

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ – ΜΟΝΑΔΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ

ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΝΘΗ Σ. ΤΡΑΥΛΟΥ



Αιμόσταση – Νέες ρυθμιστικές πρωτεΐνες – Πρωτεΐνη Z

Διδακτορική Διατριβή

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ

ΙΑΤΡΟΣ -ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

Αθήνα 2013

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

ΚΕΙΜΕΝΟ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἰστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὅρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου.
Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες

Βιογραφικό σημείωμα

Περίληψη.....	28
---------------	----

Abstract.....	30
---------------	----

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μηχανισμός της αιμόστασης

1.1. Ο μηχανισμός της αρχικής αιμόστασης

1.1.1. Δομή των αιμοπεταλίων.....	32
-----------------------------------	----

1.1.2. Λειτουργία των αιμοπεταλίων.....	34
---	----

1.1.3. Μηχανισμοί αυτοελέγχου	36
-------------------------------------	----

1.1.4. Παθοφυσιολογία της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.....	37
---	----

1.2. Ο μηχανισμός της πήξεως του αίματος

1.2.1 Κλασσικό και Κυτταρικό Μοντέλο της πήξης	38
--	----

1.3. Ο μηχανισμός της ινωδόλυσης

1.3.1. Το Ινωδολυτικό Σύστημα	41
-------------------------------------	----

1.3.2. Μηχανισμός ινωδόλυσης.....	42
-----------------------------------	----

2. Μηχανισμός της Θρόμβωσης - Υπερπηκτικότητα

2.1 Σύντομη Ιστορική αναδρομή	46
-------------------------------------	----

2.2. Θρομβοφιλία.....	47
-----------------------	----

2.2.1 Θρομβοφιλία και Κληρονομικότητα.....	49
--	----

2.2.2. Αιτίες Θρομβοφιλίας.....	52
---------------------------------	----

2.2.2.1 Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C.....	52
-------------------------------------	----

2.2.2.2. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S.....	55
--------------------------------------	----

2.2.2.3. Θρομβομοντουλίνη & Ενδοθηλιακός υποδοχέας της πρωτεΐνης C	55
--	----

2.2.2.4. Παράγοντας V R506Q και αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C.....	56
---	----

2.2.2.5. Αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C χωρίς FVL.....	61
--	----

2.2.2.6. Άλλες μεταλλάξεις του παράγοντα V & θρομβοφιλία.....	61
2.2.2.7. Μετάλλαξη προθρομβίνης G20210A.....	62
2.2.2.8. Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνη.....	64
2.2.2.9. Υπερομοκυστιναιμία (HHC).....	66
2.2.2.10. Δυσινωδογοναιμία	70
2.2.2.11. Αυξημένα επίπεδα παραγόντων.....	71
3. Νέες ρυθμιστικές πρωτεΐνες- Πρωτεΐνη Z	
3.1 Γενικά στοιχεία	76
3.2. Βιοχημεία.....	77
3.3. Γενετικός έλεγχος PZ και ZPI.....	80
3.4. Μέτρηση της PZ και ZPI	81
3.5. Πρωτεΐνη Z και πολυμορφισμός-13 A/G.....	81
3.6. Πρωτεΐνη Z και Θρόμβωση.....	82
 B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Σκοπός.....	88
Ασθενείς και μέθοδοι.....	89
Αποτελέσματα.....	93
Συζήτηση.....	101
 Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Γεράσιμος Πάγκαλης**
- 2. Θεοφάνης Οικονομόπουλος**
- 3. Ωραιάνθη Τραυλού**

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Γεράσιμος Πάγκαλης**
- 2. Θεοφάνης Οικονομόπουλος**
- 3. Ωραιάνθη Τραυλού**
- 4. Ιωάννης Μελέτης**
- 5. Κωνσταντίνος Κωνσταντόπουλος**
- 6. Μαριάνα Πολίτου**
- 7. Αργυρή Γιαλεράκη**

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής καθηγητές κ. Γ.Πάγκαλη , κ. Θ. Οικονομόπουλο και την κα Α.Τραυλού

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα τις κες Ε.Μερκούρη και Α.Γιαλεράκη για την αμέριστη βοήθεια τους, υπομονή και υποστήριξη καθώς και την τεχνολόγο της αιμοδοσίας του Γ.Ν.Νίκαιας Π.Καρυδά για την έμπρακτη και πραγματικά πολύτιμη βοήθεια της.

Ευχαριστώ επίσης την κα Ε. Μελισσάρη Διευθύντρια του Ωνάσειου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου για την επιστημονική της βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου την Μέλανι, την Ιουλία και τον Αλέξανδρο που μου δίνουν λόγο για να συνεχίζω και να υπάρχω.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- ΕΠΩΝΥΜΟ : ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ
- ΟΝΟΜΑ : ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
- ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ : ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
- ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΡΟΣ : ΑΡΣΙΝΟΗ , ΤΟ ΓΕΝΟΣ ΛΑΓΙΟΥ
- ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ : 1962
- ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ : ΑΘΗΝΑ
- ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ : ΕΛΛΗΝΙΚΗ
- ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ : ΜΑΒΙΛΗ 5 – ΔΡΟΣΙΑ , ΤΗΛ : 210-8137959 / 693 - 8015785
- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤ/ΣΗ : ΕΓΓΑΜΟΣ, ΠΑΤΕΡΑΣ ΔΥΟ ΠΑΙΔΙΩΝ

ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ – ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

1973 -1979 : Μέση εκπαίδευση : “ΛΥΚΕΙΟ Η ΑΘΗΝΑ “ Γ. ΖΗΡΙΔΗ

1981 - 1987 : Φοίτηση στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κλουζ - Ρουμανίας

Σεπτ. 1987 : Αποφοίτηση με βαθμό “ΑΡΙΣΤΑ”

Νοέμβ. 1987 : Επιτυχείς εξετάσεις αναγνώρισης Πτυχίου Ιατρικής

1987 - 1988 : Στρατιωτική θητεία με την ιδιότητα του Ιατρού μονάδος.

1989 - 1990 : Υπηρεσία υπαίθρου στο Κ.Υ.Κύμης -Νοσ. Κύμης.

1990 - 1992: Έμμισθος ειδικευόμενος ιατρός Α Παθολογική κλινική Νοσ. Α.ΦΛΕΜΙΓΚ (Δ/ντής :Π.Οικονομόπουλος).

1992 -1996 : Έμμισθος ειδικευόμενος Αιματολογίας Κλινική Παθολογικής Φυσιολογίας Νοσ. “ ΛΑΙΚΟ “ (Δ/ντής : Καθηγητής Χ. Μ . Μουτσόπουλος)

Ιανουάριος1997 : Λήψη τίτλου ιατρικής ειδικότητας Αιματολογίας

Νοέμβ.1996-Φεβρουάριος 1997 Επιστημονικός Συνεργάτης Κέντρου Αιμοδοσίας Λαϊκού Νοσοκομείου (Δ/ντρια Τ.Μανδαλάκη)

Ιούνιος 1997 - Νοέμβριος 1997 : Αιματολόγος στα διεθνή διαγνωστικά εργαστήρια “ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ”

28 Ιουλίου1997- 6 Νοεμβρίου 1997 : Αιματολόγος στην αιμοδοσία του 3ου Θεραπευτηρίου ΙΚΑ

10 Οκτωβρίου 1997 : Λήψη θέσεως μετά από κρίση (ΦΕΚ 167/10-10-97) επιμελητή Β' στο Κέντρο Αιμοδοσίας και Παρασκευής Παραγώγων Αίματος Π.Γ. Νοσοκομείου Νίκαιας Πειραιά "Άγιος Παντελεήμων"

21 Δεκεμβρίου 2005 : Λήψη θέσεως μετά από κρίση (ΦΕΚ 321/ 21-12-2005) επιμελητή Α Αιματολογίας στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Νίκαιας-Πειραιά «Αγ.Παντελεήμων»

Αύγουστος 2002 μέχρι Δεκέμβριος 2005 : Παράλληλα με τις δραστηριότητες μου στο Κέντρο Αιμοδοσίας της Νίκαιας προσφέρω υπηρεσίες και στο Εθνικό Κέντρο Παρασκευής Παραγώγων Αίματος "Ηλίας Πολίτης" ως υπεύθυνος Διασφάλισης ποιότητας

Φεβρουάριος 2004 μέχρι Σεπτέμβριο 2004: με απόφαση του Γ' ΠεΣΥ καλύπτω παράλληλα με τις εφημερίες στο Π.Γ.Ν.Νίκαιας και τις εφημερίες του Αιματολογικού τμήματος και Μονάδας Αιμοδοσίας του Παν/κου Νοσοκομείου «Αττικόν» (Δ/ντρια Επικ. Καθηγ. Ω.Τραυλου).

Ιανουάριος 2006 – Ιανουάριος 2007 : με απόφαση Διοικητού Γ.Ν.Νίκαιας εγκρίνεται η απασχόληση μου εκτός θέσης προκειμένου να προσφέρω τις υπηρεσίες μου στο Ε.Κ.Π.Π.Α «Ηλ.Πολίτης» συνεχίζοντας την επιστημονική συνεργασία με το Νοσοκομείο της Νίκαιας και μετέχοντας στο πρόγραμμα εφημεριών του Κέντρου Αιμοδοσίας

Ιανουάριος 2007 : επιστρέφω στην οργανική μου θέση ως επιμελητής Α στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Νίκαιας

Μάρτιος 2007 – Σεπτέμβριος 2007: εκτελώ καθήκοντα Διευθυντή στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Νίκαιας μετά από ομόφωνη απόφαση του Επιστημονικού Συμβουλίου

Φεβρουάριος 2007 - Ιούνιος 2007: Έμμισθος Καθηγητής στην ειδικότητα Ιατρικών και Βιολογικών εργαστηρίων του Αιματολογικού εργαστηρίου του Οργανισμού Επαγγελματικής Εκπαίδευσης και Κατάρτισης (Ο.Ε.Ε.Κ.) Ι.Ε.Κ Πειραιά με σύνολο διδακτικών ωρών 112 ώρες.

Σεπτέμβριος 2007 – Μάρτιος 2012 : επιμελητής Α στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Νίκαιας

Μάιος 2012 : Διευθυντής Ε.Σ.Υ

Μάρτιος 2012 έως σήμερα : Επιστημονικός Διευθυντής στο Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Γλώσσες : Άριστη γνώση Αγγλικών και Ρουμανικών

Χειρισμός Η/Υ : Γνώση των λειτουργικών συστημάτων Windows , SPSS, Power Point.

1. Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells

Kriebardis AG, Antonelou MH, **Stamoulis KE**, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.

Blood Cells Molecules & Diseases 36(2): 279-282, 2006[IF: 2,749]

Σύνολο αναφορών: 11

Ετεροαναφορές: 5

1. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage

D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L.

Journal of Proteome Research 6(8):3242-3255, 2007

2. Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics

Barelli S, Canellini G, Thadikkaran L, Crettaz D, Quadroni M, Rossier JS, Tissot J-D, Lion N.

Proteomics - Clinical Applications 2 (2):142-157, 2008

3. Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing

Šoškić V, Groebe K, Schrattenholz A.

Experimental Gerontology 43(4):247-257, 2008

4. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)

Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot J-D.

Journal of Proteomics 73(3):374-385, 2010

5. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro

Bosman GJCGM, Lasonder E, Groenen-Döpp YAM, Willekens FLA, Werre JM, Novotný VMJ.

Journal of Proteomics 73(3):396-402, 2010

2. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells

Kriebardis AG, Antonelou MH, **Stamoulis KE**, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.

Journal of Cellular and Molecular Medicine, 11(1):148-155, 2007.....[IF: 5,114]

Σύνολο αναφορών: 22

Ετεροαναφορές: 20

1. Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics

Barelli S, Canellini G, Thadikkaran L, et al.

Proteimics Clinical Applications 2 (2):142-157, 2008

2. Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing

Šoškić V, Groebe K, Schrattenholz A.

Experimental Gerontology 43(4):247-257, 2008

3. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions
Bosman GJCGM, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotný VMJ, Bos H, De Grip WJ.
Transfusion 48(5):827-835, 2008
4. Microparticles in stored red blood cells: An approach using flow cytometry and proteomic tools
Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J-D, Lion N.
Vox Sanguinis 95(4):289-297, 2008
5. Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: Influence on cell properties
Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, Hayes J, Reinhart WH.
Vox Sanguinis 95(4):280-287, 2008
6. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: Structural aspects and implications for transfusion
Bosman GJCGM, Werre JM, Willekens FLA, Novotný VMJ.
Transfusion Medicine 18(6):335-347, 2008
7. Suicidal death of erythrocytes due to selenium-compounds
Sopjani M, Föller M, Gulbins E, Lang F.
Cellular Physiology and Biochemistry 22 (5-6), pp. 387-394, 2008
8. Lipopeptides in the triggering of erythrocyte cell membrane scrambling
Wang K, Mahmud H, Föller M, Biswas R, Lang KS, Bohn E, Götz F, Lang F.
Cellular Physiology and Biochemistry 22(5-6):381-386, 2008
9. The effect of storage on the accumulation of oxidative biomarkers in donated packed red blood cells
Rael LT, Bar-Or R, Ambruso DR, Mains CW, Slone DS, Craun ML, Bar-Or D.
Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care 66(1):76-81, 2009
10. Adverse effects related to storage lesions: Proteomic profiles of red blood cells during storage
Zolla L, Liumbruno GM, D'Amici GM, Grazzini G.
Blood Transfusion 7 (SUPPL. 1):1, 2009
11. Proteomics of juvenile senegal sole (*solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds
Salas-Leiton E, Cánovas-Conesa B, Zerolo R, López-Barea J, Cañavate JP, Alhama J.
Marine Biotechnology 11(4):473-487, 2009
12. Inhibition of suicidal erythrocyte death by resveratrol
Qadri, S.M., Föller, M., Lang, F.
Life Sciences 85(1-2):33-38, 2009

13. Modulation of suicidal erythrocyte cation channels by an AMPA antagonist
Föller M, Mahmud H, Gu S, Kucherenko Y, Gehring E-M, Shumilina E, Floride E, Sprengel R, Lang F.

Journal of Cellular and Molecular Medicine 13(9 B):3680-3686, 2009

14. Effects of aging on antioxidant response and phagocytosis in senescent erythrocytes
Brajovich ML, Rucci A, Acosta IL, Cotorruelo C, Borrs SG, Racca L, Biondi C, Racca A.

