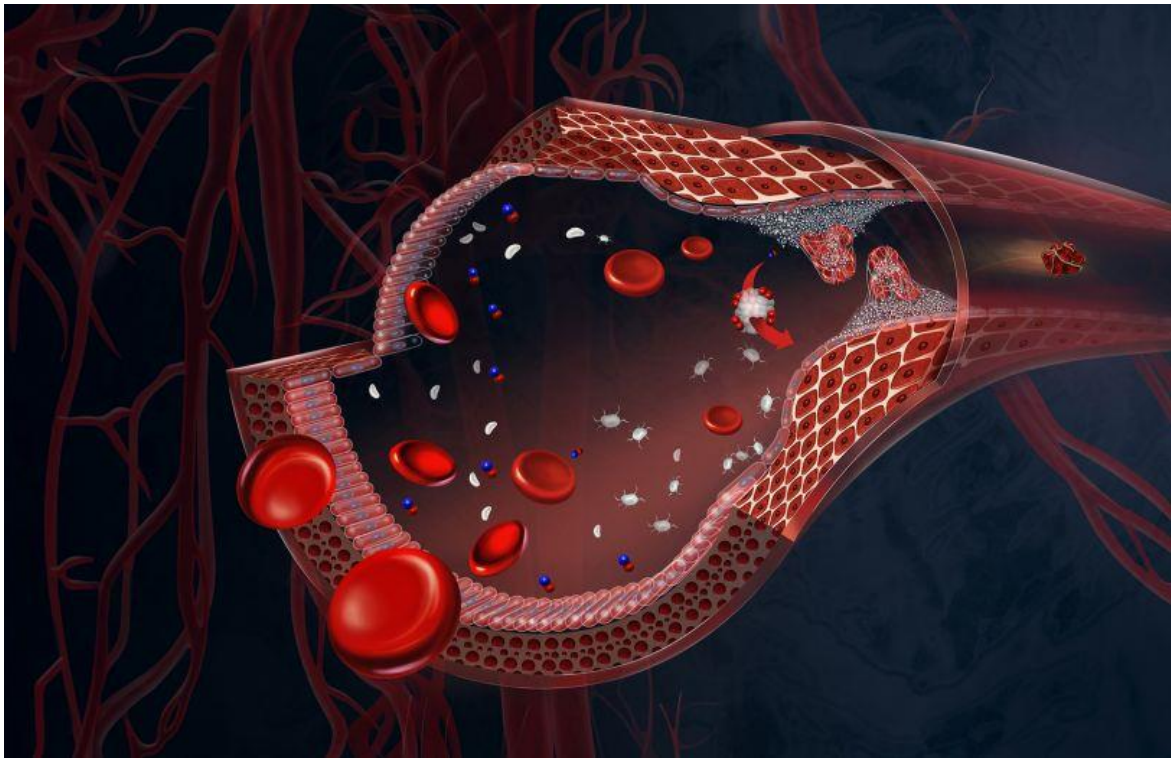


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η ενεργότητα των προπηκτικών φωσφολιπιδίων ως βιοδείκτης διαταραχών της
αιμόστασης**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ

Γαρυφαλιά Βασσάλου

19678022

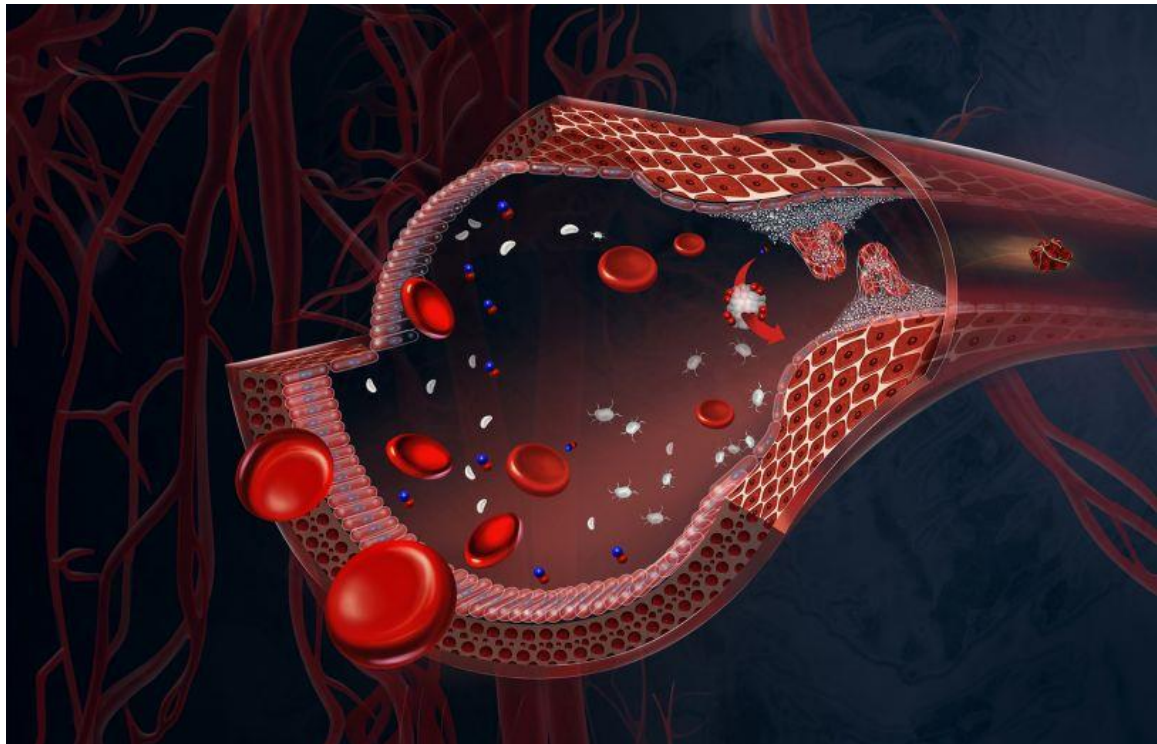
bisc19678022@uniwa.gr

ΟΝΟΜΑΕΙΣΗΓΗΤΗ

Πάυλου Ευθυμία

GRADUATE THESIS

The activity of procoagulant phospholipids as a biomarker of hemostasis disorders



NAME OF STUDENT

GaryfaliaVassalou

19678022

bisc19678022@uniwa.gr

NAME OF THE SUPERVISOR

PavlouEfthymia



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Η ενεργότητα των προπηκτικών φωσφολιπιδίων ως βιοδείκτης διαταραχών της αιμόστασης

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΑΥΛΟΥ	
2	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	
3	ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΜΠΙΡΤΣΑΣ	

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γαρυφαλιά Βασσάλου του Ευαγγέλου, με αριθμό μητρώου 19678022, φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Γαρυφαλιά Βασσάλου

(Υπογραφή)



Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Ευθυμία Παύλου, Προϊσταμένη του Παραϊατρικού Τμήματος Ιατρικής Υπηρεσίας του Γ.Ν.Α. Ιπποκρατείου, για την πολύτιμη βοήθεια της, τις χρήσιμες συμβουλές αλλά και τη συνολική καθοδήγηση που μου παρείχε.

Στη συνέχεια ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα άτομα του τμήματος της Αιμόστασης του Ιπποκρατείου και πιο συγκεκριμένα τη Σταυρούλα Δασκαλάκη που με βοήθησε να τρέξω τα δείγματα μου, την Μαρία Σιουμάλα και την Αρετή Γιαννιώτη η βοήθεια των οποίων ήταν πολύ σημαντική.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τον κ. Φόρτη για την πολύτιμη βοήθεια του στην ολοκλήρωση της εργασίας καθώς και τον κ. Κριεμπάρδη για τις πολύπλευρες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου των προπτυχιακών σπουδών μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και του φίλους μου για τη στήριξη και την υπομονή που επέδειξαν σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Λέξεις κλειδιά : αιμόσταση , αιμορραγία , θρόμβωση , ενεργότητα , φωσφολιπίδια

Περίληψη

Η φυσιολογική λειτουργία της αιμόστασης στον οργανισμό αφορά την αποκατάσταση οποιασδήποτε αγγειακής βλάβης, εμποδίζοντας την απώλεια αίματος και διατηρώντας την ομαλή ροή του αίματος εντός των αγγείων . Η αιμόσταση διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις, την αγγειακή , την αιμοπεταλιακή, τη φάση των παραγόντων πήξης και την ινωδολυτική φάση . Διαταραχές στον αιμοστατικό μηχανισμό οδηγούν είτε σε θρομβώσεις είτε σε αιμορραγίες . Σχετικά με τις θρομβοφιλίες, πρόκειται για τη θρομβωτική τάση που έχει ένα άτομο, κατά την οποία συσσωρεύονται παθολογικά στοιχεία του αίματος σχηματίζοντας θρόμβους που προκαλούν φλεγμονή ή αρτηριακή απόφραξη. Η θρομβοφιλική διάθεση διακρίνεται σε κληρονομική και επίκτητη και οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων. Η αιμορραγική διάθεση είναι η κατάσταση κατά την οποία ο οργανισμός αδυνατεί να αναστείλει την εξαγγείωση του αίματος, είτε πρόκειται για εξωτερική αιμορραγία, μετά από τρώση αγγείου, είτε για εσωτερική σε κοιλότητες ή ιστούς και οφείλεται σε διαταραχές των αιμοπεταλίων ή των παραγόντων πήξης . Έπειτα αναφορικά με τα προπηκτικά φωσφολιπίδια τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά προώθησης της πήξης του αίματος, ένα εξ' αυτών είναι η φωσφατιδυλοσερίνη η οποία εκτίθεται στη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυττάρων κατόπιν ερεθισμάτων όπως η ενεργοποίηση ή η απόπτωση, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η σύζευξη των παραγόντων πήξης και της προθρομβίνης στο αίμα, όπως και αυξάνουν τη δραστικότητα του συμπλέγματος της εξωγενούς τενάσης .

Σκοπός: Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των προπηκτικών φωσφολιπιδίων στον μηχανισμό της αιμόστασης και την ικανότητα τους να τον ενεργοποιούν.

Key Words:hemostasis , bleeding , thrombosis ,activity , phospholipids

ABSTRACT

The normal function of hemostasis in the body concerns the restoration of any vascular damage , preventing blood loss and maintaining the smooth flow of blood within the vessels . Hemostasis is divided into four phases, the vascular phase, the platelet phase, the coagulation factor phase and the fibrinolytic phase. Disorders in the haemostatic mechanism lead to either thrombosis or bleeding. Regarding thrombophilias, it is the thrombotic tendency that the person has, in which pathological elements of the blood accumulate, forming clots that cause inflammation or arterial blockage. Thrombophilic disposition is divided into hereditary and acquired and is due to a multitude of factors. Hemorrhagic tendency is the condition in which the body is unable to inhibit the extravasation of blood, whether it is external bleeding, after vessel'scorrosion,or internal bleeding in cavities or tissue and is due to disorders of platelets or clotting factors. Then regarding the procoagulant phospholipids which are the main components promoting blood coagulation , one of them is phosphatidylserine which is exposed to the lipid bilayer of cells following stimuli such as activation or apoptosis, thus facilitating the coupling of the factors coagulation and prothrombin in the blood, as well as increase the activity of the extrinsic tenase complex.

Purpose: The purpose of this study is the examination of the effect of procoagulant phospholipids on the hemostasis mechanism and their ability to activate it.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	13
1. Αιμόσταση.....	13
1.2 Αγγειακή φάση και αγγειοσύσπαση.....	13
1.3 Αιμοπεταλιακή φάση.....	13
1.4 Φάση των παραγόντων πήξης.....	15
1.4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V :	17
1.4.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII :	18
1.4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ IX :	18
1.4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ XI – XII.....	18
1.4.5 ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ ή ΗΜWK	19
1.5 Ινωδόλυση.....	19
1.6 Φυσιικοί αναστολείς του μηχανισμού πήξης	21
1.7 Μετάλλαξη της προθρομβίνης.....	21
2.Θρομβώσεις – Θρομβοφιλίες	21
2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VLEIDEN.....	23
2.2 ΠΡΩΤΕΙΝΗ C.....	24
2.3 ΠΡΩΤΕΙΝΗ S.....	24
2.4 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗΣ ΑΤΙΙΙ.....	25
2.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΧΙΙ (Hageman).....	25
2.6 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ C.....	26
2.7 ΜΤΗFR.....	26
2.8 ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ	27
2.9 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΙΣΤΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ.....	27
2.10 GPlα.....	28
2.11 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	28

2.12 ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ	29
2.13 ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ.....	29
2.14 ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ	30
3.Αιμορραγική Διάθεση.....	30
3.1 Νόσος vonWillebrand	31
3.2 Αιμορροφιλία Α και Β	31
3.3 Αιμοπεταλιοπάθεια	32
4.Φωσφολιπίδια	32
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι.....	34
1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	34
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	35
2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....	35
2.2 Δοκιμασίες Προσυμπτωματικού Ελέγχου στην Αιμόσταση.....	35
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	36
Αντιδραστήρια	36
Διαδικασία.....	36
2.2.2 Χρόνος Μερικής Θρομβοπλαστίνης (APTT)	37
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	37
Αντιδραστήρια	37
Διαδικασία.....	38
2.2.3 Ινωδογόνο.....	38
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	38
Αντιδραστήρια	38
Διαδικασία.....	38
2.2.4 Δ-Διμερή (d-Dimers).....	39
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	39
Αντιδραστήρια	40
Διαδικασία.....	40
2.3 Αντιπηκτικά του λύκου	40
Λήψη και χειρισμός δείγματος.....	41
Αντιδραστήρια	41
Διαδικασία.....	41
2.4 Πρωτεΐνη S (PrS)	41
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	42

Αντιδραστήρια	42
Διαδικασία	42
2.5 Πρωτεΐνη S Ag Free (PrSAgFree).....	42
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	42
Αντιδραστήρια	43
Διαδικασία	43
2.6 Πρωτεΐνη C (PrC).....	43
Λήψη και χειρισμός δείγματος	43
Αντιδραστήρια	44
Διαδικασία	44
2.7 Αντιθρομβίνη III (ATIII).....	44
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	44
Αντιδραστήρια	45
Διαδικασία	45
2.8 Πλασμινογόνο.....	45
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	46
2.9 Αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης (GM).....	46
Λήψη και χειρισμός του δείγματος.....	46
Διαδικασία	47
2.10 Αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης (Anti-B2 GPI).....	47
2.11 Ομοκυστεΐνη.....	48
Μοριακός έλεγχος MTHFR.....	48
2.12 Αναστολέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου -1 (PAI-1)	49
Διαδικασία	50
2.13 Προπηκτικά Φωσφολιπίδια (PPL).....	50
Κεφάλαιο 3. Στατιστικός Έλεγχος	52
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση.....	60
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.....	14
Εικόνα 2-Ο ρόλος του ιστικού παράγοντα	16
Εικόνα 3-Καταρράκτης της πήξης.....	17
Εικόνα 4-Αποδόμηση ινωδογόνου	20

Εικόνα 5 Τριάδα του Virchow	22
Εικόνα 6-Φωσφολιπιδική μεμβράνη	33
Εικόνα 7 Σχηματική Αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών με μετάλλαξεις που εμφάνισαν Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο	53
Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών που παρουσίασαν θρόμβωση	54
Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού.....	56
Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των γυναικών που εμφάνισαν αποβολές	56

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PGE2: προσταγλαδίνες

TXA2: θρομβοξάνη

GPIb-IX: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol anchored proteins (IX)

GPIa : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol anchored proteins

ADP: Adenosine Diphosphate

TF: Tissue Factor

P: Positive

N: Negative

PK: Prekallikrein

PrC: Protein C

PrS: Protein S

PrSAgFree: Protein S Antigen Free

LA: Lupus Antibodies

vWF: von Willebrand

APTT: Activated Partial Thromboplastin Clotting Time

PT: Prothrombin Time

HK , HMWK : High Molecular Weight Kininogen

tPA: Tissue Polypeptide Antigen

APC: Activated Protein C

ATIII: Antithrombin III

MTHFR:Μεθυλεντετραυδροφολικόξύ

PAI:Plasminogen Activator Inhibitor

aPL:προπηκτικάαμινοφωσfolιπίδια

PS:φωσφατιδυλοσερίνη

PC:φωσφατιδυλοχολίνη

PG:φωσφατιδυλογλυκερόλη

PE:φωσφατιδυλαιθανολαμίνη

PI:φωσφατιδυλινοσιτόλη

HELLP:Hemolysiselevatedliverenzymesandlowplateletcount

HRGP :Histidin rich glycoprotein

PPL: Procoagulant Phospholipids

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1. Αιμόσταση

Αιμόσταση ορίζεται ως η φυσιολογική διεργασία που περιορίζει την απώλεια αίματος μετά από αγγειακό τραυματισμό μέσα από την έναρξη του καταρράκτη της πήξης στον οποίο δρουν διαλυτές πρωτεΐνες πλάσματος και ακολουθεί η διαδοχική ενεργοποίηση ενζύμων σχηματίζοντας τελικά το θρόμβο ινώδους .[1]

Η αιμόσταση διακρίνεται σε τεσσέρις φάσεις, την αγγειακή, την αιμοπεταλιακή τη φάση των παραγόντων πήξης και την ινωδολυτική

1.2 Αγγειακή φάση και αγγειοσύσπαση

Τα αιμοφόρα αγγεία επενδύονται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι αντιθρομβωτικά επιτρέποντας την ομαλή ροή του αίματος εντός τους, αυτό οφείλεται στην ρυθμιζόμενη έκκριση αντισταμοπεταλιακών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου της προστακυκλίνης και του μονοξειδίου του αζώτου . Έτσι, μετά από τρώση του αγγείου για να επιτευχθεί η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην εκτειθέμενη υποενδοθηλιακή μήτρα απαιτείται ο παράγοντας vonWillebrand, μια γλυκοπρωτεΐνη των ενδοθηλιακών κυττάρων .[2]

Στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων συμμετέχουν τα υποενδοθηλιακά κύτταρα καθώς περιέχουν μη κολλαγόνες ουσίες, πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο .

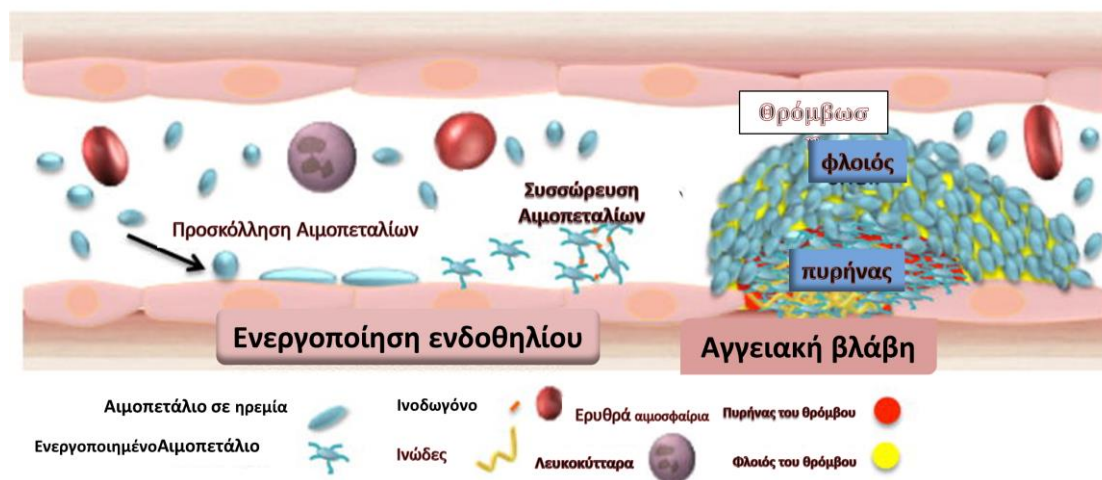
Τον τραυματισμό των αιμοφόρων αγγείων ακολουθεί η αγγειοσύσπαση η οποία απαντάται εντός 30 λεπτών στην περιοχή της βλάβης επάγεται από το νευρικό σύστημα και προκαλείται από την απελευθέρωση ενδοθηλίνης, κολλαγόνου, σεροτονίνης, αγγειοτανσίνης II, ινοπεπτιδίου B.[3]

1.3 Αιμοπεταλιακή φάση

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα που προέρχονται από το μεγακαρυοκύτταρο, περιβάλλονται από μια μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας η οποία περιέχει χοληστερόλη, γλυκολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες και λιπαρά οξέα με πιο

συχνό το αραχιδονικό οξύ το οποίο οξειδώνεται και παράγονται προσταγλαδίνες (PGE2) και θρομβοξάνη (TXA2). Διαθέτουν τρεις τύπους κοκκίων τα πυκνά κοκκία, α κοκκία και τα λυσοσωμικά κοκκία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση και τη δημιουργία θρόμβου . Η έκθεση κολλαγόνου ωθεί τα αιμοπετάλια να προσκολληθούν, να ενεργοποιηθούν και να συσσωρευτούν, ο μηχανισμός προσκόλλησης τους εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των μεμβρανικών υποδοχέων τους (GP υποδοχείς) και των πρωτεϊνών του πλάσματος. Η πρόσφυση προκαλείται από των παράγοντα vonWillebrand ο οποίος δεσμεύεται στο GPIb-IX της αιμοπεταλιακής μεμβράνης. Τα προσκολλημένα αιμοπετάλια υφίστανται αποκοκκίωση και απελευθερώνουν σεροτονίνη, αιμοπεταλιακούς ενεργοποιητές και διφωσφωρική αδενοσίνη (ADP). Ενώ στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων απαιτείται το σύμπλεγμα GlycoproteinIIbIIIa (GPIIbIIIa) το οποίο εξαρτάται από το ασβέστιο και ταυτόχρονα συντήθουν και εκκρίνουν θρομβοξάνη A2 (TXA2) που παίζει ρόλο στην αγγειοσυστολή και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, όπου στην τελευταία συμβάλλει και η P-σελεκτίνη η οποία απελευθερώνεται από τα α- κοκκία της μεμβράνης προς την αιμοπεταλιακή μεμβράνη.[4]

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση



Εικόνα 1-Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.

Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται στο αγγείο σε διάφορα στάδια που αρχίζουν με την προσκόλληση στην ενδοθηλιακή ή υποενδοθηλιακή μήτρα , ακολουθείται από σταθερή προσκόλληση, διάλυση τους και ενδοαιμοπεταλιακή μεταγωγή σήματος. Η αρχική συσσώρευση αιμοπεταλίων σχηματίζει έναν πυρήνα στην περιοχή του τραυματισμού που είναι πλούσιος σε ινώδες. Ανατύπωση από [3]

1.4 Φάση των παραγόντων πήξης

Η πήξη αποτελεί ένα πολύπλοκο αμυντικό μηχανισμό που αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών της πήξης (παραγόντων) που οδηγεί στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και στο σχηματισμό αδιάλυτου ινώδους . Οι περισσότεροι από τους παράγοντες πήξης συντίθενται στο ήπαρ , στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μυελοειδή κύτταρα, είναι ανενεργές πρωτεΐνες και ενεργοποιούνται από πρωτεάση . Η θρομβομοντουλίνη είναι ένας συμπαράγοντας της θρομβίνης που διεγείρει την ενεργοποίηση της αντιπηκτικής πρωτεΐνης C, που είναι μια πρωτεάση σερίνης. Η αντιθρομβίνη είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης ενεργοποιείται από πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης και απενεργοποιεί τη θρομβίνη και τον παράγοντα Χα .[5, 6]

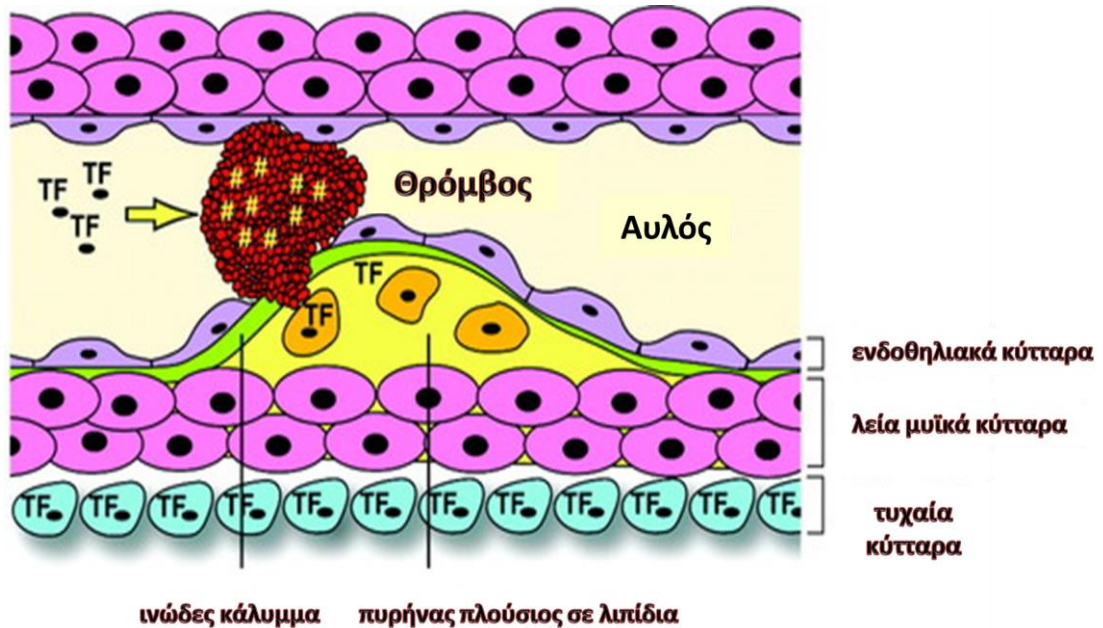
Η ονοματολογία των παραγόντων πήξης στηρίζεται στην λατινική αρίθμηση και είναι οι εξής :

1. Παράγοντας I → Ινωδογόνο
2. Παράγοντας II → Προθρομβίνη
3. Παράγοντας III → Ινικός παράγοντας
4. Παράγοντας IV→ Ιόντα ασβεστίου
5. Παράγοντας V →Ασταθής παράγοντας
6. Παράγοντας VII →Σταθερός παράγοντας
7. Παράγοντας VIII→Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας A
8. Παράγοντας IX→Αντιαιμορροφιλικός παράγονταςB / παράγονταςChristmas
9. Παράγοντας X →Παράγοντας Stuart
10. Παράγοντας XI → Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας C
11. Παράγοντας XII → Παράγοντας Hageman
12. Παράγοντας XIII → Παράγοντας που σταθεροποιεί το ινώδες

Η πήξη διακρίνεται σε δύο οδούς την εξωγενή και την ενδογενή :

Στην εξωγενή οδό της πήξης περιγράφεται η έκθεση του ιστικού παράγοντα (TF) στην αιματική κυκλοφορία έπειτα από τον τραυματισμό του αγγειακού συστήματος καθώς το αίμα εκτίθεται σε εξωαγγειακούς ιστούς που είναι

πλούσιοι σε αυτόν . Το σύμπλεγμα TF και του παράγοντα VII ενεργοποιούν τον παράγοντα X και IX . Ο παράγοντας IX ενεργοποιεί επίσης τον παράγοντα X παρουσία του συμπαραγόντα VIIIa . Ο παράγοντας X παρουσία του συμπαραγόντα Va ενεργοποιεί την προθρομβίνη η οποία μετατρέπεται σε θρομβίνη.[7]

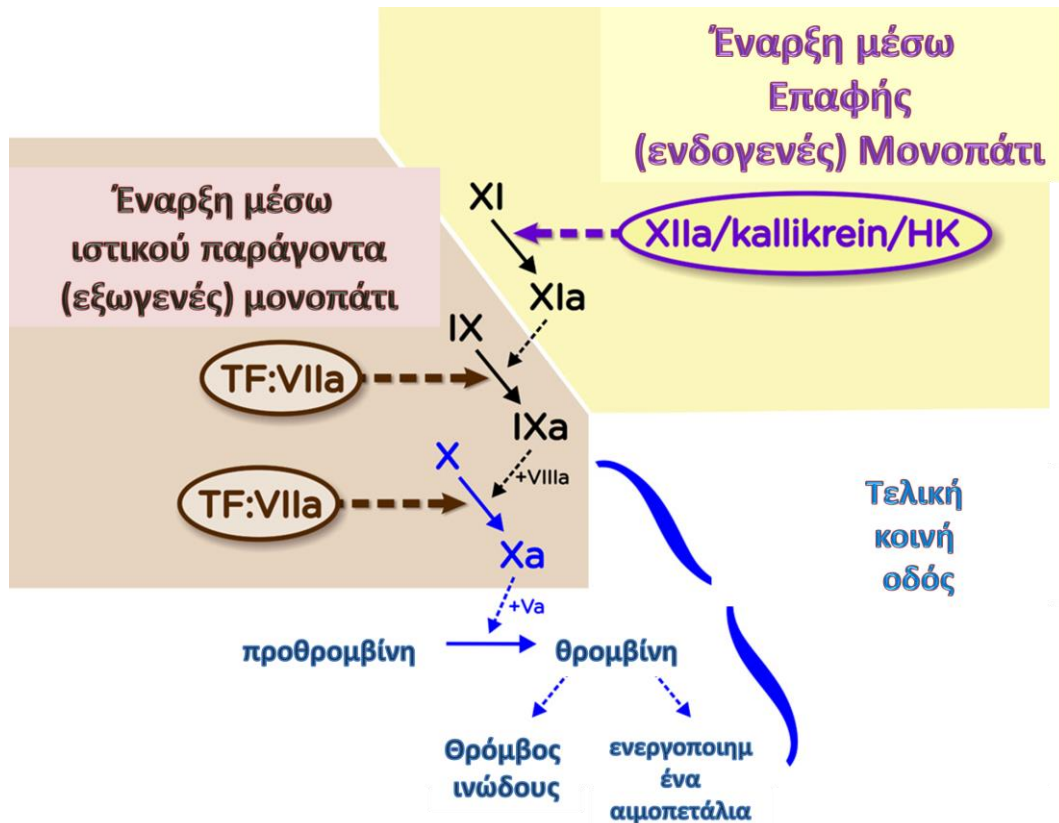


Εικόνα 2-Ο ρόλος του ιστικού παράγοντα.

Παρατηρείται ο ρόλος του TF στο σχηματισμό θρόμβου έπειτα από τη ρήξη αθηρωματικής πλάκας. Ο TF που εκφράζεται στα αφρώδη κύτταρα και στο νεκρωτικό πυρήνα της πλάκας θα εκτεθεί σε παράγοντες πήξης στο αίμα και θα ξεκινήσει η πήξη. Η αιματογενής μορφή του TF συμβάλλει στη διάδοση του θρόμβου, επιπλέον παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά. Ανατύπωση από [8]

Η ενδογενής οδός της πήξης ξεκινά με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους (HK) και προκαλλικρεΐνη (PK) πλάσματος . Η έκθεση του XII σε αρνητικά φορτισμένα μόρια και επιφάνειες οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του και κατ'έπекταση στην ενεργοποίησή του. Στη συνέχεια, αυτό το ένζυμο ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη, ενεργοποιείται αμοιβαία ο παράγοντας XII από

την καλλικρεΐνη και η PK από τον fXIIa και οδηγεί σε βρόχο θετικής ανάδρασης . Έπειτα ο fXIIa ενεργοποιεί τον fXI σε fXIa, ο οποίος με περιορισμένη πρωτεόλυση του FIX σε FIXa από το fXIa επιτρέπει το σχηματισμό του συμπλέγματος «εγγενούς τενάσης» , δηλαδή του συμπλέγματος FIXa, fVIII, ασβέστιο και φωσφολιπίδια και ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa. Η τελευταία κοινή οδός πήξης του αίματος οδηγεί τη δημιουργία θρομβίνης .[9]



Εικόνα 3-Καταρράκτης της πήξης

1.4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V :

Ο παράγοντας V είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, δεν είναι Β-εξαρτώμενη πρωτεΐνη, στο πλάσμα κυκλοφορεί ως πολυπεπίδιο μονής αλυσίδας που είναι ανενεργό προπηκτικό . Ένα ποσοστό (20%) του FV βρίσκεται στα α- κοκκία των αιμοπεταλίων. Αποτελεί συμπαράγοντα του πλάσματος για το σύμπλεγμα προθρομβινάσης που μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Ελλείψεις του FV διακρίνονται σε κληρονομικές και επίκτητες, όπως και σε διαταραχές των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Επίσης τα χαμηλά του επίπεδα

συνδέονται με αιμορραγικές διαθέσεις και παρατεταμένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης και προθρομβίνης ΡΤ.[10]

1.4.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VIII :

Ο παράγοντας πήξης VIII (αντι – αιμοφιλικός παράγοντας Α) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στα ηπατοκύτταρα, στα νεφρά, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο λεμφικό ιστό. Κυκλοφορεί στο αίμα μαζί με τον vWillebrand (vWF) σε ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο. Ο vWF προστατεύει τον παράγοντα VIII από την πρόωρη πρωτεόλυση και τον μεταφέρει στα σημεία της ενδοθηλιακής βλάβης και σε αυτόν δεσμεύεται και η πρωτεΐνη C η οποία είναι αναστολέας της πήξης . Η δραστική μορφή του παράγοντα VIII είναι ο FVIII ένας μη ενζυματικός συμπαράγοντας για το σύμπλεγμα προθρομβινάσης και τενάσης στην ενδογενή οδό της πήξης που επιταχύνει την ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον ενεργοποιημένο IX (FIXa) παρουσία των φωσφολιπιδίων και ασβεστίου . Μια μετάλλαξη στο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα X για τον παράγοντα συμπληκτικότητας VIII οδηγεί σε συγγενή αιμορραγική διαταραχή, την αιμορροφιλία Α όπου παρατηρείται παρατεταμένος χρόνος, μερικής θρομβοπλαστίνης (ΑΡΤΤ), με κανονικό χρόνο ροής και χρόνο προθρομβίνης (ΡΤ).[11]

1.4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ IX :

Ο παράγοντας IX είναι μια από τις τρεις πρωτεΐνες πλάσματος που εξαρτώνται από τη βιταμίνη Κ και συμμετέχουν στην ενδογενή οδό πήξης του αίματος και παράγεται από το ήπαρ. Ο παράγοντας IX ενεργοποιείται από τον παράγοντα VII και τον XIa . Επίσης , παρουσία του VIIIa , φωσφολιπιδίων και ασβεστίου ο IXa μετατρέπει τον παράγοντα X σε Xa .[12] Έλλειψη του παράγοντα IX οδηγεί σε Αιμορροφιλία Β και εμφανίζεται παράταση του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης (ΑΡΤΤ), με κανονικό χρόνο ροής και προθρομβίνης (ΡΤ) .[13]

1.4.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ XI – XII

Ο παράγοντας XI είναι ένα ζυμογόνο πρωτεάσης πλάσματος και κυκλοφορεί ως μη ομοιοπολικό σύμπλοκο με το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη (ΗΚ). Στα αρχικά στάδια του καταρράκτη της πήξης το

FXI μετατρέπεται σε FXIa από τον παράγοντα XIIa . Η ανεπάρκεια του παράγοντα XI οδηγεί σε Αιμορροφιλία C ή σύνδρομο Rosenthal. [14]

Ο παράγοντας πήξης XII (παράγοντας Hageman) παράγεται και εκκρίνεται από το ήπαρ . Ενεργοποιείται με πρωτεολυτική διάσπαση από πρωτεϊνάσες του πλάσματος, όπως η καλλικρεΐνη και η πλασμίνη . Επίσης ο FXII κατά την επαφή με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες (π.χ. γυαλί, καολίνη) αυτοενεργοποιείται σε FXIIa, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της προκαλλικρεΐνης PK προς καλλικρεΐνη του πλάσματος .[15]

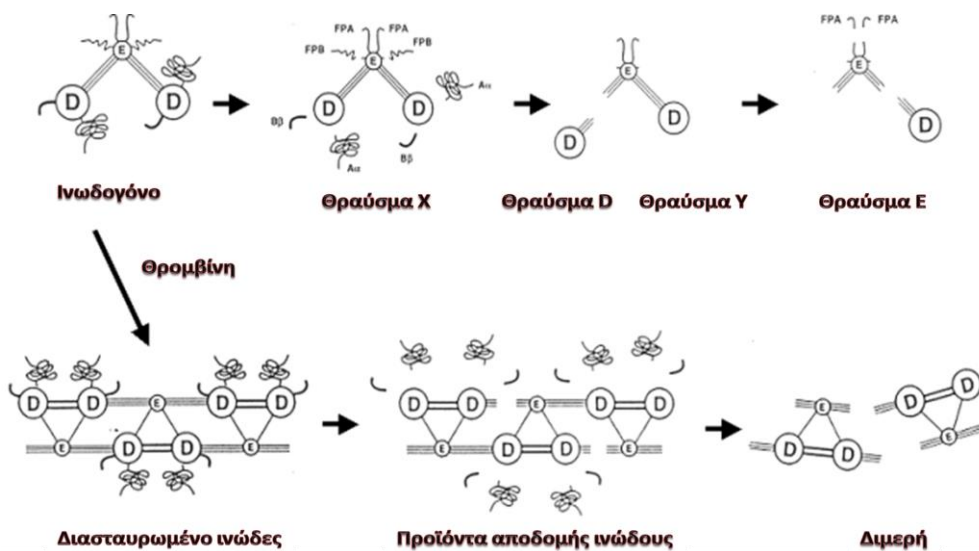
1.4.5 ΚΑΛΛΙΚΡΕΙΝΗ ή ΗΜWK

Το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους χρησιμεύει ως μητρικό μόριο για την αγγειοδραστικό πεπτίδιο βραδυκινίνη και ως συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση των πρωτεασών σερίνης πλάσματος του συστήματος επαφής και μπορεί να εκφραστεί στην επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Η καλλικρεΐνη προέρχεται από τη μετατροπή της προκαλλικρεΐνης σε καλλικρεΐνη με τη βοήθεια του παράγοντα XII. Η καλλικρεΐνη μαζί με άλλους παράγοντες και τα αιμοπετάλια προσκολλάται στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου και ενεργοποιείται ο παράγοντας XII.[16]

1.5 Ινωδόλυση

Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας της πήξης αποτελεί η ινωδόλυση, κατά την οποία επέρχεται η διάσπαση των θρόμβων και αποτελείται από τρεις βασικές πρωτεάσες σερίνης που κυκλοφορούν ως προένζυμα στο αίμα. Κατά την φάση στην οποία η θρομβίνη, ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIII(XIIIa) και η πλασμίνη δραστηριοποιούνται για τη δημιουργία του D-διμερούς. Η έναρξη αυτής της διαδικασίας γίνεται όταν η θρομβίνη που παράγεται κατά την πήξη μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε μονομερή ινώδους. Κάθε μόριο ινωδογόνου είναι ένα συμμετρικό διμερές που απαρτίζεται από τρία ζεύγη, τριών αλληλένδετων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, τις λεγόμενες α,β,γ. Αυτές οι αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, έτσι ώστε τα μόρια ινωδογόνου να αποτελούνται από μια κεντρική περιοχή , την περιοχή E, η οποία συνδέεται σε δύο περιφερικές περιοχές D. Η θρομβίνη διασπά τα πεπτίδια από τα NH₂ άκρα των α και β αλυσίδων ,ώστε να εκτεθούν στις Ew

περιοχές και έπειτα να εισαχθούν στις D περιοχές. Με αυτόν τον τρόπο τα μονομερή ινώδους πολυμερίζονται και σχηματίζουν δίκλινα πρωτοϊνίδια ινώδους. Τα μονομερή και τα πρωτοϊνίδια συνδέονται με μη ομοιοπολικό τρόπο, το δίκτυο ινώδους είναι ασταθές και έτσι ενισχύεται από τον παράγοντα XIIIa, οποίος ενώνει τις περιοχές των D γειτονικών μονομερών ινώδους σταυροειδώς, καθώς και τις α-αλυσίδες των αντιτιθέμενων μονομερών ώστε να σχηματίσουν D-διμερές και α-πολυμερή, αντίστοιχα. Η πλασμίνη που αφορά την κυτταρική λύση του θρόμβου και παράγεται από το πλασμινογόνο διασπά δραστικά το ινώδες και διατηρεί τα αγγεία. Το πλασμινογόνο ενεργοποιείται από ένα προένζυμο τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ιστού πρωτεασών (tPA), το οποίο απελευθερώνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα έπειτα από τραυματισμό, και τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης(uPA), το τριμερές σύμπλοκο που σχηματίζεται στη επιφάνεια του θρόμβου ινώδους σχηματίζει την πλασμίνη η οποία αποικοδομεί το δίκτυο ινώδους σε διαλυτά θραύσματα, με δομικό στοιχείο το (DD)Εμε επιπλέον πρωτεόλυση από την πλασμίνη αποκόπτεται το θραύσμα Ε απελευθερώνοντας το σύμπλεγμα (DD)Εκαι το D-διμέρες κυκλοφορεί ελεύθερο στο πλάσμα.[17, 18]



Εικόνα 4-Αποδόμηση ινωδογόνου

Σε αρχικό στάδιο ο C-τελικές περιοχές των α και β – αλυσίδων διασπώνται από την πλασμίνη μέσα στην D-περιοχή του ινωδογόνου, απελευθερώνοντας τα θραύσματα Αα και Ββ. Το θραύσμα Χ δημιουργείται από το ινοπεπτιδίο Β που περιέχει θραύσμα από τη Ν-τελική περιοχή της β-αλυσίδας και απελευθερώνεται. Έπειτα τα

θραύσματα D,Y,E δημιουργούνται μετά τη διάσπαση των τριών πολυπεπτιδικών αλυσίδων που συνδέουν τη D και E περιοχές, από την πλασμίνη. Το ινωδογόνο πολυμερίζεται με θρομβίνη και σχηματίζεται ινώδες διαλυτοποιείται και δημιουργούνται D-Dimers (προϊόντα αποδόμησης ινώδους) . Ανατύπωση από [19]

1.6 Φυσικοί αναστολείς του μηχανισμού πήξης

Κατά το σχηματισμό θρόμβου καθίσταται απαραίτητη η ενεργοποίηση κάποιου μηχανισμού για την καταστροφή του στο σημείο της βλάβης. Έτσι ενεργοποιείται ο μηχανισμός της πήξης και έπειτα ακολουθούν δύο μηχανισμοί που ρυθμίζουν την παραγωγή θρομβίνης

- a. Ένα άμεσο σύστημα που αναστέλλει τη δράση ενεργοποιημένων παραγόντων των πρωτεασών και της σερίνης
- b. Ένα έμμεσο σύστημα βιταμίνης-K εξαρτώμενο που αναστέλλει τους ενεργοποιημένους επιταχυντές της πήξης και το αποτελεί η πρωτεΐνη C (PC) και ο συμπαράγοντας της πρωτεΐνης S

1.7 Μετάλλαξη της προθρομβίνης

Μια γενετική παραλλαγή στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της προθρομβίνης όπου η γουανίνη (C) αντικαθίσταται από αδερίνη (A) στη νουκλεοτιδική θέση 20210, ενέχει κίνδυνο για φλεβική θρόμβωση. Η συχνότητα της θρόμβωσης έχει παρατηρηθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό σε ετεροζυγώτες. Η προθρομβίνη αποτελεί παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση λόγω των αυξημένων επιπέδων στο πλάσμα και της αυξημένης δραστηριότητάς της. Σε ασθενείς με PTM τυπικές μορφές φλεβικής θρομβοεμβολής είναι η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) και η πνευμονική εμβολή (PE), ωστόσο έχει παρατηρηθεί θρόμβωση σε άτυπα σημεία όπως των πυλαίων, ηπατικών και εγκεφαλικών φλεβών.[21, 22]

