



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη προφίλ έκφρασης miRNAs σε παιδιά με θρομβωτικά επεισόδια»

Ιφιγένεια Γκιντώνη

Βιοτεχνολόγος - Υποψήφια Διδάκτωρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρήστος Γιαπιτζάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)

Ιωάννα Παπαθανασίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS-GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS

**“Study of miRNA expression profiles in pediatric patients
with thrombotic events”**

Iphigenia Gintoni

Biotechnologist - PhD Candidate

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
A.1. Αιμοστατική ισορροπία: Μηχανισμοί πήξης και ινωδόλυσης	8
A.1.1 Ο καταρράκτης της πήξης (coagulation cascade)	10
A.1.1.1. Εξωγενής οδός πήξης (TF-FVIIa)	11
A.1.1.2. Ενδογενής οδός πήξης (FVIIIa-FIXa)	12
A.1.2 Ενδογενείς αντιπηκτικοί μηχανισμοί	13
A.1.3. Ο μηχανισμός της ινωδόλυσης	14
A.1.3.1 Ενδογενής έλεγχος της ινωδολυτικής δραστηριότητας	15
A.1.3.2 Διαμόρφωση των επιπέδων του κύριου αναστολέα ινωδόλυσης (PAI-1)	17
A.2. Θρόμβωση	18
A.2.1. Επιδημιολογία και κλινικές εκδηλώσεις	18
A.2.2. Παθογένεση της θρόμβωσης - Η «τριάδα του Virchow»	19
A.2.3. Παράγοντες κινδύνου	20
A.2.3.1. Γενετική προδιάθεση για θρομβοφιλία	21
A.2.4. Ρόλος και διακυμάνσεις του PAI-1 στην θρόμβωση	22
A.2.4.1. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός 4G/5G του γονιδίου <i>SERPINE1</i>	23
A.2.5. Αγγειοτενσίνη II και ο άξονας ACE/PAI-1 στην θρόμβωση	24
A.2.5.1. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός I/D του γονιδίου <i>ACE</i>	25
A.3. Παιδιατρική Θρόμβωση	26
A.3.1. Παράγοντες κινδύνου θρόμβωσης στην παιδική ηλικία	27
A.3.2. Γενετικό υπόβαθρο της παιδιατρικής θρόμβωσης	28
A.3.2.1. Ο πολυμορφισμός 4G/5G ως κύρια γενετική συνιστώσα	28
A.4. Μόρια microRNA (miRNA) και θρόμβωση	28
A.4.1. Βιογένεση των miRNA και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	29
A.4.2. Εμπλοκή miRNA στη θρόμβωση ενηλίκων	31
A.4.3. Κενό γνώσης στην παιδιατρική θρόμβωση	34
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
B.1. Σκοπός της μελέτης	35
B.2. Υλικά και Μέθοδοι	36
B.2.1. Βιοπληροφορική ανάλυση miRNA/mRNA στόχευσης	36

B.2.2. Συλλογή δειγμάτων	36
B.2.3. Διαχωρισμός ορού από ολικό αίμα	36
B.2.4. Απομόνωση RNA ορού	37
B.2.5. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	38
B.2.6. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	39
B.2.7. Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος	42
B.2.8. Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμού 4G/5G του γονιδίου <i>SERPINE1</i>	43
B.2.9. Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμού I/D του γονιδίου <i>ACE</i>	46
B.2.10. Στατιστική ανάλυση.....	48
B.3. Αποτελέσματα.....	49
B.3.1. Χαρακτηριστικά μελετώμενων ομάδων	49
B.3.2. Δεδομένα βιοπληροφορικής ανάλυσης miRNA/mRNA στόχευσης	50
B.3.3. Διαφορική έκφραση miRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων	52
B.3.4. Προφίλ έκφρασης miRNA σε υποομάδες ασθενών συναρτήσει κλινικών και γενετικών παραγόντων	53
B.3.4.I. Χρόνος μετά το θρομβωτικό επεισόδιο	53
B.3.4.II. Γονότυπος πολυμορφισμού 4G/5G (<i>SERPINE1</i>)	54
B.3.4.III. Θεραπευτική αγωγή	54
B.3.4.IV. Πρόσφατη ολοκλήρωση θεραπείας	55
B.3.4.V. Οικογενειακό ιστορικό θρομβώσεων	56
B.3.4.VI. Ανατομική θέση και τύπος εμφάνισης θρόμβωσης.....	56
B.3.4.VII. Γονότυπος πολυμορφισμού I/D (<i>ACE</i>).....	58
B.3.4.VIII. Συνδυαστική επίδραση γονότυπου <i>ACE</i> , τύπου εμφάνισης και ανατομικής θέσης θρόμβωσης	59
B.3.4.IX. Διπλή ομοζυγωτία 4G/4G (<i>SERPINE1</i>) και D/D (<i>ACE</i>).....	60
B.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
B.4.1. Υπόβαθρο και ερευνητικό πλαίσιο	62
B.4.2. Σχεδιασμός και ερευνητική υπόθεση μελέτης	64
B.4.3. Περιγραφική σύνοψη κύριων ευρημάτων	64
B.4.4. Ερμηνεία αποτελεσμάτων και προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης	67
B.4.5. Περιορισμοί μελέτης	71
B.4.6. Μελλοντικές προοπτικές	71
Βιβλιογραφία.....	72

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν, ο καθένας από την δική του πλευρά, σε αυτή τη διαδρομή.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Χρήστο Γιαπιτζάκη, για την πολύπλευρη και ουσιαστική του στήριξη σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια, σε συνδυασμό με την ενθάρρυνση που μου παρείχε κατά τα στάδια σχεδιασμού και υλοποίησής της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Παράλληλα, η ενεργός του συμμετοχή και καθοδήγηση στη οργάνωση της συλλογής των δειγμάτων, καθώς και η μερίμνα για διασφάλιση της βιοηθικής ακεραιότητας της μελέτης, ήταν θεμέλιες για την επιτυχή διεξαγωγή και ολοκλήρωση της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τις Καθηγήτριες Ασπασία Τσέζου και Ιωάννα Παπαθανασίου για τη συνεπίβλεψη της παρούσας εργασίας, την εμπιστοσύνη, καθώς και για το γόνιμο και δημιουργικό ακαδημαϊκό περιβάλλον που διαμόρφωσαν μέσα από την ενεργό διδασκαλία τους, καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις οικογένειες όλων των συμμετεχόντων (ασθενών και υγιών μαρτύρων) για τη στήριξη της παρούσας έρευνας, αλλά και το υγειονομικό προσωπικό της Μονάδας Αιμορραγικών Διαθέσεων (Μονάδα Αιμόστασης και Θρόμβωσης), του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία», για την πολύπλοκη ενορχήστρωση της δειγματοληψίας, ενώ θα ήθελα ειδικά να ευχαριστήσω την ειδικευόμενη Παιδιάτρο Κλεονίκη Μπαλντούνη για τη σημαντική της συμβολή στη συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου προς την οικογένεια και τους δικούς μου ανθρώπους που έχουν στηρίξει κάθε μου ακαδημαϊκό βήμα ως τώρα, προσφέροντας απλόχερα αδιάκοπη ενθάρρυνση και κατανόηση, και που είναι εκείνοι με τους οποίους θέλω να μοιράζομαι κάθε επιτυχία.

Περίληψη

Υπόβαθρο: Η παιδιατρική θρόμβωση αποτελεί σπάνια κλινική οντότητα που εκδηλώνεται από τη νεογνική έως την εφηβική ηλικία, ενέχοντας απειλητικές για τη ζωή συνέπειες. Αποδίδεται στην δυσαναλογία μεταξύ πήξης και ινωδόλυσης, καθώς και στην αλληλεπίδραση της ανώριμης παιδικής αιμόστασης με περιβαλλοντικούς παράγοντες και ένα ισχυρό θρομβοφιλικό γενετικό υπόβαθρο που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1, γονίδιο *SERPINE1*). Ο PAI-1 αποτελεί τον κύριο αναστολέα της ινωδόλυσης και υπόκειται σε ανοδική ρύθμιση από το ACE (ένζυμο μετατροπής αγγειοτενσίνης). Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η έκφραση δύο miRNA ρυθμιστών του άξονα ACE/PAI-1 στο πλαίσιο της παιδιατρικής θρόμβωσης, σε σχέση με κλινικές και γενετικές παραμέτρους που σχετίζονται με χαρακτηριστικές διακυμάνσεις του PAI-1.

Μέθοδοι: Μετά από βιοπληροφορική ανάλυση στόχευσης, η έκφραση των miRNA αξιολογήθηκε με qRT-PCR σε δείγματα ορού 19 παιδιατρικών ασθενών με θρόμβωση (1-18 μήνες μετά το επεισόδιο) και 19 υγιών μαρτύρων. Οι ασθενείς γονοτυπήθηκαν για τους λειτουργικούς πολυμορφισμούς *SERPINE1*-4G/5G και *ACE*-I/D. Τα γονοτυπικά και κλινικά δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά σε σχέση με την έκφραση των miRNA. **Αποτελέσματα:** Τα miR-145-5p, miR-34a-5p ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *SERPINE1*, ενώ το miR-34a στοχεύει επιπλέον τα γονίδια *ACE* και *SERPINF2*. Η έκφραση του miR-34a εμφάνισε σημαντική μείωση (40%) στους ασθενείς, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0,029$), ενώ το miR-145 δεν διέφερε σημαντικά. Στους ασθενείς, η έκφραση του miR-34a παρουσίασε μέγιστο στους 1-3 μήνες μετά τη θρόμβωση και μειώθηκε κατακόρυφα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας ($p=0,031$), με επακόλουθη ήπια αύξηση. Η έκφραση του miR-34a διέφερε ανάλογα με την θέση θρόμβωσης ($p=0,019$), με κορύφωση σε εγκεφαλικά επεισόδια τραυματικής αιτιολογίας ($p=0,016$). Τέλος, στην εγκεφαλική θρόμβωση, η παρουσία διπλής ομοζυγωτίας (4G/4G+D/D) συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του miR-34a, με τον γονότυπο D/D να αντιστρέφει την, επαγόμενη από τον 4G/4G, ανοδική ρύθμιση του miRNA ($p=0,006$). **Συμπεράσματα:** Τα ευρήματά υποδεικνύουν την ύπαρξη ρυθμιστικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του miR-34a και των γονιδίων *ACE* και *SERPINE1*, ενώ τα επίπεδα του στον ορό αποτελούν υποσχόμενο δείκτη ινωδολυτικής επάρκειας, ο οποίος εμφανίζει χαρακτηριστική μείωση σε παιδιατρικούς ασθενείς με θρόμβωση συγκριτικά με υγιή παιδιά, πιθανότατα οδηγώντας σε υποϊνωδόλυση, μέσω ανεπαρκούς ρύθμισης του άξονα ACE/PAI-1.

Λέξεις κλειδιά: microRNA, παιδιατρική θρόμβωση, ACE, PAI-1, *SERPINE1*

Abstract

Background: Pediatric thrombosis is a rare condition that can manifest from neonatal life to adolescence, encompassing life-threatening complications. Its etiological origins lie in the disproportionate imbalance between coagulation and fibrinolysis, driven by premature hemostasis, environmental factors, and a strong thrombophilic genetic background, ultimately resulting in increased levels of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1, *SERPINE1* gene). PAI-1 represents the principal inhibitor of fibrinolysis, with its levels markedly shaped through the upstream regulation of ACE (angiotensin-converting enzyme). In the present study, the expression of two miRNA regulators of the ACE/PAI-1 axis (miR-145-5p, miR-34a-5p) was investigated in the context of pediatric thrombosis and in relation to clinical and genetic parameters, associated with PAI-1 anticipated fluctuations. **Methods:** Following bioinformatic target-prediction, miRNA expression was assessed by qRT-PCR in serum samples from 19 pediatric patients with thrombosis (1-18 months post-incident) and 19 healthy controls. Patients were additionally genotyped for the *SERPINE1*-4G/5G and *ACE*-I/D functional polymorphisms, which contribute to increased PAI-1 levels. Genotypic and clinical data were statistically analyzed in relation to the expression of the studied miRNAs. **Results:** The two miRNAs were identified to regulate the expression of the *SERPINE1* gene, with miR-34a additionally targeting the mRNAs of *ACE* and *SERPINF2*. The expression of miR-34a exhibited a significant decrease (40%) in patients compared to controls ($p=0.029$), while miR-145 levels did not significantly differ between the studied groups. Within patients, the expression of miR-34a attained maximum levels at 1-3 months post-thrombosis, followed by a *nadir* sharply after the completion of treatment ($p=0.031$), and a subsequent mild long-term increase. The expression of miR-34a varied significantly depending on the anatomical site of thrombosis ($p=0.019$), while its levels peaked in trauma-induced strokes ($p=0.016$). Finally, in cerebral thrombosis, the presence of double homozygosity (4G/4G+D/D) was associated with a significant decrease in miR-34a expression, with the D/D genotype reversing its 4G/4G-induced upregulation ($p=0.006$). **Conclusions:** The findings of the present study indicate a regulatory interplay between miR-34a and its targets *ACE* and *SERPINE1*, while its serum expression holds great promise as indicator of fibrinolytic capacity. Its characteristic decrease in pediatric patients with thrombosis, compared to healthy children, possibly leads to hypofibrinolysis, through the inadequate regulation of the ACE/PAI-1 axis.

Keywords: microRNA, pediatric thrombosis, ACE, PAI-1, SERPINE1

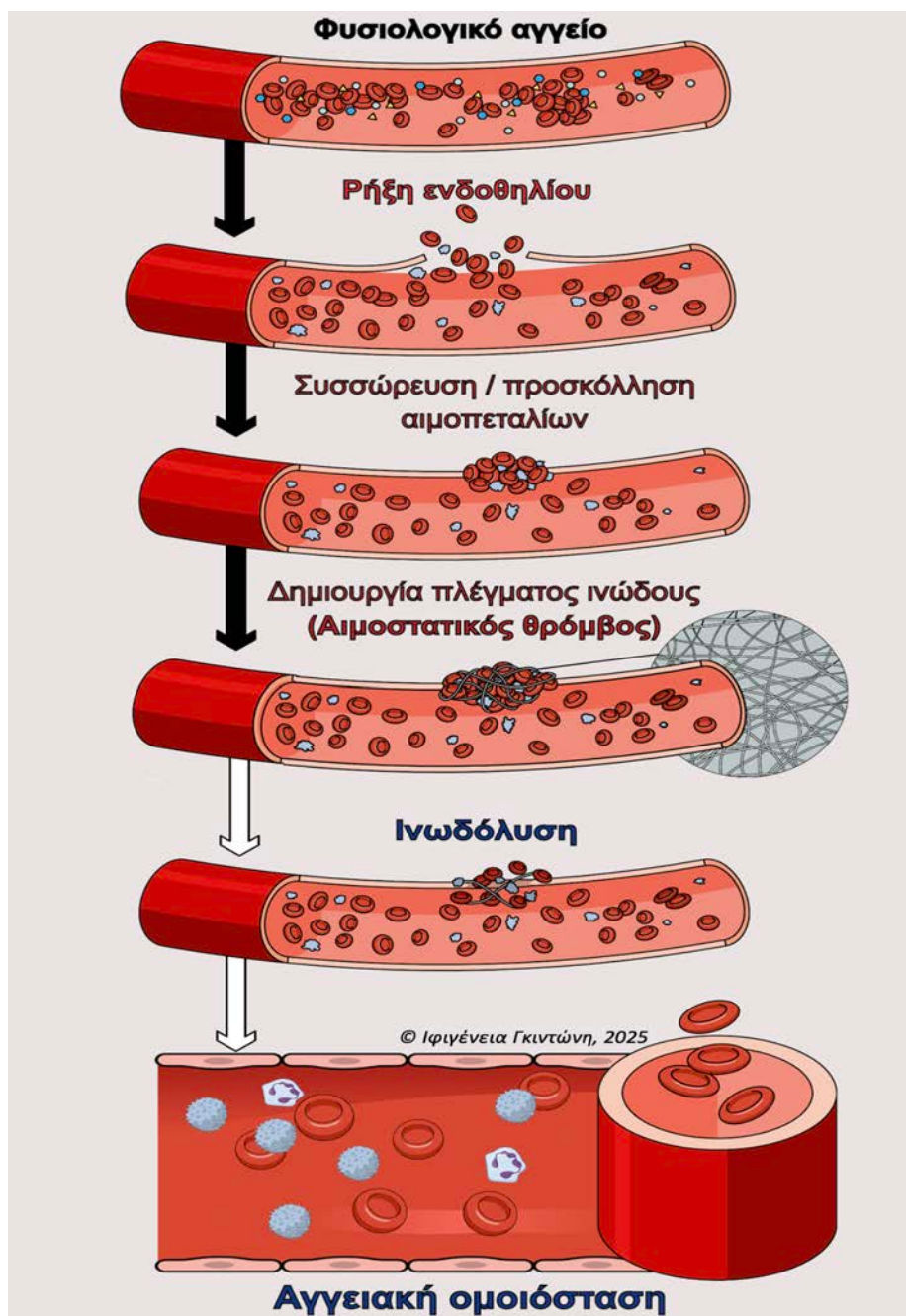
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Αιμοστατική ισορροπία: Μηχανισμοί πήξης και ινωδόλυσης

Η αιμόσταση αποτελεί μια από τις κρίσιμότερες διεργασίες για τη διατήρηση της ομοιόστασης του αγγειακού συστήματος και κατ' επέκταση του οργανισμού (Εικόνα 1). Ο ρόλος της αιμόστασης, υπό φυσιολογικές συνθήκες, έγκειται στη διατήρηση του κυκλοφορόντος αίματος υπό υγρή μορφή, ενώ σε περιπτώσεις διαταραχής της ακεραιότητας του αγγειακού τοιχώματος, αποτρέπει την αιμορραγία μέσω ταχείας ενεργοποίησης της πήξης και τον επακόλουθο σχηματισμό θρόμβου στο σημείο της βλάβης (Bijak *et al.*, 2015; Camire, 2021).

Το τελευταίο περιλαμβάνει τη δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ του αγγειακού ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων, με τους παράγοντες προαγωγής της πήξης και τελικά του ινώδους, ενός βιοπολυμερούς το οποίο σταθεροποιεί τον σχηματισθέντα θρόμβο. Το τελικό στάδιο της αιμόστασης, το οποίο ακολουθεί την αποκατάσταση της αγγειακής βλάβης, περιλαμβάνει την απομάκρυνση του θρόμβου και κατ' επέκταση την επαναφορά της φυσιολογικής αιματικής ροής. Η λύση του θρόμβου προκύπτει μέσω της διαδικασίας της ινωδόλυσης, η οποία περιλαμβάνει την ενζυμική διάσπαση του ινώδους από την πλασμίνη (Weisel, 2005; Johari and Loke, 2012; Sierra, Moreno and García-Ruiz, 2022).

Επομένως, η αιμόσταση δεν αποτελεί στατική κατάσταση. Αντιθέτως, αντιπροσωπεύει μια δυναμική και προσαρμοστική διεργασία, η οποία περιλαμβάνει τη συνεχή αλληλεπίδραση μεταξύ πηκτικών και αντιπηκτικών μηχανισμών με τελικό στόχο την αγγειακή ομοιόσταση. Η διατάραξη αυτής της δυναμικής ισορροπίας, που προκύπτει σε περιπτώσεις υπερβολικής ενεργοποίησης του συστήματος της πήξης ή/και αυξημένης αναστολής της ινωδόλυσης, δύναται να οδηγήσει στην παθολογική κατάσταση της θρόμβωσης, με εν δυνάμει σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή επιπτώσεις (Celkan and Dikme, 2018; Alkarithi *et al.*, 2021).



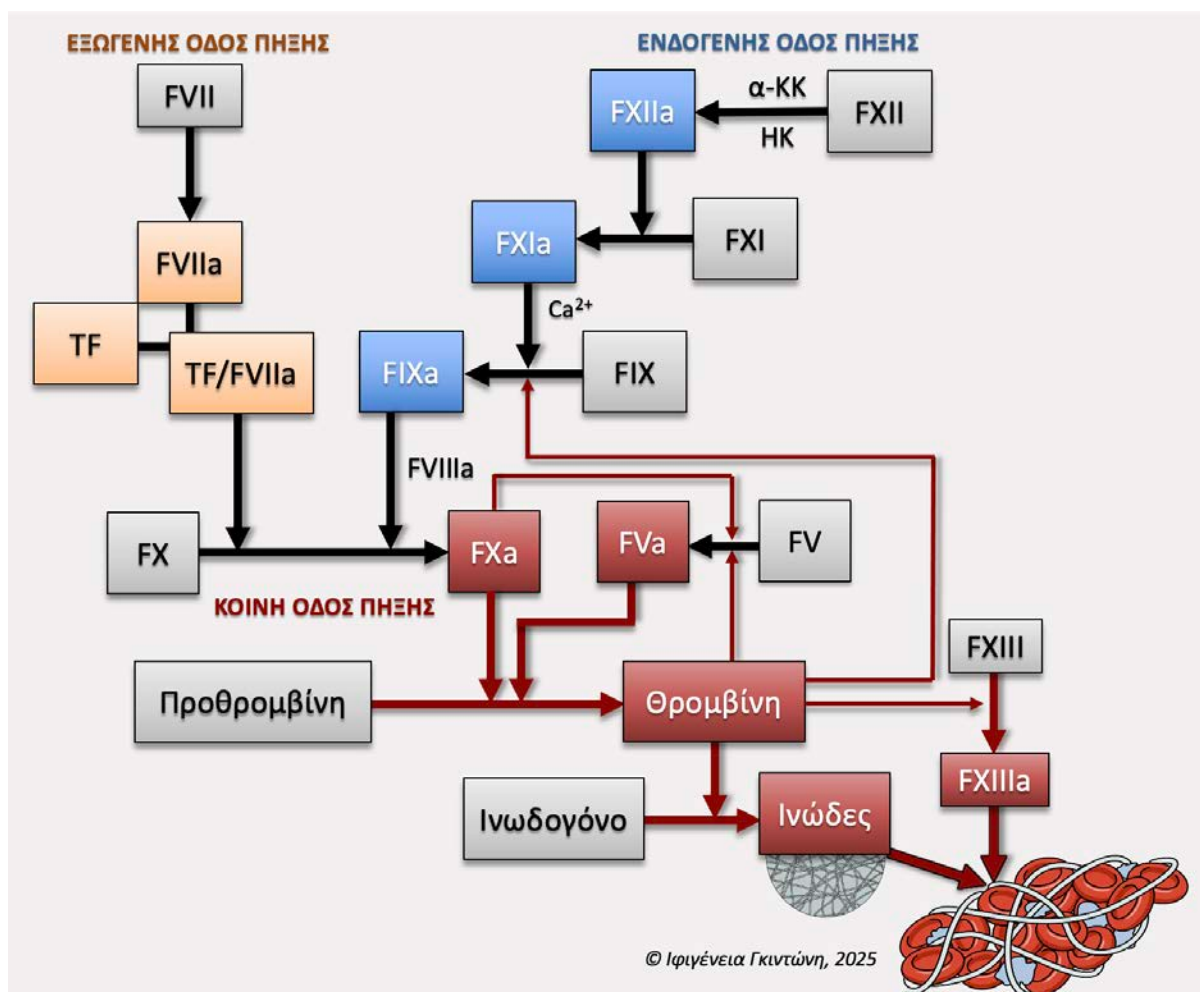
Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των βασικών σταδίων αιμόστασης, με τελικό αποτέλεσμα την αγγειακή ομοιόσταση υπό τη διατήρηση της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ των αλληλοεπιδρώντων μηχανισμών πήξης και ινωδόλυσης. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.1.1 Ο καταρράκτης της πήξης (coagulation cascade)

Η πήξη του αίματος πρόκειται για πολυσύνθετη διαδικασία, βασιζόμενη σε αλληλουχία πρωτεολυτικών αντιδράσεων στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, γνωστή και ως «καταρράκτης της πήξης», με τελικό αποτέλεσμα τη θρομβογένεση (Johari and Loke, 2012).

Ο θρόμβος που σχηματίζεται εντός του αγγειακού συστήματος αποτελεί απόρροια της τοπικής συσσωμάτωσης κυττάρων του αίματος (κυρίως αιμοπεταλίων) και της εναπόθεσης ενός πλέγματος ινώδους (Weisel, 2005; Green, 2006; Camire, 2021). Το τελευταίο προκύπτει από την ενζυμική δράση της πρωτεάσης θρομβίνης, η οποία διασπά το ινωδογόνο σε αδιάλυτα μονομερή ινώδους, τα οποία με τη σειρά τους συσπειρώνονται, δημιουργώντας τον σταθεροποιητικό σκελετό του θρόμβου και αγκιστρώνοντας τον στο ενδοθήλιο. Η θρομβίνη σχηματίζεται μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασης του ανενεργού μορίου της προθρομβίνης από το ενζυμικό σύμπλεγμα της προθρομβινάσης, το οποίο αποτελείται από τον ενεργοποιημένο παράγοντα X (Factor X activated, FXa), τον συμπαράγοντα του, FVa (Factor V activated), καθώς και ιόντα ασβεστίου (Camire, 2021; Cardenas, 2021; Sierra, Moreno and García-Ruiz, 2022).

Ο FX, ως κύριος ρυθμιστής του σχηματισμού θρομβίνης, διαδραματίζει τον πλέον κομβικό ρόλο στον καταρράκτη της πήξης, με τις διεργασίες που ακολουθούν την ενεργοποίησή του να αποτελούν το κοινό, τελικό μονοπάτι πήξεως που οδηγεί στη θρομβογένεση (Εικόνα 2). Ωστόσο, η ενεργοποίηση του FX, η οποία σηματοδοτεί την αφετηρία της κοινής οδού, δύναται να πραγματοποιηθεί μέσω δύο διακριτών μηχανισμών: της εξωγενούς και της ενδογενούς οδού πήξης (Camire, 2021).

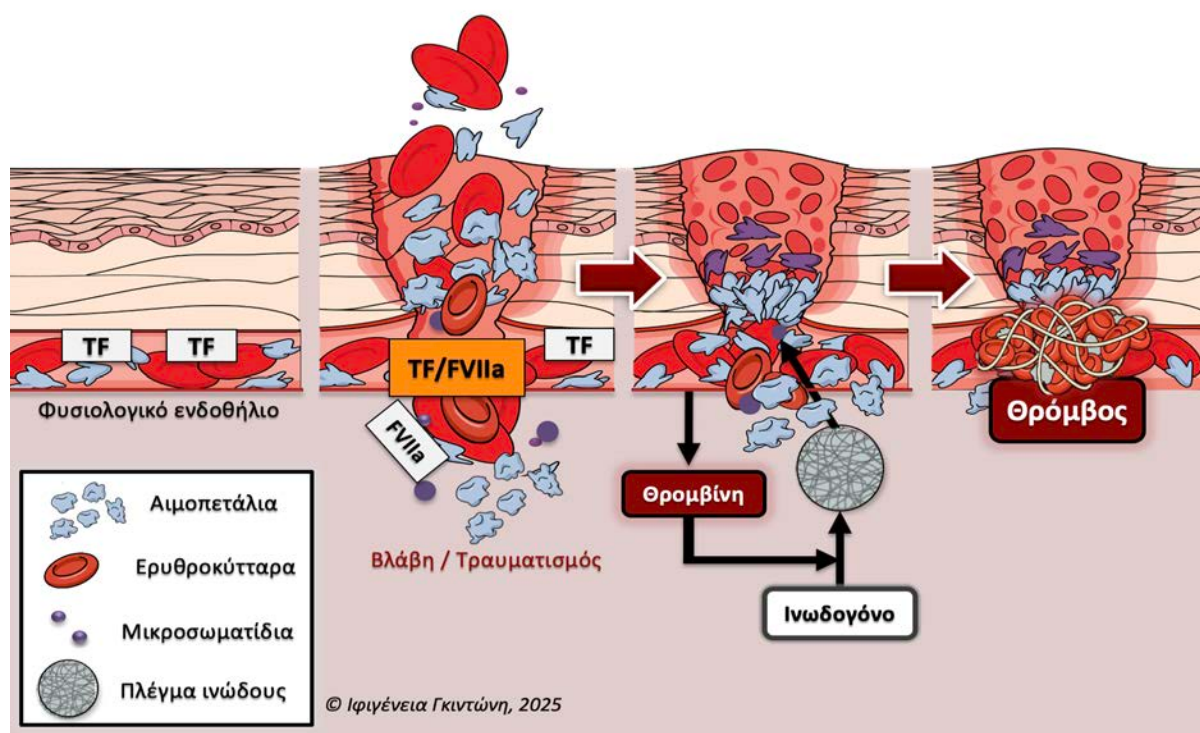


Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των τριών οδών της πήξης του αίματος (εξωγενής, ενδογενής και κοινή), οι οποίες συγκλίνουν στο σχηματισμό θρομβίνης και την επακόλουθη δημιουργία θρόμβου στο σημείο της βλάβης. Στο σχήμα απεικονίζονται επιπλέον οι ανατροφοδοτικές αλληλεπιδράσεις της θρομβίνης με το ενδογενές μονοπάτι πήξεως. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.1.1.1. Εξωγενής οδός πήξης (TF-FVIIa)

Η εξωγενής οδός της πήξης ενεργοποιείται ως απάντηση σε αγγειακό τραυματισμό, ο οποίος προκαλεί την τοπική ρήξη του ενδοθηλιακού «φραγμού», με αποτέλεσμα την έκθεση υποενδοθηλιακών παραγόντων στην κυκλοφορία του αίματος (Εικόνα 3). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν το κολλαγόνο και ο ιστικός παράγοντας (Tissue Factor, TF), ο οποίος έρχεται σε επαφή με τον ενεργό παράγοντα VII (FVIIa) του πλάσματος (Johari and Loke, 2012; Camire, 2021). Η εν λόγω αλληλεπίδραση οδηγεί στον σχηματισμό του ενεργού συμπλέγματος TF/FVIIa που προάγει την πήξη (Εικόνα 2, Εικόνα 3), ξεκινώντας από την προσέλκυση αιμοπεταλίων, τα οποία προχωρούν σε έκκριση σελεκτίνης P (P-selectin) και του παράγοντα Von Willebrand (Von Willebrand Factor, VWF), οδηγώντας συνεργιστικά σε προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων στο

εκτεθειμένο κολλαγόνο του ενδοθηλίου και τελικά στον καθορισμό της θέσης της επικείμενης θρομβογένεσης στο αγγείο (Green, 2006; Mackman, Tilley and Key, 2007; Camire, 2021). Το σύμπλοκο TF/FVIIa, το οποίο σηματοδοτεί την εξωγενή οδό, θεωρείται ως ο κύριος ενεργοποιητής του πρωτεολυτικού καταρράκτη της πήξης, οδηγώντας σε συσσώρευση επιπλέον αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης και ενεργοποίηση του παράγοντα FX της κοινής οδού προς παραγωγή ποσότητας θρομβίνης (Εικόνα 3), η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί την ενδογενή οδό πήξης μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα VIII (FVIII) (Mackman, Tilley and Key, 2007). Τελικό αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης αποτελεί η απότομη και εκτεταμένη παραγωγή θρομβίνης που θα οδηγήσει στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του αιμοστατικού θρόμβου (Johari and Loke, 2012; Grover and Mackman, 2019).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της πυροδότησης της εξωγενούς οδού πήξης, μέσω έκθεσης του ιστικού παράγοντα (TF) στην κυκλοφορία και δημιουργίας του συμπλόκου TF/FVIIa, έπειτα από αγγειακό τραυματισμό και ρήξη του ενδοθηλίου. Στη συνέχεια απεικονίζεται συνοπτικά η διαδικασία σχηματισμού θρόμβου στο σημείο τραυματισμού, μέσω της κοινής οδού, προς αιμόσταση και αποκατάσταση της βλάβης. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.1.1.2. Ενδογενής οδός πήξης (FVIIIa-FIXa)

Η ενδογενής οδός αποτελεί τον δεύτερο βασικό μηχανισμό ενεργοποίησης του καταρράκτη της πήξεως (Εικόνα 2). Σε αντίθεση με την προαναφερθείσα εξωγενή οδό, η οποία εξαρτάται από την έκθεση του ιστικού παράγοντα TF στην κυκλοφορία, η ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης παραγόντων που βρίσκονται αποκλειστικά στο

πλάσμα. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεολυτικές αντιδράσεις οι οποίες περιλαμβάνονται στην ενδογενή οδό, πυροδοτούνται από την επαφή του κυκλοφορούντος πλάσματος με αρνητικά φορτισμένα μόρια ή επιφάνειες (Wheeler and Gailani, 2016; Grover and Mackman, 2019).

