



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

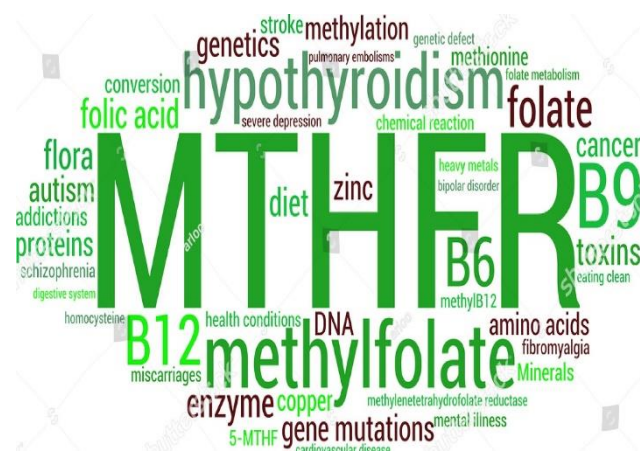


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης του φολικού οξέος και της βιταμίνης B12 σε ασθενείς με μετάλλαξη MTHFR

POST GRADUATE THESIS

### Levels of homocysteine folic acid and vitamin B12 in patients with MTHFR mutation



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Μαίρη Μιχαήλ

Mary Mekhail

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χαρά Γεωργατζάκου

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2023



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



POST GRADUATE THESIS

**Levels of homocysteine folic acid and vitamin B12 in patients with  
MTHFR mutation**

MARY MEKHAIL

Dml20045

Mariamekhail96@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Chara Georgatzakou

SECOND SUPERVISOR

Anastasios Kriebardis

AIGALEO 2023

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10 Φεβρουαρίου 2023

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 <sup>ος</sup> Εξεταστής	ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ	
2 <sup>ος</sup> Εξεταστής	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	

### **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μαίρη Μιχαήλ του Ρουμάνι, με αριθμό μητρώου dml20046 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

Όνομα φοιτητή

Μαίρη Μιχαήλ

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία «Τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, βιταμίνης Β12 και φολικού οξέος σε ασθενείς με μετάλλαξη MTHFR», η οποία πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ, οφείλω και θέλω να ευχαριστήσω:

Αρχικά την κυρία Ευθυμία Παύλου, Προϊσταμένη του Παραϊατρικού Τμήματος Ιατρικής Υπηρεσίας του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειου, καθηγήτρια και εισηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, για την υποστήριξη, την καθοδήγηση και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε, όλο το χρονικό διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το άτομό μου, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα διπλωματικής.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ τα άτομα του τμήματος της αιμόστασης του ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ, και συγκεκριμένα την Αρετή, την Μαρία και την Σταυρούλα Δασκαλάκη, όπου η βοήθειά τους ήταν πολύ σημαντική για εμένα. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Μηνά από το βιοχημικό τμήμα που με βοήθησε να τρέξω τα δείγματα.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την άμεση ανταπόκριση του και την πολύτιμη βοήθεια του ως δεύτερος επιβλέπωντας αλλά και τον κ. Σωτήριο Φόρτη ως τρίτος επιβλέπωντας.

Επίσης ευχαριστώ την Δελικούρα Ειρήνη, υπεύθυνη της βιβλιοθήκης του Νοσοκομείου, για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, ψάχνοντας πληροφορίες και άρθρα για την βιβλιογραφία της μελέτης μου.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη, υπομονή και ανοχή που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών, ιδιαίτερα τον πατέρα μου, ο οποίος με παρότρυνε να κάνω αυτό το σοβαρό βήμα στη ζωή μου παρέχοντας μου στήριξη και εμπιστοσύνη.

Ευχαριστώ θερμά και τον σύντροφό μου Μηνά Αττάρα για την κατανόηση και επιμονή του αλλά και την φίλη μου Αικατερίνη Λάτκα και τα ξαδέρφια μου Μαρία, Ιωάννα Βερόνικα για την πολύτιμη βοήθεια τους.

## ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Η παρούσα εργασία την αφιερώνω στην μνήμη του αδερφού μου Μιλάντ.

## Περίληψη

### Εισαγωγή

Το MTHFR αποτελεί μία γενετική προδιάθεση που περιορίζει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο αίμα. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και κληρονομείται στους απογόνους και από τους δύο γονείς. Συνεπώς, ο καθένας μας κατέχει δύο γονίδια MTHFR. Ανάλογα τη γενετική μετάλλαξη που θα εμφανίσει στο γονίδιο ένα ή δύο το άτομο καλείτε ετερόζυγο ή ομόζυγο αντίστοιχα. Μία παραλλαγή της μετάλλαξης είναι η C677T, η οποία αντικαθιστά τη κυτοσίνη με αυτή της θυμίνης στη θέση 677 προκαλώντας με αυτό το τρόπο αύξηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης. Αυτή θεωρείται η πιο συχνή μετάλλαξη σε διάφορους γεωγραφικούς και εθνοτικούς πληθυσμούς. Η πιο σημαντική επίπτωση αυτής της μετάλλαξης είναι η υπερομοκυστεϊναιμία.

Η υπερομοκυστεϊναιμία αποτελεί κίνδυνο για θρομβώσεις αρτηριακές ή φλεβικές θρομβώσεις (DVT), πνευμονική εμβολή (PE) και γενικότερα καρδιαγγειακές παθήσεις. Είναι γενικότερα γνωστό το γεγονός ότι τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, φολικού οξέος και βιταμίνης B12 με το γονότυπο της μετάλλαξης MTHFR αλληλοσυνδέονται βιοχημικά. Με βάση αυτής της θεωρίας η παρούσα ερευνητική εργασία φέρει ως στόχο την εξέταση της στατιστικής συσχέτισης αυτών των παραμέτρων μεταξύ τους.

**Σκοπός:** Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της ομοκυστεΐνης, B12, φολικό οξύ, και της μετάλλαξης MTHFR μεταξύ τους, σε ασθενείς με ιστορικό που περιλαμβάνει αποβολές, διάφορα περιστατικά θρομβώσεων, πνευμονική εμβολή και ΑΕΕ(αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο).

**Μέθοδος:** Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 80 άτομα, οι οποίοι φέρουν μία από τις δύο μεταλλάξεις MTHFR (C677T ή A1298) και μετρήθηκαν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, βιταμίνης B12 και του φολικού οξέος για να γίνει αργότερα συσχέτιση μεταξύ τους.

Οι πάσχοντες καταγράφηκαν ως περιστατικά σε φύλλο Excel συμπεριλαμβανομένων (ηλικία, κωδικό και ημερομηνία εξέτασης και φύλο). Σε συνέχεια, ακολούθησε στατιστική σύγκριση με τη χρήση Graf.

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν έδειξαν κάποια σημαντική στατιστική συσχέτιση σχετικά με τους ασθενείς με παθολογικά επίπεδα ομοκυστεΐνης σε σύγκριση με τα επίπεδα της B12 και του φολικού οξέος. Μόνο κατά τη συσχέτιση φολικού οξέος, βιταμίνης B12 και ομοκυστεΐνης σε ασθενείς με τη μετάλλαξη παρατηρήθηκε αρνητική στατιστική συσχέτιση.

**Συμπεράσματα:** Το συμπέρασμα της έρευνας μας είναι ότι δεν υπάρχει πιθανή σημαντική συστατική συσχέτιση χωρίς όμως αυτό να μπορεί να υποστηριχτεί με βεβαιότητα, λόγω ύπαρξης άλλων παραγόντων που επηρεάζουν την ομοκυστεΐνη. Μελλοντική προοπτική αποτελεί η περεταίρω διερεύνηση του θέματος.

Λέξεις κλειδιά: Φολικό οξύ, Βιταμίνη B12, ομοκυστεΐνη, μετάλλαξη MTHFR.



## **Abstract**

### **Introduction:**

MTHFR is a genetic predisposition that limits homocysteine levels in the blood. It is found in the cytoplasm of cells and is inherited in offspring from both parents. Therefore, each of us has two MTHFR genes. Depending on the genetic mutation that occurs in gene one or two, the person is called heterozygous or homozygous respectively. One variant of the mutation is C677T, which replaces cytosine with thymine at position 677, thus causing an increase in the concentration of homocysteine. This is considered the most common mutation in various geographical and ethnic populations. The major consequence of this mutation is Hyperhomocysteinemia.

Hyperhomocysteinemia is a risk for arterial or venous thrombosis (DVT), pulmonary embolism (PE), and cardiovascular disease in general. It is generally known that homocysteine, folic acid, and vitamin B12 levels are biochemically linked to the MTHFR mutation genotype. Based on this theory, this research aims to examine the statistical correlation between these parameters.

**Purpose:** The purpose of the present study is to evaluate the association between homocysteine, B12, folic acid, and MTHFR mutation in patients with a medical history including miscarriages, various incidents of thrombosis, pulmonary embolism, and stroke.

**Method:** In the present study, 80 individuals carrying one of the two MTHFR mutations (C677T or A1298) were included and the levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid were measured to later correlate between them. Sufferers were recorded as cases in an excel spreadsheet including (age, code, date of examination, and sex). This was followed by a statistical comparison using Graf.

**Results:** The results of the research did not indicate any significant statistical correlation regarding patients with pathological homocysteine levels compared to B12 and folic acid levels, although only when folic acid, vitamin B12, and homocysteine were compared in patients with the mutation, a negative statistical correlation was observed.

**Discussion:** Our study concludes that there is no possible significant constitutive association, but this cannot be supported with certainty, due to the existence of other factors affecting homocysteine. A future perspective is to further investigate this issue.

**Keywords:** Folic acid, Vitamin B12, homocysteine, MTHFR mutation.

## Περιεχόμενα

Επιτροπή εξέτασης.....	iii
Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ .....	vi
Περίληψη.....	vii
Εισαγωγή:.....	vii
Abstract .....	ix
Introduction:.....	ix
Συνομογραφίες .....	xiii
Πρόλογος .....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή .....	2
1. Αιμόσταση .....	2
1.1 Γενικό μέρος.....	2
1.2 ΑΙΜΟΦΟΡΑ ΑΓΓΕΙΑ:.....	2
1.3 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ .....	2
1.4 Αγγειοσύσπαση .....	3
2. ΠΗΞΗ ΑΙΜΑΤΟΣ .....	4
2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ .....	5
3. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ ΠΗΞΕΩΣ .....	6
3.1 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ.....	6
3.2 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΠΗΞΕΩΣ.....	7
4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΟΔΟΥ .....	7
4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V .....	7
4.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII.....	8
4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ IX .....	8
4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ XI – XII.....	8
4.5 ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ –ΗΜWΚ.....	9
5. ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ- ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΕΣ .....	10
5.1 Εισαγωγή .....	10
5.2 ΦΥΣΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΗΞΗΣ.....	11
5.3 ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ .....	11
5.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V-LEIDEN .....	12

5.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C [PC] .....	12
5.6 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ S [PC].....	13
5.7 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΪΝΗΣ [ATIII].....	13
5.8 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XII [Hageman].....	13
5.9 ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ G20210Α ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ .....	14
5.10 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C(APC-R).....	14
5.11 GPIa.....	14
6. ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ .....	15
6.1 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ .....	15
6.2 ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ .....	15
6.3 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ – ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ .....	16
6.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ .....	16
6.5 ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ .....	17
6.6 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ.....	17
6.7 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ.....	18
7. ΜΤΗFR .....	19
7.1 Ορισμός .....	19
7.2 Λειτουργικότητα του ενζύμου (μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή) .....	19
7.3 Παθογένεια και Αντιμετώπιση .....	19
8. ΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΗ.....	20
8.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	20
8.2 Παθογένεια υπερομοκυστεΐναιμίας .....	21
8.3 Αντιμετώπιση υπερομοκυστεΐναιμίας .....	21
9. Βιταμίνες.....	22
9.1 Εισαγωγή .....	22
Βιταμίνη B12.....	22
9.2 Ορισμός .....	22
Βιταμίνη B12.....	23
9.3 Ιστορική αναδρομή .....	23
Βιταμίνη B12.....	23
9.4 Απορρόφηση .....	23
Βιταμίνη B12.....	24
9.5 Παθογένεια.....	24

Βιταμίνη Β12.....	24
9.6 Θεραπεία .....	24
10. Φολικό οξύ .....	25
10.1 Ορισμός .....	25
Φολικό(folic acid) και Φυλλικό οξύ(folate acid) .....	25
10.2 Διαφορές .....	25
Φολικό οξύ (folic acid).....	25
10.3 Ανεπάρκεια.....	25
Φολικό οξύ .....	26
10.4 Θεραπεία .....	26
11. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΤΗFR, ΦΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΜΚΥΣΤΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β12.....	26
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι .....	28
1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	29
2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων. ....	29
2.2 Μοριακός Έλεγχος.....	29
3. ΜΤΗFR .....	29
3.1 Εισαγωγή .....	29
3.2 Αρχή μεθόδου Real Time – PCR (πραγματικού χρόνου).....	29
3.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΜΤΗFR.....	30
3.4 Απομόνωση DNA πρωτόκολλο .....	30
4. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ.....	31
4.1 Αρχή μεθόδου .....	31
4.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	31
5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β12 ΚΑΙ ΦΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	32
5.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	32
5.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	32
5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ (CMIA) .....	32
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	34
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα .....	34
Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	43
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	44
Κεφάλαιο 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	46

## Συντομογραφίες

### Αγγλική ορολογία

HCY: Homocysteine

DVT: Deep vein thrombosis

PE: Pulmonary embolism

VWF: Von Willebrand factor

### Ελληνική ορολογία

AEE: Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

CBS: β-συνθετάση κυσταθειονίνης

MTHFR: μεθυλεντετραυδροφολικό οξύ

MB: Μοριακό βάρος

---

GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol  
anchored proteins

PAF: Platelet-activating factor

PL: plasmin

TF: Tissue factor

MMP's: Matrix metalloproteinases

HMWK: High-molecular-weight  
kininogen

APC: Activated protein C

PTT: activated partial thromboplastin  
time

APPT: activated partial  
thromboplastin time

EGF: epidermal growth factor

VKA: Vitamin K antagonists

UFH: Unfractionated Heparin

LMWH: Low-molecular-weight  
heparin

CBS: cystathionine β-synthase

## Πρόλογος

Το 1988, εντοπίστηκε μια θερμοδιαλυτή παραλλαγή του MTHFR μέσω ενζυμικών δοκιμών σε εκχυλίσματα λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Οι παραλλαγές MTHFR βρίσκονται σε ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 1 στους 3 ανθρώπους έχει τουλάχιστον μία παραλλαγή MTHFR και 1 στους 10 ανθρώπους έχει παραλλαγές και στα δύο αντίγραφα του γονιδίου MTHFR.

Με την πάροδο του χρόνου, οι μεταγενέστερες επιπτώσεις των μεταλλάξεων στο γονίδιο MTHFR μπορούν να θέσουν τους ανθρώπους σε υψηλότερο κίνδυνο για πολλά κοινά προβλήματα υγείας, όπως προληπτικές καρδιακές παθήσεις, καρκίνο του παχέος εντέρου, εγκεφαλικό επεισόδιο, νόσο Αλτσχάιμερ κ.ά.

Η αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης που προκαλείται από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου MTHFR έχει μελετηθεί ως πιθανός παράγοντας κινδύνου για διάφορες κοινές παθήσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται η υψηλή αρτηριακή πίεση (υπέρταση), οι θρόμβοι αίματος, η απώλεια εγκυμοσύνης, οι ψυχιατρικές διαταραχές και ορισμένοι τύποι καρκίνου. Πολλοί άνθρωποι στο γενικό πληθυσμό έχουν ήπια ή μέτρια αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, που ονομάζονται ομοκυστεΐναιμία.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μετρηθούν τα επίπεδα B12 και του φολικού σε άτομα με αυξημένα και φυσιολογικά επίπεδα ομοκυστεΐνης και σε άτομα με ή χωρίς μετάλλαξη MTHFR. Με αυτόν το τρόπο θα προσπαθήσουμε να αντιληφθούμε αν με τη παρουσία της μετάλλαξης MTHFR είναι μειωμένα ή αυξημένα τα επίπεδα του φολικού οξέος και της βιταμίνης β12 και να συσχετιστούν οι τιμές μεταξύ τους.

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

### 1. Αιμόσταση

#### 1.1 Γενικό μέρος

Αιμόσταση είναι όλοι οι μηχανισμοί που πραγματοποιούνται στο μέρος της λύσης της συνέχειας του αγγειακού τοιχώματος, με αποτέλεσμα να σταματήσει η αιμορραγία.

Στον μηχανισμό της αιμόστασης σημαντικό ρόλο έχουν τα αιμοπετάλια, το αγγειακό ενδοθήλιο, οι αναστολείς, οι παράγοντες της πήξης, της ινωδόλυσης και τα λευκά-ερυθρά αιμοσφαίρια. Η ενεργοποίηση των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιείται μόνο όταν παρατηρηθεί ανωμαλία στη κυκλοφορία του αίματος ή αλλιώς αγγειακή βλάβη. Το αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι ο σχηματισμός θρόμβου [1].

#### 1.2 ΑΙΜΟΦΟΡΑ ΑΓΓΕΙΑ

Γενικότερα, η δημιουργία των αιμοφόρων αγγείων αποτελείται από τον έσω, μέσο και έξω χιτώνα. Το ενδοθήλιο και ο υπενδοθηλιακός ιστός βρίσκονται στον έσω χιτώνα. Το ενδοθήλιο φέρει αντιθρομβωτικές ιδιότητες δηλαδή δεν επιτρέπει να σχηματιστεί θρόμβος καθώς έχει ως στόχο τη διατήρηση της ομαλής κυκλοφορίας του αίματος. Καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος των αιμοφόρων αγγείων και συμμετέχει στην σύνθεση της πρωτεΐνης S [2].

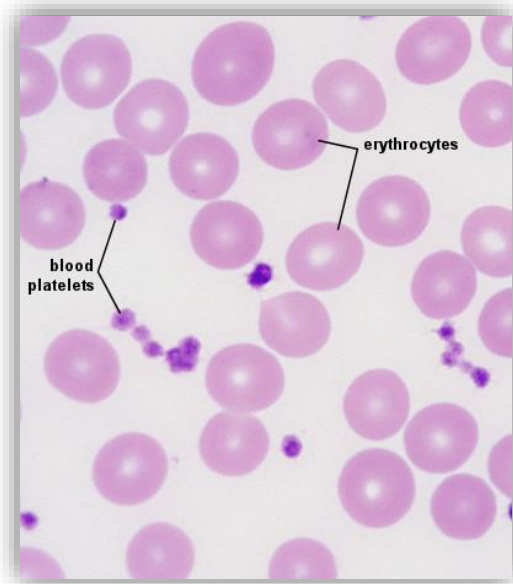
Το ενδοθήλιο λόγω της αντιθρομβωτικής ιδιότητας του δεν επιτρέπει την προσκόλληση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σε αυτή την ιδιότητα ευθύνεται η παραγωγή του (Von Willebrand).

