμβωση και η επακόλουθη πνευμονική εμβολή και το μετα-θρομβωτικό σύνδρομο είναι μερικές από τις πιο συχνές διαταραχές. Ένας θρόμβος είτε προκύπτει αυθόρμητα είτε προκαλείται από κλινικές καταστάσεις όπως χειρουργική επέμβαση, τραύμα ή παρατεταμένη ανάπαυση στο κρεβάτι. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η προφύλαξη με χαμηλή δόση αντιπηκτικού είναι αποτελεσματική. Η διάγνωση της βαθιάς φλεβικής θρόμβωσης βασίζεται σε τεχνικές απεικόνισης όπως υπερηχογραφία ή βεντογραφία. Μόνο περίπου το 25% των συμπτωματικών ασθενών έχουν θρόμβο (Fowkes FJL et al, 2003). Έτσι, η κλινική εκτίμηση κινδύνου και η μέτρηση D-διμερούς χρησιμοποιούνται για τον αποκλεισμό της θρόμβωσης βαθιάς φλέβας. Η πρόοδος και ο εμβολιασμός του θρόμβου μπορούν να προληφθούν από ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ακολουθούμενη από ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Η χρήση αυτών των ανταγωνιστών για 3-6 μήνες αρκεί για πολλούς ασθενείς. Εκείνοι με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, με αντιπηκτικό του λύκου, ομόζυγα ή συνδυασμένα ελαττώματα ή με προηγούμενη θρόμβωση βαθιάς φλέβας μπορούν να επωφεληθούν αντιπηκτική αγωγή επ'άοριστον Σε ασθενείς με καρκίνο, η ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους είναι πιο αποτελεσματική και είναι τουλάχιστον εξίσου ασφαλής με τους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Οι γυναίκες φαίνεται να έχουν χαμηλότερο κίνδυνο θρόμβωσης από τους άνδρες, αλλά η εγκυμοσύνη ή η χρήση από του

στόματος αντισυλληπτικών ή η θεραπεία αντικατάστασης ορμονών αντιπροσωπεύουν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου (Kyrle et al, 2005).

Αρτηριακή Θρόμβωση

Η αρτηριακή θρόμβωση είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαταραχή που περιλαμβάνει πολλαπλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι αλληλεπιδρούν για την παραγωγή του χαρακτηριστικού φαινοτύπου. Τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετές έρευνες θέτουν ως επίκεντρο τη μοριακή γενετική των αρτηριακών αγγειακών διαταραχών και έχουν εντοπισθεί πολλοί πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το αιμοστατικό σύστημα και σε ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση και τη βιοδιαθεσιμότητα του νιτρικού οξειδίου (NO). Η αρτηριακή θρόμβωση και οι κλινικές εκδηλώσεις της αντιπροσωπεύουν την κύρια αιτία θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο. Η παθογένεση της αρτηριακής θρομβωτικής νόσου είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει πολλαπλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και τη θρόμβωση, καθώς και την αλληλεπίδρασή τους (Voetsch et al, 2004). Η κύρια αιτία της αρτηριακής θρόμβωσης είναι η ρήξη μιας αθηροσκληρωτικής πλάκας, προκαλώντας πλήρη ή μερική απόφραξη των αγγείων. Όταν εμφανίζεται ρήξη της πλάκας, ο πυρήνας των λιπιδίων του εκτίθεται στο κυκλοφορούν αίμα στον αρτηριακό αυλό. Η περιοχή πυρήνα της πλάκας περιέχει ιστικό παράγοντα (TF) και θραύσματα κολλαγόνου, τα οποία είναι πολύ θρομβογόνα (Bassand JP et al, 2007). Η κυκλοφορία του TF αυξάνεται επίσης σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και μπορεί να συμβάλει στη θρόμβωση μετά ρήξη πλάκας (Davies MJ 2000). Κατά το αρχικό στάδιο της ρήξης της πλάκας, τα αιμοπετάλια στρατολογούνται γρήγορα στην περιοχή, ακολουθούμενη από συσσωμάτωση και την προκύπτουσα ταχεία ανάπτυξη του θρόμβου (Εικ. 7). Ο καταρράκτης πήξης ενεργοποιείται επίσης σε αυτό το στάδιο με το σχηματισμό θρομβίνης, η οποία ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προάγουν περαιτέρω πρόσληψη αιμοπεταλίων, πρόσφυση, συσσωμάτωση και ενεργοποίηση (Mackman N. 2008). Έτσι, ένας αρτηριακός θρόμβος είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια και εκτίθεται σε αίμα που ρέει

γρήγορα. Το συστατικό ινώδους του θρόμβου αυξάνεται καθώς εκτείνεται στον αρτηριακό αυλό, αν και η επιφάνεια του θρόμβου που εκτίθεται στο αίμα στον αυλό θα καλυφθεί από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Ένα χαλαρό δίκτυο ινώδους με μεγάλο αριθμό παγιδευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί επίσης μέρος του θρόμβου στο τελικό στάδιο της θρόμβωσης (Turpie et al, 2011). Αρκετές πρόσφατες μελέτες συμφωνούν πως ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων υποδηλώνει την πιθανότητα σύνδεσης μεταξύ φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης. Οι δύο αγγειακές επιπλοκές μοιράζονται διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως ηλικία, παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη, υπέρταση αίματος, υπερτριγλυκεριδαιμία και μεταβολικό σύνδρομο (Prandoni et al, 2009). Όσον αφορά την ηλικία η επίπτωση τόσο της φλεβικής όσο και της αρτηριακής θρόμβωσης αυξάνεται εκθετικά με την ηλικία τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Πιθανοί λόγοι περιλαμβάνουν: αύξηση της ακινησίας, τραύμα, χειρουργική επέμβαση, αύξηση του επιπολασμού (και / ή σωρευτικών επιδράσεων) της παχυσαρκίας, της αρτηριακής πίεσης, δυσλιπιδαιμία και δυσανεξία στη γλυκόζη, αύξηση του επιπολασμού της αθηροσκλήρωσης και αύξηση των κυκλοφορούντων δεικτών φλεγμονής (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, CRP) και θρόμβωσης (Rich-Edwards W. 1995). Ενώ η αρτηριακή θρόμβωση είναι λιγότερο συχνή στις γυναίκες, ο σχετικός κίνδυνος για κλασικούς παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι τουλάχιστον τόσο ισχυρός στις γυναίκες όσο και στους άνδρες. Αξίζει να σημειωθεί πως αυξημένος κίνδυνος αρτηριακής θρόμβωσης έχει παρατηρηθεί και με βάση την ορμονολογική κατάσταση τόσο των γυναικών όσο και των ανδρών. Συγκεκριμένα οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν χαμηλότερο κίνδυνο αρτηριακής θρόμβωσης (στεφανιαία, εγκεφαλική ή άκρη) σε σύγκριση με τους προεμμηνοπαυσιακούς άνδρες. Οι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν υψηλότερα επίπεδα υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης, χοληστερόλης (Burchfield CM et al, 1995) και χαμηλότερα επίπεδα αιματοκρίτη και ιξώδους αίματος ή πλάσματος. Ωστόσο υπάρχουν λιγότερες πληροφορίες σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου για αρτηριακή θρόμβωση σε γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες (Lowe et al, 2005).



Εικόνα 7: Αρτηριακή Θρόμβωση (Shutterstock.com)

Μηχανισμός

Με τον όρο θρόμβωση εννοούμε την ενδοκοιλιακή μερική ή πλήρη απόφραξη ενός αγγείου από έναν θρόμβο λόγω αλλαγών στα προϋπάρχοντα συστατικά του αίματος: αυτά μπορεί να επηρεάσουν είτε τα κυτταρικά στοιχεία είτε το πλάσμα ή και τις δύο αυτές ουσίες. Η θρόμβωση εμφανίζεται συχνότερα στις φλέβες, αλλά βρίσκεται επίσης στα τριχοειδή αγγεία, στις αρτηρίες και στην καρδιά. Αυτό το φαινόμενο προηγείται ή σχετίζεται με διαταραχές στη χημική σύσταση ή στην κυκλοφορία του αίματος, με φλεγμονώδεις διαδικασίες ή τραυματισμούς στο αγγειακό τοίχωμα (Medved LV et al, 1983). Η δημιουργία αιμοστατικού θρόμβου απαιτεί τη μεσολαβούμενη από θρομβίνη μετατροπή ινωδογόνου σε ινώδες. Προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση θρόμβου που υπάρχει τη στιγμή της ζελατινοποίησης επηρεάζει βαθιά τη δομή της ίνας ινώδους. Οι θρόμβοι που σχηματίζονται παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων θρομβίνης αποτελούνται από παχιές ίνες ινώδους και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ινωδόλυση, ενώ, ο σχηματισμός θρόμβου παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων θρομβίνης αποτελείται από λεπτές ίνες και είναι σχετικά ανθεκτικός στην ινωδόλυση. Ενώ οι περισσότερες μελέτες σχηματισμού θρόμβων έχουν πραγματοποιηθεί προσθέτοντας μια σταθερή

ποσότητα καθαρισμένης θρομβίνης στο ινωδογόνο, ο σχηματισμός θρόμβων *in vivo* λαμβάνει χώρα σε ένα πλαίσιο συνεχών, δυναμικών αλλαγών στη συγκέντρωση θρομβίνης (Ferry JD et al, 1987). Αυτές οι αλλαγές εξαρτώνται από τις τοπικές συγκεντρώσεις των προπηκτικών και των κυτταρικών δραστηριοτήτων. Μια βασική ερώτηση για την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε θρόμβωση είναι: «Πώς οι αντιδράσεις πήξης καταλήγουν στην παραγωγή ενός σταθερού θρόμβου ινώδους;». Οι μηχανισμοί παραγωγής ινώδους και συγκρότησης του θρόμβου έχουν διευκρινιστεί κυρίως από μελέτες στις οποίες προστίθεται μια συγκεκριμένη ποσότητα θρομβίνης στο καθαρισμένο ινωδογόνο. Η θρομβίνη συνδέεται στο κεντρικό E οξίδιο του ινωδογόνου και απομακρύνει τα N τερματικά πεπτίδια των αλυσίδων Aa και Bb. Η θρομβίνη διασπά τις πρώτες αλυσίδες Aa, απομακρύνοντας το N-τερματικό υπόλειμμα του 16 πεπτιδίου (ινωδοπεπτίδιο A, FpA). Η αφαίρεση του FpA εκθέτει μια νέα ακολουθία N-τερματικού GPRVVE, γνωστή ως ιστότοπος «A». Αυτός ο ιστότοπος «A» αντιστοιχεί στη μη ομοιοπολική ένωση του κεντρικού οξιδίου με ένα συστατικά εκτεθειμένο "α" στην αλυσίδα Γ του οξιδίου ενός άλλου μορίου ινωδογόνου (Betts L et al, 2006).

3.1.2 Συμμετοχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η πρώτη δημοσιευμένη κλινική παρατήρηση που υποδηλώνει ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) μπορεί να διαδραματίσουν ενεργό ρόλο στην αιμόσταση έγινε το 1910 από τον Duke (Burch GE et al, 1962), ο οποίος σημείωσε ότι οι θρομβοκυτταροπενικοί ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση στους χρόνους αιμορραγίας μετά τη μετάγγιση, παρόλο που ο αριθμός των αιμοπεταλίων τους παρέμεινε χαμηλός. Αν και δεν υπήρχε τίποτα που να τεκμηριώνει ότι το ερυθρό ήταν το υπεύθυνο συστατικό, η μεγάλη αύξηση των RBCs στο αγγειακό σύστημα

(παρά την καμία αύξηση στα αιμοπετάλια) το κατέστησε τον πιθανότερο υποψήφιο. Πενήντα χρόνια αργότερα, ο Hellem (Sorlie PD et al, 1981) πραγματοποίησε ελεγχόμενες μελέτες με στόχο την αξιολόγηση των πιθανών επιπτώσεων του αιματοκρίτη στην αιμόσταση. Εξετάζοντας αναιμικούς ασθενείς με αιμορραγικές ανωμαλίες, παρατήρησε μείωση του χρόνου αιμορραγίας μετά τη μετάγγιση πλυμένων ερυθρών. Επειδή ο αριθμός των αιμοπεταλίων των ασθενών μειώθηκε ελαφρώς, ο αιτιολογικός παράγοντας θεωρήθηκε και πάλι ότι ήταν το ερυθροκύτταρο. Σε αντίθεση με μια ξεπερασμένη αντίληψη ότι τα ερυθροκύτταρα παίζουν έναν παθητικό και δευτερεύοντα ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, τις τελευταίες δεκαετίες υπήρξαν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν βιολογικά και κλινικά σημαντικές λειτουργίες στην πήξη του αίματος και διαταραχές. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ικανότητα των αποθηκευμένων και παθολογικά αλλοιωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων να παράγουν θρομβίνη μέσω έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης. Το προπηκτικό και προθρομβωτικό δυναμικό των μικροσωματιδίων που προέρχονται από ερυθροκύτταρα που μεταγγίστηκαν με αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια ή σχηματίστηκαν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με αιμόλυση έχει περιγραφεί μαζί με προθρομβωτικά αποτελέσματα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και αίμης (Carr ME et al, 1987). Η δέσμευση ινωδογόνου ή ινώδους σε ένα ερυθρό μπορεί να επηρεάσει τις επιδράσεις τους στη δομή του δικτύου ινώδους, στις μηχανικές ιδιότητες θρόμβων και στην ινωδολυτική αντίσταση. Πρόσφατα δεδομένα που αφορούν τη συστολή θρόμβου που οδηγούνται από αιμοπετάλια δείχνουν ότι τα ερυθρά που συμπιέζονται από τα αιμοπετάλια που αλληλεπιδρούν με το ινώδες σχηματίζουν μια σφιχτά συσκευασμένη σειρά πολυεδρικών ερυθροκυττάρων ή πολυαιδροκυττάρων, η οποία περιλαμβάνει ένα σχεδόν αδιαπέραστο φράγμα σημαντικό για την αιμόσταση και την επούλωση τραυμάτων. Τα ερυθρά μπορεί να εκτελούν διπλούς ρόλους, βοηθώντας και τους δύο να σταματήσουν την αιμορραγία, αλλά ταυτόχρονα συμβάλλουν στη θρόμβωση με διάφορους τρόπους (Byrnes et al, 2017). Η μελέτη των ερυθροκυττάρων αποτελούσε το επίκεντρο της αιματολογίας, όπως ήταν η αιμόσταση και η θρόμβωση, αλλά μέχρι πρόσφατα, υπήρξε μικρή αλληλεπικάλυψη σε αυτές τις δύο περιοχές, επειδή οι περισσότεροι επιστήμονες

