



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

Διαταραχές της Αιμόστασης σε Ασθενείς με Αιμορροφιλία Α

Φορμόζης Σταύρος (20678325)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Παύλου Ευθυμία

stavros formozis



University of West Attica
Faculty of Health and Care Sciences
Department of Biomedical Sciences
Division of Medical Laboratories

Disorders of Hemostasis in Patients with Haemophilia A

Formozis Stavros (20678325)

Supervisor: Pavlou Efthymia

Athens 2024

Επιτροπή Εξέτασης:

Ημερομηνία Εξέτασης: 8/10/2023

	Όνομα Εξεταστών	Υπογραφή
1ος Εξεταστής	Αναστάσιος Κριεμπάρδης	
2ος Εξεταστής	Γεώργιος Δρύλλης	
3ος Εξεταστής	Ευθυμία Παύλου	

Δήλωση Συγγραφέα Προπτυχιακής Εργασίας:

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Φορμόζης Σταύρος του Παντελεήμων, με αριθμό μητρώου 20378325 φοιτητής 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 της δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου»

Όνομα Φοιτητή:

Σταύρος Φορμόζης

Υπογραφή Φοιτητή

Ευχαριστίες:

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 03/2024 με 07/2024 στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που με βοήθησαν να ολοκληρώσω με επιτυχία την πτυχιακή μου εργασία. Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την βοήθεια στην διενέργεια όλου του πειραματικού πρωτοκόλλου αλλά για την υπομονή και καθοδήγησή τους στις εργαστηριακές τεχνικές κατά την εκπαίδευσή μου στο Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο.

Ευχαριστώ ξεχωριστά την κυρία Παύλου Ευθυμία, επιβλέπουσα καθηγήτρια και Προϊστάμενη Παραϊατρικού Προσωπικού του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για το ότι αποτέλεσε κινητήριο δύναμη για την εξειδίκευσή μου στον τομέα της Αιμόστασης. Ακόμα θέλω να την ευχαριστήσω για την υποστήριξη και τον συμβουλευτικό ρόλο που είχε σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Κωνσταντίνα Πατάρη, Ντύλαν Χαραλάμπους και Μαρία – Παναγιώτα Τερζή, για την εξαιρετική συνεργασία, υποστήριξη και βοήθεια σε κάθε στάδιο της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ανυπολόγιστη βοήθεια και υποστήριξη τους.

Περίληψη

Εισαγωγή:

Η αιμορροφιλία Α αποτελεί μία φυλοσύνδετη κληρονομική διαταραχή που οφείλεται σε ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Η κλινική εικόνα της νόσου ποικίλει ανάλογα με τον βαθμό ανεπάρκειας του παράγοντα. Η πλειονότητα των ασθενών πάσχουν από σοβαρή ανεπάρκεια του FVIII, με επίπεδα <1%. Η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® παρέχει γρήγορα πληροφορίες για την ταχύτητα σχηματισμού θρόμβου αλλά και για την ποιότητα του. Ως Point-of-Care αναλυτής, με το εξειδικευμένο τεστ Intem, το οποίο αναλύει την ενδογενή οδό της πήξης μπορεί να παρέχει γρήγορα αποτελέσματα για την εκτίμηση του aPTT, για το αν υπάρχει μείωση του FVIII αλλά και για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α. Αυτό θα γίνεται διότι οι υψηλές τιμές των παραμέτρων υποδηλώνουν σοβαρή ανεπάρκεια του FVIII και τάση για αιμορραγία.

Σκοπός Μελέτης:

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η εκτίμηση της συσχέτισης της τιμής του παράγοντα VIII και του aPTT με τις παραμέτρους της θρομβοελαστογραφίας από τον ROTEM delta, με απώτερο στόχο τη γρήγορη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών με αιμορροφιλία Α

Ασθενείς-Μέθοδος-Υλικά:

Για την διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς μάρτυρες αιμοδοτές και 33 δείγματα ασθενών με αιμορροφιλία Α του Ιατρείου Αιμορροφιλίας της Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α Ιπποκράτειου, που κατά τα έτη 2022-2023 άλλαξε η θεραπευτική τους αγωγή. Τα δείγματα αρχικά αναλύθηκαν για το βασικό screening της πήξης (PT sec, PT INR, aPTT, Ινωδογόνο και D-Dimers) και στην συνέχεια μετρήθηκε ο παράγοντας VIII και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Η θρομβοελαστογραφία πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή ROTEM delta με το αποθηκευμένο πλάσμα των ασθενών. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά στο spss κα διευρύνθηκε η συσχέτιση μεταξύ τους.

Αποτελέσματα:

Συγκρίνοντας τις βασικές παραμέτρους του ROTEM® παρατηρείται ότι οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α έχουν υψηλότερες τιμές από τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Λόγω μη κανονικής κατανομής των τιμών που αναλύθηκαν και ορίζοντας ως στατιστικά σημαντική τιμή p-value ≤ 0.05 , πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος, στον οποίο διερευνήθηκε με το Spearman test η πιθανή συσχέτιση τους με τα επίπεδα του FVIII, του aPTT και της θεραπευτικής αγωγής (παλιάς και καινούργιας).

Παρατηρήθηκε μεταξύ της παραμέτρου Coagulation Time (CT) και του aPTT θετική συσχέτιση και με τον FVIII και την παράμετρο angle (α) αρνητική συσχέτιση. Μεταξύ της παραμέτρου angle (α) και του FVIII παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση και με το aPTT και την παράμετρο CT αρνητική συσχέτιση. Τέλος, συγκρίνοντας τις τιμές των παραμέτρων του θρομβοελαστογραφήματος μεταξύ νέας και παλιάς θεραπευτικής αγωγής παρατηρείται μείωση των τιμών των παραμέτρων του ROTEM με την καινούργια αγωγή, με αποτέλεσμα την δυνατότητα εκτίμησης της αποδοτικότητας της θεραπείας τους.

Συμπεράσματα:

Χρησιμοποιώντας την θρομβοελαστογραφία σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α μπορεί να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών με στόχο να προληφθεί ένα νέο αιμορραγικό επεισόδιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτό γίνεται καθώς μπορεί γρήγορα να εκτιμηθεί η παράταση στο aPTT και το αν υπάρχει μείωση του FVIII.

Abstract:

Introduction:

Hemophilia A is an X-linked hereditary disorder caused by a deficiency in factor VIII. The clinical presentation of the disease varies depending on the degree of factor deficiency. Most patients suffer from severe factor VIII deficiency, with levels of the Factor VIII is <1%. Rotational Thromboelastography ROTEM® provides rapidly information on the speed of clot formation as well as its quality. As a point-of-care analyzer, with the specialized Intem test, which analyzes the intrinsic pathway of coagulation, it can quickly provide information for evaluation of the aPTT, to determine whether there is a reduction in factor VIII, and to evaluate the effectiveness of treatment in patients with hemophilia A. This is possible, because elevated parameter values indicate severe factor VIII deficiency and a tendency for bleeding.

Purpose of this Study:

The objective of this study is to evaluate the correlation between factor VIII levels and aPTT with thromboelastography parameters from the ROTEM delta, aiming at the rapid assessment of the effectiveness of the therapeutic regimen in patients with hemophilia A.

Patients-Methods-Materials:

For this study, 10 controls from healthy blood donor and 33 samples from patients with hemophilia A from the Hemophilia Clinic of the Blood Donation Department of G.N.A. Ippokrateio, who changed their treatment between the period 2022-2023, were used. The samples were initially analyzed for basic coagulation screening (PT sec, PT INR, aPTT, Fibrinogen, and D-Dimers), then factor VIII was measured, and the samples were stored at -80°C. Thromboelastography was performed on the ROTEM delta analyzer using the stored plasma from the patients. The results were statistically analyzed in SPSS, and the correlation between them was further examined.

Results:

Comparing the basic ROTEM® parameters, it is observed that patients with hemophilia A have higher values than healthy controls. Due to the non-normal distribution of the analyzed values and using a p-value ≤ 0.05 as statistically significant, statistical analysis was performed. The Spearman test was used to investigate potential correlations with factor VIII levels, aPTT, and the therapeutic regimen (old and new). A positive correlation was observed between the Coagulation Time (CT) parameter and aPTT, and a negative correlation was found with factor VIII and the angle (α) parameter. Between the angle (α) parameter and factor VIII, a positive correlation was observed, and with aPTT and the CT parameter, a negative correlation was found. Finally, comparing the thromboelastogram parameter values between the new and old

therapeutic treatment, a reduction in the ROTEM parameter values was observed with the new treatment, allowing for the assessment of treatment efficacy.

Conclusion:

Using thromboelastography in patients with hemophilia A can help assess the effectiveness of the therapeutic treatment, with the aim of preventing new bleeding episodes. According to the study's findings, this is possible because the prolongation of aPTT and the presence of reduced factor VIII can be rapidly evaluated.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες:	v
Περίληψη	vi
Abstract:	viii
Πίνακας περιεχομένων	x
A. Γενικό Μέρος	1
1. Φυσιολογία της Αιμόστασης:	2
1.1 Πρωτογενής Αιμόσταση:	3
1.1.1 Ο Ρόλος των Αιμοπεταλίων στην Αιμόσταση:	3
1.1.2 Ενεργοποίηση των Αιμοπεταλίων:	4
1.2 Δευτερογενής Αιμόσταση:	5
1.2.1 Μοντέλο του Καταρράκτη:	5
1.2.2 Κυτταρικό Μοντέλο Αιμόστασης:	7
1.2.2.1 Φάση Έναρξης (Initiation):	8
1.2.2.2 Φάση Ενίσχυσης (Amplification):	9
1.2.2.3 Φάση Διάδοσης (Propagation):	9
1.3 Φυσικοί Αναστολείς της Αιμόστασης:	10
1.4 Ινωδύλωση:	11
2. Αιμορροφιλία A:	13
2.1 Ιστορική Αναδρομή:	14
2.2 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά:	16
2.3 Παθοφυσιολογία και Κλινική Εικόνα της Αιμορροφιλίας A:	17
2.4 Διαγνωστική Προσέγγιση Αιμορροφιλίας A:	20
2.5 Θεραπεία Αιμορροφιλίας A:	23
2.5.1 Διαθέσιμα Σκευάσματα Παράγοντα VIII:	23
2.5.2 Διαθέσιμα Σκευάσματα Αντικατάστασης του Παράγοντα VIII:	26
2.5.3 Γονιδιακή Θεραπεία:	26
2.6 Αναστολέας Έναντι του Παράγοντα VIII:	27
2.6.1 Διάγνωση Αναστολέα έναντι του Παράγοντα VIII:	28
2.6.2 Θεραπεία Ασθενών με Αναστολέα έναντι του Παράγοντα VIII:	28
3. Επίκτητη Αιμορροφιλία A:	30
3.1 Παθοφυσιολογία και Κλινική Εικόνα Επίκτητης Αιμορροφιλίας A:	30
3.2 Διαγνωστική Προσέγγιση Επίκτητης Αιμορροφιλίας A:	30

3.3	Θεραπεία Επίκτητης Αιμορροφιλίας Α:	32
4.	Περιστροφική Θρομβοελαστογραφία:	33
4.1	Αρχή Μεθόδου Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:	34
4.2	Δοκιμασίες Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:	35
4.3	Παράμετροι Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:	37
4.4	Περιορισμοί Χρήσης Θρομβοελαστογραφίας:	40
4.5	Κλινικές Εφαρμογές Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:	40
4.6	Ρόλος Θρομβοελαστογραφίας στην Αιμορροφιλία Α:	42
5.	Σκοπός της Εργασίας:	44
	Β. Πειραματικό Μέρος:	45
6.	Υλικά και Μέθοδοι:	46
6.1	Αναλώσιμα Υλικά:	46
6.2	Αντιδραστήρια – Διαλύτες:	47
6.3	Εργαστηριακά Όργανα:	48
7.	Πειραματική Πορεία:	49
7.1	Λήψη και Προετοιμασία Δείγματος:	49
7.2	Βασικός Έλεγχος Ρουτίνας της Αιμόστασης:	49
7.3	Μέτρηση Παράγοντα VIII:	50
7.3.1	Μέθοδος Ενός Σταδίου:	51
7.3.2	Χρωμογονικός Προσδιορισμός:	51
7.4	Θρομβοελαστογραφία:	52
8.	Αποτελέσματα:	54
9.	Συμπεράσματα:	60
	Συντμήσεις:	62
	Παράρτημα Εικόνων:	63
	Παράρτημα Πινάκων:	64
	Βιβλιογραφία	65

Α. Γενικό Μέρος

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η αιμορροφιλία Α, και διερευνώνται τυχόν διαταραχές της αιμόστασης με την χρήση της θρομβοελαστογραφίας. Πιο αναλυτικά, σε ερευνητικό επίπεδο ασχολείται με την συσχέτιση των παραμέτρων της θρομβοελαστογραφίας με τα επίπεδα του παράγοντα VIII και του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated Partial Thromboplastin Time, aPTT) σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α, καθώς και με την πορεία της θεραπείας τους.

Η αιμορροφιλία Α αποτελεί μία φυλοσύνδετη κληρονομική διάθεση που οφείλεται σε ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Η κλινική εικόνα της νόσου ποικίλει ανάλογα με τον βαθμό ανεπάρκειας του παράγοντα πήξης και περιλαμβάνει πιο συχνά ενδομυϊκές αιμορραγίες. Η πλειονότητα όμως των ασθενών πάσχουν από σοβαρή ανεπάρκεια του παράγοντα VIII, δηλαδή σε επίπεδα του παράγοντα <1% (1).

Επίσης, με την χρήση του θρομβοελαστογράφου ROTEM delta δίνεται η δυνατότητα να αναλυθεί όλη η αιμόσταση. Μελετάται με ξεχωριστές δοκιμασίες η εξωγενής, ενδογενής οδός, η οδός της ινωδόλυσης και η δράση του παράγοντα XIII. Στο τέλος της ανάλυσης θα προκύψουν τέσσερα διαφορετικά γραφήματα που θα αναλυθούν ξεχωριστά. Αυτό δίνει τη δυνατότητα να διερευνηθούν τυχόν διαταραχές και σε άλλους τομείς της αιμόστασης, αλλά και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής αγωγής που λαμβάνει ο ασθενής, γιατί θα διερευνηθεί τυχόν συσχέτιση των παραμέτρων του θρομβοελαστογραφήματος με τα επίπεδα του παράγοντα VIII, το aPTT των ασθενών αλλά και με την πορεία της θεραπευτικής τους αγωγής.

Πριν αναφερθεί η πειραματική πορεία της ερευνητικής εργασίας και αναλυθούν τα αποτελέσματα της θα πρέπει πρώτα να αναλυθεί η αιμόσταση εστιάζοντας στον παράγοντα VIII και να μελετηθεί η παθοφυσιολογία της αιμορροφιλίας Α, αλλά και η σημασία της θρομβοελαστογραφίας.

1. Φυσιολογία της Αιμόστασης:

Αιμόσταση ορίζεται ως η διαδικασία διατήρησης του αίματος μέσα σε ένα κατεστραμμένο αγγείο (2) σε υγρή κατάσταση αποτρέποντας έτσι την διαφυγή του μέσω του σχηματισμού θρόμβου. Αυτός σχηματίζεται μέσω πολλών βιοχημικών και κυτταρικών αντιδράσεων με στόχο να αποτραπεί η απώλεια αίματος από το τραυματισμένο αγγείο (3). Η αιμόσταση, ένας βασικός αμυντικός μηχανισμός του οργανισμού (4), περιλαμβάνει ένα σύνολο διεργασιών που απαρτίζει την πήξη του αίματος, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την αγγειακή αποκατάσταση. Κατά τον τραυματισμό ενός αγγείου ενεργοποιείται το αιμοστατικό σύστημα του οργανισμού και ξεκινά μία «αλυσίδα» αντιδράσεων όπου ενεργοποιούνται διάφοροι εξωαγγειακοί υποδοχείς που λειτουργούν σε συντονισμό με τους παράγοντες πήξης ώστε να

σχηματιστεί ο θρόμβος. Η πήξη του αίματος στη συνέχεια αναστέλλεται από τους φυσικούς αναστολείς της αιμόστασης ώστε να εμποδιστεί ο υπερβολικός σχηματισμός θρόμβων και η γενικευμένη θρόμβωση (5).

Για να περιγράψει η αιμόσταση έχουν δημιουργηθεί πολλά μοντέλα όπως το μοντέλο του καταρράκτη και το κυτταρικό μοντέλο. Μια σαφής κατηγοριοποίηση της αιμόστασης είναι η εξής:

1. Πρωτογενής αιμόσταση
2. Δευτερογενής Αιμόσταση

Πιο αναλυτικά, η πρωτογενής αιμόσταση περιλαμβάνει την απάντηση του αγγειακού συστήματος, και των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο αγγείο, σφραγίζοντας έτσι το τραύμα. Πραγματοποιείται, σε τραυματισμένα αγγεία τα οποία συστέλλονται για να το σφραγίσουν, μέσω της διαδικασίας της αγγειοσύσπασης (2) και τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο υποενδοθήλιο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του παράγοντα von Willebrand (vWF) και υποδοχέων των αιμοπεταλίων. Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει την απέκκριση του συστήματος πήξης στον τραυματισμό του αγγείου με σκοπό την πήξη του αίματος (3).

1.1 Πρωτογενής Αιμόσταση:

Όπως έχει ήδη διαπιστωθεί πρωταρχικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση έχουν τα αιμοπετάλια. Τα **αιμοπετάλια** είναι θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων με δισκοειδές σχήμα και διαθέτουν κυτταρόπλασμα πλούσιο σε κοκκία και στην κυτταρική τους μεμβράνη έχουν πολλούς υποδοχείς (6). Αυτοί οι μεμβρανικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν πολλούς ενεργοποιητές τους, όπως το ADP, την θρομβοξάνη A₂ (TXA₂), πολλούς ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων, διάφορα ανοσοσυμπλέγματα και την θρομβίνη. Τα αιμοπετάλια εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος σε μη ενεργοποιημένη μορφή και αλληλοεπιδρούν με το περιβάλλον (3). Επιπλέον, στο κυτταρόπλασμα τους διαθέτουν πολυάριθμα κοκκία, τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. **α-κοκκία:** τα οποία περιέχουν παράγοντες πήξης και ινωδόλυσης, όπως τον παράγοντα vWF, το ινωδογόνο και την φιβρονεκτίνη, αλλά και την θρομβοσποντίνη, τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων 4 (PF4), και πολλούς αυξητικούς παράγοντες (7).
2. **πυκνά σωμάτια:** περιέχουν επαγωγούς της συσώρευσης των αιμοπεταλίων όπως το ADP, το ATP και την σεροτονίνη (3).

1.1.1 Ο Ρόλος των Αιμοπεταλίων στην Αιμόσταση:

Σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχει η μεμβράνη των PLTs. Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερης σημασίας είναι οι γλυκοπρωτεΐνες που υπάρχουν στην μεμβράνη που λειτουργούν ως υποδοχείς για το κολλαγόνο οι **γλυκοπρωτεΐνες GPIa** και **GPIIa**, για το ινωδογόνο οι γλυκοπρωτεΐνες **GPIIb** και **GPIIIa** και για τον παράγοντα von Willebrand η γλυκοπρωτεΐνη **GPIb**. Η

διέγερση αυτών των υποδοχέων επιτρέπει την αμφίδρομη σηματοδότηση μεταξύ των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών διαμερισμάτων του αιμοπεταλίου. Επιπλέον, ο υποδοχέας του von Willebrand λειτουργεί ως γέφυρα καθώς συνδέεται με το κολλαγόνο των τραυματισμένων αιμοφόρων αγγείων προάγοντας έτσι τον σχηματισμό θρόμβου (6). Τέλος τόσο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων όσο και στον σχηματισμό του θρόμβου συμβάλει και η γλυκοπρωτεΐνη GPIIb του συμπλέγματος GPIIb-IX-V, η οποία αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα vWF και το κολλαγόνο και είναι υπεύθυνη για την συμβολή των λευκοκυττάρων σε βακτηριακές ή ιογενείς λοιμώξεις (8).

1.1.2 Ενεργοποίηση των Αιμοπεταλίων:

Τα αιμοπετάλια παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση καθώς σε περίπτωση τραυματισμού ενός αγγείου συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα θρόμβο (9). Όταν τραυματίζεται ένα αιμοφόρο αγγείο, τα αιμοπετάλια επειδή είναι εξειδικευμένα να το αναγνωρίζουν, συνδέονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν το αγγείο. Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με την δράση του παράγοντα von Willebrand και ορισμένων υποδοχέων των αιμοπεταλίων. Τα PLTs προσκολλώνται γρήγορα στην επιφάνεια του τραυματισμένου αγγείου, ενεργοποιούνται και εκκρίνουν το περιεχόμενο των ενδοκυττάρων οργανιδίων αποθήκευσης τους, των α-κοκκίων και των πυκνών σωματίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συσσωματώνονται και να σχηματίζουν γρήγορα τον θρόμβο αποτρέποντας της απώλεια αίματος και προωθώντας την επούλωση του τραύματος (8).

Πιο αναλυτικά, όταν διεγείρονται τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν το περιεχόμενο των α-κοκκίων και των πυκνών σωματίων (3). Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην αύξηση του επιπέδου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των PLTs. Τα α-κοκκία περιέχουν τον παράγοντα αιμοπεταλίων (PF4), την β-θρομβοσφαιρίνη, αυξητικούς παράγοντες, το ινωδογόνο, τον παράγοντα V και τον vWF και τον αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1). Τα πυκνά σωματίδια περιέχουν ATP, ADP και σεροτονίνη. Η απελευθέρωση τους οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, συσσώρευση και ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης (6).

Κατά την **συσσώρευση** των αιμοπεταλίων ξοδεύεται η αποθηκευμένη πηγή ενέργειας τους, και χάνουν την ακεραιότητα της μεμβράνης τους και σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα. Επίσης, απελευθερώνουν και σωματίδια μικροαιμοπεταλίων που είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια και διάφορους παράγοντες πήξης. Αυτά συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, το οποίο απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης σε θρομβοξάνη A₂(TXA₂). Αυτή αποτελεί ένα ισχυρό επαγωγό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (3).

Στην **πρωτοπαθή αιμόσταση** τα αιμοπετάλια αλληλοεπιδρούν με τα στοιχεία του κατεστραμμένου αγγείου και σχηματίζεται έτσι ο θρόμβος. Αυτό περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων, όπως την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα συστατικά του υποενδοθηλίου, την απελευθέρωση των κόκκων αιμοπεταλίων, τον σχηματισμό του ινώδους και τέλος την ινωδόλυση (3). Σε αυτή την διαδικασία η ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων από φωσφολιπίδια που υπάρχουν στην επιφάνεια τους, διευκολύνει τη ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης και την δημιουργία της θρομβίνης και του ινώδους. Τέλος, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσλαμβάνουν λευκοκύτταρα στο σημείο του τραύματος επάγοντας από νωρίς το ανοσοποιητικό σύστημα (8).

1.2 Δευτερογενής Αιμόσταση:

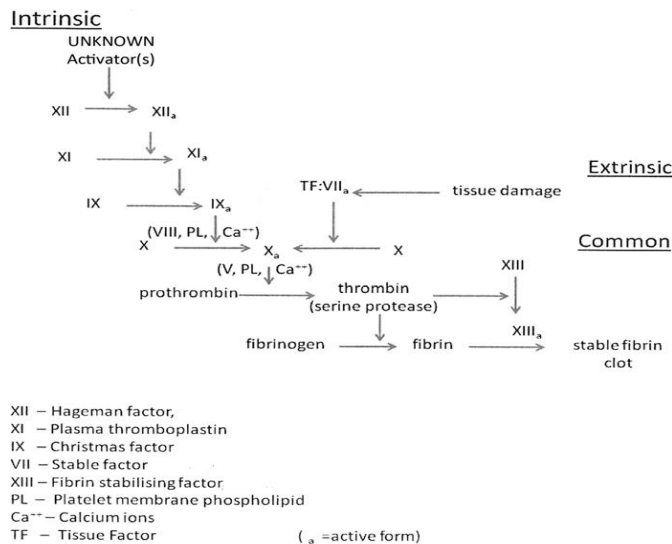
Η πήξη του αίματος παραδοσιακά περιγράφεται σε δύο φάσεις στην πρωτογενή και δευτερογενή αιμόσταση. Τα αιμοπετάλια, πρωτογενώς, συσσωματώνονται και σχηματίζουν το αρχικό βύσμα αιμοπεταλίων και ακολουθεί η ενεργοποίηση του συστήματος πήξης και τον σχηματισμό του θρόμβου ινώδους. Όπως έχει αναφερθεί το ενδοθήλιο του τοιχώματος των αγγείων παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όσο και στο σύστημα πήξης. Για αυτό τον λόγο, τα μοντέλα που περιγράφουν τη δευτερογενή αιμόσταση έχουν εξελιχθεί (5).

Τα σύγχρονα μοντέλα, που περιγράφουν την αιμόσταση, τα οποία αναλύονται παρακάτω, είναι τα εξής:

1. Μοντέλο του Καταρράκτη της Πήξης
2. Κυτταρικό Μοντέλο της Αιμόστασης

1.2.1 Μοντέλο του Καταρράκτη:

Το παραδοσιακό μοντέλο περιγραφής της αιμόστασης είναι το μοντέλο του καταρράκτη της πήξης. Αυτό περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1964 από τους Favie και Ratnoff ως δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις που συγκλίνουν σε μία κοινή οδό με την ενεργοποίηση του παράγοντα X (10). Ο **καταρράκτης πήξης ή εξαρτώμενος από Ca^{2+} καταρράκτης πήξης** ξεκινά από την ενεργοποίηση της ενδογενούς ή εξωγενούς οδό που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της θρομβίνης και του ινώδους (5). Το πλεονέκτημα αυτό του μοντέλου, το οποίο απεικονίζεται στην Εικόνα 1 είναι η περιγραφή της αλληλοεπίδρασης των παραγόντων πήξης (10). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το γράμμα a δίπλα στον λατινικό αριθμό του παράγοντα πήξης συμβολίζει την ενεργοποιημένη μορφή του.



Εικόνα 1: Περιγραφή του καταρράκτη Πήξης (11)

Τα βασικά βήματα του καταρράκτη της πήξης πιστευόταν ότι προερχόταν από την ενδογενή οδό, η οποία ονομάστηκε έτσι επειδή τα απαραίτητα συστατικά της εντοπίζονται στο αίμα. Το μοντέλο αυτό εξελίχθηκε για να περιγράψει η εξωτερική οδός της πήξης και η δράση του **ιστικού παράγοντα** (TF). Τέλος, πρόσφατες τροποποιήσεις του μοντέλου περιλαμβάνουν την κοινή οδό της πήξης με την δράση του παράγοντα X και την ανακάλυψη ότι οι παράγοντες V και VIII δρουν ως συμπαράγοντες παρά ως ένζυμα (11).

Στο παραδοσιακό μοντέλο του καταρράκτη της πήξης απεικονίζει τα δύο ανεξάρτητα μονοπάτια, την ενδογενή και εξωγενή οδό, τα οποία ενώνονται στην κοινή οδό. Η κοινή οδός ή το μονοπάτι του παράγοντα Xa παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό της θρομβίνης και τελικά του ινώδους (11). Μόλις ενεργοποιηθεί ο καταρράκτης της πήξης παράγεται η θρομβίνη άμεσα, η οποία ενισχύεται από την ενεργοποίηση των συμπαραγόντων FV και FVIII. Ο παράγοντας V, όπως και οι περισσότεροι παράγοντες πήξης προέρχονται από τα ηπατοκύτταρα, ενώ η προέλευση του παράγοντα VIII δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα (5).

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, με την έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF) συμβάλλουν στην παραγωγή της θρομβίνης. Η παραγωγή της στο κλασικό μοντέλο της πήξης ξεκινά με την ενεργοποίηση της εξωγενούς οδού, που ενεργοποιείται ο παράγοντας VII σε VIIa. Επίσης μπορεί να ενεργοποιηθεί από την ενδογενή οδό από την ενεργοποίηση του παράγοντα XII σε XIIa (5).

Η **εξωγενής οδός** ενεργοποιείται όταν συνδεθεί ο παράγοντας VII, που βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος με τον ιστικό παράγοντα (TF). Ο ιστικός παράγοντας, που είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τα αιμοφόρα αγγεία (6). Η έκφραση του μπορεί επίσης να προκληθεί και από προσκολλημένα λευκοκύτταρα, τα οποία εκφράζουν TF ως απάντηση σε αγγειακό τραυματισμό ή σε φλεγμονώδη ερεθίσματα (5). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα VII σε VIIa. Το σύμπλεγμα TF-VIIa σε συνδυασμό με τα φωσφολιπίδια των τραυματισμένων αγγείων και το ασβέστιο, ενεργοποιεί τον παράγοντα X. Στην συνέχεια ο Xa μαζί με τον παράγοντα V, δημιουργεί το σύμπλεγμα

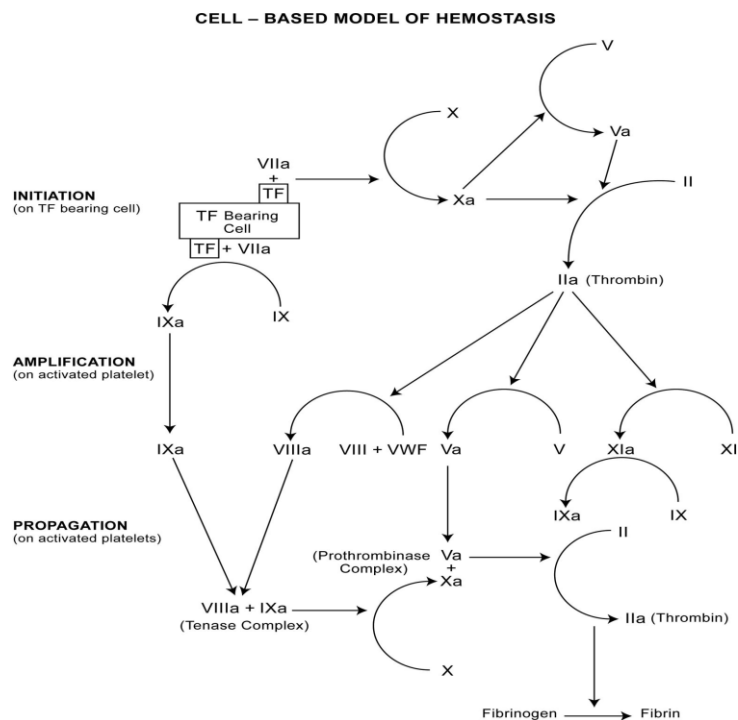
ενεργοποίησης της προθρομβίνης, το οποίο θα διασπάσει την προθρομβίνη και θα σχηματίσει τη **θρομβίνη (10)**.