Τέλος, τα υπενδοθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων εξαιτίας των ουσιών που υπάρχουν στην περιοχή αυτή όπως: μη κολλαγόνες ουσίες, πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο [3].

#### 1.3 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα δισκοειδές κύτταρα τα οποία προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα τα οποία είναι απύρρηνα και διαθέτουν τα α, δ και τα λυσοσωμικά κοκκία (Εικόνα1). Αποτελούνται από μεμβράνη λιπιδικής διπλοστοιβάδας, φωσφωλιπίδια, χοληστερόλη, γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες GPI-GPIX.

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην πήξη του αίματος είναι να δημιουργούν το πρωτογενή αιμοστατικό μηχανισμό σε περιοχές που έχουν υποστεί βλάβη με την προσκόλληση και συσώρευση. Προσφέρουν μια προ πηκτική επιφάνεια για τις αντιδράσεις της πήξεως και απελευθερώνουν παράγοντες και προ πηκτικά μόρια [4].



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση αιμοπεταλίων σε επίχρισμα αίματος βαμμένο με χρώση Leishman.

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/blood/blood.htm>

#### 1.4 Αγγειοσύσπαση

Ο μηχανισμός της αγγειοσύσπασης κινητοποιείται από το νευρικό σύστημα στο μυϊκό ιστό των αγγείων. Αποτελεί το πρώτο στάδιο της αιμόστασης και βοηθά στην επιβράδυνση της ροής του αίματος στο τραυματισμένο αγγείο κάνοντας τα αιμοπετάλια να προσκολληθούν στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται μόνο με τη παρουσία αγγειοσυσπαστικών ουσιών όπως η αγγειοτενσίνη II, ινοπεπτίδιο Β, ενδοθηλίνη-1 και σεροτονίνη. Αυτά, είτε παράγονται είτε ελκύονται τοπικά είτε προσέρχονται στο αίμα όπως η αδρεναλίνη [5].

Τα αιμοπετάλια αλλάζουν μορφή και γίνονται σφαιρικά όταν έρχονται σε επαφή με το τραυματισμένο αγγείο. Για να επιτευχθεί η προσκόλληση και η συσώρευση των αιμοπεταλίων βοηθούν διάφορες ουσίες όπως η Ρ σελεκτίνη, GPIa/IIa, VWF με τη παρουσία ιόντων ασβεστίου, ινωδογόνου και ο VWF ενώ στην ενεργοποίηση συμμετέχει



η ουσία της θρομβοξάνης και θρομβίνης. Ο παράγοντας FXIIIa ευθύνεται στη δημιουργία θρόμβων [6].

## 2. ΠΗΞΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο μηχανισμός της πήξης είναι ένας αμυντικός μηχανισμός και αποτελείται από παράγοντες (Factors), οι οποίοι είναι πρωτεΐνες. Σε αρχική φάση είναι ανενεργές οι πρωτεΐνες και με τη βοήθεια της πρωτεάσης ενεργοποιείται και ακολουθεί στη πορεία η επόμενη αντίδραση του μηχανισμού. Οι ενεργοί παράγοντες στο τραυματισμένο σημείο περιορίζουν και ελέγχουν τη δραστηριότητα των παραγόντων και την ενδοαγγειακή πήξη. Η ονοματολογία των παραγόντων βασίζεται σε λατινική αρίθμηση (I έως XIII), ενώ λείπει ο παράγοντας VI [7].

Ένας από τους σημαντικότερους ανασταλτικούς παράγοντες της πήξης είναι η ATIII (αντιθρομβίνη), η οποία απενεργοποιεί τους παράγοντες X, IX, XI, XII, και της θρομβίνης καθώς και οι πρωτεΐνες C, S, C1 αναστέλλουν τους παράγοντες της πήξης. Επιπλέον, όπως αναφέρεται και προηγουμένως τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν την προστακυκλίνη, η οποία με τη σειρά της εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και του σχηματισμού θρόμβου.

Η διαδικασία της πήξης ξεκινά αφού γίνει η έκθεση του TF του τραυματισμένου επιθηλίου. Συνεχίζει ο ιστικός παράγοντας να συνδέεται με τον FVII και το σύμπλεγμα TF/VIIa ενεργοποιώντας τους παράγοντες IX, X, τα οποία με τη σειρά τους σχηματίζουν την θρομβίνη. Με τη σειρά της η θρομβίνη είναι υπεύθυνη να ενεργοποιεί τους VIII και V παράγοντες. Η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη επιτυγχάνεται από τον IXa παράγοντα οποίος ενεργοποιεί περισσότερο τον X παράγοντα. Η θρομβίνη διασπά το ινωδογόνο σε μονομερή του ινώδους και σχηματίζεται το πήγμα ινώδους. Στην τελευταία αντίδραση συμμετέχει και ο παράγοντας FXIII, που έχει ενεργοποιηθεί από την θρομβίνη [8,9,10].

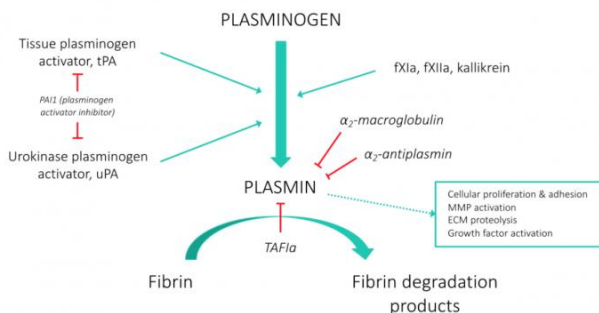
### 2.1 ΙΝΩΔΟΛΥΣΗ

Η ινωδολύση θεωρείται το τελικό στάδιο κατά το οποίο καταστρέφεται ο θρόμβος. Κατόπιν τραυματισμού της περιοχής ενεργοποιείται η λύση του ινώδους με τη βοήθεια δύο παραγόντων. Ο πρώτος και κυριότερος παράγοντας είναι το πλασμινογόνο το οποίο

είναι ένα ανενεργό προένζυμο το οποίο όταν ενεργοποιηθεί σε πλασμίνη διασπά την ινική σε διαλυτά προϊόντα (Εικόνα 2).

Ο δεύτερος παράγοντας είναι η κυτταρική λύση του θρόμβου. Η πλασμίνη, η οποία δημιουργείται από το πλασμινογόνο θεωρείται από τα πιο ισχυρά πρωτεολυτικά ένζυμα καθώς προχωρά στην διάλυση του θρόμβου και επιτελεί ως κύρια λειτουργία τη διάσπαση του ινώδους και τη συντήρηση των αγγείων. Τα ινωδολυτικά κύτταρα σχετίζονται με διάφορα άλλα κύτταρα όπως αιμοπετάλια, μακροφάγα και λευκοκύτταρα. Τα μακροφάγα και τα λευκά αφού επηρεαστούν από τις πρωτεάσες και τις εστεράσες μπορούν να φαγοκυτταρώνουν το ινώδες και τα θραύσματα των ήδη κατεστραμμένων κυττάρων.

Το βασικό ένζυμο της ινωδολύσης είναι η PL που βοηθάει στη λύση του θρόμβου και το σύστημα MMP's, το οποίο στη συνέχεια αποκαθιστά την βλάβη του αγγείου. Οι φυσικοί ανασταλτές της ινωδολύσης σταθεροποιούν τη διαδικασία της ινωδολύσης, όπως η α2-αντιπλασμίνη [11].



**Εικόνα 2:** Ινωδόλυση.

<http://www.rarecoagulationdisorders.org/diseases/plasminogen%20deficiency/diseaseoverview>.

## 2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ

Οι παράγοντες της πήξης είναι πρωτεΐνες, οι οποίες κυκλοφορούν με ανενεργή μορφή ως προένζυμα. Οι παράγοντες του μηχανισμού της πήξης προστατεύουν σε περίπτωση ανεπάρκειας του μηχανισμού τον πρωτογενή θρόμβο, το οποίο έχει σχηματιστεί από τα αιμοπετάλια και μπορεί ανά πάσα στιγμή να απομακρυνθεί αν δεν είναι σταθερός στο σημείο της βλάβης με αποτέλεσμα η αιμορραγία να συνεχιστεί. Η ονοματολογία τους στηρίζεται στη λατινική αριθμηση I έως XIII, ο παράγοντας VI δεν υπάρχει [12].

1. παράγοντας I (ινωδογόνο),
2. παράγοντας II (προθρομβίνη),
3. παράγοντας III (ινικός παράγοντας),
4. παράγοντας IV (ιόντα ασβεστίου),
5. παράγοντας V (ασταθής παράγοντας),
6. παράγοντας VII (σταθερός παράγοντας),
7. παράγοντας VIII (αντιαμορροφιλικός παράγοντας A),
8. παράγοντας IX (αντιαμορροφιλικός παράγοντας B, παράγοντας Christmas),
9. παράγοντας X (παράγοντας Stuart, παράγοντας Stuart-Power),
10. παράγοντας XI (αντιαμορροφιλικός παράγοντας C),
11. παράγοντας XII (παράγοντας Hageman),
12. παράγοντας XIII παράγοντας που σταθεροποιεί το ινώδες).

Οι παράγοντες της πήξης κατατάσσονται σε:

- παράγοντες βιταμινο-Κ εξαρτώμενη, δηλαδή οι II, VII, IX, X, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S,
- παράγοντες ευαίσθητοι στη θρομβίνη, δηλαδή οι I, V, VIII, XIII, παράγοντες επαφής, οι οποίοι είναι ο XII, XI, το υψηλού ΜΒ κινινογόνο, και η προκαλλικρεΐνη,
- φωσφολιπίδια και ιόντα Ca,
- οι ανασταλτές της πήξης [13].

### 3. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ ΠΗΞΕΩΣ

#### 3.1 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ

Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται όταν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ο ιστικός παράγοντας TF το οποίο στη συνέχεια έρχεται σε επαφή με τον παράγοντα VII και σχηματίζει στην επιφάνεια του κυττάρου σύμπλεγμα με την ενεργοποιημένη μορφή του (TF/FVIIa). Αυτό το σύμπλεγμα έχει την ικανότητα ενεργοποίησης του παράγοντα X σε Xa και του παράγοντα IX σε IXa [13].

### 3.2 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ ΤΗΣ ΠΗΞΕΩΣ

Στην αρχική φάση της ενδογενούς οδού συμμετέχουν οι λεγόμενοι παράγοντες επαφής, οι οποίοι είναι τέσσερις (ο παράγοντας XII, το κινινογόνο μεγάλου ΜΒ [ΗΜWΚ], η προκαλλικρεΐνη πλάσματος[PK] και ο παράγοντας XI), αλλά συνολικά συμμετέχουν 6 πρωτεΐνες πήξεως τα δύο υπολειπόμενα είναι (ο παράγοντας IX, και ο παράγοντας XIII).

Σκοπός της οδού αυτής είναι να ενεργοποιηθεί ο παράγοντας X αφού σε μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια έρχεται σε επαφή το αίμα με τη «ξένη επιφάνεια». Στο αρχικό στάδιο της διαδικασίας, το ασβέστιο δεν παίζει κανένα ρόλο στην ενεργοποίηση κανενός παράγοντα. Το στάδιο αυτό, καλείται φάση εκκίνησης.

Οι λειτουργίες των παραγόντων επαφής που συμβαίνουν είναι οι εξής:

- Και οι τέσσερις παράγοντες XII, PK, XI, και ΗΜWΚ ενεργοποιούν τον XI σε XIa πάνω σε αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια.
- Ο ενεργοποιημένος XI σε XIa διαλύει τον XIa.
- Ο παράγοντας της προκαλλικρεΐνης μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη καθώς ενεργοποιεί αρκετά μόρια XII. Η καλλικρεΐνη μαζί με τον XI παράγοντα αποτελούν το σύμπλεγμα ΗΜWΚ και υπάρχουν στο πλάσμα.
- Το σύμπλεγμα ΗΜWΚ επιτελεί αρκετές λειτουργίες. Ένας από αυτούς είναι ενισχυτικός καθώς βοηθάει στην ενεργοποίηση του XI από XIIa και στην μετατροπή της προκαλλικρεΐνης στην καλλικρεΐνη. Θεωρείται επίσης εφικτό ότι το μόριο του ΗΜWΚ μεταφέρει τον παράγοντα XI, και τα μόρια της PK με το μόριο του XII παράγοντα και τα φέρει σε στενή επαφή μεταξύ τους.
- Ο XI με τη παρουσία Ca ενεργοποιείται από τον XI(XIa).
- Με τη παρουσία ασβεστίου, VIII και φωσφολιπιδίων ο παράγοντας XI ενεργοποιεί τον X(Xa)

Ο παράγοντας VIII λειτουργεί ως συμπαράγοντας καθώς τα φωσφολιπίδια χρησιμοποιούνται από τα λιπίδια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων [13].

## 4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΟΔΟΥ

### 4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V

Ο παράγοντας V είναι πρωτεΐνη, η οποία δεν είναι Β-εξαρτώμενη βιταμίνη και παράγεται στο ήπαρ, στα αιμοπετάλια και στα μεγακαρυοκύτταρα. Το 25% του V παράγοντα βρίσκεται στα αιμοπετάλια και είναι συχνή η επίκτητη ανεπάρκεια του. Ο ρόλος του

συμπαράγοντα Va είναι να μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η έλλειψη του, προκαλεί αιμορραγίες και παρατεταμένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης και προθρομβίνης PT [15].

#### 4.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII

Ο συγκεκριμένος παράγοντας ενεργοποιείται από την προθρομβίνη, είναι δεσμευμένος με τον Von Willebrand και τον προστατεύει η πρωτεΐνη C. Παράγεται σε διάφορους ιστούς αλλά επιβεβαιωμένα στο ήπαρ. Ο VIIIa σε συνδυασμό με το ασβέστιο και τα φωσφολιπίδια ενεργοποιεί τον X σε Xa(συμπαράγοντας της VIIIa και ένζυμο).

Η ανεπάρκεια του, προκαλεί ένα παθολογικό σύμπτωμα που καλείται αιμορροφιλία A καθώς εντοπίζεται παρατεταμένος χρόνος της μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), με κανονικό χρόνο ροής, και χρόνου προθρομβίνης (PT). Μεταβιβάζεται στους απογόνους με υπολειπόμενο χαρακτήρα καθώς οι διάφοροι νόσοι του ήπατος αυξάνουν τη δραστηριότητα του VIII [16].

#### 4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ IX

Ο παράγοντας IX ονομάζεται και παράγοντας Christmas ή αντιαιμορροφιλική σφαιρίνη B. Κατατάσσεται στο έμμεσο B-εξαρτώμενο σύστημα, συμμετέχει στη διαδικασία της ενδογενούς οδού και παράγεται στο ήπαρ. Οι ήδη ενεργοποιημένοι παράγοντες VIIa και XIa ενεργοποιούν τον IX σε IXa. Η ανεπάρκεια του συγκεκριμένου παράγοντα προκαλεί την Αιμορροφιλία B η οποία θεωρείται παθολογικής φύσεως κατάσταση με αποτέλεσμα να υπάρξει παρατεταμένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), με κανονικό χρόνο ροής και προθρομβίνης (PT). Μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο χαρακτήρα [17].

#### 4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ XI – XII

Ο παράγοντας XI και XII ανήκουν στην αρχική φάση της ενδογενούς οδού και καλούνται ως παράγοντες επαφής μαζί με άλλους παράγοντες. Ενεργοποιούνται όταν έρχονται σε στενή επαφή με αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια όπως γυαλί, καολίνη κ.ά.

Ο XI αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη που οι πολυπεπτιδικές της αλυσίδες συνδέονται με δισουλφικό δεσμό [17]. Από την άλλη ο παράγοντας XII (Hageman factor) και αυτό είναι γλυκοπρωτεΐνη η οποία δεν είναι γνωστή ακόμη η διαδικασία ενεργοποίησης του αλλά ο

XIIa ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη. Υπάρχει στον ορό ή το πλάσμα του ανθρώπινου οργανισμού και στο εργαστήριο είναι σταθερός παράγοντας.

Γενικότερα, η διαδικασία του σχηματισμού αιμοπεταλιακού θρόμβου ξεκινάει όταν παρατηρηθεί διάσπαση του ενδοθηλίου και στη συνέχεια ξεκινούν και άλλες διαδικασίες από τον οργανισμό. Αρχικά, ενεργοποιούνται όλοι οι παράγοντες επαφής στο πλάσμα με αρχηγό τον παράγοντα XII και ακολουθούν οι παράγοντες: XI, πλασμινογόνου και της καλλικρεΐνης.

Ο Hageman παράγοντας έχει την ικανότητα να μεταβάλλεται και να εκθέτει σε στενή επαφή το ενεργό (serine) κέντρο του με μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Η προκαλλικρεΐνη με το παράγοντα XI ενεργοποιούνται από το XIIa με τη παρουσία του συμπαραγόντα HMWK και εν τέλει δημιουργούν σύμπλεγμα, όπου αυτός τους ελκεί προς την επιφάνεια που είναι συνδεδεμένο ο XIIa δηλαδή προς την αγγειακή επιφάνεια. Σημαντικό στο σχηματισμό της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας όπου είναι και ο τόπος των ενζυμικών ενεργοποιήσεων των παραγόντων της πήξης είναι τα φωσφολιπίδια [18].

#### 4.5 ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ ή HMWK

Η καλλικρεΐνη προκύπτει από τη μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη και αποτελεί υδρολυτικό ένζυμο. Βρίσκεται στο πλάσμα, διασπά το HMWK για την παραγωγή βραδυκινίνης και ενεργοποιεί διάφορους παράγοντες πήξης και του πλασμινογόνου. Σχετικά με τη προκαλλικρεΐνη καλείτε το πεπτίδιο της μονής αλυσίδας που με την βοήθεια του XII μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη. Τα χαμηλά επίπεδα της προκαλούν παράταση του APTT. Το κινινογόνο είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος με υψηλό MB 11.000 daltons δημιουργεί σύμπλοκο με την προκαλλικρεΐνη και βρίσκεται στο πλάσμα. Το σύμπλοκο αποτελεί συμπαραγόντα στην ενεργοποίηση του XII.

