



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Έλεγχος αντισωμάτων PF4/H στην θρομβοπενία που προκαλείται από ηπαρίνη μέσω διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος HIT (Heparin Induced Thrombocytopenia) σε ασθενείς μονάδων εντατικής θεραπείας COVID-19 και πιθανή συσχέτισή τους με δείκτες φλεγμονής

POST GRADUATE THESIS

Detection of PF4/H antiplatelets antibodies to heparin induced thrombocytopenia (HIT) by stimulation of the immune system in patients of COVID-19 intensive care units and their possible association with markers of inflammation



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Κανέλλα Κοτούλα

Kanella Kotoula

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Γεωργατζάκου Χαρά

Georgatzakou Hara

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Detection of PF4/H antiplatelets antibodies to heparin induced thrombocytopenia (HIT) by stimulation of the immune system in patients of COVID-19 intensive care units and their possible association with markers of inflammation

NAME OF STUDENT

Kanella Kotoula

Registration Number

20040

nellikotoula@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Georgatzakou Hara

SECOND SUPERVISOR

Fortis Sotirios

AIGALEO 2023

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10 Φεβρουαρίου 2023

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Γεωργατζάκου Χαρά

2^{ος} Εξεταστής Φόρτης Σωτήριος

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κοτούλα Κανέλλα του Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 20040 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής 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».

Η Δηλούσα

Κανέλλα Κοτούλα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Μικροβιολογικό τμήμα του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Αθηνών κα Κώτση Χριστίνα, Κα Μπούντα Μάρθα και Τσένο Αλέξανδρο για το χώρο και τον χρόνο που μου διέθεσαν, την προϊσταμένη μου κα Παύλου Ευθυμία για την παρότρυνση και την υποστήριξη, τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό για το γέλιο και την αλληλοβοήθεια που μοιραστήκαμε τα δύο αυτά χρόνια, τους επιβλέποντες καθηγητές της παρούσας εργασίας κα Γεωργατζάκου Χαρά, κο Φόρτη Σωτήριο και κο Κριεμπάρδη Αναστάσιο γιατί ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειάστηκα και κυρίως το σύζυγό μου Γιάννη Προμπονά που χωρίς αυτόν τίποτα από αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Αφιερώσεις

Θα ήθελα να αφιερώσω αυτή τη προσπάθεια στα τρία μου παιδιά Νατάσσα, Σταμάτη και Ανδρέα με την ευχή να γίνω ένα μικρό παράδειγμα, πως στη ζωή ποτέ δεν είναι αργά για να μάθεις, να βελτιωθείς και να κυνηγήσεις τα όνειρά σου.

Περίληψη

Εισαγωγή: Η θρομβοπενία, σε ασθενείς COVID-19, προκαλούμενη από την ηπαρίνη (HIT) είναι από τις πλέον σοβαρές επιπλοκές της ηπαρίνης και του μικρού μοριακού βάρους ηπαρινών, γιατί μπορεί να οδηγήσει σε πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο. Προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (PLT) και αργότερα τη μαζική συγκόλλησή τους. Έτσι τα αιμοπετάλια καταναλώνονται με αποτέλεσμα την σοβαρή θρομβοπενία. Παράλληλα ενεργοποιείται και ο καταρράκτης της πήξης και δημιουργούνται θρόμβοι τόσο στις φλέβες όσο και στις αρτηρίες.

Σκοπός: Η ανίχνευση των αντισωμάτων PF4/H, σε ασθενείς με COVID-19 που νοσηλεύτηκαν στην ΜΕΘ του Γ.Ν.Α ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ το χρονικό διάστημα 2021-2022 (περίοδος έξαρσης της πανδημίας SARS COV-2). Επίσης στα θετικά δείγματα θα γίνει έλεγχος συσχέτισης με συγκεκριμένους δείκτες φλεγμονής σαν προγνωστικός παράγοντας της εξέλιξης του συνδρόμου HIT.

Μέθοδος- Υλικά: Στο ειδικό μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ορός και πλάσμα ασθενών στα οποία μετρήθηκαν τα HIT αντι-ηπαρινικά αντισώματα με την μέθοδο της ανοσοθολοσυμμετρίας, πραγματοποιήθηκαν οι κλασικές δοκιμασίες πήξης (PT/APTT/INR/DD/ Ινωδογόνο), μετρήσεις αιμοπεταλίων (PLT) καθώς και δείκτες φλεγμονής όπως WBC, CRP, φερριτίνη, LDH σε αναλυτές χημειοφωταύγειας, θολοσυμμετρίας και αιματολογικούς αναλυτές.

Αποτελέσματα: Ελέγχθηκαν 60 ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στην ΜΕΘ COVID-19 για PF4/H αντισώματα. Από αυτούς 43 ήταν αρνητικοί, ποσοστό 71,6% και 17 θετικοί, ποσοστό 28,4%. Η μέση ηλικία ήταν 70 έτη με 43 από αυτούς άνδρες και 17 γυναίκες. Στο σύνολο των ασθενών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της CRP, LDH, D-Dimers και φερριτίνης. Στους ασθενείς με HIT(+) παρατηρήθηκε σχετική συσχέτιση της φερριτίνης με τα αιμοπετάλια. Την ημέρα εξέτασης για HIT ο αριθμός των αιμοπεταλίων βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε ασθενείς με HIT(+).

Συμπεράσματα: Η ανάπτυξη των αντισωμάτων PF4/H στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς με COVID-19 ίσως είναι χαρακτηριστικό στην COVID-19 καθώς ένα σημαντικό ποσοστό 28,4% των ασθενών βρέθηκαν θετικοί για τα αντισώματα αυτά χωρίς όμως αυτό να υποδηλώνει πάντοτε παθολογική HIT. Η πτώση των αιμοπεταλίων ήταν μεγαλύτερη από το 50% από την αρχική τους τιμή. Όλοι οι δείκτες φλεγμονής, ιστικής βλάβης και αιμόστασης επηρεάζονται εντυπωσιακά ανεξάρτητα από την εμφάνιση ή όχι των

antiPF4/H. Οριακά αυξημένα επίπεδα LDH, D-dimers, CRP και φερριτίνης σε ασθενείς με HIT(+) συγκριτικά με ασθενείς με HIT(-).

Λέξεις κλειδιά: HIT, Θρομβοπενία, Ηπαρίνη, Αντισταμοπεταλιακά αντισώματα, COVID-19.

Abstract

Introduction: Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) in COVID-19 patients is one of the most serious complications of heparin and low molecular weight heparin, because it can lead to multiorgan failure and death. It causes platelet activation (PLT) and later massive platelet aggregation. Thus, platelets are consumed resulting in severe thrombocytopenia. At the same time, the coagulation cascade is also activated and clots are formed in both veins and arteries.

Purpose: The detection of PF4/H antibodies, in patients with COVID-19 who were hospitalized in the ICU of the General Hospital of Hippocrates in the period 2021-2022 (period of SARS pandemic COV-2 outbreak). The positive samples will also be tested for correlation with specific markers of inflammation as a predictor of the progression of HIT syndrome.

Method: In the specific part of the study, serum and plasma of patients were used in which HIT anti-heparin antibodies were measured by the immunohistochemistry method, classical coagulation tests (PT/APTT/INR/DD/Fibrinogen), platelet count (PLT) and inflammation markers such as WBC, CRP, ferritin, LDH were performed in chemiluminescence, tholosymetry and haematological analysers.

Results: 60 patients hospitalized in the COVID-19 ICU were screened for PF4/H antibodies. Of these, 43 were negative, 71.6% and 17 were positive, 28.4%. The mean age was 70 years with 43 of them male and 17 females. In all the patients statistically, significant positive correlation was observed between CRP, LDH, D-Dimmers and ferritin. In patients with HIT(+) a relative correlation of ferritin with platelets was observed. On the day of examination for HIT, platelet count was found to be statistically significantly decreased in patients with HIT(+).

Discussion: The development of PF4/H antibodies in severely affected COVID-19 patients may be typical in COVID-19 as a significant 28.4% of patients tested positive for these antibodies but this does not always indicate pathological HIT. The drop in platelets was greater than 50% from baseline. All markers of inflammation, tissue damage and haemostasis were strikingly affected independently of the presence or absence of antiPF4/H. Borderline elevated levels of LDH, D-dimmers, CRP and ferritin in HIT(+) patients compared to HIT(-) patients.

Key words: HIT, Thrombocytopenia, Heparin, Antiplatelet antibodies, COVID-19

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract	ix
Πρόλογος.....	12
Εισαγωγή	13
Νόσος COVID-19	13
Κεφάλαιο 1. Πήξη και αιμόσταση.....	15
Κεφάλαιο 2. COVID-19 και διαταραχές πήξης.....	21
Κεφάλαιο 3. Ηπαρίνη.....	24
Κεφάλαιο 4. Αιμοπετάλια- Αντιγόνα και αντισώματα αιμοπεταλίων	26
Τεχνικές ανίχνευσης Ag-Ab των PLT	28
Κεφάλαιο 5. HIT (Heparin Induced Thrombocytopenia)	29
Ανοσολογικός μηχανισμός HIT	29
Θεραπεία της HIT.....	35
Εργαστηριακή διάγνωση HIT	35
Κεφάλαιο 6. HIT και COVID-19	37
Κεφάλαιο 7. Πειραματικό μέρος	38
Εισαγωγή.....	38
Ανάλυση αποτελεσμάτων	42
Συμπεράσματα	48
Βιβλιογραφία.....	50
Πίνακας Εικόνων.....	56
Πίνακες.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
Διαγράμματα	56

Πρόλογος

Τον Δεκέμβριο του 2022 κλείσαμε 3 χρόνια από την εμφάνιση του ιού SARS- COV 2 και την έξαρση της πανδημίας. Στο διάστημα αυτό, στα μεγάλα νοσοκομεία της Αθήνας, εκατοντάδες ασθενείς οδηγήθηκαν στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) μετά από επιπλοκές της ασθένειας COVID-19.

Μία από αυτές και αρκετά σοβαρή, είναι η υπερπηκτικότητα που ανέπτυξαν αυτοί οι ασθενείς, η οποία συσχετίστηκε με κακή έκβαση της νόσου (1) (2). Για τον παραπάνω λόγο οι ασθενείς αυτοί λαμβάνουν θεραπεία με ηπαρίνη (UFH) και ηπαρίνες μικρού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Heparin-LMWH), οι οποίες είναι και το φάρμακο εκλογής για άμεση αντιθρομβωτική αγωγή (3) (4). Ωστόσο ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών, κυρίως στις ΜΕΘ, εκδήλωσε τόσο αρτηριακή όσο και φλεβική θρομβοεμβολή. Μία πιθανή αιτία αυτού του γεγονότος είναι η από την ηπαρίνη προκαλούμενη θρομβοπενία/ θρόμβωση, το γνωστό ως HIT (Heparin Induced Thrombocytopenia), μέσω διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η HIT είναι δυνητικά η πλέον σοβαρή επιπλοκή της ηπαρίνης και των LMWH και αυτό διότι σε ένα ποσοστό έως 40% μπορεί να προκαλέσει πολυοργανική ανεπάρκεια και θάνατο, λόγω των θρόμβων που δημιουργούνται σε φλέβες και αρτηρίες (5) (6). Οφείλεται στην παραγωγή ειδικών IgG αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος PF4/H (Αιμοπεταλιακός Παράγοντας 4 συνδεδεμένος με την ηπαρίνη) (7). Τα ειδικά αυτά αντισώματα (Ab) προσδένονται στο σύμπλεγμα PF4/H και προκαλούν ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (PLT) και στην συνέχεια μαζική συγκόλληση τους. Έτσι τα PLT καταναλώνονται με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρής θρομβοπενίας (8) (9). Παράλληλα ενεργοποιείται ο καταρράκτης της πήξης που οδηγεί στον σχηματισμό θρόμβων. Λόγω της υψηλής νοσηρότητας και θνησιμότητας της HIT, η έγκαιρη διάγνωσή της και η αλλαγή της αντιπηκτικής θεραπείας είναι ζωτικής σημασίας για την μείωση των επιπλοκών στους ασθενείς.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας, είναι να ανιχνεύσει τα αντισώματα PF4/H και τα οποία οδηγούν δυνητικά σε HIT σε ασθενείς με COVID-19 που νοσηλεύθηκαν στην ΜΕΘ του ΓΝΑ Ιπποκράτειο, το χρονικό διάστημα 2021-2022 (περίοδος έξαρσης της πανδημίας SARS-COV2). Επίσης θα συσχετιστούν τα δείγματα με: α. Δείκτες φλεγμονής οξείας φάσης: CRP (C αντιδρώσα πρωτεΐνη), WBC (λευκά αιμοσφαίρια) φερριτίνη β. Δείκτες ιστικής βλάβης: LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) γ. Διαταραχές πήκτικότητας του αίματος: αυξημένα D-dimers, παρατεταμένο χρόνο προθρομβίνης (PT), μειωμένη δραστικότητα αντιθρομβίνης (APTT), INR μειωμένα αιμοπετάλια.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εργαστηριακοί μέθοδοι της Ανοσοθολοσιμετρίας, Χημειοφωταύγειας και οι κλασικοί αιματολογικοί αναλυτές.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι, κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, δεν θα υπάρχει άμεση πρόσβαση στους φακέλους των ασθενών, παρά μόνο θα χρησιμοποιηθούν ανώνυμα εργαστηριακά δεδομένα από περιστατικά νοσηλευόμενων σε ΜΕΘ, στα πλαίσια εμπιστευτικότητας και των προσωπικών δεδομένων.

Εισαγωγή

Νόσος COVID-19

Η τρέχουσα έξαρση της νόσου COVID-19 ξεκίνησε στα τέλη του 2019. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας την κήρυξε πανδημία στις 11 Μαρτίου 2020. Πρόκειται για την πρώτη πανδημία που οφείλεται σε κορονοϊό (10).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι κορονοϊών. Οι περισσότεροι μολύνουν κυρίως τα ζώα. Ορισμένοι όμως μπορούν να μολύνουν και τον άνθρωπο. Η νόσος COVID-19 προκαλείται από τον κορονοϊό σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου 2 (SARS COV-2). Ο SARS-COV-2 είναι ένα στέλεχος κορονοϊού, το οποίο δεν είχε εντοπιστεί στον άνθρωπο πριν από τον Δεκέμβριο του 2019. Η πιο πιθανή φυσική δεξαμενή του SARS-COV-2 θεωρούνται οι νυχτερίδες. Έχουν ανιχνευθεί σε ένα μόνο είδος νυχτερίδας 58 ιοί SARS-COV. Παρατηρήθηκε 96% ταύτιση του

γενετικού υλικού SARS-COV-2 με τον κορονοϊό της νυχτερίδας, 91% με του μυρμηγκοφάγου και 80% με τον SARS-COV-1. Οι διαφορές στο γονιδίωμα μεταξύ του κορονοϊού της νυχτερίδας και του SARS-COV-2 δείχνουν ότι οι άνθρωποι μολύνθηκαν μέσω ενός ενδιάμεσου ξενιστή του οποίου ο αριθμός και η ταυτότητα παραμένουν ακόμα αβέβαιες (11).

Ο SARS-COV-2 είναι ένας RNA ιός με γονιδίωμα μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας. Αυτό σημαίνει ότι είναι έτοιμος για γρήγορη μετάφραση στα ριβοσώματα. Το ιικό σωματίο του ιού έχει διάμετρο 50-200 νανόμετρα. Έχει τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, την πρωτεΐνη S (ακίδα-Spike), την E (περίβλημα- Envelope), την M (μεμβράνη- Membrane) και την N (νουκλεοκαψίδιο- Nucleocapsid). Η πρωτεΐνη N συγκρατεί το γονιδίωμα RNA και οι πρωτεΐνες M, E και S δημιουργούν το ιικό περίβλημα. Η πρωτεΐνη S (ακίδα) είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση του ιού στην μεμβράνη του κυττάρου- ξενιστή. Ειδικά η υπομονάδα S₁ της ακίδας είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση και η υπομονάδα S₂ ευθύνεται για την είσοδο στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξωτερικής μεμβράνης των ανθρώπινων κυττάρων (12). Δώδεκα νουκλεοτίδια εισήχθησαν στην Spike πρωτεΐνη των παλιών κορονοϊών και έδωσαν την μετάλλαξη του SARS-COV-2. Παγκοσμίως παρακολουθούνται οι μεταλλάξεις της Spike πρωτεΐνης. Κάθε ένα από τα στελέχη του COVID-2 Β,Γ,Δ,Ο έχει μετάλλαξη στην S πρωτεΐνη σε σχέση με το στέλεχος Α (αρχικό).