και κλινικοί έχουν υποθέσει ότι τα ερυθρα παίζουν σχετικά ασήμαντο ρόλο στη θρόμβωση και την αιμόσταση. Ωστόσο, πλέον είναι προφανές ότι τα ερυθρά εκτελούν ποικίλες σημαντικές λειτουργίες και έχουν σημαντική επίδραση στην πήξη του αίματος, στην αιμόσταση και στη θρόμβωση (Barr JD et al, 2013). Αυτή η έννοια βασίζεται στις κύριες παρατηρήσεις που περιλαμβάνουν μειωμένη αιμορραγία σε υψηλό αιματοκρίτη ανεξάρτητα από τον αριθμό των αιμοπεταλίων και την προδιάθεση για θρόμβωση που σχετίζεται με αύξηση του αριθμού RBC, συγγενείς ερυθροειδείς ασθένειες και διάφορες επίκτητες παθολογικές καταστάσεις που αλλάζουν τις ιδιότητες των ερυθροκυττάρων. Μια σχετικά υψηλή συχνότητα εμφάνισης θρομβωτικών επιπλοκών μετά από μεταγγίσεις ερυθρών παρέχει ένα άλλο ισχυρό επιχείρημα για την εμπλοκή των ερυθροκυττάρων σε διαταραχές πήξης του αίματος, αν και ο κίνδυνος θρόμβωσης μπορεί επίσης να αποδοθεί στην υποκείμενη ασθένεια, η οποία μπορεί να μειώσει την αιτιότητα της μετάγγισης αίματος για θρόμβωση. Εκτός από τις κλινικές παρατηρήσεις και τις πειραματικές μελέτες, η υπολογιστική μοντελοποίηση της θρόμβωσης με έμφαση στις επιδράσεις των ερυθροκυττάρων παρείχε ποσοτικές και μηχανιστικές γνώσεις (Litvinov et al, 2017).

Τα ερυθρά μπορεί να συμβάλλουν στη θρόμβωση με διάφορους τρόπους. Πρώτον, αυξάνουν το ιξώδες του αίματος και περιορίζουν τα αιμοπετάλια προς το ενδοθήλιο, τοποθετώντας τα σε πολύ κοντινή απόσταση από θέσεις αγγειακού τραύματος. Δεύτερον, ένα κλάσμα των ερυθρών εκφράζει φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνειά τους και *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι τα RBC's μπορούν να υποστηρίξουν τη δημιουργία θρομβίνης, υποδηλώνοντας έτσι ότι μπορούν να προάγουν την εναπόθεση ινώδους κατά τη διάρκεια της φλεβικής θρόμβωσης (Wang W et al, 2013). Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης συσχετίζεται με ενδογενείς δείκτες ενεργοποίησης της πήξης σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο ή δρεπανοκυττάρωση (Sickle cell disease ή SCD) (Uitte de Willige S et al, 2005). Τρίτον, τα ερυθρά φαίνεται να ασκούν άμεσα, πολύπλοκες επιδράσεις στη δομή και τη σταθερότητα του θρόμβου. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν το μέγεθος των πόρων στο δίκτυο ινώδους, αλλά μειώνουν τη διαπερατότητα του δικτύου ινώδους (Nowak-Gottl U et al, 2009), ενώ η παρουσία τους σε θρόμβους καταστέλλει την παραγωγή πλασμίνης και μειώνει

τη διάλυση θρόμβων [30]. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η μείωση της περιεκτικότητας ερυθρών σε θρόμβους θα επιταχύνει την διάλυση θρόμβων (Aleman et al, 2014). Η παρουσία των ερυθροκυττάρων επηρεάζει τη δομή των θρόμβων ινώδους. Οι ενδιάμεσες συγκεντρώσεις ερυθρών προκαλούν ετερογένεια στο δίκτυο ινών με θύλακες πυκνών ινών παράλληλα με περιοχές με λίγες ίνες. Σε υψηλά επίπεδα ερυθρών, οι ίνες διατάσσονται πιο ομοιόμορφα αλλά χαλαρά γύρω από τα κύτταρα. Παρατηρείται επίσης σημαντική αύξηση της διαμέτρου των ινών κατά την ενσωμάτωση του ερυθρού και επηρεάζονται οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες του θρόμβου. Εκτός από τα αποτελέσματα ανέπαφων ερυθροκυττάρων, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος παρατείνει τον χρόνο πήξης του ινωδογόνου λόγω μειωμένου πολυμερισμού (Omarova F et al, 2013). Ως εκ τούτου, άθικτα ή κατεστραμμένα ερυθρά προκαλούν μεταβλητότητα στη δομή του δικτύου ινώδους, μεμονωμένα χαρακτηριστικά ινών και συνολική ιξωδοελαστικότητα θρόμβου, η οποία έχει σημαντικές επιπτώσεις στον σχηματισμό θρόμβων *in vivo*, την ωρίμανση, τη σταθερότητα, τον εμβολισμό και την αποτελεσματικότητα της προφυλακτικής αντιπηκτικής και θεραπευτικής ινωδολύσης (Gersh KC et al, 2009). Έχει αποδειχθεί ότι η κατακράτηση ερυθρών εντός θρόμβων καθορίζει το μέγεθος του θρόμβου που εξαρτάται από τη δραστηριότητα του παράγοντα XIIIa, μια τρανσγλουταμινάση πλάσματος που διασυνδέει το πολυμερές ινώδες αυξάνοντας ομοιοπολικά τη μηχανική του σταθερότητα, μέσω διασύνδεσης των αλυσίδων α ινώδους (Tratar G et al, 2007). Τα ερυθροκύτταρα, λοιπόν, ενσωματώνονται σε όλους τους τύπους θρόμβων και στους θρόμβους που σχηματίζονται σε ολικό αίμα, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, είτε φλεβικά είτε αρτηριακά. Αξίζει να αναφερθεί πως τα κλινικά δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη φυσιολογική και παθολογική θρόμβωση προέρχονται από πέντε ανεξάρτητα αποδεικτικά στοιχεία: 1) η υπερβολική αιμορραγία που προέρχεται από μια ποικιλία μοριακών αιτιών μπορεί να αντιμετωπιστεί με αύξηση του αιματοκρίτη χωρίς αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, 2) η υπερπαραγωγή των ερυθρών μπορεί να οδηγήσει αντιστρόφως σε αυξημένη συχνότητα θρόμβωσης, 3) οι κληρονομικές ανωμαλίες των ερυθροκυττάρων μπορούν να προδιαθέσουν έναν ασθενή σε θρόμβωση, ακόμη και όταν όλα τα άλλα συστήματα πήξης είναι φυσιολογικά, 4) καταστάσεις

που μεταβάλλουν έμμεσα τις ιδιότητες των ερυθρών μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αυξημένο δυναμικό πήξης και 5) ορισμένοι φαρμακολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία θρομβοεμβολικών ασθενειών πιστεύεται ότι δρουν κυρίως σε ερυθρά (Kuypers FA et al, 1996). Αν και οι μοριακές βάσεις αυτών των παρατηρήσεων δεν είναι ακόμα καλά κατανοητές, μπορούν να προβλεφθούν αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί συμμετοχής των ερυθρών στην ανάπτυξη του θρόμβου (Landolfi R et al, 2004). Μέσω του δυνητικού του αντίκτυπου στο ιξώδες του αίματος, το ερυθροκύτταρο θα μπορούσε να μεταβάλει τις ρεολογικές μεταβλητές που διέπουν τη θρόμβωση. Μέσω της ικανότητάς του να απομακρύνει την αδενοσίνη (έναν αντιθρομβωτικό παράγοντα) και την απελευθέρωση ADP (προθρομβωτικός παράγοντας) μέσα στο πλάσμα, το ερυθροκύτταρο μπορεί να ρυθμίσει σημαντικά τα επίπεδα σημαντικών μορίων σήματος που ελέγχουν την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων. Με τη δυνατότητα να κινητοποιήσουν υποδοχείς προσκόλλησης για τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-κυττάρων, το ερυθρό μπορεί να προσληφθεί για μεγέθυνση ή στερεοποίηση ενός αυξανόμενου θρόμβου (Gilson CR et al, 2009). Τέλος, η ικανότητα του ερυθροκυττάρου να εκθέσει τη φωσφατιδυλοσερίνη ταχέως στην επιφάνεια του θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την ταχεία ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης. Οι οδοί μεταγωγής σήματος που απαιτούνται για την κινητοποίηση αυτών των διαφόρων αποκρίσεων είναι και οι δύο παρούσες και ενεργές σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Με βάση αυτές τις σκέψεις, συμπεραίνουμε ότι το ερυθροκύτταρο είναι πιθανώς ένα σημαντικό συστατικό στις πολύπλοκες αντιδράσεις που οδηγούν σε σχηματισμό θρόμβων (Andrews et al, 1999)

3.1.3 Επιδράσεις στα αιμοπετάλια

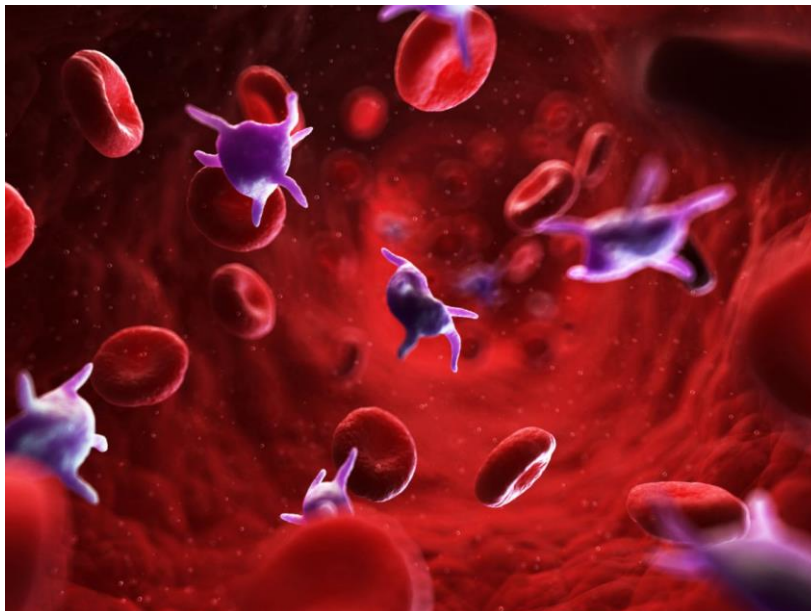
Το αίμα είναι ο μόνος ιστός που έρχεται σε επαφή με όλους τους άλλους ιστούς του σώματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) και τα αιμοπετάλια (PLTs) είναι πολύ άφθονα, εξαιρετικά εξειδικευμένα, βραχύβια, κυκλοφορούντα κύτταρα. Αν και οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων είναι φαινομενικά απλοί στη δομή τους, υπάρχουν συσσωρευμένες ενδείξεις ότι αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται στην πραγματικότητα από πολύ περίπλοκη φυσιολογία οξειδοαναγωγής, ρυθμίζοντας τις κανονικές και μη κανονικές λειτουργικές τους ιδιότητες, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους (Cortesse-Krott et al, 2019)

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στο ιξώδες του αίματος, το οποίο αυξάνεται μη γραμμικά με τον αιματοκρίτη και περιλαμβάνει έναν παθογόνο μηχανισμό θρόμβωσης. Το αυξημένο ιξώδες επιβραδύνει τη ροή και μπορεί να είναι ένας ισχυρός προθρομβωτικός παράγοντας ως συστατικό της τριάδας του Virchow, ο οποίος αντιπροσωπεύει τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς θρόμβωσης ως συνδυασμό ενδοθηλιακών βλαβών, υπερπηκτικότητας και διαταραχής της ροής του αίματος. Τέτοιες αυξήσεις στο ιξώδες αίματος μπορεί να προωθήσουν την περιθωριοποίηση των αιμοπεταλίων και να έχουν φυσικές επιδράσεις στην αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων, επειδή η πρόσφυση των αιμοπεταλίων αυξάνεται με τον αιματοκρίτη (Lamrani L et al, 2014).

Ωστόσο, ο άμεσος συσχετισμός μεταξύ αιματοκρίτη και προθρομβωτικού φαινοτύπου έχει εξαιρέσεις. Ο αυξημένος αιματοκρίτης σε ζωικά μοντέλα πολυκυτταραιμίας ή ερυθροκυττάρωσης που προκλήθηκε από ερυθροποιητίνη δεν συσχετίστηκε με θρόμβωση. Επιπλέον, η αυξημένη θρόμβωση που προκλήθηκε από FeCl₃ σε ποντίκια πολυκυτταραιμίας συνδέθηκε με αυξημένο χρόνο αιμορραγίας της ουράς, ίσως ως αποτέλεσμα ταυτόχρονης ανεπάρκειας GPVI και μειωμένης πολυμερισμού του παράγοντα von Willebrand Η ίδια τάση αιμορραγίας αποκαλύφθηκε σε ποντίκια με εξαιρετικά υψηλό αιματοκρίτη (85%), ενώ τα ζώα με χαμηλότερο αιματοκρίτη δεν διέκριναν από τους μάρτυρες σε μοντέλο θρόμβωσης, υποδηλώνοντας ότι οι προθρομβωτικές επιδράσεις των

ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να επηρεάζουν την ομαλή λειτουργία των αιμοπεταλίων (Εικ. 8) (Weisel, J. W. et al, 2019).

Σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν και βασίστηκαν σε υπολογιστικές προσομιώσεις, φυσιολογικά κλάσματα όγκου παραμορφώσιμων ερυθρών αιμοσφαιρίων και άκαμπτων ελλειπτικών σωματιδίων μεγέθους αιμοπεταλίων μελετήθηκαν υπό συνθήκες αρτηριακής ροής. Η πτώση των αιμοπεταλίων στη ζώνη εξάντλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων κοντά στα τοιχώματα των αγγείων επηρεάστηκε έντονα από τα κοντινά ερυθρά αιμοσφαίρια (Tilles, A. W. Et al, 1987) Το πάχος της εξαντλημένης ζώνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώθηκε πολύ κοντά σε έναν θρόμβο και τα αιμοπετάλια σε αυτή τη ζώνη ωθήθηκαν κοντά στην επιφάνεια του θρόμβου σε αποστάσεις που θα διευκόλυναν τη συνοχή τους σε αυτόν. Η απόσταση, η φύση και η διάρκεια των στενών συναντήσεων αιμοπεταλίων-θρόμβων επηρεάστηκαν από το πορώδες του θρόμβου. Ωστόσο, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η ισχυρή επίδραση στις αιμοπεταλιακές κινήσεις της κίνησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το πορώδες του θρόμβου για να κατανοηθεί η δυναμική της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε έναν αναπτυσσόμενο θρόμβο (Skorczewski et al, 2013).



Εικόνα 8: Αλληλεπίδραση ερυθροκύτταρο-αιμοπετάλιο (Klatt et al, 2018)

Παράδειγμα: Μοντέλο αναιμικών ποντικών

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) επηρεάζουν τη ρεολογία και απελευθερώνουν ADP, ATP και νιτρικό οξείδιο, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον ρόλο τους στην αιμόσταση και θρόμβωση, όπως έχει αναφερθεί. Σύμφωνα με έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε ποντίκια με αναιμία, ένας μικρός πληθυσμός ερυθροκυττάρων εντοπίστηκε στους θρόμβους αιμοπεταλίων και ενίσχυσε την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με άμεση κυτταρική επαφή μέσω της οδού FasL/FasR (CD95), προκαλώντας ως γνωστόν απόπτωση. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων οδήγησε σε έκθεση FasL αιμοπεταλίων που ενεργοποίησε το FasR στα ερυθρά που είναι υπεύθυνα για την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στη μεμβράνη των ερυθρών. Η αναστολή ή η γενετική διαγραφή είτε του FasL είτε του FasR οδήγησε σε μειωμένη έκθεση PS των ερυθρών και αιμοπεταλίων, μειωμένη παραγωγή θρομβίνης και μειωμένο σχηματισμό θρόμβων *in vitro* και προστασία από αρτηριακή θρόμβωση *in vivo*. Οι άμεσες κυτταρικές επαφές μεταξύ αιμοπεταλίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω FasL/FasR εμφανίστηκαν μετά από απολίνωση της κάτω κοίλης φλέβας (IVC) και σε χειρουργικά δείγματα ασθενών μετά από θρομβεκτομή (Klatt et al, 2018).

3.2 Αλληλεπιδράσεις των ερυθρών με αγγειακά κύτταρα κατά την διάρκεια της θρομβογένεσης

3.2.1 Δημιουργία θρομβίνης

Ένα υποσύνολο φυσιολογικών κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων, καθώς και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων, έχουν εκθέσει φωσφατιδυλοσερίνη στις εξωτερικές μεμβράνες τους μπορούν να αυξήσουν την έκθεση τους σε φωσφατιδυλοσερίνη. Παρόλο που η φωσφατιδυλοσερίνη στα ερυθρά μπορεί να ενεργοποιήσει την οδό επαφής και να υποστηρίξει την παραγωγή θρομβίνης *in vitro*, (Semeraro F et al, 2014) η συμβολή της δημιουργίας θρομβίνης που προκαλείται από ερυθροκύτταρα και ολικά κυστίδια στην θρόμβωση *in vivo* είναι άγνωστη. Σε ένα μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε ποντίκια, ο αυξημένος αιματοκρίτης δεν αυξάνει τα κυκλοφορούντα σύμπλοκα θρομβίνης-αντιθρομβίνης, που θεωρείται δείκτης ενεργοποίησης της πήξης (Kuypers FA et al, 1996). Επιπλέον, η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στα RBC's δεν προβλέπει θρόμβωση σε μοντέλο ποντικού HS, και σε *ex vivo* παραγωγή θρομβίνης σε ολικό αίμα από ασθενείς με δρεπανοκυττάρωση συσχετίζεται αντιστρόφως με έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (Wandersee NJ et al, 2000). Ωστόσο, τόσο η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης όσο και τα ολικά κυστίδια είναι αυξημένα σε ασθενείς με SCD, και το κυκλοφορούν θραύσμα προθρομβίνης 1.2, άλλος ένας δείκτης ενεργοποίησης της πήξης, είναι αυξημένος σε ασθενείς με SCD και σχετίζεται με την έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στα ερυθρά (Whelihan MF et al, 2016). Έτσι, τα ερυθρά μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή θρομβίνης σε ορισμένες καταστάσεις. Τα ερυθρά μπορούν να ενισχύσουν την προπηκτική δράση των μονοκυττάρων που έχουν υποστεί επεξεργασία? με λιποπολυσακχαρίτη και / ή να συμβάλλουν στην παραγωγή θρομβίνης εντός των πλούσιων σε RBC's φλεβικών θρόμβων (Byrnes et al, 2017).

Σε μια μελέτη διερευνήθηκε η παραγωγή θρομβίνης σε πλήρες ανθρώπινο αίμα, σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP)

και σε πλάσμα συμπληρωμένο με ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs). Η δημιουργία θρομβίνης χαρακτηρίστηκε από τον χρόνο καθυστέρησης πριν από την έκρηξη της θρομβίνης και από το ενδογενές δυναμικό θρομβίνης (ETP). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε φυσιολογικό αιματοκρίτη βρέθηκε πως επηρεάζουν τον χρόνο καθυστέρησης στον ίδιο βαθμό με τα αιμοπετάλια. Όταν η δημιουργία θρομβίνης πραγματοποιήθηκε σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα, τόσο ο χρόνος ETP όσο και ο χρόνος καθυστέρησης εξαρτώνταν από τον αριθμό των αιμοπεταλίων ή από τον αιματοκρίτη, αλλά τα σχήματα των καμπυλών δόσης-απόκρισης ήταν διαφορετικά. Η αναστολή δημιουργίας θρομβίνης σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα από δύο άμεσους αναστολείς θρομβίνης και παράγοντα Χα: ιρουδίνη και DX 9065A, και δύο εξαρτώμενα από την αντιθρομβίνη III (AT) αντιπηκτικά: ηπαρίνη και SR 90107A βρέθηκε να είναι παρόμοια με αυτά στο πλάσμα πλούσιο σε ερυθροκύτταρα και σε αυτό με αιμοπετάλια : η ιρουδίνη και η DX 9065A καθυστέρησαν μόνο την δημιουργία ενώ η ηπαρίνη και η SR 90107A καθυστέρησαν και μείωσαν την δημιουργία θρομβίνης (Peyrou, V et al, 1999).

Οι διαταραχές της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης δημιουργούν μια προπηκτική επιφάνεια που υποστηρίζει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου προθρομβινάσης και την επακόλουθη παραγωγή θρομβίνης. Η εξέλιξη της προπηκτικής επιφάνειας εξαρτάται εν μέρει από την έκθεση των προπηκτικών φωσφολιπιδίων. Ένας υποπληθυσμός των ερυθροκυττάρων που εκφράζουν PS (περίπου 0-5% σε υγιή άτομα) είναι ικανός να χρησιμεύσει ως συμπαράγοντας για τη συναρμολόγηση της προθρομβινάσης (Kawakami S et al, 1995). Χρησιμοποιώντας τον ιστικό παράγοντα ως ενεργοποιητή, εκτιμήθηκε ότι αυτός ο υποπληθυσμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να αντιπροσωπεύει πάνω από το 40% του δυναμικού δημιουργίας θρομβίνης του πλήρους αίματος. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε καταστάσεις όπως η δρεπανοκυτταρική νόσος όπου τα ερυθρά που εκφράζουν PS είναι σχετικά άφθονα. Σε σχετικές έρευνες αναφέρθηκε μια άμεση προπηκτική επίδραση των RBC's στην ενεργοποίηση του παράγοντα πήξης IX. Τα κατεστραμμένα ερυθρά απελευθερώνουν επίσης κυτταρικά συστατικά όπως ελεύθερη, εξωκυττάρια αιμοσφαιρίνη και μικροσωματίδια προερχόμενα από την μεμβράνη και παρέχουν προθρομβωτικά σήματα σε άλλα κύτταρα (Van Der Meijden PE et al, 2012). Το ολικό αίμα ρυθμίζει τη δραστηριότητα

της οξυγενάσης, δημιουργεί αντιδραστικά είδη οξυγόνου και ενεργοποιεί απευθείας τα ενδοθηλιακά και μακροφάγα, σηματοδοτώντας μέσω υποδοχέων τύπου Toll [59–61] Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται από –τη λύση των ερυθρών είναι τοξική για πολλά κύτταρα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ενδοθηλίου, και ιδιαίτερα βλαβερή για τους νεφρούς. Η βλάβη των κυττάρων μετριάζεται από μια σειρά προστατευτικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων πρωτεϊνών όπως η απτοσφαιρίνη, η αιμοπεξίνη και η α-μικροσφαιρίνη. Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι ικανά να ενεργοποιούν την πήξη, εν μέρει μέσω έκθεση της PS, αλλά επίσης ενδεχομένως από την εξαρτώμενη από τον παράγοντα XII παραγωγή θρομβίνης . Τα ερυθροκυτταρικά μικροκυστίδια προκαλούν οξειδωτικό στρες και απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μικροαγγειακή απόφραξη στο νεφρικό μικροαγγειακό σύστημα, ενώ η αιμοσφαιρίνη σωληνοειδές τριχοειδές ενδοθήλιο σε νεφρούς ασθενών με SCD με σπειραματοπάθειες (Gao Y et al, 2013). Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά μπορούν επίσης να ρυθμίσουν την αντιπηκτική λειτουργία του συστήματος πρωτεΐνης C, να ενισχύσουν τη συστηματική φλεγμονή μέσω της ενεργοποίησης της συμπληρωματικής οδού μέσω της θρομβίνης και της απομάκρυνσης NO. Τέλος, να σημειωθεί πως σε αρκετές αιμολυτικές καταστάσεις, όπως είναι η δρεπανοκυτταρική νόσος, θαλασσαιμία, παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία και αιμολυτικές αντιδράσεις μετάγγισης, η απελευθέρωση αυτών των κυτταρικών συστατικών θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στην ενεργοποίηση της πήξης και των κλινικών επακόλουθων (Villa et al, 2016).

3.2.2 Επιδράσεις στο τοίχωμα του αγγείου

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να ενσωματωθούν σε θρόμβους μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων με ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και/ή εκτεθειμένη υπο-ενδοθηλιακή μήτρα (Kaul DK et al, 2009]. Τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια δεν αλληλεπιδρούν με το ενδοθήλιο

αλλά γίνονται ιδιαίτερα κολλώδη υπό ορισμένες παθολογικές συνθήκες και αυτή η πρόσφυση μη φυσιολογικών και/ή διεγερμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ενδοθήλιο των αγγείων μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά σε μικροαγγειακές αποφράξεις που σχετίζονται με θρόμβωση. Οι πιο συνηθισμένες παθολογικές καταστάσεις στις οποίες τα ερυθρά αιμοσφαίρια αλληλεπιδρούν με το ενδοθήλιο περιλαμβάνουν τη δρεπανοκυτταρική νόσο την ελονοσία και τον διαβήτη (Smith JD et al, 2013). Δομικές και μεταβολικές αλλαγές στα ερυθρά αιμοσφαίρια, υπό συνθήκες αποθήκευσης, έχουν μεγαλύτερη αντοχή πρόσφυσης στο ενδοθήλιο (Litvinov et al, 2017).

Τα άθικτα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να προσκολληθούν απευθείας στο ενδοθήλιο ή στο υποενδοθηλιακό πλέγμα ή να συνδεθούν μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες και/ή κύτταρα του αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων (Colin Y et al, 2014). Μελέτες σχετικά με τα δρεπανοκυτταρικά ερυθρά αιμοσφαίρια εμπλέκουν πολλούς υποδοχείς (π.χ. ομάδα αίματος ερυθροειδούς Lutheran / μόριο προσκόλλησης βασικών κυττάρων, ιντεγκρίνη α4Ββ1, CD36, θειικά γλυκολιπίδια, μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης-4 και φωσφατιδυλοσερίνη) και προσδέματα (π.χ. β3 ιντεγκρίνες, θρομβοσπονδίνη, λαμινίνη, ινωδονεκτίνη και ινώδες [ogen]) σε αυτές τις συγκολλητικές αλληλεπιδράσεις, (Wautier JL et al, 1983) οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν ιδιαίτερα στη φλεβική απόφραξη. Ομοίως, στην εγκεφαλική ελονοσία, τα μολυσμένα ερυθρά εμφανίζουν ενισχυμένη δέσμευση στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο μέσω αλληλεπιδράσεων με τον παράγοντα von Willebrand ο οποίος είναι συνδεδεμένος με αιμοπετάλια (Hermann P et al 2003). Αυτή η εξαρτώμενη από αιμοπετάλια CD36 προσκόλληση ερυθροκυττάρων μπορεί να συμβάλει στην απομόνωση του ερυθρού και στην απόφραξη του μικροαγγειακού εγκεφάλου. Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται από τα αιμολυμένα ερυθρά μπορεί να απομακρύνει το νιτρικό οξείδιο και να αναστέλλει ενδογενείς μηχανισμούς για την πρόληψη της αγγειοσυστολής, καθώς και να ενισχύσει τις συγκολλητικές αλληλεπιδράσεις με το τοίχωμα του αγγείου (Bridges DJ et al, 2010). Σε αναιμικούς ασθενείς, οι αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση που προκαλούνται από υποξία μπορεί να αλλάξουν τον ενδοθηλιακό φαινότυπο και να αυξήσουν τον θρομβωτικό κίνδυνο.

