



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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίπεδα παραγόντων πήξεως σε ασθενείς με  
αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.**

POST GRADUATE THESIS

**Coagulation factor levels in patients with  
antiphospholipid syndrome.**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENTS

**Λάτκα Αικατερίνη  
Latka Ekaterini**

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Αναστάσιος Κριεμπάρδης  
Anastasios Kriebardis**

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



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



POST GRADUATE THESIS  
**Coagulation factor levels in patients with  
antiphospholipid syndrome.**



Latka Katerina  
dml20042  
Katerina.latka1996@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR  
Anastasios Kriebardis

SECOND SUPERVISOR  
Sotirios Fortis

AIGALEO 2023

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 07/07/2023

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξετα-

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ  
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ

στής

2<sup>ος</sup> Εξετα-

ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ

στής

## Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Λάτκα Αικατερίνη του Κώστα, με αριθμό μητρώου 20042 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Λάτκα Αικατερίνη

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την διπλωματική μου εργασία «Επίπεδα παραγόντων πήξεως σε ασθενείς με αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο» η οποία πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών και Διευθυντής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και τον χρόνο που δέχθηκε δίνοντας μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Στο ίδιο πλαίσιο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο επιβλέποντα καθηγητή μου Σωτήριο Φόρτη για την στήριξη του και την βοήθεια του στο στατιστικό μέρος της εργασίας.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Ευθυμία Παύλου, Προϊσταμένη του Παραϊατρικού Τμήματος Ιατρικής Υπηρεσίας του Γ.Ν.Α Ιπποκράτειο για την στήριξη, την καθοδήγηση και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε όλο το χρονικό διάστημα εκπόνησης της εργασίας μου. Ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το άτομο μου, αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα διπλωματικής εργασίας.

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

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη και την ενθάρρυνση σε όλο το διάστημα των σπουδών μου και ειδικότερα την μητέρα μου για την παρότρυνση της να συμμετέχω στο Μ.Π.Σ.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τον σύντροφο μου Αμπανούμπ Μπεσάϊ για την κατανόηση, την στήριξη και πολύτιμη βοήθεια του καθώς και την φίλη μου Μιχαήλ Μαίρη και την αδερφή μου Λάτκα Κωνσταντίνα.

## Πρόλογος

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι μια αυτοάνοση νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, σε συνδυασμό με ιστορικό θρόμβωσης (αρτηριακής ή/και φλεβικής) και με θρομβοπενία. Στα κριτήρια ταξινόμησης για την διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου περιλαμβάνονται: το αντιπηκτικό του Λύκου (LA), τα αντισώματα καρδιολιπίνης (ACL IgG, ACL IgM), και τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (αντι-β2GP-I), τα οποία *in vitro* έχουν αντιγονικούς επιτόπους πρωτεΐνης πλάσματος που συνδέονται με συμπλέγματα φορτισμένων φωσφολιπιδίων - μεμβράνης και η παρουσία τους *in vivo* στον ορό έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση αρτηριακών και φλεβικών θρομβώσεων καθώς και με επιπλοκές στην κύηση.

**Σκοπός:** Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετηθεί εάν το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο επηρεάζει τους παράγοντες πήξεως σε ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο.

**Μέθοδος:** Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από το Γ.Ν.Α Ιπποκράτειο, μελετήθηκαν 82 παθολογικά περιστατικά και 20 υγιείς μάρτυρες. Από τους 82 ασθενείς οι 62,2% ήταν Άρρεν και οι 37,8% ήταν Θήλυ με μέση ηλικία τα 47,6 έτη. Πραγματοποιήθηκαν εξετάσεις σχετικά με το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο καθώς και Screening test. Στην συνέχεια τα παραπάνω δεδομένα καταγράφηκαν σε φύλλο Excel και ακολούθησε ανάλυση με το στατιστικό πρόγραμμα Graf προκειμένου να συγκριθούν οι παράγοντες πήξεως ανάμεσα στις 2 ομάδες.

**Αποτέλεσμα:** Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν σημαντική θετική στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στους ασθενείς με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και τους παράγοντες πήξης. Στους φυσιολογικούς η τιμή του APTT εντοπίστηκε κατά μέσο όρο στο 27,5 ενώ στους ασθενείς στο 39,8. Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ του APTT το οποίο στους ασθενείς εντοπίστηκε 39,8 με την τιμή του PTT-LA το οποίο ήταν 53,2.

**Συμπέρασμα:** Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την μελέτη ήταν πως παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση στα άτομα που νοσούν από το σύνδρομο, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένες τιμές σχετικά με τους παράγοντες πήξης. Είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση σχετικά με τους παράγοντες πήξης ώστε να ανακαλυφθούν νέες αντιπηκτικές αγωγές που θα χορηγούνται στους ασθενείς με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.

**Λέξεις κλειδιά:** Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, παράγοντες πήξης, αντι-B2 GPI, καρδιολιπίνες, Αντιπηκτικό του Λύκου.

## Abstract

Antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease characterised by the presence of antiphospholipid antibodies, combined with a history of thrombosis (arterial and/or venous) and thrombocytopenia. Classification criteria for the diagnosis of antiphospholipid syndrome include: Lupus anticoagulant (LA), cardiolipin antibodies (ACL IgG, ACL IgM), and antibodies against  $\beta$ 2-glycoprotein I (anti- $\beta$ 2GP-I), which in vitro have antigenic plasma protein-protein epitopes associated with charged phospholipid-membrane complexes and their presence in vivo in serum has been associated with the occurrence of arterial and venous thrombosis and complications in pregnancy.

**Aim:** The aim of this study is to investigate whether antiphospholipid syndrome affects coagulation factors in patients suffering from the syndrome.

**Methods:** Data were collected from the General Hospital IPPOKRATIO, 82 pathological cases and 20 healthy controls were studied. Of the 82 patients, 62.2% were male and 37.8% were female with a mean age of 47.6 years. Tests regarding Antiphospholipid syndrome as well as Screening test were performed. Then the above data were recorded in excel sheet followed by analysis with Graf statistic program in order to compare the clotting factors between the 2 groups.

**Results:** The results showed a significant positive statistical correlation between patients with Antiphospholipid syndrome and coagulation factors. In normal subjects the APTT value was found to be on average 27.5 while in patients it was 39.8. In addition, a significant statistical correlation was observed between the APTT which in patients was detected 39.8 with the PTT-LA value which was 53.2.

**Conclusion:** The conclusions drawn from the study were that there is a significant positive correlation in the subjects suffering from the syndrome, who have elevated values regarding coagulation factors. Further future investigation on coagulation factors is necessary to discover new anticoagulant treatments to be administered to patients with Antiphospholipid syndrome.

**Key words:** Antiphospholipid syndrome, clotting factors, anti-B2 GPI, cardiolipins, lupus anticoagulant.

## Περιεχόμενα

.....	1
Επιτροπή εξέτασης.....	ii
Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Πρόλογος.....	v
Abstract.....	vi
Πίνακας περιεχομένων εικόνων.....	xi
Συνομογραφίες.....	xii
1.    ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.  Αιμοπετάλια.....	1
1.2.  Το αιμοφόρο αγγείο.....	2
1.3.  Λειτουργία Ενδοθηλιακού Κυττάρου.....	2
1.4.  Προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων.....	3
1.5.  Πήξη του αίματος και αιμόσταση.....	3
1.5.1.  Προσκόλληση αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο ενός κατεστραμμένου αιμοφόρου αγγείου.....	3
1.5.2.  Συσσώρευση των αιμοπεταλίων προς σχηματισμό του αιμοστατικού πύματος.....	3
1.5.3.  Προπηκτική δράση των αιμοπεταλίων τερματίζεται με την απομάκρυνση του θρόμβου του ινώδους.....	4
2.    Μηχανισμός της αιμόστασης.....	5
2.1.  Στάδια αιμόστασης.....	5
2.2.  Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος.....	5
2.2.1.  Ενδογενής οδός.....	6
2.2.2.  Εξωγενής οδός.....	6
2.2.3.  Κοινή οδός.....	6
2.3.  Λύση του Ινώδους.....	6
2.4.  Παράγοντες του μηχανισμού πήξης.....	7
2.5.  Παράγοντες που συμμετέχουν στην ενδογενή οδό.....	8
2.5.1.  Παράγοντας V.....	8
2.5.2.  Παράγοντας VIII.....	8
2.5.3.  Παράγοντας IX.....	8



2.5.4. Παράγοντες XI-XII .....	8
2.5.5. Καλλικρεΐνη – HMWK .....	9
3. Θρομβώσεις-Θρομβοφιλίες .....	10
3.1. Κληρονομική θρομβοφιλία .....	10
3.2. Κληρονομικοί παράγοντες της θρομβοφιλίας .....	10
3.2.1. Μείωση των φυσικών αντιπηκτικών .....	10
3.2.2. Παράγοντας V LEIDEN .....	11
3.2.3. Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης .....	11
3.2.4. MTHFR- Υπερομοκυστεΐναιμία .....	11
3.2.5. Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης (ATIII) .....	12
3.2.6. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C [PC] .....	12
3.2.7. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S [PS] .....	13
3.3. Επίκτητη θρομβοφιλία .....	13
4. ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ .....	15
4.1. Ορισμός .....	15
4.2. Ιστορική Αναδρομή .....	15
4.3. Ταξινόμηση του APS .....	16
4.4. Παθοφυσιολογία .....	16
4.5. Πώς επεμβαίνουν τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στον καταρράκτη της πήξης: .....	17
4.6. Β2 Γλυκοπρωτεΐνη (Β2-GPI) .....	19
4.7. Καρδιολιπίνες .....	21
4.8. Αντιπηκτικό του Λύκου .....	21
4.9. Κριτήρια ταξινόμησης ΑΦΣ Sapporo – Sydney .....	22
4.9.1. Κατηγορίες δοκιμασιών για την διάγνωση του APS .....	23
4.9.2. Διαφορές στα κριτήρια Sapporo και Sydney .....	23
4.9.3. Κλινικές εκδηλώσεις .....	23
4.9.4. Κλινικές εκδηλώσεις και εργαστηριακά ευρήματα που δεν συμπεριλαμβάνονται στα κριτήρια .....	24
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	25
1. Πληθυσμός μελέτης .....	26
2. Πειραματική διαδικασία .....	26
2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων .....	26
3. Μέθοδος PTT-LA .....	27

3.1. Αρχή της δοκιμασίας .....	27
3.2. Λήψη και χειρισμός δείγματος .....	27
3.3 . Σύνθεση προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου.....	27
3.4. Διαδικασία.....	27
3.5. Αποτελέσματα .....	28
4. STACLOT DRVV SCREEN – STACLOT DRVV CONFIRM (ΜΕΘΟΔΟΣ STAGO) .....	28
4.1. Αρχή της δοκιμασίας .....	28
4.2. Kit – Αντιδραστήριο.....	28
4.3. Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου .....	28
4.4. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός .....	29
4.5. Διαδικασία.....	29
4.6. Αποτελέσματα .....	29
4.7. Ερμηνεία αποτελεσμάτων.....	30
5. IL DRVVT Screen -IL DRVVT Confirm.....	30
5.1. Προβλεπόμενη χρήση.....	30
5.2. Αρχή μεθόδου.....	30
5.3. Σύνθεση .....	31
5.4. Παρασκευή, αποθήκευση και σταθερότητα αντιδραστηρίου.....	31
5.5. Συλλογή προετοιμασία και χειρισμός δειγμάτων.....	32
5.6. Έλεγχος ποιότητας.....	32
5.7. Αποτελέσματα .....	32
6. Μέτρηση B2 γλυκοπρωτεΐνης .....	32
6.1. Αρχή της δοκιμασίας .....	32
6.2. Προετοιμασία δείγματος.....	33
6.3. Προετοιμασία πριν την χρήση.....	33
6.4. Διαδικασία .....	33
7. Μέτρηση Καρδιολιπίνης.....	33
7.1. Αρχή της δοκιμασία.....	33
7.2. Μέθοδος και αποθήκευση .....	34
7.3. Προετοιμασία πριν την χρήση.....	34
7.4. Διαδικασία δοκιμής.....	34
7.5. Επεξεργασία δεδομένων.....	35
8. Στατιστικός έλεγχος – Συμπεράσματα .....	36

Συζήτηση.....	43
Συμπέρασμα .....	46
Βιβλιογραφία.....	47

## Πίνακας περιεχομένων εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1. ΔΟΜΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.....	1
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ. ....	19
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΔΟΜΗ ΤΟΥ Β2 GPI.....	20
ΕΙΚΟΝΑ 4. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΙΤΑΣ ΜΕ ΤΟΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	36
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΗΛΙΚΙΑΣ ΑΣΘΕΝΩΝ. ....	37
ΕΙΚΟΝΑ 6. ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΤΟΥ ΑΡΤΤ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ. ....	38
ΕΙΚΟΝΑ 7. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΑΡΤΤ ΜΕ ΤΗΝ ΡΤΤ-ΛΑ. ....	38
ΕΙΚΟΝΑ 8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΑΡΤΤ ΜΕ ΤΟ ΡΤΤ-ΛΑ.....	39
ΕΙΚΟΝΑ 9. ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ TR-IL ΚΑΙ TR-STAGO ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ. ....	40
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΙΣ ΤΙΜΕΣ TR-IL ΚΑΙ TR-STAGO.....	40
ΕΙΚΟΝΑ 11. ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	41
ΕΙΚΟΝΑ 12. ΘΕΡΜΙΚΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ TR-IL ΚΑΙ TR-STAGO ΜΕΤΑΞΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	36

## Συντομογραφίες

Αγγλική ορολογία

Ελληνική ορολογία

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor)	ΣΕΛ: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος)
t-PA: tissue Plasminogen Activator	Anti-b2 GPI: Αντι β2 γλυκοπρωτεΐνη I
HMWK: High Molecular Weight kininogen	a-CL: Αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης
APC: Activated protein C	ADP: Διφωσφορική αδενοσίνη
VTE: venous thromboembolic event,	ΕΦΘ: Εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση
DVT: deep venous thrombosis,	OEM: Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου
GPI: glycosylphosphatidylinositol	NO: μονοξείδιο του αζώτου
GpIIb: Glycoprotein IIb	PK: Προκαλκικρεΐνη πλάσματος
GpIIIa: Glycoprotein IIIa	TAFI: Αναστολέα ινωδόλυσης
GpIb: Glycoprotein Ib	CBS: Ενζύμου β-συνθετάση της κυσταθειονίνης
C4BP: C4b-binding protein	MS: Ενζύμων συνθετάση της μεθειονίνης
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory	MTHFR: 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή
RPR: Rapid Plasma Reagin	BHMT: μεθυλτρανσφεράση βεταΐνης - ομοκυστεΐνης
MMPs: Matrix metalloproteinases	ΑΤΙΙΙ: Αντιθρομβίνη ΙΙΙ
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1	APS: Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
ICAM-1: ntercellular adhesion molecule-1	PAI-1: Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου
PL: Plasmin	HRP: Υπεροξειδάση αγριοραπανίδας
VWF: Von Willebrand Factor	LAC: Αντιπηκτικό του Λύκου
	TMB: τετραμεθυλοβενζιδίνη
	NFkB: Πυρηνικός παράγοντας kB

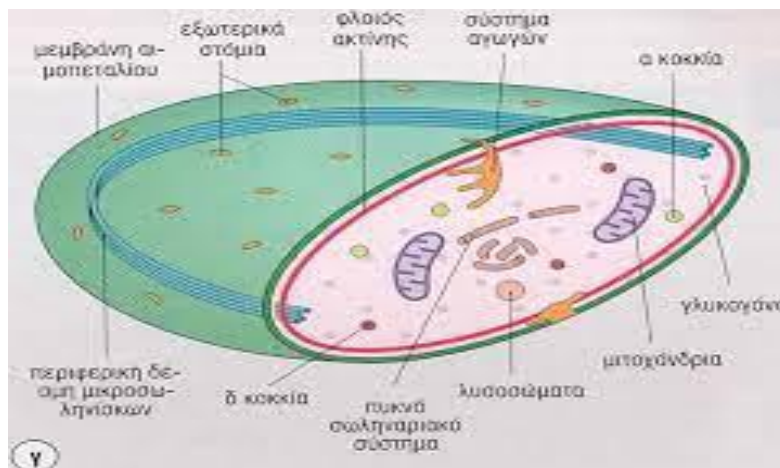
	p38MAPK :Πρωτεΐνη κινάση
	EPCR: Ενδοθηλιακός υποδοχέας της πρωτεΐνης C
	EAA: Επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές
	APTT: χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
	dRVVT : Αραιό δηλητήριο οχιάς Russell
	AEE: Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι κυτταροπλασματικά θραύσματα που προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα (Semple, Italiano, & Freedman, 2011). Η διάμετρος τους υπολογίζεται από 1,5 – 3,5 μm αλλά σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να είναι μεγαλύτερα (Speth et al., 2015). Τα αιμοπετάλια παράγονται υπό τον έλεγχο της θρομβοποιητίνης η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 35 – 70kd και παράγεται στο νεφρό και στο ήπαρ. Τα μεγακαρυοκύτταρα δημιουργούν κυτταροπλασματικές προσεκβολές οι οποίες μετατρέπονται σε προαιμοπετάλια και στην συνέχεια κατακερματίζονται σε αιμοπετάλια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται εντός 10 – 12 ημερών. Τα αιμοπετάλια δεν έχουν πυρήνα και περιβάλλονται από μια μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας (Mezger et al., 2019). Κάτω από την εξωτερική μεμβράνη υπάρχει η οριακή ζώνη των μικροσωληνίσκων η οποία ρυθμίζει το σχήμα του αιμοπεταλίου και αποπολυμερίζεται όταν ξεκινά η συσσώρευση. Το κεντρικό κυτταρόπλασμα αποτελείται από τρεις τύπους αιμοπεταλιακών κοκκίων: τα κοκκία δ, τα κοκκία α και τα λυσοσωμικά κοκκία (Charliuk & Gritsman, 1985),(Portier & Campbell, 2021).

Επιπλέον τα αιμοπετάλια διαθέτουν το ανοικτό σωληναριακό σύστημα το οποίο επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον και το σύστημα πυκνών σωληναρίων. Μέσω της αιμοπεταλιακής μεμβράνης επικοινωνεί με το περιβάλλον του πλάσματος και το τοίχωμα των αγγείων που έχουν υποστεί βλάβη (Melki, Tessandier, Zufferey, & Boilard, 2017). Η αιμοπεταλιακή μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, γλυκολιπίδια και εννέα γλυκοπρωτεΐνες (GPI-GPIX). Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η μεμβράνη εκφράζει θέσεις δέσμησης για αρκετές πρωτεΐνες πήξης όπως οι παράγοντες XI και VIII (Colberg, Cammann, Greinacher, & Seifert, 2020).



Εικόνα 1. Δομή αιμοπεταλίων.

Στην παρούσα εικόνα διακρίνεται η δομή των αιμοπεταλίων καθώς και τα οργάνιδιά αυτών. Όπως διακρίνεται τα αιμοπετάλια αποτελούνται από τρεις τύπους κοκκίων: τα κοκκία δ, τα κοκκία α και τα λυσοσωμικά κοκκία. Το αιμοπετάλιο περιβάλλεται από την εξωτερική μεμβράνη και κάτω από αυτήν βρίσκεται η περιφερική ζώνη μικροσωληνίσκων. Εσωτερικά περιλαμβάνει το ανοικτό σύστημα αγωγών με το οποίο επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον καθώς και το πυκνό σωληναριακό σύστημα. Ο γλυκοκάλυκας που

διαθέτει περιέχει γλυκοζαμινογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων.

[https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRcCRW4Nw2OcS-ceCzH4BniEjkEwjtgcgHtvAdQzhaMJNI\\_jlCxI8DqrJbCeQ5YQ5pEVmQ&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRcCRW4Nw2OcS-ceCzH4BniEjkEwjtgcgHtvAdQzhaMJNI_jlCxI8DqrJbCeQ5YQ5pEVmQ&usqp=CAU)

## 1.2. Το αιμοφόρο αγγείο

Τα αιμοφόρα αγγεία αποτελούνται από τρεις χιτώνες: τον έσω, το μέσο και τον έξω χιτώνα. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από το ενδοθήλιο και τον υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Η έσω ελαστίνη μεμβράνη διαχωρίζει τον έσω χιτώνα από το μέσο χιτώνα.

Το ενδοθήλιο αποτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν μια συνεχόμενη στιβάδα η οποία επενδύει όλα τα αιμοφόρα αγγεία. Η λειτουργία και η δομή των ενδοθηλιακών κυττάρων ποικίλλει, όταν είναι σε κατάσταση ηρεμίας εντοπίζονται τα εξής τρία χαρακτηριστικά: είναι «μη θρομβογόνο» (δηλαδή διατηρεί το αίμα στην υγρή του μορφή), παρέχει θρεπτικά συστατικά στις επενδοθηλιακές δομές και λειτουργούν ως φραγμός για τα κύτταρα. Η διαπερατότητα του ενδοθηλίου μεταβάλλεται κάθε φορά ώστε να επιτρέπει την είσοδο μορίων και κυττάρων (van Hinsbergh, 2001).