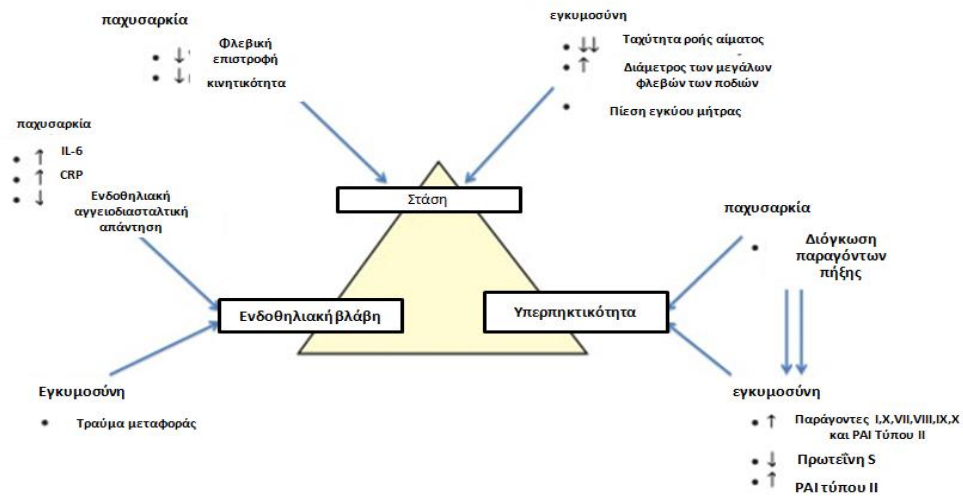
2.Θρομβώσεις – Θρομβοφιλίες

Η θρομβωτική διάθεση (θρομβοφιλία) αποτελεί την ανώμαλη ενεργοποίηση της αιμόστασης , δημιουργώντας ένα σταθερό θρόμβο ινικής που έρχεται σε άμεση επαφή με το αγγειακό τοίχωμα αποφράσσοντας με αυτόν τον τρόπο μερικά ή ολικά μια φλέβα ή αρτηρία έχοντας ως αποτέλεσμα να διακόπτεται η αιματική κυκλοφορία . Βασικός παθογενετικός μηχανισμός της θρόμβωσης είναι η τριάδα του Virchow η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα :

A) Διαταραχή της ροής του αίματος

B) Διαταραχή των συστατικών που μετέχουν στο μηχανισμό της πήξης

Γ) Βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων



Εικόνα 5 Τριάδα του Virchow

Η τριάδα του Virchow περιγράφει τις τρεις κατηγορίες των παραγόντων θρόμβωσης. Ανατύπωση από

Η θρομβοφιλία αποτελεί πολυπαραγοντική νόσο και συντείνουν στην πρόκληση της , τόσο γενετικοί όσο και επίκτητοι παράγοντες ή και ο συνδυασμός τους . Αναφορικά με τη διάκριση των παραγόντων που οδηγούν στη θρομβωτική διάθεση έχουμε την ταξινόμηση των κληρονομικών διαταραχών που είναι οι εξής :

- I. Μετάλλαξη VLeiden (μετάλλαξη στο γονίδιο του παράγοντα V οδηγεί σε ανεπαρκή αδρανοποίηση του παράγοντα Va από την ActivatedProteinC (APC) και έχουμε αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC-R))
- II. Μετάλλαξη G20210A προθρομβίνης (οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης)
- III. Έλλειψη αντιθρομβίνης III (ATIII)
- IV. Έλλειψη πρωτεΐνης C
- V. Έλλειψη πρωτεΐνης S
- VI. Δυσινωδογοναιμία
- VII. Υπερομοκυστεϊναιμία (μετάλλαξη MTHFR 677C-T)
- VIII. Διαταραχές γλυκοπρωτεϊνών των αιμοπεταλίων

Συνδυασμός επίκτητων και κληρονομικών διαταραχών :

- a) Έλλειψη του συμπαραγόνα II της ηπαρίνης
- b) Έλλειψη του πλασμινογόνου (ανεπάρκεια t-PA , περίσσεια PAI)
- c) Αυξημένοι προπηκτικοί παράγοντες VIII , IX , X
- d) Ομοκυστεϊναιμία

Επίκτητες διαταραχές :

- a. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
- b. Μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα
- c. Σύνδρομο Trousseau (καρκίνος – μεταναστεύουσα θρομβοφλεβίτιδα)
- d. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου
- e. Χειρουργικές επεμβάσεις
- f. Κύηση , λοχεία , αντισύλληψη
- g. Νεφρωσικό σύνδρομο
- h. Νυκτερινή παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία
- i. Νόσος Bechet[24]

2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VLEIDEN

Ο παράγοντας V-Leiden είναι ο πιο κοινός γενετικός παράγοντας κινδύνου για φλεβική θρομβοεμβολή και είναι μια διαταραχή που αφορά την αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (activated protein C-APC). Η μετάλλαξη V-Leiden προκύπτει από την ειδική υποκατάσταση της γουανίνης προς αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1631 στο γονίδιο του παράγοντα V (G1691A) και επομένως αντικαθίσταται η αργινίνη με γλουταμίνη. Έτσι, εξαιτίας αυτής της αμινοξικής αντικατάστασης ο παράγοντας V είναι ανθεκτικός στην APC και αδρανοποιείται με πολύ αργότερο ρυθμό με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή θρομβίνης που οδηγεί σε θρομβοφιλία.

Ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης αυξάνεται κατά πολύ στους ομοζυγώτες, συνδυάζεται όμως με άλλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες όπως η λήψη αντισυλληπτικών, η εγκυμοσύνη, η ανεπάρκεια πρωτεΐνης S και υπερομοκυστεϊναιμία.[25, 26]

2.2 ΠΡΩΤΕΙΝΗ C

Η πρωτεΐνη C είναι μια K-βιταμινωεξαρτώμενη πρωτεΐνη της πήξης που παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της θρομβίνης και συντίεται στα ηπατοκύτταρα. Η πρωτεΐνη C του πλάσματος ενεργοποιείται όταν σχηματίζεται σύμπλοκο με τη θρομβίνη στον υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων, θρομβομοντουλίνη. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) μαζί με συμπαράγοντες πρωτεΐνης (πρωτεΐνη S και παράγοντας V) και λιπιδικός συμπαράγοντας αδρανοποιεί τους ενεργοποιημένους προπηκτικούς παράγοντες V και VIII. Σε ασθενείς με ανεπάρκεια πρωτεΐνης C έχουν περιορισμένη ικανότητα να ρυθμίζουν την παραγωγή θρομβίνης από τους Va και VIIIa, αφού ενεργοποιηθούν από μικρές ποσότητες θρομβίνης κατά τη φάση έναρξης ενεργοποίησης της πήξης. [27, 28]

2.3 ΠΡΩΤΕΙΝΗ S

Η πρωτεΐνη S (PS) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη πλάσματος που συντίεται και εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα Leydig. Μετά από επεξεργασία που υφίσταται και μετατρέπεται σε ώριμη πολυμορφική πρωτεΐνη 635 αμινοξέων, αποτελείται από μια περιοχή γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος που δεσμεύει φωσφολιπίδια (GLA), μια περιοχή ευαίσθητη στη θρομβίνη και τέσσερις τομείς που προσομοιάζουν του EGF (αυξητικού επιδερμικού παράγοντα). Η πρωτεΐνη S αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της πήξης του αίματος και συμμετέχει στις οδούς ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Δύο βασικές λειτουργίες της είναι

- a. δρα ως συμπαράγοντας για την APC, ενισχύοντας την αδρανοποίηση των ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης Va και VIIIa και ενισχύει σημαντικά τον αντιπηκτικό ρόλο της πρωτεΐνης C, αυξάνοντας τη συγγένεια αυτής προς τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες
- b. Η PS δρα ως συμπαράγοντας του αναστολέα της διαδρομής του ιστικού παράγοντα διεγείροντας την αναστολή του FXa από το TFPI. Εργαστηριακά υπάρχουν δύο τύποι αναλύσεων για τη μέτρηση του PS. Ανοσοδοκιμασίες για τον προσδιορισμό των επιπέδων ολικού και ελεύθερου PS και δοκιμασίες πήξης για τη μέτρηση της δραστηριότητας του συμπαράγοντα APC. [29, 30]

2.4 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗΣ ΑΤΙΙΙ

Η αντιθρομβίνη είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης που φυσιολογικά απενεργοποιεί τη θρομβίνη (παράγοντας ΙΙα), τον παράγονταΧα αλλά και τους ΙΧα, ΧΙα, ΧΙΙα, καλλικρεΐνη, πλασμίνη και ευθύνεται για την ύπαρξη φλεβικών θρομβώσεων. Η ΑΤ είναι μια α₂ σφαιρίνη που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και έχει δύο ισομορφές α και β και η β-ισομορφή διαθέτει υψηλότερη συγγένεια με την ηπαρίνη, η παρουσία της οποίας αυξάνει την αντιπηκτική δράση της ΑΤ. Η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης διακρίνεται σε κληρονομική και επίκτητη. Η κληρονομική ανεπάρκεια διαρείται σε δύο τύπους:

- a. Στην ανεπάρκεια τύπου I που είναι ποσοτική ανεπάρκεια και αφορά μεταλλάξεις που επισυμβαίνουν στο γονίδιο της αντιθρομβίνης (διαγραφές, προσθήκες και σπανιότερα αντικαταστάσεις ζεύγους βάσεων)
- b. Η ανεπάρκεια τύπου II εμφανίζει μεταλλαγές που επηρεάζουν είτε την ενεργή περιοχή είτε την περιοχή δέσμευσης της ηπαρίνης και οδηγείται σε ποιοτικές διαταραχές. Τα ετερόζυγα άτομα με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για φλεβικές θρομβώσεις σε σχέση με άτομα με ανεπάρκεια πρωτεΐνης S ή C ή FVLeiden. Έχει αποδειχθεί ότι πολύ συχνά άτομα πάνω από 55 έτη εμφανίζουν θρομβώσεις.[21, 31]

2.5 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΧΙΙ (Hageman)

Ο παράγοντας ΧΙΙ είναι ένα ζυμογόνο του πλάσματος που μετατρέπεται από την PK (καλλικρεΐνη) σε δραστική πρωτεάση σερίνης FXIIa, στο σύστημα επαφής με το πλάσμα όπου συμμετέχει το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους (HK). Η ανεπάρκεια του FXII γνωστή και ως παράγοντας Hageman αποτελεί διαταραχή της πήξης και μπορεί να είναι είτε κληρονομική με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα είτε επίκτητη, τα αίτια της οποίας περιλαμβάνουν το νεφρωσικό σύνδρομο, σήψη και ΔΕΠ. Η ανεπάρκεια του FXII είναι εξαιρετικά σπάνια και διαγιγνώσκεται τυχαία, σε έναν παρατεταμένο χρόνο ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης

(ΑΡΤΤ). Πιθανά οδηγεί σε θρομβοεμβολές δεν έχει συσχετιστεί όμως με κίνδυνο αιμορραγίας, ούτε προστατεύει από τη θρόμβωση.[32, 33]

2.6 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C

Η APC φυσιολογικά απενεργοποιεί τους παράγοντες πήξης FV και FVIII και έτσι επιβραδύνει τη διαδικασία της πήξης. Η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC-R) οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο για τον FV, όπου η αδενίνη (A) αντικαθιστά τη γουανίνη (G) στη νουκλεοτιδική θέση 1691 και απομένως εισάγεται διαφορετικό αμινοξύ αντί της αργινίνης στη θέση 506 και μεταφράζεται η γλουταμίνη. Επομένως η APC δεν αναγνωρίζει την αργινίνη και δεν μπορεί πλέον να απενεργοποιήσει αποτελεσματικά το FV. Επίσης, κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο και οι ομόζυγοι φορείς διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν VTE σε σχέση με τους ετερόζυγους.[34]

2.7 MTHFR

Το γονίδιο του MTHFR (μεθυλοτετραϋδροφολικό οξύ) φυσιολογικά παράγει ένα ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο σώμα. Ο άνθρωπος διαθέτει 2 γονίδια MTHFR, ένα κληρονομείται από τον κάθε γονέα. Σε κάποια άτομα υπάρχει γενετική μετάλλαξη στο ένα ή και στα δύο γονίδια MTHFR, σε εκείνους που συμβαίνει μετάλλαξη στο ένα γονίδιο MTHFR καλούνται ετερόζυγοι ενώ αν υπάρχουν μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια καλούνται ομόζυγοι. Η συχνότερη μετάλλαξη MTHFR ονομάζεται MTHFR C677T, η οποία προκύπτει από τη σημειακή μετάλλαξη της αντικατάστασης της κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στη θέση 677. Μια δεύτερη μετάλλαξη είναι η A1298C η οποία προέρχεται από την αντικατάσταση της αδενίνης (A) από κυτοσίνη στη θέση 1298 του γονιδίου MTHFR A1298C. [35]

Το ένζυμο μεθυλοτετραϋδροφολική αναγωγή είναι το ρυθμιστικό ένζυμο που παράγεται από το γονίδιο του MTHFR και παίζει ρόλο στην επεξεργασία αμινοξέων. Αρχικά, μετατρέπει το 5,10-μεθυλοτετραϋδροφολικό σε 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό το οποίο

παράγει δότη μεθυλίου για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη.[36]

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του MTHFR μπορούν να αλλάξουν ή να ελαττώσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, με αποτέλεσμα να επέλθει αύξηση της ομοκυστεΐνης στο αίμα (υπερομοκυστεΐναιμία) και αυτό να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για ορισμένες παθολογικές καταστάσεις όπως η αυξημένη αρτηριακή πίεση, θρόμβους αίματος, αποβολές και κάποιους τύπους καρκίνου. Έχει μελετηθεί ότι άτομα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό C677T διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αγγειακής νόσου, τόσο καρδιακής όσο και εγκεφαλικής.[37]

2.8 ΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΗ

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ που περιέχει σουλφυδρύλιο η οποία αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν στη φυσιολογική βιοσύνθεση των αμινοξέων μεθειονίνη και κυστεΐνη. Παράγεται μέσω της απομεθυλίωσης της μεθειονίνης και υπάρχει στο πλάσμα σε τέσσερις μορφές , το 1 % κυκλοφορεί ως ελεύθερη θειόλη και το 70-80 % παραμένει δεσμευμένο στα δισουλφίδια με τις πρωτεΐνες πλάσματος.[38]

Η υπερβολική αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο αίμα καλείται υπερομοκυστεΐναιμία και εκδηλώνεται με θρομβώσεις συνήθως με εμφράγματα του μυοκαρδίου και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Προκαλείται είτε από επίκτητους παράγοντες όπως διατροφικές ελλείψεις βιταμινών ή σε κληρονομικούς όπως μεταλλάξεις στο γονίδιο του MTHFR που οδηγούν σε γενετικές βλάβες ενζύμων που μεταβολίζουν την ομοκυστεΐνη.[39]

2.9 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΙΣΤΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ

Το PAI-1 ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων του αναστολέα της πρωτεάσης σερίνης και αποτελεί τον κύριο φυσιολογικό αναστολέα των πρωτεασών σερίνης, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ιστού. Με την αναστολή του uPA\&tPAεπέρχεται αναστολή της μετατροπής του

πλασμινογόνου σε πλασμίνη, όπως και της ενεργοποίησης MMP που εξαρτάται από την πλασμίνη. Το PAI-1 συντίθεται από πικοίλα κύτταρα, όπως τα αγγειακά ενδοθηλιακά, τα λιποκύτταρα, τα μακροφάγα, τα καρδιομυοκύτταρα, και τους ινοβλάστες ενώ αποθηκεύεται κυρίως στα αιμοπετάλια. Το PAI-1 προσδένεται μέσω της βιτρονεκτινής στο ECM και προστατεύει τις πρωτεΐνες ECM από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση επιδρώντας στην επιτάχυνση της επούλωσης των πληγών, μέσω της αλληλεπίδρασης του PAI-1 με uPA/tPA, μπλοκάροντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση uPA/tPA, το σχηματισμό πλασμίνης και την πλασμίνη εξαρτώμενη ενεργοποίηση του MMP. Η υπερэкφραση του PAI-1 ινίνοκαταστέλλει την ινώδωση επιφέροντας την παθολογική εναπόθεση ινώδους και βλάβη του ιστού.[40, 41]

2.10 GPIa

Οι πρωτεΐνες GPI βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων και άλλων αιμοποιητικών κυττάρων και είναι απαραίτητες για την αποστολή αλλά και την προστασία από τους ενδογενείς και τους εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. [42] Ο υποδοχέας του κολλαγόνου των αιμοπεταλίων GPIa είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα ινώδη κολλαγόνα στα σημεία της αγγειακής βλάβης. Η διακύμανση στην πυκνότητα GPIa/IIa πάνω στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων έδειξε ότι συσχετίζεται με ένα σιωπηλό εξωνικό διμορφισμό στο νουκλεοτίδιο 807 (C/T) του cDNA της GPIa και μπορεί να προκαλέσει βραδύτερο ή ταχύτερο ρυθμό προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο τύπου I αντίστοιχα. Οι κληρονομικές διαφορές αυτού του υποδοχέα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, θα μπορούσαν να συντελέσουν σε αυξημένο είτε θρομβωτικό είτε αιμορραγικό κίνδυνο.[42-44]

2.11 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS) είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες υπερπηκτικότητας και εκδηλώνεται κυρίως με θρομβώσεις και νοσηρότητα εγκυμοσύνης. Στα κριτήρια ταξινόμησης κατατάσσονται τρία διαφορετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα: αντιπηκτικά του λύκου, η αντικαρδιολιπίνη και η αντιβ2-γλυκοπρωτεΐνη (anti-β2GPI). Το αντιπηκτικό του λύκου είναι το πιο σημαντικό αντιφωσφολιπιδικό αντίσωμα καθώς συνδέεται πιο έντονα τόσο με θρομβώσεις όσο και με δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης. Οι αναλύσεις για το αντιπηκτικό του λύκου είναι λειτουργικές, χρησιμοποιώντας πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια και προκαλεί παράταση του APTT. Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο μπορεί να σχετίζεται με άλλες αυτοάνοσες καταστάσεις και ένα ποσοστό υπάρχει

σε ασθενείς με συστηματικό ερυθροματώδη λύκο. Επίσης, πιθανά εμφανίζεται σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με ιστορικό σε φλεβικές θρομβώσεις ή αρτηριακές, σε θρομβοπενκούς ασθενείς και σε εγκύους με συχνές αποβολές.[45, 46]

2.12 ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΕΙΣ

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορούν να εμφανιστούν διάφορες διαταραχές της αιμόστασης, ο αυξημένος κίνδυνος θρομβοεμβολής είναι η υπερπηκτικότητα η οποία πιθανά έχει αναπτυχθεί για να προστατεύει τις γυναίκες από τις αιμορραγικές προκλήσεις της αποβολής και του τοκετού. Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη φλεβικής θρομβοεμβολής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι οι εξής:

1. Ιστορικό θρόμβωσης
2. Κληρονομική και επίκτητη θρομβοφιλία
3. Ηλικία της μητέρας >35 ετών
4. Ιατρικές καταστάσεις (ΣΕΛ, δρεπανοκυτταρική αναιμία, καρδιοπάθειες, παχυσαρκία, διαβήτης, υπέρταση, κάπνισμα, ιστορικό επιφανειακής θρομβοεμβολής)
5. Επιπλοκές εγκυμοσύνης και τοκετού

Διαταραχές που αφορούν τη θρομβοφιλία είναι ο παράγοντας VLeiden, το ινωδογόνο, πλασμινογόνο, μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης, έλλειψη πρωτεΐνηςC, S, μετάλλαξη της αντιθρομβίνης, ελαττωμένη ινωδόλυση, αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα, πολυμορφισμοί MTHFR και υπερομοκυστεΐναιμία.[47]

2.13 ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Η φλεβική θρομβοεμβολή είναι μια κατάσταση πήξης του αίματος και η παθογένεση της περιγράφεται από την τριάδα Virchow. Σύμφωνα με αυτήν, η φλεβική θρόμβωση προέρχεται από την υπερπηκτικότητα, είτε από μεταβολές στη ροή, είτε από κάποια ενδοθηλιακή βλάβη. Εκδηλώνεται με εν τω βάθου φλεβική θρόμβωση (DVT), πνευμονική εμβολή, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η DVT εμφανίζεται όταν σχηματίζεται θρόμβος στις βαθιές φλέβες του σώματος, συνήθως των κάτω άκρων. Η πνευμονική εμβολή προέρχεται από μια DVT όπου θραύσματα ινώδους αποφράσσουν πάνω από το 50% της διατομής της πνευμονικής αρτηρίας και αποφράσσει δύο ή περισσότερες λοβιακές αρτηρίες. Εμφανίζεται σε ασθενείς με υποκείμενη κακοήθεια, πρόσφατη χειρουργική επέμβαση και ασθενείς με ιστορικό υπερπηκτικότητας. Επιπλέον, σε ασθενείς με γενετική ή επίκτητη θρομβοφιλία, συσχετίζεται η υπερπηκτικότητα, ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, πρωτεΐνη S και πρωτεΐνηC. Άλλοι παράγοντες κινδύνου που έχουν συνδεθεί με οξεία

πνευμονική εμβολή περιλαμβάνουν ιστορικό παρατεταμένης ακινησίας, παχυσαρκία, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια, εγκυμοσύνη και χρήση αντισυλληπτικών.[48, 49]

2.14 ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι η διακοπή της ροής του αίματος προς τον εγκέφαλο που προκαλεί παράλυση, διαταραχές στην εγκεφαλική λειτουργία και μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο.[50] Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια διακρίνονται σε ισχαιμικά όπου πραγματοποιείται απόφραξη ενός αιμοφόρου αγγείου που προωθεί αίμα προς τον εγκέφαλο[51] και τα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια στα οποία συμβαίνει ρήξη αιμοφόρου αγγείου είτε ανευρίσματος, είτε αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας, συχνά λόγω υπέρτασης. Η πρόκληση εγκεφαλικού επεισοδίου συνδέεται με διάφορους αγγειακούς παράγοντες κινδύνου όπως η υπέρταση, το κάπνισμα, ο ΣΔ, η παχυσαρκία, καρδιακές νόσοι, υψηλή χοληστερίνη οι οποίοι είναι αναστρέψιμοι. Σε αντίθεση με την ηλικία, το φύλο, τη φυλή, ένα προϋπάρχον εγκεφαλικό επεισόδιο που αποτελούν μη αναστρέψιμους παράγοντες.[52] Η εμφάνιση εγκεφαλικών πέραν της καθορισμένης ηλικίας ενδεχομένως να οφείλεται και σε κληρονομικές μεταλλάξεις στις οποίες έχουμε πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο θρομβωτικό και στο θρομβολυτικό καταρράκτη.[53] Μια συσχέτιση εντοπίστηκε για δύο πολυμορφισμούς τον C677T της MTHFR και του e2-4 της ApoE.[54]

