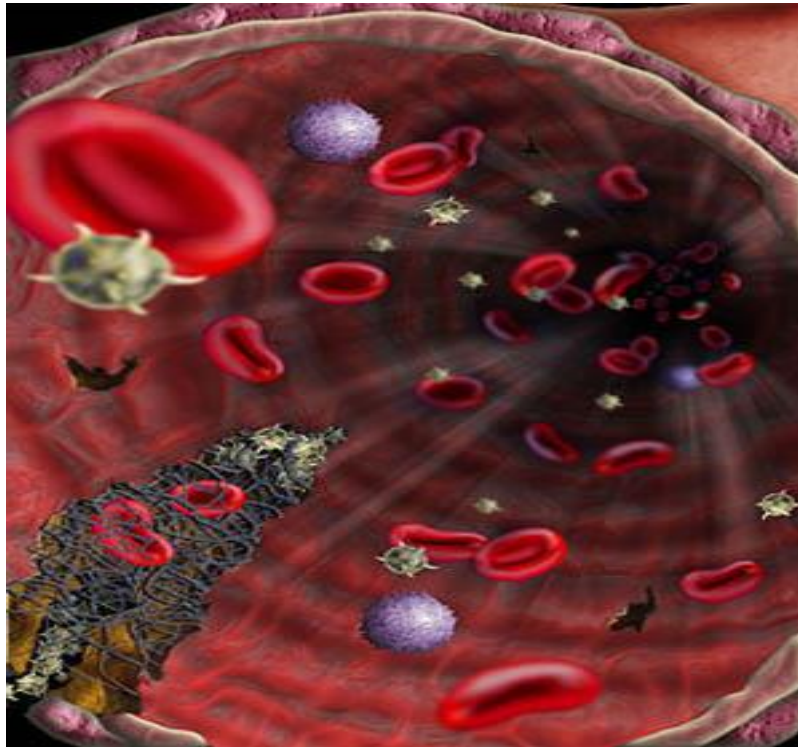


## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διαταραχές αιμόστασης σε ασθενείς με πρόσφατη κεντρική θρόμβωση



ΌΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: Ζερβάκη Μαρία

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 19678074

ΌΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ: Παύλου Ευθυμία

ΑΘΗΝΑ 2023

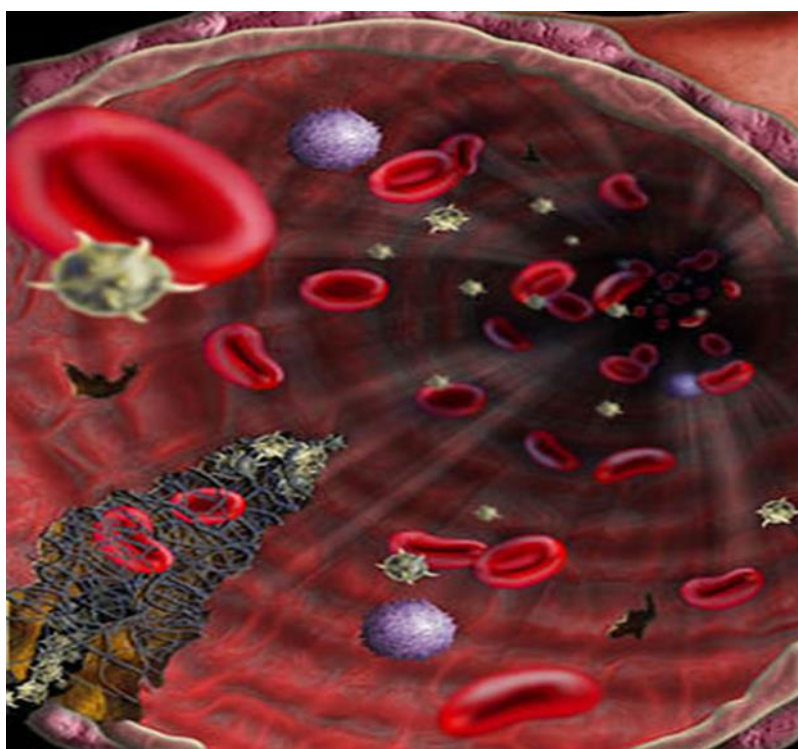


Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences



## GRADUATE THESIS

**Disorders of Hemostasis in patients with recent central thrombosis**



NAME OF STUDENT: Zervaki Maria

REGISTRATION NUMBER: 19678074

NAME OF THE SUPERVISOR: Pavlou Efthymia

ATHENS 2023



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



### Διαταραχές αιμόστασης σε ασθενείς με πρόσφατη κεντρική θρόμβωση

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/Α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΠΑΥΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ	
2	ΜΠΙΡΤΣΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	
3	ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	

### **Δήλωση συγγραφέα διπλωματικής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΖΕΡΒΑΚΗ ΜΑΡΙΑ του ΓΕΩΡΓΙΟΥ, με αριθμό μητρώου 19678074, φοιτήτρια της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία έλαβα για την ολοκλήρωσή της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, όσες πηγές χρησιμοποιήθηκαν, ιδέες ή λέξεις, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με εκτενή αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επιπλέον, βεβαιώνω πως αυτή η εργασία αποτελεί αποκλειστικά δική μου συγγραφή και είναι προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Τυχόν παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ζερβάκη Μαρία



## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου εργασία “Διαταραχές αιμόστασης σε ασθενείς με πρόσφατη κεντρική θρόμβωση”, η οποία διενεργήθηκε στο τμήμα Αιμοδοσίας και Αιμορροφιλικών ασθενών στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την επιβλέπουσα μου κ. Ευθυμία Παύλου, Προϊσταμένη του Παραϊατρικού Τμήματος του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειου, η οποία ήταν και η εισηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, για την πολύτιμη βοήθεια της, την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου παρείχε στη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τα κορίτσια του εργαστηρίου της αιμόστασης του Ιπποκράτειου, την Αρετή, τη Μαρία και τη Σταυρούλα για τις πολύ χρήσιμες πληροφορίες που μου παρείχαν και για τη προθυμία τους να με βοηθήσουν σε ό,τι χρειαζόμουν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω επίσης στον κ. Σωτήριο Φόρτη, για τη βοήθεια του στις στατιστικές αναλύσεις και για το χρόνο που αφιέρωσε για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, αλλά και στον κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο και κ. Μπίρτσα Βασίλειο, για τις γνώσεις που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Δελικούρα Ειρήνη, υπεύθυνη της βιβλιοθήκης του Γ.Ν.Α. ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ, για το χρόνο που αφιέρωσε αναζητώντας πληροφορίες για τη βιβλιογραφία της πτυχιακής μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, για τη στήριξη, την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και την υπομονή που υπέδειξε σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

## Περίληψη

Το σύστημα της αιμόστασης είναι μια πολύπλοκη δομή που περιλαμβάνει το σύστημα ινωδόλυσης, πηκτικά και αντιπηκτικά μέρη. Το σύστημα αυτό αποτελείται από αιμοπετάλια καθώς και από την ενδογενή και εξωγενή οδό. Αιμόσταση επομένως καλείται η διαδικασία σχηματισμού θρόμβων αίματος στο σημείο του αγγείου όπου επέρχεται ο τραυματισμός . Οι διαταραχές του μηχανισμού της αιμόστασης εκδηλώνονται ως αιμορραγική ή ως θρομβοφιλική (θρομβωτική) διάθεση. Σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της, έχουν τα αιμοπετάλια, το αγγειακό ενδοθήλιο, οι παράγοντες πήξης, οι αναστολείς, η ινωδόλυση, και τα λευκά-ερυθρά αιμοσφαίρια. Όταν παρατηρηθεί κάποια ανωμαλία στην κυκλοφορία του αίματος ή πιθανή βλάβη σε ένα αγγείο, τότε ενεργοποιούνται οι παραπάνω παράγοντες δημιουργώντας το θρόμβο.

Βλάβη στο τοίχωμα των αγγείων του αίματος, στάση της ροής του αίματος και αλλαγές στην πήξη του αίματος, μπορούν να περιγράψουν την παθοφυσιολογία της θρόμβωσης. Καταστάσεις που προδιαθέτουν για τη φλεβική ή αρτηριακή θρόμβωση που προκαλείται από διαταραχές των παραγόντων της αιμόστασης , καλείται θρομβοφιλία. Ορισμένες παθολογικές καταστάσεις περιλαμβάνονται στη θρομβοφιλία σε αντίθεση με την υπερπηκτικότητα όπου η πήξη είναι μια φυσιολογική διαδικασία. Η θρομβοφιλία μπορεί να είναι επίκτητη ή κληρονομική ασθένεια ή συνδυασμός και των δύο. Είναι η τάση ορισμένων ατόμων να εμφανίζουν επαναλαμβανόμενη και υποτροπιάζουσα αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση. Στη θρομβοφιλία το αίμα πήζει. Η κλινική αξιολόγηση της θρομβοφιλίας βασίζεται στο οικογενειακό και προσωπικό ιστορικό, την εργαστηριακή διάγνωση και την κλινική εξέταση. Η πιο κοινή κληρονομική μορφή θρομβοφιλίας είναι η θρομβοφιλία του παράγοντα FV LEIDEN.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας, αφορά το μηχανισμό με τον οποίο διαταράσσεται το σύστημα της αιμόστασης και τις αλλαγές που μπορεί να επιφέρει σε αυτό, ένας ασθενής που παρουσιάζει θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) ή και αποβολές όσον αφορά το γυναικείο φύλο.

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 120 ασθενείς, οι οποίοι φέρουν μοριακές μεταλλάξεις με κυριότερο το PAI, FV LEIDEN, FIIG20210A και MTHFR (C677T, A1298C) στους οποίους μετρήθηκαν βασικές πρωτεΐνες όπως η PrC και PrS, η αντιθρομβίνη (ATIIIc), η APC-R, και η δοκιμασία προ συμπτωματικού ελέγχου ή αλλιώς Screening Test, ώστε να εκτιμηθούν τα επίπεδα των εξετάσεων αυτών και να δικαιολογήσουν τη δημιουργία του θρόμβου. Οι ασθενείς καταγράφηκαν σε φύλλο Excel, όπου σε αυτό συμπεριλήφθηκε η ηλικία, το φύλο, ο κωδικός και η ημερομηνία που έγινε η εξέταση. Έπειτα ακολούθησε στατιστική ανάλυση, όπου πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της κάθε πάθησης που παρουσίαζε ο κάθε ασθενής, με τα αποτελέσματα των εξετάσεων που διενεργήθηκαν.

Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν έδειξαν κάποια σημαντική στατιστική συσχέτιση, χωρίς όμως το γεγονός αυτό να μπορεί να υποστηριχτεί με σιγουριά, καθώς

υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη δημιουργία θρόμβωσης.

Λέξεις κλειδιά : Αιμόσταση, θρομβοφιλία, θρόμβωση, πήξη αίματος, FV LEIDEN

## Abstract

The hemostasis system is a complex structure that includes the fibrinolysis system, coagulation and anticoagulation parts. This system consists of platelets and endogenous and external hemostasis pathways. Hemostasis is called the process of blood clot formation at the site of vessel injury. Disorders of hemostasis mechanism are manifested as hemorrhagic or thrombophilic (thrombotic) disposition. Platelets, vascular endothelium, coagulation factors, inhibitors, fibrinolysis, white-blood cells, are very important in its mechanism. When an abnormality in blood circulation or a vascular damage is observed, then the factors are activated and create a clot.

Damage to the blood vessel wall, stasis of blood flow, alternations in blood coagulability, could describe the pathophysiology of thrombosis. Some conditions predisposing to the venous or arterial thrombosis induced by impairing haemostasis's factors, are called thrombophilia. Thrombophilia includes some pathologic process, in contrast with hypercoagulability where coagulation is a physiology process. Thrombophilia can be an acquired or inherited disease or a combination of those two. Thrombophilia is the tendency of some people to show up repeated and recurrent arterial or venous thrombosis. The blood in thrombophilia clot. The clinical evaluation of thrombophilia is based on family and personal history, basic laboratory diagnostics and clinical examination. The most common inherited form of thrombophilia is thrombophilia Factor V LEIDEN.

The purpose of this work is related to, how hemostasis system can be disturbed, and what changes can be created in it, by a patient with thrombosis, pulmonary embolism, stroke, or miscarriages in women.

The present study included 120 patients carrying molecular mutations mainly PAI, FV LEIDEN, FIIG202I 0A, and MTHFR (C677T, A1298C) , where proteins such us PrC, PrS, antithrombin ATIIIc, APC-R and Screening TEST, were measured, in order to evaluate the results of these tests, and to justify the creation of a clot. Patients were recorded in an Excel spreadsheet, where their age, sex, code and date of examination were included. This was followed by a statistical analysis, where a comparison was made, between each condition presented by each patient, with the results of the examinations.

The results of the research didn't show any significant statistical correlation, but this fact cannot be supported with certainty, as there are other factors that can affect the formation of thrombus.

Keywords: Hemostasis, thrombophilia, thrombosis, coagulate blood, FV LEIDEN



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	6
Abstract.....	8
Κατάλογος Εικόνων.....	13
Συνομογραφίες .....	15
Abreviations.....	16
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	17
1. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ .....	17
1.1 ΓΕΝΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ.....	17
1.2 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ.....	17
1.3 ΑΓΓΕΙΟΣΥΣΠΑΣΗ .....	18
1.4 ΠΗΞΗ.....	19
1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ .....	20
1.6 ΙΝΩΔΟΛΥΣΗ.....	21
2. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ .....	22
2.1 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ .....	22
2.2 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ .....	22
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΥ.....	23
3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V .....	23
3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII.....	23
3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ IX .....	24
3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ XI-XII .....	24
3.5 ΗΜWK ή ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ.....	25
4. ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ-ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ .....	25
4.1 Εισαγωγή .....	25
4.2 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΗΞΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΦΥΣΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ .....	26
4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ FV LEIDEN .....	27
4.4 Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ.....	27
4.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ C .....	27
4.6 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ S .....	28
4.7 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗΣ.....	28

4.8	ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HAGEMAN (XII)	28
4.9	ΤΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ G20210A	29
4.10	ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ APC-R (ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ)	29
4.11	ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ 1 (PAI-1)	29
4.12	ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗ Ia (GPIa)	30
5.	ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ	30
5.1	ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	30
5.2	ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	30
5.3	ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	31
5.4	ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ	31
5.7	ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ	32
5.8	ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ	32
5.9	ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ	33
6.	ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ	34
6.1	ΟΡΙΣΜΟΣ	34
6.2	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ (ΑΕΕ)	34
6.3	ΑΙΤΙΑ ΑΕΕ	35
7.	ΜΤΗFR	35
7.1	Ορισμός	35
7.2	Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΤΗFR	36
7.3	Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΜΤΗFR ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ	36
8.	ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ	36
8.1	ΟΡΙΣΜΟΣ	36
8.2	ΥΠΕΡΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΑΙΜΙΑ	37
8.3	ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΥΠΕΡΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΑΙΜΙΑ	37
	Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και Υλικά	38
1.	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ	38
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	38
2.1	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	38
2.2	ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΘΟΔΩΝ	39
3.	ΜΤΗFR	39
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
3.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΤΗFR	39

3.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA .....	39
3.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	40
4. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ (SCREENING TEST) .....	40
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	40
4.2 ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ (PT) .....	41
4.3 ΧΡΟΝΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΡΙΚΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΛΑΣΤΙΝΗΣ (ΑΡΤΤ) .....	42
4.4 ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ.....	42
4.4 Δ-ΔΙΜΕΡΗ (D-DIMER).....	44
5. ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΤΟΥ ΛΥΚΟΥ (LLA) .....	45
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	45
5.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	45
5.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	46
5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	46
6. ΠΡΩΤΕΙΝΗ S (PrS) .....	46
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	46
6.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	46
6.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	47
6.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	47
7. ΠΡΩΤΕΙΝΗ S Ag FREE (PrSAgFree) .....	47
7.1 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	47
7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	48
7.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	48
8. ΠΡΩΤΕΙΝΗ C (PrC).....	48
8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	48
8.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	48
8.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	49
8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	49
9. ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟ .....	49
9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	49
9.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	50
9.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	50
9.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	50
10. ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ (ΑΤΙΙΙ) .....	51

10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	51
10.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	51
10.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	51
10.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	52
11. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ .....	52
11.1 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	52
11.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	53
12. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ .....	53
12.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	53
12.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	53
12.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	53
12.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	54
13. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ β2-ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Ι.....	54
13.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	54
13.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	54
13.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	55
13.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	55
14. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΡΑΙ.....	55
14.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	55
14.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....	55
14.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	56
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα .....	56
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ .....	56
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση .....	65
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

## Κατάλογος Εικόνων

**Εικόνα 1:** Ο ρόλος των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση τους διαδέχεται διάφορα στάδια ξεκινώντας από τη προσκόλληση στην ενδοθηλιακή μήτρα η οποία καταλήγει σε σταθερή προσκόλληση, τα αιμοπετάλια ισοπεδώνονται και έτσι καταλήγουν σε ενδοαιμοπεταλιακή μεταγωγή σήματος. Στη περιοχή όπου το αγγείο τραυματίζεται τα αιμοπετάλια δημιουργούν ένα πυρήνα πλούσιο σε ινώδες, ενώ τα πιο χαλαρά αιμοπετάλια στο κέλυφος του θρόμβου περιβάλλουν τον πυρήνα. (Ανατύπωση από (3)).....18

**Εικόνα 2:** Ο καταρράκτης της πήξης. Ο καταρράκτης αυτός υποδεικνύει πως η πήξη μπορεί να περιγράφεται με δύο οδούς, την ενδογενή και την εξωγενή οδό. Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται αφού γίνει η έκθεση του ιστικού παράγοντα στο πλάσμα και έτσι σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα VII (FVIIa). Από την άλλη η ενδογενής οδός ενεργοποιείται όταν το πλάσμα έρθει σε επαφή με αρνητικές επιφάνειες, Αυτές οι οδοί τελικά καταλήγουν σε μία κοινή οδό η οποία δημιουργεί τη θρομβίνη και σχηματίζει θρόμβο ινικής με διασταυρούμενη σύνδεση. (Ανατύπωση από (11)) .....20

**Εικόνα 3:** Ινωδόλυση. Το τελευταίο στάδιο της αιμόστασης. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει κυρίως το πλασμινογόνο, το οποίο από ανενεργό προ ένζυμο μπορεί να μετατραπεί σε πλασμίνη, που θεωρείται η ενεργή μορφή και η οποία μπορεί να διασπά το ινώδες. Το πλασμινογόνο ενεργοποιείται από πλασματικούς ενεργοποιητές, τον ενεργοποιητή τύπου ουρακινάσης (uPA) και τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) (15). (Ανατύπωση από <http://www.rarecoagulationdisorders.org/diseases/plasminogen-deficiency/disease-overview>) .....22

**Εικόνα 4:** Η τριάδα του Virchow. Η τριάδα αυτή αναφέρεται σε 3 σημαντικές επιρροές που συμβάλλουν στο σχηματισμό θρόμβου και αφορά: 1) την κάκωση ενδοθηλίου, 2) τη μη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος και 3) την υπερπηκτικότητα του αίματος (Ανατύπωση από <https://www.medicinehack.com/2011/07/virchows-triad.html>) .....26

**Εικόνα 5:** Εν τω βάθη φλεβική θρόμβωση (DVT). Εν τω βάθη φλεβική θρόμβωση καλείται ένας θρόμβος αίματος που μπορεί να δημιουργηθεί μέσα στις βαθιές φλέβες κυρίως του ποδιού αλλά και στα χέρια καθώς και στη μεσεντέρια και εγκεφαλική φλέβα. Είναι μέρος των διαταραχών των φλεβικών θρομβοεμβολών και αποτελεί την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από τις καρδιαγγειακές νόσους. (Ανατύπωση από <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/20301>)...33

<b>Εικόνα 6:</b> Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που έπασχαν από κάποιου είδους θρόμβωση.....	57
<b>Εικόνα 7:</b> Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που προσήλθαν προληπτικά.....	58
<b>Εικόνα 8:</b> Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που έπασχαν από ΑΕΕ.....	59
<b>Εικόνα 9:</b> Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων στον πληθυσμό των γυναικών που εμφάνισαν αποβολές. ....	60
<b>Εικόνα 10:</b> Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις Ομάδες των παθήσεων Α και Β, με τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, της PrSAgFree, της PrC και των D-διμερή.....	61
<b>Εικόνα 11:</b> Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες Α και Γ των παθήσεων, με τα επίπεδα του ινωδογόνου, των αντισωμάτων κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, της ομοκυστεΐνης και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου PAI.....	62
<b>Εικόνα 12:</b> Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Β και Γ όσον αφορά την εξέταση PAI πλάσματος .....	63
<b>Εικόνα 13:</b> Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Β και Δ, με τα επίπεδα του PT, των D-Dimers και της ομοκυστεΐνης.....	63
<b>Εικόνα 14:</b> Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Γ και Δ, με τα επίπεδα των αντισωμάτων IgM κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, με τα αντισώματα IgM κατά της καρδιολιπίνης και τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης. ....	64

## Συντομογραφίες Ελληνική ορολογία

- ADP: Αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ
- APTT: Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
- ATIII: Αντιθρομβίνη
- dNTPs: τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
- DVT: Εν τω βάθη φλεβική θρόμβωση
- GPIa: Γλυκοπρωτεΐνη Ia
- HMWK: Κινηνογόνο υψηλού μοριακού βάρους
- LA: Αντιπηκτικά του λύκου
- LMWH : Χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη
- MTHFR: Μεθυλεντετραϋδροφολικό οξύ
- N: Αρνητικός
- P: Θετικός
- PAI-1: Αναστολέας Ενεργοποιητή Πλασμινογόνου
- PK: Προκαλικρεΐνη
- PrC: Πρωτεΐνη C
- PrSAgFree: Πρωτεΐνη SAgFree
- PrS: Πρωτεΐνη S
- PT: Χρόνος προθρομβίνης
- TF: ιστικός παράγοντας
- t-PA: Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
- UFH : Τυπική ηπαρίνη (μη κλασματοποιημένη)
- u-PA: ενεργοποιητής τύπου ουρακινάσης
- vWF: παράγοντας von Willebrand

## Abbreviations

### **Αγγλική ορολογία**

ADP: Adenosine diphosphate

APTT: Activated partial thromboplastin time

ATIII: Antithrombin III

dNTPs: Nucleoside triphosphate

DVT : deep-vein thrombosis

GPIa: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol anchored proteins

HMWK: High molecular weight kininogen

LA: Lupus Antibodies

LMWH : Low molecular weight heparin

MTHFR: Methylenetetrahydrofolate reductase

N: Negative

P: Positive

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1

PK: Prekallikrein

PrC: Protein C

PrSAgFree: Protein S Antigen Free

PrS: Protein S

PT: Activated partial thromboplastin time

TF: Tissue Factor

UFH : Therapeutic unfractionated heparin

VKA : Vitamin K antagonist

vWF: Von Willebrand factor



## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

### 1. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

#### 1.1 ΓΕΝΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

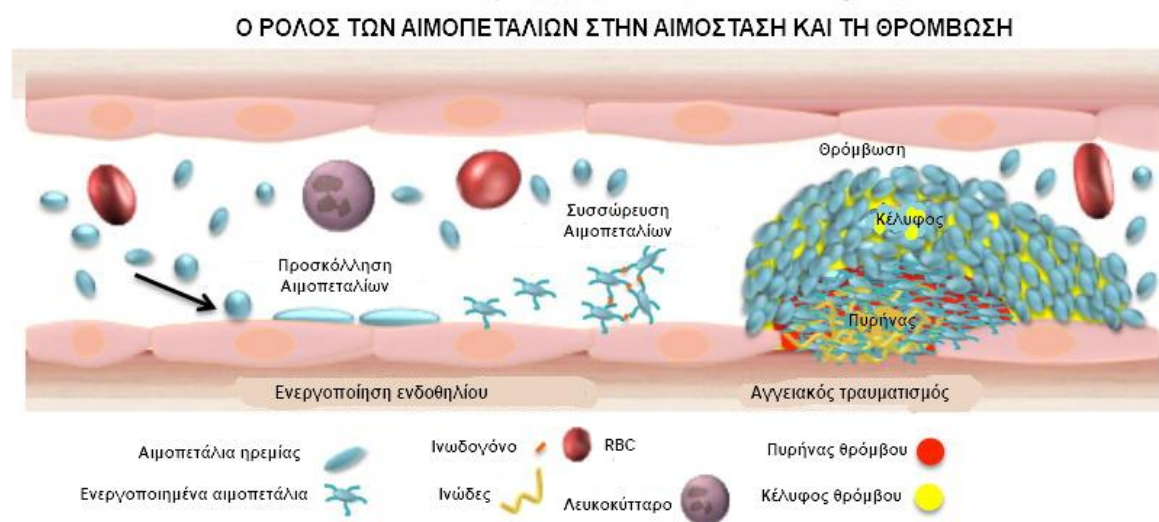
Αιμόσταση ονομάζεται ο φυσιολογικός μηχανισμός του οργανισμού που μπορεί να σταματά την αιμορραγία στο σημείο όπου υπάρχει βλάβη στο αγγείο και να συμβάλει στην ομαλότητα και στη σταθερότητα της ροής του αίματος καθώς και στη διατήρηση της ακεραιότητας των αιμοφόρων αγγείων, με τη δημιουργία θρόμβων. Τα αιμοπετάλια, οι παράγοντες πήξης, το αγγειακό ενδοθήλιο, ο παράγοντας von Willebrand, ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια έχουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της αιμόστασης καθώς με την αλληλεπίδραση τους ρυθμίζεται αυτή η φυσιολογική διαδικασία. Όταν μια αγγειακή βλάβη ή μια διαταραχή στη κυκλοφορία του αίματος παρατηρηθεί, τότε ενεργοποιούνται οι παραπάνω παράμετροι και δημιουργούν θρόμβους (1, 2).

