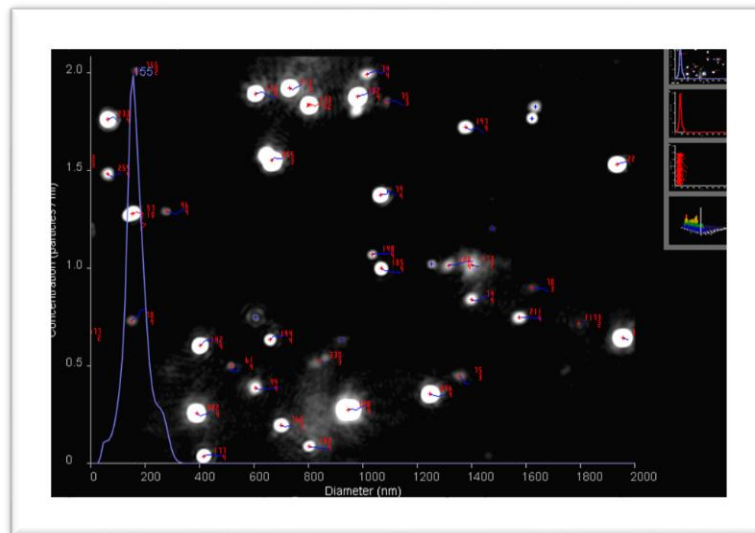




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΤΑ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ ΩΣ ΝΕΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ : ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΑΡΑΜΑΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΑΥΛΟΥ

EMAIL: [bisc19678103@uniwa.gr](mailto:bisc19678103@uniwa.gr)

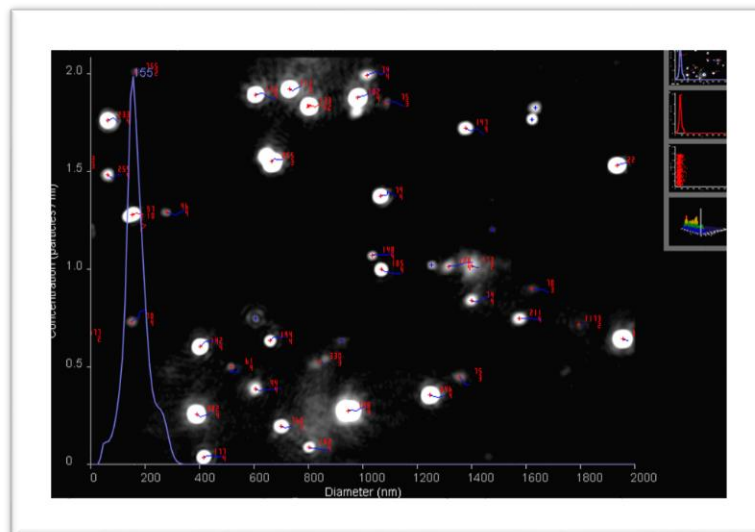
ΑΘΗΝΑ 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DIVISION MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

# MICROPARTICLES AS A NEW BIOMARKER FOR PATIENTS WITH THROMBOPHILIA



NAME AND SURNAME: CHRISTINA KARAMANI

SUPERVISOR: EFTHYMIA PAVLOU

EMAIL: [bisc19678103@uniwa.gr](mailto:bisc19678103@uniwa.gr)

ATHENS 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Τα Μικροκυστίδια ως νέος βιοδείκτης στους ασθενείς με Θρομβοφιλία

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Αναστάσιος Κριεμπάρδης	Καθηγητής	
Ευθυμία Παύλου	Ακαδημαϊκή Υπότροφος	
Βασίλειος Μπίρτσας	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΚΑΡΑΜΑΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ του ΙΩΑΝΝΗ, με αριθμό μητρώου 19678103 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

ΚΑΡΑΜΑΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	11
I. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ.....	11
1. Ορισμός.....	11
2. Διαδικασίες Αιμόστασης .....	11
3. Παράγοντες Πήξης.....	13
4. Θεωρία του Καταρράκτη .....	15
a. Ενδογενής Οδός.....	16
b. Εξωγενής Οδός.....	16
c. Κοινή Οδός.....	17
5. Αναστολείς Πήξης .....	17
6. Ινωδόλυση .....	17
II. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ.....	18
1. Εισαγωγή.....	18
2. Θρομβοφιλία .....	20
a. Συγγενής Θρομβοφιλία .....	21
b. Επίκτητη Θρομβοφιλία .....	22
3. Διάγνωση Θρομβοφιλίας.....	23
III. ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ.....	25
1. Ορισμός.....	25
2. Δημιουργία Μικροκυστιδίων .....	26
3. Λειτουργίες Μικροκυστιδίων .....	27
4. Μικροκυστιδία σε Διαταραχές της Αιμόστασης .....	27
5. Μέθοδοι Μέτρησης Μικροκυστιδίων .....	29
a. Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry).....	29

b. Ανάλυση Κατανομής Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) .....	30
IV. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ .....	32
1. Εισαγωγή.....	32
2. Βιοδείκτες Διάγνωσης Θρομβοφιλίας.....	33
3. Μικροκυστίδια ως Βιοδείκτες .....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	35
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	35
II. ΔΕΙΓΜΑΤΑ .....	35
1. Εισαγωγή.....	35
2. Προετοιμασία Δειγμάτων .....	35
III. ΑΝΑΛΥΤΗΣ NANOSIGHT NS300 .....	37
1. Εισαγωγή.....	37
2. Διαδικασία Ανάλυσης.....	37
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	41
V. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	44
VI. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	45
VII. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ .....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ .....	47

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Κυρία Ευθυμία Παύλου, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την υποστήριξη και τα χρήσιμα σχόλια καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Η τεχνογνωσία και η καθοδήγησή της ήταν καθοριστικός παράγοντας στη διαμόρφωση της κατεύθυνσης και των αποτελεσμάτων της μελέτης.

Είμαι εξαιρετικά ευγνώμων προς όλους τους καθηγητές του Ερευνητικού Εργαστηρίου Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR) για την ενθάρρυνση και την επιστημονική συμβολή τους, που εμπλούτισαν την ακαδημαϊκή μου εμπειρία και συνέβαλαν στην ανάπτυξη αυτής της έρευνας.

Ειλικρινή εκτίμηση απευθύνω στην αγαπημένη μου οικογένεια για την αγάπη, την ενθάρρυνση και την κατανόηση τους. Η μεγάλη τους υποστήριξη και η πίστη τους στις ικανότητές μου αποτέλεσαν θεμέλιο των ακαδημαϊκών μου επιτευγμάτων.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην συνάδελφό μου Βίκυ για το πνεύμα συνεργασίας, την στήριξη και τη βοήθειά της στην εκμάθηση του αναλυτή διότι ήταν πολύτιμη για την διεξαγωγή αυτής της έρευνας.

Τέλος, είμαι ευγνώμων για όλα εκείνα τα άτομα, τόσο εντός όσο και εκτός πανεπιστημίου, που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Οι συμβουλές τους και η βοήθειά τους ήταν καθοριστικής σημασίας για τη διαμόρφωση αυτού του αποτελέσματος.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι διαταραχές στην αιμόσταση, ιδίως η Θρομβοφιλία, περιλαμβάνουν μία ευρεία γκάμα παθολογικών καταστάσεων κατά τη διάρκεια των διαδικασιών της πήξης και ινωδόλυσης, θέτοντας σημαντικές προκλήσεις στην κλινική διάγνωση και αντιμετώπιση. Η εύρεση και ο προσδιορισμός αξιόπιστων βιοδεικτών είναι ζωτικής σημασίας για την ακριβή αξιολόγηση, παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και την εξατομίκευση και εύρεση θεραπευτικής αγωγής. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για ένα νέο, υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο όπου θα βοηθήσει στη μη επεμβατική διάγνωση της Θρομβοφιλίας, τα μικροκυστίδια. Τα μικροκυστίδια αποτελούν μικρές κύστες που απελευθερώνονται από τη μεμβράνη των κυττάρων στην κυκλοφορία κατά την ενεργοποίηση ή την απόπτωση. Προέρχονται από διάφορους τύπους κυττάρων, όπως τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά και τα λευκοκύτταρα. Μεταφέρουν φορτίο από πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια τα οποία αντικατοπτρίζουν και την προέλευση τους, το είδος κυττάρου από όπου και απελευθερώνονται. Τα βιομόρια αυτά μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τις υποκείμενες παθοφυσιολογικές διαδικασίες που συνδέονται με τη Θρομβοφιλία. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση των δυνατοτήτων των μικροκυστιδίων ως βιοδείκτες για τη θρομβοφιλία, εξετάζοντας τη συσχέτισή τους με τα κλινικά αποτελέσματα και το ρόλο τους στις συναφείς επιπλοκές στο πλαίσιο των θρομβωτικών διαταραχών.

Λέξεις κλειδιά: Θρομβοφιλία, Αιμόσταση, Διαταραχές Αιμόστασης, Βιοδείκτες, Μικροκυστίδια

## ABSTRACT

Hemostasis disorders, in particular Thrombophilia, encompass a wide range of pathological conditions that occur during the processes of clotting and fibrinolysis, posing significant challenges in clinical diagnosis and management. Finding and identifying reliable biomarkers is vital for accurate assessment, disease monitoring, and personalized therapeutic approaches. In recent years, research has been conducted on a novel and promising diagnostic tool for non-invasive Thrombophilia diagnosis: microparticles. Microparticles are small cysts released from cell membranes into circulation upon cell activation or shedding. They originate from various cell types, including platelets, endothelial cells, and leukocytes. Microparticles carry a cargo of proteins, nucleic acids, and lipids that reflect their parent cell origin and activation state. These biomolecules can provide valuable information about the underlying pathophysiological processes associated with Thrombophilia. This thesis aims to investigate the potential of microparticles as biomarkers for Thrombophilia, examining their correlation with clinical outcomes and their role in associated complications in the context of Thrombotic disorders.

Key Words: Thrombophilia, Haemostasis, Haemostatic Disorders, Biomarkers, Microparticles

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

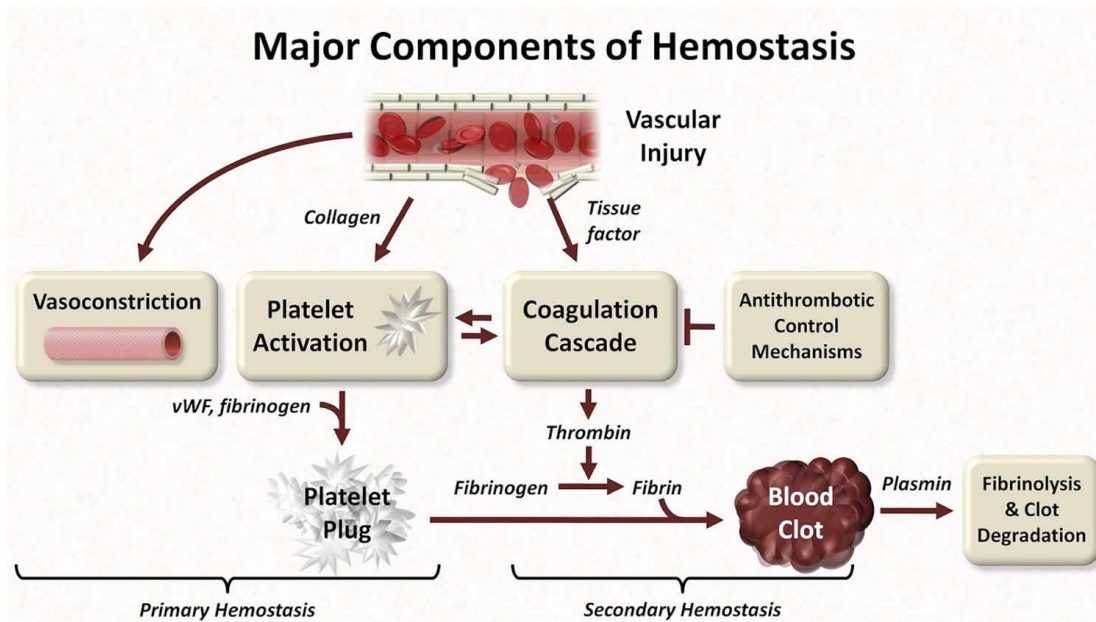
## I. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

### 1. Ορισμός

Αιμόσταση είναι ένα σύνολο βιοχημικών αντιδράσεων με στόχο το σχηματισμό θρόμβου σε ένα κατεστραμμένο αγγείο ώστε να εμποδίσει την έξοδο του αίματος . Το αίμα αποτελεί ζωτικής σημασίας στοιχείο και ρέει στα αιμοφόρα αγγεία έχοντας υδαρή φύση. Ο ρόλος του είναι η μεταφορά θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου σε όλους τους ιστούς και τα όργανα. Μέσω των διεργασιών της αιμόστασης διασφαλίζεται η ακεραιότητα των αιμοφόρων αγγείων και ελέγχεται η ροή του αίματος όπου στην περίπτωση τραυματισμού δημιουργείται αιμοπεταλιακός θρόμβος ώστε να σταματήσει η διαρροή. Στην περίπτωση αυτή, η επαφή του αίματος με τον ενδοθηλιακό χώρο ενεργοποιεί το σύστημα αιμόστασης όπου αποτελείται από συγκεκριμένες ενέργειες που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια όπου και συσσωρεύονται στο σημείο που υπάρχει το τραύμα, στο υπενδοθήλιο, και δημιουργούν ένα έμβολο αιμοπεταλίων για προσωρινή φραγή. Για την λειτουργία αυτού του συστήματος είναι απαραίτητη η συμμετοχή πολλών παραγόντων όπως το ίδιο το ενδοθήλιο των αγγείων, τα αιμοπετάλια, οι φυσικοί αναστολείς της πήξης, οι παράγοντες πήξης και το ινωδολυτικό σύστημα. (1,2)

### 2. Διαδικασίες Αιμόστασης

Ο μηχανισμός της αιμόστασης περιλαμβάνει σύνθετες και πολύπλοκες διεργασίες και μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αγγειοσύσπαση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ώστε να σχηματιστεί προσωρινός θρόμβος που προσκολλάται στο σημείο τραύματος. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πλασματικών παραγόντων της πήξης “καταρράκτης της πήξης” και την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες, όπου ενισχύει και σταθεροποιεί τον θρόμβο σταματώντας την αιμορραγία. Το τελευταίο μέρος αποτελεί την ινωδόλυση, όπου ο θρόμβος καταστρέφεται και αποκαθίσταται το τραυματισμένο αγγείο. (3)



**Εικόνα 1 : Βασικές Λειτουργίες Αιμόστασης.** Στην εικόνα παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση των βασικών διαδικασιών της αιμόστασης, συμπεριλαμβανομένης της αγγειοσύσπασης, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καταρράκτη πήξης, το σχηματισμό του θρόμβου και την ινωδόλυση. Οι διαδικασίες αυτές είναι απαραίτητες για την διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας και επούλωσης των τραυμάτων.