3.2.3 Ινωδογόνο και ινώδες

Η ποιότητα του θρόμβου επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα και τα συστατικά που προέρχονται από τα κύτταρα που υπάρχουν στο σημείο του τραυματισμού. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν παλαιότερες μη αναγνωρισμένες επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) στον σχηματισμό, τη δομή και τη σταθερότητα του ινώδους. Αυτά μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην κατανόηση των διαταραχών πήξης (Whelihan MF et al, 2012) Τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπάρχουν στους αιμοστατικούς και θρομβωτικούς θρόμβους, αλλά η ικανότητά τους να επηρεάζουν τον σχηματισμό ή τη λειτουργία θρόμβων δεν είναι σαφής. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να υποστηρίξουν τη δημιουργία θρομβίνης και ως εκ τούτου να μεταβάλλουν την προπηκτική δραστηριότητα στη θέση σχηματισμού θρόμβων (Kattula et al, 2017). Δεσμεύουν το ινωδογόνο και αυτή η αλληλεπίδραση είναι ένας βασικός μεσολαβητής της καθίζησης των ερυθροκυττάρων και του ινώδους του αίματος (Holley L et al, 1999). Ευρήματα από μοντέλα *in vitro* και *in vivo* υποδεικνύουν ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια διατηρούνται σε θρόμβους μέσω διπλής, αλλά ανεξάρτητης, συμβολής της πυκνότητας του δικτύου ινώδους και του παράγοντα πήξης XIII (α) με διαμεσολάβηση α-αλυσίδας ινώδους ινώδους. Η παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τον σχηματισμό θρόμβων αυξάνει επίσης την ετερογένεια του ινώδους δικτύου, αλλά το αν τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν ή μειώνουν το πάχος των ινών ινώδους είναι ασαφές (Wohner N et al, 2011). Μόλις βρεθούν στον θρόμβο, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταβάλλουν τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες του θρόμβου \ και, μειώνοντας την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου, αυξάνουν την αντίσταση των θρόμβων στην ινωδόλυση (Gersh KC et al, 2009). Οι επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη δομή του ινώδους μειώνονται παρουσία επιπιφιμπατίδης, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι επιδράσεις ρυθμίζονται εν μέρει από μια αλληλεπίδραση μεταξύ ινώδους (ογόνου) και ιντεγκρίνης κυτταρικής επιφάνειας. *In vitro*, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μεταβάλλουν την οργάνωση του δικτύου ινώδους και καταστέλλουν τη δημιουργία πλασμίνης (Wohner N et al, 2011) Κατά τη διάρκεια της συστολής των θρόμβων με αιμοπετάλια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα στους θρόμβους συμπιέζονται σε σχήματα («πολυεδρικά κύτταρα») που

επιτρέπουν σφιχτή συσκευασία και μειώνουν τη διαπερατότητα των θρόμβων. (Cines DB et al, 2014) Επομένως, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να καθυστερήσουν την πρόσβαση θρομβολυτικών ενζύμων στον θρόμβο και συνεπώς να παρατείνουν την λύση του θρόμβου.

3.3 Κλινικές εκδηλώσεις διαταραχών θρόμβωσης

3.3.1 Μη φυσιολογικός αιματοκρίτης

Εδώ και καιρό είναι γνωστό πως ο χαμηλός αιματοκρίτης σχετίζεται με παρατεταμένους χρόνους αιμορραγίας, ακόμη και αν ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι φυσιολογικός (Duke WW. 1910). Κατά συνέπεια, πολλές αιμορραγικές διαταραχές έχουν αντιμετωπισθεί με μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων, παρά τα φυσιολογικά ή ακόμη και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων. Αντίθετα, οι ασθενείς με ασυνήθιστα υψηλό αιματοκρίτη, όπως αυτοί με πολυκυτταραιμία ή λήψη ερυθροποιητίνης, συμπεριλαμβανομένων των υγιών αθλητών που εμπλέκονται σε ντόπινγκ (Tokish JM et al, 2004), είναι πιο επιρρεπείς σε θρομβωτικές διαταραχές. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στο ιξώδες του αίματος, το οποίο αυξάνεται μη γραμμικά με τον αιματοκρίτη και περιλαμβάνει έναν παθογόνο μηχανισμό θρόμβωσης (Kroll MH et al, 2007). Επομένως, οι φυσικές επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση εξαρτώνται τόσο από τον αιματοκρίτη όσο και από τις συνθήκες ροής.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα πιο άφθονα αιμοσφαίρια (4,2-6,1 $\times 10^9$ /mL στους ανθρώπους και 6,4-9,4 $\times 10^9$ /mL σε ποντίκια) και κατά συνέπεια αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό του όγκου αίματος. Τα διαστήματα αναφοράς για τον αιματοκρίτη είναι υψηλότερα στους άνδρες από ό, τι στις γυναίκες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει συσχετίσεις μεταξύ αυξημένου

αιματοκρίτη και αρτηριακής θρόμβωσης (Toss F et al, 2013). Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ο κίνδυνος καρδιαγγειακής νόσου (CVD) είναι υπερδιπλάσιος σε ομάδες υψηλού έναντι χαμηλού αιματοκρίτη, καθώς και λόγω της αύξησης της μείζονος ισχαιμικής καρδιακής νόσου σε άτομα με υψηλό αιματοκρίτη, ακόμη και μετά από προσαρμογή για την ηλικία, τη σωματική δραστηριότητα, τη χοληστερόλη, τον δείκτη μάζας σώματος και το κάπνισμα. Αν και οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον κίνδυνο στους άνδρες, (Sabatine MS et al, 2005) σύμφωνα με την μελέτη Framingham επιβεβαιώθηκαν συσχετισμοί μεταξύ αιματοκρίτη και θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα σε νεαρές γυναίκες εξαιτίας της παρεκκλίνουσας από το φυσιολογικό τιμής του αιματοκρίτη (Gagnon DR et al, 1994). Αυτή η μελέτη διαπίστωσε επίσης μια σχέση κινδύνου σχήματος U μεταξύ αιματοκρίτη και εγκεφαλικού επεισοδίου/παροδική ισχαιμική προσβολή σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, με αυξημένο κίνδυνο τόσο χαμηλού όσο και υψηλού αιματοκρίτη. Η ανάλυση ανδρών και γυναικών στη θρομβόλυση μέσω δοκιμών εμφράγματος του μυοκαρδίου αποκάλυψε μια σχέση σχήματος J μεταξύ της αιμοσφαιρίνης και του καρδιαγγειακού συστήματος 30 ημερών με ποσοστά θνησιμότητας. Ο κίνδυνος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου αυξάνεται επίσης σε φαινομενικά υγιή μικρά παιδιά με αναιμία από έλλειψη σιδήρου (Danesh J et al, 2000). Παρόλο που ο κίνδυνος σε αναιμικούς ασθενείς μπορεί να αντικατοπτρίζει αδιάγνωστη νόσο, συννοσηρότητες ή αλλαγές σε άλλα κύτταρα του αίματος (π.χ. δευτερογενής θρομβοκυττάρωση), πιθανός να υποδηλώνουν πολυτροπικές επιδράσεις του αιματοκρίτη στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Ασθενείς με ερυθροκυττάρωση δευτερογενώς από μυελουπερπλαστική νεοπλασία έχουν αυξημένο κίνδυνο τόσο αρτηριακής θρόμβωσης όσο και φλεβικής θρόμβωσης, (Maguire JL et al, 2007) και περίπου το 20% των ασθενών με πολυκυτταραιμία (ΦΒ) εμφανίζουν ως σύμπτωμα θρόμβωση. Έχει παρατηρηθεί πως ο όγκος των συσσωρευμένων κυττάρων που συσχετίζεται θετικά με επεισόδια απόφραξης των αγγείων οδήγησε στην υιοθέτηση των τρεχουσών κλινικών οδηγιών για τη διατήρηση του αιματοκρίτη των ασθενών με πολυκυτταραιμία στο 45%. Κατά συνέπεια, η δοκιμή CYTO-PV έδειξε ότι η θεραπευτική φλεβοτομή διατηρεί τον αιματοκρίτη των ασθενών σε αυτήν την τιμή και σχετίζεται με κίνδυνο θρόμβωσης που είναι σχεδόν τέσσερις φορές χαμηλότερος από αυτόν των

ασθενών με αιματοκρίτη μεταξύ 45% και 50% (Marchioli R et al, 2013). Ωστόσο, οι διαφορές στον αριθμό των λευκοκυττάρων μεταξύ ομάδων χαμηλού και υψηλού αιματοκρίτη δυσκόλεψαν την εύρεση ενός παθολογικού μηχανισμού που εξαρτάται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Di Nisio M et al, 2007) και η σχέση μεταξύ ερυθροκυττάρωσης και θρόμβωσης στην κλωνική ερυθροκυτταρική νόσο παραμένει αμφιλεγόμενη (Prchal JT et al, 2013). Επιπλέον, να σημειωθεί πως δεδομένου ότι αρκετές πολυκυτταρικές καταστάσεις δεν σχετίζονται με αυξημένη θρόμβωση (π.χ. εμφύσημα), άλλοι παράγοντες καθώς και προσαρμοστικές αντιδράσεις μπορεί να τροποποιήσουν τον κίνδυνο θρόμβωσης (Byrnes et al, 2017).

3.3.2 Μη φυσιολογική ποιότητα και λειτουργία ερυθρών

Ασθένειες που περιλαμβάνουν ποιοτικά ελαττώματα ερυθροκυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του ανώμαλου μεγέθους, σχήματος και/ή ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων, σχετίζονται επίσης με θρόμβωση. Οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο (SCD) βιώνουν αγγειο-αποφρακτικές κρίσεις και το 25% των ασθενών με SCD έχουν κλινικά εμφανή εγκεφαλικά μέχρι την ηλικία των 45 ετών, το 50% των οποίων είναι ισχαιμικά (Herbert JM et al, 1996). Τα διμερή D είναι αυξημένα σε ασθενείς με SCD σε σταθερή κατάσταση και κατά τη διάρκεια κρίσης, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα γεγονότα περιλαμβάνουν ένα θρομβωτικό συστατικό. Είναι ενδιαφέρον ότι, παρόλο που η μεμονωμένη θρόμβωση βαθιάς φλέβας είναι ασθενής ή δεν σχετίζεται με το SCD ή είναι ετερόζυγοι στο γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής νόσου, οι μελέτες δείχνουν σταθερά ότι οι ασθενείς με SCD έχουν δύο έως τέσσερις φορές αυξημένο κίνδυνο πνευμονικής εμβολής (Tait JF et al, 1994) . Αυτοί οι πνευμονικοί θρόμβοι μπορεί να προέρχονται από σχηματισμό θρόμβου επί τόπου στο πνευμονικό αγγείο και όχι από εμβολισμό από μακρινή θέση (Connor J et al, 1994) . Ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι αυξημένος σε ασθενείς με θαλασαιμία, ιδιαίτερα μετά από σπληνεκτομή. Ομοίως, σε ασθενείς με

κληρονομική σφαιροκύτωση (HS), ο κίνδυνος αρτηριακής θρόμβωσης και VTE αυξάνεται 7,2- και 3,3 φορές, αντίστοιχα, μετά από σπληνεκτομή. Θρόμβωση μειώνοντας την κάθαρση των μη φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων (Cadroy Y et al, 1990). Η θρόμβωση είναι επίσης συχνή σε ασθενείς με παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία, διαταραχή που χαρακτηρίζεται από αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη συμπλήρωση και αντιπροσωπεύει το 40% έως 67% των θανάτων (Peyrou, V. Et al, 1999). Η θρόμβωση σε αυτές τις διαταραχές έχει πιθανώς πολυπαραγοντική προέλευση, που περιλαμβάνει τόσο τη δυσλειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και τις επιδράσεις σε άλλα κύτταρα του αίματος και τα αγγεία. Το πλάτος κατανομής των ερυθροκυττάρων, ένα μέτρο της μεταβλητότητας του κυκλοφορούντος όγκου ερυθρών, σχετίζεται θετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου³⁰ και παρατηρείται σε ασθενείς που παρουσιάζουν VTE (Lippi G et al, 2016). Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν αυτή η συσχέτιση υποδεικνύει ανεξάρτητες συμβολές των ερυθρών στην θρόμβωση ή συννοσηρότητα που αυξάνει τη μεταβλητότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και προάγει τη θρόμβωση (π.χ. φλεγμονή). Η μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων σχετίζεται επίσης με αυξημένη επίπτωση αρτηριακής θρόμβωσης και VTE σε μετεγχειρητικούς ασθενείς και νοσηλευόμενους ασθενείς με καρκίνο, και ο αυξημένος κίνδυνος επιμένει σε πολυμεταβλητή ανάλυση (Gangireddy C et al, 2007). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι παρόλο που η αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων προκαλεί επίκτητη δυσλειτουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών της μεμβράνης και της απελευθέρωσης ερυθρών αιμοσφαιρίων μικροσωματίδια (RBC-MVs), δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χρόνου αποθήκευσης RBC και του κινδύνου θρόμβωσης ή θνησιμότητας (Larson MC et al, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές των ερυθρών που σχετίζονται με την αιμόσταση και την θρόμβωση

