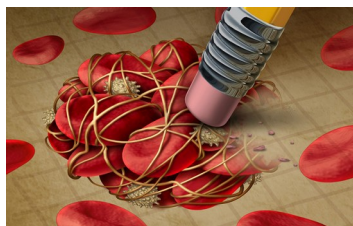




ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**"ΕΙΔΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΥΤΩΝ"**

υπό

ΔΗΜΗΤΡΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ ΜΑΡΧΑΒΙΛΑ

ΤΕ ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Θρόμβωση και Αντιθρομβωτική Αγωγή»

Λάρισα, 2023

Επιβλέπων:

Παρασκευή Κώτση Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής των μεταγγίσεων, *Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Π.Κώτση
2. Σ. Τσιάρα
3. Ε. Λευκού

Αναπληρωματικό μέλος:

Ε. Βλαχάκη

Τίτλος εργασίας στα αγγλικά:

Types of thrombophilia and their laboratory investigation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Μιλτιάδη Ματσάγκα καθηγητή του μεταπτυχιακού προγράμματος ‘Θρόμβωση και αντιθρομβωτική αγωγή’ και τους υπολοίπους καθηγητές του προγράμματος για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετέχω στο μεταπτυχιακό τους και για τις πολύτιμες γνώσεις τους που μου δίδαξαν.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κώτση για την συνεργασία της και την συμβολή της στη συγκεκριμένη εργασία, καθώς ήταν ιδιαίτερα καθοριστική .

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω απ’ τις ευχαριστίες μου την οικογένειά μου και τους συνεργάτες-συναδέλφους μου της αιματολογικής κλινικής του ΠΓΝ Λάρισας για την κατανόηση και την ψυχολογική τους υποστήριξη για την συνέχεια και εκπλήρωση της εργασίας μου .

Συντομογραφίες

ACA	Anticardiolipin antibody
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADP	Adenosine diphosphate
aPTT	Activated Partial Thromboplastin Time
APS	Antiphospholipid syndrome
CBS	Cystathionine β -synthase
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphates
DRVVT	Diluted Russel Venom Viper Time
ECM	Extracellular matrix
EIA	Enzyme immunoassay
ELFA	Enzyme--linked fluorescent assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FPIA	Fluorescence polarization immunoassay
ISI	International sensitivity index
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PCR	Polymerase chain reaction
PT	Prothrombin time
RID	Radial immunodiffusion
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TXA2	Thromboxane A2
vWF	von Willebrand Factor
VTE	Venous thromboembolism
APC	Activated protein C

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 7	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 9	
1.1 ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ.....	10
1.1.1 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ.....	11
1.1.2 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ- ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ.....	13
1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΗΞΗΣ.....	14
1.4 ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ.....	20
1.5 ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ- ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΕΣ.....	24
2.1 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ, ΠΡΩΤΕΪΝΗ C, ΠΡΩΤΕΪΝΗ S.....	26
2.1.1 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ.....	26
2.1.2 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C.....	27
2.1.3 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ S.....	28
2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V LEIDEN- ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C.....	29
2.3 FACTOR V CAMBRIDGE, FACTOR V HR2 HAPLOTYPЕ, FACTOR V HONG-KONG 30	
2.4 FACTOR XII (HAGEMAN TRAIT).....	31
2.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ G20210A.....	31
2.6 ΥΠΕΡΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΑΙΜΙΑ/ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ MTHFR.....	32
2.7 ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VIII.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΕΣ.....	36
3.1 ΗΛΙΚΙΑ	36
3.2 ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ.....	37
3.3 ΛΗΨΗ ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΠΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.....	38
3.4 ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ- ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (APS).....	40
3.5 ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΠΕΜΒΑΣΗ.....	40
3.6 ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ.....	42
4.1 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΗΞΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	44
4.1.1 ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ (PT, PROTHROMBIN TIME).....	45

4.1.2 ΧΡΟΝΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΡΙΚΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΛΑΣΤΙΝΗΣ (APTT, ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME).....	46
4.1.3 ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ.....	46
4.1.4 Δ-ΔΙΜΕΡΗ (D- DIMER).....	47
4.1.5 ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ 1 (PAI-1, PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1).....	50
4.1.6 ΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΗ.....	50
4.1.7 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C, S ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ.....	50
4.1.8 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ.....	52
4.1.9 ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C (APC-R, APC RESISTANCE).....	52
4.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ.....	53
4.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ- ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΝΟΨΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

Περίληψη

Η φλεβική θρομβοεμβολή, η οποία έχει άμεση σχέση με την πνευμονική εμβολή και την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, αποτελεί μια σύνθετη και πολυπαραγοντική νόσο. Η θρομβοφιλία ορίζεται ως η τάση για ανάπτυξη φλεβικής θρομβοεμβολής, λόγω της υπερπηκτικότητας του αίματος η οποία οφείλεται σε κληρονομικούς και επίκτητους παράγοντες. Οι κληρονομικές θρομβοφιλίες οφείλονται σε ελλείψεις σε φυσικούς αντιπηκτικούς παράγοντες (πρωτεΐνη C και S, αντιθρομβίνη), σε αυξημένα επίπεδα πηκτικών παραγόντων (παράγοντας VIII) και μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν την προθρομβίνη (μετάλλαξη G20210A) και τον παράγοντα V (παράγοντα V Leiden). Οι επίκτητες θρομβοφιλίες οφείλονται κυρίως στο αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο, στην υπερομοκυστεϊναιμία, στην κακοήθεια, στην εγκυμοσύνη και στην λήψη αντισυλληπτικών και ορμονικής υποκατάστασης. Η αποτελεσματική εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας βοηθά στην καλύτερη διάγνωση και στη βέλτιστη διαμόρφωση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Η εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας γίνεται σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες.

Σε συγκεκριμένους ασθενείς, η ανάλυση των επιπέδων της αντιθρομβίνης, των πρωτεϊνών C και S, καθώς και η διερεύνηση των συχνών μεταλλάξεων του παράγοντα V Leiden και της μετάλλαξης G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης αποτελεί συχνή πρακτική των εργαστηριακών εξετάσεων της κληρονομικής θρομβοφιλίας. Για την επίκτητη θρομβοφιλία, διερευνάται εργαστηριακά η παρουσία των αντικαρδιολιπιδικών αντισωμάτων (anticardiolipin antibody, ACA), του αντιπηκτικού του λύκου, και των ειδικών αντισωμάτων εναντίον της β2 γλυκοπρωτεΐνης I. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των εργαστηριακών εξετάσεων πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένο αιματολόγο και θα πρέπει να εξετάζονται διαφορετικές παράμετροι του κλινικού ιστορικού σε κάθε ασθενή (οξεία φάση θρομβοεμβολικού επεισοδίου, εγκυμοσύνη, αντιπηκτική αγωγή, ορμονική θεραπεία, ηλικία).

Λέξεις-Κλειδιά: Θρομβοφιλία, κληρονομική θρομβοφιλία, επίκτητη θρομβοφιλία, θρομβοφιλικό παράγοντες κινδύνου, παράγοντας V Leiden, σύνδρομο αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων, φλεβική εν τω βάθει θρόμβωση, εγκυμοσύνη.

Abstract

Venous thromboembolism, which is associated with deep vein thrombosis and pulmonary embolism, is a complex and multifactorial disease. Thrombophilia is defined as the tendency to develop venous thromboembolism due to hypercoagulability of the blood which is caused by hereditary and acquired factors. Hereditary thrombophilias are caused by deficiencies in natural anticoagulants (antithrombin, protein C, protein S), increased levels of clotting factors (factor VIII), and mutations in the genes encoding factor V (factor V Leiden) and prothrombin (G20210A mutation). Acquired thrombophilias are mainly due to antiphospholipid syndrome, hyperhomocysteinemia, malignancy, pregnancy, and taking contraceptives and hormone replacement therapy. Effective laboratory investigation of thrombophilia contributes to better diagnosis and optimal formulation of appropriate treatment. Laboratory investigation of thrombophilia is executed according to international guidelines.

In selected patients, measurement of antithrombin levels, protein C and S levels, and investigation of the frequent G20210A mutations in the prothrombin gene and factor V Leiden are part of the laboratory investigation of hereditary thrombophilia. For acquired thrombophilia, the presence of lupus anticoagulant, the presence of anticardiolipid antibodies as well as antibodies against β_2 glycoprotein I are analysed in the laboratory. The interpretation of the results of the laboratory tests must be done by a specialized hematologist and the special characteristics of each patient should be taken into account (acute phase of thromboembolic episode, pregnancy, anticoagulant therapy, hormone therapy, age).

Keywords: Thrombophilia, inherited thrombophilia, acquired thrombophilia, thrombophilic risk factors, factor V Leiden, antiphospholipid antibody syndrome, deep vein thrombosis, pregnancy.

Κεφάλαιο 1^ο: Μηχανισμοί αιμόστασης και θρομβοφιλία

Εισαγωγή

Η θρομβοφιλία συνιστά μια ομάδα διαταραχών της πήξης του αίματος, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης. Ειδικότερα, η θρομβοφιλία σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης πνευμονικής εμβολής και εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (1).

Ο όρος θρομβοφιλία χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1965 από τον Olav Egeberg (1916-77), που παρουσίασε τα ευρήματα των μελετών του που αφορούσαν περιπτώσεις κληρονομικής έλλειψης αντιθρομβίνης σε μια οικογένεια που εμφάνιζε πολλαπλές φλεβικές θρομβώσεις. Τα άτομα της συγκεκριμένης οικογένειας εμφάνιζαν μη φυσιολογικές τιμές της δράσης της αντιθρομβίνης και του συμπαράγοντα της ηπαρίνης. Η πάθηση κληρονομούνταν ως αυτοσωμικό επικρατές χαρακτηριστικό. Η μελέτη του Egeberg έδωσε ώθηση στην ανάπτυξη του ερευνητικού ενδιαφέροντος για την θρομβοφιλία. Στη σημερινή εποχή χάρη στην ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και της βιοχημείας, προστίθενται ολοένα και συχνότερα νέοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση θρομβοφιλικής διάθεσης σε ένα άτομο (2).

Η θρομβοφιλία οφείλεται σε κληρονομικά ή επίκτητα αίτια. Η θρομβοφιλία του V Leiden παράγοντα είναι η πιο συχνή κληρονομική μορφή θρομβοφιλίας (10-20% των περιπτώσεων φλεβικής θρομβοεμβολής). Ο επιπολασμός του παράγοντα V Leiden στις Η.Π.Α και στην Ευρώπη είναι 3-8% για τους ετεροζυγώτες και περίπου 1:5000 για τους ομοζυγώτες. Η σχετιζόμενη με την προθρομβίνη θρομβοφιλία συνιστά τη δεύτερη πιο συχνή μορφή θρομβοφιλίας, με γενετικό υπόβαθρο, που ανιχνεύεται στο 1,7-3% του γενικού πληθυσμού σε Ευρώπης και σε Η.Π.Α (σπάνια στην μαύρη φυλή). Η θρομβοφιλία μπορεί να έχει αυτοσωμική επικρατούσα, αυτοσωμική υπολειπόμενη ή X-συνδεδεμένη κληρονομικότητα. Ο γενετικός έλεγχος είναι χρήσιμος για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, για τη διαφορική διάγνωση, την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής και την ασυμπτωματική διάγνωση σε οικογένειες με γνωστή μετάλλαξη (3).

Οι κληρονομικές θρομβοφιλίες περιλαμβάνουν ανεπάρκειες σε συγκεκριμένους αντιπηκτικούς παράγοντες όπως είναι η πρωτεΐνη C και S, η αντιθρομβίνη, υψηλές συγκεντρώσεις πηκτικών παραγόντων (π.χ παράγοντας VIII) και μεταλλάξεις στα

γονίδια που κωδικοποιούν τον παράγοντα V (factor V Leiden) και την προθρομβίνη. Οι επίκτητες θρομβοφιλίες σχετίζονται κυρίως με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, την κακοήθεια, την κύηση και την λοχεία, την λήψη αντισυλληπτικών φαρμάκων και την θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (4).

Η καλύτερη κατανόηση των πιθανών παραγόντων κινδύνου και της παθοφυσιολογίας των διαφορετικών τύπων της θρομβοφιλίας είναι απαραίτητη για την επίτευξη έγκαιρης διάγνωσης, για την αποτελεσματικότερη προφύλαξη των ασθενών υψηλού κινδύνου και την καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση εκείνων με έκδηλη νόσο (5).

Στην παρούσα μελέτη, για την βιβλιογραφική ανασκόπηση χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες λέξεις- κλειδιά (thrombophilia, inherited thrombophilia, acquired thrombophilia, thrombophilia testing, thrombophilic risk factors) σε επιλεγμένες διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (PubMed, Medline, Scopus και Google scholar), έτσι ώστε να βρεθούν επιστημονικές μελέτες με θέμα τους διαφορετικούς τύπους θρομβοφιλίας, τους παράγοντες κινδύνου, την κλινική εικόνα και την εργαστηριακή διερεύνηση τους. Περιελήφθησαν μελέτες σχετικές με το θέμα που είναι γραμμένες στα ελληνικά και στα αγγλικά και δημοσιεύτηκαν από το 2000 και μετά.

1.1 Αιμόσταση

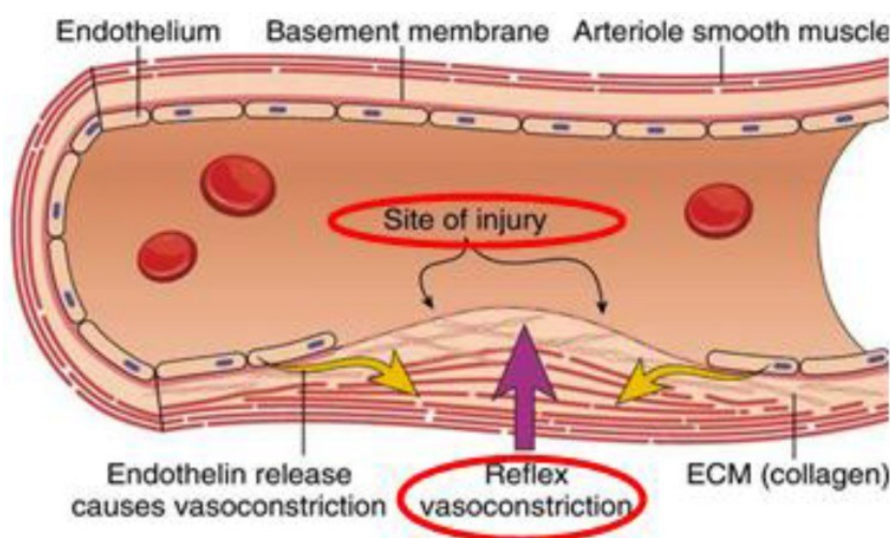
Το αίμα αποτελείται από τα έμμορφα κυτταρικά συστατικά τα οποία περιλαμβάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια και από το πλάσμα. Παραπάνω από το 99% των κυττάρων στο αίμα είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία λειτουργούν ως μεταφορείς οξυγόνου στα κύτταρα και τους ιστούς του σώματος. Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσφαιρίνη που είναι το βασικό συστατικό τους αποτελεί το όχημα μεταφοράς του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα, προς την αντίθετη κατεύθυνση. Τα λευκά αιμοσφαίρια λειτουργούν προστατευτικά απέναντι στις λοιμώξεις και στα κακοήγη νοσήματα ενώ τα αιμοπετάλια συμμετέχουν ενεργά στην πήξη του αίματος. Το πλάσμα του αίματος, το οποίο χαρακτηρίζεται από έντονο κίτρινο χρώμα, περιέχει ποικίλες ανόργανες και οργανικές ουσίες που είναι ευδιάλυτες στο νερό. Το χρώμα του οφείλεται στην παρουσία της χολερυθρίνης, η οποία αποτελεί παραπροϊόν της αποδόμησης της αιμοσφαιρίνης. Οι διαφορετικές πρωτεΐνες εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος και μπορούν να ταξινομηθούν στις σφαιρίνες στις λευκωματίνες, και στο ινωδογόνο. Εκτός από τις διάφορες ουσίες και τα μεταβολικά προϊόντα, το πλάσμα του αίματος είναι πλούσιο σε ποικιλία μεταλλικών ηλεκτρολυτών (6).

Τα αιμοπετάλια παίζουν καίριο ρόλο στην αιμόσταση καθώς συμμετέχουν στον σχηματισμό θρόμβου για τον περιορισμό της αιμορραγίας, σε περίπτωση τραυματισμού ενός αγγείου. Με τον όρο αιμόσταση (στάση ροής αίματος) περιγράφεται το σύνολο των βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο αγγειακό τοίχωμα που έχει υποστεί τον τραυματισμό. Οι μηχανισμοί της αιμόστασης στοχεύουν στην διατήρηση της ρευστότητας του αίματος, στην επίσχεση της αιμορραγίας και στην αποκατάσταση της στεγανότητας του αγγείου.

Οι κύριοι παράγοντες που σχετίζονται με την αιμόσταση είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος μαζί με τους παράγοντες πήξης. Η αιμόσταση μπορεί να διακριθεί στην πρωτογενή αιμόσταση, στην οποία συμμετέχουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα και τα αιμοπετάλια, και στην δευτερογενή αιμόσταση στην οποία ενεργοποιείται ο καταρράκτης πήξης του αίματος για τον σχηματισμό του ινώδους και την σταθεροποίηση του θρόμβου. Οι διεργασίες της πρωτογενούς και της δευτερογενούς αιμόστασης βρίσκονται σε ισορροπία και υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση, έτσι ώστε να αποφευχθεί η παθολογική αιμόσταση με την μορφή της αιμορραγίας ή της θρόμβωσης (8).

1.1.1 Πρωτογενής Αιμόσταση

Σε περίπτωση που έχουμε τραυματισμό ενός αγγείου, προκαλείται αγγειοσυστολή επιβράδυνση της ροής του αίματος και έτσι ελαττώνεται η αιμορραγία, ειδικά σε μικρού μεγέθους αγγεία. Η αγγειοσυστολή επιτυγχάνεται χάρη στην παραγωγή αγγειοσυσταλτικών ουσιών όπως είναι η αγγειοτενσίνη-II, και η ενδοθηλίνη-1 καθώς και στη δράση ουσιών όπως είναι η αδρεναλίνη, η οποία εντοπίζεται στην θέση τραυματισμού, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (9).



Εικόνα 1: Φάση αγγειοσύσπασης κατά την πρωτογενή αιμόσταση, για τον περιορισμό της ροής του αίματος και για την μείωση της αιμορραγίας (10).

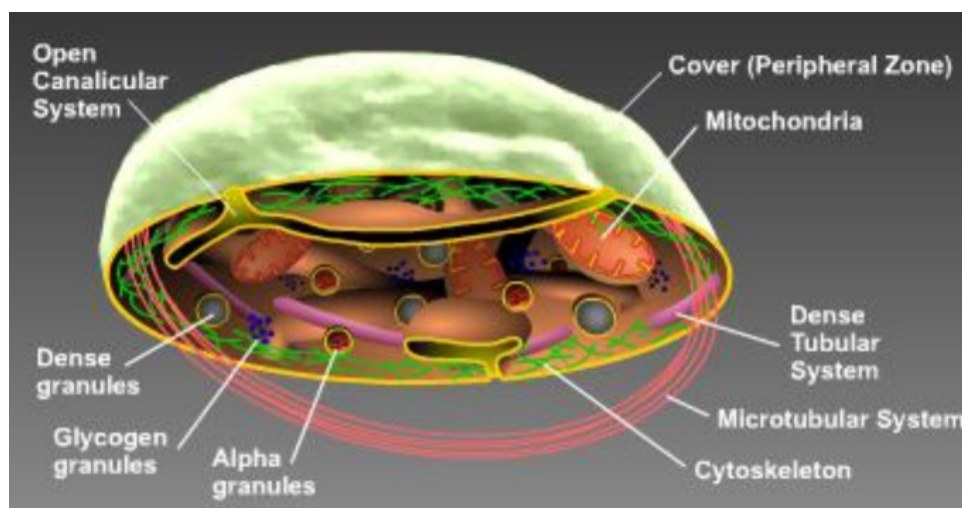
Σε αυτό το στάδιο, οι εκτεθειμένες ίνες κολλαγόνου του ενδοθηλίου θα οδηγήσουν σε μια σειρά αντιδράσεων. Επιπλέον, το εξωκυττάριο υπενδοθηλιακό στρώμα-(ECM, extracellular matrix) έχει υψηλή θρομβογονικότητα, προάγοντας την προσκόλληση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (9,10).

Η πρωτογενής αιμόσταση χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Τα στάδια για τον σχηματισμό του περιλαμβάνουν αρχικά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα διεγερμένα ή στο υπενδοθήλιο των αγγείων, την αντίδραση απελευθέρωσης την προσέλκυση και τελικά την συσσώρευση αιμοπεταλίων για τον σχηματισμό του θρόμβου (10).

Ο μηχανισμός προσκόλλησης των αιμοπεταλίων βασίζεται σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων οι οποίοι είναι εμπλουτισμένοι με γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς, ενσωματωμένους στη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων, και υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, των ιντεγκρινών, των υποδοχέων πλούσιων σε λευκίνη, των διαμεμβρανικών υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες και των σελεκτίνων. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο εκτεθειμένο υπενδοθήλιο των αγγείων επιτελείται μέσω του von Willebrand παράγοντα (vWF), που προσδένεται στον υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης Ib (Ib-IX-V), στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Ο vWF λειτουργεί ως μια συγκολλητική πρωτεΐνη, η οποία έχει την ικανότητα πρόσδεσης στο κολλαγόνο και αποτελεί την πρωτεΐνη μεταφοράς του παράγοντα VIII, στις θέσεις τραυματισμού των αγγείων (11).