## 1.3. Λειτουργία Ενδοθηλιακού Κυττάρου

A. Το ενδοθηλιακό κύτταρο περιλαμβάνει την ενδοαυλική επιφάνεια η οποία καλύπτεται από τον γλυκοκάλυκα ( δηλαδή ένα κάλυμα πρωτεογλυκανών). Περιέχει θειική ηπαρίνη και άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες που μπορούν να ενεργοποιήσουν έναν σημαντικό αναστολέα των ενζύμων της πήξης, την αντιθρομβίνη. Επίσης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων βρίσκεται ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor – TFPI). Ένας αριθμός ενεργών πρωτεϊνών της πήξης εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως η θρομβοδουλίνη και ο υποδοχέας της ενδοθηλιακής πρωτεΐνης C (endothelial Protein C -PC). Στο σημείο τραυματισμού παράγεται η θρομβίνη η οποία ταχέως δεσμεύεται στην θρομβομοντουλίνη. Ύστερα μετά από αυτήν την σύνδεση η θρομβίνη έχει την δυνατότητα να ενεργοποιήσει την PC (αποδημεί τους παράγοντες Va και VIIIa) και μια καρβοξυπεπτιδάση η οποία αναστέλλει την ινωδόλυση. Ένας ακόμη ρόλος της θρομβίνης είναι να διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράξουν τον ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator t-PA). Το ενδοθήλιο έχει την δυνατότητα να συνδέσει πρωτεΐνη S, τον συμπαράγοντα της PC, καθώς επίσης παράγει τον παράγοντα von Willebrand (VWF) ο οποίος είναι αναγκαίος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο και σταθεροποιεί τον παράγοντα VIII εντός της κυκλοφορίας. Ο παράγοντας von Willebrand αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel Palade που βρίσκονται στα κοκκία των αιμοπεταλίων και εκκρίνονται τόσο στην κυκλοφορία όσο και προς το ενδοθήλιο όπου συνδέεται με το κολλαγόνο και άλλες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Τέλος το ενδοθηλιακό κύτταρο παράγει αγγειοτενσίνη II, μονοξείδιο του αζώτου (NO), προστακυκλίνη ή αγγειοσυσπαστικές ουσίες όπως ενδοθηλίνη και θρομβοξάνη.

B. Το υπενδοθήλιο αποτελείται από συνδετικούς ιστούς: κολλαγόνο, ελαστικούς ιστούς, πρωτεογλυκάνες και μη κολλαγονώδεις γλυκοπρωτεΐνες περιλαμβανομένων του ινωδογόνου και του παράγοντα VWF. Μετά από τραυματισμό του ενδοθηλίου τα συστατικά αυτά είναι πλέον εκτεθειμένα και προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το κολλαγόνο δεσμεύει το VWF. Ο von Willebrand αφού υποστεί μεταβολή της χωροδιάταξης του



και πλέον μέσω αυτού του υποδοχέα πραγματοποιείται ασφαλέστερα η δέσμευση στον παράγοντα VWF καθώς επίσης και στο ινωδογόνο (Mackman, Tilley, & Key, 2007),(Bhattarai et al., 2022).

#### 1.4. Προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Όταν τραυματίζονται τα αγγεία, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και σχηματίζουν αιμοπεταλιακό θρόμβο. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο αγγειακό τοίχωμα και εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους. Η συσσώρευση αυξάνεται με την απελευθέρωση του παράγοντα Von Willebrand από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος παράγοντας προκαλεί προσκόλληση των γλυκοπρωτεϊνών υποδοχέων GrIb της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και του ινωδογόνου. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και θρομβοξάνη A2 τα οποία προσελκύουν περισσότερα αιμοπετάλια στο σημείο του τραύματος, τα αιμοπετάλια αλλάζουν μορφολογία, εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους και συγκεντρώνεται μεγαλύτερος αριθμός αιμοπεταλίων στο σημείο. Επιπρόσθετα τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν παράγοντες που ενεργοποιούν την διαδικασία της πήξης με αποτέλεσμα την δημιουργία θρόμβου. Οι πρωτεΐνες GrIIb και GrIIIa της μεμβράνης των αιμοπεταλίων προσκολλώνται στο ινωδογόνο και το ινώδες και σχηματίζουν πιο σταθερό θρόμβο (Belyaev & Kushchenko, 2023).

#### 1.5. Πήξη του αίματος και αιμόσταση

##### 1.5.1. Προσκόλληση αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο ενός κατεστραμμένου αιμοφόρου αγγείου

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν τρία στοιχεία: α)διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) το οποίο όπως αναφέρθηκε και παραπάνω βοηθάει στο να προσέλθουν παραπάνω αιμοπετάλια στο σημείο του τραύματος, β) θρομβοξάνη A2 η οποία έχει τον ίδιο ρόλο με το ADP αλλά προκαλεί και αγγειοσύσπαση και τέλος γ) το Ca<sup>2+</sup> το οποίο συμμετέχει στην πήξη.

Από τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνεται ο ιστικός παράγοντας TF ο οποίος προσδένεται με τον παράγοντα VIIa . Ο VIIa μετατρέπει τον παράγοντα X σε Χα όπου ύστερα ακολουθεί η κοινή οδός της πήξης.

Ο παράγοντας von Willebrand προσδένεται με τον υποδοχέα GrIb διευκολύνοντας την πρόσδεση τους στο κολλαγόνο και στην λαμινίνη του υπενδοθηλιακού χώρου.

Οι ενδοθηλίνες εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλούν σύσπαση των λείων μυών και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών με σκοπό να επιδιορθώσουν το αγγείο που έχει υποστεί την βλάβη.

##### 1.5.2. Συσσώρευση των αιμοπεταλίων προς σχηματισμό του αιμοστατικού πώματος

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους . Αυτό επιδιώκεται μέσω του ινωδογόνου του πλάσματος , το οποίο προσδένεται στους ενεργοποιημένους υποδοχείς ιντεγκρινών. Ακολουθεί η διάσπαση του ινωδογόνου από την θρομβίνη σε ινωδοπεπίδια ώστε να σχηματιστούν μονομερή του ινώδους.

Στην συνέχεια τα μονομερή του ινώδους συσσωρεύονται και σχηματίζουν τον μαλακό θρόμβο του ινώδους και ενώνονται με διασταυρούμενες συνδέσεις με τον παράγοντα XIII. Το αιμοστατικό πώμα δημιουργείται από την ένωση των αιμοπεταλίων και του ινώδους.

### 1.5.3. Προπηκτική δράση των αιμοπεταλίων τερματίζεται με την απομάκρυνση του θρόμβου του ινώδους

Η προπηκτική δράση ολοκληρώνεται με την διάλυση του θρόμβου του ινώδους. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη μέσω του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τον υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό του τραυματισμένου αγγείου). Η πλασμίνη διαλύει τον θρόμβο του ινώδους (Zhao et al., 2022),(Chen et al., 2020).

## 2. Μηχανισμός της αιμόστασης

Η αιμόσταση είναι ένας αμυντικός μηχανισμός, ο οποίος περιλαμβάνει ένα σύνολο μηχανισμών με σκοπό την αποκατάσταση της συνέχειας του τραυματισμένου αγγείου, την αποτροπή της αιμορραγίας καθώς και την αποφυγή σχηματισμού θρόμβωσης. Συνεπώς η αιμόσταση αποτελεί μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ αντικρουόμενων τάσεων προκειμένου να αποφευχθεί η θρόμβωση ή η αιμορραγία. Στην διαδικασία εμπλέκονται τα αιμοφόρα αγγεία, τα αιμοπετάλια, οι παράγοντες πήξης, οι αναστολείς πήξης και το ινωδολυτικό σύστημα. Η αιμόσταση διακρίνεται σε τρία στάδια την πρωτογενής, την δευτερογενής αιμόσταση και την ινωδόλυση (Geddings & Mackman, 2014).

### 2.1. Στάδια αιμόστασης

Η πρωτογενής αιμόσταση ενεργοποιείται όταν διαρραγεί το αγγειακό ενδοθήλιο. Στην συνέχεια ακολουθεί σύσπαση του αγγείου και αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων ώστε να σχηματιστεί ο αιμοπεταλιακός θρόμβος.

Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει τις αντιδράσεις της πήξης του αίματος οι οποίες έχουν ως τελικό σκοπό την μετατροπή του ινωδογόνου σε αδιάλυτο δίκτυο ινικής με το οποίο σταθεροποιείται ο αιμοπεταλιακός θρόμβος.

Τέλος η ινωδόλυση αποτρέπει την αύξηση του θρόμβου και επάγει την διάλυση του. Πραγματοποιείται αποδόμηση του ινώδους μετά την εκπλήρωση του αιμοστατικού ρόλου. Η διαδικασία ινωδόλυσης δεν περιορίζεται μόνο στην πήξη αλλά συμμετέχει και στην διαδικασία της ωθηλακιορρηξίας, στην γονιμοποίηση του ωαρίου, στην επούλωση των ιστών κ.α. Η ινωδόλυση ξεκινά την δεύτερη ημέρα από την έναρξη του φαινομένου της πήξης και διαρκεί μερικές ημέρες μέχρι να διαλυθεί ο θρόμβος. Η διαδικασία της ινωδόλυσης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως βιταμίνες, ορμόνες, θερμοκρασία σώματος, ηλικία, φύλο, άσκηση καθώς επίσης παρουσιάζει ημερήσια διακύμανση του αναστολέα του ενεργοποιητή του ινωδογόνου (PAI-1). Γι' αυτό τον λόγο παρουσιάζεται αυξημένο ποσοστό εμφάνισης εμφράγματος κατά τις πρωινές ώρες ενώ αυξάνεται η ικανότητα συγκόλλησης των αιμοπεταλίων (Geddings & Mackman, 2014).

### 2.2. Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος

Ο μηχανισμός της πήξης είναι ένας μηχανισμός ο οποίος έχει σκοπό να προφυλάξει τον οργανισμό από αιμορραγίες, αυτό το επιδιώκει σχηματίζοντας θρόμβο σε τραυματισμένο αιμοφόρο αγγείο μέσω της διαδικασίας παραγωγής θρομβίνης.

Στον μηχανισμό της πήξης συμμετέχουν πρωτεΐνες του πλάσματος, στοιχεία του αγγειακού ενδοθηλίου καθώς και κυτταρικά στοιχεία. Στην διαδικασία αυτή εμπλέκονται οι μηχανισμοί τόσο της πήξης όσο και της ινωδόλυσης. Στην πήξη του αίματος συμμετέχουν σε διαδοχική ενεργοποίηση διάφοροι παράγοντες που βρίσκονται στο αίμα σε ανενεργή κατάσταση.

Η ενεργοποίηση του μηχανισμού περιγράφεται μέσω δύο οδών, της ενδογενούς και εξωγενούς οδού.

### 2.2.1. Ενδογενής οδός

Η ενδογενής οδός της πήξης ενεργοποιείται από μια τοπική βλάβη της ενδοθηλιακής επένδυσης ενός αιμοφόρου αγγείου. Πυροδοτείται με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII μετά από αγγειακή βλάβη. Ο παράγοντας XII σε συνδυασμό με το κινινογόνο μεγάλου μοριακού βάρους [HMWK], την προκαλλικρεΐνη πλάσματος [PK] και τον παράγοντα XI (πάνω σε αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια) ενεργοποιούν τον παράγοντα XI σε XIa. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIIa καταλύει τον σχηματισμό του παράγοντα XIa. Η προκαλλικρεΐνη μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί πιο πολλά μόρια XII. Στην συνέχεια ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIa καταλύει την ενεργοποίηση τον παράγοντα IX σε IXa. Η ενεργοποίηση του παράγοντα IX από τον παράγοντα XIa απαιτεί την παρουσία  $Ca^{++}$  και φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Ο παράγοντας IXa σχηματίζει σύμπλεγμα με τον παράγοντα VIIIa και ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa. Ο παράγοντας X αποτελεί ένζυμο το οποίο μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη.

### 2.2.2. Εξωγενής οδός

Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται από φυσικούς τραυματισμούς όπως ρύξη του αιμοφόρου αγγείου. Μετά από τον τραυματισμό του αγγείου εκκρίνεται ο ιστικός παράγοντας (TF, Tissue Factor) ο οποίος είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη διαφόρων ιστικών κυττάρων. Όταν η αγγειακή βλάβη προκαλεί διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου, ο ιστικός παράγοντας (TF) δεσμεύει μια πρωτεΐνη του πλάσματος τον παράγοντα VII και ο συνδυασμός αυτός προκαλεί την έναρξη της διαδικασίας πήξης. Οι δύο παράγοντες συνδέονται με υψηλή συγγένεια μεταξύ τους και σχηματίζουν ισχυρό σύμπλεγμα TF/FVIIa, το οποίο δρά καταλυτικά για την ενεργοποίηση του παράγοντα X σε Xa. Το μεγαλύτερο μέρος του παράγοντα VII κυκλοφορεί ως ζυμογόνο (αδρανή μορφή) επιτρέποντας να κυκλοφορήσει στο πλάσμα το 1% του παράγοντα VIIa. Όταν το ζυμογόνο ενωθεί με το TF μετατρέπεται με την βοήθεια της πρωτεόλυσης σε ενεργοποιημένη μορφή VIIa. Τόσο η ενδογενής όσο και η εξωγενής οδός αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συγκλίνουν σε μια κοινή οδό σχηματίζοντας ένα θρόμβο ινώδους.

### 2.2.3. Κοινή οδός

Η κοινή οδός με το σύμπλεγμα FXa και FVa το οποίο με την παρουσία  $Ca^{++}$  και φωσφολιπιδίων καταλύει την μετατροπή ποσοτήτων προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η θρομβίνη διασπά το μόριο του ινωδογόνου μετατρέποντας το σε μονομερές ινώδους. Τα μονομερή ινώδους σχηματίζουν τον θρόμβο ινώδους (Key & Mackman, 2010).

## 2.3. Λύση του Ινώδους

Αφού έχει σχηματιστεί ο αιμοπεταλιακός θρόμβος και έχει αποκατασταθεί η βλάβη στο σημείο τραυματισμού ακολουθεί η λύση του ινώδους. Η διαδικασία της ινωδόλυσης ξεκινά με την βοήθεια δύο παραγόντων.

1) Αρχικά η ινωδογονολυτική δράση του πλάσματος που σχετίζεται με την πλασμίνη, το πλασμινογόνο, με τους αναστολείς και τους ενεργοποιητές του. Το πλασμινογόνο παράγει την πλασμίνη η οποία αποτελεί ένα δραστικό πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο έχει ως κύριο ρόλο να διασπά το ινώδες, να καταστρέφει τον θρόμβο, έχει τοπική δράση και ενισχύει την διατήρηση των αγγείων.

2) Δεύτερος παράγοντας αποτελεί η κυτταρική λύση του θρόμβου. Το κυτταρικό ινωδογονολυτικό σύστημα συγκροτείται από τα κύτταρα του αίματος (λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, μακροφάγα) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ως γνωστόν ο ρόλος των λευκών αιμοσφαιρίων και των μακροφάγων είναι η φαγοκυττάρωση. Φαγοκυτταρώνουν τα θραύσματα των κυττάρων που έχουν υποστεί καταστροφή και το ινώδες.

Πρωταρχικό ρόλο στην ινωδόλυση έχει η PL η οποία βοηθάει στην λύση του θρόμβου. Επίσης σημαντικός είναι και ο ρόλος του συστήματος MMP's το οποίο βοηθάει το αγγείο που έχει υποστεί την βλάβη να επανέλθει στην αρχική του μορφή. Τέλος ανασταλτές όπως η A2-αντιπλασμίνη, ο PAI και άλλοι διασφαλίζουν την ισορροπία στην διαδικασία της ινωδόλυσης (Rijken & Lijnen, 2009).

#### 2.4. Παράγοντες του μηχανισμού πήξης

Οι παράγοντες πήξης είναι μια σειρά πρωτεϊνών όπου στον καταρράκτη της πήξης ο προηγούμενος ανενεργός παράγοντας μετατρέπεται σε ενεργή μορφή τον επόμενο παράγοντα και αυτός με την σειρά του ενεργοποιεί τον αμέσως επόμενο παράγοντα. Αφού πραγματοποιηθεί ενεργοποίηση των παραγόντων πήξεως εκτελούνται διάφορες διεργασίες οι οποίες ρυθμίζουν και ελέγχουν την δράση των παραγόντων στο σημείο όπου έχει υποστεί την βλάβη, σταθεροποιούν τον πρωτογενή θρόμβο που έχει δημιουργηθεί και αποτρέπουν την γενικευμένη ενδοαγγειακή πήξη.

Οι πρωτεΐνες του μηχανισμού της πήξης είναι 13 σε αριθμό και συμβολίζονται με λατινικούς αριθμούς από το I έως XIII εκτός του αριθμού VI που δεν υπάρχει καμία συσχέτιση με κανέναν παράγοντα.

1. Παράγοντας I: Ινωδογόνο (πρωτεΐνη η οποία παράγεται στα ηπατικά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα, υπόστρωμα).
2. Παράγοντας II: Προθρομβίνη (μετατρέπεται σε θρομβίνη, ένζυμο).
3. Παράγοντας III: Ιστικός παράγοντας ή θρομβοπλασίνη (η σύνθεση του αποτελείται από ιόντα ασβεστίου, υποδοχέας - συνένζυμο).
4. Παράγοντας IV: Ασβέστιο (η σύνθεση του αποτελείται από ιόντα ασβεστίου).
5. Παράγοντας V: Προαξελарίνη (είναι γλυκοπρωτεΐνη, βοηθάει στην μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, Qσυνένζυμο).
6. Παράγοντας VI: Δεν αντιστοιχεί.
7. Παράγοντας VII: Προκομβερτίνη, (ένζυμο).
8. Παράγοντας VIII: A-αντιαιμορροφιλικός παράγοντας, von Willebrand ( παράγεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συνένζυμο).
9. Παράγοντας IX: B-αντιαιμορροφιλικός παράγοντας Christmans (ένζυμο).
10. Παράγοντας X: Stuart - Prower (ένζυμο).
11. Παράγοντας XI: Αντιαιμορροφιλικός παράγοντας C (λαμβάνει μέρος στην παραγωγή της θρομβίνης, ένζυμο).
12. Παράγοντας XII: Hageman, (ένζυμο).
13. Παράγοντας XIII: Παράγοντας σταθεροποίησης του ινώδους, (πρόένζυμο).

Οι παράγοντες συντίθενται στο ήπαρ εκτός από τον παράγοντα IV και III τα οποία αποτελούνται από ιόντα ασβεστίου.

Οι παράγοντες πήξης ταξινομούνται με βάση:

1. Παράγοντες που εξαρτώνται από την βιταμίνη Κ: II, VII, IX, X Πρωτεΐνη C, Πρωτεΐνη S.
2. Παράγοντες με ευαισθησία στην θρομβίνη: I, V, VIII, XIII.
3. Παράγοντες επαφής: XII, XI υψηλού μοριακού βάρους Κινογονόνο, Πρεκαλινκρεΐνη.
4. Φωσφολιπίδια και ιόντα Ca.
5. Ανασταλτές πήξης.

Εκτός από τους παράγοντες πήξης παίρνουν μέρος πλασματικοί παράγοντες, συμπαράγοντες φωσφολιπίδια από ιστούς και μεμβράνες κυττάρων και ανασταλτές (Key & Mackman, 2010).

## 2.5. Παράγοντες που συμμετέχουν στην ενδογενή οδό

### 2.5.1. Παράγοντας V

Η σύνθεση του ξεκινά από το ήπαρ, τα αιμοπετάλια (20-25 %) και τα μεγακαρυοκύτταρα. Αποτελεί μια πρωτεΐνη η οποία δεν εξαρτάται από την βιταμίνη Κ. Ο παράγοντας V στην ενεργή του μορφή Va λειτουργεί ως συμπαράγοντας και ο κύριος ρόλος του είναι να μετατρέψει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η έλλειψη του μπορεί να οφείλεται: α) σε συγγενή ανεπάρκεια το οποίο συνήθως συνυπάρχει με την έλλειψη του παράγοντα VIII, β) σε επίκτητη ανεπάρκεια το οποίο είναι και το πιο σύνηθες. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται παρατεταμένος χρόνος PT και APTT με αποτέλεσμα το άτομο να αιμορραγεί (Huang & Koerper, 2008).

### 2.5.2. Παράγοντας VIII

Ο παράγοντας VIII συντίθεται στο ήπαρ και βρίσκεται συνδεδεμένος με τον von Willebrand. Ενεργοποιείται από την προθρομβίνη και η ενεργή μορφή του VIIIa μαζί με την παρουσία Ca και φωσφολιπιδίων δρά για την γρηγορότερη ενεργοποίηση του παράγοντα X σε Xa.

Η έλλειψη του παρατηρείται σε ασθενείς με αιμορροφιλία A οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένο χρόνο APTT και PT. Το γονίδιο του παράγοντα VIII εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X και κληρονομείται με υπολειπόμενο χαρακτήρα (Antonarakis, 1995).

### 2.5.3. Παράγοντας IX

Αποτελεί έναν παράγοντα ο οποίος εξαρτάται από την βιταμίνη Κ, συντίθεται στο ήπαρ και ονομάζεται παράγοντας Christmas ή B-αιμορροφιλικός. Ενεργοποιείται από τον IX σε IXa με την βοήθεια των παραγόντων VIIa και XIa. Η απουσία του είναι υπεύθυνη για την αιμορροφιλία B και εργαστηριακά παρ' όλο που γίνεται αντιληπτός ο αυξημένος χρόνος APTT, ο χρόνος PT παραμένει φυσιολογικός (Di Scipio, Kurachi, & Davie, 1978).

### 2.5.4. Παράγοντες XI-XII

Ο παράγοντας XII ή αλλιώς Hageman Factor αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία ενεργοποιείται ερχόμενη σε επαφή με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και αποτελεί ενεργοποιητή της προκαλινκρεΐνης.

Ο παράγοντας XI ή αλλιώς αντιαιμορροφιλικός παράγοντας C είναι επίσης μια γλυκοπρωτεΐνη και εντάσσεται στην κατηγορία των παραγόντων επαφής.

Και οι δύο ξεκινούν την διαδικασία παραγωγής θρόμβου όταν έρθουν σε επαφή με επιφάνεια αρνητικά φορτισμένη. Ενεργοποιείται ο παράγοντας XII και κατόπιν ο παράγοντας XI, το πλασμινογόνο και η προκαλλικρεΐνη. Απαραίτητη είναι και η παρουσία ΗΜWΚ ως συμπαράγοντας ώστε να σχηματιστεί το τελικό σύμπλεγμα. Ο ρόλος του είναι πολύ βασικός καθώς οδηγεί το σύμπλεγμα προς την αγγειακή επιφάνεια προκειμένου να συναντήσει το XIIa. Σημαντική επίσης είναι η παρουσία των ιόντων ασβεστίου και των φωσφολιπιδίων τα οποία έχουν αναλάβει τον ρόλο να σχηματίσουν την αρνητική φορτισμένη επιφάνεια η οποία είναι αναγκαία ώστε να ενεργοποιηθούν οι παράγοντες πήξης (Stavrou & Schmaier, 2010).