Immunological Investigations 38(6):551-559, 2009

15. Biopreservation of red blood cells - The struggle with hemoglobin oxidation
Kanas T, Acker JP.

FEBS Journal 277(2):343-356, 2010

16. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)

Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot J-D.

Journal of Proteomics 73(3):374-385, 2010

17. A single assay for multiple storage-sensitive red blood cell characteristics by means of infrared spectroscopy

Pistorius AMA, Luten M, Bosman GJCGM, Degrip WJ.

Transfusion 50(2):366-375, 2010

18. Clinical impact of blood storage lesions

Zubair AC.

American Journal of Hematology 85(2):117-122, 2010

19. Does carbonyl stress cause increased blood viscosity during storage?

Li G, He H, Yan H, Zhao Q, Yin D.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 44(2):145-154, 2010

20. Erythrocyte death in vitro induced by starvation in the absence of Ca²⁺

Pompeo G, Girasole M, Cricenti A, Boumis G, Bellelli A, Amiconi S.

Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1798(6):1047-1055, 2010.

3. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement and caspase activation

Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.

Transfusion, 47(7) 1212-1220, 2007.....[IF: 3,475]

Σύνολο αναφορών: 20

Ετεροαναφορές: 18

1. Heat-shock protein-27, -70 and peroxiredoxin-II show molecular chaperone function in sickle red cells: Evidence from transgenic sickle cell mouse model

Biondani A, Turrini F, Carta F, Matté A, Filippini A, Siciliano A, Beuzard Y, De Franceschi L.

Proteomics - Clinical Applications 2(5):706-719, 2008.

2. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions
Bosman GJCGM, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotný VMJ, Bos H, De Grip WJ.
Transfusion 48(5):827-835, 2008.
3. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*
Rosa EAR, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, Da Silva WJ, Yau JYY, Samaranayake LP.
Journal of Medical Microbiology 57(10):1277-1281, 2008.
4. Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: Influence on cell properties
Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, Hayes J, Reinhart WH.
Vox Sanguinis 95 (4):280-287, 2008.
5. Microparticles in stored red blood cells: An approach using flow cytometry and proteomic tools
Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J-D, Lion N.
Vox Sanguinis 95 (4), pp. 289-297, 2008.
6. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: Structural aspects and implications for transfusion
Bosman GJCGM, Werre JM, Willekens FLA, Novotný VMJ.
Transfusion Medicine 18 (6):335-347, 2008.
7. Suicidal death of erythrocytes due to selenium-compounds
Sopjani, M., Föller, M., Gulbins, E., Lang, F.
Cellular Physiology and Biochemistry 22(5-6):387-394, 2008.
8. Lipopeptides in the triggering of erythrocyte cell membrane scrambling
Wang K, Mahmud H, Föller M, Biswas R, Lang KS, Bohn E, Götz F, Lang F.
Cellular Physiology and Biochemistry 22 (5-6), pp. 381-386, 2008.
9. Active caspases-8 and -3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: A cytometric demonstration
Bratosin D, Tcacenco L, Sidoroff M, Cotoraci C, Slomianny C, Estaquier J, Montreuil J.
Cytometry Part A 75 (3):236-244, 2009.
10. Why an Alternative to Blood Transfusion?
Shander A, Goodnough LT.
Critical Care Clinics 25 (2):261-277, 2009.
11. Eryptosis triggered by bismuth
Braun M, Föller M, Gulbins E, Lang F.
BioMetals 22 (3):453-460, 2009.
12. Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells
Karon BS, Hoyer JD, Stubbs JR, Thomas DD. *Transfusion* 49 (7): 1435-1442, 2009.

13. TSH induces co-localization of TSH receptor and Na/K-ATPase in human erythrocytes
Balzan S, Del Carratore R, Nicolini G, Forini , Lubrano V, Simili M, Benedetti PA, Iervasi G.
Cell Biochemistry and Function 27 (5):259-263, 2009.

14. Blood Group Antigens and Normal Red Blood Cell Physiology: A Canadian Blood Services Research and Development Symposium
Lin Y, Pavenski K, Saidenberg E, Branch DR.
Transfusion Medicine Reviews 23 (4), pp. 292-309, 2009.

15. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)
Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot J-D.
Journal of Proteomics 73 (3), pp. 374-385, 2010.

16. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro
Bosman GJCGM, Lasonder E, Groenen-Döpp YAM, Willekens FLA, Werre JM, Novotný VMJ.
Journal of Proteomics 73 (3), pp. 396-402, 2010.

17. Clinical impact of blood storage lesions
Zubair AC.
American Journal of Hematology 85 (2): 117-122, 2010.

18. Blood transfusion is associated with increased morbidity and mortality after lower extremity revascularization
O'Keeffe SD, Davenport DL, Minion DJ, Sorial EE, Endean ED, Xenos ES.
Journal of Vascular Surgery 51 (3): 616-621,e3, 2010.

4. RBC-derived vesicles during storage. Ultrastructure, protein composition, oxidation and signalling components

Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.

Transfusion, 48(9): 1943-1953, 2008.....[IF: 3,475]

Σύνολο αναφορών: 9

Ετεροαναφορές: 8

1. Lipopeptides in the triggering of erythrocyte cell membrane scrambling
Wang K, Mahmud H, Föller M, Biswas R, Lang KS, Bohn E, Götz F, Lang F.
Cellular Physiology and Biochemistry 22 (5-6), pp. 381-386, 2008.

2. Functional CNTF receptor α subunit restored by its recombinant in corneal endothelial cells in stored human donor corneas: Connexin-43 upregulation
Koh S-W.M, Celeste J, Paul Ku CY.
Investigative Ophthalmology and Visual Science 50 (4), pp. 1801-1807, 2009.

3. Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells
Karon BS, Hoyer JD, Stubbs JR, Thomas DD.
Transfusion 49 (7):1435-1442, 2009.

4. Biopreservation of red blood cells - The struggle with hemoglobin oxidation
Kanas T, Acker JP.
FEBS Journal 277(2):343-356, 2010.
5. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro
Bosman GJCGM, Lasonder E, Groenen-Döpp YAM, Willekens FLA, Werre JM, Novotný VMJ.
Journal of Proteomics 73 (3):396-402, 2010.
6. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)
Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot J-D.
Journal of Proteomics 73 (3):374-385, 2010.
7. A single assay for multiple storage-sensitive red blood cell characteristics by means of infrared spectroscopy
Pistorius AMA, Luten M, Bosman GJCGM, Degrip WJ.
Transfusion 50 (2):366-375, 2010.
8. Clinical impact of blood storage lesions
Zubair AC.
American Journal of Hematology 85(2):117-122, 2010.

5. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol

Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.

Transfusion, 50: 376-389, 2010.....[IF: 3,475]

Σύνολο αναφορών: 0

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Παρατίθενται τα IF των επιστημονικών περιοδικών δημοσίευσης, η σειρά ονόματος και ο αριθμός αναφορών για κάθε δημοσίευση ερευνητικού άρθρου και άρθρου ανασκόπησης σε διεθνή περιοδικά με κριτές.

A/A	Περιοδικό	IF	Έτος δημοσίευσης	Σειρά εμφάνισης στους συγγραφείς	Αναφορές (Σύνολο)	Ετερο-αναφορές
1	Blood Cell Mol Dis	2,749	2006	3 (6)	11	5
2	J Cell Mol Med	5,114	2007	3 (6)	22	20
3	Transfusion	3,475	2007	3 (6)	20	18
4	Transfusion	3,475	2008	3 (6)	9	8
5	Transfusion	3,475	2010	3 (6)	0	0
	ΣΥΝΟΛΑ	18,288			62	51

ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ-ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ-ΣΤΡΟΓΓΥΛΑ ΤΡΑΠΕΖΙΑ ΩΣ ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΣ ΟΜΙΛΗΤΗΣ
- ΠΡΟΕΔΡΕΙΑ

1. Διάλεξη με θέμα: "Παθογένεια αρτηριακής -φλεβικής θρομβώσης" στο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο 1998 με θέμα "ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ και ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ" Θεσσαλονίκη 8-10 Μαΐου 1998 και Αθήνα 29-31 Μαΐου 1998.
2. Διάλεξη με θέμα : "Αιμοληψία ολικού αίματος" στην Ημερίδα του τμήματος Αιμοδοσίας - Αιμαφύρεσης της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας , Αθήνα - Νοσ. Ευαγγελισμός 5 /12/ 1998
3. Διάλεξη με θέμα "Αιμορραγικές διαταραχές σε Σήψη- SIRS" στην ημερίδα που διοργάνωσε το τμήμα Αιμόστασης της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας , Αθήνα 26 Ιουνίου 1999
4. Διάλεξη με θέμα « Χρήση παραγώγων αίματος στη ΜΕΘ. Ενδείξεις – επιπλοκές» στο 7ο πανελλήνιο συνέδριο εντατικής θεραπείας. Αθήνα 7 – 10 Οκτωβρίου 1999
5. Στρογγυλό τραπέζι στα πλαίσια του 1ου Πανελληνίου συνεδρίου μεταγγισιοθεραπείας . Επάρκεια αίματος και παραγώγων στην Ελλάδα και στην Ευρωπαϊκή Ένωση .Συντονιστές : Α. Μανιάτη – Ι. Δέδες. Διάλεξη με θέμα : Συλλογή πλάσματος για κλασματοποίηση στην Ελλάδα . Αθήνα 17 – 18 Μαρτίου 2000.
6. Διάλεξη στην ημερίδα « Επίκτητες αιμορραγικές Διαθέσεις» με θέμα Αιμορραγικές Διαθέσεις στους Υπερήλικες – συντονιστής Ε. Κοντοπούλου – Α. Καραφουλίδου . Holiday Inn , Αθήνα 6 Οκτωβρίου 2000.
7. Συμμετοχή στη Στρογγυλή Τράπεζα με θέμα « Η ATIII στη διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και το σηπτικό shock» , θέμα εισήγησης « Ορισμοί και παθοφυσιολογία της σήψης» στα πλαίσια του 11ου Πανελληνίου Αιματολογικού Συνέδριου , 16 – 19 Νοεμβρίου 2000, Θεσσαλονίκη .
8. Συμμετοχή στην επιστημονική Συνεδρίαση με θέμα «Ασφάλεια Μετάγγισης από τα Μεταδιδόμενα με το Αίμα Νοσήματα» θέμα εισήγησης «Μεταδιδόμενα με την μετάγγιση αίματος νοσήματα. Υπάρχει Τέλος?» στα πλαίσια του 12ου Πανελληνίου Αιματολογικού Συνέδριου, 22 – 25 Νοεμβρίου 2001.

9. Εισηγητής στην Συνάντηση Διευθυντών και Στελεχών Αιμοδοσίας που διοργάνωσε η Γεν.Διεύθυνση Υγείας του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας με θέμα «Τεχνικές Προδιαγραφές Πλάσματος για Κλασματοποίηση» Νοέμβριος 2001
10. Διάλεξη με θέμα : Νεότεροι μοριακοί θρομβοφιλικόι παράγοντες κινδύνου στα πλαίσια της ημερίδας που διοργανώθηκε από την Ελληνική Αιματολογική εταιρεία με θέμα Νεότερα θεραπευτικά δεδομένα στη θρομβοεμβολική και αιμορραγική νόσο. NIMITΣ, Αθήνα, 29 Μαρτίου 2003 .
11. Διάλεξη με θέμα : Μοριακός έλεγχος δεξαμενών έναντι μονήρων αιμοληψιών . Αδρανοποίηση σταθερών και ασταθών παραγώγων αίματος στα πλαίσια της ημερίδας που διοργανώθηκε από την Ελληνική Αιματολογική εταιρεία με θέμα : Εφαρμογές της μοριακής βιολογίας στην αιμοδοσία. Θεσσαλονίκη 11, Απριλίου 2003 .
12. Διάλεξη σε στρογγυλή τράπεζα με θέμα : Χρήση παραγώγων πλάσματος και αιμοπεταλίων στον βαριά πάσχοντα . Στα πλαίσια του 9 ου Πανελληνίου Συνέδριου Εντατικής Θεραπείας . Αθήνα 17 - 19 Οκτωβρίου 2003 .
13. Διάλεξη με θέμα : Το έργο του ΕΚΠΠΑ κατά την τελευταία πενταετία-προοπτικές στα πλαίσια της ημερίδας της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας με θέμα : Πλάσμα:: Διασφάλιση ποιότητας στη συλλογή, παραγωγή και κλασματοποίηση. 12 Δεκεμβρίου 2003 NIMITΣ , Αθήνα
14. Διάλεξη στα πλαίσια Διαιτητικής τράπεζας στο 30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο με θέμα : Μετάγγιση αίματος : από την ανάγκη στην κατάχρηση. Συντονιστές : Ν.Φίλιας, Α.Μανιάτη Εισήγηση : «Ενδείξεις Μετάγγισης πλάσματος στον βαρέως πάσχοντα» 1^η Μαΐου 2004, Αθήνα
15. Διάλεξη σε στρογγυλή τράπεζα στα πλαίσια του 3^{ου} Πανελληνίου Συνέδριου Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα «Μεταδιδόμενοι Λοιμώδεις παράγοντες με μεταγίσεις». 16 Οκτωβρίου 2004, Λουτράκι
16. Διάλεξη στην Διαιτητική ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας με θέμα Ενδείξεις χορήγησης πλάσματος και Λευκωματίνης με εισήγηση : « Παρασκευή – Ασφάλεια – Διάθεση έγκαιρα κατεψυγμένου πλάσματος» Συμμετέχουν Ελληνική εταιρεία εντατικής θεραπείας, Ελληνική αναισθησιολογική εταιρεία, Ελληνική χειρουργική εταιρεία, Ελληνική εταιρεία χειρουργικής θώρακος- καρδιάς, Ελληνική μαιευτική και γυναικολογική

εταιρεία, Ελληνική εταιρεία μελέτης ήπατος, Ελληνική παιδιατρική εταιρεία. 10 Δεκεμβρίου 2004, Αθήνα.