3. Αιμορραγική Διάθεση

Η αιμορραγική διάθεση προκαλείται από διαταραχές στην πρωτογενή αιμόσταση (νόσος του von Willebrand, κληρονομικές διαταραχές της λειτουργίας των αιμοπεταλίων), στη δευτερογενή αιμόσταση (αιμορροφιλία Α, Β, ανεπάρκεια του πηκτικού παράγοντα), διαταραχές στην ινωδόλυση και στο σχηματισμό συνδετικού ιστού και αγγείων. Στην εργαστηριακή αξιολόγηση ασθενούς με αιμορραγική τάση εξετάζονται ο χρόνος προθρομβίνης (PT) και ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT). Έτσι, παρατηρείται παράταση του PT σε ανεπάρκεια του FVII, το APTT παρατείνεται σε ανεπάρκεια του FVIII, FIX, FXI και τόσο το PT όσο και το APTT μπορούν να παραταθούν σε ανεπάρκεια FII, FV, FX και σε χαμηλά επίπεδα ινωδογόνου.[55]

3.1 Νόσος vonWillebrand

Η νόσος vonWillebrand οφείλεται σε ποσοτικές ή ποιοτικές ανεπάρκειες του παράγοντα vonWillebrand , μια σύνθετη πρωτεΐνη πλάσματος που συμβάλλει στο σχηματισμό θρόμβου αιμοπεταλίων στα σημεία αγγειακής βλάβης ώστε να προληφθεί η απώλεια αίματος . Κύρια λειτουργία του είναι η προσκόλληση αιμοπεταλίων στα σημεία αγγειακής βλάβης ώστε να προληφθεί η απώλεια αίματος . Κύρια λειτουργία του είναι η προσκόλληση των αιμοπεταλίων μέσω υποδοχέων όπως της γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb) αλλά και του GPIIb/IIIa στα σημεία τραυματισμού, συνδέεται με τα συστατικά της υποενδοθηλιακής μήτρας όπως το κολλαγόνο, δεσμεύει επίσης τον VIII και τον μεταφέρει στα σημεία της βλάβης. Η νόσος vonWillebrand υποδιαιρείται σε τύπους με βάση το υποκείμενο ελάττωμα, το οποίο μπορεί να είναι είτε μερική ανεπάρκεια (τύπος 1) , είτε απόλυτη έλλειψη (τύπος 3) . Ο τύπος 2 αφορά ποιοτικές διαταραχές, ελάττωμα στον πολυμερισμό και ανώμαλη δέσμευση με συνδέτη, όπως αυξημένη σύνδεση με GPIb και ελαττωματική με τον FVIII και τα πολυμερή αντίστοιχα . Η κλινική εμφάνιση της αιμορραγίας εξαρτάται από τα επίπεδα πτώσης του FVIII και η εργαστηριακή διερεύνηση αφορά τη μέτρηση του APTT, το χρόνο αιμορραγίας του VIII: Συμπαράγοντα ριστοκετίνης και αντιγόνον WF.[56, 57]

3.2 Αιμορροφιλία A και B

Η αιμορροφιλία A είναι μια κληρονομική αιμορραγική διαταραχή συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα X και προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο για τον παράγοντα VIII . Συχνά αναπτύσσονται ανασταλτικά αντισώματα έναντι του παράγοντα VIII και IX (για την αιμορροφιλία B), ειδικά σε αιμορροφιλικούς ασθενείς με μεταλλάξεις που προέρχονται από διαγραφές (αιμορροφιλία B) ή τυχαίες μεταλλάξεις, πιθανά αναπτύσσουν αναστολές είτε για τον VIII είτε για τον IX. Η ισχύς του αναστολέα εξαρτάται από την ικανότητα του να αδρανοποιεί την ενεργότητα του εκάστοτε παράγοντα .[58]

Η αιμορροφιλία B είναι μια κληρονομική αιμορραγική διαταραχή που συνδέεται με το χρωμόσωμα X και επηρεάζει κυρίως τους άνδρες. Η επαναλαμβανόμενη παρατεταμένη αιμορραγία οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα ή στην έλλειψη του

παράγοντα IX στο πλάσμα , ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διάσπαση και την ενεργοποίηση του FXστον καταρράκτη της πήξης.[59]Η διαγνωστική προσέγγιση των δύο νόσων βασίζεται στη μέτρηση της δραστηριότητας του FVIII ή FIX στο πλάσμα και εργαστηριακά αφορά τη μέτρηση του ενεργοποιημένου χρόνου μερικής θρομβοπλαστικής (APTT) και τη δοκιμασία χρωμογόνου υποστρώματος (CSA).[60]

3.3 Αιμοπεταλιοπάθεια

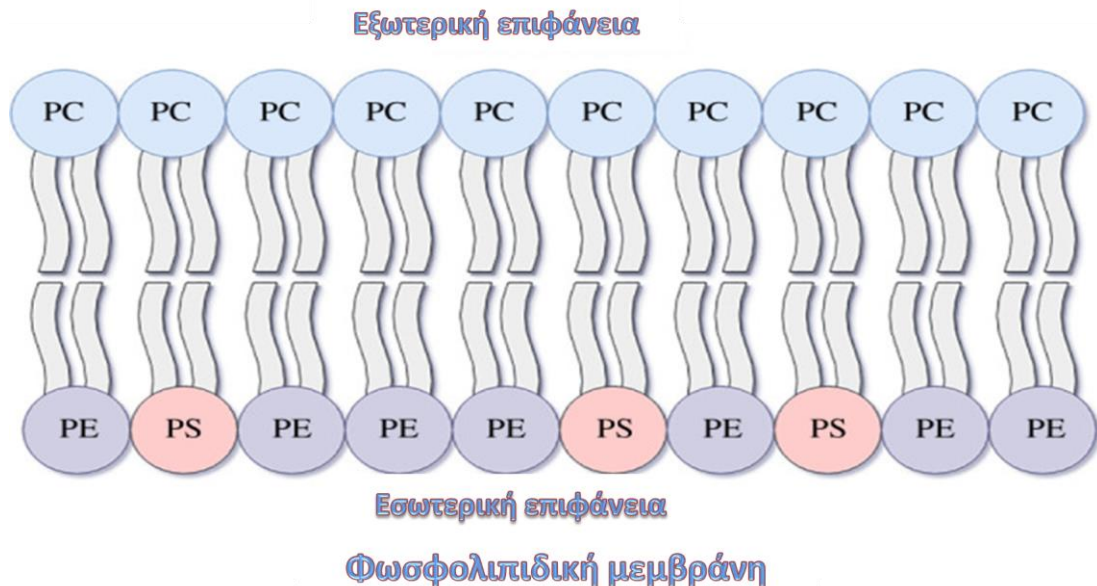
Η θρομβοπενία ορίζεται ως ένας αριθμός αιμοπεταλίων μικρότερος από 150×10^3 / μL. Ασθενείς με αριθμό αιμοπεταλίων μεγαλύτερο από 50×10^3 μείναι συνήθως ασυμπτωματικοί , ένας αριθμός αιμοπεταλίων από 30 με 50×10^3 /μl εκδηλώνεται σπάνια ως πορφύρα, αιμοπετάλια από 10 με 30×10^3 / μl με ένα ελάχιστο τραύμα προκαλεί αιμορραγία και αιμοπετάλια λιγότερα από 5×10^3 /μl μπορεί να προκαλέσει μια αυθόρμητη αιμορραγία (αιμορραγία σε κάποιο βλεννογόνο, ενδοκρανιακή, γαστρεντερική και ουρογεννητική αιμορραγία. Η θρομβοπενία μπορεί να προύψει από μειωμένη παραγωγή αιμοπεταλίων, αυξημένη κατανόηση ή δέσμευση. Η θρομβοπενία μπορεί να προκληθεί ως μέρος μιας πολυσυστημικής διαταραχής, από κάποια οξεία λοίμωξη, από ηπαρίνη, η ηπατική νόσο, από θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα/ αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο HELLP (Hemolysiselevatedliverenzymesandlowplateletcount) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Μεμονωμένη θρομβοπενία παρατηρείται σε ασθενείς που λαμβάνουν φάρμακα. Άλλες μορφές θρομβοπενίας είναι η θρομβοπενική πορφύρα του ανοσοποιητικού, ψευδοθρομβοπενία και η θρομβοπενία κύησης.[61]

4.Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια βρίσκονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και είναι απαραίτητα για τη δομική υποστήριξη και για τις σηματοδοτικές οδούς ενεργοποίησης των κυττάρων. Σε κύτταρα ηρεμίας τα φωσφολιπίδια καταλαμβάνουν ασύμμετρα ολόκληρη την πλασματική μεμβράνη με τα φυσικά προπηκτικά αμινοφωσφολιπίδια (aPL) να διατηρούνται ενεργά στην εσωτερική στιβάδα της μεμβράνης. Σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα aPL προβάλλουν ταχύτατα στην εξωτερική στιβάδα παίζοντας βασικό υποστηρικτικό ρόλο στον καταρράκτη της πήξης , παρέχοντας θέσεις για τη δέσμευση των παραγόντων.

Η κυρίαρχη ομάδα δομικών λιπιδίων στα αιμοπετάλια είναι τα φωσφολιπίδια τα οποία σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες με το υδρόφοβο τμήμα FAνα προσανατολίζεται στον πυρήνα και τις κεφαλικές ομάδες που αποτελούνται από

πολικά φωσφορικά στρέφονται προς την υδατική φάση. Στα θηλαστικά διακρίνονται τέσσερα είδη φωσφολιπιδίων, η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοσερίνη (PS)



Εικόνα 6-Φωσφολιπιδική μεμβράνη

Απεικονίζεται παραπάνω η φυσική πλασματική μεμβράνη φωσφολιπιδίων (PL) σχετιζόμενη με την πήξη. Τα πολωμένα PL δομούν τη διπλή στιβάδα της μεμβράνης, με τις φωσφορικές κεφαλές στραμμένες προς την υδατική φάση και τα υδρόφοβα λιπαρά οξέα προς τον πυρήνα. Ανατύπωση από [62]

Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) είναι ένα αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο που έχει προπηκτική δράση και εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs). Η συναρμολόγηση των παραγόντων πήξης FVII, FIX,FX και της προθρομβίνης (FII), διευκολύνεται από την παρουσία της PS στην επιφάνεια της μεμβράνης. Επίσης επιταχύνει τη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα TF:FVIIa. Ο χρόνος που απαιτείται για την πήξη των προπηκτικών φωσφολιπιδίων(PPL), αφορά το χρόνο που χρειάζεται για να σχηματιστούν οι θρόμβοι και μετράται σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια. Επομένως υψηλό PPLCT σημαίνει χαμηλή δραστηριότητα τουPPL.[63, 64]

Κατά τη φάση έναρξης είναι απαραίτητο να εκφραστεί ο ιστικός παράγοντας (TF) για να ενεργοποιηθεί η πήξη. Αυτή η διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελεί

υποδοχέα του παράγοντα VII και για την ενεργοποιημένη μορφή του. Η ενεργοποίηση του TF επηρεάζεται από τη συνέκφραση του με τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στη μεμβράνη των φωσφολιπιδίων (PL), σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ των υπολειμμάτων κυστεΐνης και αλληλεπιδρούν με τις λιπιδικές σχεδίες που περιέχουν χοληστερόλη. Για τη δέσμευση άλλων παραγόντων πήξης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ PS και TF, η οποία συμβαίνει μεταξύ της πολικής κεφαλής της PS και των υπολειμμάτων λυσίνης στην εξωκυτταρική περιοχή TF, έτσι ενεργοποιείται το σύμπλεγμα εξωγενούς τενάσης TF:FVIIa με το οποίο ξεκινά η πήξη.[62]

Η παρουσία αυξημένου κυκλοφορούντος προπηκτικού φωσφολιπιδίου (PPL) έχει ανιχνευθεί σε ένα αριθμό προθρομβωτικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος του μυοκαρδίου, του καρκίνου και του τραύματος ενώ δεν έχει αναφερθεί για VTE. Μια επερχόμενη θρόμβωση μπορεί να προέλθει από την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια απορρίπτουν τα θετικά σε PPL μικροσωματίδια και αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές για τον παράγοντα X και την προθρομβίνη.[65]

Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι

1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το χρονικό διάστημα 2019 έως 2021, στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο πραγματοποιήθηκαν 100 αιμοληψίες. Οι ασθενείς που εξετάστηκαν είχαν εκδηλώσει θρομβώσεις που περιλάμβαναν αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, θρομβοφιλική διάθεση, αποβολές και κάποιοι απ' αυτούς πραγματοποίησαν προληπτικούς ελέγχους λόγω οικογενειακού ιστορικού. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 44 έτη, με μεγαλύτερο να ανέρχεται στα 79 έτη και το μικρότερο στα 14 έτη. Ο έλεγχος που διενεργήθηκε αφορούσε τον πλήρη έλεγχο θρομβοφιλίας και πιο συγκεκριμένα το screeningtest (PT, APTT, προϊόντα αποδομής ινώδους ή D-dimers, ινωδογόνο), μέτρηση πλασμινογόνου, ATIII, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, APC-R, αντιπηκτικά του λύκου (LLA), αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης (ACA-IGM, ACA-IgG), μέτρηση αντισωμάτων B2 γλυκοπρωτεΐνης 1 (antiB2-GP1 IgG, antiB2-GP1 IgM), ομοκυστεΐνη, μετάλλαξη MTHFR (C677T, A1298) και την μετάλλαξη για τον παράγοντα VLEIDEN και τον παράγοντα IIG20I 0A.

Από τους 100 ασθενείς, οι 64 ήταν γυναίκες και οι 36 ήταν άνδρες. Από τους οποίους οι 16 εμφάνισαν ΑΕΕ, οι 47 εμφάνισαν θρομβοφιλία, οι 22 πραγματοποίησαν προληπτικό έλεγχο και οι 14 εμφάνισαν αποβολές επομένως αναφερόμαστε σε γυναίκες. Η συλλογή όλων των δειγμάτων καθώς και ο εργαστηριακός τους έλεγχος πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο.

ΠΑΘΗΣΕΙΣ	ΠΛΗΘΟΣ (N)
ΑΕΕ	16
Θρομβοφιλίες	47
Προληπτικός έλεγχος	22
Αποβολές	14

Πίνακας 1: Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται οι κύριες παθήσεις που καταγράφηκαν από το ιστορικό των ασθενών

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη συλλέχθηκαν τα στοιχεία των ασθενών κωδικός και ημερομηνία εξέτασης, ηλικία, φύλο, και καταγραφή του ιστορικού των ασθενών. Έπειτα, από τη συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε πλήρης έλεγχος θρομβοφιλίας. Στη δεύτερη φάση, διενεργήθηκε η μέτρηση των προπηκτικών φωσφολιπιδίων.

2.2 Δοκιμασίες Προσυμπτωματικού Ελέγχου στην Αιμόσταση

2.2.1 Χρόνος Προθρομβίνης (PT)

Για την ποσοτική μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης που βοηθάει στη διάγνωση, , χρησιμοποιείται το THROMBOREL®έναιin vitro διαγνωστικό αντιδραστήριο, σε ανθρώπινο πλάσμα στον αυτοματοποιημένο αναλυτή BCS XP της εταιρίας SIEMENS. Πιο συγκεκριμένα, το THROMBOREL®είναι ένα λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο θρομβοπλαστίνης που προέρχεται από ανθρώπινο πλακούντα. Το αντιδραστήριο αυτό ξεκινάει την πήξη μέσω της εξωγενούς και της κοινής οδού από τον χρόνο προθρομβίνης, ο οποίος χρησιμεύει για τη διάγνωση ανωμαλιών της πήξης και χρησιμοποιείται στις παρακάτω περιπτώσεις :

- I. Για την παρακολούθηση της από του στόματος αντιπηκτικής θεραπείας σε ασθενείς που λαμβάνουν ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ
- II. Για την αξιολόγηση του κινδύνου αιμορραγίας σε προεγχειρητικό στάδιο
- III. Για τον έλεγχο αιμορραγικών διαταραχών
- IV. Βοηθητικά για τη διάγνωση αιμοστατικών διαταραχών, όπως η ηπατοπάθεια και η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η διαδικασία της πήξης πυροδοτείται μέσω της επώασης του πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα θρομβοπλαστίνης και ασβεστίου και έπειτα μετράται ο χρόνος για το σχηματισμό θρόμβου ινώδους.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

Για τη συλλογή του δείγματος, απαιτείται η λήψη με εκκενωμένο σύστημα σωληναρίου ή με σύριγγα αίμα ασθενούς εννέα μέρη του οποίου αναμειγνύονται με ένα μέρος 0,11 ή 0,13 mol/L διαλύματος κιτρικού νατρίου, έπειτα το δείγμα το φυλάσσουμε σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό σωλήνα.

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου THROMBOREL®S πραγματοποιούμε ανασύσταση με την ποσότητα απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα του αντιδραστηρίου και αναδεύουμε αναστρέφοντας το φιαλίδιο 8 με 10 φορές και πριν το χρησιμοποιήσουμε το θερμαίνουμε στους 37°C

Διαδικασία

Τα υλικά που παρέχονται από το κιτ είναι ΟUHP29 THROMBOREL®S10x→4mL και ΟUHP49 THROMBOREL®S10x→10mL

Τα υπόλοιπα υλικά που απαιτούνται είναι REFOPAT03 PT Multi-Calibrator, REFORKL17 Standard plasma που είναι φυσιολογικό πλάσμα που έχει ληφθεί πρόσφατα και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του χρόνου αντίδρασης του φυσιολογικού πλάσματος. Το ControlN και το ControlP. Πιο συγκεκριμένα, το ControlN είναι ένα υλικό ελέγχου που χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η απόκλιση της ανάλυσης στο φυσιολογικό εύρος τιμών για το PT, APTT, ινωδογόνο. Έτσι το ControlN είναι ένα λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο που περιέχει πλάσμα υγιούς ανθρώπου και σταθεροποιητή HEPES, το ανασυσταμένο πλάσμα ελέγχου πρέπει να καταψύχεται ταχύτατα και η απόψυξη πρέπει να γίνεται εντός 10 λεπτών στους 37°C. Για την προετοιμασία του εκτελούμε ανασύσταση του ControlN προσθέτοντας 1 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού, ανακινούμε με προσοχή αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού, το αφήνουμε στους 15-25°C για 15 λεπτά τουλάχιστον και ανακινούμε ξανά πριν τη χρήση. Για το ControlP το οποίο

είναι ένα αναλυόμενο υλικό ελέγχου που χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η απόκλιση της ανάλυσης στο παθολογικό εύρος τιμών για το PT, APTT, ινωδογόνο και η προετοιμασία καθώς και η παρασκευή του είναι η ίδια που ακολουθήθηκε και για το ControlN παραπάνω. Οι αναμενόμενες τιμές και για τα δύο Control παρέχονται στον ειδικό πίνακα αποδιδόμενων τιμών για την παρτίδα και τη μέθοδο που εσωκλείεται. Η εξέταση πραγματοποιείται στον αυτόματο αναλυτή BCSXP από την SIEMENS

2.2.2 Χρόνος Μερικής Θρομβοπλαστίνης (APTT)

Το Pathromtin®SL χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης ως διαγνωστικό αντιδραστήριο και είναι ένα υγρό αντιδραστήριο βασισμένο σε φυτικά φωσφολιπίδια, με σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου για να ενεργοποιηθεί το πλάσμα. Ο APTT είναι μια κλινικά σημαντική εξέταση για τη διάγνωση διαταραχών της πήξης και για την παρακολούθηση θεραπείας και πιο συγκεκριμένα :

- I. Για την αξιολόγηση του προεγχειρητικού κινδύνου αιμορραγίας
- II. Στον έλεγχο προεγχειρητικών διαταραχών
- III. Σε ασθενείς με θρομβοφιλία βοηθάει στη διάγνωση αντιπηκτικών του λύκου
- IV. Για την παρακολούθηση της θεραπείας σε ασθενείς που λαμβάνουν μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στην επώαση του πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα φωσφολιπιδίων και έναν επιφανειακό ενεργοποιητή παραγόντων του ενδογενούς συστήματος πήξης, η διαδικασία της πήξης πυροδοτείται με την προσήκη ιόντων ασβεστίου και έπειτα μετράται ο χρόνος μέχρι να σχηματιστεί ο θρόμβος ινώδους.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

Για τη συλλογή του δείγματος, απαιτείται η λήψη με εκκενωμένο σύστημα σωληναρίου ή με σύριγγα φλεβικό αίμα ασθενούς εννέα μέρη του οποίου αναμειγνύονται με ένα μέρος 0,11 ή 0,13 mol/L διαλύματος κιτρικού νατρίου, έπειτα φυγοκεντρούμε το δείγμα απευθείας για τουλάχιστον 15 λεπτά στις 1500 xg, αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και το φυλάσσουμε σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό σωλήνα.

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου Pathromtin®SL, αρχικά αναστρέφεται ήπια 5 έως 8 φορές για να αναμειχθεί πριν χρησιμοποιηθεί πρώτη φορά, αυτό το αντιδραστήριο πρέπει να χρησιμοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διαδικασία

Τα υλικά που παρέχονται από το κιτ είναι OQGS29 Pathromtin®SL 10× → 5mL και OQGS35 Pathromtin®SL 20× → 5mL. Τα υπόλοιπα υλικά που απαιτούνται είναι διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂ solution), πλάσμα ελέγχου N και πλάσμα ελέγχου P (η προετοιμασία των οποίων αναφέρεται παραπάνω). Η εξέταση πραγματοποιείται στον αναλυτή BCSXP από τη SIEMENS και τα αποτελέσματα δίνονται σε δευτερόλεπτα.