#### 2.5.5. Καλλικρεΐνη – ΗΜWΚ

Η καλλικρεΐνη δημιουργείται από την προκαλλικρεΐνη μέσω του παράγοντα XII. Παράταση του ΑΡΤΤ εντοπίζεται όταν στο αίμα του ασθενή υπάρχουν χαμηλά επίπεδα της προκαλλικρεΐνης. Η προκαλλικρεΐνη υπάρχει στο πλάσμα μαζί με το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους. Το σύμπλεγμα προκαλλικρεΐνης - κινινογόνου ενεργοποιεί το XII. Στην συνέχεια η προκαλλικρεΐνη μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη από το XIIa.

Παράταση του ΑΡΤΤ προκαλεί και το ΗΜWΚ το οποίο καταλύει τις παρακάτω αντιδράσεις :

1. Ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη μέσω του XII (XIIa), (η προκαλλικρεΐνη βοηθάει στην μεγαλύτερη παραγωγή του XII).
2. Ο παράγοντας XI συνδέεται με την προκαλλικρεΐνη μέσω της ΗΜWΚ. Το σύμπλεγμα που δημιουργείται ενεργοποιεί τον παράγοντα XI (συμμετέχει και ο XIIa).
3. Παραγωγή βραδυκινίνης (Lijnen, 2001).



### 3. Θρομβώσεις-Θρομβοφιλίες

Θρόμβωση ονομάζεται η κατάσταση κατά την οποία ένας θρόμβος παρεμποδίζει την ροή του αίματος μέσα σε ένα αγγείο, αρτηρία ή φλέβα προκαλώντας απόφραξη του. Η απόφραξη μπορεί να είναι ολική ή μερική. Η κατάσταση αυτή μπορεί να προκληθεί από την τριάδα του Virchow εξαιτίας: α) βλάβης στο ενδοθήλιο του αγγείου, β) είτε από διαταραχές στην ροή του αίματος, γ) είτε από κάποια δυσλειτουργία στα συστατικά του μηχανισμού πήξης.

Ο όρος θρομβοφιλία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1965 από τον Egeber και είναι η κατάσταση κατά την οποία ένα άτομο έχει προδιάθεση να δημιουργεί θρόμβους στην αιματική του κυκλοφορία. Για την θρομβοφιλία έχει στοχοποιηθεί η έλλειψη ενός φυσικού αντιπηκτικού της αντιθρομβίνης καθώς επίσης έχουν ενοχοποιηθεί και άλλες καταστάσεις όπως η μεγάλη ηλικία, κακοήθειες, χειρουργεία, παχυσαρκία, κύηση και λοχειά, κατανάλωση σκευασμάτων οιστρογόνων (αντισυλληπτικά ή σκευάσματα ορμονών. Η θρομβοφιλία διακρίνεται σε κληρονομική και επίκτητη (Rosendaal, 1999).

#### 3.1. Κληρονομική θρομβοφιλία

Τα αίτια που την προκαλούν οφείλονται σε δύο κατηγορίες: α) λόγω κληρονομούμενων διαταραχών όπως η ανεπάρκεια των φυσικών αντιπηκτικών (αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S) του παράγοντα V Leiden, της μετάλλαξης G20210A της προθρομβίνης, β) λόγω πολυπαραγοντικών (και τουλάχιστον μερικώς κληρονομούμενες) όπως είναι η αύξηση των επιπέδων του παράγοντα VIII και η υπερμοκουστεϊναιμία.

Με βάση τα παραπάνω οι θρομβοφιλίες μπορούν να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες: α) η θρομβοφιλία στην οποία παρατηρείται ελάττωση των επιπέδων φυσικών αντιπηκτικών, β) η θρομβοφιλία στην οποία παρουσιάζεται αυξημένη δραστηριότητα των παραγόντων πήξης. Οι ασθενείς που εντάσσονται στην πρώτη κατηγορία η οποία είναι υψηλότερου κινδύνου και την συναντάμε σπάνια παρουσιάζουν θρομβωτικό επεισόδιο πριν τα 60 έτη τους καθώς μικρή μείωση των αντιπηκτικών είναι ικανή να προκαλέσει θρομβωτική διάθεση. Αντιθέτως οι ασθενείς της δεύτερης κατηγορίας την οποία συναντάμε πιο συχνά παρουσιάζουν θρομβωτική διάθεση ελαφράς μορφής πριν τα 60 έτη (Davenport & Kutteh, 2014),(Crowther & Kelton, 2003),(Martinelli et al., 1998).

#### 3.2. Κληρονομικοί παράγοντες της θρομβοφιλίας

##### 3.2.1. Μείωση των φυσικών αντιπηκτικών

Τα φυσικά αντιπηκτικά η αντιθρομβίνη (AT), η πρωτεΐνη S (PS) και η πρωτεΐνη C (PC) ρυθμίζουν τον καταρράκτη της πήξης και ο τρόπος με τον οποίον κληρονομείται είναι με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Έλλειψη των παραπάνω παραγόντων οδηγεί σε μια υπερπηκτική κατάσταση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η αντιθρομβίνη ενώνει και θέτει εκτός λειτουργίας την θρομβίνη (FIIa) και τους ενεργούς παράγοντες FXa, FIXa, FXIa, και FXIIa. Το σύμπλεγμα θρομβίνης με την θρομβομοντουλίνη θέτει σε λειτουργία την πρωτεΐνη C και ως ενεργή μορφή (activated protein C, APC) εξουδετερώνει την λειτουργία των παραγόντων FVa και FVIIIa με αποτέλεσμα να σταθεί ως εμπόδιο στην πήξη του αίματος. Απαραίτητη είναι και η παρουσία της πρωτεΐνης S ως συμπαράγοντα. Έλλειψη ή μείωση τους οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή θρομβίνης με να οδηγεί σε υπερπηκτικότητα (Bucalossi, Marotta, Bigazzi, Galieni, & Dispensa, 1996).



### 3.2.2. Παράγοντας V LEIDEN

Ο παράγοντας V Leiden αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη 330 kDa από 6 περιοχές (A1, A2, B, A3, C1, C2) και το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1q23). Η θρομβίνη σε συνδυασμό με τον Χα ενεργοποιούν τον FV, στην συνέχεια ο FVa με την παρουσία  $Ca^{++}$  το οποίο λαμβάνει τον ρόλο του συμπαράγοντα του FXa στο σύμπλεγμα προθρομβινάσης με σκοπό την αύξηση παραγωγής της προθρομβίνης.

Αντιθέτως η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) απενεργοποιεί τον παράγοντα FVa και FVIIIa οδηγώντας στον τερματισμό της παραγωγής της θρομβίνης. Στην συνέχεια ο FVa αφού πρώτα έχει προηγηθεί η διάσπαση του σε Arg 506 και Arg 306 μαζί με τον APC και PS απενεργοποιεί τον παράγοντα FVIIIa.

Το 1993 παρατηρήθηκε από τον Dadlback ότι άτομα με θρόμβωση παρουσιάζουν αυξημένο APTT το οποίο επανερχόταν με προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος. Αυτό ορίστηκε ως αντίσταση στην πρωτεΐνη C το οποίο οφείλεται σε βλάβη του γονιδίου του παράγοντα V και κληρονομείται με αυτοσωμικό κυρίαρχο χαρακτήρα και την θέση της αργινίνης λαμβάνει η γλουταμίνη θέση 506 (Arg 506 Gln).

Αποτέλεσμα της παραπάνω μετάλλαξης είναι ο FV Leiden να απενεργοποιείται 10 φορές με πιο γρήγορο τρόπο από τον APC, δεν δρά πλέον ως συμπαράγοντας για να απενεργοποιήσει τον FVIIIa με συνέπεια να παράγεται θρομβίνη και να δημιουργείται θρόμβος (Thorelli, Kaufman, & Dahlback, 1999),(Bertina et al., 1994),(Dahlback & Hildebrand, 1994).

### 3.2.3. Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης

Αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη 72kDa. Η προθρομβίνη FII μεταβάλλεται σε θρομβίνη από το σύμπλεγμα τενάσης που την αποτελούν ο FVa σε συνδυασμό με ιόντα  $Ca^{++}$  και φωσφολιπίδια. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 και οφείλεται στην αλλαγή της θέσης (20210) της γουανιδίνης από την αδενίνη. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα να καταστρέφει με πιο αργούς ρυθμούς την m RNA της προθρομβίνης και παράλληλα αυξάνεται η παραγωγή της προθρομβίνης. Στην ομόζυγη μορφή τα επίπεδα FII φτάνουν 70% και υπάρχει υψηλού βαθμού κινδύνου για θρόμβωση ενώ στην ετερόζυγη μορφή τα επίπεδα φτάνουν στο 30%. Η αυξημένη σύνθεση της θρομβίνης αυξάνει και τον TAFI (αναστολέα ινωδόλυσης), μετατρέπει σε δυσλειτουργική την διαδικασία της G20210A και η V LEIDEN προκαλούν εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (ΕΦΘ) και φλεβικές θρομβώσεις (Degen & Davie, 1987),(Ehrenforth et al., 1998),(Emmerich et al., 2001).

### 3.2.4. MTHFR- Υπερομοκυστεϊναιμία

Η ομοκυστεΐνη προέρχεται από την μετατροπή της μεθειονίνης, στην συνέχεια είτε μετατρέπεται σε κυσταθειονίνη και κυστεΐνη με την βοήθεια του ενζύμου β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS) και της βιταμίνης Β6, είτε επαναμεθυλιώνεται σε μεθειονίνη. Επιπλέον τρόποι αποτελούν η παρουσία των ενζύμων συνθετάση της μεθειονίνης (MS), η 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή (MTHFR) και μεθυλτρανσφεράση βεταΐνης -ομοκυστεΐνης (BHMT) καθώς και η βιταμίνη Β12 η οποία λειτουργεί ως συμπαράγοντας. Επίσης απαραίτητη είναι και η παρουσία του φυλλικού οξέος και η βεταΐνη τα οποία λειτουργούν ως δότες μεθυλικών ομάδων. Όπως προαναφέρεται τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης είναι τα CBS, MS, MTHFR, BHMT, τυχόν μετάλλαξη προκαλεί

υπερομοκυστεϊναιμία. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο του MTHFR (χρωμόσωμα 1 (1p36)) είναι στην θέση 677 (677C > T όπου την θέση της κυτοκίνης λαμβάνει η θυμίνη) και στην θέση 1298 (1298 A > C όπου την θέση της αδενίνης λαμβάνει η κυτοσίνη). Στην θέση 677 σημειώνεται ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου στους ομοζυγώτες (30%) και στους ετεροζυγώτες (65%). Αντιθέτως η μετάλλαξη 1298 δεν φαίνεται να έχει κάποια κλινική σημασία για τα επίπεδα ομοκυστεϊνης. Ως συνέπεια της αυξημένης ομοκυστεϊνης παρατηρείται ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αναστολή της έκκρισης προστακυκλίνης και NO, αύξηση των λείων μυϊκών ινών, αγγειακή φλεγμονή, αθηροσκλήρυνση, θρόμβωση. Επίσης παρατηρείται αύξηση του (TF), αναστολή του ιστικού τύπου ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) και τέλος αναστολή της ενεργοποίησης της PC από την θρομβομοδουλίνη. Άνοδος της ομοκυστεϊνης δημιουργεί και η μειωμένη αφομοίωση της B12 ή B6 και φυλλικού οξέος (Selhub, 1999),(Rozen, 1997),(Weisberg, Tran, Christensen, Sibani, & Rozen, 1998),(Selhub, Jacques, Wilson, Rush, & Rosenberg, 1993),(Perla-Kajan, Twardowski, & Jakubowski, 2007).

### 3.2.5. Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης (ATIII)

Η αντιθρομβίνη ATIII είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 58 kDa η οποία παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο ήπαρ και αποτελεί τον βασικότερο αναστολέα της θρομβίνης καθώς και των παραγόντων IXα, Xα, XIα, XIIα, πλασμίνης, t-PA, ουρακινάσης και καλλικρεΐνης. Η ανεπάρκεια της προέρχεται από αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και είναι υπεύθυνη για τις φλεβικές θρομβώσεις. Μεγάλη σημασία και μεγαλύτερη επικινδυνότητα υπάρχει όταν η μετάλλαξη συμβαίνει στην θέση σύνδεσης με την θρομβίνη παρά στην θέση σύνδεσης με την ηπαρίνη. Η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης μπορεί να είμαι επίκτητη ή κληρονομική και ο κίνδυνος αυξάνεται στους ετεροζυγώτες. Εμφανίζονται δύο κατηγορίες ανεπάρκειας της AT. Στην πρώτη κατηγορία υπάρχει η ποιοτική ανεπάρκεια όπου μειώνεται η λειτουργικότητα και η αντιγονικότητα σε ποσοστό 50%. Στην δεύτερη κατηγορία υπάρχει η ποσοτική ανεπάρκεια όπου μειώνεται μόνο η δραστηριότητα και αποτελεί πιο συχνό φαινόμενο. Κλινικά παρατηρείται φλεβική θρόμβωση σε άτομα άνω των 40 ετών και αρτηριακή θρόμβωση σε νεαρά άτομα (Thaler & Lechner, 1981).

### 3.2.6. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C [PC]

Αποτελεί μια πρωτεΐνη 62 kDa, είναι K βιταμινοεξαρτώμενη πρωτεΐνη και αποτελείται από δύο αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες. Ο ρόλος της στον καταρράκτη της πήξης είναι πολύ βασικός και στο πλάσμα κυκλοφορεί σε χαμηλή συγκέντρωση. Η ενεργή μορφή της αδρανοποιεί τον παράγοντα V και VIII οι οποίοι χρειάζονται για την παραγωγή θρομβίνης. Η επίκτητη μορφή της συμβαίνει εξαιτίας ανεπάρκειας της βιταμίνης K, μετά από θεραπεία με βαρφαρίνη, ή ύστερα από σοβαρή ηπατική νόσο. Για την κληρονομική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης υπεύθυνο είναι το γονίδιο PROC το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (2q 13-14) και δημιουργείται από 9 εξόνια [I-IX]. Διακρίνονται σε δύο τύπους, ο τύπος I όπου παρουσιάζεται ελάττωση επιπέδων πρωτεΐνης, των αντιγονικών επιπέδων και της λειτουργικότητας της [PC] και ο τύπος II όπου η λειτουργικότητα του PC είναι ελαττωμένη ενώ τα αντιγονικά επίπεδα της πρωτεΐνης είναι φυσιολογικά. Η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν τα άτομα με ανεπάρκεια της PC είναι πνευμονική εμβολή, εν τω βαθειφλεβοθρόμβωση, παρεγχυματικός θρόμβος και ΔΕΠ (Tait et al., 1995),(Alhenc-Gelas, Gandrille, Aubry, & Aiach, 2000),(Mosnier, Zlokovic, & Griffin, 2007).

### 3.2.7. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S [PS]

Η πρωτεΐνη S είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 75kDa η οποία είναι K βιταμινοεξαρτώμενη όπως η πρωτεΐνη C. Τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι μειωμένα και ο ρόλος της στον καταρράκτη της πήξης είναι εξίσου βασικός. Στο περιφερικό αίμα εντοπίζεται σε δύο κατηγορίες, α) την ελεύθερη μορφή κατά 40%, β) την συνδεδεμένη μορφή με τον παράγοντα του συμπλέγματος C4b-binding protein (C4BP) κατά 60%[43](Castoldi & Hackeng, 2008). Η πρωτεΐνη S δρά με δύο τρόπους:

- 1) Προορίζεται ως συμπαράγοντας της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, διακόπτει την λειτουργία των παραγόντων της πήξης Va και VIIIa. Αφού θέσει σε λειτουργία την PC, η PS μαζί με την APC προσδένεται στην επιφάνεια των PTLs και λαμβάνει μέρος στην απενεργοποίηση του FVa.
- 2) Η PS σε συνεργασία με τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (TFPI) απενεργοποιούν τον Xa και το (TF)/Factor VIIa (Dahlback, 2018).

Υπεύθυνο φαίνεται πως είναι το γονίδιο της PS (PROS1) το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 (3p11). Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S συγκριτικά με τα αντιγονικά επίπεδα, την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και την ελεύθερη μορφή της ταξινομείται σε τρεις τύπους:

- 1) Τύπος I : παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης κατά 50% καθώς και ελάττωση της ελεύθερης μορφής του.
- 2) Τύπου II : εντοπίζεται ομαλή συγκέντρωση της ολικής και ελεύθερης PS ενώ απουσιάζει η δραστηριότητα της.
- 3) Τύπου III : παρουσιάζεται ομαλή συγκέντρωση της ολικής μορφής της πρωτεΐνης και ελάττωση της συγκέντρωσης της ελεύθερης μορφής του καθώς και της δραστηριότητας κατά 40%.

Η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με την έλλειψη της PS είναι παρόμοια με την εικόνα που παρατηρείται στους ασθενείς με την έλλειψη της πρωτεΐνης C. Η ετερόζυγη μορφή του πρόκαλει θρομβωτικό επεισόδιο μετά την ηλικία των 18 ετών, όταν συνυπάρχει με την ομόζυγη μορφή ή άλλη γενετική θρομβοφιλική ανωμαλία οδηγεί σε νεογνική πορφύρα (Esmon, 2003),(Koster et al., 1995),(Zoller, Svensson, He, & Dahlback, 1994),(Mahasandana et al., 1996).

### 3.3. Επίκτητη θρομβοφιλία

Η επίκτητη θρομβοφιλία είναι συχνότερη και αποτελεί μια υποτροπιάζουσα νόσο οδηγώντας τον ασθενή σε θρομβωτικές καταστάσεις οι οποίες δεν μπορούν να αποκατασταθούν και θέτουν την ζωή του ασθενή σε υψηλό κίνδυνο και υψηλή θνησιμότητα. Τέτοιες περιπτώσεις είναι το αντιφωσφιλιπιδικό σύνδρομο, αιματολογικές κακοήθειες, νεοπλάσματα, μετά από χειρουργική επέμβαση, κατά την διάρκεια κύησης, λοχεία, παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία, μετά από λήψη αντισυλληπτικών, ορμονικών σκευασμάτων.

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται πιο συχνά έλεγχος για την θρομβοφιλία και ειδικότερα σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (ΕΦΘ), ασθενείς που παρουσιάζουν θρομβωτικά επεισόδια καθώς και όσοι έχουν ιστορικό.

Ο εργαστηριακός έλεγχος για την θρομβοφιλία περιλαμβάνει:

1. Γενική αίματος, καταμέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων.
2. Χρόνος προθρομβίνη (PT) και μερικής θρομβοπλαστικής (APTT).
3. Επίχρισμα περιφερικού αίματος.
4. Μέτρηση Αντιθρομβίνης (ATIII), πρωτεΐνης C και πρωτεΐνης S.
5. Μέτρηση APC-resistance που έχει σχέση με την μετάλλαξη των V-Leiden.
6. Έλεγχος για την μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης και FVLEIDEN.
7. Έλεγχος για LA, αντισώματα καρδιολιπίνων και αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης (anti-b2-GPI).
8. Έλεγχος για μυελουπερπλαστικά σύνδρομα (JAK 2 κινάση) (Middeldorp & van Hylckama Vlieg, 2008),(Baglin et al., 2010).

## 4. ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

### 4.1. Ορισμός

Το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS) είναι μια φλεγμονώδης αυτοάνοση νόσος η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Hughes ως μια κατάσταση υπερπηκτικότητας και η οποία σχετίζεται με την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα δηλαδή τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (αντί-β2GP-I), τα αντισώματα καρδιολιπίνης (ACL IgG, ACL IgM) και το αντιπηκτικό του Λύκου (Lac) είναι μια μεγάλη ετερογενής οικογένεια ανοσοσφαιρινών οι οποίες στρέφονται εναντίον φωσφολιπιδίων ή έναντι πρωτεϊνών του πλάσματος που συνδέονται με ανιονικά φωσφολιπίδια και οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες όπου βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων ή αιμοπεταλίων εμπλέκονται στην διαδικασία της πήξης του αίματος. Το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εκδηλώνεται τόσο με αρτηριακές όσο και με φλεβικές θρομβώσεις όπου οι συχνότερες είναι οι εν τω βάθει φλεβοθρομβώσεις των άκρων και οι θρομβώσεις των ενδοκράνιων αγγείων. Προκαλεί επίσης επιπλοκές και στην κύηση με αποβολές και εμβρυικό θάνατο, πρόωρο τοκετό και άλλες επιπλοκές του πλακούντα (Keswani & Chauhan, 2002).

### 4.2. Ιστορική Αναδρομή

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του Αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου είχαν ξεκινήσει από το 1905 όταν ο Von Wasserman παρουσίασε δείγματα ασθενών οι οποίοι δεν νοσούσαν από σύφιλη να προκαλούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ορολογικές δοκιμασίες για την σύφιλη ( VDRL (Veneral Disease Research Laboratory - κροκίδωση), RPRμ(Rapid Plasma Reagin - συγκόλληση).

Αργότερα το 1940 παρατηρήθηκε από επιστημονική ομάδα πως η δοκιμασία της σύφιλης ήταν θετική σε ασθενείς οι οποίοι νοσούσαν από συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) ή από άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Στους ασθενείς με ΣΕΛ τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα συνδέονται στην αρνητικά φορτισμένη καρδιολιπίνη προκαλώντας κροκίδωση ή συγκόλληση όπως ακριβώς συμβαίνει με τα αντισυφιλιδικά αντισώματα στον ορό των συφιλιδικών (Moore & Mohr, 1952).

Επιπλέον οι αιματολόγοι περιέγραψαν έναν μη ειδικό ανασταλτή της πήξης ο οποίος προκαλούσε παράταση του χρόνου πήξης και του χρόνου θρομβίνης χωρίς να μειώνει κανέναν άλλον παράγοντα, ούτε συνοδευόταν από αιμορραγική διάθεση. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε «αντιπηκτικό λύκου» (LA) το 1972 από τους Feinstein και Rapaport.