Η **ενδογενής οδός** ενεργοποιείται όταν το σύμπλεγμα των παραγόντων XII και XI και προκαλλικρεΐνης ενώνεται και δημιουργεί το **σύστημα επαφής**. Αυτό αποτελεί τους άγνωστους εκκινητές της ενδογενής οδού που απεικονίζονται στην Εικόνα 1 (6). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παράγοντας XII που εντοπίζεται στην κυκλοφορία του αίματος έλθει σε επαφή με το κατεστραμμένο ενδοθήλιο του τραυματισμένου αιμοφόρου αγγείου. Με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται ο παράγοντας XII σε XIIa και απελευθερώνονται τα φωσφολιπίδια της επιφάνειας των αιμοπεταλίων (10), αλλά και μετατρέπεται η προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη (6). Στην συνέχεια ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIIa μετατρέπει τον παράγοντα XI στην ενεργοποιημένη μορφή του Xia, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τον παράγοντα IX (6). Ο ενεργοποιημένος IXa μαζί με ασβέστιο, τα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων και τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIIIa ενεργοποιούν τον παράγοντα X (10). Στην συνέχεια ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xa μαζί με το ασβέστιο τον παράγοντα V και τα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων δημιουργεί το σύμπλεγμα ενεργοποίησης της προθρομβίνης (παράγοντας II) και διασπάται για να σχηματιστεί τελικά η **θρομβίνη** (ενεργοποιημένος παράγοντας IIa) (11).

Κατά την **κοινή οδό** του καταρράκτη της πήξης, οι μικρές ποσότητες του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa είναι επαρκείς για τη διάσπαση της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Επίσης, η θρομβίνη ενεργοποιεί τους παράγοντες V και VIII διατηρώντας τη συνεχιζόμενη ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης (6). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xa μαζί με τον παράγοντα Va, τα ιόντα ασβεστίου και τα φωσφολιπίδια της επιφάνειας των αιμοπεταλίων δημιουργούν το σύμπλεγμα προθρομβινάσης, το οποίο μετατρέπουν την προθρομβίνη (παράγοντας II) σε η θρομβίνη (ενεργοποιημένος παράγοντας IIa) (11). Η θρομβίνη διασπά το διαλυτό ινωδογόνο για να δημιουργήσει ένα θρόμβο φιβρίνης. Τα μονομερή φιβρίνης ενώνονται με τον παράγοντα XIII και με ασβέστιο για τον σχηματισμό του **θρόμβου ινώδους (6)**.

1.2.2 Κυτταρικό Μοντέλο Αιμόστασης:

Η συνεχής μελέτη του συστήματος πήξης έχει οδηγήσει στην εξέλιξη του μοντέλου του καταρράκτη της πήξης. Το μειονέκτημα του καταρράκτη της πήξης είναι ότι δεν περιγράφει την αλληλεπίδραση των διαφορετικών πρωτεϊνών της αιμόστασης και των κυττάρων που εμπλέκονται στην αιμόσταση με το σύστημα πήξης (10). Για τον λόγο αυτό, το 2003 διατυπώθηκε το **κυτταρικό μοντέλο της πήξης** (cell-based model of coagulation), όπου τα κύτταρα που συμμετέχουν στην αιμόσταση θεωρούνται βασικά στοιχεία στην διαδικασία σχηματισμού θρόμβου (10). Το περίπλοκο αυτό μοντέλο το οποίο απεικονίζεται και στην Εικόνα 2 μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την **έναρξη (initiation)**, την **ενίσχυση (amplification)** και τη **διάδοση (propagation)** (5).



Εικόνα 2: Κυτταρικό Μοντέλο Αιμόστασης (12)

Μετά από την ενδελεχή έρευνα της αιμόστασης, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ενδογενής οδός της πήξης δεν έχει πραγματικό φυσιολογικό ρόλο στην αιμόσταση. Αυτό γίνεται καθώς αποδείχθηκε ότι το σύμπλεγμα TF-FVIII, που αποτελεί τον εκκινητή της εξωγενής οδού, μπορεί να ενεργοποιήσει τον παράγοντα IX της ενδογενούς οδού. Μία ακόμα σημαντική ανακάλυψη ήταν ότι η θρομβίνη, δηλαδή ο ενεργοποιημένος παράγοντας IIa αποτελεί φυσιολογικό ενεργοποιητή του παράγοντα XI, παρακάμπτοντας το σύστημα επαφής του κλασσικού μοντέλου του καταρράκτη της πήξης. Επομένως, ο παράγοντας XII, η προκαλλικρεΐνη, και το υψηλού μοριακού βάρους κιννογόνο δεν έχουν κάποιο ρόλο στην φυσιολογία της αιμόστασης. Για αυτό τον λόγο προτάθηκε το κυτταρικό μοντέλο της αιμόστασης (12).

1.2.2.1 Φάση Έναρξης (Initiation):

Η φάση της **έναρξης** σύμφωνα με το κυτταρικό μοντέλο της αιμόστασης ξεκινά με τον αγγειακό τραυματισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου του αγγείου, που αποτελείται από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά και υποενδοθηλιακά κύτταρα. Το υποενδοθηλιακό κολλαγόνο εκτίθεται στο αίμα και έχει σημαντικό ρόλο στην αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του κολλαγόνου μέσω του παράγοντα **von Willebrand (vWF)** (5). Η συσσώματωση των PLTs θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβίνης (13). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στην επιφάνεια ενός ενεργοποιημένου ενδοθηλιακού κυττάρου (14). Παράλληλα με την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τον **ιστικό παράγοντα (Tissue Factor, TF)**, ο οποίος συνδέεται με τον παράγοντα VII και δρουν ως συμπαράγοντες (5). Ο ιστικός παράγοντας ονομάζεται και

θρομβοπλαστική ή παράγοντας III (11). Μόλις συνδεθεί ο TF με τον παράγοντα VII, αυτός ενεργοποιείται και σχηματίζεται το σύμπλοκο **TF/VIIa** (12).

Το σύμπλοκο TF/VIIa διασπά πρωτεολυτικά τον παράγοντα IX και X, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Οι ενεργοποιημένοι παράγοντες IXa και Xa συμμετέχουν στην δημιουργία θρομβίνης (5). Ο παράγοντας Xa μπορεί να ενεργοποιήσει στον παράγοντα V. Όμως, αν αποκολληθεί από την κυτταρική επιφάνεια ο παράγοντας Xa αδρανοποιείται από την δράση της αντιθρομβίνης III και του αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντας (TFPI). Ο παράγοντας Va και Xa μετατρέπουν μικρή ποσότητα προθρομβίνης σε θρομβίνη (12). Επιπλέον, το σύμπλοκο TF/VIIa ενεργοποιεί την φάση ενίσχυσης του κυτταρικού μοντέλου, όπου κρίσιμο ρόλο έχει το αιμοπεταλιακό φωσφολιπίδιο 3 (PF3) (13). Η διάρκεια της φάσης έναρξης και του σχηματισμού του αρχικού συμπλόκου TF/VIIa επηρεάζεται από την συγκέντρωση του ιστικού παράγοντα και ο φυσικός αναστολέας της είναι ο αναστολέας της οδού του TF (TFPI) (15).

1.2.2.2 Φάση Ενίσχυσης (Amplification):

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο πραγματοποιείται χάρη στον υποδοχέα κολλαγόνου των αιμοπεταλίων, τις γλυκοπρωτεΐνες Ia/IIa και τον παράγοντα von Willebrand (vWF) (12). Η μικρή ποσότητα θρομβίνης που παράγεται κατά την φάση έναρξης ενεργοποιεί τους παράγοντες V, VIII και XI (5). Η παραγωγή θρομβίνης διεγείρει την παραγωγή το αιμοπεταλιακό φωσφολιπίδιο 3 (PF3), αλλά η αντίδραση αυτή καθοδηγείται από τον παράγοντα IX. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν από τα κοκκία τους παράγοντα V, οποίος ενεργοποιείται είτε από την θρομβίνη είτε από τον ενεργοποιημένο παράγοντα Xa (12). Επίσης, ο παράγοντας vWF διασπάται από την θρομβίνη και απελευθερώνεται ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIIIa (11). Με αυτό τον τρόπο, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν στην επιφάνειά τους τους ενεργοποιημένους παράγοντες Va, VIIIa, και XIa (12). Παρουσία του παράγοντα VIII και ιόντων ασβεστίου ενεργοποιείται ο παράγοντας Xa με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί την προθρομβίνη παρουσία του παράγοντα Va και ιόντων ασβεστίου. Το αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων είναι η παραγωγή της **θρομβίνης** (13).

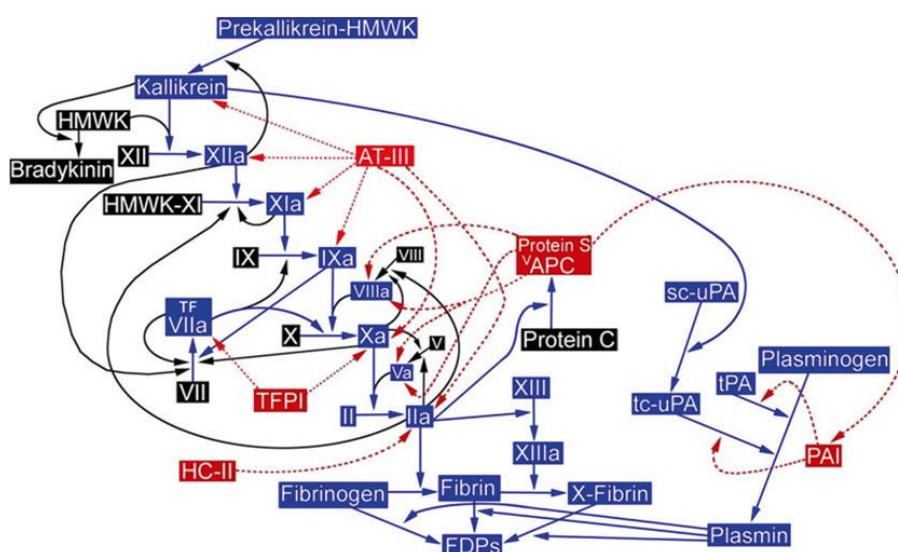
1.2.2.3 Φάση Διάδοσης (Propagation):

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η φάση της έναρξης επιτυγχάνεται από την ενεργοποίηση των παραγόντων X και IX και των συμπαραγόντων V και VIII. Στην συνέχεια, ο ενεργοποιημένος παράγοντας IXa συνδέεται με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIIIa στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου και σχηματίζουν το **σύμπλοκο τενάσης** (5). Παρουσία ιόντων ασβεστίου, το σύμπλοκο τενάσης ενεργοποιεί τον παράγοντα X, ο οποίος με την σειρά του θα ενεργοποιήσει τον σύμπλοκο προθρομβινάσης, που αποτελείται από ιόντα ασβεστίου, και τους ενεργοποιημένους παράγοντες Va και Xa (11). Το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιώντας την **προθρομβίνη**, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή **θρομβίνης**, η οποία μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε ινώδες και την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII, που αποτελεί σταθεροποιητή του αιμοστατικού θρόμβου ινώδους (12). Ο σταθερός αυτός θρόμβος σταματά την

αιμορραγία στο σημείο του αγγειακού τραυματισμού (10). Μόλις σχηματιστεί και σφραγιστεί η θέση του τραυματισμού, η διαδικασία της πήξης αναστέλλεται από τους φυσικούς αναστολείς της αιμόστασης, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω (11).

1.3 Φυσικοί Αναστολείς της Αιμόστασης:

Η αιμόσταση αποτελεί μία ισχυρή και αποτελεσματική διαδικασία, και για αυτό απαιτείται η αυστηρή ρύθμιση του συστήματος για την αποφυγή άσκοπου σχηματισμού θρόμβου. Οποιαδήποτε διαταραχή των οδών ρύθμισης της αιμόστασης μπορεί να προκαλέσει θρόμβωση (5). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα του συστήματος πήξης, δηλαδή οι παράγοντες πήξης με εξαίρεση τον παράγοντα XIII, είναι πρωτεάσες σερίνης (16). Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω κυκλοφορούν σε ανενεργή μορφή και ενεργοποιούνται μέσω της διάσπασης ενός τμήματος του μορίου τους, το οποίο εκτίθεται στην ενεργή σερίνη (16). Για την ρύθμιση του συστήματος πήξης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν αναστολείς πρωτεασών σερίνης, δηλαδή τα φυσικά αντιπηκτικά (2). Οι σημαντικότεροι φυσικοί αναστολείς της πήξης είναι η **αντιθρομβίνη (AT)**, η **πρωτεΐνη C (PrC)** και **S (PrS)**, ο **αναστολέας C1**, η **α2-μακροσφαιρίνη**, η **αι-αντιθρυψίνη** και ο **αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI)** (16). Η δράση των φυσικών αναστολέων απεικονίζεται στην Εικόνα 3 και αναλύεται παρακάτω



Εικόνα 3 Δράση Φυσικών Αναστολέων Αιμόστασης (6)

Οι φυσικοί αναστολείς της πήξης μπορούν να αναστείλουν τις πρωτεάσες σερίνης είτε με άμεση αναστολή της πρωτεάσης ή μέσω αποικοδόμησης του παράγοντα πήξης. Η αντιθρομβίνη III (AT), ο αναστολέας C1 και ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI) συνδέονται στην ενεργή θέση των πρωτεασών αποτρέποντας την να ενεργοποιηθεί. Επίσης, οι παράγοντες πήξης μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω της ενεργοποίησης της οδού πρωτεΐνης C και S, καθώς ενεργοποιείται η μεταλλοπρωτεΐνη ADAMTS'13 ή ο ιστικός ενεργοποιητής t-PA (5).

Πιο αναλυτικά, η **αντιθρομβίνη (AT)** είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ (16) και αποτελεί συμπάργοντα ηπαρίνης και αναστολέα

πρωτεάσης σερίνης (17). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διαφορετικές δραστηριότητες της αντιθρομβίνης στο πλάσμα κάτι που οδήγησε στην ταξινόμηση της σε τάξεις I έως IV. Όμως έχει αποδειχθεί ότι όλες τις διαφορετικές λειτουργίες τις επιτελούσε μόνο η αντιθρομβίνη III. Η αντιθρομβίνη αναστέλλει πρωταρχικός τον ενεργοποιημένο παράγοντα Xa και την θρομβίνη και δευτερογενώς μπορεί και αναστέλλει τους ενεργοποιημένους παράγοντες IXa, XIa, XIIa, και την καλλικρεΐνη και την πλασμίνη (17) (18). Τέλος, η δράση της αντιθρομβίνης είναι αργή αλλά ενισχύεται με την παρουσία στο πλάσμα ηπαρίνης (16)

Η **πρωτεΐνη S** και **C** είναι βιταμιο-K εξαρτώμενες γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από το ήπαρ (19) (20). Περίπου το 60-70% της PrS βρίσκεται συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη δέσμευσης C4, και η ελεύθερη PrS λειτουργεί ως συμπαράγοντας της PrC και ενισχύει την δραστηριότητα της **ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (Active Protein C, APC)** (20). Επίσης, η PrC συνδέεται με τον υποδοχέα της πρωτεΐνης C (EPCR) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιείται παρουσία θρομβίνης και θρομβομοντουλίνης (TM) (21). Πιο συγκεκριμένα, η θρομβομοντουλίνη μετατρέπει την θρομβίνη σε αντιπηκτικό ένζυμο με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PrC (22). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) μαζί με τον συμπαράγοντα της, την PrS απενεργοποιούν τον ενεργοποιημένο παράγοντα Va και VIIIa.

Ένας ακόμη σημαντικός φυσικός ανασταλτής της αιμόστασης είναι ο **αναστολέας C1**, που αποτελεί πρωτεάση του πλάσματος και αναστέλλει την δράση της καλλικρεΐνης, της πλασμίνης και των ενεργοποιημένων παραγόντων XIa και XIIa. Επίσης, η α₂-μακροσφαιρίνη δρα ως φυσικό αντιπηκτικό και αναστέλλει την πλασμίνη, την θρομβίνη και την καλλικρεΐνη. Αποτελεί σημαντικό αναστολέα της αιμόστασης, καθώς η καλλικρεΐνη αποτελεί ενεργοποιητή του παράγοντα XII μέσω του συστήματος επαφής όπως αναφέρεται παραπάνω (16).

1.4 Ινωδόλυση:

Το τελικό στάδιο της αιμόστασης αποτελεί η **ινωδόλυση**, δηλαδή η διαδικασία λύσης του θρόμβου που έχει σχηματιστεί από το ελεύθερο ινωδογόνο, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (23). Ο θρόμβος που σχηματίζεται αποτελείται από ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια, τα οποία δεσμεύονται με πολυμερή ινώδους και προσκολλώνται στην υπενδοθηλιακή επιφάνεια. Για την σταθεροποίηση του θρόμβου ενεργοποιείται ο παράγοντας XIII, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την διαδικασία αυτή (13). Την ίδια στιγμή που έχει σχηματιστεί ο θρόμβος, έχει ήδη ξεκινήσει η διαδικασία της ινωδόλυσης (13).

Η ινωδόλυση περιλαμβάνει την μετατροπή του **πλασμινογόνου** σε **πλασμίνη**. Το πλασμινογόνο είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται με το ινώδες για τον σχηματισμό του θρόμβου (11) και παράγεται στο ήπαρ (24). Το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε ενεργή μορφή, την πλασμίνη παρουσία ινωδολυτικών ενεργοποιητών, όπως ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA), που προέρχεται από το ενδοθήλιο (13). Επίσης, η μετατροπή αυτή μπορεί να προκληθεί και από τον ενεργοποιημένο παράγοντα XIIa και την καλλικρεΐνη (24). Άλλος ένας ενεργοποιητής του πλασμινογόνου είναι η **ουροκινάση**, η οποία παράγεται από τα κύτταρα του

ουροποιητικού συστήματος και κύριος ρόλος της είναι να αποτρέπει τον σχηματισμό θρόμβου (24).

Στην συνέχεια, η πλασμίνη αφού ενεργοποιηθεί θα αποικοδομήσει το πολυμερισμένο ινώδες και το ινωδογόνο και θα απενεργοποιήσει τους παράγοντες V και VIII (23). Τα προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους προκύπτουν από την διάσπαση του ινώδους και του ινωδογόνου και τα θραύσματά τους είναι παρόμοια (24). Τα διασταυρούμενα μόρια ινώδους έχουν σχηματιστεί από την δράση του ενεργοποιημένου **παράγοντα XIIIa** και αποικοδομούνται σχηματίζοντας τα D-Dimers. Τα D-Dimers αποτελούν σημαντικό βιοδείκτη της διάσπασης ενός θρόμβου ινώδους (11). Αφού σχηματιστούν τα θραύσματα ινώδους και διαλυθεί ο θρόμβος, η τελική επίλυση του αγγειακού τραυματισμού επιτυγχάνεται από τους ινοβλάστες. Αυτοί, μεταναστεύουν στην περιοχή του τραύματος και παράγουν κολλαγόνο για την αποκατάσταση του (24).

Η αναστολή της ινωδόλυσης πραγματοποιείται με την δράση παραγόντων που αναστέλλουν την πλασμίνη και με την δράση παραγόντων που αναστέλλουν την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου. Ένας σημαντικός αναστολέας της ινωδόλυσης, αποτελεί η α_2 -αντιπλασμίνη, μία γλυκοκοπρωτεΐνη που δρα άμεσα με την πλασμίνη (23). Η πλασμίνη απενεργοποιείται άμεσα, καθώς σχηματίζονται σύμπλοκα με την α_2 -αντιπλασμίνη και την α_2 -μακροσφαιρίνη (24). Τέλος, ένας αναστολέας του πλασμινογόνου είναι ο **αναστολέας ενεργοποίησης πλασμινογόνου 1 (Plasminogen Acticator Inhibitor 1, PAI-1)** που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια (23).

2. Αιμορροφιλία Α:

Η **αιμορροφιλία Α** αποτελεί φυλοσύνδετη κληρονομική αιμορραγική διάθεση, που οφείλεται σε ανεπάρκεια του **παράγοντα VIII**. Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του παράγοντα VIII, το οποίο αποτελείται από 26 εξόνια με μήκος 180 kbp, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X στο μακρύ σκέλος του στην περιοχή q28 (25). Η αιμορροφιλία Α κληρονομείται με φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τύπο κληρονόμησης και για αυτό τον λόγο, η πλειονότητα των ασθενών είναι άνδρες (26). Συνήθως, οι γυναίκες είναι φορείς του μεταλλαγμένου γονιδίου και μπορούν να παρουσιάσουν μειωμένα επίπεδα FVIII, το οποίο σχετίζεται με ήπια συμπτώματα. Όμως, σε ετερόζυγες γυναίκες αν αδρανοποιηθεί το χρωμόσωμα X με το φυσιολογικό γονίδιο κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, μπορούν να εμφανίσουν αιμορροφιλία Α (27).

Η αιμορροφιλία Α όπως και η αιμορροφιλία Β είναι συγγενείς κληρονομικές διαταραχές της αιμόστασης, που οφείλονται σε ανεπάρκεια του παράγοντα VIII και IX αντίστοιχα. Η ανεπάρκεια του παράγοντα XI στο παρελθόν είχε οριστεί ως αιμορροφιλία C, όπως σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία μόνο η αιμορροφιλία Α και Β ορίζονται ως αιμορροφιλίες και οι άλλες ανεπάρκειες παραγόντων πήξης ορίζονται ως σπάνιες αιμορραγικές διαταραχές (27).

Στην παρούσα εργασία θα αναλυθεί η αιμορροφιλία Α. Σύμφωνα με τα παραπάνω, φυσιολογικά ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIIIa λειτουργεί ως συμπάροντας σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με τον ενεργοποιημένο παράγοντα IXa στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Λόγω του σχηματισμού αυτού, επιταχύνεται ο ρυθμός ενεργοποίησης του παράγοντα X. Σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α, λόγω της ανεπάρκειας του παράγοντα VIII, η παραγωγή θρομβίνης και κατ' επέκταση ο σχηματισμός θρόμβου μειώνεται δραστικά, το οποίο οδηγεί σε αιμορραγία (1). Επιπλέον, επειδή ο παράγοντας VIII συνδέεται με τον παράγοντα von Willebrand (vWF), τα επίπεδα του FVIII επηρεάζονται από την σύνδεση αυτή. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να γίνει η διαφοροδιάγνωση της αιμορροφιλίας Α από την νόσο von Willebrand (25).

Η δραστικότητα του παράγοντα VIII στο πλάσμα συσχετίζεται με την κλινική σοβαρότητα της νόσου. Αυτό επιτρέπει την ταξινόμηση των ασθενών σε πρώιμη παιδική ηλικία στις εξής κατηγορίες: σε **σοβαρής βαρύτητας** αιμορροφιλία Α, όπου τα επίπεδα του παράγοντα VIII είναι $\leq 1\%$, **μέτριας βαρύτητας** με επίπεδα παράγοντα **1-5%** και **ήπιας βαρύτητας** με επίπεδα παράγοντα **5-40%** (27). Σε ασθενείς με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία Α εμφανίζεται συχνές, δηλαδή αρκετές φορές το μήνα, και αυτόματες αιμορραγίες ειδικά σε αρθρώσεις και μύες που φέρουν βάρος. Αυτοί ασθενείς αποτελούν τους μισούς ασθενείς με αιμορροφιλία Α και απαιτούν μακροχρόνια και προφυλακτική χορήγηση του παράγοντα VIII. Η επαναλαμβανόμενη αιμορραγία σε συνδυασμό με ανεπαρκή θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή διαταραχή του μυοσκελετικού συστήματος και σε αιμοφιλική αρθροπάθεια, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω (25). Σπάνια, παρατηρούνται αιμορραγίες που είναι απειλητικές για την ζωή, όπως για παράδειγμα η ενδοκρανιακή αιμορραγία ή οι αιμορραγίες σε

εσωτερικά όργανα. Σε ήπιας βαρύτητα αιμορροφιλία, οι αιμορραγίες προκύπτουν έπειτα από κάποιον τραυματισμό ή κάποια χειρουργική επέμβαση (27), (26).

Το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με αιμορροφιλία A μέχρι την δεκαετία του 1960 ήταν περίπου τα 30 έτη. Όμως, λόγω της μελέτης της διαταραχής και της ανάπτυξης αποτελεσματικής θεραπείας, η οποία βασίζεται σε προφυλακτική αντικατάσταση του παράγοντα VIII, οι ασθενείς με αιμορροφιλία σήμερα διαθέτουν ένα φυσιολογικό προσδόκιμο ζωής και ποιότητα ζωής. Η θεραπεία των ασθενών αυτών, έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της χρήσης αποτελεσματικών και ασφαλών σκευασμάτων παραγόντων πήξης. Αυτό βοήθησε στην μείωση της μετάδοσης με το αίμα λοιμογόνων παραγόντων, όπως η ηπατίτιδα C και ο ιός HIV (27).

Υπάρχει, επίσης, αυξημένος κίνδυνος σε ασθενείς με αιμορροφιλία A να αναπτύξουν αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII. Περίπου το 10-35% των ασθενών με σοβαρή αιμορροφιλία A εμφανίζουν **αναστολέα** (25). Ο αναστολέας αυτός εμφανίζεται κυρίως κατά την παιδική ηλικία στις πρώτες 25 μέρες από την έναρξη της θεραπείας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η θεραπεία υποκατάστασης του παράγοντα να αποτελεί σημαντική απειλή για τους ασθενείς αυτούς. Για αυτό, έχουν αναπτυχθεί νέες θεραπείες με τροποποιημένο παράγοντα VIII, ο οποίος έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (27).

Για την κλινική διάγνωση και ταξινόμηση της αιμορροφιλία απαιτείται ο προσδιορισμός της δραστηρότητας του παράγοντα VIII στο πλάσμα. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων του παράγοντα VIII χρησιμοποιείται είτε η **δοκιμασία ενός σταδίου**, είτε η **δοκιμασία δύο σταδίων** είτε η **χρωμογονική δοκιμασία**. Οι νέες μέθοδοι που βασίζονται στην δημιουργία της θρομβίνης παρέχουν την δυνατότητα της εργαστηριακής παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας υποκατάστασης (25).

2.1 Ιστορική Αναδρομή:

Η ιστορία της αιμορροφιλίας χρονολογείται από τον 2^ο αιώνα μ.Χ., ενώ οι πρώτες «σύγχρονες» περιγραφές της νόσου έγινε περίπου τον 19^ο αιώνα (28). Τα κύρια χαρακτηριστικά της αιμορροφιλίας, δηλαδή η αιμορραγία σε αρσενικά άτομα και η κληρονόμηση της αιμορραγικής αυτής διάθεσης από μητέρα σε αρσενικό απόγονο ανάγεται στον 2^ο αιώνα μ.Χ. Εκείνη την εποχή σύμφωνα με τον ραβινικό κανόνα επέτρεπε την απαλλαγή από την περιτομή για τους άνδρες, στους οποίους δύο αδέρφια τους είχαν πεθάνει (29). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η πρώτη σύγχρονη περιγραφή της αιμορροφιλίας πραγματοποιήθηκε το 1803 από τον Αμερικανό ιατρό Dr John Conrad Otto. Περιέγραψε μία αιμορραγική κληρονομική διαταραχή που εμφανίζεται σε πολλές οικογένειες μόνο στους αρσενικούς απογόνους, τους οποίους καλούσε «αιμοφιλικούς» (28). Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά του όρου «αιμοφιλία» έγινε το 1828 από τον Johann Lukas Schönlein και Friedrich Hopff, ο οποίος μελέτησε στην διατριβή του την αιμορραγική αυτή διάθεση (28) (29). Όπως αναλύθηκε ύστερα, ο όρος «αιμοφιλία» στην πραγματικότητα σημαίνει συγγένεια με το αίμα, το οποίο αν και

αναφέρεται από τον Horff, ο Schönlein ήταν υπέρ του όρου «αιμορροφιλία» που σημαίνει τάση για αιμορραγία (28).

Στις πρώτες μελέτες που περιεγράφηκε η γενετική της αιμορροφιλίας αναφερόταν ότι μεταδιδόταν από φυσιολογικές μητέρες στους αρσενικούς απογόνους. Για αυτό τον λόγο η αιμορροφιλία αποκαλείται και «η ασθένεια των βασιλιάδων» ή «η βασιλική ασθένεια», καθώς αρκετά μέλη των ευρωπαϊκών βασιλικών οικογενειών εμφάνισαν αιμορροφιλία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Βασίλισσα Βικτωρία της Αγγλίας, η οποία ήταν φορέας της αιμορροφιλίας και ο γιός εμφάνιζε συχνές αιμορραγίες και τελικά πέθανε σε ηλικία 31 ετών από εγκεφαλικό αιμορραγικό επεισόδιο. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η «βασιλική ασθένεια» ήταν στην πραγματικότητα η αιμορροφιλία Β (28).