Τα προσκολλημένα αιμοπετάλια υφίστανται αποκοκκίωση και απελευθερώνουν από τα κυτταροπλασματικά τους κοκκία σεροτονίνη, παράγοντες πήξης, παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και ADP (adenosine diphosphate) . Στη συνέχεια, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, αλλάζοντας σχήμα (από δισκοειδές σε σφαιρικό με ψευδοπόδια) και αυξάνουν την έκφραση των υποδοχέων ινωδογόνου στην επιφανειακή τους μεμβράνη (GpIIbIIIa). Ταυτόχρονα, τα αιμοπετάλια συνθέτουν και εκκρίνουν θρομβοξανή A₂ (TXA₂, thromboxane A₂), η οποία βοηθά στην αγγειοσυστολή και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, οι ιντεγκρίνες και η P-σελεκτίνη μετακινούνται από τη μεμβράνη των α-κοκκίων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων για να ενισχύσουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και να διευκολύνουν

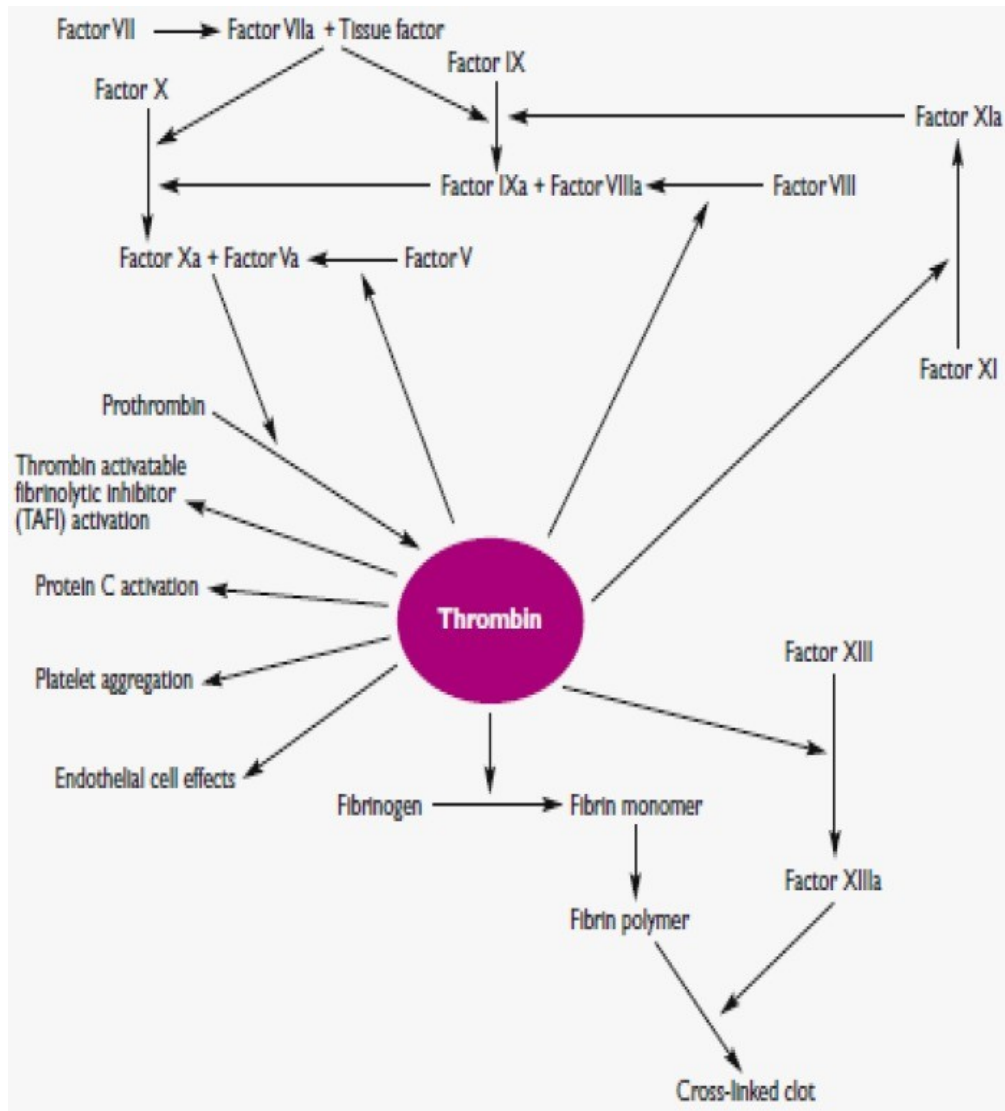
τη διαδικασία της αιμόστασης. Η συνεχόμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων οδηγεί στον σχηματισμό του πρωτογενούς αιμοπεταλιακού θρόμβου (12).



Εικόνα 2: Εσωτερική δομή αιμοπεταλίων (10).

1.1.2 Δευτερογενής Αιμόσταση- Καταρράκτης της πήξης

Ο καταρράκτης πήξης του αίματος ενεργοποιείται κατά την φάση της δευτερογενούς αιμόστασης και αποτελείται από δύο κύριες οδούς: (i) την ενδογενή (ενεργοποίηση συστήματος επαφής) (ii) την εξωγενή (οδός TF- ιστικού παράγοντα). Η διαδικασία πήξης του αίματος περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (i) την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου καταρράκτη αντιδράσεων των παραγόντων πήξης που οδηγούν στο σχηματισμό του ινώδους για τη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου (ii) τη δημιουργία της θρομβίνης από την προθρομβίνη (prothrombin), (iii) τον σχηματισμό ινώδους από το ινωδογόνο, που τελικά οδηγεί στον σχηματισμό ενός πιο σταθερού θρόμβου.



Εικόνα 3: Δευτερογενής αιμόσταση-ο καταρράκτης της πήξης. Η θρομβίνη παίζει ζωτικό ρόλο στη δημιουργία ινώδους διασπώντας το ινωδογόνο σε ινώδες και ενεργοποιώντας αρκετούς άλλους παράγοντες πήξης. Η θρομβίνη ρυθμίζει επίσης άλλες σημαντικές κυτταρικές δραστηριότητες μέσω υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες. Ταυτόχρονα, θα αυξήσει άμεσα τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την παραγωγή της TXA₂ για να εκφράσει τα ειδικά μόρια προσκόλλησης (13).

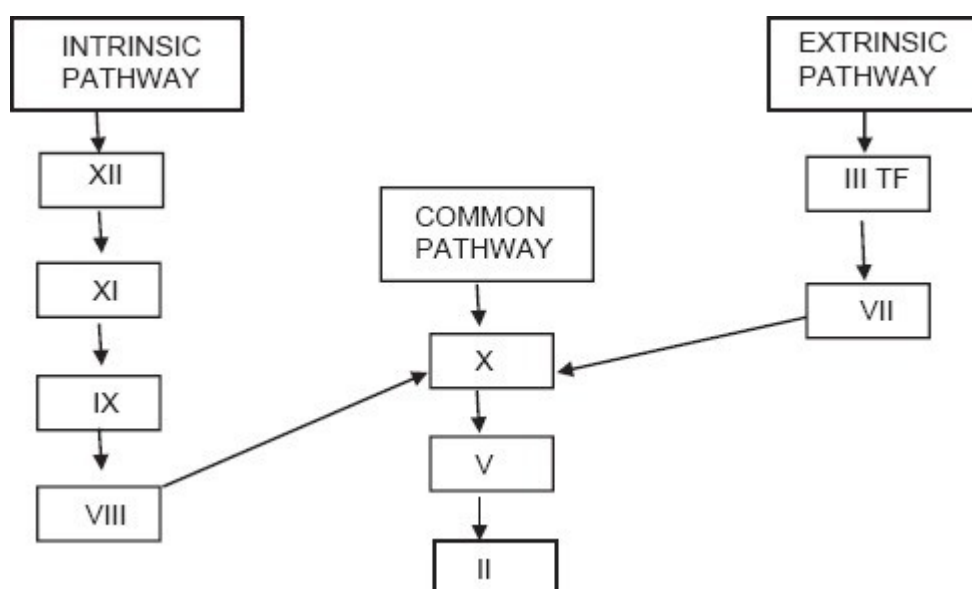
1.3 Παράγοντες του μηχανισμού πήξης

Οι παράγοντες του μηχανισμού πήξης είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσης, που αρχικά βρίσκονται σε ανενεργή μορφή. Χάρη στην δράση ειδικών ενζύμων, οι ανενεργές μορφές των πηκτικών παραγόντων μετατρέπονται σε ενεργές (πρωτεόλυση) (14, 15).

Η έναρξη της ενδογενούς οδού γίνεται χάρη στην ενεργοποίηση του παράγοντα XII (FXII) στο τοίχωμα των αγγείων. Η ενεργοποίηση του παράγοντα XII (FXII)

οφείλεται στην άμεση επαφή με επιφάνειες που έχουν αρνητικό φορτίο και ευοδώνεται από τον παράγοντα XI (FXI). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας XIIa, (FXIIa) δρα ως καταλύτης, και θέτει σε λειτουργία τον παράγοντα XI, (FXI) ο οποίος, με την βοήθεια των ιόντων ασβεστίου, ενεργοποιεί τον παράγοντα IX (FIX). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας IX (FIX) δημιουργεί ένα σύμπλοκο με τον παράγοντα VIII (FVIII) και με την συνδρομή των ιόντων ασβεστίου και ενός φωσφολιποξειδούς, ενεργοποιεί τον παράγοντα X (FX) σε Xa (FXa) στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων (14, 15).

Η ενεργοποίηση της εξωγενούς οδού πραγματοποιείται χάρη στην απελευθέρωση του TF, ο οποίος μετά από τον τραυματισμό των αγγείων, εκτίθεται στην επιφάνεια και δημιουργεί σύμπλοκο, με τη βοήθεια ιόντων ασβεστίου, με τον παράγοντα VII, (FVII). Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα X, (FX) ενώ το σύμπλεγμα που απαρτίζεται από τον TF και τον παράγοντα VIIa (FX) ενεργοποιεί την ενδογενή οδό χάρη στην ενεργοποίηση του παράγοντα IX (14, 15).



Εικόνα 4: Ενδογενής οδός, εξωγενής οδός και κοινή οδός στον καταρράκτη πήξης του αίματος (16).

Στην κοινή οδό του καταρράκτη πήξης, ο παράγοντας X που έχει ενεργοποιηθεί σχηματίζει σύμπλοκο με τον παράγοντα V, το οποίο συμμετέχει στην ενζυμική μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη (πρωτεάση σερίνης). Η θρομβίνη καταλύει την μετατροπή των μονομερών ινώδους με την απόσπαση των ινωδοπεπτιδίων A και B. Τα μονομερή διαπλέκονται μεταξύ του δημιουργώντας πολυμερή αδιάλυτα μόρια τα οποία σταθεροποιούνται με την δράση του παράγοντα FXIII για να σχηματίσουν τον θρόμβο αίματος. Ο θρόμβος που σχηματίστηκε προστατεύεται από τον αναστολέα της ινωδολύσης τον TAFI (Thrombin activatable fibrinolysis),

ενεργοποιημένο από την θρομβίνη. Οι βασικοί αναστολείς των πηκτικών παραγόντων είναι η αντιθρομβίνη, ο αναστολέας TFPI (Tissue factor pathway inhibitor), η πρωτεΐνη C και η πρωτεΐνη S (14, 15).

Πίνακας 1: Οι διαφορετικοί πηκτικοί παράγοντες που συμμετέχουν στον καταρράκτη πήξης του αίματος (9).

Πηκτικοί Παράγοντες	Όνομα	Πηγή	Οδός πήξης	Περιγραφή	Λειτουργία
I	Ινωδογόνο	Ήπαρ	Κοινή	Γλυκοπρωτεΐνη πλάσματος; Μοριακό βάρος (MW)= 340 kilodaltons (kDa)	Συγκολλητική ή πρωτεΐνη του ινώδους και του θρόμβου
II	Προθρομβίνη	Ήπαρ	Κοινή	Πρωτεάση σερίνης εξαρτώμενη από την βιταμίνη K; MW= 72 kDa	Ένζυμο με κεντρική θέση στον πηκτικό μηχανισμό
III	Ιστικός παράγοντας TF	Τραυματισμ ένα κύτταρα και αιμοπετάλια	Εξωγενής και ενδογενής	MW= 37 kDa	Λιποπρωτεΐν η- Εκκινητής της εξωγενούς οδού πήξης
IV	Ιόντα ασβεστίου	Οστά και έντερο	Ενδογενής , εξωγενής και κοινή	Απαραίτητα για την πρόσδεση των παραγόντων	Κατιόντα μετάλλου

Πηκτικοί Παράγοντες	Όνομα	Πηγή	Οδός πήξης	Περιγραφή	Λειτουργία
				πήξης	
V	Proaccelerin / Παράγοντας Labile	Ήπαρ και αιμοπετάλια	Ενδογενής και εξωγενής	MW = 330 kDa	Συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση της προθρομβίνης σε θρομβίνη)
VII	Προκονβερίνη	Ήπαρ	Εξωγενής	MW = 50 kDa; Πρωτεάση σερίνης εξαρτώμενη από την βιταμίνη K	Μαζί με τον TF εκκινούν την εξωγενή οδό (Παράγοντες IX και X)
VIII	Αντιαιμοφιλικός παράγοντας A (συμπαράγοντας)	Αιμοπετάλια και ενδοθήλιο	Ενδογενής	MW = 330 kDa	Συμπαράγοντας για την ενδογενή ενεργοποίηση του παράγοντα X
IX	Παράγοντας Christmas / Αντιαιμοφιλικός παράγοντας factor B	Ήπαρ	Ενδογενής	MW = 50 kDa; Πρωτεάση σερίνης εξαρτώμενη από την βιταμίνη K	Η ενεργοποιημένη μορφή του ενζύμου καταλύει την ενδογενή ενεργοποίηση του

Πηκτικοί Παράγοντες	Όνομα	Πηγή	Οδός πήξης	Περιγραφή	Λειτουργία
					παράγοντα X
X	Παράγοντας Stuart-Prower	Ήπαρ	Ενδογενής εξωγενής	MW = 58.9 kDa; Πρωτεάση σερίνης εξαρτώμενη από την βιταμίνη K	Η ενεργοποιημ ένη μορφή του ενζύμου είναι απαραίτητη για την κοινή οδό και την ενεργοποίησ η της προθρομβίνη ς σε θρομβίνη
XI	Plasma thromboplastin antecedent	Ήπαρ	Ενδογενής	MW = 160 kDa; Πρωτεάση σερίνης	Ενεργοποιεί τον ενεργοποιητ ή του παράγοντα IX
XII	Παράγοντας Hageman	Ήπαρ	Ενδογενής :	MW = 80 kDa; Πρωτεάση σερίνης	Ενεργοποιεί τους παράγοντες XI, VII και prekallikrein
XIII	Σταθεροποιητι κός παράγοντας ινώδους	Ήπαρ	Καταστέλ λει την ινωδόλυσ η	MW = 320 kDa, Δημιουργεί γέφυρες με	Σταθεροποιή ση θρόμβου

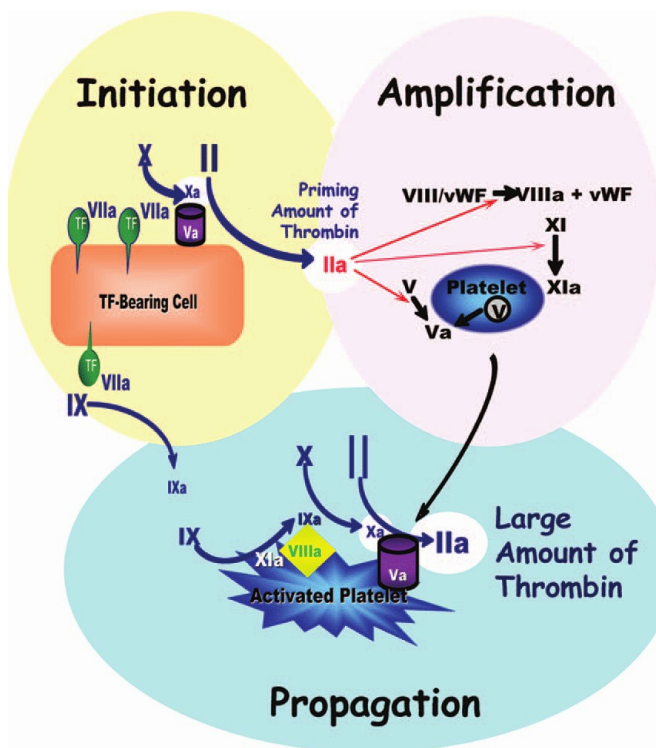
Πηκτικοί Παράγοντες	Όνομα	Πηγή	Οδός πήξης	Περιγραφή	Λειτουργία
				τα μόρια του ινώδους	

1.4 Το κυτταρικό μοντέλο της πήξης

Σύμφωνα με το κυτταρικό μοντέλο της αιμόστασης, η πήξη του αίματος πραγματοποιείται σε κυτταρικές επιφάνειες. Η αιμόσταση σύμφωνα με τους Hoffman και Monroe, λαμβάνει χώρα σε τρεις φάσεις. Κατά την έναρξη (initiation) της αιμόστασης, η έκθεση του ιστικού παράγοντα (TF) λόγω βλάβης του ενδοθηλίου σε περιπτώσεις τραυματισμού, φλεγμονής ή υποξίας έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα VII (VIIa). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο TF/VIIa οδηγεί σε ενεργοποίηση του X (Xa) και του IX (IXa), ενώ ο παράγοντας Xa, οδηγεί σε ενεργοποίηση του V (Va) (15, 16).

Εάν ο παράγοντας Xa απομακρυνθεί από την επιφάνεια των κυττάρων, αναστέλλεται από τον αναστολέα TFPI και την αντιθρομβίνη, και με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η δράση του ενεργοποιημένου παράγοντα X. Ο παράγοντας Xa, σε συνεργασία με τον ενεργοποιημένο παράγοντα V παράγει λίγη ποσότητα θρομβίνης, η οποία βοηθά στην ενεργοποίηση του παράγοντα VIII και των αιμοπεταλίων, αποσπώντας τον από τον φορέα του, τον παράγοντα Willebrand, κατά τη φάση της ενίσχυσης (amplification) της αιμόστασης. Κατά το στάδιο αυτό της ενίσχυσης διεγείρονται τα αιμοπετάλια, από τη μικρή ποσότητα θρομβίνης που δημιουργήθηκε κατά την έναρξη της αιμόστασης και εκφράζουν φωσφολιπίδια στην εξωτερική τους επιφάνεια, γεγονός που αυξάνει την προσκόλλησή και ενεργοποίησή των συμπλοκών των παραγόντων πήξεως (15, 16).

Το σύμπλεγμα παράγοντα von Willebrand/παράγοντα VIII με τη δράση της μικρής ποσότητας θρομβίνης διαχωρίζει τον παράγοντα vW, καθώς ενεργοποιεί τον παράγοντα VIII που παραμένει στα αιμοπετάλια. Συνεπώς, με την ολική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και αφού φέρουν στην επιφάνειά τους τους παράγοντες V και VIII που έχουν ενεργοποιηθεί, συμμετέχουν καθοριστικά στον σχηματισμό της θρομβίνης στην φάση της εξάπλωσης (propagation) (15, 16).



Εικόνα 5: Το κυτταρικό μοντέλο της αιμόστασης (16).

1.5 Θρομβοφιλία- Κλινική εικόνα

Σε υγιή άτομα, εντοπίζεται μια αιμοστατική ισορροπία στους μηχανισμούς της αιμορραγίας και της πήξης. Ωστόσο, υπάρχουν συγκεκριμένες παθήσεις που σχετίζονται είτε με αιμορραγικές είτε με θρομβωτικές επιπλοκές. Η θρομβοφιλία συνιστά μια πάθηση, η οποία ευνοεί την αυξημένη πηκτικότητα του αίματος, και επομένως τις πιθανότητες θρόμβωσης στα αγγεία. Η αρτηριακή θρόμβωση σχετίζεται με προ υπάρχουσες βλάβες στο ενδοθήλιο των αγγείων ενώ η φλεβική θρόμβωση με την μειωμένη ροή του αίματος στις φλέβες (17).