Στην αρχή θεωρούσαν πως το LA προκαλούσε αιμορραγικές εκδηλώσεις. Αργότερα τα αντισώματα αυτά συσχετίστηκαν με το ΣΕΛ από τον A.Mc Gee Harvey. Τα LA παρουσίαζαν θρομβοεμβολικά επεισόδια και όχι αιμορραγία.

Το 1983 - 1986 ο Dr Hughes και η ομάδα του περιέγραψαν για πρώτη φορά την πλήρη εικόνα του συνδρόμου. Το 1985 τέθηκε ο όρος Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Από το 1984 και κάθε διετία πραγματοποιείται συμπόσιο για το APS όπου συμμετέχουν ιατροί όλων των ειδικοτήτων.

Τέλος το 1998 στο 8<sup>ο</sup> Διεθνές συμπόσιο που πήρε μέρος στο Supporo της Ιαπωνίας την οποία συγκροτούσαν 56 ερευνητές καθορίστηκαν τα κριτήρια για τον ορισμό του APS

### 4.3. Ταξινόμηση του APS

Πρωτοπαθές APS : είναι εκείνο το οποίο δεν παρουσιάζει κλινική εικόνα ή εργαστηριακά ευρήματα ούτε σχετίζεται με ρευματολογική ή αυτοάνοση νόσο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος.
- Αρτηριακή θρομβοεμβολική νόσος, κυρίως ως θρομβωτικό εγκεφαλικό επεισόδιο.
- Άσηπτη ενδοκαρδίτιδα με εμβολή.
- Υποτροπιάζουσες αυτόματες αποβολές.

Δευτεροπαθές APS : συνυπάρχει με συστηματικό ερυθματώδη λύκο (ΣΕΛ) αλλά και με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές (ΣΕΛ, RA (ρευματοειδής αρθρίτιδα), συστηματική σκλήρυνση, σύνδρομο Behget, κροταφική αρτηρίτιδα, σύνδρομο Sjogren, ψωριασική αρθρίτιδα, άλλα νοσήματα (αγγειίτιδες, μυοσίτιδες, κλπ), κακοήθειες, φάρμακα ή λοιμώξεις. Το 40 % των ασθενών με ΣΕΛ εμφανίζουν υψηλό τίτλο αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Παρουσιάζουν διαγνωστικά στοιχεία όπως θρομβωτικά ή θρομβοεμβολικά επεισόδια, ανεξήγητη θρομβοπενία, παράταση του χρόνου πήξεως. Μπορεί να εμφανίσει κλινικές εκδηλώσεις όπως εμβολές στο δέρμα, στο νευρικό σύστημα, στα σπλάχνα, ισχαιμία των δακτύλων, γάγγραινα, εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- ΣΕΛ (Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος).
- RA (ρευματοειδής αρθρίτιδα).
- Συστηματική σκλήρυνση.
- Σύνδρομο Behget.

**Καταστροφικό APS:** εκδηλώνεται σε σπάνιες περιπτώσεις με δραματική κλινική εικόνα καθώς και με μεγάλη θνησιμότητα έως 50%. Προκαλεί οξεία διάχυτη θρόμβωση σε πολλά όργανα (πάνω από 3 όργανα) με ανεπάρκεια αυτών (Arreola-Diaz, Majluf-Cruz, Sanchez-Torres, & Hernandez-Juarez, 2022).

### 4.4. Παθοφυσιολογία

Οι πιο γνωστοί υπότυποι για την ανίχνευση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου είναι τα a-CL, τα anti-b2GP και τα LA. Η δράση του LA πραγματοποιείται με την μεσολάβηση του b2-GP και της προθρομβίνης, ενώ τα αντικαριολιπινικά εξαρτώνται μόνο από την δράση της b2-GP. Πρώτες έρευνες έδειχναν πως τα αντισώματα αυτά στρέφονται έναντι φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης από όπου ονομάστηκαν και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα.

Αργότερα όμως εντοπίστηκε πως στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών του πλάσματος οι οποίες συνδέονται με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες φωσφολιπιδίων όπως για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες και οι τροφοβλάστες.

Πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος αποτελούν αντιγονικοί στόχοι των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων με κύριο ρόλο την β2-γλυκοπρωτεΐνη I. Άλλες πρωτεΐνες στόχοι των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων είναι η προθρομβίνη, αννεξίνη V, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη



S, χαμηλού και υψηλού βάρους κινινογόνα, ο ιστικός ενεργοποιητής του συμπληρώματος, ο παράγοντας von Willebrand κ.α.

Οι πρωτεΐνες αυτές στο μόριο τους περιλαμβάνουν τμήματα που δεσμεύουν φωσφολιπίδια (phospholipid binding domains) π.χ καρδιολιπίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη, φωσφατιδικό οξύ κ.α

Τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από την δράση της anti-β2GPI με αποτέλεσμα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων να εκφράζονται τα ακόλουθα μόρια προσκόλλησης: VCAM-1, ICAM-1, E-σελεκτίνη τα οποία προκαλούν αύξηση της παραγωγής του ιστικού παράγοντα.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αυξάνουν την έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης IIbIIIa και της σύνθεσης της θρομβοξαάνης A2 με αποτέλεσμα την διατάραξη της ισορροπίας θρομβοξαάνης - προστακυκλίνης η οποία ευνοεί την θρόμβωση. Στην διαδικασία αυτή λαμβάνουν μέρος ο πυρηνικός παράγοντας κB (NFκB) και η πρωτεΐνη κινάση(p38MAPK) καθώς και το συμπλήρωμα το οποίο ευνοεί και την φλεγμονή στην διαδικασία της θρόμβωσης (Gonzalo-Gil et al., 2018).

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα διαφοροποιούν την έκφραση σημαντικών γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για πληροφορίες που σχετίζονται με φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, παράγοντες πήξης, μόρια προσκόλλησης, ενεργοποιητές λευκοκυττάρων. Προκαλούν επίσης στα αγγεία προπηκτικές, αθηρωματικές και προφλεγμονώδεις αλλοιώσεις. Αφού ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα προκαλούν μια προπηκτική κατάσταση μέσω της αύξησης της θρομβοξαάνης A2 και του ιστικού παράγοντα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος in vivo να οδηγεί σε θρόμβωση. Επιπλέον η αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με παράγοντες πήξεως όπως πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, προθρομβίνη και πλασμίνη εμποδίζουν την ινωδόλυση.

Αν και in vivo οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις αγγειακές θρομβώσεις και αυτόματες αποβολές σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι άγνωστοι, γνωρίζουμε πως τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα επηρεάζουν τον καταρράκτη της πήξεως. Προκαλούν αναστολή της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C και της αντιθρομβίνης III, αναστολή της ινωδόλυσης και αύξηση της δράσης του ιστικού παράγοντα (tissue factor TF) (Agréola-Diaz et al., 2022),(Cohen et al., 2020).

#### 4.5. Πώς επεμβαίνουν τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στον καταρράκτη της πήξης:

B2 Γλυκοπρωτεΐνη I: αποτελεί αναστολέα πήξεως, συνδέεται με φορτισμένα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, εμποδίζει την σύνδεση παραγόντων πήξεως με αποτέλεσμα να αναστείλει τον καταρράκτη της πήξης. Με την παρουσία των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων τα οποία στρέφονται εναντίον της παρεμποδίζουν τον ρόλο της (Krone, Allen, & McCrae, 2010),(Ng et al., 2018).

Αννεΐνη V: είναι πλακουντιακή πρωτεΐνη I ή αγγειακό αντιπηκτικό. Έχει απομονωθεί από ανθρώπινο πλακούντα και τα αγγεία. Έχει ισχυρή αντιπηκτική δράση λόγω της μεγάλης συγγένειας με τα αρνητικά PL και της ικανότητας της να εκτοπίζει τους παράγοντες πήξης από τις φωσφολιπιδικές επιφάνειες. Σχηματίζει πάνω από το PL ένα προστατευτικό

κέλυφος και έτσι δεν είναι διαθέσιμα για τις αντιδράσεις πήξης. Βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στην τροφοπλάστη του πλακούντα και στα κύτταρα των μικρολαχνών της συγκυτιοτροφοβλάστης. Έχει θρομβορυθμιστική δράση στον πλακούντα και στο ενδοθήλιο των αγγείων. Ο ρόλος της είναι να μπλοκάρει την σύνδεση συμπλεγμάτων παραγόντων πήξεως και έτσι αναστέλλει την διαδικασία πήξης. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα εμποδίζουν την αννερίνη V να σχηματίζει συμπλέγματα με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα πολλά αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια παραμένουν ελεύθερα με αποτέλεσμα να σχηματίζουν συμπλέγματα με παράγοντες πήξεως. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε θρόμβωση (Rand et al., 1997),(Rand et al., 1998).

Ενδοθηλιακά κύτταρα: η επίδραση των αντισωμάτων στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων έχουν ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το αντιπηκτικό φαινότυπο του ενδοθηλίου σε προπηκτικό και προφλεγμονώδη. Η αλληλεπίδραση αυτή προάγει πολλές αντιδράσεις όπως την έκφραση μορίων προσκόλλησης (E - σελεκτίνη, κυτταροκίνες IL-1, -6, -8), την έκφραση του ιστικού παράγοντα TF στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μονοκύτταρα.

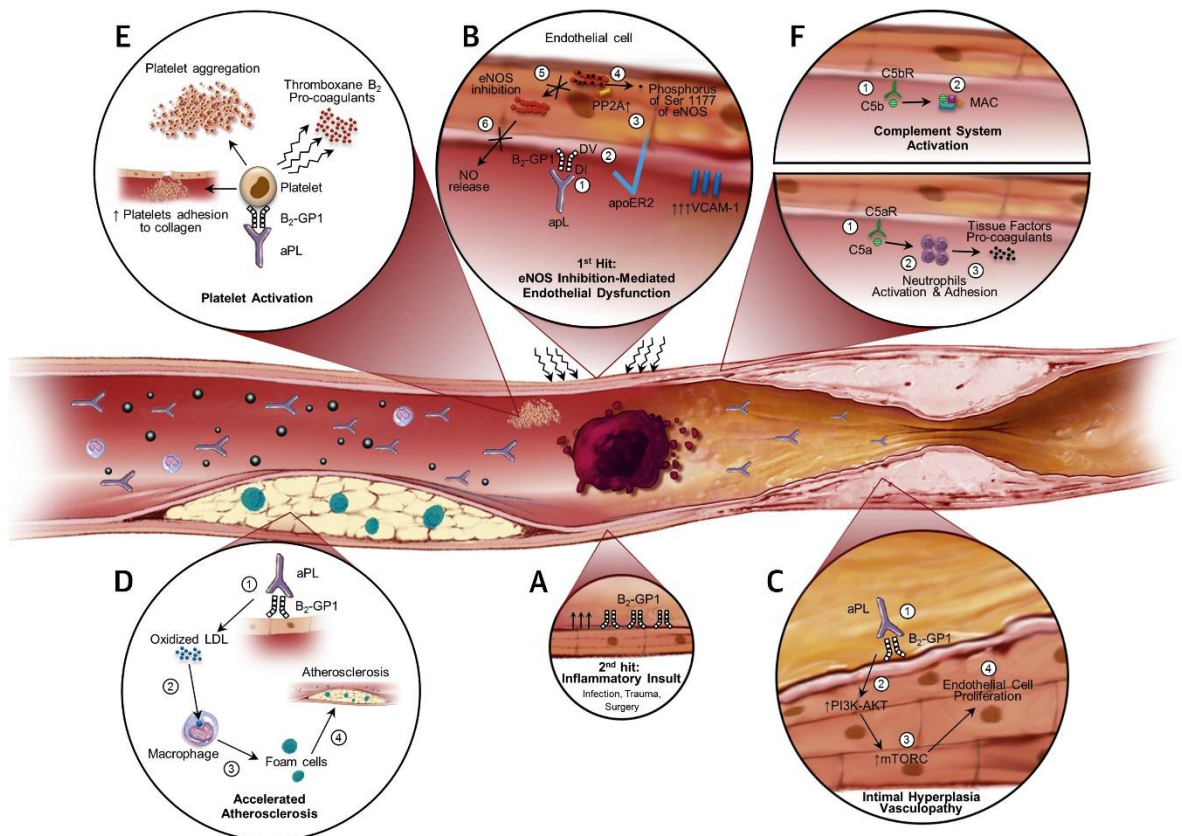
Ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου t-PA: στόχος των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων φαίνεται πως αποτελεί και ο ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου ο οποίος συμμετέχει στην ινωδόλυση. Ο t-PA παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εκκρίνεται στο αίμα. Η σύνδεση του με το ινώδες το καθιστά πιο δραστικό. Επομένως τα αντί- t-PA αντισώματα που βρίσκονται αυξημένα στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εμποδίζουν την δράση του και οδηγούν σε υπερπηκτικές καταστάσεις.

Ενδοθηλιακός υποδοχέας της πρωτεΐνης C (EPCR): είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και έχει ως ρόλο να συνδέεται με φωσφολιπίδια και να υποδέχεται την πρωτεΐνη C καθώς έχει ως χαρακτηριστικό την αντιπηκτική δραστηριότητα. Εντοπίζεται σε μεγάλα αγγεία και σε αρτηρίες. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει εντοπιστεί και άλλο ένα χαρακτηριστικό του, βοηθάει στην διατήρηση της κύησης καθώς η καταστροφή του σε ποντίκια προκαλεί θρόμβωση στον πλακούντα και ενδομήτριο θάνατο. Τα aPL πιθανόν στρέφονται εναντίον του EPCR και σχετίζονται με τις θρομβώσεις και τις αυτόματες αποβολές που προκαλεί.

Αιμοπετάλια: τα aPL συνδέονται με την GPIIb ή τον PF4 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Προκαλούν απελευθέρωση θρομβοξάνης και PF4, αύξηση της έκφρασης της GPIIb-IIIa και ενεργοποιούν την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό θρόμβου.

Παράγοντες πήξης: επεμβαίνουν σε πρωτεΐνες της πήξης όπως πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, παράγοντα X ή πλασμίνη προκαλώντας αναστολή της αντιπηκτικής δράσης των φυσικών ανασταλτών πήξης, εμποδίζουν την ινωδόλυση και δεν επιτρέπουν την ένωση με την αννερίνη V σε ανιονικές επιφάνειες (Corban et al., 2017).





Εικόνα 2. Παθογένεση στο Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο.

A) Παρατηρείται η ανοδική ρύθμιση των υποδοχέων B2 GPI στα ενδοθηλιακά κύτταρα ύστερα από φλεγμονώδη προσβολή «δεύτερου χτυπήματος». B) Αναστολή ενδοθηλιακής σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου eNOS ύστερα από το «πρώτο χτύπημα» του συνδρόμου με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου. C) Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, μη αθηρωματική αγγειακή στένωση, υπερπλασία εσωτερικού χιτώνα. E) Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, συσσωρεύονται και προκαλούν θρόμβωση. F) Ενεργοποιείται το σύστημα συμπληρώματος με αποτέλεσμα να προκαλείται θρόμβωση.

<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0735109717360485-gr1.jpg>

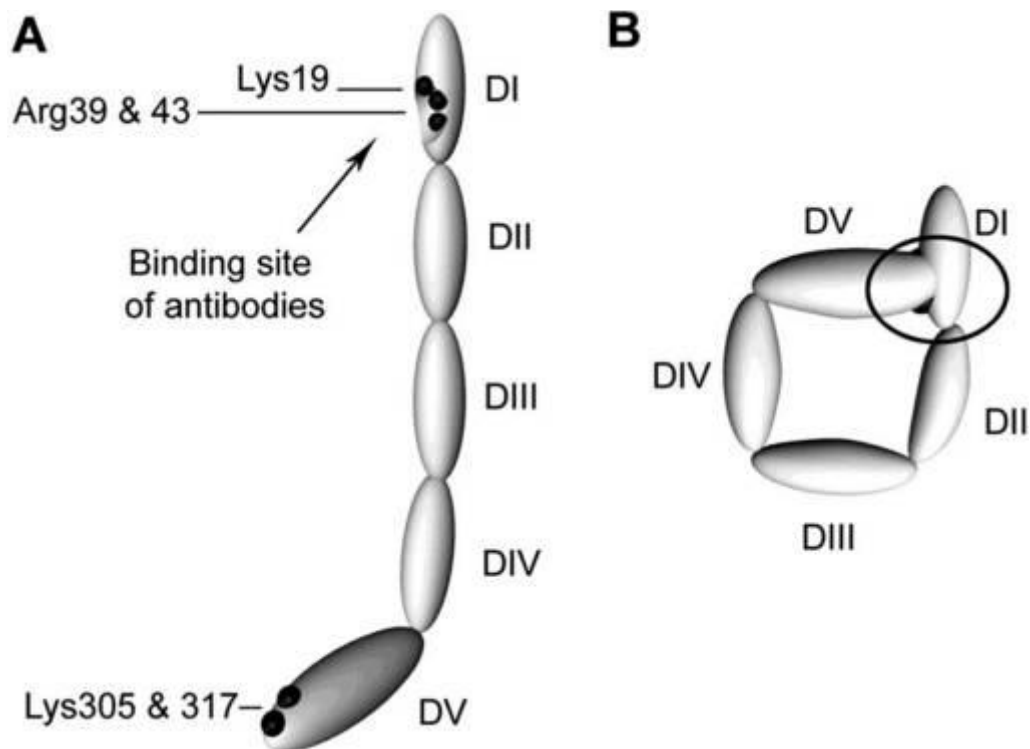
#### 4.6. B2 Γλυκοπρωτεΐνη (B2-GPI)

Αποτελεί μια πρωτεΐνη MB 50kDa η οποία απαρτίζεται από 326 αμινοξέα. Η παρουσία της στο πλάσμα υπολογίζεται σε συγκέντρωση 200mg/ml και είναι φυσικός αναστολέας της πήξης. Συντίθεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα κύτταρα του πλακούντα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά κατά κύριο μέρος στο ήπαρ. Αποτελείται από πέντε μικρές αλληλουχίες - περιοχές domains τα οποία δημιουργούν μια τρισδιάστατη δομή και παράγονται στο ήπαρ. Οι τέσσερις αλληλουχίες domains (I, II, III, IV) έχουν παρόμοια δομή και περιέχουν επιτόπους για την ένωση των αντισωμάτων. Αντιθέτως η περιοχή V αποτελείται από θετικά φορτισμένο σύμπλεγμα λυσινών και χάρις στην παρουσία τους επιτρέπεται η αντίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια (Khamashta, Taraborelli, Sciascia, & Tincani, 2016).

Οι περιοχές I - IV της B2 - GPI αποτελούνται από κοινές αναδιπλώσεις ενώ η περιοχή V διαθέτει μια εσοχή η οποία απαρτίζεται από 6 αμινοξέα και ένα Ο - τελικό τμήμα με 19 αμινοξέα η οποία σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχουσες αναδιπλώσεις δημιουργεί μια θετικώς φορτισμένη περιοχή περίπου 2000 Å<sup>0</sup>. Σε κάποιο τμήμα αυτής της περιοχής βρίσκεται μια εύκαμπτη υδρόφοβη αγκύλη (Ser311 - Lys317) η οποία εισχωρεί στην φωσφολιπιδική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται η σύνδεση της με την μεμβράνη. Τα domains III - IV είναι γλυκοζυλιωμένες περιοχές και είναι προστατευμένες από αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Τα τμήματα I - II διαθέτουν θέσεις σύνδεσης με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Τα περισσότερα aPL συνδέονται στην περιοχή I.

Η παρουσία μετάλλαξης στο domain I επιφέρει αλλαγές στην ένωση με τα αντι-B2GPI αντισώματα με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης τους. Επιπλέον στο τμήμα I της B2 GPI που αποτελείται από Gly40 - Arg43 τα οποία οδηγούν στον σχηματισμό διμερών ή και πενταμερών της B2 GPI με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεγαλύτερη συγγένεια των αντι - B2- GPI και να οδηγούν στην ενεργή κατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά αυτόν τον τρόπο προκαλείται μεγαλύτερη έκφραση μορίων προσκόλλησης, το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται με μεγαλύτερους ρυθμούς καθώς επίσης εκκρίνονται κυτταροκίνες σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι να δημιουργηθεί μια προφλεγμονώδης κατάσταση και προπηκτικές συνθήκες για το ενδοθήλιο (Lutters et al., 2003).



Εικόνα 3. Δομή του B2 GPI.

A) «Ανοιχτή» μορφή της δομής του B2 GPI. Αυτή η μορφή στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως «αγκίστρι ψαριού». Περιέχει έναν επίτοπο που διαθέτει Lys19, Arg39 και Arg43 τα οποία αναγνωρίζονται από τα αντισώματα anti-B2 GPI. Σε αυτήν την μορφή εκτίθεται η αντιγονική περιοχή της περιοχής 1. B) Αυτή αποτελεί την κυκλική μορφή του B2 GPI. Σε

αυτήν την μορφή οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα anti-B2 GPI δεν είναι διαθέσιμοι. Η περιοχή 1 δεν εκτίθεται.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/corecgi/tileshop/tileshop.fcgi?p=PMC3&id=286020&s=73&r=1&c=4>

#### 4.7. Καρδιολιπίνες

Η καρδιολιπίνη αποτελεί ανιονικό φωσφολιπίδιο το οποίο περιλαμβάνει 4 ακόρεστα λιπαρά οξέα και εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη της καρδιάς. Τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (ACL IgG και IgM) εντοπίζονται σε ασθενείς με Ερυθματώδη Λύκο, παρατηρούνται αυξημένες τιμές και στις φλεβικές και αρτηριακές θρομβώσεις, σε επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές (ΕΑΑ) καθώς και σε θρομβοκυτταροπενία. Τα επίπεδα των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων αυξάνονται και στο δευτεροπαθές αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο όπου τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα συνυπάρχουν με τον Ερυθματώδη Λύκο. Τα ACL IgG έχουν μεγαλύτερη διαγνωστική αξία σχετικά με τα IgM και ειδικότερα όταν συνυπάρχουν με την κλινική εικόνα του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Στον Ερυθματώδη Λύκο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της ACL IgA και οι ασθενείς παρουσιάζουν αγγειακές επιπλοκές.