Το HMWK, προκαλεί παράταση της ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης και μαζί με άλλους παράγοντες με τα αιμοπετάλια και με την προσκόλληση στο κολλαγόνο του υπενδοθηλίου ενεργοποιείται ο παράγοντας XII. Το HMWK, έχει την ικανότητα να καταστρέφει τις παρακάτω αντιδράσεις:

- α) σύνδεση και μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη από το XIIa.
- β) ο παράγοντας XI συνδέεται με τη καλλικρεΐνη και με το HMWK,
- γ) προκαλείται η έκκλιση βραδυκινινών.

Το ήδη υπάρχον σύμπλεγμα ενεργοποιεί με την βοήθεια του XIIa τον XI παράγοντα [19].

## 5. ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ- ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΕΣ

### 5.1 Εισαγωγή

Η θρόμβωση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία συσσωρεύονται παθολογικά συστατικά αίματος σχηματίζοντας έναν θρόμβο ινικής, το οποίο έρχεται σε άμεση επαφή με το τοίχωμα των αγγείων και μπορεί να προκαλέσει απόφραξη μίας αρτηρίας ή φλέβας, ολικώς ή μερικώς.

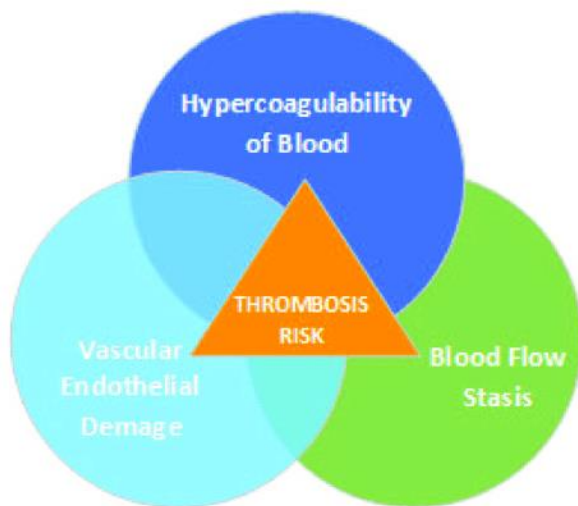
Επομένως, παρεμποδίζεται η φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος και προκαλείται νέκρωση των ιστών λόγω ανεπάρκειας οξυγόνωσης και θρέψης το λεγόμενο έμφραγμα.

Οι θρόμβοι ή αλλιώς τα πήγματα αίματος μπορούν να παρασυρθούν ολόκληρα ή τμήματα αυτών σε θέσεις του κυκλοφορικού συστήματος με στενή δίοδο τις οποίες και αποφράσσουν, προκαλώντας τη λεγόμενη εμβολή.

Η παθολογική αυτή κατάσταση βασίζεται στη τριάδα Virchow, δηλαδή προκαλείται είτε από βλάβες στο ενδοθήλιο των αγγείων, είτε από διαταραχές στην ομαλή ροή του αίματος, είτε από διαταραχές στα συστατικά που παίρνουν μέρος στον μηχανισμό της πήξεως (Εικόνα 3).

Η θρομβοφιλία ή θρομβοφιλική διάθεση δεν αποτελεί νόσο από μόνη της και αναφέρεται σε άτομα με προδιάθεση για τη δημιουργία θρομβώσεων στην κυκλοφορία του αίματος. Οι θρομβοφιλίες χωρίζονται σε κληρονομικές που οφείλονται σε γενετικές διαταραχές και σε επίκτητες όπου παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος θρόμβων. Οι πιο πολλοί κληρονομικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για θρομβώσεις μπορούν να επηρεάσουν την ισορροπία στους προθρομβιτικούς – αντιθρομβωτικούς μηχανισμούς. Οι πιο συχνοί είναι ο παράγων V Leiden (μετάλλαξη στον παράγοντα V, G 1691A), η μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης (G 20210A), η μετάλλαξη στο γονίδιο της ομοκυστεΐνης (MTHFR,υπερομοκυστεϊναιμία), η έλλειψη της πρωτεΐνης C, η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης, η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S και η ανεπάρκεια του παράγοντα XII.

Παράλληλα, οι φλεβικές θρομβώσεις παρατηρούνται σε κληρονομικές θρομβοφιλίες αλλά συνδυαστικά και με άλλους παράγοντες κινδύνου (σακχαρώδης διαβήτης, κάπνισμα κ.ά.) μπορούν να προκληθούν και αρτηριακές θρομβώσεις [20].



**Εικόνα 3:** Η τριάδα Virchow, η οποία περιγράφει τις τρεις κατηγορίες παραγόντων της θρόμβωσης.

<https://www.mdpi.com/2227-9059/10/4/888>.

## 5.2 ΦΥΣΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΗΞΗΣ

Όταν σχηματιστεί θρόμβος είναι σημαντικό να ενεργοποιηθεί κάποιος μηχανισμός για την καταστροφή του στο σημείο της βλάβης.

Ο μηχανισμός που ενεργοποιείται είναι της πήξης και στη συνέχεια ακολουθούν δύο μηχανισμοί που ελέγχουν τη παραγωγή της θρομβίνης:

- α. ένα σύστημα άμεσο που αναστέλλει τη δράση παραγόντων που έχουν ενεργοποιηθεί των πρωτεασών και της σερίνης,
- β. ένα σύστημα έμμεσο βιταμινο-Κ εξαρτώμενο που προκαλεί την αναστολή των ενεργοποιημένων επιταχυντών της πήξης και αποτελείται από την πρωτεΐνη C (PC) και τον συμπαράγοντα της πρωτεΐνης S [21].

## 5.3 ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Η μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης (FII της πήξεως) ανήκει στη κατηγορία της κληρονομικής θρομβοφιλίας καθώς αυξάνει τα επίπεδα της προθρομβίνης στο περιφερικό αίμα με συνέπεια να είναι πιο πιθανό το αποτέλεσμα της φλεβικής θρόμβωσης και της πνευματικής εμβολής. Η σημειακή αυτή μετάλλαξη περιγράφηκε το 1996 από τους Poort και τους συνεργάτες.

Προκύπτει από την υποκατάσταση της γουανίνης από την αδενίνη, στην θέση 20210 των νουκλεοτιδίων, στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή στο γονίδιο της



προθρομβίνης [22]. Άτομα με αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης, χωρίς κάποια γενετική βλάβη αποτελούν ευπαθείς ομάδες με αυξημένο κίνδυνο για θρόμβωση. Η μετάλλαξη αυτή θεωρείται η αιτία για την εν τω βάθι φλεβική θρόμβωση, όπου είναι και η πιο συχνή. Εντοπίζεται και σε άλλα μέρη όπως (εγκεφαλικές φλέβες, ενδοκοιλιακά κ.α), αλλά και από διάφορες κακές συνήθειες όπως το κάπνισμα μπορεί να οδηγήσουν σε έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η διάγνωση της μετάλλαξης πραγματοποιείται με διάφορες μοριακές τεχνικές [23].

#### 5.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V-LEIDEN

Πρόκειται για μια παθολογική μετάλλαξη κατά την οποία προκύπτει στο γονίδιο του FV (G1691A) όπου γίνεται αντικατάσταση της αργινίνης από την γλουταμίνη. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης του γονιδίου δημιουργείται ένα προϊόν ανθεκτικό στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (activated protein C- APC), με αποτέλεσμα την αύξηση της θρομβίνης στο αίμα επομένως αυξάνεται και ο κίνδυνος των θρομβώσεων. Η μετάλλαξη V-Leiden αναστέλλει την απενεργοποίηση του ενεργοποιημένου παράγοντα V, αφού αφαιρεί την θέση προτίμησης για προτεόλυση της πρωτεΐνης C, του ενεργοποιημένου παράγοντα Leiden. Μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης θρομβοφιλίας παρουσιάζουν οι ομοζυγωτές [24].

#### 5.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C [PC]

Η συχνότητα της διαταραχής αυτής είναι σπάνια σε γενικό πληθυσμό. Η μετάλλαξη στο γονίδιο της PROC, συσχετίζεται με την μείωση της ενεργότητας της, όπου η ενεργοποιημένη αυτή πρωτεΐνη απενεργοποιεί τον παράγοντα V στις ακόλουθες θέσεις: Arg506(αποτελεί την πρώτη θέση που συμμετέχει στη προτεόλυση), την Arg306 και Arg679. Η κληρονομική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης, οφείλεται σε μεταλλάξεις στις περιοχές ρύθμισης και κωδικοποίησης του γονιδίου της PROC.

Η προδιάθεση για σχηματισμό θρόμβου οφείλεται και στις μεταλλάξεις αυτές, οι οποίες διαταράσσουν την λειτουργία της πρωτεΐνης C με αποτέλεσμα την μείωση της απενεργοποίησης των ενεργοποιημένων παραγόντων V-VIII(FV-FVIII). Σε ετερόζυγα άτομα με μεταλλάξεις της πρωτεΐνης C έχουν προδιάθεση και για φλεβικές θρομβώσεις. Μια σπάνια μορφή ΔΕΠ, η οποία καλείται κεραυνοβόλος πορφύρας είναι μία πάθηση που εμφανίζεται σε άτομα που κληρονομούν δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα PROC [25].

## 5.6 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ S [PC]

Η πρωτεΐνη S είναι συμπαράγοντας και δρα με την πρωτεΐνη C. Οι δύο βασικές λειτουργίες που επιτελεί η PS είναι: α) προκαλεί την απενεργοποίηση του V-LEIDEN μέσω της PC και β) ενισχύει τη διαδικασία της πρωτεόλυσης συμμετέχοντας στη θέση Arg306. Είναι μία πρωτεΐνη που εξαρτάται από τη βιταμίνη K και εμφανίζει ομοιότητες με τις πρωτεάσες και της σερίνης. Αποτελείται από τέσσερις περιοχές EGF και μία GIa περιοχή. Έχει την ιδιότητα μέσω της APC να επαυξάνει τη παράταση στο χρόνο της διαδικασίας της πήξης. Η αιματολογική εξέταση του ολικού ή ελεύθερου αντιγόνου πραγματοποιείται με διάφορες ενζυμικές ανοσοπροσροφητικές μεθόδους [26].

## 5.7 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΪΝΗΣ [ATIII]

Η αντιθρομβίνη AT είναι πρωτεΐνη και ανήκει στην οικογένεια των σερπινών, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ανασταλτές της θρομβίνης αλλά και των παραγόντων της πήξης: IXa, XIa, XIIa, Xa, καλλικρεΐνη, πλασμίνη και ευθύνεται για την παρουσία των φλεβικών θρομβώσεων.

Η ανεπάρκεια της AT οφείλεται σε αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα η οποία κληρονομείται από τους γονείς στους απογόνους. Υπάρχουν δύο τύποι ανεπάρκειας της αντιθρομβίνης: α) στην πρώτη κατηγορία ανεπάρκειας τύπου I : μειώνεται η δραστηριότητα της AT, λόγω πλήρους έλλειψης του γονιδίου σε ποσοστό 50% και β) στην δεύτερη κατηγορία ανεπάρκειας τύπου II: η πρωτεΐνη δυσλειτουργεί καθώς η βιολογική δραστηριότητα είναι χαμηλή.

Όταν η ανωμαλία υπάρχει στη θέση σύνδεσης της ηπαρίνης ο κίνδυνος είναι μικρότερος παρά τη θέση σύνθεσης της θρομβίνης [23]. Τα ετερόζυγα άτομα με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης αντιμετωπίζουν μεγάλο κίνδυνο για φλεβικές θρομβώσεις παρά άτομα με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S ή C. Σε μεγάλο ποσοστό έχει αποδείχθει ότι μετά το 55<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας ο άνθρωπος αναπτύσσει θρομβώσεις [27].

## 5.8 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XII [Hageman]

Η ανεπάρκεια αυτού του παράγοντα συνήθως είναι ασυμπτωματικοί και ανευρίσκεται τυχαία από τις αιματολογικές εξετάσεις, συγκεκριμένα από το παρατεταμένο χρόνο του ΡΤΤ. Ο ποσοτικός προσδιορισμός στο αίμα ή στον ορό του ασθενή είναι βασικός για τη

διάγνωση. Είναι σπάνια γενετική διαταραχή του αίματος που προκαλεί πήξη αλλά δεν παρουσιάζονται αιμορραγικές τάσεις ή άλλα συμπτώματα. Η έλλειψη XII κληρονομείται στον απόγονο ως υπολειπόμενος σωματικός χαρακτήρας [28].

#### 5.9 ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ G20210A ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Είναι μια παραλλαγή της προθρομβίνης, η οποία όταν ανεβαίνουν τα επίπεδα της στο περιφερικό αίμα, αυξάνεται ο κίνδυνος παρουσίασης θρομβώσεων. Δεν είναι σίγουρο ακόμη, αλλά αναφέρεται πως κατά τη διάρκεια της φλεβικής θρόμβωσης όταν υπάρχει αυτή η μετάλλαξη ή όταν είναι αυξημένα τα επίπεδα VIII-IX, είναι συνεχές η παραγωγή της θρομβίνης με παράλληλη επιβράδυνση στη διαδικασία της ινωδολύσης. Η παρουσία της ευθύνεται επαναλαμβανόμενες απώλειες εμβρύου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [29].

#### 5.10 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ C (APC-R)

Η APC (activated protein C) έχει αντιπηκτική δράση η οποία οφείλεται στην ικανότητα να αδρανοποιεί με πρωτεολυτική διάσπαση τους ενεργοποιημένους παράγοντες Va και VIIIa (μειωμένη πρωτεόλυση). Σε περίπτωση, που εμφανιστεί κάποια κληρονομική διαταραχή που επιδρά στην APC, αποτελεί και την αιτία για τη παρουσίαση θρομβοφιλίας.

Η αντίσταση όσον αφορά την αντιπηκτική δράση οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις, στο γονίδιο του V-LEIDEN παράγοντα κατά τον οποίο πραγματοποιείται αποκατάσταση της θέσης Arg506 από την Gln. Εξαιτίας αυτής της ανωμαλίας, ο μεταλλαγμένος πλέον Va, εμφανίζει λιγότερο ευαισθησία (σχετικά με το κανονικό Va) στην ενεργοποίηση από την APC. Η APC-R κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και είναι ο πιο συχνός λόγος για οικογενή θρομβοφιλία. Τα ετερόζυγα άτομα φέρουν λιγότερο τον κίνδυνο για φλεβοθρόμβωση εξαιτίας της APC-R, ενώ τα ομόζυγα άτομα πιο συχνά εμφανίζουν περιστατικά θρόμβωσης και είναι εκείνοι που αντιμετωπίζουν το μεγαλύτερο κίνδυνο [30].

#### 5.11 GPIa

Οι GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol anchored proteins) είναι πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και άλλων αιμοποιητικών κυττάρων. Είναι απαραίτητες για την αποστολή αλλά και για την προστασία τους από τους

ενδογενείς και εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. Οι κυριότερες παρόμοιες πρωτεϊνικές ομάδες που έχουν περιγραφεί είναι για παράδειγμα: CD55ag ή DAF, ακετυλοχολινεστεράση, CD59 ή MIRL, C8bp, LAF-3 ή CD58 και έχουν προστατευτικό ρόλο για το κύτταρο έναντι της λύσης του ενεργοποιημένου C συμπληρώματος.

Η παρουσία της  $\alpha 1,6N$ -ακετυλο-γλυκοζαμινοζυλοτρανσφεράση είναι πολύ σημαντική για τη σύνδεση των κυτταρικών μεμβρανών και των επιφανειακών πρωτεϊνών και με το παραπάνω τρόπο επιτυγχάνεται η καλύτερη έκφραση των GPI πρωτεϊνών. Η ανεπάρκεια των GPI σχετίζεται με όλα τα κύτταρα του αίματος αφού η ανωμαλία παρατηρείται στα πολυδύναμα αιμοποιητικά όλων των σειρών [31].

## 6. ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

### 6.1 ΑΝΤΙΦΟΣΦΩΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αντιφωσφωλιπιδικά αντισώματα, τα αντιπηκτικά του λύκου και οι καρδιολιπίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη πρόκληση θρόμβων στους πάσχοντες. Συνήθως, άτομα που προχωρούν στην ανίχνευση αυτών των αντισωμάτων πάσχουν από συστηματικό ερμηματώδη λύκο ή διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Από την άλλη, μπορεί να παρουσιαστεί και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς είτε λόγω ιστορικού για φλεβικές θρομβώσεις ή αρτηριακές, είτε λόγω θρομβοπενίας ή σε εγκυμονούσες για συνεχές αποβολές του εμβρύου.

Το αντιπηκτικό του λύκου, προκαλεί παράταση του APTT ακόμη και αν γίνει προσθήκη ορού δεν αλλάζει. Θεωρείται θρομβογόνο η αντίδραση των αντισωμάτων με τα φωσφωλιπίδια αλλά και την γλυκοπρωτεΐνη b2- GPI στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [32].

### 6.2 ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ

Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να εμφανιστούν διάφορες διαταραχές στην ομαλή λειτουργία της αιμόστασης λόγω διαφόρων αιτιών:

- η παρουσία κάποιου αυτοάνοσου που να οδηγήσει σε θρομβοπενία,
- λήψη διάφορων φαρμακευτικών αγωγών,
- έλλειψη σε κάποιο παράγοντα πήξεως,
- διαταραχή στη πήξη του αίματος,
- πολυμορφισμοί MTHFR και υπερομοκυστεϊναιμία.

Οι οικογενής μορφές των θρομβώσεων ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: α) στην κληρονομική έλλειψη της αντιθρομβίνης III και β) στην επίκτητη έλλειψη της. Το ινωδογόνο, η PC, PS, το πλασμινογόνο, η αντιθρομβίνη III και η ελαττωμένη ινωδόλυση αποτελούν παράγοντες της πήξης που στην κύηση διαταράσσονται όταν έχουμε μορφές θρομβοεμβολικών νόσων. Επίσης, μπορεί να οφείλεται και σε ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης ATIII, και μείωση της ATII(θρομβίνη, καλλικρεΐνη, πλασμίνη, XII(Hageman) [33].

### 6.3 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ – ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ

Αρχικά, οι θρόμβοι εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, στους αμφιβληστροειδής των οφθαλμών, στα άνω και κάτω άκρα και στις στεφανιαίες αρτηρίες. Σε αρκετές περιπτώσεις οι θρομβώσεις στους πάσχοντες θεραπεύονται με χειρουργεία ή μικρές επεμβάσεις όπως η προσθήκη καθετήρων ενδοαρτηριακά, η διαγνωστική αγγειογραφία κ.ά.