Συγκεκριμένα, από το αρνητικό φορτίο πυροδοτείται η ενεργοποίηση του πρόδρομου παράγοντα XII (FXII/ FXIIa), η οποία σηματοδοτεί και την έναρξη της ενδογενούς οδού πήξης. Ο FXIIa με τη σειρά του προκαλεί την μετατροπή της προκαλλικρεΐνης του πλάσματος σε ενεργή α-καλλικρεΐνη και μαζί με το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HK) σχηματίζουν το σύστημα καλλικρεΐνης-κινίνης του πλάσματος που οδηγεί στην επιπλέον ενεργοποίηση του FXII, υπό μορφή ανατροφοδοτικού μηχανισμού. Στη συνέχεια ο FXIIa καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα XI (FXI/FXIa), ο οποίος με τη σειρά του θα καταλύσει την ενεργοποίηση του IX παράγοντα (FIX/FIXa). Ο τελευταίος, μέσω του FVIII, θα οδηγήσει τελικά στην ενεργοποίηση του FX, και κατά συνέπεια της κοινής οδού προς παραγωγή θρομβίνης και αδιάλυτου ινώδους (Johari and Loke, 2012; Wheeler and Gailani, 2016; Grover and Mackman, 2019).

Τέλος, η ενεργοποίηση του FIX δύναται να προκύψει και από το σύμπλοκο TF/FVIIa της εξωγενούς οδού, λειτουργώντας ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των δύο οδών πήξης, σε μια μορφή διασταυρούμενης ενεργοποίησης τους (Grover and Mackman, 2019).

A.1.2 Ενδογενείς αντιπηκτικοί μηχανισμοί

Προκειμένου η αιμόσταση να καταστεί επιτυχής και να επιτελέσει πράγματι ομοιοστατικό ρόλο, απαιτείται η ολοκλήρωση της με απομάκρυνση του θρόμβου ύστερα από αποκατάσταση της αγγειακής ακεραιότητας (Εικόνα 1), φαινόμενο που με τη σειρά του θα επιτρέψει την επαναφορά της φυσιολογικής αιματικής ροής εντός του αγγειακού συστήματος (Weisel, 2005; Johari and Loke, 2012; Sierra, Moreno and García-Ruiz, 2022). Έτσι, οι ενδογενείς αντιπηκτικοί μηχανισμοί καθίστανται απαραίτητοι για τη διατήρηση της αιμοστατικής ισορροπίας και την παρεμπόδιση της παθολογικής υπερενεργοποίησης της πήξης, η οποία αποτελεί πυλώνα ανάπτυξης θρομβωτικών διαταραχών (Johari and Loke, 2012; Grover and Mackman, 2019).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η θρομβογένεση τελεί υπό έλεγχο, εξαιτίας της συντονισμένης δράσης ποικίλων αντιθρομβωτικών μηχανισμών. Ο κυριότερος εξ αυτών έγκειται στην εξουδετέρωση της θρομβίνης και άλλων παραγόντων πήξης όπως οι FXIa, FIXa και ο κομβικός FXa, από την αντιθρομβίνη III (Antithrombin III, AT-III), τον κύριο αναστολέα πρωτεασών

του πλάσματος, η δράση της οποίας ενισχύεται από εκείνη της ηπαρίνης (Johari and Loke, 2012).

Επιπλέον, ως αντισταθμιστική απάντηση στον σχηματισμό και απελευθέρωση της θρομβίνης, επέρχεται η ενεργοποίηση της αντιπηκτικής γλυκοπρωτεΐνης C του πλάσματος, η οποία εξουδετερώνει πρωτεολυτικά τους ενεργοποιημένους παράγοντες πήξης FV και FVIII, μέσω της αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη S (Johari and Loke, 2012; Sedzro *et al.*, 2022). Η τελευταία αποτελεί συμπαράγοντα και του αναστολέα του μονοπατιού του TF (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI), ο οποίος αποτελεί επιπλέον αντιπηκτικό μηχανισμό, μέσω της παρεμπόδισης της ενεργοποίησης του FX και της εκκίνησης της πήξης από το σύμπλοκο TF/FVIIa, της εξωγενούς οδού (Sedzro *et al.*, 2022).

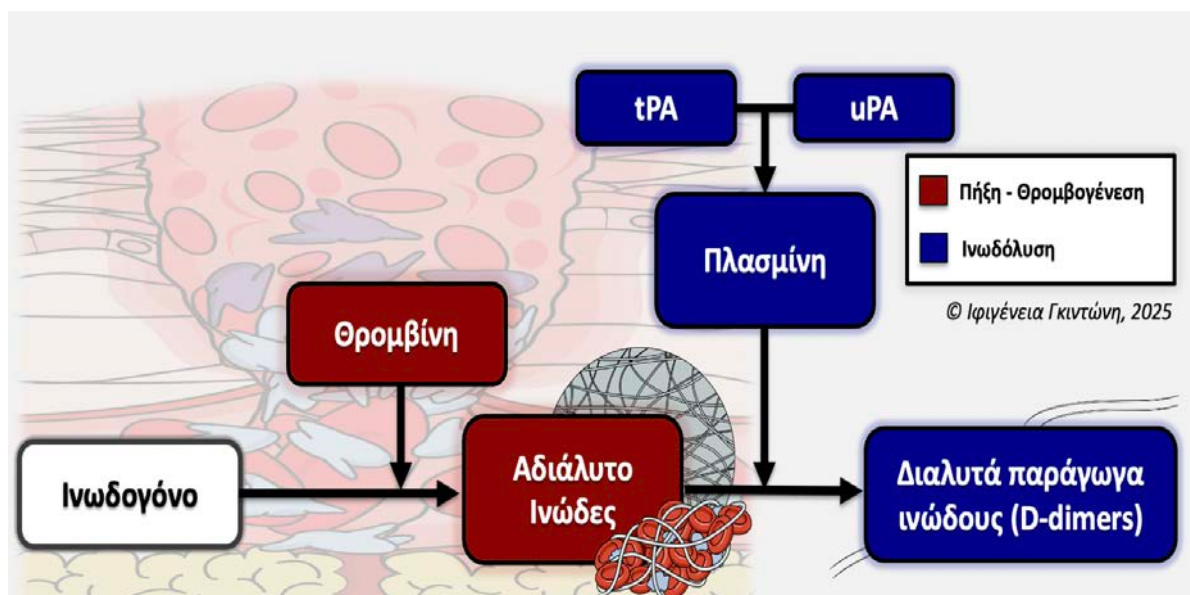
A.1.3. Ο μηχανισμός της ινωδόλυσης

Το ινωδογόνο αποτελεί μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες πήξης του αίματος και απαρτίζεται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες μετά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συναρμολογούνται σε ένα εξαγωνικό σύμπλεγμα «διμερούς τριμερών» που εκκρίνεται στην κυκλοφορία ως γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 340 kDa (Dobson *et al.*, 2024).

Η περίσσεια θρομβίνης που δεν εξουδετερώνεται από τους παραπάνω αντιπηκτικούς μηχανισμούς, είναι εκείνη που μετατρέπει πρωτεολυτικά το κυκλοφορούν ινωδογόνο σε αδιάλυτες ίνες ινώδους, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII (FXIII), που επάγει τη δημιουργία ινώδους πλέγματος μέσω σταθεροποίησης των μονομερών (Εικόνα 2). Το πλέγμα ινώδους που δημιουργείται παγιδεύει μηχανικά αιμοπετάλια, αλλά και ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια, λειτουργώντας ως «σκελετός» του σχηματισθέντος θρόμβου (Johari and Loke, 2012; Franchini *et al.*, 2024).

Έτσι, φυσιολογικά, η εκκίνηση του καταρράκτη της πήξης του αίματος ακολουθείται από την ενεργοποίηση της ινωδόλυσης (Εικόνα 4), διαδικασίας υπεύθυνης για την παρεμπόδιση της ανεξέλεγκτης εξάπλωσης του πλέγματος ινώδους, τη διευκόλυνση της αποκατάστασης της αγγειακής βλάβης, καθώς και την απομάκρυνση των θρόμβων από το αγγειακό σύστημα (Mutch and Medcalf, 2023; Franchini *et al.*, 2024). Η ινωδόλυση βασίζεται στην πρωτεολυτική δράση του ενζύμου της πλασμίνης. Η τελευταία σχηματίζεται από την μετατροπή του ανενεργού, πρόδρομου πλασμινογόνου της κυκλοφορίας, μέσω της δράσης του ιστικού ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tissue-type Plasminogen Activator, tPA), ενός ενζύμου της οικογένειας των πρωτεασών σερίνης, αλλά και της ουροκινάσης τύπου PA (urokinase PA, uPA) (Gintoni, Adamopoulou and Yapijakis, 2021; Sillen and Declerck, 2021; Yepes, 2024). Η

πλασμίνη δρα αναγνωρίζοντας το -υπό μορφή πλέγματος- ινώδες των θρόμβων και προοδευτικά κατακερματίζοντας το σε διαλυτά παράγωγα, συμπεριλαμβανομένων των D-διμερών (D-dimers). Η παρουσία των D-dimers στην κυκλοφορία είναι φυσιολογικό φαινόμενο, με τα επίπεδα τους να αντικατοπτρίζουν την δυναμική ισορροπία μεταξύ πήξης και ινωδολύσης, αλλά και τη διαταραχή αυτής σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η θρόμβωση (Franchini *et al.*, 2024).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ινωδολύσης, μέσω της δράσης της πλασμίνης, μετά το σχηματισμό θρόμβου. Στο σχήμα οι παράγοντες που απαρτίζουν το μονοπάτι της ινωδολύσης έχουν σημειωθεί με μπλε χρώμα, ενώ με κόκκινο αναπαρίστανται οι παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό θρόμβου.

(© Ιφριγένεια Γκιντώνη, 2025)

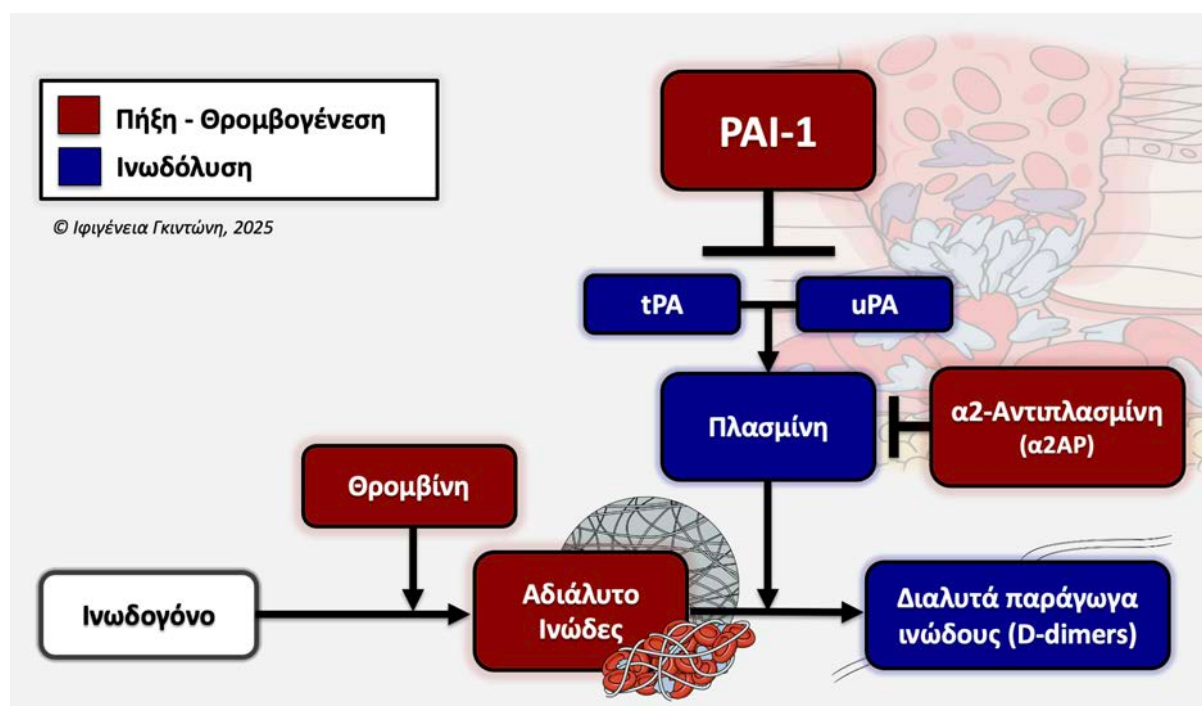
A.1.3.1 Ενδογενής έλεγχος της ινωδολυτικής δραστηριότητας

Ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αποτελεί τον κυρίαρχο αρνητικό ρυθμιστή του ινωδολυτικού συστήματος. Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη 50 kDa (Ha, Oh and Lee, 2009), η οποία εντάσσεται στην οικογένεια των αναστολέων πρωτεασών σερίνης. Ο PAI-1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *SERPINE1* και εκκρίνεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια ως απάντηση στο σχηματισμό θρομβίνης. Ο ρόλος του PAI-1 περιλαμβάνει την ταχεία και ισχυρή αναστολή των κυκλοφορούντων tPA και uPA (Εικόνα 5), παραγόντων καθοριστικών για το σχηματισμό της ινωδολυτικής πλασμίνης (Huebner *et al.*, 2018; Sillen and Declerck, 2021; Ha *et al.*, 2024).

Σχετικά πρόσφατα αναδείχθηκε ο ρόλος ενός επιπλέον σημαντικού ρυθμιστή της ινωδολύσης, της α2-αντιπλασμίνης (α2 antiplasmin, α2AP), η οποία ανήκει στην οικογένεια των

αναστολέων πρωτεασών σερίνης, ομοίως με τον PAI-1 (Viganò *et al.*, 2018; Mohammed, 2021). Η α2AP που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SERPINF2*, εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και δρα μέσω δημιουργίας συμπλόκου με την ελεύθερη πλασμίνη, οδηγώντας στην ταχεία αδρανοποίησή της. Η ενεργοποίησή του, εξαρτώμενου από την α2AP, μηχανισμού αναστολής της ινωδόλυσης, πυροδοτείται από την μετατροπή του συνολικού διαθέσιμου κυκλοφορούντος πλασμινογόνου σε ενεργή πλασμίνη. Δευτερευόντως η α2AP δρα αποτρέποντας την πρόσδεση της πλασμίνης στο πλέγμα ινώδους, ενώ παράλληλα δύναται να παρεμποδίζει την δέσμευση του πρόδρομου πλασμινογόνου στον θρόμβο (Mohammed, 2021). Η σημαντικότητα της α2AP στην αιμόσταση υπογραμμίζεται, καθώς προκαλεί μη αντιστρεπτή αναστολή του 90% της ελεύθερης πλασμίνης, ενώ η απουσία λειτουργικότητας της έχει συσχετιστεί με αιμορραγική διάθεση λόγω δυσλειτουργικής ινωδολυτικής δραστηριότητας (Mohammed, 2021).

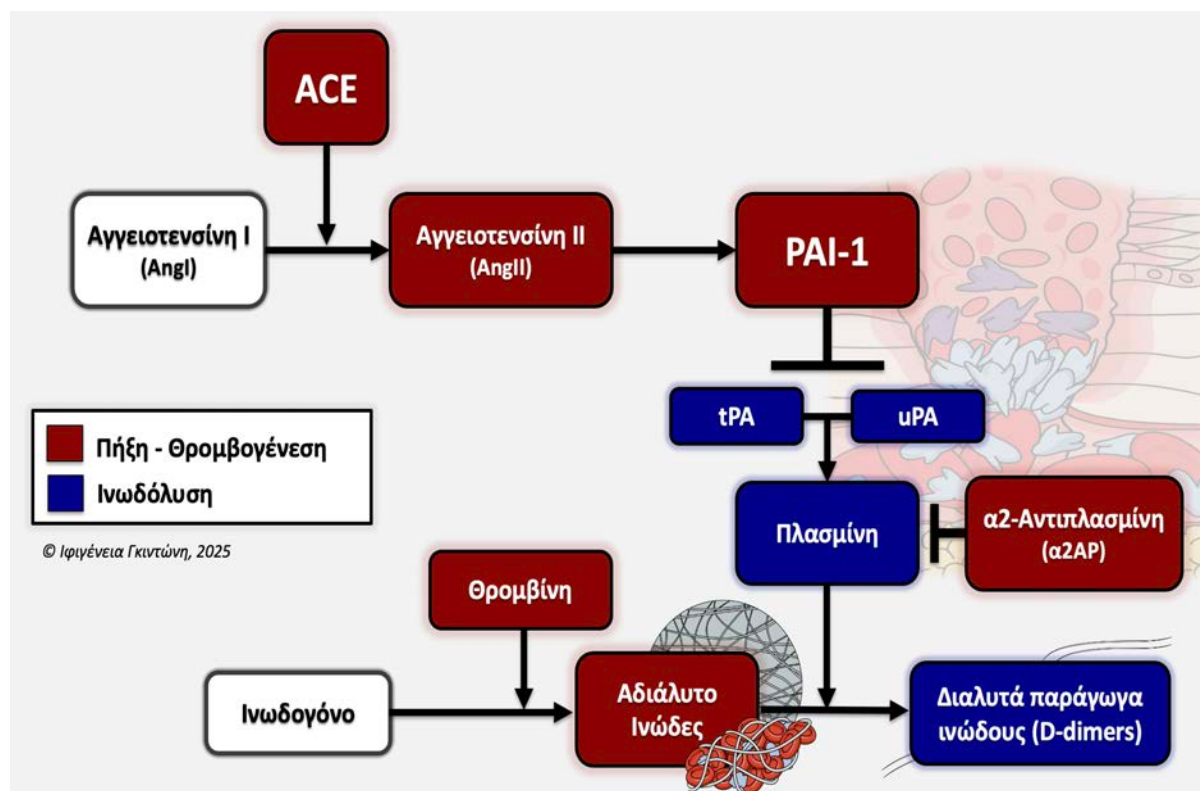
Επομένως, η κρίσιμη διαδικασία της ινωδόλυσης ρυθμίζεται αρνητικά μέσω δύο βασικών μηχανισμών (Εικόνα 5): με έμμεση αναστολή του ίδιου του σχηματισμού πλασμίνης από τον PAI-1 και με άμεση αναστολή της παραχθείσας πλασμίνης από την α2-αντιπλασμίνη (Viganò *et al.*, 2018; Mohammed, 2021; Sillen and Declerck, 2021).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των ενδογενών μηχανισμών ελέγχου της ινωδόλυσης, μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού πλασμίνης (PAI-1) ή αδρανοποίησης της πλασμίνης μετά το σχηματισμό της (α2AP). Στο σχήμα οι παράγοντες που απαρτίζουν το μονοπάτι της ινωδόλυσης έχουν σημειωθεί με μπλε χρώμα, ενώ με κόκκινο αναπαρίστανται οι παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό θρόμβου άμεσα ή μέσω παρεμπόδισης της ινωδολυτικής διαδικασίας. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.1.3.2 Διαμόρφωση των επιπέδων του κύριου αναστολέα ινωδόλυσης (PAI-1)

Η αύξηση των επιπέδων του PAI-1 αποτελεί φυσιολογικό φαινόμενο οξείας απόκρισης σε περιπτώσεις όπου η δημιουργία αιμοστατικών θρόμβων είναι απαραίτητη για την αποφυγή αιμορραγίας, όπως χαρακτηριστικά συμβαίνει σε περιστατικά βαρέων τραυματισμών (Huebner *et al.*, 2018; Moore *et al.*, 2019). Τα επίπεδα του PAI-1 ρυθμίζονται σημαντικά από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Renin Angiotensin System, RAS) (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα επηρεάζονται από την αγγειοδραστική ορμόνη, αγγειοτενσίνη II (angiotensin II, AngII), η οποία προάγει την αύξηση του στην κυκλοφορία, με τα επίπεδα της να ορίζονται από το μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης (ACE), που ευθύνεται για το σχηματισμό της (Felmeden and Lip, 2000; Moore *et al.*, 2002; Gintoni, Adamopoulou and Yapijakis, 2021).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των επιπέδων του κύριου αναστολέα της ινωδόλυσης (PAI-1) μέσω του συστήματος RAS και συγκεκριμένα της αγγειοδραστικής ορμόνης AngII, η οποία σχηματίζεται μέσω της πρωτεολυτικής δράσης του ενζύμου ACE, κατά μήκος του άξονα. Στο σχήμα οι παράγοντες που απαρτίζουν το μονοπάτι της ινωδόλυσης έχουν σημειωθεί με μπλε χρώμα, ενώ με κόκκινο αναπαρίστανται οι παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό θρόμβου άμεσα ή με παρεμπόδιση της ινωδολυτικής διαδικασίας, φαινόμενο που περιλαμβάνει την ανοδική ρύθμιση των επιπέδων του PAI-1. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

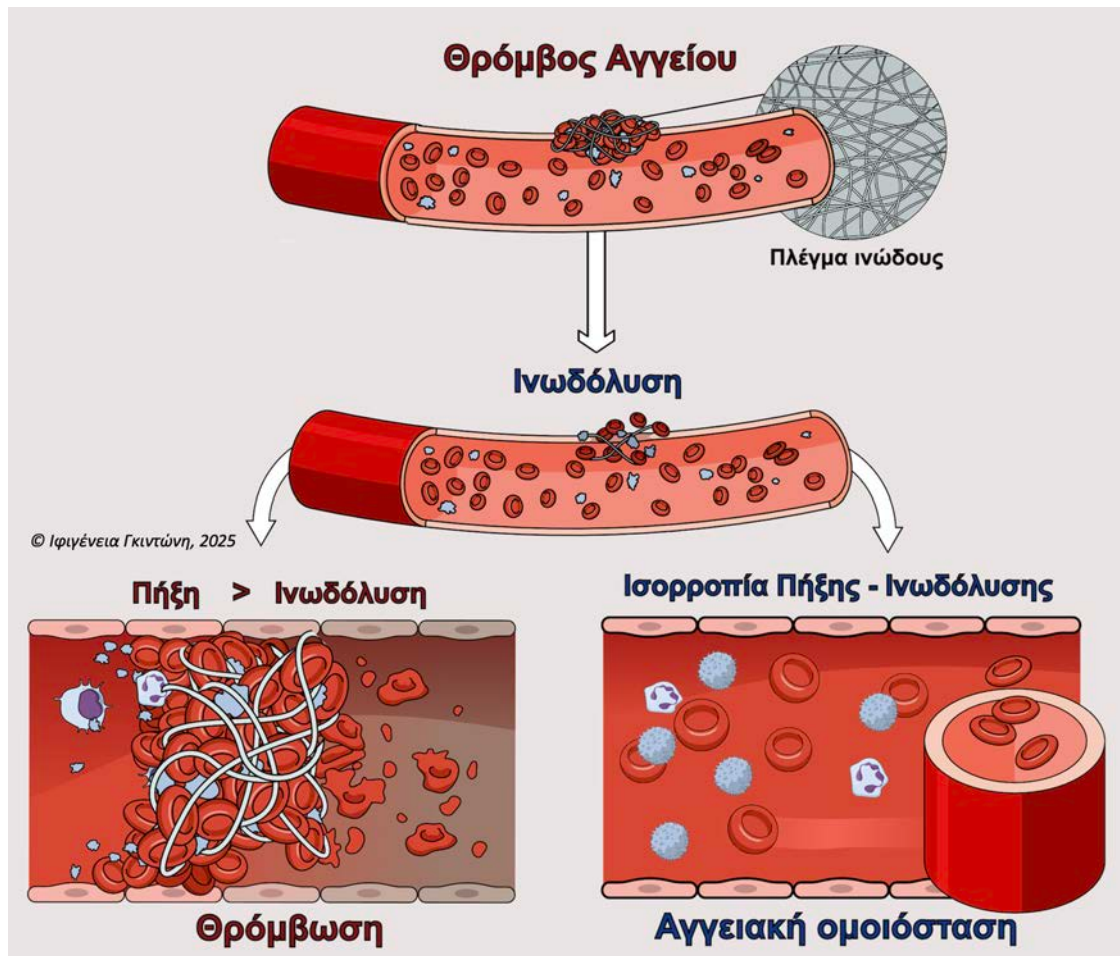
A.2. Θρόμβωση

Η θρόμβωση (ή θρομβοεμβολή) κατατάσσεται μεταξύ των κυριότερων αιτιών νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Ορίζεται ως ο παθολογικός σχηματισμός θρόμβου εντός του αγγειακού συστήματος, ο οποίος αποτελεί συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και λευκοκυττάρων και παρεμποδίζει την κυκλοφορία του αίματος (Εικόνα 7) (Celkan and Dikme, 2018; Alkarithi *et al.*, 2021; Sadia, Ashraf and Mishra, 2021; Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025).

A.2.1. Επιδημιολογία και κλινικές εκδηλώσεις

Ανάλογα με το προσβληθέν αγγείο, η θρόμβωση μπορεί να είναι φλεβική ή αρτηριακή, γεγονός που επηρεάζει την επιδημιολογική εικόνα. Η φλεβική θρόμβωση αποτελεί την επικρατέστερη μορφή, με διαφορετική συχνότητα εμφάνισης ανά ηλικιακή ομάδα του γενικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, μεταξύ ηλικιωμένων, η συχνότητα θρομβοεμβολής έχει καταγραφεί σε 1 στα 100 άτομα ετησίως, ενώ η ετήσια συχνότητα για τη μέση και αναπαραγωγική ηλικία σημειώνεται ως 1/1.000 και 1/10.000, αντίστοιχα. Τέλος, η χαμηλότερη συχνότητα αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό και περιορίζεται σε 1 στα 100.000 παιδιά ετησίως (Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025).