2.2.3 Ινωδογόνο

Το ινωδογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ και παίζει βασικό ρόλο στο σχηματισμό θρόμβου ινικής. Όταν το ινωδογόνο διασπάται από τη θρομβίνη, δημιουργούνται μονομερή ινώδους τα οποία αυθόρμητα πολυμερίζονται και δημιουργείται ο πρώτος ασταθής θρόμβος ινικής, που σταθεροποιείται από τη λειτουργία του παράγοντα FXIII. Σε μειωμένη ποσότητα ή δυσλειτουργία του ινωδογόνου υπάρχει αυξημένος ο κίνδυνος αιμορραγίας.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ινωδογόνου χρησιμοποιείται το διαγνωστικό αντιδραστήριο Multifibren®U σύμφωνα με την μέθοδο Clauss, επομένως το ινωδογόνο μετράται στο πλάσμα στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- Σε συγγενή ή επίκτητη ανεπάρκεια ινωδογόνου
- Για την παρακολούθηση της θεραπείας υποκατάστασης ινωδογόνου

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στην τροποποιημένη μέθοδο Clauss όπου στο κιτρικό πλάσμα επέρχεται η πήξη με υψηλή ποσότητα θρομβίνης και ο χρόνος πήξης εξαρτάται από το περιεχόμενο του δείγματος σε ινωδογόνο.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

Για τη συλλογή του δείγματος, απαιτείται η λήψη με εκκενωμένο σύστημα σωληναρίου ή με σύριγγα φλεβικό αίμα ασθενούς εννέα μέρη του οποίου αναμειγνύονται με ένα μέρος 0,11 ή 0,13 mol/L διαλύματος κιτρικού νατρίου, έπειτα φυγοκεντρούμε το δείγμα απευθείας για τουλάχιστον 15 λεπτά στις 1500 xg, αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και το φυλάσσουμε σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό σωλήνα.

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου Multifibren®U πραγματοποιούμε ανασύσταση με την ποσότητα απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα του αντιδραστήριου, αναδεύουμε και πριν το χρησιμοποιήσουμε το θερμαίνουμε στους 37°C

Διαδικασία

Τα υλικά που παρέχονται από το κιτ είναι OWZG19 Multifibren®U 10× → 2mL και OWZG23 Multifibren®U 10× → 5mL. Τα υπόλοιπα υλικά είναι το εναιώρημα

καολίνης (kaolin) για fibrintimer, ControlN και ControlP και το κιτ του βαθμονομητή ινωδογόνου (fibrinogen calibrator), ο οποίος χρησιμοποιείται για την προετοιμασία καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό του ινωδογόνου. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς που προέρχεται από διπλούς ή τριπλούς προσδιορισμούς των χρόνων πήξης. Η ακρίβεια της καμπύλης βαθμονόμησης θα πρέπει να εκτιμάται με την ανάλυση κατάλληλων προτύπων υλικών ελέγχου, αν αυτά εμφανίζουν συστηματικές αποκλίσεις από το διάστημα εμπιστοσύνης που έχει δηλωθεί από τον πίνακα τιμών αναφοράς που εξαρτώνται από την παρτίδα, πρέπει να προσδιοριστεί μια νέα πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η εξέταση πραγματοποιείται στον αναλυτή BCSXP από τη SIEMENS.

2.2.4 Δ-Διμερή (d-Dimers)

Το D- Διμερές αποτελεί ένα γενικό δείκτη ενεργοποίησης της πήξης και της ινωδολύσης και επομένως έναν έμμεσο δείκτη της θρομβωτικής δραστηριότητας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να κυκλοφορούν χαμηλά επίπεδα d-διμερούς, ενώ υψηλά επίπεδα έχουμε σε παθολογικές καταστάσεις όπως η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, σε φλεβικό θρομβοεμβολισμό, σε καρκίνο, σε χειρουργική επέμβαση, εγκυμοσύνη και φλεγμονώδεις νόσους. Κυρίως προσεγγίζει διαγνωστικά τον αποκλεισμό θρομβοεμβολικών συμβάντων, όπως την εν τω βάθου φλεβική θρόμβωση (DVT) ή πνευμονική εμβολή (PE)[66]

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων αποδόμησης διασυνδεδεμένου ινώδους (d-dimers) χρησιμοποιείται το διαγνωστικό αντιδραστήριο INNOVANCE® D-Dimer το οποίο χρησιμεύει και για την διάγνωση και παρακολούθηση υπερπηκτικών καταστάσεων σε ασθενείς με σημεία διάχυτης ενδαγγειακής πήξης ή άλλες διαταραχές σχετικές με υπερπηκτικότητα.

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στο ότι σωματίδια πολυστυρενίου που είναι ομοιοπολικά επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα συσσωρεύονται κατά την ανάμειξη με δείγματα που φέρουν δ-διμερές. Ο επίτοπος για το μονοκλωνικό αντίσωμα εμφανίζεται δύο φορές και έτσι ένα αντίσωμα είναι επαρκές για να πυροδοτήσει μια αντίδραση συσσωμάτωσης, η οποία στη συνέχεια ανιχνεύεται θολοσιμετρικά από την αύξηση της θολερότητας.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

Για την εξέταση χρησιμοποιείται πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια και έτσι λαμβάνουμε το πλάσμα αναμιγνύοντας προσεκτικά 1 μέρος διαλύματος κιτρικού νατρίου με 9 μέρη φλεβικού αίματος, χρησιμοποιώντας εκκενωμένο σύστημα σωληναρίων ή σύριγγα και αποφεύγουμε το σχηματισμό αφρού. Έπειτα φυγοκεντρούμε το σωληνάριο αίματος για 15 λεπτά στις 1500 έως 2500 g και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 1500 g.

Αντιδραστήρια

Για την ανασύσταση των αντιδραστηρίων διαλύουμε σε 4 mL απεσταγμένου νερού, αναστρέφουμε τρεις φορές και αφήνουμε το φιαλίδιο στους 15 με 25 °C για 15 λεπτά. Πριν τα τοποθετήσουμε στο σύστημα, αναμειγνύουμε ξανά τρεις φορές αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού και αφαιρούμε τις φυσαλίδες. Ακολούθως, αναμειγνύουμε καλά αναστρέφοντας τρεις φορές ώστε να χωρίσουμε σε κλάσματα σε κάποιο άδειο φιαλίδιο που παρέχεται από το κιτ. Για το Buffer Supplement Diluent, το οποίο είναι έτοιμο προς χρήση πριν το τοποθετήσουμε στο σύστημα αποφεύγουμε το σχηματισμό αφρού. Για το buffer επαναιωρούμε για πιθανό ίζημα με απαλή ανάδευση, αφαιρούμε τις φυσαλίδες και χωρίζουμε σε κλάσματα σε κάποιο άδειο φιαλίδιο που παρέχεται από το κιτ. Αναφορικά με τον calibrator διαλύουμε σε 1 mL απεσταγμένου νερού αναμειγνύουμε αποφεύγοντας το σχηματισμό αφρού και αφήνουμε το φιαλίδιο στους 15 με 25 °C για 15 λεπτά. Έπειτα αναμειγνύουμε ξανά προσεκτικά και δεν χρησιμοποιούμε το φιαλίδιο εφόσον έχει σχηματιστεί ορατός θρόμβος.

Διαδικασία

Ταυλικά που παρέχονται από το κιτ είναι OPBP03 INNOVANCE® D-Dimer Reagent 3x → 4 mL, INNOVANCE® D-Dimer Buffer 3x → 5 mL, INNOVANCE® D-Dimer Supplement 3x → 2,6 mL, INNOVANCE® D-Dimer Diluent 3x → 5 mL, INNOVANCE® D-Dimer Calibrator 2x → 1 mL. Πρόσθετα υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται από το κιτ είναι τα INNOVANCE® D-Dimer Control 1 (5x → 1 mL) και Control 2 (5x → 1 mL) τα οποία είναι αναλυόμενα υλικά ελέγχου ώστε να αξιολογηθεί η ακρίβεια και το αναλυτικό σφάλμα στο φυσιολογικό και στο παθολογικό εύρος τιμών για τον προσδιορισμό του δ-διμερούς στον αναλυτή BCSXP της SIEMENS.

Οι τιμές στόχοι εκχωρήθηκαν με τη χρήση του βαθμονομητή και των αντίστοιχων αντιδραστηρίων και το εύρος αποδοχής είναι σταθερό διάστημα που καλύπτει τις συστηματικές αποκλίσεις της ανάλυσης και ελέγχεται το κατώτερο εύρος μέτρησης με το control 1 ενώ το ανώτερο με το control 2.

Τα αποτελέσματα για το INNOVANCE® D-Dimer δίνονται σε mg/LFEU.

2.3 Αντιπηκτικά του λύκου

Τα αντιπηκτικά του λύκου (LA) είναι αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα τα οποία κατευθύνονται στα αρνητικά φορτισμένα φωσολιπίδια ή συμπλέγματα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών και προκαλούν παράταση δοκιμασιών των χρόνων πήξης που εξαρτώνται από φωσφολιπίδια (APTT, SCT, Drvtt)[67].

Λήψη και χειρισμός δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 Μ προς 1 νοίσε 9 νοί αίματος
- Φυγοκεντρώνεται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια και έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και φυγοκεντρούμε μια δεύτερη φορά για 15 λεπτά στις 2000-2500 g.

Αντιδραστήρια

Πραγματοποιείται ανασύσταση των αντιδραστηρίων σε κάθε φιαλίδιο κατα την οποία :

- STA®- Staclo® dRVVScreen^② με 2 ml απεσταγμένο νερό
- STA®- Staclo® dRVVScreen^⑤ με 5 ml απεσταγμένο νερό
- STA®- Staclo® dRVVConfirm με 2 ml απεσταγμένο νερό

Έπειτα αφήνουμε το διάλυμα να σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία (18-25 °C) δωματίου για 30 λεπτά και ακολούθως αναδεύουμε ώστε να δημιουργηθεί ομογενές εναιώρημα.

Διαδικασία

Τα πλάσματα που εξετάζονται χρησιμοποιούνται ως έχουν και τοποθετούνται στον αναλυτή STAR MAX της STAGO όπου και επιλέγεται η εξέταση για τα LA. Επιπρόσθετα για τον ποιοτικό έλεγχο τοποθετούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, STA® Control LA 1 + 2 και καθορίζουμε ένα πεδίο αναφοράς με περίπου 20 ανθρώπινα φυσιολογικά πλάσματα, το αποτέλεσμα των οποίων πρέπει να βρίσκεται εντός του πεδίου, θα δοκιμαστεί σε κάθε σειρά και θα χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστούν οι αναλογίες. Τα controls χρησιμοποιούνται ως έχουν και τοποθετούνται στον αναλυτή.

Ο προσδιορισμός του χρόνου πήξης των εξεταζόμενων πλάσμάτων πραγματοποιείται από τον αναλυτή αυτόματα κατά τη διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων.

2.4 Πρωτεΐνη S (PrS)

Η πρωτεΐνη S είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K, έχει βασικό αντιπηκτικό ρόλο και αποτελεί συμπαράγοντα της πρωτεΐνης C. Οι ανεπάρκειες της πρωτεΐνης S διακρίνονται σε συγγενείς και επίκτητες οι οποίες μειώνουν την αντιπηκτική δράση της στο αίμα και αυξάνεται ο κίνδυνος θρομβοεμβολής.[68]

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος
- Φυγοκεντρώνεται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια και έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και φυγοκεντρούμε μια δεύτερη φορά για 15 λεπτά στις 2000-2500 g.

Αντιδραστήρια

Κάνουμε ανασύσταση του περιεχομένου των φιαλιδίων των αντιδραστηρίων 1 (που περιέχει ανθρώπινο λυοφιλιωμένο πλάσμα χωρίς πρωτεΐνη S), 2 (που περιέχει λυοφιλιωμένη ενεργοποιημένη ανθρώπινη πρωτεΐνη C) και 3 (λυοφιλιωμένο παρασκεύασμα από βόειο παράγοντα Va) με συγκεκριμένη ποσότητα 1 mL απεσταγμένου νερού και αφήνουμε το διάλυμα να σταθεροποιηθεί για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) και ακολούθως ομογενοποιούμε πριν τα χρησιμοποιήσουμε.

Διαδικασία

Η αρχή της δοκιμασίας βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του συμπαράγοντα της πρωτεΐνης S που ενισχύει την αντιπηκτική δράση της πρωτεΐνης S και επέρχεται παράταση του χρόνου πήξης σε ένα σύστημα πλούσιο σε παράγοντα Va, που αποτελεί φυσικό υπόστρωμα αυτού του αναστολέα.

Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή StarMax 3 της Stago με το STA®Unicalibrator, έπειτα τα εξεταζόμενα πλάσματα τοποθετούνται στον αναλυτή σε καθαρή μορφή και προγραμματίζεται η εξέταση για την πρωτεΐνη S. Ακολούθως, χρησιμοποιούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες που προσφέρουν ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, τοποθετούμε την συσκευασία STA® - System ControlIN+P σε καθαρή μορφή στον αναλυτή. Ο αναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης S στα εξεταζόμενα πλάσματα, κατά την διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα για ένα πλάσμα βρεθεί εκτός του εύρους μέτρησης, εκτελείται αυτόματη αραίωση από το μηχάνημα για αυτό το δείγμα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται εφόσον αυτό το βήμα έχει εισαχθεί στις ρυθμίσεις των παραμέτρων της εξέτασης.

2.5 Πρωτεΐνη S Ag Free (PrS Ag Free)

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος

- ο Φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια και έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και φυγοκεντρούμε μια δεύτερη φορά για 15 λεπτά στις 2000-2500 g.

Αντιδραστήρια

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων 1 και 2 τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) να σταθεροποιηθούνγια 15 λεπτά και πριν τα χρησιμοποιήσουμε ομογενοποιούμε για με προσοχή για την αποφυγή φυσαλίδων.

Διαδικασία

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αύξηση της απορροφητικότητας του μέσου λόγω αύξησης της θολερότητας που προκαλείται από την αντίδραση αντιγόνου αντισώματος η οποία οδηγεί σε συγκόλληση των μικροσφαιριδίων Latexστα οποία είναι προσκολλημένα τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα της πρωτεΐνης S υπό την παρουσία ελεύθερης πρωτεΐνης S στο πλάσμα.

Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή StarMax 3 της Stago με ολόκληρη την παρτίδα αντιδραστηρίων και επαληθεύεται μετά τον προσδιορισμό τηςελεύθερης πρωτεΐνης S με δύο μάρτυρες τον θετικό (παθολογικό) και τον αρνητικό (φυσιολογικό)οι οποίοι προσφέρουν ακρίβεια και αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων και τοποθετούμε την συσκευασία STA[®] - Liatest[®]ControlIN+Pσε καθαρή μορφή στον αναλυτή. Οαναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης S στα εξεταζόμενα πλάσματα, κατά την διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα για ένα πλάσμα βρεθεί εκτός του εύρους μέτρησης, εκτελείται αυτόματη αραίωση από το μηχάνημα για αυτό το δείγμα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται εφόσον αυτό το βήμα έχει εισαχθεί στις ρυθμίσεις των παραμέτρων της εξέτασης.Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ελεύθερης πρωτεΐνης Sτων πλάσμάτων που εξετάζονται πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη φόρτωση των δειγμάτων στα 540 nm.

2.6 Πρωτεΐνη C (PrC)

Η πρωτεΐνη C κατατάσσεται στην ομάδα πρωτεΐνων της βιταμίνης K που εξαρτώνται από την πήξη και συντίθεται στο ήπαρ, στο πλάσμα έχει τη μορφή προενζύμου και μετατρέπεται υπό την παρουσία θρομβίνης, φωσφολιπιδίων και ασβεστίου σε ενεργό ένζυμο, η ενεργοποίηση του οποίου ενισχύεται από την θρομβομοντουλίνη. Ηλειτουργία της πρωτεΐνηςC αναστέλλεται από τον αναστολέα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης Cκαι την α1- αντιθρυψίνη.[69]

Λήψη και χειρισμός δείγματος

- ο Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος

- Φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια.

Αντιδραστήρια

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων 1 και 2 κάνουμε ανασύσταση με 3 και 6mLαπεσταγμένου νερού αντίστοιχα, στο αντιδραστήριο 1 το ανακινούμε ελαφρώς ενώ στο 2 δεν κάνουμε ανάδευση, έπειτα τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 1 ώρα ώστε να σταθεροποιηθούν. Τέλος, ανακινούμε ελαφρώς και τα τοποθετούμε σε ένα νέο STA[®] - mini Reducer και το καψύλλιο

Διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή Star Max 3 της Stago με το STA[®]Unicalibrator, έπειτα τα εξεταζόμενα πλάσματα τοποθετούνται στον αναλυτή σε καθαρή μορφή και προγραμματίζεται η εξέταση για την πρωτεΐνη C. Ακολουθως, χρησιμοποιούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες που προσφέρουν ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, τοποθετούμε την συσκευασία STA[®] - System ControlN+P σε καθαρή μορφή στον αναλυτή. Ο αναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης S στα εξεταζόμενα πλάσματα, κατά την διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα για ένα πλάσμα βρεθεί εκτός του εύρους μέτρησης, εκτελείται αυτόματη αραιώση από το μηχάνημα για αυτό το δείγμα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται εφόσον αυτό το βήμα έχει εισαχθεί στις ρυθμίσεις των παραμέτρων της εξέτασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης Cτων πλάσμάτων που εξετάζονται πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη φόρτωση των δειγμάτων στα 405nm.

2.7 Αντιθρομβίνη III (ATIII)

- Η αντιθρομβίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ, αποτελεί αναστολέα της πήξης και σχηματίζει ένα αδρανές μη αναστρέψιμο σύμπλοκο στη σύνδεσή της με τη θρομβίνη, αντίδραση που επιταχύνεται παρουσία ηπαρίνης. Η συγγενής μείωση των επιπέδων της αντιθρομβίνης οδηγεί σε συχνές θρομβοεμβολικές διαταραχές[70]

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος
- Φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια και έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και φυγοκεντρούμε μια δεύτερη φορά για 15 λεπτά στις 2000-2500 g.

Αντιδραστήρια

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, αρχικά πραγματοποιούμε ανασύσταση κάθε φιαλιδίου του αντιδραστηρίου 1, αφού ανακινήσουμε περιεχόμενο ενός φιαλιδίου του αντιδραστηρίου 3 (R3), το οποίο παρέχεται στο σετ και το αφήνουμε να σταθεροποιηθεί για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) έπειτα ομογενοποιούμε και τοποθετούμε σε ένα νέο STA[®] - mini Reducer. Για το αντιδραστήριο 2 κάνουμε ανασύσταση κάθε φιαλιδίου του ανά 3 mL απεσταγμένου νερού και το αφήνουμε να σταθεροποιηθεί για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) έπειτα ομογενοποιούμε και τοποθετούμε σε ένα νέο STA[®] - mini Reducer, ανακινούμε το αντιδραστήριο 3 και είναι έτοιμο προς χρήση.

Διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή Star Max 3 της STAGO με το STA[®]Unicalibrator, έπειτα τα εξεταζόμενα πλάσματα τοποθετούνται στον αναλυτή σε καθαρή μορφή και προγραμματίζεται η εξέταση για την αντιθρομβίνη. Ακολούθως, χρησιμοποιούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες που προσφέρουν ακρίβεια και αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων, τοποθετούμε την συσκευασία STA[®] - System ControlN+P σε καθαρή μορφή στον αναλυτή. Ο αναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιθρομβίνης στα εξεταζόμενα πλάσματα, κατά την διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα για ένα πλάσμα βρεθεί εκτός του εύρους μέτρησης, εκτελείται αυτόματη αραιώση από το μηχάνημα για αυτό το δείγμα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται εφόσον αυτό το βήμα έχει εισαχθεί στις ρυθμίσεις των παραμέτρων της εξέτασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αντιθρομβίνης των πλάσμάτων που εξετάζονται πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη φόρτωση των δειγμάτων στα 405nm.

2.8 Πλασμινογόνο

- Το πλασμινογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία συντίθεται στο ήπαρ και αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, υπάρχει στο πλάσμα ελεύθερο ή συνδεδεμένο με HRGP, σε α2 αντιπλασμίνη ή ινωδογόνο. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη υπό την παρουσία ενεργοποιητών του ιστού ή του πλάσματος και έχει ως βασικό ρόλο τη διάσπαση του ινώδους και του ινωδογόνου. Κλινικά το πλασμινογόνο εμφανίζει δύο ειδών ανεπάρκειες τις ποσοτικές ή τύπου I και τις ποιοτικές ή τύπου II και αποτελούν θρομβογόνους παράγοντες. Η συγκέντρωση του πλασμινογόνου στο πλάσμα αυξάνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις ενώ μειώνεται κατά την ηπατική βλάβη και στις θρομβολυτικές θεραπείες.[71]

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος
- Φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια.

Αντιδραστήρια

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων κάνουμε ανασύσταση κάθε φιαλιδίου των αντιδραστηρίων 1 και 2 με 3 mL απεσταγμένου νερού για το καθένα αντίστοιχα και τα αφήνουμε να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 60 λεπτά και έπειτα ανακινούμε ήπια.

Διαδικασία

Αρχικά, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του αναλυτή STAR MAX 3 της STAGO με το STA®Unicalibrator, έπειτα τα εξεταζόμενα πλάσματα τοποθετούνται στον αναλυτή σε καθαρή μορφή και προγραμματίζεται η εξέταση για το πλάσμινογόνο. Ακολούθως, χρησιμοποιούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες που προσφέρουν ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, τοποθετούμε την συσκευασία STA® - SystemControlIN+P σε καθαρή μορφή στον αναλυτή. Ο αναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιθρομβίνης στα εξεταζόμενα πλάσματα, κατά την διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα για ένα πλάσμα βρεθεί εκτός του εύρους μέτρησης, εκτελείται αυτόματη αραιώση από το μηχάνημα για αυτό το δείγμα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται εφόσον αυτό το βήμα έχει εισαχθεί στις ρυθμίσεις των παραμέτρων της εξέτασης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του πλάσμινογόνου των πλάσμάτων που εξετάζονται πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη φόρτωση των δειγμάτων στα 405 nm.