Η διαταραχή της πήξης που σχετίζεται με την αιμορροφιλία πιστευόταν ότι ήταν αποτέλεσμα της ανεπάρκειας ασβεστίου. Η υπόθεση αυτή διαψεύστηκε το 1908 από τους Morawitz και Lossen, οι οποίοι πρότειναν ότι οφειλόταν σε ανεπάρκεια της θρομβοκινάσης. Λίγα χρόνια αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η ουσία που είναι σε θέση να μειώσει τον χρόνο πήξης του πλάσματος αιμορροφιλικών ασθενών ήταν μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στην πήξη του αίματος. Αυτό αποδείχθηκε το 1936 από τους Patek και Taylor, οι οποίοι εντόπισαν μια ουσία, στο καθαρό από αιμοπετάλια πλάσμα των αιμορροφιλικών ασθενών, η οποία μειώνει αποτελεσματικά τον χρόνο πήξης του αίματος τους. Η ουσία αυτή, αποτελούσε μία σφαιρίνη και ονομάστηκε «αντιαιμοφιλική σφαιρίνη» (Antihæmophilic Globulin, AHG) (28).

Στην συνέχεια, αποδείχθηκε ότι ο ανεπαρκής παράγοντας στην αιμορροφιλία δεν ήταν η προθρομβίνη, αλλά ήταν κάποιο παράγωγό της. Αυτό έγινε από την ανάπτυξη της δοκιμής του χρόνου προθρομβίνης ενός σταδίου από τον Quick του 1935, ο οποίος απέδειξε ότι ο χρόνος προθρομβίνης (Prothombin Time, PT) στο πλάσμα των αιμορροφιλικών ασθενών ήταν φυσιολογικό. Επίσης, το 1939 ο Brinkhous απέδειξε ότι η περιεκτικότητα σε προθρομβίνη του πλάσματος τους ήταν επίσης φυσιολογικός αλλά ο ρυθμός μετατροπής της προθρομβίνης ήταν παρατεταμένος. Το 1947 οι Quick και Brinkhous, απέδειξαν ότι η ανεπάρκεια στην αντιαιμοφιλική σφαιρίνη (AHG) προκαλούσε διαταραχή στην πήξη του αίματος και παράταση του χρόνου δημιουργίας θρομβοπλαστίνη (28).

Το 1952 οι Macfarlane και Biggs ανακάλυψαν ότι ο παράγοντας IX είναι υπεύθυνος για την αιμορροφιλία Β και το 1973, ο Arthur Bloom όρισε ότι η ανεπάρκεια του παράγοντα VIII είναι υπεύθυνη για την αιμορροφιλία Α και του παράγοντα vWF για την νόσο von Willebrand. Η μελέτη του παράγοντα VIII, αλλά και της γενετικής υπόστασης της αιμορροφιλίας και της ανάπτυξης των μοριακών τεχνικών οδήγησε το 1982 στην κλωνοποίηση του γονιδίου του παράγοντα VIII (30). Για να συμβεί αυτό είχε προηγουμένως αποδειχθεί ο φυλοσύνδετος τρόπος κληρονομής της αιμορροφιλίας Α και Β (28).

Μέχρι την δεκαετία του 1970 έγινε ξεκάθαρη η διάκριση μεταξύ των δύο αιμορραγικών διαταραχών και της νόσου von Willebrand. Αποδείχθηκε, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ότι η ανεπάρκεια στον παράγοντα πήξης VIII ονομάζεται αιμορροφιλία Α και ότι ο παράγοντας von Willebrand (vWF) ήταν ένας ξεχωριστός παράγοντας πήξης που συνδέεται με τον παράγοντα VIII. Για αυτό τον λόγο προτάθηκε

ότι οι ασθενείς με νόσο von Willebrand θα πρέπει να λαμβάνουν θεραπεία με παράγοντα vWF και σκευάσματα παρόμοια με εκείνα που λαμβάνουν οι ασθενείς με αιμορροφιλία A (28).

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1960, οι ασθενείς με αιμορροφιλία είχαν χαμηλό προσδόκιμο ζωής και ποιότητα ζωής. Αυτό συνέβαινε, γιατί η σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία ήταν απειλητική για την ζωή καθώς οι ασθενείς εμφάνιζαν αιμοφιλική αρθροπάθεια και παρουσίαζαν θανατηφόρες αιμορραγίες, όπως ενδοκρανιακές αιμορραγίες. Η θεραπεία της αιμορροφιλίας τότε ήταν η ενδοφλέβια αντικατάσταση του παράγοντα που βρισκόταν σε ανεπάρκεια (31). Το 1964, σημειώθηκε σημαντική βελτίωση στη θεραπεία της αιμορροφιλία επειδή η Judith Pool ανακάλυψε ότι στο κρυοκαθίζημα του ασκού πλάσματος περιεχόντουσαν μεγάλες ποσότητες παράγοντα VIII (32). Το κρυοκαθίζημα και τα πρώιμα συμπωκνώματα του παράγοντα βοήθησαν στον έλεγχο των απειλητικών για την ζωή αιμορραγιών (32). Τόσο το κρυοκαθίζημα όσο τα σκευάσματα χαμηλής καθαρότητας παράγοντα ήταν κατάλληλα μόνο για αργή ενδοφλέβια έγχυση και συχνά προκαλούσε αλλεργικές αντιδράσεις (32).

Όλα άλλαξαν την δεκαετία του 1970 όπου κυκλοφόρησαν τα πρώτα σκευάσματα λυοφιλοποιημένου παράγοντα ενδιάμεσης καθαρότητας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, το προσδόκιμο ζωής και η ποιότητα ζωής των ασθενών με αιμορροφιλία να βελτιωθεί καθώς υπήρχε η δυνατότητα για θεραπεία στο σπίτι (32). Παρόλα αυτά πολλοί ερευνητές και κλινικοί ιατροί ανησυχούσαν για την ασφάλεια της χρήσης των σκευασμάτων, γιατί είχαν αναφερθεί πολλά περιστατικά μετάδοσης με τα συσκευάσματα αυτά ιών μεταδιδόμενων με τα αίμα, όπως του ιού του HIV και του ιού της ηπατίτιδας B και C. Όμως με την παστερίωση και την χρήση τεχνικών απενεργοποίησης των ιών μπορούν πλέον να χορηγούνται τα συσκευάσματα του παράγοντα με ασφάλεια (31). Επιπλέον, το 1977 η ανακάλυψη της δεσμοπρεσίνης παρείχε έναν ασφαλή και φθινό τρόπο θεραπείας σε ασθενείς με ήπια βαρύτητας αιμορροφιλία A και νόσο von Willebrand (32).

Η θεραπεία των αιμορροφιλικών ασθενών με ανασταλτή έχει σημειώσει σημαντική εξέλιξη καθώς έχουν παραχθεί παράγοντες παράκαμψης με αποτέλεσμα τον καλύτερο έλεγχο της αιμορραγίας (28). Τέλος, αν και έχει δημιουργηθεί με επιτυχία για την αιμορροφιλία B γονιδιακή θεραπεία με την χρήση αδενό-σχετιζόμενων ιών (Adeno-Associated Virus, AAV), στην αιμορροφιλία A λόγω των πολλών δυσκολιών που αναλύονται παρακάτω υπάρχουν ορισμένες γονιδιακές θεραπείες που βρίσκονται ακόμα σε κλινική φάση (30).

2.2 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά:

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η αιμορροφιλία A αποτελεί μία **φυλοσύνδετη κληρονομική αιμορραγική διάθεση** που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου του παράγοντα VIII που εδράζεται στο **X χρωμόσωμα**. Αυτό θα οδηγήσει σε μειωμένη δραστηριότητα του παράγοντα VIII και τάση για αιμορραγία (29). Η αιμορροφιλία A παρατηρείται σε συχνότητα 1 ανά 5000-10000 γεννήσεις ζώντων αρσενικών απογόνων και κληρονομείται με φυλοσύνδετο τύπο κληρονόμησης (26). Σύμφωνα με μία

στατιστική ανάλυση στο Ηνωμένο Βασίλειο, η αιμορροφιλία A εμφανίζεται σε 12,8 ανά 100000 άνδρες και η αιμορροφιλία B 2,7 ανά 100000 άνδρες. Πιο συγκεκριμένα για την αιμορροφιλία A περίπου το 40% των ασθενών έχει σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία, περίπου το 10% εμφανίζει μέτριας βαρύτητα αιμορροφιλία και το υπόλοιπο 50% έχει ήπιας βαρύτητα αιμορροφιλία (27). Τέλος, σύμφωνα με την βιβλιογραφία η πλειονότητα των ασθενών είχε τουλάχιστον ένα αιμορραγικό επεισόδιο κατά την διάρκεια της ζωής του, και πιο συγκεκριμένα οι περισσότερες ήταν βλεννοδερματικές αιμορραγίες αλλά παρατηρούνται και σχεδόν στους μισούς ασθενείς μυοσκελετικές αιμορραγίες (33).

2.3 Παθοφυσιολογία και Κλινική Εικόνα της Αιμορροφιλίας A:

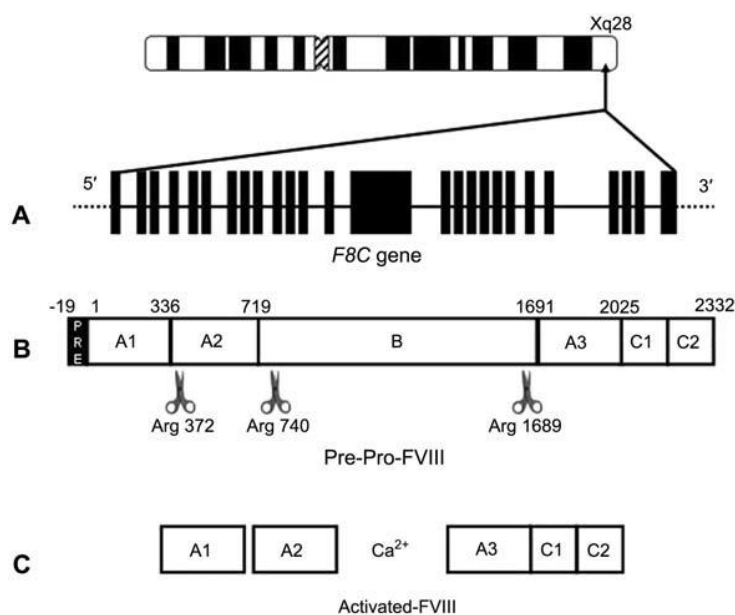
Για να αναλυθεί η **παθοφυσιολογία** της αιμορροφιλίας A θα πρέπει πρώτα να αναλυθεί ο φυσιολογικός ρόλος του παράγοντα VIII στην αιμόσταση. Τόσο ο παράγοντας VIII όσο και ο παράγοντας IX αποτελούν σημαντικές πρωτεΐνες του καταρράκτη της πήξης, ο οποίος θα έχει ως τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρόμβου ινώδους. Όπως αναφέρεται παραπάνω η αιμόσταση ξεκινά με τον τραυματισμό του αιμοφόρου αγγείου επιτρέποντας έτσι την σύνδεση του ιστικού παράγοντα (TF) με τον παράγοντα VII. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIIa σύμφωνα με το κυτταρικό μοντέλο στη φάση της έναρξης θα έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή θρομβίνης. Η θρομβίνη επιτρέπει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που επιτυγχάνεται χάρη στον παράγοντα von Willebrand και τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης τους. Η επιφάνεια αυτών των αιμοπεταλίων θα αποτελέσει το σημείο όπου ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIII και IX μέσω του συμπλέγματος τενάσης θα ενισχύσουν και θα διαδώσουν την παραγωγή θρομβίνης. Το αποτέλεσμα θα είναι ο σχηματισμός ενός σταθερού θρόμβου (27).

Όπως γίνεται αντιληπτό η ανεπάρκεια είτε του παράγοντα VIII είτε του παράγοντα IX θα οδηγήσει σε κίνδυνο ενεργοποίησης του παράγοντα X με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής θρομβίνης και την ανεπάρκεια της πρώιμης αντοχής του θρόμβου. Έτσι ο παθοφυσιολογικός ρόλος της αιμορραγίας είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς παραγωγής θρομβίνης λόγω ανοδικής ανεπάρκειας του παράγοντα (27). Για αυτό τον λόγο, οι ασθενείς με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία A, δηλαδή με επίπεδα παράγοντα <1%, εμφανίζουν συχνές αιμορραγικές εκδηλώσεις χωρίς την ύπαρξη κάποιου τραύματος. Οι αιμορραγίες αυτές εμφανίζονται συχνά στις αρθρώσεις προκαλώντας την αιμάρθρωση, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, αλλά και στους μύες, στους μαλακούς ιστούς αλλά και στο κεντρικό νευρικό σύστημα απειλώντας την ζωή του ασθενούς (34).

Πριν αναλυθούν τα συμπτώματα της αιμορροφιλίας A, θα πρέπει να αναφερθεί η μοριακή ανάλυση του γονιδίου του παράγοντα VIII, το οποίο χαρτογραφήθηκε το 1984. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα VIII (F8) αποτελείται από **26 εξόνια** με μήκος 180kb και βρίσκεται στο **μακρύ σκέλος του X χρωμοσώματος (Xq28)** (29). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού οδηγούν στην φυλοσύνδετη υπολειπόμενη κληρονομική αιμορραγική διάθεση, την αιμορροφιλία A. Για αυτό, οι περισσότεροι ασθενείς με αιμορροφιλία A είναι άνδρες, όμως ανεπάρκεια στον παράγοντα VIII

μπορούν να εμφανίσουν οι γυναίκες φορείς του γονιδίου λόγω της τυχαίας αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν την αιμορροφιλία A μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων ή οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης με την δημιουργία κωδικονίου λήξης της μετάφρασης και μεταλλάξεις που οδηγούν σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και μεγάλες ελλείψεις και αναστροφές, όπως οι αναστροφές του ιντρονίου 22 ή του ιντρονίου 1 (26), (27). Πιο συγκεκριμένα, η **αναστροφή του ιντρονίου 22** είναι η πιο κοινή μοριακή αιτιολογία της **σοβαρής βαρύτητας αιμορροφιλίας A** και εμφανίζεται σε περίπου στο 40% των ασθενών. Επίσης, οι σημειακές μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την ήπια βαρύτητα αιμορροφιλία A (27).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, αφού μεταγραφεί και μεταφραστεί το γονίδιο του παράγοντα VIII, υφίσταται κάποιες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Ο παράγοντας VIII ενεργοποιείται μετά από τις ειδικές πρωτεολυτικές τομές στα σημεία που απεικονίζονται στην Εικόνα 4 από την θρομβίνη και τον παράγοντα X με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του τριμερούς A1 και A2 και A3-C1-C2. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIII αποτελείται από τις βαριές αλυσίδες A1 και A2 και την ελαφριά αλυσίδα A3-C1-C2 και δρα ως συμπάροντες για την ενεργοποίηση του παράγοντα IX και την διάσπαση του vWF (29).



Εικόνα 4 Το γονίδιο και η πρωτεϊνική δομή του παράγοντα VIII (29)

Τα συμπτώματα των ασθενών με αιμορροφιλία A προκύπτουν από την τάση των ασθενών για αιμορραγία. Η αιμορραγία είναι πιο συχνή στις μεγάλες αρθρώσεις, κυρίως τις αρθρώσεις του αστραγάλου, του γονάτου και του αγκώνα (27). Οι αρθρώσεις που επηρεάζονται περισσότερο είναι η άρθρωση του γονάτου και του αστραγάλου γιατί φέρουν το βάρος του σώματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση τελικά αρθροπάθειας λόγω της επαναλαμβανόμενης αιμορραγίας (35). Σε μία **αιμορροφιλική άρθρωση** λόγω της επαναλαμβανόμενης αιμορραγίας, ο αρθρικός υμένας υπερτροφεί και προεξέχει στον αρθρικό χώρο. Σε ιστολογικές τομές παρατηρείται εναπόθεση αιμοσιδηρίνης (27). Έχει παρατηρηθεί και αιμορραγία σε αιμορροφικούς ασθενείς μετά από οδοντιατρικές επεμβάσεις, όπως η εξαγωγή μόνιμων δοντιών (1).

Τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια ενδοαρθρικής αιμορραγίας έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της **αιμορροφιλικής αρθροπάθειας**. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι χρόνιος πόνος, λειτουργικός περιορισμός της άρθρωσης και παραμόρφωσή της και μειώνεται η ποιότητα ζωής των ασθενών. Προκαλούνται επίσης και ενδομυϊκά αιματώματα στο σημείο της άρθρωσης (36). Τα συμπτώματα αυτά εμφανίζονται από τις υποτροπιάζουσες αιμορραγίες στις αρθρώσεις, που έχουν ως αποτέλεσμα τον χρόνιο πόνο και την διαταραχή στην αρθρική λειτουργία (34).

Η παθοφυσιολογία της αιμορροφιλικής αρθροπάθειας είναι πολύπλοκη και αποτελεί από εκφυλιστικά και φλεγμονώδη χαρακτηριστικά. Εξαιτίας της αρθροπάθειας που παρατηρείται στην άρθρωση που εμφανίζεται η αιμορραγία, ως απάντηση στην απόκριση των ερυθροκυττάρων μέσα στην άρθρωση παρατηρείται μία φλεγμονώδη αντίδραση (36). Αυτό συμβαίνει διότι οι εναποθέσεις σιδήρου που σχετίζονται με την αιμοσφαιρίνη αυξάνουν αποδεδειγμένα τις φλεγμονώδεις κυττοκίνες (35). Μέσα από την αντίδραση αυτή και την υπερπλασία και αγγειογένεση που παρατηρείται δημιουργείται ένας επαναλαμβανόμενος κύκλος αιμορραγίας και καταστροφής των αρθρώσεων. Η συνδρομή της μαγνητικής και αξονικής τομογραφίας είναι σημαντική για την παρακολούθηση της αιμορροφιλικής αρθροπάθειας (36). Για την αξιολόγηση και παρακολούθηση της αιμορροφιλικής αρθροπάθειας χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα ταξινόμησης. Τα ευρήματα από τις αξονικές και μαγνητικές τομογραφίες του ασθενή χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βλάβης στις αρθρώσεις τους (37).

Οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α, έχουν μεγάλη πιθανότητα να αναπτύξουν **αυθόρμητα αιματώματα**, τα οποία εμφανίζονται στο μυοσκελετικό σύστημα. Επίσης, ο αιμοφιλικός ψευδοόγκος είναι ένας τύπος αιματώματος, το οποίο σταδιακά επεκτείνεται λόγω της οξείας και χρόνιας αιμορραγίας. Με την πάροδο του χρόνου, το αιμάτωμα αντικαθίσταται από ινώδη ιστό και δημιουργείται μία κάψουλα που περιλαμβάνει μακροφάγα με εναποθετημένη αιμοσιδερίνη (36).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχουν παρατηρηθεί γεγονότα με επεισόδια εγκεφαλικής αιμορραγίας σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α. Στους ασθενείς αυτούς, παρατηρούνται διαταραχές της πνευματικής λειτουργίας και των οπτικοχωρικών δεξιοτήτων λόγω της ενδοκρανιακής αιμορραγίας. Η **αιματουρία** είναι πιο συχνή στους ασθενείς με αιμορροφιλία Α παρά στον γενικό πληθυσμό (35), αλλά και σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές υπάρχει συσχέτιση της αιμόστασης και της καρκινογένεσης. Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τους αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τους παράγοντες πήξης. Λόγω του κινδύνου μόλυνσης των αιμορροφιλικών ασθενών από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), και τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου στους αιμορροφιλικούς ασθενείς (38). Επιπλέον, σύμφωνα με την μελέτη των Lastrapes et al., έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των επικαλυπτόμενων αιμοπεταλίων με την σοβαρή βαρύτητα αιμορροφιλία Α (39). Τέλος, σε πολλούς ασθενείς με σοβαρή βαρύτητα αιμορροφιλία Α που λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης υπάρχει η πιθανότητα ανάπτυξης **αντισωμάτων αναστολέων έναντι του παράγοντα VIII**, το οποίο θα αναλυθεί παρακάτω (1).

2.4 Διαγνωστική Προσέγγιση Αιμορροφιλίας Α:

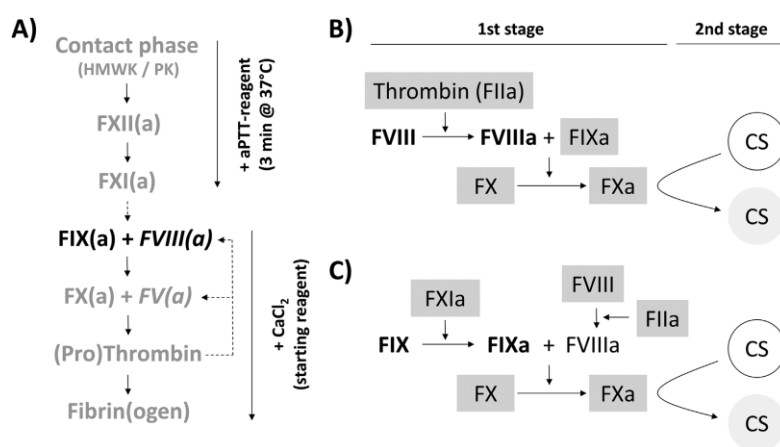
Η αιμορροφιλία, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, αποτελεί κληρονομική ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Για αυτό τον λόγο θα πρέπει πρώτα να λαμβάνεται **λεπτομερές ιστορικό** προκειμένου να οριστεί η βαρύτητα της ασθένειας (1), αλλά και να οριστεί η μετάλλαξη που προκαλεί την αιμορροφιλία Α στην οικογένεια του ασθενούς (27). Το θετικό οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας, το ιστορικό με αυτόματη αιμορραγία στον ασθενή ή σε μέλη της οικογένειάς του αλλά και τα παθολογικά ευρήματα σε εργαστηριακές δοκιμασίες της πήξης μπορούν να οδηγήσουν στην διάγνωση για αιμορροφιλία Α (27). Όταν υπάρχουν άτομα με αιμορροφιλία Α στην οικογένεια του ασθενούς, μπορεί να μελετηθεί και το γενεαλογικό τους δέντρο και να εξακριβωθεί η ύπαρξη γυναικών φορέων της ασθένειας (27) (1).

Όλοι οι ασθενείς με αιμορραγική διάθεση υποβάλλονται σε ένα **βασικό έλεγχο της αιμόστασης**. Ο βασικός αυτός έλεγχος (screening) περιλαμβάνει την μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης (Prothrombin Time, PT), του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated Partial Thromboplastin Time, aPTT) και τον αριθμό των αιμοπεταλίων (1). Η αιμορροφιλία Α, λόγω της ανεπάρκειας του παράγοντα VIII προκαλεί παράταση στο aPTT και ο υπόλοιπος έλεγχος είναι φυσιολογικός. Για να αποκλειστεί η παρουσία κάποιου αναστολέα πραγματοποιούνται **πειράματα μίξης** με ίσο όγκο φυσιολογικού πλάσματος και επώαση στους 37°C και επαναμέτρηση του aPTT (26). Η διόρθωση του aPTT υποδηλώνει την ανεπάρκεια κάποιου παράγοντα της ενδογενούς οδού της πήξης, ενώ η παράταση του aPTT και μετά την επώαση υποδηλώνει την ύπαρξη είτε κάποιου ανασταλτή του παράγοντα VIII είτε την ύπαρξη αντιπηκτικών του λύκου, δηλαδή πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των φωσφολιπιδίων (27).

Η διάγνωση της αιμορροφιλίας Α οριστικοποιείται με την δοκιμασία της δραστηριότητας του παράγοντα VIII (FVIII:C). Η μέτρηση αυτή μπορεί να γίνει είτε με την **μέθοδο του ενός σταδίου** είτε με **χρωμογονικούς προσδιορισμούς** (40). Στην δεκαετία του 1970 για τον υπολογισμό των επιπέδων του παράγοντα VIII χρησιμοποιούταν η μέθοδος δύο σταδίων, η οποία ήταν χειροκίνητη και τεχνικά δύσκολη. Όμως με την εξέλιξη της τεχνολογία και την χρήση αυτόματων αναλυτών η μέθοδος ενός σταδίου έγινε πιο αξιόπιστη και χρησιμοποιείται ευρέως για την διάγνωση της αιμορροφιλίας Α. Η αρχή μεθόδου της στηρίζεται στην διόρθωση του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) σε ένα μείγμα αραιωμένου πλάσματος ασθενούς και πλάσματος με ανεπάρκεια του παράγοντα VIII (41). Στο μείγμα αυτό προστίθεται το αντιδραστήριο του aPTT και επωάζεται στους 37°C για 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται CaCl₂, που λειτουργεί ως αντιδραστήριο έναρξης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλέγματος τενάσης και της προθρομβινάσης (42). Μετά την ενεργοποίηση των παραγόντων XI και XII, η προσθήκη του ασβεστίου ξεκινά το ενζυμικό μονοπάτι προς τον σχηματισμό του θρόμβου. Ο χρόνος πήξης του πλάσματος είναι ανάλογος της δραστηριότητας και του επιπέδου του παράγοντα VIII (41). Αν και η πηξιολογική αυτή μέθοδος αποτελείται από δύο στάδια, ορίζεται ως μέθοδος ενός σταδίου (One Stage Clotting Assay) (42).

Η άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του παράγοντα VIII είναι η **χρωμογονική μέθοδος**. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη

μέτρηση της ποσότητας του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa στο πλάσμα, που είναι ανάλογη με το επίπεδο του λειτουργικού παράγοντα VIII (27). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι χρησιμοποιείται υπόστρωμα ενεργοποιημένου παράγοντα Xa με βοδινή προέλευση για να υπάρχουν πιο αξιόπιστα και έγκυρα αποτελέσματα. Στο πλάσμα του ασθενούς προστίθεται βοοειδούς προέλευσης ενεργοποιημένος παράγοντα IXa και θρομβίνη. Ο παράγοντας VIII στο πλάσμα ενεργοποιείται και συνδέεται με τον ενεργοποιημένο παράγοντα IXa και ενεργοποιείται ο παράγοντας X προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa (41). Κατά την μέθοδο αυτή, η συγκέντρωση του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας ένα ειδικό χρωμογονικό υπόστρωμα ειδικό για αυτόν. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τα επίπεδα του ενεργοποιημένου παράγοντα Xa που δημιουργήθηκαν και ανάλογα με τα επίπεδα του παράγοντα VIII (27). Οι διαφορές και η αρχή των παραπάνω μεθόδων φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σχηματική Απεικόνιση της Αρχής Μεθόδου της μεθόδου Ενός Σταδίου (2) και του Χρωμογονικού Προσδιορισμού (B) (34).

Τα πλεονεκτήματα της χρωμογονικής μεθόδου είναι ότι δεν επηρεάζεται από ορισμένες προαναλυτικές μεταβλητές και ότι δεν απαιτείται η χρήση πλάσματος με ανεπάρκεια στον παράγοντα VIII σε σχέση με την μέθοδο του ενός σταδίου (27). Επίσης η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου του ενός σταδίου, γιατί είναι πιο ακριβής μέθοδος και παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας στον ενεργοποιημένο παράγοντα VIIIa λόγω της ενεργοποίησης του από την θρομβίνη. Επιπλέον, παρατηρείται μειωμένη επίδραση των ειδικών αναστολέων της αιμόστασης, όπως η ηπαρίνη και διά του στόματος αντιπηκτικών, στην ανάλυση. Τέλος, παρατηρείται καλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια στην διάγνωση της ήπιας βαρύτητας αιμορροφιλία A και στην διάγνωση της σε ασθενείς στους οποίους εμφανίζεται ασυμφωνία αναλύσεων λόγω ύπαρξης διαφορετικών μεταλλάξεων (41).

Η μέθοδος ενός σταδίου χρησιμοποιείται γενικά για την διάγνωση της αιμορροφιλία A. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και οι δύο μέθοδοι. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο χρωμογονικός προσδιορισμός χρησιμοποιείται κυρίως για την διάγνωση της ήπιας βαρύτητα αιμορροφιλία A (27). Επιπλέον, για την παρακολούθηση των επιπέδων του παράγοντα VIII σε ασθενείς με αιμορροφιλία A επιλέγεται η μέτρηση της δραστηριότητας του παράγοντα VIII με την χρωμογονική μέθοδο, γιατί τα διαθέσιμα ανασυνδυασμένα σκευάσματα παράγοντα

VIII παρουσιάζουν ασυμβατότητα μεταξύ της μεθόδου ενός σταδίου και του χρωμογονικού προσδιορισμού. Αυτό παρατηρείται και σε ασθενείς που έχουν λάβει γονιδιακή θεραπεία για την αιμορροφιλία Α. Έχει παρατηρηθεί ότι τα σκευάσματα με παράγοντες παράκαμψης ή σκευάσματα ενεργοποιημένου συμπλέγματος προθρομβίνης (activated Prothrombin Complex Concentrates, aPCC) ή και το μονοκλωνικό αντίσωμα emicizumab προκαλούν μείωση του aPTT και για αυτό επηρεάζεται το αποτέλεσμα της μεθόδου ενός σταδίου (42).

Η **ασυμβατότητα** που αναφέρεται παραπάνω, ορίζεται ως ο λόγος μεταξύ του αποτελέσματος του ενός σταδίου προς το αποτέλεσμα του χρωμογονικού προσδιορισμού. Για να οριστεί η ασυμβατότητα αυτή θα πρέπει ο λόγος να είναι 1,5-1,7 (41). Στην ήπιας βαρύτητα αιμορροφιλία Α αν η αναλογία είναι μεγαλύτερος από 2,0 θεωρείται ότι υπάρχει σημαντική απόκλιση. Στις περισσότερες τέτοιες περιπτώσεις τα επίπεδα του παράγοντα VIII είναι μικρότερα από 40IU/dl, αλλά έχουν καταγραφεί στην βιβλιογραφία περιπτώσεις όπου η μέτρηση με την μέθοδο ενός σταδίου είναι φυσιολογική και με την χρωμογονική μέθοδο η μέτρηση είναι παθολογική (27). Αυτό συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων που επηρεάζουν τις περιοχές A1,A2 και A3 του παράγοντα VIII, αλλά και τις θέσεις όπου πραγματοποιείται η διάσπαση της θρομβίνης ή και η δέσμευση στον παράγοντα IX (40). Αν χρησιμοποιούταν μόνο η μία μέθοδος δεν θα υπήρχε έγκυρη και αξιόπιστη διάγνωση (27).