Η θρόμβωση αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό στην παθοφυσιολογία οξέων και χρόνιων παθήσεων. Οξείες θρομβωτικές εκδηλώσεις, που περιλαμβάνουν την αιφνίδια απόφραξη αγγείου (φλέβας ή αρτηρίας), αποτελούν το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια και η πνευμονική εμβολή. Οι παραπάνω καταστάσεις αντιπροσωπεύουν ιδιαίτερα σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις, απειλητικές για τη ζωή (Bochenek, Schütz and Schäfer, 2016). Οι χρόνιες καταστάσεις που σχετίζονται με τη θρόμβωση, περιλαμβάνουν υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο επαναλαμβανόμενων θρομβωτικών επεισοδίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι καρδιαγγειακές παθήσεις (συμπεριλαμβανομένων και των επίκτητων βαλβιδοπαθειών), και τα χρόνια φλεγμονώδη ή λοιμώδη νοσήματα, τα οποία μέσω των μεσολαβητών φλεγμονής, πυροδοτούν την έναρξη θρομβωτικών συμβάντων (Shahinian, Chan and Pislariu, 2022; Thakur *et al.*, 2023).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις ισορροπίας μεταξύ των διαδικασιών πήξης και ινωδόλυσης (αγγειακή ομοιόσταση), αλλά και περιπτώσεις κατά τις οποίες η ινωδολυτική δραστηριότητα υστερεί της πήξης, οδηγώντας στην παθολογική κατάσταση της θρόμβωσης. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.2.2. Παθογένεση της θρόμβωσης - Η «τριάδα του Virchow»

Η ανάπτυξη θρόμβωσης υποδηλώνει σημαντική διατάραξη της αιμοστατικής ισορροπίας και συγκεκριμένα την παθολογική δυσαναλογία μεταξύ των διαδικασιών πήξης και ινωδόλυσης (Εικόνα 7) (Celkan and Dikme, 2018; Alkarithi *et al.*, 2021; Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025). Η παθογένεση της περιγράφεται συγκεντρωτικά από την «τριάδα του Virchow», η οποία περιλαμβάνει τις τρεις βασικές συνιστώσες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη θρομβώσεων: την ενδοθηλιακή βλάβη, την υπερπηκτικότητα, καθώς και τη στάση του αίματος (Gonzalez-Gonzalez, Ziccardi and McCauley, 2021; Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025). Ενδοθηλιακή βλάβη δύναται να προκύψει άμεσα λόγω τραυματισμού ή και έμμεσα εξαιτίας προφλεγμονωδών διεργασιών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μορίων όπως οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες (πχ. ιντερλευκίνες IL-1, IL-1β, IL-6, IL-8 και παράγοντας νέκρωσης όγκων α, TNF-α), οι οποίες δρουν προθρομβωτικά, συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων και στον έμμεσο σχηματισμό θρομβίνης (Gonzalez-Gonzalez, Ziccardi and McCauley, 2021; Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025). Το μη φυσιολογικό αγγειακό ενδοθήλιο, το οποίο στερείται της ικανότητας φυσιολογικής αιμοστατικής ρύθμισης και θρομβόλυσης, ευνοεί την παθολογική παραμονή και επέκταση των θρόμβων, οδηγώντας σε θρομβοεμβολή (Mason *et al.*, 1977).

Η κατάσταση στάσης του αίματος επέρχεται από τη μείωση της διαμέτρου των αγγείων κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προς δημιουργία θρόμβου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση της αιματικής ροής. Η στάση του αίματος είναι πιθανότερο να σημειωθεί σε περιπτώσεις δυσλειτουργικού ή τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου, αλλά δύναται επιπλέον να εμφανιστεί εξαιτίας παραγόντων που επηρεάζουν τη γενική κυκλοφορία, όπως η κατάκλιση και η έλλειψη κίνησης, συνδυαστικά με μια συστηματική προθρομβωτική κατάσταση, όπως συγκεκριμένες ιογενείς λοιμώξεις (πχ. COVID-19) (Gonzalez-Gonzalez, Ziccardi and McCauley, 2021).

Τέλος, η υπερπηκτικότητα του αίματος αποτελεί κατάσταση ανισορροπίας της αιμόστασης που προκύπτει από την λειτουργική υπεροχή των πηκτικών μηχανισμών, έναντι της ενδογενούς αντιπήξης ή/και λόγω της ανεπαρκούς λειτουργίας των αντιπηκτικών και ινωδολυτικών μηχανισμών, έναντι της πήξεως. Η παραπάνω δυσλειτουργία της αιμόστασης μπορεί να είναι επίκτητη, εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων ή καταστάσεων όπως η κύηση, είτε κληρονομούμενη, λόγω γενετικά καθορισμένης προδιάθεσης για θρομβοφιλία (Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025).

A.2.3. Παράγοντες κινδύνου

Η θρόμβωση αποτελεί πολυπαραγοντική παθολογία, η εκδήλωση της οποίας απορρέει από τον συνδυασμό περιβαλλοντικών και ενδογενών παραγόντων κινδύνου. Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη θρόμβωση συντελούν στη δημιουργία των απαραίτητων προθρομβωτικών συνθηκών, όπως αυτές περιγράφονται από «τριάδα του Virchow». Σε αυτούς περιλαμβάνονται καταστάσεις που προκαλούν ενδοθηλιακό τραυματισμό, όπως σοβαροί τραυματισμοί, χειρουργικές επεμβάσεις και εισαγωγή ενδοαγγειακών καθετήρων, καθώς και στάση του αίματος, όπως η παρατεταμένη ακινησία (Liu *et al.*, 2022; Wolf *et al.*, 2024; Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025). Επιπλέον, περιλαμβάνονται συνθήκες που επάγουν την υπερπηκτικότητα του αίματος, όπως η κύηση ή άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με την αύξηση των οιστρογόνων, συμπεριλαμβανομένης της φαρμακευτικής αντισύλληψης και της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης κατά την εμμηνόπαυση (Abou-Ismaïl, Citla Sridhar and

Nayak, 2020; Gintoni, Adamopoulou and Yarijakis, 2021; Liu *et al.*, 2022; Wolf *et al.*, 2024). Τέλος, ο κίνδυνος θρομβώσεων αυξάνεται υπό την παρουσία χρόνιας φλεγμονής, υποξίας, και συστηματικών ιογενών λοιμώξεων, καθώς και σε περιπτώσεις κακοήθειας ή κατά τη διάρκεια χημειοθεραπείας. Συγκεκριμένα, κυρίως λόγω της συνεχούς αγγειογένεσης που χαρακτηρίζει τους καρκινικούς όγκους, οι ασθενείς με κακοήθεια παρουσιάζουν 12 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ενώ ο κίνδυνος αυξάνεται έως και 23 φορές σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγωγή με χημειοθεραπευτικά σχήματα (Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015; Sadia, Ashraf and Mishra, 2021; Wolf *et al.*, 2024).

Περίπου το 1/3 των ασθενών με φλεβική θρόμβωση παρουσιάζει υποτροπή εντός των δέκα πρώτων ετών από το αρχικό θρομβωτικό επεισόδιο. Το γεγονός αυτό οφείλεται τόσο στη βαρύτητα, όσο και στην παραμονή παραγόντων κινδύνου που εξαρχής συντέλεσαν στην εμφάνιση της παθολογίας (Wolf *et al.*, 2024). Τον μονιμότερο ενδογενή παράγοντα κινδύνου, αποτελεί η γενετική προδιάθεση για θρομβοφιλία (Yarijakis *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2024).

A.2.3.1. Γενετική προδιάθεση για θρομβοφιλία

Παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη θρόμβωσης αποτελεί επίσης η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού, βεβαρημένου με θρομβωτικά επεισόδια. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την καθοριστική συμβολή της γενετικής προδιάθεσης για θρομβοφιλία, η οποία εκτιμάται πως αντιπροσωπεύει έως και στο 50% του συνολικού κινδύνου εμφάνισης θρομβώσεων (Yarijakis *et al.*, 2012; Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015; Wolf *et al.*, 2024).

Η θρομβοφιλία, η οποία ορίζεται ως η αυξημένη προδιάθεση για πήξη του αίματος, σχετίζεται κυρίως με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης φλεβικών θρομβώσεων, οι οποίες δύνανται να εντοπιστούν σε σημεία όπως ο εγκέφαλος, οι αμφιβληστροειδείς και τα σπλάχνα (Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015; Dautaj *et al.*, 2019). Η θρομβοφιλία γενετικής αιτιολογίας εμφανίζει ιδιαίτερα μεταβλητή έκφραση, καθώς ορισμένα άτομα μπορεί να μην εκδηλώσουν ποτέ κάποιο σοβαρό θρομβωτικό επεισόδιο, άλλα δύνανται να παραμείνουν ασυμπτωματικά έως μεταγενέστερα στάδια της ενήλικης ζωής, ενώ σημειώνονται περιπτώσεις που εμφανίζουν, ακόμη και επαναλαμβανόμενες, θρομβώσεις πριν την ηλικία των 30 ετών (Dautaj *et al.*, 2019).

Η γενετική προδιάθεση για θρόμβωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία κληρονομούμενων παραλλαγών σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν παράγοντες του συστήματος αιμόστασης (Yarijakis *et al.*, 2012; Dautaj *et al.*, 2019). Οι παραλλαγές αυτές επηρεάζουν είτε την παραγόμενη ποσότητα είτε τη λειτουργικότητα των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών, με

αποτέλεσμα να επιφέρουν μια γενετικά καθορισμένη διαταραχή της αιμοστατικής ισορροπίας στα φέροντα άτομα (Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015; Wolf et al., 2024).

Οι πιο κοινές παραλλαγές περιλαμβάνουν τον παράγοντα V (Factor V, FV) Leiden και τον πολυμορφισμό G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης έως και 3 φορές (Wolf et al., 2024). Οι παραλλαγές αυτές θεωρούνται κυρίαρχοι προδιαθεσικοί παράγοντες για θρομβοφιλία και εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα σε πληθυσμούς της ανατολικής και νότιας Ευρώπης, συμπεριλαμβανομένου και του Ελληνικού (Yarijakis et al., 2012; Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015).

Άλλες εδραιωμένες γενετικές παραλλαγές, που προδιαθέτουν σε θρομβοφιλική διάθεση, περιλαμβάνουν τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου *MTHFR* (*Methylene Tetrahydrofolate Reductase*), αλλά και λειτουργικούς πολυμορφισμούς που επηρεάζουν τα επίπεδα γονιδίων των συστημάτων RAS και ινωδόλυσης (Yarijakis et al., 2012; Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015). Συγκεκριμένα πρόκειται για τον πολυμορφισμό Insertion/Deletion (I/D) του γονιδίου *ACE*, καθώς και τον 4G/5G λειτουργικό πολυμορφισμό του γονιδίου *SERPINE1*, που κωδικοποιεί τον κύριο αναστολέα της ινωδόλυσης, PAI-1 (Yarijakis et al., 2012; Huebner et al., 2018).

A.2.4. Ρόλος και διακυμάνσεις του PAI-1 στην θρόμβωση

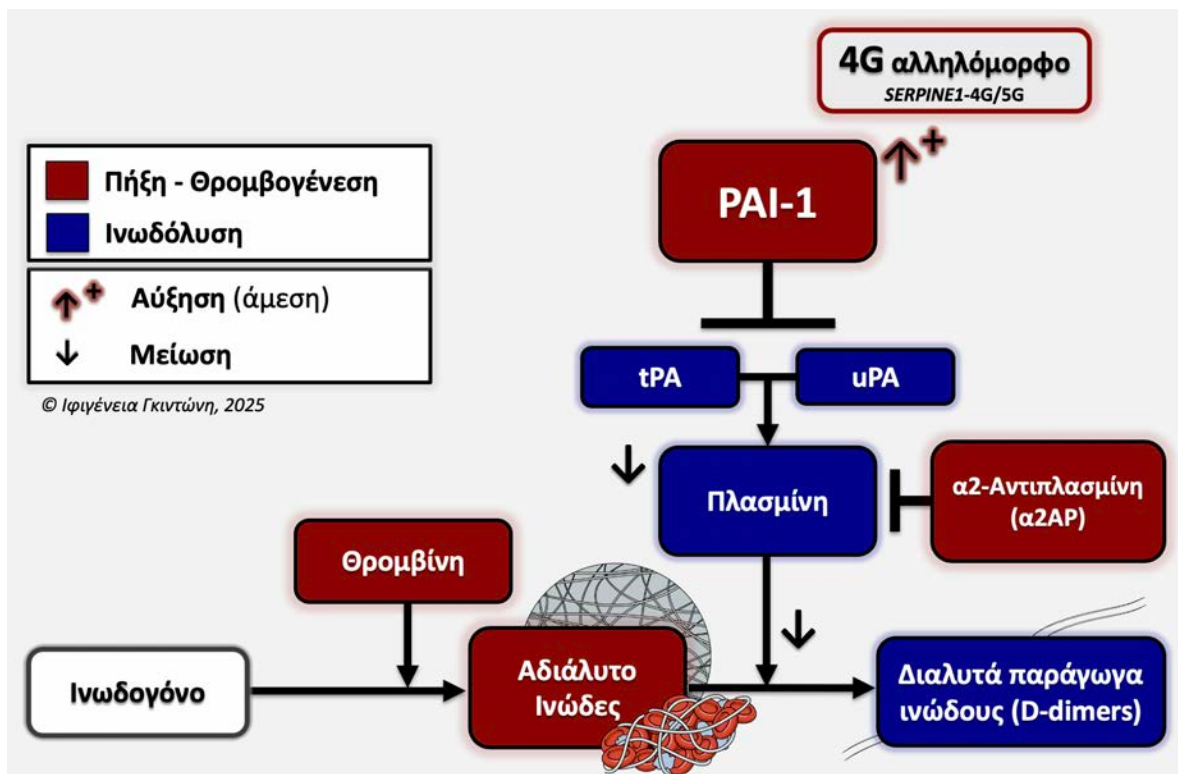
Ο παράγοντας PAI-1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της θρόμβωσης μέσω της ισχυρής αναστολής των tPA και uPA, οδηγώντας στην παρεμπόδιση σχηματισμού πλασμίνης, και κατ' επέκταση της ινωδόλυσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα του στην κυκλοφορία και τους ιστούς απαντώνται εξαιρετικά χαμηλά, ωστόσο αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις, μέσω παραπροϊόντων υποξίας, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, όπως οι τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Weisel, 2005; Ha, Oh and Lee, 2009; Huebner et al., 2018).

Έχει αποδειχθεί πως η αύξηση των επιπέδων του PAI-1 οδηγεί σε σημαντική μείωση της ινωδολυτικής δραστηριότητας και σε υπερπηκτική κατάσταση του αίματος, αυξάνοντας κατακόρυφα τον κίνδυνο ανάπτυξης θρομβώσεων, αλλά και αντίστασης στη θρομβολυτική θεραπεία (Brown, 2010; Tarango and Manco-Johnson, 2017). Ταυτόχρονα η ίδια η θρομβίνη, η οποία ευθύνεται άμεσα για τον σχηματισμό του θρόμβου μετατρέποντας το ινωδογόνο σε ινώδες, αποτελεί παράγοντα που πυροδοτεί την έκκριση του PAI-1, ενισχύοντας έτσι τον φαύλο κύκλο υπερπηκτικότητας (AL, 2012; Han et al., 2016; Seheult and Chibisov, 2016; Huebner et al., 2018; Basurto et al., 2024).

Κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη της θρόμβωσης, αλλά και τη μεταθρομβωτική περίοδο, τα επίπεδα του PAI-1 εμφανίζουν χαρακτηριστικές διακυμάνσεις. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί πως η αύξηση του PAI-1 ξεκινά πριν από την εκδήλωση του θρομβωτικού επεισοδίου, κορυφώνεται κατά την οξεία φάση της θρόμβωσης, ενώ σημειώνει μείωση μετά το πέρας επιτυχούς θεραπείας (AL, 2012; Mo *et al.*, 2015; Bacciedoni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024). Ωστόσο, η μείωση των επιπέδων δεν συνεπάγεται απαραίτητα την επαναφορά σε φυσιολογικές τιμές, καθώς μετά από ένα θρομβωτικό συμβάν, ο PAI-1 δύναται να παραμένει αυξημένος στην κυκλοφορία για εκτεταμένες χρονικές περιόδους, με κατώτατο όριο τους τρεις μήνες. Το γεγονός αυτό συντελεί μεταθρομβωτικά στην αιμοστατική ανισορροπία και κατ' επέκταση σε μειωμένη ινωδολυτική ικανότητα, η οποία απαντάται έως και στο 54% των ασθενών μετά από εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (Nguyen *et al.*, 1988).

A.2.4.1. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1*

Η διαμόρφωση των επιπέδων του PAI-1 επηρεάζεται καθοριστικά από τον λειτουργικό πολυμορφισμό 4G/5G (rs1799768), ο οποίος περιλαμβάνει την απαλοιφή μιας γουανίνης (G) στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *SERPINE1* (Glueck *et al.*, 1999; AL, 2012; Sundquist *et al.*, 2015). Η παρουσία του αλληλομόρφου 4G, σχετίζεται με σημαντική αύξηση των επιπέδων και της ενεργότητας του κυκλοφορούντος PAI-1 και σχετίζεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Συγκεκριμένα, η έλλειψη της μιας βάσης, παρέχει στο 4G αλληλόμορφο τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με ενεργοποιητές της μεταγραφής, αυξάνοντας έτσι την έκφραση του *SERPINE1* και κατ' επέκταση οδηγώντας σε μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα και εν δυνάμει αυξημένη πηκτικότητα του αίματος (Εικόνα 8). Αντίθετα, το αλληλόμορφο 5G αλληλεπιδρά με καταστολείς της μεταγραφής και ευθύνεται για τα φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα του PAI-1, ενώ παράλληλα εμφανίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της επανεμφάνισης θρομβώσεων (Glueck *et al.*, 1999; Sundquist *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020).



Εικόνα 8. Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης στην αιμόσταση του λειτουργικού πολυμορφισμού 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1* που κωδικοποιεί τον κύριο αναστολέα της ινωδόλυσης (PAI-1), αυξάνοντας τα επίπεδα του και κατ' επέκταση παρεμποδίζοντας περαιτέρω τον σχηματισμό πλασμίνης, οδηγώντας έτσι σε ανεπαρκή ινωδολυτική δραστηριότητα. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.2.5. Αγγειοτενσίνη II και ο άξονας ACE/PAI-1 στην θρόμβωση

Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα του PAI-1 ρυθμίζονται έμμεσα από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, το οποίο διεγείρει την έκκριση του, μέσω της αγγειοδραστικής ορμόνης, αγγειοτενσίνης II (Felmeden and Lip, 2000; Moore *et al.*, 2002). Τα αυξημένα επίπεδα της angII, είναι γνωστό πως σχετίζονται με την υπέρταση, την υποξία και τη φλεγμονή, καταστάσεις που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη θρομβώσεων (Senchenkova *et al.*, 2010; Sadia, Ashraf and Mishra, 2021; Gintoni *et al.*, 2025).

Πειραματικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν αναδείξει τον παθοφυσιολογικό ρόλο της αγγειοτενσίνης II στη θρομβογένεση. Η χρόνια έγχυση της ορμόνης φαίνεται πως προκαλεί σποραδική θρόμβωση των αγγείων, ενώ η χορήγηση της σε ποντίκια έχει καταγραφεί πως επιταχύνει σημαντικά την ανάπτυξη των θρόμβων (Senchenkova *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2022). Τα διαθέσιμα μοντέλα επαγόμενης αύξησης της αγγειοτενσίνης II, είτε μέσω γενετικών τροποποιήσεων είτε μέσω έγχυσης, συγκλίνουν ως προς την θρομβογόνο δράση της, μέσω σημαντικής αύξησης των επιπέδων του PAI-1 στην κυκλοφορία, επιβεβαιώνοντας τη ρυθμιστική τους αλληλεπίδραση (Mogielnicki *et al.*, 2005; Senchenkova *et al.*, 2014).

Η angII αποτελεί προϊόν πρωτεολυτικής διάσπασης του ανενεργού πεπτιδίου της αγγιοτενσίνης I (angI), από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE), με τα επίπεδα της να εξαρτώνται άμεσα από εκείνα του ενζύμου. Κατ' αυτόν τον τρόπο, το ACE λειτουργεί ως θετικός ανάντη ρυθμιστής του PAI-1 (Εικόνα 9), ο οποίος εμμέσως επηρεάζει αρνητικά την ινωδολυτική δραστηριότητα, σχηματίζοντας τον λειτουργικό ACE/PAI-1 άξονα (Felmeden and Lip, 2000; Moore *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2013; Gintoni, Adamopoulou and Yapijakis, 2021).

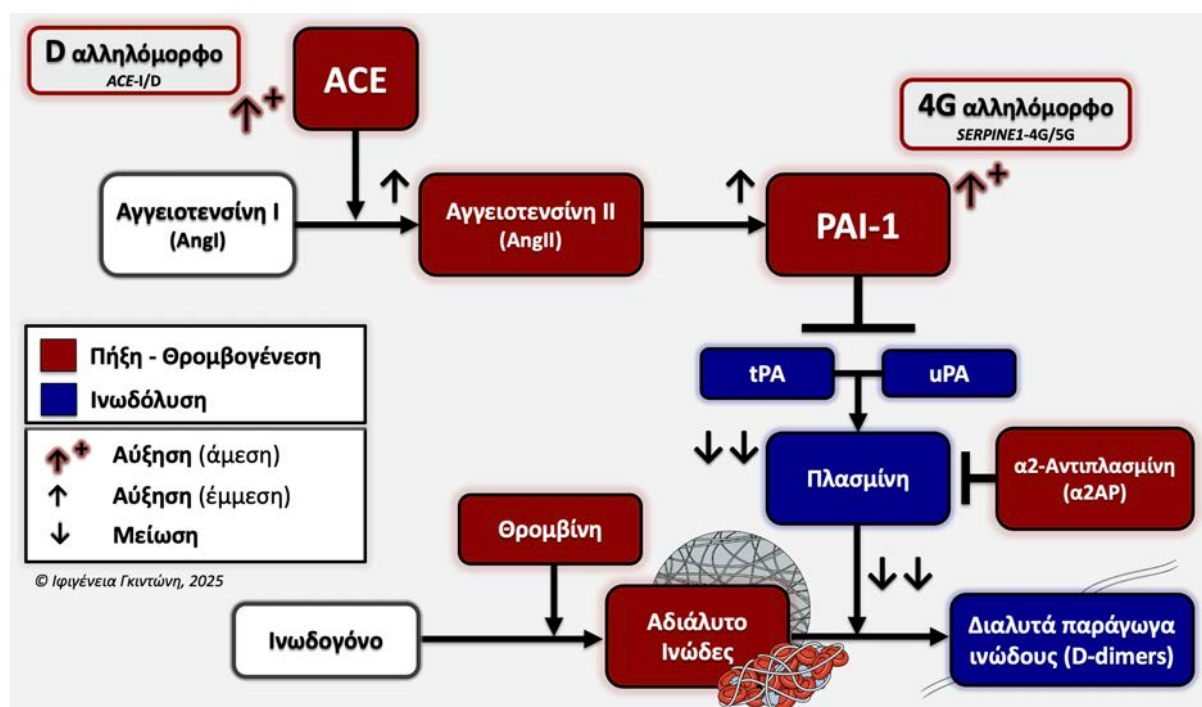
A.2.5.1. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE

Το ACE, κύριος παράγοντας του RAS, είναι πλέον γνωστό πως εμπλέκεται έμμεσα στις διαδικασίες πήξης και ινωδόλυσης μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του PAI-1 (Εικόνα 6). Αποτελεί μεταλλοπρωτεΐνωση ψευδαργύρου, η οποία καταλύει κυρίως την μετατροπή του πρόδρομου μορίου angI σε ενεργή angII, αλλά και την πρωτεολυτική διάσπαση του πολυπεπτιδίου της βραδυκινίνης, μέλους του συστήματος καλρικρεΐνης-κινίνης, η οποία σχετίζεται με τη φλεγμονή, την αγγειακή διαπερατότητα, την πήξη και τη θρόμβωση (Ay *et al.*, 2007; Rex *et al.*, 2022).

Η αύξηση των επιπέδων του ACE οδηγεί σε αύξηση της αρτηριακής πίεσης και παράλληλη μείωση της ινωδολυτικής δραστηριότητας, μέσω της επαγόμενης αύξησης του αναστολέα της, PAI-1, ενώ ταυτόχρονα ενισχύεται η ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (Bauters and Amouyel, 1998; Gintoni, Adamopoulou and Yapijakis, 2021).

Γενετικά, τα επίπεδα του ACE, στην κυκλοφορία και τους ιστούς, επηρεάζονται σημαντικά από τον λειτουργικό πολυμορφισμό Insertion/Deletion (I/D) του γονιδίου ACE, ο οποίος χαρακτηρίζεται από προσθήκη ή έλλειψη 287 βάσεων εντός του ιντρονίου 16. Η ACE-I/D παραλλαγή, έχει καταγραφεί πως ευθύνεται έως και για το 50% της διατομικής διακύμανσης στον γενικό πληθυσμό, αναφορικά με τα επίπεδα και την ενεργότητα του ενζύμου (He *et al.*, 2013). Συγκεκριμένα, η παρουσία του αλληλομόρφου D (έλλειψη), αυξάνει τα επίπεδα του mRNA και του ενζύμου στην κυκλοφορία. Ο ομόζυγος γονότυπος D/D αντιστοιχεί έως και σε διπλάσια συγκέντρωση ACE, συγκριτικά με τον φυσιολογικό γονότυπο I/I, ενώ ο ετερόζυγος I/D γονότυπος αντιστοιχεί σε αυξημένα, ενδιάμεσα επίπεδα του ενζύμου, ικανοποιώντας τη σχέση $II < ID < DD$ (Vairaktaris *et al.*, 2006a; Ay *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013; Gintoni, Adamopoulou and Yapijakis, 2022). Επιπλέον, και σε συμφωνία με την ρυθμιστική σχέση που εμφανίζει το ACE με τον PAI-1, η παρουσία του D αλληλομόρφου στον γονότυπο, και ειδικά σε περίπτωση ομοζυγωτίας (D/D), έχει παρατηρηθεί πως αυξάνει έμμεσα τα επίπεδα του PAI-

1, μειώνοντας κατ' επέκταση σημαντικά την ινωδολυτική ικανότητα (Εικόνα 9) (Zhang *et al.*, 2007).



Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση του άξονα ACE/PAI-1, και της επίδρασης των λειτουργικών πολυμορφισμών 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1* που κωδικοποιεί τον PAI-1 και I/D του γονιδίου *ACE* που κωδικοποιεί τον θετικό ρυθμιστή του, ACE, του συστήματος RAS. Οι πολυμορφισμοί αυξάνουν ο καθένας ξεχωριστά τα επίπεδα των παραγόντων ACE και PAI-1, με αποτέλεσμα όταν συνυπάρχουν να αναμένεται ισχυρή παρεμπόδιση του σχηματισμού πλασμίνης και κατ' επέκταση του ινωδολυτικού μηχανισμού. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

A.3. Παιδιατρική Θρόμβωση

Τα θρομβωτικά επεισόδια παρατηρούνται κυρίως κατά την ενήλικη ζωή, με τη συχνότητα τους να αυξάνεται κατακόρυφα με την αύξηση της ηλικίας (Ashorobi, Ameer and Fernandez, 2025). Ωστόσο, η θρομβοεμβολή αποτελεί μια σοβαρή επιπλοκή υγείας που αφορά και τον παιδιατρικό πληθυσμό. Έτσι, η παιδιατρική θρόμβωση αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική κλινική οντότητα, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και προκλήσεις. Η παιδιατρική θρόμβωση δύναται να εμφανιστεί από την νεογνική ηλικία έως και το τέλος της εφηβείας και διακρίνεται σε αρτηριακή και φλεβική, με την φλεβική να αντιπροσωπεύει την συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων (Bacciedoni *et al.*, 2016; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Abdelghani *et al.*, 2024).

Η παιδιατρική θρόμβωση αποτελεί σπάνιο φαινόμενο με επίπτωση 1 ανά 100.000 παιδιά (0,001% του γενικού παιδικού πληθυσμού). Ωστόσο η συχνότητα της εμφανίζει αξιοσημείωτη άνοδο, με επταπλάσια αύξηση των εγκεφαλικών θρομβωτικών επεισοδίων που επηρεάζουν

παιδιά και νεογνά. Τα νεογνά σημειώνουν τα υψηλότερα ποσοστά θρομβώσεων εντός του παιδιατρικού πληθυσμού, λόγω εξαιρετικά ασταθούς αιμόστασης. Η ανωριμότητα της αιμόστασης αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των αναπτυξιακών σταδίων της παιδικής ηλικίας, κατά τα οποία σημειώνεται χαρακτηριστικά μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα, συγκριτικά με αυτή των ενηλίκων (Bacciedoni *et al.*, 2016; Branchford, Betensky and Goldenberg, 2018; Celkan and Dikme, 2018; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Papadogeorgou *et al.*, 2024).

Σε παιδιατρικούς ασθενείς, τα θρομβωτικά επεισόδια εκδηλώνονται συχνότερα υπό μορφή εγκεφαλικής θρόμβωσης, ακολουθούμενη από θρομβώσεις των άκρων και πνευμονική εμβολή, καταστάσεις με πιθανά θανατηφόρες συνέπειες ή μακροχρόνιες σοβαρές επιπλοκές, όπως το μεταθρομβωτικό σύνδρομο (Van Ommen and Peters, 2006; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Engel *et al.*, 2020; Sava *et al.*, 2025).

Η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση της παιδιατρικής θρόμβωσης με την κατάλληλη αντιπηκτική/θρομβολυτική θεραπεία και επακόλουθη χημειοπροφύλαξη, συνιστούν καθοριστικά ορόσημα για την κλινική έκβαση και την μετέπειτα πρόγνωση των ασθενών. Παράλληλα, η ενδελεχής, πολυπαραγοντική και εξατομικευμένη αξιολόγηση του κινδύνου θρόμβωσης που διατρέχει ο κάθε ασθενής καθίσταται κρίσιμη, τόσο για την κλινική διαχείριση, όσο και για την ενεργή πρόληψη δευτερογενών θρομβώσεων, μεταθρομβωτικού συνδρόμου και μελλοντικών υποτροπών (Branchford, Betensky and Goldenberg, 2018; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Engel *et al.*, 2020; Gerstl *et al.*, 2020).

A.3.1. Παράγοντες κινδύνου θρόμβωσης στην παιδική ηλικία

Αντίστοιχα με την ενήλικη μορφή, η παιδιατρική θρόμβωση αποτελεί μια πολυπαραγοντική παθολογία, η οποία προκύπτει από την διαταραχή της ισορροπίας πήξης και ινωδόλυσης. Η εγγενής ανωριμότητα της αιμόστασης με σημαντικά μειωμένη ινωδόλυση στην παιδική ηλικία ενισχύεται από επιβαρυντικούς παράγοντες, οι οποίοι συντελούν στην παθογένεση θρομβοεμβολής. Στους ανωτέρω περιλαμβάνονται ο τραυματισμός, η υποξία, καθώς και η παρουσία φλεγμονωδών καταστάσεων και κακοήθειας. Τέλος, η εκδήλωση παιδιατρικής θρόμβωσης χαρακτηρίζεται από έντονο γενετικό υπόβαθρο, το οποίο αυξάνει την προδιάθεση των ασθενών για θρομβοφιλία (Huebner *et al.*, 2018; Guzoglu, Albayrak and Aliefendioglu, 2023; Krliza *et al.*, 2023; Sava *et al.*, 2025).