2.9 Αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης (GM)

Τα αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης εντάσσονται στη ομάδα των αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων που είναι ειδικά για αρνητικά φορτισμένα φωσfolιπίδια, συστατικά των βιολογικών μεμβρανών. Η καρδιολιπίνη αποτελεί ένα όξινο φωσfolιπίδιο που προέρχεται από τη γλυκερόλη. Τα αντισώματα έναντι των φωσfolιπιδίων εντοπίζονται συχνά σε ορούς ασθενών με συστηματικό ερυθροματώδη λύκο (ΣΕΛ) και η εμφάνισή τους σε αυτόν είναι τυπικό για δευτερογενές αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (APS).

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος, με προσοχή τα δείγματα να μην λιπαιμικά,

ικτερικά και αιμολυμένα η λήψη να γίνεται πάντα σύμφωνα με τους διεθνείς κανονισμούς

- Φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια.

Διαδικασία

Η αρχή μεθόδου της AESKULISA Cardiolipin-GM είναι μια ενζυμική ανοσοδοκιμασία στερεάς φάσης που χρησιμοποιεί καρδιολιπίνη και ανθρώπινη β2 γλυκοπρωτεΐνη I για την ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG ή /και IgM έναντι της καρδιολιπίνης στον ανθρώπινο ορό, αυτή η ανάλυση συντελεί στη διάγνωση του κινδύνου θρόμβωσης σε ασθενείς με ΣΕΛ.

- Αραιώνουμε το συμπυκνωμένο sample buffer με απεσταγμένο νερό 1:5
- Αραιώνουμε το συμπυκνωμένο wash buffer με απεσταγμένο νερό 1:50
- Αραιώνουμε τα δείγματα ορού με sample buffer 1:101

Για την έκπλυση προετοιμάζουμε 20 ml αραιωμένου wash buffer για 8 πηγαδάκια, έπειτα απορρίπτουμε το υγρό από τα πηγαδάκια αναστρέφοντας τα, έπειτα πιπετάρουμε 300 μl αραιωμένου wash buffer σε κάθε πηγαδάκι και περιμένουμε για 20 δευτερόλεπτα, επαναλαμβάνουμε τα παραπάνω για ακόμα δύο φορές. Στην πορεία, εφόσον τα IgG και τα IgM προσδιορίζονται παράλληλα calibrators, controls και δείγματα πρέπει να εκτελεστούν 2 φορές χωριστά είτε για ποσοτική ερμηνεία είτε για ποιοτική. Έτσι, στη συνέχεια πιπετάρουμε στα πηγαδάκια 100 μl από τα calibrators για την ποσοτική μέθοδο ή 100 μl cutoff-calibrator για την ποιοτική μέθοδο και ακόμα 100 μl Negative και Positive control και 100 μl αραιωμένου ορού του ασθενή, επωάζουμε για 30 λεπτά στους 20-32 °C και ξεπλένουμε 3 φορές με 300 μl washing buffer (αραιωμένο 1:50). Έπειτα, πιπετάρουμε 100 μl συζευγμένου ενζύμου σε κάθε πηγαδάκι, επωάζουμε για 30 λεπτά στους 20-32 °C και ξεπλένουμε 3 φορές με 300 μl washing buffer (αραιωμένο 1:50). Ακολούθως, πιπετάρουμε 100 μl υποστρώματος TMB σε κάθε πηγαδάκι και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 20-32 °C στο σκοτάδι. Για το stop solution πιπετάρουμε 100 μl σε κάθε well, επωάζουμε τουλάχιστον για 5 λεπτά, αναδεύουμε την πλάκα προσεκτικά για 5 δευτερόλεπτα και διαβάζουμε την απορρόφηση από το μηχάνημα στα 30 λεπτά

2.10 Αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης (Anti-B2 GPI)

Τα αντι-β2 αντισώματα της γλυκοπρωτεΐνης I αναγνωρίζουν ειδικούς επιτόπους στην ανθρώπινη β2-γλυκοπρωτεΐνη I αλληλεπιδρώντας με τις λιπιδικές μεμβράνες και ανήκουν στην ομάδα των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στοχεύοντας σε σύμπλοκα που αποτελούνται από αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες πλάσματος. Η ανάλυση αυτών των αντισωμάτων συντελεί στη διάγνωση πρωτογενούς και δευτερογενούς αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου (APS).

Η αρχή μεθόδου της διαδικασίας όσο και η ίδια η διαδικασία εφαρμόζεται κατά τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω και για την καρδιολιπίνη

2.11 Ομοκυστεΐνη

Αρχή μεθόδου

Η δοκιμασία της ομοκυστεΐνης AxSYM βασίζεται στην πολικότητα φθορισμού μέσω ανοσοανάλυσης (FPIA). Έτσι έχουμε μετατροπή της δεσμευμένης HCY σε ελεύθερη HCY, η οποία μετατρέπεται ενζυμικά σε s-αδενοσυλ-L-χομοκυστεΐνη (SAH), η SAH μεταβάλλεται σε ομοκυστεΐνη σε ομαλές συνθήκες.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

Το δείγμα λαμβάνεται με αιμοληψία σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA ολικού αίματος το οποίο φυλάσσεται σε πάγο, δεν φυγοκεντρούμε το δείγμα για 48 ώρες και το φυλάσσουμε σε θερμοκρασία 20-25 °C ή για 7 ημέρες στους 2-8°C και από αυτό εξαρτάται η σταθερότητα του δείγματος. Η εξέταση εκτελείται εντός 3-7 ημερών. Πρωτού ληφθεί το δείγμα ο ασθενής οφείλει να είναι νηστικός για 12 ώρες. Το αποτέλεσμα που δίνεται για την ομοκυστεΐνη αναγράφεται ως αρνητικό που σημαίνει ότι δεν ανιχνεύεται, αυτό όμως δεν αναιρεί άλλες αιτίες αύξησης της ομοκυστεΐνης όπως η σταφαναία νόσος.

Μοριακός έλεγχος MTHFR

Το ένζυμο MTHFR αποτελεί μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και περιορίζει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης. Ο παράγοντας κινδύνου για θρομβοφιλία αυξάνεται με την αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης που προκαλείται από μεταλλάξεις του MTHFR.

Αρχή μεθόδου RealTime PCR

Η πραγματικού χρόνου RT-PCR είναι η διαδικασία κατά την οποία πολλαπλασιάζεται μια νουκλεοτιδική αλληλουχία (DNA) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα ανιχνεύεται το παραγόμενο προϊόν σε πραγματικό και σύντομο χρονικό διάστημα, από τη χρήση ειδικών φθορίζοντων χρωστικών που εισάγονται στην αλληλουχία που ενισχύεται.

Αντιδραστήρια και υλικά

Σε πρώτο στάδιο στην RT-PCR γίνεται απομόνωση του DNA, παρακάτω αναφέρονται τα υλικά για την απομόνωση και για την PCR :

- Καθαρή ξυλόλη και αιθανόλη για την απομόνωση του DNA
- Πιπέτες και ρύγχη (10 μl, 100 μl)
- Εκκινητές DNA πολυμεράσης
- Η taq πολυμεράση
- dNTPs
- Αντιδραστήρια 20 rxns

- MTHFR 1298 wildtypePCR βασικού μείγματος 430μl
- MTHFR 1298 mutantPCRβασικού μείγματος 430μl
- DNA control 20 μl

Διαδικασία

Το πρωτόκολλο απομόνωσης του DNA περιλαμβάνει, αρχικά την προσθήκη στο διάλυμα πυκνής αιθανόλης γιατί παρουσία του άλατος το DNA μετατρέπεται σε υδρόφοβο, έπειτα το διάλυμα εφαρμόζεται σε στήλη από silica, ακολούθως φυγοκεντρείται και το DNA προσδένεται στη στήλη, απομακρύνουμε τις πρωτεΐνες και τα κυτταρικά στοιχεία και εφαρμόζουμε αραιή αιθανόλη στη στήλη και φυγοκεντρούμε ξανά, απομακρύνουμε τα άλατα και το DNA μετατρέπεται σε υδρόφιλο. Στη συνέχεια, τοποθετούμε αλκαλικό διάλυμα έκλυσης στη στήλη και φυγοκεντρούμε ακόμα μια φορά, τέλος το DNA αποδεσμεύεται από τη στήλη. Σε δεύτερη φάση το απομονωμένο DNA εισάγεται στο θερμικό κυκλοποιητή, συσκευή μέσα στην οποία πραγματοποιείται η PCR. Η PCR διακρίνεται σε τρία βασικά στάδια που επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Την αποδιάταξη όπου το εκμαγείο DNA αποδιάτάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία 94-95 °Cγια 30 λεπτά, τον υβριδισμό των εκκινητών με πτώση της θερμοκρασίας στους 55-65°Cγια 30 λεπτά, οι εκκινητές συνδέονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του εκμαγείου DNA και τέλος η επιμήκυνση, κατά την οποία αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°Cπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση απομακρύνει τους εκκινητές εισάγοντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια στις συμπληρωματικές θέσεις του DNA εκμαγείου. Το DNA φθορίζει όταν σε αυτό συνδέεται η φθορίζουσα ουσία και επομένως η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της απαιτούμενης ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Εν μέσω της αντίδρασης μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται από ιχνηθέτες που υβριδοποιούνται με το προϊόν της αντίδρασης, αυτός ο φθορισμός που προκύπτει σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των αλληλουχιών που παράγονται σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο.

Με τις ίδιες μοριακές μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω διεξήχθη η μέτρηση για το FVLEIDEN και το FIIG20210A.

2.12 Αναστολέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου -1 (PAI-1)

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου οι οποίοι μετατρέπουν το πλασμινογόνο σε πλασμίνη ρυθμίζονται από αναστολείς του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου όπως ο αναστολέας τύπου 1, η φυσιολογική δράση του οποίου είναι να αποτρέπει την διάλυση των πηγμάτων. Αυξημένη δραστηριότητα PAI πλάσματος υπάρχει σε οξέα θρομβοεμβολικά φαινόμενα, σε κακοήθειες νόσους και σε εγκύους.

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι ο PAI δείγματος αδρανοποιεί την ουροκινάση που περιέχεται και η δραστηριότητα της υπόλοιπης ουροκινάσης

καθορίζεται από την μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Η πλασμίνη που προκύπτει μετράται από το διαχωρισμό ενός υποστρώματος χρωμογόνου στα 405 nm.

Διαδικασία

Τα υλικά που παρέχονται από το κιτ είναι τα εξής :

Berichrom® PAIOWO Aμε

- 2x → 0,5 mL, Standard 1, πρότυπο υλικό βαθμονόμησης PAIS1
- 1x → 0,5 mL, Standard 2, πρότυπο υλικό βαθμονόμησης PAIS2
- 2x → 0,5 mL, Control πλάσμα ελέγχου PAI
- 1x → 2 mL, Reagent U, αντιδραστήριο ουροκινάσης
- 1x → 4 mL, Reagent P, αντιδραστήριο πλασμινογόνου
- 1x → 4 mL, Reagent O, οξειδωτικός παράγοντας
- 1x → 2 mL, Plasmin substrate, υπόστρωμα πλασμίνης
- 1x 8 mL Substrate diluent, διάλυμα εργασίας υποστρώματος

Η εξέταση πραγματοποιείται στον αναλυτή BCSXP από τη SIEMENS

2.13 Προπηκτικά Φωσφολιπίδια (PPL)

Οι ιδιότητες των προπηκτικών φωσφολιπιδίων εξαρτώνται από την εξωτερική επιρροή της φωσφατιδυλοσερίνης και την έκθεση της στην λιπιδική διπλοστιβάδα της της μεμβράνης, έπειτα από διάφορα ερεθίσματα όπως η κυτταρική ενεργοποίηση, η απόπτωση τα οποία τους επιτρέπουν να προάγουν το σχηματισμό των ενζυμικών συμπλεγμάτων πήξης [63].

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η δοκιμασία μετράει τον χρόνο πήξης, παρουσία ασβεστίου, προσθέτοντας ένα πλάσμα το οποίο στερείται υποστρώματος φωσφολιπιδίων (Αντιδραστήριο 1) και επομένως η δοκιμασία εξαρτάται αποκλειστικά από τα προπηκτικά φωσφολιπίδια που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα. Το αντιδραστήριο 2 πυροδοτεί την έναρξη του καταρράκτη της πήξης από τον παράγοντα Χα. Μείωση στο χρόνο πήξης που μετράται με τον STA® Procoag-PPL συγκριτικά με τις συνηθισμένες τιμές σημαίνει αύξηση των προπηκτικών φωσφολιπιδίων.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος

- ο Πραγματοποιείται αιμοληψία σε σωληνάρια από πλαστικό ή σιλικονούχο γυαλί που περιέχουν αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο σε αναλογία 0,109 M προς 1 vol σε 9 vol αίματος
- ο Φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά προγραμματισμένο στις 2000-2500 g ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός του πλάσματος από τα αιμοπετάλια και έπειτα αφαιρούμε το υπερκείμενο πλάσμα και φυγοκεντρούμε μια δεύτερη φορά για 15 λεπτά στις 2000-2500 g.

Αντιδραστήρια

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων 1 , 2, 3 και 4 πραγματοποιείται ανασύσταση του κάθε φιαλιδίου με 1ml απεσταγμένου νερού για τα 1, 3, 4 και 4ml απεσταγμένου για το αντιδραστήριο 2, τα αφήνουμε να σταθεροποιηθούν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) και έπειτα ανακινούμε ελαφρώς για να ομογενοποιηθούν.

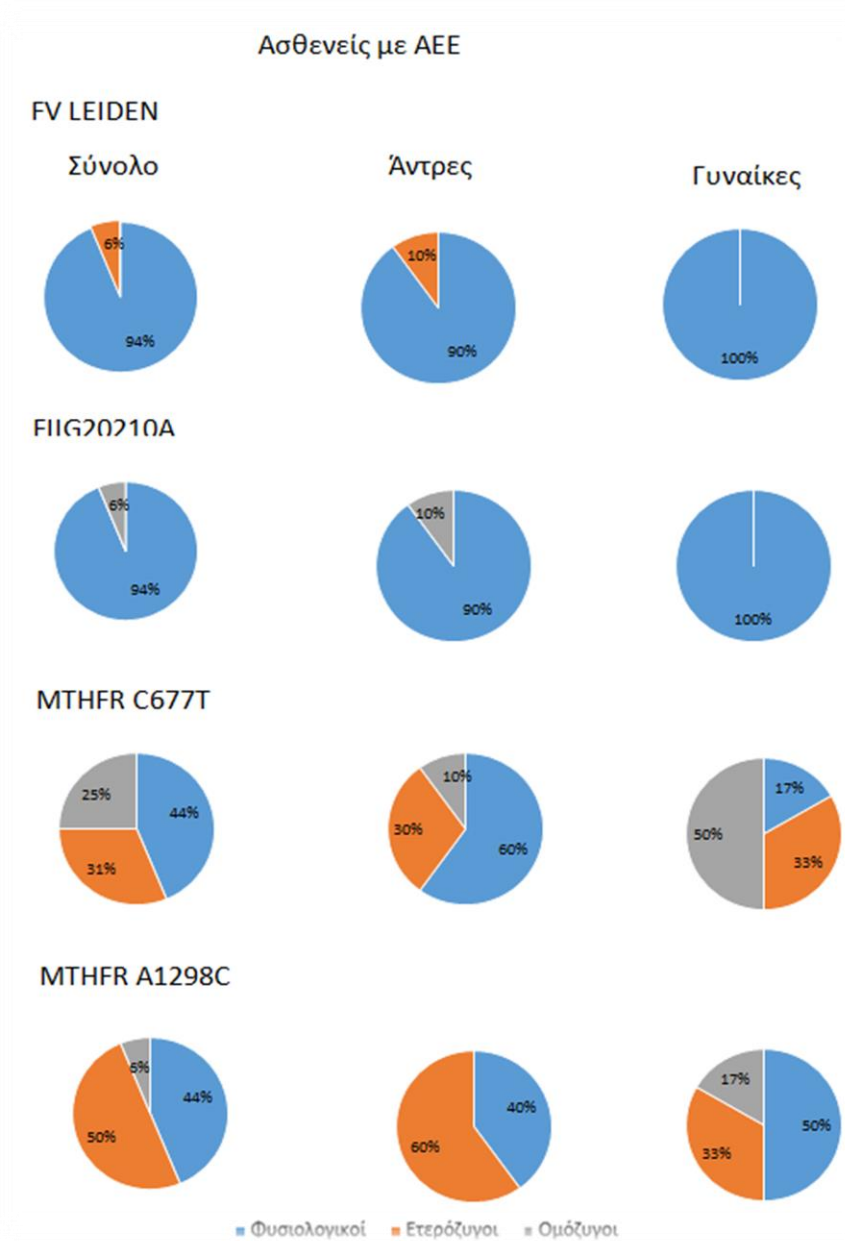
Διαδικασία

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση του χρόνου πήξης παρουσία ασβεστίου σε ένα σύστημα στο οποίο όταν προστίθενται φωσφολιπίδια εξαντλείται το υπόστρωμα πλάσματος και έτσι το δείγμα που εξετάζεται εξαρτάται από τα προπηκτικά φωσφολιπίδια (αντιδραστήριο 1). Το αντιδραστήριο 2 πυροδοτεί την έναρξη του καταρράκτη της πήξης .

Τα πλάσματα που εξετάζονται χρησιμοποιούνται ως έχουν και τοποθετούνται στον αναλυτή STA-RMAX 3 της Stago όπου και επιλέγεται η εξέταση για τα Procoag - PPL. Επιπρόσθετα για τον ποιοτικό έλεγχο τοποθετούμε τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, STA®ControlP-PPL που δίνονται από το κιτ και καθορίζουμε ένα πεδίο αναφοράς με περίπου 20 ανθρώπινα φυσιολογικά πλάσματα τα οποία πρέπει να βρίσκονται στις ίδιες συνθήκες με το εξεταζόμενο πλάσμα. Το αποτέλεσμα τους πρέπει να βρίσκεται εντός του πεδίου και ο μέσος χρόνος πήξης (χρόνος αναφοράς) θα χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστούν οι αναλογίες. Τα controls χρησιμοποιούνται ως έχουν και τοποθετούνται στον αναλυτή. Ο προσδιορισμός του χρόνου πήξης των εξεταζόμενων πλάσμάτων πραγματοποιείται από τον αναλυτή αυτόματα κατά τη διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων. Τα όρια των control για τις φυσιολογικά είναι 66-100s ενώ τα παθολογικά 18-28s.

Κεφάλαιο 3. Στατιστικός Έλεγχος

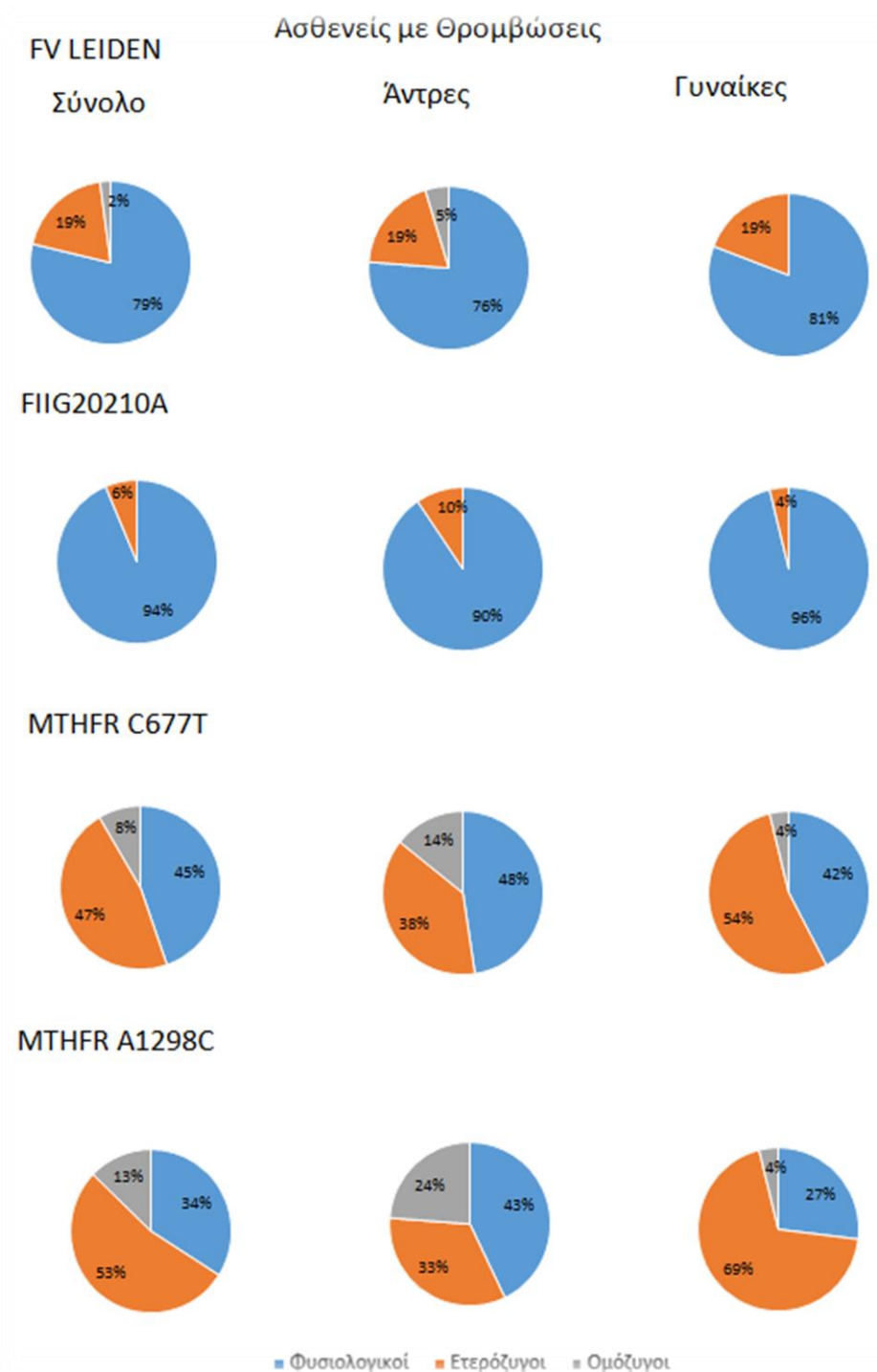
Από τους 16 ασθενείς που έπασχαν από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο οι 10 ήταν άνδρες και οι 6 γυναίκες και μελετήθηκαν ως προς τις μεταλλάξεις FVLEIDEN, FIIIG20210A και την μετάλλαξη για το MTHFR (C677T, A1298C) από τους οποίους κάποιοι ήταν φυσιολογικοί, κάποιοι ετερόζυγοι και μερικοί ομόζυγοι. Πιο αναλυτικά, άνδρες με μετάλλαξη στον παράγοντα VLeiden ήταν στο 90% φυσιολογικοί και ένα ποσοστό 10% παρουσίασε ετεροζυγωτία σε σχέση με τις γυναίκες που στο σύνολο τους ήταν φυσιολογικές. Έπειτα, για τη μετάλλαξη του παράγοντα IIG20210A οι άνδρες ήταν φυσιολογικοί στο 90% ενώ ένα ποσοστό 10% εμφάνισε ομοζυγωτία σε αντίθεση με τις γυναίκες που ήταν φυσιολογικές. Για τη μετάλλαξη του MTHFR C677T οι άνδρες ήταν φυσιολογικοί στο 60% , εμφάνισαν ετεροζυγωτία σε ποσοστό 30% και ομοζυγωτία 10% ενώ οι γυναίκες ήταν φυσιολογικές κατά 17% και εμφάνισαν ετεροζυγωτία σε ποσοστό 33% ενώ το 50% αυτών ήταν ομόζυγες. Για τη μετάλλαξη του MTHFR A1298C οι άνδρες ήταν φυσιολογικοί κατά 40% και ετερόζυγοι σε ποσοστό 60% συγκριτικά με τις γυναίκες που φυσιολογικές κατά το 50% και απο τις οποίες το 33% ήτα ετερόζυγες και εμφάνισαν και ένα ποσοστό 17% ομοζυγωτίας.