4.1 Ποσοτικές αλλαγές

4.1.1 Συγκέντρωση ερυθρών

Ένα καλό παράδειγμα για την σημασία της τοπικά αλλαγμένης ρεολογίας του αίματος είναι ο σχηματισμός γραμμικών συστοιχιών στοιβαγμένων κυττάρων ή τρισδιάστατων συσσωματωμάτων με στάση αίματος ή σε χαμηλούς ρυθμούς διάτμησης (Rampling et al, 1988). Αυτά τα συσσωματώματα αυξάνουν το ιξώδες του αίματος και την υδροδυναμική αντίσταση σε μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία με χαμηλή διάτμηση, όπως οι είναι φλέβες στα κάτω άκρα (Chien S. et al, 1975), επιβεβαιώνοντας την τριάδα του Virchow, καθώς αυτά τα συσσωματώματα RBC προάγουν τη φλεβική θρόμβωση. Αυτό υποδεικνύει ότι η ρεολογία του αίματος είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας στη φλεβική θρόμβωση. Οι θέσεις της θρόμβωσης υποδηλώνουν συνθήκες χαμηλής διάτμησης που ευνοούν τη συσσώρευση ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν τη φλεβική στάση και τη θρομβογένεση. Η φλεβική θρόμβωση σχετίζεται επίσης με υψηλά επίπεδα αιματοκρίτη και ινωδογόνου, τα οποία προάγουν τη συσσώρευση ερυθροκυττάρων. Η μείωση των επιπέδων του αιματοκρίτη ή του ινωδογόνου φαίνεται να μειώνει την επίπτωση ή την έκταση του θρομβοεμβολισμού της φλέβας. Αυξημένα επίπεδα αιματοκρίτη και ινωδογόνου μπορεί επίσης να προάγουν τη θρόμβωση με ενεργοποίηση της αιμόστασης, καθώς επίσης και με την προώθηση φλεβικής στάσης (Lowe et al, 1984). Σε πολύ μικρά αγγεία, τα συσσωρευμένα ερυθροκύτταρα συγκεντρώνονται κατά μήκος του άξονα ροής και ενισχύουν την περιθωριοποίηση των αιμοπεταλίων προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο μειωμένο τοπικό ιξώδες και μειωμένη αντίσταση ροής, όπως αποκαλείται φαινόμενο Fahraeus (Yalcin O et al, 2004). Έχουν προταθεί δύο εναλλακτικοί μηχανισμοί συσσώρευσης ερυθροκυττάρων, δηλαδή ένα μοντέλο γεφύρωσης και ένα μοντέλο τοπικής οσμωτικής διαβάθμισης (Chien S. 1967). Το μοντέλο

γεφύρωσης υποδηλώνει ότι οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις προκαλούνται από πρωτεΐνες πλάσματος, κυρίως από ινωδογόνο και ανοσοσφαιρίνες. Το τοπικό μοντέλο οσμωτικής διαβάθμισης ή εξάντλησης αποδίδει τη συσσώρευση των ερυθρών σε χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης κοντά στην κυτταρική μεμβράνη σε σύγκριση με το διάλυμα περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα είδος οσμωτικής διαβάθμισης ή αλληλεπίδραση τοπικής μείωσης (Yu FTH et al, 2007). Οι παράγοντες κινδύνου επαναλαμβανόμενης θρόμβωσης βαθιάς φλέβας (DVT) υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός πρώτου ιδιοπαθούς DVT, γεγονός που υποδηλώνει έντονα την ύπαρξη μη διαγνωσμένων ή/και μη αναγνωρισμένων προθρομβωτικών ανωμαλιών (Yu et al, 2011).

4.1.2 Αποθήκευση ερυθρών

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αίματος που προορίζεται για μεταγγίσεις, τα παρασκευάσματα ερυθρών αιμοσφαιρίων αναπτύσσουν πολλαπλές και ποικίλες αλλαγές στη δομή και το μεταβολισμό τους που προκαλούνται από τη συσσώρευση των δικών τους μη χρήσιμων πλέον ουσιών, από ενζυματική και οξειδωτική βλάβη, καθώς και από προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Smith JD et al, 2013). Αυτές οι μεταβολές χαρακτηρίζονται συνολικά ως «βλάβη αποθήκευσης» και περιλαμβάνουν μείωση του περιεχομένου των συγκεντρώσεων 2,3-διφωσφογλυκερικού και ATP, απώλεια μεμβράνης, αλλαγές σχήματος, σχηματισμός MVs και απελευθέρωση τοξικών προϊόντων, όπως είναι η εξωκυτταρική αιμοσφαιρίνη που σχετίζεται με αιμόλυση, λυσοφωσφολιπίδια και ιόντα σιδήρου (Grossin N et al, 2009). Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια σύνθετη δομική και μεταβολική βλάβη που περιλαμβάνει διαρροή αιμοσφαιρίνης από τα κύτταρα και αιμόλυση, μειωμένη ενέργεια και παραγωγή NO, σχηματισμό τοξικών προϊόντων, όπως λυσοφωσφολιπίδια και ελεύθερο σίδηρο, έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη (Hess Jr 2014). Όλες αυτές, καθώς και άλλες αλλαγές που εμφανίζονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης καθιστούν τις μεταγγίσεις ερυθρών μια διαδικασία με αρκετά

συχνές παρενέργειες και επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης θρόμβωσης βαθιάς φλέβας (Koch Cg et al, 2008). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η συγκέντρωση των μικροκυψελίδων αυξάνεται, όπως και ο αριθμός εκείνων που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη (Gao Y et al 2013), ο οποίος αντιπροσωπεύει έναν μηχανισμό με τον οποίο τα αποθηκευμένα ερυθρά θα μπορούσαν να προωθήσουν θρομβωτικές επιπλοκές μετά την μετάγγιση (Litvinov et al, 2017). Η αποθήκευση των ερυθρών συνοδεύεται από ισχυρές προπηκτικές αλλαγές, όπως η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στα κύτταρα καθώς και στα άφθονα κυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά. Υψηλές συγκεντρώσεις προ-πηκτικών κυστιδίων που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη που σχηματίζονται σε παρασκευάσματα αποθηκευμένων RBC's προωθούν τις θρομβωτικές επιπλοκές μετά από μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επιπλέον, η ελεύθερη εξωκυττάρια αιμοσφαιρίνη που προκύπτει από αιμόλυση που σχετίζεται με την αποθήκευση δεσμεύει και απενεργοποιεί το μονοξείδιο του αζώτου στο αίμα, έναν ισχυρό αγγειοδιασταλτικό και αναστολέα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, που είναι μια άλλη προθρομβωτική συνέπεια (Liu C et al, 2014). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι μεταγγίσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων να έχουν δυσμενείς θρομβωτικές επιπλοκές, μεταξύ των οποίων η θρόμβωση βαθιάς φλέβας, η οποία είναι μία από τις πιο συχνές επιπτώσεις (Wiesel J. W. Et al, 2019).

4.1.3 Μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά

Πολλά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών, συχνά δημιουργούν μικροσκοπικές εξωκυτταρικές μεμβρανώδεις δομές, οι οποίες ονομάζονται μικροκυστίδια (MVs) ή μικροσωματίδια ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης, απόπτωσης ή γήρανσης των κυττάρων. Η εκροή των μεμβρανών και ο σχηματισμός MVs αποτελούν συνέπεια της απώλειας ασυμμετρίας φωσφολιπιδικής μεμβράνης στα ερυθρά, γι 'αυτό τα κυστίδια φέρουν φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνειά τους (Sprague RS et al, 1996). Η παραγωγή MV στα ερυθρά αιμοσφαίρια προκύπτει από διαταραχή των αλληλεπιδράσεων μεμβράνης-κυτταροσκελετού (Helms CC et

al, 2003). Η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν MVs *in vivo* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστικός μηχανισμός φυσιολογικών αντιδράσεων, ένα μέσο για ενδοκυτταρικές επικοινωνίες ενώ σε πολλές ασθένειες που επηρεάζουν την αιμόσταση και τη θρόμβωση (Brill A et al, 2005). Ο σχηματισμός μικροκυψελίδων που προέρχονται από ερυθρά είναι τυπικός κατά την *ex vivo* αποθήκευση πλήρους αίματος (Rubin O et al, 2008) και η συσσώρευση MVs θεωρείται υπεύθυνη για αυξημένη συχνότητα θρόμβωσης βαθιάς φλέβας μετά από μετάγγιση «γηρασμένων» ερυθρών αιμοσφαιρίων (Morel O et al 2006). Τα MV που προέρχονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν σημαντικά στη δρεπανοκυτταρική και την αιμολυτική αναιμία και σε άλλες προθρομβωτικές καταστάσεις σχετιζόμενες με διαταραχές των ερυθροκυττάρων (van Beers EJ et al, 2009). Τα υψηλότερα επίπεδα MV στο πλάσμα συνδέονται με μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση της παραγωγής θρομβίνης και τη μείωση του χρόνου πήξης, υποδηλώνοντας έτσι ότι αυξάνουν την υπερπηκτική ικανότητα (Kim Y et al, 2018). Αυτή η ενισχυμένη παραγωγή θρομβίνης έχει συσχετιστεί με έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης (Morel O et al 2011). Εναλλακτικά, τα MV που προέρχονται από ερυθροκύτταρα μπορούν να ξεκινήσουν το σχηματισμό θρομβίνης μέσω μιας οδού που εξαρτάται από τον παράγοντα XII χωρίς δραστηριότητα παράγοντα ιστού (Van Der Meijden PE et al, 2012), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μικροκυστίδια αυξάνουν την υπερπηκτική ικανότητα. Τα κυκλοφορούντα MV μπορούν επίσης να προωθήσουν την αγγειο-απόφραξη εσωτερικεύοντας την ελεύθερη αίμη και μεταφέροντάς την στο αγγειακό ενδοθήλιο, ενισχύοντας τη συστηματική φλεγμονή ενεργοποιώντας το σύστημα συμπληρώματος μέσω της θρομβίνης (Zecher D et al, 2014). Συνολικά, μπορούμε να πούμε ότι τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, είτε σχηματίζονται *in vivo* είτε μεταγγίζονται μαζί με αποθηκευμένα RBC, έχουν προθρομβωτικά αποτελέσματα με πολλαπλούς υποκείμενους μηχανισμούς (Fischer D et al, 2017). Με όλες αυτές τις προπηκτικές δραστηριότητες, τα μικροκυστίδια αυτά θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για τη θεραπεία των θρομβωτικών διαταραχών (Wiesel J W et al, 2019).

4.2 Ποιοτικές αλλαγές

4.2.1 Παραμόρφωση ερυθρών

Φυσιολογικά, τα ερυθροκύτταρα που έχουν μέγεθος περίπου 7-8 μm πρέπει να αλλάζουν από το φυσικό τους σχήμα αμφίκιουλου δίσκου σε σφαιρικό κάθε φορά που συμπιέζουν τα αιμοφόρα αγγεία 1-3 μm για να μπορέσουν να διατηρήσουν μια υψηλή επιφάνεια απαραίτητη για την αποτελεσματική ανταλλαγή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ αίματος και ιστών (Boneu B et al, 1987). Η μεγάλη παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων είναι κατά κύριο λόγο συνέπεια του σχήματος τους, συγκεκριμένα του υψηλού λόγου επιφάνειας προς όγκο. Τα πιο άκαμπτα ερυθρά πιθανόν να είναι λιγότερο ικανά να συμπιέζονται μέσω των τριχοειδών αγγείων και επίσης αυξάνουν την περιθωριοποίηση των αιμοπεταλίων, συνεπώς αυξάνουν και την ευαισθησία στη θρόμβωση (Samokhin GP et al, 1984). Η αποτελεσματικότητα αυτής της διάχυτης ανταλλαγής καθορίζεται μεγιστοποιώντας την ενεργή περιοχή επαφής μεταξύ ενός ερυθρού και του τοιχώματος του αγγείου, ως αποτέλεσμα της παραμόρφωσης των RBCs και ενός υψηλού λόγου επιφάνειας προς όγκο. Το δισκοειδές σχήμα, σε σύγκριση με ένα σφαιρικό σχήμα, παρέχει περίπου 40 μm^2 (43%) επιπλέον επιφάνειας (Davenport RD et al, 2005). Η αυξημένη ακαμψία μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της παραμόρφωσης της μεμβράνης, που καθορίζεται κυρίως από τον κυτταροσκελετό και την κυτταρική μεταβολική ενέργεια, είτε από το κυτταροπλασματικό ιξώδες, που καθορίζεται κυρίως από τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (Turitto VT et al, 1980). Η δυνατότητα παραμόρφωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαρτάται κυρίως από κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και το ενδοκυτταρικό ιξώδες (Villa et al, 2016) Τα κύτταρα αυτά έχουν ένα εξαιρετικά μαλακό κυτταροσκελετό κάτω από τη μεμβράνη πλάσματος που έχει μία ειδική δυναμική μοριακή δομή, η οποία αποτελείται από μη ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών, συγκεκριμένα από τις πρωτεΐνες, ακτίνη, αγκυρίνη, ζώνη 3, ζώνη 4.1 και γλυκοφορίνη C (Aarts PA et al, 1988). Οι μεταβολές στην δομή των διαμεμβρανικών ή κυτταροσκελετικών