Το πρώτο βήμα της αιμόστασης είναι η αγγειοσύσπαση, η οποία επιτυγχάνεται απευθείας από το τραυματισμένο αγγείο ώστε να σταματήσει η ανεξέλεγκτη ροή του αίματος προς τα έξω. Αποτελεί τη βασική λειτουργία του αγγειακού τοιχώματος, όπου και απαντάται σε δευτερόλεπτα ως αντανακλαστικό και σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να αποτελεί και ικανοποιητικό μηχανισμό από μόνη της. Η διαδικασία σύσπασης των αγγείων προκαλείται από συγκεκριμένες ουσίες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ενδοθηλίου ή μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας. Αγγειοσυσπαστικές ουσίες που εκκρίνονται από το ενδοθήλιο είναι η ενδοθηλίνη-1, ο παράγοντας PAF (platelet activated factor), σεροτονίνη και το ινωδοπεπτίδιο B. Έμμεση δράση έχει και ο παράγοντας XII. Εκτός από τις ουσίες που βοηθούν στην σύσπαση, εκφράζονται και εκείνες που βοηθούν τη διαστολή των αγγείων. Αγγειοδιασταλτικές ουσίες αποτελούν η προστακυκλίνη και το νιτρικό οξύ, όπου και εμποδίζουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. (2)(3)

Παράλληλα με την αγγειοσύσπαση, γίνεται και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Καθώς το αίμα κυλάει μέσα στα αγγεία, τα έμμορφα συστατικά του έρχονται σε επαφή με τις διάφορες ουσίες που εκτίθενται λόγω του τραυματισμένου τοιχώματος, έχοντας ως αποτέλεσμα την προσκόλλησή τους στο τοίχωμα και την προσωρινή απόφραξη, δημιουργώντας ένα έμβολο που αποτελείται από αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια δεν μπορούν να συνδεθούν στο ενδοθήλιο εξαιτίας του αρνητικού φορτίου που φέρουν. Ουσίες όπως είναι το κολλαγόνο, η λαμίνη, η ελαστίνη, ο Von Willebrand Factor (vWF) και άλλες προπηπτικές ουσίες που προέρχονται από το ενδοθήλιο συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή δημιουργώντας μια "γέφυρα" για τη σύνδεση.(4) Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν κυτταροκίνες, όπου ενισχύουν την τοπική αγγειοσύσπαση και ενεργοποιούν και άλλα αιμοπετάλια της κυκλοφορίας με στόχο τη

συσσώρευση και τη δημιουργία λευκού θρόμβου (ασταθής πρωτογενής θρόμβου). Εκκρίνουν, επίσης, ουσίες όπου λειτουργούν σαν “σήματα” που προωθούν την συσσώρευση πολλών αιμοπεταλίων. Μία βασική τέτοια ουσία αποτελεί η Διφωσφορική Αδενοσίνη (ADP), η οποία δεσμεύει συγκεκριμένους υποδοχείς στα γειτονικά αιμοπετάλια ώστε να ενωθούν μεταξύ τους. Άλλες ουσίες που επιτελούν τον ίδιο στόχο αποτελούν η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>), η σεροτονίνη, τα ιόντα ασβεστίου και άλλοι παράγοντες ανάπτυξης. (5) Το ασβέστιο αποτελεί την βάση για τη σύνδεση με άλλους παράγοντες πήξης. (6)

Τα αιμοπετάλια για να “κολλήσουν” στο σημείο της βλάβης αλλάζουν το αρνητικό φορτίο και το σχηματισμό τους, ενώ παράλληλα προεκβάλλουν ψευδοπόδια ώστε να κολλήσουν πάνω στην τραυματισμένη επιφάνεια. Στην επιφάνεια τους, φέρουν υποδοχείς όπως η γλυκοπρωτεΐνη Ib (GPIb) η οποία αλληλοεπιδρά με τον vWF παράγοντα της επιφάνειας του τοιχώματος. Τα αιμοπετάλια ενώνονται μεταξύ τους μέσω των GPIIb/IIIa υποδοχέων και ακολουθεί η συγκόλλησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται από την αλλαγή σχήματος από σφαιρικό σε δικτυωτό.(7)

Αφού επιτευχθεί η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός ενός δικτύου γύρω από την αιχμή, ακολουθεί ο καταρράκτης της πήξης. Ενεργοποιείται, συνεπώς, το σύστημα που περιλαμβάνει μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με στόχο την μετατροπή του ινωδογόνου σε ένα πλέγμα ινικής, όπου θα σταθεροποιηθεί και θα ενισχύσει το “φράγμα” αιμοπεταλίων πάνω στο τραύμα για να σταματήσει την αιμορραγία. Η μετατροπή αυτή γίνεται μέσω της δημιουργίας θρομβίνης η οποία πολυμερίζει το ινωδογόνο. Οι παράγοντες πήξης, όπως ονομάζονται, ενεργοποιούνται με αλυσιδωτή αντίδραση όπου ο ένας παράγοντας ενεργοποιεί τον άλλον και λειτουργεί ως υπόστρωμα. Η διαδικασία της πήξης χωρίζεται σε δύο μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές.(8) Η διαφορά μεταξύ της ενδογενούς και της εξωγενούς οδού είναι πως η ενδογενής ενεργοποιείται όταν υπάρχει εσωτερική βλάβη σε ένα αγγείο, δηλαδή όλοι οι παράγοντες βρίσκονται στο αίμα, ενώ αντίθετα η εξωγενής οδός, που ενεργοποιείται όταν τραυματίζεται το αγγείο, χρειάζεται επιπρόσθετα το κολλαγόνο και τον ιστικό παράγοντα για να γίνει η ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης. Και τα δύο μονοπάτια καταλήγουν σε μία κοινή οδό για τον σχηματισμό του ινώδους μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα X. (9)

### 3. Παράγοντες Πήξης

Οι παράγοντες πήξης είναι πρωτεΐνες του πλάσματος που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της πήξης του αίματος. Υπάρχουν συνολικά 13 παράγοντες ακολουθώντας την λατινική αρίθμηση, αριθμημένοι από το I έως το XIII, ενώ ορισμένοι παράγοντες έχουν επιπλέον υπότυπους.(10) Παράγονται από τα κύτταρα του ήπατος με εξαίρεση τον παράγοντα VIII που προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, και έχουν πάρει το όνομά τους από τη λατινική αρίθμηση. (11)Κυκλοφορούν ανενεργοί στο αίμα και η πλειονότητα είναι πρωτεάσες σερίνης εκτός από τους παράγοντες V και VIII που είναι γλυκοπρωτεΐνες ενώ ο παράγοντας XIII είναι τρανσγλουταμινάση. Ο παράγοντας II, ή αλλιώς προθρομβίνη, είναι

το ζυμογόνο που επιτελεί στη δημιουργία του ενζύμου θρομβίνη όταν ενεργοποιείται. Οι παράγοντες II, VII, IX και X ανήκουν στους παράγοντες που εξαρτώνται από την βιταμίνη K και αποτελούν ένα σύμπλεγμα για τη δημιουργία της θρομβίνης. Οι παράγοντες πήξης συνεργάζονται μεταξύ τους για το σχηματισμό του καταρράκτη της πήξης.

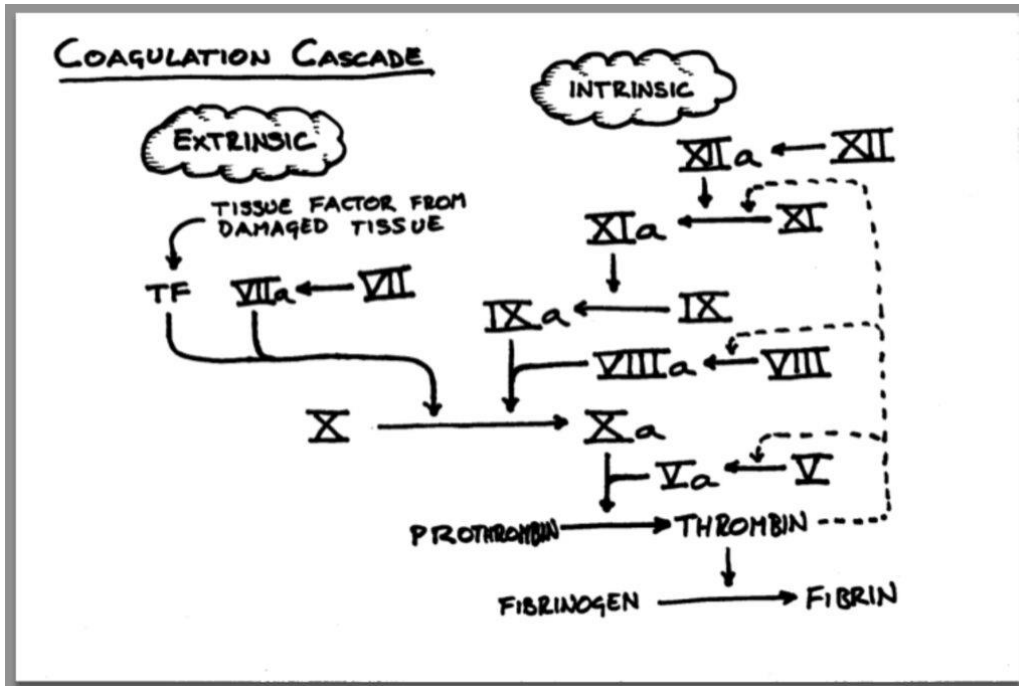
Συγκεκριμένα, ο παράγοντας I ή ινωδογόνο μετατρέπεται σε ινώδες, δημιουργώντας μία βάση για το σχηματισμό θρόμβου. Ο παράγοντας II ή προθρομβίνη ενεργοποιείται σε θρομβίνη, ένα ένζυμο που ευθύνεται για τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Ο παράγοντας III ή ιστικός παράγοντας εκκινεί τη διαδικασία πήξης, ενεργοποιώντας τον παράγοντα VII. Οι παράγοντες VIII και IX ή αντισταμοφιλικό παράγοντες A και B, είναι απαραίτητοι για την ενδογενή οδό και απουσιάζουν στην αιμοφιλία A και B. Ο παράγοντας X λειτουργεί ως σημείο σύγκλισης ανάμεσα στην ενδογενή και εξωγενή οδό, βοηθώντας στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Ο παράγοντας XIII παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του θρόμβου. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλουν στη δημιουργία θρόμβου, όπου απαιτείται, και στη διατήρηση της ισορροπίας ώστε να αποφευχθεί η πήξη όπου δεν απαιτείται μέσα στο κυκλοφορικό σύστημα. (12) Αναλυτικά αναφέρονται και οι ρόλοι των υπολοίπων παραγόντων στην παρακάτω εικόνα :

I	Fibrinogen	Clot formation
II	Prothrombin	Activation of factors I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C and platelets
III	Tissue factor	Cofactor VIIa
IV	Calcium	Role in binding of phospholipid coagulation factors
V	Proaccelerin	Cofactor of X – prothrombinase complex
VI		Activated form of V
VII	Proconvertin	Enables factors IX and X
VIII	Antihemophilic factor A	Cofactor of IX complex
IX	Antihemophilic factor B or Christmas factor	Enables factor X, forms the complex tenase with factor VII
X	Stuart–Prower factor	Forms the prothrombinase complex together with factor V which will activate factor II
XI	Antecedent of plasma thromboplastin	Activates factor IX
XII	Hageman factor	Enables factors XI, VII and prekallikrein
XIII	Fibrin stabilizing factor	Creating cross-links between fibrin monomers
XIV	Prekallikrein – Fletcher factor	Precursor of kallikrein
XV	HMWK – Fitzgerald factor	Cofactor
XVI	von Willebrand factor	Role in platelet adhesion; it is linked to factor VIII
XVII	Antithrombin III	Inhibits IIa, Xa and other proteases
XVIII	Heparin cofactor II	Inhibits IIa
XIX	Protein C	Inactivates factors Va and VII
XX	Protein S	Cofactor for activated C protease

**Εικόνα 2: Παράγοντες Πήξης.** Η εικόνα παρουσιάζει τους Παράγοντες Πήξης καθένας από τους οποίους παίζει κρίσιμο ρόλο στην διαδικασία της πήξης. Απεικονίζονται οι λειτουργίες τους, αναδεικνύοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ τους για την διασφάλιση του σχηματισμού του θρόμβου, μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για την αιμόσταση.

#### 4. Θεωρία του Καταρράκτη

Ο καταρράκτης της πήξης είναι μια σειρά από αντιδράσεις που συμβαίνουν στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Είναι μία ζωτικής σημασίας διαδικασία που βοηθά να αποτραπεί η υπερβολική αιμορραγία όταν ένα αγγείο υποστεί ζημιά. Ο καταρράκτης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση και αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων πήξης, ένζυμα και ρυθμιστικών πρωτεϊνών με μία ρυθμιζόμενη ακολουθία. Υπάρχουν δύο κύριες διαδρομές που συμμετέχουν στον καταρράκτη της πήξης, η Ενδογενής (Intrinsic) και Εξωγενής (Extrinsic) οδός. (13)



Εικόνα 3 : Καταρράκτης Πήξης. Ο καταρράκτης πήξης αποτελεί ένα δίκτυο διαδοχικών αντιδράσεων για τη διασφάλιση της πήξης του αίματος. Αυτή η απεικόνιση παρουσιάζει βήμα προς βήμα την αλληλεπίδραση των παραγόντων πήξης με στόχο τη διατήρηση της αιμόστασης.

a. Ενδογενής Οδός

Η διαδρομή αυτή περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X. Ο παράγοντας XII ενεργοποιείται όταν έρχεται σε επαφή με την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. (14)

b. Εξωγενής Οδός

Για την ενεργοποίηση της εξωγενής οδού είναι απαραίτητη η παρουσία του ιστικού παράγοντα, όπου σχηματίζει σύμπλοκο μαζί με τον παράγοντα VIIa που λειτουργεί και ως υποδοχέας του. Το σύμπλοκο αυτό ως τενάση, μετατρέπει τον παράγοντα X σε Xa όπου συνδέεται με τον συμπαράγοντα FV και με παρουσία ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{++}$ ) μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη στην επιφάνεια των κυττάρων ώστε να γίνει στην συνέχεια η μετατροπή του ινώδες. Ο ιστικός παράγοντας λειτουργεί ως συμπαράγοντας επιταχύνοντας τις 2 αντιδράσεις μέσω αλλαγής της δομής του παράγοντα VII ή VIIa, κατά την ενεργοποίηση του παράγοντα VII και X. (15)



### c. Κοινή Οδός

Αφού γίνει η ενεργοποίηση του παράγοντα X, ο παράγοντας V ενεργοποιείται μετατρέποντας στην ενεργό του μορφή μέσω διάσπασης της θρομβίνης και δεσμεύει τον παράγοντα X. Σχηματίζεται το σύμπλοκο της προθρομβινάσης μεταξύ των παραγόντων Xa και Va και ακολουθεί η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες. Τα ινίδια σταθεροποιούνται πάνω στην περιοχή του τραύματος από τον παράγοντα XIII.(13)

### 5. Αναστολείς Πήξης

Η πήξη ελέγχεται από την παρουσία φυσικών ανασταλτών της αιμόστασης. Αυτοί οι αναστολείς αποτελούν ουσίες που βοηθούν στον έλεγχο της αιμόστασης και προλαμβάνουν την ανεξέλεγκτη πήξης διατηρώντας την ισορροπία. Αυτοί οι αναστολείς περιλαμβάνουν την αντιθρομβίνη III, την πρωτεΐνη C και S, τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα(TFPI), τη θρομβομοντουλίνη και την πλασμίνη. Στη ρύθμιση της πήξης συμβάλει και το ήπαρ καθώς αποκαθαίρει τους ενεργοποιημένους παράγοντες της πήξης.(16)