Τα αποτελέσματα των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων ερμηνεύονται από τον κλινικό ιατρό ο οποίος θα πρέπει να βγάλει πόρισμα υπολογίζοντας το ιστορικό, την κλινική εικόνα του ασθενούς καθώς και τα εργαστηριακά αποτελέσματα. Στην περίπτωση όπου υπάρχει υποψία για θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και ο ασθενής έχει αρνητικό τίτλο αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του αντιπηκτικού του λύκου. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ορίζονται ως θετικά μόνο στην περίπτωση όπου η μία ή και οι δύο αναλύσεις έχουν θετικό αποτέλεσμα. Έχει παρατηρηθεί η συνύπαρξη του Αντιπηκτικού του Λύκου με τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα στο 70% σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ενώ το καθένα ξεχωριστά 20 - 40% για το Αντιπηκτικό του Λύκου και 45% για τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα. Τέλος θετικά ACL IgG δίνουν κατά 40% οροθετικοί ασθενείς στην σύφιλη (Cohen, Mackie, Anagnostopoulos, Savage, & Machin, 1989).

#### 4.8. Αντιπηκτικό του Λύκου

Το Αντιπηκτικό του Λύκου είναι αντισώματα εναντίον φωσφολιπιδίων και αποτελεί αναστολέα της πήξης, διότι έχει μεγάλη εξάρτηση από τα φωσφολιπίδια και γι' αυτόν τον λόγο ανιχνεύεται με ευαίσθητες δοκιμασίες πήξης. Αποτελεί τον ισχυρό παράγοντα θρομβώσεων στο Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Στα δείγματα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση δύο φορές ώστε να απομακρυνθούν τα αιμοπετάλια τα οποία αποτελούν πηγή φωσφολιπιδίων. Εκτελούνται δύο διαδικασίες για την ανίχνευση του LA, το πρώτο είναι το APTT (χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης) και η δεύτερη μέθοδος είναι το d RVVT (αραιό δηλητήριο οχιάς Russell). Η αντιπηκτική θεραπεία προκαλεί παράταση του χρόνου πήξης. Για να μην προκύπτουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει η μέτρηση του LA να πραγματοποιηθεί μετά την διακοπή της αντιπηκτικής θεραπείας ή πριν την έναρξη της θεραπείας. Αποφεύγεται η συλλογή του δείγματος κατά την κορύφωση του θρομβωτικού επεισοδίου καθώς το συγκεκριμένο δείγμα χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα του παράγοντα VIII τα οποία επηρεάζουν την μέτρηση του LAC (Devreese et al., 2020).

Ένα θετικό αποτέλεσμα LA θα πρέπει πάντα να επιβεβαιωθεί με ELISA αντισώματα καρδιολιπίνων (ACL) και αντι-β2 γλυκοπρωτεΐνη I. Σε περίπτωση ανίχνευσης μεσαίων ή υψηλών επιπέδων ACL και B2 GPI τότε συμφωνεί με ένα θετικό LA αποτέλεσμα το οποίο έχει ως πόρισμα τον υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης (Miyakis et al., 2006).

#### 4.9. Κριτήρια ταξινόμησης AΦΣ Sapporo – Sydney

Τα κριτήρια για την ταξινόμηση του Αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου καθιερώθηκαν αρχικά το 1998 γνωστά ως κριτήρια Sapporo και στην συνέχεια το 2004 αναθεωρήθηκαν γνωστά ως κριτήρια Sydney. Τα παραπάνω κριτήρια αποτέλεσαν την βάση για την ταξινόμηση του συνδρόμου και βοήθησαν στην διάγνωση.

Η ταξινόμηση Sapporo κατατάσσει τα κριτήρια σε κλινικά και εργαστηριακά. Παρ' όλο που τα κριτήρια παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα παρατηρείται να έχουν και υψηλή συχνότητα σε ασθενείς με Ερυθματώδη Λύκο καθώς και με ηλικιωμένους οι οποίοι παρουσιάζουν θρομβοεμβολικά επεισόδια. Σύμφωνα με τα κριτήρια θα πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον ένα κλινικό κριτήριο και ένα εργαστηριακό κριτήριο.

- ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

- ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ: Αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση σε μεγάλα ή μικρά αγγεία σε οποιοδήποτε ιστό ή όργανο. Συνήθως οι θρομβώσεις είναι επαναλαμβανόμενες. Τα παραπάνω ευρήματα θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ιστολογικές εξετάσεις.

- ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ

1. Ένας ή περισσότεροι θάνατοι εμβρύων με φυσιολογική μορφολογία η οποία έχει επιβεβαιωθεί με υπερηχογράφημα και επιπλέον εξετάσεις κατά την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης.
2. Ένας ή περισσότεροι πρόωροι τοκετοί πριν την 34<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης όπου το έμβρυο έχει φυσιολογική μορφολογία και παρατηρείται πλακουντιακή ανενάρκεια ή εκλαμψία σοβαρή και μη σοβαρή.
3. Τρεις ή περισσότερες αποβολές πριν από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης χωρίς την παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών που οφείλονται στην μητέρα ή στον πατέρα ή ανατομικές και ορμονικές ανωμαλίες που οφείλονται στην μητέρα (Miyakis et al., 2006),(Harris et al., 1986).

- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

- Παρουσία του LA όπου οι δύο μετρήσεις να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον 12 εβδομάδες μεταξύ τους.
- Παρουσία αντισωμάτων αντικαρδιολιπίνης (ACL) του ισότυπου IgG ή και IgM σε μεσαίο ή υψηλό τίτλο (>40 ή και >90). Οι μετρήσεις θα πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 12 εβδομάδες μεταξύ τους.
- Παρουσία αντισωμάτων κατά της B2 γλυκοπρωτεΐνης I του ισότυπου IgG ή και IgM και να απέχουν οι μετρήσεις μεταξύ τους τουλάχιστον 12 εβδομάδες (Miyakis et al., 2006).

Εάν μεταξύ των θετικών εργαστηριακών κριτηρίων και της κλινικής εικόνας που εκδηλώνεται στον ασθενή παρέλθει διάστημα λιγότερο των 12 εβδομάδων και περισσότερο των 5 ετών τότε δεν θα πρέπει να ταξινομείται το περιστατικό στο APS (Nourelidine, Nour-Eldine, Khamashta, & Uthman, 2019).

#### 4.9.1. Κατηγορίες δοκιμασιών για την διάγνωση του APS

Για την διάγνωση του συνδρόμου εκτελούνται δύο δοκιμασίες:

1. Δοκιμασίες πήξης όπου σχετίζονται με την LAC και κατά πόσο επηρεάζει τον χρόνο πήξης.
2. Δοκιμασία ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων καρδιολιπίνης IgG ή και IgM ή και B2 γλυκοπρωτεΐνη I.

Οι ασθενείς ταξινομούνται ανάλογα με τα εργαστηριακά ευρήματα σε :

1. Θετικό Αντιπηκτικό του Λύκου.
2. Θετικά αντισώματα αντικαρδιολιπίνης IgG ή και IgM.
3. Θετικά αντι - B2 γλυκοπρωτεΐνη IgG ή και IgM.
4. Συνδυασμός δύο ή περισσότερων εργαστηριακών ευρημάτων θετικά (Miyakis et al., 2006).

#### 4.9.2. Διαφορές στα κριτήρια Sapporo και Sydney

Ανάμεσα στα δύο κριτήρια υπάρχουν ορισμένες διαφορές ως προς την κλινική διάγνωση και την κλινική εικόνα. Όσον αφορά την κλινική εικόνα διαφέρουν στην ποσοτικοποίησή των τίτλων των αντισωμάτων ACL που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση και την μέτρηση του b2 GPI ως ανεξάρτητο εργαστηριακό κριτήριο.

Επιπλέον υπάρχει διαφορά μεταξύ τους ως προς την ένταξη του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και της παροδικής εγκεφαλικής ισχαιμίας στα κριτήρια διάγνωσης που αφορούν την κλινική εικόνα του ασθενή.

Τέλος υπάρχει διαφορετική άποψη σχετικά με την επανάληψη της δοκιμασίας των εργαστηριακών μετρήσεων μετά από 6 εβδομάδες στα κριτήρια Sapporo ενώ στα κριτήρια Sydney μετά από 12 εβδομάδες (Galli et al., 2007), (Matsuura, Igarashi, Fujimoto, Ichikawa, & Koike, 1990).

#### 4.9.3. Κλινικές εκδηλώσεις

Οι κλινικές εκδηλώσεις στο Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο σχετίζονται με έναν μεγάλο αριθμό κλινικών συμπτωμάτων είτε πρόκειται για το Πρωτοπαθές είτε για το Δευτεροπαθές σύνδρομο το οποίο τις περισσότερες φορές συνοδεύεται με ΣΕΛ ή κάποιο άλλο αυτοάνοσο. Η παρουσία των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων δεν είναι αρκετή ώστε να εκδηλώσει ένας ασθενής θρομβωτικό επεισόδιο, απαιτείται η παρουσία τους να συνοδεύεται από κάποιο κλινικό σύμπτωμα. Τα πιο συχνά συμπτώματα του συνδρόμου σε ένα θρομβωτικό επεισόδιο είναι τα εξής:

- Θρομβωτικά επεισόδια: αποτελεί την πιο συχνή εικόνα του συνδρόμου. Προσβάλλει μεγάλα ή μικρά αγγεία σε ιστούς ή όργανα. Προκαλεί φλεβικές επιπλοκές όπως είναι η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση η οποία εντοπίζεται στο 55% των παθόντων οι οποίοι συνήθως οδηγούνται σε πνευμονική εμβολή λόγω εκτόπισης τμήματος του θρόμβου, προκαλώντας απόφραξη της πνευμονικής αρτηρίας. Ακόμη μια φλεβική επιπλοκή αποτελεί η επιπολής θρομβοφλεβίτιδα. Επιπλέον παρατηρούνται αρτηριακές επιπλοκές όπως ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), παροδικό (ΑΕΕ), αρτηριακές θρομβώσεις άνω και κάτω άκρων καθώς και οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (ΟΕΜ).



- Μαιευτικό ΑΦΣ: γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας παρουσιάζουν μαιευτικές επιπλοκές όπως απώλεια εμβρύου μετά την 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης ή πρόωρο τοκετό λόγω πλακουντιακής ανεπάρκειας ή εκλαμψίας. Οι επιπλοκές προκύπτουν από την μη επαρκή αιμάτωση του πλακούντα λόγω της παρουσίας θρόμβωσης. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα αλληλεπιδρούν με την αννεξίνη V της τροφοβλάστης με αποτέλεσμα να χάνεται η αντιπηκτική δράση της. Άλλος ένας ρόλος των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων είναι να μειώνουν την έκκριση ορμονών από την τροφοβλάστη και να οδηγεί στην πλακουντιακή ανεπάρκεια και συνεπώς σε αυτόματες αποβολές (Rand, Wu, Quinn, & Taatjes, 2010).
- Καταστροφικό ΑΦΣ: παρατηρείται σε μικρό ποσοστό ασθενών με θνησιμότητα έως 50%. Παρουσιάζει σοβαρή κλινική εικόνα απειλητική για την ζωή. Προσβάλλει μεγάλα αγγεία και προκαλεί θρομβώσεις πολλαπλών οργάνων καθώς και συστημάτων (νεφρά, ΚΝΣ, καρδιά, δέρμα, πνεύμονες) (Asherson, 1992).

#### 4.9.4. Κλινικές εκδηλώσεις και εργαστηριακά ευρήματα που δεν συμπεριλαμβάνονται στα κριτήρια

Εκτός από την κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα που έχουν καθοριστεί με βάση τα δύο κριτήρια, στο σύνδρομο εκδηλώνονται συμπτώματα τα οποία παρουσιάζουν άλλες κλινικές εκδηλώσεις οι οποίες άλλοτε συνοδεύονται από θρομβώσεις και επιπλοκές στην κύηση και άλλοτε όχι.

Οι εκδηλώσεις παρατηρούνται σε διάφορα όργανα και συστήματα. Τα συστήματα που προσβάλλονται είναι κυρίως το ΚΝΣ, το καρδιαγγειακό, το νεφρικό σύστημα κ.α. Επιπλέον εντοπίζονται αιματολογικές διαταραχές, δερματικές διαταραχές καθώς και διαταραχές όρασης, οστική νέκρωση, οξεία απώλεια ακοής και ενδοκοιλιακές θρομβώσεις.

- Κεντρικό νευρικό σύστημα: αποτελεί στόχο του συνδρόμου εκτός από τα βασικά χαρακτηριστικά που αναφέρονται στα κριτήρια και αφορούν φλεβικές και αρτηριακές θρομβώσεις εντοπίζονται και νευρολογικές εκδηλώσεις. Η πιο συχνή νευρολογική εκδήλωση είναι η ημικρανία/κεφαλαλγία (25%) και η επιληψία (14%).
- Καρδιολογικές διαταραχές: εντοπίζονται σε μεγάλο ποσοστό στο Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο με τα πιο συχνά να αποτελούν οι βαλβιδοπάθειες (14,3%), η στηθάγχη (2,7%) και η πνευμονική υπέρταση (2,2%).
- Δερματικές εκδηλώσεις: οι πιο συχνές εκδηλώσεις του δέρματος είναι η δικτυωτή πελίωση (24,1%), έλκος (5,5%) και η γάγγραινα δακτύλων (3,3%).
- Αιματολογικά χαρακτηριστικά: η θρομβοπενία (29,6%) αποτελεί ένα από τα πιο συνήθη εργαστηριακά ευρήματα του συνδρόμου. Επιπλέον στους ασθενείς παρατηρείται αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (9,7%) και λευκοπενία.
- Άλλες διαταραχές: διαταραχές όρασης (5,4%), οστική νέκρωση (2,1%), απώλεια ακοής και ενδοκοιλιακές θρομβώσεις όπως νεφρικές θρομβώσεις, ισχαιμία μεσεντερίου και σύνδρομο Addison (Miyakis et al., 2006),(Meroni, Chighizola, Rovelli, & Gerosa, 2014).

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. Πληθυσμός μελέτης

Η έρευνα πήρε μέρος στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ κατά το χρονικό διάστημα 2019 έως 2022. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία σε 82 ασθενείς εκ των οποίων οι 51 ήταν άρρεν ενώ οι 31 θήλυ, με μέση ηλικία τα 47,6 έτη. Οι ασθενείς παρουσίαζαν ως κλινική εικόνα θρομβοεμβολικά επεισόδια σε διάφορα όργανα και συστήματα. Στα συγκεκριμένα άτομα πραγματοποιήθηκε screening test (PT, APTT, DD, FIB, μέτρηση αιμοπεταλίων), μέτρηση των παραγόντων πήξεως καθώς και μετρήσεις για PTT-LA, TR-IL, TR-STAGO, ACA IgG/IgM, anti-B2 IgG/IgM. Οι ασθενείς οι οποίοι είχαν φυσιολογική τιμή APTT ήταν 27,5 ενώ εκείνοι οι οποίοι είχαν παθολογικό APTT ήταν 39,8. Η συλλογή των δειγμάτων καθώς και η εργαστηριακές αναλύσεις έλαβαν χώρα στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ στο εργαστήριο πήξης.

Επιπρόσθετα έγινε χρήση 20 φυσιολογικών ατόμων ως μάρτυρες. Τα άτομα αυτά δεν παρουσίαζαν κανένα θρομβοεμβολικό επεισόδιο, ούτε παρατηρήθηκε κανένα στοιχείο στο ιστορικό τους. Στα δείγματα τους πραγματοποιήθηκε παρόμοιος έλεγχος με εκείνων των παθολογικών δειγμάτων.

## 2. Πειραματική διαδικασία

### 2.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά εκτελέστηκε screening test για την εντόπιση θρομβοφιλίας καθώς μετρήθηκαν και οι παράγοντες πήξης και στην πορεία διενεργήθηκαν οι απαιτούμενες εξετάσεις για την διάγνωση του Αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου.

Στους παραπάνω ασθενείς διενεργήθηκαν οι εξής εξετάσεις:

1. Αρίθμηση αιμοπεταλίων
2. Χρόνος προθρομβίνης (PT)
3. Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT)
4. Μέτρηση Ινωδογόνου
5. Μέτρηση D-Dimmers
6. Ricof

Οι παραπάνω εξετάσεις αναλύθηκαν στον αναλυτή BCS XP SIEMENS.

Επιπλέον έγιναν μετρήσεις για PTT-LA, TR-IL, TR-STAGO καθώς και για ACA IgG/IgM, anti-B2 IgG/IgM. Οι εξετάσεις που αφορούν το Αντιπηκτικό του Λύκου πραγματοποιήθηκαν στον αναλυτή STA R- MAX3 ενώ τα αντισώματα ACA και anti-B2 GPI πραγματοποιήθηκαν στον αναλυτή DIAMEDIX MACO PLUS.



## 3. Μέθοδος PTT-LA

### 3.1. Αρχή της δοκιμασίας

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση του χρόνου επανασβεστοποίησης στο πλάσμα με την παρουσία κεφαλίνης. Η παρουσία αντιπηκτικών του λύκου στο πλάσμα προκαλεί παράταση του χρόνου πήξης. Το αντιδραστήριο είναι ειδικά σχεδιασμένο ώστε να ενισχύει την παράταση του χρόνου πήξης λόγω του LA και αποτελεί προϊόν της εταιρίας DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.

### 3.2. Λήψη και χειρισμός δείγματος

Συλλέχθηκε αίμα σε σωληνάριο πλαστικό ή σιλικονοποιημένο γυαλί με διάλυμα κιτρικού τρινατρίου 0,109 M δηλαδή ένας όγκος κιτρικού για εννέα όγκους αίματος. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 2000 – 2500 στροφές. Εκτελέστηκε συλλογή του υπερκείμενου πλάσματος και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση με σκοπό ο αριθμός των αιμοπεταλίων να είναι μικρότερος από  $10 \cdot 10^9/L$ . Οι εξετάσεις είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Εάν πρέπει να αποθηκευτεί καταψύχεται στους  $-20^\circ C$ , αποψύχεται στους  $37^\circ C$ .

### 3.3. Σύνθεση προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου

Το PTT-LA περιέχει κεφαλίνη, παρασκευάζεται από εγκεφαλικούς ιστούς κουνελιού και σωματιδιακό ενεργοποιητή (πυρίτια) σε ρυθμισμένο μέσο (γλυκίνη), λυοφιλοποιημένο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!** Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται από προϊόντα ζωικής και ανθρώπινης προέλευσης. Πραγματοποιείται εγκεκριμένος έλεγχος για αντισώματα έναντι του HIV1, HIV2, HCV, του HBsAg και λαμβάνονται αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο καμία μέθοδος δοκιμής δεν προσφέρει πλήρη διασφάλιση ότι οι μολυσματικοί παράγοντες απουσιάζουν. Επομένως οι χρήστες θα πρέπει να χειρίζονται το αντιδραστήριο με τις απαραίτητες προφυλάξεις ασφάλειας κατά τον χειρισμό.

Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου ξεκίνησε με την ανασύσταση του φιαλιδίου PTT-LA με 2 mL απιονισμένο νερό. Αφήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ( $18 - 25^\circ C$ ) για 30 λεπτά. Στην συνέχεια ακολούθησε ανακίνηση του φιαλιδίου απαλά ώστε να ομοιογενοποιηθεί το διάλυμα.

Το αντιδραστήριο σε άθικτα φιαλίδια είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία που αναγράφεται πάνω στην ετικέτα, φυλάσσεται στους  $2 - 8^\circ C$ .

Μετά την ανασύσταση παραμένει σταθερό για:

- 24h στους  $20 \pm 5^\circ C$
- 5 μέρες στους  $2 - 8^\circ C$  (σε περίπτωση αποθήκευσης στους  $2 - 8^\circ C$  θα πρέπει πρώτα να αποψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου ( $18 - 25^\circ C$ ) για 30 λεπτά και ύστερα να γίνει χρήση του.

### 3.4. Διαδικασία

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα ή κυβελίδα σε θερμοκρασία  $37^\circ C$  τοποθετήθηκε 0,1 mL πλάσματος ασθενούς και 0,1 mL PTT-LA αντιδραστήριο, ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους  $37^\circ C$  για 3 λεπτά ακριβώς. Ξεκινώντας ένα χρονόμετρο προστέθηκε 0,1 mL

(0,025M) CaCl<sub>2</sub> στους 37°C. Τέλος σημειώθηκαν οι χρόνοι πήξης του φυσιολογικού πλάσματος και του πλάσματος που εξετάζεται. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται σύμφωνα με την κλινική και βιολογική εικόνα και κατάσταση του ασθενή.

### 3.5. Αποτελέσματα

Κάθε εργαστήριο προσδιορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές με βάση το όργανο που χρησιμοποιείται. Οι τιμές θα πρέπει να κυμαίνονται στο εύρος  $\pm 2$  τυπικές αποκλίσεις ( $X + 2 SD$ ). Σε θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει να τηρούνται οι συστάσεις της Επιτροπής Επιστημονικής και Ταυτοποίησης της LA. Η παράταση του χρόνου πήξης του PTT-LA δεν θα πρέπει να ερμηνευτεί αμέσως ότι οφείλεται σε LA αλλά θα πρέπει πρώτα να αποκλειστούν οι άλλες αιτίες που προκαλούν αύξηση του LA.

## 4. STACLOT DRVV SCREEN – STACLOT DRVV CONFIRM (ΜΕΘΟΔΟΣ STAGO)

Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για ανίχνευση αντιπηκτικών του λύκου (LA) στο πλάσμα με τη δοκιμή αραιωμένου δηλητηρίου της οχιάς Russell. Αποτελεί προϊόν της εταιρίας DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.