Επίσης, άλλο ένα είδος θεραπείας θεωρείται η θεραπευτική αγγειοπλαστική και προσθήκη τεχνικών βαλβίδων στα χειρουργεία της καρδιάς. Κατόπιν, της τοποθέτησης των βαλβίδων τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται και προσκολλώνται στο σημείο. Το ADP (αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ) ελκύεται από τα ερυθρά και περνούν από τη βαλβίδα με αποτέλεσμα να αιμολύονται.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως άτομα που έχουν υποστεί χειρουργείο-επέμβαση λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες δηλαδή (ασπιρίνη, δυπιριδαμόλη κ.ά.) για τη αποφυγή των θρομβώσεων [38].

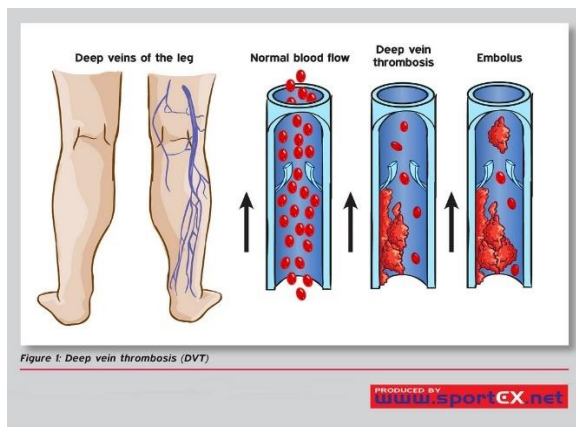
### 6.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης, το νεφρωσικό σύνδρομο, η παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία, τα αντισυλληπτικά, ο καρκίνος, η υπεργλοιοπύκνωση του αίματος, η κακή διατροφή (παχυσαρκία) και η ηλικία (γήρας) παίζουν μεγάλο ρόλο στο κίνδυνο της επίκτητης θρομβοφιλίας [39].

## 6.5 ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Η φλεβική θρόμβωση είναι η απόφραξη των φλεβών λόγω του σχηματισμού θρόμβου. Προκαλεί διάφορες παθήσεις όπως πνευμονική εμβολή, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ή έμφραγμα του μυοκαρδίου και εντοπίζεται συνήθως στα κάτω άκρα στις εν τω βάθει φλέβες της κνήμης (Εικόνα 4).

Η θεραπεία που μπορεί να χορηγηθεί είναι συνήθως τα αντιπηκτικά. Εάν δεν γίνει παρακολούθηση μπορεί να υπάρξουν σοβαρές επιπλοκές ακόμη και θάνατος. Μπορεί να παρουσιάσουν συμπτώματα ασθενείς μικρής ηλικίας είτε λόγω κληρονομικότητας είτε λόγω διαφόρων παραγόντων όπως : η ακινησία, παχυσαρκία, υπερπηκτικότητα κ.ά. Στα άτομα με γενετική ή επίκτητη θρομβοφιλία συσχετίζεται η υπερπηκτικότητα, ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, πρωτεΐνη S, πρωτεΐνη C κ.ά. Λιγότερο κίνδυνου θεωρούνται τα αντισυλληπτικά, έγκυες κ.ά. Για τη θεραπεία δίδονται απόψεις μεταξύ των αντιπηκτικών ή της αναμονής [40].



**Εικόνα 4:** Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT).

<https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/20301>.

## 6.6 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Αντίστοιχα η αρτηριακή θρόμβωση είναι η απόφραξη της αρτηρίας με το σχηματισμό θρόμβου. Ευθύνεται για τη πρόκληση εμφραγμάτων του μυοκαρδίου, εγκεφαλικών επεισοδίων, καταστροφή των περιφερικών αγγείων και θρομβώσεις της κοιλιακής αρτηρίας. Αυτό συμβαίνει λόγω της συνεχούς εκχύσεως φαρμάκων, μετά από επεμβάσεις με προσθήκη βαλβίδων και καθετήρων.

Διάφοροι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο είναι: παχυσαρκία, κάπνισμα, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, τα αυξημένα λιπίδια και λιποπρωτείνες στον ορό κ.ά. ενώ ο πιο σοβαρός λόγος που οφείλεται σε συγγενείς μεταβολικές ανωμαλίες είναι η αθηροσκλήρυνση. Όταν συσσωρεύονται τα λιπίδια και πολλαπλασιάζονται τα λεία μυικά κύτταρα στον εσωτερικό χιτώνα δημιουργούνται οι αθηρωματικές πλάκες. Αυτό το γεγονός προκαλεί ρήξη του ενδοθηλίου και συσσώρευση των αιμοπεταλίων με πιθανότητες να συμβούν σοβαρότερες βλάβες όπως απόφραξης της πάσχουσας αρτηρίας. Αυτό το είδος θρόμβωσης μπορεί να είναι ασυμπτωματικός για μεγάλο χρονικό διάστημα και να εμφανιστεί αιφνίδια αφού γίνει κάποια απόφραξη σε κάποιο όργανο (όπως καρδιά, εγκέφαλος, άνω ή κάτω άκρα κλπ).

Εκδηλώνεται ως στεφανιαία νόσος, σύνδρομο Legiche, νεφραγγειακή υπέρταση, σύνδρομο μεσεντερίας αρτηρίας και ισχαιμία στα κάτω άκρα.

Η θεραπεία της οξείας αρτηριακής απόφραξης πραγματοποιείται με δύο τρόπους ανάλογα με την κλινική εκδήλωση: α) χειρουργικά: με εμβολεκτομή ή by pass για την άμεση αποκατάσταση της αρτηριακής κυκλοφορίας και β) συντηρητική: η θρομβολυτική θεραπεία, σε οξείες περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου περιφερική εμβολή κ.ά. Σε πιο ήπιες καταστάσεις που δεν είναι οξείες χορηγούνται αντιαιμοπεταλιακά ή αντιπηκτικές αγωγές [41].

## 6.7 ANTIMETΩΠΙΣΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

Η θεραπεία γίνεται με βάση τη κατάσταση του κάθε πάσχοντα δηλαδή σε άτομα που εμφάνισαν κλινικές εκδηλώσεις σε κάποια φάση της ζωής τους και σε ασθενείς που τυχαία σε αιματολογικές εξετάσεις βρέθηκε κάποιο πρόβλημα σε θρομβολυτικό παράγοντα χωρίς κανένα σύμπτωμα. Υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες για την αντιμετώπιση της θρομβοφιλίας: α) αντιαιμοπεταλιακά: ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, τικλοπιδίνη, β) αντιπηκτική: VKA, UFH, LMWH, γ) Αντιθρομβωτικά: ιρουδίνη, Ximelagatam κ.α. Οι πάσχοντες με κλινικές εκδηλώσεις παίρνουν αντιθρομβωτική αγωγή ενώ οι καρκινοπαθής λαμβάνουν ηπαρίνη χαμηλού Μ.Β για την αποφυγή της αιμορραγίας.

Και τέλος, άτομα που δεν παρουσιάζουν συμπτώματα συμβουλεύονται με υγιεινό τρόπο ζωής όπως διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος, ακινησίας κλπ. Εάν τα άτομα αυτά δεν χειρουργηθούν όπως κύηση είναι απαραίτητη προληπτική χορήγηση αντιθρομβωτικής αγωγής [42].

## 7. MTHFR

### 7.1 Ορισμός

Η επίσημη ονομασία του MTHFR είναι το μεθυλοτετραυδροφολικό οξύ. Η μεθυλοτετραυδροφολική αναγωγή είναι το ρυθμιστικό ένζυμο που παράγεται από το γονίδιο του MTHFR. Αυτό το ένζυμο συμμετέχει στο μεταβολισμό του φολικού οξέος και της ομοκυστεΐνης. Είναι δεδομένο ότι κάθε άτομο φέρει δύο γονίδια MTHFR, τα οποία κληρονομεί ένα από κάθε γονέα. Τα άτομα που έχουν τη μετάλλαξη σε ένα γονίδιο καλούνται ετερόζυγοι ενώ αν τη φέρουν και στα δύο καλούνται ομόζυγοι.

Υπάρχουν δύο μεταλλάξεις MTHFR. Η πρώτη και η συχνότερη ονομάζεται μετάλλαξη MTHFR C677T η οποία προκύπτει από τη σημειακή μεταλλαγή της αντικατάστασης κυτοσίνης (C) με την θυμίνη (T), στη θέση 677. Η άλλη μετάλλαξη είναι η A1298C η οποία προκύπτει από την αλλαγή της αδεΐνης (A) από τη κυτοσίνη (C) στη θέση 1298 του παραπάνω γονιδίου MTHFR A1298C [43].

### 7.2 Λειτουργικότητα του ενζύμου (μεθυλενοτετραυδροφολική αναγωγή)

Αυτό το ένζυμο παίζει ρόλο στην επεξεργασία των αμινοξέων, των δομικών στοιχείων των πρωτεϊνών. Η μεθυλενοτετραυδροφολική αναγωγή είναι σημαντική για μια χημική αντίδραση που περιλαμβάνει το φολικό οξύ (ονομάζεται επίσης βιταμίνη B9). Συγκεκριμένα, αυτό το ένζυμο μετατρέπει μια μορφή φυλλικού οξέος που ονομάζεται 5,10-μεθυλενοτετραυδροφολικό σε μια διαφορετική μορφή φολικού οξέος που ονομάζεται 5-μεθυλτετραυδροφολικό. Αυτή είναι η κύρια μορφή φολικού οξέος που βρίσκεται στο αίμα και είναι απαραίτητη για τη διαδικασία πολλαπλών σταδίων που μετατρέπει το αμινοξύ ομοκυστεΐνη σε ένα άλλο αμινοξύ, τη μεθειονίνη. Ο ανθρώπινος οργανισμός χρησιμοποιεί τη μεθειονίνη για να παράγει πρωτεΐνες και άλλες σημαντικές ενώσεις [44].

### 7.3 Παθογένεια και Αντιμετώπιση

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο MTHFR μπορούν να αλλάξουν ή να μειώσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα να αυξηθεί ελάχιστα η ομοκυστεΐνη στο αίμα (υπερομοκυστεΐναιμία). Έχουν μελετηθεί ότι η αύξηση στα επίπεδα της ομοκυστεΐνης είναι πιθανοί παράγοντες κινδύνου για διάφορες συνηθισμένες καταστάσεις που αντιμετωπίζει ο άνθρωπος στην καθημερινότητά του. Αυτά περιλαμβάνουν υψηλή



αρτηριακή πίεση (υπέρταση), θρόμβους αίματος, απώλεια εγκυμοσύνης, ψυχιατρικές διαταραχές και ορισμένους τύπους καρκίνου.

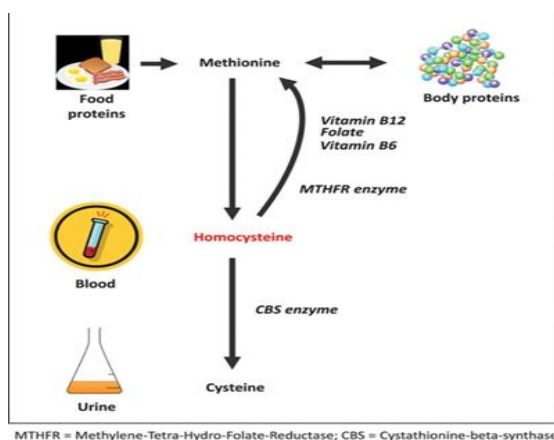
Αρκετές μελέτες που έχουν γίνει αναφέρουν ότι τα άτομα με πολυμορφισμό C677T και στα δύο αντίγραφα του γονιδίου MTHFR έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν αγγειακή νόσο, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής νόσου και του εγκεφαλικού. Ο πολυμορφισμός C677T έχει επίσης προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για σχιστία χείλους και υπερώας, ένα γενετικό ελάττωμα κατά το οποίο υπάρχει σχίσιμο στο άνω χείλος και άνοιγμα στην οροφή του στόματος [45].

## 8. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ

### 8.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η ομοκυστεΐνη είναι μια θειόλη που περιέχει αμινοξύ και υπάρχει σε όλα τα υγρά του σώματος. Παράγεται από την ενδοκυτταρική απομεθυλίωση της μεθειονίνης. Η ομοκυστεΐνη εξάγεται και κυκλοφορεί στο πλάσμα καθώς βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή και συνδέεται με πρωτεΐνες. Η ολική ομοκυστεΐνη (tHCy) αναφέρεται στο άθροισμα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα ή στον ορό.

Η ομοκυστεΐνη μεταβολίζεται σε κυσταθειονίνη και στη πορεία σε κυστεΐνη με τη δράση του ενζύμου CBS (β-συνθετάση της κυσταθειονίνης) και την παρουσία της βιταμίνης B6. Η βασική δράση της B6 είναι ότι προσθέτει δισουλφιδικούς δεσμούς στην κυστεΐνη και στη ομοκυστεΐνη (Εικόνα 5). Η ολική ομοκυστεΐνη στο αίμα κατά το 70-80% της είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, όπως η λευκωματίνη [46].



**Εικόνα 5:** Πορεία της ομοκυστεΐνης: διάσπαση και ανακύκλωση. Η CBS υποδηλώνει την κυσταθειονίνη-β-συνθετάση και η MTHFR, αναγωγή του μεθυλενοτετραϋδροφυλικού.

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circulationaha.114.013311>.

## 8.2 Παθogenεία υπερομοκυστεϊναιμίας

Η υπερομοκυστεϊναιμία είναι η υπερβολική αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο αίμα. Εκδηλώνεται με θρομβώσεις συνήθως εμφράγματα μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Μπορεί να είναι επίκτητη η οποία οφείλεται σε διατροφικές ελλείψεις βιταμινών και σε κληρονομική που οφείλεται σε γενετικές βλάβες ενζύμων του μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης, συνήθως μεταλλάξεις στο γονίδιο MTHFR (μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγάσης) και σπανιότερα της CBS (β-συνθετάση της κυσταθειόνης).

Το φαινόμενο της ομοκυστεϊνουρίας είναι όταν αυξάνεται η ομοκυστεΐνη και απεκκρίνεται από τον οργανισμό με τα ούρα. Η ομοκυστινουρία είναι κληρονομική αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή του μεταβολισμού της μεθειονίνης και οφείλεται σε ανεπάρκεια της CBS [47].

## 8.3 Αντιμετώπιση υπερομοκυστεϊναιμίας

Το υψηλό επίπεδο της ομοκυστεΐνης στο αίμα όπως αναφέρεται παραπάνω αποτελεί καρδιαγγειακό κίνδυνο. Έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση του φολικού οξέος(φυλλικό οξύ), βιταμίνη B6 και βιταμίνη B12 μπορεί να μειώσει την ομοκυστεΐνη στο αίμα. Μία καλή πηγή φολικού οξέος θεωρούνται τα λαχανικά, δημητριακά, φακές, ρεβίθια, σπαράγγια, σπανάκι, φασόλια κ.ά.

Είναι αξιoσημείωτο να αναφερθεί ότι η λήψη συμπληρωμάτων που περιέχουν φολικό οξύ, βιταμίνη B6 και B12 ή και ο συνδυασμός των τριών μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, υπήρξε ενδιαφέρον και για τα άτομα με λιγότερο εκσεσημασμένη αύξηση στα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, όπου αποδείχθηκε πως υπάρχει συσχέτιση της υπερομοκυστεϊναιμίας με φλεβικές-αρτηριακές θρομβώσεις.

Τρόπος υπολογισμού της ομοκυστεΐνης είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ή η φασματοσκοπία μάζας, αλλά υπάρχει και άλλη δοκιμασία που στηρίζεται στην μέθοδο ELISA. Η ομοκυστεΐνη υπολογίζεται μετά από νηστεία, ή μετά από φόρτωση του ατόμου με μεθειονίνη. Επίσης, το δείγμα αίματος πρέπει να επεξεργαστεί τάχιστα στο εργαστήριο, διότι η ομοκυστεΐνη διαρρέει γρήγορα έξω από τα ερυθρά αιμοσφαίρια [46].

## 9. Βιταμίνες

### 9.1 Εισαγωγή

Οι βιταμίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ορθή λειτουργία των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού, στον σωστό μεταβολισμό, ανάπτυξη και υγεία. Θεωρούνται οργανικές ουσίες που καλούνται και «απαραίτητα θρεπτικά συστατικά» επειδή ενώ είναι βασικά σε μικρές ποσότητες, δεν μπορούν να συντεθούν αυτά από τον οργανισμό καθώς η μη σωστή απορρόφηση τους από τον οργανισμό ή η έλλειψη τους προκαλούν διάφορες διαταραχές.

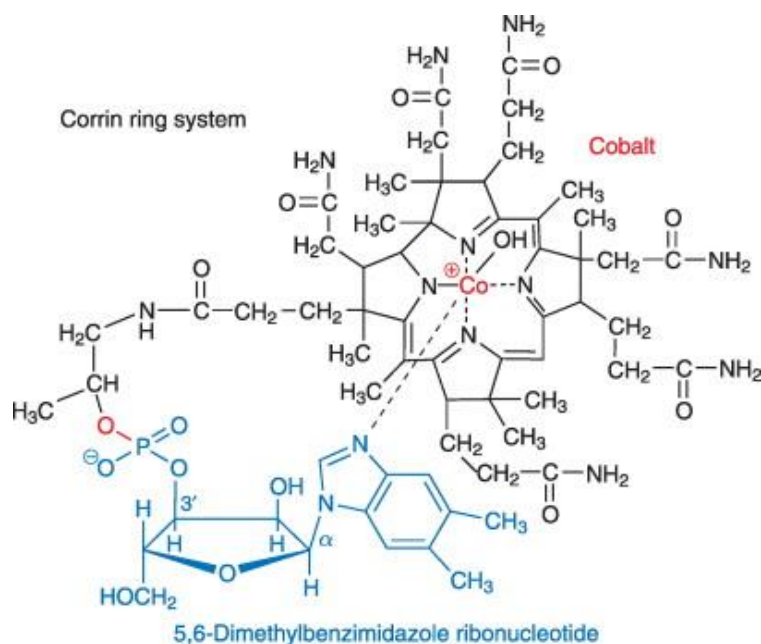
Οι βιταμίνες διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες. Σε υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες δεν αποθηκεύονται στον οργανισμό, η τυχόν υπολειπόμενη ποσότητα αποβάλλεται. Είναι βασική η τακτική λήψη τους για να αποφευχθεί η έλλειψη τους αν και οργανισμός αποθηκεύει ένα μικρό απόθεμα τους.

Η μόνη υδατοδιαλυτή βιταμίνη είναι η κοβαλαμίνη ή αλλιώς βιταμίνη B12 και μπορεί να αποθηκευτεί στο ήπαρ για πολλά χρόνια σε αντίθεση με τις λιποδιαλυτές που αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό του σώματος. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες χαρακτηρίζονται από επιλεγμένα γράμματα της αλφαβήτου αλλά και ορίζονται απο χημικές ονομασίες. Αποτελούνται από τέσσερις λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K) και είναι ευκολότερα στην απορρόφηση [48].