Τα όργανα που επηρεάζονται περισσότερο από την ασθένεια είναι οι πνεύμονες. Ο κορονοϊός εισβάλλει στα κύτταρα μέσω ενός ενζύμου, του ACE₂ (μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2), το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στα τύπου 2 κυψελιδικά κύτταρα των πνευμόνων. Η πυκνότητα του ACE₂ σε κάθε ιστό σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου. Η λοίμωξη μπορεί να εξελιχθεί σε πνευμονία και αναπνευστική ανεπάρκεια. Η υποξαιμική αναπνευστική ανεπάρκεια αποτελεί τον πιο συχνό λόγο εισαγωγής στις ΜΕΘ (13). Οι βαρέως πάσχοντες ασθενείς όμως, σε ένα ποσοστό τους, εμφανίζουν και άλλες επιπλοκές της νόσου, όπως βακτηριακές ή μυκητιασικές συν-μολύνσεις, καρδιομυοπάθεια, καρδιακή ανεπάρκεια και μυοκαρδίτιδα που σχετίζονται με την υπερφλεγμονώδη αντίδραση και τα θρομβωτικά συμβάντα που αναπτύσσονται.

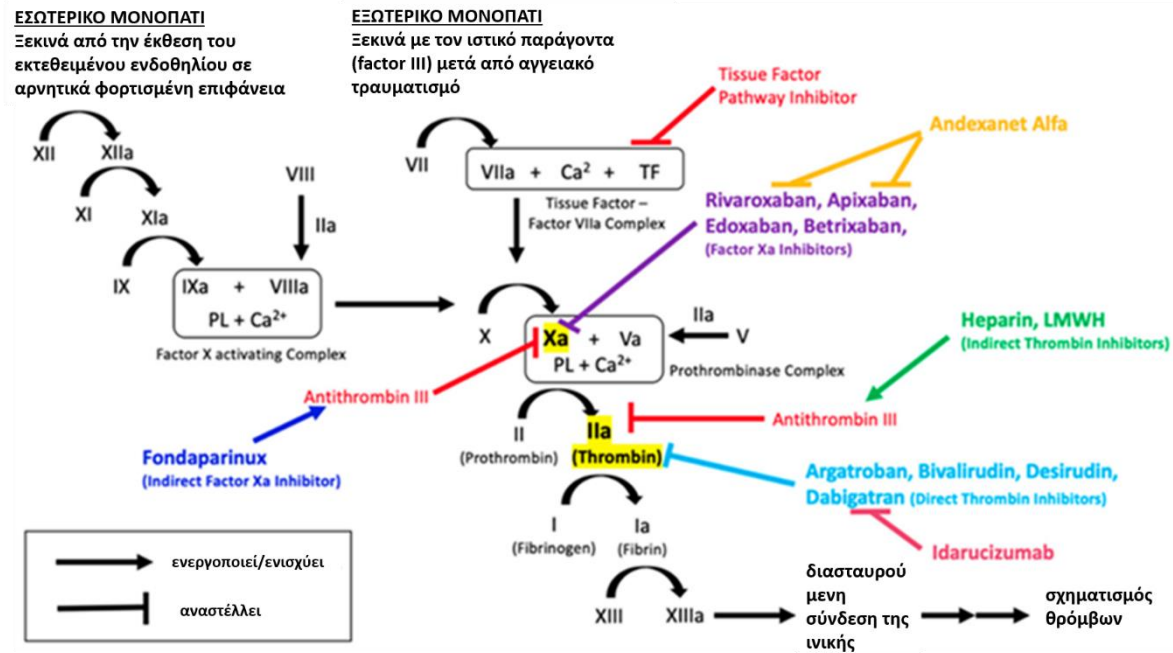
Κεφάλαιο 1. Πήξη και αιμόσταση

Με τον όρο αιμόσταση εννοούμε τη διακοπή της αιμορραγίας στο σημείο όπου ένα αγγείο τραυματίζεται. Εκεί σχηματίζεται ένας θρόμβος, δηλαδή αίμα σε στερεή μορφή, ο οποίος λειτουργεί ως "πώμα", εμποδίζοντας το αίμα να ρέει έξω από το τραυματισμένο αγγείο. Όταν υποστεί βλάβη η εσωτερική επιφάνεια των αγγείων (ενδοθήλιο), το αίμα έρχεται σε επαφή με τα συστατικά του ενδοθηλίου με άμεσο αποτέλεσμα την έναρξη της αιμόστασης (14).

Η αιμόσταση ξεκινάει με τον αγγειακό σπασμό. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου που έχουν την βλάβη εκκρίνουν την ενδοθηλίνη 1 και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν την θρομβοξάνη A₂ (TX-A₂) και την σεροτονίνη. Στην συνέχεια δημιουργείται ο αιμοπεταλιακός θρόμβος και τέλος η πήξη μέσω των κυττάρων που παράγουν τον ιστικό παράγοντα (Tissue factor ή TF ή FIII) και τους υπόλοιπους παράγοντες πήξης.

Ο αιμοπεταλιακός θρόμβος αρχίζει με την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο κάτω από το τραυματισμένο ενδοθήλιο, στην συνέχεια τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και τέλος συγκολλούνται μεταξύ τους μέσω του ινωδογόνου. Με μιά σειρά διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων από τους παράγοντες πήξης απλώνεται ένα τρισδιάστατο πλέγμα ινώδους μέσα στο θρόμβο, καταστρώντας τον στέρεο και ερυθρό.

Τα μονοπάτια της πήξης, εξωγενές και ενδογενές, είναι οι δύο δρόμοι με τους οποίους δημιουργείται το πλέγμα του ινώδους μέσα στον αιμοπεταλιακό θρόμβο (Εικόνα 1). Το εξωγενές μονοπάτι αρχίζει όταν ο ιστικός παράγοντας έρχεται σε επαφή με τον παράγοντα πήξης VII (7). Το ενδογενές μονοπάτι ξεκινά όταν το κολλαγόνο κάτω από το ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγείου έρχεται σε επαφή με τον παράγοντα XII (12). Η ενδογενής οδός είναι υπεύθυνη για την σταθεροποίηση του θρόμβου με αποτέλεσμα να παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα θρομβίνης. Επίσης συσχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα και την φλεγμονή (15).



Εικόνα 1. Εσωτερικό και εξωτερικό μονοπάτι πήξης Πηγή: <https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2021/04/21>

Η αιμόσταση περιγραφικά συνοψίζεται σε τρία στάδια: 1. Πρωτογενής: σύσπαση αγγείου και δημιουργία λευκού αιμοπεταλιακού θρόμβου, 2. Δευτερογενής: δημιουργία πλέγματος ινώδους και σταθερού θρόμβου, 3. Ινωδολύση: διάλυση της περίσσιας ποσότητας του θρόμβου.

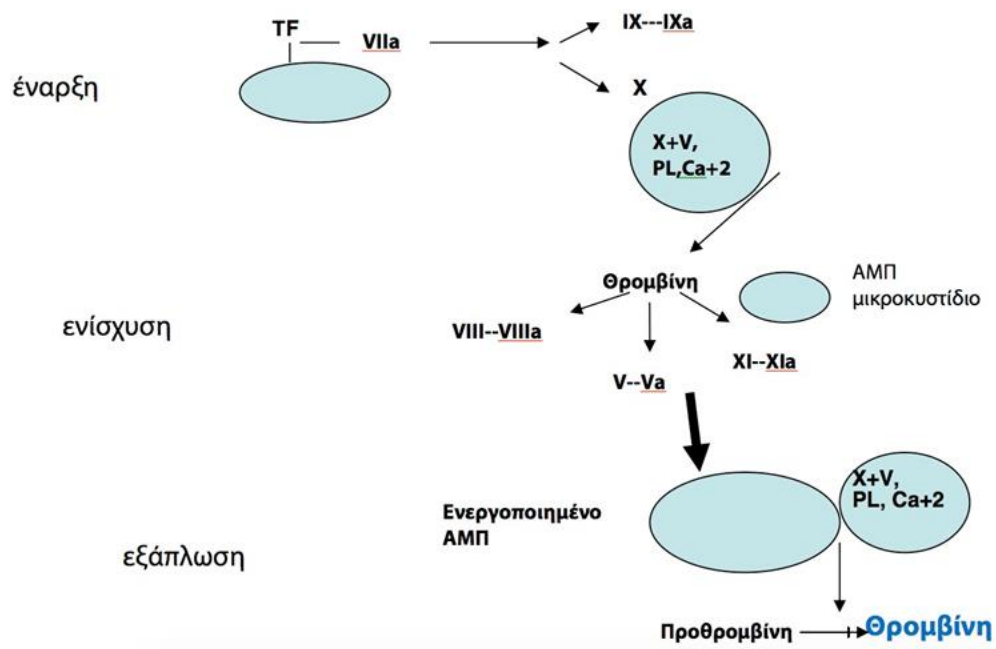
Τα αιμοπετάλια επιτυγχάνουν την δημιουργία του θρόμβου σε τρία στάδια: 1. Την προσκόλληση (adhesion) με το ενδοθήλιο μέσω του παράγοντα von Willebrand (vWF). Στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων βρίσκεται ο υποδοχέας της γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb), ο οποίος ενώνεται με το κολλαγόνο του υποενδοθηλίου και τον vWF. 2. Την ενεργοποίηση (release reaction) των αιμοπεταλίων κατά την οποία αλλάζει το σχήμα

τους και απελευθερώνονται τα κοκκία τους. Παράλληλα στο κυτταρόπλασμα μετατρέπεται το αραχιδονικό οξύ σε A₂ θρομβοξάνη που προάγει τη αγγειοσυστολή. 3. Τη συσσώρευση (aggregation) των αιμοπεταλίων, καθώς τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ενώνονται μεταξύ τους. Τα μόρια που βοηθούν στην συσσώρευση είναι το ινωδογόνο, η βιτρονεκτίνη και φμπρονεκτίνη. Οι γλυκοπρωτεΐνες GPIIb/IIIa και GPIb της μεμβράνης των αιμοπεταλίων παίζουν τον ρόλο της γέφυρας στην δημιουργία του αιμοστατικού θρόμβου (16).

Στην δευτερογενή αιμόσταση περιλαμβάνεται ο καταρράκτης της πήξης, δηλαδή ένα σύνολο διαδοχικών αντιδράσεων οι οποίες μέσω κατάλυσης οδηγούν στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες και τελικά σε πλέγμα ινικής. Το αδιάλυτο ινώδες παράγεται από την διάσπαση της θρομβίνης. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και η δημιουργία του ινώδους γίνεται παράλληλα. Στην εξωγενή οδό το ινώδες ξεκινά να δημιουργείται όταν ο ιστικός παράγοντας (Tissue factor ή TF) ενώνεται με τον παράγοντα πήξης VII (7). Ο TF ή FII βρίσκεται έξω από το αγγείο. Το σύμπλεγμα αυτό ενεργοποιεί τους παράγοντες FIX , FX και τον συμπαράγοντα FVIII και τους μετατρέπει σε ενεργοποιημένες μορφές τους. Ο TF ενεργοποιεί και τα δύο μονοπάτια πήξης καθώς FIX και ο FVIII ανήκουν στην ενδογενή οδό της πήξης.

Στην πορεία, σε ένα κοινό μονοπάτι οι ενεργοποιημένοι παράγοντες FXa και FVa πάνω στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων καταλύουν την μετατροπή μεγάλων ποσοτήτων προθρομβίνης σε θρομβίνη (Εικόνα 2). Η θρομβίνη με την σειρά της ενεργοποιεί τον FI ή ινωδογόνο ο οποίος μετατρέπεται σε ινώδες. Το ινώδες με την βοήθεια του παράγοντα FXIII μετατρέπεται σε τρισδιάστατο πλέγμα. Έτσι ισχυροποιείται ο μαλακός αιμοπεταλιακός θρόμβος. Οι παράγοντες της πήξης για να καταστούν αποτελεσματικοί έχουν ανάγκη τα ιόντα ασβεστίου (FIV) και τα φωσφολιπίδια που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Είναι πρωτεΐνες που κυκλοφορούν στο αίμα και συντίθεται στο ήπαρ εκτός από τους FVIII και TF που συντίθεται κυρίως στο ενδοθήλιο των αγγείων (15).

τα αιμοπετάλια, τον παράγοντα FVIII, ο οποίος αποσυνδέεται από τον VWF, του παράγοντα V που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τον παράγοντα XI. Ο ενεργοποιημένος από την θρομβίνη FIXa σχηματίζει σύμπλεγμα με τον συμπαράγοντα FVIIIa, το σύμπλεγμα τενάσης. Η σύνδεση αυτή υποβοηθείται από τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της επιφάνειας των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Το σύμπλεγμα τενάσης μπορεί να μετατρέπει μεγάλες ποσότητες FX σε FXa ενεργοποιώντας το σύμπλοκο προθρομβινάσης με αποτέλεσμα την δημιουργία περισσότερης θρομβίνης (17).



Εικόνα 3. Κυτταρικό Μοντέλο πήξης Πηγή: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/3087>

Η ΤΕΛΙΚΗ ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ – Η ΙΝΩΔΟΛΥΣΗ

Ινωδύλωση είναι η διαδικασία αναχαίτισης της αύξησης του θρόμβου προκειμένου να αποκατασταθεί η ροή του αίματος. Αρχικά ο θρόμβος συρρικνώνεται εξαιτίας της σύσπασης των ινιδίων του κυτταροσκελετού των αιμοπεταλίων. Στην συνέχεια η πλασμίνη διαλύει το ινώδες σε πεπτίδια, τα D-dimers. Το D-dimer είναι ένα πολύ μικρό πρωτεϊνικό θραύσμα που προέρχεται από το διαλυμένο ινώδες. Η πλασμίνη δημιουργείται από το πλασμιγόνο. Το πλασμιγόνο είναι ένα προένζυμο το οποίο μέσω των ενεργοποιητών tPA (ιστικός ενεργοποιητής), uPA (ενεργοποιητής ουροκινάσης), κινινογόνο και καλλικρεΐνη μετατρέπεται σε ενεργό ένζυμο δηλαδή τη πλασμίνη. Η ινωδύλωση αρχίζει μερικές ώρες μετά τον τραυματισμό ενός αγγείου και διαρκεί περίπου δυο με τρεις ημέρες οδηγώντας στο τέλος της αιμόστασης και στην επούλωση του αγγείου (15) (17).

Η ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΘΡΟΜΒΟΓΕΝΕΣΗΣ ΘΡΟΜΒΟΔΙΑΛΥΣΗΣ

Υπό κανονικές συνθήκες ο οργανισμός μας ισορροπεί μεταξύ αιμορραγιών και θρομβώσεων. Η αιμόσταση οφείλει να σταματήσει στο σημείο της αιμορραγίας. Έτσι η φύση έχει προβλέψει φυσικούς αναστολείς πήξης που μειώνουν την δράση των παραγόντων της πήξης. Οι πιο σπουδαίοι φυσικοί αναστολείς πήξης είναι η αντιθρομβίνη III, η πρωτεΐνη S, η πρωτεΐνη C, ο αναστολέας του μονοπατιού TF (TFPI) και η πρωτεΐνη Z. Η θρομβογένεση και θρομβόλυση γίνεται μέσω δύο προσταγλαδινών που δρουν αντίθετα. Η θρομβοξάνη A₂ μέσω της κυκλοοξυγενάσης -1 (COX 1) παράγεται από τα αιμοπετάλια και προκαλεί αγγειοσυστολή και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, άρα δημιουργία θρόμβων. Η προστακυκλίνη 12 (PG-12) μέσω της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX 2) παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλεί αγγειοδιαστολή και μείωση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, άρα μείωση θρόμβων. Η φυσιολογική αιμόσταση είναι μια ισορροπία μεταξύ προπηκτικού συστήματος (αιμοπετάλια, καταρράκτη πήξης) και αντιπηκτικού συστήματος (πλασμίνη, πρωτεΐνη S, ινωδύλωση). Αν κάποιο από αυτά τα συστήματα έχει έλλειψη, η αιμόσταση παύει να είναι ισορροπημένη με αποτέλεσμα να έχουμε την αιμορραγία ή τη θρόμβωση (15) (18).