### 4.1. Αρχή της δοκιμασίας

Το δηλητήριο της οχιάς το οποίο υπάρχει στο αντιδραστήριο STA-Staciot dRVV Screen και STA-Staclor dRVV Confirm με παρουσία ασβεστίου και φωσφολιπιδίων ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε παράγοντα Xa. Ο Xa κολλάει την προθρομβίνη στην θρομβίνη το οποίο μεταβάλλει το ινωδογόνο σε ινώδες ώστε να δημιουργηθεί το πήγμα.

Τα φωσφολιπίδια που περιλαμβάνονται στο αντιδραστήριο προκαλούν αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας για την εξέταση της LA. Το dRVV confirm περιλαμβάνει υψηλά φωσφολιπίδια τα οποία σε συνδυασμό με το dRVV Screen βοηθούν στην επιβεβαίωση της παρουσίας LA στο πλάσμα. Το dRVV Screen έχει χαμηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων ενώ το dRVV confirm έχει υψηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων που εξουδετερώνουν το LA που υπάρχει στο πλάσμα το οποίο πρόκειται να εξεταστεί.

### 4.2. Kit – Αντιδραστήριο

Το αντιδραστήριο περιέχει:

- Δηλητήριο της οχιάς Russell
- Φωσφολιπίδια
- Ασβέστιο
- Αναστολέα Ηπαρίνης (UFH)

Το αντιδραστήριο περιέχει αζίδιο του νατρίου (<1g/l) ως συντηρητικό γι' αυτόν τον λόγο θα πρέπει να απορρίπτεται σε νεροχύτη χρησιμοποιώντας άφθονο νερό.

### 4.3. Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου

- Ανασύσταση του Staclor dRVV Screen (REF 00339) με 2 ml απιονισμένο νερό.
- Ανασύσταση Staciot dRVV Screen (REF 00333) με 5 ml απιονισμένο νερό.

- STA-Staclor dRVV (REF 00334) με 2 ml απιονισμένο νερό. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25 °C) για 30 λεπτά. Ανακίνηση ώστε να ομοιογενοποιηθεί το διάλυμα.
- Τοποθέτηση του νέου STA mini Reducer (REF 00797) και εγκατάσταση στο διάτρητο καπάκι.

Τα αντιδραστήρια σε άθικτα φιαλίδια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία που αναγράφεται στην ετικέτα, όταν φυλάσσονται στους 2 – 8 °C.

Για τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια ισχύει:

- 3 μέρες με STA-R και STA Compact στα αρχικά τους φιαλίδια με STA mini Reducer και διάτρητο πώμα.
- 7 μέρες στους 2 – 8 °C στο αρχικό πωματισμένο φιαλίδιο (αποφυγή χρήσης STA – mini).
- 1 μήνα στους -20°C κάτω από 1 ml σε πλαστικό δοχείο. Απόψυξη στους 37°C.

#### 4.4. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

- STA®- Control LA 1+2 : πλάσμα ελέγχου, LA αρνητικό και θετικά πλάσματα.
- STA®- mini Reducer.
- STA-R® ή STA Compact®.

#### 4.5. Διαδικασία

- Προσδιορισμός εύρους αναφοράς: για κάθε παρτίδα STA Staclor dRVV Screen και STA Staciot dRVV Confirm το οποίο καθορίζεται από τουλάχιστον 20 μεμονομένα φυσιολογικά δείγματα πλάσματος. Τα πλάσματα αυτά (δεξαμενή αναφοράς) δοκιμάζονται σε κάθε βάρδια εργασίας και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της αναλογίας.
- Τα πλάσματα των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν σε αδιάλυτη μορφή. Τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα.
- Έλεγχος ποιότητας: είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται ώστε να διασφαλίζεται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα. Πραγματοποιήθηκε χρήση του STA® Control LA 1+2, η χρήση τους έγινε σε αδιάλυτη μορφή και σαρώθηκαν στον αναλυτή.
- Αφού φορτώθηκαν τα δείγματα στον αναλυτή πραγματοποιείται αυτόματα ο έλεγχος τους.

#### 4.6. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην οθόνη του αναλυτή:

STA – Staciot Drvv Screen το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αναλογία:

$$Screen\ ratio = \frac{\text{εξαρθώμενο πλάσμα}}{\text{δεξαμενή αναφοράς}}$$

Όταν η αναλογία Screen του ασθενούς είναι μεγαλύτερη από 1,20 τότε το αποτέλεσμα είναι μη φυσιολογικό και υπάρχει υποψία για LA.

STA – Staclot dRVV Confirm, το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως φυσιολογική αναλογία:

$$\text{Confirm ratio} = \frac{\text{εξεταζόμενο πλάσμα}}{\text{δεξαμενή αναφοράς}}$$

$$\text{Φυσιολογικό ratio} = \frac{\text{Screen ratio}}{\text{Confirm ratio}}$$

#### 4.7. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Η παρουσία LA στο δείγμα επιβεβαιώνεται εάν η φυσιολογική αναλογία είναι μεγαλύτερη ή ίση με 1,20. Στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο το δείγμα συνεχίζει να βγάζει θετικό αποτέλεσμα ύστερα από 12 εβδομάδες. Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία LA πρέπει να τηρηθούν οι συστάσεις της Επιστημονικής Επιτροπής και της Επιτροπής Τυποποίησης του LA. Όταν η αναλογία διαλογής ενός ασθενούς είναι υψηλότερη από 1,20 τότε εκτελούνται μελέτες ανάμειξης προκειμένου να διαφοροποιηθεί η ανεπάρκεια του παράγοντα πήξης. Όταν η φυσιολογική αναλογία είναι υψηλότερη ή ίση με 1,20 η δοκιμή STA – Staclot dRVV Confirm επιβεβαιώνει την αντιφωσφολιπιδική φύση του αντιπηκτικού.

### 5. IL DRVVT Screen -IL DRVVT Confirm

#### 5.1. Προβλεπόμενη χρήση

Οι δοκιμές dRVV Screen και dRVV Confirm της εταιρίας Hemosil είναι ποιοτικά in vitro διαγνωστικά προϊόντα που βοηθούν στην ανίχνευση αντιπηκτικών του λύκου σε ανθρώπινο κίτρινο πλάσμα με την μέθοδο αραιωμένου δηλητηρίου οχιάς στα συστήματα πήξης IL. Οι δοκιμές dRVV Screen και dRVV Confirm προορίζονται για την αξιολόγηση ασθενών που έχουν ανεξήγητα αποτελέσματα παρατεταμένης δοκιμής APTT. Οι δοκιμές αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλα ως ολοκληρωμένο τεστ για την ανίχνευση του αντιπηκτικού λύκου.

#### 5.2. Αρχή μεθόδου

Τα αντιπηκτικά του λύκου (LA) ανήκουν στην ομάδα των Αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων που στρέφονται ενάντια σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια ή σύμπλοκα μεταξύ φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών (είτε β2 γλυκοπρωτεΐνη I, είτε παράγοντες πήξης όπως η προθρομβίνη). Όταν προσδιορίζεται από την ικανότητα τους να παρατείνουν τις εξαρτώμενες από φωσφολιπίδια τέστ (APTT, SCT, DRVVT) αυτά τα αντισώματα αναφέρονται ως LA.

Οι ασθενείς με LA διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο κλινικών επιπλοκών όπως θρόμβωση και επαναλαμβανόμενες αποβολές. Οι δοκιμές dRVV Screen και dRVV Confirm είναι βελτιωμένα αντιδραστήρια dRVV και προορίζονται να απλοποιήσουν και να τυποποιήσουν την ανίχνευση του LA σε κλινικές αξιολογήσεις. Η ανάλυση dRVV Screen είναι φτωχή σε φωσφολιπίδια καθιστώντας την ευαίσθητη στα LA. Η πρόσθετη ποσότητα φωσφολιπιδίων στο dRVV Confirm εξουδετερώνει το LA για να δώσει μικρότερους χρόνους πήξης. Το δηλητήριο της οχιάς με την παρουσία ασβεστίου ενεργοποιεί απευθείας τον παράγοντα X. Επομένως οι δοκιμές dRVV Screen και dRVV Confirm δεν επηρεάζονται από ανωμαλίες του παράγοντα επαφής, ανεπάρκειας ή αναστολές των

παραγόντων VII, VIII και IX. Η παρεμβολή ηπαρίνης έως 1 U/ml εξουδετερώνεται από το πολυβρένιο.

Ως αποτέλεσμα το dRVV Screen και το dRVV Confirm είναι πιο συγκεκριμένες δοκιμές για την αξιολόγηση του LA από το APTT. Το dRVV Screen και το dRVV Confirm είναι ένα ολοκληρωμένο τεστ όπως αναφέρεται στην σύσταση της επιτροπής ISTH 2009 για την ανίχνευση Αντιπηκτικών Λύκου.

### 5.3. Σύνθεση

Κάθε ανάλυση dRVV Screen αποτελείται:

- 10 x 2 ml φιαλίδια λυοφιλοποιημένου παρασκευάσματος που περιέχει δηλητήριο της οχιάς.
- Φωσφολιπίδια.
- Ασβέστιο.
- Πολυβρένιο.
- Ρυθμιστικά διαλύματα.
- Σταθεροποιητές.
- Χρωστικές ουσίες.
- Συντηρητικό.

Κάθε dRVV Confirm αποτελείται:

- 10 x 2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένου παρασκευάσματος που περιέχει δηλητήριο της οχιάς.
- Φωσφολιπίδια.
- Ασβέστιο.
- Πολυβρένιο.
- Ρυθμιστικά διαλύματα.
- Σταθεροποιητές.
- Χρωστικές ουσίες.
- Συντηρητικό.

### 5.4. Παρασκευή, αποθήκευση και σταθερότητα αντιδραστήριου

Διαλύθηκε το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου με 2 ml απιονισμένου νερού. Επανατοποθετήθηκε το πόμα και ανακινήθηκε απαλά. Πραγματοποιήθηκε πλήρης ανασύσταση του προϊόντος. Διατηρήθηκε το αντιδραστήριο στους 15 – 20 °C για 30 λεπτά και τοποθετήθηκε σε αναποδογυρισμένη θέση πριν από την χρήση. Χωρίς ανακίνηση.

Τα αντιδραστήρια που δεν έχουν ανοιχτεί είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο όταν φυλάσσονται στους 2-8 °C. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση: 15 ημέρες στους 2-8 °C σε κλειστά αρχικά φιαλίδια, 3 ημέρες στους 15 °C στα αρχικά φιαλίδια. Για βέλτιστη σταθερότητα αφαιρούνται τα αντιδραστήρια από το σύστημα και φυλάσσονται κλειστά στους 2 – 8 °C στα αρχικά φιαλίδια. Δεν καταψύχονται.

## 5.5. Συλλογή προετοιμασία και χειρισμός δειγμάτων

Εννέα μέρη πρόσφατα ληφθέντος φλεβικού αίματος συλλέχθηκαν σε ένα μέρος 3,2% κτρικού νατρίου. Οι ISTH LA Guidelines συνιστούν ότι για ανάλυση LA τα δείγματα πλάσματος πρέπει να είναι φτωχά σε αιμοπετάλια, πριν από την ανάλυση ή την κατάψυξη. Οι δοκιμές dRVV Screen/ dRVV Confirm μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε με φρέσκα είτε με κατεψυγμένα δείγματα.

Πρόσθετα αντιδραστήρια που δεν παρέχονται στο κιτ είναι:

- LA θετικός μάρτυρας
- LA αρνητικός μάρτυρας
- Καθαριστικό

## 5.6. Έλεγχος ποιότητας

Συνιστώνται κανονικοί και μη φυσιολογικοί έλεγχοι για ένα πλήρες πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου. Το Hemosil LA Positive Control και το Hemosil Negative Control έχουν σχεδιαστεί για αυτό το πρόγραμμα. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει τη δική του μέση τιμή και τυπική απόκλιση και θα πρέπει να δημιουργήσει ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου για την παρακολούθηση δοκιμών. Οι μάρτυρες θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον μια φορά κάθε οχτάωρη βάρδια σύμφωνα με την καλή εργαστηριακή πρακτική.

## 5.7. Αποτελέσματα

Η ακόλουθη διαδικασία θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των αναλογιών dRVV Screen και dRVV Confirm:

- Για κάθε νέα παρτίδα κιτ dRVV Screen και dRVV Confirm θα πρέπει να προσδιορίζεται ένα νέο κανονικό εύρος.
- Προσδιορισμός της μέσης τιμής κάθε κανονικού εύρους σε δευτερόλεπτα.
- Ο μέσος όρος του κανονικού εύρους θα χρησιμοποιείται ως σταθερός παρονομαστής στους υπολογισμούς των λόγων (οθόνη DRVVT).

Το αποτέλεσμα του δείγματος ασθενούς σε δευτερόλεπτα διαιρείται με την μέση τιμή του κανονικού εύρους της οθόνης DRVVT.

## 6. Μέτρηση B2 γλυκοπρωτεΐνης

### 6.1. Αρχή της δοκιμασίας

Πραγματοποιήθηκε ενζυμική ανοσοδοκιμασία (ELISA), για ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgG και IgM. Τα αντισώματα των προτύπων, ο θετικός μάρτυρας και τα αραιωμένα δείγματα των ασθενών αντιδρούν με το B2-GP-1 το οποίο βρίσκεται στην στερεή φάση της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Αφού προηγήθηκε επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκε πλύση ώστε να αφαιρεθούν τα μη δεσμευμένα αντισώματα. Τα δεσμευμένα αντισώματα αντέδρασαν με τα ειδικά αντιανθρώπινα IgG ή IgM (τα οποία είναι συζευγμένα με HRP) εντός της περιόδου επώασης (30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Η υπερβολική σύζευξη διαχωρίστηκε από τα ανοσοσύμπλοκα στερεής φάσης με πλύση που πραγματοποιήθηκε. Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύματος στο 450nm ήταν ευθέως ανάλογη με την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που δεσμεύτηκαν. Η τυπική



καμπύλη καθορίστηκε με την γραμμική παράταση των συγκεντρώσεων αντισωμάτων των βαθμονομητών (άξονα χ) και των αντίστοιχων τιμών OD (άξονα ψ) που μετρήθηκαν.

## 6.2. Προετοιμασία δείγματος

Για την εξέταση χρησιμοποιήθηκε ορός αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πλάσμα. Απορρίφθηκαν λιπαιμικά, αιμολυτικά και μολυσμένα δείγματα. Αποφυγή επαναλαμβανόμενης κατάψυξης και απόψυξης.

## 6.3. Προετοιμασία πριν την χρήση

- Τα δείγματα αφέθηκαν ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τον προσδιορισμό.
- Πραγματοποιήθηκε αραιώση 1 +100 (v/v).
- Το δείγμα φυλάσσεται στους 2-8 °C έως 3 μέρες, ενώ για μακροπρόθεσμη αποθήκευση στους -20°C.
- Η πλάκα μικροτιτλοδότησης σφραγίστηκε από κενό σε ένα φύλλο με ξηραντικό το οποίο αποτελείται από πλαίσιο και λωρίδες με εύθραυστα φρεάτια. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης πριν την χρήση πρέπει να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μη χρησιμοποιημένα φρεάτια αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.
- Παρασκευάστηκε επαρκής ποσότητα διαλύματος πλύσης.

## 6.4. Διαδικασία

- Αφού πραγματοποιήθηκε αραιώση στους ορούς των ασθενών 1 +100(v/v), αφέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία 20-25°C.
- Τοποθετήθηκαν : 100μl calibrators (0 προαιρετικά) 1 - 4 ποσοτικά ή 100μl calibrator 1  
100μl μάρτυρες (αρνητικό και θετικό)  
100μl αραιωμένο δείγμα ασθενών στα αντίστοιχα πηγαδάκια.
- Πραγματοποιήθηκε επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20-25°C.
- Ακολούθησαν πλύσεις x3 με διάλυμα πλύσης 300μl.
- Προσθήκη 100μl conjugate σε κάθε φρεάτιο.
- Επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση x3 με διάλυμα πλύσης`.
- Προσθήκη 100μl υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο.
- Επώαση για 15 λεπτά προστατευμένο από φως στους 20-25°C.
- Τοποθέτηση 100μl διαλύματος τερματισμού σε κάθε φρεάτιο.
- Μέτρηση OD στα 450nm έναντι 620nm 30 λεπτά μετά την προσθήκη διαλύματος τερματισμού.

# 7. Μέτρηση Καρδιολιπίνης

## 7.1. Αρχή της δοκιμασίας

Είναι μια ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgG και IgM έναντι της καρδιολιπίνης. Τα αντισώματα των προτύπων, των δειγμάτων ελέγχου και των ασθενών αντιδρούν με ένα σύμπλεγμα αντιγόνου που αποτελείται από καρ-

διολιπίνη και τον συμπαράγοντα β2 GPI ακινητοποιημένο σε στερεή φάση των πλακών μικροτιτλοδότησης. Χρήση υψηλά καθαρού β2 GPI εγγυάται την ειδική δέσμευση των αντισωμάτων καρδιολιπίνης που σχετίζονται με αυτοάνοσο του υπό εξέταση δείγματος. Ύστερα από επώαση 60 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου τα μη δεσμευμένα αντισώματα δείγματος αφαιρούνται με τις πλύσεις. Τα δεσμευμένα αντισώματα αντιδρούν ειδικά με anti-human-IgG ή anti-human-IgM συζευγμένο με υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (HRP) εντός της περιόδου των 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Η υπερβολική σύζευξη διαχωρίζεται από το ανοσοσύμπλοκο στερεάς φάσης με τις πλύσεις. Το HRP μετατρέπει το άχρωμο διάλυμα υποστρώματος 3,3', 5,5' – τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) που προστίθεται σε ένα μπλε προϊόν. Η αντίδραση διακόπτεται με την διανομή ενός όξινου διαλύματος στα φρεάτια μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μετατρέποντας το διάλυμα από μπλε σε κίτρινο. Η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύματος στα 450 nm είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που δεσμεύονται. Η τυπική καμπύλη καθορίζεται με τη γραφική παράσταση των συγκεντρώσεων αντισωμάτων των βαθμονομητών (άξονα χ) και των αντίστοιχων τιμών OD του άξονα ψ που μετρήθηκαν.

## 7.2. Μέθοδος και αποθήκευση

- Το anti-cardiolipin IgG/IgM έχει σχεδιαστεί για 96 προσδιορισμούς.
- Η ημ/νια λήξης κάθε συστατικού αναφέρεται στην αντίστοιχη ετικέτα του κάθε κιτ.
- Κατά την παραλαβή όλα τα συστατικά του anti-cardiolipin IgG/IgM φυλάσσονται στους 2-8 °C, όλα τα εξαρτήματα του κιτ παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 2 μήνες με την κατάλληλη αποθήκευση.

## 7.3. Προετοιμασία πριν την χρήση

- Όλα τα εξαρτήματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την χρήση τους.
- Η πλάκα μικροτιτλοδότησης σφραγίστηκε υπό κενό σε ένα φύλλο με ξηραντικό. Η πλάκα αποτελείται από πλαίσιο και λωρίδες με εύθραυστα φρεάτια. Η σφραγισμένη μικροπλάκα αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου πριν το άνοιγμα. Τα μη χρησιμοποιημένα φρεάτια φυλάχθηκαν στο ψυγείο ώστε να προστατευτούν από την υγρασία.
- Παρασκευάστηκε αρκετή ποσότητα διαλύματος πλύσης αραιώνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα 10 φορές (1+9) με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- Το διάλυμα πλύσης που παρασκευάστηκε ήταν σταθερό για 30 μέρες στους 2-8°C. Ο χρόνος εμποτισμού του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης στα φρεάτια ήταν 5 δευτερόλεπτα ανά κύκλο πλύσης. Αποφεύχθηκε η έκθεση του διαλύματος υποστρώματος TMB στο φως.

## 7.4. Διαδικασία δοκιμής

- Αφού πραγματοποιήθηκε αραιώση στους ορούς των ασθενών 1 +100(v/v), αφέθηκαν όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία 20-25°C.
- Τοποθετήθηκαν : 100μl calibrators (0 προαιρετικά) 1-4 ποσοτικά ή 100μl calibrator 1
  - 100μl μάρτυρες (αρνητικό και θετικό)
  - 100μl αραιωμένο δείγμα ασθενών στα αντίστοιχα πηγαδάκια.
- Πραγματοποιήθηκε επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20-25°C.
- Ακολούθησαν πλύσεις x3 με διάλυμα πλύσης 300μl.



- Προσθήκη 100μl conjugate σε κάθε φρεάτιο.
- Επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση x3 με διάλυμα πλύσης.
- Προσθήκη 100μl υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο.
- Επώαση για 15 λεπτά προστατευμένο από φως στους 20-25°C.
- Τοποθέτηση 100μl διαλύματος τερματισμού σε κάθε φρεάτιο.
- Μέτρηση OD στα 450nm έναντι 620nm 30 λεπτά μετά την προσθήκη διαλύματος τερματισμού.

## 7.5. Επεξεργασία δεδομένων

Το Anti- cardiolipin IgG/IgM επιτρέπει τόσο την ποσοτική (4+1 βαθμονομητές) όσο και την ημιποσοτική (βαθμονομητής 1) προσδιορισμό των αποτελεσμάτων.

### Ποσοτική αξιολόγηση

Η τυπική καμπύλη καθορίζεται σχετίζοντας τις μέσες τιμές OD των βαθμονομητών 1-4 (CAL 0 προαιρετικό) στην τεταγμένη, άξονα ψ έναντι των αντίστοιχων συγκεντρώσεων αντικαρδιολιπινών στον τετμημένο άξονα χ. Οι συγκεντρώσεις αντικαρδιολιπίνης των άγνωστων δειγμάτων διαβάζονται απευθείας σε U/ml έναντι των αντίστοιχων τιμών OD. Χρησιμοποιώντας την συνιστώμενη αραίωση 1+100 v/v για τους ορούς ασθενών δεν απαιτείται διορθωτικός παράγοντας.