#### 1.2 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια είναι απύρνηνα έμμορφα συστατικά του αίματος που προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Έχουν πάχος 0,5 μm και διάμετρο 2-5μm, δισκοειδές σχήμα, ζουν 5-7 μέρες στο αίμα και είναι πολυάριθμα (3). Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης δύο μοναδικά οργανίδια, τα α και δ κοκκία καθώς και τα λυσοσωμικά κοκκία. Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων αποτελείται από διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, όπου υπάρχουν κυρίως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, χοληστερόλη και GPI-GPIX γλυκοπρωτεΐνες. Τα φωσφολιπίδια και κυρίως τα αρνητικά φορτισμένα, συναντώνται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ενός αιμοπεταλίου, όμως όταν υπάρχει αιμορραγία ή βλάβη στα αγγεία, αυτά ενεργοποιούνται και έτσι τα φωσφολιπίδια περνούν από την εσωτερική στην εξωτερική επιφάνεια συμβάλλοντας στην καταπολέμηση της βλάβης και στο μηχανισμό της αιμόστασης. Έξω από την κυτταρική μεμβράνη βρίσκεται ο γλυκοκάλυκας, που περιβάλλει εξωτερικά το αιμοπετάλιο. Αυτός που καθορίζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι ο κυτταροσκελετός. Καθορίζει το σχήμα τους, τη μεταφορά των κυστιδίων και άλλων ουσιών καθώς είναι επίσης υπεύθυνος και για τη δημιουργία ψευδοποδίων τα οποία μπορούν να εμφανιστούν αφού ενεργοποιηθούν (4).

Τα αιμοπετάλια έχουν κυρίως ρυθμιστικό ρόλο στην αιμόσταση και στη θρόμβωση. Μόλις το αγγείο τραυματιστεί, γίνεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στο αίμα και έτσι προσκολλώνται στην εξωκυτταρική μήτρα κάτω από το ενδοθήλιο δημιουργώντας τελικά έναν θρόμβο αποτελούμενος τόσο από πυρήνα όσο και από κέλυφος (Εικ.1) (3). Η πρόσφυση, η απελευθέρωση και η συσσώρευση αποτελούν τα

σημαντικότερα βήματα που διενεργούν τα αιμοπετάλια στην περιοχή της αγγειακής βλάβης, προκειμένου να επιτελέσουν την κύρια λειτουργία τους που είναι η αιμόσταση, η πήξη και ο σχηματισμός θρόμβου. Τα 3 αυτά βήματα αποτελούν τη λεγόμενη πρωτογενής αιμόσταση (2, 5).



**Εικόνα 1:** Ο ρόλος των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίησή τους διαδέχεται διάφορα στάδια ξεκινώντας από τη προσκόλληση στην ενδοθηλιακή μήτρα η οποία καταλήγει σε σταθερή προσκόλληση, τα αιμοπετάλια ισοπεδώνονται και έτσι καταλήγουν σε ενδοαιμοπεταλιακή μεταγωγή σήματος. Στη περιοχή όπου το αγγείο τραυματίζεται τα αιμοπετάλια δημιουργούν ένα πυρήνα πλούσιο σε ινώδες, ενώ τα πιο χαλαρά αιμοπετάλια στο κέλυφος του θρόμβου περιβάλλουν τον πυρήνα. (Ανατύπωση από (3))

### 1.3 ΑΓΓΕΙΟΣΥΣΠΑΣΗ

Η αγγειοσύσπαση ή αλλιώς πρωτογενής αιμόσταση, αποτελεί το πρώτο στάδιο της αιμόστασης. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτού γίνεται στο μυϊκό ιστό από το νευρικό σύστημα. Με την αγγειοσύσπαση ελαττώνεται η διάμετρος του αγγείου και κατά συνέπεια επιβραδύνεται η ροή του αίματος με αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να προσκολλώνται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Η σύσπαση του μυϊκού χιτώνα πραγματοποιείται με τη παρουσία διάφορων αγγειοσυσπαστικών ουσιών όπως είναι η αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, αγγειοτενσίνη II, σεροτονίνη, ενδοθηλίνη-1 και το ινοπεπτίδιο Β. Από αυτά ορισμένα όπως η αδρεναλίνη προσέρχονται στο αίμα ή εκλύονται από τα διερχόμενα αιμοπετάλια είτε παράγονται. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στις ίνες του κολλαγόνου με τη βοήθεια του von Willebrand (vW), συσσωματώνονται και ενεργοποιούνται, γεγονός που διαταράσσει την ακεραιότητα του αγγειακού ενδοθηλίου. Το κολλαγόνο ως ισχυρός ενεργοποιητής αιμοπεταλίων, προκαλεί την απελευθέρωση περιεχομένων κόκκων όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate, ADP), τον παράγοντα vW και V και της θρομβοξάνης A2 (6).

Όταν τα αιμοπετάλια έρθουν σε επαφή με το τραυματισμένο αγγείο αποκτούν σφαιρική μορφή. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους

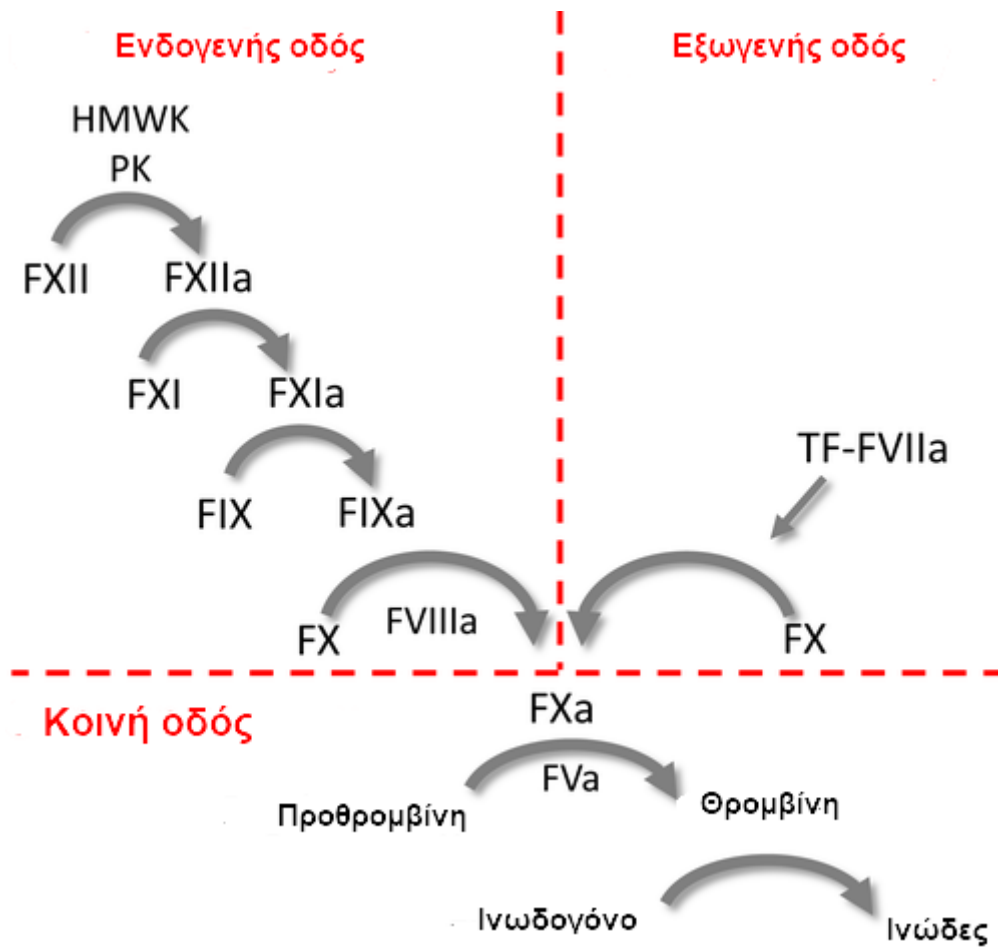
με μόρια, όπως η βιτρονεκτίνη, το ινωδογόνο και η φιβρονεκτίνη. Για να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση και η συσώρευση των αιμοπεταλίων, σημαντικό ρόλο έχουν διάφορες ουσίες όπως το σύμπλεγμα GPIb των αιμοπεταλίων και ο παράγοντας von Willebrand, ο οποίος συνδέεται από τη μια πλευρά με τη γλυκοπρωτεΐνη Ib και από την άλλη με το υπενδοθηλιακό κολλαγόνο. Η έκκριση του ADP που αναφέρθηκε παραπάνω οδηγεί στη συσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω γεφυρών ασβεστίου (Ca) και ινωδογόνου, η οποία τελικά καταλήγει στη συγκόλληση αυτών με τη βοήθεια των μεμβρανικών υποδοχέων GPIIb/IIIa. Η ενεργοποίηση επιτυγχάνεται με τις ουσίες θρομβοξάνης και θρομβίνης. Το τελικό στάδιο των διεργασιών αυτών αποτελεί ο αιμοπεταλιακός θρόμβος ο οποίος παρότι είναι ασταθής μπορεί να διακόψει προσωρινά την αιμορραγία (7).

#### 1.4 ΠΗΞΗ

Ο μηχανισμός της πήξης και η πρωτογενής αιμόσταση έχουν αποτελέσει σημαντικούς αμυντικούς μηχανισμούς κατά της αιμορραγίας. Στη διαδικασία της πήξης συμμετέχει μια σειρά ενζύμων πρωτεάσης σερίνης καθώς και οι συμπαραγοντες τους που αλληλεπιδρούν σε μια φωσφολιπιδική επιφάνεια ώστε να δημιουργηθεί ένας σταθερός θρόμβος ινώδους. Οι παράγοντες ή αλλιώς Factors που είναι πρωτεΐνες και λειτουργούν σαν ένζυμα, στην αρχή είναι ανενεργοί και έπειτα ενεργοποιούνται από την πρωτεάση. Η ενεργοποίηση των παραγόντων πήξεων ξεκινάει στο σημείο τρώσεως του αγγείου. Οι παράγοντες οι οποίοι είναι 13 σε αριθμό βασίζουν την ονοματολογία στην λατινική αρίθμηση. Στην επιφάνεια των λιπιδίων προσκολλώνται αυτοί οι παράγοντες (8).

Η αντιθρομβίνη (ATIII) ανήκει στους αναστολείς πήξης και αποτελεί το κύριο αντιπηκτικό μαζί με το συμπάραγοντα ηπαρίνης II. Η ATIII απενεργοποιεί τους X, IX, XI, XII παράγοντες και τη θρομβίνη. Οι πρωτεΐνες C, S προκαλούν αναστολή στους παράγοντες πήξης. Ανεπάρκεια σε αντιθρομβίνη και πρωτεΐνες C, S ενέχουν προδιάθεση για φλεβική θρόμβωση.

Η διαδικασία της πήξης προκαλείται από τον TF σε συνδυασμό με τον FVII στις επιφάνειες των κυτταρικών μεμβρανών. Η δημιουργία του συμπλέγματος TF/VIIa σηματοδοτεί την έναρξη της εξωγενούς οδού, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τους παράγοντες IX, X και έτσι δημιουργούν τη θρομβίνη. Η θρομβίνη αποτελεί το βασικό ένζυμο του συστήματος πήξης. Μπορεί να ενεργοποιεί τους παράγοντες VIII και V. Η θρομβίνη έχει την ιδιότητα να μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες και έτσι δημιουργείται το πήγμα ινώδους, καθώς και να ενεργοποιεί τον FXIII παράγοντα, ο οποίος συμμετέχει στη δημιουργία σταθερού θρόμβου (Εικ.2) (9, 10).



**Εικόνα 2:** Ο καταρράκτης της πήξης. Ο καταρράκτης αυτός υποδεικνύει πως η πήξη μπορεί να περιγράφεται με δύο οδούς, την ενδογενή και την εξωγενή οδό. Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται αφού γίνει η έκθεση του ιστικού παράγοντα στο πλάσμα και έτσι σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα VII (FVIIa). Από την άλλη η ενδογενής οδός ενεργοποιείται όταν το πλάσμα έρθει σε επαφή με αρνητικές επιφάνειες. Αυτές οι οδοί τελικά καταλήγουν σε μία κοινή οδό η οποία δημιουργεί τη θρομβίνη και σχηματίζει θρόμβο ινικής με διασταυρούμενη σύνδεση. (Ανατύπωση από (11))

### 1.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ

Η ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης, πραγματοποιείται στο σημείο όπου τραυματίζεται το αγγείο, όπως συμβαίνει και στη πρωτογενή αιμόσταση, με δύο κύριους μηχανισμούς. Όταν μιλάμε για παράγοντες πήξης εννοούμε πρωτεΐνες, που κυκλοφορούν ως προένζυμα με αδρανή μορφή στο πλάσμα. Οι παράγοντες έχουν την τάση να προστατεύουν τους πρωτογενείς θρόμβους σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του μηχανισμού. Είναι 13 σε αριθμό και η ονομασία τους καθορίζεται με λατινικούς αριθμούς, ξεκινώντας από το I και φτάνοντας έως τον παράγοντα πήξης XIII ενώ απουσιάζει ο VI παράγοντας. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης αναφέρονται ως διακριτές «οδοί» και χωρίζονται στην εξωγενή οδό, όπου η ενεργοποίηση των παραγόντων γίνεται με ιστική θρομβοπλασίνη και την ενδογενή οδό όπου η ενεργοποίηση ξεκινά από παράγοντες που βρίσκονται κυρίως μέσα στο πλάσμα και ειδικότερα από τον XII όταν έρθει σε επαφή με το υπενδοθηλιακό κολλαγόνο. Στη

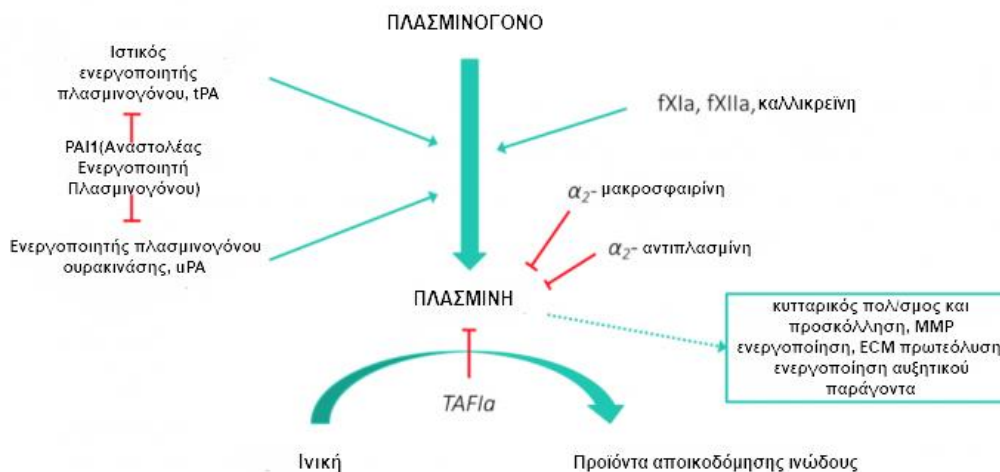
συνέχεια και αφού περάσει η αρχική φάση, οι δύο οδοί συμβάλλουν και από κοινού εξελίσσονται καταλήγοντας σε κοινή οδό που έχει ως στόχο τη δημιουργία ενός μηχανισμού για τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και την επίδραση της θρομβίνης στο ινωδογόνο του πλάσματος που μετατρέπεται σε ινική (12, 13).

1. Παράγοντας 1 (Ινωδογόνο) -> I
2. Παράγοντας 2 ( Προθρομβίνη) -> II
3. Παράγοντας 3 (Ιστικός παράγοντας) -> III
4. Παράγοντας 4 ( Ιόντα Ασβεστίου) -> IV
5. Παράγοντας 5 ( Προ-αξελερίνη) -> V
6. Παράγοντας 6 (Αξελερίνη) -> VI
7. Παράγοντας 7 (Προ-κονβερίνη) -> VII
8. Παράγοντας 8 (Αντι-αιμοφιλικός παράγων) -> VIII
9. Παράγοντας 9 ( Παράγων Christmas) -> IX
10. Παράγοντας 10 (Παράγων Stuart-Prower) -> X
11. Παράγοντας 11 ( Πρόδρομη Θρομβοπλαστίνη) -> XI
12. Παράγοντας 12 ( Παράγων Hageman) -> XII
13. Παράγοντας 13 ( Παράγων σταθεροποίησης ινώδους) -> XIII

#### 1.6 ΙΝΩΔΟΛΥΣΗ

Η ινωδόλυση, αποτελεί το τελευταίο στάδιο της αιμόστασης, όπου αποδομείται η περίσσεια ινωδογόνου/ινώδους σε προϊόντα μικρού μοριακού βάρους στο πλάσμα, και αποκαθίσταται έτσι η ομαλή κυκλοφορία του αίματος στα αγγεία, καταστρέφοντας το θρόμβο. Η ενεργοποιημένη μορφή του πλασμινογόνου ή αλλιώς πλασμίνη όπως αποκαλείται, αποτελεί ένα ισχυρό προ-ένζυμο του πλάσματος, που διασπά την ινική σε διαλυτά προϊόντα (Εικ.3). Το πλασμινογόνο ενεργοποιείται από τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) που ενισχύεται με την παρουσία ινώδους και συντίθεται από ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ η έκκριση του γίνεται στο πλάσμα, τον ενεργοποιητή τύπου ουρακινάσης (u-PA), βακτηριακούς και πλασματικούς ενεργοποιητές. Στο επίπεδο της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί η αναστολή του ινωδολυτικού συστήματος από ειδικό αναστολέα (PAI-1) ή από αναστολέα ινωδόλυσης (TAFI). Τα συστατικά του συστήματος ινωδόλυσης έχουν ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες ενώ οι φυσικοί ανασταλτές του συστήματος μπορούν να σταθεροποιήσουν τη διαδικασία της ινωδόλυσης, όπως κάνει η α2-αντιπλασμίνη.

Η υπερβολική ενεργοποίηση ή ανεπάρκεια παραγόντων πήξης μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία ενώ η μειωμένη ενεργοποίηση ή ανεπάρκεια των αναστολέων πήξης σε δημιουργία θρόμβου. Οι παραπάνω διεργασίες μπορεί να θεωρηθούν ορισμένες από τις διαταραχές του ινωδολυτικού συστήματος (13, 14).



**Εικόνα 3:** Ινωδόλυση. Το τελευταίο στάδιο της αιμόστασης. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει κυρίως το πλασμινογόνο, το οποίο από ανενεργό προ ένζυμο μπορεί να μετατραπεί σε πλασμίνη, που θεωρείται η ενεργή μορφή και η οποία μπορεί να διασπά το ινώδες. Το πλασμινογόνο ενεργοποιείται από πλασματικούς ενεργοποιητές, τον ενεργοποιητή τύπου ουρακινάσης (uPA) και τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) (15). (Ανατύπωση από <http://www.rarecoagulationdisorders.org/diseases/plasminogen-deficiency/disease-overview>)

## 2. ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ-ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ

### 2.1 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ

Όταν γίνει η σύνδεση του παράγοντα VII με τον ιστικό παράγοντα TF (tissue factor), στο σημείο τραυματισμού του αγγείου τότε ενεργοποιείται η εξωγενής οδός. Ο ιστικός παράγων συντίθεται μέσα σε ινοβλάστες, σε ενδοθηλιακά και μονοκύτταρα κύτταρα, ενώ ο παράγων VII προέρχεται από το ήπαρ. Το σύμπλεγμα TF/VII που δημιουργείται ενεργοποιεί την προθρομβινάση, και τον παράγοντα X σε Xa καθώς και τον παράγοντα IX σε IXa παρεμβαίνοντας έτσι στην ενδογενή οδό (16).

### 2.2 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ

Η ενδογενής πήξη ξεκινάει με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII, όταν ο παράγοντας αυτός έρθει σε επαφή με διάφορα κυτταρικά συστατικά που υπάρχουν στο σημείο τρώσεως του αγγείου. Ο παράγοντας XII, το σύστημα HMWK (high molecular weight kininogen) ή αλλιώς κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους, η προκαλλικρείνη (PK) καθώς και ο παράγων XI, αποτελούν τους τέσσερις παράγοντες επαφής οι οποίοι συμμετέχουν στην ενδογενή οδό της πήξης. Αιμοπετάλια συμμετέχουν στην μετατροπή XII-XIIa με την προσκόλληση τους στο κολλαγόνο της αγγειακής πληγής. Στόχος της ενδογενούς οδού είναι η ενεργοποίηση του παράγοντα X.

Οι διεργασίες που πραγματοποιούν οι παράγοντες επαφής είναι οι εξής :

- Ο παράγοντας XI ενεργοποιείται σε XIa πάνω σε επιφάνεια που είναι φορτισμένη αρνητικά, από τους 4 παράγοντες επαφής.
- Μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη μέσω του XIIIa και ενεργοποίηση του XII παράγοντα από την καλλικρεΐνη.
- Ο παράγοντας XI συνδέεται με την προκαλλικρεΐνη και δημιουργούν το σύμπλεγμα HMWK, που ενεργοποιεί τον XI
- Ενεργοποίηση του παράγοντα XI με την παρουσία ασβεστίου, ακολουθείται από ενεργοποίηση του IX
- Ο IXa συνδέεται με VIIIa παράγοντα και έτσι ενεργοποιείται ο X παράγοντας

Ο παράγων VIII είναι μια μεγαλομοριακή πρωτεΐνη που χρησιμεύει ως συμπαράγοντας και υπάρχει σε μικρή συγκέντρωση στο πλάσμα (16).

### 3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΟΔΟΥ

#### 3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V

Ο παράγοντας V περιγράφεται ως μια γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας που έχει ουσιαστικό ρόλο στη πήξη του αίματος. Αποτελεί τον συμπαράγοντα του πλάσματος για το σύμπλεγμα ενεργοποίησης της προθρομβινάσης και μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Μπορεί να παραχθεί στο ήπαρ, στα μεγακαρυοκύτταρα και στα αιμοπετάλια ενώ περίπου το 20% του παράγοντα εντοπίζεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Όταν η λειτουργία του ήπατος εξασθενίσει, μειώνονται και τα επίπεδα του παράγοντα. Ανεπάρκεια του παράγοντα V μπορεί να προκαλέσει αιμορραγίες καθώς και να παρατείνει το χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης και το χρόνο προθρομβίνης (PT). Όταν επίσης τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων διαταράσσονται τότε μπορούμε να παρατηρήσουμε χαμηλά επίπεδα του V παράγοντα. Στα πλαίσια ρευματολογικών διαταραχών μπορεί να προκύψουν επίκτητες ανεπάρκειες του παράγοντα (17, 18).

#### 3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII

Ο παράγοντας VIII είναι μια μεγαλομοριακή πρωτεΐνη που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και σε ποικίλους άλλους ιστούς όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα νεφρά και τον λεμφικό ιστό. Η ενεργοποίηση του πραγματοποιείται με τη προθρομβίνη. Βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στο πλάσμα και προστατεύεται με τη σύνδεση του με τον παράγοντα von Willebrand, καθώς τον εμποδίζει να προχωρήσει σε πρόωρη πρωτεόλυση και τον μεταφέρει σε σημεία ενδοθηλιακής βλάβης. Ο παράγων VIII αποτελεί έναν από τους πιο μεγάλους παράγοντες πήξης που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος. Ο VIII παρουσία ασβεστίου και φωσφολιπιδίων, ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa. Η ανεπάρκεια του παράγοντα οδηγεί σε αιμορραγική διαταραχή, γνωστή ως Αιμορροφιλία A, η οποία χαρακτηρίζεται από παρατεταμένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT), φυσιολογικό χρόνο ροής και

χρόνου προθρομβίνης (PT). Η αιμορροφιλία A εντοπίζεται κυρίως στους άνδρες που έχουν ένα χρωμόσωμα X, και μεταβιβάζεται με υπολειπόμενη κληρονομικότητα (19, 20).

### 3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΙΧ

Ο ΙΧ παράγοντας ή αλλιώς παράγοντας Christmas είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος με μονή αλυσίδα που εμφανίζεται στη φάση της ενδογενούς οδού περίπου στη μέση της διαδικασίας. Εντοπίζεται ως ζυμογόνο στα πλάσμα και μπορεί να μετατραπεί σε πρωτεάση σερίνης με τον παράγοντα XIa με την παρουσία ασβεστίου. Συντίθεται στο ήπαρ και η Αιμορροφιλία Β αποτελεί παθολογικής φύσεως διαταραχή στους ασθενείς με ανεπάρκεια του ΙΧ παράγοντα. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν παρατεταμένο ΑΡΤΤ, φυσιολογικό χρόνο ροής και ΡΤ. Ο υπολειπόμενος χαρακτήρας του παράγοντα χαρακτηρίζει τον τρόπο μεταβίβασης στους απογόνους τους (21, 22).