Κεφάλαιο 2. COVID-19 και διαταραχές πήξης

Η νόσος COVID-19 συνδέεται με διαταραχές της πήξης που χαρακτηρίζονται από αύξηση των προπηκτικών παραγόντων. Οι μη φυσιολογικές παράμετροι αιμόστασης, ιδίως τα αυξημένα επίπεδα D-dimers, αναγνωρίστηκαν γρήγορα ως τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μολύνθηκαν με SARS-COV-2 και συσχετίστηκαν με κακή έκβαση της νόσου. Οι ασθενείς αυτοί αναπτύσσουν υπερπηκτικότητα που οδηγεί συχνά σε θρομβοεμβολή. Η πηκτικότητα που προκαλείται από σήψη (SIC) ή η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (DIC) ευθύνονται για την πλειονότητα των θανάτων στις ΜΕΘ COVID (19) (20). Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων, η επακόλουθη φλεγμονή και η δημιουργία προθρομβωτικού περιβάλλοντος είναι ορισμένοι προτεινόμενοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της COVID-19 (20). Ο SARS-COV-2 μπορεί να προκαλέσει θρομβώσεις με διάφορους μηχανισμούς, όπως καταιγίδα κυτταροκινών με ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνδέεται άμεσα με τις αρτηριακές θρομβώσεις), με αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβίνης και το σχηματισμό ινικής, ενώ ταυτόχρονα περιορίζεται η ινωδόλυση. Σε αυτή την αλληλεπίδραση η φλεγμονή και η αιμόσταση δρουν από κοινού για να εμποδίσουν την εξάπλωση του ιού (21). Η κατάσταση αυτή έχει ονομαστεί θρομβοφλεγμονή και σχετίζεται άμεσα με μικροαγγειακή θρόμβωση (19). Μια άλλη σημαντική διαδικασία που εμπλέκεται στην θρόμβωση και έχει άμεση σχέση με την COVID-19 είναι η υπερβολική ενεργοποίηση του συμπληρώματος που επάγει στην ιστική βλάβη και την ενδοαγγειακή θρόμβωση (22).

Κατά την διάρκεια της λοίμωξης, βαριά πάσχοντες ασθενείς εμφανίζουν ενδοθηλιακή βλάβη (αυξημένα επίπεδα παράγοντα von-Willebrand) και ενδοθηλίτιδα (παρουσία ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων και μακροφάγων) σε πολλαπλά αγγειακά στρώματα (πνεύμονες, καρδιά, νεφροί, ήπαρ, λεπτό έντερο). Αυτό μπορεί να πυροδοτήσει υπερβολική παραγωγή προθρομβίνης, να αναστείλει την ινωδόλυση και να ενεργοποιήσει τις οδούς του συμπληρώματος, ξεκινώντας έτσι την φλεγμονή και την θρόμβωση με κατάληξη την μικροθρόμβωση και την αγγειακή δυσλειτουργία. Είναι γνωστό ότι σε μια ιογενή λοίμωξη ο οργανισμός ως απάντηση εκδηλώνει μια συστηματική φλεγμονή που οδηγεί

σε ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου toll και των μονοπατιών του ιστικού παράγοντα, σε συσσώρευση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων, καθώς και σε ενεργοποίηση μακροφάγων, μονοκύτταρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, αιμοπεταλίων και λεμφοκυττάρων (23) (19). Χαρακτηριστικό της σοβαρής COVID-19 είναι η δυσλειτουργία της ανοσολογικής απάντησης και το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτταροκινών (καταρράκτης), λόγω της υπερενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας σε συνθήκες εξάντλησης των T-λεμφοκυττάρων (1). Έτσι, η λοίμωξη COVID-19 μπορεί να προκαλέσει μαζική φλεγμονώδη απάντηση με υψηλά επίπεδα κυτταροκινών όπως παράγοντα νέκρωσης α (TNF- α), ιντερλευκινών 2, 6, 7 και χημειοκινών. Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση σχετίζεται άμεσα με την υπερπηκτικότητα (22). Ένας επίσης σημαντικός παράγοντας που αναγνωρίζεται πρόσφατα είναι η παθολογική αγγειογένεση, όπως αυτή φαίνεται από την υπερέκφραση των προαγγειογενετικών παραγόντων VEGF και FGF στους ασθενείς με COVID-19.

Άλλοι παράγοντες όπως η φωσφατιδυλοσερίνη στην κυτταρική μεμβράνη, οι εξωκυτταρικές παγίδες των ουδετερόφιλων και τα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβες μπορεί να εμπλέκονται στο προπηκτικό προφίλ στη COVID-19. Σε κάποιες περιπτώσεις αναφέρεται η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που μπορούν να προκαλέσουν αρτηριακή θρόμβωση (19).

Εκτός από τους προηγούμενους μηχανισμούς διάφοροι άλλοι παράγοντες και υποκείμενα νοσήματα μπορεί να συμβάλουν σε μία υπερπηκτική κατάσταση, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η κληρονομική θρομβοφιλία, οι κεντρικοί φλεβοκαθετήρες, η ακινησία, η παχυσαρκία και η προχωρημένη ηλικία (24) (25) (26).

Τα αυξημένα επίπεδα D-dimer και ινωδογόνου είναι τα χαρακτηριστικά εργαστηριακά ευρήματα της πηκτικότητας που σχετίζονται με την COVID-19 (CAC- COVID-19 associated coagulopathy). Τα D-dimers αυξάνονται λόγω της απελευθέρωσης του ενεργοποιητή πλασμινογόνου της ουροκινάσης από τα κυψελιδικά μακροφάγα προκαλώντας την αύξηση της τοπικής ινωδόλυσης στις κυψελίδες. Στο δεύτερο μηχανισμό που είναι η άμεση μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων, επίσης παρατηρείται μαζική απελευθέρωση ενεργοποιητών πλασμινογόνου (27) (28) (29).

Στην πηκτικότητα που προκαλείται από σήψη (SIC) και την διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (DIC) υπάρχει υπερβολική παραγωγή PAI-1 (αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1) με αποτέλεσμα την καταστολή της ινωδόλυσης και ως συνέπεια, τα επίπεδα των D-dimer δεν είναι συνήθως τόσο ψηλά όσο στην CAC (27) (29). Οι τυπικές διαταραχές πήξης SIC και DIC εκδηλώνονται με μείωση των αιμοπεταλίων και αύξηση του χρόνου προθρομβίνης, λόγω της συνεχούς κατανάλωσης και εξάντλησης των αιμοπεταλίων και των πρωτεϊνών της πήξης του πλάσματος. Πάντως αυτός ο τύπος πηκτικότητας δεν εμφανίζεται συνήθως στην πρώιμη φάση της COVID-19. Η ιντερλευκίνη 1 και 6 (IL-1, IL-6) προκαλούν θρομβοκυττάρωση και υπερिनωδογοναιμία και η παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να συνεχίσει την παραγωγή αυτών των παραγόντων. Παρ' όλα αυτά, η CAC δυνητικά μπορεί να εξελιχθεί σε SIC/DIC (27).

Η φλεβική και αρτηριακή θρομβοεμβολή μπορεί να εκδηλωθεί σαν αρτηριακός θρόμβος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο, πνευμονική εμβολή, φλεβική θρόμβωση και θρομβωτική μικρο-αγγειοπάθεια (30). Οι ασθενείς με σοβαρά κλινικά συμπτώματα μπορεί να επιδεινωθούν σύντομα. Η αξιολόγησή τους πρέπει να περιλαμβάνει ηλεκτροκαρδιογράφημα, ακτινογραφίες ή αξονικές, εξετάσεις ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας, γενική αίματος, διαφορική λευκοκυτταρική μέτρηση, δείκτες φλεγμονής και δείκτη ιστικής βλάβης και δοκιμασίες πήξης (29) (31).

Εργαστηριακές διαταραχές που υποδηλώνουν βαρύτερη πρόγνωση:

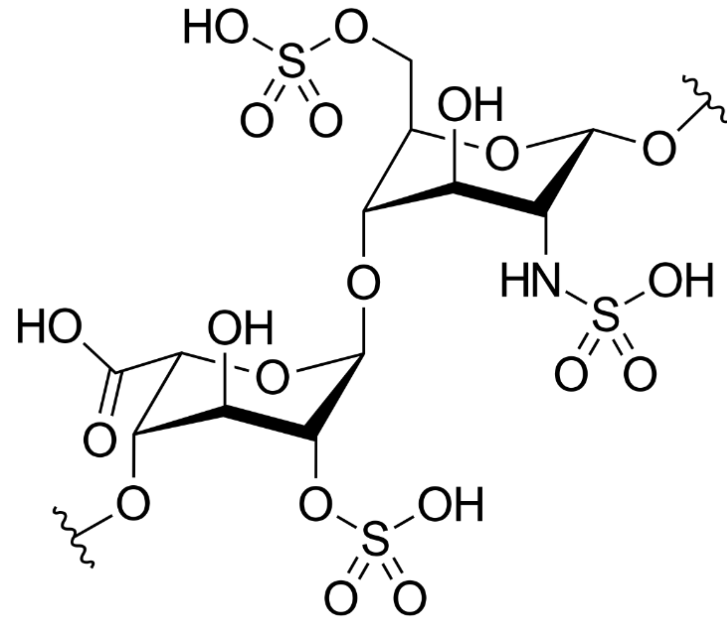
1. Δείκτες ιστικής βλάβης: Αυξημένα LDH (γαλακτική αφυδρογονάση), SGOT/ALT (πυροσταφυλική τρανσαμινάση), τροπονίνη και κρεατινίνη.
2. Δείκτες φλεγμονής οξείας φάσης: CRP (C αντιδρώσα πρωτεΐνη), TKE (ταχύτητα καθίζησης ερυθρών), PCT (προκαλσιτονίνη), WBC (λευκά αιμοσφαίρια), ινωδογόνο, φερριτίνη.
3. Διαταραχές πηκτικότητας του αίματος: Αυξημένα D-dimers, παρατεταμένοι χρόνοι προθρομβίνης (PT) και ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), μειωμένη δραστικότητα αντιθρομβίνης και μειωμένα αιμοπετάλια (PLT).

Λίγο μετά την εξάπλωση του ιού στην Ευρώπη, αρκετοί διεθνείς οδηγοί συνέστησαν αντιπηκτικά για την διαχείριση της CAC και φαρμακευτική θρομβοπροφύλαξη ρουτίνας για όλους τους νοσηλευόμενους ασθενείς με COVID-19 χωρίς αντενδείξεις (32). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές η μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη (UFH) και η ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH) ενδείκνυται για αυτούς τους ασθενείς (33).

Κεφάλαιο 3. Ηπαρίνη

Η ηπαρίνη (UFH) είναι το κλασικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της θρόμβωσης. Στον άνθρωπο παράγεται από τα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα του αίματος και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος όταν υπάρχει βλάβη ιστού. Είναι ένας υδατάνθρακας της οικογένειας των γλυκοζαμινογλυκανών, αρνητικά φορτισμένος και πλούσιος σε θεικές ρίζες (Εικόνα 4). Ανάλογα με την ικανότητα πολυμερισμού του το μόριο της ηπαρίνης μπορεί να έχει διαφορετικά μήκη μοριακής αλυσίδας άρα και διαφορετικό μοριακό βάρος. Σε μια πρώιμη μορφή της λαμβάνεται συνήθως από πνεύμονα βοοειδών και από έντερο χοίρων. Στην συνέχεια με μεθόδους βιοτεχνολογίας και την κατάλληλη επεξεργασία παίρνει την τελική φαρμακευτική της μορφή (34) .

Η αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης οφείλεται στην σύνδεσή της με την αντιθρομβίνη III. Δημιουργείται ένα ισχυρό σύμπλεγμα το οποίο αδρανοποιεί τις ενεργοποιημένες πρωτεάσες που παίρνουν μέρος στην πήξη του αίματος όπως η θρομβίνη και ο παράγοντας Χα (34) .



Εικόνα 4. Στερεοχημική δομή μονομερούς ηπαρίνης Πηγή: <https://el.wikipedia.org/wiki/media:Heparin.svg>

Έχει υπολογιστεί πως με την δράση της ηπαρίνης οι παράγοντες πήξης μπορούν να αδρανοποιηθούν μέχρι και 1000 φορές παραπάνω. Ουσιαστικά μέσω της ηπαρίνης αποτρέπεται η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και η απελευθέρωση της θρομβοπλαστίνης από τα αιμοπετάλια. Η ηπαρίνη δεσμεύεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επειδή απορροφάται λίγο από την γαστρεντερική οδό χορηγείται ενδοφλέβια ή υποδόρια ως άλας νατρίου ή ασβεστίου. Η αποτελεσματικότητα της ηπαρίνης ελέγχεται εργαστηριακά με το ΑΡΤΤ (χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης). Το ΑΡΤΤ πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 1,5. Τιμές ΑΡΤΤ μικρότερες του 1,5 αυξάνουν την πιθανότητα θρόμβωσης (34). Οι ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Heparin LMWH) είναι κλάσματα της UFH τα οποία αναπτύχθηκαν μέσω χημικής υδρόλυσης με αποπολυμερισμό ή με σύνθεση ολιγοσακχαριτών. Το μέσο μοριακό βάρος τους είναι συνήθως το

1/3 της κλασσικής μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης (35). Έχουν λιγότερες αιμορραγικές επιπλοκές, καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής και ταυτόχρονα ίδια αντιθρομβωτικά αποτελέσματα με την UFH. Έχουν κυρίως anti-Xa δραστικότητα σε αντίθεση με την UFH που έχει και anti-Xa και anti-IIa (θρομβίνη) δράση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγίες. Η δράση τόσο της UFH όσο και των LMWH πρέπει να ελέγχονται συχνά μετρώντας την anti-Xa και την anti-IIa δραστικότητα καθώς και την παράταση του APTT. Είναι σημαντικό προκειμένου να αποφευχθούν παρενέργειες όπως θρομβώσεις ή αιμορραγίες. Τέλος επειδή η απέκκρισή τους γίνεται μέσω των νεφρών πρέπει να μειώνεται η δόση τους σε νεφρική ανεπάρκεια και σε θρομβοπενία (36).

Κεφάλαιο 4. Αιμοπετάλια- Αντιγόνα και αντισώματα αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια (platelets PLT) παράγονται στο μυελό των οστών από τα μεγακαρυοκύτταρα (αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα). Κάθε μεγακαρυοκύτταρο με την βοήθεια της θρομβοποιητίνης παράγει 4.000 αιμοπετάλια μέσα σε 10 ημέρες. Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα απύρνηνα κύτταρα του αίματος. Ζουν 7 έως 10 ημέρες. Φυσιολογικές τιμές (Φ.Τ) μεταξύ 150.000 και 400.000. Θρομβοκυττάρωση= $PLT > 450.000$, θρομβοπενία= $PLT < 150.000$. Όταν $PLT < 50.000$ συνήθως ένα 40% των ασθενών οδηγείται σε αιμορραγία, καθώς είναι οι βασικοί παράγοντες της πρωτογενούς αιμόστασης.

Στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη υπάρχουν ειδικές γλυκοπρωτεΐνες που δρουν σα υποδοχείς και παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των PLT. Οι υποδοχείς αυτοί είναι: α. Ο GPIb/Ix/v ο οποίος συνδέεται με τον παράγοντα Von Willebrand και οδηγούν τα PLT στην προσκόλληση στα υποενδοθηλιακά ινίδια και β. οι GPIIb/IIIa GPVI και ιντεγρίνη αIIbβ3 με τους οποίους προσκολλώνται τα αιμοπετάλια στο κολλαγόνο (37).