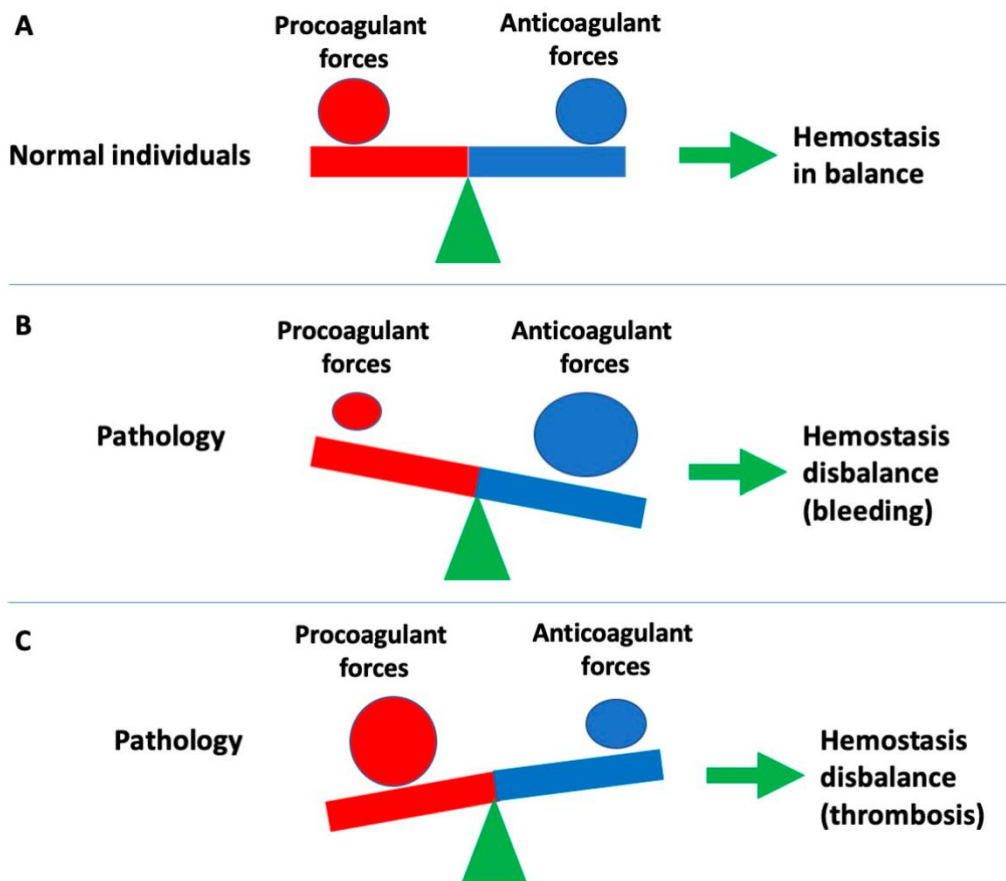
### 6. Ινωδόλυση

Αποτελεί μια πολύπλοκη και ελεγχόμενη διαδικασία ώστε να γίνει η αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγείου και της αιμόστασης. Απομακρύνεται ο θρόμβος από την πλασμίνη και ακολουθεί η αναδιαμόρφωση του ιστού που καταστράφηκε. Η πλασμίνη αποτελεί το ενεργό ένζυμο προερχόμενο από την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και λειτουργεί ως “κόφτης” ώστε να διασπάσει το δίκτυο του ινώδους στο σημείο της αιχμής. Πραγματοποιείται σταδιακή διάλυση του θρόμβου και αποκατάστασης της φυσιολογικής και ομαλής ροής του αίματος. (17)

## II. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

### 1. Εισαγωγή

Η ισορροπία ανάμεσα στην αιμορραγία και στην πήξη είναι σημαντική για την διατήρηση της λειτουργικότητας και της ακεραιότητας του κυκλοφορικού συστήματος. Η αιμόσταση, η περίπλοκη διαδικασία του οργανισμού για την αποτροπή υπερβολικής αιμορραγίας και τη διασφάλιση της βέλτιστης ροής του αίματος, εξαρτάται από τον καλά συντονισμένο συνδυασμό διαφόρων κυτταρικών και μοριακών συστατικών. Ωστόσο, όταν αυτή η εύθραυστη ισορροπία διαταραχθεί, προκύπτουν οι διαταραχές της αιμόστασης που εμφανίζουν ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις και αποτελούν σημαντικές προκλήσεις τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους παρόχους υγείας. (18)



**Εικόνα 4 : Διαταραχές Αιμόστασης.** Η εικόνα παρουσιάζει τις συνέπειες της διαταραγμένης ισορροπίας της αιμόστασης οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις. Με κόκκινο απεικονίζονται οι δυνάμεις προπηκτικής δράσης ενώ με μπλε απεικονίζονται οι αντιπηκτικές δυνάμεις. Όταν διαταράσσεται η ισορροπία των δύο δυνάμεων προκύπτουν παθολογικές καταστάσεις όπως θρόμβωση και αιμορραγία.

Η μελέτη των διαταραχών στην αιμόσταση αντιπροσωπεύει ένα συναρπαστικό και εξελισσόμενο πεδίο της ιατρικής έρευνας. Αυτές οι διαταραχές καλύπτουν μια ευρεία γκάμα παθήσεων από κληρονομούμενες γενετικές ανωμαλίες έως και επίκτητες διαταραχές στην διαδικασία της πήξης και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Η κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών αυτών των διαταραχών είναι ζωτικής σημασίας για την ακριβή διάγνωση, την αποτελεσματική διαχείριση και τη βελτίωση των αποτελεσμάτων για τους ασθενείς. (19)

Οι διαταραχές στην αιμόσταση μπορεί να επιφέρουν πολύ σοβαρές συνέπειες, όπως είναι η ανεξέλεγκτη αιμορραγία ή ανεξέλεγκτη πήξη. Οι πιο κοινές διαταραχές στην αιμόσταση είναι οι εξής :

– Αιμορροφιλία

Η αιμορροφιλία είναι μια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από έλλειψη συγκεκριμένων παραγόντων πήξης, παράγοντες VIII(Αιμορροφιλία A ) και IX (Αιμορροφιλία B) ή από δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών αυτών παραγόντων. Προκαλεί παρατεταμένη και υπερβολική αιμορραγία ύστερα από μικρό τραυματισμό ή και αυθόρμητα. (20)

– Von Willebrand

Η νόσος Von Willebrand είναι η πιο κοινή κληρονομούμενη αιμορραγική διαταραχή, η οποία οφείλεται στην έλλειψη ή δυσλειτουργία του παράγοντα Von Willebrand. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μια πρωτεΐνη που βοηθά στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο του τραύματος. Χαρακτηρίζεται από μώλωπες, αιμορραγίες από τη μύτη και παρατεταμένη αιμορραγία μετά από τραυματισμό ή και χειρουργική επέμβαση. (21)

– Θρομβοκυτταροπενία

Χαρακτηρίζεται από χαμηλά ποσοστά θρομβοκυττάρων στο αίμα και μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη αιμορραγία. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν θρομβοκυτταροπενία. Μπορεί να οφείλεται σε αυτοάνοση καταστροφή των θρομβοκυττάρων, μειωμένη παραγωγή τους ή αυξημένη καταστροφή τους εξαιτίας ορισμένων φαρμάκων. (22)

– Διάχυτη Ενδοαγγειακή Πήξη (ΔΕΠ)

Χαρακτηρίζεται από την ευρεία ενεργοποίηση της πήξης με αποτέλεσμα των σχηματισμό πολλών θρόμβων στο αίμα. Μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή ή τραύμα που επηρεάζει την ικανότητα του σώματος να συμμετέχει στην πήξη. (23)

– Έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων

Χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα αντιπηκτικών παραγόντων ή δυσλειτουργία των παραγόντων αυτών. Φυσιολογικοί αντιπηκτικοί παράγοντες είναι η πρωτεΐνη C και η πρωτεΐνη S. Οι ελλείψεις αυτών των παραγόντων αυξάνουν τον κίνδυνο για σχηματισμό μη φυσιολογικών θρόμβων και κυρίως φλεβικών θρομβώσεων. (24)

- Διαταραχές αιμοπεταλίων

Χαρακτηρίζονται από τη δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό λανθασμένου θρόμβου. Στις διαταραχές περιλαμβάνεται το σύνδρομο Bernad-Soulier και η θρομβασθαιμία Glanzmann. (25,26) Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν μώλωπες, αιμορραγίες στους βλεννογόνους και παρατεταμένη αιμορραγία μετά από τραυματισμό. (27)

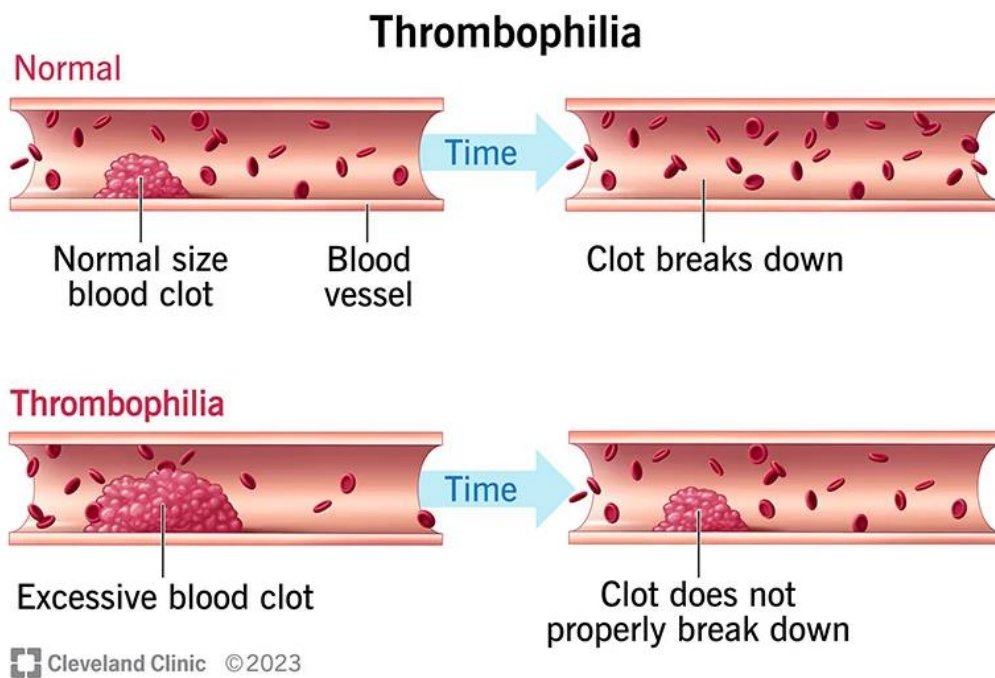
- Επίκτητες διαταραχές Πήξης

Χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στο σχηματισμό θρόμβου, αιμορραγίες και διαταραχές στην ισορροπία της αιμόστασης. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορα αίτια ακόμα και τη χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων. Παράδειγμα αποτελούν η νόσος του ήπατος, έλλειψη βιταμίνης Κ, καρκίνος αλλά και ορισμένα αντιπηκτικά φάρμακα.(28)

## 2. Θρομβοφιλία

Θρομβοφιλία ονομάζουμε μια ομάδα κληρονομικών ή επίκτητων διαταραχών κατά την πήξη του αίματος. Οι διαταραχές σχετίζονται με την ανεξέλεγκτη πήξη στις φλέβες και στις αρτηρίες με κίνδυνο θρόμβωσης. (29) Τα θρομβωτικά επεισόδια στη βρεφική και παιδική ηλικία αναγνωρίζονται ολοένα και περισσότερο ως μία σημαντική αιτία θνησιμότητας με το ποσοστό να φτάνει το 16% σε παιδιά με φλεβική θρόμβωση. (30) Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων με θρομβοφιλία δεν εμφανίζει θρόμβωση.

Η αιτία για την δημιουργία θρόμβου μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, επίκτητες αλλαγές στον μηχανισμό πήξης ή πιο συχνά στο συνδυασμό και των δύο.(31) Σε πολλές περιπτώσεις η Θρομβοφιλία συνδέεται με τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής Θρομβοεμβολικής Νόσου. (32) Διαχωρίζεται συνεπώς σε συγγενής και επίκτητη Θρομβοφιλία.



**Εικόνα 5: Θρομβοφιλία.** Η Θρομβοφιλία χαρακτηρίζεται από την αυξημένη τάση σχηματισμού θρόμβων στο αίμα.

*α. Συγγενής Θρομβοφιλία*

Η Συγγενής ή Κληρονομική Θρομβοφιλία σχετίζεται με τις γενετικές διαταραχές σε γονίδια που επηρεάζουν τη σωστή πήξη του αίματος. Συγκεκριμένα, επηρεάζει την ισορροπία της αιμόστασης καθώς αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας θρόμβου. Οι γενετικές διαταραχές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στους παράγοντες V Leiden και προθρομβίνης G20210A, ελλείψεις σε φυσικούς αναστολείς όπως αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C και S, αλλά και αυξήσεις στους παράγοντες πήξης VIII και XI. (33) (34) Οι πιο συνήθεις τύποι Θρομβοφιλίας είναι εκείνοι του παράγοντα V Leiden και της προθρομβίνης, με ποσοστά 1%-5% του πληθυσμού σε Ευρώπη και Αμερική. (32) Οι κληρονομικές ανωμαλίες αλληλοεπιδρούν συχνά με επίκτητους παράγοντες όπως η αδράνεια, το τραύμα, οι κακοήθειες και η αντισυλληπτική αγωγή. (35) (36)

## b. Επίκτητη Θρομβοφιλία

Η επίκτητη Θρομβοφιλία αναφέρεται σε μια ομάδα παθολογικών καταστάσεων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβώσεων και δεν οφείλονται σε κληρονομήσιμες γενετικές αλλαγές. Η πιο συνηθής επίκτητη θρομβοφιλία είναι το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο [ Antiphospholipid syndrome (APS)] και μπορεί να προκαλέσει θρόμβους στις φλέβες των ποδιών αλλά και σε διάφορα όργανα όπως οι πνεύμονες, τα νεφρά και ο εγκέφαλος.(37) (38) Οφείλεται σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα την παραγωγή αντισώματος που παρεμβαίνει στην διαδικασία της πήξης. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία αυτοάνοση διαταραχή όπου τα αντισώματα "επιτίθενται" στα φωσφολιπίδια, τα οποία είναι απαραίτητα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης και είναι σημαντικά για την διατήρηση της πυκνότητας του αίματος.(39) Αναφορές δείχνουν πως περίπου το 70% των ατόμων με Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι γυναίκες. (40) (41)

<b>Θρομβοφιλίες</b>	<b>Επίκτιτοι παράγοντες προδιάθεσης για φλεβική θρόμβωση</b>
<b>Κοινές</b> Παράγοντας V Leiden Προθρομβίνη G20210A Αυξημένο επίπεδο παράγοντα VIII* Ομοζυγώτος πολυμορφισμός C677T στη μεθυλενοτετραυδροφυλλική ρεντουκτάση†	Αύξηση της ηλικίας Χειρουργική επέμβαση ή τραύμα Παρατεταμένη ακινητοποίηση Παχυσαρκία Κάπνισμα
<b>Σπάνιες</b> Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S Ανεπάρκεια αντιθρομβίνης	Κακοήθη νεοπλάσματα Μυελοϋπερπλαστικές ασθένειες Επιφανειακή φλεβική θρόμβωση Προηγούμενη φλεβική θρόμβωση/κιρσώδεις φλέβες Εγκυμοσύνη και περίοδος 6 εβδομάδων μετά την εγκυμοσύνη
<b>Πολύ σπάνιες</b> Δυσινωδογοναιμία Ομοζυγωτική ομοκυστεϊνουρία	Χρήση γυναικείων ορμονών Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα/αντιπηκτικά λύκου Υπερομοκυστεϊναιμία Αντίσταση ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C που δεν σχετίζεται με τον παράγοντα V Leiden

**Εικόνα 6: Τα είδη Θρομβοφιλίας.** Στην εικόνα απεικονίζονται τα διαφορετικά είδη Θρομβοφιλίας. Αναγράφονται οι κληρονομικές αιτίες εμφάνισης της ασθένειας, από τις πιο κοινές μέχρι τις πιο σπάνιες καθώς και οι επίκτιτοι παράγοντες.