πρωτεϊνών ή η σύνθεση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης οδηγούν σε ρήξη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, Εκτός από τη μείωση της ευκαμψίας της μεμβράνης, η αυξημένη ακαμψία του ερυθρού μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στο ιξώδες του κυτταροπλάσματος λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης ή της μείωσης της διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης (Flamm MH et al, 2012). Το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο του ATP που χρησιμοποιείται από τις αντλίες ιόντων για τη διατήρηση του όγκου των ερυθρών μέσω της ισορροπίας της περιεκτικότητας σε νερό και ιόντα, καθώς και της αυξημένης συγκέντρωσης Ca^{2+} , μειώνει επίσης την παραμόρφωση του ερυθροκυττάρου. Ανεξάρτητα από τους υποκείμενους μηχανισμούς, τα πιο άκαμπτα RBCs σχετίζονται με θρομβογόνο δυναμικό, επειδή δύσκολα μπορούν να συμπιεστούν μέσω του μικροαγγειακού συστήματος ενισχύοντας ταυτόχρονα την περιθωριοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα ερυθρά με μειωμένη παραμόρφωση αποτελούν ένα κλινικά σημαντικό χαρακτηριστικό αρκετών κληρονομικών ασθενειών, (Litvinov et al, 2017) όπως αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, δρεπανοκυτταρική νόσος, θαλασσαιμία, κληρονομική σφαιροκυττάρωση και ξεροκυττάρωση (Wang W et al, 2013). Σε ασθενείς που πάσχουν από δρεπανοκυτταρική αναιμία, η μεμβράνη των ερυθρών είναι πολύ πιο άκαμπτη από ότι σε φυσιολογικά κύτταρα (Barabino GA et al, 2010). Εκτός από την αυξημένη ακαμψία της μεμβράνης, η συνολική ακαμψία των κυττάρων αυξάνεται δραματικά ως αποτέλεσμα του ενδοκυτταρικού πολυμερισμού της μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης S, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δρεπανοκυτταρικών. Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις με αυξημένη δυσκαμψία των μεμβρανών των ερυθρών σε συνδυασμό με προθρομβωτικές ιδιότητες των RBCs επίσης σε β-θαλασσαιμία, ανοσοαιμολυτικές αναιμίες, κληρονομική στοματοκυττάρωση, στεφανιαία νόσο, υπέρταση, διαβήτης και θρόμβωση βαθιάς φλέβας (Weisel, J. W et al, 2019). Μερικές ασθένειες, όπως είναι ο διαβήτης, η υπέρταση, η θρόμβωση των φλεβών των κάτω άκρων και η στεφανιαία νόσος, μπορούν δευτερεύοντα να αλλάξουν τις ιδιότητες των κυττάρων, και να τις κάνουν πιο δύσκαμπτες και προθρομβωτικές (Symeonidis A et al, 2001). Έχει αποδειχθεί πως το ιξώδες και η ακαμψία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης συσχετίζονται άμεσα με την υπεροξειδωση λιπιδίων της μεμβράνης? (Becatti M et al, 2016). Ωστόσο, η παραμόρφωση του ερυθρού σε συνθήκες

οξειδωτικού στρες διατηρείται από το νιτρικό οξύ (Diederich L et al, 2018). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η ακαμψία των ερυθρών αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνο για τις θρομβωτικές επιπλοκές των μεταγγίσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων μαζί με άλλες αλλοιώσεις, καθώς και για τον θρομβωτικό κίνδυνο που σχετίζεται με την πρωτοπαθή νόσο. Συνεπώς, τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αλλοιωμένα βιοφυσικά χαρακτηριστικά (Sparrow RL 2015).

4.2.2 Έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Για την αποτελεσματική πήξη του αίματος απαιτούνται επαρκείς προθρομβωτικές επιφάνειες για τη σωστή συναρμολόγηση του συμπλόκου προθρομβινάσης και τη δημιουργία θρομβίνης για την έναρξη της πήξης. Αυτές οι επιφάνειες παρέχονται από κύτταρα που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία είναι ένα αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο που βρίσκεται συνήθως στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, δηλαδή στον εσωτερικό φλοιό (Εικ.9). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως στην έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης κατά την πήξη, εκτός από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, εμπλέκονται και ερυθροκύτταρα και μπορούν να εκθέσουν φωσφατιδυλοσερίνη στη μεμβράνη τους και να προωθήσουν το σχηματισμό θρομβίνης (Litvinov et al, 2017). Η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται από την πρωτεΐνη σκραμπλάση που καταργεί τη φυσική μεμβρανική φωσφολιπιδική ασυμμετρία σε απόκριση σε ιόντα Ca^{2+} προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την αδρανοποίηση της τρανστοκάσης και της φλιπάσης, οι οποίες υποστηρίζουν αυτήν την ασυμμετρία (Kay JG et al, 2013). Υπό συνθήκες απόπτωσης ή βλάβης του ερυθροκυττάρου, όπως υψηλά ποσοστά διάτμησης, φλεγμονή ή οξειδωτικό στρες, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να χάσουν την ασυμμετρία της μεμβράνης και να εκθέσουν φωσφατιδυλοσερίνη (Shi J et al, 2006). Η εξωτερίκευση και η απόρριψη της φωσφατιδυλοσερίνης προκαλούνται από την αυξημένη κυτταρική ροή Ca^{2+} και παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική γήρανση του ερυθρού [Freikman

I et al, 2011). Το προθρομβωτικό δυναμικό έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης σε ερυθρά είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα του υψηλού αριθμού ερυθρών. Αν και περίπου το 0,5% - 0,6% του πληθυσμού των ερυθρών συνήθως εκφράζει φωσφατιδυλοσερίνη σε υγιή άτομα και προκαλεί κάποια παραγωγή θρομβίνης, η συμβολή των ερυθρών σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να φτάσει το 40% του δυναμικού δημιουργίας θρομβίνης ολικού αίματος (Whelihan MF et al, 2012). Μερικά αξιοσημείωτα παραδείγματα έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης στις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες είναι η δρεπανοκυτταρική νόσος και η θαλασσαιμία (Ataga KI et al, 2007). Στην δρεπανοκυτταρική αναιμία πιστεύεται ότι αυτή η έκθεση προκύπτει από την επαναλαμβανόμενη κυτταρική παραμόρφωση των φυσιολογικών κυττάρων σε δρεπανοκύτταρα και επιστρέφει στο φυσιολογικό σχήμα ως αποτέλεσμα αναστρέψιμου πολυμερισμού της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης. Μεγαλο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι στο αίμα ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο, η παραγωγή θρομβίνης έχει αποδειχθεί πως συσχετίζεται αντιστρόφως με την έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη που προέρχεται από ερυθροκύτταρα (Whelihan MF et al, 2016), υποδηλώνοντας ότι στην δρεπανοκυτταρική νόσο, υπάρχουν πρόσθετοι προπηκτικοί μηχανισμοί που δεν σχετίζονται με τη φωσφατιδυλοσερίνη. Τέλος, να σημειωθεί ότι στη β-θαλασσαιμία, η αυξημένη έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνεια των RBCs σχετίζεται με την οδό του κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται ερύψωση (Ibrahim HA et al, 2014).



Εικόνα 9: Η δομή της φωσφατιδυλοσερίνης (Villa et al, 2016)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ερυθροκύτταρο είναι ένας «κρυφός» παράγοντας που συμμετέχει ενεργά στις διαδικασίες της φυσιολογικής αιμόστασης και θρόμβωσης. Η συμμετοχή φυσιολογικών ερυθροκυττάρων στην αιμοστατική διαδικασία έχει αποτελέσει αντικείμενο ενός μεγάλου αριθμού μελετών και ο ρόλος τους πιστεύεται ότι σχετίζεται κυρίως με τη ρεολογία του αίματος ή με την αύξηση της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να έχουν διπλό ρόλο, συμβάλλοντας στην αναχαίτιση της αιμορραγίας και ταυτόχρονα στη θρόμβωση με διάφορους τρόπους. Έχουν καταγραφεί ποικίλες επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ιξώδες του αίματος, την κυτταρική λειτουργία και το σχηματισμό, τη δομή και τη σταθερότητα των θρόμβων. Η στοχευμένη μελέτη και κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων ή οι επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη λειτουργία των αιμοπεταλίων μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο θρόμβωσης. Ομοίως τα ερυθρά αιμοσφαίρια παίζουν πράγματι σημαντικό ρόλο και στην αιμόσταση. Σε περίπτωση μείωσης του επιπέδου της αιμοσφαιρίνης, έχει παρατηρηθεί σημαντική βελτίωση τόσο στην ισχύ όσο και στην ποιότητα των θρόμβων. Να σημειωθεί ότι πολλές διαταραχές αιμορραγίας μπορούν να αντιμετωπιστούν με αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων παρά τα χαμηλά ή φυσιολογικά επίπεδα αιμοπεταλίων. Αυτές και άλλες παρατηρήσεις παρείχαν έμμεσες αλλά ισχυρές αποδείξεις ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι σημαντικοί παράγοντες στην αιμόσταση και τη θρόμβωση και μπορούν να λειτουργήσουν ως προπηκτικό και προθρομβωτικό συστατικό αίματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατήρηση της ρευστότητας του αίματος εντός του αγγειακού συστήματος είναι μια σημαντική φυσιολογική διαδικασία του ανθρώπου. Ο όρος «αιμόσταση» αναφέρεται στην κανονική απόκριση του αγγείου σε τραυματισμό σχηματίζοντας θρόμβο που χρησιμεύει για τον περιορισμό της αιμορραγίας. Η θρόμβωση είναι παθολογικός σχηματισμός θρόμβων που προκύπτει όταν η αιμόσταση ενεργοποιείται υπερβολικά απουσία αιμορραγίας («αιμόσταση σε λάθος μέρος»). Υπάρχει ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων που καταδεικνύουν ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμμετέχουν στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην αιμόσταση/θρόμβωση μέσω πολλαπλών μηχανισμών που εξαρτώνται από τις βιομηχανικές τους ιδιότητες, την κατανομή των συστατικών του αίματος εντός του αγγειακού αυλού, τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, τη συναρμολόγηση παραγόντων πήξης και την απελευθέρωση προπηκτικών σηματοδοτικών ενώσεων. Όσον αφορά την αιμόσταση, ο ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι πολύ συγκεκριμένος, καθώς επιτυγχάνεται μέσω της φωσφαδιτυλοσερίνης (PS) που εκκρίνεται από τα ερυθροκύτταρα όταν αυτά αποπίπτουν ή εκκρίνεται μέσω των κυστιδίων που αυτά περιέχουν. Πλέον έχουν αναπτυχθεί αρκετές εργαστηριακές μέθοδοι με την βοήθεια των οποίων μας δίνεται η δυνατότητα μέτρησης του εξωγενούς μονοπατιού πήξης του αίματος, με την βοήθεια πάντα της συμμετοχής των ερυθροκυττάρων. Στην μελέτη αυτή περιγράφεται η συμμετοχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, εφόσον υπάρχουν τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές αλλαγές στα ερυθρά αιμοσφαίρια που επηρεάζουν την αιμορραγία και τη θρόμβωση, καθώς και αλληλεπιδράσεις αυτών με κυτταρικά και μοριακά συστατικά του αιμοστατικού συστήματος. Η αναθεωρημένη αυτή έννοια της μεγάλης σημασίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε κλινικές και πειραματικές συσχετίσεις μεταξύ ερυθρών αιμοσφαιρίων και θρόμβωσης ή αιμορραγίας, υποδηλώνοντας πως τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν προοπτικό θεραπευτικό στόχο σε αιμοστατικές και θρομβωτικές διαταραχές.

SUMMARY

Maintaining the fluidity of blood within the vascular system is an important normal human process. The term "hemostasis" refers to the normal response of a blood vessel to an injury forming a clot that serves to limit bleeding. Thrombosis is a pathological formation of blood clots that occurs when hemostasis is activated excessively in the absence of bleeding ("hemostasis in the wrong place"). There is a growing body of evidence that red blood cells are involved in hemostasis and thrombosis. Red blood cells contribute to hemostasis / thrombosis through multiple mechanisms that depend on their industrial properties, the distribution of blood components within the vascular lumen, intercellular interactions, the assembly of coagulation factors and the release of coagulants. With regard to hemostasis, the role of red blood cells is very specific, as it is achieved through phosphatidylserine (PS) secreted by erythrocytes when they fall off or secreted through the vesicles they contain. Now several laboratory methods have been developed with the help of which we are able to measure the exogenous path of blood coagulation, always with the help of the participation of red blood cells. This study describes the involvement of red blood cells in hemostasis and thrombosis, since there are both quantitative and qualitative changes in red blood cells that affect bleeding and thrombosis, as well as their interactions with cellular and molecular components of the hemostatic system. This revised understanding of the importance of red blood cells is largely based on clinical and experimental correlations between red blood cells and thrombosis or bleeding, suggesting that red blood cells are a prospective therapeutic target in hemostatic and thrombotic disorders.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ford J. Approach to disorders of red blood cells. In: Non-neoplastic hematopathology and infections, 1st edn. Cualing HD, Bhargava P, Sandin RL (eds). Hoboken: WileyBlackwell, 2012: 45–64
- Skogerboe KJ, West SF, Smith C, Terashita ST, LeCrone CN, Detter JC, Tait JF. Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA determined genotype. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1012–18.
- Laosombat V, Viprakasit V, Dissaneevate S, Leetanaporn R, Chotsampancharoen T, Wongchanchailert M, Kodchawan S, Thongnoppakun W, Duangchu S. Natural history of Southeast Asian Ovalocytosis during the first 3 years of life. *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:29–32.
- Gelderman MP, Yazer MH, Jia Y, Wood F, Alayash AI, Vostal JG. Serial oxygen equilibrium and kinetic measurements during RBC storage. *Transf Med.* (2010) 20:341–45. doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01016.x
- Bosman GJ. The proteome of the red blood cell: an auspicious source of new insights into membrane-centered regulation of homeostasis. *Proteomes* (2016) 4:E35. doi: 10.3390/proteomes4040035
- B. Bull, J. Brenton-Gorius, Morphology of the erythron, in: T. Kipps (Ed.), *William's Hematology*, McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 349–363.
- P. Quesenberry, Hemopoietic stem cells, in: M. Lichtman (Ed.), *Hematology*, McGraw-Hill, New York, 1986, pp. 129–143.
- M.J. Koury, M.C. Bondurant, J.B. Atkinson, Erythropoietin control of terminal erythroid differentiation: maintenance of cell viability, production of hemoglobin and development of the erythrocyte membrane, *Blood Cells* 13 (1987) 217–226.
- R.G. Kendall, Erythropoietin, *Clin. Lab. Haematol.* 23 (2001) 71–80
- Klinken, S. Peter. "Red blood cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* 34.12 (2002): 1513-1518.
- Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993; 70:884–893
- Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001;86:222–232
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1381–1389
- Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* 1995;74:111–116
- Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, et al. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:646–653
- Leiderman, K., and A. L. Fogelson. 2010. Grow with the flow: a spatial-temporal model of platelet deposition and blood coagulation under flow. *Math. Med. Biol.* 28:47–84.