A.3.2. Γενετικό υπόβαθρο της παιδιατρικής θρόμβωσης

Η γενετικά καθορισμένη θρομβοφιλία αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου για την παιδιατρική θρόμβωση, ο οποίος δρα επιβαρύνοντας την ήδη υπάρχουσα ανισορροπία πήξης και ινωδόλυσης που χαρακτηρίζει το αναπτυσσόμενο παιδικό αιμοστατικό σύστημα (Guzoglu, Albayrak and Aliefendioglu, 2023; Krleza *et al.*, 2023). Περιλαμβάνει την παρουσία κληρονομήσιμων γενετικών παραλλαγών, οι οποίες προκαλούν λειτουργικές ή ποσοτικές διαταραχές της ισορροπίας μεταξύ των παραγόντων της αιμόστασης. Το σύνολο των παραλλαγών που έχουν συσχετιστεί σημαντικά με την ανάπτυξη θρόμβωσης κατά την παιδική ηλικία περιλαμβάνει παράγοντες που ενοχοποιούνται και για τη θρομβοφιλία στους ενήλικες, όπως ο παράγοντας FV Leiden, ο πολυμορφισμός G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, η παραλλαγή C677T του *MTHFR*, ο 4G/5G του *SERPINE1*, καθώς και ο I/D του γονιδίου *ACE* (Saedi *et al.*, 2020; Guzoglu, Albayrak and Aliefendioglu, 2023; Sava *et al.*, 2025).

Ωστόσο, η διαφοροποίηση στη γενετική αιτιολογία μεταξύ παιδιατρικής και ενήλικης θρόμβωσης έγκειται στην παραλλαγή που κατέχει τον κυρίαρχο ρόλο στην προδιάθεση (Sava *et al.*, 2025).

A.3.2.1. Ο πολυμορφισμός 4G/5G ως κύρια γενετική συνιστώσα

Μεταξύ των προαναφερθέντων κληρονομούμενων παραλλαγών, οι οποίες έχουν σχετιστεί με την ανάπτυξη θρομβωτικών επεισοδίων στην παιδική ηλικία, πρόσφατα αναδείχθηκε πως ο πολυμορφισμός 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1* αποτελεί τον σημαντικότερο γενετικό προδιαθεσικό παράγοντα. Αναλυτικότερα, ο συγκεκριμένος λειτουργικός πολυμορφισμός στο γονίδιο του αναστολέα της ινωδόλυσης, PAI-1, φαίνεται πως αποτελεί τον πιο συχνά φερόμενο ενδογενή παράγοντα κινδύνου, μεταξύ νεογνών, παιδιών και εφήβων που έχουν υποστεί θρομβωτικά επεισόδια (φλεβικά, αρτηριακά ή μεικτά), με συχνότερες τις εγκεφαλικές θρομβοεμβολές, ακολουθούμενες από θρομβώσεις των άνω και κάτω άκρων (Sava *et al.*, 2025).

A.4. Μόρια microRNA (miRNA) και θρόμβωση

Τα μόρια microRNA (miRNA) αποτελούν μονόκλωνα, μη-κωδικά μόρια RNA, μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων. Μετά την ανακάλυψή τους το 1993, τα miRNA έχει βρεθεί πως απαντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, λειτουργώντας ως κυρίαρχοι επιγενετικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, μετά το στάδιο της μεταγραφής. Ο ρόλος τους αυτός προκύπτει από την ικανότητα τους να προσδένονται συμπληρωματικά σε ειδικές θέσεις (binding sites) των 3'

αμετάφραστων περιοχών (3'-UTRs) των mRNA των γονιδίων-στόχων τους, παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση με δύο διακριτούς μηχανισμούς: είτε μέσω αναστολής της μετάφρασης του mRNA στα ριβοσώματα, είτε μέσω επαγωγής του κατακερματισμού του (Correia de Sousa *et al.*, 2019; Vishnoi and Rani, 2023; Gintoni *et al.*, 2024). Στον άνθρωπο έχουν καταγραφεί περίπου 2600 διαφορετικές αλληλουχίες ώριμων miRNA (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015). Κάθε μόριο miRNA έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει ταυτόχρονα την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ κάθε γονίδιο δύναται να ρυθμίζεται μετα-μεταγραφικά από πληθώρα miRNA, για τα οποία υπάρχουν συμπληρωματικές θέσεις πρόσδεσης στην 3'UTR του mRNA του (Loginov *et al.*, 2015).

Η αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα miRNA είναι μείζονος σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού. Μέσω της δράσης τους καθορίζεται ο βαθμός έκφρασης κάθε γονιδίου, διασφαλίζοντας έτσι τον ακριβή συντονισμό θεμελιωδών βιολογικών διεργασιών, όπως η εμβρυική ανάπτυξη, η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, καθώς και κρίσιμων συστημάτων όπως η φλεγμονή, η ανοσολογική απόκριση και η αιμόσταση, μέσω ρύθμισης των επιπέδων των εμπλεκόμενων παραγόντων (Bhaskaran and Mohan, 2014; Petri *et al.*, 2014; Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Nejad, Stunden and Gantier, 2018).

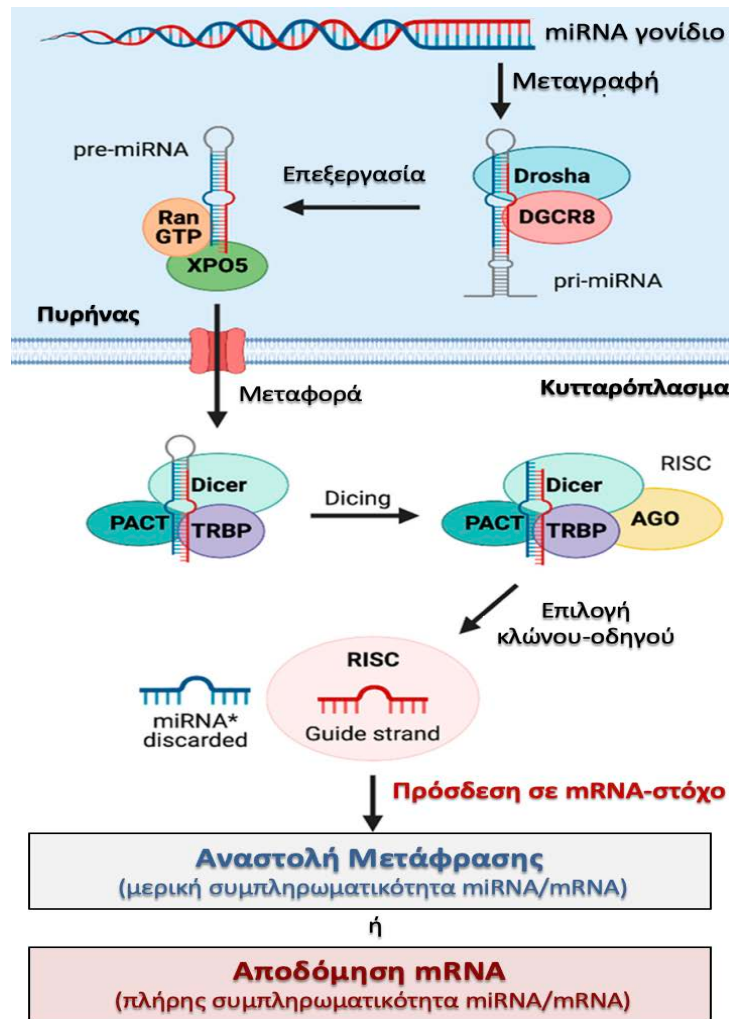
Σε περιπτώσεις απορρύθμισης των επιπέδων των miRNA, η πολύπλοκη ενορχήστρωση της γονιδιακής έκφρασης διαταράσσεται, οδηγώντας στην ανάπτυξη ποικίλων παθολογιών, όπως ο καρκίνος, η αυτοανοσία και η θρόμβωση (Singh *et al.*, 2013; Yapijakis, 2021; Gintoni *et al.*, 2023).

A.4.1. Βιογένεση των miRNA και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Τα miRNA αποτελούν μετάγραφα περιοχών του γονιδιώματος, γνωστών και ως «miRNA γονίδια», τα οποία απαντώνται σε μεσογονιδιακές περιοχές του γονιδιώματος (intergenic areas) ή εντός περιοχών άλλων γονιδίων όπως τα ιντρόνια (intragenic) ή σπανιότερα ως αλληλοεπικάλυψη ιντρονίων και εξονίων (Loginov *et al.*, 2015; Shang *et al.*, 2023).

Η πλειονότητα των εξελικτικά συντηρημένων miRNA μορίων, τα οποία είναι κοινά στα σπονδυλωτά, μεταγράφονται κυρίως από την RNA πολυμεράση II (RNA pol II) και απολήγουν στην ώριμη μορφή τους μέσω της δράσης δύο ενζύμων της οικογένειας RNασών III (RNase III), Drosha και Dicer, κατά μήκος της «κανονικής οδού βιογένεσης» (Εικόνα 10). Πιο αναλυτικά, από τη μεταγραφή των miRNA γονιδίων προκύπτει η μορφή pri-miRNA (primary miRNA) με δομή φουρκέτας (stem loop), η οποία αναγνωρίζεται και υφίσταται διάσπαση από

το σύμπλοκο Drosha/DGCR8 (γνωστό και ως “microprocessor”) εντός του πυρήνα, οδηγώντας στο σχηματισμό του πρόδρομου μορίου pre-miRNA (precursor miRNA), το οποίο διατηρεί τη δομή φουρκέτας και μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, μέσω της εξαπορτίνης 5 (exportin-5, exp5), η οποία αποτελεί μέλος των υποδοχέων πυρηνικής μεταφοράς. Στο κυτταρόπλασμα, η ριβονουκλεάση Dicer αποκόπτει τον τερματικό βρόγχο του pre-miRNA, οδηγώντας στη δημιουργία δίκλωνου miRNA. Το δίκλωνο μόριο ενσωματώνεται σε πρωτεΐνη Ago της οικογένειας των αργοναυτών (Argonaute, Ago), και μετά την απομάκρυνση του ενός κλώνου, σχηματίζεται το λειτουργικό σύμπλοκο επαγόμενης από RNA σίγασης (RISC) (Shang *et al.*, 2023). Το μονόκλωνο, ώριμο πλέον miRNA καθοδηγεί το σύμπλοκο προς τις συμπληρωματικές θέσεις των mRNA στόχων. Το αποτέλεσμα της πρόσδεσης της seed αλληλουχίας (νουκλεοτίδια 2-8) που βρίσκεται στην 5' περιοχή του miRNA με τη θέση πρόσδεσης του mRNA στόχου, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μεταφραστική καταστολή σε περιπτώσεις μερικής συμπληρωματικότητας. Ωστόσο, σε περιπτώσεις πλήρους συμπληρωματικότητας μεταξύ των δύο αλληλουχιών, επάγεται η αποδόμησή του mRNA στόχου, πριν αυτό φθάσει στο ριβόσωμα (Εικόνα 9). Η σταθερότητα και αποτελεσματικότητα του mRNA/miRNA συμπλόκου ενισχύεται περαιτέρω, όταν στο μόριο mRNA εντοπίζεται αδερίνη (A) απέναντι από τη θέση 1 της 5' περιοχής του miRNA, η οποία συνήθως καταλαμβάνεται από τη συμπληρωματική της βάση, ουρακίλη (U) (Bofill-De Ros, Yang and Gu, 2020; Vishnoi and Rani, 2023). Ακολούθως του επιτυχούς “seed-matching”, η καταστολή των στόχων επιτελείται από τη μεσολάβηση του πρωτεϊνικού μόριου TNRC6A (Trinucleotide Repeat Containing Adaptor 6A), το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη Ago του συμπλόκου RISC, επάγοντας την προσέλκυση παραγόντων, οι οποίοι τελούν την αποδόμηση του mRNA στόχου ή την αναστολή της μετάφρασης του (Shang *et al.*, 2023).



Εικόνα 10. Συγκεντρωτική διαγραμματική απεικόνιση της βιογένεσης των μορίων miRNA, μέσω της κανονικής οδού (Drosha/Dicer), καθώς και της βασικής λειτουργίας τους στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, είτε μέσω μεταφραστικής καταστολής (ατελής/μερική συμπληρωματικότητα), είτε μέσω αποδόμησης των mRNA στόχων τους (πλήρης συμπληρωματικότητα). Επεξεργασία/Μετάφραση εικόνας από: Breedon and Storey, 2022, *Oxygen* (© Authors, CC BY 4.0).

A.4.2. Εμπλοκή miRNA στη θρόμβωση ενηλίκων

Η διατήρηση της απαραίτητης ισορροπίας μεταξύ πήξης, αντιπήξης και ινωδόλυσης, κατά την αιμόσταση, χαρακτηρίζεται από συνεχή και ιδιαίτερα ακριβή ρύθμιση, στην οποία η συμμετοχή των miRNA μορίων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα των εμπλεκόμενων παραγόντων (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η απορρύθμιση της δράσης των miRNA είναι αρκετή ώστε να οδηγήσει σε διατάραξη της αιμοστατικής ισορροπίας, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο ανάπτυξης θρομβώσεων. Συγκεκριμένα, τα miRNA έχει αποδειχθεί πως εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με προθρομβωτική κατάσταση, όπως η

ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα αυξημένα επίπεδα πηκτικών παραγόντων και η διατάραξη της ινωδολύσης (Gao *et al.*, 2017; Gareev *et al.*, 2023). Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει την σημαντικότητα της επαγόμενης από τα miRNA ρύθμισης της αιμόστασης, καθώς η απορυθμισμένη έκφραση πληθώρας miRNA (υπερέκφραση ή μείωση των επιπέδων τους), έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων στηριζόμενων στη θρόμβωση, όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, η πνευμονική θρομβοεμβολή και η στεφανιαία νόσος (Hembrom *et al.*, 2020; Yarijakis, 2021).

Όσον αφορά την ομοιόσταση του αγγειακού ενδοθηλίου, οι παράγοντες KLF2 και KLF4 της οικογένειας KLF (Krüppel-like factors) παίζουν καθοριστικό ρόλο, καθώς εκφράζονται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζουν διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση τους, διατηρώντας την ομοιόσταση και παρέχοντας αντιθρομβωτική προστασία. Έχειδειχθεί πως η επαγόμενη καταστολή του παράγοντα KLF4 από τη δράση του miR-103 συμμετέχει στην προαγωγή αγγειακής δυσπροσαρμογής και αθηροσκλήρωσης, ενώ η επαγόμενη από την ox-LDL (oxidized Low-Density Lipoprotein) υπερέκφραση του miR-92a προάγει την ενδοθηλιακή φλεγμονή, μέσω καταστολής των KLF2 και KLF4, αλλά και του παράγοντα SOCS5 (Suppressor of Cytokine signaling 5), ο οποίος φυσιολογικά παίζει ρόλο στην αναστολή της σηματοδότησης των κυτοκινών (Gao *et al.*, 2017). Επιπλέον, σε περιπτώσεις αγγειακής βλάβης ή τραυματισμού, το miR-145, το οποίο εκφράζεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζει άμεσα την έκφραση του ιστικού παράγοντα TF, παρουσιάζει σημαντική μείωση, η οποία με τη σειρά της έχει συσχετιστεί με διατάραξη της αγγειακής ομοιόστασης και με αυξημένη θρομβογένεση (Hembrom *et al.*, 2020).

Τα miRNA φαίνεται πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, με το προφίλ έκφρασης των αιμοπεταλιακών miRNA να διαφοροποιείται με την ηλικία, το φύλο και την καταγωγή (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Khodadi, 2020). Έχειδειχθεί πως τα miR-96, miR-200b, miR-495 και miR-107 ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην έκκριση κοκκίων και στην αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων, ενώ αμιγώς την αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα προάγουν τα μόρια miR-320a/b και miR-423-5p. Παράλληλα, τα υψηλά επίπεδα του miR-223 έχουν συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένη ανταπόκριση στην αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με κολπιδογρέλη, η οποία παρεμποδίζει την ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, προλαμβάνοντας το σχηματισμό θρόμβου, ενώ η μείωση των επιπέδων του σχετίζεται με αντιθρομβωτική δράση και καθυστέρηση της απόφραξης των αρτηριών από θρόμβους, μέσω ρύθμισης της έκφρασης

του IGF-IR (Insulin-like Growth Factor-I Receptor) στα κύτταρα του ενδοθηλίου (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Hembrom *et al.*, 2020).

Αναφορικά με τη ρύθμιση της πήξης, η έκφραση του κύριου εκκινητή της εξωγενούς οδού, TF, ρυθμίζεται από το miRNA σύμπλεγμα miR-17-92, ενώ παράλληλα έχειδειχθεί πως η μείωση των επιπέδων των μορίων miR-19b και miR-20a σχετίζονται με υπερέκφραση του, η οποία έχει προθρομβωτική επίδραση. Ταυτόχρονα, η ποσότητα του ινωδογόνου φαίνεται να πως επηρεάζεται από τα miR-409-3p και miR-29c μέσω ρύθμισης των γονιδίων επιμέρους αλυσίδων του, ενώ η οικογένεια miR-29 έχειδειχθεί πως επηρεάζει έμμεσα την έκφραση των γονιδίων όλων των αλυσίδων του ινωδογόνου, μέσω ρύθμισης του παράγοντα HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015).

Η απορρύθμιση των miRNA έχει ενοχοποιηθεί σημαντικά και για τη διαταραχή των ενδογενών αντιπηκτικών μηχανισμών και της ινωδόλυσης, διεργασίες των οποίων η δυσλειτουργία συνιστά θεμέλιο λίθο της θρομβογένεσης (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Gao *et al.*, 2017). Η αντιθρομβίνη (antithrombin, AT), ο σημαντικότερος ενδογενής αντιπηκτικός παράγοντας που αναστέλλει την θρομβίνη και τον FXa, φαίνεται πως επηρεάζεται σημαντικά από τα miR-18 και miR-19b, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου της (*SERPINC1*), στο ήπαρ, ενώ το miR-200a φαίνεται πως ρυθμίζει έμμεσα τη γλυκοζυλίωση της AT κατά τη νεογνική περίοδο, επηρεάζοντας τη λειτουργικότητά της. Επιπλέον, η πρωτεΐνη S, συμπαράγοντας της πρωτεΐνης C κρίσιμος για την αντιπήξη, έχειδειχθεί πως ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-494, με την κατασταλτική επίδραση του μορίου να αυξάνεται σε συνθήκες αυξημένων οιστρογόνων όπως η κύηση, οδηγώντας σε περαιτέρω μείωση της PS στην κυκλοφορία και κατ' επέκταση συμβάλλοντας στη δημιουργία προθρομβωτικού περιβάλλοντος (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015). Τέλος τα miR-24-3p και miR-34a-5p φαίνεται πως ενέχουν έμμεση, αλλά σημαντική επιρροή στην έκφραση σημαντικών αντιπηκτικών παραγόντων όπως η αντιθρομβίνη, καθώς και οι πρωτεΐνες S και C, μέσω ρύθμισης του HNF4α, αλλά παράλληλα και προπηκτικών παραγόντων όπως οι FV, F8, F9, F11 και F12, υπογραμμίζοντας έναν σύνθετο πολυπαραγοντικό ρόλο στη ρύθμιση της αιμόστασης και τη θρομβογένεση, ο οποίος δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί (Salloum-Asfar *et al.*, 2016).

Τέλος, η ινωδόλυση, η οποία ρυθμίζεται κυρίως από τον PAI-1, επηρεάζεται από αρκετά miRNA που στοχεύουν το mRNA του γονιδίου *SERPINE1*. Συγκεκριμένα, η αύξηση miRNA ρυθμιστών του *SERPINE1*, όπως τα miR-30c και let-7g, οδηγεί σε μείωση του κυκλοφορούντος PAI-1 και αύξηση της ινωδόλυσης, ενώ η αναστολή του let-7g έχειδειχθεί λειτουργικά πως οδηγεί σε σημαντική αύξηση του PAI-1 στο αγγειακό ενδοθήλιο, και κατ'

επέκταση σε μειωμένη ινωδολυτική ικανότητα. Συνολικά, η ρύθμιση της ινωδόλυσης από τα miRNA, μέσω των επιπέδων του PAI-1, φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα περίπλοκη, καθώς τα μέχρι σήμερα δεδομένα περιλαμβάνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα που υποδεικνύουν την ύπαρξη μη αναδεδειγμένων ρυθμιστικών miRNA μηχανισμών, με ενδεχομένως ισχυρότερη επίδραση (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Ha *et al.*, 2024).

A.4.3. Κενό γνώσης στην παιδιατρική θρόμβωση

Παρά το αυξημένο σώμα δεδομένων που αφορά την εμπλοκή των miRNA στην παθογένεση της θρόμβωσης στους ενήλικες (Teruel-Montoya, Rosendaal and Martínez, 2015; Yarijakis, 2021), αντίστοιχες μελέτες για την παιδιατρική μορφή απουσιάζουν πλήρως.

Η παιδιατρική θρόμβωση διαφοροποιείται ουσιαστικά σε σχέση με αυτή των ενηλίκων ως προς την παθοφυσιολογία της. Η διαφοροποίηση αυτή αποδίδεται στις ιδιαιτερότητες του αιμοστατικού συστήματος των παιδιών, που χαρακτηρίζεται από μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα σε σχέση με τους ενήλικες, στις διαφοροποιήσεις που αφορούν τη βαρύτητα των γενετικών παραγόντων προδιάθεσης, καθώς και στην απουσία συσσώρευσης περιβαλλοντικών παραγόντων που σχετίζονται με τη γήρανση (Bacciedoni *et al.*, 2016; Branchford, Betensky and Goldenberg, 2018; Celkan and Dikme, 2018; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Sava *et al.*, 2025). Τα παραπάνω καθιστούν αδύνατη την αξιόπιστη αναγωγή των δεδομένων από μελέτες miRNA σε θρομβωτικά επεισόδια ενηλίκων στην παθογένεση της παιδιατρικής θρόμβωσης και υπογραμμίζουν την ανάγκη διεξαγωγής στοχευμένων μελετών, προσαρμοσμένων στις ιδιαιτερότητες της συγκεκριμένης κλινικής οντότητας.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας πειραματικής έρευνας είναι η διερεύνηση του ρόλου δύο miRNA ρυθμιστών του άξονα ACE/PAI-1 στο πλαίσιο της παιδιατρικής θρόμβωσης, μέσω μελέτης της έκφρασης τους στον ορό αίματος παιδιατρικών ασθενών με θρόμβωση (1-18 μήνες μετά το επεισόδιο) και υγιών μαρτύρων. Τα προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη miRNA αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε διακριτές υποομάδες μεταξύ των ασθενών, σε συνάρτηση με κλινικές και γενετικές παραμέτρους, οι οποίες είναι τεκμηριωμένο πως σχετίζονται με προβλέψιμες μεταβολές στα επίπεδα του κύριου αναστολέα της ινωδόλυσης, PAI-1. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση στην miRNA έκφραση του χρόνου μετά τη θρομβοεμβολή, του θεραπευτικού καθεστώτος (treatment status), του είδους εμφάνισης και της ανατομικής θέσης του θρομβωτικού επεισοδίου, καθώς και των γονότυπων για τους λειτουργικούς πολυμορφισμούς 4G/5G του γονιδίου του PAI-1 (*SERPINE1*) και I/D του γονιδίου *ACE*, το οποίο κωδικοποιεί τον ανάντη θετικό ρυθμιστή του.

Η παρούσα έρευνα, σύμφωνα με την τρέχουσα γνώση, αποτελεί την πρώτη διεθνώς μελέτη, η οποία εξετάζει την εμπλοκή και τα προφίλ έκφρασης miRNA μορίων στο πεδίο της παιδιατρικής θρόμβωσης.

B.2. Υλικά και Μέθοδοι

B.2.1. Βιοπληροφορική ανάλυση miRNA/mRNA στόχευσης

Για την επιλογή των υποψήφιων προς μελέτη miRNA μορίων, εφαρμόστηκε *in-silico* προβλεπτική ανάλυση στόχευσης, καθώς και ταυτοποίηση πειραματικά επιβεβαιωμένων αλληλεπιδράσεων miRNA/mRNA. Για τους παραπάνω σκοπούς χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά τα βιοπληροφορικά εργαλεία TargetScanHuman, miRNet 2.0 και TarBase.v.9 με ενσωμάτωση του αλγορίθμου DIANA-microT-CDS.

B.2.2. Συλλογή δειγμάτων

Το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο έχει λάβει έγκριση (7516/01-04-19) από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» μετά από βιοηθική αξιολόγηση και διεξήχθη σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι (1964).

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων ολικού αίματος παιδιατρικών ασθενών με θρόμβωση και υγιών μαρτύρων, σε αντιστοιχία ηλικίας και φύλου. Η συλλογή δειγμάτων διενεργήθηκε στη Μονάδα Αιμορραγικών Διαθέσεων (Μονάδα Αιμόστασης και Θρόμβωσης), του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία». Τα δείγματα των ασθενών συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια επισκέψεων παρακολούθησης, 1-18 μήνες μετά το θρομβωτικό επεισόδιο. Μετά από αναλυτική ενημέρωση, οι γονείς όλων των συμμετεχόντων παρείχαν γραπτή συναίνεση για τη συλλογή δειγμάτων αίματος των παιδιών τους και αξιοποίησή τους προς ερευνητικές μοριακές αναλύσεις, καθώς και για τη συνεκτίμηση των διαθέσιμων κλινικών δεδομένων. Για κάθε συμμετέχοντα, πραγματοποιήθηκε λήψη αναλυτικού ατομικού και οικογενειακού ιστορικού (τεσσάρων γενεών).

Τα δείγματα ολικού αίματος που προορίζονταν για τον διαχωρισμό ορού συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με ενεργοποιητή πήξης, ενώ τα δείγματα που ελήφθησαν για γονιδιωματική ανάλυση συλλέχθηκαν σε σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό παράγοντα EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ).

B.2.3. Διαχωρισμός ορού από ολικό αίμα

Τα συλλεχθέντα δείγματα ολικού αίματος με ενεργοποιητή πήξης, παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης πήξη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των σωληναρίων σε ψυχόμενη φυγόκεντρο με αιωρούμενο (swing-bucket) ρότορα για 10 λεπτά στις 3.000 rpm και 4°C. Ακολούθησε η προσεκτική συλλογή του υπερκείμενου ορού χωρίς διατάραξη του πύργου, ο οποίος στη συνέχεια

υποβλήθηκε σε επαναληπτική φυγοκέντρηση, προκειμένου να διασφαλιστεί η καθαρότητα του δείγματος για επακόλουθη απομόνωση RNA.

B.2.4. Απομόνωση RNA ορού

Η απομόνωση ολικού RNA από τα δείγματα ορού πραγματοποιήθηκε με χρήση του “NucleoSpin miRNA Plasma, Mini kit for circulating miRNA” (MACHEREY-NAGEL, Germany), υπό συνθήκες απαλλαγμένες από την παρουσία RNασών, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

I. Προετοιμασία δείγματος

- Σε σωληνάριο προπυλενίου 1,5 ml (ελεύθερο από RNάσες), μεταφέρθηκαν 300 μl δείγματος ορού. Ακολούθησε προσθήκη 10 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (~ 30 μg/μL) και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C, προκειμένου να επέλθει αποδόμηση των πρωτεϊνών του δείγματος, μέσω διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών.
- Μετά το πέρας της επώασης, στο δείγμα προστέθηκαν 90 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, με σκοπό τη διάσπαση των κυτταρικών και πρωτεϊνικών δομών και συνεπώς την απελευθέρωση του RNA. Ακολούθησε έντονη σύντομη ανακίνηση με vortex (5’’) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 3 λεπτά.

II. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

- Στο διάλυμα που προέκυψε από τη λύση, προστέθηκαν 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεϊνών (protein precipitation buffer), με σκοπό τη δημιουργία αδιάλυτου πρωτεϊνικού ιζήματος και την παραμονή των νουκλεϊκών οξέων στο υπερκείμενο.
- Ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και επακόλουθη φυγοκέντρηση σε 14.000 στροφές/λεπτό (rpm) προς δημιουργία του πρωτεϊνικού ιζήματος.
- Το διαυγές υπερκείμενο που περιέχει το RNA μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο (2 ml)

III. Δέσμευση RNA

- Στο διάλυμα προστέθηκαν 400μl καθαρής ισοπρολάνολης και ακολούθησε ανάδευση με vortex για 5 s, η οποία διευκολύνει τη δέσμευση του RNA από μεμβράνη πυριτίου.
- Το δείγμα φορτώθηκε σε ειδική στήλη με μεμβράνη οξειδίου του πυριτίου (silica membrane), τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής (collection tube).
- Μετά από επώαση 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 30 s σε 14.000 rpm, με επακόλουθη απόρριψη του διηθήματος (flowthrough).

IV. Καθαρισμός μεμβράνης πριν την έκλυση

- Προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα πρωτεϊνών, αλάτων και λιπιδίων και να αποφευχθεί η συνέκλυση τους με το RNA, πραγματοποιήθηκε σειρά δύο διαδοχικών πλύσεων της μεμβράνης με προσθήκη 100 και 700 μl ρυθμιστικών διαλυμάτων πλύσης (wash buffers), αντίστοιχα, ακολουθούμενη από φυγοκεντρήσεις 30 s σε 14.000 rpm.
- Ακολούθησε προσθήκη 250 μl wash buffer στη στήλη και φυγοκέντρωση 2 λεπτών σε 14.000 rpm, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η υπολειπόμενη υγρασία από τη μεμβράνη.