Όταν τα PLT προσκολληθούν αλλάζουν σχήμα, δημιουργούν ψευδοπόδια και εκκρίνουν ADP. Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια πλησιάζουν μεταξύ τους και μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων GPIIb/IIIa συγκολλούνται με μόρια σύνδεσης κυρίως με το ινωδόγονο και τον παράγοντα Von Willebrand (38).

Τα αιμοπετάλια έχουν τα δικά τους μοναδικά αντιγόνα που εκφράζονται στην κυτταρική τους μεμβράνη (Human Platelet Antigens-HPA). Μερικές από τις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσολογία των αιμοπεταλίων. Αυτές είναι: α. Οι ιντεγρίνες οι οποίες αποτελούνται από δύο υποομάδες (α και β). Τα αιμοπετάλια έχουν δύο ιντεγρίνες της β₂ υποομάδας και 3 ιντεγρίνες της β₁ υποομάδας και β. Η GPIb-V-ix μια πλούσια σε λευκίνη γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 4 αλυσίδες τις GPIba, GPIbβ, GPV και GPIx και διαφορετική δομή από τις ιντεγρίνες (39). Τα ειδικά αντιγόνα των αιμοπεταλίων είναι πολυμορφικοί επίτοποι αυτών των γλυκοπρωτεϊνών. Τα περισσότερα από τα αντιγόνα αυτά παρατηρήθηκαν σε άτομα που ανέπτυξαν αντισώματα μετά από μεταμόσχευση, μετάγγιση ή εγκυμοσύνη που συνοδεύτηκε από θρομβοπενία ή αιμορραγία. Τα πρώτα αντιγόνα αιμοπεταλίων πήραν το όνομά τους από τα αρχικά των ασθενών που ανέπτυξαν τα αντίστοιχα αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα. Σήμερα έχουν προσδιοριστεί 27 ειδικά αντιγόνα αιμοπεταλίων τα οποία εκφράζονται σε 5 διαφορετικές γλυκοπρωτεΐνες. Εκτός από ένα όλα οφείλονται στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην νουκλεοτιδική αλυσίδα τους. Τα HPA-1,-2,-3,-4,-5,-15 είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα. Τα υπόλοιπα HPA σπανίως εμφανίζονται και αφορούν κυρίως άτομα συγκεκριμένων οικογενειών και συγκεκριμένων πληθυσμών (39). Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε την συχνότητα των HPA σε συγκεκριμένο πληθυσμό γιατί έτσι βοηθείται η διάγνωση του ανοσολογικού τύπου της θρομβοπενίας και γίνεται σωστότερος προγραμματισμός των μεθόδων ελέγχου.

Έναντι των HPA αναπτύσσονται διάφοροι τύποι αντισωμάτων τα οποία τα καταστρέφουν μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Στην συνέχεια τα αιμοπετάλια μέσω του σπλήνα απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος, καταστρέφονται και έτσι πραγματοποιείται μείωση του αριθμού τους. Τα αντιαιμοπεταλιακά αντισώματα είναι IgG ανοσοσφαιρίνες τα οποία δημιουργούνται έναντι συγκεκριμένων γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Είναι αυτοάνοσης προέλευσης, συνήθως μετά από μετάγγιση αίματος, εγκυμοσύνης και λήψης φαρμάκων. Τα HPA αντισώματα λόγω αλλοανοσοποίησης δημιουργούνται από: α. Αντίσταση στην μετάγγιση με ανοσολογικά και μη ανοσολογικά αίτια, β. Θρομβοκυτταροπενία εμβρύων και νεογνών. Κατά την εγκυμοσύνη η μητέρα ευαισθητοποιείται έναντι μη συμβατών πατρικών αντιγόνων στα αιμοπετάλια του εμβρύου (συνήθως HPA-1a). Αναπτύσσονται ειδικά IgG για τα εμβρυικά αιμοπετάλια αντισώματα τα διέρχονται από τον πλακούντα και προκαλούν ανοσολογική καταστροφή των αιμοπεταλίων του εμβρύου. Το έμβρυο αναπτύσσει θρομβοπενία

με κίνδυνο να υποστεί ενδοκρανιακή αιμορραγία και γ. Μετά- μεταγγισιακή πορφύρα. Αναπτύσσονται αντισώματα (κυρίως αντί HPA-1a) που καταστρέφουν τα μεταγγισμένα αιμοπετάλια (40) . Τα παραπάνω αντισώματα αλλοανοσοποίησης είναι συχνά σε άτομα με έλλειψη GPIIb/CD36 (υποδοχέας εκκαθάρισης).

Ένας άλλος λόγος παραγωγής αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων είναι η παρενέργεια μιας φαρμακευτικής θεραπείας. Εδώ έχουμε παραγωγή φαρμακοεξαρτόμενων και μη αντισωμάτων. Ο μηχανισμός δημιουργίας τους συνίσταται στην πρόσδεση του μορίου του φαρμάκου σε αιμοπεταλιακή μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Δημιουργούνται και προσελκύνονται αντισώματα τα οποία προσδένονται στα αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας. Ακολουθεί ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και ταχεία εμφάνιση θρομβοκυτταροπενίας. Σταματά 3 με 4 ημέρες μετά την παύση της φαρμακευτικής αγωγής.

Τεχνικές ανίχνευσης Ag-Ab των PLT

1. Δοκιμασίες ειδικές για γλυκοπρωτεΐνες.

Μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα για HPA. ELISA, MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen), δηλαδή τεχνική ακινητοποίησης των αιμοπεταλίων με μονοκλωνικά αντισώματα (μόνο για HPA-1a), ανοσοφθορισμός MACE (41) (42).

2. Τεχνική με ακέραια αιμοπετάλια.

Κυτταρομετρία ροής, SPRCA (43).

3. Γονοτύπηση αιμοπεταλίων με μοριακές μεθόδους.

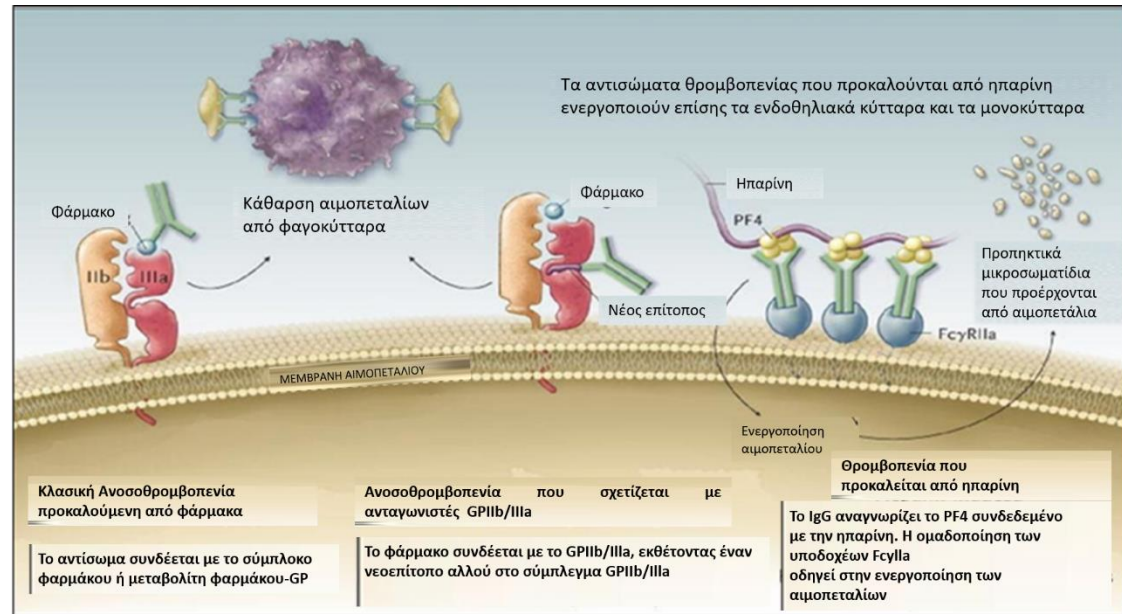
Τεχνικές PCR, RT-PCR, RFLP.OLA.

Κεφάλαιο 5. HIT (Heparin Induced Thrombocytopenia)

Η επαγόμενη από ηπαρίνη θρομβοπενία ανοσολογικού τύπου ή τύπου 2 (HIT) είναι μια σοβαρή και συχνά θανατηφόρα επιπλοκή της θεραπείας με ηπαρίνη και με ηπαρίνες χαμηλού μορτιακού βάρους. Η θνησιμότητα των ασθενών με HIT μέσα στα νοσοκομεία είναι τετραπλάσια σε σχέση με ασθενείς με άλλου τύπου θρομβοπενία, η διάρκεια νοσηλείας τους είναι τριπλάσια και το κόστος της τετραπλάσιο. Είναι μια διαταραχή που παραμένει δύσκολη τόσο στην διάγνωση όσο και στην διαχείριση (44). Σχετίζεται περισσότερο με την ηπαρίνη που προέρχεται από τα βοοειδή και λιγότερο από την χοιρινή ηπαρίνη. Η δοσολογία και ο τρόπος χορήγησης δεν επηρεάζουν συνήθως την εκδήλωση ή μη της HIT. Το HIT θεωρείται ένα παράδοξο νόσημα, καθώς ενώ για την πρόληψη της θρόμβωσης χορηγείται αντιπηκτική αγωγή, τελικά το κλινικό αποτέλεσμα είναι η θρόμβωση.

Ανοσολογικός μηχανισμός HIT

Στην HIT σαν αντιγόνα αναγνωρίζονται τα σύμπλοκα του PF4 και της ηπαρίνης. Η PF4 είναι μία πρωτεΐνη θετικά φορτισμένη η οποία είναι αποθηκευμένη στα α κοκκία των αιμοπεταλίων υπό μορφή τετραμερών. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται η PF4 απελευθερώνεται και αλληλοεπιδρά με την ηπαρίνη που είναι μια αρνητικά φορτισμένη γλυκοζαμινογλυκάνη (GAG). Η σύνδεση αυτή, που γίνεται στα κοντινά ενδοθηλιακά κύτταρα, δημιουργεί το ανοσογόνο σύμπλοκο PF4/ηπαρίνης, εκτοπίζει την δεσμευμένη αντιθρομβίνη και καθιστά το περιβάλλον προθρομβωτικό (Εικόνα 5) (45).



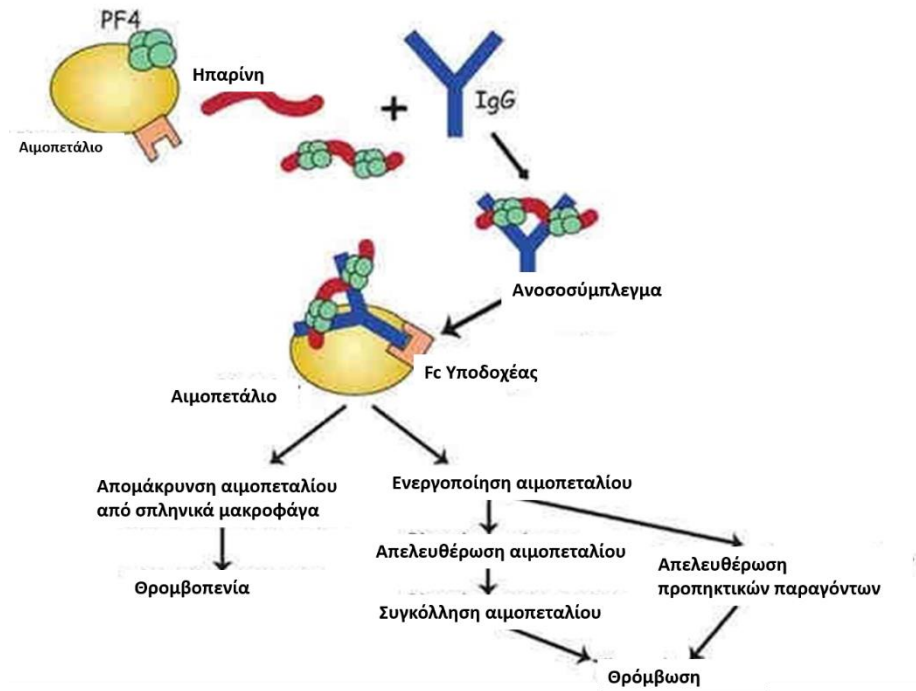
Εικόνα 5. Φαρμακοεξαρτώμενη θρομβοπενία Πηγή:<https://eclass.uniwa.gr/modules/document/index.php?course=DML104&open>

Η δημιουργία αυτών των αντιγόνων ποικίλει ανάλογα με την σύνθεση του φαρμάκου (μήκος αλυσίδας), τη διάρκεια έκθεσης του ασθενούς στο φάρμακο και την προηγούμενη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (46). Έχει παρατηρηθεί ότι το σύμπλοκο PF4/H ανευρίσκεται σε πολύ υψηλότερο ποσοστό μετά από θεραπεία με μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη από ότι με ηπαρίνη χαμηλού MB, καθώς επίσης και σε ασθενείς με ήδη επιβαρυσμένη αγγειακή νόσο, δηλαδή περισσότερη χρόνια ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων άρα και υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων PF4 (47). Ο σχηματισμός του συμπλόκου PF4/H εξαρτάται αποκλειστικά από το φορτίο. Για να σχηματιστεί το PF4/H πρέπει οι δύο ενώσεις να είναι παρούσες σε τέτοιες μοριακές ποσότητες, ούτως ώστε να εξουδετερωθεί το φορτίο. Περίσσεια του ενός ή του άλλου συστατικού οδηγούν σε ανισορροπία φορτίου, αυξημένες απωστικές δυνάμεις και αλλαγές στην δημιουργία του συμπλόκου (48). Μόρια

ηπαρίνης με επαρκές μήκος αλυσίδας μπορούν να συνδεθούν με τετραμερή PF4 και τετραμερή PF4 μπορούν να συζευχθούν με παραπάνω από ένα μόρια ηπαρίνης με αποτέλεσμα την δημιουργία ολιγομερών PF4/H. Αυτό εξηγεί την μεγαλύτερη ανοσογονικότητα της UFH έναντι των LMWH (49) (50) (51) (52).

Έναντι λοιπόν του συμπλόκου PF4/H που δρα σαν αντιγόνο, σε ένα ποσοστό 2 έως 8% των ασθενών, αναπτύσσεται το αντίσωμα HIT. Σε ασθενείς δε που υποβάλλονται σε καρδιοχειρουργική επέμβαση το ποσοστό αυτό μπορεί να φθάσει έως και 50%. Τα αντί PF4/H είναι IgG αντισώματα που εμφανίζονται 5 με 10 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας με ηπαρίνη. Σε ασθενείς που είχαν λάβει ηπαρίνη τους 3 προηγούμενους μήνες, μπορεί να εμφανισθεί πολύ νωρίτερα, ακόμα και το πρώτο εικοσιτετράωρο της επαναχορήγησης, λόγω προηγούμενης ευαισθητοποίησης. Επίσης ασθενείς που έχουν υποστεί οξεία ή χρόνια βακτηριακή λοίμωξη έχουν ήδη ευαισθητοποιηθεί καθώς η PF4 συνδέεται αποτελεσματικά με τα τοιχώματα των gram (+) και gram (-) βακτηρίων (53) (54).