### 3.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΧΙ-ΧΙΙ

Οι παράγοντες ΧΙ και ΧΙΙ αποτελούν μαζί με άλλους παράγοντες τους παράγοντες επαφής που συμμετέχουν στην ενδογενή οδό. Η ενεργοποίηση τους επιτυγχάνεται με επαφή με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες όπως η καολίνη και το γυαλί καθώς και με κυτταρικά συστατικά όπως είναι οι βλεννοπολυσακχαρίδες. Ο παράγοντας ΧΙ είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του οποίου οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενώνονται με δεσμό δισφουλφιδικό (22). Οι αιμορραγικές διαταραχές του παράγοντα ΧΙ είναι ήπιες σε αντίθεση με την αιμορροφιλία Α ή Β και εντοπίζεται και στα δύο φύλα (23). Ο παράγοντας ΧΙΙ είναι ακόμη μια γλυκοπρωτεΐνη της οποίας όμως η διαδικασία ενεργοποίησης είναι ακόμα άγνωστη. Η έλλειψη του παράγοντα αυτού δεν σχετίζεται με αιμορραγία. Ο ΧΙΙa μπορεί να ενεργοποιήσει την προκαλλικρεΐνη, βρίσκεται στο πλάσμα ή στον ορό του οργανισμού του ανθρώπου και αποτελεί ένα σταθερό παράγοντα.

Όταν πραγματοποιηθεί διάσπαση ενδοθηλίου ξεκινάει η διαδικασία σχηματισμού αιμοπεταλιακών θρόμβων. Όταν συμβεί αυτό, πρώτα από όλα ενεργοποιούνται στο πλάσμα όλοι οι παράγοντες επαφής, και κυρίως ο ΧΙΙ, ΧΙ το πλασμινογόνο και η καλλικρεΐνη. Ο παράγοντας ΧΙΙ ή αλλιώς Hageman όπως ονομάζεται έρχεται σε στενή επαφή με επιφάνεια που είναι φορτισμένη αρνητικά. Ο ΧΙΙa ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη και τον ΧΙ παράγοντα με τη συμβολή του παράγοντα ΗΜWΚ, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα κινινογόνου υψηλού μοριακού βάρους. Τα φωσφολιπίδια έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία επιφάνειας που έχει φορτιστεί αρνητικά στην οποία διαδραματίζονται και οι ενζυμικές ενεργοποιήσεις (24).



### 3.5 ΗΜWΚ ή ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ

Η μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη πραγματοποιείται μέσω του παράγοντα XIIIa. Η καλλικρεΐνη είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο που εντοπίζεται στο πλάσμα και έχει την ικανότητα να διασπά το ΗΜWΚ ώστε αυτό να παράγει βραδυκινίνη, και μπορεί επίσης να ενεργοποιεί το πλασμινογόνο και τους παράγοντες πήξης. Χαμηλά επίπεδα της προκαλλικρεΐνης οδηγούν σε παράταση του ΑΡΤΤ. Το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους (ΗΜWΚ), αποτελεί πρωτεΐνη στο πλάσμα που δημιουργεί σύμπλεγμα με την προκαλλικρεΐνη και μπορεί να δράσει ως συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση του XII. Το ΗΜWΚ με τη συμβολή άλλων παραγόντων, των αιμοπεταλίων και με τη πρόσδεση στο κολλαγόνο του υπενδοθηλίου, ενεργοποιεί τον παράγοντα XII. Επιπλέον το σύστημα ΗΜWΚ καταλύει τις ακόλουθες ανακυκλούμενες αντιδράσεις :

- Ο παράγοντας XIIIa μπορεί να συνδέσει και να μετατρέψει την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη.
- Σύνδεση του XI παράγοντα με προκαλλικρεΐνη προς δημιουργία του ΗΜWΚ, το οποίο ενεργοποιεί τον XI.
- Έκλυση βραδυκινίνων με πολλές ιδιότητες (25).

## 4. ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ-ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ

### 4.1 Εισαγωγή

Η διαδικασία όπου συστατικά του αίματος κυρίως παθολογικά, συσσωρεύονται και δημιουργούν ένα θρόμβο ινικής, ο οποίος μπορεί να έρθει σε επαφή με αγγειακό τοίχωμα δημιουργώντας έτσι ολική ή μερική απόφραξη μίας φλέβας ή μίας αρτηρίας, καλείται θρόμβωση ή αλλιώς θρομβοφιλική διάθεση. Το αποτέλεσμα της θρόμβωσης είναι η τοπική διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος, με συνέπεια οι ιστοί να νεκρώνουν λόγω μη επαρκούς θρέψης και οξυγόνωσης και έτσι οδηγούνται σε έμφραγμα. Η θρομβοφιλία μπορεί να είναι κληρονομική που αφορά γενετικές διαταραχές ή επίκτητη με μεγάλο κίνδυνο δημιουργίας θρόμβου, που μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία.

Η παθογένεια του μηχανισμού της θρομβοφιλικής διάθεσης περιγράφεται από την τριάδα του Virchow, και σύμφωνα με αυτό, ανωμαλία στη ροή του αίματος, βλάβη στο ενδοθήλιο των αγγείων, διαταραχές στα συστατικά που συμμετέχουν στο μηχανισμό της πήξης, μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία θρόμβου (Εικ. 4). Η θρομβοφιλία δεν είναι νόσος από μόνη της αλλά απευθύνεται σε άτομα με προδιάθεση να δημιουργήσουν θρόμβους στη κυκλοφορία του αίματος. Τα κύρια αίτια της κληρονομικής θρομβοφιλίας περιέχουν μια ομάδα κληρονομικών διαταραχών που προέρχονται από γενετικές ανωμαλίες και επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ προθρομβωτικών-αντιθρομβωτικών μηχανισμών. Τα πιο συχνά αίτια μπορεί να είναι :

- Μετάλλαξη του γονιδίου προθρομβίνης (G20210A), που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης στη κυκλοφορία.

- Αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (APCR) που οφείλεται κυρίως σε μετάλλαξη στον παράγοντα V, G 1691A γνωστή και ως μετάλλαξη V LEIDEN.
- Ανεπάρκεια πρωτεϊνών C (PC) και S (PS) και αντιθρομβίνης III
- Ανεπάρκεια του XII παράγοντα
- Ομοκυστεϊναιμία που οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο ομοκυστεϊνης (MTHFR, υπερομοκυστεϊναιμία)
- Ύπαρξη αντιπηκτικών του λύκου που αποτελεί επίκτητο αυτοαντίσωμα που δρα έναντι των φωσφολιπιδίων.

Επιπλέον η φλεβική θρόμβωση εντοπίζεται επίσης σε συγγενείς θρομβοφιλίες και παράλληλα με άλλους παράγοντες όπως το κάπνισμα ή ο σακχαρώδης διαβήτης, που μπορούν να προκαλέσουν και αρτηριακές θρομβώσεις (26).



**Εικόνα 4:** Η τριάδα του Virchow. Η τριάδα αυτή αναφέρεται σε 3 σημαντικές επιρροές που συμβάλλουν στο σχηματισμό θρόμβου και αφορά: 1) την κάκωση ενδοθηλίου, 2) τη μη φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος και 3) την υπερπηκτικότητα του αίματος (Ανατύπωση από <https://www.medicinehack.com/2011/07/virchows-triad.html>)

#### 4.2 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΗΞΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΦΥΣΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ

Ύστερα από μία αγγειακή βλάβη, η αιμόσταση αποτελεί την διαδικασία που συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας ενός κλειστού κυκλοφορικού συστήματος με υψηλή πίεση. Η δημιουργία θρόμβου σηματοδοτεί την ενεργοποίηση κάποιου μηχανισμού για την καταστροφή του στο σημείο όπου υπέστη η βλάβη. Τα αιμοπετάλια αποτελούν το βασικό συστατικό του σχηματιζόμενου θρόμβου στο σημείο του τραυματισμού. Η πήξη είναι ο μηχανισμός που θα ενεργοποιηθεί προκειμένου να καταστραφεί ο θρόμβος. Η παραγωγή της θρομβίνης ελέγχεται από δυο άλλους μηχανισμούς, ένα άμεσο σύστημα που προκαλεί την αναστολή της δράσης των παραγόντων που έχουν ενεργοποιηθεί της σερίνης και των πρωτεασών και ένα έμμεσο σύστημα που εξαρτάται από τη βιταμίνη K, αποτελούμενο από

πρωτεΐνη C και της πρωτεΐνης S τον συμπαράγοντα, και μπορεί να αναστείλει τους ενεργοποιημένους επιταχυντές της πήξης (27).

#### 4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ FV LEIDEN

Η μετάλλαξη FV LEIDEN, αφορά παθολογική μετάλλαξη, συγκεκριμένα στο γονίδιο FV (G1619A) όπου η αργινίνη αντικαθίσταται από την γλουταμίνη. Στη διάρκεια της μετάφρασης του γονιδίου ένα ανθεκτικό προϊόν ως προς τη δράση της APC-R (activated protein C- APC) δημιουργείται, και έτσι αυξάνεται η θρομβίνη στο αίμα άρα και ο κίνδυνος πιθανής θρόμβωσης. Η απενεργοποίηση του ενεργοποιημένου V παράγοντα μπορεί να ανασταθθεί με τη μετάλλαξη V LEIDEN, αφαιρώντας τη θέση προτίμησης για πρωτεόλυση της PrC, του παράγοντα LEIDEN. Οι ομοζυγώτες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης θρομβοφιλίας.(28) Επομένως η μετάλλαξη του παράγοντα V LEIDEN μπορεί να οδηγήσει σε υπερπηκτικότητα αίματος οδηγώντας τον ασθενή σε απειλητικά συμπτώματα για τη ζωή (29).

#### 4.4 Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Η αντικατάσταση της γουανίνης από την αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 20210 στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή, σηματοδοτεί μία μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης, που σχετίζεται με κινδύνους φλεβικής θρόμβωσης σε ετεροζυγώτες και με κληρονομικές θρομβοφιλίες. Η φλεβική θρόμβωση προκύπτει από την αύξηση των επιπέδων προθρομβίνης στο περιφερικό αίμα, εξαιτίας της μετάλλαξης στο γονίδιο της (30). Αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θρόμβωσης, έχουν τα άτομα που ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες και δεν παρουσιάζουν κάποια γενετική βλάβη, λόγω της αυξημένης τιμής της προθρομβίνης τους. Η πιο συχνή αιτία για εν τω βάθι φλεβική θρόμβωση θεωρείται η μετάλλαξη του γονιδίου προθρομβίνης, η οποία μπορεί να παρουσιαστεί και σε άλλα μη συνηθισμένα σημεία όπως στις εγκεφαλικές φλέβες, ενδοκοιλιακά, στις πυλαίες ή μεσεντέριες φλέβες κτλ., όπως επίσης και από το κάπνισμα που οδηγεί σε έμφραγμα μυοκαρδίου. Ποικίλες μοριακές τεχνικές αποτελούν τον τρόπο διάγνωσης της μετάλλαξης της προθρομβίνης (31).

#### 4.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C

Η διαταραχή αυτή είναι λιγότερο συχνή στο γενικό πληθυσμό. Η ελάττωση της ενεργότητας της πρωτεΐνης σχετίζεται με τη μετάλλαξη στο γονίδιο της. Στις θέσεις Arg506, Arg306, Arg679 η πρωτεΐνη μπορεί να απενεργοποιήσει τον V παράγοντα. Η έλλειψη της πρωτεΐνης C μπορεί να οφείλεται και σε κληρονομικά αίτια, λόγω μεταλλάξεων στις περιοχές κωδικοποίησης και ρύθμισης του γονιδίου της πρωτεΐνης. Οι παραπάνω μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν και στη δημιουργία θρόμβου, λόγω διαταραχής της λειτουργίας της πρωτεΐνης C μειώνοντας έτσι την απενεργοποίηση των ενεργοποιημένων FV-FVII. Οι ετεροζυγώτες με μεταλλάξεις της PROC, εμφανίζουν κίνδυνο ανάπτυξης φλεβικών θρομβώσεων. Κεραυνοβόλος

πορφύρα, καλείται η πάθηση των ατόμων που κληρονομούν δύο αλληλόμορφα της πρωτεΐνης C τα οποία έχουν μεταλλαχθεί (32).

#### 4.6 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ S

Η S πρωτεΐνη συντίθεται στα ηπατοκύτταρα και μπορεί να δράσει με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C ως συμπαράγοντάς της. Κύριες λειτουργίες της πρωτεΐνης S είναι να απενεργοποιεί τον παράγοντα V-LEIDEN με τη βοήθεια της πρωτεΐνης C και να ενισχύει τη πρωτεολυτική διαδικασία με τη συμμετοχή της στη θέση Arg306. Η πρωτεΐνη S εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K, παρουσιάζει ομοιότητες με τη σερίνη και τις πρωτεάσες. Η πρωτεΐνη S μέσω της APC μπορεί να αυξήσει τους χρόνους διαδικασίας της πήξης. Διαθέτει τέσσερις EGF περιοχές και μία GIa. Για την ανάλυση του αντιγόνου υπάρχουν δύο τύποι. Για τη μέτρηση του ολικού ή ελεύθερου αντιγόνου υπάρχουν ποικίλες ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες και για τη μέτρηση της δραστηριότητας του APC συμπαράγοντα υπάρχουν διάφορες δοκιμασίες πήξης (33).

#### 4.7 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Η αντιθρομβίνη ή αλλιώς εν συντομία AT είναι μία πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των σερπινών, που αποτελεί σημαντικό ανασταλτή της θρομβίνης καθώς και των παραγόντων πήξης όπως της καλλικρείνης, της πλασμίνης και των IXa, XIa, XIIa, Xa παραγόντων. Είναι επίσης υπεύθυνη για τη δημιουργία φλεβικής θρόμβωσης (31).

Η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης (AT), καλείται μία ετερογενής διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, και η οποία περνάει από τους γονείς στους απογόνους. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι ανεπάρκειας AT, βασισμένοι στους υπότυπους ως εξής : α) ανεπάρκεια τύπου I όπου σημειώνεται μείωση της δραστηριότητας της αντιθρομβίνης στο αίμα, σε ποσοστό 50% λόγω μειωμένης σύνθεσης μορίων αναστολέα πρωτεάσης β) ανεπάρκεια τύπου II όπου σημειώνεται δυσλειτουργία της πρωτεΐνης καθώς η δραστηριότητα της AT του πλάσματος είναι αισθητά μειωμένη με κίνδυνο την ανάπτυξη θρόμβωσης και γ) ανεπάρκεια τύπου III όπου σημειώνονται φυσιολογικά επίπεδα αντιθρομβίνης όσον αφορά τη λειτουργία και τα αντιγόνα της αλλά χαμηλή αλληλεπίδραση μεταξύ αντιθρομβίνης και ηπαρίνης.

Οι ετεροζυγώτες με ανεπάρκεια AT εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης φλεβικής θρόμβωσης, σε αντίθεση με τα άτομα που έχουν έλλειψη των πρωτεϊνών S και C. Οι θρομβώσεις έχει αποδειχτεί ότι είναι σπάνιες πριν την εφηβεία σε άτομα με ανεπάρκεια AT ενώ αυξάνονται με την πρόοδο της ηλικίας. Σε μεγάλο ποσοστό ο άνθρωπος μπορεί να αναπτύξει θρόμβωση μετά τα 55 του χρόνια (34).

#### 4.8 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HAGEMAN (XII)

Πρόκειται για μία ασυνήθιστη γενετική διαταραχή στο αίμα που οδηγεί στην πήξη, αλλά παρόλα αυτά δεν εμφανίζονται άλλα συμπτώματα ή αιμορραγικές τάσεις. Οι

ασθενείς με έλλειψη του παράγοντα XII είναι κυρίως ασυμπτωματικοί, και εντοπίζονται τυχαία με τις αιματολογική εξέταση λόγω του παρατεταμένου χρόνου του ΡΤΤ. Η διάγνωση του ασθενή πραγματοποιείται με ποσοτικό προσδιορισμό στο αίμα ή στον ορό του. Η ανεπάρκεια του παράγοντα μπορεί να κληρονομηθεί στον απόγονο, με υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα (35).

#### 4.9 ΤΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ G20210A

Όταν τα επίπεδα του G20210A αυξάνουν στο περιφερικό αίμα, μεγαλώνει και ο κίνδυνος δημιουργίας θρόμβωσης. Στη διάρκεια μιας φλεβικής θρόμβωσης, αναφέρεται με μια επιφύλαξη, πως όταν υπάρχει η μετάλλαξη αυτή ή όταν τα επίπεδα των VIII-IX αυξάνουν, τότε η θρομβίνη παράγεται συνεχώς επιβραδύνοντας παράλληλα τη διαδικασία της ινωδόλυσης. Η παρουσία της επιπλέον, επηρεάζει τα έμβρυα στη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς μπορεί να οδηγήσει και σε αποβολές (36).

#### 4.10 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ APC-R (ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ)

Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη APC έχει δράση αντυπηκτική που οφείλεται στην ικανότητά της να μπορεί να αδρανοποιεί τους παράγοντες Va και VIIIa με πρωτεολυτική διάσπαση. Η εμφάνιση θρομβοφιλίας οφείλεται στην περίπτωση που κάποια διαταραχή κληρονομική, επιδράσει στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη.

Οι σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με το γονίδιο του παράγοντα V-LEIDEN κατά τις οποίες γίνεται αντικατάσταση, και έτσι η Gln παίρνει τη θέση Arg506, αποτελούν αιτία για την αντίσταση που παρουσιάζει η APC στην αντυπηκτική της δράση. Έτσι προκύπτει πως ο νέος Va που έχει μεταλλαχτεί, παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία στην ενεργοποίηση από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη APC σε σχέση με το μη μεταλλαγμένο Va. Η κληρονομικότητα της APC γίνεται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και παρουσιάζει αρκετή συχνότητα στις οικογενειακές θρομβοφιλίες. Οι ομοζυγώτες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης περιστατικών θρόμβωσης σε σχέση με τους ετεροζυγώτες που φέρουν μικρότερο κίνδυνο για θρόμβωση λόγω της APC-R (37).

#### 4.11 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ 1 (PAI-1)

Το PAI-1 αποτελεί μέλος της οικογένειας των αναστολέων της πρωτεάσης σερίνης και αποτελεί τον κύριο αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουρακινάσης (uPA) καθώς και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου ιστού (tPA). Ο αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αποτελεί για το σύστημα του πλασμινογόνου, τον κύριο ρυθμιστή του. Μπορεί να αναστείλει τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, με αποτέλεσμα να εγκυμονούν κίνδυνοι για θρομβώσεις. Η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη καθώς και η ενεργοποίηση MMP, αναστέλλεται λόγω αναστολής του uPA / tPA. Το PAI-1 μπορεί

να συντεθεί από διάφορα κύτταρα όπως τα λιποκύτταρα, τα μακροφάγα, τους ινοβλάστες, τα κύτταρα του καρδιακού μυ κ.α., αλλά η αποθήκευσή του γίνεται στα αιμοπετάλια. Υψηλές τιμές του PAI-1 στο πλάσμα μπορεί να οδηγήσουν σε ποικίλες θρομβωτικές ασθένειες όπως είναι η εν τω βάθη φλεβική θρόμβωση, η στηθάγχη, το έμφραγμα το μυοκαρδίου κ.α. (38, 39).

#### 4.12 ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗ Ia (GPIa)

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια και διάφορα άλλα αιμοποιητικά κύτταρα, έχουν στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες οι οποίες καλούνται GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol anchored proteins) πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποστολή και στην προστασία τους από βλαπτικούς παράγοντες όπως είναι οι εξωγενείς και οι ενδογενείς. Υπάρχουν και άλλες ομάδες πρωτεϊνών όπως οι DAF ή αλλιώς CD55ag, MIRL ή CD59, C8bp, CD58 και η ακετυλοχολινεστεράση, που προστατεύουν το κύτταρο από τη λύση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος C.

Η α1,6N-ακετυλο-γλυκοζαμινοζυλοτρανσφεράση είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς συνδέει τις κυτταρικές μεμβράνες με τις επιφανειακές πρωτεΐνες και έτσι επιτυγχάνεται με καλύτερο τρόπο η έκφραση των πρωτεϊνών GPI. Όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανεπάρκεια των πρωτεϊνών GPI καθώς αυτή η διαταραχή εμφανίζεται στα κύτταρα του αίματος όλων των σειρών (40).

### 5. ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

#### 5.1 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η δημιουργία ενός θρόμβου μπορεί να προκληθεί από τις καρδιολιπίνες, τα αντιπηκτικά του λύκου καθώς και από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Στα άτομα που ανιχνεύονται τα αντισώματα αυτά συνήθως προκύπτει ότι πάσχουν από κάποιο αυτοάνοσο νόσημα ή από συστηματικό ερμηθυματώδη λύκο. Ασυμπτωματικός ασθενής μπορεί επίσης να παρουσιάσει τα παραπάνω, είτε σε περίπτωση ιστορικού φλεβικών ή αρτηριακών θρομβώσεων, είτε εξαιτίας θρομβοπενίας είτε ακόμα και σε εγκυμοσύνες όπου υπάρχει συνεχής αποβολή εμβρύου.

Η παράταση του APTT προκύπτει από την παρουσία του αντιπηκτικού του λύκου. Τα αντισώματα όταν αντιδρούν με την b2-GPI γλυκοπρωτεΐνη και με φωσφολιπίδια, αντίδραση που πραγματοποιείται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, προκαλούν θρόμβο (41).

#### 5.2 ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Στην εγκυμοσύνη οι διαταραχές στη λειτουργία της αιμόστασης είναι συχνές εξαιτίας διαφόρων παραγόντων όπως :

- Έλλειψη κάποιου παράγοντα πήξης

- Διαταραχές στην πήξη αίματος
- Εμφάνιση αυτοάνοσου που μπορεί να οδηγήσει σε θρομβοπενία
- Η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθεί η έγκυος
- Υπερομοκυστεϊναιμία
- Διάφοροι πολυμορφισμοί MTHFR

Όσον αφορά τις θρομβώσεις, οι οικογενής μορφές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες : α) στην έλλειψη της αντιθρομβίνης III λόγω κληρονομικότητας και β) στην επίκτητη έλλειψη της ATIII. Στη διάρκεια της κύησης, ορισμένοι παράγοντες πήξης όπως οι πρωτεΐνες S και C, το πλασμινογόνο, το ινωδογόνο, καθώς και η αντιθρομβίνη III, μπορούν να διαταραχθούν εάν υπάρχουν θρομβοεμβολικές νόσοι. Επιπλέον η μειωμένη αντιθρομβίνη III μπορεί να οδηγήσει στην ανεπάρκεια της ATII (42).

### 5.3 ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

Οι θρόμβοι μπορούν να εντοπιστούν σε πολλά σημεία στο ανθρώπινο σώμα, όπως είναι ο αμφιβληστροειδής του οφθαλμού, τα άκρα του σώματος, οι στεφανιαίες αρτηρίες και το νευρικό σύστημα. Το χειρουργείο ή διάφορες μικροεπεμβάσεις όπως η αγγειογραφία ή η τοποθέτηση καθετήρα εντός της αρτηρίας, μπορούν να συμβάλλουν στη θεραπεία των ασθενών από τις θρομβώσεις. Οι τεχνικές βαλβίδες που τοποθετούνται στην καρδιά στα χειρουργεία, είναι επιπλέον μια άλλη θεραπεία, που μετά το πέρας της διαδικασίας έχουμε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη προσκόλληση τους στο σημείο όπου έγινε η τοποθέτηση της βαλβίδας. Τα ερυθρά ελκύουν το ADP και διέρχονται από τη βαλβίδα με αποτέλεσμα να προκαλείται αιμόλυση. Άτομα που έχουν χειρουργηθεί είναι σημαντικό μετά, να τους χορηγηθούν παράγοντες αντιαιμοπεταλιακοί όπως είναι η ασπιρίνη κ.α., ώστε να αποφύγουν τον κίνδυνο δημιουργίας θρόμβου (43).

### 5.4 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΗΣ

Στην επίκτητη θρομβοφιλία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, οι κακές διατροφικές συνήθειες, τα καρκινικά επεισόδια που μπορεί να έχει περάσει ένας άνθρωπος, το πέρας της ηλικίας, τα αντισυλληπτικά που επηρεάζουν το γυναικείο φύλο και ο σακχαρώδης διαβήτης. Επιπλέον η υπέρταση, η εγκυμοσύνη, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, διάφορα νοσήματα του αίματος και η ανεπάρκεια του ήπατος, είναι μερικά ακόμα αίτια επίκτητης θρομβοφιλίας. Όταν αυξάνεται ο παράγοντας VIII και ο XII, η υπερομοκυστεϊναιμία δίχως τον παράγοντα V LEIDEN και το πλασμινογόνο, τότε μιλάμε για κοινά αίτια που αφορούν την συγγενή και την επίκτητη θρομβοφιλία (26).