V. Έκλυση RNA

- Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού και στεγνώματος της μεμβράνης, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο 1,5 ml και σε αυτή προστέθηκαν 20 μl νερού απαλλαγμένου από RNάσες (RNase-free H₂O).
- Ακολούθως της επώασης 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου, η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό στις 14.000 rpm, προς παραλαβή του ολικού RNA με τη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση miRNA μορίων, λόγω του μικρού όγκου έκλυσης.

VI. Ποσοτικοποίηση RNA

- Η αξιολόγηση της ποιότητας και συγκέντρωσης (ng/μl) των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου “BioSpec-nano Spectrophotometer for Life Science” (Shimadzu Corporation, Japan).

B.2.5. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Όλα τα απομονωθέντα δείγματα RNA υποβλήθηκαν στη διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής προς σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) μετά την απομόνωση, αφού προηγουμένως πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση και εξομοίωση των συγκεντρώσεων μεταξύ των δειγμάτων, προκειμένου να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητά τους στα επόμενα βήματα.

Για τη σύνθεση cDNA, συγκεκριμένα από τα miRNA των δειγμάτων RNA, εφαρμόστηκε μέθοδος που βασίζεται στην πολυαδενυλίωση, ακολουθούμενη από αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT). Με την in vitro πολυαδενυλίωση, πραγματοποιείται προσθήκη πολύ(A) ουράς (polyA tail), δηλαδή αλληλουχίας διαδοχικών βάσεων αδερίνης (A), στο ελεύθερο 3' άκρο των μορίων miRNA. Σε αυτή προσδένονται σε δεύτερο στάδιο, συμπληρωματικοί oligo(dT) εκκινητές για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο δύναται να χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για

επακόλουθες αναλύσεις ποσοτικοποίησης των miRNA, όπως η PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

Για τον συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων σε μία ενιαία αντίδραση σύνθεσης cDNA, χρησιμοποιήθηκε το “miRCURY LNA RT Kit” (Qiagen, Γερμανία). Οι αντιδράσεις πολυαδενυλίωσης και RT πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 10 μ l, μετά από προσθήκη 2 μ l ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης RT (5X), 2 μ l RNA εκμαγείου, 1 μ l ενζυμικού μίγματος πολύ(A) πολυμεράσης (PAP) και αντίστροφης μεταγραφάσης, καθώς και 5 μ l νερού (ελεύθερου RNAsών). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή “Gradient Thermal Cycler” (Takara Bio, Japan) και περιελάμβανε στάδιο επώασης στους 40°C για 60 λεπτά, ακολουθούμενο από στάδιο απενεργοποίησης στους 95°C για 5 λεπτά και τελική ψύξη στους 4°C, για ελάχιστο χρόνο 5 λεπτών και δυνατότητα διατήρησης (Πίνακας 1).

Τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C, έως τη στιγμή της περαιτέρω επεξεργασίας τους την επόμενη ημέρα.

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο ενιαίας αντίδρασης πολυαδενυλίωσης και αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση cDNA από τα miRNA των απομονωμένων δειγμάτων RNA.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ l)	Θερμικό πρόγραμμα αντίδρασης RT		
		Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
5x RT SYBR-Green Reaction Buffer	2 μ l	Επώαση	40°C	60 min
RNA εκμαγείο	2 μ l	Απενεργοποίηση	95°C	5 min
10x RT Enzyme-Mix	1 μ l	Ψύξη	4°C	5 min
RNase-free νερό	5 μ l	Διατήρηση ψύξης	4°C	∞
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl			

B.2.6. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Το cDNA που συντέθηκε από τα miRNA των δειγμάτων ορού, χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μορίων miR-145-5p και miR-34a-5p, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει των συνδυαστικών δεδομένων που προέκυψαν από τις βιοπληροφορικές αναλύσεις. Η έκφραση των υπό μελέτη μορίων ποσοτικοποιήθηκε με την εφαρμογή ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR), βασισμένη στη δράση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR-Green.

Η SYBR-Green έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA, επιτρέποντας τη μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος που παράγεται κατά την PCR ενίσχυση, σε πραγματικό χρόνο. Το επίπεδο φθορισμού της SYBR-Green καταγράφεται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ενίσχυσης της qRT-PCR, σε σχέση με τον βασικό φθορισμό

(baseline), ο οποίος σημειώνεται στην αρχή της ενίσχυσης. Ο κύκλος της αντίδρασης, κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού που αντιστοιχεί στο μόριο ενδιαφέροντος υπερβεί σημαντικά το baseline, ονομάζεται “threshold cycle” και εκφράζεται ως τιμή Ct. Όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct, τόσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου στόχου που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα της αντίδρασης. Αντίστροφα, όσο υψηλότερη είναι η τιμή Ct, τόσο χαμηλότερη είναι η αρχική ποσότητα του μορίου, καθώς χρειάστηκαν περισσότεροι κύκλοι ενίσχυσης για την ανίχνευσή του. Η qRT-PCR διακρίνεται από δύο βασικές προσεγγίσεις ποσοτικοποίησης της έκφρασης των μορίων στόχων: την απόλυτη και την σχετική ποσοτικοποίηση. Κατά την απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification) γίνεται αξιοποίηση καμπύλης αναφοράς, βασισμένης σε γνωστές συγκεντρώσεις πρότυπου μορίου, παρέχοντας τη δυνατότητα υπολογισμού της αρχικής ποσότητας του μορίου στόχου στην αντίδραση. Από την άλλη, η σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) με τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$, περιλαμβάνει τη σύγκριση της έκφρασης του μορίου στόχου με εκείνη ενός σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς, αυστηρά ανεπηρέαστου από βιολογικές μεταβολές.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, οι αντιδράσεις qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν στην πλατφόρμα “LightCycler 480 II” (Roche, Switzerland), με χρήση του ενσωματωμένου λογισμικού ανάλυσης δεδομένων, LightCycler® 480 Software (έκδοση 1.5.1.62). Κάθε αντίδραση, τελικού όγκου 10 μ l, περιείχε 4 μ l αραιωμένου cDNA, 5 μ l SYBR-Green Master Mix (LNA miRCURY) και 1 μ l μίγματος εκκινήτων (forward και reverse) της σειράς “miRCURY LNA miRNA PCR Assays” (Qiagen, Γερμανία), ειδικού για την ανίχνευση του εκάστοτε στόχου (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο αντιδράσεων qRT-PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ l)
2XmiRCURY SYBR-Green Master Mix	5 μ l
cDNA μήτρα	4 μ l
Primer Mix (Forward/Reverse)	1 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

Δεδομένης της ηλικιακής ετερογένειας των μελετώμενων ομάδων που περιλάμβαναν παιδιά 0.6-16 ετών (εύρος που αντιστοιχεί σε πολλαπλά αναπτυξιακά στάδια), η χρήση συμβατικού γονιδίου αναφοράς για σχετική ποσοτικοποίηση των miRNA με τη μέθοδο $\Delta\Delta Ct$, κρίθηκε επισφαλής λόγω πιθανής αστάθειας κατά μήκος του αναπτυξιακού φάσματος. Για τον λόγο αυτό, εφαρμόστηκε απόλυτη ποσοτικοποίηση της έκφρασης κάθε miRNA στόχου (copies/ μ l),

με χρήση αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς ($R^2 \geq 0,99$), από σειριακές 2-fold αραιώσεις συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (Qiagen, Γερμανία), μετά από αντίστροφη μεταγραφή με το “miRCURY LNA RT Kit”, σύμφωνα με το ανωτέρω πρωτόκολλο.

Το πρωτόκολλο qPCR περιλάμβανε αρχική ενεργοποίηση στους 95°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 45 κύκλους δύο σταδίων: αποδιάταξης 95°C για 15 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης 60°C για 1 λεπτό, με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 1,5°C/s. Τέλος, ακολούθησε ανάλυση καμπύλης τήξεως (Melting Curve Analysis) από 60 έως 95°C για περίπου 20 λεπτά, με ρυθμό αύξησης θερμοκρασίας 0,03°C/s και συνεχή καταγραφή φθορισμού (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Σύνοψη θερμικού πρωτοκόλλου qRT-PCR.

Στάδιο αντίδρασης:	Θερμική ενεργοποίηση
Θερμοκρασία	Χρόνος
95°C	10 min
Στάδιο αντίδρασης:	Διφασική κυκλοποίηση
Αριθμός κύκλων	45
Θερμοκρασία	Χρόνος
95°C	15 s
60°C	1 min
Στάδιο αντίδρασης:	Ανάλυση καμπύλης τήξης
Θερμοκρασία	Χρόνος
60°C (ελάχιστη)	~ 20 min
95°C (μέγιστη)	(0,03°C/s)

Οι τιμές Ct των αντιδράσεων ανακτήθηκαν μέσω της ανάλυσης “Absolute Quantification/2nd Derivative Max” στο λογισμικό του κυκλοποιητή, με το όριο ανίχνευσης να έχει τεθεί στους 40 από τους 45 κύκλους ενίσχυσης. Σε συνέχεια της ποσοτικοποίησης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης (copies/μl) των miRNA μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, αλλά και μεταξύ διαφορετικών υποομάδων του πληθυσμού των ασθενών, οι οποίες ορίστηκαν σύμφωνα με κλινικές και γενετικές παραμέτρους.

B.2.7. Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος

Προκειμένου να γίνει εφικτή η γονοτύπηση των ασθενών για τους πολυμορφισμούς *SERPINE1*-4G/5G και *ACE*-I/D, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από τον πυρήνα λευκοκυττάρων, στα συλλεχθέντα δείγματα περιφερικού αίματος (EDTA). Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε το “NucleoSpin Blood Mini kit for DNA from blood” (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία), σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

I. Λύση δειγμάτων ολικού αίματος

- Σε στείρο σωληνάριο προπυλενίου 1,5 ml (ελεύθερο από DNάσες), μεταφέρθηκε 1 ml περιφερικού αίματος, το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά σε 2.500 rpm. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος, στο οποίο περιέχονται τα λευκοκύτταρα.
- Το ίζημα διαλύθηκε σε τελικό όγκο 200μl, με προσθήκη διαλύματος NaCl 0.9%.
- Στο δείγμα προστέθηκαν 25 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (~ 30 μg/μL) και 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Ακολούθησε ανακίνηση με vortex (20 s) και επώαση σε θερμοκρασία 65°C για 20 λεπτά.

II. Δέσμευση DNA

- Μετά το πέρας της επώασης, στο δείγμα προστέθηκαν 200μl απόλυτης αιθανόλης (100%), η οποία προάγει την δέσμευση του DNA σε επιφάνεια μεμβράνης silica. Ακολούθησε ανάδευση με vortex, για 20 s.
- Το παρασκεύασμα μεταφέρθηκε σε στήλη έκλουσης με μεμβράνη πυριτίου (silica), τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής (collection tube). Η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό σε 11.000 rpm, με επακόλουθη απόρριψη του διηθήματος.

III. Καθαρισμός μεμβράνης πριν την έκλυση

- Προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα πρωτεϊνών, αλάτων και λιπιδίων και να αποφευχθεί η συνέκλυση τους με το DNA, πραγματοποιήθηκε πλύση της μεμβράνης με προσθήκη 350 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (wash buffer), ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση σε 11.000 rpm για 3 λεπτά, η οποία διευκόλυνε ταυτόχρονα την απομάκρυνση υγρασίας από τη μεμβράνη.

IV. Έκλυση γενωμικού DNA

- Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού και στεγνώματος της μεμβράνης πυριτίου, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο 1,5 ml και σε αυτή προστέθηκαν 50 μl διαλύματος έκλυσης (elution buffer), προθερμασμένου σε θερμοκρασία 65°C.

- Πραγματοποιήθηκε επώαση 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου, προς αποδέσμευση του DNA από τη μεμβράνη, και στη συνέχεια φυγοκέντρωση της στήλης για 1 λεπτό σε 11.000 rpm, προς παραλαβή του DNA.

B.2.8. Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμού 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1*

Η γονοτύπηση των δειγμάτων DNA για τον λειτουργικό πολυμορφισμό 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1* πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου PCR, για την ενίσχυση του κατάλληλου γονιδιακού τμήματος με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές (primers), ακολουθούμενης από επώαση με ένζυμο περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

I. Ενίσχυση γονιδιακής περιοχής με PCR

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε κυκλοποιητή Gradient Thermal Cycler (Takara Bio, Japan), σε τελικό όγκο 25 μl, με χρήση του “2XFastGene® Optima HotStart Ready-mix”, το οποίο αποτελεί μίγμα με τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση PCR, όπως DNA πολυμεράση, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂), σταθεροποιητικούς παράγοντες, καθώς και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη δράση του ενζύμου. Στον όγκο της αντίδρασης προστέθηκαν οι primers (forward και reverse), γενωμικό DNA, καθώς και δις απιονισμένο νερό, απαλλαγμένο από DNάσες. Συγκεντρωτικά, η στοιχειομετρία της αντίδρασης και οι συνθήκες του θερμικού προγράμματος κυκλοποίησης, που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή του *SERPINE1*, η οποία περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό 4G/5G, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, ενώ οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

Forward primer: 5'- CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'

Reverse primer: 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

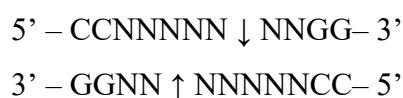
Το προϊόν PCR, μεγέθους 99 bp, υποβλήθηκε εν συνέχεια σε επώαση με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος κάθε ασθενή.

Πίνακας 4. Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR και συνθήκες θερμοκυκλοποίησης, για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του *SERPINE1*, στην οποία απαντάται ο λειτουργικός πολυμορφισμός 4G/5G.

Αντιδραστήριο		Όγκος (μl)
2X HotStart Master Mix		12,5 μl
Forward <i>SERPINE1</i> primer		0,5 μl
Reverse <i>SERPINE1</i> primer		0,5 μl
Γενωμικό DNA		1 μl
DNase-free νερό		10,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης		25 μl
Θερμικό πρόγραμμα PCR		
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη DNA	94°C	4 min
PCR ενίσχυση		
Αριθμός κύκλων:	35	
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη DNA	94°C	30 s
Υβριδισμός primers	57°C	1 min
Επιμήκυνση	72°C	1 min
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min
Ψύξη	4°C	∞

II. Ενζυμική πέψη προϊόντος PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τη διαπίστωση του γονοτύπου κάθε ασθενή, τα προϊόντα που προέκυψαν από την ενίσχυση με PCR του επιθυμητού τμήματος του υποκινητή του γονιδίου *SERPINE1*, υποβλήθηκαν σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση BseLI (BslI), η οποία αναγνωρίζει την παρακάτω αλληλουχία στο δίκλωνο DNA, κόβοντας στα σημεία που υποδεικνύονται από βέλη:



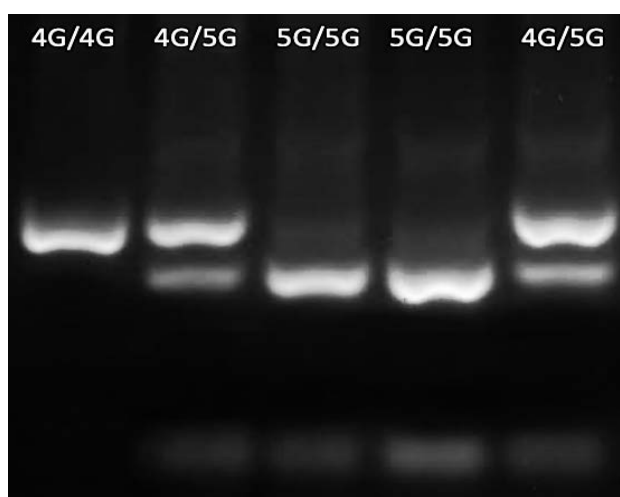
Στο ενισχυμένο τμήμα DNA, η παρουσία μίας γουανίνης που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό 5G αλληλόμορφο του πολυμορφισμού *SERPINE1*-4G/5G, δημιουργεί αυτόματα θέση αναγνώρισης για την BslI. Έτσι, σε περίπτωση παρουσίας του 5G αλληλομόρφου, το τμήμα DNA (99 bp) κατατέμνεται από την BslI, οδηγώντας στη δημιουργία δύο θραυσμάτων μεγέθους 77 bp και

22 bp αντίστοιχα. Σε περίπτωση έλλειψης της γουανίνης από το συγκεκριμένο σημείο του υποκινητή, που αντιστοιχεί στο 4G αλληλόμορφο, η θέση αναγνώρισης της BslI καταργείται και το προϊόν PCR παραμένει άθικτο (Εικόνα 11).

Για την πέψη με το ένζυμο BslI, ακολουθήθηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που εμφανίζεται στον Πίνακα 5. Η αντίδραση πέψης επωάστηκε επί 17 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 37°C. Η τελική γονοτύπηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικοποίησης των θραυσμάτων DNA, υπό υπεριώδεις (UV) φως, μετά από ηλεκτροφόρηση (30 λεπτά, υπό τάση 200V, με χρήση μάρτυρα μεγέθους DNA 100bp ladder) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, εμποτισμένο με τη φθορίζουσα χρωστική νουκλεϊκών οξέων “GelRed fluorescent stain” (Biotium, USA) (Εικόνα 11).

Πίνακας 5. Πρωτόκολλο ενζυμικής πέψης των προϊόντων PCR ενίσχυσης, τμήματος του *SERPINE1*, με το ένζυμο BslI (New England Biolabs, USA). ¹Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) για την προστασία και σταθεροποίηση της ενδονουκλεάσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
BSA ¹	2,5 μl
10X BslI Buffer	2,5 μl
BslI (10 units/μl)	0,5 μl
Προϊόν ενίσχυσης PCR	19,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	25 μl



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR για τον 4G/5G πολυμορφισμό του γονιδίου *SERPINE1*, μετά από πέψη με το ένζυμο περιορισμού BslI. Στην εικόνα έχουν σημειωθεί τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα που αντιστοιχούν σε που σε κάθε γονότυπο του πολυμορφισμού (5G/5G, 4G/5G και 4G/4G).

B.2.9. Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμού I/D του γονιδίου *ACE*

Η γονοτύπηση για τον λειτουργικό πολυμορφισμό I/D (Insertion/Deletion), του γονιδίου *ACE*, βασίστηκε αποκλειστικά στη διαδικασία PCR, ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση. Αυτό αποτελεί απόρροια του γεγονότος πως το μέγεθος της έλλειψης D επιτρέπει τον σαφή διαχωρισμό των γονοτύπων, με βάση το μήκος των προϊόντων PCR (Yarijakis, Serefoglou and Voumnourakis, 2015). Συγκεκριμένα, τα προϊόντα ενίσχυσης αντιστοιχούν σε τμήματα 490 και 190 bp, υποδηλώνοντας την παρουσία των αλληλομόρφων I και D, αντίστοιχα (Εικόνα 12). Συγκεντρωτικά, η στοιχειομετρία της αντίδρασης και οι συνθήκες του θερμικού προγράμματος κυκλοποίησης, που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου *ACE*, η οποία περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό I/D, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, ενώ οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

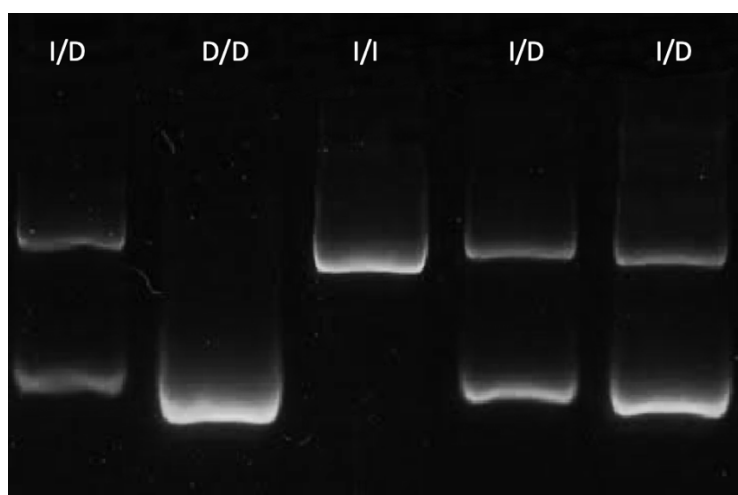
Forward primer: 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'

Reverse primer: 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'

Η τελική γονοτύπηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικοποίησης των θραυσμάτων DNA, υπό υπεριώδες (UV) φως, μετά από ηλεκτροφόρηση (30 λεπτά, υπό τάση 200V, με χρήση μάρτυρα μεγέθους DNA 100bp ladder) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, εμποτισμένο με τη φθορίζουσα χρωστική νουκλεϊκών οξέων “GelRed fluorescent stain” (Biotium, USA) (Εικόνα 12).

Πίνακας 6. Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR και συνθήκες θερμοκυκλοποίησης, για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του *ACE*, στην οποία απαντάται ο λειτουργικός πολυμορφισμός I/D.

Αντιδραστήριο		Όγκος (μl)
2X HotStart Master Mix		12,5 μl
Forward <i>ACE</i> primer		0,5 μl
Reverse <i>ACE</i> primer		0,5 μl
Γενομικό DNA		1 μl
DNase-free νερό		10,5 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης		25 μl
Θερμικό πρόγραμμα PCR		
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη DNA	94°C	4 min
PCR ενίσχυση		
Αριθμός κύκλων:		35
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη DNA	94°C	30 s
Υβριδισμός primers	60°C	1 min
Επιμήκυνση	72°C	1 min
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min
Ψύξη	4°C	∞



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων PCR για τον I/D πολυμορφισμό του γονιδίου *ACE*. Στην εικόνα έχουν σημειωθεί τα ηλεκτροφορητικά αποτελέσματα που αντιστοιχούν σε που σε κάθε γονότυπο του πολυμορφισμού (I/I, I/D και D/D).

B.2.10. Στατιστική ανάλυση

Το σύνολο των στατιστικών αναλύσεων για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics. Η κανονικότητα της κατανομής των δεδομένων για τις συνεχείς μεταβλητές αξιολογήθηκε με διενέργεια του ελέγχου Shapiro-Wilk, σε συμφωνία με το μέγεθος του δείγματος. Οι συγκρίσεις μέσω όρων μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων πραγματοποιήθηκαν με t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων (Independent Samples t-test) ή με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann-Whitney U, ανάλογα με την κατανομή των τιμών των εξεταζόμενων μεταβλητών. Συγκρίσεις μεταξύ περισσότερων των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή των δοκιμασιών one-way ANOVA και Kruskal-Wallis test, όπου ήταν απαραίτητο, ενώ επιπλέον διενεργήθηκε ο έλεγχος Jonckheere-Terpstra για συγκρίσεις διατεταγμένων ομάδων, καθώς και pairwise διερεύνηση διαφορών. Τέλος, για τη διερεύνηση της συνδυαστικής επίδρασης μεταβλητών στην έκφραση miRNA, χρησιμοποιήθηκαν γενικά γραμμικά μοντέλα (General Linear Models, GLM). Στα γραφήματα περιλαμβάνονται error bars για την απεικόνιση διασποράς των δεδομένων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο $p < 0,05$.

B.3. Αποτελέσματα

B.3.1. Χαρακτηριστικά μελετώμενων ομάδων

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν 38 άτομα, εκ των οποίων 19 παιδιατρικοί ασθενείς με επιβεβαιωμένα θρομβωτικά επεισόδια κατά τους τελευταίους 1-18 μήνες, καθώς και 19 υγιείς μάρτυρες (controls). Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων όπως η ηλικία και το φύλο, καθώς και κλινικά δεδομένα των ασθενών, συμπεριλαμβανομένου του τύπου θρόμβωσης (φλεβική/αρτηριακή), του τύπου εμφάνισης του θρομβωτικού επεισοδίου (προκληθέν/απρόκλητο), καθώς και της ανατομικής θέσης της θρόμβωσης. Επιπλέον, για τους ασθενείς καταγράφονται τα χρονικά διαστήματα μεταξύ θρόμβωσης και λήψης δείγματος αίματος, το θεραπευτικό καθεστώς και οι συχνότητες των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς 4G/5G και I/D των γονιδίων *SERPINE1* και *ACE*, αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά και κλινικά δεδομένα των ομάδων ασθενών και μαρτύρων. ¹ Μέση τιμή (Εύρος); ^α Mann-Whitney U test (2-sided), ^β Pearson Chi-Square (2-sided), ^γ Independent Samples T-test.

Μεταβλητή	Ασθενείς (n=19)		Controls (n=19)		P-value
Ηλικία (έτη) ¹	9.51 (0.6-16)		7.03 (0.6-15)		0.124 ^α
Φύλο n (%)	Άρρεν	Θήλυ	Άρρεν	Θήλυ	0.163 ^β
	15 (78.9%)	4 (21.1%)	11 (57.9%)	8 (42.1%)	
Ασθενείς (n=19)					
Τύπος θρόμβωσης (n,%)					
Αρτηριακή 1 (5.3%)			Φλεβική 18 (94.7%)		
Ανατομική θέση θρόμβωσης (n,%)					
Εγκέφαλος		Κάτω άκρα		Πνεύμονες	
9 (47.4%)		6 (31.6%)		4 (21.0%)	
Τύπος έναρξης θρομβωτικού επεισοδίου (n,%)					
Προκληθέν 6 (31.6%)			Απρόκλητο 13 (68.4%)		
Μήνες μετά τη θρόμβωση ¹ 7.63 (1-18)					
Χρονικές ομάδες (months; n,%)	1-3	3.1-6	6.1-12		12.1-18
	4 (21.1%)	5 (26.32%)	7 (36.8%)		3 (15.79%)
Υπό θεραπεία	Ναι (47.37%)		Όχι (52.63%)		
Οικογενειακό ιστορικό θρομβώσεων (n,%)					P-value
Θετικό 12 (63.2%)			Αρνητικό 7 (36.8%)		0.710 ^γ
Γονότυπος πολυμορφισμού <i>SERPINE1</i> - 4G/5G (rs1799889) (n,%)					
5G/5G 3 (15.8%)		4G/5G 12 (63.2%)		4G/4G 4 (21.1%)	
Γονότυπος πολυμορφισμού <i>ACE</i> - I/D (rs1799752) (n,%)					
I/I 1 (5.3%)		I/D 11 (57.9%)		D/D 7 (36.8%)	

Για τη σύγκριση της ηλικίας μεταξύ των δύο ομάδων εφαρμόστηκε έλεγχος Mann-Whitney U, ο οποίος δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων ($p=0,124$), ενώ και η κατανομή των φύλων ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες (X^2 test, $p=0,163$). Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών εμφάνισε φλεβική θρομβοεμβολή, ενώ μόλις το 5% του δείγματος αντιστοιχεί σε αρτηριακή θρόμβωση, σε συμφωνία με τα επιδημιολογικά δεδομένα για την παιδιατρική θρόμβωση στον γενικό πληθυσμό (Bacciedoni *et al.*, 2016; Audu, Wakefield and Coleman, 2019; Abdelghani *et al.*, 2024). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών (~50%) είχε αναπτύξει εγκεφαλικό θρομβωτικό επεισόδιο. Σε συχνότητα ακολούθησαν οι θρομβώσεις κάτω άκρων (~30%) και η πνευμονική θρομβοεμβολή (~20%). Υπολογίστηκε πως η έναρξη του θρομβωτικού επεισοδίου για το 68% των περιπτώσεων ήταν απρόκλητη, ενώ το υπόλοιπο 32% αποδόθηκε σε τραυματισμό (προκληθέν επεισόδιο). Οι ασθενείς σε ποσοστό 63% εμφάνιζαν θετικό οικογενειακό ιστορικό θρομβώσεων, το οποίο ορίστηκε από παρουσία ≥ 1 προσβεβλημένου ατόμου ανά γενιά (σε τέσσερις διαδοχικές γενιές), μέσω μιας γονεϊκής γραμμής (κάθετη κληρονομικότητα), ή ≥ 2 προσβεβλημένων ατόμων σε περίπτωση συμμετοχής και της πατρικής και της μητρικής γενεαλογικής γραμμής. Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, 84% των ασθενών έφεραν τουλάχιστον ένα 4G αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1*, το οποίο σχετίζεται με υψηλά επίπεδα του PAI-1 στην κυκλοφορία και αυξημένο κίνδυνο για θρομβώσεις (AL, 2012; Sava *et al.*, 2025), ενώ μόλις το 15% έφερε το φυσιολογικό αλληλόμορφο 5G σε κατάσταση ομοζυγωτίας. Σε σχέση με τον λειτουργικό πολυμορφισμό I/D του γονιδίου *ACE*, το 95% των ασθενών έφερε την έλλειψη D, η οποία σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων και της ενεργότητας του κυκλοφορούντος ACE, αλλά και με έμμεση, αλλά σημαντική αύξηση των επιπέδων του PAI-1.

B.3.2. Δεδομένα βιοπληροφορικής ανάλυσης miRNA/mRNA στόχευσης

Τα αποτελέσματα της προβλεπτικής ανάλυσης στόχευσης κατέδειξαν πως τα μόρια miR-145-5p και miR-34a-5p διατηρούν εξελικτικά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης στις θέσεις 32-38 και 959-966 της περιοχής 3'-UTR του mRNA του γονιδίου *SERPINE1*, το οποίο κωδικοποιεί τον παράγοντα PAI-1 (Εικόνα 13).