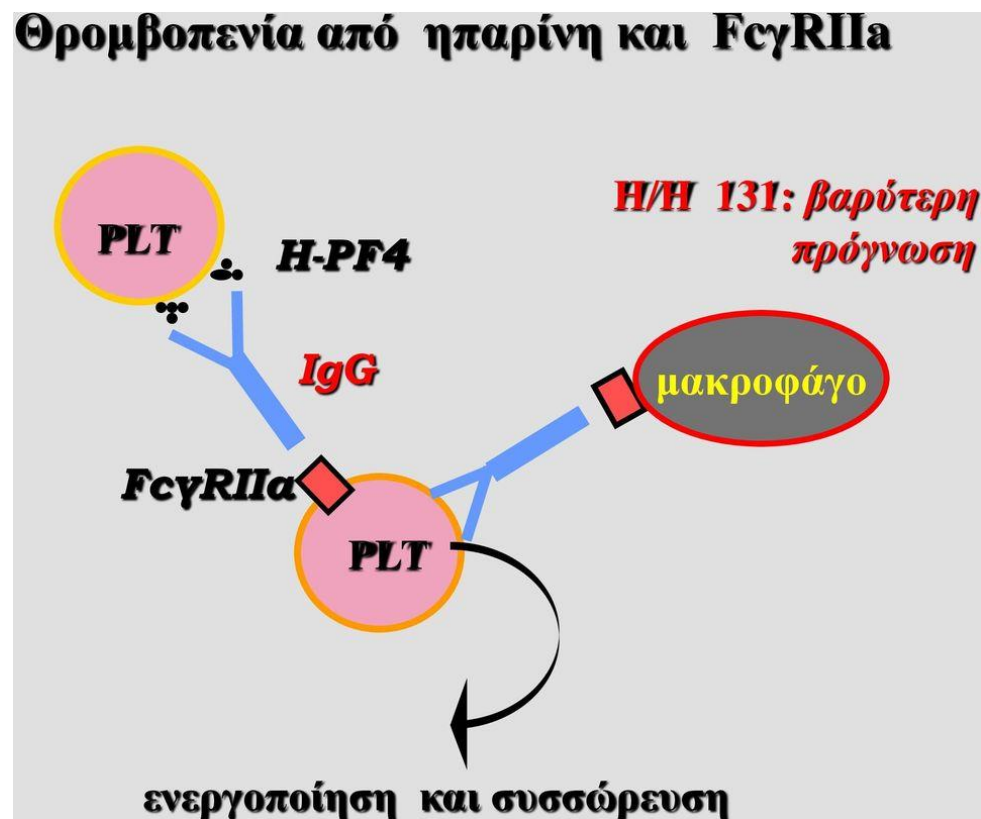
Μελέτες έχουν καταδείξει την εξιδεικευμένη σύνδεση του συμπλόκου PF4/H με τα Β λεμφοκύτταρα. Τα σύμπλοκα PF4/H ενεργοποιούν το συμπλήρωμα C3 και στην συνέχεια δεσμεύονται στα Β κύτταρα μέσω του υποδοχέα συμπληρώματος 2/CD21 (55). Η δέσμευση αυτή αυξάνει την ανοσογονικότητα του αντιγόνου κατά 1.000 έως 10.000 φορές συμβάλλοντας έτσι στην αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων. Τα βασικά κύτταρα που στοχεύουν τα αντισώματα της HIT είναι τα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην μεμβράνη τους τους υποδοχείς FcγRIIa οι οποίοι συνδέουν πολυμερή ανοσοσυμπλέγματα. Η σύνδεση FcγRIIa με τους προσδέτες τους (αντισώματα IgG έναντι συμπλόκου PF4/H), ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια σηματοδότηση που περιλαμβάνει την κινάση τυροσίνη του σπληνός (Εικόνα 6) (56) (57) (58).



Εικόνα 6. Παθογένεια HIT Πηγή: <https://www.vyrides.com.cy/zePortal/WebFiles/vyrides/WebDocuments.pdf>

Η κυτταρική ενεργοποίηση του FcγR3 προάγει την έκφραση του ιστικού παράγοντα και έτσι μέσω της θρομβίνης διευκολύνεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα ευρήματα πολλών ερευνών τόσο σε διαγονιδιακά ποντίκια όσο και σε ηπαρινισμένους ασθενείς που εκδήλωσαν HIT καταδεικνύει την σοβαρή συμβολή των υποδοχέων FcγR3 στην παθογένεια της HIT (Εικόνα 7) (59) (60) (61). Τα ουδετερόφιλα, τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα που φέρουν FcγR3 δεσμεύονται και ανταποκρίνονται διαφορετικά το καθένα στα ανοσοσυμπλέγματα της HIT, γεγονός που έχει μεγάλη σημασία στην έκφραση και στην βαρύτητα της νόσου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρόλο που στην μεμβράνη τους δεν φέρουν

FcγRIIa ενεργοποιούνται και αυτά στην HIT. Στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων εκφράζεται θειική ηπαρίνη και άλλες γλυκοπρωτεΐνες. Αυτές δεσμεύουν την PF4 που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια και δημιουργούν σύμπλοκα. Στην συνέχεια από το τραυματισμένο αγγείο απελευθερώνονται μεγάλα πολυμερή Von Willebrand τα οποία δεσμεύουν και αυτά με την σειρά τους PF4 και σύμπλοκα PF4/H και έτσι διαδίδεται περαιτέρω η θρόμβωση (62) (63).



Εικόνα 7. Θρομβοπενία από ηπαρίνη και FcγRIIa

Πηγή: <https://docplayer.gr/1697656-Thrombopenia-apo-iparini-tyroy-ii-iit-ii.html>

Το χαρακτηριστικό κλινικό αποτέλεσμα της HIT είναι η ελάττωση των αιμοπεταλίων >50% της αρχικής τους τιμής, που σε ένα ποσοστό 10 έως 15% των ασθενών μπορεί να φτάσει σε απόλυτη τιμή <30.000/κχ. Η θρομβοπενία στη HIT μπορεί να είναι μέτρια και δεν συνοδεύεται από αιμορραγία. Οι ασθενείς όμως έχουν υψηλό κίνδυνο να κάνουν θρόμβωση εξαιτίας των αυτοαντισωμάτων που κυκλοφορούν και είναι ικανά να δεσμεύσουν τα ενδογενή σύμπλοκα PF4/H. Σε κάποιες περιπτώσεις η HIT παρουσιάζεται χωρίς θρομβοπενία με θρομβωτικές όμως επιπλοκές όπως η νέκρωση του δέρματος εξαιτίας της ηπαρίνης (64). Στους περισσότερους όμως ασθενείς η θρομβοπενία εμφανίζεται μαζί με την θρόμβωση και μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε αγγείο. Μέχρι σήμερα δεν έχει εξηγηθεί γιατί κάποιοι ασθενείς με HIT αντισώματα παραμένουν ασυμπτωματικοί, ενώ κάποιοι άλλοι αναπτύσσουν σοβαρή νόσο. Από κλινικές μελέτες έχει καταδειχθεί πως τα υψηλά επίπεδα αντισωμάτων, η ικανότητα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ο ισότυπος IgG σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικού επεισοδίου (45). Επίσης η βαρύτητα της θρομβοπενίας συσχετίζεται με το θρομβωτικό κίνδυνο, καθώς οι ασθενείς των οποίων τα αιμοπετάλια μειώθηκαν σε ποσοστό περίπου ίσο με 90% από τα αρχικά τους (πριν την εκδήλωση της HIT) έχουν οχταπλάσιο κίνδυνο θρόμβωσης σε σχέση με ασθενείς που είχαν μείωση μικρότερη ή ίση του 30% των αρχικών τους αιμοπεταλίων (65). Στους υγιείς ανθρώπους τα αντί PF4/H είναι εξαιρετικά σπάνια. Υπάρχει περίπτωση να εμφανισθούν σε κάποιους ασθενείς που αναπτύσσουν φλεγμονή μετά από χειρουργείο. Η HIT ωστόσο είναι μία νόσος που αφορά κατά πλειονότητα ασθενείς που εκτέθηκαν στην ηπαρίνη. Η βαρύτητα της ποικίλει ανάλογα με τα υποκείμενα νοσήματα, όπως προϋπάρχουσα αγγειακή νόσος, το είδος της ηπαρίνης που χορηγείται (μη κλασματοποιημένη ή μικρού μοριακού βάρους) και τη δόση (προφυλακτική ή θεραπευτική) (66) .

Το κομβικό σημείο στην αναγνώριση της HIT είναι η χρονική στιγμή που ξεκινάνε οι επιπλοκές της ηπαρίνης. Σε ασθενείς που δεν είχαν εκτεθεί νωρίτερα σε ηπαρίνη τα PF4/H αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν περίπου 4 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας και η θρομβοπενία ή θρόμβωση 1 έως 5 ημέρες μετά την ανίχνευση των αντισωμάτων (67). Σε ήδη ευαισθητοποιημένους ασθενείς με αντί PF4/H η θρομβοπενία εμφανίζεται αυτόματα το 1^ο εικοσιτετράωρο. Μια σπάνια παραλλαγή της HIT είναι η «καθυστερημένη HIT» στην οποία παρόλο

που η θρομβοπενία εμφανίζεται στον σωστό χρόνο, η θρόμβωση εκδηλώνεται μέρες ή ακόμα και εβδομάδες μετά την διακοπή της ηπαρίνης (68) (69).

Θεραπεία της HIT

Η θεραπεία της HIT έγκειται ουσιαστικά στην άμεση διακοπή της ηπαρίνης και της αντικατάστασης της με άλλα αντιπηκτικά φάρμακα. Τα αιμοπετάλια πρέπει να επανέλθουν σε φυσιολογικά επίπεδα. Μπορούν να γίνουν και άλλοι χειρισμοί όπως πλασμαφαίρεση (αν δεν υποχωρεί το σύνδρομο), χρησιμοποίηση γ-σφαιρίνης, τοποθέτηση φίλτρου στην κάτω κοίλη αν υπάρχει επέκταση της θρόμβωσης. Η κάθαρση των αντισωμάτων γίνεται μέσα σε 50 έως 90 ημέρες από την διακοπή της θεραπείας. Ένα ποσοστό περίπου 35% των ασθενών μπορεί να δίνουν θετικά αντισώματα μέχρι και ένα χρόνο μετά (70). Στο 65% των ασθενών τα αιμοπετάλια επανέρχονται στις φυσιολογικές τιμές μια εβδομάδα μετά την διακοπή της ηπαρίνης. Όμως συνεχίζουν να διατρέχουν κίνδυνο θρόμβωσης για 4 έως 6 εβδομάδες αφού αντισώματα PF4/H κυκλοφορούν ακόμα. Δεν φαίνεται να υπάρχει ανοσολογική μνήμη σε ασθενείς που νόσησαν από HIT. Μια νέα έκθεση σε ηπαρίνη μήνες ή χρόνια μετά την αρχική, ενέχει τον κίνδυνο εμφάνισης αντισωμάτων παρόμοιο με τη πρώτη (71).

Εργαστηριακή διάγνωση HIT

Η εργαστηριακή διάγνωση της HIT περιλαμβάνει δύο κατηγορίες εξετάσεων:

1. Τις λειτουργικές δοκιμασίες στις οποίες έχουμε επαγωγή του φαινομένου in vitro.

Στις λειτουργικές δοκιμασίες ουσιαστικά ελέγχεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων:

- SRA (14C-Serotonin release assay) προσδιορισμός ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με απελευθέρωση ραδιοσημασμένης σεροτονίνης. Χρησιμοποιεί πλυμένα αιμοπετάλια και έχει ευαισθησία 80-90% και ειδικότητα 85-95%.
- PEA (P- selection Expression assay) Κυτταρομετρία ροής με βάση την έκφραση P-σελεκτίνης και Ανεξίνης-V.

- Multiplate platelet analyser. Προσδιορισμός συγκόλλησης αιμοπεταλίων σε αναλυτή ολικού αίματος.
- PAT (platelet aggregation test). Προσδιορισμός συσσώρευσης αιμοπεταλίων.
- HIPA test (Heparin Induced Platelet Aggregation test). Προσδιορισμός συσσώρευσης αιμοπεταλίων επαγόμενη από ηπαρίνη.

Οι παραπάνω δοκιμασίες ανιχνεύουν τα αντισώματα που μπορούν να δεσμεύσουν και να διασυνδέσουν την FcγRIIIa των αιμοπεταλίων. Παρόλο που έχουν μεγάλη ειδικότητα (>95%) έχουν μικρότερη ευαισθησία (56%-100%). Αποκαλύπτουν μόνο IgG αντισώματα, έχουν τεχνικές δυσκολίες και επηρεάζονται αρκετά από τις αλλαγές των αιμοπεταλίων λόγω των διαφόρων παραγόντων του πλάσματος. Έτσι δεν χρησιμοποιούνται στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια (72) (73) (74).

2. Τις ανοσολογικές δοκιμασίες στις οποίες ανιχνεύουμε την παρουσία αντισωμάτων. Στις ανοσολογικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται οι κλασικές μέθοδοι της ανοσολογίας.

- Ανοσοθολοσιμετρία
- Πηκτή σωματιδίων ID-Diamed
- ELISA στερεάς φάσης για ανίχνευση αντί PF4/H
- ELISA υγρής φάσης για ανίχνευση αντί PF4/H
- Χημειοφωταύγεια

Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι τεχνικά πιο εύκολες, έχουν υψηλή ευαισθησία (>99%) και αποκαλύπτουν μόνο το αντί PF4/H. Έχουν όμως χαμηλή ειδικότητα (30-70%) στη διάγνωση της HIT εξαιτίας της εμφάνισης αντισωμάτων σε ασυμπτωματικούς ασθενείς. Η ειδικότητα στις μεθόδους αυτές μπορεί να αυξηθεί με το ποσοτικό προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων (75) (76) (77).

Η διάγνωση της HIT είναι ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα που πρέπει συνδυαστικά να βασίζεται στην κλινική βαθμολόγηση στις ανοσολογικές δοκιμασίες και στις λειτουργικές δοκιμασίες των αιμοπεταλίων (όπου αυτές είναι δυνατές).

Ο ασθενής με HIT πρέπει να παρακολουθείται στενά με καθημερινές εργαστηριακές εξετάσεις ελέγχου PLT, πήξης, δεικτών φλεγμονής και ιστικής βλάβης και η θεραπεία του να αναπροσαρμόζεται ανάλογα με τη κλινική εικόνα του και τα αποτελέσματα των εξετάσεων.

Κεφάλαιο 6. HIT και COVID-19

Είναι άραγε η HIT χαρακτηριστικό στην COVID-19; Στη διεθνή βιβλιογραφία τα τελευταία 2 χρόνια έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές για την παρουσία αντι PF4/h σε ασθενείς με COVID-19 σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι σε άλλες ομάδες ασθενών. Όμως όλα αυτά τα αντισώματα δεν θα οδηγήσουν απαραίτητα σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σε θρομβοπενία- θρόμβωση HIT. Ο κίνδυνος εκδήλωσης HIT εξαρτάται κατά πολύ από την κλινική κατάσταση του ασθενή. Καθώς η COVID-1, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επηρεάζει τόσο την πρωτογενή και δευτερογενή αιμόσταση όσο και την ανοσολογική απόκριση, είναι αναμενόμενο οι βαρέως πάσχοντες ασθενείς στις ΜΕΘ COVID να κινδυνεύουν περισσότερο από την HIT. Η διάγνωσή της, εκτός από την ανίχνευση των αντισωμάτων PF4/H, πρέπει να επιβεβαιώνεται με λειτουργική δοκιμασία αιμοπεταλίων και την κλινική εικόνα με βάση τη βαθμολογία 4T (παρουσία θρόμβωσης, θρομβοπενία, χρόνος πτώσης των αιμοπεταλίων μετά την έκθεση στην ηπαρίνη, άλλες αιτίες θρομβοπενίας, με δύο βαθμούς να δίνονται σε κάθε κριτήριο). Στην πράξη όμως αυτό σπάνια γίνεται συνδυαστικά και έτσι στις περισσότερες μελέτες οι πληροφορίες σχετικά με την επίπτωση της HIT στους ασθενείς με COVID-19 διαφέρουν σημαντικά, ενώ κάποιες είναι και αλληλοαντικρουόμενες (78) . Επίσης έχουν αναφερθεί συμβάντα που μοιάζουν με HIT, χωρίς προηγούμενη έκθεση σε ηπαρίνη και στα οποία ενοχοποιείται ο μηχανισμός πρόσδεσης της ακίδας του SARS-COV-2 σε υποδοχέα της επιφάνειας των αιμοπεταλίων που τα οδηγεί σε ενεργοποίηση. Η κατάσταση περιπλέκεται ακόμη περισσότερο με τα περιστατικά θρομβώσεων μετά τον εμβολιασμό κατά του SARS-COV-2 (79) (80) (81) (82). Η παθοφυσιολογία του φαινομένου δεν έχει ακόμα κατανοηθεί επαρκώς. Οι υψηλές δόσεις ηπαρίνης που παίρνουν οι βαρέως πάσχοντες ασθενείς με COVID-19 μπορούν ίσως να εξηγήσουν την αυξημένη επίπτωση της HIT σε αυτούς τους ασθενείς. Το σίγουρο είναι ότι χρειάζονται περισσότερες και πληρέστερες έρευνες πάνω στην ανάπτυξη αντισωμάτων PF4/H ή HIT στους ασθενείς με COVID-19.