### Ημιποσοτική αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με τον υπολογισμό του δείκτη δέσμευσης (BI) χρησιμοποιώντας τον βαθμονομητή 1 (10 U/ml) ως βαθμονομητή αποκοπής. Το BI είναι ο λόγος της τιμής OD ενός δείγματος προς την τιμή αποκοπής OD (CAL1).

$$BI = \frac{D.O \text{ δείγμα}}{D.O \text{ βαθμονομητή 1}}$$

Και οι δύο παραλλαγές αξιολόγησης του Anti- cardiolipin μπορούν να επιτευχθούν με λογισμικό ανάλυσης ενσωματωμένο στο φωτόμετρο. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τα δικά του φυσιολογικά και παθολογικά εύρη αναφοράς για τα επίπεδα Anti- cardiolipin όπως γίνεται και για άλλες διαγνωστικές παραμέτρους.

## 8. Στατιστικός έλεγχος – Συμπεράσματα

Στην έρευνα πήραν μέρος 82 ασθενείς. Τον μεγαλύτερο αριθμό αποτελούσε ο αντρικός πληθυσμός και στην συνέχεια ακολουθούσε ο γυναικείος πληθυσμός.

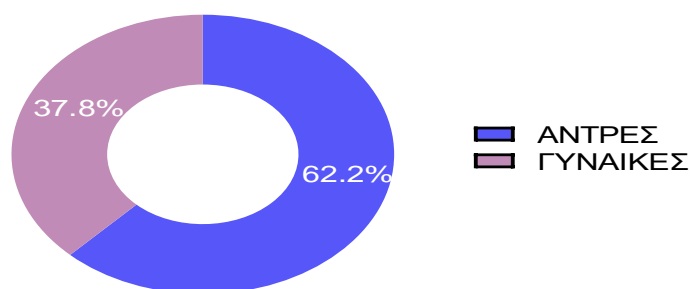
Στα παρακάτω διαγράμματα περιγράφεται αναλυτικά ο πληθυσμός της έρευνας, οι ηλικίες της κάθε ομάδας και η μέση ηλικία των ασθενών που πήραν μέρος σε αυτήν. Επιπλέον στα διαγράμματα αναλύονται οι τιμές του APTT ως προς τους ασθενείς και τις φυσιολογικές τιμές, η συσχέτιση του APTT με το PTT-LA. Ακολουθούν συσχετίσεις ανάμεσα στο TR-IL και TR-STAGO, περιγράφονται τα επίπεδα έκφρασης των αντισωμάτων καθώς και συσχετίσεις αυτών με το TR-IL και TR-STAGO.

Οι ασθενείς που εξετάστηκαν ανήκουν στα δύο φύλα με την πλειοψηφία να αποτελεί ο αντρικός πληθυσμός.

ΦΥΛΟ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΑΡΡΕΝ	51
ΘΥΛΗ	31

Πίνακας 1. Πληθυσμός έρευνας.

Στον παραπάνω πίνακα καταγράφονται πόσοι άντρες και πόσες γυναίκες πήραν μέρος στην έρευνα. Από τους 82 ασθενείς το μεγαλύτερο πληθυσμό αποτελεί ο αντρικός πληθυσμός με 51 άτομα ενώ ο γυναικείος πληθυσμός ανέρχεται στα 31 άτομα.

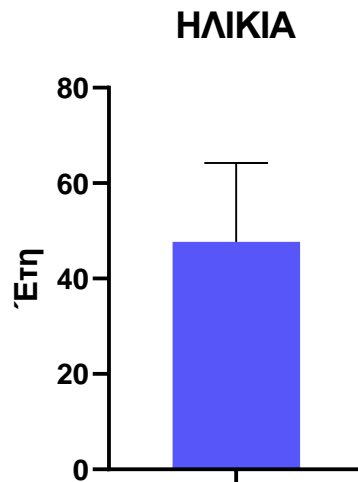


**Αριθμός Ασθενών=82**

Εικόνα 4. Διάγραμμα πίτας με τον πληθυσμό της έρευνας

Στην εικόνα 4 απεικονίζεται ένα διάγραμμα πίτας με τον αριθμό ασθενών που έλαβαν μέρος στην έρευνα. Ο αριθμός των ασθενών ανέρχεται στα 82 άτομα, με μπλε χρώμα αναγράφεται ο αντρικός πληθυσμός 62,2% ενώ με μωβ χρώμα ο γυναικείος πληθυσμός 37,8%.

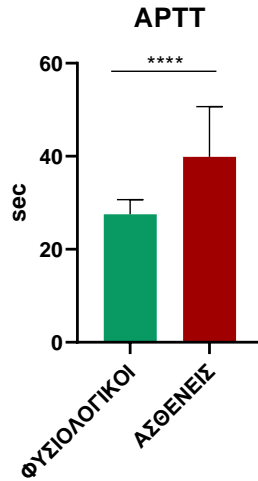
Στο διάγραμμα πίτας καταγράφεται ο αριθμός των ασθενών με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο όπου αποτελείται από 82 άτομα. Παρατηρείται με μπλε χρώμα ο αντρικός πληθυσμός ο οποίος ανέρχεται στο 62,2 % δηλαδή 51 άντρες και με μωβ χρώμα ο γυναικείος πληθυσμός ο οποίος ανέρχεται στο 37,8% δηλαδή 31 γυναίκες.



*Εικόνα 5. Διάγραμμα ηλικίας ασθενών.*

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται η μέση τιμή ηλικίας των ασθενών με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο η οποία ανέρχεται στα 47,6 έτη.

Στο παραπάνω διάγραμμα αναπαριστάνεται η μέση ηλικία των ασθενών η οποία είναι τα 47,6 έτη. Ανάμεσα σε αυτά τα άτομα υπάρχουν και γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας στις οποίες το σύνδρομο προκαλεί επιπλοκές στην κύηση τους όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω.

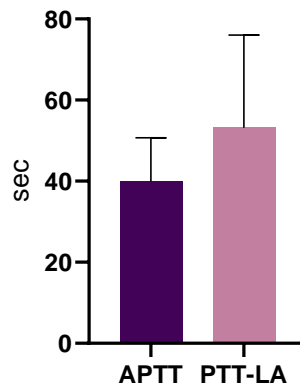


Εικόνα 6. Μέση τιμή του APTT σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς.

Στην εικόνα 6 περιγράφεται με πράσινο χρώμα η τιμή APTT των φυσιολογικών ατόμων η οποία είναι 27,5 ενώ με κόκκινο χρώμα των ασθενών και η τιμή ανέρχεται στο 39,8. Με την μέτρηση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης APTT ελέγχεται η ενδογενείς οδός του καταρράκτη της πήξης, δηλαδή ελέγχονται οι παράγοντες FVIII, FIX, FXI και FXII. Στους ασθενείς με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο ο χρόνος πήξης παρατηρείται παρατεταμένος.

Στην παραπάνω εικόνα αποτυπώνεται η μέση τιμή του APTT ως προς τα φυσιολογικά άτομα το οποίο βάση διαγράμματος παρατηρείται με πράσινο χρώμα στην τιμή 27,5 ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο οι οποίοι παρουσιάζουν ανεβασμένη τιμή APTT όπου παρατηρείται στο 39,8. Η αυξημένη τιμή του APTT υποδηλώνει διαταραχή της πήξης λόγω της παρουσίας των Αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων.

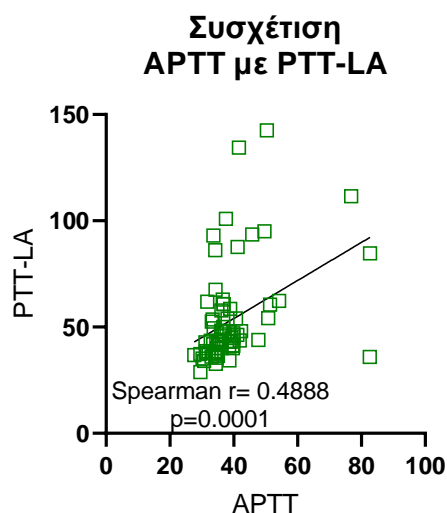
#### ΕΠΙΠΕΔΑ APTT & PTT-LA



Εικόνα 7. Συσχέτιση του APTT με την PTT-LA.

Στην εικόνα 7 με μωβ σκούρο χρώμα απεικονίζεται η τιμή του APTT ενώ με μωβ ανοιχτό χρώμα η τιμή του PTT-LA. Η μέτρηση του APTT πραγματοποιείται συνδυαστικά με την μέτρηση του PTT-LA διότι το αντιδραστήριο του APTT δεν είναι ευαισθητοποιημένο στο LA, προκαλεί μικρότερη παράταση του χρόνου πήξης σε παρουσία του LA. Αντιθέτως το αντιδραστήριο PTT-LA είναι ειδικά σχεδιασμένο να ενισχύει την παράταση του χρόνου πήξης σε παρουσία LA.

Στο διάγραμμα παρουσιάζεται με μωβ σκούρο χρώμα οι ασθενείς με ανεβασμένη την τιμή APTT (39,8) και με μωβ ανοιχτό χρώμα οι ασθενείς με ανεβασμένη την τιμή PTT-LA (53,2). Οι δυο μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για μεγαλύτερη ευαισθησία και επαλήθευση στην παρουσία του LA.

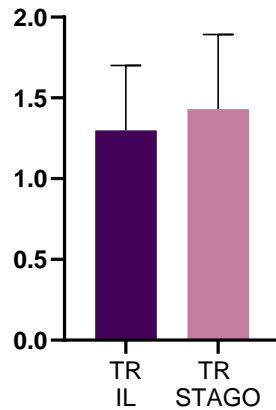


*Εικόνα 8. Στατιστική συσχέτιση του APTT με το PTT-LA.*

Στην εικόνα 8 παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο τιμές. Οι δύο μετρήσεις χρησιμοποιούνται συνδυαστικά για την ανίχνευση της παρουσίας του LA. Από την στατιστική ανάλυση οι δύο μετρήσεις συσχετίζονται μεταξύ τους σε υψηλό βαθμό όπως παρατηρείται και από το διάγραμμα.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται σημαντική στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές του APTT με το PTT-LA. Όπως παρατηρείται και στο διάγραμμα στους ασθενείς με το σύνδρομο καταγράφονται ανεβασμένες τιμές των δύο εξετάσεων. Spearman  $r= 0.4888$ ,  $p= 0.0001$ .

### ΕΠΙΠΕΔΑ DRVVT TR-IL & TR-STAGO

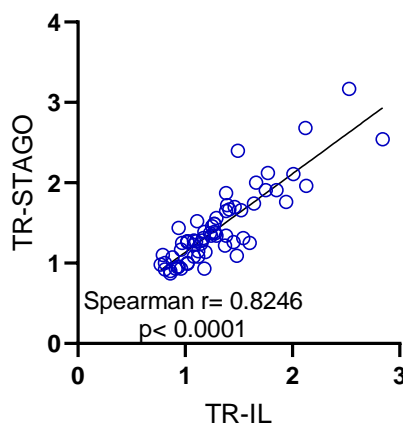


Εικόνα 9. Μέση τιμή TR-IL και TR-STAGO σε ασθενείς.

Στην παραπάνω εικόνα περιγράφεται με μωβ σκούρο χρώμα η μέση τιμή του TR-IL ενώ με μωβ ανοιχτό χρώμα η μέση τιμή του TR-STAGO. Και οι δύο μετρήσεις πραγματοποιούνται για την απλοποιημένη ανίχνευση του LA. Η διαφορά μεταξύ τους είναι πώς στην TR-IL αυξάνει τον χρόνο πήξης ενώ η TR-STAGO λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων τα οποία εξουδετερώνουν την παρουσία LA οπότε μειώνουν και τον χρόνο πήξης.

Αντίστοιχα στην παραπάνω εικόνα εντοπίζεται η συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μετρήσεις TR-IL και TR-STAGO. Με σκούρο μωβ χρώμα απεικονίζεται η μέση τιμή της μέτρησης TR-IL σε ασθενείς όπου βρίσκεται στο 1,3 ενώ με μωβ ανοιχτό χρώμα καταγράφεται η μέτρηση TR-STAGO σε ασθενείς η οποία καταγράφεται στο 1,4.

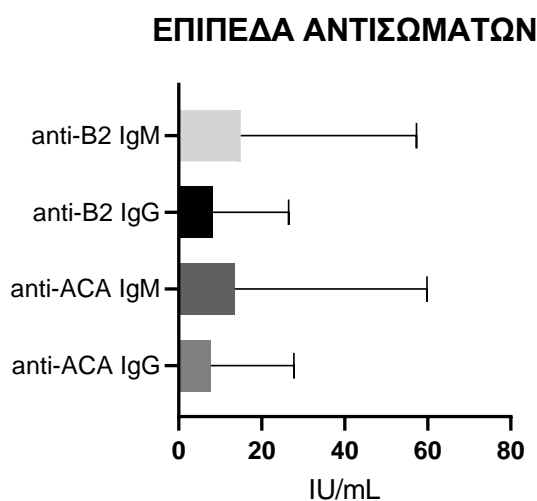
### Συσχέτιση TR-IL με TR-STAGO



Εικόνα 10. Συσχέτιση στις τιμές TR-IL και TR-STAGO.

Στην εικόνα 10 παρατηρείται σημαντική στατιστική θετική συσχέτιση ανάμεσα στις δύο τιμές. Παρατηρείται αυξημένη θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μετρήσεων όπως εντοπίζεται και στο παραπάνω διάγραμμα. Οι δύο μετρήσεις φανερώνουν την παρουσία του LA στον παθολογικό πληθυσμό που μελετάται.

Στο διάγραμμα εντοπίζεται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση στις τιμές TR-IL και TR-STAGO σε ασθενείς. Οι δύο μετρήσεις έχουν πολύ μικρή απόκλιση μεταξύ τους στους ασθενείς με Αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Spearman  $r=0.8245$ ,  $p<0.0001$ .

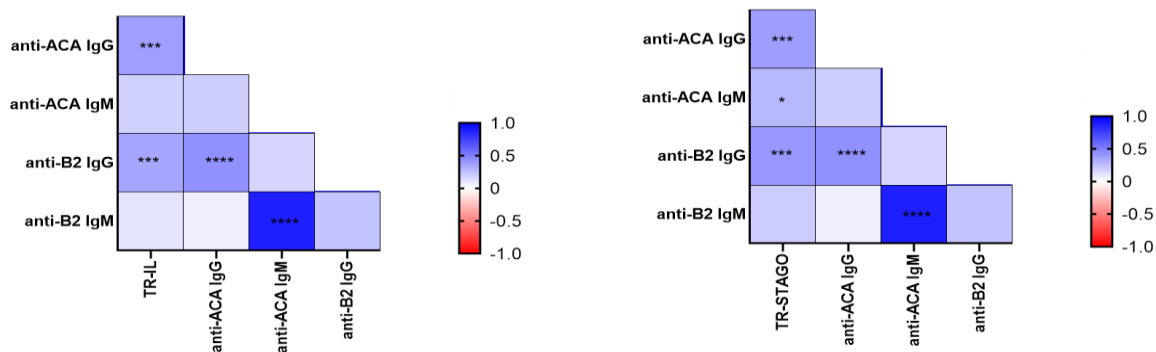


*Εικόνα 11. Μέση τιμή επιπέδων έκφρασης των αντισωμάτων.*

Στην εικόνα 11 περιγράφεται αναλυτικά η μέση τιμή των αντισωμάτων καρδιολιπίνης IgG/IgM καθώς και των anti-B2 IgG/IgM. Στο παραπάνω διάγραμμα αναλύεται η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης των αντισωμάτων. Τα IgM αντισώματα παρατηρούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα anti-ACA και στα anti-B2 όπου τα πρώτα εντοπίζονται στο 13,5 ενώ τα δεύτερα στο 14,9. Τα IgG παρατηρούνται σε μικρότερο βαθμό, τα anti-ACA στο 7,8 ενώ τα anti-B2 στο 8,3.

Στην εικόνα 11 παρατηρείται η μέση τιμή των επιπέδων των αντισωμάτων στους ασθενείς. Τα anti- B2 IgM αντισώματα ανέρχονται στο 14.9 ενώ τα anti-B2 IgG στο 8,3. Επιπλέον τα anti-ACA IgM βρίσκονται στο 13,5 ενώ τα anti-ACA IgG ανέρχονται στο 7,8.





Εικόνα 12. Θερμικά διαγράμματα συσχέτισης TR-IL και TR-STAGO μεταξύ αντισωμάτων.

Στην εικόνα 12 απεικονίζονται δύο θερμικά διαγράμματα. Στο αριστερό θερμικό διάγραμμα περιγράφεται η σχέση του TR-IL με τα αντισώματα anti-ACA IgG/IgM και anti-B2 IgG/IgM ενώ στο δεξί θερμικό διάγραμμα περιγράφεται η σχέση TR-STAGO με τα αντισώματα. Και στις δύο περιπτώσεις εντοπίζεται σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων και των TR-IL και TR-STAGO αντίστοιχα.

Τα θερμικά διαγράμματα απεικονίζουν τις συσχετίσεις μεταξύ TR-IL και των anti-ACA IgG & IgM και anti-B2 IgG & IgM στους ασθενείς αριστερά και TR-STAGO και των anti-ACA IgG & IgM και anti-B2 IgG & IgM στους ασθενείς δεξιά.

Με κόκκινο χρώμα (-0,5 και -1,0) παρουσιάζονται οι αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ μετρήσεων όπου στα παραπάνω θερμικά διαγράμματα δεν παρατηρείται καμία αρνητική συσχέτιση.

Με μπλε χρώμα (0,5 και 1,0) παρουσιάζονται οι θετικές συσχετίσεις.

Με λευκό χρώμα (0) παρουσιάζονται όσοι συνδυασμοί δεν εμφανίζουν συσχετίσεις.

Στο σύνολο των ασθενών παρατηρείται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του TR-IL και των anti-ACA IgG καθώς και του TR-IL με τα anti-B2 IgG στο αριστερό θερμικό διάγραμμα όπου περιγράφονται στο διάγραμμα με τρεις αστερίσκους. Επιπλέον στο αριστερό διάγραμμα εντοπίζεται θετική συσχέτιση και ανάμεσα στα anti-ACA IgG με τα anti-B2 IgG. Τέλος την μεγαλύτερη θετική στατιστική συσχέτιση στο αριστερό διάγραμμα παρουσιάζουν τα anti-ACA IgM με τα anti-B2 IgM με έντονο μπλε χρώμα της κλίμακας 1.0.

Στο δεξί διάγραμμα στο σύνολο των ασθενών παρατηρείται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του TR-STAGO και anti-ACA IgG καθώς και μεταξύ TR-STAGO και anti-ACA IgM. Επιπλέον στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση υπάρχει μεταξύ των TR-ISTAGO με τα anti-B2 IgG στο δεξί θερμικό διάγραμμα. Επιπρόσθετα παρατηρείται και σε αυτό το διάγραμμα θετική συσχέτιση μεταξύ anti-ACA IgG και anti-B2 IgG. Εντονότερη συσχέτιση παρατηρείται ανάμεσα στα anti-ACA IgM και anti-B2 IgM με έντονο μπλε χρώμα της κλίμακας 1.0.

Τέλος στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις παρατηρούνται μεταξύ anti-B2 IgG και anti-ACA IgG καθώς και μεταξύ anti-B2 IgM με anti-ACA IgM.

## Συζήτηση

Το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή που οδηγεί σε μια κατάσταση υπερπηκτικότητας η οποία σχετίζεται με την παρουσία των Αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Τα Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (αντισώματα ACL, αντι B2 GPI και το Αντιπηκτικό του Λύκου (LAC)) στρέφονται κατά των πρωτεϊνών που δεσμεύουν φωσφολιπίδια και φωσφολιπιδίων που συνδέονται με κυτταρικές μεμβράνες, με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούν συστατικά του συμπληρώματος. Τα αντισώματα αναγνωρίζονται ως αντιγόνο, ενεργοποιούν τα κύτταρα μεταξύ αυτών και τα αιμοπετάλια τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη της πήξης και να προκαλούνται θρομβωτικά επεισόδια.

Μέσα από την ανασκόπηση των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τα προηγούμενα χρόνια αναφέρεται πώς αντιγονικοί στόχοι των αντισωμάτων αποτελούν η προθρομβίνη, η αννεξίνη V, η πρωτεΐνη S, η πρωτεΐνη C καθώς και ο παράγοντας von Willebrand. Τα αντισώματα διαφοροποιούν την έκφραση σημαντικών γονιδίων για πληροφορίες που σχετίζονται με διάφορες καταστάσεις στα οποία εντοπίζονται και οι παράγοντες πήξεως. Με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκύτταρων προκαλείται μια προπηκτική κατάσταση. Επιπλέον από την αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με τους παράγοντες πήξεως εμποδίζεται η ινωδόλυση. Τα Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα επηρεάζουν τον καταρράκτη της πήξης αφού αναστέλλουν την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C και της αντιθρομβίνης III, αναστέλλουν την ινωδόλυση και αυξάνουν την δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα. (Arreola-Diaz et al., 2022), (Cohen et al., 2020)

Πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με τα Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι η αννεξίνη V, η B2 γλυκοπρωτεΐνη I, η προθρομβίνη, η καρδιολιπίνη και το Αντιπηκτικό του Λύκου. Σημαντικό ρόλο στον καταρράκτη της πήξης έχει η B2 γλυκοπρωτεΐνη I η οποία είναι αναστολέας πήξεως και εμποδίζει την σύνδεση των παραγόντων πήξης και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει τον καταρράκτη της πήξης (Krone et al., 2010), (Ng et al., 2018). Η αννεξίνη V μπλοκάρει την σύνδεση συμπλεγμάτων παραγόντων πήξεως και εμποδίζει την διαδικασία πήξης (Rand et al., 1997), (Rand et al., 1998). Το Αντιπηκτικό του Λύκου αποτελεί μια οικογένεια αντισωμάτων που στρέφονται κατά σύνθετων αντιγόνων που αποτελούνται από B2 γλυκοπρωτεΐνη I ή και προθρομβίνη, στρέφονται εναντίον φωσφολιπιδίων και προκαλούν αναστολή πήξης (Devreese et al., 2020).