- Eckstein, E. C., and F. Belgacem. 1991. Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms. *Biophys. J.* 60:53–69.
- Crowl, L., and A. Fogelson. 2010. Analysis of mechanisms for platelet near-wall excess under arterial blood flow conditions. *J. Fluid Mech.* 676:348–375.
- Skorczewski, Tyler, Lindsay Crowl Erickson, and Aaron L. Fogelson. "Platelet motion near a vessel wall or thrombus surface in two-dimensional whole blood simulations." *Biophysical journal* 104.8 (2013): 1764-1772.
- Jurk, Kerstin, and Beate E. Kehrel. "Platelets: physiology and biochemistry." *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Vol. 31. No. 4. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, c1974-, 2005.
- Coleman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (editors). *Hemostasis and thrombosis. Basic principals and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996; 47: 315–31.
- Topper JN, Gimbrone MA. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999; 5: 40–6
- Rasche, H. "Haemostasis and thrombosis: an overview." *European Heart Journal Supplements* 3.suppl_Q (2001): Q3-Q7
- Sira, James, and Lorna Eyre. "Physiology of haemostasis." *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 17.2 (2016): 79-82
- Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014; 58: 515e23.
- Zaidi, Abbas, and Laura Green. "Physiology of haemostasis." *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 20.3 (2019): 152-158.
- O'Donnell, James S., Jamie M. O'Sullivan, and Roger JS Preston. "Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis." *British journal of haematology* 186.1 (2019): 24-36.
- Davie, E.W. & Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145, 1310–1312.
- Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M. & Gordon, D. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2839–2843
- Macfarlane, R.G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202, 498–499.

- Monroe, D.M. & Hoffman, M. (2006) What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, 41–48.
- Monroe, D.M., Roberts, H.R. & Hoffman, M. (1996) Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *British Journal of Haematology*, 88, 364–371.
- Roeloffzen, Wilfried WH, et al. "Effects of red blood cells on hemostasis." *Transfusion* 50.7 (2010): 1536-1544.
- Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA*. 1910; 60:1185- 1192
- Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SB. The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol*. 1961; 7:42-50
- Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. *Blood Rev*. 2015; 29:215-221
- Rasche, H. "Haemostasis and thrombosis: an overview." *European Heart Journal Supplements* 3.suppl_Q (2001): Q3-Q7
- Ho, C. H. "The hemostatic effect of packed red cell transfusion in patients with anemia." *Transfusion* 38.11-12 (1998): 1011-1014.
- Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 584–95
- Skewis LR, Lebedeva T, Papkov V, et al.: T2 magnetic resonance: a diagnostic platform for studying integrated hemostasis in whole blood—proof of concept. *Clin Chem* 2014; 60:1174–1182
- Brummel-Ziedins KE, Wolberg AS: Global assays of hemostasis. *Curr Opin Hematol* 2014; 21:395–403
- Lowe, Gordon. "Blood rheology and venous thrombosis." *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 4.6 (1984): 571-588.
- Merrill EW. Rheology of blood. *Physiol Rev* 1969;49:863– 888
- Vahidkhah K, Diamond SL, Bagchi P: Hydrodynamic interaction between a platelet and an erythrocyte: effect of erythrocyte deformability, dynamics, and wall proximity. *J Biomech Eng* 2013; 135:51002
- Samokhin GP, Smirnov MD, Muzykantov VR, et al.: Effect of flow rate and blood cellular elements on the efficiency of red blood cell targeting to collagen-coated surfaces. *J Appl Biochem* 1984; 6:70–75

- Kaul DK, Koshkaryev A, Artmann G, et al.: Additive effect of red blood cell rigidity and adherence to endothelial cells in inducing vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H1788–H1793
- Aarts PA, Heethaar RM, Sixma JJ: Red blood cell deformability influences platelets–vessel wall interaction in flowing blood. *Blood* 1984; 64:1228–1233
- Bravo MC, Orfeo T, Lavoie E, et al.: Analysis of the protein C system under flow and the impact of red blood cells. *Blood* 2014; 124:148–1480
- Adams Y, Kuhnrae P, Higgins MK, et al.: Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect Immun* 2014; 82:949–959
- Helms CC, Marvel M, Zhao W, et al.: Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost* 2013; 11:2148–2154
- Weisel, J. W., and R. I. Litvinov. "Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17.2 (2019): 271-282.
- Du VX, Huskens D, Maas C, Al Dieri R, de Groot PG, de Laat B. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 72–80.
- Wautier MP, Heron E, Picot J, Colin Y, Hermine O, Wautier JL. Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1049–55.
- Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer GV, Hansen JK, Motto DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood* 2013; 121: 3733–41
- Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594–604
- Ibrahim HA, Fouda MI, Yahya RS, Abousamra NK, Abd Elazim RA. Erythrocyte phosphatidylserine exposure in beta-thalassemia. *Lab Hematol* 2014; 20: 9–14
- Silvain J, Collet JP, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, Cayla G, Pena A, Brugier D, Barthelemy O, Montalescot G, Weisel JW. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1359–67

- Reimers RC, Sutera SP, Joist JH. Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood* 1984; 64: 1200–6.
- Kattula, Sravya, James R. Byrnes, and Alisa S. Wolberg. "Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37.3 (2017): e13-e21.
- Chung DW, Davie EW. gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing. *Biochemistry*. 1984;23:4232–4236
- Fornace AJ Jr, Cummings DE, Comeau CM, Kant JA, Crabtree GR. Structure of the human gamma-fibrinogen gene. Alternate mRNA splicing near the 3' end of the gene produces gamma A and gamma B forms of gamma-fibrinogen. *J Biol Chem*. 1984;259:12826–12830
- Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion* 2006; 46: 1836–44.
- Franchini M, Mannucci PM. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost* 2014; 112: 1103–9
- Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2013; 11(Suppl 1): 202–11.
- Franchini M, Lippi G. Relative risks of thrombosis and bleeding in different ABO blood groups. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 112–7
- O'donnell, J., and M. A. Laffan. "The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor." *Transfusion Medicine* 11.4 (2001): 343-351.
- Dorgalaleh A, Daneshi M, Rashidpanah J, Yasaghi ER. An Overview of Hemostasis. *Congenital Bleeding Disorders. Diagnosis and Management*. Cham, Switzerland: Springer; 2018:3-26. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-76723-9_1.
- Dorgalaleh, Akbar, et al. "Standardization of Prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR)." *International Journal of Laboratory Hematology* 43.1 (2021): 21-28.
- D'Angelo A, Seveso MP, D'Angelo SV, Gilardoni F, Macagni A, Manotti C. Comparison of two automated coagulometers and the manual tilt tube method for the determination of prothrombin time. *Am J Clin Pathol* 1989;92:321–8
- Poller L, van den Besselaar AMHP, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. The European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA). Field studies of

coagulometer effects on the ISI of ECAA thromboplastins. *Thromb Haemost* 1998;80:615–23

- Poller, Leon, et al. "Simplified method for international normalized ratio (INR) derivation based on the prothrombin time/INR line: an international study." *Clinical chemistry* 56.10 (2010): 1608-1617.
- Poller L, Ibrahim S, Keown M, Pattison A, Jespersen J; Anticoagulation EAo. The prothrombin time/international normalized ratio (PT/ INR) Line: derivation of local INR with commercial thromboplastins and coagulometers—two independent studies. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):140-148.
- Poller, L. "Standardization of the aPTT test current status." *Scandinavian Journal of Haematology* 24.S37 (1980): 49-63.
- Stainsby D, MacLennan S, Hamilton PJ. Management of massive blood loss: a template guideline. *Br J Anaesth* 2000;85: 487–91
- Niederdöckl, J., et al. "Point-of-care PT and aPTT in patients with suspected deficiencies of coagulation factors." *International journal of laboratory hematology* 38.4 (2016): 426-434
- Babson A L & Babson S R (1974) Comparative evaluation of a partial thromboplastin reagent containing a non-settling particulate activator. *Am J Clin Path* 62, 856
- Lippi, Giuseppe, and Emmanuel J. Falavaro. "Activated partial thromboplastin time: new tricks for an old dogma." *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Vol. 34. No. 07. © Thieme Medical Publishers, 2008.
- Πολίτη, Μαριάννα. "ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ." (2015).
- Rosendaal, Fritz R. "Venous thrombosis: a multicausal disease." *The Lancet* 353.9159 (1999): 1167-1173.
- Rosendaal, Fritz R. "Venous thrombosis: a multicausal disease." *The Lancet* 353.9159 (1999): 1167-1173.
- Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 692–9
- Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med* 2004; 350: 2558–63
- Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516–30

- Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WHW, Vessey MP, Shapiro S, Lewis GP, Worcester J. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. *Lancet* 1969; i: 539–42
- Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370–3
- Bertina RM, Koeleman RPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, Van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–7
- Rosendaal, F. R., and P. H. Reitsma. "Genetics of venous thrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7 (2009): 301-304
- Nicolaidis AN, Kakkar VV, Field ES, Renney JT. The origin of deep vein thrombosis: a venographic study. *Br J Radiol* 1971; 44: 653–63.
- Killewich LA, Bedford GR, Beach KW, Strandness DE Jr. Spontaneous lysis of deep venous thrombi: rate and outcome. *J Vasc Surg* 1989; 9: 89–97
- Kyrle, Paul A., and Sabine Eichinger. "Deep vein thrombosis." *The Lancet* 365.9465 (2005): 1163-1174.
- Zöller B, Berntsdotter A, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-23 .
- Van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, et al. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75: 417–21 .
- Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, et al. Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997 ; 170:142 –29
- Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504 – 08 .
- Koster T, Rosendaal FR, Briët E, et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85: 2756 – 61 .
- Freiderich PW, Sanson BJ, Simioni P, et al. Frequency of pregnancy-related venous thromboembolism in anticoagulant factor-deficient women: implications for prophylaxis. *Ann Intern Med* 1996; 125 : 955 – 60 .

- Bokarewa MI, Bremme K, Blomback M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996; 92: 473–78.
- McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, et al. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Throm Haemost* 1997; 78: 1183–88.
- deBruijn SF, Stam J, Koopman MM, Vandenbroucke JP. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of hereditary prothrombotic conditions. *BMJ* 1998; 316: 589–92
- Fowkes FJI, Price JF, Fowkes FGR. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 1–5.
- Voetsch, Barbara, and Joseph Loscalzo. "Genetic determinants of arterial thrombosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24.2 (2004): 216-229.
- Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28: 1598–1660.
- Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83: 361–366
- Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008; 451: 914–918.
- Turpie, Alexander GG, and Charles Esmon. "Venous and arterial thrombosis—pathogenesis and the rationale for anticoagulation." *Thrombosis and haemostasis* 105.04 (2011): 586-596.
- Prandoni, Paolo. "Venous and arterial thrombosis: two aspects of the same disease?." *Clinical epidemiology* 1 (2009): 1.
- Rich-Edwards W. The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1995;332: 1758–66
- Burchfield CM, Laws A, Benfante R, Goldberg RJ, Hwang L-J, Chiu D, et al. Combined effects of HDL cholesterol, triglycerides, and total cholesterol concentrations on 18-year risk of atherosclerotic disease. *Circulation* 1995;92: 1430–6.
- Lowe, Gordon DO. "Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages." *Maturitas* 47.4 (2004): 259-263.
- Medved LV, Gorkun OV, Privalov PL. Structural organization of C-terminal parts of fibrinogen A alpha-chains. *FEBS Lett.* 1983;160:291–5.