## 5.7 ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Η αρτηριακή θρόμβωση μπορεί να προκαλέσει εμφράγματα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικά επεισόδια, θρόμβωση στη κοιλιακή αορτή καθώς επίσης και καταστροφές των περιφερικών αγγείων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα φάρμακα που παρέχονται στους ασθενείς ύστερα από χειρουργεία που αφορούν την προσθήκη καθετήρων ή και βαλβίδων. Η αθηροσκλήρυνση αποτελεί την πιο σοβαρή αιτία που οδηγεί σε αρτηριακή θρόμβωση.

Υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που εγκυμονούν κινδύνους όπως είναι, η υπέρταση, το κάπνισμα, τα παραπάνω κιλά που καταλήγουν σε παχυσαρκία, οι πρωτεΐνες του λίπους στον ορό καθώς και οι μεγάλες τιμές των λιπιδίων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων στον εσωτερικό χιτώνα οδηγεί στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Έτσι το ενδοθήλιο οδηγείται σε ρήξη και τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται με κίνδυνο τη δημιουργία κι άλλων βλαβών όπως είναι η απόφραξη της πάσχουσας αρτηρίας. Η θρόμβωση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ασυμπτωματική για αρκετό διάστημα και να παρουσιαστεί αιφνίδια στον άνθρωπο μέσω κάποιας απόφραξης σε ένα όργανο όπως στην καρδιά, στα άκρα το σώματος και στον εγκέφαλο.

Μπορεί να εκδηλωθεί ως νόσος στεφανιαία, ως ισχαιμική πάθηση στα κάτω άκρα του σώματος, ως υπέρταση νεφραγγειακή και διάφορα άλλα σημαντικά σύνδρομα.

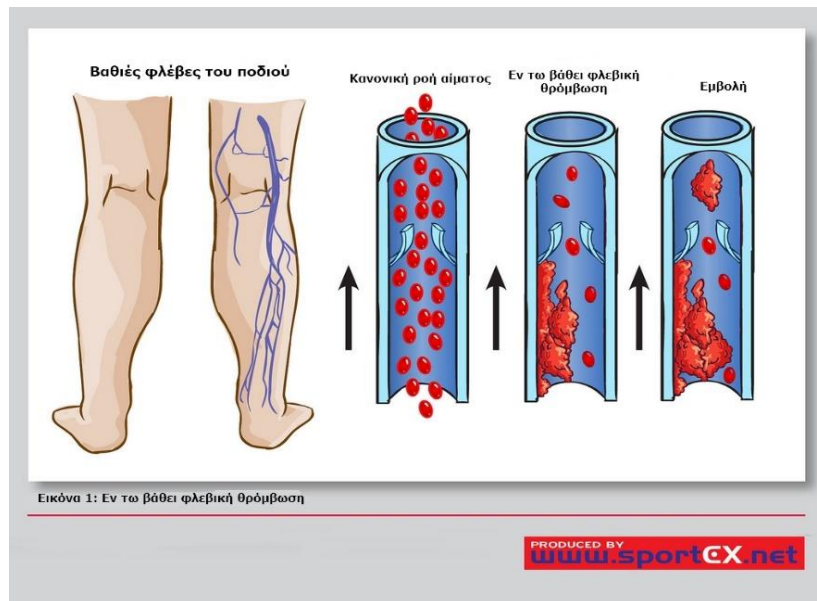
Ανάλογα με τον τρόπο εκδήλωσης της αρτηριακής απόφραξης υπάρχουν δύο μέθοδοι θεραπειών : α) με χειρουργείο όπου γίνεται by pass ή αλλιώς εμβολεκτομή προκειμένου να αποκατασταθεί η αρτηριακή κυκλοφορία και β) με συντηρητικό τρόπο με τη βοήθεια της θρομβολυτικής θεραπείας όπως σε περιπτώσεις οξύ εμφράγματος του μυοκαρδίου. Στις πιο ήπιες περιπτώσεις μπορούν να χορηγηθούν διάφορες αντιπηκτικές αγωγές ή και αντιαιμοπεταλιακά (44).

## 5.8 ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Η φλεβική θρόμβωση αποτελεί την απόφραξη της φλέβας εξαιτίας της δημιουργίας θρόμβου. Μπορεί να προκαλέσει πολλές παθήσεις όπως είναι το έμφραγμα μυοκαρδίου, το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο αλλά και πνευμονική εμβολή, παθήσεις που μπορούν να εντοπιστούν κυρίως στο κάτω μέρος του σώματος (κάτω άκρα) και ειδικά στις εν τω βάθη φλέβες που βρίσκονται στην κνήμη.

Η κύρια θεραπεία της φλεβικής θρόμβωσης είναι η χορήγηση αντιπηκτικών. Χρειάζεται απαραίτητη προσοχή και παρακολούθηση καθώς πολλές είναι οι επιπλοκές που μπορεί να δημιουργηθούν και έτσι μπορεί οι ασθενείς να φτάσουν ακόμα και στο θάνατο. Η εμφάνιση συμπτωμάτων σε μικρή ηλικία δεν είναι απίθανη, είτε εξαιτίας κληρονομικότητας είτε εξαιτίας ακινησίας, παχυσαρκίας, κ.α. Η επίκτητη θρομβοφιλία σχετίζεται με την υπερπηκτικότητα και την ανεπάρκεια των πρωτεϊνών S και C, και της αντιθρομβίνης. Μικρότερο κίνδυνο κατέχουν τα αντισυλληπτικά, οι εγκυμονούσες κ.α. (45).





**Εικόνα 5:** Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT). Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση καλείται ένας θρόμβος αίματος που μπορεί να δημιουργηθεί μέσα στις βαθιές φλέβες κυρίως του ποδιού αλλά και στα χέρια καθώς και στη μεσεντέρια και εγκεφαλική φλέβα. Είναι μέρος των διαταραχών των φλεβικών θρομβοεμβολών και αποτελεί την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από τις καρδιαγγειακές νόσους. (Ανατύπωση από <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/20301>)

## 5.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ

Κάθε ασθενής που πάσχει από θρομβοφιλία αντιμετωπίζει μια διαφορετική κατάσταση, στην οποία στηρίζεται και η θεραπεία του. Υπάρχουν ασθενείς που σε εξετάσεις αίματός τους, εντοπίστηκε τυχαία κάποιος παράγοντας που θεωρήθηκε θρομβολυτικός, χωρίς να εμφανίσουν συμπτώματα ενώ υπάρχουν και ασθενείς που εμφάνισαν συμπτώματα σε κάποια περίοδο της ζωής τους. Η αντιμετώπιση της θρομβολυτικής νόσου στηρίζεται σε 3 κατηγορίες φαρμάκων: α) στα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, όπως είναι η ασπιρίνη, η κλοπιδογρέλη και η τικλοπιδίνη, τα οποία είναι φάρμακα που δρουν στα αιμοπετάλια και εμποδίζουν την ενεργοποίησή τους στη δημιουργία θρόμβου στις αρτηρίες β) στα αντιθρομβωτικά φάρμακα όπως είναι η ιρουδίνη και τέλος γ) στα αντιπηκτικά όπως είναι η χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH), η τυπική ηπαρίνη (UFH) και το Sintrom ή αλλιώς VKA (Vitamin K Antagonist). Άτομα που πάσχουν από καρκίνο τους χορηγείται LMWH ώστε να αποφευχθεί η αιμορραγία ενώ ασθενείς με συμπτώματα λαμβάνουν αντιθρομβωτικά φάρμακα. Οι ασθενείς χωρίς συμπτώματα ακολουθούν μια υγιεινή ζωή που περιλαμβάνει άσκηση, υγιεινή διατροφή και όχι κάπνισμα, ενώ τους παρέχεται προληπτικά και αντιθρομβωτική αγωγή (46).

## 6. ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

### 6.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Το εγκεφαλικό αποτελεί την κύρια αιτία αναπηριών και μπορεί να οριστεί ως η διακοπή της ροής του αίματος στον εγκέφαλο επειδή μπορεί να γίνει απόφραξη μιας αρτηρίας του εγκεφάλου, γεγονός που οδηγεί σε παράλυση, αλλόκοτη ομιλία, δυσλειτουργία του εγκεφάλου ακόμα και θάνατο. Τα κύτταρα του εγκεφάλου δεν οξυγονώνονται όπως πρέπει και έτσι σταματούν να λειτουργούν φυσιολογικά. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη περιοχή που επηρεάζεται και το μέγεθος της βλάβης. Μπορεί να αφορούν μούδιασμα στο πρόσωπο, το χέρι ή το πόδι, κυρίως στη μία πλευρά του σώματος, αδυναμία στην ομιλία και την όραση, αλλά και ζαλάδα και απώλεια συντονισμού κινήσεων. Ο διαβήτης, η υπέρταση και οι αυξημένες τιμές λιπιδίων, αποτελούν παράγοντες των οποίων οι τιμές χρειάζεται να τροποποιηθούν σημαντικά ώστε να αποφευχθεί το εγκεφαλικό επεισόδιο. Ο τρόπος ζωής (κάπνισμα, παχυσαρκία, ακινησία κ.α.) αποτελεί επίσης ένα παράγοντα κινδύνου που πρέπει να αντιμετωπιστεί (47).

### 6.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ (ΑΕΕ)

Τρεις είναι οι κατηγορίες των ΑΕΕ : α) Ισχαιμικά εγκεφαλικά β) Αιμορραγικά και γ) Παροδικά.

Τα Ισχαιμικά εγκεφαλικά καλύπτουν περίπου το 70-80% του συνόλου των εγκεφαλικών επεισοδίων και εμφανίζονται συνήθως όταν σε ένα αγγείο του αίματος γίνεται απόφραξη και έτσι δεν μπορεί να παροχετεύσει αίμα στον εγκέφαλο. Η εναπόθεση του λίπους στο αγγειακό τοίχωμα οδηγεί στην απόφραξη του αγγείου, κατάσταση η οποία ονομάζεται αθηροσκλήρωση. Δύο είναι οι τύποι απόφραξης που μπορούν να δημιουργηθούν : α) η εγκεφαλική θρόμβωση, όπου ο θρόμβος μπορεί να αναπτυχθεί στο σημείο του αγγείου που είναι φραγμένο και β) η εγκεφαλική εμβολή όπου ο θρόμβος μπορεί να αναπτυχθεί σε άλλο σημείο στο κυκλοφορικό σύστημα όπως στην καρδιά ή στις αρτηρίες του λαιμού. Στη συνέχεια έχουμε τη λύση του θρόμβου και τη μεταφορά του μέσω της κυκλοφορίας στα αγγεία του εγκεφάλου, ώσπου να εντοπίσει μικρό αγγείο που να μπορέσει να το διαπεράσει. Η κολπική μαρμαρυγή αποτελεί αιτία εγκεφαλικής εμβολής. Το πόσο σοβαρό μπορεί να αποβεί ένα ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, εξαρτάται από το μέγεθος και τη σημασία του αγγείου, όπου έγινε η διακοπή της κυκλοφορίας λόγω της δημιουργίας θρόμβου.

Αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια σημειώνονται λόγω ρήξης ενός αγγείου του αίματος ή λόγω ανευρύσματος. Η συχνότερη αιτία αιμορραγικού εγκεφαλικού αποτελεί η δίχως όρια υπέρταση.

Η δημιουργία προσωρινού θρόμβου οδηγεί στα παροδικά εγκεφαλικά επεισόδια, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν το λεγόμενο μικρό-εγκεφαλικό με κίνδυνο την παρουσία κι άλλου εγκεφαλικού (48).

### 6.3 ΑΙΤΙΑ ΑΕΕ

Ο τρόπος ζωής όπως έχει μελετηθεί και ιδιαίτερα οι κακές διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, ο αλκοολισμός, η έλλειψη άσκησης είναι μερικές από τις πιο σοβαρές αιτίες που μπορεί να προκαλέσουν εγκεφαλικά επεισόδια. Στα παραπάνω αίτια μπορούν επίσης να ενταχθούν, η υπέρταση, ο διαβήτης, νόσοι της καρδιάς και η υψηλή χοληστερόλη. Οι παράγοντες αυτοί ωστόσο μπορούν να θεωρηθούν αναστρέψιμοι καθώς ο ασθενής μπορεί να αλλάξει τον τρόπο ζωής του προκειμένου να αποφύγει τον κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου (47). Από την άλλη η ηλικία, το φύλο, κάποιο ιστορικό στην οικογένεια με εγκεφαλικά επεισόδια, ή κάποιο περασμένο εγκεφαλικό σε προηγούμενη ηλικία, αποτελούν παράγοντες μη αναστρέψιμους.

Όταν αυξάνεται η αρτηριακή πίεση μεγαλώνει και ο κίνδυνος ανάπτυξης εγκεφαλικού επεισοδίου, καθώς η υπέρταση αποτελεί τον πιο ισχυρό παράγοντα. Υπάρχουν διαφορές ανάμεσα σε ανδρικό και γυναικείο φύλο όσον αφορά την αύξηση της αρτηριακής πίεσης καθώς σε μικρές ηλικίες παρουσιάζει συχνότητα στους άντρες ενώ μεγαλώνοντας στις γυναίκες.

Η κολπική μαρμαρυγή αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα (μετά την υπέρταση) αιτία ανάπτυξης εγκεφαλικού επεισοδίου. Η νόσος αυτή σχετίζεται με την ροή του αίματος που είναι ακανόνιστη, λόγω ακανόνιστου χτυπήματος στον αριστερό κόλπο της καρδιάς. Άτομα μεγαλύτερης ηλικίας έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού λόγω των νόσων της καρδιάς.

Η αντιμετώπιση των περιστατικών ΑΕΕ εξαρτάται από το είδος και το στάδιο όπου γίνεται αντιληπτό. Ο περιορισμός των παραγόντων που οδηγούν σε εγκεφαλικά καλείται πρόληψη, η θεραπεία σχετίζεται με τη διάλυση του θρόμβου ενώ η αποκατάσταση σχετίζεται με τα προβλήματα που μπορεί να επιφέρει ένα εγκεφαλικό (49).

## 7. MTHFR

### 7.1 Ορισμός

Όταν οι άνθρωποι παρουσιάζουν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης τους αυξημένα, τότε αυτό μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Υπάρχουν όμως και άτομα που εμφανίζουν πιο μικρές αυξήσεις στην ομοκυστεΐνη εξαιτίας μιας μετάλλαξης σε ένα γονίδιο που καλείται MTHFR. Η μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή αποτελεί το ρυθμιστικό ένζυμο που μπορεί να παραχθεί μέσω του γονιδίου MTHFR. Όλοι οι άνθρωποι έχουν δύο γονίδια MTHFR, δηλαδή κληρονομούν ένα από κάθε γονέα. Ορισμένα άτομα μπορούν να εμφανίσουν γενετική μετάλλαξη σε ένα γονίδιο του MTHFR και τα άτομα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ετερόζυγα. Από την άλλη υπάρχουν άτομα που μπορούν να εμφανίσουν γενετική μετάλλαξη και στα δύο γονίδια του MTHFR τους και εκείνα χαρακτηρίζονται ομόζυγα.

Η πιο συχνή μετάλλαξη του MTHFR είναι η MTHFR C677T, η οποία προκύπτει από αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) με τη θυμίνη (T) στο σημείο 677 του γονιδίου C677T

MTHFR. Υπάρχει και μία δεύτερη μετάλλαξη που ονομάζεται A1298C, όπου εδώ γίνεται αντικατάσταση της αδενίνης (A) από την κυτοσίνη (C) στο σημείο 1298 του MTHFR γονιδίου (50).

## 7.2 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ MTHFR

Η μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή, έχει μεγάλη σημασία στις πρωτεΐνες καθώς μπορεί να επεξεργαστεί τα αμινοξέα τους. Το ένζυμο αυτό συμμετέχει σε χημική αντίδραση με το φολικό οξύ, μετατρέποντας 5,10 μεθυλενοτετραϋδροφολικό σε 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό. Αυτό το είδος φολικού οξέος μπορεί να εντοπιστεί στο αίμα και μπορεί να μετατρέψει την ομοκυστεΐνη σε μεθειονίνη. Το αμινοξύ μεθειονίνη χρησιμοποιείται στον οργανισμό του ανθρώπου για την παραγωγή πρωτεϊνών και διάφορων άλλων ενώσεων (51).

## 7.3 Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ MTHFR ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ

Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο του MTHFR που καλούνται και ως πολυμορφισμοί, έχουν την ικανότητα να αλλάζουν ή και να μειώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, και έτσι η ομοκυστεΐνη μπορεί να αυξηθεί λίγο στο αίμα, κατάσταση που καλείται υπερομοκυστεϊναιμία. Η υπερομοκυστεϊναιμία αποτελεί έναν αναδυόμενο παράγοντα κινδύνου για πολλές νόσους της καρδιάς. Όταν τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο αίμα αυξηθούν, τότε εγκυμονούν κίνδυνοι για τον άνθρωπο για πολλές καταστάσεις που μπορεί να αντιμετωπίσει στην καθημερινότητά του, όπως είναι η υπέρταση που προκύπτει από τις υψηλές τιμές της αρτηριακής πίεσης, διάφοροι τύποι καρκίνου, αποβολές αλλά και θρόμβους στο αίμα.

Ύστερα από μελέτες έχει διαπιστωθεί πως άτομα που διαγιγνώσκονται με τον C677T πολυμορφισμό και στα δύο αντίγραφα του MTHFR γονιδίου, εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν από αγγειακές παθήσεις είτε της καρδιάς είτε του εγκεφάλου. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι αιτία επίσης για δύο γενετικά χαρακτηριστικά, το ένα αφορά το χείλος του στόματος και συγκεκριμένα το άνω, στο οποίο εντοπίζεται ένα σχίσμο, και το δεύτερο αφορά ένα άνοιγμα που εντοπίζεται στο στόμα στην οροφή (52).

## 8. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ

### 8.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Ομοκυστεΐνη καλείται ένα μη πρωτεϊνογόνο αμινοξύ, συγκεκριμένα μία θειόλη που εμπεριέχει αμινοξύ και μπορεί να βρίσκεται στο ανθρώπινο σώμα μέσω των υγρών. Προέρχεται από την μεθειονίνη και συγκεκριμένα από την απομεθυλίωσή της και αποτελεί ανάλογο της κυστεΐνης. Η μορφή της ομοκυστεΐνης που είναι οξειδωμένη μπορεί να κυκλοφορεί στο πλάσμα και να ενώνεται με πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης μπορεί να ρυθμιστεί με δύο τρόπους : α) με τη διαδικασία της

επαναμεθυλίωσης σε μεθειονίνη και β) με τη διαδικασία της μεταθείωσης σε κυστεΐνη με τη βοήθεια του ενζύμου β-συνθετάση της κυσταθειόνης (CBS) καθώς και με τη βοήθεια της Β6 βιταμίνης. Το σύνολο της ομοκυστεΐνης στον ορό ή στο πλάσμα οδηγεί στην ολική ομοκυστεΐνη (tHCy). Η λευκωματίνη είναι μια πρωτεΐνη με μεγάλο μοριακό βάρος, που μπορεί να ενωθεί με την ολική ομοκυστεΐνη στο αίμα καθώς η ομοκυστεΐνη σε μεγάλο βαθμό περίπου στο 80%, μπορεί να ενωθεί με τέτοιου είδους πρωτεΐνες (53, 54).

## 8.2 ΥΠΕΡΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΑΙΜΙΑ

Όταν η ομοκυστεΐνη εμφανίζει πολύ υψηλές τιμές στο αίμα τότε αυτό το γεγονός οδηγεί σε πάθηση που καλείται υπερομοκυστεΐναιμία. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου, περιστατικά θρομβώσεων και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, είναι μερικές από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις της πάθησης αυτής. Η εμφάνισή της, μπορεί να οφείλεται σε κληρονομικό χαρακτήρα που αφορά ίσως κάποια γενετική βλάβη σε κάποιο ένζυμο στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης όπως είναι η μετάλλαξη του γονιδίου MTHFR ή η μετάλλαξη της CBS, αλλά μπορεί επίσης να πρόκειται για επίκτητη υπερομοκυστεΐναιμία εξαιτίας της έλλειψης ορισμένων βιταμινών.

Ομοκυστεΐνουρία ονομάζεται η πάθηση κατά την οποία έχουμε αύξηση της ομοκυστεΐνης και απέκκριση της από τον οργανισμό μέσω των ούρων. Πρόκειται για κληρονομικού αυτοσωμικού υπολειπόμενου χαρακτήρα διαταραχή της μεθειονίνης και δημιουργείται εξαιτίας της έλλειψης της CBS (55).

## 8.3 ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΥΠΕΡΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΑΙΜΙΑ

Το φυλλικό οξύ και οι βιταμίνες Β6 και Β12 έχουν την ιδιότητα να μειώνουν τις τιμές της ομοκυστεΐνης στο αίμα, με αποτέλεσμα να μειώνουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακό νόσημα. Τα λαχανικά, ορισμένα όσπρια και τα δημητριακά έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν πολύ σημαντική πηγή φολικού οξέος. Παράλληλα τα συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν τις βιταμίνες Β6 και Β12 καθώς και το φυλλικό οξύ μπορούν να μειώσουν τις τιμές της ομοκυστεΐνης στο αίμα.

Η ομοκυστεΐνη μπορεί να υπολογιστεί με υγρή χρωματογραφία ή φασματοσκοπία αλλά ακόμα και με τη μέθοδο ELISA. Για τον υπολογισμό της χρειάζεται στον άνθρωπο που θα μπει στη διαδικασία μέτρησής της, να δοθούν κατάλληλες οδηγίες που αφορούν τη διατροφή του και τη 12ωρη νηστεία που χρειάζεται να ακολουθήσει το προηγούμενο βράδυ πριν προχωρήσει την επόμενη μέρα σε αιματολογικές εξετάσεις. Επιπλέον είναι πιθανό να του χορηγηθεί μεθειονίνη. Σημαντικό είναι το δείγμα το αίματος που θα ληφθεί από το κάθε άτομο να επεξεργαστεί με ταχύ ρυθμούς καθώς η ομοκυστεΐνη μπορεί να διαρρεύσει πολύ γρήγορα έξω από τα ερυθροκύτταρα (54).

## Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και Υλικά

### 1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ

Το έτος 2017 έως 2020 στο Ιπποκράτειο Αθηνών διενεργήθηκαν 120 αιμοληψίες. Ορισμένοι ασθενείς από αυτούς που εξετάστηκαν, εκδήλωσαν επικίνδυνα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, πολλά είδη θρομβώσεων, ενώ άλλοι προσήλθαν προληπτικά λόγω οικογενειακού ιστορικού. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 40 με τον μεγαλύτερο να αγγίζει τα 72 έτη και τον μικρότερο να είναι μόλις 16 ετών. Πολλές επίσης ήταν οι περιπτώσεις που στο γυναικείο φύλο παρατηρήθηκαν αποβολές. Ειδικότερα ο έλεγχος που διενεργήθηκε αφορούσε τον πλήρη έλεγχο θρομβοφιλίας και πιο συγκεκριμένα οι εξετάσεις που περιλαμβάνονται σε αυτό τον έλεγχο είναι : η δοκιμασία προσυμπτωματικού ελέγχου ή αλλιώς screening test (PT, APTT, προϊόντα αποδομής ινώδους ή αλλιώς D-dimers όπως αποκαλούνται, ινωδογόνο), ATIII, μέτρηση επιπέδων πλασμινογόνου, πρωτεΐνες S και C, μέτρηση APC-R, ανιπηκτικά του λύκου (LLA), μέτρηση αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης (ACA-IgM, ACA-IgG), μέτρηση αντισωμάτων B2 γλυκοπρωτεΐνης 1 (anti-B2 GPI IgG, anti-B2 GPI IgM) μέτρηση της ομοκυστεΐνης, μετάλλαξη MTHFR (A1298 και C677T) , μετάλλαξη για τον παράγοντα V LEIDEN και τον παράγοντα IIG202I OA.

Από τους 120 ασθενείς οι 35 ήταν άνδρες και οι 85 γυναίκες. Από εκείνους, οι 52 εμφάνισαν θρομβώσεις, οι 32 είχαν αποβολές άρα μιλάμε για γυναίκες μόνο, οι 24 προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού και οι υπόλοιποι 12 ασθενείς εμφάνισαν ΑΕΕ. Η συλλογή όλων των δειγμάτων καθώς και ο έλεγχος που διενεργήθηκε στα εργαστήρια, πραγματοποιήθηκε Ιπποκράτειο Αθηνών.

ΠΑΘΗΣΕΙΣ	ΠΛΗΘΟΣ (N)
Θρομβώσεις	52
Αποβολές	32
Προληπτικός έλεγχος	24
ΑΕΕ	12

**Πίνακας 1** : Οι παθήσεις που καταγράφηκαν από τους ασθενείς που μελετήθηκαν αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα.

### 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η έρευνα έλαβε μέρος σε δύο φάσεις. Η πρώτη αφορούσε τη συλλογή των δειγμάτων και την καταγραφή των στοιχείων των ασθενών σε ότι αφορά την ημερομηνία που λήφθηκαν τα δείγματα, το φύλο, την ηλικία και κυρίως το οικογενειακό ιστορικό. Μετά τη λήψη των δειγμάτων συνέχεια είχε η πραγματοποίηση του πλήρη ελέγχου για θρομβοφιλία και σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν μεταλλάξεις που μπορεί να προκλήθηκαν όπως είναι το PAI-1, GPIa κ.α.