Η **μοριακή ανάλυση** στην αιμορροφιλία Α έχει βοηθήσει στην έγκυρη διάγνωση των ασθενών με αιμορροφιλία Α αλλά και στον εντοπισμό των φορέων της ασθένειας. Όταν εντοπίζεται μία γυναίκα φορέας θα πρέπει να παραχωρούνται οι κατάλληλες οδηγίες για τον προγεννητικό έλεγχο σε περίπτωση εγκυμοσύνης (29). Επίσης, η μοριακή ανάλυση βοήθησε στην πρόβλεψη του κινδύνου ανάπτυξης αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII, ο οποίος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές της ασθένειας. Έχει παρατηρηθεί ότι η σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία Α οφείλεται σε 50% των περιπτώσεων στην αναστροφή στο ιντρόνιο 22. Η δεύτερη πιο κοινή μετάλλαξη είναι η αναστροφή στο ιντρόνιο 1 και εμφανίζεται σε περίπου 5% των ασθενών. Το υπόλοιπο 45% των σοβαρών αιμορροφιλιών Α και η μέτριας και ήπιας βαρύτητα αιμορροφιλία Α οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις και μικρές διαγραφές (29).

Για την μοριακή διάγνωση αυτών των μεταλλάξεων έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (25). Όμως λόγω της ετερογένειας της ασθένειας και του γεγονότος ότι έχουν αναγνωριστεί πολλές μεταλλάξεις που προκαλούν την αιμορροφιλία Α, οι σύγχρονες οδηγίες για την μοριακή ανάλυση στηρίζονται **στην τεχνολογία της αλληλούχισης νέας γενιάς** (Next Generation Sequencing, NGS). Με άλλα λόγια, λόγω της δυσκολίας ανίχνευσης της μετάλλαξης που οφείλεται η αιμορροφιλία Α στον ασθενή προτείνεται να γίνεται η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου (43). Τέλος είναι σημαντικό να γίνεται η διαφοροδιάγνωση της αιμορροφιλίας Α από την νόσο von Willebrand για να παρέχεται καλύτερη γενετική συμβουλευτική (25).

2.5 Θεραπεία Αιμορροφιλίας Α:

Οι ασθενείς με αιμορροφιλία θα πρέπει να παρακολουθούνται από εξειδικευμένο προσωπικό για να μειωθεί ο κίνδυνος πιθανής αιμορραγίας και να αποφευχθούν όλες οι επιπλοκές της (26). Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει να έχουν πρόσβαση σε εξειδικευμένα κέντρα αιμορροφιλίας και σε εργαστήρια αιμόστασης (27). Στους ασθενείς αυτούς, οποιαδήποτε χειρουργική ή οδοντιατρική επέμβαση θα πρέπει να γίνεται από κατάλληλο προσωπικό, και σε συνεργασία με το κέντρο αναφοράς αιμορροφιλίας που παρακολουθείται ο ασθενής, για τον κατάλληλο σχεδιασμό και για να αποτρέπονται οι αιμορραγικές εκδηλώσεις. Ορισμένα φάρμακα, όπως η ασπιρίνη και τα αντιπηκτικά, θα πρέπει να αποφεύγονται διότι αυξάνουν τον κίνδυνο για αιμορραγία (26).

Ο βασικός κανόνας της θεραπείας της αιμορροφιλίας Α είναι η **αντικατάσταση του παράγοντα VIII** για επιτευχθούν τα κατάλληλα επίπεδα του παράγοντα VIII για να προληφθεί ή να διακοπεί η αιμορραγία. Η **θεραπεία υποκατάστασης** με τον παράγοντα VIII δεν είναι ίδια για όλους τους ασθενείς, αλλά εξαρτάται από τον βαθμό ανεπάρκειας του παράγοντα. Η θεραπεία μπορεί να διακριθεί σε θεραπεία κατ'επίκληση όπου ο παράγοντας χορηγείται κατά την διάρκεια της αιμορραγίας, σε συνεχή προφυλακτική θεραπεία, όπου ο παράγοντας χορηγείται για 45 εβδομάδες του έτος ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, που ορίζονται από το συμπύκνωμα που λαμβάνει ο ασθενής και σε περιοδική προφυλακτική θεραπεία, όπου ο παράγοντας χορηγείται για μικρά χρονικά διαστήματα (26). Η πρωτογενής προφυλακτική θεραπεία ορίζεται ως η συνεχής προφυλακτική χορήγηση του παράγοντα VIII και αποτελεί την προτιμώμενη θεραπευτική επιλογή (27). Εξαιτίας των πολλών θεραπευτικών επιλογών που υπάρχουν για τους ασθενείς με αιμορροφιλία Α, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω κρίνεται αναγκαίο η ύπαρξη ενός συστήματος κοινής λήψης αποφάσεων μεταξύ των διάφορων κέντρων αιμορροφιλίας (44).

2.5.1 Διαθέσιμα Σκευάσματα Παράγοντα VIII:

Η **θεραπεία υποκατάστασης** αν και είναι πολύ αποτελεσματική στην μείωση του κινδύνου αιμορραγιών ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης αντισωμάτων έναντι του παράγοντα VIII. Αυτό παρατηρείται περίπου στο 25-40% των ασθενών με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία Α εντός των πρώτων 50 ημερών μετά την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης. Για αυτό τον λόγο, η ανίχνευση του αναστολέα του παράγοντα VIII σε αυτούς τους ασθενείς γίνεται στην παιδική ηλικία τους (34). Οι ασθενείς με αναστολέα έναντι στον παράγοντα VIII απαιτούν την θεραπεία με παράγοντες παράκαμψης, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω. Στους ασθενείς χωρίς ανασταλή έναντι στον παράγοντα VIII, η θεραπεία υποκατάστασης αποτρέπει την αρθραλγία και κατ'επέκταση την αιμάθρωση (34).

Για την θεραπεία υποκατάστασης σε ορισμένες χώρες εξαιτίας του χαμηλού κόστους χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα το **κρυοκαθίζημα** και το **φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα** (FFP). Έχει αποδειχθεί ότι με την χρήση τους μπορεί να μεταδοθούν αιματογενώς παθογόνοι παράγοντες, όπως ο ιός HIV ή ο ιός HBV και ότι δεν αποτρέπουν επαρκώς την πιθανότητα αιμορραγίας στους ασθενείς (27). Με τις

διαδικασίες απενεργοποίησης των ιών στο πλάσμα προς μετάγγιση, έχει παρατηρηθεί η μετάδοση του παρβοϊού B19 που επιφέρει σημαντικές επιπλοκές σε ασθενείς με αιμορροφιλία A. Για αυτό τον λόγο, και με την εξέλιξη της τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, οι **ανασυνδυασμένοι παράγοντες** θεωρούνται ασφαλέστεροι από τα προϊόντα του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, οι διαγονιδιακοί χοίροι θεωρούνται οι καταλληλότερες πηγές **ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII(rVIII)**. Αυτό συμβαίνει διότι τα επιθηλιακά μαστικά τους κύτταρα είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτείται για να ενεργοποιηθεί ο παράγοντας VIII. Τα προϊόντα αυτά θα απενεργοποιηθούν ικά για να πραγματοποιηθεί στην συνέχεια η λυοφιλοποίηση τους για να είναι διαθέσιμα για ενδοφλέβια έγχυση στο σπίτι των ασθενών με αιμορροφιλία A (29).

Τα **σκευάσματα παράγοντα VIII τυπικού χρόνου ημιζωής (Standard Half Life, SHL)** διαθέτουν πολλούς περιορισμούς και επιβαρύνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών. Ο χρόνος ημιζωής του παράγοντα VIII στο συμπύκνωμα SHL είναι 8 έως 12 ώρες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η προφυλακτική θεραπεία των ασθενών να πραγματοποιείται 3 έως 4 φορές την εβδομάδα με ενδοφλέβια έγχυση (45). Επιπλέον, με την θεραπεία με SHL σκευάσματα παράγοντα VIII μπορούν να επιτευχθούν επίπεδα παράγοντα 1-3%, αλλά περίπου το 25-40% των ασθενών με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία A που τα λαμβάνουν μπορούν να αναπτύξουν αναστολέα έναντι στον παράγοντα VIII (31). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ασθενείς λαμβάνουν θεραπεία με παράγοντες παράκαμψης ή σκευάσματα συμπλέγματος ενεργοποιημένης προθρομβίνης (aPCC) (31).

Εξαιτίας των παραπάνω δυσκολιών έχουν αναπτυχθεί νέες θεραπείες με **σκευάσματα παράγοντα VIII με παρατεταμένο χρόνο ημιζωής πλάσματος (Extended plasma Half-Lives, EHL)**. Τα νέα αυτά σκευάσματα έχουν έως και 1,5 φορές μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με τα SHL σκευάσματα και αλληλοεπιδρούν με τον ενδογενή παράγοντα von Willebrand (vWF) (34). Το πλεονέκτημα τους, είναι ότι διατηρούν υψηλότερα τα χαμηλά επίπεδα παράγοντα VIII και είναι πιο αποτελεσματικά στην πρόληψη αιμορραγιών (45). Για την παράταση του χρόνου ημιζωής των σκευασμάτων παράγοντα VIII χρησιμοποιούνται τεχνικές σύντηξης του παράγοντα VIII με το κρυσταλλώσιμο θραύσμα Fc (Fragment crystallizable, Fc) του αντισώματος και η σύζευξη του με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) (45). Με την σύζευξη με την ανοσοσφαιρίνη αποφεύγεται η ενδοκυτταρική αποδόμηση του ανασυνδυασμένου παράγοντα, ενώ με την προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης μειώνεται η ευαισθησία του στην πρωτεόλυση (27).

Η δοσολογία του παράγοντα που πρέπει να χορηγηθεί με ενδοφλέβια έγχυση στους ασθενείς εξαρτάται από την ποσοστιαία διόρθωση του παράγοντα. Μπορεί να προσδιοριστεί από τον πολλαπλασιασμό του βάρους του ασθενή με το ήμισυ της ποσοστιαίας διόρθωσης του παράγοντα VIII (1). Για την καλύτερη καταπολέμηση των συμπτωμάτων της αιμορροφιλία A θα πρέπει τα επίπεδα του παράγοντα να διατηρηθούν σε υψηλότερα επίπεδα για να έχει ο ασθενής καλύτερη ποιότητα ζωής. Συνήθως στην προφυλακτική αγωγή τα επίπεδα του παράγοντα θα πρέπει να διορθωθούν σε φυσιολογικά επίπεδα, δηλαδή η ποσοστιαία διόρθωση του παράγοντα θα πρέπει να κυμαίνεται στο εύρος 70-120%. Αναλόγως τα κλινικά συμπτώματα του

ασθενή διαφοροποιείται η ποσοστιαία διόρθωση (46). Η παρατεταμένη αιματοουρία αλλά και η ενδοσκόπηση απαιτούν αντικατάσταση του παράγοντα σε ποσοστό 50%, ενώ η χρόνια αιμορραγία σε μία άρθρωση απαιτεί αντικατάστασή του σε ποσοστό 100% (1). Επιπλέον, οι ασθενείς με ήπιας ή μέτριας βαρύτητα αιμορροφιλία A λαμβάνουν θεραπεία με **δεσμοπρεσσίνη (DDAVP)**. Η χορήγηση του μπορεί να γίνει είτε με ενδοφλέβια έγχυση είτε ενδορινικά και είναι αποτελεσματικό και για την θεραπεία των συμπτωμάτων των θηλυκών φορέων. Παρόλα αυτά, στην σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία A αλλά και σε περιπτώσεις που ασθενής δεν έχει ανταπόκριση στο DDAVP, η θεραπεία με δεσμοπρεσσίνη είναι αναποτελεσματική (33).

Για την παρακολούθηση της θεραπευτικής πορείας των ασθενών θα πρέπει να ελέγχονται τα επίπεδα του παράγοντα VIII ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Αναλόγως το σκεύασμα του παράγοντα VIII, θα πρέπει να επιλέγεται η μέθοδος του ενός σταδίου ή ο χρωμογονικός προσδιορισμός (27). Όταν ο ασθενής λαμβάνει θεραπεία με υψηλής καθαρότητα παράγοντα που προέρχεται είτε από το πλάσμα είτε από ανασυνδυασμένο παράγοντα με διαγραμμένο την Β περιοχή του παράγοντα, τα επίπεδα του παράγοντα VIII είναι χαμηλότερα στη μέθοδο ενός σταδίου, σε σύγκριση με την χρωμογονική μέθοδο (42). Έχει παρατηρηθεί έως και 50% χαμηλότερη δραστηριότητα παράγοντα VIII με την μέθοδο του ενός σταδίου όταν χορηγείται στον ασθενή το σκεύασμα Moroctocog alfa (με εμπορική ονομασία ReFacto®) (42).

Τα σκευάσματα παράγοντα VIII με παρατεταμένο χρόνο ημιζωής (EHL), που είναι διαθέσιμα στην Ελλάδα είναι οι εξής: Damoctocog alfa pegol (Jivi®), Lonoctocog alfa (Afstylla®), Rurioctocog alfa pegol (Adynovi®), Efmoroctocog alfa (Elocta®) (42). Πιο αναλυτικά, το Efmoroctocog alfa (Elocta®) αποτελεί έναν ανασυνδυασμένο παράγοντα VIII (rVIII), στον οποίο έχει διαγραφεί η περιοχή Β του παράγοντα και έχει συνδεθεί με το τμήμα Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG₁. Αποτελεί το πρώτο σκεύασμα ανασυνδυασμένου παράγοντα με παρατεταμένο χρόνο ημιζωής που αδειοδοτήθηκε για χρήση (45). Επειδή λαμβάνονται υψηλότερα επίπεδα παράγοντα VIII με την χρωμογονική μέθοδο, θα πρέπει να αξιολογούνται και οι δύο μέθοδοι για την παρακολούθηση των ασθενών που το λαμβάνουν (42). Το Damoctocog alfa pegol (Jivi®) αποτελεί έναν ανασυνδυασμένο παράγοντα VIII (rVIII) στον οποίο έχει διαγραφεί η περιοχή Β του παράγοντα και έχει συζευχθεί με την ουσία PEG (45). Στο παρελθόν είχε παρατηρηθεί ασυμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων, που οφειλόταν στην χρήση αντιδραστηρίων του aPTT που περιείχαν πυρίτιο. Για αυτό τον λόγο προτιμάται η εκτίμηση των επιπέδων του παράγοντα VIII σε ασθενείς που λαμβάνουν το Jivi® με χρωμογονικό προσδιορισμό (42).

Επιπλέον, το Lonoctocog alfa (Afstylla®) αποτελεί ανασυνδυασμένο παράγοντα VIII (rVIII) μονής αλυσίδας, ο οποίος συνδέεται και αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα vWF. Αν και αποτελεί SHL επειδή παρουσιάζει βελτιωμένη φαρμακοκινητική θεωρείται EHL. Στους ασθενείς που λαμβάνουν afstylla®, τα επίπεδα παράγοντα VIII θα πρέπει να υπολογίζονται με τον χρωμογονικό προσδιορισμό (42). Το Rurioctocog alfa pegol (Adynovi®) αποτελεί ανασυνδυασμένο παράγοντα VIII (rVIII) συνδεδεμένο με την ουσία PEG και εξέλιξη του Octocog alfa (Advate®) (42), (45). Το adynovi® παρασκευάζεται με την σύνδεση ενός μορίου

20kDa PEG σε ένα μόριο SHL ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII, του Octocog alfa (Advate®) (45).

2.5.2 Διαθέσιμα Σκευάσματα Αντικατάστασης του Παράγοντα VIII:

Σύμφωνα με τις τελευταίες βιβλιογραφικές αναφορές, έχουν αναπτυχθεί σκευάσματα που δεν υποκαθιστούν τον παράγοντα VIII αλλά προάγουν την αιμόσταση. Τα σκευάσματα αυτά μπορούν να χορηγηθούν με υποδόρια έγχυση (27). Το **Emicizumab** με εμπορική ονομασία Hemlibra® (31) έχει πάρει έγκριση το 2017 από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων για την θεραπεία ασθενών με αιμορροφιλία Α με αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII, ενώ ένα χρόνο αργότερα πήρε άδεια για την θεραπεία της αιμορροφιλίας Α (26). Το Emicizumab αποτελεί ένα εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG₄ που μιμείται την λειτουργία του ενεργοποιημένου παράγοντα VIIIa (42). Έχει την ικανότητα να δεσμεύεται ταυτόχρονα και στον ενεργοποιημένο παράγοντα IXa και στον ενεργοποιημένο παράγοντα Xa επιτυγχάνοντας την παραγωγή θρομβίνης (31). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του emicizumab είναι ότι χορηγείται υποδόρια και έχει μακρύ χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται μεταξύ 4-5 εβδομάδες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με αιμορροφιλία Α (31). Η σοβαρή επιπλοκή του emicizumab είναι η πρόκληση θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας (26).

Σε αντίθεση με τον σκευάσματα παράγοντα VIII, το emicizumab δεν απαιτεί την ενεργοποίηση του παράγοντα VIII και δεν υπόκειται σε ρύθμιση. Με βάση τον μηχανισμό δράσης του, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση του aPTT. Για αυτό τον λόγο, ο προσδιορισμός του επιπέδου του παράγοντα VIII σε ασθενείς που λαμβάνουν emicizumab θα πρέπει να γίνεται με χρωμογονικό προσδιορισμό, διότι η μέθοδος του ενός σταδίου που χρησιμοποιεί αντιδραστήριο aPTT επηρεάζεται (42).

Ένα άλλο σκευάσμα αντικατάστασης του παράγοντα VIII είναι το **fitusiran**. Αυτό αποτελεί ένα μικρό παρεμβαλλόμενο μόριο RNA (short interference RNA, siRNA), το οποίο συνδέεται στο mRNA που κωδικοποιεί την αντιθρομβίνη στα ηπατικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή της θρομβίνης. Ενδείκνυται για την θεραπεία ασθενών με αιμορροφιλία Α ή Β. Όπως και το emicizumab χορηγείται και αυτό με υποδόρια έγχυση ανά μεγάλα χρονικά διαστήματα (31).

2.5.3 Γονιδιακή Θεραπεία:

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχουν ήδη ανακοινωθεί τα πρώτα αποτελέσματα για την γονιδιακή θεραπεία με **adeno-associated virus (AAV)** τόσο για την αιμορροφιλία Α όσο και για την αιμορροφιλία Β (26). Τα νεότερα πρότυπα σχεδιασμού γονιδιακών θεραπειών βασίζονται στην μεταφορά cDNA του παράγοντα VIII, στο οποίο έχει διαγραφεί η περιοχή Β του αρχικού ανενεργού μορίου του παράγοντα στα ηπατοκύτταρα του ασθενή για να παραχθεί τελικά ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIII με την χρήση ειδικών ιικών φορέων (47). Έχουν αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός ιικών φορέων με διαφορετική συσκευασία και ικανότητα ενσωμάτωσης του γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του ανθρώπου (29). Όμως, οι

σύγχρονες μελέτες ανάπτυξης και σχεδιασμού των γονιδιακών θεραπειών για την αιμορροφιλία Α βασίζονται στην χρήση μία νέας γενιάς αδενοϊκών φορέων, των AAV, οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλή ανοσογονικότητα λόγω έλλειψης γονιδίων αγρίου τύπου (29).

Πρόσφατες δημοσιευμένες μελέτες αποδεικνύουν την πολυετή θεραπευτική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των AAV σε ζώα εργαστηρίου με αιμορροφιλία Α. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν την βάση για τις επικείμενες κλινικές μελέτες για την γονιδιακή θεραπεία σε ανθρώπους (29). Το 2023 η γονιδιακή θεραπεία με την εμπορική ονομασία roctavian™, που χρησιμοποιεί τον αδενοϊό valoctocogen rocharaγnonoc, έλαβε υπό όρους έγκριση από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την θεραπεία της σοβαρής βαρύτητας αιμορροφιλία Α σε άνδρες χωρίς ιστορικό αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII και χωρίς κάποιο ανιχνεύσιμο αντίσωμα έναντι του AAV. Η θεραπεία αυτή χορηγείται με ενδοφλέβια έγχυση (44).

Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας συστήνεται η παρακολούθηση των βιοδεικτών που εκφράζουν την ηπατική λειτουργία. Τα αυξημένα ηπατικά ένζυμα σηματοδοτούν την ηπατική φλεγμονή και τον κίνδυνο μειωμένης γονιδιακής έκφρασης. Για να αποτραπεί η απόρριψη της θεραπείας θα πρέπει σε αυτή τη περίπτωση να χορηγηθούν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Για να εξασφαλισθεί η καλή υγεία του ήπατος του ασθενούς που έλαβε την γονιδιακή θεραπεία συστήνεται η αποχή από το αλκοόλ για ένα χρόνο και να αποφεύγεται η υπερβολική λήψη του για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης, θα πρέπει να ελέγχονται και τα επίπεδα του παράγοντα VIII επειδή η υπερβολική έκφρασή του μπορεί να προκαλέσει θρομβωτικά επεισόδια (44).

2.6 Αναστολέας Έναντι του Παράγοντα VIII:

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η σημαντικότερη επιπλοκή της θεραπείας αντικατάστασης του παράγοντα VIII είναι η **ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του παράγοντα VIII**. Οι ασθενείς αυτοί απαιτούν θεραπεία με παράγοντες παράκαμψης και **θεραπεία ανοσοαντοχής (Immune Tolerance Induction, ITI)** (34). Η ανοσολογική απόκριση έναντι του θεραπευτικού ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στην θεραπευτική πορεία του ασθενή. Τα πεπτίδια του θεραπευτικού ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII παρουσιάζονται με μόρια MHC τάξης II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να ενεργοποιηθεί ένα βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο με απώτερο στόχο να παραχθούν κύτταρα Β που παράγουν αντισώματα έναντι του παράγοντα (27). Οι αναστολείς του παράγοντα VIII είναι τελικά αντισώματα IgG, συνήθως είναι της υποκατηγορίας IgG₄ και παρεμβαίνουν στην αλληλοεπίδραση του παράγοντα VIII με τους συμπαράγοντες και ενεργοποιητές του (1). Αυτό συμβαίνει διότι τα αντισώματα αυτά στρέφονται έναντι των επιτόπων A2, A3, C1 και C2 του παράγοντα VIII αποτρέποντας έτσι την αλληλοεπίδρασή του με άλλους παράγοντες της πήξης (29).

Υπάρχουν κάποιοι παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII. Ο σημαντικότερος παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη αναστολέων είναι ο τύπος της γενετικής βλάβης, η οποία

προκαλεί την ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Μεγάλες ελλείψεις αλλά και η αναστροφή του ιντρονίου 22 και άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία A είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη αναστολέα (26). Η μοριακή ανάλυση του γονιδίου του παράγοντα VIII μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό του κινδύνου ανάπτυξης αναστολέα σε ένα ασθενή με αιμορροφιλία A (29). Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι το οικογενειακό ιστορικό, η φυλή, η ηλικία της πρώτης έκθεσης σε σκεύασμα παράγοντα VIII, αλλά και το είδος του σκευάσματος, ο γονότυπος HLA του ασθενή (48).

Η ανάπτυξη αναστολέα έναντι στον παράγοντα που βρίσκεται σε ανεπάρκεια μπορεί να μειώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών με αιμορροφιλία ανεξαρτήτων ηλικίας (48). Επίσης, σύμφωνα με την βιβλιογραφία παρατηρείται χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αναστολέα σε ασθενείς που λαμβάνουν σκευάσματα παράγοντα που προέρχεται από το ανθρώπινο πλάσμα. Αυτό συμβαίνει διότι ο παράγοντας VIII που προέρχεται από το πλάσμα είναι πιο φυσικός και λιγότερο ανοσογονικός σε σχέση με τον ανασυνδυασμένο παράγοντα (49). Για τον λόγο αυτό σε ασθενείς με αναστολέα <5 BU για την αντιμετώπιση των αιμορραγικών επεισοδίων χορηγείται ανθρώπινος παράγοντας VIII (26).

2.6.1 Διάγνωση Αναστολέα έναντι του Παράγοντα VIII:

Ο τίτλος των αντισωμάτων προσδιορίζεται με την **μέθοδο Bethesda** και εκφράζεται σε μονάδες Bethesda ανά ml (BU/ml). Η υποψία παρουσίας αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII τίθεται όταν η επώαση του πλάσματος του ασθενούς με φυσιολογικό πλάσμα 1:1 δεν διορθώνει το aPTT μετά από την επώαση στους 37°C για 2 ώρες (26). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο Bethesda, το πλάσμα του ασθενούς αραιώνεται με διαδοχικές αραιώσεις με φυσιολογικό πλάσμα και επωάζεται στους 37°C για 2 ώρες. Στην συνέχεια μετρούνται τα επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα VIII. Με βάση τον ορισμό, μία μονάδα Bethesda ανά ml αναστέλλει την δραστηριότητα του παράγοντα VIII κατά 50% και ένας τίτλος 2 BU/ml κατά 75%. Χρησιμοποιώ την αραιώση, με την οποία τα επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα VIII είναι εντός του εύρους 25-75% και με βάση το αποτέλεσμα της μέτρησης στην αραιώση αυτή, υπολογίζω από την καμπύλη του πρωτοκόλλου Bethesda, την τιμή του αναστολέα. Την τιμή αυτή την πολλαπλασιάζω με την αραιώση που χρησιμοποίησα για την καμπύλη και το τελικό αποτέλεσμα θα είναι οι μονάδες του αναστολέα έναντι στον παράγοντα VIII (42).

2.6.2 Θεραπεία Ασθενών με Αναστολέα έναντι του Παράγοντα VIII:

Για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε ασθενείς με αιμορροφιλία A με αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII, γίνεται η διάκριση των ασθενών σε δύο κατηγορίες. Οι ασθενείς με αρχικά επίπεδα αναστολέα πάνω από 10 μονάδες Bethesda (BU) θεωρούνται ως υψηλά ανταποκρινόμενοι και οι ασθενείς με επίπεδα αναστολέα κάτω από 10 BU ταξινομούνται ως χαμηλά ανταποκρινόμενοι (26). Με άλλα λόγια, για την ταξινόμηση των ασθενών αξιολογείται η ανταπόκριση τους μετά την έκθεση στον παράγοντα VIII (1).

Η θεραπεία των ασθενών με αιμορροφιλία Α ή Β που έχουν αναπτύξει αναστολέα έναντι του παράγοντα που βρίσκεται σε ανεπάρκεια, στοχεύει στην **επαγωγή της ανοσολογικής ανοχής**, στην ελάττωση του τίτλου του αναστολέα και στη αντιμετώπιση των αιμορραγικών επεισοδίων (26). Όπως αναφέρεται παραπάνω, σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α και αναστολέα μπορεί να χορηγηθεί και το Emicizumab (42). Για την εξάλειψη του αναστολέα έναντι στον παράγοντα VIII η θεραπεία επαγωγής της ανοσολογικής ανοχής (Immune Tolerance Induction, ITI) θεωρείται η βέλτιστη θεραπεία. Κατά την ITI χορηγούνται για μεγάλο χρονικό αποτέλεσμα ανασυνδυασμένος παράγοντα VIII σε υψηλές συχνότητες. Το 70% των ασθενών με αιμορροφιλία Α με αναστολέα βρίσκεται σε ύφεση μετά την ITI (42). Για την αντιμετώπιση των αιμορραγικών επεισοδίων χορηγούνται **σκευάσματα ανασυνδυασμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VIIa ή συμπυκνώματα συμπλέγματος προθρομβίνης (aPCC) (50)** ή σκευάσματα παράγοντα παράκαμψης, όπως είναι το **Feiba® (27)**. Η σημαντικότερη ανεπιθύμητη αντίδραση από την λήψη των σκευασμάτων παραγόντων παράκαμψης είναι η πρόκληση θρόμβωσης (1).

3. Επίκτητη Αιμορροφιλία Α:

Η **επίκτητη αιμορροφιλία Α** αποτελεί μία σπάνια πάθηση που ορίζεται από την παρουσία αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII. Αποτελεί την πιο κοινή αιτία επίκτητων αναστολέων των παραγόντων πήξης. Αντισώματα έναντι των άλλων παραγόντων πήξης είναι εξαιρετικά σπάνια (51). Ο αναστολέας αυτός είναι συνήθως αυτοαντισώματα που στρέφονται κατά του παράγοντα VIII και παρεμποδίζουν την λειτουργία του (52). Η επίκτητη αιμορροφιλία Α μπορεί να είναι είτε ιδιοπαθής είτε να σχετίζεται με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, την περίοδο της λοχείας, και την χρήση φαρμάκων (1). Η ιδιοπαθής επίκτητη αιμορροφιλία Α αναφέρεται σε περίπου το 50% των περιστατικών. Η εμφάνιση ασθενών με επίκτητη αιμορροφιλία Α είναι 1 ανά 1 εκατομμύριο άτομα ετησίως. Τα επιδημιολογικά δεδομένα αυξάνονται με την ηλικία, καθώς η επίκτητη αιμορροφιλία Α εμφανίζεται σε περισσότερους ηλικιωμένους ασθενείς παρά στον μικρότερο σε ηλικία πληθυσμό (53). Τέλος, η θνησιμότητα της ασθένειας υπερβαίνει το 20% (54).

3.1 Παθοφυσιολογία και Κλινική Εικόνα Επίκτητης Αιμορροφιλίας Α:

Η επίκτητη αιμορροφιλία Α αποτελεί ένα **αυτοάνοσο νόσημα** που προκύπτει από την παρουσία **αυτοαντισωμάτων** έναντι του παράγοντα πήξης VIII. Τα αυτοαντισώματα αυτά είναι της κατηγορίας IgG και δεν συνδέονται με το συμπλήρωμα (52). Αποτελεί επίσης μία συχνά απαιτητική κλινική πρόκληση και απειλητική για την ζωή, λόγω της σοβαρότητας της αιμορραγίας, της υποεκτίμησης των κλινικών συμπτωμάτων και της καθυστέρησης της διάγνωσης (53). Το πιο κοινό σύμπτωμα της ασθένειας αυτής είναι η μη φυσιολογική ή αυθόρμητη αιμορραγία που εμφανίζεται στο δέρμα, στους βλεννογόνους και μαλακούς ιστούς και στους μύες (52). Μπορεί να ακολουθήσει οξεία αιμορραγία και οι ασθενείς παρουσιάζουν και γαστρεντερική, ουροποιητική και οπισθοπεριτοναϊκή αιμορραγία. Η κλινική εικόνα αυτή έρχεται σε αντίθεση με την κλινική εικόνα των ασθενών με αιμορροφιλία Α, όπου η αιμορροφιλική αρθροπάθεια είναι σύνηθες (51).