### Βιταμίνη B12

#### 9.2 Ορισμός

Κοβαλαμίνη ονομάζεται η βιταμίνη B12 και είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη που εμπλέκεται στον μεταβολισμό κάθε κυττάρου του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελεί μία απο τις οκτώ βιταμίνες B. Είναι συμπαράγοντας στη σύνθεση του DNA και στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και αμινοξέων. Επίσης είναι σημαντική για τον σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη διατήρηση του κεντρικού νευρικού συστήματος και η έλλειψη της στα παιδιά περιορίζει την ανάπτυξη τους [49].



**Εικόνα 6:** Χημική δομή της κοβαλαμίνης (βιταμίνη B12).

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/vitamin-b12>.

## Βιταμίνη B12

### 9.3 Ιστορική αναδρομή

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1926 από τον George Minot και William Murphy αποδείχθηκε ότι η μεγαλοβλαστική ή κακοήθης αναιμία μπορεί να θεραπευθούν με διατροφή πλούσια σε συμπύκνωμα ήπατος με υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη B12. Το 1948, για πρώτη φορά απομονώθηκε από τον Dorothy Hodgkin η βιταμίνη B12 η οποία προσδιορίστηκε και η τρισδιάστατη μορφή της. Έχει τον πιο περίπλοκο χημικό τύπο με MB 1355. Σε διάλυμα φέρει κόκκινο χρώμα και έχει pH 4-6 (Εικόνα 6) [50].

## Βιταμίνη B12

### 9.4 Απορρόφηση

Στον ανθρώπινο οργανισμό είναι γνωστές δύο ενζυμικές αντιδράσεις που εξαρτώνται από την βιταμίνη B12. Κατά τη πρώτη αντίδραση, το μεθυλομαλονικό οξύ μεταβάλλεται σε σουκκινυλο – CoA με την χρήση της B12 ως συμπαραγόντας. Η αύξηση του μεθυλομαλονικού οξέος στον ορό οφείλεται στην έλλειψη της B12. Κατά την δεύτερη αντίδραση, η ομοκυστεΐνη μετατρέπεται σε μεθειονίνη χρησιμοποιώντας την βιταμίνη B12 και φυλλικό οξύ ως συμπαραγόντες.

Επομένως, η ανεπάρκεια της B12 και φολικού οξέος οδηγούν στην αύξηση της ομοκυστεΐνης την λεγόμενη υπερομοκυστεΐναιμία. Το όξινο περιβάλλον του στομάχου διευκολύνει τη διάσπαση της βιταμίνης B12 που είναι συνδεδεμένη με την τροφή. Στην πορεία, το στομάχι εκκρίνει μία γλυκοπρωτεΐνη που καλείται εσωτερικός παράγοντας και συνδέεται με την B12 στον εντερικό σωλήνα. Το σύμπλοκο αυτό (εσωτερικός παράγοντας-B12), ενώνεται με έναν ειδικό υποδοχέα στα τοιχώματα του ειλεού και σε τελικό στάδιο βοηθά στην απορρόφηση της B12. Για να γίνει η απελευθέρωση της βιταμίνης στο αίμα, το σύμπλοκο αυτό διασπάται από έναν απελευθερωτικό παράγοντα και μεταφέρεται ενεργά μέσω της μεμβράνης του ειλεού στο περιφερικό αίμα [49].

## Βιταμίνη B12

### 9.5 Παθολογία

Η αιτία της ανεπάρκειας της B12 μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις βασικές κατηγορίες: α) διατροφική ανεπάρκεια, β) σύνδρομο δυσαπορρόφησης, γ) και άλλα γαστρικά αίτια. Αρχικά, στη διατροφική ανεπάρκεια όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι πηγές βιταμίνης B12 είναι κυρίως κρέατα, ψάρια και γαλακτοκομικά προϊόντα κ.α. Οπότε η διατροφή παρόμοια με τα αναφερόμενα παραπάνω αυξάνουν τα επίπεδα της βιταμίνης B12 στο αίμα. Στο σύνδρομο δυσαπορρόφησης η μεγαλοβλαστική ή κακοήθεις αναιμία προκαλείται από την έλλειψη του εσωτερικού παράγοντα που οδηγεί σε αδυναμία απορρόφησης της βιταμίνης B12. Όσον αφορά τα γαστρικά αίτια αποτελούν σπάνιες αιτίες ανεπάρκειας βιταμίνης B12, τα οποία θεωρούνται σπάνιες. Άτομα που πάσχουν από γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως δυσπεψία, υποτροπιάζουσα πεπτική ελκοπάθεια ή διάρροια μπορούν να είναι ένδειξη για τη παρουσία διαφόρων νόσων [49].

## Βιταμίνη B12

### 9.6 Θεραπεία

Αφού είναι σίγουρη πλέον η ανεπάρκεια της B12 και ξεκινήσει η διαδικασία της θεραπείας, είναι απαραίτητη η τακτική παρακολούθηση για τον προσδιορισμό της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία. Εάν έλλειψη της βιταμίνης σχετίζεται με σοβαρή αναιμία τότε μπορεί ο ασθενής να οδηγηθεί σε έντονη δικτυοερυθροκυττάρωση λόγω τη θεραπείας. Σε ήπια ανεπάρκεια βιταμίνης B12, συνιστούμε επαναληπτικές

μετρήσεις των επιπέδων βιταμίνης B12, ομοκυστεΐνης και μεθυλομαλονικού οξέος στον ορό δύο έως τρεις μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας [51].

## 10. Φολικό οξύ

### 10.1 Ορισμός

Το φολικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών βιταμινών του συμπλέγματος Β. Το φυλλικό οξύ ήταν γνωστό παλαιότερα ως «φολακίνη» και ως βιταμίνη Β9. Η ονομασία φολικό προέρχεται από το λατινικό «folium» γιατί βρίσκεται στα πράσινα λαχανικά.

Είναι απαραίτητο στον ανθρώπινο οργανισμό για την δημιουργία του DNA και RNA, τον μεταβολισμό των αμινοξέων που είναι σημαντική για τη κυτταρική διαίρεση. Βοηθάει να παράγει και να διατηρεί ο οργανισμός καινούργια κύτταρα. Το ανθρώπινο σώμα δεν παράγει φολικό οξύ, άρα η βιταμίνη λαμβάνεται από διάφορες τροφές όπως (αποξηραμένα φασόλια, φακές, πορτοκάλια, προϊόντα ολικής αλέσεως, συκώτι, παντζάρια κλπ.) ή από διάφορα συμπληρώματα διατροφής για θεραπεία κυρίως διαφόρων τύπων αναιμίας (έλλειψη ερυθρών αιμοσφαιρίων ) [52].

Φολικό (folic acid) και Φυλλικό οξύ (folate acid)

### 10.2 Διαφορές

Το φυλλικό οξύ διαφέρει από το φολικό οξύ και δεν είναι ταυτόσημοι όροι. Το φυλλικό οξύ αναφέρεται στην φυσική μορφή της βιταμίνης η οποία βρίσκεται στις τροφές. Ωστόσο, το φολικό οξύ είναι συνθετικό μόριο και βρίσκεται στα συμπληρώματα διατροφής και είναι σημαντικό στην πρόληψη ελαττωμάτων του νευρικού σωλήνα [53].

Φολικό οξύ (folic acid)

### 10.3 Ανεπάρκεια

Το φολικό οξύ επιτελεί πολλές σημαντικές λειτουργίες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Μία από αυτές είναι ότι βοηθάει την σύνθεση του DNA και RNA καθώς και στην παραγωγή νέων πρωτεϊνών. Η ανεπάρκεια του φολικού οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Η κακή ποιότητας διατροφή μειώνει τα επίπεδα του στον οργανισμό για παράδειγμα η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ. Επίσης, άτομα με διάφορα γαστρικά προβλήματα όπως φλεγμονή στο έντερο, κοιλιοκάκη κ.α. δεν έχουν καλή απορρόφηση του φολικού οξέος.

Όπως αναφέρεται και παραπάνω άτομα με τον γενετικό πολυμορφισμό MTHFR δεν έχουν την ικανότητα μετατροπής του φυλλικού οξέος σε μία από τις ενεργές μορφές του. Ερυθροκύτταρα δυσκολεύονται να μεταφέρουν τον οξυγόνο στους ιστούς. Άλλες ενδείξεις ανεπάρκειας της βιταμίνης είναι έλκη και πληγές στη γλώσσα και στο βλεννογόνο του στόματος, αλλαγές στο χρώμα του δέρματος, στα μαλλιά και στα νύχια [54].

Φολικό οξύ

#### 10.4 Θεραπεία

Αφού πλέον είναι σίγουρη η ανεπάρκεια του φολικού οξέος, η διαδικασία της θεραπείας γίνεται με τη λήψη ενός δισκίου φολικού οξέος μέχρι να επανέλθουν τα επίπεδα της αναιμίας και να αυξηθούν οι αποθήκες φυλλικού οξέος στο σώμα. Αντιμετωπίζεται κιόλας με διατροφή σε συνδυασμό με τα φάρμακα. Μπορεί να χρειαστεί να λαμβάνεται η θεραπεία εφόρου ζωής εφόσον δεν οφείλεται η ανεπάρκεια στη κακή διατροφή αλλά για παράδειγμα σε δρεπανοκυτταρική αναιμία [55].

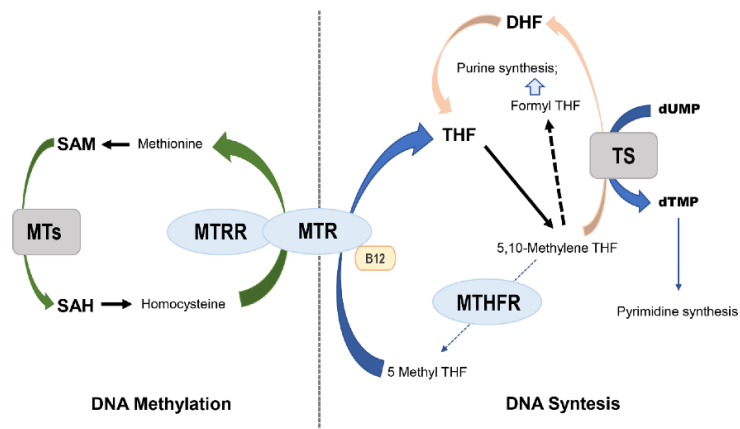
### 11. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ MTHFR, ΦΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΜΚΥΣΤΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ B12

Ο πολυμορφισμός της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR) C677T συνδέεται με ποικίλες διαταραχές όπως νευρολογικές και αγγειακές παθήσεις, καρκίνοι, διαβήτη και ψωρίαση. Η επιδημιολογική εικόνα του πολυμορφισμού C677T εξαρτάται από τη γεωγραφική και εθνική καταγωγή. Το ένζυμο αυτό είναι βασικό στο μεταβολισμό του φυλλικού οξέος το οποίο παίζει πολύ βασικό ρόλο στη διαδικασία του κυτταρικού μεταβολισμού στη μεθυλίωση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών και συμβάλλει στο μεταβολισμό του αμινοξέος ομοκυστεΐνη. Καταλύει την αναγωγή του 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολικού σε 5-μεθυλτετραϋδροφολικό, σχηματίζοντας έτσι τη δραστική μορφή του φυλλικού οξέος που συμβάλλει στην επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη (Εικόνα 7).

Η έλλειψη του MTHFR είναι πιθανόν να συσχετίζεται με αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα του ασθενούς, η οποία προκαλεί αύξηση κινδύνου αγγειακής διαταραχής. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ομοζυγωτές ασθενείς με μετάλλαξη MTHFR έχουν περισσότερο αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης από τους ετεροζυγωτές

ασθενείς με τη μετάλλαξη αυτή, οι οποίοι παρουσιάζουν ήπια αύξηση της ομοκυστεΐνης συγκριτικά με τους φυσιολογικούς που δεν εμφανίζουν την μετάλλαξη MTHFR.

Από τα παραπάνω λοιπόν γίνεται αντιληπτό το γεγονός ότι η υπερομοκυστεϊναιμία αποτελεί παράγοντας για καρδιαγγειακές διαταραχές και σε αρκετές περιπτώσεις προκύπτουν επιπτώσεις νοσηρότητας και θνησιμότητας των πασχόντων. Η χορήγηση βιταμίνης B12 και φολικού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής φαίνεται ότι επηρεάζουν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα των ασθενών και τα μειώνει αποτελεσματικά και είναι ακόμη υπό μελέτη για να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία [56].



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του μεταβολισμού του φυλλικού οξέος. Επιδράσεις της μειωμένης δραστηριότητας του MTHFR στη σύνθεση και τη μεθυλίωση του DNA.

<https://www.mdpi.com/2073-4425/12/4/587>.



## Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο Γενικό Νοσοκομείο Ιπποκράτειο Αθηνών, κατά το έτος 2020 έως 2021 πραγματοποιήθηκαν 80 αιμοληψίες. Οι ασθενείς είχαν εκδηλώσει μεσογειακή αναιμία, συχνές αποβολές, ΑΕΕ, διάφορων ειδών θρομβώσεων, σακχαρώδεις διαβήτης τύπου II και άλλες παθήσεις. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε επίπεδα ομοκυστεΐνης, μεταλλάξεις MTHFR (A1298 και C677T), βιταμίνη B12 και φολικό οξύ. Τα κίτ και τα control που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας «ABBOTT» για το B12 και το φολικό και για την ομοκυστεΐνη χρησιμοποιήθηκαν από την εταιρεία «SIEMENS» τα «Reagent kit».

Τα δείγματα ανήκαν σε συνολικά 80 ασθενείς από τους οποίους 50 ήταν γυναίκες και 30 άνδρες. Εκ των οποίων 47 ασθενείς είχαν ανεβασμένα τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και 33 ήταν φυσιολογικά. Από τους 80 ασθενείς οι 20 δεν παρουσιάζουν μετάλλαξη MTHFR και οι υπόλοιποι 60 (ετεροζυγωτές, ομοζυγωτές και διπλά ετεροζυγωτές) παρουσιάζουν μεταλλάξεις MTHFR (A1298 και C677T).

Αναλυτικά οι ασθενείς που έχουν τις μεταλλάξεις MTHFR κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες: (20 ομοζυγωτές, 20 ετεροζυγωτές και 20 διπλά ετεροζυγωτές). Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 42 ετών, με μεγαλύτερη αυτή των 79 ετών και μικρότερη αυτή των 17 ετών. Η συλλογή των δειγμάτων καθώς και ο εργαστηριακός έλεγχος έγινε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ.

**Πίνακας 1:** Οι κύριες παθήσεις που καταγράφηκαν από το ιστορικό των ασθενών παριστάνεται στο παρακάτω πίνακα.

ΠΑΘΗΣΕΙΣ	N
Πνευμονική εμβολή	7
ΑΕΕ	19
Αποβολές	7
Έμφραγμα	3
Διάφορες θρομβώσεις	28

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Κατά τη πρώτη φάση, συλλέχθηκαν τα στοιχεία των ασθενών (κωδικό εξέτασης, ημερομηνία εξέτασης, ηλικία, φύλο και το βασικότερο το ιστορικό των ασθενών) καθώς κατόπιν συλλογής των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος στα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και τον γονότυπο της μετάλλαξης MTHFR(A1298 και C677T). Κατά την δεύτερη φάση, διενεργήθηκε έλεγχος για τα επίπεδα της βιταμίνης B12 και φολικού οξέος των ασθενών.

### 2.2 Μοριακός Έλεγχος

Σε αρχική φάση πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος των μεταλλάξεων MTHFR(C677T),MTHFR(A1298C) με μοριακή τεχνική REAL Time PCR. Επίσης, μετρήθηκαν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης HCY ( $\mu\text{mol/L}$ ) των ασθενών σε αναλυτή SIEMENS. Η δεύτερη φάση αφορά την μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης B12 και φολικού οξέος με αναλυτή Alinity της ABBOT με τη μέθοδο της ανοσοχημειοφωταύγειας.

## 3. MTHFR

### 3.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί και λεπτομερώς παραπάνω το ένζυμο MTHFR αποτελεί μια πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και έχει την ικανότητα να περιορίζει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης. Οι μεταλλάξεις του MTHFR αυξάνουν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο αίμα και αποτελούν παράγοντα κινδύνου θρομβοφιλίας. Επομένως, για τη μείωση της ομοκυστεΐνης συνεπώς και οι κίνδυνοι που παρουσιάζονται συνιστάται η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης B12 και φολικού οξέος.

### 3.2 Αρχή μεθόδου Real Time – PCR (πραγματικού χρόνου)

Η πραγματικού χρόνου RT-PCR είναι η διαδικασία πολλαπλασιασμού μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA) με τη μέθοδο PCR (αλυσιδωτής πολυμεράσης) και παράλληλα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό αλλά και σύντομο χρονικό διάστημα μέσω της χρήσης ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που ενσωματώνονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.

### 3.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ MTHFR

Στην RT-PCR πραγματοποιείται απομόνωση DNA.

Υλικά απομόνωσης DNA και της PCR:

- απομόνωση DNA Καθαρή ξυλόλη και αιθανόλη,
- πιπέτες - tips(10μl, 100μl),
- εκκινητές DNA πολυμεράσης 15 μl,
- taq πολυμεράση,
- dNTPs,
- αντιδραστήρια 20 rxns,
- MTHFR 1298 wild type PCR βασικού μείγματος 430 μl,
- MTHFR 1298 Mutant PCR βασικού μείγματος 430 μl,
- DNA Control 20 μl.

### 3.4 Απομόνωση DNA πρωτόκολλο

- προσθήκη πυκνής αιθανόλης στο διάλυμα (παρουσία άλατος κάνει το DNA υδρόφοβο),
- εφαρμογή του διαλύματος σε στήλη με silica και φυγοκέντρηση,
- πρόσδεση του DNA στη στήλη,
- απομάκρυνση πρωτεϊνών και κυτταρικών στοιχείων,
- εφαρμογή αραιής αιθανόλης στη στήλη και φυγοκέντρηση,
- απομάκρυνση του άλατος,
- το DNA ξαναγίνεται υδρόφιλο,
- εφαρμογή αλκαλικού διαλύματος έκλουσης (ή νερού) στη στήλη και φυγοκέντρηση,
- αποδέσμευση του DNA από τη στήλη.

Στη πορεία, το DNA που απομονώθηκε τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή. Η φθορίζουσα ουσία συνδέεται με το δίκλωνο DNA και μόνο τότε αυτό φθορίζει. Συνεπώς, η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της απαιτούμενης ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετράτε ο φθορισμός που εκπέμπεται από ιχνηθέτες που υβριδοποιούνται με το προϊόν της αντίδρασης. Ο φθορισμός που προκύπτει σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των αλληλουχιών που παράγονται σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο.