Κεφάλαιο 7. Πειραματικό μέρος

Εισαγωγή

Στο δεύτερο, εργαστηριακό μέρος της εργασίας το δείγμα αποτελούν εξήντα ασθενείς με επιβεβαιωμένη COVID-19 (θετική PCR) που εισήχθησαν στην ΜΕΘ COVID του ΓΝΑ Ιπποκράτειου κατά το διάστημα από τον Απρίλιο 2021 έως τον Ιανουάριο 2022. Το ιατρικό ιστορικό, τα υποκείμενα νοσήματα καθώς και οι ενδείξεις εισαγωγής στην ΜΕΘ δεν είναι γνωστά. Όλοι οι ασθενείς που επιλέχθηκαν για την εργασία λάμβαναν ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα θετικά HIT αντισώματα δεν επιβεβαιώθηκαν με λειτουργικές δοκιμασίες αιμοπεταλίων και δεν είναι γνωστή από τον κλινικό ιατρό η βαθμολογία 4T των ασθενών αυτών. Στους εξήντα αυτούς ασθενείς αναλύθηκε το εργαστηριακό προφίλ, ξεκινώντας από την ημερομηνία εισαγωγής τους στην ΜΕΘ. Οι μετρήσεις των δεικτών που θα αναφερθούν παρακάτω έγιναν την ημέρα που ο κλινικός γιατρός ζήτησε εξέταση για HIT που είναι και η ημέρα που παρατηρείται η μεγαλύτερη πτώση των αιμοπεταλίων, συνήθως 7 έως 14 ημέρες από την εισαγωγή. Εξαιρέση αποτελεί η φερριτίνη της οποίας η αύξηση παρατηρείται 7 τουλάχιστον ημέρες πριν την πτώση των αιμοπεταλίων.

Παράμετροι που μετρήθηκαν:

1. PT: (Prothrombin Time) χρόνος προθρομβίνης.
2. APTT: (Activated Partial Thromboplastin Time) χρόνος ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης. Το APTT αξιολογεί το ενδογενές μονοπάτι της πήξης.
3. INR: (International Normalized Ratio). Το PT/INR αξιολογεί το εξωγενές μονοπάτι της πήξης.
4. WBC: (White Blood Cells) λευκά αιμοσφαίρια. Δείκτης φλεγμονής.

5. Ινωδογόνο: (παράγοντας πήξης Ι) Πολυπεπτίδιο που συντίθεται στο ήπαρ. Πρωτεΐνη οξείας φάσης που με την βοήθεια της θρομβίνης σχηματίζει το ινώδες.
6. D-Dimer: Το μικρότερο πρωτεϊνικό θραύσμα από την διάλυση του ινώδους που υπάρχει στον θρόμβο. Δείκτης θρομβογένεσης και θρομβοδιάλυσης.
7. CRP: (C Reaction Protein) C αντιδρώσα πρωτεΐνη. Πρωτεΐνη οξείας φάσης. Συντίθεται στο ήπαρ από τα μακροφάγα και τα λιποκύτταρα. Συνδέεται με την φωσφοχολίνη, πρωτεΐνη στην επιφάνεια νεκρών κυττάρων και βακτηρίων που οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Δείκτης φλεγμονής.
8. LDH: Γαλακτική αφυδρογονάση. Ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Στον κύκλο της γλυκόλυσης η LDH καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ. Είναι δείκτης ιστικής βλάβης.
9. Φερριτίνη: Ενδοκυτταρική πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου. Χρησιμοποιείται και σαν δείκτης φλεγμονής οξείας φάσης.
10. PLT: Αιμοπετάλια. Βασικός παράγοντας πρωτογενούς αιμόστασης.
11. HIT: Μονοκλωνικά αντισώματα PF4/H.
12. Το φύλλο του ασθενούς.
13. Η ηλικία του ασθενούς

Οι μέθοδοι και οι αναλυτές που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις είναι:

- Λευκά και αιμοπετάλια: Αιματολογικός αναλυτής ολικού αίματος ADVIA.
- Δοκιμασίες πήξης: Αναλυτής BCS XP SIEMENS.
- LDH: Θολοσιμετρία, βιοχημικός αναλυτής ALINITY ABBOTT.
- CRP: Θολοσιμετρία, βιοχημικός αναλυτής ALINITY C ABBOTT.
- Φερριτίνη: Χημειοφωταύγεια, ανοσολογικός αναλυτής ALINITY I ABBOTT.

- HIT: Μέθοδος ανοσοθολοσιμετρίας στον αναλυτή ACL TOP 750 SERIES IL ANTISELL. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι που μιμείται τα ανθρώπινα αντισώματα HIT (anti PF4/H) επικαλύπτεται πάνω σε σωματίδια LATEX. Παρουσία PF4 από ανθρώπινα αιμοπετάλια με σουλφονικό πολυβινυστέρα (PVS) και το δείγμα του ασθενούς εμφανίζεται μια ανταγωνιστική αντίδραση συγκόλλησης. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων στο δείγμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό συγκόλλησης και προσδιορίζεται με την μέτρηση της μείωσης του μεταδιδόμενου φωτός που προκαλείται από τα συσσωματώματα (βασική αρχή μεθόδου θολοσιμετρίας).

Προκειμένου να αντιληφθούμε το μέγεθος της διαταραχής στη πήξη του αίματος και στους δείκτες φλεγμονής και ιστικής βλάβης που έχουν υποστεί οι ασθενείς αυτοί, αναφέρονται παρακάτω οι φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων που μετρήθηκαν:

CRP: 0-5 mg/l

LDH: 125-220 U/L

PLT: 130.000-400.000 /UL

WBC: 5200-12.400/UL

HIT: (-) <1,0 U/ml

PT: 11-14 sec

APTT: 27-35 sec

INR: 0,8-1,2 (δίχως αντιπηκτική αγωγή)

Ινωδογόνο (FIB): 200-400 mg/dl

D-Dimer: < 500 µg/L

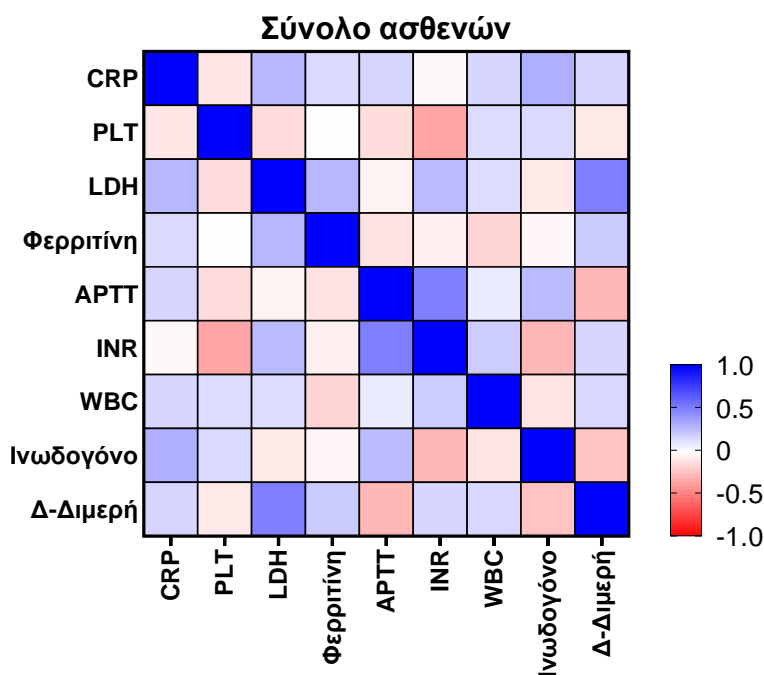
TT (χρόνος θρομβίνης): <21 sec

Φερριτίνη: 21,9-275 ng/ml

Για τη στατιστική ανάλυση και τα διαγράμματα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Graphpad Prism 8.0. Εφαρμόστηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney μεταξύ των ομάδων που ελέγχθηκαν. Επίσης ελέγχθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

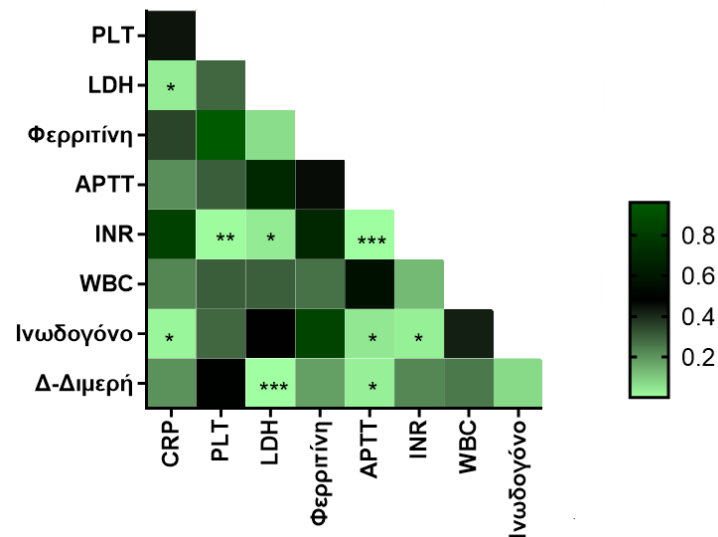
- Σε μια αρχική ανάλυση συσχετίστηκαν οι παράμετροι που μετρήθηκαν στο σύνολο των ασθενών, προκειμένου να παρατηρήσουμε πως συνδυάζονται οι δείκτες φλεγμονής και ιστικής βλάβης με τους δείκτες πήξης του αίματος στους ασθενείς αυτούς. Ακολουθεί σχετικό διάγραμμα heatmaps στο οποίο έχουν χρησιμοποιηθεί τα παθολογικά PLTs και δεν χρησιμοποιήθηκε το PT παρά μόνο το APTT. Το θερμικό διάγραμμα (Διάγραμμα 1) απεικονίζει τις συσχετίσεις μεταξύ των μετρήσεων στο σύνολο των ασθενών. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ μετρήσεων, με μπλε οι θετικές συσχετίσεις και με λευκό όσοι συνδυασμοί δεν εμφανίζουν συσχέτιση. Στο σύνολο των ασθενών παρατηρείται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της CRP και LDH (Spearman $r=0.142$, $p=0.032$) και της CRP με το Ινωδογόνο (Spearman $r=0.3120$, $p=0.016$). Αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση των PLTs με το INR (Spearman $r=-0.354$, $p=0.005$).



Διάγραμμα 1. Θερμικό διάγραμμα συσχετίσεων μεταξύ των μετρήσεων στο σύνολο των ασθενών.

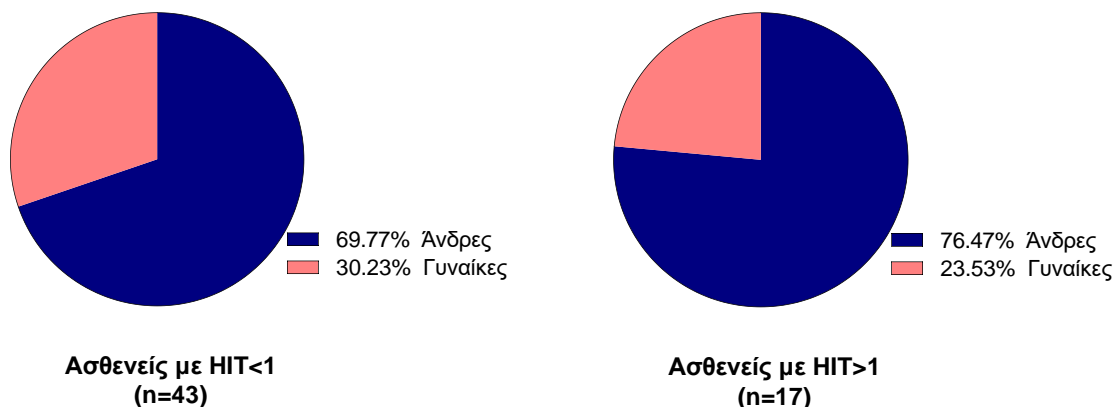
- Το διάγραμμα (Διάγραμμα 2) παρουσιάζει τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Στο διάγραμμα όσο πιο ανοιχτό πράσινο χρώμα, τόσο ισχυρότερη η στατιστική συσχέτιση. Θετικές στατιστικές συσχετίσεις της LDH με INR (Spearman $r=0.270$, $p=0.037$ και με τα Δ-διμερή (Spearman $r=0.507$, $p < 0.0001$). Σημαντικά θετικές στατιστικές συσχετίσεις του APTT με το INR (Spearman $r=0.499$, $p=0.00005$) και με το Ινωδογόνο (Spearman $r=0.266$,

$p = 0.0042$) και αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα Δ-διμερή (Spearman $r = -0.286$, $p = 0.027$). Αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση του INR με το Ινωδογόνο (Spearman $r = -0.286$, $p = 0.028$).

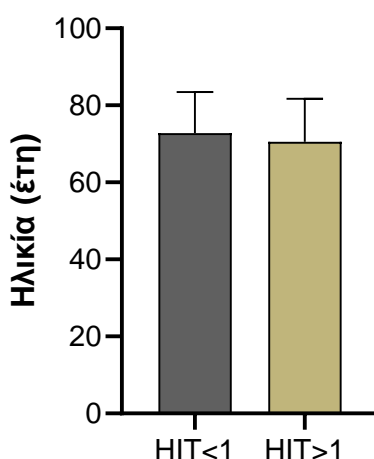


Διάγραμμα 2. Θερμικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις στατιστικά συσχετίσεις μεταξύ των μετρήσεων. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $p < 0.001$.

- Στην συνέχεια της ανάλυσης των αποτελεσμάτων οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ασθενείς με HIT αρνητικό ($HIT < 1$) και σε ασθενείς με HIT θετικό ($HIT > 1$). Ειδικότερα 43 ήταν αρνητικοί (71,6%) και 17 ήταν θετικοί (28,4%). Από τους 60 ασθενείς 43 ήταν άνδρες και 17 γυναίκες με ηλικίες από 56 έως 91 ετών, με μία γυναίκα 41 ετών και έναν άνδρα 93 ετών. Όπως παρατηρούμε στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 3,4) το ποσοστό θετικών HIT ασθενών δεν αλλάζει ιδιαίτερα σε σχέση με το φύλο, 13 άνδρες θετικοί και 4 γυναίκες, με τους άνδρες να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό θετικότητας καθώς και στο δείγμα μας οι άνδρες είναι οι περισσότεροι ασθενείς. Σε σχέση με την ηλικία πάλι δεν αλλάζει το ποσοστό θετικότητας καθώς και στις δύο ομάδες ασθενών ο μέσος όρος ηλικίας είναι τα 70 έτη.



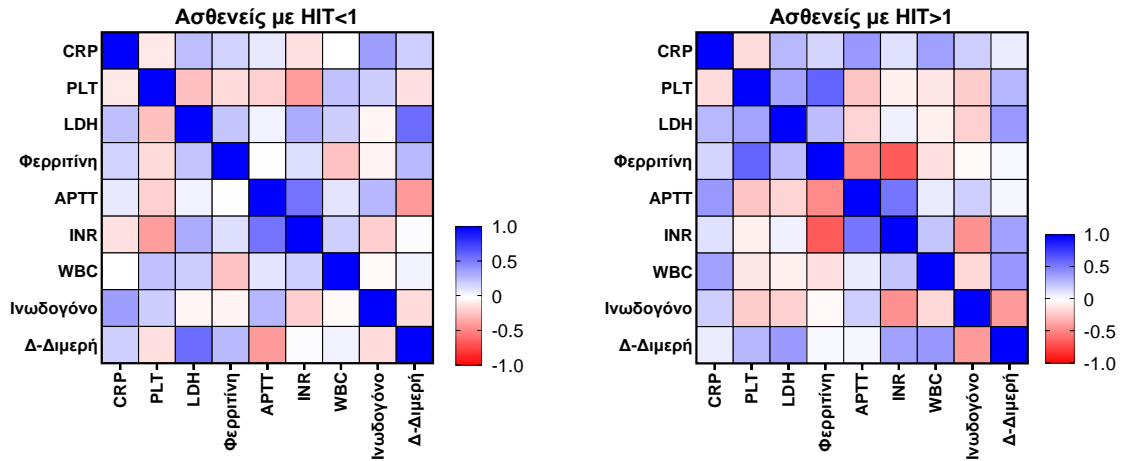
Διάγραμμα 3. Διαγράμματα πίτας συσχέτισης φύλου σε ασθενείς με αρνητικό HIT (αριστερά) και ασθενείς με θετικό HIT (δεξιά).