- Ferry JD, Morrison PR. Preparation and properties of serum and plasma proteins. VIII. The conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions. *J Am Chem Soc* 1947;69:388–400.
- Betts L, Merenbloom BK, Lord ST. The structure of fibrinogen fragment D with the 'A' knob peptide GPRVVE. *J Thromb Haemost* 2006;4:1139–41
- Burch GE, Depasquale NP. The hematocrit in patients with myocardial infarction. *JAMA*. 1962; 180:62-63
- Sorlie PD, Garcia-Palmieri MR, Costas R Jr, Havlik RJ. Hematocrit and risk of coronary heart disease: the Puerto Rico Health Program. *Am Heart J*. 1981;101(4):456-461.
- Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer GV, et al. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood*. 2013; 121:3733-3741
- Litvinov, Rustem I., and John W. Weisel. "Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis." *ISBT science series 12.1* (2017): 176-183.
- Wang W, Diacovo TG, Chen J, Freund JB, King MR. Simulation of platelet, thrombus and erythrocyte hydrodynamic interactions in a 3D arteriole with in vivo comparison. *PLoS ONE* 2013; 8: e76949
- Aleman, Maria M., et al. "Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis." *Thrombosis research* 133 (2014): S38-S40.
- Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. *Blood* 2005; 106: 4176–83.
- Nowak-Gottl U, Weiler H, Hernandez I, Thedieck S, Seehafer T, Schulte T, Stoll M. Fibrinogen alpha and gamma genes and factor V Leiden in children with thromboembolism: results from 2 family-based association studies. *Blood* 2009; 114: 1947–53
- Omarova F, Uitte De Willige S, Ariëns RA, Rosing J, Bertina RM, Castoldi E. Inhibition of thrombin-mediated factor V activation contributes to the anticoagulant activity of fibrinogen gamma'. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1669–78.
- Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost*. 2009; 102:1169-1175

- Tratar G, Blinc A, Podbregar M, et al. Characterization of pulmonary emboli ex vivo by magnetic resonance imaging and ultrasound. *Thromb Res.* 2007; 120:763-771
- Andrews, Dina A., and Philip S. Low. "Role of red blood cells in thrombosis." *Current opinion in hematology* 6.2 (1999): 76
- Gilson CR, Kraus TS, Hod EA, et al. A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival. *Transfusion.* 2009;49(8):1546-1553.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2004;350(2):114-124.
- Carr ME, Jr., Hardin CL. Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol.* 1987; 253:H1069-1073
- Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood.* 1996; 87(3):1179-1187.
- Cortese-Krott, Miriam M., and Sruti Shiva. "The redox physiology of red blood cells and platelets: implications for their interactions and potential use as systemic biomarkers." *Current Opinion in Physiology* 9 (2019): 56-66.
- Lamrani L, Lacout C, Ollivier V, Denis CV, Gardiner E, Ho Tin Noe B, Vainchenker W, Villeval JL, Jandrot-Perrus M. Hemostatic disorders in a JAK2V617F-driven mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2014; 124: 1136–45
- Weisel, J. W., and R. I. Litvinov. "Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17.2 (2019): 271-282.
- Tilles, A. W., and E. C. Eckstein. 1987. The near-wall excess of platelet-sized particles in blood flow: its dependence on hematocrit and wall shear rate. *Microvasc. Res.* 33:211–223.
- Skorczewski, Tyler, Lindsay Crowl Erickson, and Aaron L. Fogelson. "Platelet motion near a vessel wall or thrombus surface in two-dimensional whole blood simulations." *Biophysical journal* 104.8 (2013): 1764-1772.
- Semeraro F, Ammollo CT, Esmon NL, Esmon CT. Histones induce phosphatidylserine exposure and a procoagulant phenotype in human red blood cells. *J Thromb Haemost.* 2014;12(10): 1697-1702.
- Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood.* 1996; 87(3):1179-1187.

- Wandersee NJ, Tait JF, Barker JE. Erythroid phosphatidyl serine exposure is not predictive of thrombotic risk in mice with hemolytic anemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2000;26(1):75-83.
- Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost.* 2016;14(10):1941-1952.
- Byrnes, James R., and Alisa S. Wolberg. "Red blood cells in thrombosis." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 130.16 (2017): 1795-1799.
- Peyrou, V., et al. "Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood." *Thrombosis and haemostasis* 81.03 (1999): 400-406.
- Kawakami S, Kaibara M, Kawamoto Y, et al.: Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelial cell-coated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface. *Biorheology* 1995; 32:521–536
- Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, et al.: Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIIa. *J Thromb Haemost* 2012; 10:1355–1362
- Gao Y, Lv L, Liu S, et al.: Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox Sang* 2013; 105:11–17
- Villa, C. H., V. R. Muzykantov, and D. B. Cines. "The emerging role for red blood cells in haemostasis: opportunity for intervention." *ISBT Science Series* 11.S1 (2016): 158-164.
- Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation.* 2009; 16:97-111
- Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, et al. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013; 15:1976-1983
- Litvinov, Rustem I., and John W. Weisel. "Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis." *ISBT science series* 12.1 (2017): 176-183.
- Colin Y, Le Van Kim C, El Nemer W. Red cell adhesion in human diseases. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(3):186-192
- Wautier JL, Pintigny D, Wautier MP, et al. Fibrinogen, a modulator of erythrocyte adhesion to vascular endothelium. *J Lab Clin Med.* 1983; 101(6):911-920.
- Hermand P, Gane P, Huet M, et al. Red Cell ICAM-4 Is a Novel Ligand for Platelet-activated α IIb β 3 Integrin. *J Biol Chem.* 2003;278(7): 4892-4898.

- Bridges DJ, Bunn J, van Mourik JA, et al. Rapid activation of endothelial cells enables Plasmodium falciparum adhesion to plateletdecorated von Willebrand factor strings. *Blood*. 2010;115(7):1472-1474.
- Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Mann KG. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. 2012;120:3837–3845. doi: 10.1182/blood-2012-05-427856.
- Kattula, Sravya, James R. Byrnes, and Alisa S. Wolberg. "Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37.3 (2017): e13-e21.
- Holley L, Woodland N, Hung WT, Cordatos K, Reuben A. Influence of fibrinogen and haematocrit on erythrocyte sedimentation kinetics. *Biorheology*. 1999;36(4):287-297.
- Wohner N, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedjiev K, Silva MM, Longstaff C, Kolev K. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2306–2313. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.229088.
- Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost*. 2009;102:1169–1175. doi: 10.1160/TH09-03-0199.
- Wohner N, S ´otonyi P, Machovich R, et al. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10): 2306-2313.
- Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 2014;123(10): 1596-1603.
- Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA* 1910; 60: 1185–92
- Tokish JM, Kocher MS, Hawkins RJ. Ergogenic aids: a review of basic science, performance, side effects, and status in sports. *Am J Sports Med* 2004; 32: 1543–53.
- Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. *Blood Rev* 2015; 29: 215–21. 5 Barshtein G, Ben-Ami R, Yedgar S. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5: 743–52
- Toss F, Nordstr ¨om A, Nordstr ¨om P. Association between hematocrit in late adolescence and subsequent myocardial infarction in Swedish men. *Int J Cardiol*. 2013;168(4):3588-3593

- Sabatine MS, Morrow DA, Giugliano RP, et al. Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2005;111(16):2042-2049.
- Gagnon DR, Zhang TJ, Brand FN, Kannel WB. Hematocrit and the risk of cardiovascular disease—the Framingham study: a 34-year followup. *Am Heart J*. 1994;127(3):674-682.
- Danesh J, Collins R, Peto R, Lowe GD. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2000;21(7): 515-520
- Maguire JL, deVeber G, Parkin PC. Association between iron-deficiency anemia and stroke in young children. *Pediatrics*. 2007;120(5): 1053-1057
- Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, et al; CYTO-PV Collaborative Group. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013;368(1):22-33.
- Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, et al; European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP) Investigators. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2007;136(2):249-259.
- Prchal JT, Gordeuk VR. Treatment target in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013;368(16): 1555-1556.
- Byrnes, James R., and Alisa S. Wolberg. "Red blood cells in thrombosis." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 130.16 (2017): 1795-1799.
- Herbert JM, Bernat A, Dol F, Herault JP, Crepon B, Lormeau JC. DX 9065A, a novel synthetic, selective and orally active inhibitor of factor Xa: In vitro and in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 1030.
- Tait JF, Gibson D. Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 741.
- Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 2399.
- Cadroy Y, Hanson SR. Effects of red blood cell concentration on haemostasis and thrombus formation in a primate model. *Blood* 1990; 75: 2185.
- Peyrou, V., et al. "Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood." *Thrombosis and haemostasis* 81.03 (1999): 400-406.

- Lippi G, Buonocore R, Cervellin G. Value of red blood cell distribution width on emergency department admission in patients with venous thrombosis. *Am J Cardiol.* 2016;117(4):670-675.
- Gangireddy C, Rectenwald JR, Upchurch GR, et al. Risk factors and clinical impact of postoperative symptomatic venous thromboembolism. *J Vasc Surg.* 2007;45(2): 335-341, discussion 341-342
- Larson MC, Karafin MS, Hillery CA, Hogg N. Phosphatidylethanolamine is progressively exposed in RBCs during storage. *Transfus Med.* 2017;27(2):136-141.
- Rampling MW. Red cell aggregation and yield stress. In: Lowe GDO, ed. *Clinical Blood Rheology.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1988:11–44
- Chien S. Biophysical behavior of red cells in suspension. In: Surgenor DM, ed. *Red Blood Cell, Vol. 3.* New York: Academic Press; 1975:1031–1133
- Lowe, Gordon. "Blood rheology and venous thrombosis." *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 4.6 (1984): 571-588.
- Yalcin O, Uyuklu M, Armstrong JK, Meiselman HJ, Baskurt OK. Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance. *Am J Physiol* 2004; 287: H2644–50
- Chien S. Blood viscosity: influence of erythrocyte aggregation. *Science* 1967; 157: 829–31.
- Yu FTH, Cloutier G. Experimental ultrasound characterization of red blood cell aggregation using the structure factor size estimator. *J Acoust Soc Am* 2007; 122: 645–56
- Yu, François TH, et al. "A local increase in red blood cell aggregation can trigger deep vein thrombosis: evidence based on quantitative cellular ultrasound imaging." *Journal of thrombosis and haemostasis* 9.3 (2011): 481-488.
- Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, et al. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013; 15:1976-1983
- Grossin N, Wautier MP, Wautier JL. Red blood cell adhesion in diabetes mellitus is mediated by advanced glycation end product receptor and is modulated by nitric oxide. *Biorheology.* 2009; 46:63-72
- Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 2014; 107:1-9
- Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2008; 358:1229-1239
- Gao Y, Lv L, Liu S, et al. Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox Sang.* 2013; 105:11-17

- Litvinov, Rustem I., and John W. Weisel. "Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis." *ISBT science series* 12.1 (2017): 176-183.
- Liu C, Liu X, Janes J, Stapley R, Patel RP, Gladwin MT, KimShapiro DB. Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells. *Redox Biol* 2014; 2: 211–9.
- Weisel, J. W., and R. I. Litvinov. "Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17.2 (2019): 271-282.
- Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, et al. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol*. 1996; 271:H2717-2722
- Helms CC, Marvel M, Zhao W, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2013; 11:2148-2154
- Brill A, Dashevsky O, Rivo J, et al. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res*. 2005; 67:30-38
- Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:2594-2604
- Rubin O, Crettaz D, Canellini G, et al. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang*. 2008; 95:288-297
- van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; 94: 1513–9.
- Kim Y, Xia BT, Jung AD, Chang AL, Abplanalp WA, Caldwell CC, Goodman MD, Pritts TA. Microparticles from stored red blood cells promote a hypercoagulable state in a murine model of transfusion. *Surgery* 2018; 163: 423–9.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 15–26.
- Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renne T, ten Cate H, Spronk HM. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1355–62
- Zecher D, Cumpelik A, Schifferli JA. Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombindependent activation of complement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 313–20.

- Fischer D, Bussow J, Meybohm P, Weber CF, Zacharowski K, Urbschat A, Muller MM, Jennewein C. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. *Transfusion* 2017; 57: 2701–11.
- Boneu B, Fernandez F: The role of the hematocrit in bleeding. *Transfus Med Rev* 1987; 1:182–185
- Samokhin GP, Smirnov MD, Muzykantov VR, et al.: Effect of flow rate and blood cellular elements on the efficiency of red blood cell targeting to collagen-coated surfaces. *J Appl Biochem* 1984; 6:70–75
- Davenport RD: Pathophysiology of hemolytic transfusion reactions. *Semin Hematol* 2005; 42:165–168
- Turitto VT, Weiss HJ: Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science* 1980; 207:541–543
- Villa, C. H., V. R. Muzykantov, and D. B. Cines. "The emerging role for red blood cells in haemostasis: opportunity for intervention." *ISBT Science Series 11.S1* (2016): 158-164.
- Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, et al. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis*. 1988; 8:819-824
- Flamm MH, Diamond SL. Multiscale systems biology and physics of thrombosis under flow. *Ann Biomed Eng*. 2012; 40:2355-2364
- Wang W, Diacovo TG, Chen J, Freund JB, King MR. Simulation of platelet, thrombus and erythrocyte hydrodynamic interactions in a 3D arteriole with in vivo comparison. *PLoS ONE* 2013; 8: e76949.
- Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sickle cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 345–67
- Symeonidis A, Athanassiou G, Psiroyannis A, et al. Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *Clin Lab Haematol*. 2001; 23:103-109
- Becatti M, Marcucci R, Gori AM, Mannini L, Grifoni E, Alessandrello Liotta A, Sodi A, Tartaro R, Taddei N, Rizzo S, Prisco D, Abbate R, Fiorillo C. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2287–97
- Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCSt, Barbarino F, Sutton TR, Kramer CM, Luckstadt W, Isakson BE, Gohlke H, Feelisch M, Kelm M, Cortese-Krott MM. On the

effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability. *Front Physiol* 2018; 9: 332

- Sparrow RL. Red blood cell storage duration and trauma. *Transfus Med Rev.* 2015; 29:120-126
- Litvinov, Rustem I., and John W. Weisel. "Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis." *ISBT science series* 12.1 (2017): 176-183.
- Kay JG, Grinstein S. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. *Adv Exp Med Biol* 2013; 991: 177–93.
- Shi J, Shi Y, Waehrens LN, et al. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A.* 2006; 69:1193-1201
- Freikman I, Fibach E. Distribution and shedding of the membrane phosphatidylserine during maturation and aging of erythroid cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808:2773- 2780
- Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Mann KG. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood* 2012; 120: 3837–45
- Ataga KI, Cappellini MD, Rachmilewitz EA. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. *Br J Haematol.* 2007; 139:3-13
- Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, Cai J, Monroe DM, Ataga KI, Mann KG, Key NS. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 1941–52.
- Ibrahim HA, Fouda MI, Yahya RS, Abousamra NK, Abd Elazim RA. Erythrocyte phosphatidylserine exposure in beta-thalassemia. *Lab Hematol* 2014; 20: 9–14.
- Whelihan, Matthew F., et al. "Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 120.18 (2012): 3837-3845.