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη παρουσίασαν θετικά Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των αντισωμάτων anti-ACA IgM και anti-B2 IgM καθώς και μεταξύ anti-ACA IgG και anti-B2 IgG. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των anti-ACA IgG και anti-B2 IgG με την TR-IL καθώς και anti-ACA IgG, anti-B2 IgG με το TR-STAGO. Θετική επίσης συσχέτιση αλλά μικρότερου βαθμού εντοπίστηκε ανάμεσα στα anti-ACA IgM και anti-B2 IgM με τα TR-IL και TR-STAGO.

Στους 82 ασθενείς εντοπίστηκε επιπλέον αυξημένος αριθμός APTT και συγκεκριμένα η μέση τιμή καθορίστηκε στο 39,8% γεγονός που υποδηλώνει διαταραχή στον καταρράκτη της πήξης. Στα παθολογικά δείγματα καταγράφηκαν αυξημένοι παράγοντες πήξης και ιδιαίτερα οι παράγοντες VIII, IX, XI και XII. Αυτό συμβαίνει In vitro λόγω της παρουσίας των Αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων τα οποία επιβραδύνουν τον σχηματισμό της θρομβίνης με αποτέλεσμα να επιμηκύνουν τον χρόνο των δοκιμασιών της πήξης. Γι' αυτόν

τον λόγο παρατηρείται αυξημένος αριθμός APTT και συνάμα των παραγόντων της πήξης. Η δράση των αντισωμάτων *in vivo* λειτουργεί με αντίθετο τρόπο προκαλώντας υπερπηκτικότητα που τελικά οδηγεί σε αγγειακές και φλεβικές θρομβώσεις. Προς το παρόν τα αίτια που προκαλούν αυτό το φαινόμενο δεν είναι επαρκή στην βιβλιογραφία. Παρ' όλα αυτά γνωρίζουμε πως ένας ακόμη τρόπος που επεμβαίνουν τα Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στον καταρράκτη της πήξης είναι προκαλώντας αναστολή της πρωτεΐνης C και της αντιθρομβίνης III, αναστέλλοντας την ινωδόλυση και προκαλώντας αύξηση του ιστικού παράγοντα. Τέλος τα αντισώματα στρέφονται εναντίον της B2 γλυκοπρωτεΐνης I η οποία δρά ως φυσικός αναστολέας της πήξης.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση του APTT με το PTT-LA. Η παρουσία του LA προκαλεί παράταση του APTT, τα αντιδραστήρια του APTT δεν είναι ευαισθητοποιημένα στο LA γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται συνδυαστικά με την εξέταση PTT-LA όπου σε αυτήν παρατηρείται μεγαλύτερη παράταση. Το PTT-LA αποτελεί ένα ειδικό σχεδιασμένο αντιδραστήριο το οποίο ενισχύει την παράταση του χρόνου πήξης όταν υπάρχει παρουσία LA. Στους ασθενείς που μελετήθηκαν οι δύο τιμές των εξετάσεων παρουσιάζουν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους. Το APTT ανέρχεται στο 39,8 ενώ το PTT-LA στο 53,2.

Επιπρόσθετα η εκτέλεση των δύο παρακάτω μεθόδων TR-IL και TR-STAGO πραγματοποιείται για την απλοποιημένη ανίχνευση του LA. Η διαφορά των δύο μεθόδων είναι ότι το αντιδραστήριο TR-STAGO περιέχει υψηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων. Η παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων εξουδετερώνει τα αντισώματα του LA με αποτέλεσμα να μειώνεται και ο χρόνος πήξης. Αντίθετα το TR-IL προκαλεί παράταση του χρόνου πήξης. Επιπλέον το TR-IL αποτελεί πιο ειδική εξέταση σε σχέση με το APTT διότι δεν επηρεάζεται από τον παράγοντα επαφής ή την ανεπάρκεια του, ούτε και από τα αντισώματα του παράγοντα VIII. Στον πληθυσμό της έρευνας παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση του TR-IL και του TR-STAGO όπου η μέση τιμή του πρώτου ανέρχεται στο 1,3 ενώ η μέση τιμή του δεύτερου ανέρχεται στο 1,4. Αυτό φανερώνει την παρουσία του LA στους ασθενείς.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση με την μέθοδο ELISA των αντισωμάτων της καρδιολιπίνης IgG/IgM καθώς και των anti-B2 IgG/IgM. Η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης των αντισωμάτων της καρδιολιπίνης ανέρχεται για τα anti-ACA IgM στο 13,5 ενώ για τα anti-ACA IgG στο 7,8. Η μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης των anti-B2 IgM ανέρχεται στο 14,9 ενώ για τα anti-B2 IgG στο 8,3. Τα αντισώματα παρουσίασαν σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ τους αλλά και με το TR-IL και το TR-STAGO όπως αναλύθηκε παραπάνω.

Ολοκληρώνοντας από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε παρατηρείται πως οι ασθενείς εμφανίζουν θετικά Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα σε συνδυασμό με την κλινική τους εικόνα. Η παρουσία των αντισωμάτων επηρεάζει τον καταρράκτη της πήξης αυξάνοντας τους παράγοντες πήξης και συνάμα το APTT το οποίο σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα εμφανίζεται παρατεταμένο.

Τα θρομβωτικά επεισόδια αποτελούν ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου και προκαλούν διάφορες επιπλοκές σε όργανα και συστήματα. Η έγκυρη διάγνωση του συνδρόμου και η αντιμετώπιση της με διάφορες αντιπηκτικές αγωγές είναι σωτήρια. Με-

λοντικές έρευνες θα δώσουν απαντήσεις σε διάφορα ζητήματα του συνδρόμου που απασχολούν ακόμα την επιστημονική κοινότητα σχετικά με την γρήγορη διάγνωση του συνδρόμου την περαιτέρω ανάλυση και κατανόηση του καταρράκτη της πήξης σε σχέση με το σύνδρομο ώστε να υπάρξει καλύτερη αντιπηκτική αγωγή.

## Συμπέρασμα

Τα Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ανταγωνίζονται τους παράγοντες πήξης για τις θέσεις που διαθέτουν ώστε να προσδεθούν με τα φωσφολιπίδια και κατά αυτόν τον τρόπο παρατείνουν τους χρόνους πήξης. Αντί να προκαλέσουν αιμορραγία ύστερα από την παράταση του χρόνου πήξεως, προκαλούν θρόμβωση διότι αυξάνουν την παραγωγή θρομβίνης in vivo συγκεντρώνοντας την προθρομβίνη σε επιφάνειες φωσφολιπιδίων. Στην παραπάνω έρευνα εντοπίστηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις:

- Σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ APTT και PTT-LA των ασθενών (Spearman  $r=0.488$   $p=0.001$ ).
- Σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ TR-IL και TR-STAGO των ασθενών (Spearman  $r=0.8246$   $p<0.0001$ ).
- Σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του TR-IL και των anti-ACA IgG (Spearman  $r=0.375$ ,  $p=0.002$ ).
- Σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ TR-STAGO και των anti-ACA IgG (Spearman  $r=0.378$ ,  $p=0.002$ ), καθώς και μεταξύ του TR-STAGO και την anti-ACA IgM (Spearman  $r=0.275$ ,  $p=0.030$ ). Επιπλέον μεγάλη συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ TR-ISTAGO και των anti-B2 IgG (Spearman  $r=0.405$ ,  $p=0.001$ ).
- Τέλος σημαντική θετική στατιστική συσχέτιση εντοπίστηκε μεταξύ των anti-B2 IgG και anti-ACA IgG (Spearman  $r=0.432$ ,  $p<0.001$ ) καθώς και ανάμεσα των anti-B2 IgM και anti-ACA IgM (Spearman  $r=0.880$   $p<0.001$ ).

Οι δύο μέθοδοι ανίχνευσης του Αντιπηκτικού του Λύκου TR-IL και TR-STAGO παρουσίασαν την μεγαλύτερη στατιστική συσχέτιση. Επιπλέον στα παθολογικά δείγματα εντοπίστηκε παρατεταμένο APTT (39,8).

Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας παρ' όλο που είχε αρκετές θετικές στατιστικές συσχετίσεις μπορεί να μην είναι αντικειμενική διότι ο πληθυσμός στον οποίο πραγματοποιήθηκε δεν εκπροσωπεί μεγάλο αριθμό δειγμάτων παρά μόνο 82 παθολογικών περιστατικών το διάστημα 2019-2022 του Γ.Ν.Α Ιπποκράτειου.

## Βιβλιογραφία

- Alhenc-Gelas, M., Gandrille, S., Aubry, M. L., & Aiach, M. (2000). Thirty-three novel mutations in the protein C gene. French INSERM network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. *Thromb Haemost*, *83*(1), 86-92.
- Antonarakis, S. E. (1995). Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. *Thromb Haemost*, *74*(1), 322-328.
- Arreola-Diaz, R., Majluf-Cruz, A., Sanchez-Torres, L. E., & Hernandez-Juarez, J. (2022). The Pathophysiology of The Antiphospholipid Syndrome: A Perspective From The Blood Coagulation System. *Clin Appl Thromb Hemost*, *28*, 10760296221088576. doi:10.1177/10760296221088576
- Asherson, R. A. (1992). The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*, *19*(4), 508-512.
- Baglin, T., Gray, E., Greaves, M., Hunt, B. J., Keeling, D., Machin, S., . . . British Committee for Standards in, H. (2010). Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol*, *149*(2), 209-220. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08022.x
- Belyaev, A. V., & Kushchenko, Y. K. (2023). Biomechanical activation of blood platelets via adhesion to von Willebrand factor studied with mesoscopic simulations. *Biomech Model Mechanobiol*, *22*(3), 785-808. doi:10.1007/s10237-022-01681-3
- Bertina, R. M., Koeleman, B. P., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., de Ronde, H., . . . Reitsma, P. H. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, *369*(6475), 64-67. doi:10.1038/369064a0
- Bhattarai, A., Shah, S., Bagherieh, S., Mirmosayyeb, O., Thapa, S., Paudel, S., . . . Khanal, P. (2022). Endothelium, Platelets, and Coagulation Factors as the Three Vital Components for Diagnosing Bleeding Disorders: A Simplified Perspective with Clinical Relevance. *Int J Clin Pract*, *2022*, 5369001. doi:10.1155/2022/5369001
- Bucalossi, A., Marotta, G., Bigazzi, C., Galieni, P., & Dispensa, E. (1996). Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. *Am J Hematol*, *52*(1), 14-20. doi:10.1002/(SICI)1096-8652(199605)52:1<14::AID-AJH3>3.0.CO;2-9
- Castoldi, E., & Hackeng, T. M. (2008). Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol*, *15*(5), 529-536. doi:10.1097/MOH.0b013e328309ec97
- Chapliuk, M. I., & Gritsman, I. (1985). [Assessment of the questionnaire method in the establishing of groups at a high cancer risk]. *Sov Med*(10), 50-53.
- Chen, X., Gupta, S., Cooper, M., DeHelian, D., Zhao, X., Naik, M. U., . . . Ma, P. (2020). GRK6 regulates the hemostatic response to injury through its rate-limiting effects on GPCR signaling in platelets. *Blood Adv*, *4*(1), 76-86. doi:10.1182/bloodadvances.2019000467
- Cohen, H., Cuadrado, M. J., Erkan, D., Duarte-Garcia, A., Isenberg, D. A., Knight, J. S., . . . Andrade, D. (2020). 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends. *Lupus*, *29*(12), 1571-1593. doi:10.1177/0961203320950461

- Cohen, H., Mackie, I. J., Anagnostopoulos, N., Savage, G. F., & Machin, S. J. (1989). Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, and human immunodeficiency virus in haemophilia. *J Clin Pathol*, *42*(6), 629-633. doi:10.1136/jcp.42.6.629
- Colberg, L., Cammann, C., Greinacher, A., & Seifert, U. (2020). Structure and function of the ubiquitin-proteasome system in platelets. *J Thromb Haemost*, *18*(4), 771-780. doi:10.1111/jth.14730
- Corban, M. T., Duarte-Garcia, A., McBane, R. D., Matteson, E. L., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2017). Antiphospholipid Syndrome: Role of Vascular Endothelial Cells and Implications for Risk Stratification and Targeted Therapeutics. *J Am Coll Cardiol*, *69*(18), 2317-2330. doi:10.1016/j.jacc.2017.02.058
- Crowther, M. A., & Kelton, J. G. (2003). Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med*, *138*(2), 128-134. doi:10.7326/0003-4819-138-2-200301210-00014
- Dahlback, B. (2018). Vitamin K-Dependent Protein S: Beyond the Protein C Pathway. *Semin Thromb Hemost*, *44*(2), 176-184. doi:10.1055/s-0037-1604092
- Dahlback, B., & Hildebrand, B. (1994). Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(4), 1396-1400. doi:10.1073/pnas.91.4.1396
- Davenport, W. B., & Kutteh, W. H. (2014). Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a review of screening patterns and recommendations. *Obstet Gynecol Clin North Am*, *41*(1), 133-144. doi:10.1016/j.ogc.2013.10.005
- Degen, S. J., & Davie, E. W. (1987). Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*, *26*(19), 6165-6177. doi:10.1021/bi00393a033
- Devreese, K. M. J., de Groot, P. G., de Laat, B., Erkan, D., Favaloro, E. J., Mackie, I., . . . Cohen, H. (2020). Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost*, *18*(11), 2828-2839. doi:10.1111/jth.15047
- Di Scipio, R. G., Kurachi, K., & Davie, E. W. (1978). Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest*, *61*(6), 1528-1538. doi:10.1172/JCI109073
- Ehrenforth, S., Ludwig, G., Klinke, S., Krause, M., Scharrer, I., & Nowak-Gottl, U. (1998). The prothrombin 20210 A allele is frequently coinherited in young carriers of the factor V Arg 506 to Gln mutation with venous thrombophilia. *Blood*, *91*(6), 2209-2210.
- Emmerich, J., Rosendaal, F. R., Cattaneo, M., Margaglione, M., De Stefano, V., Cumming, T., . . . Reny, J. L. (2001). Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost*, *86*(3), 809-816.
- Esmon, C. T. (2003). The protein C pathway. *Chest*, *124*(3 Suppl), 26S-32S. doi:10.1378/chest.124.3\_suppl.26s
- Galli, M., Borrelli, G., Jacobsen, E. M., Marfisi, R. M., Finazzi, G., Marchioli, R., . . . Barbui, T. (2007). Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood*, *110*(4), 1178-1183. doi:10.1182/blood-2007-01-066043



- Geddings, J. E., & Mackman, N. (2014). New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*, *111*(4), 570-574. doi:10.1160/TH13-10-0812
- Gonzalo-Gil, E., Garcia-Herrero, C., Toldos, O., Usategui, A., Criado, G., Perez-Yague, S., . . . Galindo, M. (2018). Microthrombotic Renal Vascular Lesions Are Associated to Increased Renal Inflammatory Infiltration in Murine Lupus Nephritis. *Front Immunol*, *9*, 1948. doi:10.3389/fimmu.2018.01948
- Harris, E. N., Chan, J. K., Asherson, R. A., Aber, V. R., Gharavi, A. E., & Hughes, G. R. (1986). Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med*, *146*(11), 2153-2156.
- Huang, J. N., & Koerper, M. A. (2008). Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia*, *14*(6), 1164-1169. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01785.x
- Keswani, S. C., & Chauhan, N. (2002). Antiphospholipid syndrome. *J R Soc Med*, *95*(7), 336-342. doi:10.1177/014107680209500705
- Key, N. S., & Mackman, N. (2010). Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. *Semin Thromb Hemost*, *36*(8), 865-875. doi:10.1055/s-0030-1267040
- Khamashta, M., Taraborelli, M., Sciascia, S., & Tincani, A. (2016). Antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, *30*(1), 133-148. doi:10.1016/j.berh.2016.04.002
- Koster, T., Rosendaal, F. R., Briet, E., van der Meer, F. J., Colly, L. P., Trienekens, P. H., . . . Vandenbroucke, J. P. (1995). Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood*, *85*(10), 2756-2761.
- Krone, K. A., Allen, K. L., & McCrae, K. R. (2010). Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*, *12*(1), 53-57. doi:10.1007/s11926-009-0075-4
- Lijnen, H. R. (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci*, *936*, 226-236. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03511.x
- Lutters, B. C., Derksen, R. H., Tekelenburg, W. L., Lenting, P. J., Arnout, J., & de Groot, P. G. (2003). Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem*, *278*(36), 33831-33838. doi:10.1074/jbc.M212655200
- Mackman, N., Tilley, R. E., & Key, N. S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *27*(8), 1687-1693. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141911
- Mahasandana, C., Veerakul, G., Tanphaichitr, V. S., Suvatte, V., Opartkiattikul, N., & Hathaway, W. E. (1996). Homozygous protein S deficiency: 7-year follow-up. *Thromb Haemost*, *76*(6), 1122.
- Martinelli, I., Mannucci, P. M., De Stefano, V., Taioli, E., Rossi, V., Crosti, F., . . . Faioni, E. M. (1998). Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*, *92*(7), 2353-2358.
- Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., & Koike, T. (1990). Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, *336*(8708), 177-178. doi:10.1016/0140-6736(90)91697-9
- Melki, I., Tessandier, N., Zufferey, A., & Boilard, E. (2017). Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets*, *28*(3), 214-221. doi:10.1080/09537104.2016.1265924

- Meroni, P. L., Chighizola, C. B., Rovelli, F., & Gerosa, M. (2014). Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res Ther*, *16*(2), 209. doi:10.1186/ar4549
- Mezger, M., Nording, H., Sauter, R., Graf, T., Heim, C., von Bubnoff, N., . . . Langer, H. F. (2019). Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol*, *10*, 1731. doi:10.3389/fimmu.2019.01731
- Middeldorp, S., & van Hylckama Vlieg, A. (2008). Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br J Haematol*, *143*(3), 321-335. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07339.x
- Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., . . . Krilis, S. A. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*, *4*(2), 295-306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
- Moore, J. E., & Mohr, C. F. (1952). Biologically false positive serologic tests for syphilis; type, incidence, and cause. *J Am Med Assoc*, *150*(5), 467-473. doi:10.1001/jama.1952.03680050033010
- Mosnier, L. O., Zlokovic, B. V., & Griffin, J. H. (2007). The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, *109*(8), 3161-3172. doi:10.1182/blood-2006-09-003004
- Ng, C. J., McCrae, K. R., Ashworth, K., Sosa, L. J., Betapudi, V., Manco-Johnson, M. J., . . . Di Paola, J. (2018). Effects of anti-beta2GPI antibodies on VWF release from human umbilical vein endothelial cells and ADAMTS13 activity. *Res Pract Thromb Haemost*, *2*(2), 380-389. doi:10.1002/rth2.12090
- Nourelidine, M. H. A., Nour-Eldine, W., Khamashta, M. A., & Uthman, I. (2019). Insights into the diagnosis and pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum*, *48*(5), 860-866. doi:10.1016/j.semarthrit.2018.08.004
- Perla-Kajan, J., Twardowski, T., & Jakubowski, H. (2007). Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*, *32*(4), 561-572. doi:10.1007/s00726-006-0432-9
- Portier, I., & Campbell, R. A. (2021). Role of Platelets in Detection and Regulation of Infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *41*(1), 70-78. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314645
- Rand, J. H., Wu, X. X., Andree, H. A., Lockwood, C. J., Guller, S., Scher, J., & Harpel, P. C. (1997). Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome--a possible thrombogenic mechanism. *N Engl J Med*, *337*(3), 154-160. doi:10.1056/NEJM199707173370303
- Rand, J. H., Wu, X. X., Andree, H. A., Ross, J. B., Rusinova, E., Gascon-Lema, M. G., . . . Harpel, P. C. (1998). Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a "lupus procoagulant" phenomenon. *Blood*, *92*(5), 1652-1660.
- Rand, J. H., Wu, X. X., Quinn, A. S., & Taatjes, D. J. (2010). The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus*, *19*(4), 460-469. doi:10.1177/0961203310361485
- Rijken, D. C., & Lijnen, H. R. (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*, *7*(1), 4-13. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x
- Rosendaal, F. R. (1999). Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, *353*(9159), 1167-1173. doi:10.1016/s0140-6736(98)10266-0

- Rozen, R. (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*, 78(1), 523-526.
- Selhub, J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 19, 217-246. doi:10.1146/annurev.nutr.19.1.217
- Selhub, J., Jacques, P. F., Wilson, P. W., Rush, D., & Rosenberg, I. H. (1993). Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*, 270(22), 2693-2698. doi:10.1001/jama.1993.03510220049033
- Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, 11(4), 264-274. doi:10.1038/nri2956
- Speth, C., Rambach, G., Wurzner, R., Lass-Flörl, C., Kozarcanin, H., Hamad, O. A., . . . Ekdahl, K. N. (2015). Complement and platelets: Mutual interference in the immune network. *Mol Immunol*, 67(1), 108-118. doi:10.1016/j.molimm.2015.03.244
- Stavrou, E., & Schmaier, A. H. (2010). Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res*, 125(3), 210-215. doi:10.1016/j.thromres.2009.11.028
- Tait, R. C., Walker, I. D., Reitsma, P. H., Islam, S. I., McCall, F., Poort, S. R., . . . Bertina, R. M. (1995). Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost*, 73(1), 87-93.
- Thaler, E., & Lechner, K. (1981). Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Haematol*, 10(2), 369-390.
- Thorelli, E., Kaufman, R. J., & Dahlback, B. (1999). Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood*, 93(8), 2552-2558.
- van Hinsbergh, V. W. (2001). The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 95(2), 198-201. doi:10.1016/s0301-2115(00)00490-5
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., & Rozen, R. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 64(3), 169-172. doi:10.1006/mgme.1998.2714
- Zhao, X., Cooper, M., Michael, J. V., Yarman, Y., Baltz, A., Chuprun, J. K., . . . Ma, P. (2022). GRK2 regulates ADP signaling in platelets via P2Y1 and P2Y12. *Blood Adv*, 6(15), 4524-4536. doi:10.1182/bloodadvances.2022007007
- Zoller, B., Svensson, P. J., He, X., & Dahlback, B. (1994). Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest*, 94(6), 2521-2524. doi:10.1172/JCI117623