Η επίκτητη αιμορροφιλία Α μπορεί να είναι **ιδιοπαθής** όπως έχει προαναφερθεί αλλά μπορεί να οφείλεται και σε άλλες κλινικές καταστάσεις. Συμπαγείς όγκοι και λεμφοπολλαπλασιαστικές κακοήθειες, αυτοάνοσες διαταραχές όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το σύνδρομο Sjogren, διαταραχές του θυρεοειδή αλλά και δερματικές παθήσεις και συγκεκριμένα φάρμακα όπως η πενικιλίνη σχετίζονται με την επίκτητη αιμορροφιλία Α (53), (55). Έχουν αναφερθεί και περιστατικά επίκτητης αιμορροφιλίας Α σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Αυτοί οι ασθενείς παρουσίασαν ένα γιγάντιο αιμάτωμα το οποίο εξελίχθηκε σε υποδόρια αιμορραγία (54).

3.2 Διαγνωστική Προσέγγιση Επίκτητης Αιμορροφιλίας Α:

Η έγκαιρη διάγνωση και έναρξη της κατάλληλης θεραπείας αποτελεί σημαντικό βήμα για την ευνοϊκή έκβαση της επίκτητης αιμορροφιλίας Α (53). Στον

βασικό έλεγχο της αιμόστασης, που πραγματοποιείται σε όλους τους ασθενείς με αιμορραγικές διαθέσεις, παρατηρείται **παράταση του χρόνου μερικής ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης (aPTT)** και ο χρόνος προθρομβίνης (PT) και ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι φυσιολογικός (51). Πραγματοποιείται επίσης και πείραμα μίξης με ίσο όγκο φυσιολογικού πλάσματος και επώαση στους 37°C για 2 ώρες και επαναμέτρηση του aPTT. Παρατηρείται παράταση του aPTT μετά την επώαση, το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου αναστολέα ή αντιπηκτικών του λύκου (53). Στην συνέχεια διενεργείται έλεγχος για την ύπαρξη αντιπηκτικών του λύκου, ο οποίος για τους ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία A είναι αρνητικός. Για αυτό τον λόγο πραγματοποιείται η μέθοδος Bethesda για την ποσοτικοποίηση του τίτλου του αναστολέα (52). Επιπλέον, πραγματοποιείται και μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII. Η διάγνωση για την επίκτητη αιμορροφιλία A στηρίζεται στην αναγνώριση των μειωμένων επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII και την ύπαρξη του αναστολέα του παράγοντα (55). Σημαντικό ρόλο στην διάγνωση της έχει το πλήρες οικογενειακό ιστορικό, διότι οι ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία A θα πρέπει να έχουν αρνητικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό αυτόματων αιμορραγιών και να μην έχουν συγγενείς με κληρονομικές ανεπάρκειες των παραγόντων πήξης (53).

Για την ποσοτικοποίηση του τίτλου του αναστολέα του παράγοντα VIII χρησιμοποιείται το **πρωτόκολλο Bethesda**. Ο τίτλος του αναστολέα ορίζεται ως η αραιώση του πλάσματος του ασθενή που προκαλεί 50% μείωση της δραστηριότητας του παράγοντα VIII και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε μονάδες Bethesda. Οι αναστολείς χαρακτηρίζονται ως χαμηλού τίτλου όταν ο τίτλος τους είναι μικρότερος από 5 BU και ως υψηλού τίτλου όταν είναι μεγαλύτερος από 5 BU (1). Τα αλλοαντισώματα που ανιχνεύονται στην συγγενή αιμορροφιλία A είναι παρόμοια με τα αυτοαντισώματα της επίκτητης αιμορροφιλίας A και είναι πολυκλωνικά IgG. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τόσο τα αυτοαντισώματα όσο και τα αλλοαντισώματα αντιδρούν με τις ίδιες περιοχές του παράγοντα VIII, τις A2, A3 και C2, παρεμποδίζοντας έτσι την σύνδεση του με τον ενεργοποιημένο παράγοντα IXa, με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και με τον παράγοντα vWF (53).

Για να αξιολογηθεί ο τίτλος του αναστολέα στην επίκτητη αιμορροφιλία A θα πρέπει να αναλυθεί ο μηχανισμός της αιμορραγίας στην ασθένεια αυτή. Παρατηρείται διαφορά στο μοτίβο αδρανοποίησης του παράγοντα VIII μεταξύ των δύο αντισωμάτων. Τα αντισώματα που προκύπτουν στην συγγενή αιμορροφιλία A δρουν με μία χημική γραμμική κινητική αντίδραση πρώτης τάξης κατά το πρωτόκολλο Bethesda, ενώ τα αντισώματα της επίκτητης αιμορροφιλίας A δρουν με μη γραμμική χημική κινητική αντίδραση δεύτερης τάξης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο τίτλος του αναστολέα να μην σχετίζεται στενά με τον αιμορραγικό φαινότυπο και η σοβαρή αιμορραγία μπορεί να εμφανιστεί και σε ασθενείς με σχετικά υψηλά επίπεδα παράγοντα VIII, δηλαδή και σε ασθενείς με επίπεδα 10-20% (53).

3.3 Θεραπεία Επίκτητης Αιμορροφιλίας Α:

Η θεραπεία της επίκτητης αιμορροφιλίας Α στηρίζεται στην αντιμετώπιση της αιμορραγίας και εκκρίζωση του αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII. Η διαχείριση της θεραπείας των ασθενών θα πρέπει να γίνεται σε συνεργασία των κλινικών ιατρών με ένα έμπειρο κέντρο αιμορροφιλίας (55). Η αποτελεσματική αιμόσταση και ο έλεγχος της αιμορραγίας μπορούν να επιτευχθούν με μία ποικιλία μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνδυασμό αναλόγως την βαρύτητα του περιστατικού. Για την διόρθωση της ανεπάρκειας του παράγοντα VIII χορηγείται στον ασθενή με επίκτητη αιμορροφιλία Α προερχόμενο από ανθρώπινο πλάσμα σκευάσμα παράγοντα VIII. Μπορούν να του χορηγηθούν και **σκευάσματα ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII** ή και **δεσμοπρεσσίνη**. Για την παράκαμψη της δράσης του αναστολέα χορηγούνται **σκευάσματα ενεργού συμπλέγματος προθρομβίνης (aPCC)** και **ανασυνδυασμένος παράγοντας VIIa** ή και αφαίρεση του αναστολέα με **πλασμαφαίρεση** ή ανοσοπροσρόφηση (53). Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χορήγησης παραγόντων παράκαμψης είναι ότι δεν έχει επικυρωθεί κάποια εργαστηριακή μέθοδος για την παρακολούθηση των ασθενών που τους λαμβάνουν. Ωστόσο, η χρήση δοκιμών παραγωγής θρομβίνης (Thrombin Generation Assays, TGA) και η χρήση θρομβοελαστογραφίας μπορούν να βοηθήσουν στην παρακολούθηση των ασθενών, αλλά δεν έχουν δημοσιευθεί κάποια αποτελέσματα για τους ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία Α (55).

Οι ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία Α και με χαμηλό τίτλο αναστολέα, δηλαδή <5BU, συχνά αντιμετωπίζονται με επαρκείς δόσεις σκευασμάτων ανασυνδυασμένου ή ανθρώπινου παράγοντα VIII (1). Ωστόσο, αν αντιμετωπίζουν σοβαρή αιμορραγία συνήθως αντιμετωπίζονται με παράγοντες παράκαμψης, όπως με την χορήγηση σκευασμάτων ανασυνδυασμένου παράγοντα VIIa (εμπορική ονομασία Novoseven®) ή με συμπυκνώματα συμπλέγματος θρομβίνης (aPCC), το οποίο καλείται και παράγοντας παράκαμψης αναστολέα παράγοντα VIII από πλάσμα (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity, FEIBA) (56). Οι ασθενείς με υψηλό τίτλο αντισωμάτων δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία υπακατάστασης του παράγοντα VIII (1).

Οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει επιπλέον να λαμβάνουν και ανοσοκατασταλτική θεραπεία για την εξάλειψη των ανασταλτικών αυτοαντισωμάτων αμέσως μετά την διάγνωσή τους. Αυτό γίνεται γιατί οι ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία Α παραμένουν σε κίνδυνο θανατηφόρου αιμορραγίας μέχρι να αποκατασταθεί η φυσιολογική αιμόσταση. Για την επίτευξη της ανοσοκαταστολής, χορηγούνται στους ασθενείς είτε μόνο **κορτικοστεροειδή** είτε σε συνδυασμό με κυκλοφωσφαμίδη, με αζαθειοπρίνη, με κυκλοσπορίνη Α και με το μονοκλωνικό αντίσωμα rituximab (53). Οι πρόσφατες διεθνείς συστάσεις υποδηλώνουν την χορήγηση κορτικοστεροειδών σε συνδυασμό με το μονοκλωνικό **αντί-CD20** αντίσωμα **rituximab** σε ασθενείς με επίκτητη αιμορροφιλία Α με σοβαρή ανεπάρκεια του παράγοντα VIII ή με τίτλο αναστολέα >20 BU (56). Τέλος έχουν αναπτυχθεί και πρωτόκολλα επαγωγής ανοσολογικής ανοχής (ITI) (53).

4. Περιστροφική Θρομβοελαστογραφία:

Το 1948 ο Γερμανός Dr Helmut Hartert παρουσίασε την πρώτη ιξωδοελαστική εξέταση, την οποία ονόμασε **Θρομβοελαστογραφία**. Το 1953, οι MacFarlane και Biggs παρουσίασαν την μέθοδο μέτρησης της παραγωγής θρομβίνης στο αίμα. Όμως, εκείνη την στιγμή και οι δύο τεχνικές ήταν χρονοβόρες και απαιτητικές και δεν εφαρμόζονταν (57). Το 1948 η θρομβοελαστογραφία χρησιμοποιούταν στην έρευνα της αιμοστατικής ικανότητας του ολικού αίματος, ενώ στα τέλη της δεκαετίας του 1960 η ιξωδοελαστική αιμοστατική δοκιμασία της θρομβοελαστογραφίας με τον αναλυτή TEG® χρησιμοποιήθηκε σε χειρουργεία για την καθοδήγηση των ιατρών για την χορήγηση κατάλληλων παραγώγων αίματος κατά την διάρκεια χειρουργείων μεταμόσχευσης ήπατος (58). Αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην διάγνωση παθήσεων της πήξης και στην αιμοστατική θεραπεία παρά την κλίνη του ασθενούς. Έχει αποδειχθεί ότι με την θρομβοελαστογραφία μπορεί να ανιχνευθεί η υπερβολική επίδραση της ηπαρίνης και η αιμοαραίωση στον τομέα της καρδιοχειρουργικής. Με αυτά τα αποτελέσματα, γίνεται η κατάλληλη μετάγγιση παραγώγων αίματος μειώνοντας έτσι το κόστος της θεραπείας (57).

Με τον όρο **ιξωδοελαστικότητα** ορίζεται η ιδιότητα ορισμένων υλικών όταν και τα δύο εμφανίζουν ιξώδη και ελαστικά χαρακτηριστικά όταν υφίστανται παραμόρφωση. Το αίμα, αν και φυσιολογικά είναι παχύρευστο και κατά την διαδικασία της πήξης το αίμα χάνει το ιξώδες του και γίνεται ελαστικό. Επίσης, η ικανότητα ενός υλικού που αντιστέκεται στην παραμόρφωση ονομάζεται μέτρο διάτμησης ή μέτρο ακαμψίας ενός υλικού. Στα ιξωδοελαστικά συστήματα, ο όρος ισχύς θρόμβου αν και χρησιμοποιείται συχνά, μετριέται η ακαμψία του θρόμβου. Χρησιμοποιώντας τους αναλυτές **TEG® 500** και **ROTEM® delta**, το μέτρο διάτμησης εκτιμάται έμμεσα με την χρήση κυψελίδας και καρφίτσας, στην οποία προστίθεται το ολικό αίμα (58).

Το 1948 περιεγράφηκε αρχικά από το Hertert η θρομβοελαστογραφία (TEG), η οποία παρέχει μία εκτίμηση σε πραγματικό χρόνο της ιξωδοελαστικής ισχύος του θρόμβου σε ολικό αίμα. Η περιστροφική θρομβοελαστογραφία αποτελεί εξέλιξη της κλασσικής τεχνολογίας της θρομβοελαστογραφίας TEG®. Τόσο η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM®, όσο και η θρομβοελαστογραφία TEG® αποτελούν μέθοδοι **παρά την κλίνη** (Point of Care, POC) για τον έλεγχο της αιμόστασης και αξιολογούν την κινητική και δυναμική του θρόμβου (59).

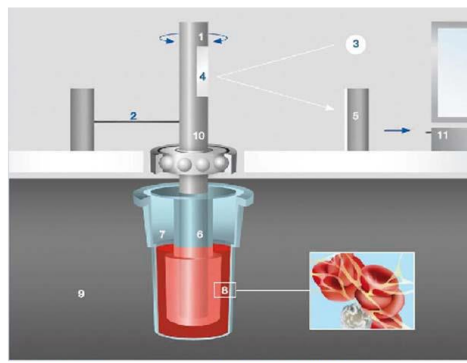
Η **περιστροφική θρομβοελαστογραφία** χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για την αξιολόγηση και παρακολούθηση των ασθενών με διαταραχές της πήξης. Με την μέθοδο αυτή, η κινητική του σχηματισμού θρόμβου απεικονίζεται σε διάγραμμα και διακρίνονται οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων πήξης, των αναστολέων, των θρομβοκυττάρων και του συστήματος ινωδόλυσης (60). Τέλος, το γράφημα αυτό μπορεί να βοηθήσει την παρακολούθηση των ασθενών με σήψη, αλλά και την διάγνωση και παρακολούθηση της θεραπείας των αιμορροφιλικών ασθενών αξιολογώντας όλο τον καταρράκτη πήξης (57).

4.1 Αρχή Μεθόδου Περιτροφικής Θρομβοελαστογραφίας:

Η θρομβοελαστογραφία TEG® και η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® αποτελούν ένα σύνολο δοκιμασιών που μετρούν την απόδοση και την κινητική του θρόμβου και κατά επέκταση της πήξης του αίματος (61). Η τεχνική της, που χρησιμοποιεί κατά βάση **ολικό αίμα**, πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει συνολικά την αιμόσταση in vivo, όπου τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος, που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους συμβάλλουν στην δημιουργία θρομβίνης και στην ινωδόλυση στα σημεία του τραυματισμού. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η παροχή της δυνατότητας της οπτικής αξιολόγησης του σχηματισμού του θρόμβου και της επακόλουθης λύσης του (62). Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να καθοδηγήσουν τους κλινικούς ιατρούς για την επιλογή του κατάλληλου παράγωγου αίματος κατά την μετάγγιση του ασθενούς. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται στις χειρουργικές επεμβάσεις και στις μονάδες εντατικής θεραπείας (61).

Η θρομβοελαστογραφία μετρά την ποσότητα της πήξης αλλά κυρίως και την ποιότητα του θρόμβου που δημιουργείται, η οποία δεν καταγράφεται από τον βασικό πηξιολογικό έλεγχο της αιμόστασης. Με την περιστροφική θρομβοελαστογραφία, που αποτελεί εξέλιξη της κλασσικής μεθόδου, αποφεύγονται πολλοί περιορισμοί που υπήρχαν. Με την κλασσική τεχνολογία του TEG®, η θρομβοελαστογραφία πραγματοποιείται γεμίζοντας μια ειδική για τον αναλυτή κυβέττα με ολικό αίμα και ένα έμβολο η οποία βυθίζεται στο αίμα. Στην συνέχεια η κυψελίδα περιστρέφεται κατά 4,45° ανά 5 δευτερόλεπτα. Καθώς σχηματίζεται ο θρόμβος η κίνηση αυτή περιορίζεται με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται οπτικά στο διάγραμμα (63).

Από την άλλη πλευρά, στην ανάλυση της **περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας** με την τεχνολογία ROTEM® χρησιμοποιούνται ειδικές κυψελίδες μιας χρήσης, στις οποίες με την ειδική αυτόματη πιπέττα του αναλυτή προστίθεται το κατάλληλο αντιδραστήριο και το δείγμα αίματος και η κυψελίδα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή που υπάρχει το ειδικό έμβολο (62). Το δείγμα αίματος τοποθετείται σε ειδικό θερμαινόμενο στήριγμα για επιτευχθεί η βέλτιστη θερμοκρασία, που είναι 37°C, για όλη την διάρκεια της ανάλυσης (64). Ο κυλινδρικός άξονας περιστρέφεται κατά 4,75° κάθε 6 δευτερόλεπτα. Μόλις η ιξωδοελαστική αντοχή αυξάνεται η κίνηση του άξονα παρεμποδίζεται και παρατηρείται οπτικά στο θρομβοελαστογράφημα το αποτέλεσμα (62). Στην Εικόνα 6 παρατηρείται η αρχή μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη, του ROTEM® delta.



Εικόνα 6: Αρχή Μεθόδου ROTEM® delta. Οι αριθμοί που διακρίνονται στην εικόνα αντιστοιχούν στα εξής: 1= Άξονας (+/- 4,75°), 2= Ελατήριο, 3= Πηγή φωτός/ δίοδος, 4=Κάτοπτρο, 5= Συσσκευή ανίχνευσης, 6=Έμβολο

αισθητήρα, 7=Κυψελίδα με ολικό αίμα, 8=Ινίδια ινώδους και συσσωματώματα θρομβοκυττάρων, 9=Θερμαινόμενο στήριγμα κυψελίδας, 10= Ρουλεμάν και 11= Επεξεργασία (59)

Το αίμα που χρησιμοποιείται είναι ολικό αίμα σε σωληνάριο με αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο 3,2% (sodium citrate) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εντός 4 ωρών μετά τη λήψη του . Το πλεονέκτημα της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® είναι η δυνατότητα παρακολούθησης όλου του καταρράκτη της πήξης μέσω ειδικών δοκιμασιών που θα αναλυθούν παρακάτω που ελέγχεται η εξωγενής και ενδογενής οδός της πήξης και η δράση της ηπαρίνης. Ωστόσο, δεν έχει την ικανότητα παρακολούθησης της αντιαιμοπεταλιακής θεραπευτικής αγωγής, σε αντίθεση με το εξελιγμένο TEG® που έχει την δυνατότητα παρακολούθησης της κλοπιδογρέλης χωρίς την παραγωγή της θρομβίνης, αλλά και της αναστολής του υποδοχέα του ADP των αιμοπεταλίων (65).

Τόσο το ROTEM® όσο και το TEG® αξιολογούν την κινητική και την δυναμική του σχηματισμού θρόμβου. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η τυπική συσκευή TEG® παρέχει την δυνατότητα ανάλυση 2 δειγμάτων ταυτόχρονα, ενώ η τροποποιημένη συσκευή αναλύει μόνο ένα δείγμα, σε αντίθεση με την τυπική συσκευή ROTEM® που αναλύει 4 δείγματα ταυτόχρονα. Επειδή, υπάρχουν διαφορές στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών τεχνολογιών, χρησιμοποιούνται διαφορετικές ονοματολογίες για να περιγράψουν τις ίδιες παραμέτρους (59). Παρόλα αυτά, έχουν ευρύ χρήση ως αναλυτές παρά τη κλίνη (Point Of Care, POC), καθώς παρέχουν γρήγορα αποτέλεσμα για την αιμόσταση του ασθενή. Τέλος, η ανάλυση ROTEM® έχει ενσωματωθεί σε διαγνωστικούς αλγορίθμους για την θεραπεία της αιμορραγίας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως οι ασθενείς που υποβάλλονται σε καρδιοχειρουργική επέμβαση ή υποφέρουν από εκτεταμένο τραύμα (64).

4.2 Δοκιμασίες Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:

Όπως αναφέρεται παραπάνω το μεγάλο πλεονέκτημα της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® είναι ότι αναλύονται τέσσερα δείγματα ασθενών ταυτόχρονα με μία δοκιμασία ή μπορούν να πραγματοποιηθούν για το ίδιο δείγμα ασθενούς τέσσερις διαφορετικές δοκιμασίες. Όταν χρησιμοποιούνται παρά την κλίνη του ασθενούς συνήθως εκτιμώνται μόνο οι παράμετροι ενεργοποίησης της πήξης και πολυμερισμού του ινώδους, οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω. Οι βασικές δοκιμασίες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είναι οι δοκιμασίες: **EXTEM**, **INTEM**, **FIBTEM** και **APTEM**. Με τις δοκιμασίες αυτές ελέγχεται αντίστοιχα η εξωγενής οδός της πήξης, η ενδογενής οδός της πήξης, η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης μετά τον αποκλεισμό των αιμοπεταλίων και η εκτίμηση της σταθερότητας του θρόμβου μετά τον αποκλεισμό της ινωδόλυσης (65). Με την δοκιμασία **EXTEM** παρέχονται πληροφορίες για την εξωγενή οδό της πήξης παρόμοιες με αυτές του **PT INR**, ενώ με την δοκιμασία **INTEM** παρέχονται πληροφορίες για την ενδογενή οδό της πήξης παρόμοιες με το **aPTT** (60). Τέλος, υπάρχουν και οι δοκιμασίες **HEPTEM**, στην οποία ενεργοποιείται η ενδογενής οδός της πήξης παρουσία του ενζύμου αποικοδόμησης της ηπαρίνης (65) και **NANTEM**, όπου το δείγμα αίματος αναλύεται μετά από επενασβεστοποίηση του (59). Στον Πίνακα 1 αναφέρονται οι ενεργοποιητές και η κλινική εφαρμογή των δοκιμασιών της θρομβοελαστογραφίας ROTEM®.

Πίνακας 1: Δοκιμασίες ROTEM

Δοκιμασία ROTEM	Ενεργοποιητές και άλλα προσθήκες	Κλινική εφαρμογή
EXTEM	Ανασυνδυασμένος Ιστικός παράγοντας και Πολυβρένιο και CaCl ₂	Μελετάται η εξωγενής οδός της πήξης και η δράση των παραγόντων II, V, VII, X
INTEM	Ελλαγικό οξύ και CaCl ₂	Μελετάται η ενδογενής οδός της πήξης και η δράση των παραγόντων II, V, X, VIII, IX, XI, XII
FIBTEM	Ανασυνδυασμένος Ιστικός Παράγοντας και Κυτοχλασίνη D και Πολυβρένιο και CaCl ₂	Η κυτοχλασίνη D παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της δοσολογίας συμπυκνωμένου ινωδογόνου
APTEM	Ανασυνδυασμένος Ιστικός παράγοντας και Τρανεξαμικό οξύ και Πολυβρένιο και CaCl ₂	Αναλύει την ινωδόλυση σε συνδυασμό με το EXTEM. Χρησιμοποιείται για την διαφοροδιάγνωση της ανεπάρκειας του παράγοντα XIII
HEPTEM	Ελλαγικό οξύ και Ηπαρίνωση CaCl ₂	Μελετάται η επίδραση της ηπαρίνης σε σύγκριση με INTEM
NANTEM	CaCl ₂	Το δείγμα ολικού αίματος αναλύεται μετά από επανασβεστοποίησή του

Πιο αναλυτικά, για την δοκιμασία **INTEM** ενεργοποιείται η ενδογενής οδός μέσω του συστήματος επαφής με φωσφολιπίδια και ελλαγικό οξύ (63). Η ενεργοποίηση της γίνεται από αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, όπως από την καολίνη και από το ελλαγικό οξύ. Παρέχει παρόμοιες πληροφορίες με αυτές του χρόνου ενεργοποίησης μερικής θρομβοπλαστίνης (**aPTT**) και ειδικότερα η παράμετρος **Clotting Time (CT)** (63), (64). Η δοκιμασία **EXTEM** εξετάζει την εξωγενή οδό της πήξης μέσω της ενεργοποίησής της μέσω του ιστικού παράγοντα (TF) (62). Οι παράμετροι που προκύπτουν από την δοκιμασία EXTEM αντιστοιχούν στο χρόνο προθρομβίνης (**PT INR**) του βασικού ελέγχου της αιμόστασης. Το κοινό των δύο αυτών δοκιμασιών είναι ότι η αντοχή του θρόμβου επηρεάζεται κυρίως από το ινωδογόνο και τα αιμοπετάλια. Οι παθολογικές τιμές συγκεκριμένων παραμέτρων αντικατοπτρίζουν την ανεπάρκεια των αντίστοιχων παραγόντων πήξης (64).

Επιπλέον, με την δοκιμασία **FIBTEM** παρέχεται η δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης του λειτουργικού **ινωδογόνου**, καθώς χρησιμοποιείται η κυτοχλασίνη D που αποτελεί αναστολέα των αιμοπεταλίων και αποτρέπει τη συμμετοχή τους στον σχηματισμό θρόμβου (63). Το σημαντικό πλεονέκτημα της δοκιμασίας αυτής είναι ότι παρέχονται γρήγορα πληροφορίες για την λειτουργικότητα του ινωδογόνου σε σχέση με την τροποποιημένη μέθοδο Clauss για την οποία απαιτείται περίπου μία ώρα για να είναι διαθέσιμο το αποτέλεσμα. Χρησιμοποιείται η δοκιμασία αυτή στην διαχείριση της ενεργής αιμορραγίας σε ασθενείς με τραύμα για την παροχή πρώιμης αντινωδολυτικής θεραπείας (64).

Με την δοκιμασία **APTEM** αξιολογείται η ινωδόλυση, χρησιμοποιώντας τον αναστολέα της πλασμίνης, την απροτινίνη για την αναστολή της ινωδόλυσης (62). Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας EXTEM και η μείωση του χρόνου πήξης (CT) και η αυξημένη μέγιστη ισχύς του θρόμβου (Maximum Clot Firmness, MCF) υποδηλώνει ινωδόλυση (64). Με την δοκιμασία **HEPTEM** που

χρησιμοποιείται σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με ηπαρίνη, παρέχονται αποτελέσματα για την επίδραση της. Επειδή το INTEM είναι ευαίσθητο στην ηπαρίνη συνιστάται να συνδυάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών INTEM και HEPTEM (63). Τέλος με την δοκιμασία NATEM αξιολογείται ο σχηματισμός θρόμβων σε κιτρικό ολικό αίμα προσθέτοντας μόνο CaCl₂ (62).

Ο χρόνος διεκπεραίωσης του βασικού ελέγχου της αιμόστασης είναι πιο χρονοβόρα από την μέθοδο της θρομβοελαστογραφίας. Για τον έλεγχο αυτό απαιτούνται κατά μέσο όρο 45 με 60 λεπτά, ενώ η θρομβοελαστογραφία μπορεί να παρέχει γρήγορα αποτελέσματα σε ασθενείς με σοβαρή αιμορραγία με την χρήση των κατάλληλων δοκιμασιών (59). Με την ανάλυση από τον θρομβοελαστογράφο ROTEM® delta παρέχεται λεπτομερής ανάλυση του καταρράκτη πήξης του ασθενή και την ινωδόλυσης και της επίδρασης της ισχύος του θρόμβου όταν χορηγείται στον ασθενή ηπαρίνη (58).

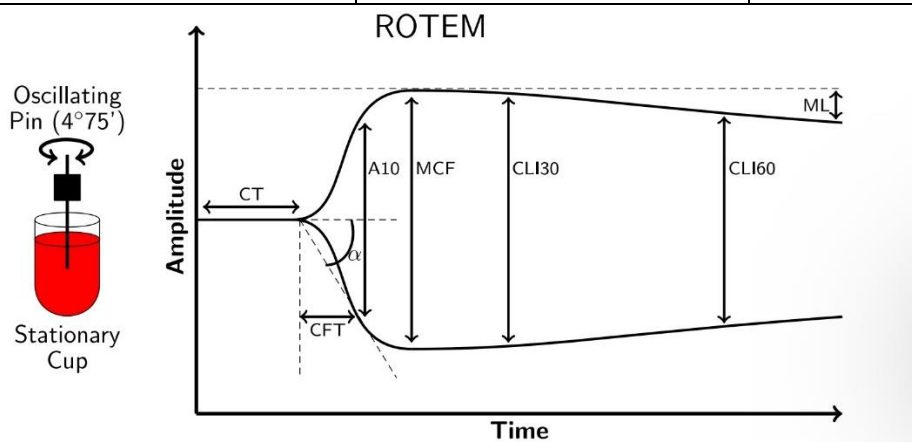
4.3 Παράμετροι Περιτροφικής Θρομβοελαστογραφίας:

Οι δοκιμασίες όπως η θρομβοελαστογραφία TEG® ή η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® μπορούν να αναλύσουν την λειτουργία της αιμόστασης, η οποία επηρεάζεται, παρά έναν παράγοντα πήξης που βρίσκεται σε ανεπάρκεια. Αυτές οι μέθοδοι χρειάζονται έμπειρο προσωπικό τόσο για την διεξαγωγή της όσο και για την ανάλυση της και συχνά δεν είναι διαθέσιμα για την κλίνη του ασθενούς σε όλα τα κέντρα θεραπείας (66). Επειδή στην συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη θα χρησιμοποιηθεί μόνο η τεχνολογία της θρομβοελαστογραφίας ROTEM®, και για αυτό τον λόγο θα αναλυθούν μόνο οι παράμετροι αυτής της μεθόδου.