Εικόνα 7 Σχηματική Αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών με μεταλλάξεις που εμφάνισαν Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο

Το σύνολο των ασθενών που εμφάνισαν θρομβώσεις είναι 47 από τους οποίους οι 21 ήταν άνδρες και οι 26 γυναίκες. Για τη μετάλλαξη FVLeiden οι άνδρες παρουσίασαν ετεροζυγωτία σε ποσοστό 19% και ομοζυγωτία κατά 5%, ενώ οι γυναίκες εμφάνισαν μόνο ομοζυγωτία σε ποσοστό 19%. Για τη μετάλλαξη FIIG20210A οι άνδρες ήταν ετερόζυγοι σε ποσοστό 10% ενώ το ποσοστό των γυναικών με ετεροζυγωτία ήταν 4%. Στη μετάλλαξη του MTHFR C677T οι άνδρες εμφάνισαν ποσοστό ετεροζυγωτίας 38% ενώ ένα 14% εμφάνισε ομοζυγωτία, στην περίπτωση των γυναικών εμφάνισαν ετεροζυγωτία κατά 54% και ομοζυγωτία 4%. Για τη μετάλλαξη του

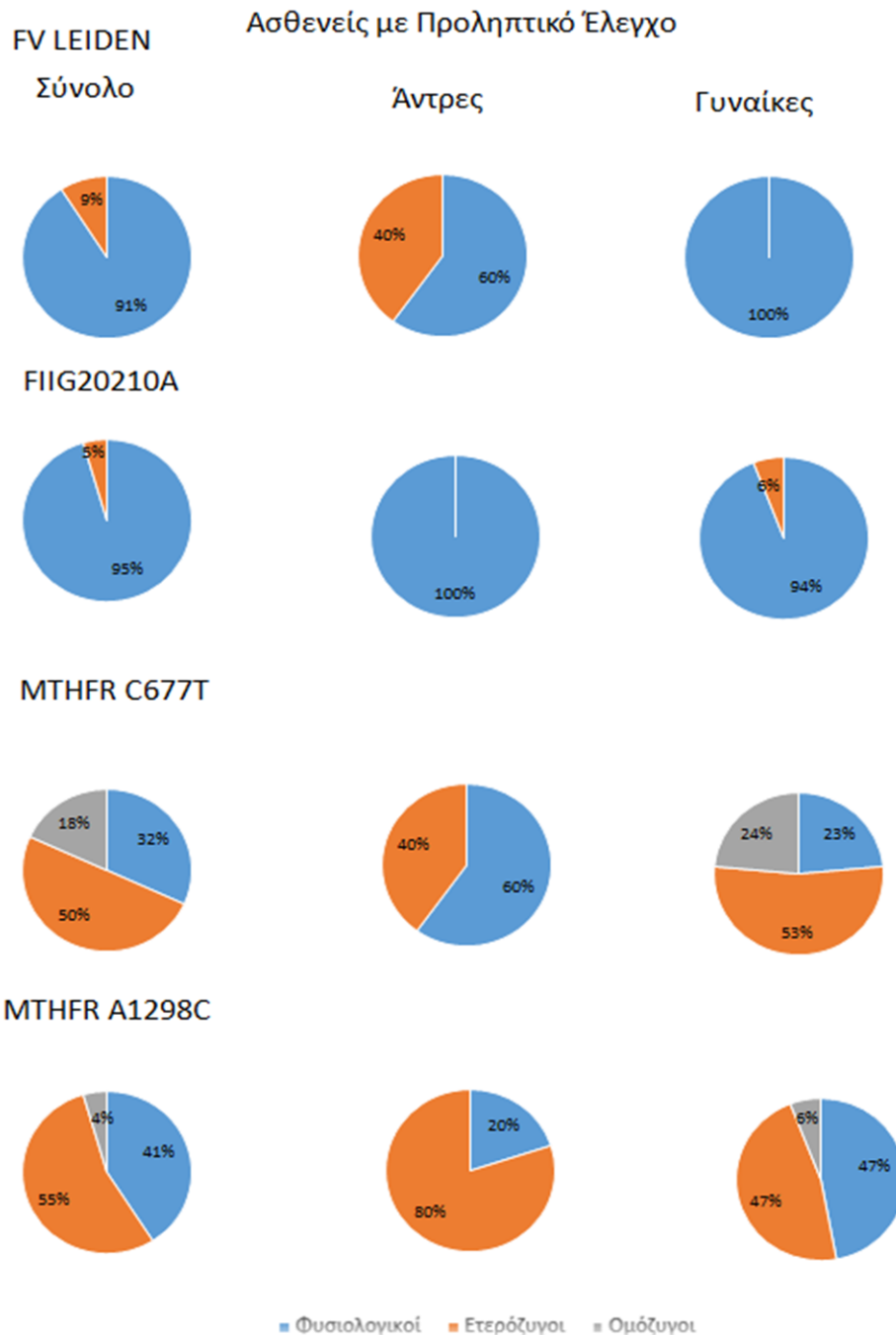
ΜΤΗFRA1298C οι άνδρες παρουσίασαν ετεροζυγωτία κατά 33% και ομοζυγωτία κατά 24% σε σχέση με τις γυναίκες που εμφάνισαν ένα μεγάλο ποσοστό ετεροζυγωτίας κατά 69% και μικρότερο ποσοστό ομοζυγωτίας που ήταν 4%.



Εικόνα 8 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών που παρουσίασαν θρόμβωση

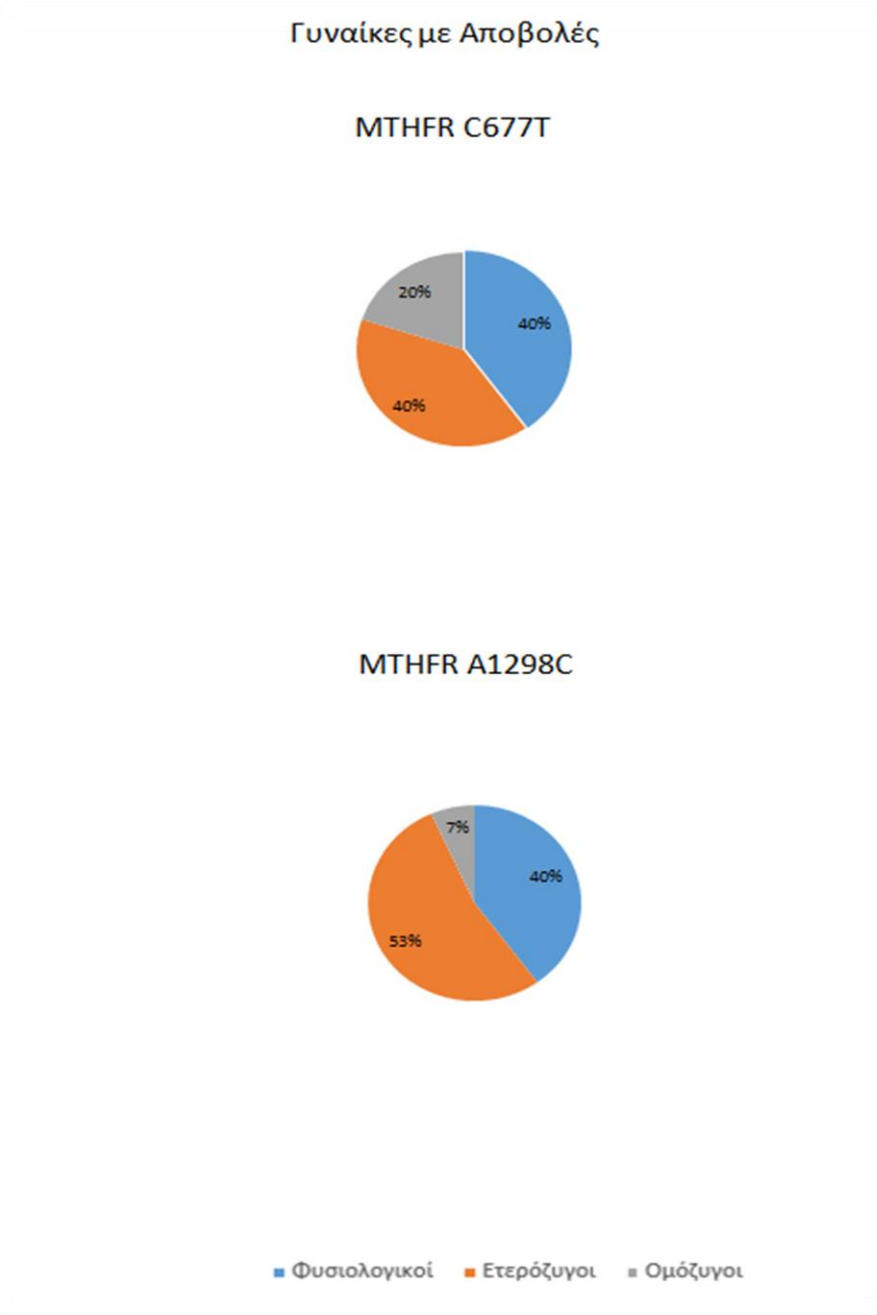
Ένα σύνολο 22 ασθενών υποβλήθηκε σε προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού από αυτούς οι 5 ήταν άνδρες και οι 17 γυναίκες. Αναφορικά με τη

μετάλλαξη FVLeiden οι άνδρες παρουσίασαν ετεροζυγωτία σε ποσοστό 40% ενώ οι γυναίκες ήταν όλες φυσιολογικές. Για τη μετάλλαξη FIIG20210A οι άνδρες είναι όλοι φυσιολογικοί ενώ οι γυναίκες εμφανίζουν ένα ποσοστό 6% ετεροζυγωτίας. Για τη μετάλλαξη του MTHFRC677T οι άνδρες εμφανίζουν ετεροζυγωτία σε ποσοστό κατά 40% ενώ οι γυναίκες 53% και εμφανισαν ομοζυγωτία σε ποσοστό 24%. Στη μετάλλαξη MTHFRA1298C ένα μεγάλο ποσοστό ανδρών το 80% εμφανίζει ετεροζυγωτία ενώ στις γυναίκες μόνο το 47%, όμως εμφανίζουν ομοζυγωτία σε ποσοστό 6%.

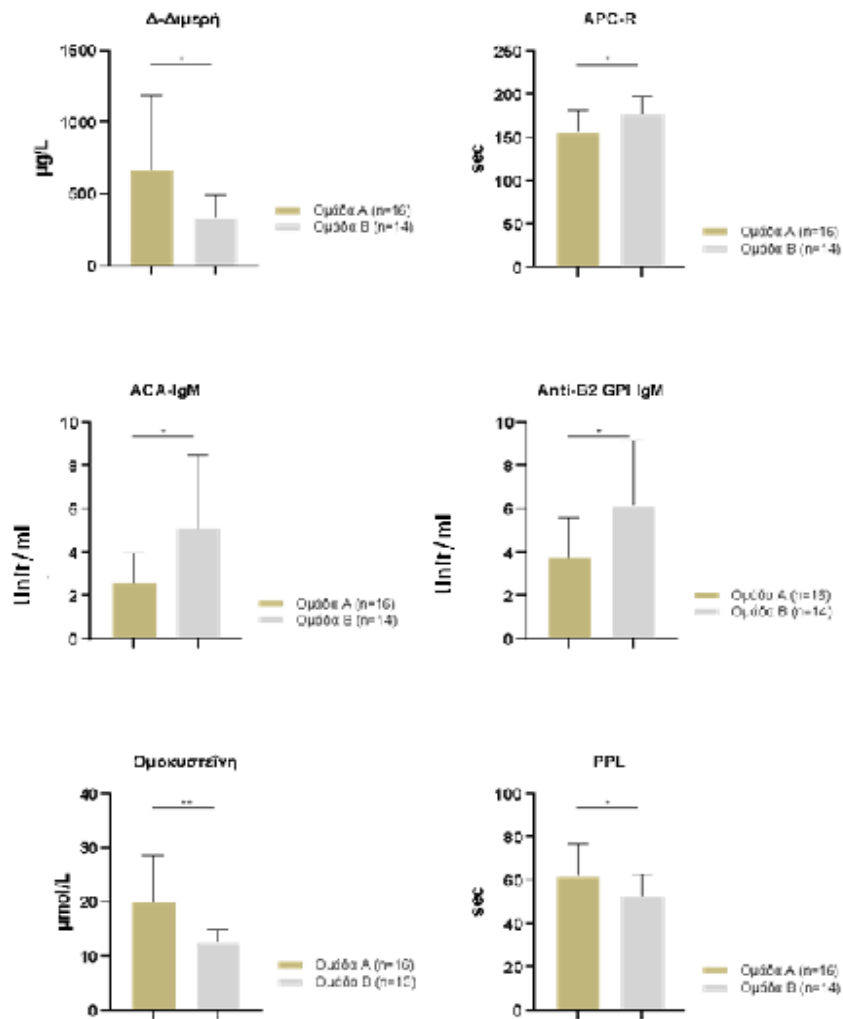


Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των ασθενών που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού

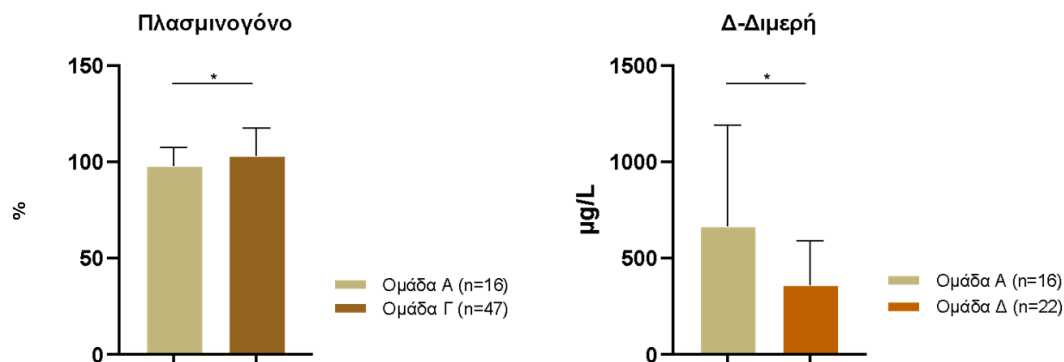
Οι γυναίκες ασθενείς που έκαναν αποβολές ήταν συνολικά 15, από αυτές για τη μετάλλαξη MTHFR C677T ένα ποσοστό 40% εμφάνισε ετεροζυγωτία και ένα ποσοστό 20% ομοζυγωτία, ενώ για τη μετάλλαξη του MTHFR A1298C το 53% αυτών εμφάνισαν ετεροζυγωτία και το 7% ομοζυγωτία.



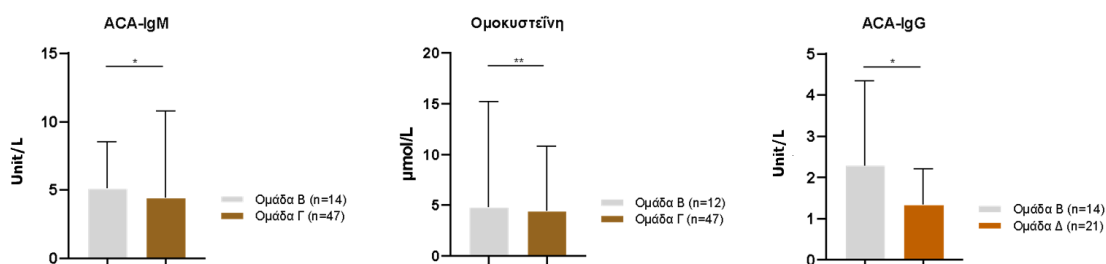
Εικόνα 10 Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των γυναικών που εμφάνισαν αποβολές



Διάγραμμα 1 Διαγραμματική απεικόνιση των ευρεθείσων τιμών για καθεμία από τις εξετάσεις που διενεργήθηκαν για την ομάδα Α (ΑΕΕ) και την ομάδα Β (Αποβολές). Οι αστερίσκοι που διαφαίνονται στα διαγράμματα συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών. Το πρώτο διάγραμμα αφορά τη μέτρηση των δ-διμερών μεταξύ των ασθενών που εμφάνισαν ΑΕΕ και αποβολές και όπως γίνεται φανερό από τον ένα αστερίσκο έχει στατιστική σημαντικότητα ($p=0,0157$). Το δεύτερο διάγραμμα αφορά τη μέτρηση της APC-R μεταξύ των ασθενών που εμφάνισαν ΑΕΕ και εκείνων που έκαναν αποβολές και φαίνεται και από τον αστερίσκο η στατιστική σημαντικότητα που παρουσιάζουν ($p=0,0383$). Στο τρίτο διάγραμμα για τον έλεγχο των ACA-IgM παρατηρούμε μια στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο πληθυσμών ($p=0,0136$). Το τέταρτο διάγραμμα στα anti-B2 GPI τα οποία μεταξύ των δύο πληθυσμών δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($p=0,0282$). Το πέμπτο διάγραμμα αναφέρεται στην μέτρηση της τιμής της ομοκυσεΐνης μεταξύ αυτών που εμφάνισαν ΑΕΕ και αυτών που εμφάνισαν αποβολές και προκύπτει και από τους δύο αστερίσκους ότι εμφανίζουν μέτρια στατιστική σημαντικότητα ($p=0,0389$). Στο έκτο διάγραμμα αναπαρίστανται οι μετρήσεις για το PPL μεταξύ των δύο πληθυσμών και γίνεται φανερό από τον ένα αστερίσκο ότι υπάρχει μια στατιστική διαφορά ($p=0,0392$).

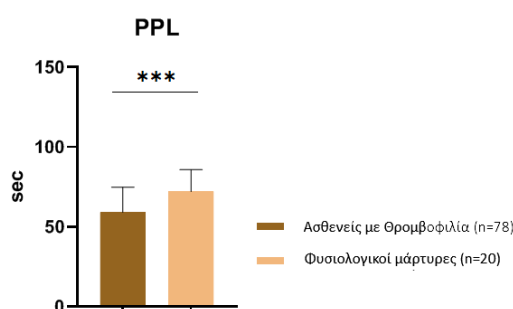


Διάγραμμα 2 Διαγραμματική απεικόνιση των ευρεθείσων τιμών για καθεμία από τις εξετάσεις που διενεργήθηκαν για την ομάδα Α (ΑΕΕ) και την ομάδα Γ (θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και έμφραγμα). Οι αστερίσκοι που διαφαίνονται στα διαγράμματα συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών. Το πρώτο διάγραμμα αφορά τη μέτρηση του πλασμινογόνου μεταξύ των ασθενών που έπασχαν από ΑΕΕ και των ασθενών με θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και έμφραγμα και όπως φίνεται φανερό από τον ένα αστερίσκο οι δύο πληθυσμοί έχουν στατιστική σημαντικότητα ($p=0,0216$). Στο δεύτερο διάγραμμα που απεικονίζεται σχηματικά η μέτρηση των δ-διμερών μεταξύ των ασθενών που έπασχαν από ΑΕΕ και των ασθενών με θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και έμφραγμα και όπως φίνεται φανερό από τον ένα αστερίσκο οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν στατιστική διαφορά ($p=0,0123$).