17. Διάλεξη σε στρογγυλή τράπεζα με θέμα :Διάχυτη Ενδοαγγειακή πήξη – Παθοφυσιολογία στα πλαίσια του 10^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Εντατικής Θεραπείας 14-16 Οκτωβρίου 2005, Αθήνα Συντονιστές Α.Μαυρομμάτης – Ν.Καλτσάς

18. Διάλεξη με θέμα :Επίτευξη Επάρκειας σε εθελοντικό αίμα στα πλαίσια ημερίδας για τα στελέχη των Συλλόγων Εθελοντών Αιμοδοτών μελών της ΠΟΣΕΑ που διοργανώθηκε από το Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Πατρών, Κέντρο Αιμοδοσίας Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών και την Πανελλήνια Ομοσπονδία Συλλόγων Εθελοντών Αιμοδοτών 21-22 Οκτωβρίου 2005, Πάτρα

19. Προεδρείο στη συνεδρία Ελευθέρων Ανακοινώσεων στο πλαίσιο του 6^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Προληπτικής Ιατρικής 26-28 Ιανουαρίου 2006, Αθήνα

20. Διάλεξη με θέμα «Οι τελευταίες οδηγίες της Ε.Ε 2002/98/ΕΚ και η εναρμόνιση της Ελλάδας» στο 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο για την Εθελοντική Αιμοδοσία που οργανώθηκε από την Πανελλήνια Ομοσπονδία Συλλόγων Εθελοντών Αιμοδοτών 12-14 Μαΐου 2006, Τρίπολη

21. Διάλεξη σε δορυφορικό συμπόσιο στα πλαίσια του 4^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα : «Εφαρμογή των Μοριακών Τεχνικών στο Εθνικό Σύστημα Αιμοδοσίας» Συντονιστής: καθηγητής Στ.Χατζηγιάννης Μάιος 2006, Χανιά Κρήτη

22. Προεδρεύων στη Στρογγυλή Τράπεζα με θέμα «Μοριακή Βιολογία στην Αιμοδοσία» στα πλαίσια της 4^{ης} Πανελλήνιας Επιστημονικής Διημερίδας της Πανελλήνιας Ένωσης τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων 24-25 Νοεμβρίου 2006, Αθήνα

23. Διάλεξη στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής στο στρογγυλό τραπέζι με θέμα : «αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα – αντιαιμοπεταλιακή αγωγή» συντονίστρια : κα Ι. Σπηλιωτοπούλου με ομιλία με θέμα «Αναστολείς COX» 25 – 27 Ιανουαρίου 2007, Αθήνα.

24. Διάλεξη στη 6^η διημερίδα Ιογενούς Ηπατίτιδας Β και C της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος σε στρογγυλό τραπέζι με θέμα : «Αναμενόμενες εξελίξεις και προβλήματα για το 2007 και μετά», συντονιστής: Ε. Τσιάνος και Χ. Κατάμης, με ομιλία με

θέμα : «Έλεγχος για HBV και HCV του προς μετάγγιση αίματος και των παραγώγων του με την τεχνολογία πυρηνικών οξέων.» 27 και 28 Ιανουαρίου 2007, Αθήνα

25. Διάλεξη στην Ημερίδα της Αιματολογικής εταιρείας με θέμα : Ποιότητα στην αιμοδοσία με ομιλία με θέμα «Ποιοτικός έλεγχος ορολογικού και μοριακού ελέγχου μονάδων αίματος» 16 Μαρτίου 2007, Αθήνα

26. Διάλεξη στο τριήμερο μνήμης και περισυλλογής που διοργανώθηκε από την Πυροσβεστική Ακαδημία με θέμα : « Εθελοντική Αιμοδοσία- Μια άλλη προσέγγιση» 5 – 7 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα.

27. Προεδρεύων στο δορυφορικό συμπόσιο του 5^ο Πανελλήνιου συνεδρίου Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα: «Νεώτερα δεδομένα στον Μοριακό έλεγχο (NAT) με Real Time PCR- Εμπειρία άλλων χωρών – Νέες παράμετροι». Προσκεκλημένοι ομιλητές : M.A. Vesga, Δ. Μακρή, J. Saldanha. 8-10 Μαΐου 2008, Κέρκυρα

28. Προεδρεύων στο στρογγυλό τραπέζι του 5^ο Πανελλήνιου συνεδρίου Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα: «Βιοεπαγρύπνηση και ασφάλεια της μετάγγισης». Προσκεκλημένοι ομιλητές : H.S.Karlan, M.Γιαννάκου-Πεφτουλίδου, K. Φουντούλη. 8-10 Μαΐου 2008, Κέρκυρα.

29. Προεδρεύων στη συνεδρία προφορικών ανακοινώσεων του 20th International Congress on Thrombosis με θέμα: “Antithrombotic Drugs – Clinical Trials”. 25-28 June 2008, Athens-Greece.

30. Διάλεξη στην ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας-Τμήμα αιμόστασης με θέμα: «Κληρονομική Θρομβοφιλία». 19-20 Σεπτεμβρίου 2008, Κεφαλονιά

31. Διάλεξη στην 22^η Αμφικτιονία Συλλόγων Εθελοντών Αιμοδοτών με θέμα: «Αιμοδότες συγγενικού περιβάλλοντος» 10-12 Οκτωβρίου 2008.Πάτρα

32. Διάλεξη στο 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο με θέμα: «Μαζική Μετάγγιση» 19-22 Νοεμβρίου 2008, Αθήνα.

33. Διάλεξη στην ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας-Τμήμα αιμοδοσίας-αφαίρεσης με θέμα: «Αναπνευστική λειτουργία αιμοσφαιρίνης». 13 Δεκεμβρίου 2008, Αθήνα.

34. Διάλεξη στο 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο προληπτικής Ιατρικής στο πλαίσιο στρογγυλής τράπεζας με θέμα : Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος και συντονίστρια την κα Ι.Σπηλιωτοπούλου με ομιλία με θέμα: Πρόληψη φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου στο χειρουργικό και παθολογικό ασθενή. 22-24 Ιανουαρίου 2009, Αθήνα.
35. Ομιλία στο 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νέων Εθελοντών Αιμοδοτών με θέμα : «Πανελλήνια έρευνα της Π.Ο.Σ.Ε.Α. για την εθελοντική αιμοδοσία στην Ελλάδα. Ποιο είναι το προφίλ των Ελλήνων εθελοντών και πως θα προσελκύσουμε περισσότερους». 12-15 Μαρτίου 2009, Κάρπαθος
36. Διάλεξη στο 6^ο Σεμινάριο Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα : Κλινικά σημαντικά ερυθροκυτταρικά αντισώματα. 13-14 Μαρτίου 2009, Αθήνα
37. Προεδρείο στην Ημερίδα Εθελοντικής Αιμοδοσίας που διοργάνωσε το Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας με θέμα: «Συνεργασία Ε.ΚΕ.Α και Υπηρεσιών Αιμοδοσίας για την εδραίωση της Εθελοντικής Αιμοδοσίας στη χώρα μας» Αθήνα 4 Μαΐου 2009
38. Ομιλία στην Ημερίδα Εθελοντικής Αιμοδοσίας που διοργάνωσε το Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας με θέμα : «Η σημασία της διατήρησης του Εθελοντή αιμοδότη».Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης 4 Μαΐου 2009
39. Προσκεκλημένος ομιλητής του καθηγητή του Umberto Rossi στα πλαίσια του workshop με τίτλο: "Quality control and safety in surgery" με εισήγηση για την χασφαλή χρήση του αίματος στο πλαίσιο της New European Surgical Academy (NESA) Athens, 28-30th May 2009
40. Ομιλία στο συμπόσιο αιμοδοσίας στα πλαίσια του 20^{ου} Πανελλήνιου Αιματολογικού Συνέδριου με θέμα : «Κλιματικές αλλαγές και ιογενείς λοιμώξεις με πιθανή επίπτωση στη μετάγγιση αίματος» 4- 7Νοεμβρίου 2009, Κρήτη
41. Προεδρείο στην ημερίδα που διοργάνωσε το τμήμα αιμόστασης της ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα: «Διάγνωση και θεραπευτική προσέγγιση οξέων αιμορραγικών διαταραχών» 21 Νοεμβρίου 2009, Αθήνα
42. Ομιλία στην 12^η Εθνική Συνάντηση για την αιμοεπαγρύπνηση με θέμα «Πρόοδος στην Αιμοεπαγρύπνηση, Βιοεπαγρύπνηση για ιστούς και κύτταρα. Πανδημία της γρίπης Α

(H1N1) και Αιμοδοσία» με εισήγηση για : «Δάγγειος πυρετός, Λοίμωξη Q και άλλες νεοαναδυόμενες λοιμώξεις» 15 Δεκεμβρίου 2009, Αθήνα

43. Ομιλία στο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο προληπτικής Ιατρικής στα πλαίσια στρογγυλής τράπεζας για την Πρόληψη και αντιμετώπιση αναιμιών με θέμα : Σιδηροπενική αναιμία. 18-20 Φεβρουαρίου 2010, Αθήνα

44. Διάλεξη στο 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας στο στρογγυλό τραπέζι (προεδρεύων Ο.Μαραντίδου-Γ.Μανουσαρίδης) με θέμα: «Ποιότητα παραγώγων αίματος – Πλάσμα». 22-24 Απριλίου 2010, Ιωάννινα

45. Ομιλία στα πλαίσια διαιτηρικής συζήτησης με συντονιστές Καθηγητή Αγγειοχειρουργικής κ.Χ.Λιάπη και κα Γ.Χατζηδημητρίου με θέμα Καρκίνος και θρόμβωση και εισήγηση με θέμα : «Θρομβοεμβολική νόσος σε αιματολογικές κακοήθειες» στο 36^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 4-8 Μαΐου 2010, Αθήνα

46. Ομιλία σε στρογγυλό τραπέζι με θέμα «Ο έλεγχος του μεταγγιζόμενου αίματος» Αναδυόμενα νοσήματα που μεταδίδονται με το αίμα στα πλαίσια του 9^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Κλινικής Χημείας 7-9 Οκτωβρίου 2010, Αθήνα

47. Ομιλία στο πλαίσιο του 21^{ου} Πανελλήνιου Αιματολογικού Συνεδρίου στο τραπέζι με θέμα : Μεταγγισιακές επιπλοκές ερυθροκυτταρικής γήρανσης – Κλινικές επιπτώσεις. Θεσσαλονίκη 10-12 Νοεμβρίου 2010

48. Διάλεξη στο πλαίσιο της ημερίδας του τμήματος Αιμοδοσίας –Αφαίρεσης της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα : Παγκόσμιες προοπτικές και Μέλλον της Αιμοδοσίας, Αθήνα 27 Νοεμβρίου 2010

49. Ομιλία σε στρογγυλή τράπεζα : Θρομβοπενία με συντονίστρια Π.Ρούσσου στο πλαίσιο των εκπαιδευτικών ημερίδων πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας «Γ.Παπαδάκης» με θέμα: Μέτρηση αιμοπεταλίων και παγίδες στην εκτίμηση της θρομβοπενίας. Ζάππειο Μέγαρο-Αθήνα 31 Ιανουαρίου 2011

50. Διάλεξη στα πλαίσια του 7^{ου} Σεμιναρίου Ελληνικής εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας με θέμα : Διαχείριση Εθελοντών Αιμοδοτών 18-19 Μαρτίου 2011

51. Προεδρείο σε στρογγυλή τράπεζα με θέμα : Μετάγγιση πλάσματος: που, πως, πότε και γιατί; Στα πλαίσια του 7^{ου} Σεμιναρίου Ελληνικής εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας Αθήνα 18-19 Μαρτίου 2011
52. Προεδρείο σε δορυφορική διάλεξη με θέμα : First dublex NAT test for Parvovirus B19 and Hepatitis A Virus Increases Safety of Human Plasma and Plasma Products. Προσκεκλημένος Ομιλητής John Saldanha-USA. Στα πλαίσια του 7^{ου} Σεμιναρίου Ελληνικής εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας Αθήνα 18-19 Μαρτίου 2011
53. Διάλεξη στην ημερίδα της Ελληνικής Επιτροπής Αντιμετώπισης της Θρομβοεμβολικής νόσου με θέμα : Ατμοσφαιρική μόλυνση και φλεβική θρόμβωση Π.Γ.Ν ΑΤΤΙΚΟΝ 15 Οκτωβρίου 2011
54. Προεδρείο στο συμπόσιο Νοσηλευτών – Τεχνολόγων Αιμοδοσίας με θέμα : Επίλυση προβλημάτων στο ανοσοαιματολογικό εργαστήριο στο πλαίσιο του 22^{ου} Πανελληνίου Αιματολογικού Συνέδριου Αθήνα 24-26 Νοεμβρίου 2011
55. Ομιλία στο πλαίσιο της ημερίδας του τμήματος αιμόστασης της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας με θέμα : Αναστροφή αποτελέσματος αντιβιταμινών. Αθήνα 17 Δεκεμβρίου 2011
56. Ομιλία σε στρογγυλή τράπεζα της ημερίδας του τμήματος αιμοδοσίας της Ελληνικής Αιματολογικής εταιρείας με θέμα : Λάθος και παρ'ολignon λάθος στην ιατρική των μεταγγίσεων . Αθήνα 18 Δεκεμβρίου 2011
57. Παρουσίαση του On Line συστήματος διαχείρισης αιμοδοτών με σπάνια ερυθροκυτταρικά αντιγόνα στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας Θεσσαλονίκη 3-5 Μαΐου 2012
58. Προεδρείο στη δορυφορική διάλεξη με θέμα : The emergence of West Nile Virus in North America and Europe – J Saldanha (USA) στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας Θεσσαλονίκη 3-5 Μαΐου 2012
59. Προεδρείο στο δορυφορικό συμπόσιο στο 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας Θεσσαλονίκη 3-5 Μαΐου 2012 με θέμα:
- 40 years of hepatitis leadership, the evolution to today's for key markers in blood screening and future trends ομιλητής Dr. H.P Kapprell R&D Manager Abbott Laboratories

- How to improve the efficiency of Blood Transfusion Services ομιλητής DR. J. Jongerius Lab Manager National Screening Laboratory Sanquin, The Netherlands

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΒΙΒΛΙΩΝ

- Συγγραφή βιβλίου με τίτλο : ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΑ Επιδημιολογικά δεδομένα στην Ελλάδα Τ.Μανδαλάκη-Γιαννιτσιώτη, Κ.Σταμούλης . Αθήνα 2000. Σελίδες 32
- Συγγραφή Μονογραφίας με θέμα : Η χρήση της Λευκωματίνης και του Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος .Έκδοση Κρατικού Κέντρου Αιμοδοσίας και Παρασκευής Παραγώγων Αίματος. Αθήνα 1998. Σελίδες 18

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

- Διαταραχές της αιμόστασης στη σήψη στο βιβλίο «ΜΕΘ ΚΑΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ» έκδοση της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας 1999
- Επίκτητες Αιμορραγικές Διαθέσεις στους Υπερήλικες στο βιβλίο «ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΕΣ ΔΙΑΘΕΣΕΙΣ» έκδοση της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας 2000
- ”Παθογένεια αρτηριακής -φλεβικής θρομβώσης” στο βιβλίο “ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ και ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ” Έκδοση της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας 1998;Σελίδες 268-274
- «Νεότεροι μοριακοί θρομβοφιλικό παράγοντες κινδύνου» στο βιβλίο «Νεότερα θεραπευτικά δεδομένα στη θρομβοεμβολική και αιμορραγική νόσο» Έκδοση της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας 2003 ; Σελίδες 7 – 29 .
- Συγγραφή κεφαλαίου στο βιβλίο με τίτλο ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΥΝΗΘΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΓΙΑΤΡΟ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ ΥΓΕΙΑΣ υπεύθυνος έκδοσης Σ.Παππάς τόμοι II σελίδες 866 με θέμα: ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ Αξιολόγηση των ποσοτικών και ποιοτικών ανωμαλιών των εμόρφων στοιχείων του αίματος Κ.Βαλιανάτου, Ν.Λαουτάρης, Σ.Σταθάκης, Κ.Σταμούλης (σελ. 137- 163) 2004.
- Συγγραφή κεφαλαίου στο βιβλίο με τίτλο ΘΕΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ με θέμα «Βασικές Αρχές μεταγγισιοθεραπείας» (σελ 148-168) 2005 Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας Κλινικής Βιοχημείας.