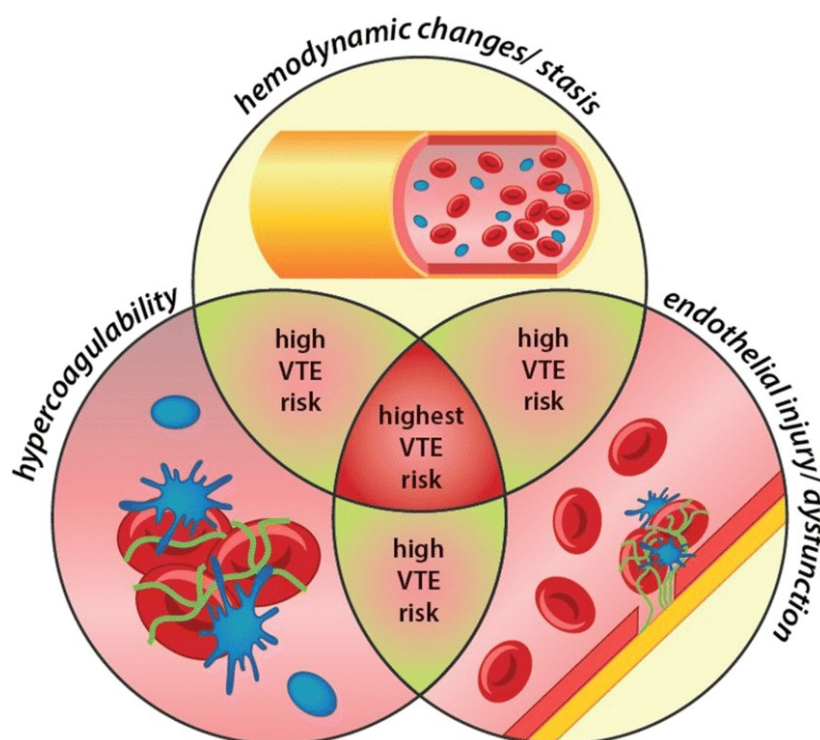
Η θρόμβωση μπορεί να προκαλέσει αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, έμφραγμα του μυοκαρδίου, πνευμονική εμβολή και εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση. Η φλεβική θρόμβωση (εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή) συνιστά μια συχνή πάθηση, ειδικά στις χώρες του δυτικού κόσμου με επίπτωση 1/1000 (18). Τα ποσοστά της φλεβικής θρόμβωσης αυξάνονται απότομα μετά τα 45 έτη και είναι σχετικά πιο αυξημένα στους άνδρες, συγκριτικά με τις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας. Μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα της πνευμονικής εμβολής είναι 29 έως 48 ανά 100.000 ανθρωποέτη ενώ οι αντίστοιχες τιμές για την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση είναι 45 έως 117 ανά 100.000 ανθρωποέτη (19).

Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση θρόμβωσης είναι η διενέργεια κάποιας χειρουργικής επέμβασης, η κύηση, η λοχεία, η αυξημένη ηλικία, η λήψη

ορμονών, η ακινησία κατά την νοσηλεία, οι νεοπλασίες, η παχυσαρκία καθώς και οι διαταραχές πήξης του αίματος (20).

Η αρτηριακή θρόμβωση σχετίζεται με την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Στην καρδιά, μικροθρόμβοι μπορεί να αναπτυχθούν ως αποτέλεσμα της στάσης του αίματος στις κοιλίες ή στους κόλπους, λόγω υποκείμενης βαλβιδικής νόσου, μυοκαρδιοπαθειών ή αρρυθμιών όπως η κολπική μαρμαρυγή που προδιαθέτει για ισχαιμικές εμβολές και καρδιαγγειακά επεισόδια (19). Η αρτηριακή θρόμβωση συνήθως ξεκινά με τη συσσώρευση λιπιδικών πλακών στο αρτηριακό τοίχωμα, προκαλώντας χρόνια φλεγμονή και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αρτηριακής θρόμβωσης σε σύγκριση με τη φλεβική θρόμβωση, και αυτό εξηγεί γιατί οι αντιαιμοπεταλικοί παράγοντες αποτελούν σημαντικά εργαλεία για τη πρόληψη και τη θεραπεία της αρτηριακής θρόμβωσης (21).

Η αυξημένη ηλικία των ασθενών συνιστά έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ενός θρομβωτικού επεισοδίου. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί της θρόμβωσης επηρεάζονται από τις διαταραχές στην κυκλοφορία του αίματος, τις διαταραχές που σχετίζονται με τους πηκτικούς παράγοντες και ευνοούν την εμφάνιση υπερπηκτικότητας του αίματος και από τις διαταραχές που εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων (τριάδα Virchow) (22).



Εικόνα 6: Η τριάδα του Virchow, η οποία αναλύει τις τρεις κατηγορίες παραγόντων κινδύνου που συνεισφέρουν στην αύξηση των πιθανοτήτων εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης (αιμοδυναμικές διαταραχές, βλάβη του ενδοθηλίου και υπερπηκτικότητα του αίματος.) (VTE, venous thromboembolism- φλεβική θρομβοεμβολή) (23).

Η θρομβοφιλία σχετίζεται με επίκτητους και γενετικούς παράγοντες. Η κληρονομική θρομβοφιλία διακρίνεται σε υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Ειδικότερα, η υψηλού κινδύνου θρομβοφιλία που σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων εντοπίζεται σε ομοζυγώτες ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους V Leiden και II (έλλειψη αντιθρομβίνης). Αντίθετα η θρομβοφιλία χαμηλού κινδύνου εντοπίζεται σε άτομα ετερόζυγα για τις μεταλλάξεις αυτές (24). Η επίκτητη θρομβοφιλία εμφανίζεται κατά την διάρκεια της ζωής ενός ασθενούς και σχετίζεται με ποικίλες καταστάσεις όπως είναι το αντιφωσfolιπιδικό συνδρόμο (APS, antiphospholipid syndrome), ένα χειρουργείο, η εγκυμοσύνη, η λήψη αντισυλληπτικών φαρμάκων, το κάπνισμα, η παχυσαρκία και η κακοήθεια (25).

Η κλινική εικόνα της θρομβοφιλίας περιλαμβάνει την πνευμονική εμβολή, την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, τις θρομβώσεις σε ασυνήθιστες εντοπίσεις (μεσεντέριες, ηπατικές, πυλαίες, εγκεφαλικές, νεφρικές φλέβες), τις αρτηριακές θρομβώσεις, την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (19, 20). Ειδικά στις γυναίκες, η θρομβοφιλία σχετίζεται με την πρόκληση πολλαπλών αποβολών και την εμφάνιση ποικίλων επιπλοκών κατά την εγκυμοσύνη όπως είναι η αποκόλληση πλακούντα, η καθυστερημένη ενδομήτρια ανάπτυξη του εμβρύου, ο ενδομήτριος θάνατος και η προεκλαμψία (26).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος θρομβοφιλία αναφέρεται στην τάση που έχει ένα άτομο να εμφανίσει θρόμβωση, εξαιτίας της ύπαρξης ενός ή περισσότερων κληρονομικών ή επίκτητων παραγόντων κινδύνου εκδήλωσης θρόμβωσης. Με άλλα λόγια, η πλειοψηφία των ατόμων με θρομβοφιλία δεν θα εμφανίσουν επεισόδια θρόμβωσης (17).

Κεφάλαιο 2^ο: Κληρονομικές θρομβοφιλίες

Η κληρονομική θρομβοφιλία αποτελεί μια γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη της φλεβικής θρομβοεμβολής. Οι πιο συχνές αιτίες της κληρονομικής θρομβοφιλίας είναι η μετάλλαξη G20210A στο γονίδιο της προθρομβίνης και ο παράγοντας V Leiden, που εντοπίζονται στο 50% με 70% των διαγνωσμένων περιστατικών με κληρονομική θρομβοφιλία. Οι λιγότερο συχνές μορφές κληρονομικής θρομβοφιλίας

περιλαμβάνουν τις ανεπάρκειες σε πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S και αντιθρομβίνη, (27). Επιπρόσθετα, εντοπίζονται εν μέρει κληρονομικές θρομβοφιλίες οι οποίες έχουν πολυπαραγοντική παθογένεια και περιλαμβάνουν την ήπια υπερομοκυστεϊναιμία καθώς και τις υψηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα VIII (28).

Πίνακας 2: Συχνότερες αιτίες της κληρονομικής θρομβοφιλίας (27, 28).

Κληρονομικές θρομβοφιλίες	Πολυπαραγοντικές και εν μέρει κληρονομικές θρομβοφιλίες
Παράγοντας V Leiden	Ήπια υπερομοκυστεϊναιμία
Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης	Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII
Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S Ανεπάρκεια αντιθρομβίνης	

Σημειώνεται ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός οικογενειών (περίπου 30-40%), με συμπτωματική θρομβοφιλία στην οποία δεν έχει εντοπιστεί καμία από τις γνωστές μεταλλάξεις. Η ανεξήγητη θρομβοφιλία είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις που δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη (1, 27).

2.1 Ανεπάρκεια σε αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S

2.1.1 Ανεπάρκεια σε αντιθρομβίνη

Η αντιθρομβίνη και οι πρωτεΐνες C και S αποτελούν σημαντικούς αναστολείς του μηχανισμού πήξης του αίματος. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα φυσικά αντιπηκτικά κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή ή υπολειπόμενο τρόπο. Οι ανεπάρκειες στους συγκεκριμένους αντιπηκτικούς παράγοντες σχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα θρόμβωσης, γεγονός που αναδεικνύεται από την αύξηση των επιπέδων της θρομβίνης στα άτομα με αυτές τις διαταραχές (3). Η κληρονομική ανεπάρκεια αντιθρομβίνης III έχει επιπολασμό 1:500-5000 στο γενικό πληθυσμό (3, 29).

Η αντιθρομβίνη είναι ένα φυσικό αντιπηκτικό του συστήματος πήξης. Η αντιθρομβίνη αναστέλλει την δράση της θρομβίνης και των παραγόντων Xa, IXa, XIa και XIIa, που έχουν ενεργοποιηθεί, γεγονός που ενισχύεται από την δράση της ηπαρίνης (29).

Οι ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο της αντιθρομβίνης σχετίζονται με μείωση της συγκέντρωσης ή της δράσης της αντιθρομβίνης, πράμα που προκαλεί μειωμένη αναστολή του παράγοντα Xa και της θρομβίνης και, κατά συνέπεια αυξημένη παραγωγή και δραστηριότητα της θρομβίνης. Περισσότερες από 250 διαφορετικές γενετικές βλάβες έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο της αντιθρομβίνης, συμπεριλαμβανομένων μεταλλάξεων αντικατάστασης, προσθήκης και έλλειψης βάσεων. Οι μεταλλάξεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε εκείνες που οδηγούν σε μειωμένη σύνθεση μιας λειτουργικής πρωτεΐνης και σε εκείνες που έχουν σαν αποτέλεσμα την σύνθεση μιας μη φυσιολογικής πρωτεΐνης με μειωμένη λειτουργική δραστηριότητα. Ειδικότερα, οι τελευταίες περιλαμβάνουν εκείνες που προκαλούν αλλαγή στο ενεργό κέντρο της αντιθρομβίνης, μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της ηπαρίνης και ελαττωμένες συγκεντρώσεις της μεταλλαγμένης αντιθρομβίνης που είναι πιθανό να οφείλονται σε μικρότερη παραγωγή, έκκριση και σε έντονο καταβολισμό (30).

Περιπτώσεις ομοζυγωτίας σε μεταλλάξεις της αντιθρομβίνης είναι σπάνιες, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ομοζυγωτία σχετίζεται με τον εμβρυϊκό θάνατο (29, 30). Ο κίνδυνος εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολής σε ασυμπτωματικούς φορείς με ανεπάρκεια στην αντιθρομβίνη είναι περίπου 2%. Μια πληθυσμιακή μελέτη έδειξε

ότι η ανεπάρκεια στην αντιθρομβίνη συσχετίστηκε με πενταπλάσιο (95% CI 0,7–34) κίνδυνο ενός πρώτου επεισοδίου εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (31).

2.1.2 Ανεπάρκεια σε πρωτεΐνη C

Η πρωτεΐνη C είναι μια πρωτεΐνη που εξαρτάται από την βιταμίνη K, που ενεργοποιείται από το σύμπλοκο θρομβίνης/ θρομβομοντουλίνης. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC, activated protein C) αναστέλλει τους παράγοντες Va και VIIIa, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του παράγοντα X και στο σχηματισμό της θρομβίνης. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η διαδικασία της πήξης του αίματος. Η πρωτεΐνη C για να δράσει χρειάζεται ως συμπαράγοντα την πρωτεΐνη S. Η πρώτη μελέτη για την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C δημοσιεύτηκε το 1981. Στις περιπτώσεις που η πρωτεΐνη C δεν λειτουργεί σωστά ή δεν παράγεται στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, αυξάνεται η παραγωγή της θρομβίνης και ο κίνδυνος εμφάνισης θρόμβωσης (28).

Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 0.2% έως 0.4%. Η μέτρια ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C επηρεάζει περίπου 1:500 άτομα. Σοβαρή ανεπάρκεια εμφανίζεται περίπου σε 1:4000000 νεογνά. Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C ανιχνεύεται λιγότερο συχνά από την θρομβοφιλία του παράγοντα V Leiden ή την μετάλλαξη G20210A του γονιδίου προθρομβίνης. Η συχνότητα της πάθησης στους Καυκάσιους εκτιμάται ότι είναι 0,2–0,5% (32).

Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή και υπολειπόμενο τρόπο και σχετίζεται με την οικογενή φλεβική θρόμβωση. Το γονίδιο της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (2q13–14). Έχουν διερευνηθεί δυο υποτύποι (τύπου I και II) της ετερόζυγης ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C, με βάση λειτουργικές και ανοσολογικές μελέτες. Η τύπου I ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C είναι η πιο συχνή. Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ετερόζυγοι και παρουσιάζουν ελαττωμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης C περίπου κατά 50% του φυσιολογικού. Οι ομοζυγώτες που δεν παράγουν καθόλου πρωτεΐνη C είναι σπάνιοι (33).

Το γονίδιο της ανθρώπινης πρωτεΐνης C (*PROC*) περιλαμβάνει 9 εξόνια και η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C έχει συσχετιστεί με περισσότερες από 270 μεταλλάξεις. Πάνω από το 50% των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα είναι μη νοηματικές (nonsense) και παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις. Άλλοι τύποι μεταλλάξεων περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου, προσθήκες και ελλείψεις βάσεων και μεταλλάξεις ματίσματος. Υπάρχει έντονη φαινοτυπική

ποικιλομορφία στους ετεροζυγώτες ασθενείς με τύπου I ανεπάρκεια πρωτεΐνης C. Σημειώνεται ότι παρόμοιες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί και σε ασυμπτωματικά άτομα, γεγονός που δείχνει ότι η μετάλλαξη του γονιδίου της πρωτεΐνης C από μόνη της δεν αποτελεί την κύρια αιτία για την φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρατηρείται. Τα άτομα με τύπου II ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C έχουν κανονικά επίπεδα της πρωτεΐνης C με ελαττωμένη λειτουργικότητα. Μια ποικιλία σημειακών μεταλλάξεων έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο της πρωτεΐνης C (34).

Τα κλινικά συμπτώματα της ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C περιλαμβάνουν την εμφάνιση φλεβικής θρομβοεμβολής. Σημειώνεται ότι σε ασθενείς με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C έχουν καταγραφεί περιστατικά θρομβώσεων σε ασυνήθιστες εντοπίσεις (νεφρικές φλέβες, εγκεφαλικές φλέβες, φλέβες οφθαλμών, μεσεντέριες και πυλαίες φλέβες) (35).

Μπορεί να εμφανιστούν δερματικές νεκρώσεις, κατά την έναρξη της θεραπείας με αντιβιταμίνες K. Τα νεογνά που είναι ομόζυγα στην έλλειψη της πρωτεΐνης C εκδηλώνουν σοβαρή θρόμβωση και το σύνδρομο της κεραυνοβόλου πορφύρας το οποίο χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση εκχυμώσεων, δερματικών νεκρώσεων, θρόμβωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τύφλωση (36).

2.1.3 Ανεπάρκεια σε πρωτεΐνη S

Η πρώτη μελέτη που δημοσιεύτηκε για την ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη S δημοσιεύτηκε το 1984. Η πρωτεΐνη S είναι μια πρωτεΐνη που εξαρτάται από την βιταμίνη K και συνιστά τον συμπαράγοντα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Στο αίμα ανιχνεύεται με την ελεύθερη μορφή και την συνδεδεμένη μορφή με την δεσμευτική πρωτεΐνη C4b. Η ελεύθερη πρωτεΐνη S προσδένεται στην πρωτεΐνη C στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων και παίρνει μέρος στην απενεργοποίηση του παράγοντα Va, αυξάνοντας τα ποσοστά υδρόλυσης του κατά 20 φορές από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Η πρωτεΐνη S μαζί με τον παράγοντα V, βοηθά στην αναστολή του παράγοντα από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη S ως αντιπηκτικός παράγοντας δρα στον παράγοντα Xa και στην προθρομβινάση, ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη C που έχει ενεργοποιηθεί (37).

Η ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη S μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις ομάδες ανεπαρκειών, ανάλογα με το αν εντοπίζονται ποιοτικές ή ποσοτικές διαταραχές της πρωτεΐνης. Στον τύπο I, καταγράφεται χαμηλή συγκέντρωση της ελεύθερης και της συνδεδεμένης πρωτεΐνης S. Στον τύπο II, τα επίπεδα της πρωτεΐνης S είναι

φυσιολογικά αλλά εντοπίζεται δυσλειτουργική πρωτεΐνη. Στον τύπο III, παρατηρούνται φυσιολογικά επίπεδα της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης S και χαμηλή συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτεΐνης S (38).

Εντοπίζονται δύο αλληλόμορφα γονίδια της πρωτεΐνης S, τα PROS1 (ενεργό γονίδιο) και PROS2 (ψευδογονίδιο), που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 3. Το PROS1 είναι το ενεργό γονίδιο το οποίο αποτελείται από 15 εξόνια. Το PROS2 θεωρείται ότι είναι ανενεργό ψευδογονίδιο. Το PROS2 ταυτίζεται κατά 97% με το ενεργό γονίδιο, αλλά δεν έχει το εξόνιο I. Στο υπόλοιπο 3% της αλληλουχίας του PROS2 εντοπίζονται πολλαπλές μετατοπίσεις πλαισίου και κωδικόνια λήξης. Διαφορετικές γενετικές διαταραχές μπορεί να προκαλέσουν ποιοτικές ή ποσοτικές διαταραχές της πρωτεΐνης S, όπως σημειακές μεταλλάξεις, προσθήκες και ελλείψεις βάσεων στο γονίδιο PROS1. Έχουν αναφερθεί πάνω από 200 διαφορετικές τέτοιες μεταλλάξεις σε ασθενείς με ανεπάρκεια στην πρωτεΐνη S, κυρίως τύπου I και III (37).

Στο γενικό πληθυσμό, ο επιπολασμός της ανεπάρκειας της πρωτεΐνης S υπολογίζεται στο 0,03-0,1%. Το ποσοστό εμφάνισής της σε ασθενείς που έχουν υποστεί θρομβοεμβολικά επεισόδια υπολογίζεται στο 2%. Η μέτρια ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S εκτιμάται ότι επηρεάζει 1:500 άτομα. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν επαναλαμβανόμενα θρομβοεμβολικά επεισόδια τα οποία είναι πιθανό να συνοδεύονται από νεκρωτικές δερματικές αλλοιώσεις. Η σοβαρή ανεπάρκεια είναι σπάνια και ο επιπολασμός της είναι άγνωστος. Τα ομόζυγα άτομα τα οποία είναι σπάνια παρουσιάζουν οξεία νεογνική θρομβοπενική πορφύρα (39).

2.2 Παράγοντας V Leiden- Αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C

Ο πηκτικός παράγοντας V δρα ως συμπαράγοντας του παράγοντα Xa (FXa) για την μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η ενεργοποίηση του παράγοντα V (FV) από την θρομβίνη επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς πρωτεολυτικών διασπάσεων. Η ενεργή μορφή του παράγοντα V (FV) διασπάται και αναστέλλεται η δράση του από την πρωτεΐνη C (40).

Η θρομβοφιλία που οφείλεται στον παράγοντα V Leiden είναι η πιο συχνή κληρονομική μορφή θρομβοφιλίας. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Στην Καυκάσια φυλή αντιπροσωπεύει το 40-50% των περιπτώσεων συγγενούς θρομβοφιλίας. Ο επιπολασμός του παράγοντα V Leiden στις Η.Π.Α και στην Ευρώπη είναι 3-8% για τους ετεροζυγώτες και περίπου 1:5000 για τους ομόζυγους.

Οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν θρομβωτικό επεισόδιο κατά 7 φορές ενώ στα ομόζυγα άτομα ο κίνδυνος εμφάνισης θρόμβωσης είναι αυξημένος κατά 80 φορές (41). Στους ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή, η συχνότητα του παράγοντα V Leiden είναι 10-26%. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ομάδες ατόμων από Ελλάδα, Σουηδία και Λίβανο καταγράφηκαν ποσοστά έως 15% του παράγοντα V Leiden στο γενικό πληθυσμό ενώ σε χώρες της Ασίας (Κίνα, Ιαπωνία), η συχνότητα του παράγοντα V Leiden ήταν σχεδόν μηδενική (41, 42). Ο παράγοντας V Leiden προκαλείται από μια σημειακή μετάλλαξη (G1691A), αντικατάστασης βάσης στο γονίδιο *F5* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1q23 και κωδικοποιεί τον V παράγοντα του καταρράκτη πήξης. Ειδικότερα, αντικαθίσταται το αμινοξύ αργινίνη από γλουταμίνη σε σημείο της πρωτεϊνικής αλυσίδας, στο οποίο φυσιολογικά δρα η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, αδρανοποιώντας τον παράγοντα Va. Αυτή η αλλαγή οδηγεί στην ανάπτυξη αντίστασης του παράγοντα V στην πρωτεολυτική δράση της πρωτεΐνης C (42).

2.3 Factor V Cambridge, Factor V HR2 Haplotype, Factor V Hong-Kong

Έχουν εντοπιστεί αρκετές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *F5* που προκαλούν αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C σε διαφορετικούς πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των Arg306→Gly (FV Hong Kong), Arg306→Thr (FV Cambridge), Glu666→Asp (άγνωστος μηχανισμός), Ile359→Thr (FV Liverpool) και Ala512→Val (FV Bonn) (43).

Ο HR2 πολυμορφισμός συνιστά έναν ήπιο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση φλεβική θρόμβωση. Στα ετερόζυγα άτομα, ο κίνδυνος θρόμβωσης είναι αυξημένος κατά 1,8 φορές. Οι ετεροζυγώτες που είναι θετικοί για τη μετάλλαξη του V Leiden παράγοντα και τον πολυμορφισμό HR2 παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες φλεβικών θρομβώσεων (44).