### 3. Διάγνωση Θρομβοφιλίας

Η Θρομβοφιλία μπορεί να ανιχνευθεί μέσω ανάλυσης του αίματος. Συγκεκριμένα, μέχρι πρόσφατα η θρομβοφιλία διευρυνόταν σχεδόν αποκλειστικά από δοκιμασίες του πλάσματος συγκρίνοντας τους φαινοτύπους. Βασιζόταν στην ανίχνευση ελλείψεων αντιθρομβίνης, πρωτεϊνών C και S, αναζήτηση για δυσιντερογοναιμία και αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων/αντιπηκτικών λύκου. Έχει αποδειχθεί όμως πως υπάρχουν κάποια είδη Θρομβοφιλίας που μπορεί να αποδώσουν αρνητικά αποτελέσματα στις εξετάσεις ενώ υπάρχει κληρονομικός παράγοντας, όπου αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης. Πλέον χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός μεθόδων και αναλύσεων τόσο εποπτικές δοκιμασίες, όπως είναι χρόνος προθρομβίνης (PT) και Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής Θρομβοπλαστίνης (aPTT) αλλά και ειδικές εργαστηριακές δοκιμασίες για την ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων του παράγοντα V-Leiden( και του παράγοντα προθρομβίνης (FII, G20210A μετάλλαξη). (42) (43)

Οι Εργαστηριακές Εξετάσεις που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση της Θρομβοφιλίας είναι:

- Δοκιμασία Αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APCR)
- Δοκιμασία Αντιθρομβίνης
- Δοκιμή Δραστηριότητας πρωτεΐνης C
- Δοκιμή Δραστηριότητας πρωτεΐνης S
- Δοκιμή επιπέδου Ινωδογόνου
- Δοκιμή D-Dimer
- Δοκιμή επιπέδου Ομοκυστεΐνης
- Χρόνος Προθρομβίνης (PT)
- Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT)
- Χρόνος Θρομβίνης(TT)
- Δοκιμές παραγόντων VIII , IX ,XI ,XII
- Δοκιμές λειτουργικότητας αιμοπεταλίων
- Γενετικές Εξετάσεις για τις μεταλλάξεις V-Leiden , προθρομβίνης, MTHFR

Οι εξετάσεις διενεργούνται ανάλογα με την κλινική εικόνα του ατόμου. Για μία ολοκληρωμένη αξιολόγηση είναι απαραίτητο να υπάρχει συνδυασμός μεθόδων μαζί με ένα λεπτομερές προσωπικό και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό. (44) Η προσέγγιση της διάγνωσης θα πρέπει να είναι σταδιακή, όσον αφορά τις μεθόδους ανάλυσης. Στο πρώτο βήμα θα πρέπει να διαπιστώνεται αν το άτομο φέρει μία από τις συνηθισμένες αιτίες Θρομβοφιλίας. Στη περίπτωση ενός ή πολλών μη φυσιολογικών αποτελεσμάτων, το δεύτερο διαγνωστικό βήμα περιλαμβάνει δοκιμασίες με σκοπό την επιβεβαίωση και το χαρακτηρισμό της κλινικής κατάστασης. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη και άλλες μεταβλητές που ενδέχεται να επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Σε αυτές τις μεταβλητές ανήκει ο χρόνος εξέτασης, η ηλικία, το φύλο, η ορμονική κατάσταση, η εγκυμοσύνη και η ηπατική λειτουργία.(45)

Η εξέταση της Θρομβοφιλίας είναι δαπανηρή και χρονοβόρα, συνεπώς είναι σημαντικό να είναι κατάλληλα στοχευμένη και να διενεργείται μόνο αν τα αποτελέσματα θα έχουν άμεσο αντίκτυπο στην κλινική διαχείριση. Ο έλεγχος για θρομβοφιλία συνίσταται σε άτομα που παρουσιάζουν σχετικές κλινικές ενδείξεις ώστε να γίνει η αξιολόγηση για πιθανές προθρομβωτικές τάσεις. Η απόφαση για τη διενέργεια του ελέγχου θα πρέπει να προσαρμόζεται σε κάθε περίπτωση, λαμβάνοντας το ιατρικό ιστορικό του ατόμου, οικογενειακή προδιάθεση και άλλων παραγόντων κινδύνου. Οι ενδείξεις για τη διεξαγωγή ελέγχου περιλαμβάνουν περιπτώσεις προσωπικού ή οικογενειακού ιστορικού θρομβωτικών επεισοδίων (ειδικότερα σε νεαρή ηλικία) που δηλώνουν πρώιμη έναρξη και ιδίως ελλείπει παραγόντων κινδύνου, όπως χειρουργικές επεμβάσεις ή τραύμα. Σημαντική είναι η εξέταση και σε περιπτώσεις με επαναλαμβανόμενες αποβολές ή επιπλοκές, αλλά και σε άτομα με ιστορικό αγωγής ορμονών (χρήση αντισυλληπτικών). Επιπλέον, σε περιπτώσεις θρόμβωσης σε άτυπες αγγειακές θέσεις όπως οι μεσεντέριες ή εγκεφαλικές φλέβες. Μια ακόμα ένδειξη αποτελεί το ιστορικό παρατεταμένης ακινησίας κατά τη διάρκεια νοσηλείας ή ταξιδιού μεγάλης απόστασης, αλλά και η παρουσία των παραγόντων κινδύνου όπως η παχυσαρκία και το κάπνισμα. (46)

Μελέτες δείχνουν πως ο έλεγχος Θρομβοφιλίας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς συνίσταται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, αυτές περιλαμβάνουν ορισμένες ελλείψεις όπως η αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C και S, ομόζυγοι στον παράγοντα V-Leiden. Παράλληλα, η εξέταση για Θρομβοφιλία έχει μεγάλη σημασία για γυναίκες που σχεδιάζουν εγκυμοσύνη ή εξετάζουν το ενδεχόμενο λήψης αντισυλληπτικών. (47–49)

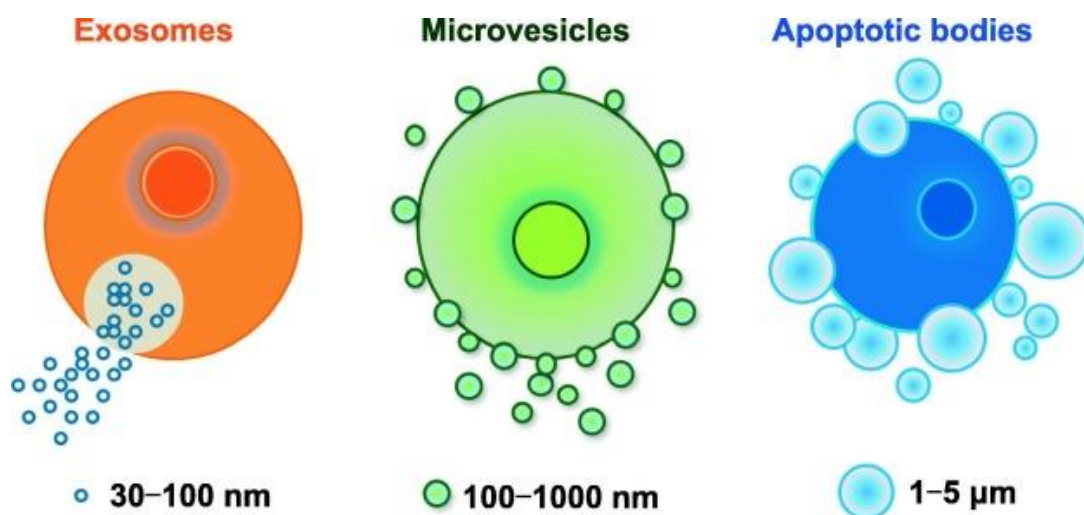


### III. ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ

#### 1. Ορισμός

Τα μικροκυστίδια ή Μικροσωματίδια (MPs, Microparticles) είναι μικρά θραύσματα των πλασματικών μεμβρανών που προκύπτουν φυσικά κατά την διαδικασία της απόπτωσης ή σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Προέρχονται από διάφορα είδη κυττάρων όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν τα αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια με 70%-90% του συνόλου. (50) Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0.2-2.0μm. Τα μικροκυστίδια που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι εκείνα που προέρχονται από τα αιμοπετάλια πάραυτα μπορεί να προέρχονται και από άλλα είδη κυττάρων όπως είναι τα ερυθρά κύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. (51) Παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 1967 από τον Wolf όπου και για πολύ καιρό χαρακτηρίζονταν ως "αιμοπεταλιακή σκόνη" και θεωρούνταν ως υπολείμματα των κυττάρων χωρίς κάποια λειτουργία. (52) Αποδείχθηκε όμως, πως συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες καθώς και στην παθογένηση ασθενειών. Αποτελούν συστατικά του αίματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αιμόστασης. Ο ρόλος των μικροκυστιδίων καθορίζεται από τα μητρικά κύτταρα από τα οποία και προέρχονται.

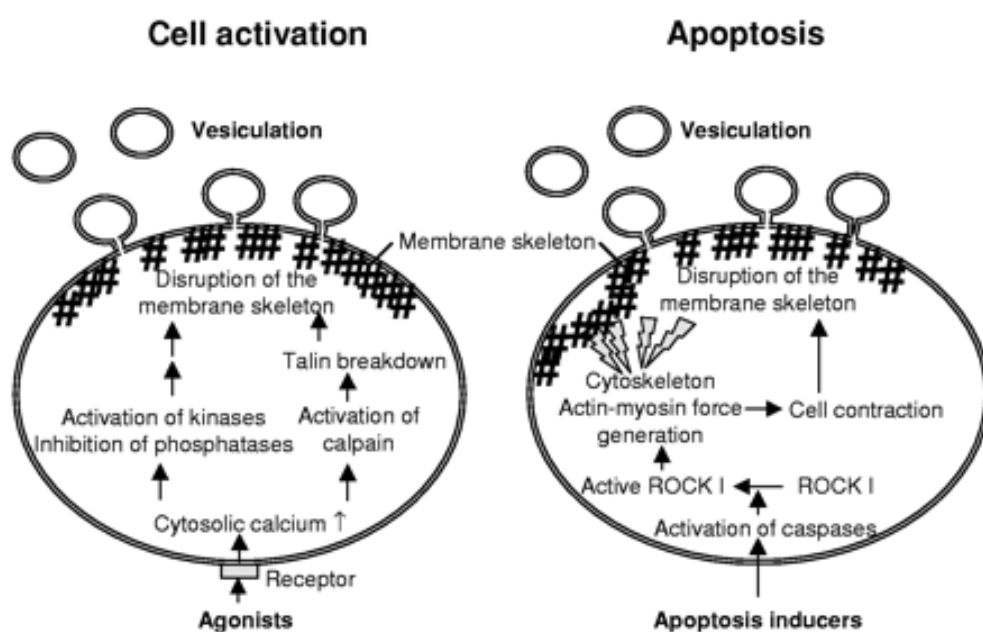
Τα μικροκυστίδια περιέχουν ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς και απελευθερώνουν πρωτεΐνες όπως είναι οι κυτοκίνες και οι χημειοκίνες όπου βοηθούν την επικοινωνία ανάμεσα στα κύτταρα. Επιπλέον, περιέχουν και άλλα μόρια όπως αυξητικούς παράγοντες, DNA, RNA και λιπίδια. (53)



**Εικόνα 7:Εξωκυττάρια Κυστίδια.** Τα εξωκυττάρια κυστίδια αποτελούν τα εξωσώματα, μικροκυστίδια και τα αποπτωτικά σώματα. Τονίζονται τα διαφορετικά μεγέθη τους.

## 2. Δημιουργία Μικροκυστιδίων

Τα μικροσωματίδια δημιουργούνται όταν ενεργοποιούνται τα κύτταρα εξαιτίας ενός ερεθίσματος. Αυξάνεται το επίπεδο των ιόντων ασβεστίου όπου οδηγεί στη αναδιάταξη της πλασματικής μεμβράνης και στον κυτταροσκελετό της. Μετασχηματίζεται η μεμβράνη με την φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine, PS) να μετακινείται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης ενεργοποιώντας έτσι συγκεκριμένα ένζυμα (αμινοφωσγολιπιδική τρανσλοκάση, φλοπάση και σκραμπλάση). Σε συνθήκες κυτταρικού στρες, επηρεάζεται το σχήμα και η δομή των κυττάρων με αποτέλεσμα την αλλαγή στη δυναμική της μεμβράνης. Τα ένζυμα ευαίσθητα στο ασβέστιο (καλπαίνη και γκελσολίνη) βοηθούν στη δημιουργία των μικροκυστιδίων. Ανάλογα με το κάθε είδος κύτταρου και του ερεθίσματος που ενεργοποιείται την διαδικασία αυτή, διαφέρουν και τα βήματα στον σχηματισμό των μικροσωματιδίων τους. Μικροκυστιδία σχηματίζονται και κατά τη διάρκεια της απόπτωσης όπου και διαφέρουν φαινοτυπικά και ποσοτικά, ακόμα και αν προέρχονται από τον ίδιο τύπο κυττάρου. Στο μετασχηματισμό του σκελετού συμμετέχουν η ακτίνη και η μυοσίνη που συμβάλουν στο σχηματισμό προεξοχών της μεμβράνης μέσω αναδίπλωσης και αλλάζουν την καμπυλότητα της, δημιουργώντας μικρές κύστες. Κατά το σχηματισμό των κυστιδίων, τα κυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα ενσωματώνονται στις νεοσχηματισμένες κύστες. Η κάθε κύστη διαφέρει ως προς το φορτίο που περιέχει ανάλογα με τις συνθήκες ενεργοποίησης, τον τύπο του κυττάρου όπου προέρχεται αλλά και την επιδιωκόμενη λειτουργία του. Ύστερα ακολουθεί η αποκοπή τους από τη μεμβράνη και η απελευθέρωση τους στον εξωκυττάριο χώρο λειτουργώντας ως ανεξάρτητες δομές. Η διαδικασία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει ενζυμικές διεργασίες και πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης της μεμβράνης. (54) (55) (56)



**Εικόνα 8: Δημιουργία Μικροκυστιδίων.** Η εικόνα παρουσιάζει δύο απαραίτητες διαδικασίες για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και τη ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών λειτουργιών, την απόπτωση και την κυτταρική

ενεργοποίηση. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, δημιουργούνται κυτταρικά θραύσματα τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό των μικροκυστιδίων. Αντίθετα, σε συνθήκες κυτταρικής ενεργοποίησης προκαλεί απελευθέρωση των μικροκυστιδίων ως τρόπο επικοινωνίας των κυττάρων και διαμόρφωσης της ανοσολογικής απόκρισης.

### 3. Λειτουργίες Μικροκυστιδίων

Τα μικροκυστίδια μεταφέρουν φορτίο ανάλογα με το μητρικό κύτταρο από το οποίο προήρθαν. (57) Φέρουν πολλές λειτουργίες με τις κυριότερες να είναι οι εξής:

- Διακυτταρική επικοινωνία

Μπορούν να μεταφέρουν πληροφορίες ανάμεσα στα κύτταρα επηρεάζοντας την κυτταρική συμπεριφορά και λειτουργία. (58)

- Μεταφορά μορίων και ουσιών

Μεταφορά μορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. (59)

- Σηματοδότες ανάμεσα στα κύτταρα

Μπορούν να περιέχουν μόρια σήμανσης, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων ανάπτυξης, κυττοκίνες και ορμόνες. Όταν απελευθερώνονται στα κύτταρα στόχους, τα μόρια σήμανσης μπορούν να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένες αντιδράσεις και να ρυθμίσουν διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η ανοσοαπόκριση.