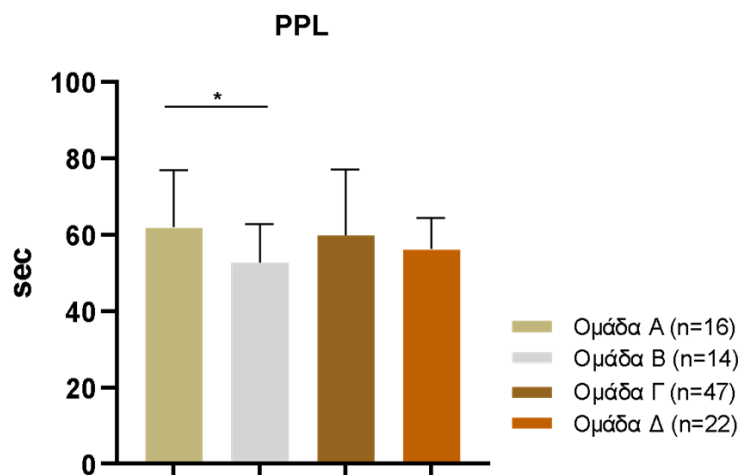


Διάγραμμα 3 Διαγραμματική απεικόνιση των ευρεθείσων τιμών για καθεμία από τις εξετάσεις που διενεργήθηκαν για την ομάδα Β (Αποβολές) και την ομάδα Γ (θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και έμφραγμα). Οι αστερίσκοι που διαφαίνονται στα διαγράμματα συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών που μελετώνται και παρατηρείται χαμηλή στατιστική σημαντικότητα, όπως φαίνεται και από τον έναν αστερίσκο ($p=0,0231$). Το δεύτερο

διάγραμμα αφορά τη μέτρηση της ομοκουσεΐνης στους δύο πληθυσμούς και από τους δύο αστερίσκους φαίνεται ότι εμφανίζουν μέτρια στατιστική σημαντικότητα ($p=0,0233$). Το τρίτο διάγραμμα αφορά τη μέτρηση των ACA-IgG για τους ασθενείς της ομάδας Β που έκαναν αποβολές και για τους ασθενείς της ομάδας Δ που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού. Παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών στατιστική σημαντικότητα όπως φαίνεται και από τον έναν αστερίσκο ($p=0,0330$).



Διάγραμμα 4 Το παραπάνω γράφημα αφορά την απεικόνιση των ευρεθείσων τιμών των χρόνων πήξης για τον πληθυσμό των φυσιολογικών μαρτύρων που εξετάστηκαν για το PPL σε σχέση με τους ασθενείς που εμφάνισαν θρομβοφιλία και όπως φαίνεται και από τους τρεις αστερίσκους υπάρχει ισχυρή στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο πληθυσμών ($p<0,0001$) γεγονός που δικαιολογείται από τους χαμηλούς χρόνους πήξης για το PPL που εμφανίζουν οι θρομβοφιλικόι ασθενείς



Διάγραμμα 5 Η διαγραμματική απεικόνιση των τιμών που προέκυψαν έπειτα από μέτρηση του PPL σε ασθενείς της ομάδας Α που εμφάνισαν ΑΕΕ, της ομάδας Β που έκαναν αποβολές, της ομάδας Γ με θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και έμφραγμα και της ομάδας Δ ασθενείς που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο. Παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών γεγονός που διαφαίνεται και από τον έναν αστερίσκο ($p < 0,05$)

Κεφάλαιο 4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε σε δείγματα που προέρχονταν τόσο από θρομβοφιλικούς ασθενείς όσο και από ασθενείς που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού και αφορούσε το σύνολο των εξετάσεων που περιλαμβάνει ο πλήρης έλεγχος θρομβοφιλίας καθώς και την εξειδικευμένη εξέταση της ενεργότητας των προπηκτικών φωσfolιπιδίων (PPL) σε πλάσματα των παραπάνω ασθενών.

Η θρομβοφιλία είναι μια διαταραχή που αφορά την έλλειψη του φυσικού αντιπηκτικού αντιθρομβίνης [72] και έχει πολλές θρομβωτικές εκδηλώσεις όπως η φλεβική θρομβοεμβολή (VTE), πνευμονική θρομβοεμβολή (PE), έμφραγμα του μυοκαρδίου, αποβολές. Η κλινική θρομβοεμβολή είναι μια πολυπαραγοντική νόσος και εκδηλώνεται όταν συνυπάρχουν οι παράγοντες κινδύνου γενετικοί και περιβαλλοντικοί ταυτόχρονα [73] γεγονός που έγινε φανερό από τη μελέτη μας καθώς υπήρχε σχετική διακύμανση και στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών που υποβλήθηκαν στις εξετάσεις, εμφανές παράδειγμα αυτού αποτελεί η μέτρηση της ομοκυστεΐνης. Σε αυτή παρατηρήσαμε μια μέτρια στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της ομάδας ασθενών που εμφάνισαν ΑΕΕ των οποίων οι τιμές για την ομοκυστεΐνη ήταν ελαφρώς αυξημένες σε σχέση με τις γυναίκες που έκαναν αποβολές, το οποίο υποδεικνύει ότι υπάρχει σαφής συσχέτιση της υπερομοκυστεΐναιμίας με τα ΑΕΕ. Έπειτα, είναι άξιο λόγου η αναφορά στους μοριακούς ελέγχους που διεξήχθησαν και δη για το MTHFR ένα γονίδιο του οποίου

οι μεταλλάξεις και κυρίως η C677T σε ομοζυγωτία αυξάνει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση σε σχέση με τη μετάλλαξη του A1298C του οποίου η συσχέτιση με τη θρόμβωση είναι ακόμα υπό μελέτη [74]. Όπως φαίνεται από τη σχηματική αναπαράσταση η ομοζυγωτία για το MTHFR C677T στους θρομβοφιλικούς ασθενείς τόσο ανά φύλο όσο και στο σύνολο είναι αυξημένο το ποσοστό σε σχέση με τους ασθενείς που εμφάνισαν ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη A1298C. Ωστόσο, οι απόψεις είναι διφορούμενες αναφορικά με το κατά πόσον τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης σχετίζονται με τη μετάλλαξη του γονιδίου MTHFR, λόγω του ότι εξετάζονται ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό θρομβοφιλίας και ενδεχομένως να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [75].

Αναφορικά με τη μετάλλαξη του παράγοντα VLeiden έχει παρατηρηθεί ότι αποτελεί τη συχνότερη αιτία θρομβοφιλικής διάθεσης. Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε αυξημένο το ποσοστό των ετεροζυγωτών για το FVLeiden σε όλες τις παθήσεις που εξετάστηκαν αλλά και στον προληπτικό έλεγχο τόσο στο σύνολο των πληθυσμών όσο και ανά φύλο και ένα ελάχιστο ποσοστό αυτών εμφάνισαν ομοζυγωτία, καθώς ένα ποσοστό 1% είναι πιθανό να είναι ομόζυγο για αυτή τη μετάλλαξη που παρόλα αυτά είναι κλινικά σημαντική εφόσον έχει αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο, γεγονός που επιβεβαιώνεται από μελέτες. [76]

Η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης εμφανίζει μια ευρεία κατανομή της τάξεως 0,7 – 6,5 %στο γενικό πληθυσμό ύστερα από έρευνες [77]. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι υπερτερούσε το ποσοστό των ετεροζυγωτών για αυτή τη μετάλλαξη σε σχέση με τους ομοζυγώτες. Στους ασθενείς με ΑΕΕ βρέθηκε ένα ποσοστό 6% ομοζυγωτίας του συνόλου το οποίο αφορούσε τους άντρες. Έτσι όπως επιβεβαιώνεται και από μελέτες η πιθανότητα να εμφανιστεί ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη FII G20210A είναι σπάνια αν και ενέχει πολύ μεγάλο θρομβωτικό κίνδυνο σε σχέση με την ετεροζυγωτία που είναι συχνότερη αλλά χαμηλότερου θρομβωτικού κινδύνου [78].

Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς που μελετήθηκαν, όσοι βρέθηκαν με μετάλλαξη FV Leiden και ήταν συμπτωματικοί σχεδόν πάντα συνυπήρχε και η μετάλλαξη FII G20210A, γεγονός που επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες που υποστηρίζουν την υψηλή συνύπαρξη και άλλου θρομβοφιλικού κληρονομικού παράγοντα με τον FV Leiden [79]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία διπλοί ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις αυτές διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης VTE συγκριτικά με άτομα που φέρουν μια διαταραχή. [80]

Τα προπηκτικά φωσφολιπίδια παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη διαδικασία της πήξης [81]. Η δοκιμασία που εκτελέστηκε αφορούσε τη μέτρηση του χρόνου πήξης του θρόμβου που εξαρτώνταν αποκλειστικά από τα προπηκτικά φωσφολιπίδια στο δείγμα. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της έρευνάς μας αναφορικά με τους χρόνους πήξης για το PPL ήταν αρκετά χαμηλοί για τους θρομβοφιλικούς ασθενείς, κάτω από τα φυσιολογικά όρια (66-100 s) σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώνεται ερευνητικά βάσει του γεγονότος ότι όσο μεγαλύτερη είναι η δραστηριότητα των προπηκτικών φωσφολιπιδίων στο δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος πήξης [82]. Τα

διαγράμματα που απεικονίζουν τους χρόνους πήξης για το PPL μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν (ΑΕΕ, αποβολές, θρομβώσεις, προληπτικός έλεγχος λόγω οικογενειακού ιστορικού) κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα και κάτω από τις κατώτερες φυσιολογικές τιμές, μια συνθήκη που υποστηρίζει ότι ο μειωμένος χρόνος πήξης για τα προπηκτικά φωσφολιπίδια μπορεί να συσχετιστεί με ασθενείς που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολής (VTE)[83].

Στη μελέτη διενεργήθηκε ένα πακέτο εξετάσεων που αφορούσαν στο σύνολο τους τον πλήρη έλεγχο θρομβοφιλίας, όμως λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών ή και των πλασμάτων που ενδεχομένως να μην ήταν επαρκή, κάποια δεδομένα δεν έχουν μεγάλη στατιστική συσχέτιση και επομένως τα αποτελέσματα που λάβαμε ίσως είναι περιορισμένα.

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη εξέτασε ένα σύνολο ασθενών ηλικίας 14 έως 79 έτη από τους οποίους κάποιοι ήταν θρομβοφιλικοί ασθενείς και άλλοι προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο λόγω οικογενειακού ιστορικού θρομβοφιλίας. Σε αυτούς τους ασθενείς πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου της αιμόστασης όπου παρατηρήθηκαν παρατεταμένοι οι χρόνοι πήξης και ιδιαίτερα ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT) γεγονός που δικαιολογείται από τη θρομβοφιλική διάθεση. Έπειτα διενεργήθηκε πλήρης έλεγχος θρομβοφιλίας και εξετάστηκαν οι ασθενείς ως προς το φύλο για τις κληρονομικές μεταλλάξεις γονιδίων αλλά και για τις τιμές των εξετάσεων που πραγματοποιήθηκαν. Βασικό αντικείμενο της μελέτης ήταν ο χρόνος πήξης για το PPL ο οποίος εξετάστηκε τόσο για τους θρομβοφιλικούς ασθενείς, εκείνους που προσήλθαν για προληπτικό έλεγχο αλλά και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Στις δύο πρώτες ομάδες παρατηρήθηκε χαμηλός ο χρόνος πήξης για το PPL ενώ στην δεύτερη ομάδα εντός των φυσιολογικών ορίων που έχουν οριστεί και συνεπώς οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι σε θρομβωτικές καταστάσεις έχουμε υπερδραστικότητα των προπηκτικών φωσφολιπιδίων. Συγκρίνοντας στατιστικά τις δύο ομάδες μεταξύ τους αυτό επιβεβαιώνεται από την αυξημένη στατιστική σημαντικότητα που εμφάνισαν οι τιμές τους.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την έρευνα δεν έχουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών που αξιολογήθηκαν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 326-36.

2. Levin, E.G. and M. Hanano, [*Endothelial cells and vascular hemostasis*]. Nihon Rinsho, 1992. **50**(2): p. 303-6.
3. Holinstat, M., *Normal platelet function*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 195-198.
4. Sang, Y., et al., *Interplay between platelets and coagulation*. Blood Rev, 2021. **46**: p. 100733.
5. Lagrange, J. and P. Wenzel, *The regulatory role of coagulation factors in vascular function*. Front Biosci (Landmark Ed), 2019. **24**(3): p. 494-513.
6. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
7. Mast, A.E. and W. Ruf, *Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy*. J Thromb Haemost, 2022. **20**(6): p. 1290-1300.
8. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1015-22.
9. Grover, S.P. and N. Mackman, *Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(3): p. 331-338.
10. Huang, J.N. and M.A. Koerper, *Factor V deficiency: a concise review*. Haemophilia, 2008. **14**(6): p. 1164-9.
11. Mazurkiewicz-Pisarek, A., et al., *The factor VIII protein and its function*. Acta Biochim Pol, 2016. **63**(1): p. 11-16.
12. Di Scipio, R.G., K. Kurachi, and E.W. Davie, *Activation of human factor IX (Christmas factor)*. J Clin Invest, 1978. **61**(6): p. 1528-38.
13. Ljung, R., et al., *Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients*. Eur J Haematol, 2019. **102**(2): p. 111-122.
14. Mohammed, B.M., et al., *An update on factor XI structure and function*. Thromb Res, 2018. **161**: p. 94-105.
15. Stavrou, E. and A.H. Schmaier, *Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis*. Thromb Res, 2010. **125**(3): p. 210-5.
16. Schmaier, A.H., et al., *The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 16327-33.
17. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, *New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(1): p. 4-13.
18. Weitz, J.I., J.C. Fredenburgh, and J.W. Eikelboom, *A Test in Context: D-Dimer*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(19): p. 2411-2420.
19. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
20. Schulze, H. and R.A. Shivdasani, *Mechanisms of thrombopoiesis*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1717-24.
21. Patnaik, M.M. and S. Moll, *Inherited antithrombin deficiency: a review*. Haemophilia, 2008. **14**(6): p. 1229-39.
22. Elkattawy, S., et al., *Prothrombin G20210A Gene Mutation-Induced Recurrent Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Case Report and Literature Review*. J Investig Med High Impact Case Rep, 2022. **10**: p. 23247096211058486.
23. Joanne Ellison, A.T., *17- Obesity and Venous Thromboembolism*. 2013: p. 229-246.
24. ΒΑΪΟΠΟΥΛΟΣ, Γ., *ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ*. 2010, ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ
25. Kujovich, J.L., *Factor V Leiden thrombophilia*. Genet Med, 2011. **13**(1): p. 1-16.
26. Van Cott, E.M., B. Khor, and J.L. Zehnder, *Factor V Leiden*. Am J Hematol, 2016. **91**(1): p. 46-9.

27. Goldenberg, N.A. and M.J. Manco-Johnson, *Protein C deficiency*. Haemophilia, 2008. **14**(6): p. 1214-21.
28. Dinarvand, P. and K.A. Moser, *Protein C Deficiency*. Arch Pathol Lab Med, 2019. **143**(10): p. 1281-1285.
29. Majumder, R. and T. Nguyen, *Protein S: function, regulation, and clinical perspectives*. Curr Opin Hematol, 2021. **28**(5): p. 339-344.
30. ten Kate, M.K. and J. van der Meer, *Protein S deficiency: a clinical perspective*. Haemophilia, 2008. **14**(6): p. 1222-8.
31. Khan, S. and J.D. Dickerman, *Hereditary thrombophilia*. Thromb J, 2006. **4**: p. 15.
32. Al-Ansari, R.Y., et al., *Hereditary factor XII deficiency in an adult patient: A case report*. SAGE Open Med Case Rep, 2022. **10**: p. 2050313X221118728.
33. Maas, C. and T. Renne, *Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation*. Blood, 2018. **131**(17): p. 1903-1909.
34. Jadaon, M.M., *Epidemiology of activated protein C resistance and factor v leiden mutation in the mediterranean region*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2011. **3**(1): p. e2011037.
35. Moll, S. and E.A. Varga, *Homocysteine and MTHFR Mutations*. Circulation, 2015. **132**(1): p. e6-9.
36. Liew, S.C. and E.D. Gupta, *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases*. Eur J Med Genet, 2015. **58**(1): p. 1-10.
37. Sukla, K.K. and R. Raman, *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): p. 111-8.
38. Ganguly, P. and S.F. Alam, *Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease*. Nutr J, 2015. **14**: p. 6.
39. Chawla, J. and D. Kvarnberg, *Hydrosoluble vitamins*. Handb Clin Neurol, 2014. **120**: p. 891-914.
40. Ghosh, A.K. and D.E. Vaughan, *PAI-1 in tissue fibrosis*. J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 493-507.
41. Chu, Y., J.C. Bucci, and C.B. Peterson, *Identification of a PAI-1-binding site within an intrinsically disordered region of vitronectin*. Protein Sci, 2020. **29**(2): p. 494-508.
42. Loertscher, R. and P. Lavery, *The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 93-6.
43. Croft, S.A., et al., *The GPIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction*. Br J Haematol, 1999. **106**(3): p. 771-6.
44. Santoso, S., et al., *Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2449-53.
45. Petri, M., *Antiphospholipid syndrome*. Transl Res, 2020. **225**: p. 70-81.
46. Sayar, Z., et al., *Thrombotic antiphospholipid syndrome: A practical guide to diagnosis and management*. Thromb Res, 2021. **198**: p. 213-221.
47. James, A.H., *Pregnancy-associated thrombosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 277-85.
48. Esmon, C.T., *Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis*. Blood Rev, 2009. **23**(5): p. 225-9.
49. Martinez Licha, C.R., et al., *Current Management of Acute Pulmonary Embolism*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2020. **26**(2): p. 65-71.
50. James Philip Bowman, F.D.G., *An Illustrated Guide to Brain Structure, Blood Supply, and Clinical Signs*. 2003: Prentice Hall.

51. Herpich, F. and F. Rincon, *Management of Acute Ischemic Stroke*. Crit Care Med, 2020. **48**(11): p. 1654-1663.
52. Liu, M. and J. Gutierrez, *Genetic Risk Factors of Intracranial Atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2020. **22**(4): p. 13.
53. Maguire, J.M., et al., *Polymorphisms in platelet glycoprotein 1balpha and factor VII and risk of ischemic stroke: a meta-analysis*. Stroke, 2008. **39**(6): p. 1710-6.
54. Cheng, Y.C., et al., *Genetics of ischemic stroke in young adults*. Circ Cardiovasc Genet, 2014. **7**(3): p. 383-92.
55. Boender, J., M.J. Kruij, and F.W. Leebeek, *A diagnostic approach to mild bleeding disorders*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(8): p. 1507-16.
56. Echahdi, H., et al., *Von Willebrand's disease: case report and review of literature*. Pan Afr Med J, 2017. **27**: p. 147.
57. Weyand, A.C. and V.H. Flood, *Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management*. Hematol Oncol Clin North Am, 2021. **35**(6): p. 1085-1101.
58. Cahill, M.R. and B.T. Colvin, *Haemophilia*. Postgrad Med J, 1997. **73**(858): p. 201-6.
59. Goodeve, A.C., *Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(7): p. 1184-95.
60. Muller, J., et al., *An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B*. Hamostaseologie, 2022. **42**(4): p. 248-260.
61. Gauer, R.L. and M.M. Braun, *Thrombocytopenia*. Am Fam Physician, 2012. **85**(6): p. 612-22.
62. Protty, M.B., et al., *The role of procoagulant phospholipids on the surface of circulating blood cells in thrombosis and haemostasis*. Open Biol, 2022. **12**(4): p. 210318.
63. Ramberg, C., et al., *Plasma procoagulant phospholipid clotting time and venous thromboembolism risk*. Res Pract Thromb Haemost, 2021. **5**(8): p. e12640.
64. Mallik, S., et al., *Synthesis of Phosphatidylserine and Its Stereoisomers: Their Role in Activation of Blood Coagulation*. ACS Med Chem Lett, 2018. **9**(5): p. 434-439.
65. Owen, B.A., et al., *Procoagulant activity, but not number, of microparticles increases with age and in individuals after a single venous thromboembolism*. Thromb Res, 2011. **127**(1): p. 39-46.
66. Bates, S.M., *D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders*. Semin Thromb Hemost, 2012. **38**(7): p. 673-82.
67. Brandt, J.T., et al., *Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH*. Thromb Haemost, 1995. **74**(4): p. 1185-90.
68. Maccaferri, M., et al., *Protein S activity in patients with hereditary protein S deficiency and in patients with juvenile venous thrombosis. Results of a functional method*. Thromb Res, 1991. **64**(6): p. 647-58.
69. Green, D., D.R. Ganger, and A.T. Blei, *Protein C deficiency in splanchnic venous thrombosis*. Am J Med, 1987. **82**(6): p. 1171-4.
70. Hsu, E. and L. Moosavi, *Biochemistry, Antithrombin III*, in StatPearls. 2023: Treasure Island (FL) companies. Disclosure: Leila Moosavi declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
71. Miles, L.A., et al., *Plasminogen Receptors and Fibrinolysis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
72. Egeberg, O., *Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia*. Thromb Diath Haemorrh, 1965. **13**: p. 516-30.
73. Rosendaal, F.R., *Venous thrombosis: a multicausal disease*. Lancet, 1999. **353**(9159): p. 1167-73.

74. Weisberg, I., et al., *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity*. Mol Genet Metab, 1998. **64**(3): p. 169-72.
75. Schmitz, C., et al., *Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study*. Circulation, 1996. **94**(8): p. 1812-4.
76. Rosendaal, F.R., et al., *High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance)*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1504-8.
77. Rosendaal, F.R., et al., *Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant*. Thromb Haemost, 1998. **79**(4): p. 706-8.
78. Koster, T., et al., *Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study)*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2756-61.
79. Ehrenforth, S., et al., *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): p. 2209-10.
80. Emmerich, J., 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): p. 809-16.
81. Ramberg, C., et al., *Rosuvastatin treatment decreases plasma procoagulant phospholipid activity after a VTE: A randomized controlled trial*. J Thromb Haemost, 2022. **20**(4): p. 877-887.
82. Nielsen, T., et al., *Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation*. J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1454777.
83. Fotiou, D., et al., *Longer procoagulant phospholipid-dependent clotting time, lower endogenous thrombin potential and higher tissue factor pathway inhibitor concentrations are associated with increased VTE occurrence in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the prospective ROADMAP-MM-CAT study*. Blood Cancer J, 2018. **8**(11): p. 102.