▪ Συγγραφή κεφαλαίου στο βιβλίο με τίτλο ANTIMETΩΠΙΣΗ ΣΥΝΗΘΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΙΑΤΡΟ ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ ΥΓΕΙΑΣ υπεύθυνος έκδοσης Σ.Παππάς τόμοι II σελίδες 632 με θέμα: Μέτρηση αιμοπεταλίων και παγίδες στην εκτίμηση της θρομβοπενίας (σελ. 191- 204) 2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ :

1. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα υπό την εποπτεία της Αμ. Επικ. Καθ. Τ. Μανδαλάκη Δ/ντριας του 2^ο Περιφεριακού κέντρου αιμοδοσίας και του Κέντρου Αιμορροφιλικών , με θέμα: “Coping with physical illness with a particular focus on blood discrasias”

2. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα υπό την εποπτεία της Αμ. Επικ. Καθ. Τ. Μανδαλάκη Δ/ντριας του 2^ο Περιφεριακού κέντρου αιμοδοσίας και του Κέντρου Αιμορροφιλικών , με θέμα: “European study on the socioeconomic aspects of hemophilia care ”

3. Εκπόνηση ερευνητικού προγράμματος με θέμα : “Επιδημιολογική μελέτη της IgA ανεπάρκειας στην Ελλάδα. Δημιουργία δεξαμενής παραγώγων αίματος από δότες με IgA ανεπάρκεια»

Ερευνητικό κέντρο: Κρατικό Κέντρο Αιμοδοσίας και Παρασκευής Παραγώγων Αίματος
Συνεργαζόμενα εργαστήρια : Τμ. Ανοσολογίας Γ.Κ.Α. Δ/ντρια Κ.Σταυροπούλου –Γκικόκα

4. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα 2003 της Β Καρδιολογικής κλινικής του Γ.Κ.Νίκαιας, με θέμα : « Επίδραση στατινών σε αιμοστατικούς δείκτες μετά από τρίμηνη χορήγηση σε δυσλιπιδαιμικούς μη στεφανιαίους ασθενείς» Επιστημονικός υπεύθυνος : Λουκιανός Ραλλίδης Επιμ.Α , Β Καρδιολογικής Κλινικής Γ.Κ.Νίκαιας

5. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα 2003 της Β Καρδιολογικής κλινικής του Γ.Κ.Νίκαιας, με θέμα : « Προγνωστική αξία αιμοστατικών δεικτών όσον αφορά την επαναστένωση σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική καρωτίδων» Επιστημονικός υπεύθυνος : Λουκιανός Ραλλίδης Επιμ.Α , Β Καρδιολογικής Κλινικής Γ.Κ.Νίκαιας

6. Συμμετοχή από το 2004 μέχρι σήμερα στο ερευνητικό πρόγραμμα του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών – Τμήμα Βιολογίας – Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής με θέμα : «Κυτταροβιολογική μελέτη των συμπυκνωμένων ερυθρών

αιμοσφαιρίων που προορίζονται για μετάγγιση στα αντιπηκτικά CPDA-1 CPD/SAGM με την παρουσία ή την απουσία των λευκών αιμοσφαιρίων». Επιστημονικός υπεύθυνος : Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ισιδώρα Σ.Παπασιδέρη

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ :

1. **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης** : «Η Εισαγωγή της NAT τεχνολογίας σε δεξαμενές πλάσματος για τον έλεγχο του ιού της ηπατίτιδας C». Λ.Φουντουλάκη, Ε.Σεραφή, Κ.Ε.Σταμούλης, Α.Μαροπούλου, Α.Κουρεντή, Α.Λυράκης, Κ.Σωφρονιάδου. 12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο . Αθήνα 22-25 Νοεμβρίου 2001
2. **Βραβείο Προφορικής ανακοίνωσης εις Μνήμην Α. Παπαγιάννη** : «Μελέτη Du με κλασσική και με πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδο (Autovue) .Ταυτοποίηση φαινοτύπου Du». Β. Φακίτσα, Χ. Λεκατσά, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου, Κ. Σταμούλης, Σ. Γιαννουλέα, Π. Καρυδά, Κ. Σωφρονιάδου. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνική Εταιρεία Μεταγγισιοθεραπείας. Πάτρα 18 – 20 Απριλίου 2002.
3. **Βραβείο καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης** : «Πολυετής εμπειρία εφαρμογής μοριακού ελέγχου μονάδων αίματος. Πρώτη περίπτωση αιμοδότη κατά την περίοδο του παραθύρου». Κ.Σταμούλης, Ε.Σεραφή, Ι.Δαμαλίτη, Μ.Μαμασούλα, Μ.Αφεντάκη, Π.Τσαχουρίδου, Α.Κουρουπάκη, Β.Ζευγώλης, Ε.Οικονόμου . 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας 14-16 Οκτωβρίου 2004 Λουτράκι
4. **Επιλεγμένη Προφορική Ανακοίνωση Επάθλου «Αρκάγαθος Γούτας»** «Αλλοιώσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ερυθροκύτταρα αποθηκευμένα σε CPDA» . Α.Κριεμπάρδης, Μ.Αντωνέλου, Κ.Σταμούλης, Ε.Οικονόμου. στα πλαίσια του 16^{ου} Πανελλήνιου Αιματολογικού Συνεδρίου 16-19 Νοεμβρίου 2005 Θεσσαλονίκη
5. **Βραβείο καλύτερης εργασίας στη θεματική ενότητα της αιμοδοσίας** : «Η πρωτεϊνική έκφραση στα ερυθροκυτταρικά μικορκυστίδια που σχηματίζονται κατά την αποθήκευση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων». Α. Κριεμπάρδης, Μ. Αντωνέλου, Κ. Σταμούλης, Ε.Οικονόμου-Petersen, Λ. Μαργαρίτης, Ι. Παπασιδέρη. 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 17 Νοεμβρίου 2007, Θεσσαλονίκη.

- 6. Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης :** «Παθολογικές τροποποιήσεις της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση μηχανισμών κυτταρικής σηματοδότησης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης». Κριεμπάρδης Α, Αντωνέλου Μ, Σταμούλης Κ, Οικονόμου-Petersen Ε, Μαργαρίτης Λ, Παπασιδέρη. 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 19-22 Νοεμβρίου 2008, Αθήνα.
- 7. Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης :** «Συγκριτική μελέτη της γήρανσης των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση». Αντωνέλου Μ, Κριεμπάρδης Α, Σταμούλης Κ, Οικονόμου-Petersen Ε, Μαργαρίτης Λ, Παπασιδέρη Ι. 20^ο Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο. 4 - 7 Νοεμβρίου 2009, Κρήτη.
- 8. Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης :** «Secretory apolipoprotein J/Clusterin is an integral component of human erythrocytes and a novel biomarker of vesiculation and senescence in vivo and in stored red cells. Antonelou Η Marianna, Kriebardis G Anastasios, Stamoulis Ε Konstantinos, Margaritis Η Lukas, Trougakos Ioannis, Papassideri S Issidora.» XXXIst International Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Belin, Germany 26 June – 1 July, 2010
- 9. Έπαθλο «Αρκάγαθος Γούτας»** για την εργασία με τίτλο «Ερυθροκυτταρική κλαστερίνη: Ένας νέος μοριακός βιοδείκτης κυτταρικού στρες και γήρανσης». Αντωνέλου Μ, Κριεμπάρδης Α, Σταμούλης Κ, Τρουγκάκος Ι, Παπασιδέρη Ι. Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία 2011

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ :

- Μέλος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας .
- Μέλος τμήματος Αιμοδοσίας-Αφαίρεσης (πρόεδρος) της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας
- Μέλος Δ.Σ. (γραμματέας) της Ελληνικής Εταιρείας Μεταγγισιοθεραπείας
- Μέλος του Δ.Σ (ταμίας) της εταιρείας αντιμετώπισης Θρομβοεμβολικής Νόσου
- Μέλος της “Mediterranean League against thromboembolic diseases”
- Μέλος της International Society for Thrombosis and Haemostasis (ISTH)
- Μέλος της American Association of Blood Banks (AABB)

Περίληψη

Το γεγονός ότι η θρομβοεμβολική νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στη συνεχή αναζήτηση οποιασδήποτε αιτίας μπορεί να παρεμβαίνει στον αιμοστατικό μηχανισμό ιδιαίτερα στην ρύθμιση του μηχανισμού της πήξης προκειμένου να εντοπίσει νέους προθρομβωτικούς παράγοντες.

Πρόσφατες μελέτες ανακάλυψαν το σύστημα της πρωτεΐνης Z/ZPI. In vitro μελέτες υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο του συστήματος PZ/ZPI στη ρύθμιση του αιμοστατικού μηχανισμού, υποδηλώνοντας ισχυρή αντιπηκτική δράση, ρυθμίζοντας κατά παράδοξο τρόπο τόσο τη δράση του συστήματος της δεκάσης όσο και αυτή της προθρομβινάσης. Πραγματικά η ZPI αναστέλλει τους ενεργοποιημένους παράγοντες FXa, FXIa και FIIa μέσω διαφορετικών οδών, που δεν ακολουθούν απαραίτητα τις τυπικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεασών της σερπίνης.

Επιπλέον δεν έχει αποκλειστεί η ανεξάρτητη και αυτόνομη δράση της πρωτεΐνης Z, ενώ μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδηλώνουν ότι ανεπάρκειες της σερπίνης ή του συμπαράγοντα της μπορεί να έχουν προθρομβωτική δράση. Μελέτες αναφορικά με τον ρόλο της πρωτεΐνης Z στην πρόκληση θρομβωτικών επιπλοκών είναι αντικρουόμενες. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι μελέτες των Vasse et al και των Heeb et al. συσχετίζουν τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Z με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων ενώ αντίθετα μελέτες των Kobelt και συνεργατών συσχετίζουν τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z. Σε αντίθεση και με τους δύο ερευνητές έρχονται οι μελέτες των Loraciuk και McQuillan οι οποίοι δεν βρίσκουν καμιά συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης Z και του κινδύνου εμφάνισης ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών.

Σε αυτό που συμφωνούν όλοι οι ερευνητές είναι στο γεγονός ότι ο παθοφυσιολογικός ρόλος του συστήματος PZ/ZPI στους ανθρώπους δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Δύο μεταλλάξεις του γονιδίου της ZPI έχουν ενοχοποιηθεί για την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης, όμως αυτό δεν επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες. Παρόμοια δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως η συσχέτιση της έλλειψης PZ με την εμφάνιση θρόμβωσης, όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσχέτιση της με άλλους παράγοντες θρομβοφιλίας ενδεχομένως αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης. Συγκρινόμενη με άλλα αντιπηκτικά συστήματα ο ρόλος του συμπλέγματος PZ/ZPI φαίνεται να προσομοιάζει με αυτόν του συμπαράγοντα II της ηπαρίνης και λιγότερο με αυτόν της αντιθρομβίνης.

Η δική μας προσπάθεια μάλλον θα μπορούσαμε να πούμε ότι έρχεται να υποστηρίξει την πλευρά των ερευνητών που συσχετίζουν την εμφάνιση θρομβωτικών επιπλοκών με αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης Z. Με δεδομένα τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας αναφορικά με τον ακριβή ρόλο και τη συμμετοχή του συμπλέγματος PZ/ZPI στο φαινόμενο της θρόμβωσης πιθανή επέκταση της έρευνας στην κατεύθυνση μελέτης ενδεχομένων μεταλλάξεων ή/και πολυμορφισμών του συμπλέγματος PZ/ZPI να μπορούσε να δώσει μία αξιόπιστη ερμηνεία των ευρημάτων. Πάντως είναι σίγουρο ότι θα χρειαστούν νέες και μεγαλύτερες μελέτες προκειμένου να αποδειχθεί ο ακριβής ρόλος του συμπλέγματος PZ/ZPI καθώς και η πιθανή συμμετοχή του στην εμφάνιση θρομβωτικών επιπλοκών.

Abstract

A new anticoagulant system involving a serpin has been recently characterized. The protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) system inhibits activated factors X, XI and IX by different mechanisms. By homology with other anticoagulant systems (antithrombin or the protein C/protein S), deficiency of the serpin (ZPI) or its cofactor (PZ) might imbalance the haemostatic system with thrombotic consequences. Evidence supports the *in vivo* anticoagulant role of this complex and the thrombotic consequences of its deficiency. Non-sense variations of the ZPI (W303X and R67X) have been associated with increased risk of venous thrombosis. Moreover, PZ deficient mice carrying the FV Leiden have a thrombotic phenotype. Finally, some reports suggest that PZ deficiency might increase the risk of thrombosis. However, other studies question the thrombotic relevance of both ZPI and PZ deficiencies and there is still insufficient evidence with regard to protein Z levels and thrombotic events

Although protein Z was characterized already in the 1980s, its role in normal and pathologic coagulation is still somewhat controversial. This system could play a redundant role in haemostasis that explains the conflicting results on its thrombotic potential, which might be exacerbated in combination with other prothrombotic factors.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μηχανισμός της αιμόστασης

Η αιμόσταση είναι ένας αμυντικός μηχανισμός του οργανισμού που αποσκοπεί στον έλεγχο της αιμορραγίας μετά τον τραυματισμό ενός αγγείου και επομένως στη μη απώλεια αίματος ενός ιστού-οργάνου ιδιαίτερα σημαντικού για τη διατήρηση της ζωής. Με τον όρο αιμόσταση εννοούμε σήμερα έναν πολύπλοκο μηχανισμό αλληλοδιάδοχων και αλληλοενεργοποιούμενων αντιδράσεων μεταξύ διαφόρων παραγόντων, κυτταρικών (ενδοθηλίο- έμμορφα στοιχεία του αίματος), ιστικών (από το αγγειακό τοίχωμα και τους ιστούς) και τέλος πρωτεϊνών του πλάσματος.