- Ανοσολογική Ρύθμιση

Μπορούν να μεταφέρουν αντιγόνα, το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας MHC, μόρια ανοσολογικής ρύθμισης τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν από άλλα ανοσοκύτταρα και να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση. (60)

- Επιδιόρθωση Ιστών

Μπορούν να μεταφέρουν παράγοντες για την επούλωση, αγγειογένεση και την κινητικότητα των κυττάρων. Μέσω αυτών των παραγόντων γίνεται η επιδιόρθωση τραυματισμένων ιστών.

- Παθογένεση

Τα μικροκυστίδια έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικά επεισόδια. Μπορούν να μεταφέρουν μόρια που οδηγούν στην πρόοδο της νόσου, στη μετάσταση και αδυναμία απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος.

### 4. Μικροκυστίδια σε Διαταραχές της Αιμόστασης

Μολονότι τα μικροκυστίδια είναι παρόντα σε υγιή άτομα και ο σχηματισμός τους αποτελεί φυσιολογική διαδικασία, αυξάνεται ο αριθμός τους σε άτομα με συγκεκριμένες παθήσεις όπως στη σήψη, σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στο διαβήτη και στον καρκίνο. (61) Έχει προταθεί ότι έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση αναδεικνύοντας τον ουσιαστικό ρόλο στην αιμόσταση και τη δυναμική χρήση τους ως βιοδείκτες ασθενειών, προκαλώντας ένα μεγάλο ενδιαφέρον για αναζήτηση στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. (62)

Αύξηση στον αριθμό των μικροκυστιδίων παρατηρείται σε ασθενείς που σχετίζονται με την υπερπήξη, όπως η Ιδιοπαθής Θρομβοπενική πορφύρα, η Νυχτερινή παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία, το αντιπηκτικό του λύκου και το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Μείωση αντίστοιχα παρατηρείται σε αρκετές αιμορραγικές διαταραχές όπως το σύνδρομο Scott, η νόσος Castaman και η θρομβασθένεια Glanzmann. Τα αιμοπετάλια από ασθενείς με σύνδρομο Scott και Glanzmann έχουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής μικροκυστιδίων και των υποδοχέων του παράγοντα Va. Επιπλέον, τα μικροκυστίδια αποκαλύπτουν τον ιστικό παράγοντα (Tissue Factor, TF) σε αρκετές κλινικές καταστάσεις που συνδέονται με την ανεξέλεγκτη πήξη. (63) (64) Η έκθεση των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοσερίνη) και του ιστικού παράγοντα τα καθιστούν προπηπτικά. Ενώ φυσιολογικά τα επίπεδα των μικροσωματιδίων που εκτίθενται στον TF είναι χαμηλά, σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων αυξάνονται, γεγονός που υποστηρίζει τη συσχέτισή τους στην παθολογία θρομβωτικών επιπλοκών. (65,66)

Μελέτη που πραγματοποιήθηκαν το 1946 από τους Chargaff και West έδειξε πως ο χρόνος προθρομβίνης ενός φυσιολογικού ατόμου επεκτάθηκε μετά την αφαίρεση των μικροκυστιδίων. Για την απομάκρυνση τους χρησιμοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε υψηλές ταχύτητες. (67) Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 1967 από τον Wolf, αναφέρεται πως η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην παραγωγή των μικροκυστιδίων ή όπως χαρακτηρίζεται αιμοπεταλιακή σκόνη, όπου ενισχύουν και βοηθούν την παραγωγή θρομβίνης σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια. (68) Μελέτες σχετικά με τη διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη που προκαλείται από σηψαιμικό σοκ, έδειξαν πως τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα κυριαρχούν έναντι των υπολοίπων φαινοτύπων ενώ οι συγκεντρώσεις του συνολικού αριθμού μικροκυστιδίων είναι ίδιες στους ασθενείς και μη. Συνεπώς, τα μικροκυστίδια που προήλθαν από το ενδοθήλιο συσχετίστηκαν ισχυρά με την πρώιμη διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη και αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες για την αξιολόγηση της ασθένειας σε πρώιμο στάδιο. (69) Σε θρομβοπάθειες που προκλήθηκαν από τραυματισμό, δεδομένα αποδεικνύουν πως υπάρχει χαρακτηριστικό μοτίβο φαινοτύπου μικροκυστιδίων στα τραύματα, το οποίο μπορεί να επηρεάσει την αιμόσταση ενισχύοντας την πρωτοβάθμια φάση της αιμοστατικής απόκρισης. (70) Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν πως συγκεκριμένοι φαινότυποι των μικροκυστιδίων που επικρατούν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για ασθένειες.

Έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα μικροκυστιδίων στο αίμα σε ασθενείς με μετάλλαξη V Leiden και προθρομβίνης G20210A γεγονός που έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο Θρομβοεμβολής (VTE). Η συσχέτιση αυτή υποδηλώνει τη συμβολή των μικροσωματιδίων

στην υπερπηκτικότητα. Σε έρευνα όπου πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ελλείψεις σε φυσικούς αντιπηκτικούς παράγοντες, μετρήθηκαν τα επίπεδα των κυκλοφορόντων μικροσωματιδίων και παρατηρήθηκε αυξημένος ο αριθμός τους σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα αυξημένα επίπεδα μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο σε φορείς ήπιας ή σοβαρής κληρονομικής Θρομβοφιλίας. (71) Μελέτη για τη συγκέντρωση και τη δραστηριότητα των μικροκυστιδίων πραγματοποιήθηκε και σε ασθενείς με μεταλλάξεις του παράγοντα V Leiden και του γονιδίου προθρομβίνης G20210A. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι φορείς της μετάλλαξη προθρομβίνης είχαν εξίσου σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορόντων μικροκυστιδίων, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως πιθανώς να επηρεάζουν την ανάπτυξη φλεβικής θρομβοεμβολής αυξάνοντας τη θρομβίνη. (72) Παράλληλα, μπορεί να επηρεάζουν το θρομβογόνο προφίλ των φορέων της μετάλλαξης του παράγοντα V Leiden συμβάλλοντας στην ανάπτυξη θρόμβωσης στους φορείς. (73,74)

## 5. Μέθοδοι Μέτρησης Μικροκυστιδίων

Τα μικροκυστίδια, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, είναι μικρά θραύσματα μεμβρανών με διάμετρο από 0.2-2.0μm και με διαφορετική σύσταση ανάλογα την προέλευση τους, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη μέτρηση τους. Πληθώρα τεχνικών έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τη μέτρηση των μικροσωματιδίων. (75) Κάποιες από τις τεχνικές αυτές είναι οι εξής :

1. Electron microscopy
2. Enzyme-linked immunosorbent assays
3. Flow cytometry
4. Atomic force microscopy
5. Dynamic light scattering (DLS)
6. Nanoparticle tracking analysis

Μελέτες έδειξαν πως οι περισσότερες από αυτές τις τεχνικές φέρουν πολλές δυσκολίες και περιορισμούς κατά τη μέτρηση των μικροκυστιδίων. Σε πολλές από αυτές απαιτείται μεγάλη προετοιμασία των δειγμάτων πριν την ανάλυση, ενώ σε άλλες παρατηρείται αδυναμία ποσοτικοποίησης των σωματιδίων και καθορισμός του μεγέθους, ενώ παράλληλα υπάρχει και αδυναμία διαχωρισμού των μικροκυστιδίων με τα εξωσώματα (μεγαλύτερα σε διάμετρο από τα μικροκυστίδια, 40-150nm) . (76)

Οι συχνότερα διαδεδομένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry) και η νέα μέθοδος της Ανάλυσης Κατανομής των Νανοσωματιδίων ( Nanoparticles Tracking Analysis, NTA) . (77)

### a. Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry)

Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση των μικροσωματιδίων είναι η Κυτταρομετρία Ροής. Η μέθοδος αυτή προσφέρει ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων τύπων μικροσωματιδίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλινικούς σκοπούς, λόγω της ευρείας χρήσης της στη διάγνωση παθολογίας. Για τη μέτρηση χρησιμοποιούνται ειδικές μαθηματικές φόρμουλες, που υπολογίζουν τη συγκέντρωση των μικροκυστιδίων στα δείγματα. (78) Η Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry) αποτελεί μια αυτοματοποιημένη και ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη πολλαπλών φυσικών χαρακτηριστικών σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων, σε μικρό χρονικό διάστημα. (79) Το δείγμα ρέει διαμέσου μία συσκευής που εκπέμπει δέσμη λέιζερ(μονή ή πολλαπλές) για οπτική και ηλεκτρονική ανίχνευση. (80) Χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός από σκεδασμένο και φθορίζον φως όπου ανιχνεύεται και αναλύεται δίνοντας πληροφορίες για τα φυσικά και χημικά συστατικά κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Ο σκεδασμός του φωτός γίνεται σε δύο κατευθύνσεις, εμπρόσθια και πλάγια. Με την εμπρόσθια (FSC) σκέδαση λαμβάνουμε πληροφορίες για το μέγεθος, ενώ με την πλάγια(SSC) παρατηρούμε την πολυπλοκότητα του σωματιδίου. Ο σκεδασμός είναι ανεξάρτητος από το φθορισμό. Η μέθοδος αυτή έχει πολλές εφαρμογές στην ανοσολογία, ιολογία και στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Συγκεκριμένα, για την ανάλυση των μικροκυστιδίων είναι η πιο κοινή μέθοδος, διότι προσφέρει τη δυνατότητα ταυτοποίησης της προέλευσης του κυστιδίου εξαιτίας της παρουσίας συγκεκριμένων αντιγόνων επιφάνειας. (81) Παρόλο την εξέλιξη των κυτταρομέτρων τα τελευταία χρόνια, που μπορούν να ανιχνεύσουν σωματίδια μικρότερα των 500nm, οι μετρήσεις σε τόσο χαμηλές τιμές παραμένουν ακόμα αβέβαιες σε καθημερινή ρουτίνα. Επομένως, απαιτούνται εργαλεία και τεχνικές για μεγαλύτερη αξιοπιστία στη μέτρηση.(82)

b. Ανάλυση Κατανομής Νανοσωματιδίων (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA)

Η μέθοδος NTA αναζητά την κατανομή των μικροκυστιδίων στα δείγματα που τοποθετούνται στο μηχάνημα. (83) Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει την κίνηση Μπράουν (Brownian motion) των μικροκυστιδίων σε μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου σε πραγματικό χρόνο. (77) Μετράτε το μέγεθος και ο κυτταρικός φαινότυπος του μικροσωματιδίου καθώς τα κυστίδια απεικονίζονται μέσω της διάθλασης του φωτός χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο. Το μηχάνημα δημιουργεί ένα βίντεο από τις κινήσεις των κυστιδίων που λαμβάνει από τα δείγματα και καταγράφει το κάθε ένα κυστίδιο μετρώντας το μέγεθος και την ολική συγκέντρωση. Η τεχνική αυτή φέρει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με την Κυτταρομετρία Ροής καθώς μπορεί να ανιχνεύσει σωματίδια μικρότερα από 50 nm. (76) Το δείγμα εισέρχεται στον αναλυτή με σύριγγα και διοχετεύετε στο μηχάνημα μέσω ενός ειδικού συστήματος-αντλίας, που σπρώχνει το έμβολο της σύριγγας με σταθερή ταχύτητα. Η λειτουργία αυτή βελτιώνει την ποιότητα των μετρήσεων εξαιτίας της μεγαλύτερης ποσότητας μεμονωμένων κυστιδίων που ανιχνεύονται. Είναι αναγκαίο τα δείγματα να αραιώνονται πριν την ανάλυση, διότι υπάρχει συγκεκριμένο δυναμικό εύρος για τη συγκέντρωση των σωματιδίων. (84)



## IV. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

### 1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξερεύνηση νέων βιοδεικτών με σκοπό τη διάγνωση των διαταραχών της αιμόστασης. Ένας τέτοιος αναδυόμενος βιοδείκτης είναι τα μικροσωματίδια, τα οποία είναι μικρά κυστίδια που απελευθερώνονται από διάφορα κύτταρα σε απόκριση στην κυτταρική ενεργοποίηση, τον τραυματισμό ή την απόπτωση. Αυτές οι μικρές δομές που περιβάλλονται από μεμβράνες, περιέχουν ποικίλα φορτία πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων, καθιστώντας τες υποσχόμενο δείκτη για την αξιολόγηση των παθοφυσιολογικών διεργασιών που υπόκεινται στις διαταραχές αιμόστασης.

Το πεδίο της έρευνας για τα μικροκυστίδια έχει διευρυνθεί με γρήγορο ρυθμό, με τη συμβολή των προηγμένων αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν τον εντοπισμό, τη χαρακτηριστική περιγραφή και την ποσοτικοποίηση των μικροσωματιδίων σε βιολογικά δείγματα. Αυτές οι εξελίξεις έχουν εστιάσει στην πιθανή κλινική χρησιμότητα των μικροσωματιδίων ως διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών στις διαταραχές αιμόστασης, προσφέροντας ένα μη επεμβατικό και ευαίσθητο τρόπο για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της νόσου, την παρακολούθηση μίας θεραπείας και την πρόβλεψη κλινικών αποτελεσμάτων. (85)

Αυτή η εργασία έχει ως στόχο να ερευνήσει τον ρόλο των μικροκυστιδίων ως νεός βιοδείκτης για τα άτομα με διαταραχές στην αιμόσταση. Με την έρευνα της προέλευσης, σύνθεσης και των λειτουργικών ιδιοτήτων των μικροκυστιδίων, επιδιώκουμε να ανακαλύψουμε τις δυνατότητές τους ως αξιόπιστοι δείκτες. Επιπλέον, θα εξετάσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους συμβάλουν στη δυσλειτουργία της αιμόστασης, εντοπίζοντας τη συμμετοχή τους σε θρομβωτικά γεγονότα, της αναστολής της πήξης και άλλες αιμοσταστικές διαταραχές.

Μέσω της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, θα εξετάσουμε τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση, την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των μικροκυστιδίων και θα εξετάσουμε τις κλινικές μελέτες που έχουν διερευνήσει την συσχέτιση μεταξύ των μικροσωματιδίων και των διαταραχών της αιμόστασης, με στόχο να συνοψίσουμε τα υπάρχοντα στοιχεία και να συμβάλλουμε στη γνώση ως μια πιθανή διαγνωστική και προγνωστική μέθοδο, για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και προσεγγίσεων στον τομέα της αιμόστασης.