Οι προηγούμενες παραλλαγές του παράγοντα V προκαλούν ενδιάμεση αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, συγκριτικά με τον παράγοντα V και V Leiden. Για αυτό το λόγο, συνδέονται με χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης θρομβοεμβολής, σε σχέση με τον παράγοντα V Leiden (43).

2.4 Factor XII (Hageman Trait)

Ο παράγοντας Hageman (παράγοντας XII) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ενδογενούς συστήματος πήξης που μετράται από τον ενεργοποιημένο μερικό χρόνο θρομβοπλαστίνης (aPPT, Activated Partial Thromboplastin Time). Η ανεπάρκεια του παράγοντα Hageman κληρονομείται συχνότερα με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, αλλά μπορεί να κληρονομηθεί επίσης με αυτοσωμική επικρατούσα κληρονομικότητα. Ο ακριβής επιπολασμός αυτής της πάθησης δεν είναι γνωστός, καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ασυμπτωματική (45, 46).

2.5 Μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης G20210A

Η προθρομβίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο της θρομβίνης, ενός βιταμινο-K εξαρτώμενου παράγοντα ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος, αφού μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες. Το γονίδιο της προθρομβίνης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11, στην γενετική θέση 11p11-q12 και περιλαμβάνει τις 5 και 3' αμετάφραστες περιοχές και 14 εξόνια τα οποία διαχωρίζονται από 13 εσώνια. Στο γονίδιο εντοπίστηκε μια σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης, από τους Roost et al, η οποία συσχετίστηκε με τον κίνδυνο εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης. Ειδικότερα, αντικαθίσταται μια γουανίνη από μια αδενίνη, στη θέση 20210 του γονιδίου της προθρομβίνης, στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει σαν αποτέλεσμα τα διαφορετικά ποσοστά πολύ-αδενυλίωσης στο παραγόμενο mRNA, τα οποία προκαλούν αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης του (47).

Η εξελικτική μελέτη των γονοτύπων δείχνει ότι η μετάλλαξη G20210A παρουσιάστηκε πριν από 24.000 χρόνια σε έναν κοινό πρόγονο, κατά την απόσχιση των Καυκασίων από τους πληθυσμούς με μογγολική προέλευση. Το ίδιο ισχύει και για την μετάλλαξη V Leiden (48).

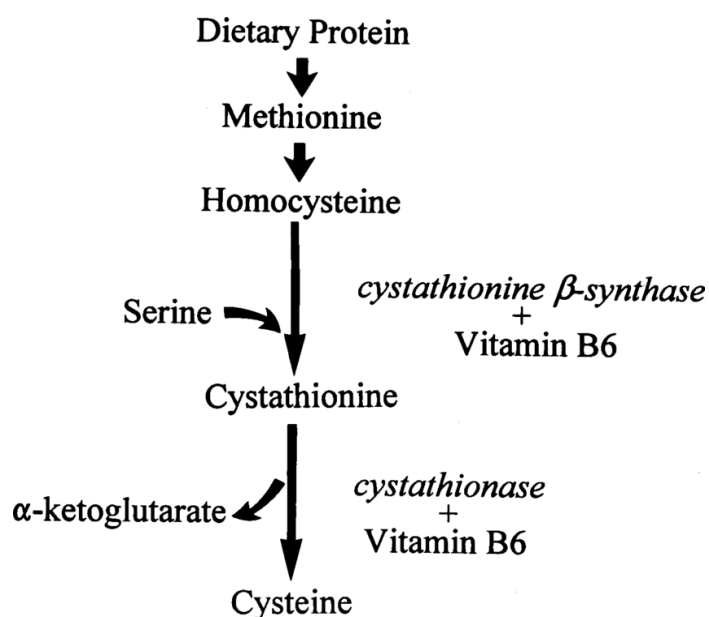
Στα ετερόζυγα άτομα, η συγκεκριμένη μετάλλαξη χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης της προθρομβίνης στο αίμα κατά περίπου 30% (μέση συγκέντρωση 1.32 U/ml με εύρος τιμών 0.95-1.78 U/ml), συγκριτικά με τα άτομα με φυσιολογικό γονότυπο (1.05 U/ml, 0.55-1.56 U/ml). Ο κίνδυνος εμφάνισης θρόμβωσης στα ετερόζυγα άτομα είναι 2,8 φορές υψηλότερος. Τα ομόζυγα άτομα με την μετάλλαξη A20210A έχουν μέση συγκέντρωση προθρομβίνης περίπου 1.70 U/ml. Η υψηλή συγκέντρωση προθρομβίνης στο αίμα αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης εν τω βάθει

φλεβικής θρόμβωσης. Τα υψηλά επίπεδα προθρομβίνης οδηγούν σε αύξηση του σχηματισμού θρόμβων που χαρακτηρίζονται από λεπτά ινίδια ινικής, τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ινωδόλυση (49).

Αναφορικά με τα επιδημιολογικά στοιχεία της μετάλλαξης G20210A, στον γενικό πληθυσμό καταγράφεται σε ποσοστό 0,7-6,5%. Σε χώρες της Ν. Ευρώπης, (Ισπανία), η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης G20210A είναι διπλάσια συγκριτικά με χώρες της βόρειας Ευρώπης (3 vs 1,7%). Η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης είναι χαμηλή σε πληθυσμούς της Ασίας και της Αφρικής. Σε ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή, η μετάλλαξη G20210A εντοπίστηκε στο 6,2%. Σημειώνεται ότι η ταυτόχρονη παρουσία μιας άλλης κληρονομικής θρομβοφιλίας, σε άτομα με την μετάλλαξη G20210A είναι συχνό φαινόμενο (50,51).

2.6 Υπερομοκυστεϊναιμία/μετάλλαξη MTHFR

Το θειούχο αμινοξύ ομοκυστεΐνη προέρχεται από την απομεθυλίωση του αμινοξέος μεθειονίνη. Η μεθειονίνη μπορεί να μετατραπεί σε ομοκυστεΐνη, που με την σειρά της, χάρη στο ένζυμο β-συνθάση της κυσταθειονίνης (cystathionine β-synthase, CBS) και της βιταμίνης B6, μετατρέπεται σε κυστεΐνη και κυσταθειονίνη. Επίσης, η μεθειονίνη μπορεί να μεθυλιωθεί ξανά, χάρη στην δράση της συνθετάσης της μεθειονίνης, της 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγάσης (methylenetetrahydrofolatereductase, MTHFR) και μεθυλτρανσφεράση βεταΐνης-ομοκυστεΐνης (BHMT). Ως συμπαραγόντες δρουν τα παράγωγα του φυλλικού οξέος, η βιταμίνη B12 και η βεταΐνη (52).



Εικόνα 7: Μεταβολική οδός για τη μετατροπή της μεθειονίνης σε κυστεΐνη (53).

Η υπερομοκυστεΐναιμία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση ($>15 \mu\text{mol/L}$) ομοκυστεΐνης στο αίμα και είναι είτε επίκτητη ή κληρονομική. Η κληρονομική υπερομοκυστεΐναιμία προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις που αφορούν τα γονίδια που κωδικοποιούν την MTHFR και την CBS (53).

Το ανθρώπινο γονίδιο της MTHFR περιέχει 12 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p36.3. Οι συχνότεροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της MTHFR περιλαμβάνουν στη θέση 677 μια αντικατάσταση βάσης, (κυτοσίνη σε θυμίνη) και μια αντικατάσταση βάσης στη θέση 1298 (αδενίνη σε κυτοσίνη). Ο πρώτος πολυμορφισμός έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση του 222^ο αμινοξέος αλανίνη από βαλίνη, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της θερμοευαισθησίας και μείωση της δραστηριότητας της MTHFR. Ο δεύτερος πολυμορφισμός έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση στη θέση 429 του γλουταμινικού οξέος από την αλανίνη, η οποία δεν επηρεάζει σημαντικά την δραστηριότητα του ενζύμου. Επιπρόσθετα, οι ανεπάρκειες σε φυλλικό οξύ, βιταμίνη B12 και B6 μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση της υπερομοκυστεΐναιμίας (54).

Το ανθρώπινο γονίδιο της CBS περιέχει 17 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21q22.3. Κωδικοποιεί το ένζυμο CBS μήκους 552 αμινοξέων, το οποίο αποτελείται από μια τετραμερή πρωτεΐνη. Γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο CBS διακόπτουν την παραγωγή του ενζύμου, εμποδίζοντας τον περαιτέρω μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης. Έτσι, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης αυξάνονται στο αίμα και η περίσσεια αυτής απεκκρίνεται στα ούρα. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Human Gene Mutation Database, το 2022, αναφέρονται σχεδόν 200 διαφορετικές γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο CBS (55).

Ο παθογενετικός μηχανισμός των θρομβώσεων στην υπερομοκυστεΐναιμία περιλαμβάνει διαταραχές στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, αύξηση του αριθμού των λείων μυϊκών ινών, παρεμπόδιση της δράσης της προστακυκλίνης και του μονοξειδίου του αζώτου (NO), αγγειίτιδα και αθηροσκλήρωση. Επιπρόσθετα, στην υπερομοκυστεΐναιμία παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του TF και αδρανοποίηση του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C (56).

Τα υψηλά επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο αίμα προκαλούν αύξηση του κινδύνου φλεβικής θρομβοεμβολής, αθηροσκλήρυνσης των αγγείων, καρδιαγγειακής νόσου και εγκεφαλικών επεισοδίων. Στο γενικό πληθυσμό, τα αυξημένα επίπεδα της

ομοκυστεΐνης (16-100 $\mu\text{mol/L}$) εντοπίζονται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 5 έως 7%. Η ήπια υπερομοκυστεϊναιμία σχετίζεται με υποτροπές της φλεβικής θρόμβωσης, ενώ στις περιπτώσεις ασθενών με άλλη κληρονομική θρομβοφιλία, αυξάνεται ο κίνδυνος θρόμβωσης κατά 10 φορές (54).

Η επίπτωση της σοβαρής υπερομοκυστεϊναιμίας σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογίζεται σε 1:344.000. Τα πιο κοινά συμπτώματα που σχετίζονται με αυτή την πάθηση είναι οφθαλμικές ανωμαλίες όπως είναι οι έκτοποι φακοί, η μυωπία και το γλαύκωμα, οι σκελετικές ανωμαλίες (σύνδρομο Marfan), η οστεοπόρωση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι επιπλοκές στην εγκυμοσύνη, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η νοητική υστέρηση και οι θρομβοεμβολές. Τα βρέφη που αναπτύσσουν ομοκυστινουρία μπορεί να εμφανίζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη και χαμηλό βάρος (57).

Οι ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις που αφορούν την MTHFR ή την CBS εμφανίζουν ήπια (16 - 24 $\mu\text{mol/L}$) ή μέτρια υπερομοκυστεϊναιμία (25 - 100 $\mu\text{mol/L}$). Οι ομοζυγώτες για την μετάλλαξη C677T του MTHFR παρουσιάζουν 25% αύξηση της ομοκυστεΐνης, η οποία συνυπάρχει με ανεπάρκεια σε φυλλικό οξύ (56). Τα ομόζυγα άτομα για τις μεταλλάξεις που αφορούν την CBS εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης (>100 $\mu\text{mol/L}$), αθηροσκλήρωση, επεισόδια φλεβικών θρομβώσεων, νοητική καθυστέρηση, ανωμαλίες του σκελετού και έκτοπους φακούς (57).

2.7 Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII

Ο παράγοντας VIII έχει κεντρική θέση στον καταρράκτη πήξης του αίματος. Ο παράγοντας VIII, που κυκλοφορεί στο πλάσμα με τον παράγοντα von Willebrand σε ανενεργή μορφή, είναι ένας σημαντικός ενδογενής παράγοντας στην οδό πήξης. Ο παράγοντας VIII όταν ενεργοποιείται, δρα στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων ως ενζυματικός συμπαράγοντας για τον ενεργοποιημένο παράγοντα IX (FIXa), προάγοντας τη μετατροπή του παράγοντα X στην ενεργοποιημένη του μορφή (Xa) και πυροδοτώντας μια σειρά από αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του ινώδους και του θρόμβου. Η θρομβίνη μετατρέπει τον παράγοντα VIII στην ενεργή του μορφή, η οποία λειτουργεί ως συμπαράγοντας του παράγοντα IXa (58).

Ο παράγοντας VIII διασπάται με πρωτεόλυση από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C στις θέσεις Arg336 και Arg562. Η αύξηση του παράγοντα VIII σχετίζεται με την αύξηση του παράγοντα von Willebrand. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του παράγοντα

VIII μπορούν να προκαλέσουν αύξηση του κινδύνου φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης και εμφάνισης υποτροπών των θρομβωτικών επεισοδίων. (59).

Ο υπαίτιος μηχανισμός για την εμφάνιση των υψηλών επιπέδων του παράγοντα VIII δεν έχει βρεθεί ακόμη. Φαίνεται ότι οι καθοριστικοί παράγοντες των επιπέδων του παράγοντα VIII στο πλάσμα του αίματος είναι η συγκέντρωση του παράγοντα von Willebrand και οι ABO ομάδες αίματος. Ειδικότερα, η ομάδα αίματος O σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του παράγοντα VIII και von Willebrand (μέσο όρο 22,4 IU /dl και 31,5 IU/dl αντίστοιχα) (60, 61).

Επιπρόσθετα, ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στον γενετικό τόπο rs505922 που ελέγχει τις ομάδες αίματος συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα του παράγοντα VIII και τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού επεισοδίου. Ο παράγοντας VIII κωδικοποιείται από το γονίδιο *F8* (186 kb, 26 εξόνια), το οποίο βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X. Μερικός γονιδιακός διπλασιασμός του γονιδίου *F8* (παράγοντας VII *radua*) σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VII και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης (61).

Κεφάλαιο 3^ο: Επίκτητες θρομβοφιλίες

Οι επίκτητες θρομβοφιλίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε σχέση με τις κληρονομικές θρομβοφιλίες. Οι επίκτητες θρομβοφιλίες σχετίζονται με την αυξημένη ηλικία, την κύηση, την λοχεία, την λήψη αντισυλληπτικών, την προηγούμενη χειρουργική επέμβαση και την κακοήθεια. Ειδικά για τους ασθενείς με καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών κακοηθειών (μυελοϊπερπλαστικά σύνδρομα, πολλαπλούν μυέλωμα), η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων αυξάνει την νοσηρότητα και τα ποσοστά θνησιμότητας τους (62).

Στις γυναίκες, οι περίοδοι της κύησης και της λοχείας καθώς και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης και η λήψη αντισυλληπτικών σχετίζονται με αύξηση του

κινδύνου θρομβοεμβολής. Η παρουσία θρομβοφιλίας κατά την εγκυμοσύνη σχετίζεται με μια ποικιλία επιπλοκών όπως είναι η καθυστέρηση στην ενδομήτρια ανάπτυξη και η αποβολή του εμβρύου. Τέλος, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο το οποίο συνιστά ένα συστηματικό αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες επίκτητης θρομβοφιλίας. Για την επιτυχή διαχείριση των ασθενών με επίκτητες θρομβοφιλίες είναι απαραίτητη η εξατομικευμένη εκτίμηση των παραγόντων κινδύνου και η αποτελεσματική χορήγηση της αντιπηκτικής αγωγής (63).

3.1 Ηλικία

Η αυξημένη ηλικία (άνω των 60 ετών) συνιστά έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της φλεβικής θρόμβωσης. Η επίπτωση της φλεβικής θρόμβωσης σε άτομα άνω των 80 ετών είναι 8/1000 ενώ η αντίστοιχη συχνότητα στην ηλικιακή ομάδα των 25 με 30 ετών είναι 1/10.000. Η κυτταρική γήρανση, οι βλάβες στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων που προκαλούν την ακαμψία τους καθώς και η μείωση της παραγωγής και της έκκρισης αγγειοδιασταλτικών παραγόντων αποτελούν μερικές από τις αιτίες για την αυξημένη συχνότητα της φλεβικής θρόμβωσης στους ηλικιωμένους (64).

Η φλεβική θρομβοεμβολή είναι μια συχνή διαταραχή στους ηλικιωμένους με ετήσια επίπτωση κοντά στο 1% σε άτομα ηλικίας 75 ετών και άνω. Αυτή η υψηλή επίπτωση σχετίζεται με τον υψηλό επιπολασμό επίκτητων υπερπηκτικών ή θρομβοφιλικών καταστάσεων στους ηλικιωμένους (65).

3.2 Εγκυμοσύνη

Τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της κύησης οδηγούν σε μια κατάσταση υπερπηκτικότητας, με αποτέλεσμα την ανοδική ρύθμιση των παραγόντων πήξης και τη μείωση των αντιπηκτικών παραγόντων. Η εγκυμοσύνη σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων συγκεκριμένων πηκτικών παραγόντων. Ειδικότερα, τα επίπεδα του ινωδογόνου διπλασιάζονται, οι παράγοντες IX, X, XII, VII, VIII, και Willebrand αυξάνονται κατά 20%- 1000%, τα επίπεδα της προθρομβίνης και του παράγοντα V παραμένουν αμετάβλητα, ενώ τα επίπεδα των παραγόντων XIII και XI μειώνονται σε μέτριο βαθμό. Οι προαναφερθείσες αλλαγές οδηγούν σε αύξηση της δράσης της θρομβίνης, των επιπέδων του ινώδους, των συμπλόκων θρομβίνης-αντιθρομβίνης και των D-dimers (προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους). Στο πρώτο τρίμηνο, το 50% και το 36% των εγκύων παρουσιάζει

αυξημένα επίπεδα συμπλόκων θρομβίνης-αντιθρομβίνης και D-dimers, αντίστοιχα (4).

Οι μεταβολές που παρατηρούνται στο αιμοστατικό σύστημα λειτουργούν προστατευτικά από μια δυνητικά θανατηφόρα αιμορραγία, κατά την περίοδο του τοκετού, αλλά μπορεί να προδιαθέσουν τόσο τη μητέρα όσο και το έμβρυο για την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος αυξάνει τα ποσοστά νοσηρότητας των εγκύων γυναικών. Σημειώνεται ότι η πνευμονική εμβολή συνιστά την πρώτη αιτία θανάτου των εγκύων. Για τη μητέρα, ο κίνδυνος εμφάνισης επιπλοκών που σχετίζονται με την προδιάθεση για θρόμβωση ξεκινά από την σύλληψη μέχρι τη μεταγεννητική περίοδο. Για το έμβρυο, οι επιπλοκές λόγω της επίκτητης θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν την προεκλαμψία, την αποκόλληση πλακούντα, την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, την πρόωρη αποβολή, τις πολλαπλές αποβολές και τον ενδομήτριο θάνατο. Ο κίνδυνος εμφάνισης των επιπλοκών είναι υψηλότερος σε γυναίκες με κληρονομική και επίκτητη θρομβοφιλία, αλλά προς το παρόν η διερεύνηση της ύπαρξης αυτών των διαταραχών δεν συνιστάται, χωρίς την εμφάνιση ενός επεισοδίου φλεβικής θρομβοεμβολής (66).

Επιπλέον, ο προσυμπτωματικός έλεγχος στις έγκυες με πιθανή θρομβοφιλία δεν είναι σίγουρα χρήσιμος καθώς ορισμένες από τις εργαστηριακές τεχνικές διάγνωσης χαρακτηρίζονται ανακριβείς. Ειδικότερα, τα επίπεδα της αντιθρομβίνης, της πρωτεΐνης C και S επηρεάζονται από την υψηλή συγκέντρωση οιστρογόνων κατά την κύηση. Βέβαια, λόγω του αυξανόμενου πληθυσμού των εγκύων που είναι μεγαλύτερης ηλικίας και της εφαρμογής τεχνικών τεχνητής αναπαραγωγής, πολλές γυναίκες κατά την έναρξη της εγκυμοσύνης, ελέγχονται για την παρουσία κληρονομικών θρομβοφιλιών (67).

Ο κίνδυνος θρόμβωσης κατά την εγκυμοσύνη αυξάνεται, ειδικά όταν συνυπάρχουν επιπρόσθετοι κληρονομικοί ή επίκτητοι παράγοντες κινδύνου. Το 10 με 20% των γυναικών με πολλαπλές αποβολές (τρεις και πάνω), έχουν ανιχνεύσιμα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα. Οι επιπλοκές της όψιμης εγκυμοσύνης σχετίζονται με αγγειακές βλάβες στον πλακούντα που προκαλούνται από τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα και μπορεί να προκαλέσουν προεκλαμψία, περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό και θνησιγένεια (68). Τα αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα που σχετίζονται με τις αποβολές στο τέλος του δευτέρου τριμήνου και τη φλεβική θρομβοεμβολή προκαλούν αναστολή της διεισδυτικότητας της τροφοβλάστης.

Επιπλέον, η αννεξίνη A5 (αντιπηκτική πρωτεΐνη του πλακούντα) είναι άφθονη στις μεμβράνες των συγκυτιοτροφοβλαστών του πλακούντα και μειώνεται παρουσία των αντιφωσφολιπιδικών αντισώματων (69).