Παρατηρήθηκε πως και τα δύο μόρια miRNA εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα της seed αλληλουχίας τους (νουκλεοτίδια 2-8) με την αντίστοιχη θέση πρόσδεσης στο mRNA του *SERPINE1*. Στην περίπτωση του miR-34a η σταθερότητα του προβλεπόμενου miRNA/mRNA συμπλόκου εννοείται ακόμη περισσότερο, λόγω της παρουσίας αδερίνης (A) στην αλληλουχία

του mRNA-στόχου, έναντι της ουρακίλης στη θέση 1 της 5' περιοχής του miRNA, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ισχυρής αλληλεπίδρασης (Εικόνα 13).

Οι τιμές microT-score βρέθηκαν υψηλές και για τα δύο miRNA ($>0,7$), δεδομένο που ενισχύει την αξιοπιστία των προβλέψεων. Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *SERPINE1* από τα miR-145 και miR-34a, έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά από 5 και 21 λειτουργικές μελέτες αντίστοιχα, σύμφωνα με τον αλγόριθμο DIANA-microT-CDS. Τα αποτελέσματα περιλάμβαναν τόσο άμεση, όσο και έμμεση επιβεβαίωση της ρύθμισης του *SERPINE1* σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους, μεταξύ των οποίων και ενδοθηλιακά κύτταρα στην περίπτωση του miR-34a.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως το miR-34a, πέραν του *SERPINE1*, διατηρεί υψηλά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης, πλήρους συμπληρωματικότητας, στα mRNA των γονιδίων *ACE* και *SERPINF2* (Εικόνα 13). Αναφορικά με το γονίδιο *ACE*, το οποίο λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής των επιπέδων του PAI-1, το miR-34a διατηρεί θέση πρόσδεσης στη θέση 772-779 του 3' UTR του mRNA του, σημειώνοντας πλήρη συμπληρωματικότητα της seed αλληλουχίας (7/7 νουκλεοτίδια), με επιπλέον παρουσία αδερίνης έναντι της θέσης 1 (U). Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του *ACE* από το miR-34a έχει επιβεβαιωθεί μέσω 8 άμεσων λειτουργικών πειραμάτων και σημειώνει microT-score 0,78.

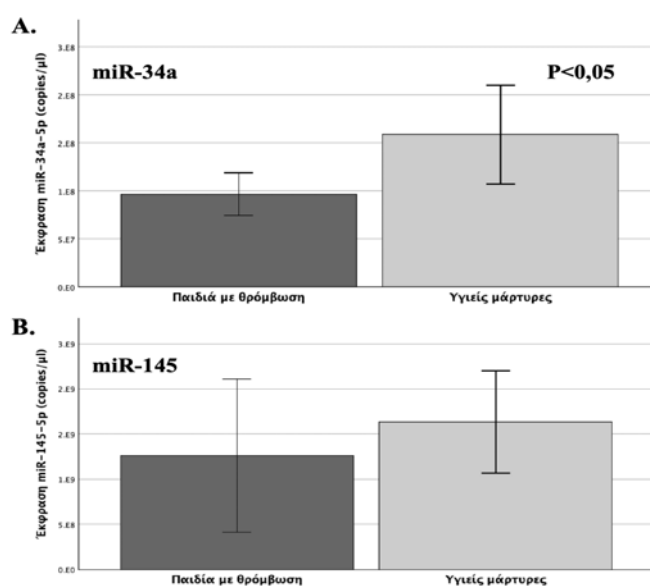
Σε σχέση με το γονίδιο *SERPINF2* που κωδικοποιεί την α2-αντιπλασμίνη, τον κύριο αδρανοποιητή της ινωδολυτικής πλασμίνης, το miR-34a προβλέπεται πως προσδένεται με πλήρη συμπληρωματικότητα (7/7 νουκλεοτίδια της seed αλληλουχίας) στη θέση 578-585 του 3' UTR του mRNA του (Εικόνα 13), θέση πρόσδεσης που σημειώνει υψηλή εξελικτική διατήρηση μεταξύ των σπονδυλωτών, χωρίς όμως να υπάρχει ακόμη διαθέσιμη πειραματική επιβεβαίωση της ρυθμιστικής σχέσης.

Position 32-38 of SERPINE1 3' UTR	5'	...CUUCAUCUGGGACAAAACUGGAG...
hsa-miR-145-5p	3'	UCCCUAAGGACCCUU--UUGACCUG
Position 959-966 of SERPINE1 3' UTR	5'	...GCGUGACGGAGCCCA--CACUGCCA...
hsa-miR-34a-5p	3'	UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU
Position 772-779 of ACE 3' UTR	5'	...AGACAGCCAUUCUAA--CACUGCCA...
hsa-miR-34a-5p	3'	UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU
Position 578-585 of SERPINF2 3' UTR	5'	...UCCUCGAGAUCCCAACACUGCCA...
hsa-miR-34a-5p	3'	UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU

Εικόνα 13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πρόβλεψης στόχευσης miRNA/mRNA, όπως προέκυψαν από το βιοπληροφορικό εργαλείο TargetScanHuman. Για όλες τις αλληλεπιδράσεις των υπό μελέτη miRNA με τα mRNA των γονιδίων ενδιαφέροντος, καταγράφηκε εξελικτικά συντηρημένη στόχευση, με απεικόνιση της αλληλουχίας seed των miRNA, καθώς και της θέσης πρόσδεσης στο 3'-UTR των mRNA-στόχων. Επιπλέον, καταγράφονται οι ακριβείς συντεταγμένες των θέσεων πρόσδεσης στα 3'-UTR. Ο τύπος συμπληρωματικότητας είναι πλήρης (7/7) σε όλες τις ανωτέρω αλληλεπιδράσεις και ενισχύεται με την παρουσία αδενίνης έναντι της ουρακίλης της θέσης 1 του miRNA, εκτός από την περίπτωση αλληλεπίδρασης του miR-145 με το mRNA του *SERPINE1*.

B.3.3. Διαφορική έκφραση miRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων

Τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό μελέτη miRNA σε ασθενείς και μάρτυρες (Εικόνα 14) έδειξαν πως τα επίπεδα του miR-34a-5p ήταν σημαντικά μειωμένα (κατά 40%) στην ομάδα των ασθενών, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (FC=0.61; p=0.029). Αναφορικά με την έκφραση miR-145-5p, παρατηρήθηκε παρόμοια τάση προς υψηλότερα επίπεδα στους υγιείς, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p=0,068).



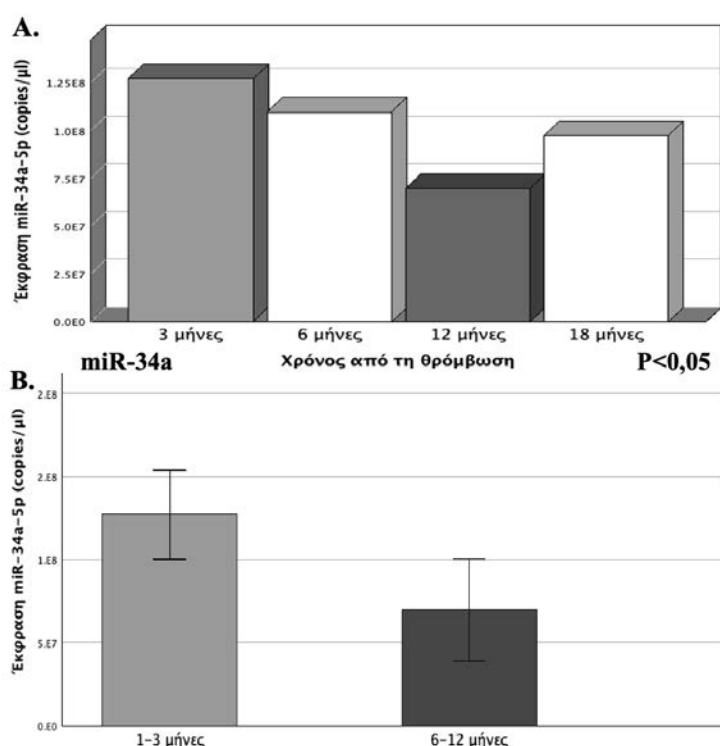
Εικόνα 14. (Α) Διαγραμματική απεικόνιση της διαφορικής έκφρασης (copies/μl) των μορίων miR-34a-5p και (Β) miR-145-5p του ορού, μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.

B.3.4. Προφίλ έκφρασης miRNA σε υποομάδες ασθενών συναρτήσει κλινικών και γενετικών παραγόντων

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προφίλ miRNA έκφρασης, μεταξύ διακριτών υποομάδων του πληθυσμού των ασθενών, οι οποίες καθορίζονται από κλινικούς και γενετικούς παράγοντες, στο πλαίσιο διερεύνησης της πιθανής τους επίδρασης στα επίπεδα των υπό μελέτη μορίων.

B.3.4.I. Χρόνος μετά το θρομβωτικό επεισόδιο

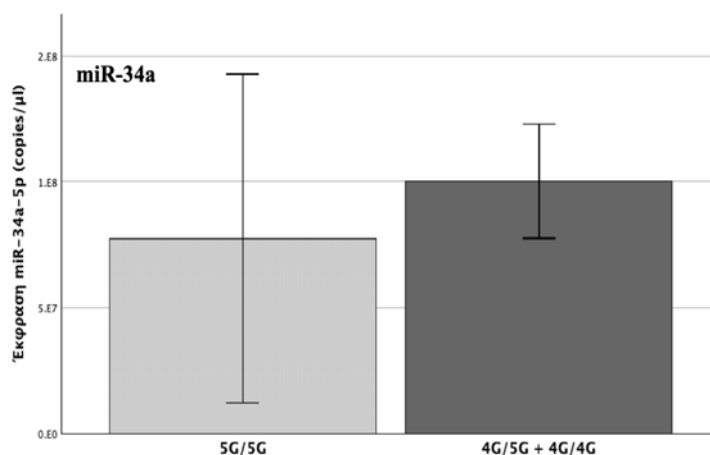
Τα επίπεδα έκφρασης του miR-145 δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων μετά τη θρόμβωση ($p=0,552$). Αντίθετα, για το miR-34a παρατηρήθηκε 45% μείωση της έκφρασής του στην ομάδα 6-12 μηνών, συγκριτικά με την ομάδα 1-3 μηνών από τη θρόμβωση (Εικόνα 15), εύρημα που επιβεβαιώθηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια μέσω t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων ($FC=0,55$; $p=0.029/p=0.031$). Τέλος, στο διάστημα 12-18 μηνών από τη θρόμβωση παρατηρήθηκε πως η έκφραση του miR-34a παρέμεινε μειωμένη κατά περίπου 39%, σε σύγκριση με τη μέση έκφρασή του στην ομάδα υγιών μαρτύρων, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί στατιστική σημαντικότητα ($FC=0.61$; $p=0.348$).



Εικόνα 15. (A) Περιγραφική διαγραμματική απεικόνιση της μέσης έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά το θρομβωτικό επεισόδιο, καθώς και (B) της σύγκρισης μεταξύ των διαστημάτων 1-3 και 6-12 μηνών, τα οποία διέφεραν σημαντικά ως προς τα επίπεδα έκφρασης του μορίου.

B.3.4.II. Γονότυπος πολυμορφισμού 4G/5G (*SERPINE1*)

Δεδομένης της επιβεβαιωμένης ρυθμιστικής σχέσης μεταξύ των μορίων miR-34a-5p και miR-145-5p και του γονιδίου *SERPINE1*, τα επίπεδα τους στην ομάδα των ασθενών αξιολογήθηκαν με βάση τις διακυμάνσεις επιπέδων του PAI-1 που ορίζονται από τα αλληλόμορφα του λειτουργικού πολυμορφισμού 4G/5G στον υποκινητή του γονιδίου. Ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε τόσο μεταξύ και των τριών γονοτύπων (5G/5G, 4G/5G, 4G/4G), όσο και με την εφαρμογή μοντέλου σύγκρισης του γονοτύπου 5G/5G έναντι 4G/5G+4G/4G. Παρατηρήθηκε ήπια αύξηση των επιπέδων του miR-34a με την αύξηση του αριθμού των αλληλομόρφων 4G στον γονότυπο (Εικόνα 16), ενώ το miR-145 δεν εμφάνισε σαφή ή σταθερή τάση. Το παρατηρούμενο πρότυπο έκφρασης του miR-34a, αν και βιολογικά αναμενόμενο ως μηχανισμός αντιστάθμισης, δεν κατέστη στατιστικά σημαντικό, πιθανότατα λόγω της έντονα ανισομερούς κατανομής των γονοτύπων, καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών (84%) έφερε το παθολογικό αλληλόμορφο 4G, μην επιτρέποντας την ισοδύναμη σύγκριση μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 16. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p σε σχέση με τον γονότυπο των ασθενών για τον πολυμορφισμό 4G/5G του γονιδίου *SERPINE1* υπό μοντέλο 5G/5G έναντι 4G/5G+4G/4G.

B.3.4.III. Θεραπευτική αγωγή

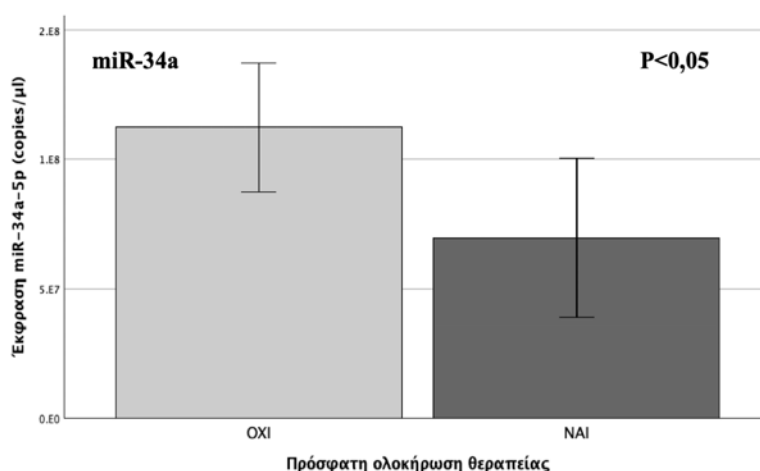
Οι ασθενείς εντάχθηκαν στη μελέτη σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά το θρομβωτικό επεισόδιο. Ως εκ τούτου, το 47% της ομάδας των ασθενών τελούσε υπό ενεργό θεραπεία (συμπεριλαμβανομένης και της χημειοπροφύλαξης) κατά το χρόνο συλλογής του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο 53% δεν λάμβανε αγωγή, είτε λόγω πρόσφατης (1-3 μήνες), είτε λόγω μακροχρόνιας διακοπής. Για το λόγο αυτό, με στόχο την αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης της θεραπείας στην έκφραση των μελετώμενων miRNA, οι ασθενείς συγκρίθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης, χωρισμένοι σε δύο ομάδες ανάλογα με το θεραπευτικό καθεστώς (λήψη/μη

λήψη αγωγής). Η έκφραση του miR-145 δεν διέφερε σημαντικά ανάλογα με το θεραπευτικό καθεστώς, ενώ το αντίστοιχο αποτέλεσμα για το miR-34a ήταν επίσης μη σημαντικό, ωστόσο εμφάνισε τάση ελάττωσης στους ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία ($p=0.06$).

Τέλος, αξιολογήθηκε η πιθανή συνδυαστική επίδραση στην έκφραση του miR-34a, του χρόνου από τη θρόμβωση και της λήψης αγωγής, χωρίς όμως να προκύψει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, από την εφαρμογή GLM, για τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση ($p=0,214$).

B.3.4.IV. Πρόσφατη ολοκλήρωση θεραπείας

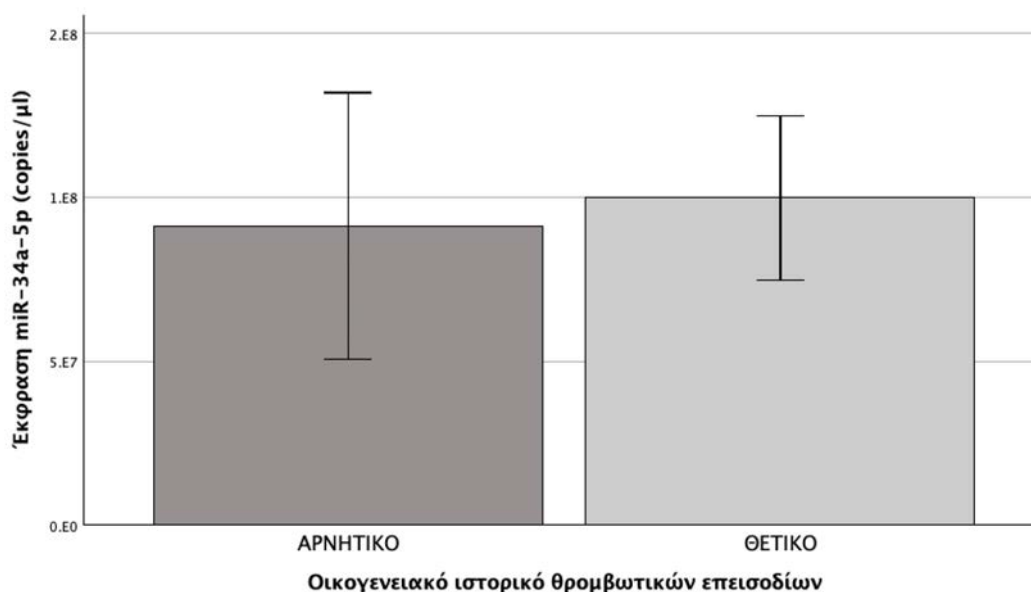
Όπως προέκυψε από τις προηγούμενες αναλύσεις, η χαμηλότερη έκφραση του miR-34a παρατηρήθηκε στην ομάδα των 6-12 μηνών μετά τη θρόμβωση, εύρημα που συνάδει με την πρόσφατη ολοκλήρωση θεραπείας/χημειοπροφύλαξης (1-3 μήνες) για τους αντίστοιχους εντεταγμένους ασθενείς, σημείο κατά το οποίο παρατηρείται κατακόρυφη μείωση των επιπέδων του PAI-1, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (AL, 2012; Mo *et al.*, 2015; Bacciedoni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024). Ως εκ τούτου, η πρόσφατη ολοκλήρωση της θεραπευτικής αγωγής εξετάστηκε ως δυαδική μεταβλητή στο πλαίσιο διερεύνησης της επίδρασης του θεραπευτικού καθεστώτος στην έκφραση των δύο μελετώμενων miRNA. Η έκφραση του miR-145 δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών που πρόσφατα ολοκλήρωσαν τη θεραπεία και των υπόλοιπων. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a σημείωσαν 38% μείωση στην υποομάδα των ασθενών που μόλις ολοκλήρωσε τη θεραπεία (Εικόνα 17), σε σχέση με εκείνους που είτε λάμβαναν ενεργά αγωγή, είτε την είχαν διακόψει για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και είχαν ενταχθεί στη μελέτη κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας παρακολούθησης (follow-up) ($FC=0.62; p=0.048$).



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p μεταξύ των ασθενών, σε σχέση με την πρόσφατη ολοκλήρωση της θεραπευτικής αγωγής (1-3 μήνες).

B.3.4.V. Οικογενειακό ιστορικό θρομβώσεων

Τα επίπεδα του miR-34a αξιολογήθηκαν σε συνάρτηση με την παρουσία οικογενειακού ιστορικού θρομβωτικών επεισοδίων, βάσει των προκαθορισμένων κριτηρίων. Η παρουσία θετικού οικογενειακού ιστορικού θρομβώσεων δεν σημείωσε στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του miRNA στους μελετώμενους ασθενείς ($p=0,710$), καθώς η παρατηρηθείσα αύξηση του miR-34a σε ασθενείς με θετικό ιστορικό ήταν αμελητέα (Εικόνα 18).



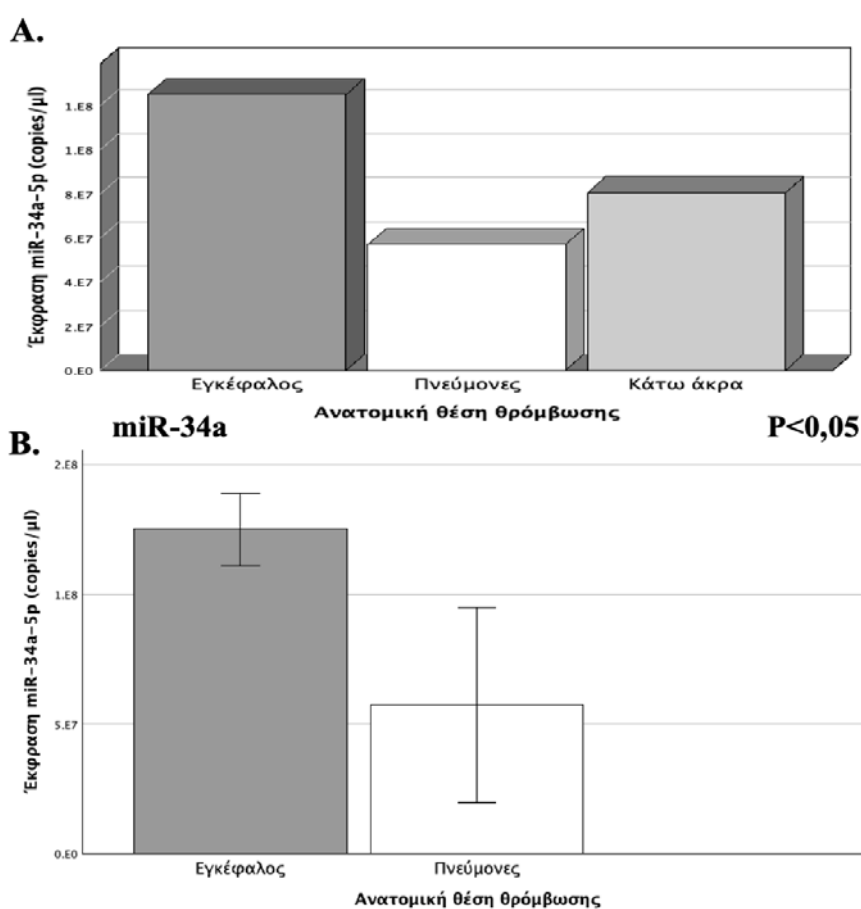
Εικόνα 18. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p μεταξύ των ασθενών, σε σχέση με το οικογενειακό ιστορικό για θρομβωτικά επεισόδια (θετικό/αρνητικό), σύμφωνα με το γενεαλογικό δένδρο κάθε ασθενή σε τέσσερις γενιές.

B.3.4.VI. Ανατομική θέση και τύπος εμφάνισης θρόμβωσης

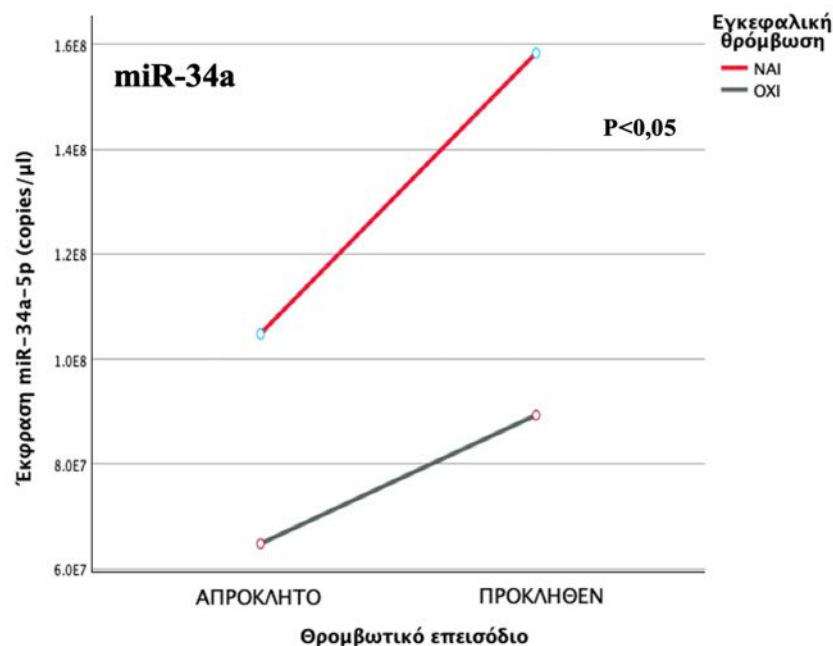
Με σκοπό τη διερεύνηση πιθανών μοτίβων έκφρασης του miR-34a, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν, σύμφωνα με την ανατομική θέση της θρόμβωσης, σε τρεις υποομάδες: εγκεφαλική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή και θρόμβωση κάτω άκρων. Η σύγκριση των τριών ομάδων αποκάλυψε σημαντική διαφορά στην έκφραση του miR-34a ($p=0,019$), υπογραμμίζοντας έτσι την ισχυρή επίδραση της θέσης θρόμβωσης (Εικόνα 19). Η υψηλότερη έκφραση του μορίου miR-34a παρατηρήθηκε στην εγκεφαλική θρόμβωση, σημειώνοντας 76% αύξηση σε σύγκριση με την πνευμονική εμβολή ($FC=1,76$; $p=0,007$).

Αναφορικά με τον τύπο εμφάνισης του θρομβωτικού επεισοδίου, η ομάδα εγκεφαλικής θρόμβωσης που παρουσίασε τη μέγιστη έκφραση miR-34a, περιλάμβανε προκλητά επεισόδια από τραυματισμό, ενώ το 75% των περιπτώσεων αφορούσε απρόκλητα συμβάντα. Η αξιολόγηση της επίδρασης του τύπου εμφάνισης του θρομβωτικού επεισοδίου

(προκλητό/απρόκλητο) στην έκφραση του miR-34a, δεν ανέδειξε μεμονωμένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ($p=0,357$). Ωστόσο, η εφαρμογή GLM για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ανατομικής θέσης και τύπου εμφάνισης θρόμβωσης, ανιχνεύθηκε σημαντική συνεργιστική επίδραση (Εικόνα 20). Συγκεκριμένα, τα εγκεφαλικά επεισόδια που προκλήθηκαν από τραυματισμό παρουσίασαν 37% αύξηση στα επίπεδα του miR-34a, συγκριτικά με την υποομάδα απρόκλητης εγκεφαλικής θρόμβωσης ($p=0,016$; $FC=1,37$).



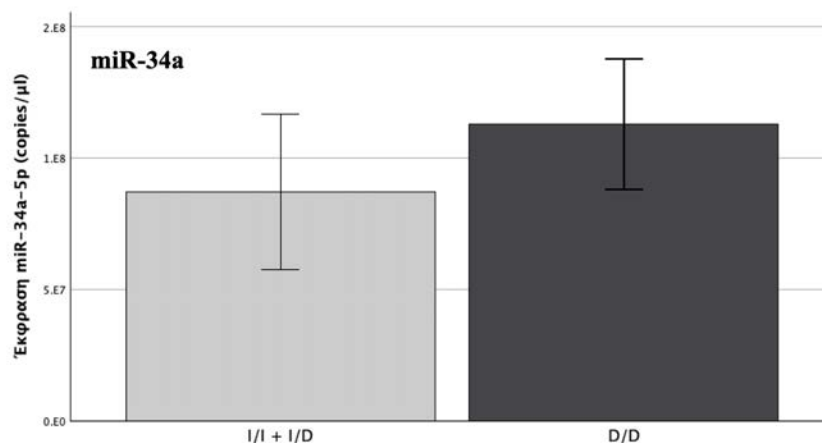
Εικόνα 19. (Α) Περιγραφική διαγραμματική απεικόνιση της μέσης έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p στις διαφορετικές ανατομικές θέσης θρόμβωσης μεταξύ των ασθενών, καθώς και **(Β)** της σύγκρισης μεταξύ της εγκεφαλικής θρόμβωσης και πνευμονικής θρομβοεμβολής, κατηγορίες που διέφεραν σημαντικά ως προς τα επίπεδα έκφρασης του μορίου, με 76% αύξηση στα εγκεφαλικά θρομβωτικά επεισόδια.



Εικόνα 20. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p υπό τη συνδυαστική επίδραση της ανατομικής θέσης θρόμβωσης (εγκεφαλική/άλλο) και τον τύπο εμφάνισης του θρομβωτικού επεισοδίου (απρόκλητο/προκληθέν).

B.3.4.VII. Γονότυπος πολυμορφισμού I/D (*ACE*)

Μετά τον προσδιορισμό του γονότυπου των ασθενών για τον λειτουργικό πολυμορφισμό I/D του γονιδίου *ACE*, θετικού ρυθμιστή των επιπέδων PAI-1, αξιολογήθηκε η έκφραση του miR-34a σε σχέση με τους γονοτύπους των ασθενών (I/I, I/D και D/D), οι οποίοι αντιστοιχούν σε προοδευτικά αυξανόμενα επίπεδα ACE, παρουσία του D αλληλομόρφου (Gintoni, Adamopoulou and Yarijakis, 2021). Η σύγκριση της έκφρασης του miR-34a μεταξύ των τριών γονότυπων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.230$). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια σαφής τάση για αύξηση της έκφρασης του, σε συνάρτηση με την παρουσία του D αλληλομόρφου (Εικόνα 21). Δεδομένου ότι η ομοζυγωτία για το φυσιολογικό αλληλόμορφο I παρατηρήθηκε μόλις στο 5% των ασθενών, μη επιτρέποντας ισοδύναμες συγκρίσεις, ο έλεγχος περιορίστηκε μεταξύ του D/D και των υπολοίπων γονοτύπων. Πράγματι, οι ασθενείς που έφεραν τον D/D γονότυπο παρουσίασαν 29% αυξημένη έκφραση miR-34a, σε σχέση με τους φέροντες το αλληλόμορφο I, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να χαρακτηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα ($FC=1,29$; $p=0,252$).