Η κλασσική διάκριση σε αρχική αιμόσταση, πήξη και ινωδόλυση έχει σήμερα μόνο διδακτική σημασία, γιατί είναι γνωστό πως οι τρεις αυτοί μηχανισμοί εξελίσσονται ταυτόχρονα και εμφανίζουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις .

1.1. Ο μηχανισμός της αρχικής αιμόστασης

Σαν αρχική αιμόσταση περιγράφονται τα φαινόμενα από τη χρονική στιγμή της βλάβης του αγγείου μέχρι το σχηματισμό του πρώτου αιμοπεταλιακού θρόμβου. Κύριοι πρωταγωνιστές σε αυτή τη φάση είναι τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και το υπενδοθήλιο.

1.1.1. Δομή των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα με την ευρεία έννοια του όρου, παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα υπο την επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων, κυρίως όμως της θρομβοποιητίνης. Η δομή των αιμοπεταλίων χαρακτηρίζεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, που έχει κλασσική κατασκευή αποτελούμενη από δύο στρώματα λιπιδίων με ενσωματωμένα πρωτεϊνικά μόρια. Ο ενδοπλασματικός χώρος χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφόρων έγκλειστων (α, δ, λυσοσωμάτια), μικροινιδίων, μιτοχονδρίων καθώς και ενός σύνθετου σωληναριακού συστήματος, που φέρνει σε επικοινωνία το εσωτερικό του κυττάρου με την εξωτερική μεμβράνη. Βασικά στοιχεία στη δομή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων αποτελούν τα γλυκοπρωτεϊνικά μόρια που είναι ενσωματωμένα σε αυτήν. Οι γλυκοπρωτεΐνες σε διάφορους συνδυασμούς σχηματίζουν συμπλέγματα που λειτουργούν σαν υποδοχείς προσδεμάτων από το περιβάλλον των αιμοπεταλίων (1, 2). Η σύνδεση υποδοχέα-προσδέματος αποτελεί φαινόμενο που οδηγεί είτε στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου είτε στη σύνδεση του με άλλα αιμοπετάλια, με ενδοθηλιακά ή άλλα κύτταρα, και με την

υπενδοθηλιακή στιβάδα (3). Η ονοματολογία των γλυκοπρωτεϊνών δεν είναι ακόμα ομοιογενής. Η περιγραφή φυσικοχημικών ιδιοτήτων, η χρονολογική σειρά της ανακάλυψης τους καθώς και τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά είχαν σαν αποτέλεσμα ένας υποδοχέας να είναι γνωστός με πολλά ονόματα (3). Στον πίνακα 1 παρατίθενται οι κυριότεροι υποδοχείς μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και οι υποδοχείς ενεργοποιητών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων.

Υποδοχέας	Σύντμηση	Αριθμός/αιμοπ.	Πρόσδεμα
Ινωδογόνου	GPIIb/IIIa, $\alpha_{IIb}\beta_3$	80000	Fg, Fn, vWF, Vn, Tsp
VWF	GPIb/IV/IX	25000	vWF
Κολλαγόνου	GPIa/IIa	1000-5000	Κολλαγόνο, VLA-2
	GPIV, GPVI	12000, 1000	$\alpha_2\beta_2$
Φιμπρονεκτίνης	GPIc/IIa, $\alpha_5\beta_1$, VLA-5	1000-2000	Fn
Βιτρονεκτίνη	$\alpha_v\beta_3$	50-100	Vn, Fg, vWF, Fn, Tsp, Osteopontin
Λαμινίνης	GPIc/IIa, $\alpha_6\beta_1$, VLA-6	1000	Laminin
ADP		100000	ADP
Θρομβίνης	PAR-I, PAR-3		Θρομβίνη, TRAP
Θρομβοξάνης		2500	TXA2
Αδρεναλίνης	α_2 -receptor	270	Αδρεναλίνη
	β -receptor	25	
Σεροτονίνης	S2-receptor		Σεροτονίνη
PAF		1100	PAF

Πίνακας 1: Οι κυριότεροι υποδοχείς μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και ενεργοποιητών λειτουργίας στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων

Οι λειτουργίες των γλυκοπρωτεϊνικών μορίων της μεμβράνης συνοψίζονται ως εξής :

α) αποτελούν υποδοχείς μορίων κυτταρικής πρόσφυσης, β) αποτελούν υποδοχείς ενεργοποιητών ή ανταγωνιστών της λειτουργίας των αιμοπεταλίων γ) συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της συμμετρίας της μεμβράνης, δ) συμβάλλουν ενεργά στη μετάδοση διεγέρσεων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου ε) χρησιμεύουν σαν οδηγοί

για την αποδομή των αιμοπεταλίων στ) συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, ουδετερόφιλα, καρκινικά κύτταρα, μικρόβια (4). Οι σπουδαιότεροι υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων θεωρούνται ο υποδοχέας του ινωδογόνου (GPIIb/IIIa ή $\alpha_{IIb}\beta_3$), ο υποδοχέας του παράγοντα Willebrand (GPIb/V/IX), οι υποδοχείς του κολλαγόνου (GPIa,IIa, GPIV, GPVI) και ο υποδοχέας της θρομβίνης (PAR-1 και PAR-3)

1.1.2. Λειτουργία των αιμοπεταλίων

Αρχές της υδροδυναμικής επιβάλλουν στα αιμοπετάλια σαν ελαφρότερα κύτταρα να κυκλοφορούν στα εξωτερικά στρώματα του ρεύματος ροής, πολύ κοντά στα τοιχώματα των αγγείων, πράγμα που υποβοηθά σημαντικά την λειτουργία τους. Στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το περιβάλλον τους διακρίνουμε τρεις μορφές αντιδράσεων :

α) αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και υπενδοθηλίου : η υπενδοθηλιακή εξωκυττάρια ουσία είναι πλούσια σε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως φμπρονεκτίνη, λαμινίνη, κολλαγόνο I και III και κατά τόπους παράγοντα Willebrand. Μετά από μια περιορισμένη ή εκτεταμένη βλάβη του τοιχώματος του αγγείου που έχει σαν αποτέλεσμα την αποκάλυψη των υπενδοθηλιακών στιβάδων, το αιμοπετάλιο χωρίς ακόμα να ενεργοποιηθεί είναι σε θέση να προσκολληθεί στη φμπρονεκτίνη και λαμινίνη με αντίστοιχους υποδοχείς της μεμβράνης του. Αυτή η ήρεμη αρχικά προσκόλληση το φέρνει σε άμεση επαφή με το κολλαγόνο το οποίο διεγείρει τους ειδικούς υποδοχείς του επάνω στο αιμοπετάλιο. Οι υψηλές ταχύτητες ροής (shear rates) μπορούν να οδηγήσουν σε ταχεία και απευθείας προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο ή τον παράγοντα Willebrand. Η διέγερση αυτή εκκλύει μια σειρά αντιδράσεων (outside-in signaling) που παίρνει εκρηκτικές διαστάσεις και καταλήγει στην πλήρη ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου με την αντίδραση απελευθέρωσης. Η μετάδοση της διέγερσης αυτής έχει δύο κατευθύνσεις. Πρώτα διεγείρεται ένα σύστημα πρωτεϊνών που βρίσκονται αμέσως κάτω από την μεμβράνη, οι οποίες φωσφορυλιώνονται και διεγείρουν αντίστροφα από μέσα (inside-out signaling) άλλους σημαντικούς υποδοχείς όπως GPIIb/IIIa και Ib/V/IX. Οι τελευταίοι προσκολλώνται σε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης τόσο του υπενδοθηλίου όσο και του πλάσματος εφόσον αποτελούν φυσικό πρόσδεμα τους (3). Έτσι π.χ εκτός από το κολλαγόνο οι νέοι εμφανισθέντες υποδοχείς μπορούν να προσκολληθούν σε μόρια παράγοντα Willebrand ή σε νέα μόρια φμπρονεκτίνης και έτσι να ισχυροποιηθεί σημαντικά η πρόσφυση του αιμοπεταλίου στην υπενδοθηλιακή στιβάδα. Παράλληλα με αυτή την ενεργοποίηση ένα άλλο φαινόμενο που εξελίσσεται ραγδαία είναι η αντίδραση

απελευθέρωσης (release reaction). Η φωσφορυλίωση που αναφέραμε προηγουμένως οδηγεί και σε μαζική μετακίνηση ιόντων Ca στο σωληναριακό σύστημα με αποτέλεσμα την απότομη συστολή των συσταλών πρωτεϊνών αυτού του συστήματος. Αυτή η σύσπαση αλλάζει θεαματικά την γεωμετρία του αιμοπεταλίου, που τώρα μοιάζει με ακτινωτή σφαίρα, και προκαλεί εξώθηση του περιεχομένου των εγκλείστων προς την πλασματική επιφάνεια. Αυτό μεγιστοποιεί την ενεργοποίηση ίδιων υποδοχέων αλλά και άλλων αιμοπεταλίων καθόσον τα εγκλείστα εν μέρει περιέχουν καθαρούς ενεργοποιητές (ADP, σεροτονίνη, θρομβοξάνη). Ταυτόχρονα η μετακίνηση ιόντων και ενέργειας στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου προκαλεί και μια αναστροφή (flip-flop) των λιπιδίων της μεμβράνης φέρνοντας στην εξωτερική επιφάνεια του αιμοπεταλίου ενεργά φωσφολιπίδια (φωσφατιδυλοσερίνη) που είναι απαραίτητα για την εξέλιξη των αντιδράσεων των παραγόντων πήξης του αίματος. Έτσι το αιμοπετάλιο προσφέρει μια επιφάνεια όπου με ευκολία ενεργοποιούνται οι παράγοντες πήξεως και σχηματίζονται τα πρώτα ίχνη θρομβίνης, η οποία εκτός των άλλων είναι και ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων. Η αντίδραση απελευθέρωσης συμβάλλει ενεργά σε αυτό γιατί απελευθερώνει παράγοντα V και X που βρίσκονται αποθηκευμένοι στα εγκλείστα. Εκτός από το υπενδοθήλιο επιφάνειες που είναι πλούσιες σε ακινητοποιημένο ινωδογόνο, ινική ή παράγοντα Willebrand, όπως π.χ. θρόμβοι ή κύτταρα με εναποθέσεις ινικής, προκαλούν αυτόματη πρόσφυση αιμοπεταλίων ενώ είναι γνωστό ότι σε υγρή φάση τα ίδια μόρια δεν προσκολλώνται στους αντίστοιχους τους υποδοχείς χωρίς προηγούμενη ενεργοποίηση. Για την σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη η υψηλή ταχύτητα ροής των αιμοπεταλίων.

β) αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με αιμοπετάλια : Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια βρισκόμενα σε απόσταση επαφής ενώνονται μεταξύ τους μέσω κοινών μορίων κυτταρικής πρόσφυσης όπως το ινωδογόνο, ο παράγοντας Willebrand, η βιτρονεκτίνη και η φιβρονεκτίνη, τα οποία χρησιμεύουν σαν συνδετικοί κρίκοι. Το μεγαλύτερο ρόλο στη συγκόλληση αιμοπεταλίων με αιμοπετάλια παίζει το ινωδογόνο γιατί ο υποδοχέας του είναι ο πολυπληθέστερος στην επιφάνεια με 80000-100000 συμπλέγματα ανά αιμοπετάλιο. Η ενεργός περιοχή σύνδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα του θεωρείται ότι είναι η γνωστή αλληλουχία αμινοξέων της Αα αλύσου RGD (Arg-Gly-Asp) . Πρόσφατα όμως αποδείχθηκε ότι βασικότερο ρόλο παίζει ένα δωδεκαπεπτίδιο στο καρβοξυτελικό άκρο της γ-αλύσου και οι RGD θέσεις είναι δευτερεύουσας σημασίας. Ο υποδοχέας του ινωδογόνου (GPIIb/IIIa) αποδείχτηκε ο πιο σπουδαίος υποδοχέας από πλευράς λειτουργικότητας, γιατί οι περισσότεροι δρόμοι ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (ADP, σεροτονίνη, κολλαγόνο, επινεφρίνη, θρομβίνη, θρομβοξάνη) καταλήγουν σε

ενεργοποίηση του (3). Ο υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια των ιντεγκρινών και είναι ετεροδιμερές μόριο αποτελούμενο από α και β άλυσσο. Η ενεργός περιοχή σύνδεσης του με το πρόσδεμα δέχεται την αλληλουχία αμινοξέων RGD. Για αυτό και έχει πλέον του ενός προσδέματα καθότι το τριπεπτίδιο RGD υπάρχει σε όλα αυτά τα μόρια (ινωδογόνο, φιμπρονεκτίνη, παράγοντας Willebrand, βιτρονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη). Έτσι ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πρόσφυση, στην έκπτυξη και στη συγκόλληση ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και στην μετάδοση διεγέρσεων μέσω της μεμβράνης.