Αναφορικά με τις μορφές κληρονομικής θρομβοφιλίας στις εγκύους, ο παράγοντας V Leiden εντοπίζεται στο 40% των εγκύων με φλεβική θρομβοεμβολή. Δεδομένης της χαμηλής συχνότητας θρόμβωσης στην εγκυμοσύνη (1/1400) και της υψηλής επίπτωσης της μετάλλαξης στον ευρωπαϊκό πληθυσμό, ο εκτιμώμενος κίνδυνος της φλεβικής θρομβοεμβολής σε ετερόζυγες εγκύους, χωρίς οικογενειακό ιστορικό είναι 1.5%. Ο κίνδυνος εμφάνισης της φλεβικής θρομβοεμβολής αυξάνεται στο 17% στις εγκύους με οικογενειακό ιστορικό φλεβικής θρομβοεμβολής (4).

Το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων και Γυναικολόγων (ACOG, American College of Obstetricians and Gynecologists) συνιστά να γίνεται έλεγχος για θρομβοφιλία σε ασθενείς με ιστορικό φλεβικής θρομβοεμβολής (π.χ. εγκυμοσύνη, χειρουργική επέμβαση, παρατεταμένη ακινησία), σε ασθενείς που παρουσιάζουν θρόμβωση σε μικρή ηλικία (κάτω από 40 ετών), σε ασθενείς από οικογένειες που παρουσιάζουν ιστορικό θρόμβωσης (>2 μέλη), σε ασθενείς με θρόμβωση σε ασυνήθιστη θέση και σε γυναίκες με περισσότερες από 3 αποβολές (70).

3.3 Λήψη αντισυλληπτικών και ορμονικής υποκατάστασης

Τα από του στόματος χορηγούμενα αντισυλληπτικά σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής, ο οποίος είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες με κληρονομική θρομβοφιλία. Τα αντισυλληπτικά που περιέχουν αιθινυλοιστραδιόλη και προγεσταγόνα, προκαλούν αλλαγές στην πήξη του αίματος και στην αιμοστατική ισορροπία, ευνοώντας την εμφάνιση θρόμβωσης. Με βάση τα δεδομένα του Π.Ο.Υ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας), η χρήση αντισυλληπτικών σε γυναίκες με κληρονομικές θρομβοφιλίες (ανεπάρκεια σε αντιθρομβίνη, πρωτεΐνης S, πρωτεΐνης C, V Leiden παράγοντας, μετάλλαξη G20210A προθρομβίνης) και σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό φλεβικής θρομβοεμβολής, σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο για την υγεία τους (71).-

Ένας παθογενετικός μηχανισμός για την εμφάνιση φλεβικής θρομβοεμβολής μετά από την λήψη αντισυλληπτικών είναι η αύξηση στην αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, μέσω της μείωσης των επιπέδων της πρωτεΐνης S και του αναστολέα του TF. Τα αντισυλληπτικά με δεσογεστρέλη ή γεστοδένη αυξάνουν σε μεγαλύτερο βαθμό τον κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής, συγκριτικά με εκείνα

που περιέχουν λεβονοργεστρέλη. Τα αντισυλληπτικά με <35 μg αιθινυλοιστραδιόλης και με προγεστερόνη δεύτερης γενιάς χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολής. Για αυτό το λόγο, συστήνονται σε γυναίκες στις οποίες χορηγούνται αντισυλληπτικά για πρώτη φορά (72).

Τα επεισόδια φλεβικής θρομβοεμβολής συνήθως λαμβάνουν χώρα στο χρονικό διάστημα από το πρώτο εξάμηνο έως το πρώτο έτος κατά την λήψη των αντισυλληπτικών. Η λήψη αντισυλληπτικών που περιέχουν προγεσταγόνο προτείνεται ως μια ασφαλής μέθοδος αντισύλληψης σε γυναίκες που έχουν θρομβοφιλία (73).

Η ορμονική υποκατάσταση δεν θα πρέπει να χορηγείται σε γυναίκες με σοβαρές κληρονομικές θρομβοφιλίες. Για τις γυναίκες με μορφές ήπιας θρομβοφιλίας, δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για την αποφυγή της ορμονικής υποκατάστασης. Σημειώνεται όμως, ότι με τη χορήγηση της ορμονικής υποκατάστασης, ο κίνδυνος για την εμφάνιση φλεβικής θρομβοεμβολής αυξάνεται κατά οκτώ φορές. Είναι αναγκαία η διερεύνηση της ύπαρξης πιθανών άλλων παραγόντων κινδύνου για φλεβική θρομβοεμβολή (ηλικία, αυξημένος δείκτης μάζας, αυξημένοι δείκτες όπως οι D-dimers) και της πιθανής διαδερμικής χορήγησης της ορμονικής υποκατάστασης (74).

3.4 Αυτοάνοσα νοσήματα- Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο (APS)

Στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS, Antiphospholipid syndrome), παράγονται αυτοαντισώματα ενάντια στα φωσφολιπίδια, τα οποία αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης. Επίσης, το APS σχετίζεται με τις πολλαπλές αποβολές και άλλες επιπλοκές κατά την κύηση και τον τοκετό. Μπορεί να διακριθεί σε πρωτοπαθές ή δευτεροπαθές συνδυαστικά με την ύπαρξη συστηματικού ερυθματώδη λύκου. Τα αυτοαντισώματα ανιχνεύονται με ειδικές ανοσολογικές δοκιμασίες (ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ή με πηκτικές δοκιμασίες. Δεν είναι πλήρως κατανοητός ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός του APS (75).

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι η αύξηση του οξειδωτικού στρες ευνοεί την έναρξη των ανοσολογικών διαταραχών και την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων. Οι θεραπευτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν εξατομικευμένη δευτερογενή πρόληψη των θρομβοεμβολικών επιπλοκών μέσω αντιπηκτικής αγωγής. Η ανοσοκατασταλτική θεραπεία δεν έχει μέχρι στιγμής αποδειχθεί επαρκώς αποτελεσματική για το APS, αλλά παραμένει αντικείμενο διερεύνησης (76).

3.5 Χειρουργική επέμβαση

Τα περιστατικά θρόμβωσης σε ορθοπεδικούς ασθενείς και σε καρκινοπαθείς που έχουν υποβληθεί σε μείζονες χειρουργικές επεμβάσεις αποτελούν συχνές μετεγχειρητικές επιπλοκές. Ειδικά στα χειρουργεία που αφορούν περιοχές του σώματος όπως είναι το ισχίο, το μηριαίο οστό και το γόνατο, η εμφάνιση θρομβώσεων ευνοείται εξαιτίας της της ακινητοποίησης, της φλεβικής στάσης του αίματος και του τραυματισμού των αγγείων (77).

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ορθοπεδική χειρουργική επέμβαση παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής. Ειδικότερα, τα άτομα που υπεβλήθησαν σε αρθροπλαστική ισχίου και στους οποίους δεν γίνεται χορήγηση φαρμακευτικής προφύλαξης, χάρη στην χρησιμοποίηση αναίμακτων τεχνικών και στην γρήγορη κινητοποίηση των ασθενών μετά το χειρουργείο, η συχνότητα της φλεβικής θρομβοεμβολής στις πρώτες δύο εβδομάδες είναι 1,8% και στις 35 μέρες αυξάνεται σε 4,3% (78).

Η συχνότητα της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης είναι υψηλότερη μεταξύ των αγγειοχειρουργικών και καρδιοχειρουργικών ασθενών. Η διεγχειρητική αντιπηκτική αγωγή δεν εμποδίζει την εμφάνιση της στην μετεγχειρητική περίοδο. Αυτοί οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν παρόμοια προφύλαξη με άλλους χειρουργικούς ασθενείς, στην περιεγχειρητική περίοδο (79).

Παρουσία προφύλαξης, τα ποσοστά της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης μετά από χειρουργική επέμβαση είναι χαμηλά, με περισσότερο από το 80% των περιπτώσεων να διαγιγνώσκονται σε νοσοκομειακό περιβάλλον. Δεδομένου ότι περισσότερα από τα μισά περιστατικά της σχετίζονται με την ύπαρξη καθετήρα, οι προσπάθειες για την πρόληψη της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τον περιορισμό του χρόνου χρησιμοποίησης ενός κεντρικού καθετήρα και τη χρήση ειδικής αντιπηκτικής αγωγής (80).

Η επίπτωση της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης στις περιπτώσεις ασθενών με μείζονα χειρουργική επέμβαση στην κοιλιά είναι 4,9%. Οι καρκινοπαθείς ασθενείς με μείζονα χειρουργική επέμβαση στην κοιλιά διάρκειας πάνω από 2 ώρες έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (81).

3.6 Κακοήθεια

Η κακοήθεια είναι μια επίκτητη θρομβοφιλική κατάσταση που σχετίζεται με σημαντικό κίνδυνο θρόμβωσης. Η φλεβική και αρτηριακή θρομβοεμβολή είναι μια συχνή επιπλοκή στους ασθενείς με καρκίνο, οι οποίοι παρουσιάζουν υπερπηκτικότητα του αίματος, ακόμη και απουσία έκδηλης θρόμβωσης. Στους ασθενείς με κακοήθεια, τα επεισόδια εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης εμφανίζονται σε ποσοστό 4-20%. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της πήξης του αίματος μπορεί να παίζει ρόλο στην εξέλιξη του όγκου. Η παθογένεση της θρόμβωσης στον καρκίνο είναι πολυπαραγοντική. Τα θρομβωτικά επεισόδια μπορούν να επηρεάσουν τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα της υποκείμενης κακοήθειας (82). Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση σε καρκινοπαθείς περιλαμβάνουν την πρωτοπαθή εντόπιση (π.χ εγκέφαλος, πνεύμονας, αιματολογικές κακοήθειες, γυναικολογικά νεοπλάσματα), την ύπαρξη μεταστάσεων, το στάδιο του καρκίνου, την μεγάλη ηλικία, το προηγούμενο ιστορικό εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης, το είδος της χημειοθεραπευτικής αγωγής (αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες) και τα αυξημένα επίπεδα των αιμοπεταλίων πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας (83).

Κεφάλαιο 4ο: Εργαστηριακή διερεύνηση θρομβοφιλίας

Η εργαστηριακή διερεύνηση των διαφορετικών τύπων της κληρονομικής ή της επίκτητης θρομβοφιλίας περιλαμβάνει (84):

1. Γενική αίματος
2. Μέτρηση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης και του χρόνου προθρομβίνης
3. Αξιολόγηση των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S και της αντιθρομβίνης,
4. Έλεγχος για την μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης
5. Έλεγχος για την μετάλλαξη του V Leiden παράγοντα
6. Ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2-GP1), του αντιπηκτικού του λύκου και των αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων.

Η εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας εξαρτάται από την ηλικία στην οποία εμφανίστηκε πρώτη φορά ένα επεισόδιο φλεβικής θρομβοεμβολής, την συχνότητα υποτροπής της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου, τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου και την παρουσία οικογενειακού ιστορικού (84, 85).

Η εργαστηριακή διερεύνηση για τους διαφορετικούς τύπους κληρονομικής ή επίκτητης θρομβοφιλίας πρέπει να λαμβάνει χώρα στις εξής περιπτώσεις (86):

1. Σε ασθενείς που εμφάνισαν το πρώτο επεισόδιο θρομβοεμβολής σε ηλικία μικρότερη από τα σαράντα έτη.
2. Σε γυναίκες με φλεβική θρομβοεμβολική νόσο στις οποίες χορηγείται ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, λαμβάνουν αντισυλληπτικά φάρμακα ή είναι έγκυες. Στις συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες, σημειώνεται ότι ο εργαστηριακός έλεγχος, (εκτός του μοριακού ελέγχου), θα πρέπει να πραγματοποιείται δύο μήνες μετά τον τοκετό ή μετά τη διακοπή της θεραπείας.
3. Σε άτομα που παρουσιάζουν υποτροπή της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου.
4. Σε άτομα με υποτροπιάζουσα επιπολής θρομβοφλεβίτιδα, τα οποία δεν παρουσιάζουν κιρσούς.
5. Σε ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολική νόσο σε σπάνιες εντοπίσεις.

6. Σε ασθενείς με νέκρωση του δέρματος η οποία προκλήθηκε από την χορήγηση βαρφαρίνης και σε νεογνά με κεραυνοβόλο πορφύρα.
7. Σε γυναίκες με ιστορικό φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου που θα υποβληθούν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, λαμβάνοντας ορμονικά σκευάσματα.
8. Σε γυναίκες με ιστορικό πολλαπλών αποβολών και καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου.

Η εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας λαμβάνει χώρα με την εξής σειρά (5, 85, 86):

A) Έλεγχος για την αιμόσταση: οι εργαστηριακές αναλύσεις που πραγματοποιούνται ταυτοποιούν τις μεταβολές στους πηκτικούς μηχανισμούς του ασθενούς, μετρώντας τις εξής παραμέτρους:

1. Χρόνος προθρομβίνης (PT – INR): εξετάζει τον χρόνο που χρειάζεται το αίμα για να πήξει. Χαμηλές τιμές υποδεικνύουν μια κατάσταση υπερπηκτικότητας (για τιμές $INR < 1.00$).
2. Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT): αποτελεί μια χρήσιμη εργαστηριακή εξέταση, συμπληρωματική της εξέτασης για τον χρόνο προθρομβίνης.
3. Ινωδογόνο: συνιστά βασικό συστατικό για τον σχηματισμό των θρόμβων. Τα αυξημένα επίπεδα του ινωδογόνου έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο σχηματισμού θρόμβου, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που χαρακτηρίζουν τα καρδιαγγειακά νοσήματα.
4. Δ-Διμερή (D-Dimers): παράγονται από την αποικοδόμηση των θρόμβων και του ινωδογόνου. Αυξημένα επίπεδα των δ- διμερών υποδεικνύουν την παρουσία θρομβωτικής κατάστασης και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολής.
5. Ομοκυστεΐνη: αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη για την παρουσία ενδοαγγειακής φλεγμονής και για την αυξημένη πιθανότητα σχηματισμού θρόμβων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης σχετίζονται με ανεπάρκεια βιταμινών καθώς και με ένα ανθυγιεινό τρόπο ζωής όπως είναι το κάπνισμα, και η παχυσαρκία.
6. Πρωτεΐνες S και C: Οι χαμηλές τους συγκεντρώσεις σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα σχηματισμού θρόμβων.
7. Αντιθρομβίνη: Ο ρόλος της αντιθρομβίνης είναι η αναστολή της λειτουργίας της θρομβίνης και άλλων πηκτικών παραγόντων με αποτέλεσμα την αναστολή της πήξης του αίματος, με συνέπεια τις καταστάσεις υπερπηκτικότητας. Η εργαστηριακή

ανάλυση της αντιθρομβίνης λαμβάνει χώρα με στόχο την ανίχνευση πιθανής ανεπάρκειας της αλλά και την αιτία των ελαττωμένων επιπέδων της (συγγενής ή επίκτητη).

8. Αντιπηκτικό λύκου: είναι αυτοαντίσωμα το οποίο σχετίζεται με την ύπαρξη θρόμβων στον οργανισμό.

B) Ανοσολογικός έλεγχος αντισωμάτων

1. Καρδιολιπίνες: Τα αυτοαντισώματα αCL IgM, IgG και IgA οφείλονται για το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό θρομβώσεων άγνωστης αιτιολογίας, σε επαναλαμβανόμενες αποβολές.

2. B-2 GPI: Είναι μια πρωτεΐνη με πολλαπλές λειτουργίες η οποία έχει κεντρικό ρόλο στον μηχανισμό της αιμόστασης. Τα αντισώματα έναντι της B-2GPI σχετίζονται με την εμφάνιση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου.

Γ) Μοριακό έλεγχο. Με κατάλληλες μοριακές τεχνικές αναλύονται οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την προθρομβίνη, τον V Leiden παράγοντα και την ομοκυστεΐνη καθώς και οι μηχανισμοί κληρονομικότητας τους (ετεροζυγωτία – ομοζυγωτία).

4.1 Αιματολογικές εξετάσεις και εξετάσεις για την πήξη του αίματος

Με τις αιματολογικές εξετάσεις πραγματοποιείται η διερεύνηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης, του αιματοκρίτη, των αιμοπεταλίων, των ερυθρών και των λευκών κυττάρων. Επίσης, με τις αιματολογικές εξετάσεις αξιολογείται η μορφολογία των κυττάρων του αίματος και οι κατηγορίες των λευκών αιμοσφαιρίων (λευκοκυτταρικός τύπος). Για την πραγματοποίηση των αιματολογικών εξετάσεων, λαμβάνεται δείγμα φλεβικού αίματος μετά από φλεβοκέντηση το οποίο συλλέγεται σε ειδικό σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό EDTA. Στη συνέχεια, το δείγμα αναλύεται με την βοήθεια αυτόματων αναλυτών. Για να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων, προτείνεται η διενέργεια επιχρίσματος περιφερικού αίματος και η χρώση αυτού, για τον πιθανό εντοπισμό ανωμαλιών στα κύτταρα του αίματος με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Για την πραγματοποίηση των εξετάσεων για την πήξη του αίματος, το δείγμα αίματος που λαμβάνεται σε ειδικά σωληνάρια με αντιπηκτικό Sodium Citrate, φυγοκεντρείται, και σε επόμενο στάδιο το πλάσμα του αίματος που λαμβάνεται εμπλουτίζεται με ασβέστιο και αντιδρά με το αντιδραστήριο

της θρομβοπλαστίνης. Η περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος λαμβάνει χώρα σε αυτόματους αναλυτές (5, 85, 87).

4.1.1 Χρόνος προθρομβίνης (PT, Prothrombin time)

Ο χρόνος προθρομβίνης μετρά τον χρόνο που χρειάζεται για να σχηματιστεί ένας θρόμβος σε ένα δείγμα αίματος. Σχετίζεται με τους παράγοντες II, VII, V και X. Ένας αυξημένος PT σχετίζεται συνήθως με την λήψη κουμαρινικών, την ανεπάρκεια σε βιταμίνης K ή στην ύπαρξη αυτοαντισωμάτων λόγω συστηματικού ερυθρελαιώδη λύκου (85).

Το πλάσμα του αίματος που λαμβάνεται από τον ασθενή επωάζεται με συγκεκριμένη δόση ασβεστίου και θρομβοπλαστίνης και μετριέται ο χρόνος για τον σχηματισμό του θρόμβου (5). Ο φυσιολογικός PT είναι μεταξύ 10 έως 15 δευτερόλεπτα, αλλά αυτό εξαρτάται και από τον τύπο θρομβοπλαστίνης που θα χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο. Για αυτό το λόγο, κάθε θρομβοπλαστίνη που είναι εμπορικά διαθέσιμη έχει έναν διεθνώς αναγνωρισμένο δείκτη ευαισθησίας (ISI – International sensitivity index), που δείχνει τα επίπεδα ευαισθησίας της κάθε θρομβοπλαστίνης συγκριτικά με μια πρότυπη θρομβοπλαστίνη του Π.Ο.Υ, η οποία έχει ISI= 1.0. Το ISI κυμαίνεται από 0.9 έως 1.7. Στην κλινική και εργαστηριακή πράξη, χρησιμοποιείται ευρέως το INR (international normalised ratio, διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο.) (PT ασθενούς/PT μάρτυρα)^{ISI}. Οι τιμές του INR ερμηνεύονται ως εξής (88, 89):

- Τιμές INR < 1 είναι φυσιολογικές
- 1.1 < INR < 2.0 : αυξημένος δείκτης, ένδειξη για ηπατική βλάβη
- 2.0 ≤ INR ≤ 3.0 : ασθενείς υπό αντιπηκτική αγωγή
- INR > 3.0 : υψηλή πιθανότητα αιμορραγίας (αυξημένος χρόνος για την πήξη του αίματος).

Το INR είναι η προτιμώμενη εξέταση για ασθενείς στους οποίους χορηγούνται ανταγωνιστές της βιταμίνης K. Το INR χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των ασθενών που λαμβάνουν αντιπηκτικά φάρμακα, όπως η βαρφαρίνη ή η ακενοκουμαρόλη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του κινδύνου αιμορραγίας ή της κατάστασης πήξης των ασθενών. Οι ασθενείς που λαμβάνουν από του στόματος αντιπηκτική αγωγή πρέπει να παρακολουθούν το INR για να προσαρμόσουν τις δόσεις των ανταγωνιστών της βιταμίνης K επειδή αυτές διαφέρουν μεταξύ των ασθενών (88, 89).

Πολλοί παράγοντες μπορούν να αυξήσουν την τιμή του INR όπως για παράδειγμα η λήψη ανταγωνιστών της βιταμίνης Κ και ποικίλων φαρμάκων όπως είναι τα αντιβιοτικά, (κοτριμοξαζόλη, μακρολίδες, μετρονιδαζόλη και φθοριοκινολόνες), τα αντιμυκητιακά (αζόλες, φλουκοναζόλη), τα χημειοθεραπευτικά (imatinib, fluorouracil, αμιοδαρόνη, αλλοπουρινόλη) και οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (φλουοξετίνη, σετραλίνη). Φάρμακα που μπορεί να μειώσουν την τιμή του INR είναι τα αντιβιοτικά δικλοξακιλλίνη, ναφκυλλίνη, αζαθειοπρίνη, τα αντιεπιληπτικά (καρβαμαζεπίνη, φαινοβαρβιτάλη, φαινυτοΐνη), το βαλσαμόχορτο και η βιταμίνη Κ. Η χρόνια ηπατική νόσος μπορεί να επηρεάσει τη δοσολογία της βαρφαρίνης, την τιμή του INR και την ομοιόσταση της πήξης. Οξείες γαστρεντερικές λοιμώξεις μπορεί επίσης να επηρεάσουν το INR (88, 89).