## 2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΘΟΔΩΝ

Ο μοριακός έλεγχος των μεταλλάξεων όπως είναι η μετάλλαξη του MTHFR (C677T, A1298C), καθώς και του παράγοντα V LEIDEN και της προθρομβίνης IIIG20210A, πραγματοποιείται με τεχνική που αφορά την REAL Time PCR. Οι τιμές της ομοκυστεΐνης των ασθενών και πολλών άλλων εξετάσεων που αναφέρονται παρακάτω, μετρήθηκαν σε ειδικό αναλυτή που λέγεται BCS XP της SIEMENS.

## 3. MTHFR

### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για το ένζυμο MTHFR έχουμε αναλύσει πως πρόκειται για μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και μπορεί να επηρεάζει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης. Διάφορες μεταλλάξεις του MTHFR όπως C677T και η A1298C κ.α., προκαλούν αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης στο αίμα και μπορούν να προκαλέσουν θρομβοφιλία.

### 3.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MTHFR

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται στην πραγματικού χρόνου RT-PCR. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιούνται :

- Πιπέτες και tips χωρητικότητας 10μl ή 100μl
- Ταq πολυμεράση
- Νουκλεοτίδια dNTPs
- Εκκινητές της DNA πολυμεράσης 15μl
- Καθαρή αιθανόλη και ξυλόλη και απομόνωση DNA
- Αντιδραστήρια 20 rxns
- MTHFR 1298 wild type PCR / Mutant PCR μείγματος 430μl

### 3.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

Για την απομόνωση του DNA προσθέτουμε πυκνή αιθανόλη στο διάλυμα, η οποία με την παρουσία άλατος μπορεί να κάνει το DNA υδρόφοβο. Εφαρμόζουμε το διάλυμα σε στήλη με silica και φυγοκεντρούμε. Το DNA μπορεί έτσι να προσδεθεί στη στήλη όπου απομακρύνονται διάφορα κυτταρικά στοιχεία και πρωτεΐνες. Στη συνέχεια εφαρμόζεται αιθανόλη αραιή στη στήλη και φυγοκεντρούμε ξανά. Απομακρύνεται έτσι το άλας και το DNA μεταπίπτει ξανά σε υδρόφιλο. Τέλος εφαρμόζουμε αλκαλικό διάλυμα έκλουσης ή νερό, στη στήλη και φυγοκεντρούμε ώστε να γίνει η αποδέσμευση από τη στήλη του DNA.

Το DNA που έχει απομονωθεί, τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή, όπου εκεί η φθορίζουσα ουσία μπορεί να συνδεθεί με το δίκλωνο DNA και έτσι αυτό μπορεί να φθορίζει. Συνεπώς γίνεται αντιληπτό πως η ένταση του φθορισμού, εξαρτάται από την ποσότητα που απαιτείται για το παραγόμενο προϊόν. Το προϊόν της αντίδρασης υβριδοποιεί ιχνηθέτες οι οποίοι εκπέμπουν φθορισμό, που μετράται κατά την

αντίδραση. Αυτός ο φθορισμός εξαρτάται από τον πληθυσμό των αλληλουχιών που μπορεί να παραχθούν στους θερμοδυναμικούς κύκλους.

### 3.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην RT-PCR, δηλαδή στη διαδικασία που ακολουθείται για τον πολλαπλασιασμό μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR), ενώ παράλληλα ανιχνεύει το παραγόμενο προϊόν σε σύντομο και πραγματικό χρόνο με τη χρήση χρωστικών που φθορίζουν.

Τα κύρια στάδια της PCR είναι 3 και μπορούν να επαναλαμβάνονται διαδοχικά.

- Αποδιάταξη : Οι αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται όταν βρεθούν σε θερμοκρασίες 94-95°C για 30''-1'.
- Υβριδισμός των εκκινητών : Όταν οι εκκινητές βρεθούν σε μειωμένες θερμοκρασίες έως 55-65°C για 30''-1', τότε υβριδίζονται στις αλληλουχίες τις συμπληρωματικές τους στο εκμαγείο στο DNA.
- Επιμήκυνση : Η αύξηση της θερμοκρασίας στη μεγαλύτερη θερμοκρασία που μπορεί να δράσει η πολυμεράση (η Taq μπορεί να δράσει έως τους 72°C), οδηγεί στη σύνθεση μιας νέας αλυσίδας. Η πολυμεράση μπορεί να οδηγήσει στην επιμήκυνση των εκκινητών, εισάγοντας dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια) έχοντας ως καλούπι συμπληρωματική αλυσίδα DNA.

Η ίδια μοριακή διαδικασία ακολουθείται και για τον παράγοντα V LEIDEN και FIIG20210A.

## 4. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ (SCREENING TEST)

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το screening test περιλαμβάνει τη μέτρηση του PT, APTT, ινωδογόνου και των Δ-Διμερή. Τα control P+N είναι αναλυόμενα υλικά ελέγχου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η απόκλιση της ανάλυσης σε ένα φυσιολογικό εύρος τιμών, πολλών αναλυόμενων ουσιών όπως είναι ο χρόνος προθρομβίνης (PT), το APTT ή αλλιώς ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης, το ινωδογόνο, τα αντιπηκτικά του λύκου, το πλασμινογόνο και διάφοροι άλλοι παράγοντες πήξης ή και αναστολείς. Τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν και τα δύο να χρησιμοποιηθούν σε αυτόματους αναλυτές πήξης. Τα πλάσματα ελέγχου control N+P αποτελούν λυοφιλισμένα αντιδραστήρια τα οποία περιέχουν πλάσμα ανθρώπου, το οποίο έχει συλλεχθεί από δότη ο οποίος είναι υγιής, σταθεροποιητή, καθώς και HEPES το οποίο έχει ανασυσταθεί 12g/L. Για τη φύλαξη αυτών των controls απαιτείται θερμοκρασία 2-8°C ενώ η σταθερότητα τους επιτυγχάνεται στους 15-25°C αφού έχουν ανασυσταθεί σε κλειστό φιαλίδιο και σε



θερμοκρασία  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  πάλι αφού έχουν ανασυσταθεί, για 4 εβδομάδες. Τα controls αυτά δεν έχουν συντηρητικά.

Η προετοιμασία τους απαιτεί τα εξής βήματα :

- Ανακίνηση των controls N+P με προσθήκη 1,0 mL απεσταγμένου νερού
- Ανακινούμε προσεχτικά για να γίνει η διάλυση των συστατικών χωρίς να δημιουργηθεί αφρός
- Αφήνουμε σε ηρεμία στους  $15-25^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά
- Ανακινούμε ξανά προσεχτικά πριν από τη χρήση

#### 4.2 ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ (PT)

Για την ποσοτικό προσδιορισμό του PT, χρησιμοποιείται το in vitro διαγνωστικό αντιδραστήριο Thromborel® S. Το αντιδραστήριο αυτό βοηθά στη διάγνωση και στον έλεγχο των αιμοστατικών διαταραχών και συμβάλλει στην παρακολούθηση της αντιπηκτικής θεραπείας έχοντας ανταγωνιστή τη βιταμίνη K. Πρόκειται για λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο θρομβοπλαστίνης που μπορεί να προέλθει από τον πλακούντα του ανθρώπου. Ξεκινά την πήξη με την εξωγενή και την κοινή οδό μέσω της εξέτασης του PT. Ο χρόνος προθρομβίνης είναι μια εξέταση σημαντική καθώς ανιχνεύει ανωμαλίες της πήξης και χρησιμοποιείται στην παρακολούθηση της αντιπηκτικής θεραπείας μέσω του στόματος σε ασθενείς που παίρνουν ανταγωνιστές της K βιταμίνης, για να ελέγχει τις αιμορραγικές διαταραχές, για να βοηθάει στη διάγνωση αιμοστατικών διαταραχών, για να ελέγχει τη συγκέντρωση του ινωδογόνου και για να αξιολογεί τον προ εγχειρητικό έλεγχο αιμορραγίας. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει ξηρό πλακούντα που έχει ανασυσταθεί  $\leq 60$  g/L, χλωριούχο Ca ανασυσταμένο  $\approx 1,5$  g/L, σταθεροποιητή και διάφορα συντηρητικά. Φυλάσσεται σε θερμοκρασίες  $2-8^{\circ}\text{C}$  και σταθεροποιείται ανασυσταμένο σε ανοιχτό φιαλίδιο στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 8 ώρες, στους  $15-25^{\circ}\text{C}$  για 2 ημέρες και στους  $2-8^{\circ}\text{C}$  για 5 ημέρες σε κλειστό φιαλίδιο. Η ανασύσταση του Thromborel® S πραγματοποιείται με προσθήκη απεσταγμένου νερού, ανακινώντας το στη συνέχεια 8-10 φορές και θερμαίνοντας το φιαλίδιο στους  $37^{\circ}\text{C}$  πριν χρησιμοποιηθεί. Αφού το αντιδραστήριο φτάσει στους  $37^{\circ}\text{C}$  στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στην ίδια θερμοκρασία για 30 λεπτά, και έπειτα ανακίνηση καλή πριν από τη χρήση.

Για τη συλλογή του δείγματος χρειάζεται να αναμείξουμε 9 μέρη αίματος ασθενούς που έχει συλλεχθεί πρόσφατα με 1 μέρος 0,11 ή 0,13 mol/L διαλύματος κιτρικού νατρίου.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διαδικασία της πήξης που σηματοδοτείται με την επώαση του πλάσματος έχοντας την καλύτερη ποσότητα ασβεστίου και θρομβοπλαστίνης. Έτσι μετράτε ο χρόνος που χρειάζεται για να σχηματιστεί ένας θρόμβος ινώδους.

#### 4.3 ΧΡΟΝΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΡΙΚΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΛΑΣΤΙΝΗΣ (APTT)

Η εξέταση που αφορά την μέτρηση του APTT, αποτελεί μια διαδικασία ελέγχου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογηθούν οι ανωμαλίες της πήξης στην ενδογενή οδό αλλά και να παρακολουθηθούν αιμορραγικές και θρομβωτικές νόσοι και να ανιχνευθούν λειτουργικές ανεπάρκειες πολλών παραγόντων όπως FII, FX, FV ή και του ινωδογόνου (56, 57). Ο APTT αποτελεί επίσης μέσο παρακολούθησης που αξιολογεί το αποτέλεσμα της θεραπείας με ηπαρίνη μη κλασματοποιημένη όπου υπάρχει παράταση του χρόνου πήξεως όσον αφορά το επίπεδο ηπαρίνης. Ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή μέσω του στόματος τα επίπεδα των παραγόντων FII, FVII, FIX και FX παρατηρούνται μειωμένα άρα αναμένεται ο APTT να είναι παρατεταμένος (57, 58). Παράταση του APTT παρατηρείται επίσης με τη παρουσία αντιπηκτικών του λύκου που θεωρούνται μη ειδικοί αναστολείς (59).

Το Pathromtin® SL αποτελεί in vitro αντιδραστήριο (υγρό) που συμμετέχει στην ποσοτική μέτρηση του APTT και συμβάλλει στη διάγνωση των αιμοστατικών διαταραχών και στην παρακολούθηση της μη κλασματοποιημένης μορφής της ηπαρίνης σε πλάσματα ανθρώπου που έχουν κιτρικό νάτριο, με αυτοματοποιημένες μεθόδους ανάλυσης πήξης. Το αντιδραστήριο αυτό βασίζεται σε φωσφολιπίδια που είναι φυτικά, με σωματίδια που περιέχουν διοξείδιο του πυριτίου και ενεργοποιούν το πλάσμα. Περιέχει επίσης λεκιθίνη σόγιας, χλωριούχο νάτριο, HEPES με pH 7,6 και αζίδιο του νατρίου (<1g/L) που είναι συντηρητικό. Φυλάσσεται στους 2-8°C και η σταθερότητα του επιτυγχάνεται στους 2-25°C για 2 εβδομάδες αφού έχει ανοιχθεί. Η παρασκευή του επιτυγχάνεται με ήπια αναστροφή 5-8 φορές σε θερμοκρασία δωματίου και για κάθε 24 ώρες που χρησιμοποιείται, το αντιδραστήριο θα πρέπει να αναστρέφεται ώστε να έρθει στην επιφάνεια τυχόν ίζημα.

Για να συλλεχθεί το δείγμα γίνεται ανάμειξη 1 μέρος 0,11 ή 0,13 mol/L κιτρικού νατρίου με 9 μέρη πρόσφατου συλλεγμένου αίματος με αποφυγή σχηματισμού αφρού. Τα δείγματα αυτά που βασίζονται στο πλάσμα, πρέπει να συλλέγονται με φλεβοκέντηση. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 1500 στροφές, αφαιρείται το υπερκείμενο πλάσμα και διατηρείται έτσι στους 15-25°C έως 4 ώρες μέχρι να χρησιμοποιηθεί για εξέταση.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην επώαση του πλάσματος με τον αριθμό των φωσφολιπιδίων να είναι ο βέλτιστος και έναν ενεργοποιητή επιφανειακό, που οδηγούν στην ενδογενή οδό του συστήματος πήξης, στην ενεργοποίηση των παραγόντων. Με την προσθήκη ιόντων Ca σηματοδοτείται η διαδικασία της πήξης. Έτσι μπορεί να μετρηθεί ο χρόνος έως ότου σχηματιστεί θρόμβος ινώδους.

#### 4.4 ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ

Το ινωδογόνο αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη, που προέρχεται από το ήπαρ και έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία θρόμβου ινικής. Η θρομβίνη μπορεί να διασπά το ινωδογόνο δημιουργώντας μονομερή ινώδους τα οποία μπορούν να πολυμεριστούν αυθόρμητα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ασταθή θρόμβου ινικής, που μπορεί

να σταθεροποιηθεί από σταυροδεσμούς. Η ποσότητα αλλά και η λειτουργία του ινωδογόνου στο πλάσμα μπορεί να μεταβληθεί από κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές. Όσον αφορά τις κληρονομικές διαταραχές, μπορεί να μειώσουν τη συγκέντρωση του ινωδογόνου ή να μετατρέψουν την πρωτεΐνη σε δυσλειτουργική. Από την άλλη μια επίκτητη διαταραχή μπορεί να είναι αποτέλεσμα αυξημένης κατανάλωσης ή χαμηλών τιμών σύνθεσης σε νόσο ηπατική (60-63).

Το Multifibren® U, αποτελεί ένα in vitro αντιδραστήριο διάγνωσης που συμβάλλει στην ποσοτική μέτρηση του ινωδογόνου. Το αντιδραστήριο αυτό αποτελεί προτυποποιημένη μέθοδο προσδιορισμού του ινωδογόνου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση και στην παρακολούθηση του ινωδογόνου όσον αφορά τους ασθενείς που κινδυνεύουν ή έχουν διάχυτη ενδογγειακή διαταραχή πήξης. Είναι λυοφιλιζμένο αντιδραστήριο που περιέχει θρομβίνη, χλωριούχο νάτριο και ασβέστιο και διάφορες άλλες ουσίες, μπορεί να φυλάσσεται στους 2-8°C και να σταθεροποιείται ανασυσταμένο, στους 37°C για 8 ώρες, για 1 ημέρα στους 15-25°C, για 5 ημέρες στους 2-8°C και σε θερμοκρασίες ≤-20°C για 2 μήνες. Για τη συλλογή του δείγματος, αναμιγνύουμε 1 μέρος κιτρικού νατρίου 0,11 mol/L με 9 μέρη αίματος φλεβικού και φυγοκεντρούμε το δείγμα στις 1500 στροφές για 15 λεπτά. Έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και το φυλάσσουμε στους 15-25°C μέχρι να εξεταστεί.

Η διαδικασία της εξέτασης περιλαμβάνει θέρμανση του αντιδραστηρίου Multifibren® U στους 37°C πριν χρησιμοποιηθεί και μεταφορά με τη βοήθεια πιπέτας σε δοκιμαστικό σωλήνα πήξης, αφού έχει προθερμαθεί στους 37°C, 100μL δείγματος. Επωάζουμε για 60 sec στους 37°C και έπειτα προσθέτουμε 200μL από το αντιδραστήριο μας. Έτσι μπορούμε να προσδιορίσουμε το χρόνο πήξης.

Για τη καμπύλη αναφοράς ο προσδιορισμός πραγματοποιείται με Fibrinogen Calibrator. Όσον αφορά και τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας το φυσιολογικό εύρος εξαρτάται από την τιμή του Control N ενώ οι παθολογικές τιμές εξαρτώνται από τις τιμές του Control P. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει είτε με εσωκλειόμενο πίνακα είτε με καμπύλη αναφοράς.

Για τον προσδιορισμό του ινωδογόνου χρησιμοποιούνται επίσης τα calibrator 1 – calibrator 6, τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία καμπύλων αναφοράς που βοηθούν στον προσδιορισμό του ινωδογόνου με τη μέθοδο Clauss μέσω του αναλυτή Siemens (64). Και τα 6 αυτά calibrators είναι λυοφιλιζμένα αντιδραστήρια που περιέχουν πλάσματα ανθρώπου, buffer και σταθεροποιητή HEPES. Φυλάσσονται στους 2-8°C και σταθεροποιούνται σε θερμοκρασίες 15-25°C ανασυσταμένα για 4 ώρες και στους -20°C ανασυσταμένα για 4 εβδομάδες. Τα αντιδραστήρια αυτά πριν χρησιμοποιηθούν πρέπει να ανασυσταθούν με 1,0mL απεσταγμένου νερού, αναδεύοντας ήπια ώστε να διαλυθούν χωρίς να σχηματίσουν αφρό. Τα αφήνουμε ακίνητα για 15 λεπτά στους 15-25°C και ανακινούμε ξανά πριν τη χρήση τους. Με τη καμπύλη βαθμονόμησης εκτιμάται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, με τα κατάλληλα πρότυπα υλικά ελέγχου.

#### 4.4 Δ-ΔΙΜΕΡΗ (D-DIMER)

Το Δ-διμερές αποτελεί ένα δείκτη που ενεργοποιεί την ινωδόλυση και την πήξη άρα αποτελεί και δείκτη της δραστηριότητας της θρόμβωσης. Μπορεί να σχηματιστεί με τη διαδοχική δράση της πλασμίνης, του παράγοντα FXIII και της θρομβίνης. Αρχικά η θρομβίνη μετατρέπει σε ινώδες το ινωδογόνο και μπορεί να ενεργοποιήσει τον FXIII παράγοντα. Έπειτα ο παράγοντας FXIIIa μπορεί να συνδέσει με ομοιοπολικό τρόπο, χρησιμοποιώντας δεσμούς διασταυρούμενους, τις D περιοχές των μονομερών ινώδους που βρίσκονται γειτονικά και σε τελικό στάδιο, η πλασμίνη μπορεί να διασπάσει το υπόστρωμα ινώδους σε καθορισμένα σημεία και έτσι αφού διασπαστεί το διασυνδεδεμένο ινώδες με τον παράγοντα FXIIIa, δημιουργούνται D-διμερή. Το D-διμερές μπορεί να αποβληθεί από το νεφρό και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και έχει μισό χρόνο ζωής στο πλάσμα για περίπου 8 ώρες. Σε καρκινικές καταστάσεις, σε χειρουργικές επεμβάσεις, σε εγκυμοσύνες, σε διάχυτες ενδοαγγειακές διαταραχές της πήξης, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις κ.α., είναι μερικές από τις καταστάσεις όπου σημειώνονται υψηλά παθολογικά επίπεδα των D-διμερών (65-67).

Το INNOVANCE® D-Dimer αποτελεί το in vitro αντιδραστήριο για την ποσοτική μη προτυποποιημένη μέθοδο προσδιορισμού των D-Dimers, που συμβάλλουν στον αποκλεισμό της DVT και της πνευμονικής εμβολής. Χρησιμοποιείται επιπλέον ως μέσο για τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών σε υπερπηκτικές καταστάσεις που βρίσκονται σε κίνδυνο ή κατέχουν σημεία διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης ή οτιδήποτε άλλη διαταραχή που αφορά την υπερπηκτικότητα. Το INNOVANCE® D-Dimer, είναι λυοφιλισμένο αντιδραστήριο που περιέχει ανθρώπινη αλβουμίνη, σωματίδια από πολυστυρένιο και ρυθμιστικά συντηρητικά διαλύματα. Φυλάσσεται στους 2-8°C και η σταθερότητα επιτυγχάνεται στους 2-8°C και στους ≤-18°C για 4 εβδομάδες.

Για την προετοιμασία του αντιδραστήριου ακολουθούμε τα εξής βήματα:

1. Αρχικά γίνεται η ανασύσταση με 4,0 mL απεσταγμένου νερού. Ανακινούμε 3 φορές και αφήνουμε στους 15-25°C για 15 λεπτά
2. Πριν τοποθετηθεί στο σύστημα, ανακινούμε ξανά 3 φορές αποφεύγοντας τους αφρούς, και αφαιρώντας τυχόν φυσαλίδες
3. Χωρίζουμε σε κλάσματα σε ένα άδειο φιαλίδιο και απορρίπτουμε τα άδεια φιαλίδια εάν δεν χρησιμοποιηθούν μέχρι την κατανάλωση του κιτ
4. Αποψύχουμε στους 37°C για 10 min και αναμιγνύουμε. Έτσι το φιαλίδιο δεν αποθηκεύεται πλέον στους 2-8°C. Αποφεύγεται η κατάψυξη ξανά μετά την απόψυξη

Για τη συλλογή του δείγματος χρησιμοποιείται πλάσμα με κιτρικά φτωχό σε αιμοπετάλια. Αναμιγνύουμε προσεχτικά 1 μέρος από το διάλυμα κιτρικού νατρίου (0,11 mol/L) με 9 μέρη από φλεβικό αίμα, χωρίς να δημιουργηθεί αφρός. Φυγοκεντρούμε το σωληνάριο με το αίμα αφού έχει συλλεχθεί, για 15 λεπτά στις

1500-2500 στροφές. Τέλος τοποθετούμε ακόμη μια φορά το πλάσμα το θολερό σε διαύγαση με τη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε περίπου 1500 στροφές.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε σωματίδια πολυστυρενίου που έχουν επικάλυψη ομοιοπολική με αντίσωμα μονοκλωνικό, τα οποία μπορούν να συσσωρευτούν μέσω της ανάμειξης με δείγματα που φέρουν Δ-διμερή. Σημειώνεται πως ο επίτοπος του μονοκλωνικού αντισώματος μπορεί να εμφανιστεί 2 φορές, και άρα ένα αντίσωμα μπορεί να είναι αρκετό για να ξεκινήσει μια αντίδραση συσσωμάτωσης, που στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευτεί θολοσιμετρικά με αύξηση της θολερότητας (68).

Το INNOVANCE D-Dimer Control 1+2 αποτελούν αναλυόμενα υλικά ελέγχου που αξιολογούν την ακρίβεια και το αναλυτικό συστηματικό σφάλμα στις φυσιολογικές και παθολογικές ζώνες τιμών, για να προσδιοριστεί το D-διμερές στους αναλυτές Siemens και SYSMEX. Και τα δυο controls είναι λυοφιλισμένα και περιέχουν πλάσματα ανθρώπου και συντηρητικά, ενώ φυλάσσονται στους 2-8°C και σταθεροποιούνται ανασυσταμένα στους 15-25°C για 8 ώρες, στους 2-8°C για 7 ημέρες και στους  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  για 4 εβδομάδες.

## 5. ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΤΟΥ ΛΥΚΟΥ (LLA)

### 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιπηκτικά του λύκου (LA) ανήκουν στην οικογένεια των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και μπορούν να στραφούν εναντίον φωσφολιπιδίων που είναι φορτισμένα αρνητικά αλλά και στα συμπλέγματα που δημιουργούν τα φωσφολιπίδια με τις πρωτεΐνες. Όταν τα αντιπηκτικά του λύκου προσδιορίζονται μέσω της ικανότητας τους να παρατείνουν τις δοκιμές που βασίζονται στα φωσφολιπίδια (APTT, SCT, dRVVT), τότε τα αντισώματα αυτά μπορούν να ονομαστούν εν συντομία, LA. Σε όσους ασθενείς εντοπίζονται αντιπηκτικά του λύκου, εγκυμονούν κίνδυνοι για θρομβώσεις και για συνεχόμενες αποβολές (69).

### 5.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία πρέπει να διενεργείται με βάση τις συστάσεις για τις εξετάσεις αιμόστασης.

- Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε πλαστικό σωληνάριο ή γυαλί από σιλίκονη, που περιέχει διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,109M/ 1 vol. κιτρικού νατρίου σε 9 vol. αίματος.
- Η απομάκρυνση των αιμοπεταλίων από το πλάσμα, πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών σε 2000-2500 στροφές. Έπειτα λαμβάνουμε το υπερκείμενο του πλάσματος και επαναλαμβάνουμε μια δεύτερη φυγοκέντρηση στα ίδια λεπτά και στις ίδιες στροφές. Ο μέγιστος αριθμός των αιμοπεταλίων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 10.000/mm<sup>3</sup>.