## 2. Βιοδείκτες Διάγνωσης Θρομβοφιλίας

Γνωρίζουμε πως δεν υπάρχει μια μόνο εργαστηριακή δοκιμή ή ένα απλό σύνολο δοκιμών που να μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα είδη Θρομβοφιλίας. Συνήθως, απαιτείται μια σειρά πολύπλοκων και δαπανηρών δοκιμών όπου πολλές από αυτές επηρεάζονται και από άλλες καταστάσεις. (86) Η άστοχη ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη διάγνωση και κυρίως στις εξετάσεις Θρομβοφιλίας. (87) Επιπλέον, οι εξετάσεις δεν προβλέπουν πάντα με ακρίβεια την πιθανότητα θρομβωτικών επεισοδίων, γεγονός που οδηγεί στη μη αποτελεσματική εφαρμογή προληπτικών μέτρων. Είναι επομένως επιτακτική ανάγκη η εύρεση νέων μεθόδων ανίχνευσης ώστε να πραγματοποιείται η έγκαιρη διάγνωση, με στόχο τη μείωση του κινδύνου των απειλητικών επιπλοκών (πνευμονική εμβολή, φλεβική θρόμβωση). (88)

Για την αποφυγή ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ηλικία, το φύλο, την αντιπηκτική αγωγή ή συγκεκριμένες καταστάσεις όπως εγκυμοσύνη και αντισυλληπτική αγωγή. (89) (90) Πρέπει συνεπώς, για τη σωστή διάγνωση να λαμβάνονται όλα τα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένου και του σημείου θρόμβωσης, των παραγόντων κινδύνου και το οικογενειακό ιστορικό. (91) Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φυσιολογικές τιμές αναφοράς για την αντιθρομβίνη και των πρωτεϊνών C και S, καθώς έχουν μεγάλο εύρος και οι ασθενείς που φέρουν ελλείψεις μπορεί να έχουν μικρές αποκλίσεις στις τιμές, γεγονός που απαιτεί επανεξέταση. (92) Επιπλέον, η εγκυμοσύνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης S και μιμείται την παρουσία του παράγοντα V Leiden προκαλώντας αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. (93)

Συμπερασματικά, επειδή τα προ-αναλυτικά σφάλματα και οι επίκτητες αιτίες είναι συχνές, πρέπει να εξεταστούν και να αποκλειστούν όλες οι πιθανότητες εσφαλμένης διάγνωσης. Συνεπώς, η διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται σε μία μόνο μη φυσιολογική εξέταση αλλά σε επαναλαμβανόμενες για την επιβεβαίωση. Είναι λοιπόν ανάγκη η ανεύρεση ενός δείκτη που θα φανερώσει απευθείας την ύπαρξη κάποιου παράγοντα κινδύνου και θα οδηγεί στη διάγνωση, ελαχιστοποιώντας τα λανθασμένα αποτελέσματα. (94–96)

## 3. Μικροκυστίδια ως Βιοδείκτες

Μελέτες αποδεικνύουν πως τα μικροκυστίδια εκτός από τη μεταφορά πρωτεϊνών και λιπιδίων από τα μητρικά κύτταρα κατά το σχηματισμό τους, μπορούν να μεταφέρουν και νουκλεϊκά οξέα όπως DNA, RNA αλλά και mRNAs, microRNAs, siRNAs και lncRNAs. Συνεπώς, συγκεκριμένα μικροκυστίδια με παθολογικά χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για αναγνώριση ή εντοπισμό διάφορων παθολογικών καταστάσεων κατά τη διάρκεια εξέλιξης τους. (97)

Τα μικροκυστίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες μέσω της αναγνώρισης του τύπου κυττάρου από όπου και προέρχονται. Αναλύοντας και ταυτοποιώντας τον τύπο, μπορεί να υπάρξει κατάλληλο συμπέρασμα για την αντιμετώπιση

μια ασθένειας. (98) Αποτελεί μια μέθοδο διάγνωσης δίχως να είναι επεμβατική, ώστε να παρακολουθείται η πορεία και η εξέλιξη μίας ασθένειας ή μιας θεραπείας αντίστοιχα. (99)

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα κύτταρα του αίματος μπορούν αν έχουν δυνητικούς διαγνωστικούς ρόλους σε παθολογικές καταστάσεις όπως Καρδιομεταβολικές Νόσους. (100) Συγκεκριμένα, στα φυσιολογικά κύτταρα, η φωσφατιδυλσερίνη (PS) βρίσκεται μόνο στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου. Κατά την κυτταρική απόπτωση ή την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων, το φωσφολιπίδιο PS μετακινείται στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης όπου και απελευθερώνεται μαζί με τα μικροκυστίδια από τα ενεργοποιημένα κύτταρα. Τα κύτταρα, όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα, ενεργοποιούνται από συγκεκριμένα ερεθίσματα. Πολλά από αυτά τα ερεθίσματα όπως είναι η υπέρταση, η παχυσαρκία, η υπερχοληστερολαιμία και ο διαβήτης συνδέονται με καρδιακές και μεταβολικές ασθένειες. Επομένως, η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων μπορεί να χαρακτηρίζει και να αντανakλά την εξέλιξη μίας νόσου. (101)

Εκτός από την παρουσία τους, τα χαρακτηριστικά και το φορτίο τους, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σαν διαγνωστικοί δείκτες. Τα επίπεδα και η σύνθεση τους αντικατοπτρίζουν τις κυτταρικές και μοριακές διεργασίες που συμβαίνουν στο σώμα. (102) Μία ακόμη μέθοδος ταυτοποίησης ασθένειας θα μπορούσε να αποτελεί τα ένζυμα που εκτίθενται στην επιφάνεια των μικροκυστιδίων. Ως ένδειξη προθρομβωτικής κατάστασης, αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων με τον ιστικό παράγοντα στην επιφάνεια. Τα μόρια αυτά μπορούν να προσδιοριστούν με Κυτταρομετρία ή Ανοσοϊστοχημεία. Η έκφραση των δεικτών συμβάλει στο διαχωρισμό και στην ταυτοποίηση του φαινοτύπου των μικροκυστιδίων που οφείλεται σε συγκεκριμένες διαταραχές.

Ανάλυση μπορεί να γίνει και στη λειτουργία των μικροκυστιδίων, καθώς εκτός από την μεταφορά φορτίου φέρουν και συγκεκριμένες ιδιότητες που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες λειτουργίες. Μελετώντας τις λειτουργίες τους, όπως η ικανότητα να βοηθούν στην πήξη ή στην φλεγμονή, μπορούν να μας δώσουν ενδείξεις για την παθοφυσιολογία της αιμοστατικής διαταραχής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα μικροκυστίδια που εκφράζουν ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, όπου συμβάλλουν στην απορρύθμιση της ινωδόλυσης σε συγκεκριμένες αιμορραγικές διαταραχές.

Εκτελώντας μελέτες μεγάλης διάρκειας σε μεμονωμένους ασθενείς μπορεί να γίνει παρακολούθηση των επιπέδων τους παρατηρώντας αλλαγές στην ποσότητα και τη σύσταση. Η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα ελέγχου των διακυμάνσεων, ώστε να παρακολουθείτε η εξέλιξη μίας νόσου, η αποτελεσματικότητα μίας θεραπευτικής αγωγής αλλά και η πιθανότητα επανεμφάνισης της.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί διεξοδικά η σκοπιμότητα της χρήσης μικροσωματιδίων ως αξιόπιστων βιοδεικτών για την έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση της Θρομβοφιλίας. Η μελέτη σχεδιάστηκε ειδικά για να εμβαθύνει στην περίπλοκη σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών των μικροσωματιδίων (μέγεθος και συγκέντρωση) και της Θρομβοφιλίας. Παράλληλα, εξετάστηκαν πιθανές κλινικές εφαρμογές τους καθώς και πραγματοποιήθηκε λεπτομερής αξιολόγηση της διαγνωστικής ακρίβειας και αξιοπιστίας τους.

Επιπροσθέτως, η έρευνα είχε ως στόχο να συμβάλει στη βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων για την θρομβοφιλία, διευκολύνοντας τις άμεσες και στοχευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις και συμβάλλοντας στην καλύτερη ποιότητα περίθαλψης.

## II. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

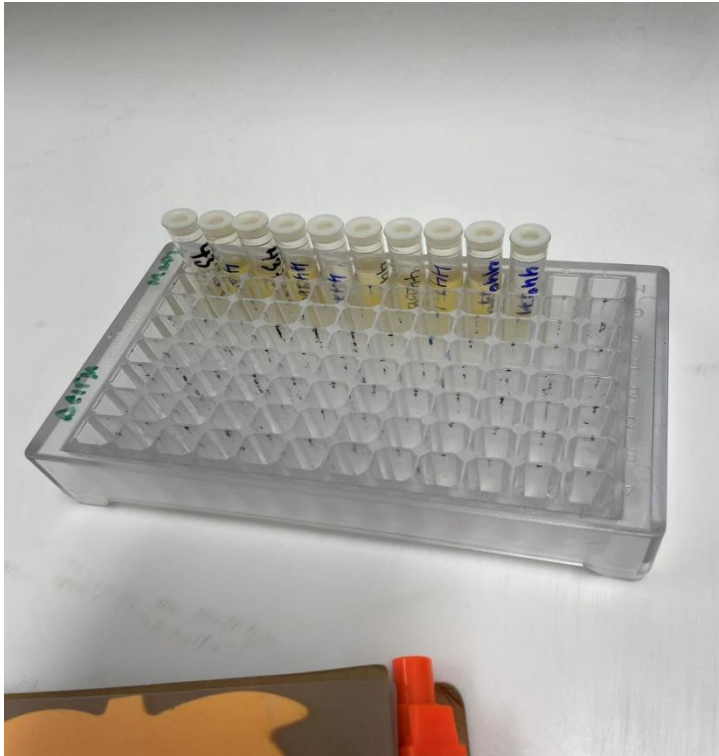
### 1. Εισαγωγή

Η μελέτη περιλάμβανε μια ομάδα 100 ατόμων που είχε ελεγχθεί για θρομβοφιλία, λόγω διάφορων ιατρικών ιστορικών και κλινικών ενδείξεων. Περιλαμβάνει 84 άτομα με διάγνωση θρομβοφιλίας και 16 άτομα αρνητικά στη θρομβοφιλία. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ασθενών και μη. Αφού συλλέχθηκε το αίμα για τις απαραίτητες εξετάσεις ανίχνευσης θρομβοφιλίας στους ασθενείς, απομονώθηκε το πλάσμα με τη διαδικασία της φυγοκέντρησης και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες  $-80^{\circ}\text{C}$  σε ειδικούς καταψύκτες. Στην συνέχεια το πλάσμα αποθηκεύτηκε σε ειδικούς καταψύκτες σε θερμοκρασίες  $-20^{\circ}\text{C}$ . Για να αποψύξουμε αυτά τα δείγματα απαλά και να διατηρήσουμε την ακεραιότητά τους, ακολουθήσαμε μια διαδικασία σταδιακής απόψυξης. Ξεκινώντας από τους  $-20^{\circ}\text{C}$ , ύστερα σε θερμοκρασία ψυγείου  $2^{\circ}\text{C}$  και έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου  $25^{\circ}\text{C}$  πριν την τοποθέτηση τους στον αναλυτή. (103)

### 2. Προετοιμασία Δειγμάτων

Για τη διασφάλιση ότι τα δείγματά έχουν την ιδανική συγκέντρωση για ανάλυση, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/100 με PBS (Phosphate-Buffered Saline). Επιλέχθηκε η αραιώση 1/100 διότι δίνει ένα βέλτιστο εύρος συγκεντρώσεων κατάλληλο για τη συγκεκριμένη ανάλυση. Σε Ependorfs προστέθηκαν 990  $\mu\text{L}$  PBS με 10  $\mu\text{L}$  πλάσματος και

ακολούθησε σχολαστική ανάδευση με vortex ώστε να γίνει ομογενοποίηση. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται η ακεραιότητα των μικροσωματιδίων και η σωστή συγκέντρωσή τους στο δείγμα, ώστε να γίνει σωστά η ανάλυση και αποφυγή συσσωματώματος.



**Εικόνα 9: Δείγματα Ασθενών.**

### III. ΑΝΑΛΥΤΗΣ NANOSIGHT NS300

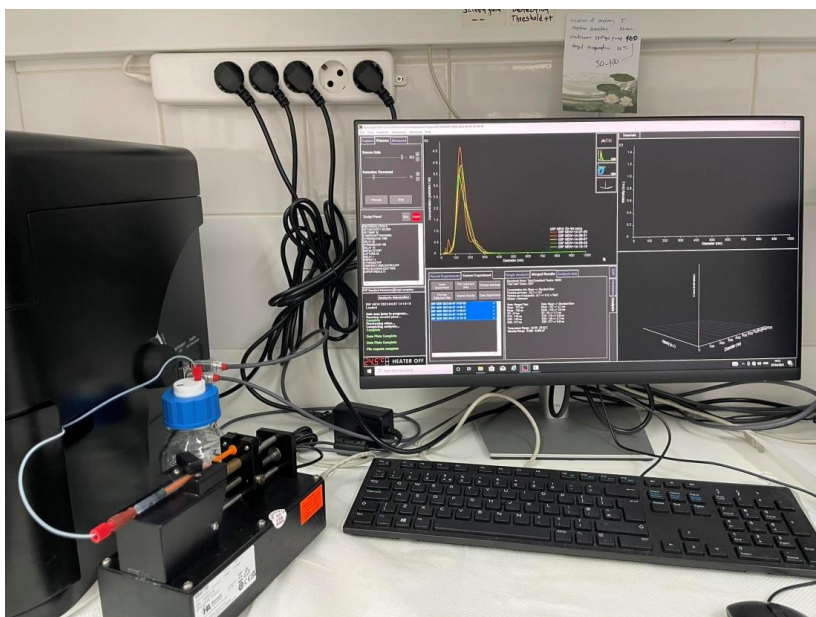
#### 1. Εισαγωγή

Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων είναι ο Nanosight NS300. Είναι ένα σύστημα που χρησιμοποιεί τη σκέδαση του φωτός με λέιζερ, δίνοντας πληροφορίες για τα νανοσωματίδια. Συγκεκριμένα, τα σωματίδια που αιωρούνται στο υγρό (πλάσμα) φορτώνονται σε ειδικό θάλαμο όπου και φωτίζονται από ειδική δέσμη λέιζερ, με αποτέλεσμα την μεμονωμένη παρακολούθηση των σωματιδίων με το μικροσκόπιο. Ο αναλυτής καταγράφει ένα βίντεο όπου και απεικονίζεται η ταχύτητα τους βάσει της κίνησης Brown και προσφέρει πληροφορίες για τις ιδιότητες τους. Αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση του μεγέθους, της συγκέντρωσης και του φθορισμού όλων των τύπων των κυστιδίων. Χρησιμοποιούνται ειδικά φθορίζοντα φίλτρα, όπου αποκλείουν το σκεδαζόμενο φως και απεικονίζουν μόνο το φθορίζον σήμα που εκπέμπουν τα σωματίδια. Επιπλέον, προσφέρει τη δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασία στο δείγμα μέσω των θερμοηλεκτρικών στοιχείων Peltier που περιέχει η μονάδα του λέιζερ. (104)

#### 2. Διαδικασία Ανάλυσης

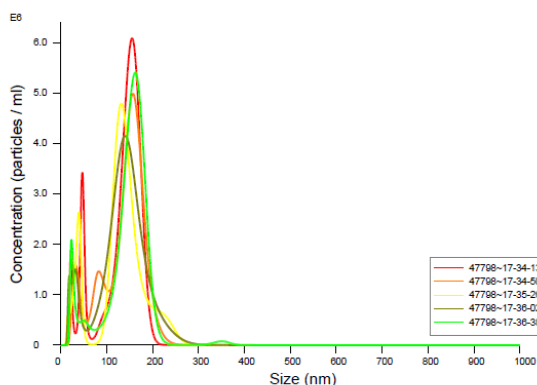
Τα δείγματα φορτώνονται στο θάλαμο με τη χρήση σύριγγας(μίας χρήσης), μέσω ειδικού εξαρτήματος(θάλαμος) που προωθεί το δείγμα στον αναλυτή με σταθερή ταχύτητα. Ο θάλαμος θα πρέπει να είναι σωστά σφραγισμένος για την αποφυγή μόλυνσης σε περίπτωση σφάλματος. (104)

Αφού γίνει η προετοιμασία των δειγμάτων και πριν την τοποθέτηση τους στον ειδικό θάλαμο, ρυθμίζουμε κατάλληλα τις παραμέτρους στο λογισμικό του αναλυτή. Ρυθμίζεται ο χρόνος λήψης του βίντεο, οι ρυθμίσεις της κάμερας ( εστίαση και φωτεινότητα) και του λέιζερ.