γ) αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με ενδοθηλιακά κύτταρα : Τα άθικτα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν τη φυσιολογική προστασία του τοιχώματος των αγγείων όσον αφορά στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αιμόστασης. Ούτε τα αιμοπετάλια ούτε οι μηχανισμοί της πήξης μπορούν να ενεργοποιηθούν σε αυτήν την επιφάνεια υπο φυσιολογικές συνθήκες. Η παρατήρηση ότι μερικές φορές ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή και σε κατάσταση ηρεμίας ακόμη μπορούν να προσκολληθούν σε φαινομενικά άθικτα ενδοθηλιακά κύτταρα οδήγησε στη γνώση ότι η πρόσφυση αυτή οφείλεται σε αλληλεπίδραση υποδοχέων και προσδεμάτων που εμφανίζονται μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εάν ενεργοποιηθούν π.χ. με θρομβίνη ή με TNF εμφανίζουν στην επιφάνεια τους μια σειρά από υποδοχείς μορίων πρόσφυσης τους ICAM-1, VCAM-1, P και E-Selectin, PECAM-1 καθώς και την ιντεγκρίνη $\alpha\beta_3$ (6). Οι υποδοχείς αυτοί μπορεί να συνδεθούν με προσδέματα που είτε είναι κοινά για άλλους υποδοχείς των αιμοπεταλίων είτε βρίσκονται ήδη στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Στην μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων υπάρχει το πρόσδεμα (CD40L) του υποδοχέα CD40 που μέχρι σχετικά πρόσφατα πιστευόταν ότι βρίσκεται μόνο στα Τα-λεμφοκύτταρα. Η σύζευξη CD40-CD40L αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για το ενδοθηλιακό κύτταρο να συνθέσει και να εμφανίσει στην επιφάνεια του ιστικό παράγοντα καθώς και υποδοχείς μορίων κυτταρικής πρόσφυσης με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της προσκόλλησης όχι μόνο αιμοπεταλίων αλλά και λευκών αιμοσφαιρίων στην ενδοθηλιακή στιβάδα του τοιχώματος των αγγείων (4).

1.1.3. Μηχανισμοί αυτοελέγχου

Στη αιμόσταση είναι γνωστοί οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί των αντιδράσεων ενεργοποίησης της πήξης και ινωδολύσης. Για την αρχική αιμόσταση δεν είχαν περιγραφεί αντίστοιχες προστατευτικές λειτουργίες, όπως π.χ. ο αυτοπεριορισμός της επέκτασης του αιμοπεταλιακού θρόμβου πέραν της περιοχής της αρχικής

ενεργοποίησης. Η διερεύνηση της λειτουργίας των υποδοχέων της μεμβράνης επέτρεψε την περιγραφή τριών μηχανισμών σαν βάσιμες υποθέσεις για την εξήγηση αυτού του αυτοέλεγχου (5) : α) το φαινόμενο της συνεχούς διακίνησης των υποδοχέων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου(outside-in trafficking) μειώνει τον αριθμό των ενεργοποιημένων υποδοχέων στην εξωτερική επιφάνεια του αιμοπεταλίου, β) το φαινόμενο της σημαντικής ελάττωσης των υποδοχέων ινωδογόνου στην ελεύθερη επιφάνεια του αιμοπεταλίου όταν αυτό προσκολληθεί σε υπόστρωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ινωδογόνο ή ινική, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της πρόσφυσης επιπλέον αιμοπεταλίων στην επιφάνεια των πρώτων και γ) η ανακάλυψη μιας εκτο-ADP-άσης στην επιφάνεια των φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία εξουδετερώνει το ADP που προέρχεται από την τοπική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, επιβραδύνοντας έτσι δυνητικά την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση περισσότερων αιμοπεταλίων.

1.1.4. Παθοφυσιολογία της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

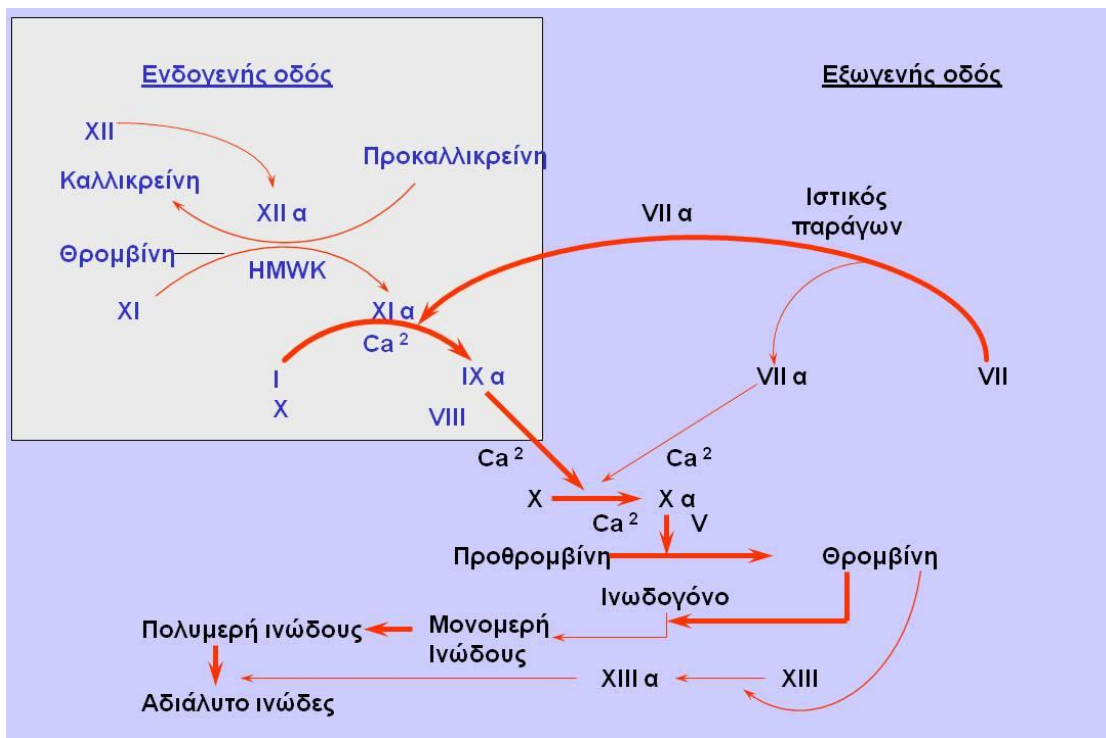
Πρωτοπαθείς βλάβες των υποδοχέων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων εκδηλώνονται κλινικά σαν ήπιες ή βαριές αιμορραγικές διαθέσεις με αιμορραγίες στους βλενογόνους και στο δέρμα. Είναι γνωστές σαν θρομβοπάθειες , κυριότερες των οποίων είναι η θρομβασθένεια Glanzmann (έλλειψη ή δυσλειτουργία του GPIIb/IIIa) και η θρομβοπάθεια Bernard-Soulier (GPIb/V/IX). Βλάβες άλλων υποδοχέων όπως GPIa/IIa GPIV, GPVI εκδηλώνονται πολύ ήπια και συχνά γίνονται αντιληπτές μόνο όταν συνυπάρχουν και άλλες κυρίως επίκτητες διαταραχές της αιμόστασης. Η ίδια αλληλεπίδραση υποδοχέων και μορίων πρόσφυσης κάτω από διαφορετικές συνθήκες μπορεί να έχει συχνά βλαπτικές συνέπειες. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των αποφρακτικών αρτηριοπαθειών παίζουν η πρόσφυση αιμοπεταλίων και η ενσωμάτωση θρόμβου στο σημείο της βλάβης (5). Η ανακάλυψη ιστικού παράγοντα μέσα στην αθηρωματική πλάκα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πήξης και σχηματισμό θρομβίνης και η διήθηση της πλάκας από παράγοντα Willebrand διευκολύνουν την ενεργοποίηση και εναπόθεση αιμοπεταλίων επάνω στην πλάκα και στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Παράγωγα αυτής της ενεργοποίησης όπως το ADP ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων και η θρομβίνη διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών. Τα αιμοπετάλια παράλληλα ενεργοποιούν το ενδοθήλιο στο οποίο προσκολλώνται ευκολότερα μονοπύρρηνα κύτταρα και μακροφάγα, τα οποία με τη σειρά τους επιδεινώνουν την τοπική φλεγμονώδη αντίδραση με παραγωγή κυτοκινών και αποτέλεσμα την προαγωγή της αρτηριοσκληρόνωσης και την στένωσης του αγγείου με τις γνωστές συνέπειες.

1.2. Ο μηχανισμός της πήξεως του αίματος

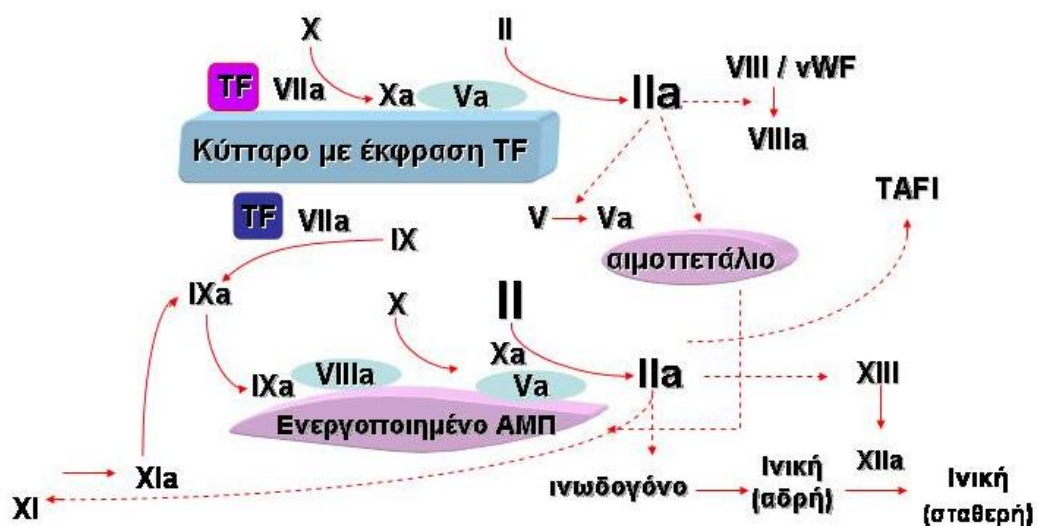
1.2.1 Κλασσικό και Κυτταρικό Μοντέλο της πήξης

Ο μηχανισμός της πήξεως του αίματος περιλαμβάνει ένα σύνολο αλληλοδιάδοχων ενεργοποιήσεων των πρωτεϊνών του πλάσματος (παράγοντες πήξεως), οι οποίες με το σχηματισμό ενζυμικών συμπλεγμάτων οδηγούν στην παραγωγή θρομβίνης και σχηματισμό ινικής. Η πήξη του αίματος ως ενιαίο φαινόμενο αυτοελέγχεται από την παρουσία των φυσικών ανασταλτών της, από τον αυτοκαταλυτικό ρόλο της θρομβίνης που περιορίζει την υπέρμετρη παραγωγή της και από την ικανότητα κάθαρσης των ενεργοποιημένων παραγόντων της πήξης από το ήπαρ (8). Μία από τις πρώτες υποθέσεις για την έναρξη του μηχανισμού της πήξεως του αίματος , ως μια σειρά αλληλοδιάδοχων αντιδράσεων με πρωτεΐνες του πλάσματος δημοσιεύθηκε το 1962 από τους Ratnoff και Davie. Ωστόσο η βιοχημική και φυσιολογική σημασία των αντιδράσεων αυτών παρέμεινε κατά μέγα μέρος ασαφής, διότι ήταν δύσκολο να απομονωθούν οι παράγοντες αυτοί σε καθαρή μορφή και να μελετηθούν οι ιδιότητες τους. Το 1964 ο MacFarlane πρότεινε πιο λεπτομερείς ερμηνείες για τους μηχανισμούς της πήξεως του αίματος (9). Στις ερμηνείες αυτές η δημιουργία του ινώδους προκύπτει από μία σειρά αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν πρωτεΐνες του πλάσματος. Την εποχή εκείνη εθεωρείτο ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες εκτός από το ινωδογόνο μετατρέπονται σε ένζυμα (10, 11). Σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι μερικές από τις πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως συμπαράγοντες αν και χρειάζονται ενεργοποίηση με μικρού βαθμού πρωτεόλυση. Έτσι η φυσιολογική αιμόσταση θεωρείται ότι εξελίσσεται σαν μία σειρά αλληλοδιάδοχων αντιδράσεων που διέπονται από αυτοκαταλυτικούς μηχανισμούς και μηχανισμούς ανάδρασης (feed-back), ενεργοποιείται από τη βλάβη του ενδοθηλίου και την επαφή του αίματος με τους υπενδοθηλιακούς ιστούς και εξισορροπείται από τη δράση ανασταλτικών μηχανισμών που και αυτοί υπόκεινται στους ίδιους αυτοκαταλυτικούς μηχανισμούς (13).

Μηχανισμός Αιμόστασης – Κλαστικό Μοντέλο



Μηχανισμός Αιμόστασης – Κυτταρικό Μοντέλο



Hoffman et al. Blood Coagul Fibrinolysis 1998;9(suppl 1):S61.

Η έναρξη της πήξης του αίματος πραγματοποιείται όταν ο TF εκτίθεται σε ίχνη ενεργοποιημένου παράγοντα VII (FVIIa) που ήδη κυκλοφορεί στο αίμα γεγονός που εμφανίζεται ως συνέπεια ενδοθηλιακής ενεργοποίησης, συστηματικής φλεγμονής (πχ. ενδοτοξιναιμία, σηψαιμία) ή τοπικής θρομβωτικής ενεργοποίησης των κυττάρων που εκφράζουν TF στο αγγειακό δίκτυο (7, 14). Το παραγόμενο σύμπλοκο FVIIa /TF, δηλαδή ο εξωγενής παράγοντας Xase (πρωτεΐνωση σερίνης), ενεργοποιεί τους εξαρτώμενους από τη βιταμίνη K ζυμογόνους παράγοντες IX (FIX) και X (FX). Οι μικρές ποσότητες του ενεργοποιημένου FX (FXa) μπορούν να παράγουν μικροποσότητες (pmol) θρομβίνης από προθρομβίνη, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, με συνέπεια την έκθεση ανιονικών φωσφολιπιδίων στην επιφάνειά τους, και μετατρέπει τους συμπαράγοντες FV και FVIII που βρίσκονται σε ανενεργό μορφή, σε ενεργοποιημένο παράγοντα V (Va) και VIII (VIIIa), αντίστοιχα (12). Στη συνέχεια ο ενεργοποιημένος παράγοντας VIII συνδέεται με τον παράγοντα IXa μέσω επιφάνειας φωσφολιπιδίων (που μπορεί να προέρχεται από αιμοπετάλια ή μικροσωματίδια) για να διαμορφώσουν το σύμπλοκο του εγγενή παράγοντα Xase. Αυτό το σύμπλοκο ενεργοποιεί τον FX σε ένα πολύ υψηλότερο ποσοστό από ότι το σύμπλοκο FVIIa/TF (εξωγενής παράγοντας Xase). Κατόπιν, ο ενεργοποιημένος FX διαμορφώνει σε συνδυασμό με τον ενεργοποιημένο παράγοντα V (τον αρχικό ενεργοποιητή της προθρομβίνης) το σύμπλοκο προθρομβινάσης στην μεμβρανική επιφάνεια (15) . Η πλέον μεγαλύτερη σε ποσότητα προκύπτουσα θρομβίνη ενεργοποιεί περαιτέρω τον πηκτικό μηχανισμό μέσω ενίσχυσης της παραγωγής της αλλά και με την ενισχυμένη ενεργοποίηση του παράγοντα XI, ολοκληρώνοντας έτσι την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, του παράγοντα V και του παράγοντα VIII. Αυτή η μαζική παραγωγή θρομβίνης οδηγεί τελικά στην απόσπαση ανά δύο ινωδοπεπτιδίων από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B του ινωδογόνου (2FpA και 2FpB) με αποτέλεσμα την παραγωγή των μονομερών του ινωδογόνου τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται και παράγουν την ινική, η οποία υπό την επίδραση του FXIII με ομοιοπολικούς δεσμούς συντελεί στη παραγωγή του σταθερού ινώδους .