- Με αυτές τις συνθήκες το πλάσμα μπορεί να διατηρηθεί για 4 ώρες σε θερμοκρασίες  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

### 5.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την ανασύσταση των αντιδραστηρίων πραγματοποιούμε σε φιαλίδιο την ανάμειξη των παρακάτω :

- STA®-Staclot® dRVV Screen ② με 2 ml νερό απεσταγμένο
- STA®-Staclot® dRVV Screen ⑤ με 5 ml νερό απεσταγμένο
- STA®-Staclot® dRVV Confirm με 2 ml νερό απεσταγμένο

Αφήνουμε έπειτα το διάλυμα για σταθεροποίηση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 30 λεπτά. Έπειτα γίνεται ανάδευση ώστε να έχουμε ένα ομογενές εναιώρημα.

### 5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία ξεκινά με τον καθορισμό πεδίου αναφοράς, όπου χρειάζονται τουλάχιστον 20 πλάσματα ανθρώπου που να είναι φυσιολογικά. Τα ανθρώπινα αυτά φυσιολογικά πλάσματα, αν και εφόσον το αποτέλεσμα τους βρίσκεται εντός αυτού του πεδίου, θα δοκιμαστούν σε κάθε σειρά ώστε να χρησιμοποιηθούν για να υπολογιστούν ακριβής οι αναλογίες.

Τα πλάσματα χρησιμοποιούνται στην αρχική τους μορφή και τοποθετούνται στον αναλυτή STACLOT όπου γίνεται η επιλογή για την εξέταση για τα LA.

Τα controls, που χρησιμοποιούνται ως έχουν, είναι επίσης σημαντικοί μάρτυρες για τον ποιοτικό έλεγχο δηλαδή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων και χρειαζόμαστε ένα θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα, STA®- Control LA 1+2.

Τέλος ο χρόνος πήξης των πλάσμάτων που εξετάζονται μπορεί να πραγματοποιηθεί αυτόματα με τον αναλυτή όπως φορτώνονται να δείγματα διαδοχικά.

## 6. ΠΡΩΤΕΙΝΗ S (PrS)

### 6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη S αποτελεί και εκείνη πρωτεΐνη του πλάσματος που εξαρτάται από τη βιταμίνη K και δεν έχει δράση εστερασική. Ο βασικότερος ρόλος της είναι η αντιπηκτική της δράση, και είναι ο συμπαράγοντας PrC (70). Οι ανεπάρκειες της PrS μπορούν να διακριθούν σε συγγενείς και επίκτητες. Οι συγγενείς ανεπάρκειες της πρωτεΐνης, κατηγοριοποιούνται σε 3 κατηγορίες (τύπου I, II, III) (71).

### 6.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Η αιμοληψία πραγματοποιείται σε πλαστικά σωληνάρια με κιτρικό νάτριο 0,109M / 1 vol. κιτρικού νατρίου για 9 vol. αίματος.

- Συνέχεια έχει η φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2500 στροφές.
- Διατηρούμε το πλάσμα για 4 ώρες στους  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

### 6.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την ανασύσταση των φιαλιδίων του κάθε αντιδραστηρίου 1 (ανθρώπινο λυοφιλιωμένο πλάσμα χωρίς S πρωτεΐνη), 2 (ανθρώπινη ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C), 3 (λυοφιλιωμένο παρασκεύασμα που έχει βόειο Va παράγοντα), αναμιγνύουμε το περιεχόμενό τους με 1 ml νερό απεσταγμένο. Η σταθεροποίηση του διαλύματος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 18-25°C (θερμοκρασία δωματίου) για 60 λεπτά. Τέλος ομογενοποιούμε πριν τη χρήση τους. Αν τα αντιδραστήρια διατηρηθούν όπως ήταν αρχικά και σταθερά στους 2-8°C, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης τους.

### 6.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της δοκιμασίας στηρίζεται στο συμπαράγοντα της PrS όσον αφορά τη δραστηριότητα του, που μπορεί να ενισχύσει την αντιπηκτική δράση της C πρωτεΐνης.

Αρχικά γίνεται βαθμονόμηση του αναλυτή με STA®- Unicalibrator. Τα εξεταζόμενα πλάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή και όταν τοποθετηθούν στον αναλυτή STAR MAX 3, επιλέγονται οι εξετάσεις της πρωτεΐνης S που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στα πλάσματα των ασθενών. Δεν παραλείπονται ξανά τα controls, STAR®- System Control N + P, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καθαρή μορφή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας. Κατά τη διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων στον αναλυτή πραγματοποιείται αυτόματα η ποσοτική μέτρηση της πρωτεΐνης S, η οποία θα πρέπει να εκτελείται αμέσως μετά το στάδιο της βαθμονόμησης. Σε περίπτωση που κάποιο πλάσμα βρεθεί εκτός ορίων, τότε το μηχάνημα πραγματοποιεί αυτόματα την απαραίτητα αραιώση του δείγματος (αφού η ρύθμιση αυτή έχει εισαχθεί στις παραμέτρους της εξέτασης) και επαναλαμβάνεται η μέτρηση.

## 7. ΠΡΩΤΕΙΝΗ S Ag FREE (PrSAgFree)

### 7.1 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία πρέπει να διενεργείται με βάση τις συστάσεις για τις εξετάσεις αιμόστασης.

- Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε πλαστικό σωληνάριο, που περιέχει διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,109M/ 1 vol. κιτρικού νατρίου σε 9 vol. αίματος.
- Συνέχεια έχει η φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2500 στροφές.

- Με αυτές τις συνθήκες το πλάσμα μπορεί να διατηρηθεί για 4 ώρες σε θερμοκρασίες  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

## 7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια 1 και 2, πριν ανοιχθούν πρέπει να σταθεροποιηθούν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν τη χρήση πρέπει να ομογενοποιηθούν χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αν διατηρηθούν στην αρχική τους κατάσταση στους 2-8°C και είναι σταθερά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης τους.

## 7.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στα μικροσωματίδια λάτεξ με την αύξηση των τιμών της θολερότητας του εναιωρήματος τους, η οποία μετρήθηκε με μέθοδο φωτομετρική. Η αύξηση αυτή της θολερότητας, οδηγεί στην αύξηση της απορροφητικότητας του μέσου μέσω της αντίδρασης αντιγόνου αντισώματος προκαλώντας συγκόλληση των μικροσωματιδίων. Το εύρος της αύξησης βασίζεται στην ποσότητα της PrsAgFree στο πλάσμα που εξετάζεται.

Αρχικά εκτελείται η βαθμονόμηση του αναλυτή, για όλη την παρτίδα αντιδραστηρίων, η οποία επαληθεύεται προσδιορίζοντας την ελεύθερη πρωτεΐνη S, με τη βοήθεια δύο controls, εκ των οποίων το ένα θεωρείται φυσιολογικό STA®-Liatest® Control N, και το άλλο παθολογικό STA®-Liatest® Control P. Τα εξεταζόμενα πλάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή και όταν τοποθετηθούν στον αναλυτή STARCLOT, επιλέγονται οι εξετάσεις της πρωτεΐνης SAgFree που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στα πλάσματα των ασθενών. Απαραίτητα ξανά είναι τα controls, STAR®-Liatest®Control N + P, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καθαρή μορφή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης S για τα εξεταζόμενα πλάσματα, διενεργείται αυτόματα με τη βοήθεια του μηχανήματος στα 540 nm με βάση τη φόρτωση των δειγμάτων.

## 8. ΠΡΩΤΕΙΝΗ C (PrC)

### 8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη C συγκαταλέγεται στην ομάδα πρωτεΐνων της βιταμίνης K που εξαρτώνται από την πήξη και δημιουργείται στο ήπαρ. Εντοπίζεται στο πλάσμα με τη μορφή προ ενζύμου ενώ μεταπίπτει σε ενεργό ένζυμο με τη βοήθεια της θρομβίνης, του ασβεστίου και των φωσφολιπιδίων. Η πρωτεΐνη C μπορεί να ανασταλθεί μέσω του αναστολέα της ενεργοποιημένης PrC καθώς και της  $\alpha_1$ -αντιτρυψίνης (72).

### 8.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία πρέπει να διενεργείται με βάση τις συστάσεις για τις εξετάσεις αιμόστασης.



- Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε πλαστικό σωληνάριο, που περιέχει διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,109M/ 1 vol. κιτρικού νατρίου σε 9 vol. αίματος.
- Συνέχεια έχει η φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 2500 στροφές.
- Με αυτές τις συνθήκες το πλάσμα μπορεί να διατηρηθεί για 8 ώρες σε θερμοκρασίες  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

### 8.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία 2-8°C, όπως ήταν αρχικά και να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης τους.

Όσον αφορά το Αντιδραστήριο 1, στο κάθε φιαλίδιο προσθέτουμε 3 ml απεσταγμένο νερό. Αφού σταθεροποιηθεί το διάλυμα για 60 min σε 18-25°C (θερμοκρασία δωματίου), ανακινούμε ελαφρώς και έπειτα βάζουμε ένα καινούριο STA®-mini Reducer καθώς και το καψύλλιο.

Για το Αντιδραστήριο 2, προσθέτουμε σε κάθε φιαλίδιο 6 ml απεσταγμένο νερό. Σε αντίθεση με το Αντιδραστήριο 1, εδώ δεν ανακινούμε το φιαλίδιο, αλλά αφήνουμε το διάλυμα για 60 min να σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ανακινούμε ελαφρώς τοποθετώντας ένα καινούριο STA®-mini Reducer καθώς και το καψύλλιο.

### 8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά εκτελείται η βαθμονόμηση του αναλυτή με STA®- Unicalibrator. Τα εξεταζόμενα πλάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή και όταν τοποθετηθούν στον αναλυτή STARCLOT, επιλέγονται οι εξετάσεις της πρωτεΐνης C που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στα πλάσματα των ασθενών. Δεν παραλείπονται ξανά τα controls, STAR®- System Control N + P, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καθαρή μορφή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας. Όσον αφορά την ποσοτική μέτρηση της PrC για τα εξεταζόμενα πλάσματα, διενεργείται αυτόματα με τη βοήθεια του μηχανήματος στα 405 nm με βάση τη φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που κάποιο πλάσμα βρεθεί εκτός ορίων, τότε το μηχάνημα πραγματοποιεί αυτόματα την απαραίτητα αραιώση του δείγματος (αφού η ρύθμιση αυτή έχει εισαχθεί στις παραμέτρους της εξέτασης) και επαναλαμβάνεται η μέτρηση.

## 9. ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟ

### 9.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πλασμινογόνο αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη που δημιουργείται στο ήπαρ και έχει μία πεπτιδική αλυσίδα. Παράγοντα κινδύνου στη δημιουργία θρομβώσεων αποτελούν τα χαμηλά επίπεδα πλασμινογόνου. Οι συγκεντρώσεις του πλάσματος

του πλασμινογόνου μπορεί να αυξηθούν σε φλεγμονώδεις και μολυσματικές καταστάσεις ενώ μπορεί να μειωθούν σε βλάβη του ήπατος ή στις θεραπείες θρομβώσεων (73).

## 9.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία πρέπει να διενεργείται με βάση τις συστάσεις για τις εξετάσεις αιμόστασης.

- Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε πλαστικό σωληνάριο, που περιέχει διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,109M/ 1 vol. κιτρικού τρινατρίου σε 9 vol. αίματος.
- Συνέχεια έχει η φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 2500 στροφές.
- Με αυτές τις συνθήκες το πλάσμα μπορεί να διατηρηθεί για 24 ώρες σε θερμοκρασίες  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

## 9.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία 2-8°C, όπως ήταν αρχικά και να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης τους.

Όσον αφορά το Αντιδραστήριο 1, στο κάθε φιαλίδιο προσθέτουμε 3 ml απεσταγμένο νερό. Αφού σταθεροποιηθεί το διάλυμα για 60 min σε 18-25°C (θερμοκρασία δωματίου), ανακινούμε ελαφρώς.

Για το Αντιδραστήριο 2, προσθέτουμε σε κάθε φιαλίδιο 6 ml απεσταγμένο νερό. Αφού σταθεροποιηθεί πάλι το διάλυμα για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα το ανακινούμε. Σημαντική παρατήρηση για το αντιδραστήριο 2, είναι πως δεν μπορεί να μπει στην κατάψυξη.

## 9.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της δοκιμασίας όσον αφορά τον ποσοτική μέτρηση του πλασμινογόνου, βασίζεται σε δύο φάσεις: α) το αντιδραστήριο 1, προστίθεται στο πλάσμα που εμπεριέχει πλασμινογόνο, αραιωμένο, ώστε να δημιουργηθεί ένα σύμπλεγμα μεταξύ της στρεπτοκινάσης που είναι το αντιδραστήριο 1, και του πλασμινογόνου β) η ποσότητα του συμπλέγματος αυτού υπολογίζεται με βάση τη δράση του στο υπόστρωμα CBS που αποτελεί το αντιδραστήριο 2. Με αυτόν τον τρόπο η αντίδραση δεν είναι ευαίσθητη σε οποιοδήποτε αναστολέα του πλάσματος.

Πρώτα από όλα πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή με STA<sup>®</sup>-Unicalibrator. Τα εξεταζόμενα πλάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή και όταν τοποθετηθούν στον αναλυτή STACHROM, επιλέγονται οι εξετάσεις του πλασμινογόνου που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στα πλάσματα των ασθενών, με τη χρωματομετρική μέθοδο που μπορεί να αναλυθεί το πλασμιγόνο. Δεν

παραλείπονται ξανά τα controls, STAR®- System Control N + P, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καθαρή μορφή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό του πλασμινογόνου για τα εξεταζόμενα πλάσματα, διενεργείται αυτόματα με τη βοήθεια του μηχανήματος στα 405 nm με βάση τη φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που κάποιο πλάσμα βρεθεί εκτός γραμμικής ζώνης, τότε το μηχάνημα πραγματοποιεί αυτόματα την απαραίτητα αραίωση του δείγματος (αφού η ρύθμιση αυτή έχει εισαχθεί στις παραμέτρους της εξέτασης) και επαναλαμβάνεται η μέτρηση.

## 10. ANTIΘΡΟΜΒΙΝΗ (ATIII)

### 10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια ακόμη γλυκοπρωτεΐνη η οποία δημιουργείται στο ήπαρ, είναι η αντιθρομβίνη. Η αντιθρομβίνη θεωρείται αναστολέας της πήξης και όταν συνδέεται με τη θρομβίνη δημιουργεί ένα αδρανές σύμπλοκο και μη αναστρέψιμο, διαδικασία που ευνοείται από την εμφάνιση της ηπαρίνης καθώς επιταχύνει την αντίδραση. Η αντιθρομβίνη παρουσιάζει επίκτητες και κληρονομικές ανεπάρκειες με τις κληρονομικές να διαχωρίζονται σε 4 κατηγορίες : α) ανεπάρκεια τύπου I β) II RS (reactive site) γ) II HBS (heparin binding site) δ) II PE (pleiotropic effect) (74).

### 10.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία πρέπει να διενεργείται με βάση τις συστάσεις για τις εξετάσεις αιμόστασης.

- Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε πλαστικό σωληνάριο, που περιέχει διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,109M/ 1 vol. κιτρικού νατρίου σε 9 vol. αίματος.
- Συνέχεια έχει η φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2000-2500 στροφές.
- Με αυτές τις συνθήκες το πλάσμα μπορεί να διατηρηθεί για 8 ώρες σε θερμοκρασίες  $20 \pm 5$  °C αλλά και για 1 μήνα στους -20°C.

### 10.3 ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία 2-8°C, όπως ήταν αρχικά και να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης τους.

Για τη μέτρηση της αντιθρομβίνης, υπάρχουν 3 αντιδραστήρια. Προσθέτουμε το Αντιδραστήριο 1 στο Αντιδραστήριο 3 που υπάρχει στο ίδιο σετ, αφού έχουμε ανακινήσει πολύ καλά το φιαλίδιο που περιέχει το αντιδραστήριο 3. Έπειτα αφήνουμε το διάλυμα να σταθεροποιηθεί για 60 min σε 18-25°C θερμοκρασία και στη συνέχεια ομογενοποιούμε και τοποθετούμε ένα καινούριο STA®-mini Reducer καθώς και το διάτρητο πώμα.

Για το Αντιδραστήριο 2, κάνουμε ανασύσταση καθένα φιαλίδιο με το αντιδραστήριο 2 ανά 3 ή 6 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα σταθεροποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min και στη συνέχεια ομογενοποιούμε και τοποθετούμε ένα καινούριο STA®-mini Reducer καθώς και το διάτρητο πώμα. Ιδιαίτερη προσοχή στο αντιδραστήριο 2 καθώς δεν πρέπει να καταψύχεται.

Το Αντιδραστήριο 3 είναι εύκολο στη χρήση του, καθώς χρησιμοποιείται ως έχει με μια ανακίνηση μόνο πριν το χρησιμοποιήσουμε.

#### 10.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της μεθόδου στην μέτρηση της αντιθρομβίνης στηρίζεται στην αντιθρομβωτική της δράση, καθώς συνδέεται με την ηπαρίνη, και διενεργείται σε δυο φάσεις : α) αρχικά επώαζεται το πλάσμα με τη βοήθεια ηπαρίνης, υπερβαίνοντας τις τιμές της θρομβίνης (αντιδραστήριο 1) β) μετράμε την περίσσεια θρομβίνης στηριζόμενοι στην αμιδολυτική της δραστηριότητα όσον αφορά το χρωμογόνο υπόστρωμα CBS (αντιδραστήριο 2)

Πρώτα από όλα εκτελείται η βαθμονόμηση του αναλυτή με STA®- Unicalibrator. Τα εξεταζόμενα πλάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή και όταν τοποθετηθούν στον αναλυτή STACHROM, επιλέγονται οι εξετάσεις της ATIII που πρόκειται να πραγματοποιηθούν στα πλάσματα των ασθενών, με τη χρωματομετρική μέθοδο που μπορεί να αναλυθεί η αντιθρομβίνη. Δεν παραλείπονται ξανά τα controls, STAR®- Coag Control N + P ή STAR®- System Control N + P, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καθαρή μορφή για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιθρομβίνης για τα εξεταζόμενα πλάσματα, διενεργείται αυτόματα με τη βοήθεια του αναλυτή στα 405 nm με βάση τη φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που κάποιο πλάσμα βρεθεί εκτός των ορίων μέτρησης, τότε το μηχάνημα πραγματοποιεί αυτόματα την απαραίτητα αραιώση του δείγματος (αφού η ρύθμιση αυτή έχει εισαχθεί στις παραμέτρους της εξέτασης) και επαναλαμβάνεται η μέτρηση.

### 11. ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ

#### 11.1 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA με ολικό αίμα και πρέπει να φυλάσσεται σε πάγο. Για 48 ώρες το δείγμα δε φυγοκεντρείται και φυλάσσεται σε 20-25°C θερμοκρασία ή μπορεί να φυλάσσεται για 7 μέρες σε θερμοκρασία 2-8°C ανάλογα τη σταθερότητα του δείγματος. Έπειτα από 3 έως 7 μέρες μπορεί να πραγματοποιηθεί η εξέταση του δείγματος. Πριν τη δειγματοληψία είναι υποχρεωτικό ο ασθενής να έχει ακολουθήσει νηστεία 12 ωρών. Σωληνάρια με ολικό αίμα που περιέχουν αντιπηκτικό ηπαρίνης ή και δείγματα ορού/πλάσματος δεν μπορούν να γίνουν αποδεκτά. Εάν δεν ανιχνεύεται ομοκυστεΐνη τότε τα αποτελέσματα δηλώνονται αρνητικά με επιφύλαξη για τυχόν άλλες αιτίες αύξησης της ομοκυστεΐνης.

## 11.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της μεθόδου της ομοκουστεΐνης βασίζεται στην πολικότητα του φθορισμού με αυτοανάλυση (FPIA). Η δεσμευμένη ομοκουστεΐνη μεταπίπτει σε ελεύθερη μέσω ενζυμικού μετασχηματισμού. Η διθειοθρεϊτόλη μπορεί να μετατρέψει την ομοκουστεΐνη, τα μικτά δισουλφίδια καθώς και την πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη υπό μορφή HCY, σε ελεύθερη HCY.

## 12. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ

### 12.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης κατατάσσονται στην ομάδα των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, τα οποία είναι ειδικά για φωσφολιπίδια που είναι φορτισμένα αρνητικά. Όσον αφορά την καρδιολιπίνη, είναι ένα φωσφολιπίδιο όξινο που παράγεται από τη γλυκερόλη και πήρε το όνομα της εξαιτίας της απομόνωσης της από την καρδιά των βοειδών. Μελέτες έχουν αποδείξει τη συσχέτιση μεταξύ των αυτοαντισωμάτων και της συχνότητας θρόμβωσης. Παρόλα αυτά όμως ο ακριβής μηχανισμός κατά τον οποίο τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα που είναι παθογόνα, μπορούν να προκαλέσουν θρόμβωση δεν έχει αποδειχθεί (75).

### 12.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα που προτιμώνται είναι αυτά που έχουν συλλεχθεί πρόσφατα και είναι δείγματα ορού. Δεν επιτρέπεται η χρήση αιμολυμένων, ικτερικών, λιπαιμικών, ή βακτηριακών μολυσμένων δειγμάτων. Κάθε ορός με σωματίδιο πρέπει να καθαρίζεται με φυγοκέντρηση χαμηλών στροφών που δεν ξεπερνούν τις 1000. Επιπλέον κάθε δείγμα πρέπει να συλλέγεται σε καθαρό, στεγνό και άδειο σωλήνα, και μετά το διαχωρισμό, κάθε δείγμα ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός των πρώτων 8 ωρών ή να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C μέχρι και 48 ώρες ή να καταψύχεται στους -20°C για μεγαλύτερη περίοδο.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα ορού 1:101 αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (1χ) και ανακατεύονται καλά. Έπειτα συνέχεια έχει το πλύσιμο παρασκευάζοντας 20ml από το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (1χ) ανά 8 φρεάτια ή 200ml για 96 φρεάτια.

### 12.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όσον αφορά τα αντιδραστήρια, αραιώνουμε τα συμπυκνωμένα πριν από τη χρήση. Συγκεκριμένα αραιώνουμε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 1:5 προσθέτοντας απεσταγμένο νερό. Επιπλέον αραιώνουμε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1:50 ξανά με απεσταγμένο νερό.

## 12.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθούμε για τη μέτρηση των καρδιολιπινών περιγράφονται στα παρακάτω βήματα :

1. Μεταφέρουμε με σιφώνιο σε καθορισμένα πηγάδια, 100μl από βαθμονομητές (controls) για ποσοτική ή Cut-off control για ποιοτική μέτρηση και 100μl από καθένα από τα παρακάτω :
  - Αρνητικός μάρτυρας (negative control, NC) και θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC)
  - Αραιωμένο ορό ασθενών
2. Επιάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 20-32°C
3. Ξεπλένουμε 3 φορές με 300μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης το οποίο είναι αραιωμένο 1:50
4. Μεταφέρουμε 100μl συζευγμένου ενζύμου μέσα σε κάθε πηγαδάκι
5. Επιάζουμε ξανά για 30 λεπτά στους 20-32°C
6. Ξεπλένουμε 3 φορές με 300μl του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης
7. Μεταφέρουμε 100μl υποστρώματος TMB σε κάθε πηγαδάκι
8. Επιάζουμε για 30 λεπτά στους 20-32°C, μακριά από το έντονο φως
9. Μεταφέρουμε τέλος 100μl stop solution σε κάθε πηγαδάκι
10. Επώαση τουλάχιστον για 5 λεπτά και έπειτα αναδεύουμε την πλάκα προσεχτικά για 5 δευτερόλεπτα
11. Διαβάζουμε την απορρόφηση στο κατάλληλο μηχάνημα στα 450nm στα 30 λεπτά

Σημειώνεται πως εάν τα IgG και IgM προσδιορίζονται παράλληλα τότε οι βαθμονομητές, τα controls και τα δείγματα θα πρέπει να γίνουν 2 φορές ξεχωριστά για κάθε υποκατηγορία.

## 13. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΣ β2-ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ I

### 13.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντισώματα κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης I κατατάσσονται στην ομάδα των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που στόχο έχουν σύμπλοκα αποτελούμενα από φωσφολιπίδια που είναι φορτισμένα αρνητικά, όπως την καρδιολιπίνη, αλλά και πρωτεΐνες πλάσματος όπως είναι η β2-γλυκοπρωτεΐνη I, οι πρωτεΐνες S και C και η προθρομβίνη. Η β2-γλυκοπρωτεΐνη I μπορεί να θεωρηθεί αυτοαντιγόνο από μόνη της καθώς εμφανίζει αντιδραστικότητα σε απομονωμένη β2-γλυκοπρωτεΐνη I. Μελέτες που έχουν γίνει κάνουν εμφανής τη συσχέτιση μεταξύ των φαινομένων θρόμβωσης και θρομβοπενίας με τα αυτοαντισώματα αυτά, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί τη θρόμβωση (76).

### 13.2 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα που προτιμώνται είναι αυτά που έχουν συλλεχθεί πρόσφατα και είναι δείγματα ορού. Δεν επιτρέπεται η χρήση αιμολυμένων, ικτερικών, λιπαιμικών, ή

βακτηριακών μολυσμένων δειγμάτων. Κάθε ορός με σωματίδιο πρέπει να καθαρίζεται με φυγοκέντρηση χαμηλών στροφών που δεν ξεπερνούν τις 1000. Επιπλέον κάθε δείγμα πρέπει να συλλέγεται σε καθαρό, στεγνό και άδειο σωλήνα, και μετά το διαχωρισμό, κάθε δείγμα ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός των πρώτων 8 ωρών ή να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C μέχρι και 48 ώρες ή να καταψύχεται στους -20°C για μεγαλύτερη περίοδο.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα ορού 1:101 αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (1χ) και ανακατεύονται καλά. Έπειτα συνέχεια έχει το πλύσιμο παρασκευάζοντας 20ml από το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (1χ) ανά 8 φρεάτια ή 200ml για 96 φρεάτια.