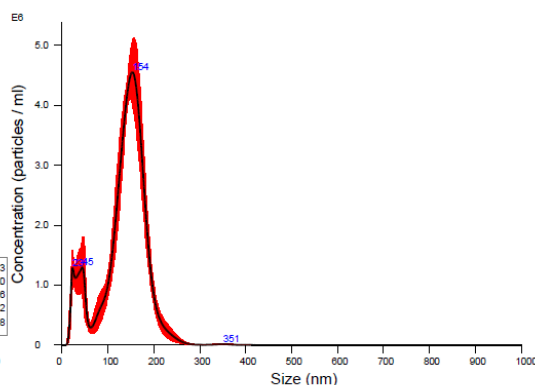


Εικόνα 10: Αναλυτής Nanosight NS300

Αφού πραγματοποιηθεί η ανάλυση και ολοκληρωθεί η επεξεργασία των δεδομένων, δημιουργείται ένα διάγραμμα κατανομής μεγέθους των κυστιδίων. Το διάγραμμα μας προσφέρει μία εικόνα των διαφορετικών μεγεθών και της συγκέντρωσης των μικροσωματιδίων σε κάθε περιοχή μεγέθους. Παράλληλα, υπολογίζεται και η συνολική συγκέντρωση στο δείγμα. Τα αποτελέσματα εξάγονται με την μορφή αρχείου pdf όπου περιέχει όλες τις τιμές που βρέθηκαν αλλά και τα διαγράμματα. Μέσω των αποτελεσμάτων μπορούμε να κατανοήσουμε τις ιδιότητες των μικροκυστιδίων και τα χαρακτηριστικά τους, με στόχο την περαιτέρω έρευνα των μικροκυστιδίων.



FTLA Concentration / Size graph for Experiment:  
47798 2023-05-15 17-32-43



Averaged FTLA Concentration / Size for Experiment:  
47798 2023-05-15 17-32-43  
Error bars indicate + / - 1 standard error of the mean

Included Files	Results
47798 2023-05-15 17-34-13	Stats: Merged Data
47798 2023-05-15 17-34-50	Mean: 136.5 nm
47798 2023-05-15 17-35-26	Mode: 153.1 nm
47798 2023-05-15 17-36-02	SD: 48.7 nm
47798 2023-05-15 17-36-38	D10: 48.5 nm
	D50: 145.3 nm
	D90: 185.6 nm
<b>Details</b>	Stats: Mean +/- Standard Error
NTA Version: NTA 3.4 Build 3.4.4	Mean: 136.5 +/- 2.5 nm
Script Used: SOP Standard Measurement 05-32-18PM 15~	Mode: 149.6 +/- 5.7 nm
Time Captured: 17:32:43 15/05/2023	SD: 48.5 +/- 1.4 nm
Operator:	D10: 52.7 +/- 1.8 nm
Pre treatment:	

Εικόνα 11 : Παράδειγμα αρχείου pdf που προκύπτει από την ανάλυση των δειγμάτων.

Αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση και των 100 δειγμάτων, έγινε συλλογή όλων των δεδομένων και δημιουργήθηκε ένα ολοκληρωμένο φύλλο Excel με όλα τα αποτελέσματα από την ανάλυση του Nanosight NS300. Δημιουργήσαμε διάφορες κατηγορίες δεδομένων για όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του ληφθέντος από το νοσοκομείο ιστορικού τους. Χωρίσαμε τα άτομα ανάλογα με τη διάγνωση που έγινε στο νοσοκομείο σε δύο ομάδες, ασθενείς και μη. Τα υπόλοιπα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν το φύλο, την ηλικία, το ιστορικό και την κατάσταση.

Στον παρακάτω Πίνακα 1 αναγράφεται το ιστορικό των ατόμων για το οποίο έγιναν και οι κατάλληλες εξετάσεις ελέγχου Θρομβοφιλίας.

### ΑΡΧΕΙΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ

	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΣΧΕΤΙΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΙΜΗΣ ΣΤΟ ΑΡΧΕΙΟ	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΣΧΕΤΙΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
ΑΓΝΩΣΤΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	1	1,0	1,0	1,0
ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ	14	14,0	14,0	15,0
ΑΠΟΒΟΛΗ	13	13,0	13,0	28,0
ΕΓΚΥΟΣ	1	1,0	1,0	29,0
ΕΜΦΡΑΓΜΑ	6	6,0	6,0	35,0
ΘΡΟΜΒΩΣΗ	36	36,0	36,0	71,0
ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΕΜΒΟΛΗ	6	6,0	6,0	77,0
ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΑ ΛΟΓΩ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	23	23,0	23,0	100,0
ΣΥΝΟΛΟ	100	100,0	100,0	

Πίνακας 1 : Ιστορικό Ασθενών



## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

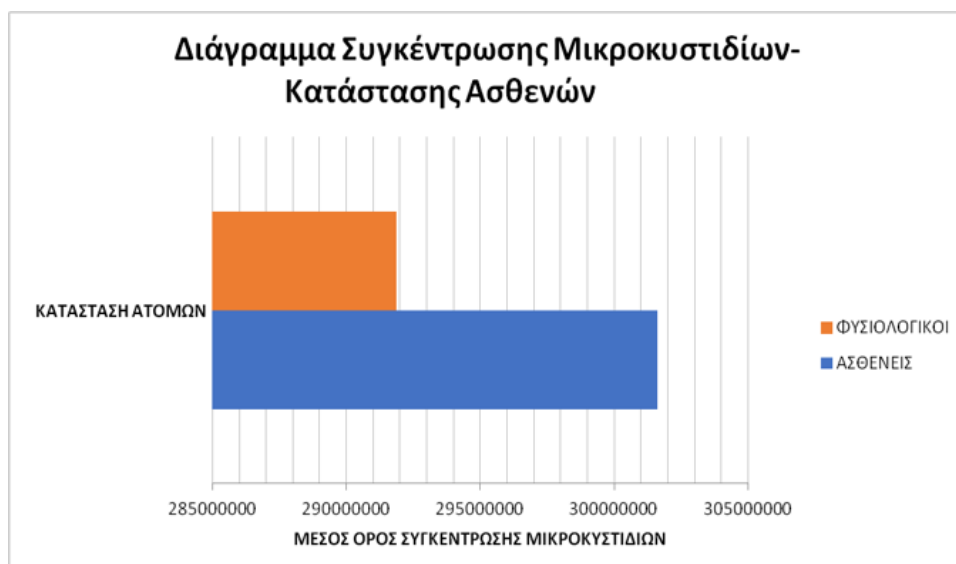
Τα αποτελέσματα από την ανάλυση και το πλήρες ιστορικό συγκεντρώθηκαν και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος SPSS. Στόχος της ανάλυσης αποτελεί η εύρεση συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών. Συγκεκριμένα, συσχέτιση ανάμεσα στην κατάσταση των ατόμων (ασθενών και μη) με το μέσο μέγεθος των μικροκυστιδίων αλλά και σχέση ανάμεσα στην κατάσταση με τη συνολική συγκέντρωσή των μικροκυστιδίων στο δείγμα.

Στον Πίνακα 2 παρατηρούμε τη μέση συγκέντρωση των μικροκυστιδίων στα δείγματα των ασθενών και αντίστοιχα στα δείγματα των φυσιολογικών ατόμων.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΡs ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΗ					
	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΛΗΘΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΣΟΥ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΡs	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	84	301616666,67	117940331,90	12868345,200
	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ	16	291868750,00	136950826,79	34237706,697

Πίνακας 2 : Συγκέντρωση μικροκυστιδίων στα δείγματα

Από τον Πίνακα 2 προκύπτει το Διάγραμμα 1:



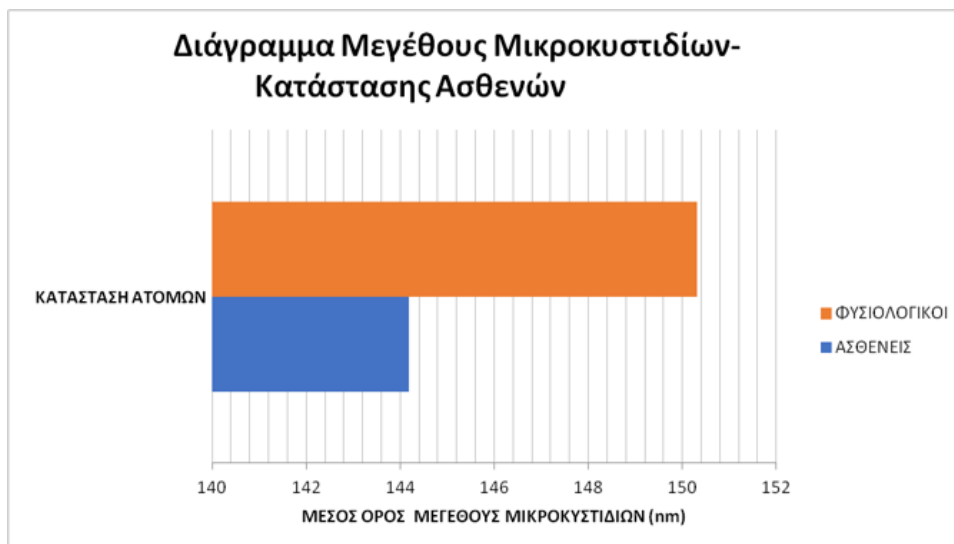
Διάγραμμα 1: Συγκέντρωσης-Κατάστασης

Στον Πίνακα 3 παρατηρούμε το μέσο μέγεθος των μικροκυστιδίων σε nm στα δείγματα των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων.

ΜΕΓΕΘΟΣ ΜΡs ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΗ					
	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΠΛΗΘΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΜΕΣΟΥ
ΜΕΣΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΩΝ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	84	144,185	27,6239	3,0140
	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ	16	150,313	24,9849	6,2462

Πίνακας 3: Μέγεθος μικροκυστιδίων στα δείγματα

Από τον Πίνακα 3 προκύπτει το Διάγραμμα 2:



Διάγραμμα 2 : Μεγέθους- Κατάστασης

Με την βοήθεια των διαγραμμάτων και των πινάκων που προκύπτουν από τα δεδομένα και την χρήση του προγράμματος, ακολουθήσαμε στατιστική ανάλυση στο πρόγραμμα SPSS. Η στατιστική εξέταση αποσκοπεί στη διαλεύκανση οποιασδήποτε πιθανής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης των μικροκυστιδίων και της παρουσίας θρομβοφιλίας στον υπό μελέτη πληθυσμό.

Χρησιμοποιήθηκε ένα t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων (independent samples t-test), με σκοπό τη σύγκριση των συγκεντρώσεων μεταξύ ατόμων με θρομβοφιλία και μη. Από τη στατιστική ανάλυση των ανεξάρτητων δειγμάτων προκύπτει ο Πίνακας 4:

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Significance		Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
						One-Sided p	Two-Sided p			Lower	Upper
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΩΝ	Equal variances assumed	1,006	,318	,295	98	,384	,768	9747916,667	33017397,605	-55774034,312	75269867,646
	Equal variances not assumed			,267	19,467	,396	,793	9747916,667	36576151,630	-66682714,013	86178547,347

**Πίνακας 4 : T-test ανεξαρτήτων δειγμάτων για τη συγκέντρωση των μικροκυστιδίων**

Το ίδιο t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε και για το μέσο μέγεθος των μικροκυστιδίων όπου προκύπτει ο Πίνακας 5 :

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Significance		Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
						One-Sided p	Two-Sided p			Lower	Upper
ΜΕΣΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΩΝ	Equal variances assumed	,635	,428	-,825	98	,206	,411	-6,1280	7,4294	-20,8714	8,6154
	Equal variances not assumed			-,884	22,577	,193	,386	-6,1280	6,9354	-20,4898	8,2339

**Πίνακας 5 :T-test ανεξαρτήτων δειγμάτων για το μέγεθος των μικροκυστιδίων**

## V. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 1 συμπεραίνουμε πως η μέση συγκέντρωση των μικροσωματιδίων (Microparticles,MPs) σε ασθενείς με θρομβοφιλία είναι ελαφρώς υψηλότερη από ότι σε φυσιολογικά άτομα. Ωστόσο, αυτή η διαφορά στους μέσους όρους από μόνη της δεν υποδηλώνει απαραίτητα σημαντική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης και της Θρομβοφιλίας.

Στο Διάγραμμα 2 παρατηρούμε πως το μέσο μέγεθος των MPs στους ασθενείς είναι ελαφρά χαμηλότερο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Ομοίως με τη συγκέντρωση, η διαφορά στους μέσους όρους δεν αποδεικνύει από μόνη της σαφή σχέση μεταξύ του μεγέθους και της Θρομβοφιλίας.

Συμπεραίνουμε από τα στατιστικά t-test (Πίνακας 4 και 5) και τα διαγράμματα, πως δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στις δύο μεταβλητές με την ύπαρξη Θρομβοφιλίας. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη το test Levene και την τιμή p-value που προέκυψε, σε σχέση με το επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας 0,05, τα στοιχεία δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά. Και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές του p-value είναι πάνω από το όριο στατιστικής σημαντικότητας. Είναι σημαντικό λοιπόν να αναγνωριστεί η πιθανή επίδραση του σχετικά μικρότερου μεγέθους του δείγματος των ατόμων χωρίς Θρομβοφιλία στη στατιστική ισχύ της ανάλυσης. Επιπλέον, τα ευρήματα υποδηλώνουν πως η σχέση μεταξύ Θρομβοφιλίας και μικροκυστιδίων είναι πιο περίπλοκη και μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετους παράγοντες που η μελέτη δεν περιέλαβε. Η απουσία άμεσης συσχέτισης δεν αναιρεί τη δυνητική χρησιμότητα των MPs στην κλινική πρακτική. Ενδέχεται να εξακολουθούν να έχουν διαγνωστική σημασία σε συγκεκριμένα πλαίσια ή παράλληλα με άλλους βιοδείκτες.

Η διάγνωση της Θρομβοφιλίας με βάση αποκλειστικά τη συγκέντρωση των MPs στο πλάσμα αποτελεί πρόκληση, διότι τα επίπεδα τους μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ατόμων και δεν υπάρχει καθιερωμένο εύρος αναφοράς για τις συγκεντρώσεις που σχετίζονται με την ασθένεια. Αν και αυξημένα επίπεδα μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένα άτομα με ασθένεια, δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο. Αντίθετα, οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται συνήθως ως μέρος μίας ευρύτερης αξιολόγησης του κινδύνου Θρομβοφιλίας.

## VI. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Παρόλο που η μελέτη παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την σχέση των MPs και της Θρομβοφιλίας, αρκετοί περιορισμοί χρήζουν σημασίας. Η άνιση κατανομή των ατόμων με Θρομβοφιλία και μη, ενδέχεται να επηρέασε σημαντικά τη στατιστική ισχύ και τη γενικευσιμότητα των αποτελεσμάτων. Ο χρόνος διεξαγωγής της έρευνας αποτελεί ακόμα ένα σημαντικό παράγοντα, καθώς η έρευνα αφορά μια χρονική στιγμή και όχι συνεχή παρακολούθηση των ασθενών με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μας αποτρέπει να έχουμε μια πλήρη εικόνα για το πως μεταβάλλονται οι τιμές των μικροκυστιδίων σε διάστημα χρόνου. Σημαντικός περιορισμός αποτελεί η μεγάλη κλινική ετερογένεια ανάμεσα στα ίδια άτομα με Θρομβοφιλία, επηρεάζοντας την ερμηνεία και τη δυνατότητα γενίκευσης σε ολόκληρο πληθυσμό της Θρομβοφιλίας. Τέλος, εξωτερικοί παράγοντες όπως η χρήση φαρμάκων, περιβαλλοντικές επιδράσεις και ο τρόπος ζωής, έπρεπε να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση, καθώς ενδέχεται να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Η αναγνώριση αυτών των περιορισμών θέτει τις βάσεις για μελλοντικές έρευνες, τονίζοντας την ανάγκη για πιο σύνθετες και αναλυτικές έρευνες με στόχο την πλήρη κατανόηση της σχέσης των μικροκυστιδίων με τη θρομβοφιλία. Χρειάζεται μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη διαλεύκανση των πολύπλοκων σχέσεων που υφίστανται.