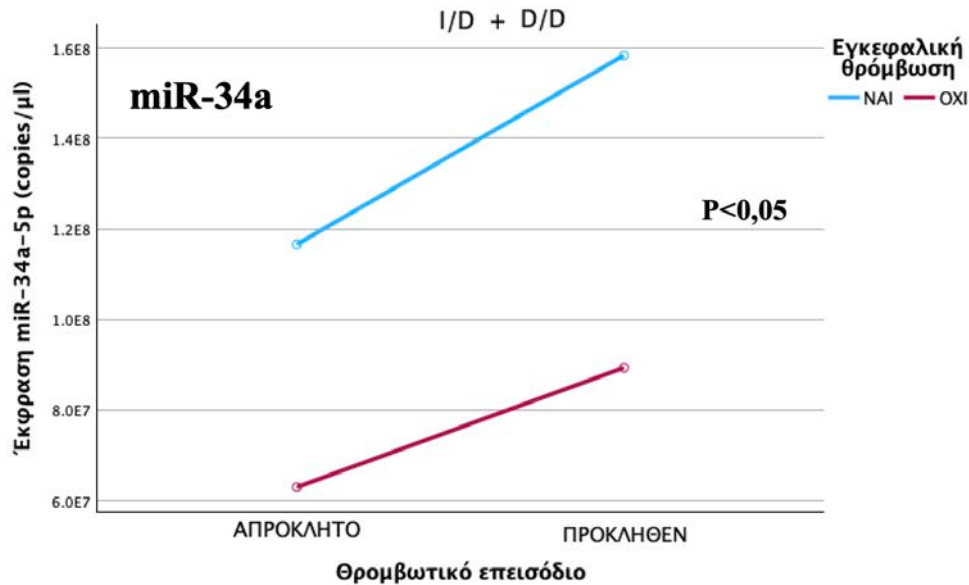


Εικόνα 21. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p σε σχέση με τον γονότυπο των ασθενών για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου *ACE* υπό μοντέλο D/D έναντι I/I+I/D.

B.3.4.VIII. Συνδυαστική επίδραση γονοτύπου *ACE*, τύπου εμφάνισης και ανατομικής θέσης θρόμβωσης

Η γονοτυπική παρουσία τουλάχιστον ενός αλληλομόρφου D του πολυμορφισμού *ACE*-I/D σε αλληλεπίδραση με την ανατομική θέση της θρόμβωσης και τον τύπο εμφάνισης επεισοδίου, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική τριμερή επίδραση στα επίπεδα του miR-34a (Εικόνα 22), σύμφωνα με την GLM ανάλυση ($p=0,035$). Το παραπάνω εύρημα υπογραμμίζει ότι η έκφραση του miR-34a καθορίζεται από την συνδυαστική επιρροή στην έκφραση ανατομικών, περιβαλλοντικών και γενετικών μεταβλητών, και όχι από απλή αλληλεπίδραση μεταξύ περιβάλλοντος και γονοτύπου.

Πιο αναλυτικά, τα περιστατικά προκληθέντων εγκεφαλικών θρομβώσεων, που έφεραν τουλάχιστον ένα D αλληλόμορφο παρουσίασαν αύξηση κατά 46% στην έκφραση του miR-34a, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μη προκληθείσες περιπτώσεις ($FC=1,46$) και 5,2 φορές υψηλότερη έκφραση (αύξηση 421%, $FC=5,22$), σε σύγκριση με αντίστοιχα περιστατικά σε οποιαδήποτε άλλη ανατομική θέση (πνεύμονες και κάτω άκρα). Το μοντέλο GLM εξήγησε περίπου το ένα τρίτο της παρατηρούμενης διακύμανσης στην έκφραση του miR-34a, υποδεικνύοντας έτσι μια ισχυρή, πολυπαραγοντική επίδραση στα επίπεδά του ($R^2=0,516$, adj. $R^2=0,330$).

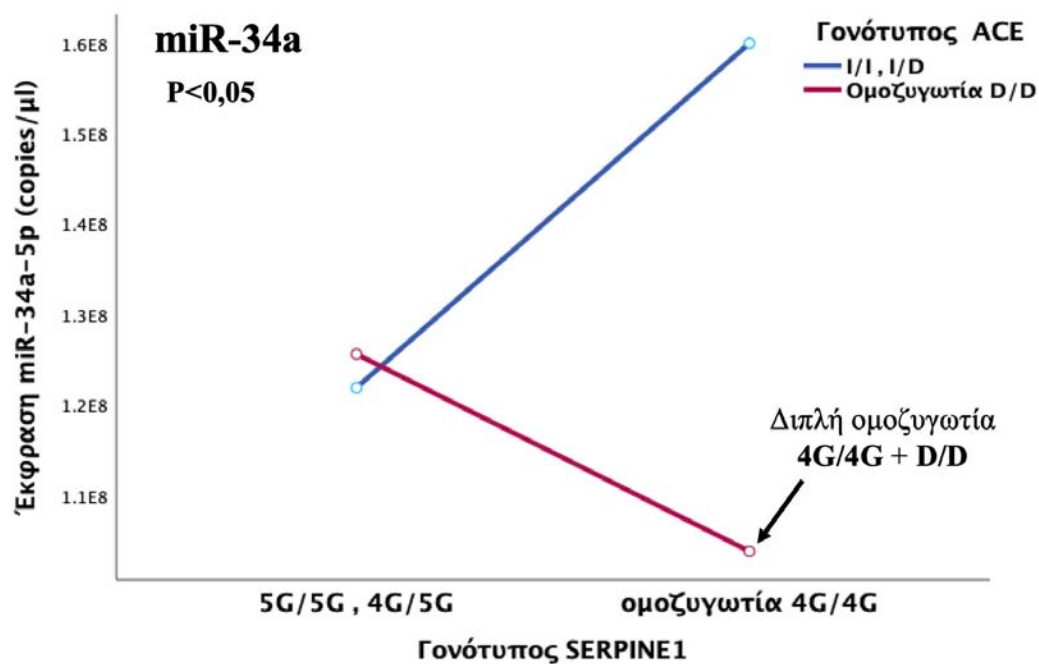


Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p υπό την συνδυαστική επίδραση της ανατομικής θέσης θρόμβωσης (εγκεφαλική/άλλο) και τον τύπο εμφάνισης του θρομβωτικού επεισοδίου (απρόκλητο/προκληθέν) σε ασθενείς που έφεραν τουλάχιστον ένα D αλληλόμορφο (γονότυποι I/D και D/D).

B.3.4.IX. Διπλή ομοζυγωτία 4G/4G (*SERPINE1*) και D/D (*ACE*)

Αντίστοιχα, αξιολογήθηκε με GLM η πιθανή συνδυαστική επίδραση στα επίπεδα του miR-34a, της ανατομικής θέσης θρόμβωσης και των γονότυπων για τους πολυμορφισμούς *SERPINE1*-4G/5G και *ACE*-I/D. Η ανάλυση ανέδειξε μια εξαιρετικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της ομοζυγωτίας 4G/4G (*SERPINE1*), της ομοζυγωτίας D/D (*ACE*) και της εγκεφαλικής θρόμβωσης, η οποία επηρεάζει καθοριστικά την έκφραση του miR-34a ($p=0,006$), με το μοντέλο να εξηγεί σχεδόν το 50% της εκφραστικής ετερογένειας του miRNA στους ασθενείς ($R^2=0,663$; adj. $R^2=0,494$).

Συγκεκριμένα, μεταξύ των ασθενών που είχαν υποστεί εγκεφαλική θρόμβωση, οι διπλοί ομοζυγώτες (4G/4G + D/D) εμφάνισαν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-34a. Το φαινόμενο αυτό αντιστράφηκε πλήρως σε φορείς του γονότυπου 4G/4G, απουσία ομοζυγωτίας DD (γονότυποι I/I και I/D). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως η ομοζυγωτία D/D στο γονίδιο *ACE* αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για το είδος της επίδρασης που θα ασκήσει ο γονότυπος 4G/4G του *SERPINE1*, σχετιζόμενος με τα μέγιστα επίπεδα PAI-1, στην έκφραση του miR-34a (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης (copies/μl) του miR-34a-5p υπό την συνδυαστική επίδραση των γονοτύπων των πολυμορφισμών *SERPINE1*-4G/5G και *ACE*-I/D στην εγκεφαλική θρόμβωση. Με βέλος έχει σημειωθεί το σημείο που αντιστοιχεί στη διπλή ομοζυγωτία 4G/4G + D/D, η οποία συσχετίστηκε με τα χαμηλότερα επίπεδα του miR-34a ($p=0,006$). Οι συγκεκριμένοι γονότυποι σχετίζονται με τα μέγιστα, γενετικά προκαθορισμένα επίπεδα των αντίστοιχων κωδικοποιούμενων παραγόντων (PAI-1 και ACE) στην κυκλοφορία.

B.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

B.4.1. Υπόβαθρο και ερευνητικό πλαίσιο

Η θρόμβωση στην παιδική ηλικία, η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κυρίως φλεβικών, αλλά και αρτηριακών θρόμβων που εμποδίζουν την κυκλοφορία του αίματος, αποτελεί μια εξαιρετικά σπάνια πάθηση που επηρεάζει 1 στα 100.000 παιδιά. Η αιτιολογική της βάση έγκειται στην ισχυρή διατάραξη της ενδογενούς ισορροπίας μεταξύ των μηχανισμών πήξης και της ινωδολύσης, η οποία είναι καθοριστική για τη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης (Celkan and Dikme, 2018; Alkarithi *et al.*, 2021). Τα θρομβωτικά επεισόδια μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης, από τη νεογνική περίοδο έως τα τέλη της εφηβείας, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης εξωγενών και ενδογενών παραγόντων κινδύνου. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υποξία, η φλεγμονή και ο τραυματισμός, καθώς και η παρουσία ενός ισχυρού θρομβοφιλικού γενετικού υποβάθρου (Huebner *et al.*, 2018; Guzoglu, Albayrak and Aliefendioglu, 2023; Sava *et al.*, 2025).

Οι παραπάνω παράγοντες κινδύνου συμβάλλουν στην ανάπτυξη θρόμβωσης, στο εκ φύσεως ανώριμο αιμοστατικό σύστημα των παιδιών, το οποίο χαρακτηρίζεται από σημαντικά χαμηλή ινωδολυτική ικανότητα, σε σύγκριση με το αντίστοιχο των ενηλίκων (Bacciedoni *et al.*, 2016; Branchford, Betensky and Goldenberg, 2018; Audu, Wakefield and Coleman, 2019).

Οι παιδιατρικοί ασθενείς που αναπτύσσουν θρόμβωση έρχονται αντιμέτωποι με εξαιρετικά σοβαρές κλινικές συνέπειες, συχνά απειλητικές για τη ζωή. Η αντιμετώπιση στην κλινική πράξη, συνήθως περιλαμβάνει τη χορήγηση αντιπηκτικής ή ινωδολυτικής αγωγής και επακόλουθης χημειοπροφύλαξης, έπειτα από εξατομικευμένη αξιολόγηση του κινδύνου θρόμβωσης, η οποία συνυπολογίζει το γενετικό προφίλ του πάσχοντος παιδιού (Branchford, Betensky and Goldenberg, 2018; Engel *et al.*, 2020; Gerstl *et al.*, 2020).

Στο πλαίσιο του γενετικού υποβάθρου, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *SERPINE1* που κωδικοποιεί τον παράγοντα PAI-1, αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως η σημαντικότερη γενετική συνιστώσα στην παιδιατρική θρόμβωση (Sava *et al.*, 2025). Ο PAI-1, ο οποίος εκκρίνεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτελεί τον κυρίαρχο αναστολέα της ινωδολύσης, καθώς μέσω αναστολής των παραγόντων tPA και uPA, παρεμποδίζει τη μετατροπή του πρόδρομου πλασμινογόνου σε ενεργή πλασμίνη, ο ρόλος της οποίας έγκειται στην αποικοδόμηση του ινώδους που αποτελεί τον σταθεροποιητικό σκελετό των θρόμβων (Huebner *et al.*, 2018; Alkarithi *et al.*, 2021).

Τα υψηλότερα επίπεδα του PAI-1 οδηγούν σε διαταραχή της αιμοστατικής ισορροπίας λόγω μειωμένης ινωδολυτικής δράσης, η οποία οδηγεί σε προθρομβωτική κατάσταση

υπερπηκτικότητας (Han *et al.*, 2016; Huebner *et al.*, 2018; Basurto *et al.*, 2024). Τα επίπεδα του κυκλοφορούντος PAI-1 εμφανίζουν χαρακτηριστικές διακυμάνσεις τόσο σε προθρομβωτικό, όσο και σε μεταθρομβωτικό επίπεδο, με προοδευτική αύξηση πριν το θρομβωτικό επεισόδιο, κορύφωση κατά την οξεία φάση και στη συνέχεια μείωση μετά την ολοκλήρωση του θεραπευτικού σχήματος που αντιστοιχεί σε επιτυχή υποχώρηση των θρόμβων (Mo *et al.*, 2015; Bacciedoni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024). Για τουλάχιστον τρεις μήνες μετά από ένα θρομβωτικό επεισόδιο, περισσότερο από το 50% των ασθενών εμφανίζει μακροπρόθεσμα μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα, η οποία αποδίδεται σε παρατεταμένη ανοδική ρύθμιση του PAI-1 και δυσαναλογία PAI-1/t-PA (Nguyen *et al.*, 1988).

Τα επίπεδα του PAI-1 επηρεάζονται σημαντικά από τον λειτουργικό πολυμορφισμό 4G/5G στον υποκινητή του γονιδίου του (*SERPINE1*), με σημαντική αύξηση του κυκλοφορούντος PAI-1 υπό την παρουσία του αλληλόμορφου 4G στο γονότυπο. Ο πολυμορφισμός 4G/5G σχετίζεται με μειωμένη ινωδόλυση και υπερπηκτικότητα και ενώ βρίσκεται στη λίστα των γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία στους ενήλικες, πρόσφατα αναδείχθηκε ως η συχνότερη προδιαθεσική παραλλαγή στο πλαίσιο της παιδιατρικής θρόμβωσης (Moore *et al.*, 2002; Sava *et al.*, 2025). Πέραν της συγκεκριμένης παραλλαγής του ίδιου γονιδίου, τα επίπεδά του PAI-1 επηρεάζονται ανοδικά από την ορμόνη angII του RAS, η οποία παράγεται από τη δράση του ενζύμου ACE, το οποίο ρυθμίζει ανοδικά τα επίπεδα του PAI-1 μέσω του σχηματισθέντος λειτουργικού ACE/PAI-1 άξονα. Ο λειτουργικός πολυμορφισμός I/D του γονιδίου *ACE* που αυξάνει τα επίπεδα του κωδικοποιούμενου ενζύμου στην κυκλοφορία, παρουσία του αλληλομόρφου D (I/I<I/D<D/D), έχει συσχετιστεί με σημαντική αύξηση του PAI-1, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε υποινωδόλυση (Felmeden and Lip, 2000; Moore *et al.*, 2002; Vairaktaris *et al.*, 2006b; Gintoni, Adamopoulou and Yarijakis, 2021).

Εκτός από το PAI-1, τα επίπεδα του οποίου αποτελούν ισχυρό δείκτη της ανάπτυξης και εξέλιξης θρόμβωσης, υποσχόμενα αποτελέσματα έχουν προκύψει από τις μελέτες εμπλοκής των miRNAs, σημαντικών επιγενετικών ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης, στην ανάπτυξη θρομβοεμβολικών συμβάντων στους ενήλικες (Yarijakis, 2021). Ωστόσο, ο ρόλος τους στην παιδιατρική θρόμβωση παραμένει εντελώς αδιερεύνητος, καθώς μέχρι στιγμής απουσιάζουν σχετικές μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία, γεγονός πιθανώς αποδιδόμενο στη σπανιότητα της συγκεκριμένης κλινικής οντότητας, η οποία περιορίζει τη συλλογή δειγμάτων και την επακόλουθη έρευνα.

B.4.2. Σχεδιασμός και ερευνητική υπόθεση μελέτης

Στην παρούσα πειραματική μελέτη διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μορίων miR-145-5p και miR-34a-5p στον ορό αίματος παιδιατρικών ασθενών (ηλικίας μεταξύ 0,6 και 16 ετών), με εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων σε διάστημα 1-18 μηνών, καθώς και αντίστοιχων υγιών μαρτύρων (Πίνακας 7). Εντός της ομάδας ασθενών, τα προφίλ έκφρασης των μελετώμενων miRNA αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε συνάρτηση με κλινικούς παράγοντες, όπως ο μεταθρομβωτικός χρόνος, το καθεστώς θεραπείας, η ανατομική θέση θρόμβωσης και ο τύπος εμφάνισης του επεισοδίου (προκληθέν/απρόκλητο), καθώς και σε σχέση με γενετικές παραμέτρους, όπως οι γονότυποι των ασθενών για τους λειτουργικούς πολυμορφισμούς 4G/5G (γονίδιο *SERPINE1*) και I/D (γονίδιο *ACE*), οι οποίοι αυξάνουν τα επίπεδα των κωδικοποιούμενων παραγόντων και κατ' επέκταση του αναστολέα ινωδόλυσης PAI-1, μέσω του ACE/PAI-1 άξονα. Η επίδραση των παραπάνω κλινικών και γενετικών παραμέτρων στην έκφραση των υπό μελέτη miRNA εξετάστηκε τόσο μεμονωμένα, όσο και στο πλαίσιο των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.

Η ερευνητική υπόθεση για την παρούσα μελέτη βασίστηκε στην αναμενόμενη ρυθμιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των miR-145 και miR-34a που έχουν εντοπιστεί ως ρυθμιστές του γονιδίου *SERPINE1* και των τεκμηριωμένων διακυμάνσεων του PAI-1 που σχετίζονται με διαφορετικά στάδια της θρομβωτικής πορείας, κλινικές παραμέτρους, καθώς και με τους διαφορετικούς γονότυπους των λειτουργικών παραλλαγών 4G/5G (*SERPINE1*) και I/D (*ACE*), οι οποίες επηρεάζουν άμεσα και έμμεσα τα επίπεδά του.

B.4.3. Περιγραφική σύνοψη κύριων ευρημάτων

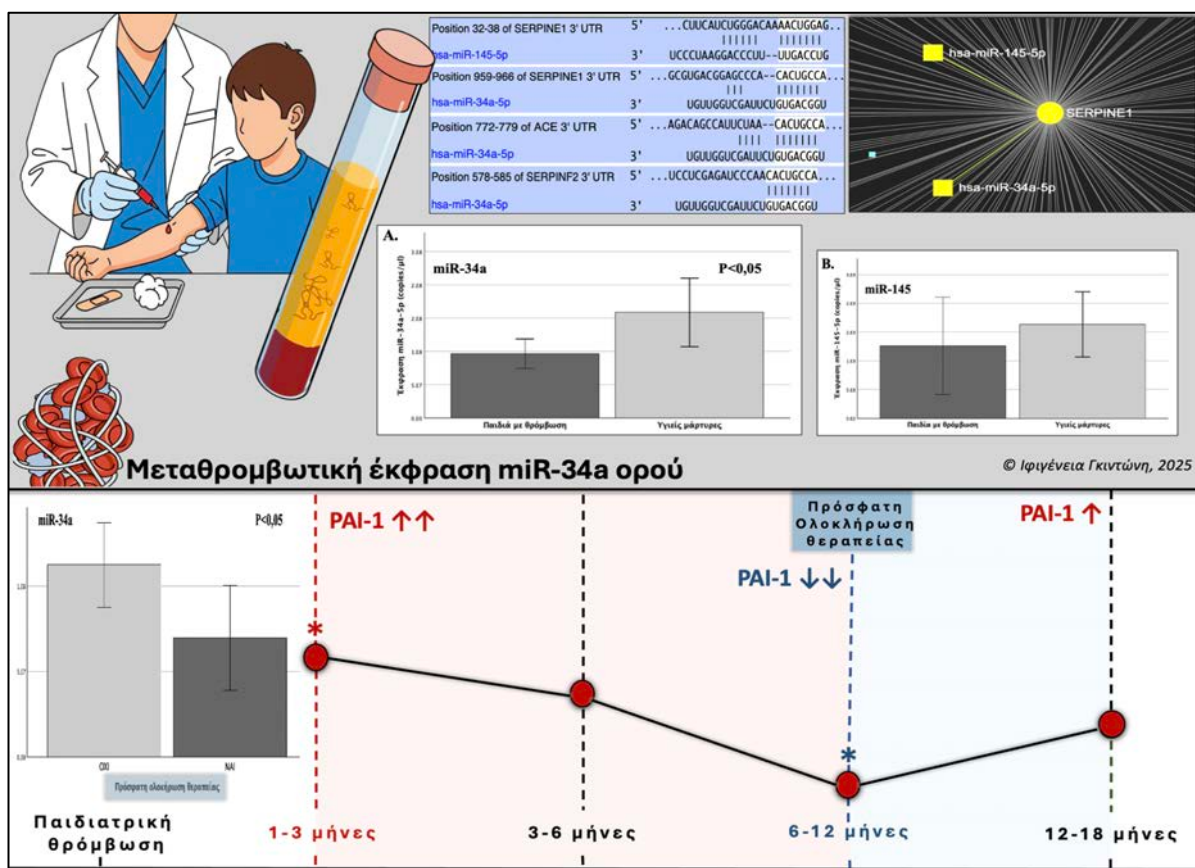
Βρέθηκε πως τα miR-145 και miR-34a διατηρούν εξελικτικά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης στο 3'-UTR του γονιδίου *SERPINE1* που κωδικοποιεί τον παράγοντα PAI-1, εμφανίζοντας τέλεια συμπληρωματικότητα, ενώ η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου και από τα δύο μόρια έχει αποδειχθεί μέσω πολλαπλών άμεσων πειραμάτων. Μεταξύ των δύο miRNA, το miR-34a αποδείχθηκε βιοπληροφορικά ότι σχηματίζει ακόμη πιο σταθερό σύμπλοκο, όχι μόνο με το mRNA του *SERPINE1*, αλλά αντίστοιχα και με τα mRNA των γονιδίων *ACE* και *SERPINF2* (Εικόνα 13), με τη ρυθμιστική σχέση miR-34a/*ACE* να έχει τεκμηριωθεί πειραματικά.

Τα ευρήματά της παρούσας μελέτης ανέδειξαν 40% μείωση της έκφρασης του miR-34a στον ορό των ασθενών με θρομβωτικά επεισόδια (Εικόνα 14), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (FC=0,61; p=0,029). Σε αντιδιαστολή, η έκφραση του miR-145

δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων, παρά την παρατηρηθείσα τάση μείωσης στους ασθενείς ($p=0,068$).

Όσον αφορά την επίδραση του μεταθρομβωτικού χρόνου στην έκφραση των υπό μελέτη miRNA, οι ασθενείς των ομάδων 1-3 και 6-12 μηνών μετά τη θρόμβωση διέφεραν σημαντικά, με μείωση των επιπέδων του miR-34a στους 6-12 μήνες κατά 45% ($FC=0,55$; $p=0,031$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χαρακτηριστική τροχιά μεταβολής της έκφρασης του miR-34a κατά το εύρος του μεταθρομβωτικού χρόνου (Εικόνα 24). Συγκεκριμένα, τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν κατά την περίοδο 1-3 μηνών, αμέσως μετά την εμφάνιση θρόμβωσης, όταν η έκφραση του PAI-1 αναμένεται στην κορύφωσή της. Στη συνέχεια, καταγράφηκε σταδιακή μείωση, η οποία τελικά έφτασε στο χαμηλότερο σημείο της κατά το διάστημα 6-12 μηνών. Το ναδίρ αυτό της έκφρασης του miR-34a συνέπεσε με την πρόσφατη ολοκλήρωση της θεραπείας ή της χημειοπροφύλαξης (1-3 μήνες) στον συγκεκριμένο υποπληθυσμό ασθενών, γεγονός που ευθυγραμμίζεται με την αναμενόμενη μείωση των επιπέδων PAI-1. Τέλος, φτάνοντας στο χρονικό διάστημα 12-18 μηνών από τη θρόμβωση, η έκφραση του miR-34a σημείωσε μια ενδιάμεση αύξηση, παραμένοντας ωστόσο κατά 39% χαμηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας των υγιών μαρτύρων ($FC=0.61$; $p=0.348$).

Αναφορικά με το θεραπευτικό καθεστώς, ούτε η λήψη θεραπείας αυτή καθαυτή, ούτε η αλληλεπίδραση της θεραπείας και του μεταθρομβωτικού χρόνου φάνηκαν να επηρεάζουν τα επίπεδα των μελετηθέντων miRNA. Ωστόσο, η πρόσφατη ολοκλήρωση της θεραπείας ή χημειοπροφύλαξης συσχετίστηκε σημαντικά με 38% μείωση των επιπέδων miR-34a ($p=0,048$), γεγονός που υποδηλώνει μια προσωρινά εξαρτώμενη επίδραση, η οποία πιθανώς αντανakλά την απουσία αναγκαιότητας ρύθμισης της έκφρασης του *SERPINE1*, λόγω της τυπικά κατακόρυφης μείωσης του PAI-1 μετά από επιτυχή θεραπεία (AL, 2012; Mo *et al.*, 2015; Bacciedoni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024)



Εικόνα 24. Σύνοψη της προβλεπόμενης στόχευσης των γονιδίων *SERPINE1*, *ACE* και *SERPINF2* από το miR-34a-5p και του *SERPINE1* από το miR-145-5p (TargetScanHuman/miRNet). Στην εικόνα παρουσιάζεται υπό μορφή γραφήματος, το πρότυπο μεταβολής της έκφρασης του miR-34a ορού στο εύρος του μεταθρομβωτικού χρόνου και σε συνάρτηση με τις τεκμηριωμένες διακυμάνσεις των επιπέδων του PAI-1, με μέγιστα επίπεδα του miR-34a στους 1-3 και ελάχιστα στους 6-12 μήνες μετά το θρομβωτικό επεισόδιο. (© Ιφιγένεια Γκιντώνη, 2025)

Όσον αφορά την επίδραση της γενετικής μεταβλητότητας του γονιδίου *SERPINE1* στα επίπεδα των miRNA, ούτε το μόριο miR-145 ούτε το miR-34a εμφάνισαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των γονότυπων του πολυμορφισμού *SERPINE1*-4G/5G. Ωστόσο, η έκφραση του miR-34a σημείωσε ήπια τάση αύξησης στους γονοτύπους 4G/5G και 4G/4G που αντιστοιχούν σε γενετικά προκαθορισμένη αύξηση των επιπέδων του PAI-1 (Glueck *et al.*, 1999; Sundquist *et al.*, 2015). Παρόλο που η αυξητική αυτή τάση του miR-34a είναι βιολογικά εύλογη, είναι πιθανό η στατιστική σημαντικότητα της παρούσας σύγκρισης να έχει επηρεαστεί από μη ισορροπημένες γονοτυπικές κατανομές, καθώς το 84% των ασθενών έφερε τουλάχιστον ένα 4G αλληλόμορφο.

Η έκφρασή του miR-34a παρατηρήθηκε πως επηρεάζεται σημαντικά από την ανατομική θέση θρόμβωσης ($p=0,019$), με κορύφωση των επιπέδων του στα εγκεφαλικά επεισόδια, σημειώνοντας 76% αύξηση, σε σύγκριση με το εκφραστικό ναδίρ της πνευμονικής εμβολής

($p=0,007$). Η συνεργιστική αλληλεπίδραση της εγκεφαλικής εντόπισης και του τύπου έναρξης του θρομβωτικού επεισοδίου (προκληθέν/απρόκλητο), παρατηρήθηκε ότι επηρεάζει σημαντικά την έκφραση του miR-34a. Συγκεκριμένα, τα εγκεφαλικά επεισόδια, προκληθέντα από τραυματισμό, παρουσίασαν 37% υψηλότερα επίπεδα του miRNA, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα απρόκλητα, υποδεικνύοντας πως ο τύπος εμφάνισης θρόμβωσης ασκεί διαφορικές επιδράσεις στην έκφραση του miR-34a, ανάλογα την προσβληθείσα ανατομική περιοχή. Επιπλέον, σημαντική επιρροή στην έκφραση του miR-34a φάνηκε πως έχει και η αλληλεπίδραση της ανατομικής θέσης και του τύπου εμφάνισης θρόμβωσης υπό την παρουσία του D αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *ACE-I/D* στο γονότυπο των ασθενών, καθώς οι φορείς του (γονότυποι I/D και D/D) εμφάνισαν έως και 50% αύξηση της miRNA έκφρασης σε περιπτώσεις μετατραυματικού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τέλος, παρατηρήθηκε μορφή επιστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των πολυμορφισμών 4G/5G και I/D των γονιδίων *SERPINE1* και *ACE*, αντίστοιχα, με ισχυρή επίδραση στην έκφραση του miR-34a κατά την εγκεφαλική θρόμβωση. Συγκεκριμένα, τα κατώτατα επίπεδα του miR-34a σημειώθηκαν σε κατάσταση διπλής ομοζυγωτίας (γονότυποι 4G/4G και D/D) για τους πολυμορφισμούς *SERPINE1*-4G/5G και *ACE*-I/D, ενώ παρατηρήθηκε πλήρης αντιστροφή του προτύπου, με τα μέγιστα επίπεδα miR-34a ορού να αντιστοιχούν σε φορείς του ομόζυγου γονοτύπου 4G/4G, χωρίς ταυτόχρονη ομοζυγωτία για το D αλληλόμορφο ($p=0.006$). Επομένως, η ικανότητα του γονοτύπου 4G/4G του γονιδίου *SERPINE1* να προκαλεί σημαντική αύξηση στα επίπεδα του miR-34a δεν είναι αυτόνομη, αλλά εκδηλώνεται μόνο απουσία του γονότυπου D/D του γονιδίου *ACE*, ο οποίος δρα ως «γενετικός διακόπτης».