### 13.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Σχετικά με τα αντιδραστήρια, αραιώνουμε τα συμπυκνωμένα πριν από τη χρήση. Συγκεκριμένα αραιώνουμε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 1:5 προσθέτοντας απεσταγμένο νερό. Επιπλέον αραιώνουμε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1:50 ξανά με απεσταγμένο νερό.

### 13.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάλυση των αντισωμάτων κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης I είναι ακριβώς ίδια με την διαδικασία που ακολουθείται για τη μέτρηση των καρδιολιπινών όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

## 14. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ PAI

### 14.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη μέσω του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουρακινάσης (uPA) και του ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tPA). Αυτοί οι ενεργοποιητές μπορούν να ρυθμιστούν από αναστολείς του ενεργοποιητή πλασμινογόνου ή αλλιώς όπως ονομάζεται PAI. Το PAI-1, που είναι ο αναστολέας τύπου 1, είναι ταχύς στη δράση του και κατέχει φυσιολογική σημασία στην κυκλοφορία καθώς μπορεί να αποτρέψει τη διάλυση των πηγμάτων που έχουν σχηματιστεί. Το PAI μπορεί να βρεθεί σε εγκύους, σε ασθενείς που μόλις έχουν εγχειριστεί ή πάσχουν από κακή νόσο καθώς και στο πλάσμα ασθενών που ταλαιπωρούνται από θρομβοεμβολικές καταστάσεις. Υψηλές τιμές του PAI μπορεί να αφορούν εμφράγματα μυοκαρδίου, εν τω βάθη φλεβική θρόμβωση κ.α. (77)

### 14.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο προσδιορισμού πλασμινογόνου είναι τα εξής :

Berichrom® PAI, REF OWOA με:

2 x -> 0,5mL Standard 1, που αποτελεί το πρότυπο υλικό βαθμονόμησης PAI S1

1 x -> 0,5mL Standard 2, που αποτελεί το πρότυπο υλικό βαθμονόμησης PAI S2

2 x -> 0,5mL Control, πλάσμα ελέγχου PAI

1 x -> 2mL Reagent U, αντιδραστήριο ουρακινάσης

1 x -> 4mL Reagent P, αντιδραστήριο πλασμινογόνου

1 x -> 4ml Reagent O, οξειδωτικός παράγοντας

1 x -> 2mL Plasmin Substrate, υπόστρωμα πλασμίνης

1 x 8mL Substrate Diluent, διάλυμα υποστρώματος

### 14.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αδρανοποίηση της ουρακινάσης από το PAI. Η δραστικότητα της περίσσειας ουρακινάσης, βασίζεται στην πλασμίνη, στην οποία μετατρέπεται το πλασμινογόνο. Η πλασμίνη που προκύπτει μπορεί να μετρηθεί μέσω του διαχωρισμού ενός χρωμογόνου υποστρώματος στα 405nm. Η μέτρηση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (PAI) πραγματοποιείται στον αναλυτή BCS XP της SIEMENS.

### Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

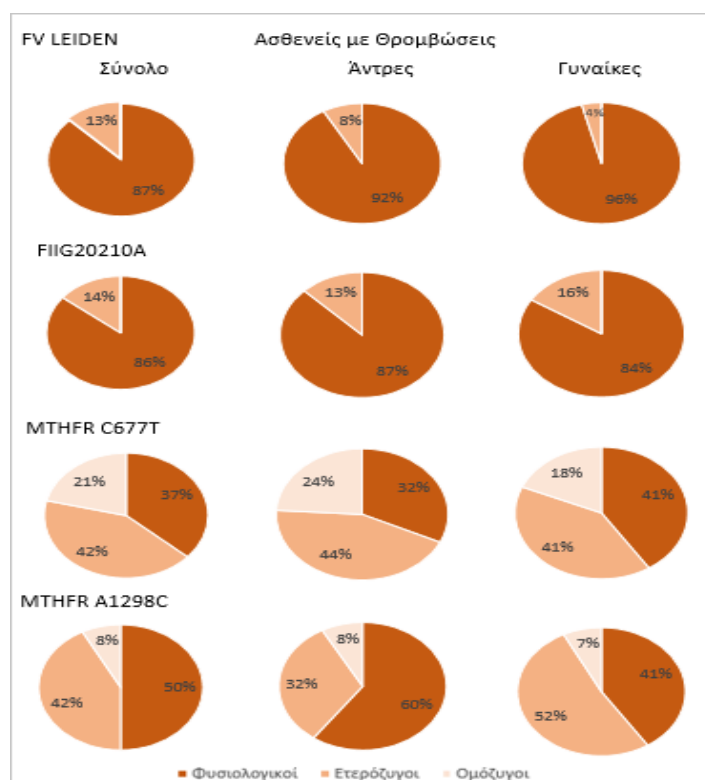
#### ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η έρευνα διενεργήθηκε σε 120 ασθενείς. Μεταξύ αυτών των ασθενών η πλειοψηφία τους αφορούσε γυναίκες και οι υπόλοιποι ήταν άνδρες. Στα κάτωθι γραφήματα/διαγράμματα παρουσιάζονται οι στατιστικές συγκρίσεις που έγιναν μεταξύ των ατόμων σε σχέση με τις ασθένειες από τις οποίες έπασχαν και τις μεταλλάξεις που εμφάνισαν. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 40 έτη, με τον μεγαλύτερο να αγγίζει τα 72 έτη και τον μικρότερο να είναι μόλις 16 ετών. Από όλους τους ασθενείς, υπήρξαν άτομα που εμφάνισαν όλες τις μεταλλάξεις που αναφέρονται παρακάτω, ενώ κάποιοι άλλοι εμφάνισαν μερικές από αυτές.

Από τους 52 ασθενείς που έπασχαν από κάποια θρόμβωση, οι 49 εμφάνισαν τον παράγοντα V LEIDEN και FIIG20210A από τους οποίους οι 25 ήταν γυναίκες και οι 24 άνδρες. Κάποιοι από αυτούς τους ασθενείς ήταν φυσιολογικοί ως προς αυτές τις μεταλλάξεις, κάποιοι εμφάνισαν ομοζυγωτία ενώ κάποιοι άλλοι ετεροζυγωτία, όπως παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα. Αναλυτικότερα ως προς τον παράγοντα V LEIDEN το 92% των ανδρών ήταν φυσιολογικοί, με ένα 8% να παρουσιάζουν ετεροζυγωτία, ενώ στις γυναίκες μόλις το 4% εμφάνισε ετεροζυγωτία με το υπόλοιπο ποσοστό να είναι φυσιολογικές. Για τη μετάλλαξη FIIG20210A το 87% των ανδρών παρουσιάστηκαν φυσιολογικοί με το 13% να εμφανίζει ετεροζυγωτία ενώ οι γυναίκες

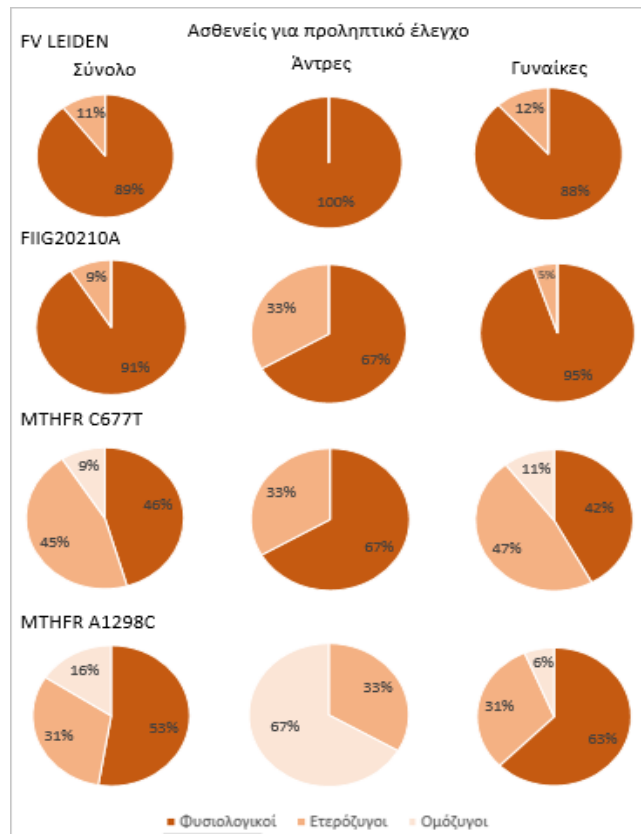


δεν διέφεραν και πολύ με ποσοστό εμφάνισης 16% ετεροζυγωτίας. Τη μετάλλαξη MTHFR (C677T,A1298C), εμφάνισαν και οι 52 ασθενείς με άνδρες και γυναίκες να εμφανίζουν ομοζυγωτία με ποσοστό 24% και 18% αντίστοιχα, και ετεροζυγωτία 44% και 41%, για τη MTHFR C677T. Τέλος για τη μετάλλαξη MTHFR (A1298C) ένα μικρό ποσοστό, 8% στους άνδρες και 7% στις γυναίκες παρουσίασε ομοζυγωτία, ενώ το 32% και 52% αντίστοιχα εμφάνισε ετεροζυγωτία.



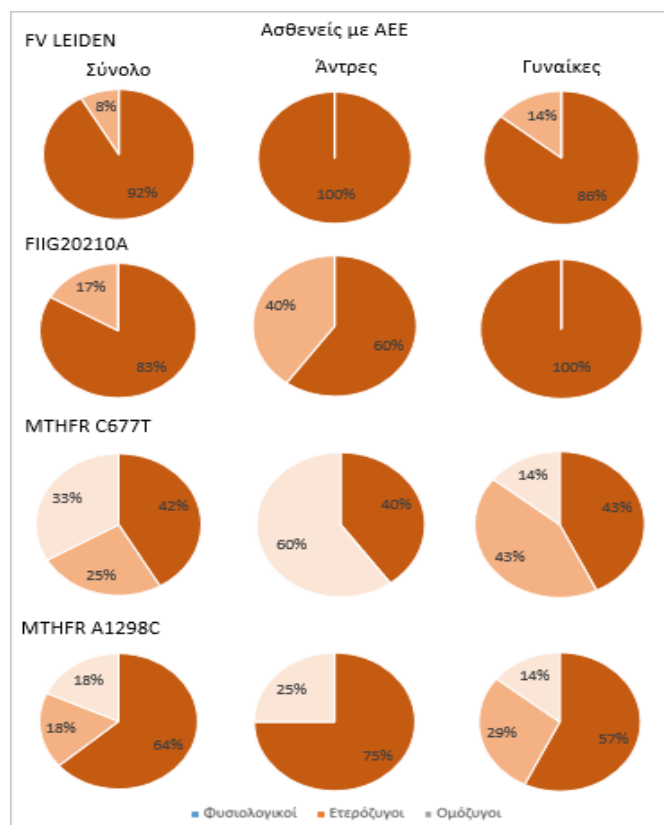
**Εικόνα 6:** Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που έπασχαν από κάποιου είδους θρόμβωση.

Υπήρχαν ασθενείς όπως ήδη αναφέρθηκε που προσήλθαν για εξετάσεις προληπτικά λόγω οικογενειακού ιστορικού που είχαν. Από αυτούς τους 24, οι 19 εμφάνισαν μετάλλαξη για τον παράγοντα V LEIDEN από τους οποίους οι 17 ήταν γυναίκες και οι 2 άντρες. Οι άντρες ήταν όλοι φυσιολογικοί ενώ στις γυναίκες ένα 12% εμφάνισε ετεροζυγωτία. Τη μετάλλαξη FIIG20210A, εμφάνισαν 22 άτομα εκ των οποίων 3 άνδρες και 19 γυναίκες με ποσοστά που παρουσιάζουν ετεροζυγωτία, 33% και 5% αντίστοιχα. Μετάλλαξη MTHFR (C677T) εμφάνισαν 22 άτομα επίσης, εκ των οποίων 3 άνδρες και 19 γυναίκες. Από τους άνδρες το 33% ήταν ετεροζυγώτες ενώ στις γυναίκες το 47% ετεροζυγώτες και το 11% ομοζυγώτες. Τέλος για τη μετάλλαξη A1298C MTHFR καταγράφηκαν 19 ασθενείς (3 άνδρες και 16 γυναίκες). Από αυτούς όσον αφορά τους άνδρες δεν υπήρξε φυσιολογικός καθώς το 33% ήταν ετεροζυγώτες και 67% ομοζυγώτες ενώ στις γυναίκες το 6% ήταν ομοζυγώτες, το 31% ετεροζυγώτες και οι υπόλοιπες φυσιολογικές.



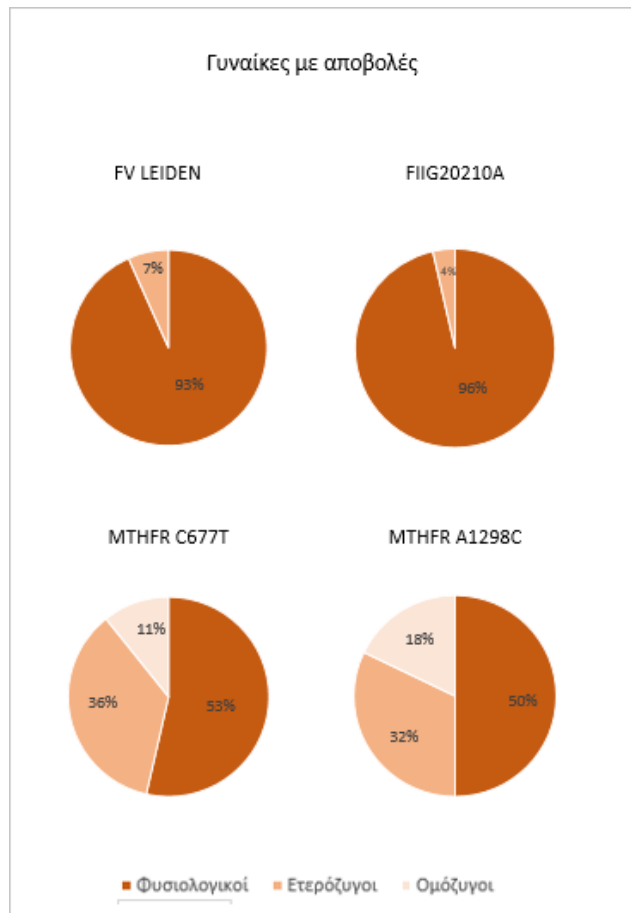
**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που προσήλθαν προληπτικά.

Από τους 12 ασθενείς που εμφάνισαν αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, όλοι εμφάνισαν μεταλλάξεις ως προς τον παράγοντα V LEIDEN, FIIG20210A, και τη μετάλλαξη MTHFR C677T, ενώ από αυτούς, ένας ασθενής δεν εμφάνισε την μετάλλαξη MTHFR A1298C. Για τις 3 πρώτες μεταλλάξεις έχουμε 5 άνδρες και 7 γυναίκες εκ των οποίων για τον παράγοντα V LEIDEN το 14% των γυναικών είναι ετεροζυγώτες ενώ οι υπόλοιπες μαζί με τους άνδρες φυσιολογικοί. Για την μετάλλαξη FIIG20210A όλες οι γυναίκες είναι φυσιολογικές ενώ το 40% των ανδρών είναι ετεροζυγώτες. Το 60% των ανδρών και το 4% των γυναικών είναι ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη MTHFR (C677T) ενώ το 43% των γυναικών εμφανίζουν επίσης ετεροζυγωτία. Τέλος στη μετάλλαξη MTHFR A1298C εμφανίζονται 4 άνδρες και 7 γυναίκες με ποσοστά ομοζυγωτίας 25% και 14% αντίστοιχα, ενώ οι γυναίκες παρουσιάζουν επιπλέον και ετεροζυγωτία στο 29%.



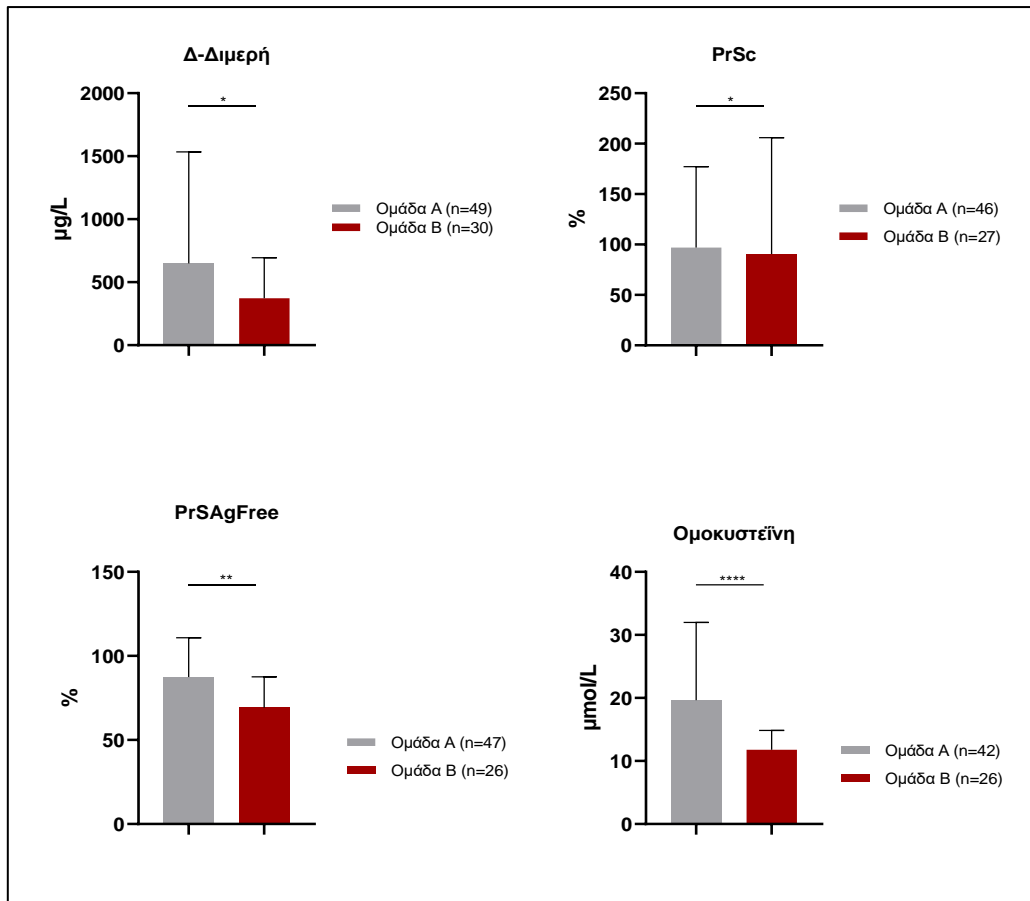
**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων του πληθυσμού των ατόμων που έπασχαν από ΑΕΕ.

Όσον αφορά τις γυναίκες που προσήλθαν για εξέταση λόγω του ότι είχαν αποβολές στο παρελθόν, από τις 32 γυναίκες που προσήλθαν, στις 30 έγιναν οι εξετάσεις που αφορούσαν τις μεταλλάξεις του παράγοντα V LEIDEN, FIIG20210A MTHFR(A1298C, C677T) και έδωσαν τα αποτελέσματα που εμφανίζονται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 9). Πιο συγκεκριμένα για τις μεταλλάξεις FV LEIDEN και FIIG20210A, το 7% και αντίστοιχα το 4% των γυναικών εμφάνισαν ετεροζυγωτία και οι υπόλοιπες ήταν φυσιολογικές ενώ για τις μεταλλάξεις MTHFR (C677T), MTHFR (A1298C) το 36% των γυναικών και αντίστοιχα το 32% εμφάνισαν ετεροζυγωτία ενώ το 11% και το 18% αντίστοιχα εμφάνισε ομοζυγωτία.



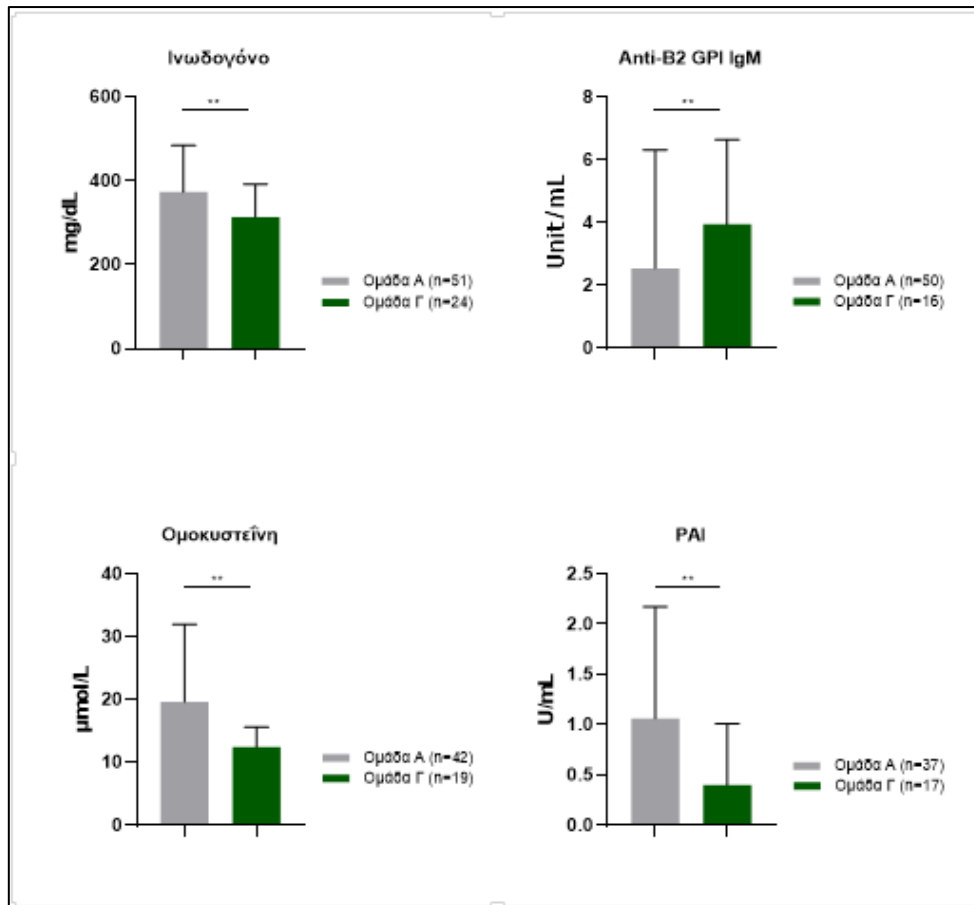
**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων στον πληθυσμό των γυναικών που εμφάνισαν αποβολές.

Στη συνέχεια αφού καταγράφηκαν τα ποσοστά των ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα αυτή, η ηλικία, το φύλο και μερικές μεταλλάξεις σε σχέση με τις παθήσεις τους, ακολούθησαν και διάφορες άλλες συσχετίσεις μεταξύ των παθήσεων των ασθενών με τα επίπεδα κι άλλων εξετάσεων που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του πλήρη ελέγχου θρομβοφιλίας.



**Εικόνα 10:** Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις Ομάδες των παθήσεων A και B, με τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης, της PrSAgFree, της PrC και των D-διμερή.

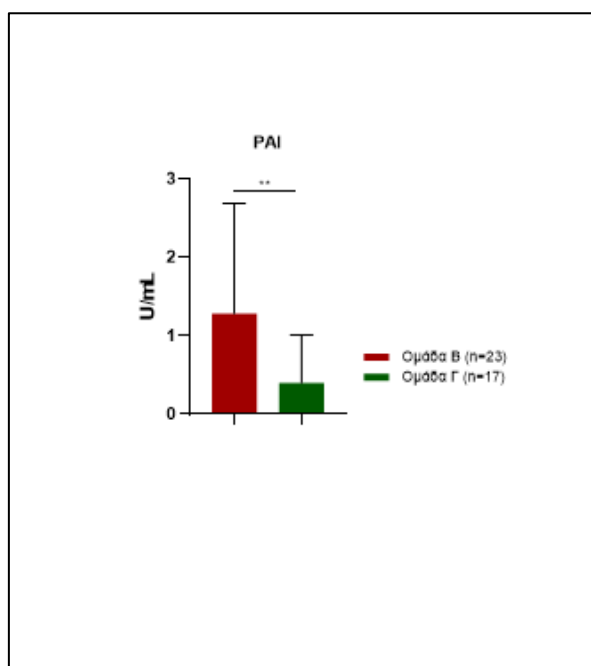
Οι ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα A όπως έχει αναφερθεί είναι άτομα που έχουν κάποιου είδους θρόμβωση, ενώ στην κατηγορία B ανήκουν οι γυναίκες που είχαν αποβολή στο παρελθόν. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών. Κάθε κουκίδα συμβολίζει τη μέτρηση ενός δείγματος. Στο πρώτο διάγραμμα παρατηρείται μικρή στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p < 0,05$ ), με τους ασθενείς της ομάδας A να εμφανίζουν μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα των Δ-διμερή. Στο δεύτερο διάγραμμα η στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών δεν είναι σημαντική καθώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης S και στους δύο πληθυσμούς δεν διαφέρουν πολύ ( $p = 0,0166$ ). Στο τρίτο διάγραμμα η στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών γίνεται αντιληπτή με τους ασθενείς της ομάδας A να παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα της πρωτεΐνης SAgFree σε σχέση με τις γυναίκες της ομάδας B ( $p = 0,0019$ ). Τέλος στο τελευταίο διάγραμμα παρατηρείται ισχυρή στατιστική διαφορά καθώς ομοίως με προηγουμένως η ομάδα A των ασθενών που πάσχουν από θρόμβωση, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας B ( $p < 0,0001$ ).