## 4. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ

### 4.1 Αρχή μεθόδου

Η δοκιμασία ομοκυστεΐνης AxSYM στηρίζεται στην πολικότητα φθορισμού μέσω ανοσοανάλυσης (FPIA). Η δεσμευμένη HCY μετατρέπεται σε ελεύθερη HCY, η οποία μετασχηματίζεται ενζυμικά σε s-αδενοσυλ-L-χομοκυστεΐνη (SAH) ως εξής: η ομοκυστεΐνη, τα μικτά δισουλφίδια και η δεσμευμένη πρωτεΐνη με τη μορφή HCY στο δείγμα μετατρέπονται σε ελεύθερη HCY με τη χρήση διθειοθρεϊτόλης

### **HCY-SS-HCY (Homocystine)**

**R1-SS-HCY (R1=υπόλειμμα θειόλης)  $\rightarrow$ <sup>DTT</sup> HCY**

Πρωτεΐνη-SS-HCY

Ενζυμική μετατροπή: ελεύθερη HCY μετατρέπεται σε SAH με χρήση SAH Υδρολάσης και περίσσεια αδενοσίνης.

### **SAH-Hybrólase**

**HCY+Adenosine  $\rightarrow$  SAH**

Υπό ομαλές προϋποθέσεις, η SAH μεταβάλλεται σε ομοκυστεΐνη. Η περιττή αδενοσίνη στο δείγμα προεπεξεργασίας οδηγεί στην μετατροπή της HCY σε SAH από ανασυνδυασμένη υδρολάση SAH.

### 4.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Αρχικά, η λήψη του δείγματος πραγματοποιείται με αιμοληψία σε σωληνάριο δειγματοληψίας με αντιπηκτικό EDTA ολικού αίματος, το οποίο φυλάσσεται σε πάγο. Το δείγμα για 48 ώρες δεν υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία 20-25 °C ή για 7 μέρες στους 2-8°C και από αυτό εξαρτάται η σταθερότητα του δείγματος. Η εκτέλεση της εξέτασης πραγματοποιείται σε 3-7 ημέρες.

Σωληνάριο δειγματοληψίας ολικού αίματος με αντιπηκτικό ηπαρίνης ή δείγμα ορού ή πλάσματος δεν θεωρείται αποδεκτό.

Ο ασθενείς οφείλει να παραμείνει 12 ώρες νηστικός πριν την συλλογή του δείγματος. Το αποτέλεσμα της εξέτασης της ομοκυστεΐνης αναγράφεται ως αρνητική που

σημαίνει ότι δεν ανιχνεύεται χωρίς να αναιρέσει άλλες αιτίες αύξησης της ομοκυστεΐνης όπως είναι η στεφανιαία νόσος.

## 5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β12 ΚΑΙ ΦΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

### 5.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης Β12 και του φολικού οξέος στον αναλυτή «Alinity i» είναι ένας ανοσοπροσδιορισμός μικροσωματιδίων με τη μέθοδο της ανοσοχημειοφωταύγειας (CMIA) που χρησιμοποιείται για το ποσοτικό προσδιορισμό του φολικού αλλά και της βιταμίνης Β12 στον ανθρώπινο ορό στον αναλυτή Alinity.

Προσοχή: Τα αντιδραστήρια αυτά περιέχουν προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης. Όταν χρησιμοποιείται ανθρώπινο πλάσμα για να κατασκευαστεί αυτό το αντιδραστήριο διερευνάται ως προς το HBsAg, HIV1 Ag, HIV1 RNA και Anti-HCV και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι αρνητικά. Παρόλα αυτά, καμία εξέταση δεν είναι απόλυτα σίγουρο η απουσία μολυσματικών στοιχείων. Συνεπώς, τα αντιδραστήρια αυτά, τα οποία είναι βιολογικής προέλευσης είναι απαραίτητη η διαχείριση τους με τις προφυλάξεις που λαμβάνονται σε προϊόντα που ίσως να είναι μολυσματικά.

### 5.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συλλογή του αίματος πραγματοποιείται σε σωληνάρια κιτρικού τρινατρίου.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 2.000-2.500 στροφές. Οι ασθενείς θα πρέπει να είναι νηστικοί τουλάχιστον 8 με 10 ώρες καθώς η πρόσληψη τροφών επηρεάζει τις τιμές. Οι εξετάσεις θα πρέπει να εκτελεστούν όσο το δυνατόν το συντομότερο μετά την συλλογή του αίματος.

Σε περίπτωση που δεν γίνουν άμεσα είναι απαραίτητη η διατήρηση τους σε κατάψυξη, αναλόγως πάντα με την χρονική περίοδο που αυτό θα συντηρηθεί, και στην συνέχεια τοποθετείται το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου 37 °C, για να εξασφαλιστεί το πλήρες ξεπάγωμα.

### 5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ (CMIA)

Η τεχνολογία ανίχνευσης μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (CMIA) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παρουσίας αντισωμάτων, αντιγόνων και

αναλυτών στα δείγματα. Τα παρακάτω αντιδρώντα και ο αναλυτής είναι απαραίτητα για την μέθοδο ανίχνευσης CMIA:

- ↳ παραμαγνητικά μικροσωματίδια επικαλυμμένα με μόρια δέσμησης (αντιγόνα, αντισώματα, ή ιικά σωματίδια) ειδικά για τον μετρούμενο αναλυτή,
- ↳ μετρούμενος αναλυτής δείγματος,
- ↳ συνδετικό διάλυμα με σήμανση ακριδίνης,
- ↳ διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης.

Η αλληλουχία αντίδρασης CMIA αποτελεί μία σειρά από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον αναλυτή που υπάρχει το δείγμα και των αντιδρώντων. Η αλληλουχία είναι ειδική ως προς το πρωτόκολλο εξέτασης.

1. το δείγμα και τα παραμαγνητικά μικροσωματίδια επικαλυμμένα με μόριο δέσμησης διανέμονται στον υποδοχέα αντίδρασης (RV). Ο αναδευτήρας αναμιγνύει το μίγμα αντίδρασης,
2. το μίγμα αντίδρασης επωάζεται. Ο αναλυτής στο δείγμα συνδέεται στα μόρια δέσμησης στα παραμαγνητικά μικροσωματίδια και σχηματίζεται το ανοσοσύμπλεγμα,
3. ένας μαγνήτης έλκει τα παραμαγνητικά μικροσωματίδια (τα οποία είναι συνδεδεμένα στον ειδικό αναλυτή) προς ένα τοίχωμα του υποδοχέα αντίδρασης (RV). Το σύστημα της ζώνης πλύσης διεξάγει πλύση του μίγματος αντίδρασης για να απομακρυνθούν τα μη συζευγμένα υλικά. Μπορεί πλέον να διεξαχθεί πρόσθετη επεξεργασία της εξέτασης,
4. ο δειγματολήπτης διανέμει συνδετικό διάλυμα χημειοφωταύγειας με σήμανση ακριδίνης στον υποδοχέα αντίδρασης (RV). Το συνδετικό διάλυμα συνδέεται στο ανοσοσύμπλεγμα για να ολοκληρωθεί το μίγμα αντίδρασης. Ο αναδευτήρας αναμιγνύει το μίγμα αντίδρασης. Το μίγμα αντίδρασης επωάζεται,
5. το σύστημα της ζώνης πλύσης διεξάγει πλύση του μίγματος αντίδρασης για να απομακρυνθούν τα μη συζευγμένα υλικά,
6. το ακροφύσιο διαλύματος αρχικής φωτοενεργοποίησης διανέμει το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης (υπεροξείδιο υδρογόνου) στο μίγμα αντίδρασης.

Ο αναδευτήρας αναμιγνύει το μίγμα αντίδρασης. Το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης:

- δημιουργεί τοξικό περιβάλλον για να αποτραπεί η πρόωρη απελευθέρωση ενέργειας (εκπομπή φωτός),
- συμβάλλει στην αποτροπή σχηματισμού συμπαγών μαζών στα μικροσωματίδια,
- διασπά τη χρωστική ακριδίνης από το συνδεδετικό διάλυμα που έχει συνδεθεί στο σύμπλεγμα μικροσωματιδίων. Με αυτό τον τρόπο, η χρωστική ακριδίνης προετοιμάζεται για το επόμενο στάδιο. Το σύστημα οπτικών CMIA διεξάγει ανάγνωση τυφλού.

7. το ακροφύσιο διαλύματος φωτοενεργοποίησης διανέμει το διάλυμα φωτοενεργοποίησης (υδροξείδιο του νατρίου) στο μίγμα αντίδρασης.

Το διάλυμα φωτοενεργοποίησης δημιουργεί ένα αλκαλικό περιβάλλον το οποίο, με την έκθεση στο υπεροξείδιο του διαλύματος αρχικής φωτοενεργοποίησης, έχει ως αποτέλεσμα η χρωστική ακριδίνης να υποβληθεί σε οξειδωτική αντίδραση. Από την οξειδωτική αντίδραση προκύπτει η αντίδραση χημειοφωταύγειας. Σχηματίζεται N-μεθυλακριδόνη και απελευθερώνει ενέργεια (εκπομπή φωτός) καθώς επανέρχεται στη θεμελιώδη κατάστασή της (κατάσταση ελάχιστης ενέργειας). Το σύστημα οπτικών CMIA μετρά την εκπομπή χημειοφωταύγειας (ενεργή μέτρηση) σε ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα για να προσδιορίσει το αποτέλεσμα.

## 5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

### Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

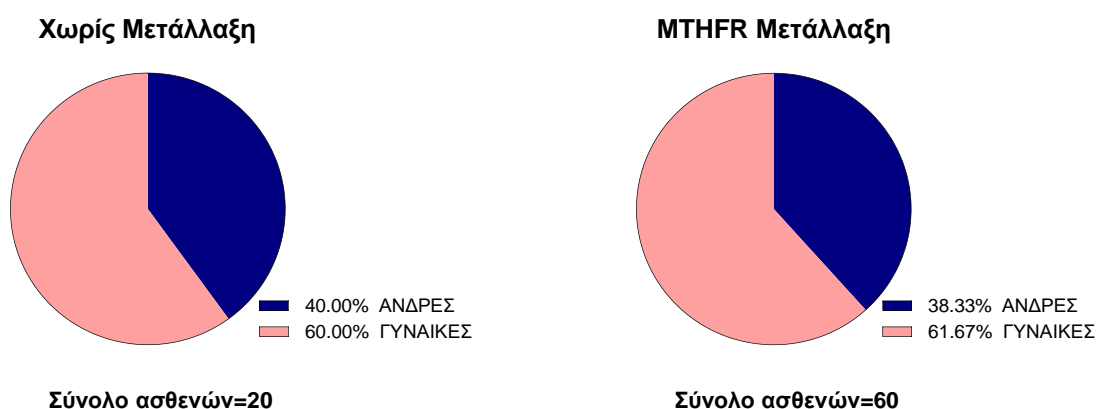
Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε 80 ασθενείς. Η πλειοψηφία των ατόμων ήταν γυναίκες και οι υπόλοιποι άνδρες. Στα παρακάτω γραφήματα παριστάνονται οι στατιστικές συγκρίσεις των ασθενών και οι διάφορες συσχετίσεις των επιπέδων βιταμίνης B12, φολικό και ομοκυστεΐνης σε άτομα με μετάλλαξη MTHFR ανά περίπτωση.

Επίσης, ακολουθούν πίνακες με γενικές πληροφορίες των ασθενών για την έρευνα που πραγματοποιήθηκε. Οι ηλικίες των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα ήταν κατά μέσο όρο 42 ετών με μεγαλύτερη αυτή των 79 και μικρότερη των 17 ετών. Από τους 80 ασθενείς οι 49 είναι γυναίκες και οι υπόλοιποι 31 άνδρες. Υπήρχαν άτομα που

εξετάστηκαν που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR και άλλα άτομα που είναι χωρίς μετάλλαξη.

**Πίνακας 2:** Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται πόσες γυναίκες και άνδρες είναι με μετάλλαξη και πόσοι χωρίς μετάλλαξη MTHFR.

Άτομα με μετάλλαξη MTHFR	Άτομα χωρίς μετάλλαξη MTHFR
Γυναίκες: 37	Γυναίκες: 12
Άνδρες: 23	Άνδρες: 8



**Εικόνα 8:** Διάγραμμα μελέτης πληθυσμού σε άτομα με μετάλλαξη και άτομα χωρίς μετάλλαξη.

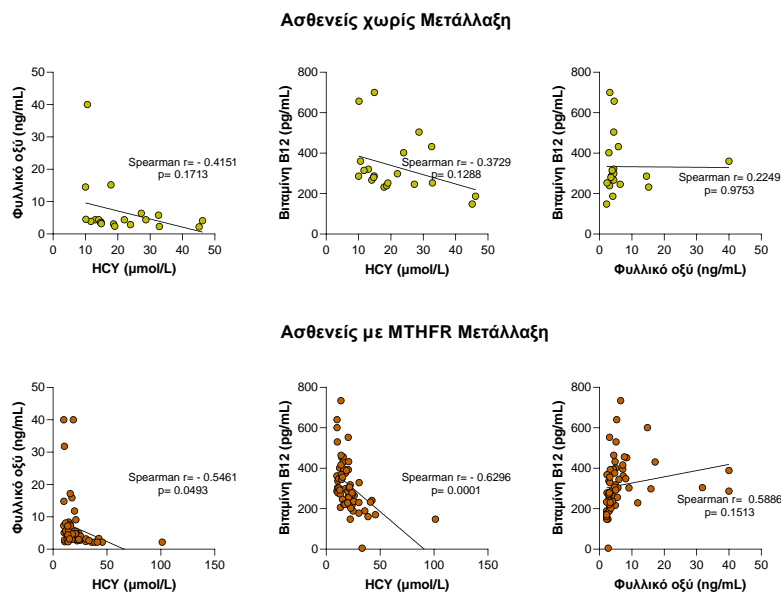
Στο διάγραμμα πίτας αναπαριστάνεται η μέτρηση πληθυσμού που συμμετείχαν στην έρευνα και ταξινομούνται σε άτομα με μετάλλαξη και άτομα χωρίς μετάλλαξη MTHFR. Αναφέρεται ότι στη κατηγορία χωρίς τη μετάλλαξη από τους συνολικά 20 ασθενείς οι 40% ήταν άνδρες (με μπλε χρώμα) ενώ 60% γυναίκες (με ροζ χρώμα). Στους ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη είναι 61.67% ο γυναικείος και 38.33% ο ανδρικός πληθυσμός ενώ συνολικά συμμετείχαν 60 άτομα (Εικόνα 8).

Παρατηρείται πως το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν γυναίκες και στις δύο κατηγορίες.

Αφού καταγράφηκαν τα ποσοστά των συμμετεχόντων, τις ηλικίες, τις παθήσεις και τα φύλα τους ακολούθησαν διάφορες συσχετίσεις.

Αρχικά, μελετήθηκε εάν υπάρχουν συσχετίσεις των επιπέδων: α) φολικού οξέος με την ομοκυστεΐνη, β) βιταμίνης B12 με ομοκυστεΐνη και γ) βιταμίνης B12 με φολικό οξύ σε άτομα με μετάλλαξη και άτομα χωρίς μετάλλαξη.





**Εικόνα 9:** Συσχέτιση φολικού οξέος, βιταμίνης B12 και ομοκυστεΐνης σε ασθενείς με ή χωρίς μετάλλαξη.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ατόμων με ομοκυστεΐνη και φολικό οξύ (τα δύο διαγράμματα πάνω και κατω αριστερά). Στο κάτω αριστερά γράφημα παρατηρείται ότι το  $p$  value=0,04  $r=0,54$ ) το οποίο υποδηλώνει ότι υπάρχει σημαντική στατιστική συσχέτιση. Σε αντίθεση με την σύγκριση των ασθενών χωρίς μετάλλαξη κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση.

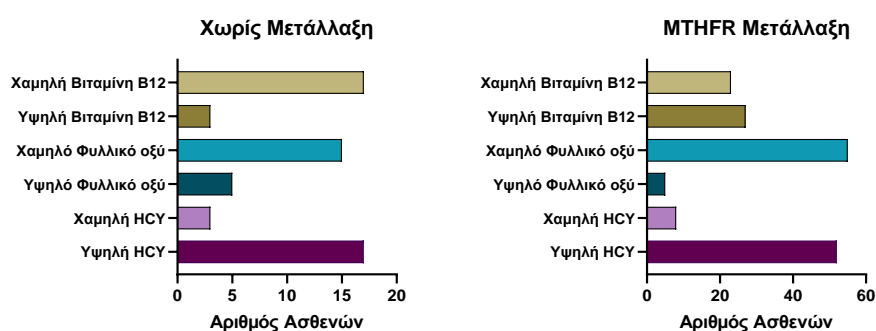
Παρομοίως, και στην επόμενη κατηγορία των ασθενών με ομοκυστεΐνη σε σύγκριση με τη βιταμίνη B12 (στην μεσαία στήλη κάθετα τα δύο διαγράμματα). Παρατηρείται ότι το  $p$  value είναι 0,01 και το  $r=0,62$ ) στο μεσαίο κάτω διάγραμμα και δείχνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε αντίθεση με το μεσαίο πάνω διάγραμμα. Επομένως, σε αυτή τη περίπτωση τα άτομα με μετάλλαξη παρουσιάζουν σημαντική αρνητική συσχέτιση ενώ χωρίς τη μετάλλαξη δε παρατηρήθηκε καμία διαφορά.

Τέλος, στην τελευταία κατηγορία πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ βιταμίνης B12 και φολικού οξέος όπου δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση συνεπώς το  $p$  value είναι μεγαλύτερο των 0,05 με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται καμία διαφορά (Εικόνα 9).

**Πίνακας 3:** Στον παρακάτω πίνακα καταγράφεται το όριο των τιμών από τους βιοδείκτες της συγκεκριμένης μετάλλαξης όταν είναι αυξημένα και όταν είναι μειωμένα.

<b>ΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΗ</b>	HCY ΥΨΗΛΗ >11 μmol/L	HCY ΧΑΜΗΛΗ < 11 μmol/L
<b>ΒΙΤΑΜΙΝΗ B12</b>	B12 ΥΨΗΛΗ >500 pg/mL	B12 ΧΑΜΗΛΗ <500 pg/mL
<b>ΦΟΛΙΚΟ ΟΞΥ</b>	ΦΥΛΛΙΚΟ ΟΞΥ ΥΨΗΛΟ> 4,5 ng/mL	ΦΥΛΛΙΚΟ ΟΞΥ ΧΑΜΗΛΟ >4,5 ng/mL

Στη πορεία, ακολουθεί κατάταξη των ασθενών σε αυτούς με αυξημένα και μειωμένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, βιταμίνης B12 και φολικού οξέος σε σύγκριση με τον αριθμό των ασθενών με μετάλλαξη και χωρίς μετάλλαξη.