B.4.4. Ερμηνεία αποτελεσμάτων και προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης

Συνολικά, οι παραπάνω πειραματικές παρατηρήσεις είναι σε μεγάλο βαθμό συμβατές με έναν ρυθμιστικό ρόλο του miR-34a, κατά τον οποίο αυτό δρα αντισταθμιστικά έναντι της υπερέκφρασης των στόχων του (*SERPINE1*, *ACE* και πιθανά *SERPINF2*). Η σχεδόν κατά το ήμισυ μείωση της έκφρασης του στον πληθυσμό των ασθενών συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, υποδηλώνει πιθανή απορρύθμιση, η οποία επιμένει ακόμη και 12-18 μήνες μετά το θρομβωτικό επεισόδιο, παρά την ήπια αύξηση που καταγράφεται συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το φαινόμενο αυτό συνάδει με μερική ανάκαμψη, αντανακλώντας τη μακροπρόθεσμη εξασθένηση της ρυθμιστικής επάρκειας του μορίου.

Περαιτέρω υποστήριξη στο συμπέρασμα αυτό προέρχεται από μελέτες έκφρασης miRNA σε ενήλικες με θρόμβωση, οι οποίες κατατάσσουν το miR-34a μεταξύ των μορίων που

παρουσιάζουν αντιδραστική αύξηση κατά την οξεία φάση θρομβωτικών επιπλοκών, όπως το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (Wei *et al.*, 2019; Ansari Dezfouli *et al.*, 2025), όπου παρατηρείται ταυτόχρονη κατακόρυφη αύξηση του κυκλοφορούντος PAI-1 (AL, 2012; Mo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2024).

Η ισχυρή επίδραση της εγκεφαλικής εντόπισης της θρόμβωσης μετά από τραυματισμό στα επίπεδα του miRNA, συμφωνεί πλήρως τόσο με την τυπική ανοδική ρύθμιση του miR-34a κατά την οξεία φάση του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου στους ενήλικες, όσο και με τον λειτουργικά τεκμηριωμένο προστατευτικό του ρόλο στην επιγενετική αντιστάθμιση της τραυματικά επαγόμενης φλεγμονής (Zhou *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). Συγκεκριμένα, το miR-34a όχι μόνο εμπλέκεται σημαντικά στην οξεία απόκριση σε μηχανικό τραυματισμό, αλλά και τα υψηλότερα επίπεδα του στον ορό έχουν συσχετιστεί με επιτυχή ύφεση σε περιπτώσεις τραυματισμού του νωτιαίου μυελού. Πιο αναλυτικά, τα συνολικά επίπεδα miR-34a στον ορό τραυματισμένων ασθενών βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα, σε σύγκριση με μη τραυματισμένα άτομα, ενώ η αξιολόγησή τους έχει προταθεί ως δείκτης παρακολούθησης της αποκατάστασης μετά από τραυματισμό σπονδυλικής στήλης (Cai, Gu and Yang, 2020).

Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με την τροχιά έκφρασης του miR-34a στον ορό των ασθενών που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, με τα υψηλότερα επίπεδά του να παρατηρούνται στην χρονική περίοδο πλησίον του θρομβωτικού συμβάντος, αντανακλώντας μια εμμένουσα αντισταθμιστική απόκριση, ακολουθούμενη από την απότομη μείωση της έκφρασής του μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, σε ένα πλαίσιο φαρμακολογικά επαγόμενης ύφεσης με εξωγενή καταστολή των παθογενετικών μονοπατιών. Τέλος, η ήπια αύξηση που παρατηρείται κατά τη μακροχρόνια απουσία φαρμακευτικής αγωγής (διάστημα 12-18 μηνών), υποδηλώνει τάση για επαναφορά της ινωδολυτικής δραστηριότητας, ενισχύοντας τον προτεινόμενο ρόλο του ως προστατευτικού μορίου υπέρ της ινωδόλυσης.

Ωστόσο, η πιθανότητα παθολογική μείωση της έκφρασης του στον ορό των ασθενών παραμένει τόσο κατά την αρχική αντιδραστική απόκριση, όσο και μακροπρόθεσμα μετά τη θρόμβωση, σε σύγκριση με υγιή παιδιά που εμφανίζουν αναμενόμενα φυσιολογική λειτουργία του miR-34a και αποτελεσματικότερους μηχανισμούς αιμόστασης.

Το σύνολο των ευρημάτων αντανακλά την ανεπάρκεια του miR-34a να λειτουργήσει φυσιολογικά ως αντιθρομβωτικός προστατευτικός μηχανισμός, μέσω της αποτελεσματικής ρύθμισης των επιπέδων του PAI-1 και του ανοδικού ρυθμιστή του, ACE, στο πλαίσιο του προθρομβωτικού άξονα ACE/PAI-1, αλλά πιθανότατα και της α2AP, η οποία εμφανίζει εξίσου σημαντική δράση κατά της ινωδόλυσης.

Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω, μέσω του γενετικού προφίλ των ασθενών, με τη συντριπτική πλειοψηφία να φέρει τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο 4G για τον πολυμορφισμό 4G/5G (*SERPINE1*), το οποίο αυξάνει άμεσα και ανά πάσα στιγμή, τα επίπεδα του PAI-1. Επιπλέον, σχεδόν όλοι οι ασθενείς (95%) έφεραν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο D για τον πολυμορφισμό I/D (*ACE*), γνωστό για τη σημαντική αύξηση των επιπέδων και της δραστηριότητας του ενζύμου ACE, η οποία οδηγεί με τη σειρά της σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα PAI-1 (Εικόνα 9).

Επομένως, η ερμηνεία των ευρημάτων της παρούσας μελέτης δεν δύναται να αποδοθεί αποκλειστικά σε επιγενετικούς μηχανισμούς, καθώς το σύνολο των δεδομένων καταδεικνύει μια ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ Γενετικής και Επιγενετικής, σε πλήρη συνέπεια με την πολυπαραγοντική φύση της θρόμβωσης. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε από την ανάδειξη προτύπου επιστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των γονιδίων *SERPINE1* και *ACE*, η οποία άσκησε ισχυρή επίδραση στην έκφραση του miR-34a.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση διπλής ομοζυγωτίας (γονότυποι 4G/4G+D/D), κατά την οποία σημειώνονται τα μέγιστα δυνατά επίπεδα PAI-1, το ήδη μειωμένο miR-34a παρουσιάζει την ελάχιστη έκφραση. Αυτό αποτελεί πιθανή απόρροια του «εξανασκασμού» του σε ταυτόχρονη ρύθμιση δύο υπερκεκραζόμενων στόχων που οδηγούν συνεργιστικά σε κατακόρυφη αύξηση του PAI-1 και προθρομβωτική παρεμπόδιση της ινωδόλυσης. Αυτή η ανεπαρκής απόκριση, πιθανότατα καταλήγει σε ινωδολυτική δυσλειτουργία, η οποία αδυνατεί να αντισταθμίσει την θρομβογένεση σε παιδιά με γενετικά καθορισμένη θρομβοφιλική προδιάθεση, σε συνδυασμό με το εκ φύσεως ανώριμο αιμοστατικό τους σύστημα.

Αυτή η πιθανώς ελαττωματική ρύθμιση υποδεικνύει πως πιθανότατα το miR-34a φυσιολογικά επιτελεί ρόλο «ρυθμιστικού φρένου» στην ανάπτυξη της παιδιατρικής θρόμβωσης, μιας κλινικής οντότητας με παθογενετικές ρίζες στην ανεπαρκή ινωδόλυση, κυρίως εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων του αναστολέα της, PAI-1. Η αποτυχία επαρκούς ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων *SERPINE1* και *ACE*, εξαιτίας της μειωμένης έκφρασής του miR-34a, επιτρέπει την ανεξέλεγκτη υπερέκφραση τους, η οποία είναι ήδη γνωστό ότι καταστέλλει την ινωδόλυση, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη θρόμβωσης (Εικόνα 25).

B.4.5. Περιορισμοί μελέτης

Περιορισμό της παρούσας μελέτης αποτελεί το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος, το οποίο οφείλεται κυρίως στη σπανιότητα των περιπτώσεων. Ο παράγοντας αυτός δύναται να επηρεάσει αρνητικά τη στατιστική ισχύ, εξηγώντας εν μέρει την έλλειψη σημαντικότητας ($p > 0,05$), παρά την ύπαρξη συνεπών προτύπων έκφρασης σε συγκεκριμένες συγκρίσεις. Στην ελάττωση της στατιστικής ισχύος συμβάλλει επιπλέον η διασπορά στις τιμές έκφρασης, φαινόμενο αναφέρεται συχνά σε μελέτες miRNA. Επομένως, η βιολογική πιθανοφάνεια θα πρέπει να αξιολογείται προσεκτικά σε περιπτώσεις αποτελεσμάτων που ενέχουν αντίφαση μεταξύ στατιστικής σημαντικότητας και σαφώς παρατηρούμενων τάσεων, πριν την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων.

B.4.6. Μελλοντικές προοπτικές

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, το μόριο miR-34a προτείνεται ως υποψήφιος βιοδείκτης αξιολόγησης της ινωδολυτικής δραστηριότητας σε πραγματικό χρόνο, σε περιπτώσεις παιδιών που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης, είτε σε παιδιατρικούς ασθενείς μετά από θρομβωτικά συμβάντα, προς αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπής. Μελλοντικές μελέτες σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερους πληθυσμούς, αλλά και λειτουργικές πειραματικές προσεγγίσεις κρίνονται απαραίτητες προκειμένου να διερευνηθεί η ακριβής του συμβολή στη ρύθμιση της αιμόστασης και η χρησιμότητά του στην κλινική πράξη.

Βιβλιογραφία

- Abdelghani, E. *et al.* (2024) “Pediatric arterial thrombosis: A single-institution cohort study of patient characteristics and thrombosis outcomes.,” *Pediatric blood & cancer*, 71(1), p. e30756. Available at: <https://doi.org/10.1002/pbc.30756>.
- Abou-Ismaïl, M.Y., Citla Sridhar, D. and Nayak, L. (2020) “Estrogen and thrombosis: A bench to bedside review.,” *Thrombosis research*, 192, pp. 40–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.05.008>.
- AL, M.-V. (2012) “Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β -synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias,” *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(10), pp. 997–1006. Available at: <https://doi.org/10.2174/138955712802762338>.
- Alkarithi, G. *et al.* (2021) “Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease.,” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(9), pp. 2370–2383. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315754>.
- Ansari Dezfouli, M. *et al.* (2025) “SIRT1 and miR-34a as Potential Plasma Biomarkers in the Acute Phase of Ischemic Stroke.,” *International journal of molecular and cellular medicine*, 14(2), pp. 714–725. Available at: <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.14.2.714>.
- Ashorobi, D., Ameer, M.A. and Fernandez, R. (2025) *Thrombosis*.
- Audu, C.O., Wakefield, T.W. and Coleman, D.M. (2019) “Pediatric deep venous thrombosis.,” *Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders*, 7(3), pp. 452–462. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jvsv.2018.12.012>.
- Ay, C. *et al.* (2007) “The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and serum levels of angiotensin-converting enzyme in venous thromboembolism. Data from a case control study.,” *Thrombosis and haemostasis*, 98(4), pp. 777–82.
- Bacciedoni, V. *et al.* (2016) “Thrombosis in newborn infants.,” *Archivos argentinos de pediatria*, 114(2), pp. 159–66. Available at: <https://doi.org/10.5546/aap.2016.eng.159>.
- Basurto, L. *et al.* (2024) “Thrombotic risk assessed by PAI-1 in patients with COVID-19: The influence of hyperglycemia and diabetes mellitus,” *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*, 36(4), pp. 201–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ARTERI.2023.12.004>.

- Bauters, C. and Amouyel, P. (1998) “Association between the ACE genotype and coronary artery disease. Insights from studies on restenosis, vasomotion and thrombosis.,” *European heart journal*, 19 Suppl J, pp. J24-9.
- Bhaskaran, M. and Mohan, M. (2014) “MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease.,” *Veterinary pathology*, 51(4), pp. 759–74. Available at: <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
- Bijak, M. *et al.* (2015) “[Cellular model of blood coagulation process].,” *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 39(229), pp. 5–8.
- Bochenek, M.L., Schütz, E. and Schäfer, K. (2016) “Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots.,” *Thrombosis research*, 147, pp. 36–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.09.019>.
- Bofill-De Ros, X., Yang, A. and Gu, S. (2020) “IsomiRs: Expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed.,” *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1863(4), p. 194373. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.03.005>.
- Branchford, B.R., Betensky, M. and Goldenberg, N.A. (2018) “Pediatric issues in thrombosis and hemostasis: The how and why of venous thromboembolism risk stratification in hospitalized children.,” *Thrombosis research*, 172, pp. 190–193. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.02.010>.
- Breedon, S.A. and Storey, K.B. (2022) “Lost in Translation: Exploring microRNA Biogenesis and Messenger RNA Fate in Anoxia-Tolerant Turtles,” *Oxygen*, 2(2), pp. 227–245. Available at: <https://doi.org/10.3390/oxygen2020017>.
- Brown, N.J. (2010) “Therapeutic potential of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitors,” *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 4(5), pp. 315–324. Available at: <https://doi.org/10.1177/1753944710379126>.
- Cai, B., Gu, H. and Yang, H. (2020) “MiR-34a may Function as Potential Biomarker for Remission after Traumatic Spinal Cord Injury.,” *Clinical laboratory*, 66(4). Available at: <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190916>.
- Camire, R.M. (2021) “Blood coagulation factor X: molecular biology, inherited disease, and engineered therapeutics.,” *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 52(2), pp. 383–390. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02456-w>.
- Cardenas, J.C. (2021) “Thrombin Generation Following Severe Trauma: Mechanisms, Modulators, and Implications for Hemostasis and Thrombosis.,” *Shock (Augusta, Ga.)*, 56(5), pp. 682–690. Available at: <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001773>.

- Celkan, T. and Dikme, G. (2018) “Thrombosis in children: Which test to whom, when and how much necessary?,” *Turk pediatri arsivi*, 53(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.5152/TurkPediatriArs.2018.2586>.
- Correia de Sousa, M. *et al.* (2019) “Deciphering miRNAs’ Action through miRNA Editing.,” *International journal of molecular sciences*, 20(24). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20246249>.
- Dautaj, A. *et al.* (2019) “Hereditary thrombophilia.,” *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 90(10-S), pp. 44–46. Available at: <https://doi.org/10.23750/abm.v90i10-S.8758>.
- Dobson, D.A. *et al.* (2024) “Regulation of fibrinogen synthesis.,” *Thrombosis research*, 242, p. 109134. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2024.109134>.
- Engel, E.R. *et al.* (2020) “Predictors of postthrombotic syndrome in pediatric thrombosis: A systematic review and meta-analysis of the literature.,” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 18(10), pp. 2601–2612. Available at: <https://doi.org/10.1111/jth.14984>.
- Felmeden, D.C. and Lip, G.Y. (2000) “The renin-angiotensin-aldosterone system and fibrinolysis.,” *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, 1(3), pp. 240–4. Available at: <https://doi.org/10.3317/jraas.2000.036>.
- Franchini, M. *et al.* (2024) “How we manage a high D-dimer.,” *Haematologica*, 109(4), pp. 1035–1045. Available at: <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283966>.
- Gao, J. *et al.* (2017) “The role of microRNAs in prethrombotic status associated with coronary artery disease.,” *Thrombosis and haemostasis*, 117(3), pp. 429–436. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH16-07-0503>.
- Gareev, I. *et al.* (2023) “MiRNAs and Their Role in Venous Thromboembolic Complications.,” *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(21). Available at: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13213383>.
- Gerstl, L. *et al.* (2020) “Childhood Arterial Ischaemic Stroke: Clinical Presentation, Risk Factors and Management.,” *Hamostaseologie*, 40(2), pp. 165–173. Available at: <https://doi.org/10.1055/a-1113-0445>.
- Gintoni, I. *et al.* (2023) “Review of Disease-Specific microRNAs by Strategically Bridging Genetics and Epigenetics in Oral Squamous Cell Carcinoma,” *Genes*, 14(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/genes14081578>.
- Gintoni, I. *et al.* (2024) “Identification of Stage-Specific microRNAs that Govern the Early Stages of Sequential Oral Oncogenesis by Strategically Bridging Human Genetics with

Epigenetics and Utilizing an Animal Model,” *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25147642>.

- Gintoni, I. *et al.* (2025) “Genetic Variations Related to Angiotensin II Production and Risk for Basal Cell Carcinoma,” *Biochemical genetics*, 63(2), pp. 917–935. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10746-0>.
- Gintoni, I., Adamopoulou, M. and Yapijakis, C. (2021) “The angiotensin-converting enzyme insertion/ deletion polymorphism as a common risk factor for major pregnancy complications,” *In Vivo*, 35(1), pp. 95–103. Available at: <https://doi.org/10.21873/INVIVO.12236>.
- Gintoni, I., Adamopoulou, M. and Yapijakis, C. (2022) “The Impact of ACE and ACE2 Gene Polymorphisms in Pulmonary Diseases Including COVID-19,” *In vivo (Athens, Greece)*, 36(1), pp. 13–29. Available at: <https://doi.org/10.21873/invivo.12672>.
- Glueck, C.J. *et al.* (1999) “Heritable thrombophilia and hypofibrinolysis. Possible causes of retinal vein occlusion,” *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 117(1), pp. 43–49. Available at: <https://doi.org/10.1001/ARCHOPHT.117.1.43>.
- Gonzalez-Gonzalez, F.J., Ziccardi, M.R. and McCauley, M.D. (2021) “Virchow’s Triad and the Role of Thrombosis in COVID-Related Stroke,” *Frontiers in physiology*, 12, p. 769254. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.769254>.
- Green, D. (2006) “Coagulation cascade,” *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis*, 10 Suppl 2, pp. S2-4. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x>.
- Grover, S.P. and Mackman, N. (2019) “Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(3), pp. 331–338. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312130>.
- Guzoglu, N., Albayrak, M. and Aliefendioglu, D. (2023) “Evaluation of Patients with Neonatal Thrombosis,” *Indian journal of pediatrics*, 90(6), pp. 615–617. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12098-023-04497-w>.
- Ha, H., Oh, E.Y. and Lee, H.B. (2009) “The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases,” *Nature reviews. Nephrology*, 5(4), pp. 203–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.15>.
- Ha, Y.H. *et al.* (2024) “Genetic Associations of Plasminogen Activator Inhibitor-1-Related miRNA Variants with Coronary Artery Disease,” *International journal of molecular sciences*, 25(21). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms252111528>.

- Han, T. *et al.* (2016) “Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by the naphthoquinone shikonin,” *Fitoterapia*, 113, pp. 117–122. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2016.07.010>.
- He, Q. *et al.* (2013) “Associations of ACE gene insertion/deletion polymorphism, ACE activity, and ACE mRNA expression with hypertension in a Chinese population.,” *PloS one*, 8(10), p. e75870. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075870>.
- Hembrom, A.A. *et al.* (2020) “MicroRNAs in venous thrombo-embolism.,” *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 504, pp. 66–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.034>.
- Huebner, B.R. *et al.* (2018) “Thrombin stimulates increased plasminogen activator inhibitor-1 release from liver compared to lung endothelium,” *The Journal of surgical research*, 225, pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2017.12.017>.
- Johari, V. and Loke, C. (2012) “Brief Overview of the Coagulation Cascade,” *Disease-a-Month*, 58(8), pp. 421–423. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.04.004>.
- Khodadi, E. (2020) “Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules.,” *Cardiovascular toxicology*, 20(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12012-019-09555-4>.
- Krleza, J.L. *et al.* (2023) “Inherited Thrombophilia Associated With Ischemic Pediatric Stroke in Parent-Child Pairs.,” *Pediatric neurology*, 146, pp. 119–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2023.06.017>.
- Liu, G.D. *et al.* (2022) “Risk factors associated with catheter-related venous thrombosis: a meta-analysis.,” *Public health*, 205, pp. 45–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2022.01.018>.
- Loginov, V.I. *et al.* (2015) “Methylation of miRNA genes and oncogenesis.,” *Biochemistry. Biokhimiia*, 80(2), pp. 145–62. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0006297915020029>.
- Mackman, N., Tilley, R.E. and Key, N.S. (2007) “Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), pp. 1687–1693. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141911>.
- Mason, R.G. *et al.* (1977) “The endothelium: roles in thrombosis and hemostasis.,” *Archives of pathology & laboratory medicine*, 101(2), pp. 61–4.

- Mo, J.W. *et al.* (2015) “TGF- β 1 and Serpine 1 expression changes in traumatic deep vein thrombosis,” *Genetics and molecular research : GMR*, 14(4), pp. 13835–13842. Available at: <https://doi.org/10.4238/2015.OCTOBER.29.3>.
- Mogielnicki, A. *et al.* (2005) “Angiotensin II enhances thrombosis development in renovascular hypertensive rats.,” *Thrombosis and haemostasis*, 93(6), pp. 1069–76. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH04-10-0701>.
- Mohammed, B.A.B. (2021) “Alpha 2-antiplasmin deficiency in a Sudanese child: a case report.,” *Journal of medical case reports*, 15(1), p. 238. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13256-021-02813-6>.
- Moore, H.B. *et al.* (2019) “Fibrinolysis Shutdown in Trauma: Historical Review and Clinical Implications.,” *Anesthesia and analgesia*, 129(3), pp. 762–773. Available at: <https://doi.org/10.1213/ANE.00000000000004234>.
- Moore, J.H. *et al.* (2002) “The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms.,” *Clinical genetics*, 62(1), pp. 53–9. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.620107.x>.
- Mutch, N.J. and Medcalf, R.L. (2023) “The fibrinolysis renaissance.,” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 21(12), pp. 3304–3316. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.09.012>.
- Nejad, C., Stunden, H.J. and Gantier, M.P. (2018) “A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses.,” *The FEBS journal*, 285(20), pp. 3695–3716. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.14482>.
- Nguyen, G. *et al.* (1988) “Residual plasminogen activator inhibitor activity after venous stasis as a criterion for hypofibrinolysis: a study in 83 patients with confirmed deep vein thrombosis.,” *Blood*, 72(2), pp. 601–5.
- Van Ommen, C.H. and Peters, M. (2006) “Acute pulmonary embolism in childhood.,” *Thrombosis research*, 118(1), pp. 13–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.05.013>.
- Papadogeorgou, P. *et al.* (2024) “Coagulation Profile in Neonates with Congenital Heart Disease: A Pilot Study.,” *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 60(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina60020268>.
- Petri, R. *et al.* (2014) “miRNAs in brain development.,” *Experimental cell research*, 321(1), pp. 84–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.09.022>.

- Rex, D.A.B. *et al.* (2022) “A modular map of Bradykinin-mediated inflammatory signaling network,” *Journal of cell communication and signaling*, 16(2), pp. 301–310. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00652-0>.
- Sadia, K., Ashraf, M.Z. and Mishra, A. (2021) “Therapeutic Role of Sirtuins Targeting Unfolded Protein Response, Coagulation, and Inflammation in Hypoxia-Induced Thrombosis,” *Frontiers in physiology*, 12, p. 733453. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.733453>.
- Saedi, S. *et al.* (2020) “Inherited thrombophilia in mechanical valve malfunction,” *Annales de cardiologie et d’angiologie*, 69(4), pp. 213–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ANCARD.2020.07.003>.
- Salloum-Asfar, S. *et al.* (2016) “MiRNA-Based Regulation of Hemostatic Factors through Hepatic Nuclear Factor-4 Alpha,” *PloS one*, 11(5), p. e0154751. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154751>.
- Sava, C. *et al.* (2025) “Thrombosis in Children: A Retrospective Study from a Single-center Database,” *In vivo (Athens, Greece)*, 39(1), pp. 473–481. Available at: <https://doi.org/10.21873/invivo.13851>.
- Sedzro, J.C. *et al.* (2022) “Antithrombotic potential of a single-domain antibody enhancing the activated protein C-cofactor activity of protein S,” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 20(7), pp. 1653–1664. Available at: <https://doi.org/10.1111/jth.15736>.
- Seheult, J.N. and Chibisov, I. (2016) “A Case of Unexplained Cerebral Sinus Thrombosis in a 22-Year-Old Obese Caucasian Woman,” *Laboratory medicine*, 47(3), pp. 233–240. Available at: <https://doi.org/10.1093/LABMED/LMW023>.
- Senchenkova, E.Y. *et al.* (2010) “Angiotensin II-mediated microvascular thrombosis,” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 56(6), pp. 1089–95. Available at: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158220>.
- Senchenkova, E.Y. *et al.* (2014) “Roles of Coagulation and fibrinolysis in angiotensin II-enhanced microvascular thrombosis,” *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 21(5), pp. 401–7. Available at: <https://doi.org/10.1111/micc.12120>.
- Shahinian, J.H., Chan, V. and Pislaru, S. V (2022) “Chronic thrombosis of bioprostheses: Diagnosis and management,” *Progress in cardiovascular diseases*, 72, pp. 15–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2022.06.008>.

- Shang, R. *et al.* (2023) “microRNAs in action: biogenesis, function and regulation.,” *Nature reviews. Genetics*, 24(12), pp. 816–833. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>.
- Sierra, C., Moreno, M. and García-Ruiz, J.C. (2022) “The physiology of hemostasis.,” *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 33(Suppl 1), pp. S1–S2. Available at: <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001099>.
- Sillen, M. and Declerck, P.J. (2021) “A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target?,” *International journal of molecular sciences*, 22(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22052721>.
- Singh, R.P. *et al.* (2013) “The role of miRNA in inflammation and autoimmunity.,” *Autoimmunity reviews*, 12(12), pp. 1160–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.003>.
- Su, M.-T. *et al.* (2013) “Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis.,” *Thrombosis and haemostasis*, 109(1), pp. 8–15. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH12-08-0584>.
- Sundquist, K. *et al.* (2015) “Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism, factor V Leiden, prothrombin mutations and the risk of VTE recurrence,” *Thrombosis and haemostasis*, 114(6), pp. 1156–1164. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH15-01-0031>.
- Tang, X. *et al.* (2022) “KLF2 regulates neutrophil activation and thrombosis in cardiac hypertrophy and heart failure progression.,” *The Journal of clinical investigation*, 132(3). Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI147191>.
- Tarango, C. and Manco-Johnson, M.J. (2017) “Pediatric Thrombolysis: A Practical Approach,” *Frontiers in Pediatrics*, 5, p. 260. Available at: <https://doi.org/10.3389/FPED.2017.00260>.
- Teruel-Montoya, R., Rosendaal, F.R. and Martínez, C. (2015) “MicroRNAs in hemostasis.,” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 13(2), pp. 170–81. Available at: <https://doi.org/10.1111/jth.12788>.
- Thakur, M. *et al.* (2023) “NETs-Induced Thrombosis Impacts on Cardiovascular and Chronic Kidney Disease.,” *Circulation research*, 132(8), pp. 933–949. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321750>.
- Vairaktaris, E. *et al.* (2006) “Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism is associated with increased risk for oral cancer.,” *Oral oncology*, 42(9), pp. 888–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.12.005>.

- Viganò, S. *et al.* (2018) “A novel allele variant of the SERPINF2 gene responsible for severe plasmin inhibitor (α 2-antiplasmin) deficiency in an Italian patient.,” *Thrombosis research*, 166, pp. 60–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.04.006>.
- Vishnoi, A. and Rani, S. (2023) “miRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Updated Overview.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2595, pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2_1.
- Wang, H. *et al.* (2022) “[MiR-34a alleviates podocyte injury in mice with diabetic nephropathy by targeted downregulation of Notch signaling pathway].,” *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 42(12), pp. 1839–1845. Available at: <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2022.12.12>.
- Wang, N. *et al.* (2024) “Plasma proteomic profiling reveals that SERPINE1 is a potential biomarker associated with coronary artery lesions in Kawasaki disease,” *International immunopharmacology*, 139. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2024.112698>.
- Wei, G.-J. *et al.* (2019) “A Genetic Variant of miR-34a Contributes to Susceptibility of Ischemic Stroke Among Chinese Population.,” *Frontiers in physiology*, 10, p. 432. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00432>.
- Weisel, J.W. (2005) “Fibrinogen and fibrin.,” *Advances in protein chemistry*, 70, pp. 247–99. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70008-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70008-5).
- Wheeler, A.P. and Gailani, D. (2016) “The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy.,” *Hematology/oncology clinics of North America*, 30(5), pp. 1099–114. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.05.007>.
- Wolf, S. *et al.* (2024) “Epidemiology of deep vein thrombosis,” *Vasa*, 53(5), pp. 298–307. Available at: <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a001145>.
- Yapijakis, C. *et al.* (2012) “Prevalence of thrombosis-related DNA polymorphisms in a healthy Greek population.,” *In vivo (Athens, Greece)*, 26(6), pp. 1095–101.
- Yapijakis, C. (2021) “The Role of MicroRNAs in Thrombosis.,” *Advances in experimental medicine and biology*, 1339, pp. 409–414. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-78787-5_51.
- Yapijakis, C., Serefoglou, Z. and Voumvourakis, C. (2015) “Common Gene Polymorphisms Associated with Thrombophilia,” in *Thrombosis, Atherosclerosis and Atherothrombosis - New Insights and Experimental Protocols*. InTech. Available at: <https://doi.org/10.5772/61859>.

- Yepes, M. (2024) “Fibrinolytic and Non-fibrinolytic Roles of Tissue-type Plasminogen Activator in the Ischemic Brain,” *Neuroscience*, 542, pp. 69–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.08.011>.
- Zhang, Q. *et al.* (2020) “Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism – a meta-analysis and systematic review,” *Vasa*, 49(2), pp. 141–146. Available at: <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000839>.
- Zhang, Y. *et al.* (2007) “[Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with ACE and PAI-1 levels in Guangdong Chinese Han patients with essential hypertension],” *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 27(11), pp. 1681–4.
- Zhou, J. *et al.* (2019) “miR-34a alleviates spinal cord injury via TLR4 signaling by inhibiting HMGB-1,” *Experimental and therapeutic medicine*, 17(3), pp. 1912–1918. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7102>.