4.1.2 Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT, Activated partial thromboplastin time)

Ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) αξιολογεί την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης του αίματος και σχετίζεται με τους παράγοντες VIII , XI, IX, XII. Κατά την εργαστηριακή δοκιμή, το δείγμα αίματος που λήφθηκε συλλέγεται σε ειδικό σωληνάριο το οποίο περιέχει αντιπηκτικά όπως το οξαλικό ή το κιτρικό νάτριο, τα οποία δεσμεύουν τα ιόντα ασβεστίου του δείγματος. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση του δείγματος για την παραλαβή του πλάσματος. Ο aPTT μετريέται με την χρήση αυτόματων αναλυτών. Μια ποσότητα του πλάσματος τοποθετείται σε σωληνάριο, με ιόντα ασβεστίου και έναν ενεργοποιητή του ενδογενούς μηχανισμού της πήξης. Ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού γίνεται με την προσθήκη ειδικά επεξεργασμένης θρομβοπλαστίνης (συνήθως κεφαλίνη). Στη συνέχεια, ενεργοποιείται ο XII παράγοντας και ο καταρράκτης πήξης με αποτέλεσμα να σχηματιστεί θρόμβος, μετά από μερικά δευτερόλεπτα (30-50 δευτερόλεπτα) (5, 90, 91).

4.1.3 Ινωδογόνο

Το ινωδογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος 340 kDa που συντίθεται από το ήπαρ. Τα φυσιολογικά επίπεδα του ινωδογόνου στο πλάσμα είναι μεταξύ 1,8 - 4,2 g/L. Αυξημένα επίπεδα του ινωδογόνου σχετίζονται με την αύξηση του κινδύνου

εμφάνισης θρόμβωσης, την ύπαρξη φλεγμονής και κακοηθειών, με τη κύηση και την μετεγχειρητική περίοδο. Η εργαστηριακή εξέταση του ινωδογόνου βοηθά στην διάγνωση της δυσινωδογοναιμίας και της υποινωδογοναιμίας. Στην υποϊνωδογοναιμία οι δοκιμασίες της πήξης παρατείνονται ανάλογα με την συγκέντρωση του ινωδογόνου του πλάσματος. Για την διενέργεια της εξέτασης χρησιμοποιείται ολικό αίμα από φλεβοκέντηση το οποίο συλλέγεται σε ειδικό σωληνάριο με κιτρικό ως αντιπηκτικό. Για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της πήξης, το ινωδογόνο αντιδρά με ποσότητα θρομβίνης (Clauss assay) (85, 92).

Η ανάλυση Clauss αποτελεί την συχνότερη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των επιπέδων του ινωδογόνου. Στην ανάλυση Clauss, αρχικά πρέπει να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, χρησιμοποιώντας γνωστή αρχική συγκέντρωση αντιδραστηρίου χρόνου προθρομβίνης και μετρώντας τους χρόνους προθρομβίνης σε διαδοχικές αραιώσεις πλάσματος (1/5, 1/10, 1/15 και 1/20) με γνωστή συγκέντρωση ινωδογόνου. Το πλάσμα επωάζεται στους 37⁰ και στη συνέχεια προστίθενται θρομβίνη, φωσφολιπίδιο και ασβέστιο. Ο χρόνος για να σχηματιστεί η ινική ξεκινά μετά την προσθήκη του ασβεστίου. Αφού καταγραφεί ο χρόνος, γίνεται σύγκριση με την πρότυπη καμπύλη για να υπολογιστεί η τελική συγκέντρωση (mg/dL) του ινωδογόνου στο δείγμα αίματος (92).

4.1.4 Δ-διμερή (D- dimer)

Τα Δ-διμερή αποτελούν υποπροϊόντα της διαδικασίας της πήξης και της διάσπασης του θρόμβου τα οποία μπορούν να μετρηθούν μέσω μιας ανάλυσης αίματος. Το αίμα συλλέγεται από τον ασθενή μέσω φλεβοτομής σε ένα φιαλίδιο που περιέχει κιτρικό νάτριο. Το δείγμα αφήνεται να αντιδράσει σε σωματίδια πολυστυρενίου τα οποία είναι επικαλυμμένα με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προσδένουν τα Δ-διμερή, δημιουργώντας συσσωματώματα τα οποία ανιχνεύονται θολοσιμετρικά (93).

Στο εμπόριο υπάρχουν πάνω από 30 κιτ διαφορετικών εταιρειών για την ανάλυση των δ-διμερών. Οι συνηθέστερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο περιλαμβάνουν τον ανοσοφθορισμό, την ELISA και τις μελέτες συγκόλλησης. Ο ανοσοφθορισμός ανήκει στις ανοσοχημικές τεχνικές που επιτυγχάνουν την ανίχνευση ποικίλων αντιγόνων σε διάφορους τύπους ιστών διαφόρων κυτταρικών παρασκευασμάτων. Ο ανοσοφθορισμός χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και

αυξημένη ενίσχυση του σήματος συγκριτικά με άλλες εξειδικευμένες τεχνικές όπως είναι η ανοσοϊστοχημία (93).

Οι ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες (EIA, enzyme immunoassays) αξιοποιούν την καταλυτική δράση των ενζύμων, έτσι ώστε να ανιχνευτούν και ποσοτικοποιηθούν οι διαφορετικές ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο δείγμα. Η ELISA συνιστά μια ετερογενή ανοσοδοκιμασία που έχει πολλές εφαρμογές σε ποικίλες εργαστηριακές εξετάσεις. Στην ELISA, ένα από τα αντιδρώντα συστατικά, προσροφάται στην επιφάνεια μιας στερεάς φάσης με ομοιοπολικό ή μη ειδικό δεσμό. Χάρη στην προσρόφηση στη στερεά φάση, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των σημασμένων αντιδραστηρίων που είναι είτε δεσμευμένα είτε ελεύθερα. Αναλυτικότερα, στην ELISA, σε ένα δείγμα αίματος στο οποίο εντοπίζεται το αντιγόνο (Ag) προς ποσοτικοποίηση, γίνεται προσθήκη του αντισώματος στερεάς φάσης (Ab) για την πραγματοποίηση της εξειδικευμένης αντίδρασης αντισώματος-αντιγόνου. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιηθούν τα απαραίτητα ξεπλύματα με ειδικό buffer, γίνεται προσθήκη ενός αντισώματος που είναι σημασμένο με ειδικό ένζυμο. Με αυτόν τον τρόπο, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο Ab-Ag-Ab. Αφού πραγματοποιηθούν εκ νέου ξεπλύματα για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος, γίνεται προσθήκη του ενζυμικού υποστρώματος. Η ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης που παράγεται είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που βρίσκονταν στο δείγμα. Η συγκέντρωση των εξειδικευμένων αντισωμάτων ενός δείγματος μπορεί επίσης να βρεθεί εφαρμόζοντας μια ειδική ELISA στην οποία το αντιγόνο είναι αυτό που προσροφάται σε μια στερεά φάση και η προσθήκη του δεύτερου αντιδραστηρίου αφορά αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο, το οποίο ανιχνεύει το αντίσωμα που θέλουμε να εξετάσουμε (93,94)

Οι ELISA εκτελούνται σε πλάκες πολυστυρενίου, συνήθως πλάκες 96 φρεατίων οι οποίες είναι κατάλληλα επικαλυμμένες για να εξασφαλίσουν την ισχυρή δέσμευση της πρωτεΐνης. Ανάλογα με τον τύπο της ELISA, απαιτείται αντιγόνο, πρωτοταγές και δευτεροταγές αντίσωμα ανίχνευσης, ρυθμιστικό buffer έκπλυσης, αντίσωμα/αντιγόνο για την επικάλυψη και χρωμογόνο το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα. Το πρωτοταγές αντίσωμα συνιστά ένα εξειδικευμένο αντίσωμα που αντιδρά μόνο με την πρωτεΐνη που θέλουμε να εξετάσουμε. Ένα δευτεροταγές αντίσωμα αποτελεί ένα δεύτερο αντίσωμα, σημασμένο με το ένζυμο που έχει την ικανότητα να αντιδρά με το πρωτοταγές αντίσωμα που δεν είναι σημασμένο ενζυμικά. Η ακολουθία των βημάτων για την πραγματοποίηση μιας ELISA, περιλαμβάνει την επικάλυψη της πρωτεΐνης

που θέλουμε να εξετάσουμε με την χρήση ενός αντισώματος ή αντιγόνου, την προσθήκη ενός παράγοντα blocking όπως είναι η αλβουμίνη βόειου ορού, την ανίχνευση και την καταγραφή και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Το στάδιο της ανίχνευσης γίνεται προσθέτοντας το υποστρώμα/ χρωμογόνο. Τα υποστρώματα που είναι εμπορικά διαθέσιμα και χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι τα ένζυμα αλκαλική φωσφατάση και υπεροξειδάση χρένου. Η αλκαλική φωσφατάση χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το p-Nitrophenyl-phosphate (pNPP). Χάρη στη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, ποσοτικοποιείται το κίτρινο χρώμα της νιτροφαινόλης αφού πραγματοποιηθεί επώαση 15 έως 30 λεπτών, σε θερμοκρασία δωματίου. Η υπεροξειδάση χρένου έχει σαν υπόστρωμα της το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ενζυμική δράση της υπεροξειδάσης χρένου οδηγεί στην εμφάνιση χρώματος μπλε.

Ένα σημαντικό στάδιο της τεχνικής είναι το καλό ξέπλυμα των πλακών για την απομάκρυνση των με δεσμευμένων στοιχείων και την μείωση των επιπέδων της μη ειδικής αντίδρασης. Ως buffer έκπλυσης χρησιμοποιούνται αλατούχα διαλύματα με φωσφορικά και μη ιονικά απορρυπαντικά. Οι πλάκες μπορούν να ξεπλένονται αρκετές φορές (δύο ή περισσότερες), ανάλογα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Σε ένα τυπικό εργαστηριακό πρωτόκολλο για την διενέργεια της ELISA, είναι απαραίτητη η τοποθέτηση διαφορετικών συγκεντρώσεων του δείγματος στα ειδικά φρεάτια σε σειριακές αραιώσεις. Μετά την καταμέτρηση των αποτελεσμάτων των σειριακών αραιώσεων, πραγματοποιείται ο σχεδιασμός της τυπικής καμπύλης. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες ELISA, η ELISA σάντουιτς, η άμεση, η έμμεση και η ανταγωνιστική ELISA (93, 94).

Η μέθοδος Vidas, ειδικότερα, εξετάζει τα προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους μέσω μιας διαδικασίας που συνδυάζει τον φθορισμό και την ELISA, με την βοήθεια ειδικών ενζύμων. Η διαδικασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα της χολερυθρίνης, της αιμοσφαιρίνης, της ηπαρίνης και την θολερότητα του πλάσματος (93, 94).

Οι φυσιολογικές τιμές των Δ-διμερών είναι κάτω από 0,50 ενώ οι παθολογικές τιμές αφορούν συγκεντρώσεις πάνω από 0,50. Η αύξηση των Δ-διμερών η οποία προέρχεται μετά από έντονη ινωδολυτική δραστηριότητα σχετίζεται με πνευμονική εμβολή, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση. Η αξιολόγηση των επιπέδων των Δ-διμερών πραγματοποιείται επίσης σε ασθενείς με αντιπηκτική φαρμακευτική αγωγή για την αποφυγή υποτροπών. Σημειώνεται ότι

αύξηση των Δ-διμερών μπορεί να εντοπιστεί σε περιπτώσεις όπως είναι η εγκυμοσύνη, η κακοήθεια, η λοίμωξη και η σήψη. Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι ασθενείς, οι ακινητοποιημένοι ασθενείς, οι καπνιστές, οι ασθενείς με αυτοάνοσες διαταραχές ή εκείνοι που υποβλήθηκαν σε πρόσφατη χειρουργική επέμβαση μπορεί να έχουν αυξημένα Δ-διμερή (94).

4.1.5 Αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1, Plasminogen activator inhibitor-1)

Ο αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 είναι ένας σημαντικός αναστολέας του ινωδολυτικού συστήματος. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται στην ενεργή του μορφή, με την επίδραση του ιστικού ενεργοποιητή. Αυξημένα επίπεδα του PAI-1 μπορούν να καταστείλουν την ινωδόλυση και να οδηγήσουν σε αυξημένο κίνδυνο φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης. Επίσης, οι αυξημένες συγκεντρώσεις του PAI-1 σχετίζονται με κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου, στεφανιαίας νόσου και ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων (95).

4.1.6 Ομοκυστεΐνη

Το εύρος της συνολικής συγκέντρωσης ομοκυστεΐνης στο πλάσμα σε υγιείς ενήλικες είναι 5 έως 15 $\mu\text{mol/L}$. Η ομοκυστεΐνη αποτελεί σημαντικό δείκτη ενδοαγγειακής φλεγμονής. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ολικής ομοκυστεΐνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης και καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης, η υπερομοκυστεϊναιμία σχετίζεται με διατροφικές ελλείψεις σε φυλλικό οξύ, βιταμίνες B6 και B12 και με μεταλλάξεις ενζύμων όπως τα MTHFR και CBS (96, 97).

4.1.7 Πρωτεΐνη C, S και αντιθρομβίνη

Για την εργαστηριακή διερεύνηση της πρωτεΐνης C, πραγματοποιούνται οι εξετάσεις της μέτρησης της δραστικότητας της (PrC) και της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Για την μέτρηση της δραστικότητας, το δείγμα αίματος που λαμβάνεται φυγοκεντρείται δύο φορές, για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων. Με αυτόν τον τρόπο συλλέγεται πλάσμα του αίματος που είναι φτωχό σε αιμοπετάλια (5).

Η πρωτεΐνη C στο δείγμα, ενεργοποιείται χάρη στο *Agkistrodon contortrix*, (δηλητήριο φιδιού). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, στη συνέχεια, διασπά τους VIIIa και Va παράγοντες, επεκτείνοντας το χρόνο της πήξεως, με βάση την PTT. Η μέτρηση της πρωτεΐνης C μπορεί να γίνει είτε χρωμογονικά ή μέσω της μέτρησης των aPTT ή PT. Οι τεχνικές που στηρίζονται στη δημιουργία θρόμβου (clot-based methods) αξιοποιούν τον χρόνο μερικής θρομβοπλαστικής (aPTT) ή το δηλητήριο της οχιάς Russell (RVV). Η χρωμογονική τεχνική (αμιδολυτική ανάλυση) μετρά την διάσπαση του χρωμογονικού υποστρώματος. Η αλλαγή στο χρώμα είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης C. Και οι δύο αυτές τεχνικές χρησιμοποιούν την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C από το Protac (98).

Οι εργαστηριακές μέθοδοι που στηρίζονται στον σχηματισμό θρόμβου (clot-based methods) είναι πιθανό να δώσουν ψευδώς χαμηλές τιμές της πρωτεΐνης C καθώς χρησιμοποιούν τροποποιημένο aPTT και υψηλά επίπεδα του παράγοντα VIII ή του ινωδογόνου. Επιπλέον, οι αναστολείς της θρομβίνης, η ηπαρίνη και το αντιπηκτικό του λύκου μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικές τιμές για την δραστικότητα της πρωτεΐνης C (98).

Ο χρωμογονικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης C δεν επηρεάζεται από τέτοιες παρεμβολές, καθώς ανιχνεύει μόνο μεταλλάξεις της πρωτεΐνης C που σχετίζονται με την ενεργό θέση της πρωτεΐνης. Αν και η χρωμογονική εξέταση της πρωτεΐνης C έχει καλύτερη εξειδίκευση, και οι δύο δοκιμασίες χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά ως ένα εργαλείο διαλογής. Η μέτρηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης C δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την διερεύνηση κάποιας θρομβοεμβολής, για την παρουσία κληρονομικής ή επίκτητης ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C (5, 98, 99).

Για την ανάλυση της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, το δείγμα του αίματος που λαμβάνεται μετά από διπλή φυγοκέντρωση, επωάζεται με δηλητήριο έχιδνας και με έναν παράγοντα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C, παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C μαζί με την πρωτεΐνη S αναστέλλει την δράση προπηκτικών και πηκτικών παραγόντων, οδηγώντας σε καθυστέρηση του σχηματισμού του θρόμβου. Ελάττωση της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C παρατηρείται σε ηπατοπάθειες, σε ανεπάρκειες στην βιταμίνη K και στη διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Η εργαστηριακή ανάλυση της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C συνιστά ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στις

περιπτώσεις γυναικών με πολλαπλές αποβολές, αποκόλληση πλακούντα και εμβρυϊκό θάνατο (98).

Η μέτρηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης S στο πλάσμα χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση ασθενών με οικογενειακό ιστορικό θρομβοεμβολών, με κληρονομική ή επίκτητη ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S και ατόμων που εμφάνισαν επεισόδιο θρομβοεμβολής. Στους ασθενείς που παρουσιάζουν συγγενή έλλειψη πρωτεΐνης S εντοπίζονται συγκεντρώσεις ελεύθερης πρωτεΐνης S <40%. Επίσης, χαμηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης S εντοπίζονται σε φυσιολογικές γυναίκες στην κύηση, σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή και στα νεογνά. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης S πλησιάζουν αυτά των ενηλίκων, μετά την πάροδο 6 μηνών (99).

Τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ για την μέτρηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης S βασίζονται στο ρόλο της ως συμπαράγοντας της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C και έχουν σχεδιαστεί για τη μέτρηση της αντιπηκτικής της δραστηριότητας. Το θετικό στοιχείο των συγκεκριμένων εργαστηριακών μεθόδων είναι ότι μπορεί να ανιχνεύουν τόσο ποιοτικά (τύπου II) όσο και ποσοτικά ελαττώματα (τύπου I και τύπου III) της πρωτεΐνης S (100).

Ο βασικός ρόλος της αντιθρομβίνης III είναι η αδρανοποίηση των παραγόντων πήξης μετά την αιμόσταση. Τα επίπεδα της αντιθρομβίνης III αυξάνονται σε ανεπάρκειες της βιταμίνης K και σε άτομα που λαμβάνουν αντισυλληπτικά φάρμακα. Η μείωση της αντιθρομβίνης III σχετίζεται με ηπατοπάθειες, κίρρωση του ήπατος, με πνευμονική εμβολή και διάχυτη ενδαγγειακή πήξη. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι για την διερεύνηση των επιπέδων της αντιθρομβίνης, η μέτρηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης και οι ανοσοδοκιμασίες. Οι εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες δραστικότητας αντιθρομβίνης χρησιμοποιούν κυρίως πρωτεολυτικές μεθόδους με χρωμογόνο (85, 101).

4.1.8 Αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο

Η εργαστηριακή διάγνωση του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου βασίζεται στην ανίχνευση του αντιπηκτικού λύκου και των αντισωμάτων έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης I (β2 GPI) και της καρδιολιπίνης. Για την εργαστηριακή ανάλυση του αντιπηκτικού λύκου χρησιμοποιείται πλάσμα το οποίο έχει χαμηλή συγκέντρωση αιμοπεταλίων, το οποίο προκύπτει μετά από διπλή φυγοκέντρωση. Τα υψηλά επίπεδα αιμοπεταλίων στο δείγμα αίματος μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά

αποτελέσματα εξαιτίας των φωσφολιπιδίων που εντοπίζονται στην επιφάνειά τους. Επιπρόσθετα, σημειώνεται ότι στις περιπτώσεις ασθενών με οξεία λοίμωξη, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων VIII οδηγούν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ η παρουσία πρωτεΐνης οξείας φάσεως μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Οι εργαστηριακές μέθοδοι που προτιμώνται είναι η μέτρηση του a-PTT και η χρήση του DRVVT (Diluted Russel Venom Viper Time). Η εργαστηριακή ανάλυση των IgG/IgM/aCL/antib2 GP αντισωμάτων και των αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης πραγματοποιείται με ELISA και την εφαρμογή ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η ακριβής εργαστηριακή μεθοδολογία, η καταμέτρηση και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων στηρίζεται σε κατευθυντήριες οδηγίες, διεθνούς επιπέδου (5, 75, 76).

Στην μέθοδο ELISA, χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες που περιέχουν αντιγόνα β2GPI ή ανιονικά φωσφολιπίδια καρδιολιπίνης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται το δείγμα ορού αίματος του ασθενή σε κατάλληλη αραίωση (1/50) και προστίθενται τα κατάλληλα σημασμένα αντισώματα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων που θα αντιδράσουν με τα αντιγόνα βοηθά στην ποσοτικοποίηση IgG/IgM/aCL/antib2 GP αντισωμάτων και των αντισωμάτων έναντι της καρδιολιπίνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης είναι λιγότερο ειδικά από τα IgG/IgM/aCL/antib2 GP στην διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, καθώς με την ELISA, ανιχνεύονται ταυτόχρονα μη ειδικά αντισώματα που σχετίζονται με διάφορες λοιμώξεις. Για αυτό, θα πρέπει να γίνεται επανάληψη της εξέτασης μετά από διάστημα 12 εβδομάδων (76).

4.1.9 Αντίσταση στην Ενεργοποιημένη Πρωτεΐνη C (APC-R, APC Resistance)

Για την εργαστηριακή μέθοδο της APC-R πραγματοποιείται μία αντίδραση aPTT παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C και μία αντίδραση aPTT χωρίς την συμμετοχή της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος του επιμηκυσμένου aPTT παρουσία και απουσία της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (φυσιολογικές τιμές: 2-2.6). Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις περιπτώσεις ασθενών που λαμβάνουν ηπαρίνη ή άλλη αντιπηκτική αγωγή ή έχουν αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα. Στην τροποποιημένη βιολογική μέθοδο, προστίθεται πλάσμα με

ανεπάρκεια του V παράγοντα, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η προαραίωση του πλάσματος του δείγματος και να αντιμετωπίζεται η παρουσία αντιβιταμινών K ή να μειώνονται οι αυξημένες συγκεντρώσεις του VIII παράγοντα. Το ποσοστό ευαισθησίας της τεχνικής είναι > 95% (75, 76).