Η κινητική κίνηση του εμβόλου ανιχνεύεται μηχανικά και εκφράζεται μέσω του υπολογισμού της **θρομβοελαστομετρικής καμπύλης**, από την οποία υπολογίζονται οι αριθμητικοί παράμετροι (65). Η θρομβοελαστομετρική καμπύλη διακρίνεται στην Εικόνα 7 ενώ στον πίνακα 2 και 3 διακρίνονται όλοι οι αριθμητικοί παράμετροι της θρομβοελαστογραφίας ROTEM®, όπως παρέχεται από το εγχειρίδιο χρήσης του αναλυτή. Οι βασικοί παράμετροι του θρομβοελαστογράφου ROTEM® είναι ο **χρόνος πήξης (Clotting Time, CT)**, ο **χρόνος σχηματισμού θρόμβου (Clot Formation Time, CFT)**, η **μέγιστη συνεκτικότητα του θρόμβου (Maximum Clot Formation, MCF)**, ο συντελεστής αντοχής ελαστικότητας διάτμησης G και η **γωνία α** που υποδηλώνει τον **ρυθμό πολυμερισμού του θρόμβου** (67). Η γωνία α είναι η εφαπτόμενη γωνία στην καμπύλη πήξης μέχρι το σημείο του πλάτους 2mm. Επιπλέον, αυτοί οι παράμετροι που αποτελούν τις παραμέτρους ρουτίνας του θρομβοελαστογραφήματος μαζί με τους παραμέτρους συνεκτικότητας και λύσης του θρόμβου βοηθούν τους εργαστηριακούς επιστήμονες και τους κλινικούς ιατρούς να αξιολογήσουν όλη την αιμόσταση του ασθενούς. Οι παράμετροι αυτοί είναι τα πλάτη **A5, A10, A15, A20, A25** και **A30** που υποδηλώνουν την συνεκτικότητα του θρόμβου στο αντίστοιχο χρονικό σημείο, η **μέγιστη λύση του θρόμβου (Maximum Lysis, ML)** και ο **δείκτης λύσης LI30, LI45** και **LI60** (65).

Πίνακας 2: Παράμετροι Ρουτίνας, Παράμετροι Συνεκτικότητας Θρόμβου, Παράμετροι Λύσης Θρόμβου, και Ερευνητικοί Παράμετροι

Σύμβολο	Παράμετρος	Μονάδα Μέτρησης	Ορισμός
Παράμετροι Ρουτίνας			
CT	Χρόνος Πήξης	sec	Ο χρόνος από την αρχή της δοκιμασίας μέχρι να επιτευχθεί το εύρος 2mm
CFT	Χρόνος Σχηματισμού Θρόμβου	sec	Ο χρόνος μεταξύ εύρους 2mm και 20mm
a	α-Γωνία	ο	Η γωνία μεταξύ της βαικής γραμμής και της εφαπτόμενης της καμπύλης πήξης μέσω του σημείου 2mm
Παράμετροι Συνεκτικότητας Θρόμβου			
MCF	Μέγιστη Συνεκτικότητα Θρόμβου	mm	Το μέγιστο εύρος που επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας
A5	Συνεκτικότητα σε χρόνο 5 min	mm	Η συνεκτικότητα του θρόμβου σε mm εύρους, στο αντίστοιχο χρονικό σημείο μετά τον CT
A10	Συνεκτικότητα σε χρόνο 10 min	mm	
A15	Συνεκτικότητα σε χρόνο 15 min	mm	
A20	Συνεκτικότητα σε χρόνο 20 min	mm	
A25	Συνεκτικότητα σε χρόνο 25 min	mm	
A30	Συνεκτικότητα σε χρόνο 30 min	mm	
Παράμετροι Λύσης του Θρόμβου			
ML	Μέγιστη Λύση	%	Η μέγιστη ανιχνεύσιμη λύση κατά τη διάρκεια του χρόνου εκτέλεσης, περιγράφεται και ως η διαφορά μεταξύ MCF και κατώτερου πλάτους, εκφράζεται στο % της MCF
LI30	Δείκτης Λύσης σε χρόνο 30 min	%	Λόγος του εύρους και της MCF σε δοθείσα χρονική στιγμή μετά το CT. Υπολογίζεται από την σχέση $A/MCF*100$
LI45	Δείκτης Λύσης σε χρόνο 45 min	%	
LI60	Δείκτης Λύσης σε χρόνο 60 min	%	
Ερευνητικοί Παράμετροι			
Ερευνητικοί Παράμετροι καμπυλών Παραγώγων			
MAXV	Μέγιστη Ταχύτητα	mm/min	το μέγιστο της 1ης παραγώγου της καμπύλης
MAXV-t	Χρόνος ως την Μέγιστη Ταχύτητα	sec	Χρόνος από την έναρξη της αντίδρασης μέχρι της επίτευξη της MAXV
AUC	Εμβαδόν κάτω από τον 1ο Παράγωγο της καμπύλης	mm*100	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη της 1ης παραγώγου από της αρχή μέχρι της επίτευξη MCF



Εικόνα 7: Καμπύλης Αντίδρασης ROTEM® delta (58)

Πίνακας 3: Υπόλοιποι Ερευνητικοί Παράμετροι

Σύμβολο	Παράμετρος	Μονάδα Μέτρησης	Ορισμός
Άλλοι Ερευνητικοί Παράμετροι			
CFR	Ρυθμός σχηματισμού θρόμβου	ο	Γωνία ανάμεσα στη βασική γραμμή και την εφαπτόμενη της καμπύλης
ACF	Πραγματική συνεκτικότητα Θρόμβου	mm	Συνεκτικότητα του Θρόμβου
MCF-t	MCF χρόνος	sec	Ο χρόνος από το CT μέχρι την επίτευξη του MCF
MCE	Μέγιστη ελαστικότητα θρόμβου $MCE=100*MCF/100-MCF$		Η MCE είναι παράμετρος υπολογιζόμενη από την MCF
AR5	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 5 min	mm ²	Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη από το CT μέχρι το αντίστοιχο χρονικό σημείο
AR10	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 10 min	mm ²	
AR15	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 15 min	mm ²	
AR20	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 20 min	mm ²	
AR25	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 25 min	mm ²	
AR30	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη σε 30 min	mm ²	
LOT	Χρόνος Έναρξης Λύσης	sec	Το χρονικό διάστημα από το CT μέχρι την έναρξη σημαντικής λύσης
CLR	Ρυθμός Λύσης Θρόμβου	ο	Η ισχυρότερη λύση, περιγραφόμενη με την γωνία ανάμεσα από την βασική γραμμή
LT	Χρόνος Λύσης	sec	Ο χρόνος από το CT μέχρι την ελάττωση κατά 10% της MCF
G	$G=5000*MCF/100-MCF$		Είναι υπολογιζόμενη παράμετρος
TPI	Δείκτης Θρομβοδυναμικής Τάσης $TPI=EMX/k$ και $EMX=100*MCF/100-MCF$		Περιγράφει την συνολική πηκτική κατάσταση του ασθενή

Πιο αναλυτικά, ο χρόνος πήξης CT είναι ο χρόνος από την έναρξη της μέτρησης μέχρι τον σχηματισμό του θρόμβου. Η παράμετρος CT επηρεάζεται από την ενεργό δράση των παραγόντων πήξης των αντίστοιχων δοκιμασιών και αποτελεί σημαντική παράμετρο για την παρακολούθηση της θεραπείας των ασθενών με αιμορροφιλία. Ο χρόνος σχηματισμού του θρόμβου (CFT) είναι ο χρόνος από την έναρξη της πήξης μέχρι να ανιχνευθεί σταθερότητα θρόμβου 20mm. Η παράμετρος αυτή επηρεάζεται από την δραστηριότητα των παραγόντων πήξης, και των αιμοπεταλίων και του σχηματισμού θρομβίνης. Επιπλέον, ο μέγιστος σχηματισμός θρόμβου (MCF) αντιπροσωπεύει την σταθερότητα του θρόμβου και επηρεάζεται από την συγκέντρωση ινώδους και ινωδογόνου. Η μέγιστη λύση (ML) είναι η μείωση της σταθερότητας του θρόμβου μετά τον MCF και υποδηλώνει στην σταθερότητα του θρόμβου (63). Τέλος, στον Πίνακα 4 διακρίνονται οι φυσιολογικές τιμές για τις παραμέτρους ρουτίνας που παρέχονται από τον ROTEM® delta (59).

Πίνακας 4: Φυσιολογικά Όρια ROTEM® delta

Δοκιμασία	Clotting Time (sec)	Clot Formation Time (sec)	MCF(mm)	Maximum Lysis (%)
EXTEM	38-79	34-159	50-72	<15
INTEM	100-240	30-130	50-72	<15
FIBTEM			9-25	
APTEM	Ο καλύτερος σχηματισμός Θρόμβων σε σύγκριση με ένα πρώιμο σημάδι υπερνωδύλης			
HEPTEM	Η καλύτερη ποιότητα θρόμβου σε σύγκριση με το INTEM και υποδηλώνει την παρουσία ηπαρίνης ή αντιπηκτικών που μοιάζουν με ηπαρίνη στο δείγμα			

4.4 Περιορισμοί Χρήσης Θρομβοελαστογραφίας:

Όπως γίνεται σε κάθε ανάλυση έτσι και στην θρομβοελαστογραφία παρατηρούνται κάποιοι περιορισμοί (57). Σύμφωνα με τις πρόσφατες μελέτες, στις οποίες ερευνώνται η σχέση μεταξύ των αναλυτών TEG® και ROTEM®. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες υπέδειξαν ότι οι δύο αυτοί αναλυτές συχνά αλληλοκαλύπτονται και ο συνδυασμός τους παρέχει πιο αξιόπιστα και ολοκληρωμένα αποτελέσματα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμα οι κατάλληλες συστάσεις για το ποιοι εκκινητές παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα, αλλά και για το ποιες παράμετροι θα πρέπει να αξιολογούνται (68).

Τα δεδομένα για την ακρίβεια της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® είναι περιορισμένα και δεν υπάρχουν δεδομένα για την αξιοπιστία της μεθόδου. Η ποιότητα της μέτρησης αξιολογείται ιδανικά από την ακρίβεια της μεθόδου και από το πόσο καλά οι μετρήσεις που προκύπτουν αντικατοπτρίζουν την πραγματική τιμή. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα εργαστηρίου παρατηρήθηκε ότι ο αναλυτής ROTEM® delta έχει υψηλή αναπαραγωγιμότητα σε όλες τις δοκιμές με ελάχιστες διακυμάνσεις. Για αυτό τον λόγο θεωρείται ιδανικά για την χρήση παρά την κλίνη του ασθενούς από εκπαιδευμένο μη εργαστηριακό προσωπικό (69).

Ο κύριος περιορισμός της περιστροφικής θρομβοελαστογραφία ROTEM® είναι ότι δεν μπορεί να αξιολογηθεί η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο και η δράση του κολλαγόνου. Για τον λόγο αυτό, η θρομβοελαστογραφία ROTEM® δεν είναι κατάλληλο για την διάγνωση της νόσου von Willebrand, γιατί το ROTEM® δεν είναι ευαίσθητο σε αιμορραγικές διαταραχές που σχετίζονται με ανωμαλίες των αιμοφόρων αγγείων (57). Επιπλέον, δεν μπορεί να εκτιμηθεί η ανεπάρκεια ενός συγκεκριμένου παράγοντας πήξης, ο οποίος μπορεί να βρίσκεται σε ανεπάρκεια. Παρόλα αυτά, η θρομβοελαστογραφία έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα αξιόπιστο και γρήγορο εργαλείο για την διαχείριση της ενεργούς αιμορραγίας (64).

4.5 Κλινικές Εφαρμογές Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας:

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί η περιστροφική θρομβοελαστογραφία επειδή χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σαν αναλυτής παρά την κλίνη του ασθενούς, έχει ευρύ φάσμα κλινικών εφαρμογών. Η σημαντικότερη χρήσης της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας είναι για τη γρήγορη **αντιμετώπιση του τραύματος** και των περιστατικών σοβαρής αιμορραγίας. Σε αντίθεση με τον κλασικό έλεγχο της αιμόστασης, που παρέχει βασικές πληροφορίες για οποιαδήποτε διαταραχή της πήξης, με την περιστροφική θρομβοελαστογραφία που χρησιμοποιεί ολικό αίμα παρέχονται γρήγορα πληροφορίες για τον σχηματισμό του θρόμβου, για την ινωδολύση αλλά και για τυχόν διαταραχές στην ενδογενή ή εξωγενή οδό της πήξης (62). Επιπλέον, το σοβαρό τραύμα μπορεί να οδηγήσει σε οξεία τραυματική πήξη (Acute Traumatic Coagulopathy), με την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C, την διαταραχή του ενδοθηλιακού γλυκοκάλυκα και με την κατανάλωση του ινωδογόνου, με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων (63). Οι ασθενείς με οξεία τραυματική πήξη εμφανίζουν υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας, τα οποία οφείλονται στην

καθυστέρηση της χορήγησης της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο βασικός έλεγχος της αιμόστασης απαιτεί περίπου μία ώρα. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιείται η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM®, με την οποία παρέχονται γρήγορα αποτελέσματα για την θεραπεία των ασθενών αυτών με το κατάλληλο παράγωγο αίματος (62). Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί σε περιστατικά μετά από δάγκωμα δηλητηριώδους φιδιού, όπου με τον αναλυτή ROTEM® ανιχνεύθηκε η υποπηκτικότητα του ασθενή και του χορηγήθηκε έγκαιρα η κατάλληλη θεραπεία (60).

Μία ακόμα σημαντική κλινική εφαρμογή της θρομβοελαστογραφίας ROTEM® είναι κατά την **θεραπεία υποκατάστασης σε ασθενείς με κληρονομικές διαταραχές του ινωδογόνου**. Οι διαταραχές αυτές είναι σπάνιες ασθένειες και επηρεάζουν την ποσότητα του κυκλοφορούντος ινωδογόνου, την ποιότητά του ή και τα δύο. Με την δοκιμασία FIBTEM της θρομβοελαστογραφίας ROTEM® παρέχονται γρήγορα αποτελέσματα για την λειτουργικότητα του ινωδογόνου. Με την εφαρμογή των ειδικών αλγορίθμων που βασίζονται σε αυτή και με την χρήση του ανασυνδυσμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VIIa, μειώθηκαν τα επίπεδα θνησιμότητας των διαταραχών αυτών (64). Ο ανασυνδυσμένος παράγοντας VIIa που χορηγείται σε αυτούς τους ασθενείς αποτελεί ισχυρό αιμοστατικό παράγοντα που αντιδρά με τον ιστικό παράγοντα στα σημεία του τραυματισμού των αγγείων για την ενεργοποίηση του παράγοντα X. Επίσης, ενεργοποιεί απευθείας τον παράγοντα X και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκρηξη παραγωγής θρομβίνης. Αναλόγως τα αποτελέσματα της θρομβοελαστογραφίας οι κλινικοί ιατροί χορηγούν την κατάλληλη ποσότητα ανασυνδυσμένου παράγοντα VIIa στους ασθενείς (70).

Χρησιμοποιείται, επίσης, και στον τομέα της **καρδιοχειρουργικής**, όπου πρέπει γρήγορα να αντιμετωπιστεί η πιθανή αιμορραγία σε αυτές τις χειρουργικές επεμβάσεις. Έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι που περιλαμβάνουν την ανάλυση με την χρήση θρομβοελαστογραφίας TEG® και περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπείας της αιμορραγίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στον τομέα της **μαιευτικής**, όπου ο κλασικός έλεγχος της αιμόστασης συσχετίζεται ελάχιστα με την επιλόχειο αιμορραγία. Για αυτό τον λόγο, οι αλγόριθμοι που έχουν προταθεί στηρίζονται στην χρήση τους για την θεραπεία συγκεκριμένων ανεπαρκειών την πήξης στους ασθενείς αυτούς (59).

Η περιστροφική θρομβοελαστογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κατά την **μεταμόσχευση ήπατος**. Λόγω των υποκείμενων παθήσεων της πήξης, που προκαλούνται από την κίρρωση του ήπατος, την αντικατάσταση της απώλειας μεγάλων ποσοτήτων αίματος δημιουργείται ένα περίπλοκο αιμοστατικό προφίλ στους ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση ήπατος. Επειδή δεν μπορεί να περιγράψει από τον βασικό έλεγχο της αιμόστασης, χρησιμοποιείται η περιστροφική θρομβοελαστογραφία, με την οποία παρέχεται γρήγορα η ανάλυση όλης της αιμόστασης του ασθενούς (59). Τέλος, σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση της και σε περιστατικά μεγάλων παιδιατρικών επεμβάσεων, όπου η θρομβοελαστογραφία πραγματοποιήθηκε εντός της χειρουργικής αίθουσας. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποδείχθηκε ότι ήταν το ίδιο αξιόπιστα με τα αποτέλεσμα

της θρομβοελαστογραφίας που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο αίμαστασης του νοσοκομείου (71).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχει καταγραφεί η χρήση της θρομβοελαστογραφίας σε ασθενείς που βρίσκονται στην **Μονάδα Εντατικής Θεραπείας**. Οι ασθενείς αυτοί, παρουσίασαν διαταραχές της πήξης του αίματος, όπως την ινωδόλυση, την ενεργοποίησης φλεγμονώδους μονοπατιών ή τους χορηγήθηκαν παράγοντες πήξης, και απαιτήθηκε η χορήγηση ηπαρίνης. Επειδή η δοκιμασία INTEM επηρεάζεται από την χορήγηση ηπαρίνης καθώς μεταβάλλονται ορισμένες παράμετροι, στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιείται και η δοκιμασία HEPTEM, η οποία αξιολογείται μαζί με την δοκιμασία INTEM (72). Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ασθενείς με ενεργό φλεγμονώδες έντερο, όπου με την θρομβοελαστογραφία ROTEM® παρέχεται η ολοκληρωμένη αξιολόγηση της αιμόστασης των ασθενών, αλλά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επιλογή των ασθενών που θα χρειαστούν αντιπηκτική αγωγή (73).

4.6 Ρόλος Θρομβοελαστογραφίας στην Αιμορροφιλία Α:

Όπως αναφέρεται παραπάνω η αιμορροφιλία Α οφείλεται σε κληρονομική ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Οι υπάρχουσες εξετάσεις, που πραγματοποιούνται για την εκτίμηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII, ποσοτικοποιούν την ποσότητα του παράγοντα VIII, αλλά δεν αξιολογείται ο βαθμός ανεπάρκειας και η πρόβλεψη της αιμοστατικής απόκρισης σε παράγοντες παράκαμψης. Υπάρχουν λίγες *in vitro* ή *ex vivo* μελέτες, στις οποίες η θρομβοελαστογραφία ROTEM® μπορεί να καθορίσει τον φαινότυπο των ασθενών με αιμορροφιλία Α και να αξιολογήσει την ανταπόκρισή τους σε θεραπεία με παράγοντες παράκαμψης (59). Με την χρήση της δοκιμασίας INTEM μπορούν να διαχωριστούν οι ασθενείς με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία Α με αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII από τους ασθενείς με σοβαρής βαρύτητα αιμορροφιλία Α χωρίς αναστολέα (74). Στην μελέτη των He et al., στη οποία πραγματοποιήθηκε η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® με την χρήση σε πρώτη φάση πλάσματος ασθενών με αιμορροφιλία Α, όπως πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την ερευνητική εργασία, παρατηρήθηκε ότι η ανάλυση ROTEM® με την χρήση αντιδραστηρίου aPTT και TF παρείχε καλύτερα αποτελέσματα για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του παράγοντα VIII (75).

Για την θεραπεία των αιμορραγικών επεισοδίων σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α με αναστολέα, χορηγούνται παράγοντες παράκαμψης, όπως ο ανασυνδυασμένος ενεργοποιημένος παράγοντα VIIa και τα συμπυκνώματα συμπλόκου προθρομβίνης (aPCC). Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αυτής της θεραπευτικής αγωγής χρησιμοποιούνται οι ιξωδοελαστικές μέθοδοι, όπως η θρομβοελαστογραφία TEG® και η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM®. Σε σύγκριση με τις κλασσικές πηξιολογικές μέθοδοι, η περιστροφική θρομβοελαστογραφία παρέχει πιο λεπτομερή και σφαιρική λειτουργία της αιμόστασης του ασθενούς (76). Με την χρήση των παραγόντων παράκαμψης, δεν μπορεί να αξιολογηθεί ο βασικός έλεγχος της αιμόστασης για την παρακολούθηση της θεραπείας των ασθενών που τα λαμβάνουν. Οι ιξωδοελαστικές δοκιμασίες από την άλλη παρέχουν τις κατάλληλες πληροφορίες

για την χορήγηση και παρακολούθηση της θεραπείας με παράγοντες παράκαμψης (77). Τέλος, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, παρατηρείται διαφορά στις παραμέτρους της περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® σε ασθενείς μετά από έγχυση ανασυνδυσμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VIIa και συμπυκνωμάτων συμπλόκου προθρομβίνης (aPCC), αλλά δεν έχει αναφερθεί διαφορά στην αξιολόγηση της θεραπείας και του ελέγχου της αιμόστασης και για αυτό παρέχεται η δυνατότητα εξατομίκευσης της δόσης του παράγοντα παράκαμψης (78).

Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με emicizumab αλλά και με ταυτόχρονη χορήγηση παραγόντων παράκαμψης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ιξωδοελαστικές δοκιμασίες. Η περιστροφική θρομβοελαστογραφία ROTEM® παρέχει πληροφορίες για την ικανότητα σχηματισμού θρόμβου σε ασθενείς με αιμορροφιλία A που λαμβάνουν emicizumab με ή χωρίς ταυτόχρονη χορήγηση παραγόντων παράκαμψης (79). Τέλος, επειδή το μονοκλωνικό αντίσωμα emicizumab μειώνει κατά πολύ τον χρόνο ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης, συνιστάται μαζί με την δοκιμασία INTEM να πραγματοποιείται και η δοκιμασία NATEM (80).

5. Σκοπός της Εργασίας:

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η αιμορροφιλία Α οφείλεται σε κληρονομική ανεπάρκεια του παράγοντα VIII. Επίσης, με την χρήση της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας, με την ειδική δοκιμασία Intem αναλύεται η ενδογενής οδός της πήξης και μπορεί να εκτιμηθεί γρήγορα το aPTT και τα επίπεδα δραστηριότητας του παράγοντα VIII. Μπορεί να εκτιμηθεί με αυτό τον τρόπο γρήγορα η αποτελεσματικότητα της θεραπείας των ασθενών με αιμορροφιλία Α. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των άλλων τριών δοκιμασιών που πραγματοποιούνται μπορεί να εκτιμηθεί και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με παράγοντες παράκαμψης, όπως του ανασυνδυασμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VIIa, που χορηγούνται σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α με αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η εκτίμηση της συσχέτισης της τιμής του παράγοντα VIII και του aPTT με τις παραμέτρους της θρομβοελαστογραφίας από τον ROTEM® delta, με απώτερο στόχο τη γρήγορη εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών με αιμορροφιλία Α. Για την μελέτη και σύγκριση των παραμέτρων της θρομβοελαστογραφίας των δειγμάτων πλάσματος των ασθενών, χρησιμοποιήθηκαν πλάσμα μαρτύρων υγείων αιμοδοτών από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο. Ο βασικός έλεγχος της αιμόστασης και η μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο 2022-2023, όπου οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α πραγματοποίησαν εξετάσεις στο Τμήμα Αιμόστασης του Κέντρου Αιμοδοσίας και του Κέντρου Αιμορροφιλικών Ασθενών του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο. Αφού ελέγχθηκε το αρχείο του εργαστηρίου, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα δείγματα, στα οποία διενεργήθηκε η θρομβοελαστογραφία.

Β. Πειραματικό Μέρος:

Σε αυτό το μέρος της εργασίας θα περιγράψουν αναλυτικά τα υλικά αλλά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της έρευνας στο Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο στο τμήμα Αιμοδοσίας – Αιμόστασης. Κατά την περίοδο 2022-2023 σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α πραγματοποιήθηκε, από το προσωπικό του εργαστηρίου της Αιμόστασης του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειου, ο εργαστηριακός έλεγχος είτε λόγω του ετήσιου ελέγχου τους είτε λόγω της σύστασης για την παρακολούθηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII από τον θεράπων ιατρός τους επειδή άλλαξαν την θεραπευτική αγωγή τους. Αφού πραγματοποιήθηκε ο βασικός έλεγχος της αιμόστασης (PT sec, PT INR, aPTT, Ινωδογόνο και D-Dimer), τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C σε επαρκή αριθμό μικρών σωληνάρων no codes push cap tubes. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ο έλεγχος των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII είτε με την μέθοδο του ενός σταδίου είτε με χρωμογονικό προσδιορισμό. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ορίζεται από το σκεύασμα ανασυνδυασμένου ή ανθρώπινου παράγοντα VIII που λαμβάνουν οι ασθενείς.

Κατά την περίοδο 03/2024-07/2024, αφού ελέγχθηκε το αρχείο του εργαστηρίου επιλέχθηκαν δείγματα ασθενών, στους οποίους η θεραπευτική αγωγή άλλαξε κατά την περίοδο 2022-2023. Επιλέχθηκαν για κάθε ασθενή δείγματα με την παλιά θεραπεία και με υψηλή τιμή επιπέδου παράγοντα VIII και με χαμηλή τιμή. Με την καινούργια θεραπευτική αγωγή επιλέχθηκαν πάλι δείγματα για τον ίδιο ασθενή με χαμηλή και υψηλή τιμή επιπέδων δραστηριότητας παράγοντα VIII. Αυτό αποσκοπεί στον έλεγχο όλης της θεραπευτικής πορείας των ασθενών. Στα δείγματα που επιλέχθηκαν τελικά πραγματοποιήθηκε την περίοδο 03/2024-07/2024 η θρομβελαστογραφία με τον αναλυτή ROTEM® delta. Τέλος θα αναλυθούν τα αποτελέσματα αυτής της ερευνητικής εργασίας και τα συμπεράσματα που προκύπτουν.

6. Υλικά και Μέθοδοι:

Τα υλικά που απαιτήθηκαν για την διεξαγωγή αυτής της ερευνητικής εργασίας θα αναφερθούν παρακάτω. Θα αναφερθούν τα αναλώσιμα υλικά, τα αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν για τον βασικό έλεγχο της αιμόστασης, για την μέτρηση του παράγοντα VIII με την μέθοδο του ενός σταδίου και με τον χρωμογονικό προσδιορισμό και για την θρομβελαστογραφία. Τέλος, θα αναφερθούν και τα εργαστηριακά όργανα που απαιτήθηκαν για την διεξαγωγή της.

6.1 Αναλώσιμα Υλικά:

Τα **υλικά αναλώσιμα** που απαιτήθηκαν για την διεξαγωγή αυτή της μελέτης είναι τα εξής:

1. Φιαλίδια κενού πλαστικό με αντιπηκτικό Sodium Citrate (3.2%) χωρητικότητας 2,7ml
2. BD Vacutainer Ultra Touch™ Push Button Blood Collection set με διάμετρο βελόνας 21G

3. Πιπέττες Pasteur χωρητικότητας 1ml
4. No coded Push Cap Tubes U-Bottom χωρητικότητας 1,4ml
5. Ειδικά πώματα Piercable TPE capclusters
6. Σωληνάρια RIA
7. Κυψελίδες ειδικές για τον αναλυτή ROTEM® delta (Cups and Pin pro)
8. Πλαστικά ρύγχη για την αυτόματη πιπέττα του αναλυτή ROTEM® delta
9. Eppendorf tubes χωρητικότητας 2ml
10. Samply cups ειδικά για τον αναλυτή ACL TOP 750
11. Πλαστικά ρύγχη για την αυτόματη πιπέττα των 1000μL

6.2 Αντιδραστήρια – Διαλύτες:

Τα αντιδραστήρια που απαιτήθηκαν για την διεξαγωγή αυτής της μελέτης διακρίνονται παρακάτω ανάλογα με τον έλεγχο που διενεργήθηκε. Για τον **βασικό έλεγχο της αιμόστασης** απαιτήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

1. INNOVANCE® Thromborel® S Reagent
2. INNOVANCE® Pathromtin® SL Reagent
3. INNOVANCE® Multifibren® U Reagent
4. INNOVANCE® D-Dimer Reagent
5. INNOVANCE® Control N και P
6. Water For Injection

Για τον έλεγχο των επιπέδων δραστηριότητας του **παράγοντα VIII** με την **μέθοδο του ενός σταδίου** απαιτήθηκαν:

1. STA® - Owren-Koller
2. STA® - C.K. Prest
3. Μαγνητική ράβδος για την ανάδευση του C.K. Prest
4. STA® - PTT A
5. STA® - CaCl₂ 0.025M
6. STA® - Unicallibrator
7. STA® - System Control N και P
8. STA® - Deficient Plasma VIII
9. Water For Injection

Για τον έλεγχο των επιπέδων δραστηριότητας του **παράγοντα VIII** με τον **χρωμογονικό προσδιορισμό** απαιτήθηκαν:

1. ACL® Clean B
2. ACL® Clean B diluted 1:8
3. BIOPHEN™ R1: Ανθρώπινος παράγοντας FX
4. BIOPHEN™ R2: Ενεργοποιημένος παράγοντας IXa και ανθρώπινη θρομβίνη και ασβέστιο
5. BIOPHEN™ R3: Χρωμογονικό Υπόστρωμα SXa-11
6. BIOPHEN™ R4: Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-BSA Buffer
7. BIOPHEN™ Normal Control παράγοντα VIII
8. BIOPHEN™ Plasma Callibrator

9. STA® - Deficient Plasma VIII
10. Water For Injection

Για την διεξαγωγή της θρομβοελαστογραφίας στον αναλυτή ROTEM® delta απαιτήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

1. ROTEM star-tem 10®
2. ROTEM ex-tem®
3. ROTEM in-tem®
4. ROTEM fib-tem®
5. ROTEM ap-tem®

6.3 Εργαστηριακά Όργανα:

Τα **εργαστηριακά όργανα** που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι τα εξής:

1. Ψυχόμενη φυγόκεντρος HERAUS
2. Αναλυτής εξετάσεων πήξης
3. Αναλυτής εξετάσεων αιμόστασης STA-R® Max3
4. Αναλυτής εξετάσεων αιμόστασης ACL TOP 750®
5. Αναλυτής Θρομβοελαστογραφίας ROTEM® delta
6. Αυτόματη Πιπέττα 1000μl

7. Πειραματική Πορεία:

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθεί η πειραματική πορεία της διεξαγωγής αυτής της ερευνητικής εργασίας. Όπως έχει αναφερθεί, οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α είτε λόγω του ετήσιου ελέγχου τους είτε λόγω σύστασης από το θεράπων ιατρό τους επειδή άλλαξαν την θεραπευτική τους αγωγή πραγματοποιήσαν ο εργαστηριακός έλεγχος που περιλάμβανε τον βασικό έλεγχο της αιμόστασης (PT sec, PT INR, aPTT, Ινωδογόνο και D-Dimer) και ο έλεγχος των επιπέδων δραστικότητας του παράγοντα VIII. Στην συνέχεια την περίοδο 03/2024-07/2024 ελέγχθηκε το αρχείο του εργαστηρίου και επιλέχθηκαν τα τελικά δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε η θρομβοελαστογραφία. Η επιλογή των κατάλληλων δειγμάτων περιγράφεται παραπάνω.