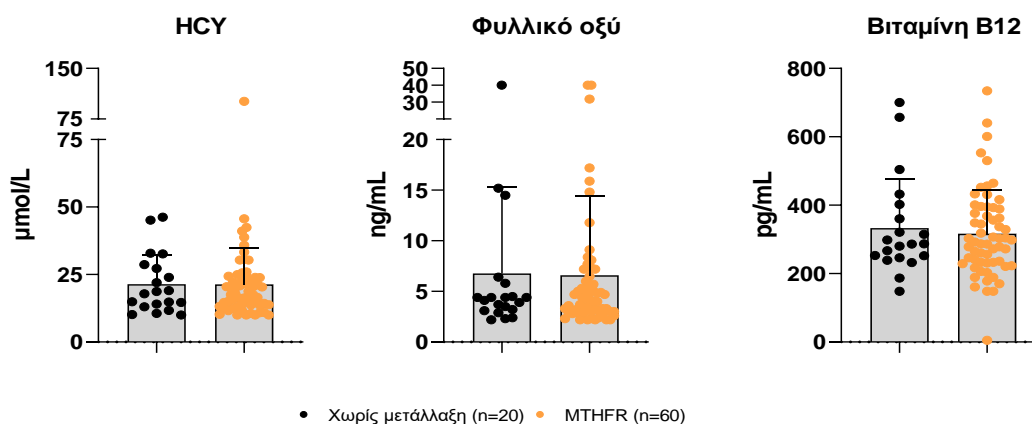


**Εικόνα 10:** Διάγραμμα συσχέτισης των αυξημένων και μειωμένων επιπέδων της ομοκυστεΐνης, βιταμίνης B12 και φολικού οξέος με τον αριθμό των ασθενών με και χωρίς μετάλλαξη.

Σύμφωνα με την εικόνα 10 παρουσιάζονται τα επίπεδα της βιταμίνης B12, ομοκυστεΐνης και φολικού οξέος σε συνάρτηση με τον αριθμό των ασθενών. Εμφανίζονται με διάφορα χρώματα και στα δύο διαγράμματα τα αυξημένα και τα μειωμένα επίπεδα των παραμέτρων. Το πρώτο αριστερά διάγραμμα αναφέρεται στους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ενώ στο δεύτερο δεξιά αναφέρεται στους ασθενείς με μετάλλαξη MTHFR. Η συνολική εικόνα που αναπαριστάνεται δεν υποδεικνύει κάποια σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ των βιοδεικτών. Συνεπώς, δεν προέκυψε κάποιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα σε μία από τις παραπάνω ομάδες (Εικόνα 10).

**Πίνακας 4:** Αναφέρεται ο συνολικός αριθμός των ατόμων με μετάλλαξη MTHFR(C677T και A1298) και αυτών χωρίς μετάλλαξη.

Άτομα με MTHFR(C677T και A1298)	60
Άτομα χωρίς μετάλλαξη	20

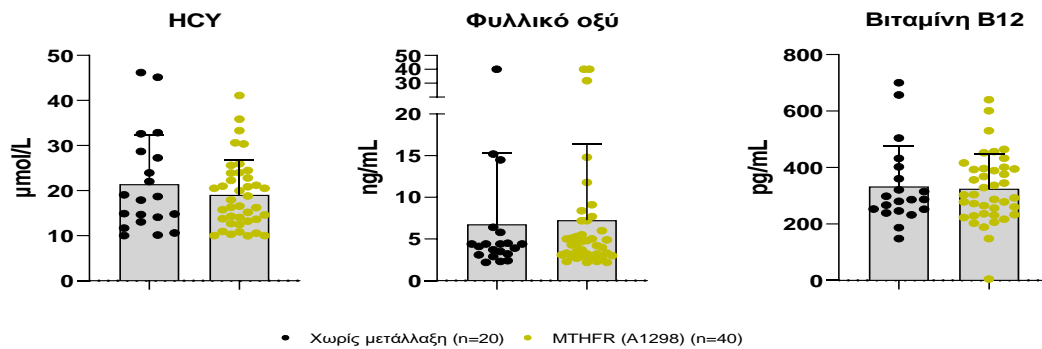


**Εικόνα 11:** Σύγκριση των επιπέδων βιταμίνης B12, φυλλικό οξύ και ομοκυστείνης μεταξύ των ατόμων που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR C677T(ετερόζυγοι ή ομόζυγοι) και A1298 (ετερόζυγοι ή ομόζυγοι) ή διπλά ετεροζυγώτες και σε αυτούς χωρίς μετάλλαξη. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζεται το MEAN +SD.

Στην προκειμένη εικόνα παρουσιάζονται τρία διαγράμματα. Εμφανίζονται με μαύρο χρώμα τα άτομα χωρίς μετάλλαξη και με πορτοκαλί τα άτομα που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR(C677T, A1298) και διακρίνονται σε ετερόζυγοι ή ομόζυγοι και σε διπλά ετερόζυγοι. Αρχικά, το πρώτο διάγραμμα αριστερά παρουσιάζει τα επίπεδα της ομοκυστείνης σε άτομα με και χωρίς τον γονότυπο MTHFR. Στο δεύτερο διάγραμμα είναι το φυλλικό οξύ και στο τρίτο η βιταμίνη B12. Οι τιμές μεταξύ των δύο κατηγοριών (σύνολο 80 ασθενείς) δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη διαφορά, με αποτέλεσμα στη προκειμένη σύγκριση να μην έχουμε κάποια σημαντική ένδειξη (Εικόνα 11).

**Πίνακας 5:** Αναφέρεται ο συνολικός αριθμός των ατόμων με μετάλλαξη MTHFR A1298 και αυτών χωρίς μετάλλαξη.

Άτομα με MTHFR A1298	40
Άτομα χωρίς μετάλλαξη	20

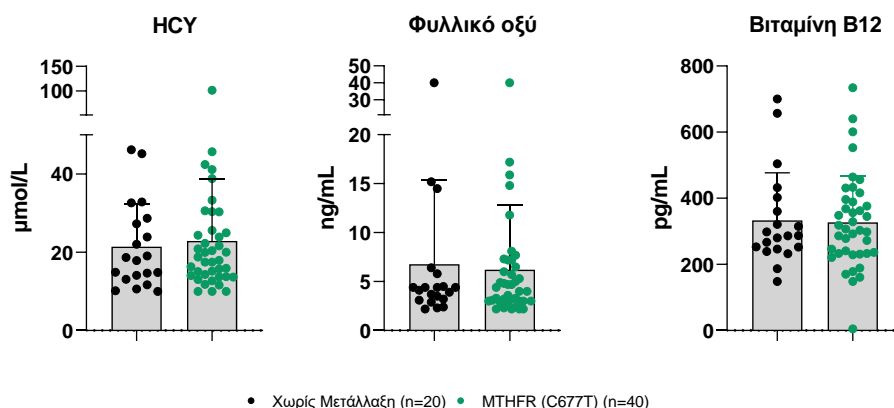


**Εικόνα 12:** Σύγκριση των επιπέδων βιταμίνης B12, φυλλικό οξύ και ομοκυστεΐνης μεταξύ των ατόμων που φέρουν την A1298 (ετερόζυγοι ή ομόζυγοι) ή διπλά ετεροζυγώτες και σε αυτούς χωρίς μετάλλαξη. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζεται το MEAN +SD.

Σε αυτό το γράφημα μελετήθηκαν τρία διαγράμματα με τους ασθενείς που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR (A1298) η οποία εντοπίζεται σε σαράντα ασθενείς από την έρευνα και σε ασθενείς που δεν φέρουν τη μετάλλαξη δηλαδή είκοσι ασθενείς από την έρευνα. Με μαύρο χρώμα κατατάσσονται οι ασθενείς χωρίς την μετάλλαξη και με κίτρινο οι ασθενείς που φέρουν μόνο την MTHFR (A1298). Εξετάζεται ομοκυστεΐνη στο πρώτο διάγραμμα, το φυλλικό στο δεύτερο και η βιταμίνη B12 στο τρίτο. Παρομοίως, δεν παρατηρήθηκε και σε αυτή την κατηγορία καμία στατιστική διαφορά μεταξύ των παραμέτρων σε καμία κατηγορία ασθενών (Εικόνα 12).

**Πίνακας 6:** Αναφέρεται ο συνολικός αριθμός των ατόμων με μετάλλαξη MTHFR C677T και αυτών χωρίς μετάλλαξη.

Άτομα με MTHFR C677T	40
Άτομα χωρίς μετάλλαξη	20



**Εικόνα 13:** Σύγκριση των επιπέδων βιταμίνης B12, φολικό οξύ και ομοκυστείνης μεταξύ των ατόμων που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR C677T (ετερόζυγοι ή ομόζυγοι) ή διπλά ετεροζυγωτές και σε αυτούς χωρίς μετάλλαξη. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζεται το MEAN +SD.

Αντίστοιχα, στο παραπάνω γράφημα αναφέρονται τα 20 άτομα χωρίς τη μετάλλαξη και τα 40 άτομα μόνο με τη μετάλλαξη MTHFR C677T. Με μαύρο χρώμα είναι οι ασθενείς που δεν φέρουν την μετάλλαξη και με πράσινο μόνο η C677T ετερόζυγοι ή ομόζυγοι ή διπλά ετεροζυγωτές. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της ομοκυστείνης, βιταμίνης B12 και φολικού οξέος μεταξύ των ασθενών που δεν έφεραν την μετάλλαξη και των ασθενών με την μετάλλαξη MTHFR C677T (Εικόνα 13).

Πίνακας 7: Στον πίνακα που ακολουθεί δίνεται ο αριθμός των ασθενών που κατά το μοριακό έλεγχο που διενεργήθηκε ήταν ομόζυγοι ή ετερόζυγοι ή αντίθετα ήταν φυσιολογικοί.

Μοριακός έλεγχος MTHFR (C677T και A1298)	Ασθενείς
Ετεροζυγωτές	20
Ομοζυγωτές	20
Διπλά ετεροζυγωτές	20
Φυσιολογικοί χωρίς μετάλλαξη	20

Στο παρακάτω διάγραμμα που ακολουθεί με διάφορα χρώματα αναπαριστώνται τα εξής:

ΧΩΡΙΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ: καμία μετάλλαξη,

MTHFR: μετάλλαξη στο C677T ετεροζυγοί και ομόζυγοι ή A1298 (ετερόζυγοι ή ομόζυγοι) και διπλά ετεροζυγωτές,

MTHFR A1298: ετερόζυγοι ή ομόζυγοι για A1298 ή διπλά ετεροζυγωτές,

MTHFR A1298 -E: ετερόζυγοι για A1298 και διπλά ετεροζυγωτές,

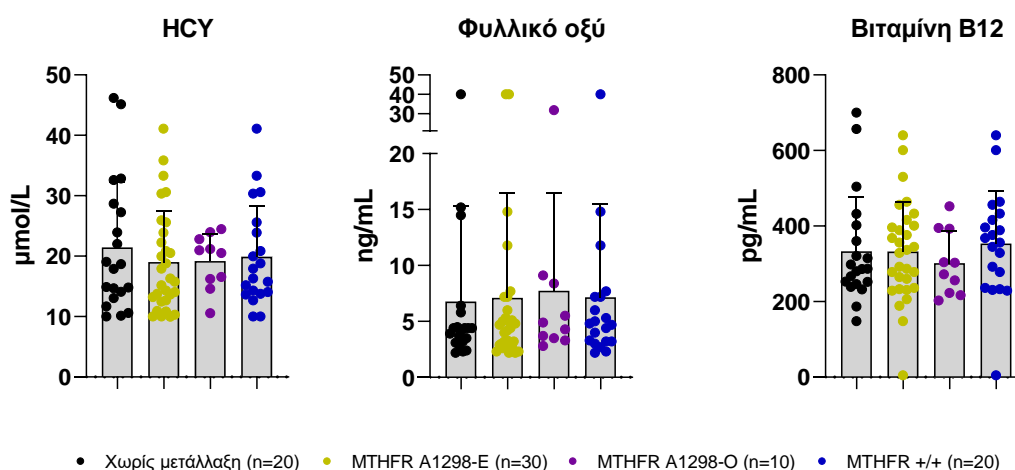
MTHFR A1298-0: ομόζυγοι για A1298,

MTHFR C677T: ετερόζυγοι ή ομόζυγοι για C677T και διπλά ετεροζυγωτές,

MTHFR C677T -E: ετερόζυγοι για C677T και διπλά ετεροζυγωτές,

MTHFR C677T-0: ομόζυγοι για C677T,

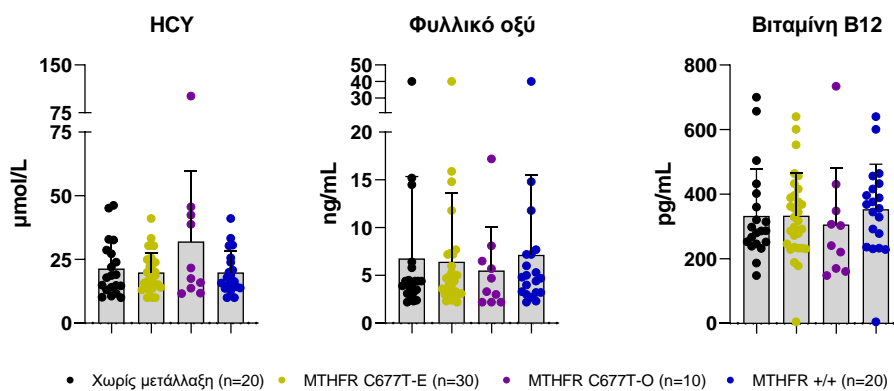
MTHFR+/: ετεροζυγωτές και για τις δύο μεταλλάξεις.



**Εικόνα 14:** Συσχέτιση όλων των βιοδεικτών της έρευνας με τα ομόζυγα, ετερόζυγα και διπλά ετερόζυγα άτομα καθώς και αυτά που δε φέρουν την μετάλλαξη MTHFR A1298. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζεται το MEAN +SD.

Στην παραπάνω εικόνα αναπαριστούνται τρία γραφήματα. Το κάθε γράφημα συσχετίζει τέσσερις κατηγορίες μεταξύ τους. Δηλαδή, στο πρώτο γράφημα συγκρίνονται τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης με τα άτομα που δεν φέρουν την μετάλλαξη, οποίοι είναι

είκοσι και με μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια, με πράσινο χρώμα είναι οι ασθενείς με την μετάλλαξη MTHFR A1298 και είναι μόνο οι ετεροζυγωτές και αποτελούν 30 άτομα απο την έρευνα. Με μώβ χρώμα είναι οι ομοζυγωτές με μετάλλαξη MTHFR A1298 και είναι μόνο 10 άτομα. Με μπλε χρώμα είναι οι διπλά ετεροζυγώτες οι οποίοι είναι είκοσι άτομα με τη μετάλλαξη MTHFR A1298. Στο δεύτερο και στο τρίτο γράφημα με το φυλλικό οξύ και την βιταμίνη B12 συμβαίνει ακριβώς η ίδια συσχέτιση. Ουσιαστικά αυτή η συσχέτιση αφορά τους ασθενείς μόνο με την μετάλλαξη MTHFR A1298 και την συσχέτιση τους μεμονωμένα με την ομοκυστεΐνη το φυλλικό και την βιταμίνη B12. Σε αυτή τη μαζική συσχέτιση λοιπόν δεν παρατηρείται στατιστική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών (Εικόνα 14).



**Εικόνα 15:** Συσχέτιση όλων των βιοδεικτών της έρευνας με τα ομόζυγα, ετερόζυγα και διπλά ετερόζυγα άτομα καθώς και αυτά που δε φέρουν την μετάλλαξη MTHFR C677T. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρουσιάζεται το MEAN +SD.

Στην παρούσα εικόνα παριστάνονται αντίστοιχα όλες οι κατηγορίες που συμμετείχαν στην έρευνα σχετικά με τη μετάλλαξη MTHFR C677T (30 ετεροζυγώτες, 20 διπλά ετεροζυγώτες και 10 ομοζυγώτες) καθώς και τους ασθενείς που δεν φέρουν την μετάλλαξη (20 άτομα). Ακολουθεί συσχέτιση των όλων των ασθενών που φέρουν την μετάλλαξη MTHFR C677T είτε ετεροζυγώτες είτε ομοζυγώτες είτε διπλά ετεροζυγώτες με την ομοκυστεΐνη βιταμίνη B12 και φυλλικό οξύ. Ομοίως, και σε αυτή τη μετάλλαξη MTHFR C677T σε κανέναν βιοδείκτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συστατικές συσχετίσεις σε καμία κατηγορία (Εικόνα 15).

#### Κεφάλαιο 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια των χρόνων έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες σχετικά με τις μεταλλάξεις MTHFR (C667T, A1298) και τη συσχέτισή τους με τα αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, τις συνεχόμενες αποβολές, τις καρδιαγγειακές αποβολές κ.ά.

Διάφορες έρευνες που είχαν θέμα την ομοκυστεΐνη αναφέρουν ότι όταν αυξάνεται περισσότερο από 5μmol/L είναι το ίδιο επικίνδυνη με μία αυξημένη χοληστερόλη άνω των 0,5μmol/L [82].

Άλλες έρευνες υποδεικνύουν ότι τα άτομα με τη θερμοδιαλυτή μετάλλαξη MTHFR επηρεάζουν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης και έχουν υψηλότερες απαιτήσεις σε φυλλικό οξύ και βιταμίνη B12 για τη πρόληψη της υπερομοκυστεϊναιμίας σε αυτά τα άτομα [81].

Πολλές μελέτες που είχαν θέμα τις συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης σε ασθενείς που κυοφορούν και έχουν μετάλλαξη MTHFR επιβεβαιώνουν μέσω της έρευνας που πραγματοποίησαν ότι τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης μειώνονται με τη κατάλληλη δοσολογία φυλλικού οξέος(5mg/ημέρα) και βιταμίνης B12(1mg/ημέρα) σε συνδυασμό με βιταμίνη B6 [75].

Λόγου ότι οι απόψεις δίστανται υπάρχουν και μελέτες που επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι σχετικά με τη μετάλλαξη MTHFR και την ομοκυστεΐνη δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ τους [83,84].