Άλλη τροποποιημένη μέθοδος με αυξημένη ευαισθησία περιλαμβάνει την χρήση διαλυτού ιστικού παράγοντα και τον υπολογισμό του σχηματισμού θρομβίνης ενδογενώς μέσω της καταμέτρησης της περιοχής που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη. Επίσης, μια άλλη εργαστηριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η Russel Viper Venom Assay στην οποία υπολογίζεται ο δείκτης dilute Russel Viper Venom Time (DRVVT). Ο DRVVT είναι αυξημένος, όταν το δείγμα έχει αφεθεί να αντιδράσει με το δηλητήριο του φιδιού *Agkistrodon contortrix contortrix*, που έχει προκαλέσει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C. Το αποτέλεσμα δίνεται ως η αναλογία του DRVVT με την προσθήκη του δηλητηρίου *Agkistrodon contortrix contortrix* και χωρίς (75, 76).

4.2 Βιοχημικές και ανοσοενζυμικές εξετάσεις

Οι βιοχημικές και ανοσοενζυμικές εξετάσεις χρησιμοποιούν δείγματα ορού αίματος το οποίο έχει πριν υποβληθεί σε φυγοκέντρηση. Με αυτούς τους τρόπους ανιχνεύονται τα αυτοαντισώματα έναντι της β2 GPI και της καρδιολιπίνης IgG, IgM και IgA. Τα IgM και IgG αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης μπορούν να ανιχνευτούν με ειδικές ανοσοενζυμικές μεθόδους. Για παράδειγμα, συχνά χρησιμοποιείται η ενζυμική μέθοδος ανοσοπροσρόφησης, χρησιμοποιώντας την τεχνική sandwich με διπλά αντισώματα. Οι τιμές αναφοράς για τα IgG αντισώματα είναι από 0 έως 15 IU/ml ενώ για τα IgM αντισώματα από 0 έως 6 IU/ml για τα. Η εργαστηριακή τεχνική χρησιμοποιεί βυθίσματα μικροπλάκας τα οποία αποτελούνται από πολυστυρένιο, και είναι επιστρωμένα με ειδικό αντίσωμα. Σε πρώτο στάδιο, ένα αντιγόνο προσροφάται σε μία σταθερή επιφάνεια και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη του δείγματος το οποίο περιέχει το επιθυμητό αντίσωμα. Αντίσωμα και αντιγόνο αντιδρούν, δημιουργώντας σύμπλοκο. Σε επόμενα στάδια, γίνεται ποσοτικοποίηση με την βοήθεια ενός ενζύμου που έχει την ικανότητα έμμεσης σύνδεσης με το σύμπλοκο. Αφού γίνει προσθήκη του υποστρώματος και πραγματοποιηθεί η ενζυμική αντίδραση που δίνει το έγχρωμο σύμπλοκο, γίνεται η μέτρηση της έντασης του φωτός, η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του προς μελέτη μορίου (96).

Η ομοκυστεΐνη μπορεί να ανιχνευτεί με βιοχημική εξέταση στον ορό του αίματος ως προϊόν του μεταβολισμού της μεθειονίνης. Ο προσδιορισμός της ομοκυστεΐνης μπορεί επίσης να γίνει με αρκετές ανοσοενζυμικές μεθόδους. Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι ανοσοδοκιμασίες, όπως η ανοσοδοκιμασία πόλωσης φθορισμού (FPIA, fluorescence polarization immunoassay), η ενζυμική ανοσοδοκιμασία (EIA, enzyme immunoassay), η ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA, chemiluminescence immunoassay) καθώς και η υγρή χρωματογραφία υψηλής τάσης με την χρήση ισοτόπων. Οι ανοσολογικές μέθοδοι μέτρησης της ομοκυστεΐνης προτιμώνται λόγω της υψηλής ακρίβειας και του χαμηλότερου κόστους (96, 97).

Ειδικότερα η μέθοδος CLIA αποτελεί μια ανοσοδοκιμασία η οποία χρησιμοποιεί την φωταύγεια ως δείκτη της αναλυτικής αντίδρασης. Ως φωταύγεια ορίζεται η εκπομπή ακτινοβολίας/ φωτός όταν ένα ηλεκτρόνιο σε διεγερμένη κατάσταση μεταπίπτει στη θεμελιώδη του κατάσταση. Στην ετερογενή φωταύγεια χρησιμοποιούνται ως δείκτες η άμεση χημειοφωταύγεια του εκπεμπόμενου φωτός καθώς και η έμμεση χημειοφωταύγεια (ένζυμα). Στην τεχνική CLIA μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν την υψηλή ειδικότητα και την υψηλή ένταση και την γρήγορη λήψη του σήματος. Τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης μπορούν να επηρεαστούν από την συγκέντρωση της ληφθείσας τροφής σε πρωτεΐνη. Για αυτό, η εργαστηριακή ανάλυση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης πραγματοποιείται σε δείγμα νηστείας. Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητη η άμεση φυγοκέντρηση του δείγματος καθώς τα κύτταρα του αίματος δεν σταματούν να παράγουν ομοκυστεΐνη. Σημειώνεται ότι για κάθε μία ώρα που το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης αυξάνεται κατά 10% (97).

Επιπρόσθετα, η ανοσολογική δοκιμασία προσδιορισμού του ινωδογόνου χρησιμοποιείται για τη διάκριση μεταξύ ποιοτικών και ποσοτικών διαταραχών ινωδογόνου. Συνήθως εφαρμόζονται οι ανοσολογικές τεχνικές της ELISA και ηλεκτροφόρησης, οι οποίες αξιολογούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης (αντιγόνου) χωρίς να δίνουν πληροφορίες για τη λειτουργική δραστηριότητα (85, 92).

Οι μέθοδοι μέτρησης του αντιγόνου της πρωτεΐνης C περιλαμβάνουν την ανοσοηλεκτροφόρηση Laurell, την ενζυμο- ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay), την ακτινική ανοσοδιάχυση (RID, radial

immunodiffusion) και την ενζυμική δοκιμασία φθορισμού (ELFA, enzyme-linked fluorescent assay) (5, 98, 99).

Επιπλέον, για την μέτρηση της συνολικής αντιγονικότητας της πρωτεΐνης S εφαρμόζεται η τεχνική της ELISA, η οποία βασίζεται στην χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία είναι ειδικά για την ελεύθερη, μη συνδεδεμένη πρωτεΐνη S. Σε αυτές τις ανοσολογικές μεθόδους, εφαρμόζονται διαφορετικοί τρόποι για τον διαχωρισμό της σύμπλοκης μορφής και την ποσοτική μέτρηση της ελεύθερης και της προσδεδεμένης πρωτεΐνης S. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης S μπορεί να γίνει με ηλεκτροανοσοδιάχυση κατά Laurell και με την χρησιμοποίηση σωματιδίων Latex (99).

Η ανίχνευση του PAI-1 πραγματοποιείται με μια χρωμογόνο μέθοδο και με την ανοσολογική τεχνική ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Στην χρωμογόνο μέθοδο, χρησιμοποιείται γνωστή ποσότητα t-PA στο πλάσμα του δείγματος. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου PAI-1 και t-PA, μετριέται η ποσότητα του tPA με χρωμογονικό τρόπο. Η συγκεκριμένη εξέταση δεν είναι ειδική ενώ πρέπει να πραγματοποιείται γρήγορα λόγω της υψηλής δραστηριότητας που παρουσιάζει ο PAI-1. Στην ELISA, σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν τιμές αναφοράς ενώ δεν παρέχονται πληροφορίες για την δραστηριότητα του PAI-1 (98, 99).

Στην ELISA που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των δ-διμερών, μελετάται η πρόσδεση του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που φέρει σήμανση σε ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο των δ- διμερών. Το αντιγόνο του δείγματος του ασθενούς λειτουργεί ως ανταγωνιστής της προηγούμενης αντίδρασης, με αποτέλεσμα το σήμα που παράγεται να είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου. Τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για την ELISA περιλαμβάνουν έτοιμο προς χρήση αντίσωμα ενωμένο με το ένζυμο, μικροπηγάδια, βαθμονομητές για την ποσοτικοποίηση της μέτρησης, υπόστρωμα, διάλυμα για τον τερματισμό της αντίδρασης και διάλυμα έκπλυσης (98, 99).

4.3 Μοριακός έλεγχος- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) συνιστά μια χρήσιμη μοριακή τεχνική που πραγματοποιείται in vitro. Η PCR βασίζεται στις αρχές της αντιγραφής του DNA, επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA και την παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων. Με

PCR μπορεί να ανιχνευτεί σε σύντομο χρονικό διάστημα η μετάλλαξη του V Leiden παράγοντα και η μετάλλαξη της προθρομβίνης G20210A που συνιστούν τις συχνότερες κληρονομικές θρομβοφιλίες (5, 85, 103).

Για την ανίχνευση της αιτιολογικής μετάλλαξης FV Leiden και G20210A χρησιμοποιούνται κυρίως οι τεχνικές των PCR-RFLP, η reverse Strip Assay®, TaqMan PCR πραγματικού χρόνου και η SNaPshot®. Η ακριβής επιλογή ασθενών θα πρέπει να προηγείται του γενετικού ελέγχου. Ο μοριακός έλεγχος μπορεί να εφαρμοστεί σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό θρομβώσεων και υποτροπές επεισοδίων θρομβοεμβολής. Ανάμεσα στους ποικίλους γενετικούς πολυμορφισμούς που έχουν βρεθεί και συνιστούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση θρομβοεμβολικής νόσου, προτείνεται να εξετάζεται μόνο η ύπαρξη της μετάλλαξης του παράγοντα V Leiden και η G20210A στο γονίδιο της προθρομβίνης (102, 103).

Για την πραγματοποίηση της PCR, χρησιμοποιούνται τα εξής στοιχεία: το DNA υπόστρωμα (template), τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleoside triphosphates, dNTPs), οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές (primers) μήκους περίπου 20 βάσεων, ιόντα μαγνησίου και το ένζυμο της Taq πολυμεράσης. Η προσθήκη αυτών των στοιχείων πραγματοποιείται σε σωληνάριο το οποίο περιέχει εκχυλισμένο DNA το οποίο λήφθηκε από το δείγμα αίματος. Για την PCR χρησιμοποιείται ολικό αίμα το οποίο συλλέγεται σε ειδικό σωληνάριο με EDTA αντιπηκτικό (104, 105).

Αναλυτικότερα, το DNA υπόστρωμα που περιέχει την αλληλουχία που θα ενισχυθεί, συνιστά το εκμαγείο για την παραγωγή της συμπληρωματικής του αλυσίδας. Το DNA υπόστρωμα αποτελείται από μονόκλωνες αλυσίδες οι οποίες προκύπτουν από την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με την βοήθεια της θέρμανσης (104, 105).

Οι εκκινητές είναι συνθετικά μικρού μεγέθους (μήκους 20-30 βάσεων) ολιγονουκλεοτίδια τα οποία παίζουν καίριο ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής της αλληλουχίας στόχου. Οι εκκινητές προσδένονται σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας στις αλληλουχίες που πρόκειται να ενισχυθούν. Η DNA πολυμεράση (DNA polymerase) αποτελεί το βασικό ένζυμο για την πραγματοποίηση των κύκλων της PCR. Είναι θερμοανθεκτικό καθώς η δράση της αναστέλλεται στους 94° C. Η Taq polymerase απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και βοήθησε σημαντικά στην αυτοματοποίηση και στην ευρεία εφαρμογή της PCR. Για να εξασφαλιστεί η δράση της DNA πολυμεράσης, απαιτείται η προσθήκη μείγματος τεσσάρων dNTPs (ATP, TTP, CTP, GTP) σε ισομοριακή

συγκέντρωση, τα οποία εφαρμόζουν στη μήτρα και πολυμερίζονται κατά το στάδιο επέκτασης των εκκινητών. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου αποτελεί βασική προϋπόθεση για να σταθεροποιηθούν οι εκκινητές σε ειδικά σημεία του εκμαγείου DNA (104, 105).

Η PCR πραγματοποιείται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής και ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών. Βασικό βήμα για την PCR είναι η πρόσδεση των εκκινητών στους δύο κλώνους της αλληλουχίας DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τα εξής στάδια (104, 105):

(α) Αποδιάταξη (denaturation) του DNA. Κατά την αποδιάταξη, η διπλή έλικα της αλληλουχίας-στόχου αποδιατάσσεται με τη θερμότητα. Η αποδιάταξη λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες 90-95° C και έχει διάρκεια 30-60".

(β) Υβριδοποίηση των εκκινητών, (primer annealing). Λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, (50-65° C). Κατά την υβριδοποίηση, τα μόρια εκκινητές υβριδοποιούνται σύμφωνα με τον κανόνα τις συμπληρωματικότητας με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους στο κομμάτι DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το συγκεκριμένο στάδιο διαρκεί 30-60".

(γ) Επιμήκυνση της αντίδρασης. Το κεντρικό ένζυμο της PCR, η DNA πολυμεράση προχωρά στην επιμήκυνση των αλληλουχιών των εκκινητών που έχουν υβριδοποιηθεί. Η κατεύθυνση της δράσης της DNA πολυμεράσης είναι 5'–3'. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν υβριδοποιηθεί τα μόρια εκκινητές. Η φάση επέκτασης (primer extension) διαρκεί 60"-120" και λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 72° C. Στη φάση επέκτασης, πραγματοποιείται σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των εκκινητών που έχουν υβριδοποιηθεί. Η σύνδεση της DNA πολυμεράσης στα σημεία που έχουν υβριδοποιηθεί τα μόρια εκκινητές ευνοείται στους 72° C για 1'-2'. Χάρη στην παρουσία μίγματος dNTPs, της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών, η πολυμεράση είναι σε θέση να αντιγράψει την αλληλουχία στόχο, προσθέτοντας νουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5'–3'.

Μετά το πέρας του κάθε κύκλου, η ποσότητα των προϊόντων της PCR πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Ενδεικτικά, μετά από 20 κύκλους, η αλληλουχία στόχος έχει πολλαπλασιαστεί κατά 1 εκατομμύριο φορές, μέσα σε μία ώρα. Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου πραγματοποιούνται σε αυτόματο θερμοκυκλοποιητή (thermocycler). Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται σε κάθε εργαστήριο επιδέχονται τροποποιήσεις (104, 105).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η ενζυμική επεξεργασία των προϊόντων της PCR με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και η ειδική χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Στην περίπτωση των φυσιολογικών αλληλομόρφων, το περιοριστικό ένζυμο (MnII ενδονουκλεάση) κόβει δύο φορές και έτσι παράγονται τρία θραύσματα. Στην περίπτωση της μετάλλαξης, το περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει μόνον μία θέση, με αποτέλεσμα να παράγονται δύο θραύσματα (104, 105).

Η διερεύνηση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με τους παράγοντες FV, FII και MTHFR μπορεί να πραγματοποιηθεί και με πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR) και με ανάστροφο υβριδισμό (reverse hybridization). Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές είναι ιχνηθετημένοι με βιοτίνη και βοηθούν στην ενίσχυση των γονιδιακών περιοχών-στόχων. Τα προϊόντα ενίσχυσης που προκύπτουν από την PCR υβριδίζονται με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, που βρίσκονται σε ειδικές ταινίες (strips) νιτροκυτταρίνης. Οι ειδικοί ανιχνευτές μπορούν να εντοπίσουν τα μεταλλαγμένα και τα «άγριου τύπου» αλληλόμορφα γονίδια. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη στρεπταβιδίνης η οποία είναι συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση και αντιδρά με τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα της PCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την multiplex PCR περιλαμβάνει την εξαγωγή γενωμικού DNA, την ενίσχυση 5 γονιδιακών περιοχών με την χρήση εκκινητών ιχνηθετημένων με βιοτίνη, τον υβριδισμό των ιχνηθετημένων προϊόντων ενίσχυσης με τους ειδικούς ανιχνευτές σε strips νιτροκυτταρίνης, τις εκπλύσεις για την απομάκρυνση των μη υβριδισμένων προϊόντων PCR, την χρήση της στρεπταβιδίνης συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση, την οπτικοποίηση της αντίδρασης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης με την βοήθεια του ειδικού χρωμογόνου (NBT/BCIP (Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate) (106).

Η διερεύνηση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με τους παράγοντες FV, FII και MTHFR μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την τεχνική ARMS multiplex PCR (amplification refractory mutation system). Με την συγκεκριμένη μέθοδο μπορούν να ανιχνευτούν ελλείψεις βάσεων και σημειακές μεταλλάξεις. Κατά την διενέργεια της ARMS PCR, πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές PCR, με τρεις διαφορετικούς εκκινητές. Ο πρώτος εκκινητής είναι ο ίδιος και στις δύο αντιδράσεις. Οι υπόλοιποι δύο διαφέρουν στα 3' άκρα τους και είναι συμπληρωματικοί είτε με τα αλληλόμορφα «άγριου τύπου» είτε με τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Στην

περίπτωση ομοζυγωτίας για την «άγριου τύπου» αλληλουχία ή της μεταλλαγμένης, η ενίσχυση θα εντοπιστεί σε ένα σωληνάριο. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας, ενίσχυση θα εντοπιστεί και στα δύο σωληνάρια (107, 108).

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα- Συζήτηση

Είναι κατανοητό ότι η θρομβοφιλία δεν αποτελεί μια νόσο αλλά μια κατάσταση υπερπηκτικότητας του αίματος που προδιαθέτει για θρόμβωση. Η θρομβοεμβολική νόσος δεν θα εμφανιστεί σε όλα τα άτομα με θρομβοφιλία. Είναι ουσιαστικά ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που εξαρτάται από ποικίλους γενετικούς και επίκτητους παράγοντες (αυτοάνοσα νοσήματα, χειρουργεία, κακοήθεια, λήψη αντισυλληπτικών, κύηση). Η θρομβοφιλία θα πρέπει να αξιολογείται με βάση τους παράγοντες κινδύνου και τους παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση υποτροπών της θρομβοεμβολικής νόσου (20, 21, 22).

Η συχνότερη επιπλοκή της θρομβοφιλίας είναι η φλεβική θρομβοεμβολή. Επιπλέον επιπλοκές περιλαμβάνουν τις φλεβικές και αρτηριακές θρομβώσεις, την πνευμονική εμβολή, την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και τις θρομβώσεις σε σπάνιες εντοπίσεις (18, 19, 20). Στις έγκυες γυναίκες, οι επιπλοκές της θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν τις πολλαπλές αποβολές, την καθυστέρηση στην ενδομήτρια ανάπτυξη, την αποκόλληση του πλακούντα και τον εμβρυικό θάνατο (66, 67). Ωστόσο, πιο σπάνια μπορούν να εκδηλωθούν νεκρωτικές δερματικές αλλοιώσεις και οξεία νεογνική θρομβοπενική πορφύρα (39).

Είναι γεγονός ότι έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος τα τελευταία χρόνια στην κατανόησή των παθογενετικών μηχανισμών της κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας, με αποτέλεσμα να παρατηρείται βελτίωση στον προσυμπτωματικό έλεγχο, στην ανίχνευση, στην διάγνωση και στην θεραπευτική αντιμετώπιση τους (28).

Οι κληρονομικές και οι επίκτητες θρομβοφιλίες περιλαμβάνουν μια ετερογενή και πολυπαραγοντική ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο φλεβικής και αρτηριακής θρομβοεμβολής. Τα τελευταία δεδομένα αναδεικνύουν την ανάγκη εξατομικευμένης προσέγγισης της θρομβοφιλίας σε διαφορετικές ομάδες ασθενών (5, 103). Η λήψη ενός ολοκληρωμένου οικογενειακού και ατομικού ιστορικού, σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση και την διενέργεια των

απαιτούμενων εργαστηριακών αναλύσεων για την κληρονομική και επίκτητη θρομβοφιλία μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της διαχείρισης των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης (85). Ο εργαστηριακός έλεγχος της θρομβοφιλίας απαιτεί υψηλά ειδικευμένο προσωπικό για την εργαστηριακή ανάλυση του. Η κλινική κατάσταση του ασθενούς καθώς και συγκεκριμένοι προαναλυτικοί, αναλυτικοί και μετααναλυτικοί παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για την λήψη έγκυρων εργαστηριακών αποτελεσμάτων (103). Τα εργαστηριακά αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων θα πρέπει να ερμηνεύονται από εξειδικευμένους αιματολόγους ενώ οι ασθενείς με θρομβοφιλία θα πρέπει να παρακολουθούνται από εξειδικευμένο κέντρο αιματολογίας (5, 87, 94, 103).