**Εικόνα 11:** Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες Α και Γ των παθήσεων, με τα επίπεδα του ινωδογόνου, των αντισωμάτων κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, της ομοκυστεΐνης και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου PAI.

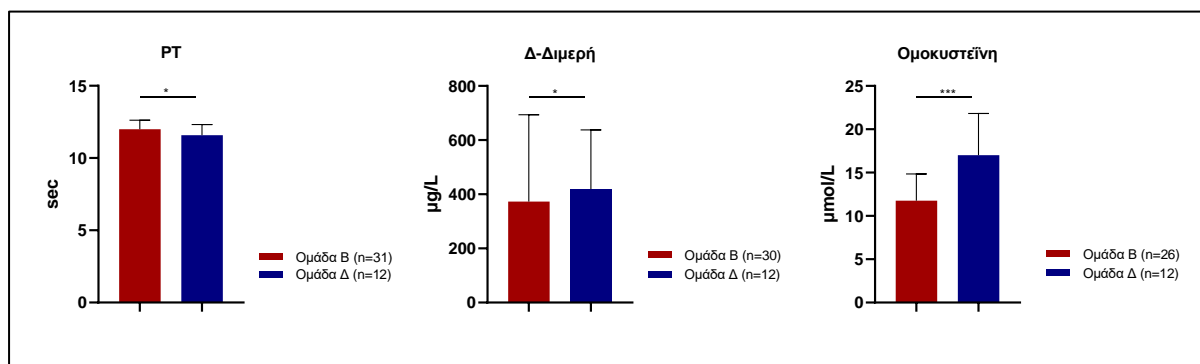
Όπως παρατηρούμε στα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται να υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών για την κάθε εξέταση που παρουσιάζεται. Οι ομάδες Α και Γ αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα τους ασθενείς που πάσχουν από κάποια είδους θρόμβωση και τα άτομα που προσήλθαν προληπτικά λόγω οικογενειακού ιστορικού. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο διάγραμμα παρατηρείται μικρή στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p=0,0020$ ) με τα επίπεδα του ινωδογόνου να είναι ελαφρώς υψηλότερα στους ασθενείς της ομάδας Α. Στο δεύτερο διάγραμμα παρουσιάζεται επίσης στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p=0,0043$ ), αυτή τη φορά όμως ο πληθυσμός της ομάδας Γ φαίνεται να έχει υψηλότερα επίπεδα των αντισωμάτων IgM κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, γεγονός που φανερώνει ίσως την προδιάθεση των ατόμων αυτών να εμφανίσουν κάποιο θρόμβο, λόγω του ιστορικού που μπορεί να έχουν στην οικογένειά τους. Το τρίτο διάγραμμα φανερώνει επίσης στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών ( $p=0,0037$ ), καθώς όπως έχει αναφερθεί η ομοκυστεΐνη αποτελεί σημαντικό δείκτη εμφάνισης στους ασθενείς που πάσχουν από θρόμβωση, και αναμένεται τα επίπεδα της να είναι υψηλά σε τέτοιες περιπτώσεις. Τέλος στο τελευταίο διάγραμμα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p=0,0063$ ), όσον αφορά τον ενεργοποιητή

πλασμινογόνου PAI του πλάσματος, με τους ασθενείς της ομάδας A να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα.



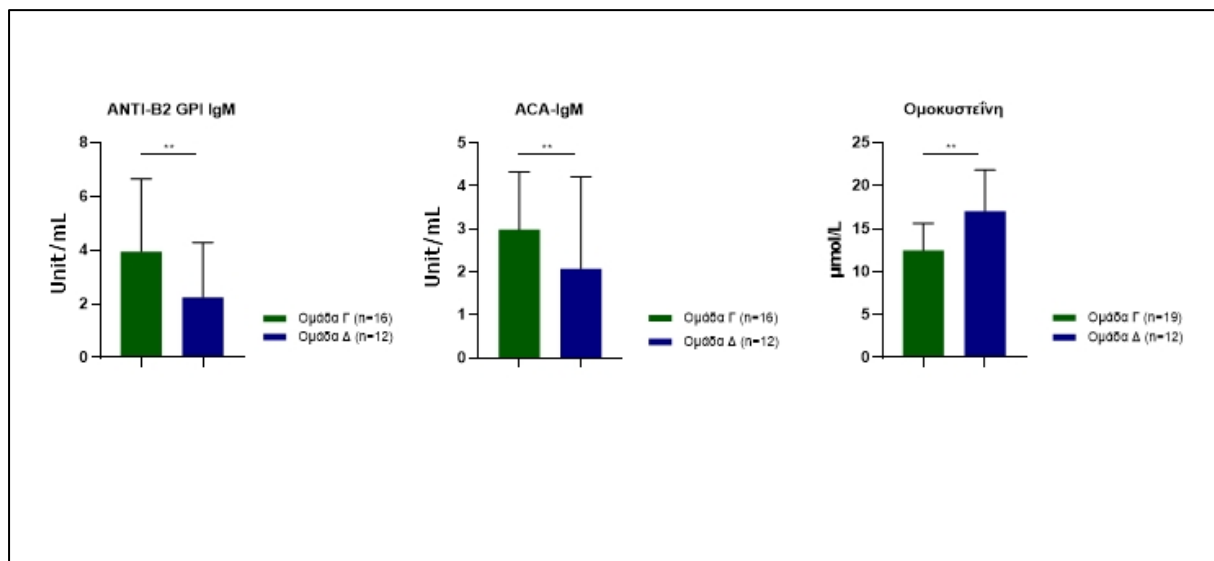
**Εικόνα 12:** Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Β και Γ όσον αφορά την εξέταση PAI πλάσματος

Η ομάδα Β όπως έχει αναφερθεί, περιλαμβάνει το γυναικείο πληθυσμό που προσήλθε για εξέταση εξαιτίας κάποιας αποβολής που είχαν στο παρελθόν. Όπως παρατηρούμε στο παραπάνω διάγραμμα, υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p=0,0074$ ), ως προς τα επίπεδα του PAI πλάσματος, καθώς οι γυναίκες που περνούν κάποια αποβολή στη ζωή τους είναι πιθανόν να εμφανίσουν θρόμβωση οπότε έτσι εξηγούνται και τα υψηλά επίπεδα της εξέτασης αυτής, ως προς την ομάδα Γ που αφορά τα άτομα που προσήλθαν για εξετάσεις προληπτικά.



**Εικόνα 13:** Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Β και Δ, με τα επίπεδα του PT, των D-Dimers και της ομοκυστεΐνης.

Η ομάδα Δ αφορά τους ασθενείς που πάσχουν από αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ). Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρούμε μικρή στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών των ομάδων Β και Δ ως προς τα επίπεδα του PT και των D-Dimers ( $p=0,0326$ ,  $p=0,0481$ ). Από την άλλη η στατιστική διαφορά στο τρίτο διάγραμμα είναι σημαντική ( $p=0,0002$ ), με τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στην ομάδα των ατόμων που πάσχουν με ΑΕΕ, να είναι αυξημένα, κάτι που κρίνεται αναμενόμενο καθώς η ομοκυστεΐνη αυξάνεται στα θρομβοφιλικά άτομα.



**Εικόνα 14:** Συσχέτιση ασθενών που ανήκουν στις ομάδες των παθήσεων Γ και Δ, με τα επίπεδα των αντισωμάτων IgM κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, με τα αντισώματα IgM κατά της καρδιολιπίνης και τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω διαγράμματα, υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών Γ και Δ. Πιο συγκεκριμένα στα δύο πρώτα διαγράμματα παρατηρούμε πως τα άτομα που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων IgM κατά της β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι και αντισωμάτων IgM κατά της καρδιολιπίνης, σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας Δ ( $p=0,0405$ ,  $p=0,0370$ ) και αυτό υποδηλώνει πως τα άτομα της ομάδας Γ λόγω οικογενειακού ιστορικού που μπορεί να υπάρχει, εμφανίζουν προδιάθεση ανάπτυξης θρόμβου. Στο τελευταίο διάγραμμα παρουσιάζεται επίσης σημαντική στατιστική διαφορά ( $p=0,0026$ ) με τους ασθενείς της ομάδας Δ αυτή τη φορά να εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα ομοκυστεΐνης σε σχέση με την ομάδα Γ.



#### Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε σε θρομβοφιλικούς ασθενείς που είτε είχαν κάποιο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, είτε ήταν γυναίκες που είχαν αποβολή στο παρελθόν είτε άτομα που απέκτησαν κάποια θρόμβωση κατά τη διάρκεια της ζωής τους, αλλά και σε άτομα που προσήλθαν για προληπτικές εξετάσεις εξαιτίας ενδεχόμενου ιστορικού της οικογενείας τους. Σε όλο τον πληθυσμό διενεργήθηκαν εξετάσεις που αφορούσαν τον πλήρη έλεγχο θρομβοφιλίας, συμπεριλαμβανομένου και των μοριακών εξετάσεων που αφορούσαν τις όποιες μεταλλάξεις.

Με την έννοια θρομβοφιλία εννοούμε σήμερα, την αυξημένη τάση των ανθρώπων να εμφανίζουν διαταραχές στο σύστημα της πήξης, με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε φλεβικές θρομβοεμβολές. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διενεργηθεί, αποδεικνύεται πως η έλλειψη αντιθρομβίνης, που θεωρείται φυσικό αντιπηκτικό, μπορεί να οδηγήσει σε θρομβοφιλικές διαταραχές (74). Η κλινική θρομβοεμβολή μπορεί να θεωρηθεί και πολυπαραγοντική, καθώς πολλοί κίνδυνοι είτε περιβαλλοντικοί είτε γενετικοί μπορούν να συνυπάρξουν την ίδια στιγμή. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, όσον αφορά τη διατροφή, την έλλειψη φυσικής κατάστασης, τη λήψη οιστρογόνων σκευασμάτων αλλά και την ηλικία, αποτελούν ορισμένους εξωτερικούς παράγοντες που σύμφωνα με μελέτες, έχουν επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη θρομβοφιλικής διάθεσης (78).

Επιπλέον με το πέρασμα των χρόνων έχουν διενεργηθεί αρκετές έρευνες σχετικά με τις μεταλλάξεις, όπως αυτή του MTHFR (C677T, A1298C) και τη συσχέτιση τους με τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης, τις επαναλαμβανόμενες αποβολές κ.α. Έχει αναφερθεί επίσης πως η αύξηση της ομοκυστεΐνης με τιμές πάνω από 5  $\mu\text{mol/L}$  μπορεί να αποτελέσει τον ίδιο παράγοντα κινδύνου, όπως με μια αυξημένη τιμή χοληστερόλης (79). Όπως γίνεται φανερό από την Εικόνα 9, που αφορά την σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων των γυναικών που είχαν αποβολές, το ποσοστό των γυναικών που εμφάνισαν τη μετάλλαξη MTHFR (C677T, A1298C) είναι υψηλότερο από το ποσοστό των γυναικών που εμφάνισε τη μετάλλαξη FV LEIDEN και FIIG20210A, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συσχέτιση της μετάλλαξης MTHFR με τις αποβολές. Ειδικότερα ο γυναικείος πληθυσμός που κυοφορεί και έχουν μετάλλαξη MTHFR, μετά από μελέτες που αφορούσαν τα υψηλά επίπεδα της ομοκυστεΐνης στις γυναίκες αυτές, επιβεβαιώθηκε πως η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης μπορεί να μειωθεί με τη χορήγηση κατάλληλων βιταμινών και σωστής δοσολογίας φυλλικού οξέος (80).

Παρόλα αυτά υπάρχουν και έρευνες που επιβεβαιώνουν πως η ομοκυστεΐνη με τη μετάλλαξη MTHFR δεν έχουν σχέση μεταξύ τους, καθώς ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό θρομβοφιλίας (αποβολές, ΑΕΕ, εμφράγματα) μπορούν να εμφανίσουν αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης που είναι πολύ πιθανόν να οφείλονται σε εξωγενείς παράγοντες που αφορούν τον τρόπο ζωής τους, όπως προ αναφέρθηκε (81).

Σχετικά με τη μετάλλαξη του παράγοντα V LEIDEN όπως γίνεται φανερό από τα αποτελέσματα μας στις εικόνες 6-9, που αναπαριστούν το ποσοστό εμφάνισης του παράγοντα σε σχέση με το φύλο και την κάθε πάθηση, φαίνεται να επιβεβαιώνουν

τις μελέτες που αναφέρουν, πως η ετεροζυγωτία για αυτή τη μετάλλαξη εμφανίζεται συχνότερα, με μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης, σε σχέση με την ομοζυγωτία, η οποία όμως παρά την μέγιστη επικινδυνότητάς της, εμφανίζεται σε ποσοστό μόλις 1% (82).

Όσον αφορά τη μετάλλαξη FIIG20210A, παρατηρείται όπως και στον παράγοντα V LEIDEN, περισσότερο η ετεροζυγωτία στα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη και αυτό επιβεβαιώνεται ξανά από τις εικόνες 6-9 με βάση τα ποσοστά που αναγράφονται. Η ομοζυγωτία και σε αυτή τη μετάλλαξη αποτελεί μεγαλύτερο κίνδυνο θρόμβωσης αλλά η παρουσία της είναι σπάνια. Επιπλέον με έρευνες επιβεβαιώνεται η συνύπαρξη του παράγοντα FIIG20210A, με άλλους θρομβοφιλικούς κληρονομικούς παράγοντες, και συχνά με τον παράγοντα V LEIDEN, σε συμπτωματικούς ασθενείς (83). Ασθενείς που είναι ετεροζυγώτες ως προς τις δυο αυτές μεταλλάξεις, έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου σε σχέση με αυτούς που εμφανίζουν μια διαταραχή (84).

Τα υψηλά επίπεδα Δ-διμερή επίσης, σχετίζονται σημαντικά με υψηλό ποσοστό σχηματισμού θρόμβου, σύμφωνα με έρευνες (85), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα της συγκεκριμένης μελέτης καθώς τα επίπεδα των D-Dimers σε ασθενείς που έπασχαν από θρόμβωση ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ήταν υψηλότερα. Στην ίδια λογική ανευρίσκεται και ο αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1), καθώς οι υψηλές τιμές του κυκλοφορούντος PAI-1 μπορούν να οδηγήσουν σε μια σειρά από θρομβωτικές ασθένειες. Τα αποτελέσματα από τα παραπάνω διαγράμματα όσον αφορά τα επίπεδα του PAI-1 σε ασθενείς που είχαν θρόμβωση, ανευρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με όσους προσήλθαν προληπτικά, γεγονός που επιβεβαιώνει μελέτες που σχετίζουν το PAI-1 με τη θρόμβωση καθώς ο ρόλος του είναι να αποτρέπει τη διάλυση πηγμάτων. Μελέτες που αφορούσαν πειραματόζωα, υποστηρίζουν επίσης το PAI-1 ως θεραπευτικό μέσο που ενισχύει το ενδογενές ινωδολυτικό σύστημα (86).

Η συγκεκριμένη εργασία έχει μερικούς περιορισμούς που μπορεί να ευθύνονται για το αποτέλεσμα της έρευνας. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περιορισμένα, με αποτέλεσμα τα δεδομένα να μην έχουν σημαντική στατιστική συσχέτιση, συγκριτικά με το αν είχε χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για κάθε μετάλλαξη, που τότε το αποτέλεσμα θα μπορούσε να ήταν πιο ξεκάθαρο.

## Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη καταγράφηκαν περιστατικά σε ανδρικό και γυναικείο φύλο με ηλικίες που κυμαίνονταν από 16-72. Συνολικά συμμετείχαν 120 ασθενείς μερικοί από τους οποίους ήταν φυσιολογικοί ως προς τις μεταλλάξεις, άλλοι ετεροζυγώτες και άλλοι ομοζυγώτες, ενώ παρουσίασαν και παθολογικές τιμές στο υπόλοιπο πακέτο εξετάσεων που τους υποβλήθηκε όπως ήταν ο παρατεταμένος χρόνος πήξης, γεγονότα που σχετίζονται με την ύπαρξη θρόμβωσης. Σε αυτό το σύνολο των εξετάσεων που διενεργήθηκε, έγιναν συγκρίσεις μεταξύ των φύλων και των

μεταλλάξεων, αλλά και στατιστικές αναλύσεις που αφορούσαν τις δοκιμασίες προ συμπτωματικού ελέγχου της αιμόστασης, τις πρωτεΐνες S και C, το πλασμινογόνο, την ομοκυστεΐνη, την APC-R, το PAI-1 και το GPIa. Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την έρευνα αυτή, δε μπορούμε με βεβαιότητα να καταλήξουμε στη στατιστική συσχέτιση μεταξύ των εξετάσεων, και αυτό διότι τα δείγματα που προσήλθαν προς εξέταση δεν ήταν επαρκή επομένως δεν μπορούμε να έχουμε ένα σίγουρο αποτέλεσμα.

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boon GD. An overview of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 1993;21(2):170-9.
2. Austin SK. Haemostasis. *Medicine.* 2017;45(4):204-8.
3. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(2):195-8.
4. Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev.* 2021;46:100733.
5. Louise Jobling LE. Haemostasis, blood platelets and coagulation. <https://www.researchgatenet/journal/Anaesthesia-Intensive-Care-Medicine-1472-0299>. 2013.
6. Mary Mathias RL. Understanding haemostasis. *Paediatrics and Child Health.* 2007;317-21.
7. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012;129(3):220-4.
8. Steven AK. Haemostasis. *Medicine.* 2017;45(4):204-8.
9. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet.* 2000;355(9215):1627-32.
10. Bachli E. History of tissue factor. *Br J Haematol.* 2000;110(2):248-55.
11. O'Donnell JS, O'Sullivan JM, Preston RJS. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol.* 2019;186(1):24-36.
12. Kamath S, Lip GY. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM.* 2003;96(10):711-29.
13. ΒΑΪΟΠΟΥΛΟΣ Γ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ 2010.
14. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4-13.

15. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-23.
16. Key NS, Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(8):865-75.
17. Rosing J, Tans G. Factor V. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(10):1123-6.
18. Huang JN, Koerper MA. Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia.* 2008;14(6):1164-9.
19. Mazurkiewicz-Pisarek A, Plucienniczak G, Ciach T, Plucienniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(1):11-6.
20. Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EG. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Hum Mutat.* 1995;5(1):1-22.
21. Giannelli F. Factor IX. *Baillieres Clin Haematol.* 1989;2(4):821-48.
22. Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest.* 1978;61(6):1528-38.
23. Gomez K, Bolton-Maggs P. Factor XI deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(6):1183-9.
24. Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 2010;125(3):210-5.
25. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:226-36.
26. Heit JA. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:127-35.
27. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359(9):938-49.
28. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Jr., Wenstrom K, et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol.* 2010;115(1):14-20.
29. Applegate JS, Gronefeld D. Factor V Leiden. *Radiol Technol.* 2019;90(3):259-73.
30. Kyrle PA, Mannhalter C, Beguin S, Stumpflen A, Hirschl M, Weltermann A, et al. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(8):1287-91.
31. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia.* 2008;14(6):1229-39.
32. Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(6):1214-21.
33. ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia.* 2008;14(6):1222-8.
34. Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J.* 2006;4:15.
35. Dessi M, Di Giovamberardino G, Pieri M, Noce A, Zenobi R, Di Daniele N, et al. Influence of dialysis techniques and alternate vitamin supplementation on homocysteine levels in patients with known MTHFR genotypes. *Clin Exp Nephrol.* 2015;19(1):140-5.
36. Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(3):700-3.

37. Jadaon MM. Epidemiology of activated protein C resistance and factor v leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011;3(1):e2011037.
38. Wu Q, Zhao Z. Inhibition of PAI-1: a new anti-thrombotic approach. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2002;2(1):27-42.
39. Morrow GB, Whyte CS, Mutch NJ. A Serpin With a Finger in Many PAIs: PAI-1's Central Function in Thromboinflammation and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:653655.
40. Loertscher R, Lavery P. The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation. *Transpl Immunol.* 2002;9(2-4):93-6.
41. 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(4):295-9.
42. James AH. Pregnancy-associated thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:277-85.
43. Whitlock RP, Sun JC, Froles SE, Rubens FD, Teoh KH. 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.* 2012;141(2 Suppl):e576S-e600S.
44. Delluc A, Lacut K, Rodger MA. Arterial and venous thrombosis: What's the link? A narrative review. *Thromb Res.* 2020;191:97-102.
45. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.* 2009;23(5):225-9.
46. Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(3):147-58.
47. Johnson W, Onuma O, Owolabi M, Sachdev S. Stroke: a global response is needed. *Bull World Health Organ.* 2016;94(9):634-A.
48. Sharma P, Yadav S, Meschia JF. Genetics of ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(12):1302-8.
49. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischaemic stroke. *Brain.* 2000;123 ( Pt 9):1784-812.
50. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation.* 2015;132(1):e6-9.
51. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1-10.
52. Sukla KK, Raman R. Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(1):111-8.
53. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Zampelas A, Choumerianou D, et al. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(4):849-54.
54. Hermann A, Sitdikova G. Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease. *Biomolecules.* 2021;11(5).

55. Chawla J, Kvarnberg D. Hydrosoluble vitamins. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:891-914.
56. Kershaw G. Performance of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT): Determining Reagent Sensitivity to Factor Deficiencies, Heparin, and Lupus Anticoagulants. *Methods Mol Biol*. 2017;1646:75-83.
57. Levy JH, Szlam F, Wolberg AS, Winkler A. Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin Lab Med*. 2014;34(3):453-77.
58. Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(7):864-73.
59. Teruya J, West AG, Suell MN. Lupus anticoagulant assays: questions answered and to be answered. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(6):885-9.
60. Verhovsek M, Moffat KA, Hayward CP. Laboratory testing for fibrinogen abnormalities. *Am J Hematol*. 2008;83(12):928-31.
61. Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD, Haemostasis, Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in H. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol*. 2003;121(3):396-404.
62. de Moerloose P, Schved JF, Nugent D. Rare coagulation disorders: fibrinogen, factor VII and factor XIII. *Haemophilia*. 2016;22 Suppl 5:61-5.
63. Besser MW, MacDonald SG. Acquired hypofibrinogenemia: current perspectives. *J Blood Med*. 2016;7:217-25.
64. Clauss A. [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. *Acta Haematol*. 1957;17(4):237-46.
65. Bates SM. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(7):673-82.
66. Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. *Clin Chem*. 2011;57(9):1256-62.
67. Weitz JI, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. A Test in Context: D-Dimer. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(19):2411-20.
68. Holvoet P, Stassen JM, Hashimoto Y, Spriggs D, Devos P, Collen D. Binding properties of monoclonal antibodies against human fragment D-dimer of cross-linked fibrin to human plasma clots in an in vivo model in rabbits. *Thromb Haemost*. 1989;61(2):307-13.
69. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*. 1986;68(4):869-74.
70. Walker FJ. Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin Thromb Hemost*. 1984;10(2):131-8.
71. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost*. 1996;76(5):651-62.
72. Mannucci PM, Vigano S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet*. 1982;2(8296):463-7.
73. Reddy KN, Markus G. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *J Biol Chem*. 1972;247(6):1683-91.
74. Egeberg O. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965;13:516-30.

75. Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies--clinical associations. *Postgrad Med J.* 1986;62(734):1081-7.
76. Schousboe I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood.* 1985;66(5):1086-91.
77. EKO. K. Plasminogen activator inhibitor 1 : biomedical, biological and clinical aspects. 1988:59-70.
78. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 1999;353(9159):1167-73.
79. McCully KS. Chemical Pathology of Homocysteine VII. Cholesterol, Thioretinaco Ozonide, Mitochondrial Dysfunction, and Prevention of Mortality. *Ann Clin Lab Sci.* 2019;49(4):425-38.
80. Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, Bandzeviciene R, Silkunas M, Bartkeviciene D. The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reprod Toxicol.* 2017;72:159-63.
81. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation.* 1996;94(8):1812-4.
82. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;85(6):1504-8.
83. Ehrenforth S, Ludwig G, Klinke S, Krause M, Scharrer I, Nowak-Gottl U. The prothrombin 20210 A allele is frequently coinherited in young carriers of the factor V Arg 506 to Gln mutation with venous thrombophilia. *Blood.* 1998;91(6):2209-10.
84. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001;86(3):809-16.
85. Hochuli M, Duester S, Frauchiger B. Quantitative d-dimer levels and the extent of venous thromboembolism in CT angiography and lower limb ultrasonography. *Vasa.* 2007;36(4):267-74.
86. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987;69(2):381-7.