Η μελέτη μας δεν έδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ βιταμίνης B12, φυλλικού οξέος, του γονότυπου MTHFR και τα επίπεδα ομοκυστεΐνης. Παρά μόνο στη σύγκριση του φυλλικού οξέος και της βιταμίνης B12 (Εικόνα 9), στα κάτω δύο πρώτα διαγράμματα προέκυψαν αρνητικές στατιστικές συσχετίσεις. Η παρούσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς οι οποίοι μπορεί να ευθύνονται για το αποτέλεσμα της έρευνας.

Πρώτον, ο αριθμός των ασθενών που αξιολογήθηκε είναι περιορισμένος, θα μπορούσε να υπάρξει πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα εάν υπήρχε αξιολόγηση για μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι το πλάσμα των ασθενών μπορεί να μην ήταν επαρκές.

Γενικότερα είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι παρόλου που η συμπληρωματική χορήγηση της βιταμίνης B12 και φυλλικού οξέος στις μέρες μας έχει χαμηλό κόστος και δεν προκαλεί σοβαρές παρενέργειες, οι γιατροί θα πρέπει να πειστούν για την αιτιολόγηση μίας μακροχρόνιας χρήσης συμπληρωμάτων.



## 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Καταγράφηκαν διάφορα περιστατικά αντρών και γυναικών με ηλικίες που ποικίλαν από 17-79. Κάποιοι από αυτούς είχαν παθολογικές τιμές της ομοκυστεΐνης και άλλοι φυσιολογικές. Συνολικά συμμετείχαν 80 άτομα από τους οποίους οι 60 είχαν τη μετάλλαξη MTHFR (C677T ή A1298C) και ήταν ομόζυγοι ή ετερόζυγοι ή διπλά ετεροζυγώτες και οι 20 ήταν φυσιολογικοί και δεν είχαν τη μετάλλαξη.

Από το υπολειπόμενο πλάσμα μετρήθηκαν τα επίπεδα B12 και φολικού οξέος οι οποίες ήταν φυσιολογικές, με σκοπό να συσχετιστούν οι τιμές μεταξύ τους. Οι πιο σημαντικές συσχετίσεις που προέκυψε κάποιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα είναι:

- α) στο παραπάνω διάγραμμα 9 από την συσχέτιση μεταξύ της ομοκυστεΐνης και του φολικού οξέος σε ασθενείς με μετάλλαξη προκύπτει αρνητική στατιστική συσχέτιση ( $P$  value=0,04 Spearman  $r=0,54$ ),
- β) στο ίδιο διάγραμμα από την συσχέτιση μεταξύ της ομοκυστεΐνης και της βιταμίνης B12 σε ασθενείς με μετάλλαξη προκύπτει σημαντική στατιστική αρνητική συσχέτιση ( $P$  value=0,01 Spearman  $r=0,62$ ).

Στην συνέχεια ακολούθησαν και άλλες συγκρίσεις που δεν έδειξαν καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση και είναι οι εξής:

- συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων B12, φολικού και ομοκυστεΐνης σε ασθενείς με τις δύο μεταλλάξεις MTHFR (C677T, A1298C),
- σύγκριση των παραπάνω παραμέτρων μεμονωμένα για τους ασθενείς που φέρουν τις μεταλλάξεις MTHFR (C677T, A1298C), για τους ασθενείς που φέρουν μόνο την C677T και για τα άτομα που φέρουν μόνο την A1298C, οι οποίοι είναι ετεροζυγώτες, ομοζυγώτες ή διπλά ετεροζυγώτες, συμπεριλαμβανομένων και των ατόμων που δεν φέρουν την μετάλλαξη,
- τέλος, γίνεται μία μαζική σύγκριση όλων των παραμέτρων της έρευνας σε αυτούς με την μετάλλαξη C677T και μεμονωμένα σε αυτούς που φέρουν την μετάλλαξη A1298C συμπεριλαμβανομένων και των ατόμων που δεν φέρουν την μετάλλαξη.

Βάση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την μελέτη που ολοκληρώθηκε δεν μπορούμε μετά βεβαιότητας να συμπεράνουμε ότι άτομα με παθολογική ομοκυστεΐνη συσχετίζονται με τα επίπεδα της B12 και φολικού οξέος στα άτομα με γονότυπο MTHFR. Σύμφωνα με τις συσχετίσεις της έρευνάς μας συμπεραίνουμε ότι άτομα με τη μετάλλαξη

MTHFR (C667T,A1298) είτε ετερόζυγοι είτε ομόζυγοι είτε διπλά ετερόζυγοι δεν φέρουν καμία σημαντική συσχέτιση.

Μόνο στην συσχέτιση φολικού οξέος, βιταμίνης B12 και ομοκυστεΐνης σε ασθενείς με μετάλλαξη παρατηρείται και από το  $p$  value ότι υπάρχει σημαντική αρνητική συσχέτιση (Εικόνα 9).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Τα συμπεράσματα είναι υποκειμενικά και βασίζομαστε σε ποσοστά. Επίσης βρέθηκαν άτομα με φυσιολογικό γονότυπο να έχουν αυξημένη ομοκυστεΐνη και καθ' εξιν αποβολές, θρομβώσεις, πνευμονικές εμβολές κπλ. Η μελέτη λόγω του μικρού δείγματος πληθυσμού πιθανότατα δεν είχε κάποιο σίγουρο αποτέλεσμα ή τα δείγματα των ασθενών που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις των παραμέτρων να μην ήταν επαρκείς.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Austin K. Steven. Haemostasis. *Medicine*, 2017;45(4):204-208.
2. Hinsbergh W.M. Victor. The endothelium: Vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001;95(2):198-201.
3. Sira J, Eyre L. Physiology of hemostasis. *Anaesth Int Care Med*, 2016;17(2):79-82.
4. Jobling L, Lorna E. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesth Int Care Med*, 2013;14(2):51-53.
5. Mathias M, Liesner R. Understanding haemostasis. *Paediatrics and Child Health*, 2007;17(8):317-321.
6. Clemetson K J. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*, 2012;129(3):220-4.
7. Austin SK. Haemostasis. *Medicine*, 2017;45(4):204-208.
8. Allford L, Sarah, Maclin SJ. Haemostasis. *Medicine*, 2004;32(5):11-14
9. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet*, 2000(5)6;355(9215):1627-32
10. Bächli E. History of tissue factor. *Br J Haematol* 2000; 110:248.
11. Rijken D.C, Lijnen H.R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*, 2009;7(1):4-13.
12. Kamath S, Lip GY. Fibrinogen, biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 2003; 96(10):711-729.
13. N. S. Key and N. MacKman. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 36, no. 8, pp. 865–875, 2010
14. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet*. 1987 May. 13(3):285-92.
15. Huang JN, Koerper MA (Nov 2008). "Factor V deficiency: a concise review". *Haemophilia*14 (6): 1164–1169. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01785.x. PMID 19141156.
16. Antonarakis SE (July 1995). "Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A". *Thromb. Haemost.* 74 (1): 322–8. PMID 8578479.
17. Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW (Jun 1978). "Activation of human factor IX (Christmas factor)". *The Journal of Clinical Investigation* 61 (6): 1528–38.doi:10.1172/JCI109073. PMC 372679. PMID 659613.
18. Stavrou E, Schmaier AH (Mar 2010). "Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis".*Thrombosis Research* 125 (3): 210–5.
19. Linjen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann NY Acad Sci*, 2001;936:226-36.

20. Garypidou V., Vakalopoulou S. Inherited Thrombophilia. Classification Epidemiology-Pathophysiology. The Journal of the Hellenic Society of Hematology. 2014; 5(1):1-13.
21. Schulze, H., Shivdasani, R.A.(2005) Mechanisms of thrombopoiesis. J Thromb Haemost 3:1717-1724. Furie, B., Furie, B.C. (2008) Mechanisms of Thrombus Formation. N Engl J Med 359:938-949.
22. Kyrle, P. A., Mannhalter, C., Béguin, S., Stümpflen, A., Hirschl, M., Weltermann, A., Stain, M., Brenner, B., Speiser, W., Pabinger, I., Lechner, K., & Eichinger, S. (1998). Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 18(8), 1287–1291..
23. Patnaik M.M. and Moll S. Inherited antithrombin deficiency a review.
24. Silver, R. M., Zhao, Y., Spong, C. Y., Sibai, B., Wendel, G., Jr, Wenstrom, K., Samuels, P., Caritis, S. N., Sorokin, Y., Miodovnik, M., O’Sullivan, M. J., Conway, D., Wapner, R. J., & Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units (NICHD MFMU) Network. (2010). Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. Obstetrics and Gynecology, 115(1), 14–20.
25. Goldenberg A.N. and Manco-Johnson J.M. Protein C deficiency. Haemophilia 2008;14:1214-1221
26. M.K.Ten Katen and J.Van Der Meer. Protein S deficiency: a clinical perspective. Haemophilia 2008;14:1222-1228
27. Khan S. and Dickerman D.J. Hereditary thrombophilia. Thrombosis Journal 2006;4(15):1-17.
28. Dessì, M., Di Giovamberardino, G., Pieri, M., Noce, A., Zenobi, R., Di Daniele, N., & Pastore, A. (2015). Influence of dialysis techniques and alternate vitamin supplementation on homocysteine levels in patients with known MTHFR genotypes. Clinical and Experimental Nephrology, 19(1), 140–145.
29. Martinelli I. et al. Interaction Between the G20210A Mutation of the Prothrombin Gene and Oral Contraceptive Use in Deep Vein Thrombosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1999;19:700-703
30. Jadaon M.M. Epidemiology of Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden Mutation in the Mediterranean Region. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases 2011;3.
31. Loertscher R, Lavery P. The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation. Transpl Immunol. 2002 May;9(2-4):93-6. doi: 10.1016/s0966-3274(02)00013-8. PMID: 12180852.

32. Ferreira E, Bettencourt PM, Moura LM. Valvular lesions in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: an old disease but a persistent challenge. *Rev Port Cardiol.* 2012;31:295-299.
33. James H.A. Pregnancy-associated thrombosis. *American Society of Hematology, Education Book 2009*:277-285.
34. Robertson L. et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British Journal of Haematology*;132:171-196.
35. Bates M.S. et al. VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis. The 9th ACCP Conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2012;141:e691S-e736S.
36. Rodger M. Evidence Base for the Management of Venous Thromboembolism in Pregnancy. *American Society of Hematology 2010*:173-180.
37. Bates M.S. Consultative Hematology: The Pregnant Patient Pregnancy Loss. *American Society of Hematology, Education Book 2010*:166-172.
38. Whitlock, R. P., Sun, J. C., Frenes, S. E., Rubens, F. D., & Teoh, K. H. (2012). Antithrombotic and thrombolytic therapy for valvular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 141(2 Suppl), e576S-e600S.
39. THROMBOPHILIA-HOW FAR AND HOW MUCH TO INVESTIGATE?, L.R.C.Reddy, R.P.Nihar, G.V.Apraveen and M.Sandeep, *Indian J.Syrp.*2012 Apr;74(2):157-162.
40. Esmon T.C. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Reviews* 2009;23:225-229.
41. Delluc, A., Lacut, K., & Rodger, M. A. (2020). Arterial and venous thrombosis: What's the link? A narrative review. *Thrombosis Research*, 191, 97–102.
42. Campello, E., Spiezia, L., Adamo, A., & Simioni, P. (2019). Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Review of Hematology*, 12(3), 147–158.
43. Moll, S., & Varga, E. A. (2015). Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation*, 132(1).
44. Liew, S.-C., & Gupta, E. D. (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated.
45. Sukla, K. K., & Raman, R. (2012). Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 111–118.
46. Dedoussis V.G. et al. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA study. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004;80:849-854.

47. Chawla, J., & Kvarnberg, D. (2014). Hydrosoluble vitamins. *Handbook of Clinical Neurology*, 120, 891–914.
48. Hasbaoui, B. E., Mebrouk, N., Saghir, S., Yajouri, A. E., Abilkassem, R., & Agadr, A. (2021). Vitamin B12 deficiency: case report and review of literature. *The Pan African Medical Journal*, 38, 237.
49. Buesing, S., Costa, M., Schilling, J. M., & Moeller-Bertram, T. (2019). Vitamin B12 as a treatment for pain. *Pain Physician*, 22(1), E45–E52.
50. Dharmarajan T.S., Norkuw E.P.: Approaches to vitamin B]2 deficiency. Early treatment may prevent devastating complications. *Postgraduate Medicine*, Volume 110, Issue 1, Pages 99-105, July 2001.
51. About folic acid. (n.d.). Nhs.uk. Retrieved December 31, 2022, from <https://www.nhs.uk/medicines/folic-acid/about-folic-acid/>
52. Scaglione, F., & Panzavolta, G. (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 44(5), 480–488.
53. Sijilmassi, O. (2019). Folic acid deficiency and vision: a review. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 257(8), 1573–1580.
54. Lewis, C.-A., de Jersey, S., Seymour, M., Hopkins, G., Hickman, I., & Osland, E. (2020). Iron, vitamin B12, folate and copper deficiency after bariatric surgery and the impact on anaemia: A systematic review. *Obesity Surgery*, 30(11), 4542–4591.
55. Nadir, Y., Hoffman, R., & Brenner, B. (2007). Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Annals of Hematology*, 86(1), 35–40.
56. Sukla, K. K., & Raman, R. (2012). Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 111–118.
57. Lindsay H. Allen, Vitamin B-12, *Advances in Nutrition*, Volume 3, Issue 1, January 2012, Pages 54–55
58. Allen, L. H. (2009). How common is vitamin B-12 deficiency? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(2), 693S-6S.
59. Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2019). Bioactive peptides from selected Latin American food crops – A nutraceutical and molecular approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1949–1975.
60. van den Driessche, J. J., Plat, J., & Mensink, R. P. (2018). Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human intervention trials. *Food & Function*, 9(4), 1944–1966.
61. Robert, C., & Brown, D. L. (2003). Vitamin B12 Deficiency. *American Family Physician*, 67(5), 979–986.

62. Smith, A. D., Warren, M. J., & Refsum, H. (2018). Vitamin B12. *Advances in Food and Nutrition Research*, 83, 215–279.
63. Pennypacker, L. C., Allen, R. H., Kelly, J. P., Matthews, L. M., Grigsby, J., Kaye, K., Lindenbaum, J., & Stabler, S. P. (1992). High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *Journal of the American Geriatrics Society*, 40(12), 1197–1204.
64. CDC. (2022, July 13). General information about NTDs, folic acid, and folate. Centers for Disease Control and Prevention.
65. Shulpekova, Y., Nechaev, V., Kardasheva, S., Sedova, A., Kurbatova, A., Bueverova, E., Kopylov, A., Malsagova, K., Dlamini, J. C., & Ivashkin, V. (2021). The concept of folic acid in health and disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12), 3731.
66. Czeizel, A. E., Dudás, I., Vereczkey, A., & Bánhidy, F. (2013). Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients*, 5(11), 4760–4775.
67. Zittan, E., Preis, M., Asmir, I., Cassel, A., Lindenfeld, N., Alroy, S., Halon, D. A., Lewis, B. S., Shiran, A., Schliamser, J. E., & Flugelman, M. Y. (2007). High frequency of vitamin B12 deficiency in asymptomatic individuals homozygous to MTHFR C677T mutation is associated with endothelial dysfunction and homocysteinemia. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H860-5.
68. Pastore, A., De Angelis, S., Casciani, S., Ruggia, R., Di Giovamberardino, G., Noce, A., Splendiani, G., Cortese, C., Federici, G., & Dessì, M. (2006). Effects of folic acid before and after vitamin B12 on plasma homocysteine concentrations in hemodialysis patients with known MTHFR genotypes. *Clinical Chemistry*, 52(1), 145–148.
69. Ozarda, Y., Sucu, D. K., Hizli, B., & Aslan, D. (2009). Rate of T alleles and TT genotype at MTHFR 677C->T locus or C alleles and CC genotype at MTHFR 1298A->C locus among healthy subjects in Turkey: impact on homocysteine and folic acid status and reference intervals. *Cell Biochemistry and Function*, 27(8), 568–577.
70. Cortese, C., & Motti, C. (2001). MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition*, 4(2B), 493–497.
71. Rainero, I., Vacca, A., Roveta, F., Govone, F., Gai, A., & Rubino, E. (2019). Targeting MTHFR for the treatment of migraines. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(1), 29–37.
72. Dell'edera, D., Tinelli, A., Milazzo, G. N., Malvasi, A., Domenico, C., Pacella, E., Pierluigi, C., Giuseppe, T., Marcello, G., Francesco, L., & Epifania, A. A. (2013). Effect of multivitamins on plasma homocysteine in patients with the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygous state. *Molecular Medicine Reports*, 8(2), 609–612.
73. Qin, X., Spence, J. D., Li, J., Zhang, Y., Li, Y., Sun, N., Liang, M., Song, Y., Zhang, Y., Wang, B., Cheng, X., Zhao, L., Wang, X., Xu, X., & Huo, Y. (2020). Interaction of serum

- vitamin B12 and folate with MTHFR genotypes on risk of ischemic stroke. *Neurology*, 94(11), e1126–e1136.
74. Román, G., Mancera-Páez, O., & Bernal, C. (2019). Epigenetic factors in late-onset Alzheimer's disease: MTHFR and CTH gene polymorphisms, metabolic transsulfuration and methylation pathways, and B vitamins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 319.
  75. Serapinas, D., Boreikaite, E., Bartkeviciute, A., Bandzeviciene, R., Silkunas, M., & Bartkeviciene, D. (2017). The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 72, 159–163.
  76. Bjelland, I., Tell, G. S., Vollset, S. E., Refsum, H., & Ueland, P. M. (2003). Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study: The Hordaland Homocysteine Study. *Archives of General Psychiatry*, 60(6), 618–626.
  77. Shivkar, R. R., Gawade, G. C., Padwal, M. K., Diwan, A. G., Mahajan, S. A., & Kadam, C. Y. (2022). Association of MTHFR C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) polymorphisms with serum homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with young coronary artery disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 37(2), 224–231.
  78. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/kallikrein>.
  79. [http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/High molecular weight kininogen](http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/High+molecular+weight+kininogen).
  80. Födinger, M., Hörl, W. H., & Sunder-Plassmann, G. (2000). Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Journal of Nephrology*, 13(1), 20–33.
  81. Jacques, P. F., Bostom, A. G., Williams, R. R., Ellison, R. C., Eckfeldt, J. H., Rosenberg, I. H., Selhub, J., & Rozen, R. (1996). Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 93(1), 7–9.
  82. McCully, K. S. (2019). Chemical pathology of homocysteine VII. Cholesterol, thioretinaco ozonide, mitochondrial dysfunction, and prevention of mortality. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 49(4), 425–438.
  83. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93:7–9.
  84. . Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J (1996) Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate Ann Hematol (2007) 86:35–40 39 reductase and myocardial infarction. A case–control study. *Circulation* 94:1812–1814.