Διάγραμμα 4. Μέση ηλικία ασθενών στις ομάδες ασθενών με HIT<1 και HIT>1

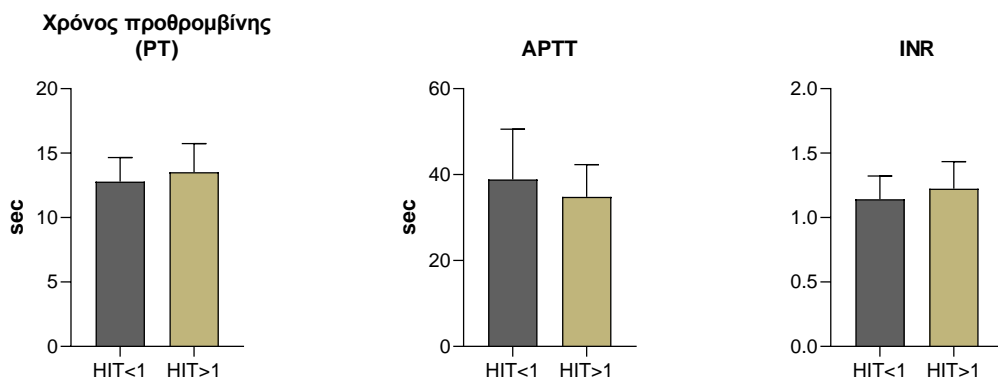
- Στο επόμενο διάγραμμα (Διάγραμμα 5) απεικονίζονται για τις δύο ομάδες ασθενών (HIT<1 και HIT>1) οι συσχετίσεις των παραμέτρων CRP, PLTs, LDH, φερριτίνης, APTT, INR, WBC, ινωδογόνου και Δ-Διμερών μεταξύ τους. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ μετρήσεων, με μπλε οι θετικές συσχετίσεις και με λευκό όσοι συνδυασμοί δεν εμφανίζουν συσχέτιση. Στους ασθενείς με HIT<1 παρατηρήθηκαν οι εξής συσχετίσεις: Ινωδογόνο με CRP θετική συσχέτιση (Spearman $r=0.32$, $p=0.013$), INR με PLT αρνητική συσχέτιση (Spearman $r=-0.32$, $p=0.010$) και θετικές συσχετίσεις INR με LDH (Spearman $r=0.33$, $p=0.033$) και INR με APTT (Spearman $r=0.55$, $p<0.001$). Τα Δ-Διμερή σχετίζονται θετικά με την LDH (Spearman $r=$

0.58, $p < 0.001$) και αρνητικά με το APTT (Spearman $r = -0.40$, $p = 0.008$). Στους ασθενείς με HIT>1 η φερριτίνη σχετίζεται θετικά με τα PLT (Spearman $r = 0.61$, $p = 0.038$) και αρνητικά με το INR (Spearman $r = -0.65$, $p = 0.027$).



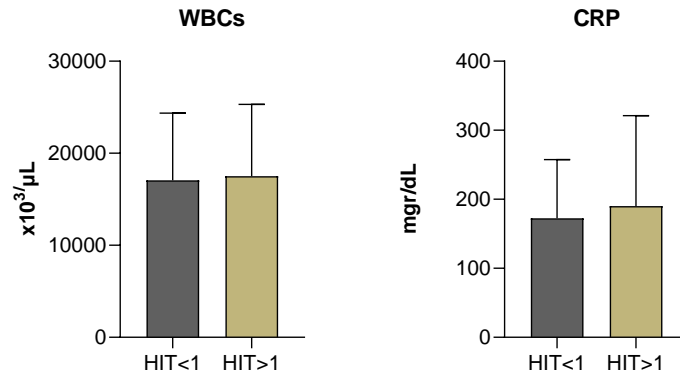
Διάγραμμα 5. Θερμικά διαγράμματα συσχετίσεων των παραμέτρων CRP, PLTs, LDH, φερριτίνης, APTT, INR, WBC, Ινωδογόνου και Δ-Διμερών σε ασθενείς με HIT<1 (αριστερά) και HIT>1 (δεξιά).

- Στην συνέχεια αναλύθηκαν ο χρόνος προθρομβίνης, το APTT και το INR στις δύο ομάδες ασθενών (με HIT<1 και HIT>1). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 6.



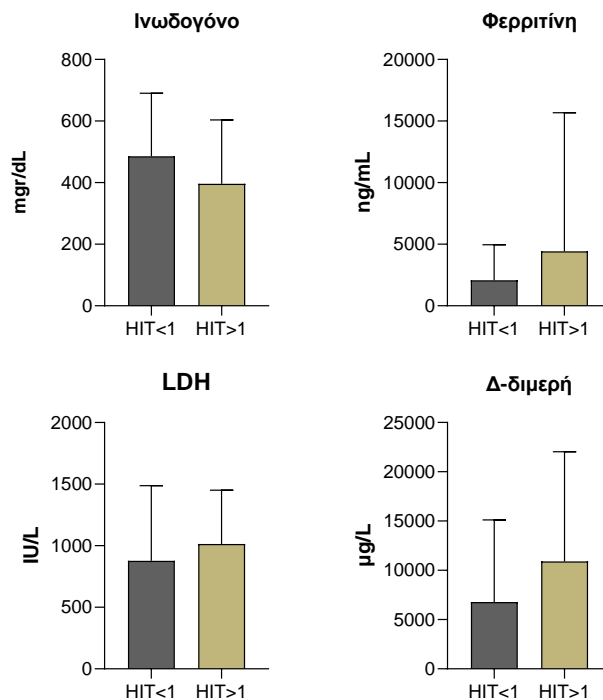
Διάγραμμα 6. Χρόνος προθρομβίνης (PT), APTT και INR σε ασθενείς με θετικό και αρνητικό HIT.

- Στη συνέχεια (Διάγραμμα 7) παρουσιάζεται ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και τα επίπεδα της CRP στους ασθενείς με αρνητικό (HIT<1) και θετικό (HIT>1). Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών.



Διάγραμμα 7. Αριθμός WBCs και επίπεδα CRP στις δύο ομάδες ασθενών (HIT<1 και HIT>1).

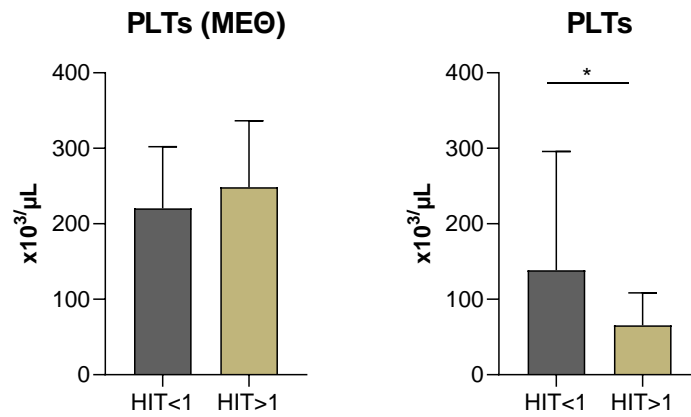
- Ακολούθως, μελετήθηκαν τα επίπεδα του ινωδογόνου, της φερριτίνης, της LDH και των Δ-Διμερών στις δύο ομάδες ασθενών (Διάγραμμα 8), χωρίς ωστόσο να παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων (HIT<1 και HIT>1) για καμία από αυτές τις παραμέτρους.



Διάγραμμα 8. Επίπεδα ινωδογόνου, φερριτίνης, LDH και Δ-διμερών στις δύο ομάδες ασθενών (HIT<1 και HIT>1).

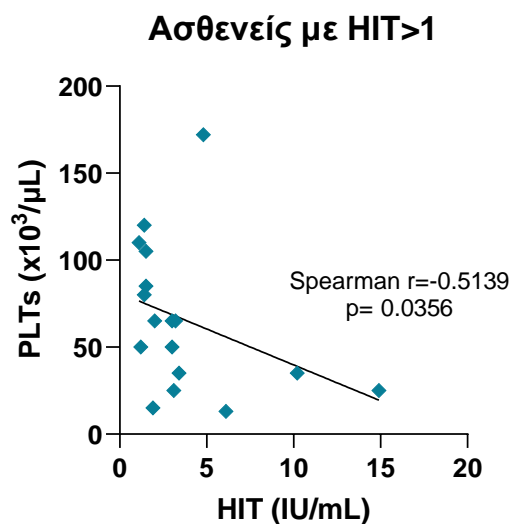
- Ελέγχθηκε επίσης, ο αριθμός των αιμοπεταλίων κατά την εισαγωγή των ασθενών στην ΜΕΘ [PLTs (ΜΕΘ)] καθώς και την ημέρα της εξέτασης για HIT (PLTs) (Διάγραμμα 9).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των PLTs την ημέρα εισαγωγής των ασθενών στην ΜΕΘ, ωστόσο την ημέρα εξέτασης για HIT, ο αριθμός αιμοπεταλίων βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε ασθενείς με HIT>1 ($p=0.0405$).



Διάγραμμα 9. Αριθμός αιμοπεταλίων την ημέρα εισαγωγής των ασθενών στην ΜΕΘ [PLTs(ΜΕΘ)] και κατά την ημέρα μέτρησης HIT [PLTs] στους ασθενείς με θετικό και αρνητικό HIT.

- Αξίζει να σημειώσουμε ότι στους ασθενείς με HIT>1 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση του αριθμού των PLTs με τις τιμές του HIT (Spearman $r= -0.5139$, $p= 0.0356$, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 10.



Διάγραμμα 10. Συσχέτιση αριθμού PLTs και επιπέδων HIT στην ομάδα των ασθενών με HIT>1.

Συμπεράσματα

Από την μελέτη των παραπάνω διαγραμμάτων διαπιστώνουμε ότι:

- Οι δείκτες πήξης αίματος παραμένουν περίπου ίδιοι και στις δύο ομάδες ασθενών (Διάγραμμα 6).

- Δεν παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα των WBCs μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών καθώς και οι δύο ομάδες έχουν ιδιαίτερα αυξημένα λευκά αιμοσφαίρια, ενώ στην ομάδα των HIT (+) ασθενών παρατηρείται μια μεγαλύτερη αύξηση της CRP (Διάγραμμα 7).

- Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα LDH, φερριτίνης και Δ-Διμερών σε ασθενείς με θετικό HIT (Διάγραμμα 8) συγκριτικά με ασθενείς με αρνητικό HIT, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές, πιθανά λόγω της μεγάλης διακύμανσης που παρατηρήθηκε στις μετρήσεις των παραμέτρων αυτών αλλά και στον σχετικά μικρό αριθμό ασθενών στην ομάδα με HIT>1. Οι ασθενείς με θετικό HIT εμφάνισαν ιδιαίτερα αυξημένες τιμές σε αυτές τις παραμέτρους γεγονός που συνάδει με τα ήδη αναφερόμενα στην διεθνή βιβλιογραφία (19) (20) (27). Ένα στοιχείο που μπορεί ίσως να προστεθεί είναι η ιδιαίτερα αυξημένη φερριτίνη και LDH, των οποίων οι τιμές αυξάνονται πολύ πριν την εκδήλωση του HIT και την πτώση των αιμοπεταλίων και που θα μπορούσαν ίσως να λειτουργήσουν σαν δείκτες πρόγνωσης ενός πιθανού HIT. Επίσης επιβεβαιώνεται (Διάγραμμα 9,10) η δραματική πτώση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με θετικό HIT καθώς οι τιμές τους πέφτουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% από την αρχική τους τιμή. Σε 4 δε ασθενείς η απόλυτη τιμή των αιμοπεταλίων έπεσε κάτω από τις 30.000 γεγονός που επίσης επιβεβαιώνει μελέτες και συμπεράσματα στην διεθνή βιβλιογραφία (64) (67) (Διάγραμμα 10).

- Τα αποτελέσματα της μελέτης κανονικά θα έπρεπε να συγκριθούν με μία ομάδα ηπαρινισμένων ασθενών που δεν είχαν μολυνθεί με SARS-COV-2 και νοσηλεύθηκαν για άλλες αιτίες. Η δυνατότητα αυτή δεν υπήρχε στα πλαίσια της διπλωματικής. Στις αναφορές της βιβλιογραφίας όμως η συνολική αναφερόμενη επίπτωση της HIT σε αυτούς τους ασθενείς κυμαίνεται από 0,2 έως 8% (78) και είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί πως στους non -COVID ασθενείς των ΜΕΘ η HIT είναι σπάνια, παρά την υψηλή χρήση της ηπαρίνης (εξαιρούνται οι καρδιοχειρουργημένοι ασθενείς) (78). Έτσι λοιπόν το ποσοστό 28,4% των ασθενών με COVID-19 που βρέθηκαν θετικοί σε PF4/H αντισώματα θεωρείται

σημαντικό συγκριτικά με τους υπόλοιπους ηπαρινισμένους ασθενείς. Ίσως η ανάπτυξη των αντισωμάτων αυτών να αποτελεί χαρακτηριστικό στην COVID-19 χωρίς όμως να υποδηλώνει πάντοτε παθολογική HIT.

- Καθώς ο SARS-COV-2 και οι επιπλοκές του δείχνουν ότι ήρθαν για να μείνουν, γίνεται όλο και περισσότερο φανερό πως πρέπει να εκπονηθούν πολλές περαιτέρω μελέτες, προκειμένου να εκτιμήσουμε με βεβαιότητα την επίπτωση και τον προσδιορισμό των παραγόντων κινδύνου για HIT σε ασθενείς με COVID-19. Το κομβικό σημείο στις μελέτες αυτές θα πρέπει να είναι η άμεση συνεργασία κλινικών γιατρών και εργαστηριακών, καθώς το πρόβλημα είναι πολυπαραγοντικό και άπτεται τόσο της κλινικής εικόνας όσο και των εργαστηριακών ευρημάτων.

Βιβλιογραφία

1. **Tang N, Li D, Wang X, Sun Z.** Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 4 18, 2020, pp. 844-847.
2. **Noppacharn Uaprasert, Nuanrat Tangcheewinsirikul, Ponlapat Rojnuckarin, Rushad Patell, Jeffrey I. Zwicker.** Heparin-induced thrombocytopenia in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Blood Advances.* 11 9, 2021, pp. 4521-4534.
3. **Thachil J, Tang N, Gando S.** ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 5 18, 2020, pp. 1023-1026.
4. **Cuker A, Tseng EK, Nieuwlaat R.** American Society of Hematology 2021 guidelines on the use of anticoagulation for thromboprophylaxis in patients with COVID-19. *Blood Advances.* 3 5, 2021, pp. 872-888.
5. **Rhodes GR, Dixon RH, Silver D.** Heparin induced thrombocytopenia: eight cases with thrombotic-hemorrhagic. *Ann Surg.* 1977, pp. 752-758.
6. **Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissac AM, Fressinaud E, Wolf.** Platelet factor 4 coplexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1992, pp. 95-96.
7. **Dunlop MG, Prowse CV, Dawes J.** Heparin-induced platelet factor 4 release in patients with atherosclerotic peripheral vascular disease. *Thromb Research.* 1987, pp. 409-410.
8. **Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Cent M, Kelton JG.** Heparin Induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular or unfractionated heparin. *N Eng J Med.* 1995, pp. 1330-1335.
9. **Palatianos GM, Foroylis CN, Vassili MI, Matsouka P, Astras GM, Kantidakis GH, Iliopoulou E, Melissari EN.** Preoperative detection and management of immune heparin-induced thrombocytopenia in patients undergoing heart surgery with iloprost. *J Thorac Cardiovasc Surgery.* 2004, pp. 548-554.
10. **(ΠΟΥ), Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.** vaccination-info.eu. <https://vaccination-info.eu/el/covid-19/pliorefories-shetika-me-ti-noso-covid-19>. [Online] 03 2020. <https://vaccination-info.eu/el/covid-19/pliorefories-shetika-me-ti-noso-covid-19>.
11. **ECDC.** «Outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): increased transmission beyond China – fourth update». <https://www.ecdc.europa.eu/>. [Online] 02 20, 2020.
12. **Thomas, Sunil.** The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. *Pathogens and Immunity.* 10 19, 2020, pp. 342-363.
13. **Michael Letko, Andrea Marzi & Vincent Munster.** Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology.* 02 24, 2020, pp. 562-569.