Όλο το σύστημα της πήξης μετά την ενεργοποίησή του ελέγχεται από ανασταλτικούς μηχανισμούς γνωστούς και ως φυσικούς αντιπηκτικούς ενεργοποιητές που είναι οι αντιθρομβίνες, οι πρωτεΐνες C και ο συμπαράγοντας αυτών S και ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor-TFPI) (9).

1.3. Ο μηχανισμός της ινωδολύσης

1.3.1. Το Ινωδολυτικό Σύστημα

Το ινωδολυτικό σύστημα του ανθρώπου αποτελεί ένα σύνολο ενζύμων και αναστολέων με κυριότερη λειτουργία την ενδαγγειακή διάλυση θρόμβων ινικής. Αποτελεί ακριβώς για αυτόν τον λόγο τον κύριο αμυντικό μηχανισμό που προστατεύει από τη θρόμβωση, περιορίζοντας τον υπέρμετρο σχηματισμό ινικής συμβάλλοντας καταυτόν τον τρόπο στην ομαλή λειτουργία του κυκλοφοριακού συστήματος (16). Το ινωδολυτικό σύστημα περιλαμβάνει ένα ανενεργό προένζυμο, το πλασμινογόνο, το οποίο αφού μετατραπεί σε ενεργό ένζυμο (πλασμίνη) διασπά την ινική σε διαλυτά προϊόντα. Δύο είναι τα κύρια ένζυμα που μετατρέπουν το πλασμινογόνο σε πλασμίνη: ο ιστικού τύπου ενεργοποιητής του πλασμινογόνου t-PA (tissue plasminogen activator) και ο τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, u-PA (urokinase plasminogen activator) (17). Αναστολή του ινωδολυτικού μηχανισμού μπορεί να συμβεί είτε στο επίπεδο των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από ειδικούς αναστολείς (plasminogen activator inhibitors-PAI₁, PAI₂), είτε στο επίπεδο της πλασμίνης από την α₂-αντιπλασμίνη.

Όλα τα ένζυμα του ινωδολυτικού συστήματος ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών σερίνης γιατί περιέχουν στην ενεργό θέση τους το αμινοξύ σερίνη (Ser). Το μόριο των πρωτεασών σερίνης αποτελείται από ορισμένες χαρακτηριστικές περιοχές με τις οποίες το ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα ή τον ειδικό αναστολέα. Στο αμινοτελικό άκρο του μορίου εντοπίζονται οι περιοχές K (Kringle domains), που αποτελούνται από 80 περίπου αμινοξέα και έχουν τη μορφή τριπλής αγκύλης, οι περιοχές E (epidermal growth factor), που είναι ομόλογες του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και οι περιοχές F (Finger domains), που ομοιάζουν με τις ομώνυμες δομές της φιμπρονεκτίνης. Στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου των πρωτεασών της σερίνης εντοπίζεται η ενεργός θέση του ενζύμου που περιέχει την καταλυτική τριάδα αμινοξέων Ser-Asp-His. Οι αναστολείς του ινωδολυτικού συστήματος ανήκουν και αυτοί στην οικογένεια των σερπινών (18).

Πλασμινογόνο και πλασμίνη

Το γονίδιο του πλασμινογόνου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6. Το πλασμινογόνο παράγεται στο ήπαρ και η συγκέντρωσή του είναι περίπου 200mg/L. Είναι γλυκοπρωτεΐνη MB 92KD και αποτελείται από 790 αμινοξέα που συνθέτουν μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το μόριο του πλασμινογόνου περιέχει 5 περιοχές K (Kringle domains). Σε αυτές τις περιοχές εντοπίζονται «ειδικές θέσεις δέσμευσης Λυσίνης» με τις

οποίες το πλασμινογόνο/πλασμίνη συνδέεται με την ινική και την α₂ αντιπλασμίνη. Μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη γίνεται μετά από υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού Arg561-Val562 από τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Το μόριο της πλασμίνης που δημιουργείται αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες: μία βαριά στο αμινοτελικό τμήμα και μία ελαφρά άλυσσο στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου. Στην ελαφρά άλυσσο εντοπίζεται η ενεργός θέση του ενζύμου που περιέχει την καταλυτική τριάδα His 603, Asp 646, Ser 741

Ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου (t-PA)

Το γονίδιο του t-PA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8. Παράγεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι γλυκοπρωτεΐνη MB 70 KD και αποτελείται από 527 αμινοξέα που συνθέτουν μια πολυπεπτιδική άλυσσο. Στο πλάσμα συνήθως ανιχνεύεται υπό μορφή συμπλέγματος με τον PAI1(95%) και η συγκέντρωση του στο πλάσμα είναι περίπου 1-5ng/ml, αλλά ποικίλει σημαντικά κάτω από διάφορες φυσιολογικές συνθήκες. Το μόριο του t-PA αποτελείται από 4 διαφορετικές περιοχές, την περιοχή F (finger domain), την περιοχή E (epidermal growth factor domain), τις περιοχές K₁ και K₂ (Kringle domains), με τις οποίες αντιδρά και συνδέεται με την ινική και την ενεργό περιοχή του ενζύμου που περιέχει την χαρακτηριστική καταλυτική τριάδα των πρωτεασών της σερίνης His 322, Asp 371, Ser 478.

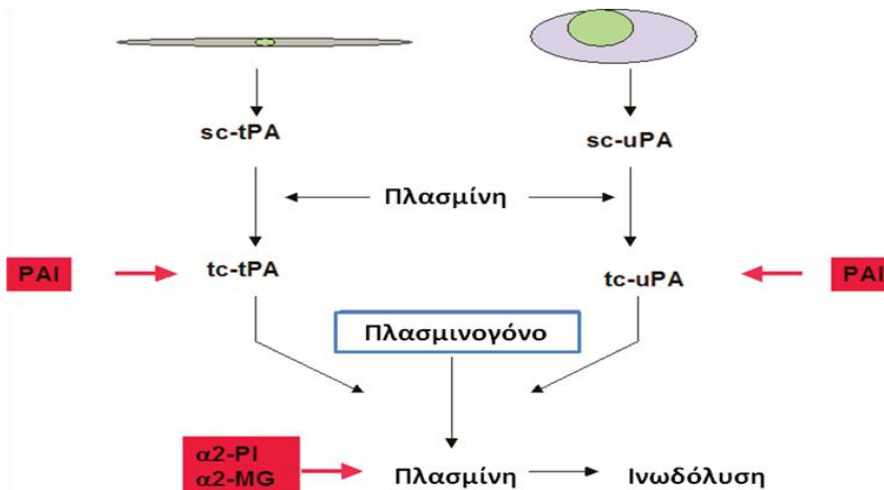
U-PA (Ουροκινάση)

Το γονίδιο της Ουροκινάσης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10. Υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου ανιχνεύονται στα ούρα (200-300ng/ml) ενώ η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι περίπου 2-2-ng/ml. Η Ουροκινάση είναι γλυκοπρωτεΐνη MB 54KD. Αποτελείται από 311 αμινοξέα που συνθέτουν μία πεπτιδική άλυσσο (Scu-PA ή προουροκινάση). Υδρόλυση από την πλασμίνη, την καλλικρεΐνη τον παράγοντα XII, του πεπτιδικού δεσμού Lys 158-Ile 159 μετατρέπει την προουροκινάση σε ουροκινάση (t-cu-PA) που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες. Το μόριο της ουροκινάσης περιέχει την περιοχή E (epidermal growth factor domain) και την περιοχή K (Kringle domain) στο αμινοτελικό τμήμα του μορίου ενώ η καταλυτική τριάδα αμινοξέων His 204, Asp 255, Ser 256 βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου.

1.3.2. Μηχανισμός ινωδολύσης

Η παρουσία ινικής διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον ινωδολυτικό μηχανισμό γιατί πυροδοτεί και ενισχύει την αντίδραση μεταξύ πλασμινογόνου και t-PA με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία πλασμίνης. Η πλασμίνη που δημιουργείται προκαλεί υδρολυτική διάσπαση της ινικής σε διαλυτά προϊόντα (f DP_s). Η ινική απορροφά στην

επιφάνεια της t-PA και πλασμινογόνο και σχηματίζει ένα τριαδικό σύμπλεγμα. Η σύνδεση του πλασμινογόνου με την ινική επιτυγχάνεται μέσω των θέσεων «δέσμευσης λυσίνης» που υπάρχουν στις περιοχές K_1 και K_2 του πλασμινογόνου και συμπληρωματικών θέσεων στην ινική που περιέχουν το αμινοξύ λυσίνη, ενώ η σύνδεση του t-PA με την ινική γίνεται μέσω των περιοχών F και K_2 του t-PA. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται σημαντικά η τοπική συγκέντρωση του πλασμινογόνου στην επιφάνεια της ινικής και ο ρυθμός ενεργοποίησης του πλασμινογόνου από τον t-PA γίνεται 2-3 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον ρυθμό ενεργοποίησης απουσία ινικής. Η πλασμίνη που σχηματίζεται στην επιφάνεια της ινικής προστατεύεται από τη δράση της $\alpha 2$ αντιπλασμίνης λόγω κατάληψης των θέσεων «δέσμευσης λυσίνης» και της ενεργού περιοχής του ενζύμου από την ινική (ημιπερίοδος ζωής 10-100sec). Αντίθετα όταν δημιουργείται ελεύθερη πλασμίνη αναστέλλεται ταχέως από την $\alpha 2$ αντιπλασμίνη (ημιπερίοδος ζωής 0.1sec). Η ουροκινάση (tcu-PA) ενεργοποιεί χωρίς διάκριση και μετατρέπει σε πλασμίνη τόσο το ελεύθερο όσο και το συνδεδεμένο με την ινική πλασμινογόνο. Αντίθετα η προουροκινάση (scu-PA) ενεργοποιεί επαρκώς το πλασμινογόνο παρουσία ινικής.



Αναστολή του Ινωδολυτικού μηχανισμού

Η ινωδόλυση είναι μηχανισμός που διέπεται από την ίδια αρχή του μηχανισμού της πήξης: αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση αδρανούς πρωτεΐνης-υποστρώματος σε ένζυμο, που ενισχύεται από μηχανισμούς ανάδρασης (feed-back) και αναστέλλεται από ειδικούς ανασταλτές (19).

α_2 -αντιπλασμίνη

Το γονίδιο της α_2 αντιπλασμίνης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18. Η α_2 αντιπλασμίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη MB 70 KD και παράγεται στο ήπαρ. Αποτελείται από 452 αμινοξέα και ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων των πρωτεασών σερίνης (serpins). Η συγκέντρωση της στο πλάσμα είναι 70 $\mu\text{g/ml}$ ενώ μέρος του ενζύμου (περίπου 30%) μετατρέπεται στην κυκλοφορία σε ανενεργό μορφή που δεν συνδέεται με την πλασμίνη λόγω απώλειας 26 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο του μορίου. Η α_2 αντιπλασμίνη συνδέεται και αναστέλλει την πλασμίνη. Στην αντίδραση αυτή τμήμα του μορίου της πλασμίνης, που βρίσκεται στην περιοχή K1 και περιέχει «θέση δέσμευσης λυσίνης» συνδέεται με αντίστοιχη περιοχή στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου της α_2 αντιπλασμίνης. Η αντίδραση αυτή είναι ταχεία και αναστρέψιμη. Σε μία δεύτερη φάση το αμινοξύ Ser που βρίσκεται στην ενεργό θέση της πλασμίνης, αντιδρά και διασπά τον πεπτιδικό Arg 354-Met 355 που βρίσκεται στο μόριο (αντιδραστική θέση) της α_2 αντιπλασμίνης. Με τον τρόπο αυτό τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της α_2 αντιπλασμίνης απελευθερώνεται, ενώ το υπόλοιπο του μορίου παραμένει συνδεδεμένο με την πλασμίνη και σχηματίζει μη αναστρέψιμο σύμπλεγμα.

PAI-1

Το γονίδιο του PAI-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Ο PAI-1 είναι γλυκοπρωτεΐνη MB 52 KD και αποτελείται από 379 αμινοξέα. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά ανιχνεύεται στα αιμοπετάλια και στον πλακούντα. Συντίθεται υπό μορφή ενεργού αναστολέα, είναι όμως ασταθής και αυτόματα μετατρέπεται σε λανθάνουσα ή ανενεργό μορφή. Η ημιπερίοδος ζωής του στο πλάσμα είναι 2-4 ώρες αλλά σταθεροποιείται και αποκτά μεγαλύτερη διάρκεια ζωής αφού συνδεθεί με τη βιτρονεκτίνη. Η συγκέντρωση του στο πλάσμα ποικίλει σημαντικά (5-85ng/ml) γιατί παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του 24-ώρου, ενώ η σύνθεση και η έκκριση του επηρεάζονται από τη δράση διαφόρων ορμονών, κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων κ.λ.π. Ο PAI-1 ανήκει στην οικογένεια των σερπινών και αναστέλλει τον t-PA και την ουροκινάση στο πλάσμα (όχι όμως την προουροκινάση). Σύμφωνα με διάφορες μετρήσεις ο PAI-1 αναστέλλει υπό φυσιολογικές συνθήκες το 50% του t-PA σε 5,5 λεπτά. Δύο είναι οι βασικές θέσεις τόσο στο μόριο του t-PA όσο και της ουροκινάσης που αντιδρούν με τον PAI-1. Η πρώτη βρίσκεται στην ενεργό θέση των ενζύμων που αναγνωρίζει τον PAI-1 ως ψευδοπρόστρωμα. Η δεύτερη θέση αφορά περιοχή γειτονική της ενεργού θέσης των ενζύμων και αποτελείται από τα αμινοξέα 296-302 (t-PA) ή 179-184 (ουροκινάση).