7.1 Λήψη και Προετοιμασία Δείγματος:

Αρχικά, κατά την περίοδο 2022-2023 οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α του Ιατρείου Αιμορροφιλίας, του τμήματος Αιμόστασης του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειου, πραγματοποίησαν εργαστηριακό έλεγχο των επιπέδων δραστικότητας του παράγοντα VIII. Σε κάθε ασθενή έγινε η λήψη τριών σωληνάρων με αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο 3,2%. Η αιμοληψία έγινε με τη χρήση πεταλούδας συγκεκριμένου τύπου (Ultra Touch™ Push Button Blood Collection set), με διάμετρο βελόνας 21G. Για την λήψη των σωληνάρων συνιστάται στην αρχή της αιμοληψίας να συλλέγεται ένα σωληνάριο με ειδικό gel για την συλλογή του ορού του αίματος (πήγμα), που έχει πορτοκαλί πάσμα και μετά να χαλαρώνει η περιίδεση και να πραγματοποιείται η λήψη των σωληνάρων με το αντιπηκτικό.

Τα σωληνάρια αυτά, μόλις καταχωρηθούν και λάβουν αριθμό αρχείου του εργαστηρίου φυγοκεντρώνται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο HERAUS® στις 3.500 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Στην συνέχεια το ένα σωληνάριο χρησιμοποιήθηκε για τον βασικό έλεγχο ρουτίνας της αιμόστασης, και από τα άλλα δύο συλλέχθηκε με τις πιπέτες Pasteur επαρκής αριθμός ειδικών σωληνάρων (No coded Push Cap Tubes U-Bottom) το πλάσμα του ασθενούς. Τέλος, τα πλάσματα τοποθετούν σε ειδικές θέσεις racks και αποθηκεύονται στους -80°C για φύλαξη. Ένα τέτοιο σωληνάριο θα ξεπαγώσει στο υδατόλουτρο του εργαστηρίου στους 37°C για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των επιπέδων της δραστικότητας του παράγοντα VIII όταν προγραμματιστεί από το εργαστήριο Αιμόστασης.

7.2 Βασικός Έλεγχος Ρουτίνας της Αιμόστασης:

Όπως προαναφέρθηκε στο ένα σωληνάριο που συλλέχθηκε από τον ασθενή πραγματοποιήθηκε ο βασικός έλεγχος ρουτίνας του εργαστηρίου που περιλαμβάνει την μέτρηση (PT sec, PT INR, aPTT, Ινωδογόνο και D-Dimer). Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή της πήξης BCS-XP, στον οποίο πραγματοποιείται καθημερινά έλεγχος ποιότητας με την χρήση των Control N και P. Πιο αναλυτικά, η μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης (Prothrombin Time) και κατ' επέκταση του PT INR χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Thromborel® S, το οποίο περιέχει ανθρώπινη

λυοφιλιποιημένη ανθρώπινη θρομβοπλαστίνη, η οποία προέρχεται από ανθρώπινο πλάκουντα και ασβέστιο. Με αυτό το αντιδραστήριο ελέγχεται η εξωγενής οδός της πήξης. Η αρχή μεθόδου στηρίζεται στην έναρξη της διαδικασίας πήξης, που πυροδοτείται μέσω της επώασης του πλάσματος με κατάλληλη ποσότητα θρομβοπλαστίνης και ασβεστίου. Στη συνέχεια μετριέται ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους. Η μέτρηση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) με το οποίο ελέγχεται η ενδογενής οδός της πήξης, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Pathromtin® SL. Η αρχή μεθόδου της εξέτασης αυτής στηρίζεται στην επώαση του πλάσματος του ασθενή με την κατάλληλη ποσότητα φωσφολιπιδίων και ένα ενεργοποιητή του συστήματος επαφής, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης της ενδογενούς οδού της. Η προσθήκη ιόντων ασβεστίου πυροδοτεί την διαδικασία πήξης και στην συνέχεια υπολογίζεται ο χρόνος μέχρι το σχηματισμό του θρόμβου ινώδους.

Στη συνέχεια, για την μέτρηση του ινωδογόνου στον ίδιο αναλυτή χρησιμοποιείται στο αντιδραστήριο Multifibren®U, το οποίο αποτελείται κυρίως από βόεια θρομβίνη και ασβέστιο. Η αρχή μεθόδου στηρίζεται στην τροποποίηση της μεθόδου Clauss. Κατά την μέθοδο αυτή το κιτρικό πλάσμα φθάνει σε διαδικασία πήξης με μεγάλη ποσότητα θρομβίνης και ο χρόνος πήξης του πλάσματος εξαρτάται από το περιεχόμενο του δείγματος σε ινωδογόνο. Για τον έλεγχο αποδόμησης του ινώδους σε διμερή μόρια (D-Dimer), πραγματοποιείται η μέτρηση D-Dimer. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των διμερών του ινώδους που δεν αντιδρούν με το ινωδογόνο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των D-Dimers.

Τέλος, αφού πραγματοποιηθεί και αξιολογηθεί ο βασικός έλεγχος ρουτίνας του εργαστήριου, το υπόλοιπο πλάσμα του σωληνάριου που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο αυτό μαζί με το πλάσμα του ασθενούς από τα άλλα δύο σωληνάρια του, συλλέγεται με πιπέττες Pasteur και τοποθετείται σε ειδικά tubes (No coded Push Cap Tubes U-Bottom), τα οποία σφραγίστηκαν με το ειδικό πώμα τους (Piercable TPE capclusters) και φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -80°C. Όταν προγραμματιστεί από το εργαστήριο, θα πραγματοποιηθεί η μέτρηση του παράγοντα VIII και θα αποψυχθούν.

7.3 Μέτρηση Παράγοντα VIII:

Όπως προαναφέρεται όταν προγραμματίζεται, από το εργαστήριο της Αιμόστασης-Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο, η μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII, αποψύχεται ένα σωληνάριο αποθηκευμένου πλάσματος του ασθενούς και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Αναλόγως της θεραπευτική αγωγή των ασθενών με αιμορροφιλία A που υπόκεινται σε μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος. Οι ασθενείς που λαμβάνουν σκευάσματα ανασυνδυασμένου παράγοντα, όπως το Efmoroctocog alfa (Elocta®), το Rurioctocog alfa pegol (Adynovi®), το Lonoctocog alfa (Afstylla®) και το Octocog alfa (Kovaltry®) θα πρέπει να πραγματοποιείται η χρωμογονική μέθοδος. Οι ασθενείς που λαμβάνουν τα υπόλοιπα διαθέσιμα

σκευάσματα ανασυνδυασμένου παράγοντα VIII, η μέτρηση των επιπέδων της δραστηριότητας του παράγοντα VIII πραγματοποιείται με την μέθοδο του ενός σταδίου.

7.3.1 Μέθοδος Ενός Σταδίου:

Η μέθοδος του ενός σταδίου του προσδιορισμού της δραστηριότητας του παράγοντα VIII, πραγματοποιείται στον αναλυτή αιμόστασης STA-R® Max3. Η αρχή μεθόδου της δοκιμασίας αυτής στηρίζεται στη μέτρηση του χρόνου πήξης ενός συστήματος όπου όλοι οι παράγοντες είναι σε περίσσεια με εξαίρεση τον παράγοντα VIII, ο οποίος παρέχεται από το εξεταζόμενο δείγμα. Η μέτρηση αυτή γίνεται παρουσία κεφαλήνης και του ενεργοποιητή της πήξης, του χλωριούχου ασβεστίου 0,025M.

Αρχικά, με την χρήση της αυτόματης πιπέτας και του Water For Injection πραγματοποιείται ανασύσταση του STA®-Unicallibrator, του STA® - System Control N και P και του STA®-Deficient Plasma VIII. Μετά την ανασύστασή τους παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα και μετά τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις στον αναλυτή STA-R® Max3. Θα πραγματοποιηθεί στην συνέχεια η βαθμονόμηση με την βοήθεια του STA®-Unicallibrator, όπου τα διάφορα σημεία της πρότυπης καμπύλης θα προκύψουν από την αραιώση του με το STA®-Owren-Koller, που πραγματοποιείται αυτόματα από τον αναλυτή.

Η καμπύλη βαθμονόμησης αξιολογείται και στην συνέχεια θα πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός έλεγχος με την χρήση των STA®-System Control N και P. Η αραιώση του γίνεται αυτόματα από τον αναλυτή με την χρήση του STA®-Owren-Koller. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού θα αξιολογηθούν και εφόσον βρίσκονται εντός των προβλεπόμενων ορίων θα συνεχιστεί η ανάλυση των δειγμάτων.

Τα δείγματα εισάγονται σε Eppendorfs ως μικροποσότητες στον αναλυτή STA-R® Max3 σε ειδικά racks. Η αραιώση τους γίνεται αυτόματα με τον αναλυτή με την χρήση του STA®-Owren-Koller και η μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII γίνεται με βάση την παραπάνω αρχή μεθόδου. Αν κάποιο αποτέλεσμα είναι εκτός του ορίου γραμμικότητας της μεθόδου, ο αναλυτής πραγματοποιεί αυτόματα την κατάλληλη αραιώση. Το εύρος αναφοράς της μέτρησης των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII στον αναλυτή STA-R® Max3 είναι 60-150%. Τέλος, τα αποτελέσματα που προκύπτουν αξιολογούνται από το εργαστήριο Αιμόστασης και παρέχονται στους ιατρούς του τμήματος, οι οποίοι θα δώσουν και την τελική γνωμάτευση στους ασθενείς που εξετάστηκαν.

7.3.2 Χρωμογονικός Προσδιορισμός:

Ο χρωμογονικός προσδιορισμός των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII πραγματοποιείται στον αναλυτή αιμόστασης ACL TOP 750®. Η αρχή μεθόδου του χρωμογονικού προσδιορισμού στηρίζεται στην ενεργοποίηση του παράγοντα X, ο οποίος θα ενεργοποιηθεί από το σύμπλοκο που σχηματίζει ο ενεργοποιημένος παράγοντας IXa με τον παράγοντα VIII. Παρουσία φωσφολιπιδίων (PLPs) και ασβεστίου, ο παράγοντας VIII που ενεργοποιείται από την θρομβίνη σχηματίζει ενζυμικό σύμπλοκο με τον ενεργοποιημένο παράγοντα IXa, το οποίο θα ενεργοποιήσει

τον παράγοντα X. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Xα που προκύπτει υδρολύεται από το χρωμογονικό ειδικό υπόστρωμα που οδηγεί στην απελευθέρωση παρανιτροανιλίνης (pNa). Η απορρόφηση της ποσότητας pNa που απελευθερώνεται φωτομετρείται σε 405nm και είναι ευθέως ανάλογη με τα επίπεδα της δραστηριότητας του παράγοντα VIII στο δείγμα που μετριέται.

Αρχικά με την χρήση της αυτόματης πιπέτας παρασκευάζεται το clean B diluted 1:8, στο οποίο προστίθεται 2ml Clean B σε 14ml Water For Injection. Στην συνέχεια με το Water For Injection και την αυτόματη πιπέτα πραγματοποιείται ανασύσταση των BIORHEN™ R1, BIORHEN™ R2, BIORHEN™ R3, BIORHEN™ Normal Control και BIORHEN™ Plasma Callibrator. Μετά την ανασύστασή τους και μία ήπια ανάδευση παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα και μετά τοποθετούνται σε ειδικά racks στον αναλυτή ACL TOP 750®, μαζί με το BIORHEN™ R4

Για την μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII χρησιμοποιούνται δύο πρωτόκολλα, η επιλογή των οποίων στηρίζεται στο αποτέλεσμα του aPTT. Στους ασθενείς με aPTT>45.0sec θα πραγματοποιηθεί το LOW πρωτόκολλο και στους ασθενείς με aPTT<45.0sec θα πραγματοποιηθεί το Normal πρωτόκολλο. Επομένως, θα πραγματοποιηθούν δύο διαφορετικές βαθμονομήσεις και διαφορετικοί ποιοτικοί έλεγχοι. Για την βαθμονόμηση της καμπύλης του Normal πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται το BIORHEN™ Plasma Callibrator, ενώ για το πρωτόκολλο LOW πραγματοποιείται αραιώσή του 1:4 με το STA®-Deficient Plasma VIII.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης αξιολογούνται και πραγματοποιείται ο ποιοτικός έλεγχος με την χρήση BIORHEN™ Normal Control παράγοντα VIII. Για το Normal πρωτόκολλο χρησιμοποιείται αυτούσιο το BIORHEN™ Normal Control, ενώ για το Low πρωτόκολλο πραγματοποιείται αραιώσή του 1:10 με το STA®-Deficient Plasma VIII. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού θα αξιολογηθούν και εφόσον βρίσκονται εντός των προβλεπόμενων ορίων θα συνεχιστεί η ανάλυση των δειγμάτων.

Τα δείγματα εισάγονται σε ειδικά για τον αναλυτή sample cups και τοποθετούνται σε ειδικά racks. Η μέτρηση των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII γίνεται με βάση την παραπάνω αρχή μεθόδου και η επιλογή του πρωτοκόλλου που θα χρησιμοποιηθεί για τον κάθε ασθενή στηρίζεται στην αξιολόγηση του aPTT. Το εύρος αναφοράς της μέτρησης των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII στον αναλυτή ACL TOP 750® είναι 50-150%. Τέλος, τα αποτελέσματα που προκύπτουν αξιολογούνται από το εργαστήριο Αιμόστασης και παρέχονται στους ιατρούς του τμήματος, οι οποίοι θα δώσουν και την τελική γνωμάτευση στους ασθενείς που εξετάστηκαν

7.4 Θρομβοελαστογραφία:

Όπως αναφέρεται παραπάνω τα αποτελέσματα των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII πραγματοποιήθηκαν κατά την περίοδο 2022-2023. Κατά την περίοδο 03/2024-07/2024 ελέγχθηκαν τα αποτελέσματα αυτά στο αρχείο του εργαστηρίου και επιλέχθηκαν συγκεκριμένα δείγματα ασθενών που κατά την περίοδο

αυτή άλλαξε η θεραπευτική τους αγωγή. Η επιλογή των δειγμάτων αναφέρεται παραπάνω. Η θρομβοελαστογραφία πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή ROTEM® delta και χρησιμοποιήθηκε επαρκής ποσότητα αποθηκευμένου πλάσματος. Αποψύχονται δύο σωληνάρια αποθηκευμένου πλάσματος του ασθενούς και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μόλις ξεπαγώσουν τοποθετείται το πλάσμα των δύο σωληναρίων σε σωληνάρια RIA και τοποθετείται στην ειδική υποδοχή δείγματος στον αναλυτή θρομβοελαστογραφίας ROTEM® delta. Πραγματοποιήθηκαν οι τέσσερις βασικές δοκιμασίες στον ROTEM® delta, το EXTEM, το INTEM, το FIBTEM και το APTEM. Επειδή ο αναλυτής αυτός χρησιμοποιείται ως Point Of Care αναλυτής, δεν απαιτείται βαθμονόμηση της μεθόδου, αλλά και ούτε τακτικός ποιοτικός έλεγχος με την χρήση ειδικών controls. Μόλις επιτευχθεί η βέλτιστη θερμοκρασία που είναι 37°C, θα πραγματοποιηθεί η θρομβοελαστογραφία στο πλάσμα του ασθενούς.

Αρχικά, τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις κάτω από τους τέσσερις άξονες οι κυψελίδες (Cups and Pin Pro) και τα ειδικά έμβολα στον αντίστοιχο άξονα. Επιλέγω την πρώτη δοκιμασία που είναι η δοκιμασία EXTEM, στην οποία με την αυτόματη πιπέττα του αναλυτή προστίθεται στην κυψελίδα ποσότητα αντιδραστήριο ROTEM star-tem 10® και ROTEM ex-tem® και στην συνέχεια τοποθετείται ποσότητα του δείγματος του ασθενούς. Για την δοκιμασία INTEM προστίθεται στην δεύτερη κυψελίδα ποσότητα αντιδραστήριου ROTEM star-tem 10®, ROTEM in-tem® και δείγματος του ασθενή με την χρήση της αυτόματης πιπέττας.

Για την δοκιμασία FIBTEM προστίθεται στην τρίτη κυψελίδα ποσότητα αντιδραστήριου ROTEM ex-tem®, ROTEM fib-tem® και δείγματος του ασθενή με την χρήση της αυτόματης πιπέττας. Για την δοκιμασία APTEM προστίθεται στην τέταρτη κυψελίδα ποσότητα αντιδραστήριου ROTEM ex-tem®, ROTEM ap-tem® και δείγματος του ασθενή με την χρήση της αυτόματης πιπέττας. Μετά το πέρας της μίας ώρας και τριάντα λεπτών παρέχονται τα αριθμητικά αποτελέσματα των παραμέτρων της θρομβοελαστογραφίας, ενώ μπορεί να παρακολουθηθεί η πορεία του γραφήματος σε πραγματικό χρόνο. Στα αποτελέσματα αυτά πραγματοποιήθηκε η παρακάτω στατιστική ανάλυση.

8. Αποτελέσματα:

Για την διεξαγωγή αυτής της ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 33 δείγματα, από 12 ασθενείς με αιμορροφιλία Α, οι οποίοι τη περίοδο 2022-2023 πραγματοποίησαν έλεγχο των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII στο τμήμα Αιμορροφιλικών Ασθενών της Αιμόστασης-Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο. Για την σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς μάρτυρες αιμοδότες, στο πλάσμα των οποίων πραγματοποιήθηκε η θρομβοελαστογραφία. Αυτό έγινε, διότι οι φυσιολογικές τιμές των παραμετρών της θρομβοελαστογραφίας ROTEM® αφορούν την ανάλυση ολικού αίματος. Όμως, παρέχεται η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου αυτής χρησιμοποιώντας πλάσμα αντί για ολικό αίμα, με τον περιορισμό ότι επηρεάζονται οι παράμετροι που αφορούν την εκτίμηση της συμβολής των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό του θρόμβου. Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία αναλύθηκαν μόνο οι παράμετροι ρουτίνας της δοκιμασίας INTEM που μελετά την ενδογενή οδό της πήξης της θρομβοελαστογραφίας ROTEM® με απώτερο σκοπό να αναδείξει τον ρόλο της στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας των ασθενών με αιμορροφιλία Α. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε από το IBM SPSS Statistics 29.0.1.0.

Στον Πίνακα 5 διακρίνεται η μέση τιμή των παραμέτρων που αναλύθηκαν των ασθενών με αιμορροφιλία Α και των υγιών μαρτύρων. Όπως διακρίνεται στον παρακάτω πίνακα, ο χρόνος πήξης CT και ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου CFT είναι παρατεταμένοι σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, το οποίο συμβαίνει λόγω της ανεπάρκειας του παράγοντα VIII. Παρατηρείται επίσης, ότι ο δείκτης λύσης του θρόμβου LI δεν μεταβάλλεται μεταξύ υγιών μαρτύρων και των ασθενών με αιμορροφιλία Α, καθώς οι ασθενείς με αιμορροφιλία Α δεν εμφανίζουν διαταραχές στον πολυμερισμό του θρόμβου.

Πίνακας 5: Μέση τιμή Μετρήσεων των Παραμέτρων Ρουτίνας της Θρομβοελαστογραφίας ROTEM® σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Αιμορροφιλία Α

Μέση τιμή ± SD		
Παράμετροι INTEM	Μάρτυρες	Δείγματα ασθενών
CT	195,1 ± 21,4	322,6 ± 169,7
CFT	76,1 ± 18,6	1941,24 ± 2163,83
A5	45,7 ± 4,1	18,39 ± 5,6
A10	55,4 ± 3,4	20,3 ± 5,76
A15	59,4 ± 3,2	21,21 ± 5,91
A20	60,9 ± 2,5	21,7 ± 6,0
A25	61,4 ± 1,9	22,03 ± 6,0
A30	61,0 ± 1,5	22,18 ± 6,0
MCF	61,5 ± 2,0	22,18 ± 6,2
ML	12,6 ± 3,6	0,01 ± 0,012
LI30	99,3 ± 1,1	100 ± 1
LI45	95,3 ± 2,6	100 ± 1
LI60	91,8 ± 3,1	100 ± 0
a	74,7 ± 3,3	67,69 ± 11,7

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος κατανομής, ώστε να παρατηρηθεί η κατανομή των μετρήσεων. Ο έλεγχος κατανομής παρέχει πληροφορίες για την μετέπειτα επιλογή των κατάλληλων test συσχέτισης κατά την στατιστική ανάλυση. Στον Πίνακα 6 διακρίνεται το p-value του ελέγχου κατανομής Shapiro-Wilk, κατά τον οποίο αν το p-value είναι μεγαλύτερο από 0,05 τότε η κατανομή της μεταβλητής είναι κανονική, ενώ αν είναι μικρότερο από το 0,05 τότε είναι μη κανονική η κατανομή. Όπως διακρίνεται τον παρακάτω πίνακα η πλειοψηφία των παραμέτρων της περιστροφικής θρομβελαστογραφίας έχουν μη κανονική κατανομή με εξαίρεση τα πλάτη του θρόμβου A15, A25 και A30. Παρόλα αυτά επειδή θα ελεγχθεί παρακάτω η πιθανή συσχέτισή τους με παραμέτρους με μη κανονική κατανομή θεωρείται ότι το σύνολο των προς ανάλυση παραμέτρων έχουν μη κανονική κατανομή.

Πίνακας 6: Έλεγχος Κατανομής: Shapiro- Wilk (p-value)

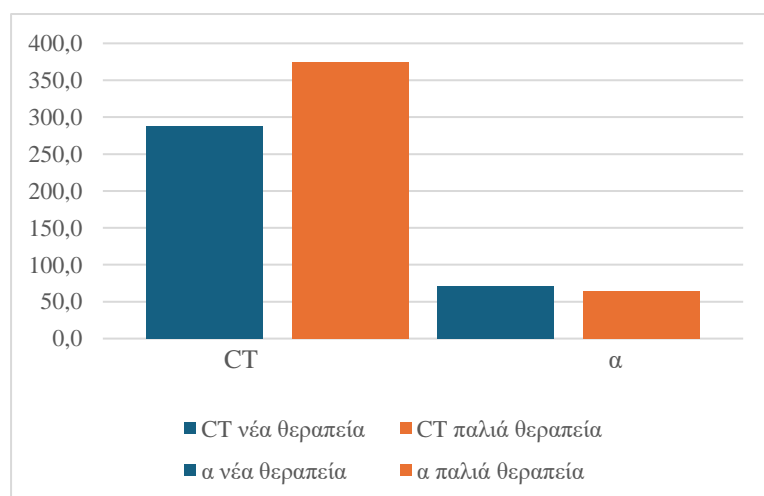
Έλεγχος Κανονικότητας	
Παράμετροι που αναλύθηκαν	Shapiro - Wilk test (p-value)
aPTT	0,017
FVIII	<0,001
Φαρμακευτική Αγωγή	<0,001
CT	<0,001
CFT	<0,01
A5	0,005
A10	<0,001
A15	0,201
A20	0,005
A25	0,467
A30	0,604
MCF	0,004
ML	<0,001
LI30	<0,001
LI45	-
LI60	-
a	<0,001

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των παραμέτρων της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® στους ασθενείς με αιμορροφιλία Α. Πραγματοποιήθηκε το test Wilcoxon signed-rank test με το οποίο διερευνήθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους της θρομβοελαστογραφίας όταν οι ασθενείς λάμβαναν την παλιά τους θεραπευτική τους αγωγή και όταν άλλαξαν στην νέα θεραπεία τους. Ορίστηκε ως οριακή τιμή p-value $\leq 0,05$ και για τιμές p-value $\leq 0,05$, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται και προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Σε αντίθετη περίπτωση θεωρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Στον πίνακα 7 διακρίνεται η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων που αναλύθηκαν ανάμεσα στα δείγματα των ασθενών με την παλιά τους θεραπεία και σε αυτά με την καινούργια θεραπεία. Παρατηρείται ότι μόνο τα πλάτη της γραφικής παράστασης της θρομβοελαστογραφίας εμφανίζουν p-value $\leq 0,05$, που σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δειγμάτων των ασθενών.

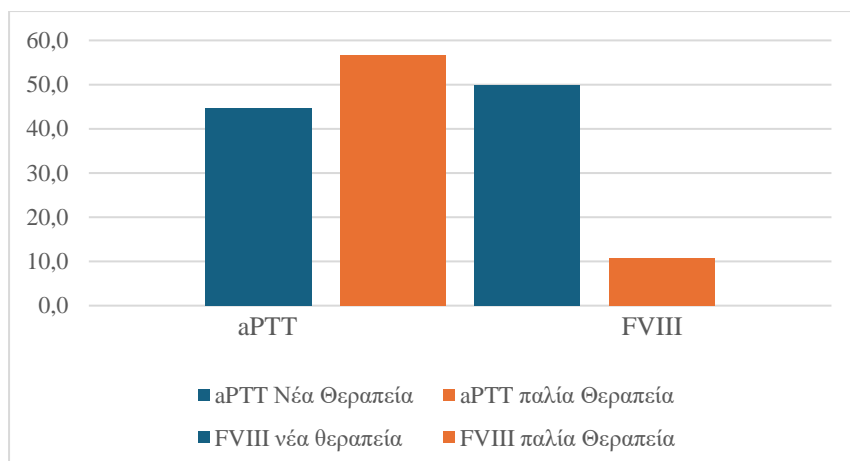
Πίνακας 7: Σύγκριση Τιμών Παραμέτρων μεταξύ παλιάς και νέας Θεραπείας

Σύγκριση Μέσων Τιμών Παραμέτρων μεταξύ παλιάς και νέας Θεραπείας (Sig 2-tailed)	
aPTT	0,101
FVIII	0,084
CT	0,116
CFT	0,139
A5	0,004
A10	0,005
A15	0,006
A20	0,006
A25	0,006
A30	0,005
MCF	0,005
ML	0,416
LI30	0,655
LI45	0,317
LI60	0,317
α	0,06

Επίσης με την βοήθεια του προγράμματος Excel, στα ακόλουθα διαγράμματα μπορεί να διακριθεί η διαφορά των μέσων τιμών των σημαντικών παραμέτρων ανάμεσα στα δείγματα των ασθενών με την παλιά και με την καινούργια τους θεραπεία. Στην Εικόνα 8, συγκρίνονται οι μέσοι όροι των παραμέτρων CT και α στα δείγματα που αναλύθηκαν και παρατηρείται σημαντική μείωση του CT όταν οι ασθενείς λαμβάναν την νέα θεραπευτική τους αγωγής. Αυτό σημαίνει ότι ο χρόνος πήξης του αίματος στην θρομβοελαστογραφία έχει μειωθεί λόγω της αύξησής των επιπέδων δραστηριότητας του παράγοντα VIII. Τέλος στην Εικόνα 9 διακρίνεται η διαφορά στο aPTT και στα επίπεδα της δραστηριότητας του παράγοντα VIII ανάμεσα στα δείγματα των ασθενών που λάμβαναν την παλιά τους θεραπεία και στα δείγματα τους όταν λάμβαναν την καινούργια τους θεραπεία. Παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της δραστηριότητας του παράγοντα VIII, το οποίο υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα τόσο της θεραπείας τους όσο και της αλλαγής που πραγματοποιήθηκε



Εικόνα 8: Σύγκριση μέσων όρων CT και α ανάμεσα σε ασθενείς που λάμβαναν την παλιά τους θεραπεία και σε ασθενείς με την νέα τους θεραπεία



Εικόνα 9: Σύγκριση μέσων όρων aPTT και FVIII ανάμεσα σε ασθενείς που λάμβαναν την παλιά τους θεραπεία και σε ασθενείς με την νέα τους θεραπεία

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν, εξαιτίας της μη κανονικής κατανομής πραγματοποιήθηκαν μη παραμετρικά test συσχέτισης των μεταβλητών αυτής της ερευνητικής εργασίας. Στον πίνακα 8 διακρίνεται το Spearman's rho, το οποίο χρησιμοποιείται για μεταβλητές με μη κανονική κατανομή. Θεωρείται πάλι οριακή τιμή $p\text{-value} \leq 0,05$, για τις οποίες η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται και προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστική σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών. Σε αντίθεση περίπτωση θεωρείται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά.