14. **AJ, Gale.** Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011, 39, pp. 273-280.
15. **Κώστας, Πισσαρίδης.** Η ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ – Η ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ – Η ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΕΣ. [Online] 10 02, 2020. <https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2020/10/02>.
16. **Μαριάννα, Πολίτη.** PLATELETS. FUNCTION AND DISTURBANCES. PARTICIPATION IN THE HEMOSTATIC PROCESS. *HEMATOLOGY LESSONS (undergraduation lessons).* KALIPOS open academic editions, 2015, Vol. chapter 6.
17. **Furie, B., Furie, B.C.** Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med.* 2008, pp. 938-949.
18. **Schulze, H., Shivdasani, R.A.** Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost.* 2005, pp. 1717-1724.
19. **Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al.** Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* 2020. 2020, pp. 1017-1032.
20. **Maria Tsafaridou¹, Ilianna Maniadaki², Ioannis Koutroubakis¹, Dimitrios N. Samonakis.** Coagulation disorders and vascular diseases of the liver in patients with COVID-19. *Clinical and Experimental Hepatology.* 2022, pp. 97-102.
21. **Giannis D, Ziogas IA, Gianni P.** Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J Clin Virol* 2020. 2020.
22. **Lorini FL, Di Matteo M, Gritti P, et al.** Coagulopathy and COVID-19. *Eur Heart J Suppl* 2021. 2021, pp. E95-E98 (Suppl E) .
23. **Sandor-Keri J, Benedek I, Poxa S, Benedek I.** The link between SARS-CoV-2 infection, inflammation and hypercoagulability—impact of hemorheologic alterations on cardiovascular mortality. *J Clin Med.* 2021, p. 10: 3015.
24. **Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, et al.** Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int* 2021. pp. 20-32., 41:.
25. **Tsutsumi T, Saito M, Nagai H, et al.** Association of coagulopathy with liver dysfunction in patients with COVID-19. *Hepatol Res* 2021. 2021, pp. 51: 227-232.
26. **Sonzogni A, Previtali G, Seghezzi M, et al.** Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver Int* 2020. 2020, pp. 40: 2110-2116.
27. **Iba T, Levy JH, Connors JM, et al.** The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit Care.* 2020, pp. 24(1):360. - PMC - PubMed.
28. **Marietta M, Coluccio V, Luppi M.** COVID-19, coagulopathy and venous thromboembolism: More questions than answers. *Intern Emerg Med.* 2020, pp. 15(8):1375–87. - PMC - PubMed.

29. **I. Gusti Ngurah Mahaalit Aribawa, Leonard Hidayat, Putu Utami Dewi, and Christopher Ryalino.** Progressive COVID-19-Associated Coagulopathy Despite Treatment with Therapeutic Anticoagulation and Thrombolysis. *Am J Case Rep.* 2021, pp. e930667-1–e930667-6.
30. **Abou-Ismaïl MY, Diamond A, Kapoor S, et al.** The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb Res.* 2020. 2020, pp. ;194:101–15.PMC - PubMed.
31. **Senapathi TGA, Ryalino C, Raju A, et al.** Perioperative management for cesarean section in COVID-19 patients. *Bali J Anaesthesiol.* 2020, pp. 4(Suppl 1.):13–16.
32. **Ibañez C, Perdomo J, Calvo A, et al. 2021.** High D dimers and low global fibrinolysis coexist in COVID19 patients: what is going on in there? *J Thromb Thrombolysis.* 2021, pp. PubMed, 51(2):308–12. - PMC -.
33. **Mucha SR, Dugar S, McCrae K, et al.** Coagulopathy in COVID-19: Manifestations and management. *Cleve Clin J Med.* 2020, pp. PubMed, 87(8):461–68. -.
34. **Μαρία Χουντή, Κωνσταντίνος Χατζηβέης, Παναγιώτης Χουντής.** Μηχανισμός δράσης και η σημασία της ηπαρίνης στη χειρουργική νοσηλευτική. *Ελληνικό Περιοδικό της Νοσηλευτικής Επιστήμης.* 2014, pp. 7(1): 11-19.
35. **Μελισσάρη, Ε.** Η από την ηπαρίνη προκαλούμενη θρομβοπενία/θρόμβωση. *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ.* 2008, 14, pp. 127-131.
36. **Η. Κυριάκου, Α. Κουσουλάκου, Ε. Μελισσάρη.** Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση της κληρονομικής θρομβοφιλίας. *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ.* 2008, 13, pp. 71-78.
37. **L. PorcelijnE. Huiskes, M. de Haas.** Progress and development of platelet antibody detection. *Transfusion and Apheresis Science.* 12 31, 2019.
38. **Kelton J.G, .Denomme G, Lucarelli A.** Comparison of the measurement of surface or total platelet-associated IgG in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Am J Hematol.* 1985, pp. 1-5.
39. *Η αιμοδοσία το 2015. Θεοδώρα, Ασπογέρακα.* Αθήνα: Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, 2015. Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία.
40. **Foxcroft Z., Campbell K, Merieux Y., Urbaniak S, Brierley M., Rigal D.** Report on the 13th international society of blood transfusion platelet immunology workshop. *Vox Sang.* 2007, pp. 300-305.
41. **Schiffer C.A., Young V.** Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *BLOOD.* 1983, pp. 311-317.
42. **Kiefel V., Santoso S., Weishet M., Mueller-Eckhardt C.** Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA). A new tool for the identification of platelet antigens. *Blood.* 1987, pp. 1722-1726.

43. **Lazarchick J, Hall S.A.** Platelet-associated IgG assay using flow cytometric analysis. *J Immunol Methods*. 1986, pp. 257-265.
44. **Dhakal P, Giri S, Pathak R, Bhatt VR.** Heparin Reexposure in Patients with a History of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015, pp. 21:626–31.
45. **Arepally, Gowthami M.** Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 05 25, 2017, pp. 2864–2872.
46. **Gowthami M. Arepally, Douglas B. Cines.** Pathogenesis of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Transl Res*. 05 15, 2020, pp. 225: 131–140.
47. **Mullen MP, Wessel DL, Thomas KC, Gauvreau K, Neufeld EJ, McGowan FX Jr., et al.** The incidence and implications of anti-heparin-platelet factor 4 antibody formation in a pediatric cardiac surgical population. *Anesth Analg*. 2008, pp. 107:371–8.
48. **Cai Z, Yarovoi SV, Zhu Z, et al.** Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun*. 2015, p. 6:8277.
49. **Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, Reilly MP, Arepally G, Weisel JW, et al.** Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2005, pp. 105:131–8.
50. **Suvarna S, Espinasse B, Qi R, Rauova L, Poncz M, Cines DB, et al.** Determinants of PF4/heparin immunogenicity. *Blood*. 2007, pp. 110:4253–60.
51. **Warkentin TE, Sheppard JA, Moore JC, Cook RJ, Kelton JG.** Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2009, pp. 113:4963–9.
52. **Greinacher A, Alban S, Omer-Adam MA, Weitschies W, Warkentin TE.** Heparin-induced thrombocytopenia: a stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings. *Thromb Res*. 2008, pp. 122:211–20.
53. **Krauel K, Potschke C, Weber C, et al.** Platelet factor 4 binds to bacteria, inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2011, pp. 117(4):1370-1378.
54. **Krauel K, Schulze A, Jouni R, et al.** Further insights into the anti-PF4/heparin IgM immune response. *Thromb Haemost*. 2016, pp. 115(4):752-761.
55. **Khandelwal S, Lee GM, Hester CG, et al.** The antigenic complex in HIT binds to B-cells via complement and complement receptor 2 (CD21). *Blood*. 2016, pp. 128(14):1789-1799.
56. **Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, et al.** Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1994, pp. 84(11):3691-3699.
57. **Qiao, J, Mohammad Al-Tamimi, Ross I Baker, Robert K Andrews, Elizabeth E Gardiner,.** FcγRIIIa: The platelet FC receptor. *Immunol Rev*. 11 2015, pp. 268(1):241-52.

58. **M. Arman, K Krauel.** Human Platelet IgG Fc receptor FcγRIIIa in immunity and thrombosis. *Thromb Haemost.* 06 2015, pp. 893-908.
59. **Arepally GM, Mayer IM.** Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood.* 2001, pp. 98(4):1252-1254.
60. **Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, et al.** PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood.* 2012, pp. 119(22):5285-5293.
61. **Tutwiler V, Madeeva D, Ahn HS, et al.** Platelet transactivation by monocytes promotes thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2016, pp. 127(4):464-472.
62. **Trikalinos TA, Karassa FB, Ioannidis JP.** Meta-analysis of the association between low-affinity Fcγ receptor gene polymorphisms and hematologic and autoimmune disease. *Blood.* 2001, pp. 98:1634–5.
63. **Johnston I, Sarkar A, Hayes V, et al.** Recognition of PF4-VWF complexes by heparin-induced thrombocytopenia antibodies contributes to thrombus propagation. *Blood.* 2020, pp. 135(15):1270–80.
64. **Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J, Kelton JG.** Heparin-induced skin lesions and other unusual sequelae of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome: a nested cohort study. *Chest.* 2005, pp. 127(5):1857-1861.
65. **Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P.** Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost.* 2005, pp. 94(1):132-135.
66. **Warkentin TE, Sheppard J, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A.** Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2006, pp. 108(9):2937-2941.
67. **Warkentin TE, Sheppard JA, Moore JC, Cook RJ, Kelton JG.** Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2009, pp. 113(20):4963-4969.
68. **Warkentin TE, Kelton JG.** Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med.* 2001, pp. 135(7):502-506.
69. **Rice L, Attisha WK, Drexler A, Francis JL.** Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med.* 2002, pp. 136(3):210-215.
70. **Mattioli AV, Bonetti L, Zennaro M, Ambrosio G, Mattioli G.** Heparin/PF4 antibodies formation after heparin treatment: temporal aspects and long-term follow-up. *Am Heart J.* 2009, pp. 157(3):589-595.

71. **Warkentin TE, Sheppard J-AI.** Serological investigation of patients with a previous history of heparin-induced thrombocytopenia who are re-exposed to heparin. *Blood*. 2014, pp. 123(16):2485-2493.
72. **Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Laporte-Simitsidis S, Delahousse B, Gruel Y.** Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14-serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. 1999, pp. 111:700–6.
73. **Padmanabhan A, Jones CG, Curtis BR, Bougie DW, Sullivan MJ, Peswani N, et al.** A novel PF4-dependent platelet activation assay identifies patients likely to have heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis (HIT). *Chest*. 2016.
74. **Warkentin TE, Arnold DM, Kelton JG, Sheppard JI, Smith JW, Nazy I.** Platelet-Activating Antibodies Are Detectable at the Earliest Onset of Heparin-Induced Thrombocytopenia, With Implications for the Operating Characteristics of the Serotonin-Release Assay. *Chest*. 2018, pp. 153:1396–404.
75. **Warkentin TE, Greinacher A, Gruel Y, et al.** Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis. *J Thromb Haemost*. 2011, pp. 9(12):2498-2500.
76. **Nagler M, Bachmann LM, Ten Cate H, Ten Cate-Hoek A.** Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2016, pp. 127(5):546-557.
77. **Sun L, Gimotty PA, Lakshmanan S, Cuker A.** Diagnostic accuracy of rapid immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2016, pp. 115(5):1044-1055.
78. **Emmanuel J, Favaloro, Brandon Michael Henry, Giuseppe Lippi.** The complicated relationships of heparin-induced thrombocytopenia and platelet factor 4 antibodies with COVID-19. *Int J Lab Hematol*. 08 2021, pp. 43(4): 547–558.
79. **Nazy I, Jevtic SD, Moore JC, et al.** Platelet-activating immune complexes identified in critically ill COVID-19 patients suspected of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2021, pp. 19(5):1342-1347, .
80. **Hvas AM, Favaloro EJ, Hellfritsch M.** Heparin-induced thrombocytopenia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Expert Rev Hematol*. 2021, pp. 30:1-12.
81. **Liu X, Zhan X, Xiao Y, et al.** Heparin-induced thrombocytopenia is associated with a high risk of mortality in critical COVID-19 patients receiving heparin-involved treatment. *medRxiv preprint*. 04 23, 2020, p. 20076851.
82. **Scully M, Singh D, Lown R, et al.** Pathologic antibodies to platelet factor 4 after ChAdOx1 nCoV-19 vaccination. *N Engl J Med*. 2021, p. 10.1056/NEJMoa2105385.

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1 Εσωτερικό και εξωτερικό μονοπάτι πήξης Πηγή: https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2021/04/21	16
Εικόνα 2 Οκαταρράκτης της πήξης Πηγή: https://repository.kallipos.gr/handle/11419/3087	18
Εικόνα 3 Κυτταρικό Μοντέλο πήξης Πηγή: https://repository.kallipos.gr/handle/11419/3087	19
Εικόνα 4 Στερεοχημική δομή μονομερούς ηπαρίνης Πηγή: https://el.wikipedia.org/wiki/mediα:Heparin.svg	25
Εικόνα 5 Φαρμακοεξαρτώμενη θρομβοπενία Πηγή: https://eclass.uniwa.gr/modules/document/index.php?course=DML104&open ...	30
Εικόνα 6 Παθογένεια HIT Πηγή: https://www.vyrides.com.cy/zePortal/WebFiles/vyrides/WebDocuments.pdf	32
Εικόνα 7 Θρομβοπενία από ηπαρίνη και FcγRIIIa Πηγή: https://docplayer.gr/1697656-Thrombopenia-aro-iparini-tyroy-ii-iit-ii.html	33

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1 Θερμικό διάγραμμα συσχέτισεων μεταξύ των μετρήσεων στο σύνολο των ασθενών.	42
Διάγραμμα 2 Θερμικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις στατιστικά συσχετίσεις μεταξύ των μετρήσεων. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $p: 0.001$	43
Διάγραμμα 3 Διαγράμματα πίτας συσχέτισης φύλου σε ασθενείς με αρνητικό HIT (αριστερά) και ασθενείς με θετικό HIT (δεξιά).	44
Διάγραμμα 4 Μέση ηλικία ασθενών στις ομάδες ασθενών με HIT<1 και HIT>1	44
Διάγραμμα 5 Θερμικά διαγράμματα συσχέτισεων των παραμέτρων CRP, PLTs, LDH, φερριτίνης, APTT, INR, WBC, Ινωδογόνου και Δ-Διμερών σε ασθενείς με HIT<1 (αριστερά) και HIT>1 (δεξιά).	45
Διάγραμμα 6 Χρόνος προθρομβίνης (PT), APTT και INR σε ασθενείς με θετικό και αρνητικό HIT.	45
Διάγραμμα 7 Αριθμός WBCs και επίπεδα CRP στις δύο ομάδες ασθενών (HIT<1 και HIT>1).	46
Διάγραμμα 8 Επίπεδα ινωδογόνου, φερριτίνης, LDH και Δ-διμερών στις δύο ομάδες ασθενών (HIT<1 και HIT>1).	46
Διάγραμμα 9 Αριθμός αιμοπεταλίων την ημέρα εισαγωγής των ασθενών στην ΜΕΘ [PLTs(MEΘ)] και κατά την ημέρα μέτρησης HIT [PLTs] στους ασθενείς με θετικό και αρνητικό HIT.	47
Διάγραμμα 10 Συσχέτιση αριθμού PLTs και επιπέδων HIT στην ομάδα των ασθενών με HIT>1.	47