## VII. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ

Τα ευρήματα που προκύπτουν από την έρευνα δεν επιδεικνύουν σημαντική συσχέτιση, τονίζοντας την περίπλοκη φύση της Θρομβοφιλίας. Χρειάζεται επανεκτίμηση του ρόλου της συγκέντρωσης και του μεγέθους των MPs ως ισχυρού βιοδείκτη για τη σωστή διάγνωση. Ως εκ τούτου, οι μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες θα πρέπει να εμβαθύνουν στη διερεύνηση πρόσθετων βιοδεικτών και πιθανών στοιχείων που συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη κατανόηση της πολύπλοκης παθοφυσιολογίας της ασθένειας, ανοίγοντας δρόμο για αποτελεσματικότερες διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές.

Η σχέση μεταξύ μικροσωματιδίων και Θρομβοφιλίας παραμένει ένας τομέας συνεχιζόμενης έρευνας. Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν συλλογή δεδομένων από τα ίδια άτομα για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας έτσι την παρατήρηση στις αλλαγές με την πάροδο του χρόνου, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των MPs. Παράλληλα, διερεύνηση πρόσθετων βιοδεικτών (συγκεκριμένες πρωτεΐνες, γενετικούς δείκτες) για ένα ολοκληρωμένο διαγνωστικό πλαίσιο. Επιπρόσθετα, μια μελέτη θα μπορούσε να περιλαμβάνει ανάλυση των MPs σε συγκεκριμένο είδος Θρομβοφιλίας, καθώς το κάθε είδος έχει διαφορετικό μηχανισμό παθογένειας. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να εντοπιστεί συγκεκριμένος δείκτης, που μπορεί να είναι ενδεικτικός της εξέλιξης της νόσου, διευκολύνοντας στην πιο στοχευμένη και εξατομικευμένη διάγνωση. Στο πλαίσιο της έρευνας, η μελέτη του τρόπου επίδρασης των MPs μέσω διάφορων θεραπειών και οι μεταβολές τους μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τέλος, η ενσωμάτωση επιπλέον τεχνικών απεικόνισης (Κυτταρομετρία Ροής) δίνει τη δυνατότητα ακριβέστερης απεικόνισης και πιο λεπτομερή χαρακτηρισμό των μικροσωματιδίων. Είναι απαραίτητη η δημιουργία τυποποιημένων πρωτοκόλλων μέτρησης των μικροκυστιδίων, ώστε να επιτευχθεί η σωστή αξιολόγηση τους σαν υποσχόμενους δείκτες .

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

1. Silverthorn DU. Φυσιολογία Του Ανθρώπου. Broken Hill Publishers Ltd; 2018. 960.
2. Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου Φωτεινή. Παιδιατρική Αιματολογία- Ογκολογία. Broken Hill Publishers Ltd; 2020. 1278.
3. Periyah MH, Halim AS, Zaharil A, Saad M. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. Vol. 11, International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research IJHOSCR. 2017.
4. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. Pharmacogenet Genomics. 2011 Aug;21(8):516–21.
5. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation [Internet]. Vol. 8, Curr Opin Hematol. 2001. Available from: <http://journals.lww.com/co-hematology>
6. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth. 2014 Sep;58(5):515–23.
7. Bioc HJ, Andrew & RK, Lopez JA, Berndt MC. REVIEW Molecular Mechanisms of Platelet Adhesion and Activation. Vol. 29. 1997.
8. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. 2023.
9. Mcgees MP, Li LC. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Functional Difference between Intrinsic and Extrinsic Coagulation Pathways KINETICS OF FACTOR X ACTIVATION ON HUMAN MONOCYTES AND ALVEOLAR MACROPHAGES\*. Vol. 266. 1991.
10. coagulation -- Britannica Online Encyclopedia. 2023 [cited 2023 May 26]; Available from: <https://www.britannica.com/https://www.britannica.com/science/coagulation-of-blood>
11. Winter WE, Greene DN, Beal SG, Isom JA, Manning H, Wilkerson G, et al. Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. In: Advances in Clinical Chemistry. Academic Press Inc.; 2020. p. 31–84.
12. Göbel K, Eichler S, Wiendl H, Chavakis T, Kleinschnitz C, Meuth SG. The coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in inflammatory disorders-a systematic review. Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.
13. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. 2023.
14. Grover SP, Mackman N. Intrinsic pathway of coagulation and thrombosis: Insights from animal models. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019 Mar 1;39(3):331–8.
15. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. Biochemistry &copy; Perspectives in Biochemistry The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation<sup>1</sup> [Internet]. 1991. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
16. Sallah S. Inhibitors to clotting factors. Ann Hematol. 1997;75(1–2):1–7.

17. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015 Jan;29(1):17–24.
18. Doherty TM, Kelley A. *Bleeding Disorders.* 2023.
19. Arrieta-Blanco JJ, Oñate-Sánchez R, Martínez-López F, Oñate-Cabrerizo D, Cabrerizo-Merino M del C. Inherited, congenital and acquired disorders by hemostasis (vascular, platelet & plasmatic phases) with repercussions in the therapeutic oral sphere. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014 May 1;19(3):e280-8.
20. Mehta P, Reddivari AKR. *Hemophilia.* 2023.
21. Sabih A, Babiker HM. *Von Willebrand Disease.* 2023.
22. Thrombocytopenia What is thrombocytopenia? [Internet]. Available from: <https://www.nlm.nih.gov/health/thrombocytopenia>
23. Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) [Internet]. Available from: <https://www.nlm.nih.gov/health/disseminated-intravascular-coagulation>
24. Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of natural anticoagulants, protein C, protein S, and antithrombin. *Circulation.* 2011 Oct 4;124(14):e365-8.
25. Krause KA, Graham BC. *Glanzmann Thrombasthenia.* 2023.
26. Almomani MH, Mangla A. *Bernard-Soulier Syndrome.* 2023.
27. Taira T. Platelet Disorders. In: *Emergency Medicine.* Elsevier; 2013. p. 1714-1720.e1.
28. Rodgers GM, Grosset AB. Acquired Coagulation Disorders. *Clin Haematol.* 1985 Jun 1;14(2):413–42.
29. Heit JA. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007;127–35.
30. Hoppe C, Matsunaga A. Pediatric thrombosis. *Pediatr Clin North Am.* 2002 Dec;49(6):1257–83.
31. Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J.* 2006 Sep 12;4:15.
32. Dautaj A, Krasi G, Bushati V, Precone V, Gheza M, Fioretti F, et al. Hereditary thrombophilia. *Acta Biomed.* 2019 Sep 30;90(10-S):44–6.
33. Phillippe HM, Hornsby LB, Treadway S, Armstrong EM, Bellone JM. Inherited Thrombophilia. *J Pharm Pract.* 2014 Jun;27(3):227–33.
34. Feero WG. Genetic thrombophilia. *Prim Care.* 2004 Sep;31(3):685–709, xi.
35. Kaushansky K and + 6 more. *Williams Hematology (9th Ed.).* New York: McGraw-Hill Education; 2016.
36. Montagnana M, Lippi G, Danese E. An Overview of Thrombophilia and Associated Laboratory Testing. In 2017. p. 113–35.
37. Armstrong EM, Bellone JM, Hornsby LB, Treadway S, Phillippe HM. Acquired Thrombophilia. *J Pharm Pract.* 2014 Jun;27(3):234–42.



38. Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol*. 2019 Mar;12(3):147–58.
39. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The Antiphospholipid Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2002 Mar 7;346(10):752–63.
40. Antiphospholipid syndrome [Internet]. Available from: <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/5824/antipho>
41. Dabit JY, Valenzuela-Almada MO, Vallejo-Ramos S, Duarte-García A. Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome in the General Population. *Curr Rheumatol Rep*. 2022 Jan 5;23(12):85.
42. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory Investigation of Thrombophilia. *Clin Chem*. 2001 Sep 1;47(9):1597–606.
43. Jennings I, Cooper P. Screening for thrombophilia: a laboratory perspective. *Br J Biomed Sci*. 2003;60(1):39–51.
44. Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J, Wheeler M, Low J, Aboud M, et al. Multilaboratory Testing of Thrombophilia: Current and Past Practice in Australasia as Assessed through the Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program for Hematology. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Feb;31(01):49–58.
45. Margetic S. Diagnostic algorithm for thrombophilia screening. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Jan 1;48.
46. Simioni P. Who should be tested for thrombophilia? *Curr Opin Hematol*. 2006 Sep;13(5):337–43.
47. Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Apr 23;31(3):275–81.
48. Arachchilage DJ, Mackillop L, Chandratheva A, Motawani J, MacCallum P, Laffan M. Thrombophilia testing: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol*. 2022 Aug;198(3):443–58.
49. Guidelines for Thrombophilia Testing Maidstone and Tunbridge Wells NHS Trust. 2014.
50. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):769–74.
51. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007 May;21(3):157–71.
52. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010 Oct 29;107(9):1047–57.
53. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011 May 13;108(10):1284–97.
54. Tricarico C, Clancy J, D’Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017 Oct 2;8(4):220–32.

55. Yang X, Yoshida T, Hanayama R. EVs and Communication. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2023 Jan 1;390–400.
56. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017 Oct 2;8(4):220–32.
57. Berezin AE. Microparticles in Chronic Heart Failure. In 2017. p. 1–41.
58. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010 May 15;123(Pt 10):1603–11.
59. Panagiotou N, Wayne Davies R, Selman C, Shiels PG. Microvesicles as Vehicles for Tissue Regeneration: Changing of the Guards. *Curr Pathobiol Rep*. 2016 Dec 27;4(4):181–7.
60. Holder BS, Tower CL, Forbes K, Mulla MJ, Aplin JD, Abrahams VM. Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*. 2012 Jun 23;136(2):184–91.
61. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011 May 13;108(10):1284–97.
62. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009 Nov 24;101(03):439–51.
63. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. Vol. 59, *Cardiovascular Research*. 2003. p. 277–87.
64. Rautou PE, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev Hematol*. 2013 Feb 10;6(1):91–101.
65. van Es N, Bleker S, Sturk A, Nieuwland R. Clinical Significance of Tissue Factor-Exposing Microparticles in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2015 Oct;41(7):718–27.
66. Rautou PE, Mackman N. Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev Hematol*. 2013 Feb;6(1):91–101.
67. CHARGAFF E, WEST R. THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE THROMBOPLASTIC PROTEIN OF BLOOD. *Journal of Biological Chemistry*. 1946 Nov 1;166(1):189–97.
68. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269–88.
69. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1695–703.
70. Caspers M, Schäfer N, Fröhlich M, Bouillon B, Mutschler M, Bauerfeind U, et al. Microparticles profiling in trauma patients: high level of microparticles induce activation of platelets in vitro. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2020 Feb 1;46(1):43–51.
71. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bulato C, Gavasso S, Tormene D, et al. Circulating microparticles and the risk of thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost*. 2016 Jan;115(1):81–8.

72. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Gavasso S, Zerbinati P, Woodhams B, et al. Circulating microparticles in carriers of prothrombin G20210A mutation. *Thromb Haemost.* 2014 Sep 2;112(3):432–7.
73. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bon M, Gavasso S, Zerbinati P, et al. Circulating microparticles in carriers of factor V Leiden with and without a history of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2012 Oct;108(4):633–9.
74. Lincz LF, Scorgie FE, Enjeti A, Seldon M. Variable plasma levels of Factor V Leiden correlate with circulating platelet microparticles in carriers of Factor V Leiden. *Thromb Res.* 2012 Feb;129(2):192–6.
75. Chandler WL. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Jul;90(4):326–36.
76. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011 Dec;7(6):780–8.
77. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res.* 2017 May 12;120(10):1632–48.
78. Alkhatatbeh MJ, Enjeti AK, Baqar S, Ekinci EI, Liu D, Thorne RF, et al. Strategies for enumeration of circulating microvesicles on a conventional flow cytometer: Counting beads and scatter parameters. *J Circ Biomark.* 2018;7:1849454418766966.
79. Givan ALongobardi. *Flow cytometry : first principles.* Wiley-Liss; 2001. 273 p.
80. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11.
81. ROBERT S, PONCELET P, LACROIX R, ARNAUD L, GIRAUDO L, HAUCHARD A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009 Jan;7(1):190–7.
82. Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat-George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytometry Part A.* 2016 Feb;89(2):148–58.
83. Wright M. Nanoparticle Tracking Analysis for the Multiparameter Characterization and Counting of Nanoparticle Suspensions. In 2012. p. 511–24.
84. Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PST. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol.* 2017 Jul;232(7):1587–90.
85. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond).* 2013 Apr;124(7):423–41.
86. Stevens SM. Role of thrombophilia testing: con. *J Thromb Thrombolysis.* 2015 Apr 23;39(3):379–91.

87. Moll S. Thrombophilias-Practical Implications and Testing Caveats [Internet]. Vol. 21, J Thromb Thrombolysis. Springer Science + Business Media, Inc. Manufactured in The Netherlands; 2006. Available from: [www.nattinfo.org](http://www.nattinfo.org)
88. Favaloro EJ. The futility of thrombophilia testing. Clin Chem Lab Med. 2014 Jan 1;52(4).
89. Machin SJ. Pros and cons of thrombophilia testing: cons. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2003 Mar;1(3):412–3.
90. Heit JA. Thrombophilia: Common Questions on Laboratory Assessment and Management. Hematology. 2007 Jan 1;2007(1):127–35.
91. Martinelli I. Thrombophilia testing. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2003 Jun;1(6):1311–2.
92. Merriman L, Greaves M. Testing for thrombophilia: an evidence-based approach. Postgrad Med J. 2006 Nov;82(973):699–704.
93. Somma J, Sussman II, Rand JH. An Evaluation of Thrombophilia Screening in an Urban Tertiary Care Medical Center. Am J Clin Pathol. 2006 Jul 1;126(1):120–7.
94. Linnemann B, Hart C. Laboratory Diagnostics in Thrombophilia. Hamostaseologie. 2019 Feb 31;39(01):049–61.
95. Ong J, Bennett A. A review of laboratory considerations in thrombophilia testing. Pathology. 2022 Dec;54(7):835–41.
96. Favaloro EJ. Danger of false negative (exclusion) or false positive (diagnosis) for ‘congenital thrombophilia’ in the age of anticoagulants. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2019 May 27;57(6):873–82.
97. Chen Y, Li G, Liu ML. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2018 Feb;16(1):50–62.
98. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? Leukemia. 2020 Dec 14;34(12):3126–35.
99. Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. J Intensive Care. 2015;3(1):2.
100. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. Biomolecules. 2022 Jun 8;12(6).
101. Helbing T, Olivier C, Bode C, Moser M, Diehl P. Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension. World J Cardiol. 2014 Nov 26;6(11):1135–9.
102. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. Thromb Res. 2008;123(1):8–23.
103. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. Vox Sang. 2009 Apr;96(3):206–12.
104. Instruments M. NANOSIGHT NS300 OPERATING MANUAL NANOSIGHT NS300 OPERATING MANUAL Contents. 2015.