Πίνακας 8: Έλεγχος Spearman's rho για την συσχέτιση των μεταβλητών

Έλεγχος συσχέτισης παραμέτρων με Spearman's rho (Sig 2-tailed)				
Παράμετροι Έρευνας	aPTT	Επίπεδα Παράγοντα VIII(%)	Φαρμακευτική Αγωγή	Clotting Time (CT)
aPTT	-	<0,001	0,083	<0.001
Επίπεδα Παράγοντα VIII(%)	<0,001	-	0,038	<0.001
Φαρμακευτική Αγωγή	0,083	0,038	-	0.165
CT	<0,001	<0,001	0,165	-
CFT	0,648	0,742	0,446	0.909
A5	0,313	0,187	0,142	0,135
A10	0,734	0,501	0,363	0,435
A15	0,232	0,237	0,097	0,527
A20	0,655	0,472	0,308	0,356
A25	0,169	0,184	0,097	0,541
A30	0,146	0,158	0,086	0,603
MCF	0,653	0,465	0,283	0,38
ML	0,868	0,985	0,688	0,261
LI30	0,561	0,671	0,728	0,876
LI45	0,837	0,918	0,22	0,758
LI60	0,837	0,918	0,22	0,758
a	0,034	0,025	0,195	<0,001

Στον παραπάνω πίνακα διακρίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων της θρομβοελαστογραφίας ROTEM® με το aPTT, τα επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII και την φαρμακευτική αγωγή. Όπως παρατηρείται παραπάνω, ο χρόνος πήξης το aPTT συσχετίζεται με τα επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII και με τον χρόνο πήξης CT και την γωνία α . Επίσης, τα επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII συσχετίζονται με το aPTT και τον χρόνο πήξης CT και την γωνία α . Όμως το σημαντικότερο, είναι ότι ο χρόνος πήξης CT συσχετίζεται με την γωνία α της γραφικής καμπύλης του θρομβοελαστογραφήματος.

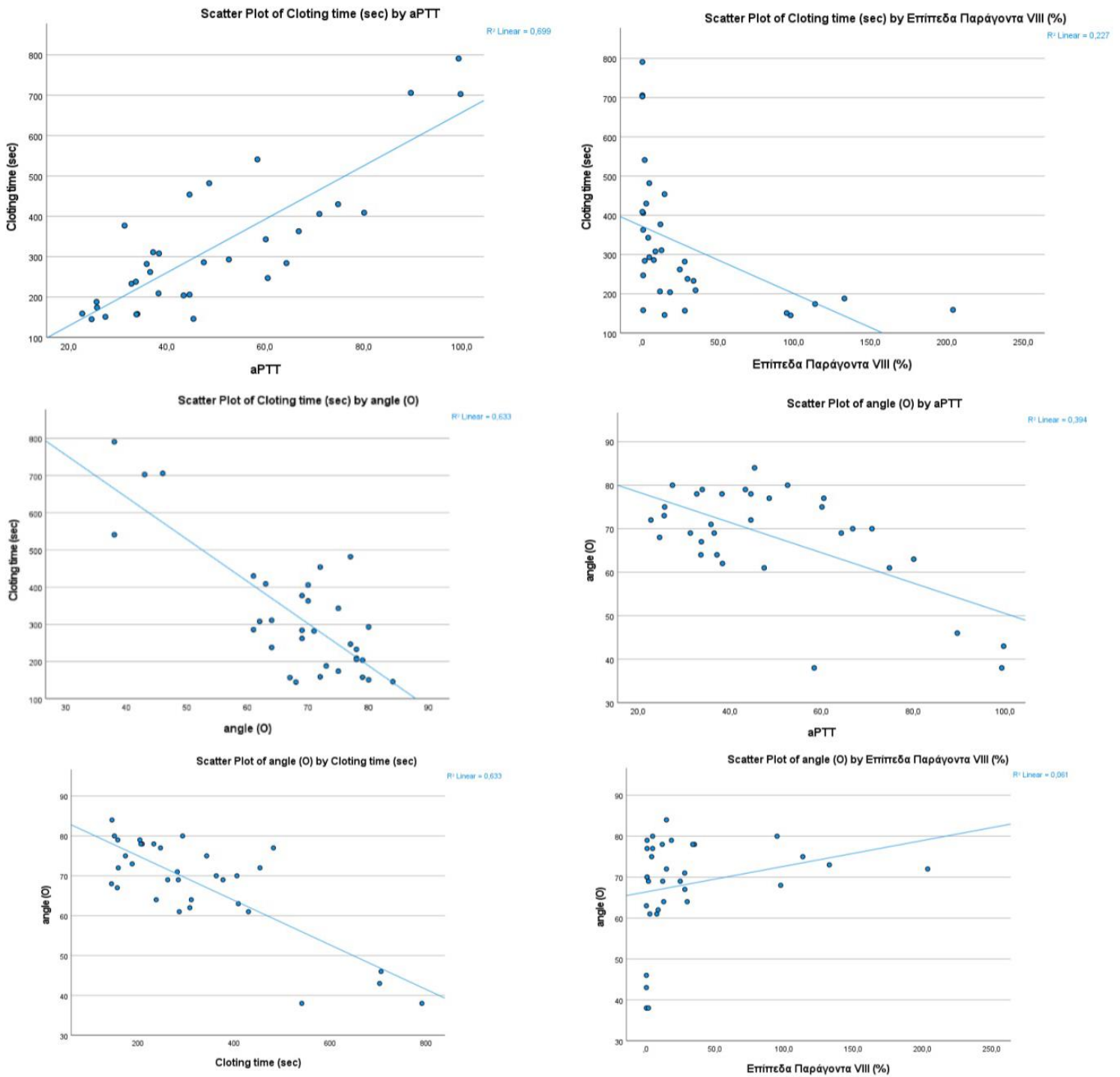
Για να περιγράψει η σχέση αυτών των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στον πίνακα 8 θα αναλυθεί ο συντελεστής συσχέτισης rho του test Spearman's rho. Όταν ο συντελεστής αυτός είναι εντός ορίων 0-0,3 ή 0 έως -0,3 τότε η συσχέτιση είναι ασθενής. Όταν ο συντελεστής αυτός είναι εντός ορίων 0,3-0,7 ή -0,3-0,7 τότε η συσχέτιση είναι μέτρια και όταν ο συντελεστής αυτός είναι εντός ορίων 0,7-1 ή -0,7 έως -1 τότε η συσχέτιση είναι ισχυρή. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 9, παραπάνω συσχετίζεις με εξαίρεση της συσχετίσεις της γωνίας α είναι ισχυρές, ενώ η συσχέτιση γωνίας α με το aPTT και με τα επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII είναι ασθενής. Τέλος, η συσχέτιση του χρόνου πήξης CT και της γωνίας α είναι μέτρια.

Πίνακας 9: Συντελεστής Συσχέτισης rho στις παραμέτρους που παρατηρήθηκε παραπάνω συσχέτιση

Συντελεστής Συσχέτισης rho του τεστ Spearman's rho				
Παράμετροι Έρευνας	aPTT	Επίπεδα Παράγοντα VIII(%)	Φαρμακευτική Αγωγή	Clotting Time (CT)
aPTT	-	-0,897	-0,306	0,748
Επίπεδα Παράγοντα VIII(%)	-0,897	-	0,362	-0,720
Φαρμακευτική Αγωγή	-0,306	0,632	-	-0,247
CT	0,748	-0,720	-0,247	-
α	-0,371	0,390	0,232	-0,596

Τέλος, για την περιγραφή της σχέσης των παραπάνω συσχετίσεων δημιουργήθηκαν στο spss τα ειδικά διαγράμματα scatter plot τα οποία διακρίνονται στην Εικόνα 10. Σύμφωνα με τα διαγράμματα αυτά, παρατηρείται ότι ο χρόνος πήξης CT με το aPTT λόγω την κλίση της καμπύλης εμφανίζει θετική συσχέτιση, ενώ ο χρόνος πήξης CT με την γωνία α και τα επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII εμφανίζει αρνητική συσχέτιση. Επιπλέον, η γωνία α εμφανίζει θετική συσχέτιση με τα

επίπεδα δραστικότητας του παράγοντα VIII, σε αντίθεση με το aPTT και τον χρόνο πήξης CT όπου εμφανίζει αρνητική συσχέτιση.



Εικόνα 10: Διαγράμματα Scatter plot

9. Συμπεράσματα:

Ανακεφαλαιώνοντας, το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η σπουδαιότητα της χρήσης της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας τους. Όπως έχει ήδη περιγράψει, η θρομβοελαστογραφία αποτελεί βασική μέθοδο παρά την κλίνη του ασθενούς για την αντιμετώπιση της σοβαρής αιμορραγίας και του τραύματος. Μπορεί να παρέχει γρήγορα μέσω των παραμέτρων αλλά και της παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο της γραφικής παράστασης, αξιόπιστες πληροφορίες στους κλινικούς ιατρούς για την χορήγηση των κατάλληλων παραγώγων αίματος, μέσω των διάφορων πρωτοκόλλων που έχουν αναπτυχθεί.

Επιπλέον, η κατανόηση της παθοφυσιολογίας της αιμορροφιλίας Α προϋποθέτει την ενδελεχή μελέτη της αιμόστασης, αλλά και των δύο μοντέλων της δευτερογενούς αιμόστασης. Η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος Emicizumab βελτιώνει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής των ασθενών με αιμορροφιλία Α, καθώς χορηγείται υποδόρια και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής. Το βασικό πλεονέκτημά του έναντι των σκευασμάτων ανασυνδυσασμένων παραγόντων VIII είναι ότι μπορεί να δεσμεύεται ταυτόχρονα με τους ενεργοποιημένους παράγοντες IXa και Xa για την παραγωγή θρομβίνης.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αν και η μέθοδος της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας έχει σημαντικούς περιορισμούς παρέχει την δυνατότητα την αξιολόγησης της λειτουργίας όλης της αιμόστασης του ασθενή σε αντίθεση με τις κλασικές πεζιολογικές δοκιμασίες. Για αυτό τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α με αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά της θεραπείας τους με παράγοντες παράκαμψης.

Επιπλέον, έχουν επιβεβαιωθεί οι παράμετροι της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας που αναγράφονται στην βιβλιογραφία ότι επηρεάζονται από την αιμορροφιλία Α. Αυτό αποδεικνύεται από την σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων που αναλύθηκαν στατιστικά σε αυτή την ερευνητική εργασία με τους φυσιολογικούς μάρτυρες αιμοδοτές που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τιμές των μεταβλητών που αναλύθηκαν παρουσιάζουν μη κανονική κατανομή και πραγματοποιήθηκαν μη παραμετρικά στατιστικά test.

Από τους ελέγχους αυτούς παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της παραμέτρου της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας ROTEM® CT με το aPTT, τα επίπεδα δραστηκότητας του παράγοντα VIII και με την γωνία α της γραφικής καμπύλης. Επίσης, η γωνία α παρουσιάζει συσχέτιση με το aPTT, τον χρόνο πήξης CT και τα επίπεδα δραστηκότητας του παράγοντα VIII. Μέσα από την ανάλυση των παραπάνω διαγραμμάτων προκύπτει η σχέση των συσχετίσεων αυτών. Οι πληροφορίες που προέρχονται από την δοκιμασία INTEM δύναται να παρέχουν γρήγορα πληροφορίες για την αρχική εκτίμηση του aPTT και κατ' επέκταση της λειτουργίας του παράγοντα VIII σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α για να αναλυθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπευτικής τους αγωγής.

Επιπλέον, από την μελέτη αυτή αποδεικνύεται ότι οι ασθενείς που λαμβάνουν την καινούργια θεραπευτική τους αγωγή έχουν αυξημένα επίπεδα δραστηκότητας παράγοντα VIII σε σχέση με την μέτρηση που είχαν όταν λάμβαναν την παλιά τους αγωγή. Παρομοίως, υπάρχει βελτίωση του aPTT μεταξύ των δειγμάτων τους με την παλιά και καινούργια θεραπεία. Η παράμετρος της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας CT παρατηρείται ότι μειώνεται σε ασθενείς που λαμβάνουν την καινούργια θεραπεία τους, ενώ στα δείγματα τους με την παλιά θεραπευτική τους αγωγή ο χρόνος πήξης CT είναι παρατεταμένος. Τέλος παρατηρείται ότι η μεταβλητή της γωνίας α δεν μεταβάλλεται σημαντικά στην αλλαγή της θεραπευτικής αγωγής σε ασθενείς με αιμορροφιλία Α.

Θα ήταν ενδιαφέρον, συνοψίζοντας, να πραγματοποιηθεί μία περαιτέρω έρευνα, στην οποία θα χρησιμοποιηθεί ολικό αίμα ασθενών με αιμορροφιλία Α, στους οποίους η παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής θα γίνεται σε πραγματικό χρόνο. Θα παρουσίαζε ενδιαφέρον, η διερεύνηση συσχέτισης των παραμέτρων της περιστροφικής θρομβοελαστογραφίας με την ύπαρξη ή μη αναστολέα έναντι του παράγοντα VIII. Αυτό θα βοηθούσε σημαντικά τόσο τους θεράποντες ιατρούς του ασθενούς για την γρήγορη χορήγηση του κατάλληλου παράγοντα παράκαμψης όσο και τους εργαστηριακούς επιστήμονες για την έγκαιρη και αποτελεσματικότερη διάγνωσή του. Τέλος, μία ακόμα ενδιαφέρουσα μελέτη θα ήταν η χρήση της θρομβοελαστογραφίας σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με Emicizumab, καθώς δεν υπάρχει ακόμα ένας έγκυρος τρόπος παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας των ασθενών αυτών.

Συντμήσεις:

- PT: Χρόνος Προθρομβίνης
- aPTT: Χρόνος Ενεργοποιημένης Μερικής Θρομβοπλαστίνης
- vWF: Παράγοντα von Willebrand
- ADP: Διφωσφορική Αδενοσίνη
- TXA₂: Θρομβοξάνη A₂
- ATP: Τριφωσφορική Αδενοσίνη
- PF4: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων 4
- PLTs: Αιμοπετάλια
- PAI-1: Αναστολέας Ενεργοποίησης Πλασμινογόνου 1
- CA²⁺: Ιόντα Ασβεστίου
- TF: Ιστικός Παράγοντας
- TFPI: Αναστολέας της Οδού του Ιστικού Παράγοντα
- ATIII: Αντιθρομβίνη III
- APC: Ενεργοποιημένη Πρωτεΐνη C
- EPCR: Υποδοχέα Ενδοθηλίου για την Πρωτεΐνη C
- PF3: Αντ αιμοπεταλικό Φωσφολιπίδιο 3
- t-PA: Ιστικός Ενεργοποιητής Πλασμινογόνου
- PrS: Πρωτεΐνη S
- PrC: Πρωτεΐνη C
- aPCC: Σκευάσματα Συμπλέγματος Ενεργοποιημένης Προθρομβίνης
- PCR: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
- rVIII: Ανασυνδρασμένο Σκευάσμα Παράγοντα VIII
- AHG: Αντ αιμοφιλική Σφαιρίνη
- SHL: Σκευάσματα παράγοντα VIII τυπικού Χρόνου Ημιζωής
- EHL: Σκευάσματα παράγοντα VIII παρατεταμένου Χρόνου Ημιζωής
- CT: Χρόνος Πήξης Αίματος
- CFT: Χρόνος Σχηματισμού Θρόμβου
- ROTEM: Περιτροφική Θρομβοελαστογραφία
- TEG: Θρομβοελαστογραφία

Παράρτημα Εικόνων:

Εικόνα 1: Περιγραφή του καταρράκτη Πήξης (11)	6
Εικόνα 2: Κυτταρικό Μοντέλο Αιμόστασης (12).....	8
Εικόνα 3 Δράση Φυσικών Αναστολέων Αιμόστασης (6)	10
Εικόνα 4 Το γονίδιο και η πρωτεϊνική δομή του παράγοντα VIII (29).....	18
Εικόνα 5: Σχηματική Απεικόνιση της Αρχής Μεθόδου της μεθόδου Ενός Σταδίου (2) και του Χρωμογονικού Προσδιορισμού (B) (34).	21
Εικόνα 6: Αρχή Μεθόδου ROTEM® delta. Οι αριθμοί που διακρίνονται στην εικόνα αντιστοιχούν στα εξής: 1= Άξονας (+/- 4,75°), 2= Ελατήριο, 3= Πηγή φωτός/ δίοδος, 4=Κάτοπτρο, 5= Συσκευή ανίχνευσης, 6=Έμβολο αισθητήρα, 7=Κυψελίδα με ολικό αίμα, 8=Ινίδια ινώδους και συσσωματώματα θρομβοκυττάρων, 9=Θερμαινόμενο στήριγμα κυψελίδας, 10= Ρουλεμάν και 11= Επεξεργασία (59).....	34
Εικόνα 7:Καμπύλης Αντίδρασης ROTEM® delta (58).....	38
Εικόνα 8: Σύγκριση μέσων όρων CT και α ανάμεσα σε ασθενείς που λάμβαναν την παλιά τους θεραπεία και σε ασθενείς με την νέα τους θεραπεία.....	56
Εικόνα 9:Σύγκριση μέσων όρων aPTT και FVIII ανάμεσα σε ασθενείς που λάμβαναν την παλιά τους θεραπεία και σε ασθενείς με την νέα τους θεραπεία.....	57
Εικόνα 10: Διαγράμματα Scatter plot	59

Παράρτημα Πινάκων:

Πίνακας 1: Δοκιμασίες ROTEM.....	36
Πίνακας 2: Παράμετροι Ρουτίνας, Παράμετροι Συνεκτικότητας Θρόμβου, Παράμετροι Λύσης Θρόμβου, και Ερευνητικοί Παράμετροι	38
Πίνακας 3: Υπόλοιποι Ερευνητικοί Παράμετροι.....	39
Πίνακας 4: Φυσιολογικά Όρια ROTEM® delta	39
Πίνακας 5: Μέση τιμή Μετρήσεων των Παραμέτρων Ρουτίνας της Θρομβοελαστογραφίας ROTEM® σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με Αιμορροφιλία Α	54
Πίνακας 6: Έλεγχος Κατανομής: Shapiro- Wilk (p-value).....	55
Πίνακας 7: Σύγκριση Τιμών Παραμέτρων μεταξύ παλιάς και νέας Θεραπείας	56
Πίνακας 8: Έλεγχος Spearman's rho για την συσχέτιση των μεταβλητών	57
Πίνακας 9: Συντελεστής Συσχέτισης rho στις παραμέτρους που παρατηρήθηκε παραπάνω συσχέτιση.....	58

Βιβλιογραφία

1. Lichtman Marshall PJKKLMBLAJ. Williams Αιματολογία. In.; 2018.
2. Silversthornd DU. Φυσιολογία του Ανθρώπου. In Silversthornd DU. Φυσιολογία του Ανθρώπου. 8th ed.: Broken Hill Publishers; 2018. p. 524-525.
3. Ogedegbe HO. An Overview of Hemostasis. Laboratory Medicine. 2002 Dec: p. 948-953.
4. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. The Veterinary Journal. 2004 Nov: p. 238-251.
5. Yau JW THVS. Endothelial cell control of thrombosis. BMC Cardiovasc Disord. 2015 Oct.
6. Iqbal JFaO. Physiology of Hemostasis. Anticoagulation and Hemostasis in Neurosurgery. 2016: p. 3-16.
7. Sang Y RMdLBdGPHD. Interplay between platelets and coagulation. Blood Rev. 2021.
8. Berndt MC MPAR. Primary haemostasis: newer insights. 2014 May: p. 15-22.
9. Garraud O CAHCHLSCF. Platelets and immunity: From physiology to pathology. Transfusion Clinique et Biologique. 2017 Jun: p. 83-86.
10. Sierra C MMGRJ. The physiology of hemostasis. Blood Coagulation & Fibrinolysis : an International Journal in Haemostasis and Thrombosis. 2022: p. 1-2.
11. M M. New models of hemostasis. Topics in Compan An Med. 2012: p. 40-45.
12. Vine AK. Recent Advances in Haemostasis and Thrombosis. The Journal of Retinal and Virteous Diseases..
13. Colvin BT. Physiology of Haemostasis. 2004: p. 43-46.
14. Mann KG BZKOTBS. Model of Blood Coagulation. Blood Cells Molecules and Diseases. 2006: p. 108-117.
15. Butenas S MK. Blood coagulation.. Biochemistry. 2002: p. 5-15.
16. Jr. MH. Natural inhibitors of the coagulation system. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 1982: p. 267-275.
17. Hepner M KV. Antithrombin. Methods Mol Biol. 2013.
18. Aoki N. Natural Inhibitors of Fibrinolysis. Progress in Cardiovascular Diseases. 1979.
19. WC A. Natural anticoagulant inhibitors: activated Protein C. Best Pract Res Clin Haematol. 2004: p. 161-182.
20. Hepner M KV. Protein S. Methods Mol Biol. 2013.
21. Hepner M KV. Protein C. Methods Mol Biol. 2013.
22. OM AA. The role of thrombin in haemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis. 2022 May 1.

23. Diethorn ML,WL. Physiologic mechanisms of hemostasis and fibrinolysis. *The Journal of Cardiovascular Nursing*. 1989: p. 1-10.
24. Troy GC. An Overview of Hemostasis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1988: p. 5-20.
25. Habart D. Molecular diagnosis of haemophilia A in clinical practice. *ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH*. 2005: p. 795-800.
26. Γεράσιμος Πάγκαλης ΘΒ. Αιματολογία στην Κλινική Πράξη. In Γεράσιμος Πάγκαλης ΘΒ. *Αιματολογία στην Κλινική Πράξη*. 3rd ed.: Broken Hill Publishers; 2024. p. 906-913.
27. Berntorp Erik KFDPHMEMDSADSaVB. Haemophilia. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021 Jun 24.
28. Schramm W. The history of haemophilia - a short review. *Thrombosis Research*. 2014: p. 4-9.
29. Castaldo GDVNPZFSVRACADMGaSF. Haemophilia A: molecular insights. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2007 Apr 17: p. 450-461.
30. Nathwani AC TE. Haemophilia, the journey in search of a cure. 1960–2020. *BRITISH SOCIETY FOR HAEMATOLOGY 60TH ANNIVERSARY SPECIAL ISSUE*. 2020 Nov: p. 573-578.
31. Pelland-Marcotte MC CM. Hemophilia in a Changing Treatment Landscape. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2019 Jun: p. 409-423.
32. Mannucci P. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Special Issue:State of the Art. XXVIII International Congress of the World Federation of Hemophilia*. 2008 Jul: p. 10-18.
33. Tagliaferri A CDPFRCPGFRMF. The natural history of mild haemophilia: a 30-year single centre experience. *Haemophilia*. 2012 Mar: p. 166-174.
34. Weyand AC PS. New therapies for hemophilia. *Blood*. 2019: p. 389-398.
35. Samuelson Bannow B RMNCHCBEEHMMKROJSEMTKC. Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Reviews*. 2019: p. 43-50.
36. Ray A CJHRRE. The musculoskeletal manifestations of haemophilia: a review of the imaging findings. *Clinical Radiology*. 2022 Oct: p. 730-737.
37. Boehlen F GLBE. Outcome measures in haemophilia: a systematic review. *European Journal of Hematology*. 2014: p. 2-15.
38. M F. Haemophilia and cancer: a personal perspective. *Blood Trasfus*. 2013 Jan: p. 26-31.
39. Lastrapes KK MBMMMEBJMGKJNMHMMDBD. Coated platelets and severe haemophilia A bleeding phenotype: Is there a connection? *Haemophilia*. 2016 Jan: p. 148-151.
40. Armstrong E HA. Assay discrepancy in mild haemophilia A. *European Journal of Hematology*. 2014: p. 48-50.
41. Bowyer AE DEAJ. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia*. 2018: p. 578-583.

42. Müller J MWPFSTSUSU, (GTH SCL(otSoTaHR. An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*. 2022; p. 248-260.
43. Dubé E GJMCBACFLDRG. The diagnosis of a haemophilia A carrier over 2 decades. *Haemophilia*. : p. 133-136.
44. Limjoco J TC. Development of a haemophilia A gene therapy shared decision-making tool for clinicians. *Haemophilia*. 2023 Sep: p. 1184-1190.
45. Aledort L MPSWTM. Factor VIII replacement is still the standard of care in haemophilia A. *Blood Transfusion*. 2019 Nov: p. 479-486.
46. Malec L MD. Targeting higher factor VIII levels for prophylaxis in haemophilia A: a narrative review. *Haemophilia*. 2023: p. 1419-1429.
47. Connelly S KM. Haemophilia A gene therapy. *Haemophilia*. 1998: p. 380-388.
48. Kreuz W EC. Inhibitors in patients with haemophilia A. *Thrombosis Research*. 2014 Nov: p. 22-26.
49. RG M. The inhibitors – a challenge for the management of patients with hereditary haemophilia A. *Romanian Journal of Internal Medicine*. 2018: p. 143-152.
50. DM D. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia*. 2000: p. 38-40.
51. Koh EJ TJAMNHKTZCM. ACQUIRED HAEMOPHILIA A. *JOURNAL OF AYUB MEDICAL COLLEGE ABBOTTABAD*. 2023: p. 690-692.
52. Marques Dias JI FMGARA. Acquired haemophilia A associated to autoimmune thyroiditis and pangastritis. *BMJ Case Reports*. 2022.
53. Franchini M MP. Acquired haemophilia A: a 2013 update. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013: p. 1114-1120.
54. Oiso N HCMYHAUSSATMTYMIKA. Localised giant haematoma and subsequent widespread purpura as a sign of acquired haemophilia A. *Australian Journal Of Dermatology*. 2012: p. 67-69.
55. PW C. Management of acquired haemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011: p. 226-235.
56. Hunt S RJCJCJRJCJHMRJYWTMAMJ. A low-dose rituximab regimen for first-line treatment of acquired haemophilia A. *European Journal of Haematology*. 2022 Jan: p. 28-33.
57. Lancé M. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thrombosis Journal*. 2015 Jan.
58. Volod O BCZNMEMHKHNMAFMPSWGAFHMMTATSGLKRZMKPFDWM. Viscoelastic Hemostatic Assays: A Primer on Legacy and New Generation Devices. *Journal of Clinical Medicine*. 2022: p. 860.
59. Whiting D DJ. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *American Journal of Hematology*. 2013 Oct: p. 228-232.
60. Dang XT NTNHHH. Correlations between rotational thromboelastometry (ROTEM) and standard coagulation tests following viper snakebites. *Journal of International Medical Research*. 2022.

61. Li Daphe WHMaAT. Overview, Measurement and Point-of-Care Testing of Platelet Function. In Loftus CM. Anticoagulation and Hemostasis in Neurosurgery.; 2016. p. 55-65.
62. Nogami K. The utility of thromboelastography in inherited and acquired bleeding disorders. British Journal of Haematology. 2016: p. 503-514.
63. Akay OM. The Double Hazard of Bleeding and Thrombosis in Hemostasis From a Clinical Point of View: A Global Assessment by Rotational Thromboelastometry (ROTEM). Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2018 Sep: p. 850-858.
64. Drotarova M ZJBKBSISJST. Basic Principles of Rotational Thromboelastometry (ROTEM®) and the Role of ROTEM-Guided Fibrinogen Replacement Therapy in the Management of Coagulopathies. Diagnostics. 2013 Oct: p. 3219.
65. Alvitigala BY GLCGWRAL. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic assays to monitor clopidogrel therapy. Pharmacology Research & Perspectives. 2020.
66. Maji D NLMJSUSGAMPSPMAS. A novel, point-of-care, whole-blood assay utilizing dielectric spectroscopy is sensitive to coagulation factor replacement therapy in haemophilia A patients. Haemophilia. 2019 Sep: p. 885-892.
67. Chitlur M SBRGYGIJOMNDKGEMLJ. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. Haemophilia. 2011 May: p. 532-537.
68. Brummel-Ziedins KE WA. Global assays of hemostasis. HEMOSTASIS AND THROMBOSIS. 2014 Sep: p. 395-403.
69. Mauch J SNHSMCKABWRWMHT. Intrarater and interrater variability of point of care coagulation testing using the ROTEM delta. Blood Coagulation & Fibrinolysis. 2011 Dec: p. 662-666.
70. Tarzia V BEBGPCBJBTGG. The danger of using a sledgehammer to crack a nut: ROTEM-guided administration of recombinant activated factor VII in a patient with refractory bleeding post-ventricular assist device implantation. Artificial Organs. 2015 Mar: p. 248-253.
71. Haas T SNMJSOSMWM. Reproducibility of thrombelastometry (ROTEM®): point-of-care versus hospital laboratory performance. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2012 Jul: p. 313-317.
72. Najafi A NMEFPPIFKMSMR. Comparison of aPTT and CT Parameter of the ROTEM Test to Monitor Heparin Anti-Coagulation Effect in ICU Patients: an Observational Study. Acta Medica Iranica. 2015 Oct: p. 643-646.
73. Meianu C ASDMLDGPDPG. Rotational Thromboelastometry Coagulation Parameters (ROTEM®) May be Discriminative for Active Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Observational Study. Journal of the Romanian Societies of Gastroenterology. 2023 Sep: p. 298-305.
74. Gupta D AVDJGNKMSAKJ. Assessment of the phenotypic severity of hemophilia A: using rotational thromboelastometry (ROTEM) and APTT-clot waveform analysis. Blood Research. 2024 Mar.
75. He S EAPPWHGLSJBMMH. A ROTEM method using APTT reagent and tissue factor as the clotting activators may better define bleeding heterogeneity in moderate or severe haemophilia A (part I: Study in plasma samples). Thrombosis Research. 2018 Nov: p. 7-13.

76. Larsen MS VJRZSTKAMPKHMWBSUKM. Rotational thromboelastometry can predict the probability of bleeding events in a translational rat model of haemophilia A following gene-based FVIIa prophylaxis. *Haemophilia*. 2020 Jan: p. 164-172.
77. Ramiz S HJYGEMCM. Clinical utility of viscoelastic testing (TEG and ROTEM analyzers) in the management of old and new therapies for hemophilia. *American Journal of Hematology*. 2019: p. 249-256.
78. Tran HTT SBBSPATGAHP. Monitoring bypassing agent therapy - a prospective crossover study comparing thromboelastometry and thrombin generation assay. *Haemophilia*. 2015 Mar: p. 275-283.
79. Furukawa S NKSNNYMTSM. Prediction of the haemostatic effects of bypassing therapy using comprehensive coagulation assays in emicizumab prophylaxis-treated haemophilia A patients with inhibitors. *British Journal of Haematology*. 2020 Sep: p. 727-735.
80. Yada K NKOKSYFSYHTMKRSM. Global coagulation function assessed by rotational thromboelastometry predicts coagulation-steady state in individual hemophilia A patients receiving emicizumab prophylaxis. *International Journal of Hematology*. 2019 Oct: p. 419-430.