Κεφάλαιο 6: Σύνοψη διατριβής

Η πήξη του αίματος στοχεύει στον περιορισμό της αιμορραγία και περιλαμβάνει έναν περίπλοκο καταρράκτη πήξης στον οποίο συμμετέχει μια πληθώρα πηκτικών παραγόντων που βοηθούν στον σχηματισμό θρόμβου. Οποιαδήποτε διαταραχή που αφορά την συγκέντρωση και την δραστικότητα των πηκτικών παραγόντων σχετίζεται με την εμφάνιση θρομβοφιλίας και την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ενός θρομβοεμβολικού επεισοδίου (6, 7, 8, 9, 10). Οι εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση των διαφορετικών τύπων κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν εξειδικευμένες αιματολογικές εξετάσεις, πηξιολογικές εξετάσεις, βιοχημικές και ανοσοενζυμικές δοκιμασίες καθώς και μοριακές εξετάσεις (5, 85, 87). Για την ανίχνευση της κληρονομικής θρομβοφιλίας εφαρμόζονται εργαστηριακές τεχνικές για την ανίχνευση της αντιθρομβίνης, της πρωτεΐνης C και της πρωτεΐνης S και του παράγοντα VIII, καθώς και μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση των μεταλλάξεων G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης και του παράγοντα V (παράγοντας V Leiden). Επίσης, πραγματοποιείται εργαστηριακή διερεύνηση της κληρονομικής υπερομοκυστεϊναιμίας που οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις που αφορούν τα γονίδια που κωδικοποιούν την MTHFR και την CBS. Για την διερεύνηση της επίκτητης θρομβοφιλίας θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράγοντες κινδύνου ανά ασθενή όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι κακοήθειες (μυελοδύπερπλαστικά νεοπλασμάτα, πολλαπλούν μυέλωμα), η κύηση, η λήψη αντισυλληπτικών (δόση οιστρογόνων και προγεστερινοειδών), η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, η αυξημένη ηλικία και οι χειρουργικές επεμβάσεις. Ειδικά, στις έγκυες γυναίκες, η θρομβοφιλία σχετίζεται με αγγειακές επιπλοκές όπως οι πολλαπλές αποβολές, η καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης, ο εμβρυικός θάνατος, η προεκλαμψία και η αποκόλληση του πλακούντα. Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι η συχνότερη αιτία επίκτητης θρομβοφιλίας και η εργαστηριακή διερεύνηση του στηρίζεται στην ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισώματων, του αντιπηκτικού του λύκου και των αντισωμάτων έναντι της β2 GPI και της καρδιολιπίνης (5, 85, 87, 94, 103). Για την ανίχνευση της κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας γίνεται προσεχτική επιλογή εργαστηριακών εξετάσεων, σε άτομα με αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο. Ο έλεγχος θρομβοφιλίας ενδείκνυται όταν τα εργαστηριακά αποτελέσματα μπορούν να επηρεάσουν τον τύπο και τη διάρκεια της θεραπείας. Οι ενδείξεις για την διενέργεια εργαστηριακού ελέγχου περιλαμβάνουν ασθενείς μετά από φλεβική θρομβοεμβολή,

με θετικό οικογενειακό ιστορικό, πριν από μείζονα χειρουργική επέμβαση, έγκυες, και γυναίκες που λαμβάνουν ή θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (84, 85, 86).

Βιβλιογραφία

- [1] Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. Expert Rev Hematol. 2019;12(3):147-158. doi:10.1080/17474086.2019.1583555.
- [2] Abildgaard U. Olav Egeberg--arvelig antitrombinmangel og trombofili [Olav Egeberg--hereditary antithrombin deficiency and thrombophilia]. Tidsskr Nor Laegeforen. 2001;121(5):604-605.
- [3] Dautaj A, Krasi G, Bushati V, et al. Hereditary thrombophilia. Acta Biomed. 2019;90(10-S):44-46. Published 2019 Sep 30. doi:10.23750/abm.v90i10-S.8758.
- [4] Rambaldi MP, Mecacci F, Guaschino S, Paidas MJ. Inherited and acquired thrombophilias. Reprod Sci. 2014;21(2):167-182. doi:10.1177/1933719113497282.
- [5] Montagnana, M., Lippi, G., & Danese, E. (2017). An Overview of Thrombophilia and Associated Laboratory Testing. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1646, 113–135. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_9.
- [6] Vander J, Sherman J., Luciano D. Φυσιολογία του ανθρώπου (Δεύτερος τόμος) Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού (Human physiology - the mechanisms of body function), Κεφάλαιο 14 Κυκλοφορία σελ: 514-521 ISBN139789608122932 Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2011, Μετάφραση Γελαδάς Ν., Τσακόπουλος Μ.
- [7] Scridon A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis-From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. Int J Mol Sci. 2022;23(21):12772. Published 2022 Oct 23. doi:10.3390/ijms232112772.
- [8] LaPelusa A, Dave HD. Physiology, Hemostasis. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/> .
- [9] Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017;11(4):319-327.

- [10] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-2349. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207522.
- [11] Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53450/>.
- [12] Gupta S. Ph.D. Thesis. Bilbao, Spain: The University of the Basque Country; 2014. Selective activation of platelets by surfaces and soluble agonists.
- [13] Lefkowitz JB .Hemostasis Physiology. JB Lippincott co: Philadelphia, Pa; 2006. Chapter 1: Coagulation pathway and physiology; pp. 3–12.
- [14] Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. [Updated 2022 Aug 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>.
- [15] Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2014). Reversing targeted oral anticoagulants. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2014(1), 518–523. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.518>
- [16] Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-523. doi:10.4103/0019-5049.144643.
- [17] Schved JF. Définition de la thrombophilie [Definition of thrombophilia]. *Ann Med Interne (Paris).* 2003;154(5-6):279-282.
- [18] Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1177-1187. doi:10.1056/NEJMr1700365.
- [19] Ashorobi D, Ameer MA, Fernandez R. Thrombosis. [Updated 2022 Sep 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538430/>.
- [20] Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol.* 2007;44(2):62-69. doi:10.1053/j.seminhematol.2007.02.004.
- [21] O'Donnell, M., Shatzel, J. J., Olson, S. R., Daughety, M. M., Nguyen, K. P., Hum, J., & DeLoughery, T. G. (2018). Arterial Thrombosis in Unusual Sites: A practical review. *European Journal of Haematology.* doi:10.1111/ejh.13165.

- [22] Kushner A, West WP, Khan Suheb MZ, Pillarisetty LS. Virchow Triad. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; December 10, 2022.
- [23] Kovačič APM, Caprnda M, Mrhar A, et al. Impact of drugs on venous thromboembolism risk in surgical patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019;75(6):751-767. doi:10.1007/s00228-019-02636-x.
- [24] Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost.* 2015;114(5):885-889. doi:10.1160/TH15-02-0141
- [25] Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, et al. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41(1):154-164. doi:10.1007/s11239-015-1316-1
- [26] McNamee K, Dawood F, Farquharson RG. Thrombophilia and early pregnancy loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(1):91-102. doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.10.002
- [27] Mannucci PM, Franchini M. The real value of thrombophilia markers in identifying patients at high risk of venous thromboembolism. *Expert Rev Hematol.* 2014;7(6):757-765. doi:10.1586/17474086.2014.960385
- [28] Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J.* 2006;4:15. Published 2006 Sep 12. doi:10.1186/1477-9560-4-15
- [29] Bauer KA, Nguyen-Cao TM, Spears JB. Issues in the Diagnosis and Management of Hereditary Antithrombin Deficiency. *Ann Pharmacother.* 2016;50(9):758-767. doi:10.1177/1060028016651276
- [30] Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res.* 2018;169:23-29. doi:10.1016/j.thromres.2018.07.008
- [31] Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;31(3):275-81.
- [32] Gupta A, Patibandla S. Protein C Deficiency. [Updated 2022 Jul 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542222/>
- [33] Dinarvand P, Moser KA. Protein C Deficiency. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(10):1281-1285. doi:10.5858/arpa.2017-0403-RS

- [34] Zhang Z, Yang Z, Chen M, Li Y. Compound heterozygous protein C deficiency with pulmonary embolism caused by a novel PROC gene mutation: Case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(42):e31221. doi:10.1097/MD.00000000000031221
- [35] De AK, Pal S, Das S, Bhattacharya T. Protein C deficiency. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30(Suppl 1):142-144. doi:10.1007/s12288-013-0298-4
- [36] Irfan Kazi SG, Siddiqui E, Habib I, Tabassum S, Afzal B, Khan IQ. Neonatal Purpura Fulminans, a rare genetic disorder due to protein C deficiency: A case report. *J Pak Med Assoc*. 2018;68(3):463-465.
- [37] Majumder R, Nguyen T. Protein S: function, regulation, and clinical perspectives. *Curr Opin Hematol*. 2021;28(5):339-344. doi:10.1097/MOH.0000000000000663
- [38] Gupta A, Tun AM, Gupta K, Tuma F. Protein S Deficiency. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; December 5, 2022.
- [39] Wu Y, Liu J, Zeng W, Hu B, Hu Y, Tang LV. Protein S Deficiency and the Risk of Venous Thromboembolism in the Han Chinese Population. *Front Cardiovasc Med*. 2022;8:796755. Published 2022 Jun 23. doi:10.3389/fcvm.2021.796755
- [40] Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med*. 2011;13(1):1-16. doi:10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2
- [41] Arsov T, Miladinova D, Spiroski M. Factor V Leiden is associated with higher risk of deep venous thrombosis of large blood vessels. *Croat Med J*. 2006;47(3):433-439.
- [42] Campello E, Spiezia L, Simioni P. Diagnosis and management of factor V Leiden. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(12):1139-1149. doi:10.1080/17474086.2016.1249364
- [43] Zammiti W, Mtiraoui N, Mercier E, et al. Association of factor V gene polymorphisms (Leiden; Cambridge; Hong Kong and HR2 haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia. A case-control study. *Thromb Haemost*. 2006;95(4):612-617.
- [44] Aleksova A, Di Nucci M, Gobbo M, et al. Factor-V HR2 haplotype and thromboembolic disease. *Acta Cardiol*. 2015;70(6):707-711. doi:10.2143/AC.70.6.3120184

- [45] Chaudhry LA, El-Sadek WYM, Chaudhry GA, Al-Atawi FE. Factor XII (Hageman Factor) Deficiency: a rare harbinger of life threatening complications. *Pan Afr Med J.* 2019;33:39. Published 2019 May 21. doi:10.11604/pamj.2019.33.39.18117
- [46] Schmaier AH. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3006-3009. doi:10.1172/JCI36617
- [47] Kujovich JL. Prothrombin Thrombophilia. 2006 Jul 25 [Updated 2021 Feb 4]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1148/>
- [48] Zivelin A, Mor-Cohen R, Kovalsky V, et al. Prothrombin 20210G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. *Blood.* 2006;107(12):4666-4668. doi:10.1182/blood-2005-12-5158
- [49] Elkattawy S, Alyacoub R, Singh KS, Fichadiya H, Kessler W. Prothrombin G20210A Gene Mutation-Induced Recurrent Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Case Report and Literature Review. *J Investig Med High Impact Case Rep.* 2022;10:23247096211058486. doi:10.1177/23247096211058486
- [50] Jadaon MM. Epidemiology of Prothrombin G20210A Mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011;3(1):e2011054. doi:10.4084/MJHID.2011.054
- [51] Dziadosz M, Baxi LV. Global prevalence of prothrombin gene mutation G20210A and implications in women's health: a systematic review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2016;27(5):481-489. doi:10.1097/MBC.0000000000000562
- [52] Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation.* 2015;132(1):e6-e9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311
- [53] Vasdev S, Ford CA, Parai S, Longerich L, Gadag V. Dietary vitamin B6 supplementation attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 1999;200(1-2):155-162. doi:10.1023/a:1007088512834
- [54] Zhang R, Huo C, Wang X, Dang B, Mu Y, Wang Y. Two Common MTHFR Gene Polymorphisms (C677T and A1298C) and Fetal Congenital Heart Disease

Risk: An Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(6):2483-2496. doi:10.1159/000488267

- [55] Human Gene Mutation Database 2022 UK Cardiff <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>
- [56] Froese DS, Huemer M, Suormala T, et al. Mutation Update and Review of Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Hum Mutat*. 2016;37(5):427-438. doi:10.1002/humu.22970
- [57] Samarasinghe N, Mahaliyanage D, De Silva S, Jasinge E, Punyasiri N, Dilanthi HW. Association of selected genetic variants in CBS and MTHFR genes in a cohort of children with homocystinuria in Sri Lanka. *J Genet Eng Biotechnol*. 2022;20(1):164. Published 2022 Dec 13. doi:10.1186/s43141-022-00449-7
- [58] Payne AB, Miller CH, Hooper WC, Lally C, Austin HD. High factor VIII, von Willebrand factor, and fibrinogen levels and risk of venous thromboembolism in blacks and whites. *Ethn Dis*. 2014;24(2):169-174.
- [59] Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, O'Donnell JS. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol*. 2012;157(6):653-663. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09134.x
- [60] Algahtani FH, Stuckey R. High factor VIII levels and arterial thrombosis: illustrative case and literature review. *Ther Adv Hematol*. 2019;10:2040620719886685. Published 2019 Nov 20. doi:10.1177/2040620719886685
- [61] Cohen W, Castelli C, Alessi MC, et al. ABO blood group and von Willebrand factor levels partially explained the incomplete penetrance of congenital thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):2021-2028. doi:10.1161/ATVBAHA.112.248161
- [62] Armstrong EM, Bellone JM, Hornsby LB, Treadway S, Phillippe HM. Acquired Thrombophilia. *J Pharm Pract*. 2014;27(3):234-242. doi:10.1177/0897190014530424
- [63] Bick RL. Hereditary and acquired thrombophilic disorders. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006;12(2):125-135. doi:10.1177/107602960601200201
- [64] Manderstedt E, Lind-Halldén C, Halldén C, et al. Classic Thrombophilias and Thrombotic Risk Among Middle-Aged and Older Adults: A Population-Based

- Cohort Study. *J Am Heart Assoc.* 2022;11(4):e023018. doi:10.1161/JAHA.121.023018
- [65] Siguret V, Emmerich J, Belleville T, et al. Prevalence of Hereditary Thrombophilia in Patients Older Than 75 Years With Venous Thromboembolism Referred for Thrombophilia Screening. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(8):977-981. doi:10.1093/gerona/glu240
- [66] Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G. Inherited thrombophilia and reproductive disorders. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2016;17(1):45-50. Published 2016 Jan 12. doi:10.5152/jtgga.2016.15212
- [67] Simcox LE, Ormesher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):28418-28428. Published 2015 Nov 30. doi:10.3390/ijms161226104
- [68] Di Prima FA, Valenti O, Hyseni E, et al. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *J Prenat Med.* 2011;5(2):41-53.
- [69] Abou-Nassar K, Carrier M, Ramsay T, Rodger MA. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res.* 2011;128(1):77-85. doi:10.1016/j.thromres.2011.02.006
- [70] Voicu DI, Munteanu O, Gherghiceanu F, et al. Maternal inherited thrombophilia and pregnancy outcomes. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):2411-2414. doi:10.3892/etm.2020.8747
- [71] Van Vlijmen, E. F. W., Wiewel-Verschueren, S., Monster, T. B. M., & Meijer, K. (2016). Combined oral contraceptives, thrombophilia and the risk of venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(7), 1393–1403. doi:10.1111/jth.13349
- [72] Morimont L, Haguet H, Dogné JM, Gaspard U, Douxfils J. Combined Oral Contraceptives and Venous Thromboembolism: Review and Perspective to Mitigate the Risk. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:769187. Published 2021 Dec 9. doi:10.3389/fendo.2021.769187
- [73] Tepper NK, Whiteman MK, Marchbanks PA, James AH, Curtis KM. Progestin-only contraception and thromboembolism: A systematic review. *Contraception.* 2016;94(6):678-700. doi:10.1016/j.contraception.2016.04.014

- [74] LaVasseur C, Neukam S, Kartika T, Samuelson Bannow B, Shatzel J, DeLoughery TG. Hormonal therapies and venous thrombosis: Considerations for prevention and management. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022;6(6):e12763. Published 2022 Aug 23. doi:10.1002/rth2.12763
- [75] Lettau M, Schrezenmeier EV, Specker C, Dörner T. Lupus und Thrombophilie : Antiphospholipidsyndrom [Lupus and thrombophilia : Antiphospholipid syndrome]. *Z Rheumatol*. 2020;79(4):332-341. doi:10.1007/s00393-020-00786-3
- [76] Espinosa G, Cervera R. Current treatment of antiphospholipid syndrome: lights and shadows. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(10):586-596. doi:10.1038/nrrheum.2015.88
- [77] Flevas DA, Megaloikonomos PD, Dimopoulos L, Mitsiokapa E, Koulouvaris P, Mavrogenis AF. Thromboembolism prophylaxis in orthopaedics: an update. *EFORT Open Rev*. 2018;3(4):136-148. Published 2018 Apr 27. doi:10.1302/2058-5241.3.170018
- [78] Kahn SR, Shivakumar S. What's new in VTE risk and prevention in orthopedic surgery. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4(3):366-376. Published 2020 Mar 9. doi:10.1002/rth2.12323
- [79] Aziz F, Patel M, Ortenzi G, Reed AB. Incidence of Postoperative Deep Venous Thrombosis Is Higher among Cardiac and Vascular Surgery Patients as Compared with General Surgery Patients. *Ann Vasc Surg*. 2015;29(4):661-669. doi:10.1016/j.avsg.2014.11.025
- [80] Smith BR, Diniz S, Stamos M, Nguyen NT. Deep venous thrombosis after general surgical operations at a university hospital: two-year data from the ACS NSQIP. *Arch Surg*. 2011;146(12):1424-1427. doi:10.1001/archsurg.2011.204
- [81] Siddique AB, Mahmud F, Haque MA, et al. A Prospective Study of Deep Vein Thrombosis after Major Abdominal Surgery in a Tertiary Level Hospital. *Mymensingh Med J*. 2021;30(4):1009-1015.
- [82] Falanga A. Thrombophilia in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(1):104-110. doi:10.1055/s-2005-863812
- [83] Falanga A, Russo L, Milesi V, Vignoli A. Mechanisms and risk factors of thrombosis in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;118:79-83. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.08.003

- [84] Γεροτζιάφας Γ., Λευκού Ε. Έλεγχος θρομβοφιλίας: σε ποιούς, πότε και γιατί. *Haema* 2014; 5(1): 35-40
- [85] Johnson NV, Khor B, Van Cott EM. Advances in laboratory testing for thrombophilia. *Am J Hematol.* 2012;87 Suppl 1:S108-S112. doi:10.1002/ajh.23186
- [86] Arachchillage DJ, Mackillop L, Chandratheva A, Motawani J, MacCallum P, Laffan M. Thrombophilia testing: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol.* 2022;198(3):443-458. doi:10.1111/bjh.18239
- [87] Hart, C., & Linnemann, B. (2019). Laboratory Diagnostics in Thrombophilia. *Hämostaseologie.* doi:10.1055/s-0039-1677840
- [88] Dorgalaleh A, Favalaro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol.* 2021;43(1):21-28. doi:10.1111/ijlh.13349
- [89] Shikdar S, Vashisht R, Bhattacharya PT., "International Normalized Ratio (INR)," In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, 8 May 2022.
- [90] Favalaro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. How to Optimize Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Testing: Solutions to Establishing and Verifying Normal Reference Intervals and Assessing APTT Reagents for Sensitivity to Heparin, Lupus Anticoagulant, and Clotting Factors. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(1):22-35. doi:10.1055/s-0038-1677018
- [91] Rountree KM, Yaker Z, Lopez PP. Partial Thromboplastin Time. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507772/>
- [92] Skornova I, Simurda T, Stasko J, et al. Use of Fibrinogen Determination Methods in Differential Diagnosis of Hypofibrinogenemia and Dysfibrinogenemia. *Clin Lab.* 2021;67(4):10.7754/Clin.Lab.2020.200820. doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200820
- [93] Bounds EJ, Kok SJ. D Dimer. [Updated 2022 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431064/>

- [94] Thachil J, Lippi G, Favaloro EJ. D-Dimer Testing: Laboratory Aspects and Current Issues. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:91-104. doi:10.1007/978-1-4939-7196-1_7
- [95] Jung RG, Motazedian P, Ramirez FD, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Thromb J.* 2018;16:12. Published 2018 Jun 5. doi:10.1186/s12959-018-0166-4
- [96] Nichols J. Testing for homocysteine in clinical practice. *Nutr Health.* 2017;23(1):13-15. doi:10.1177/0260106016686094
- [97] Paprotny Ł, Wianowska D, Izdebska M, Celejewska A, Szewczak D, Soliski J. Analysis of serum homocysteine in the laboratory practice - comparison of the direct chemiluminescence immunoassay and high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. *Biochem Med (Zagreb).* 2020;30(3):030703. doi:10.11613/BM.2020.030703
- [98] Cooper PC, Pavlova A, Moore GW, Hickey KP, Marlar RA. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2020;18(2):271-277. doi:10.1111/jth.14667
- [99] Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for protein C deficiency. *Am J Hematol.* 2010;85(6):440-442. doi:10.1002/ajh.21679
- [100] Marlar RA, Gausman JN, Tsuda H, Rollins-Raval MA, Brinkman HJM. Recommendations for clinical laboratory testing for protein S deficiency: Communication from the SSC committee plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2021;19(1):68-74. doi:10.1111/jth.15109
- [101] Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *Am J Hematol.* 2010;85(12):947-950. doi:10.1002/ajh.21893
- [102] Vrtěl P, Slavík L, Vodička R, et al. Searching for genetic variants associated with thrombophilia. *Cas Lek Cesk.* 2019;158(1):28-32.
- [103] Asmis L, Hellstern P. Thrombophilia Testing - a Systematic Review. *Clin Lab* 2023;69(4):10.7754/Clin.Lab.2022.220817. doi:10.7754/Clin.Lab.2022.220817

- [104] Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020;69(4):317-325. doi:10.2144/btn-2020-0057
- [105] Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- [106] López M, Giraldo P, Alvarez P. Multiplex assay for genetic testing of thrombophilia: a method for routine clinical care. *J Clin Lab Anal*. 2007;21(6):349-355. doi:10.1002/jcla.20183
- [107] Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbian S, et al. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(10):1353-1359. doi:10.1007/s10815-013-0071-5
- [108] Cooper PC, Rezende SM. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(3):153-162. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00892.x