Μεταλλάξεις στις περιοχές αυτές καθιστούν τους ενεργοποιητές ανθεκτικούς στη δράση του PAI-1. Στην αντίδραση αναστολής των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από τον PAI-1 αρχικά σχηματίζεται ένα αναστρέψιμο σύμπλεγμα μεταξύ PAI-1 και t-PA (ή ουροκινάσης). Στη συνέχεια αντίδραση της Ser που βρίσκεται στην ενεργό θέση του ενζύμου (t-PA ή u-PA) και των αμινοξέων Arg 346-Met 347 που περιέχονται στην αντιδραστική θέση του PAI-1 έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού Arg 346-Met 347 και την αποκοπή τμήματος του μορίου του PAI-1 που περιέχει 33 αμινοξέα (Met 347-Pro 379). Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου του PAI-1 σχηματίζει μη αναστρέψιμο σύμπλεγμα με το μόριο του ενεργοποιητή.

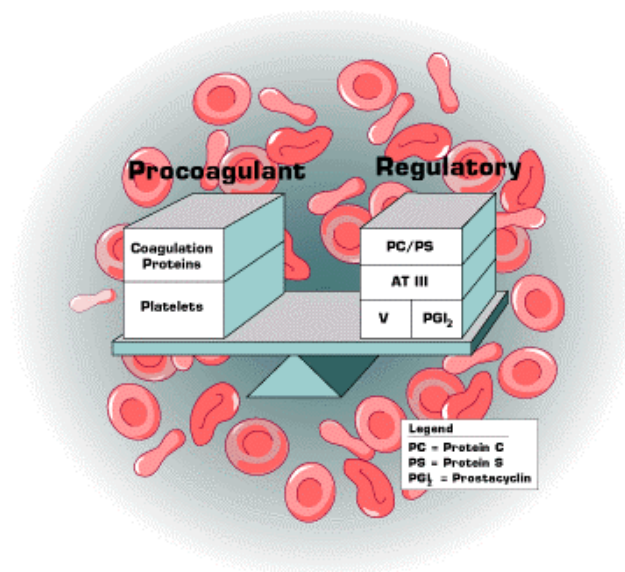
PAI-2

Το γονίδιο του PAI-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18. Αρχικά απομονώθηκε στον πλακούντα αλλά ανιχνεύεται στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και ουδετερόφιλα λευκά αιμοσφαίρια. Υψηλά επίπεδα PAI-2 (250ng/ml) ανευρίσκονται στο πλάσμα εγκύων γυναικών ιδιαίτερα στον τρίτο μήνα της κύησης. Είναι γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 415 αμινοξέα. Ανήκει στην οικογένεια των σερπινών και αναστέλλει περισσότερο την ουροκινάση παρά τον t-PA στο πλάσμα.

2. Μηχανισμός της Θρόμβωσης - Υπερπηκτικότητα

2.1 Σύνοψη Ιστορική αναδρομή

Για την παθογένεια της θρόμβωσης ήδη από το 1856 ο Rudolf Virchow ενοχοποίησε την γνωστή σε όλους μας τριάδα –διαταραχή της ροής του αίματος-βλάβη του ενδοθηλίου-υπερπηκτικότητα (αλλοίωση του αίματος). Από τότε πολλοί μελετητές αναφέρθηκαν στο φαινόμενο της αιμοστατικής ισορροπίας (ισορροπία μεταξύ των δύο βασικών μηχανισμών της πήξης και της ινωδολύσης)



Η έννοια «υπερπηκτικότητα» υπήρξε για πολλά χρόνια ασαφής και αμφισβητούμενη. Η εφαρμογή της αντιπηκτικής αγωγής κατά τη δεκαετία του 50 και ο εργαστηριακός της έλεγχος ανέδειξε τις υπάρχουσες διαφορές στην ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία και ενίσχυσαν την άποψη της ύπαρξης διαφόρου βαθμού « υπερπηκτικότητας» στους θρομβωτικούς ασθενείς. Ειδικές εργαστηριακές δοκιμασίες στον άρρωστο απέδειξαν την ύπαρξη ταχύτερης πήξης του αίματος και μεγαλύτερη κατα κάποιο τρόπο ένταση του φαινομένου. Από αυτές δύο κυρίως υπήρξαν κατά τη δεκαετία του 1950 οι πειστικότερες και έτυχαν και κλινικής εφαρμογής.

1. Η θρομβοελαστογραφία (Hartert 1952) : γραφική απεικόνιση με τη χρήση ειδικού μηχανήματος (θρομβοελαστογράφου) του φαινομένου της πήξεως του αίματος κατά την οποία ήταν δυνατή σε σύγκριση με το φυσιολογικό διάγραμμα, η διάκριση-διάγνωση υποπηκτικότητας ή υπερπηκτικότητας.

2. Η δοκιμασία ανοχής στην Ηπαρίνη (Soulier-rou Wartelle) όπου με τη χρήση διαφόρων πυκνοτήτων ηπαρίνης in vitro, ο έλεγχος της πήξεως επανασβεστωθέντος

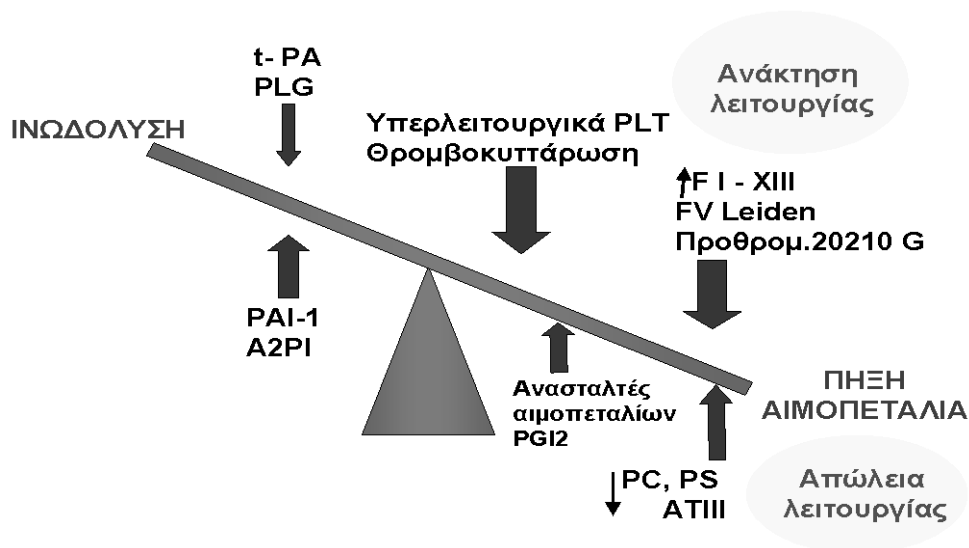
πλάσματος ανέδειξε διαφορές (σαφώς μικρότερη επιμήκυνση) στον ασθενή σε σχέση με φυσιολογικό άτομο (μάρτυρα). Η δοκιμασία αυτή ομαλοποιείτο με την αποτελεσματική εφαρμογή της αντιπηκτικής αγωγής με αντιβιταμίνες Κ και αποτέλεσε καθιερωμένη για τον ευρωπαϊκό χώρο συμπληρωματική δοκιμασία ελέγχου της από του στόματος αντιπηκτικής αγωγής για πάρα πολλά χρόνια. Η πολυπλοκότητα και η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου, σε συνδυασμό με την αδυναμία προτύπωσης της ταυτόχρονα με την ανάπτυξη νέων ευαίσθητων μεθόδων ελέγχου της ολικής πηκτικότητας (aPTT) και προτύπωσης του χρόνου προθρομβίνης, οδήγησαν στη μη περαιτέρω εφαρμογής της στην καθημερινή πράξη. Η ερμηνεία όμως της ύπαρξης της υπερπηκτικότητας δεν είχε δοθεί. Δεν είχε διαπιστωθεί αύξηση παράγοντα ή παραγόντων της πήξεως, γεγονός που αποτελούσε το κύριο επιχείρημα των αρνητών της. Το 1965 ο Νορβηγός φυσικός, Egeberg O. περιγράφει περίπτωση οικογενούς θρόμβωσης οφειλόμενη σε έλλειψη αντιθρομβίνης. Σε αυτή την μελέτη υπογραμμίζεται η συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων και της έλλειψης αντιθρομβίνης ενώ αναφέρεται για πρώτη φορά ο όρος θρομβοφιλία.

2.2. Θρομβοφιλία

Σήμερα με τον όρο θρομβοφιλία εννοούμε συνθήκες που ευνοούν τη θρόμβωση με μικρότερη ενεργοποίηση της πήξεως του αίματος, όπως συγγενής ή επίκτητη μείωση φυσικών ανασταλτών ή διαταραχή, μείωση της ινωδολυτικής δραστηριότητας (20).

Η τάση για θρόμβωση μπορεί να οφείλεται σε διαταραχές του αγγειακού τοιχώματος, των στοιχείων του αίματος καθώς και σε διαταραχή της ροής (παραμένει εν ισχύ η τριάδα του Virchow). Το ενδοθήλιο των αγγείων υπό φυσιολογικές συνθήκες χαρακτηρίζεται απο αντιθρομβωτική δράση οφειλόμενη κατά κύριο λόγο στην δυνατότητα του να τροποποιεί τη δράση της θρομβίνης (μέσω θρομβομοντουλίνης και κατ επέκταση μέσω του συστήματος της πρωτεΐνης C, και ηπαρινοειδών) αλλά και λόγω της ικανότητας του να τροποποιεί την αιμοπεταλιακή λειτουργία και να απελευθερώνει αγγειοδιασταλτικές ουσίες (προϊόντα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, οξείδιο του αζώτου NO) καθώς επίσης και λόγω της δυνατότητας του να ενεργοποιεί την ινωδολυτική δραστηριότητα (t-PA). Διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου που να οδηγεί σε θρόμβωση μπορεί να οφείλεται σε γενετικές δυσλειτουργίες των αντιθρομβωτικών μηχανισμών ή σε απευθείας βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων με απογύμνωση και έκθεση των υπενδοθηλιακών στοιβάδων όπως συμβαίνει στην αρτηριοσκλήρωση. Παράλληλα αλλαγές στην ροή του αίματος, συνεπεία στάσεως, μπορεί να οδηγήσουν σε θρόμβωση μπορεί όμως και να επηρεάσουν της γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο του ενδοθηλιακού κυττάρου.

Πιθανοί γενετικοί μηχανισμοί (21) που προκαλούν δυσλειτουργία των συστατικών του αίματος μπορεί να οφείλονται σε μεταλλάξεις με συνέπεια απώλεια της λειτουργίας των φυσικών ανασταλτών της πήξης ή σε μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανάκτηση της λειτουργίας των προπηκτικών πρωτεϊνών ή σε διαταραχές που οδηγούν σε μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα ή λειτουργικές ανωμαλίες των αιμοπεταλίων συνοδευόμενες από αυξημένη ενεργοποίηση.

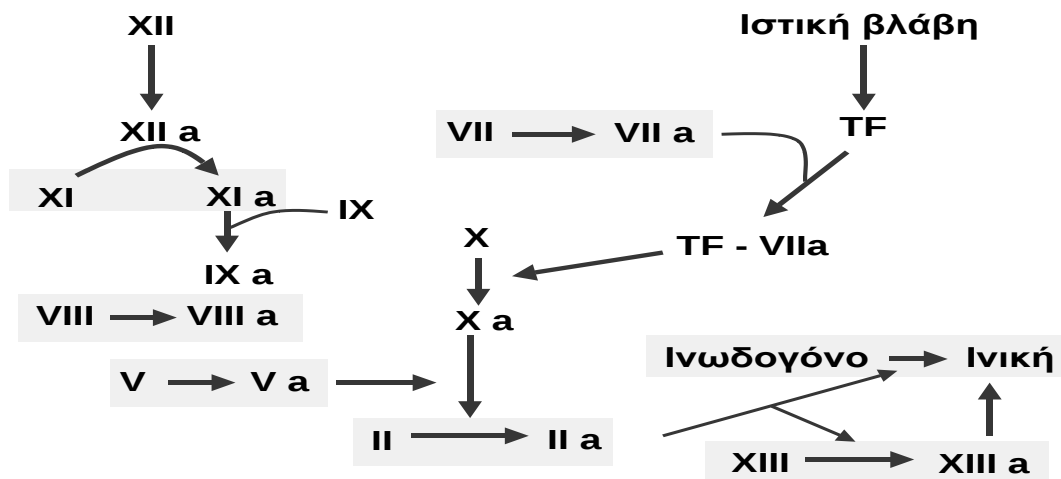


Εκτός από τους γενετικούς μηχανισμούς που μπορεί να οδηγήσουν σε θρόμβωση , έχουν περιγραφεί και επίκτητοι παράγοντες κινδύνου όπως :

- | | |
|--|--|
| ⌘ Μυελουπερπλαστικά νοσήματα | ⌘ Παχυσαρκία |
| ⌘ Θρομβοπενία μετά ηπαρίνη | ⌘ Κακοήθειες |
| ⌘ Δερματική νέκρωση μετά θεραπεία με αντιβιταμίνες K | ⌘ Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα |
| ⌘ Αντιπηκτικό του λύκου | ⌘ Παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία |
| ⌘ Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα | ⌘ Εγκυμοσύνη |
| ⌘ Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου | ⌘ Σήψη |
| ⌘ Αντισυλληπτικά | ⌘ Παράλυση |
| ⌘ Νεφρωσικό σύνδρομο | ⌘ Τραύμα |
| ⌘ Νόσος Buerger | ⌘ Χειρουργικές επεμβάσεις |
| ⌘ Σύνδρομο υπερδραστήριων αιμοπεταλίων | ⌘ Σύνδρομο Behcet |
| | ⌘ Ηλικία |

2.2.1 Θρομβοφιλία και Κληρονομικότητα

Η εκτίμηση ότι η θρομβοφιλία μπορεί να έχει κληρονομική βάση αρχικά οδήγησε στην έρευνα για ενδεχόμενες γενετικές διαταραχές στο σύστημα της πήξης (22). Οι πρώτες γενετικές διαταραχές που περιγράφηκαν αφορούσαν σε μεταλλάξεις που είχαν σαν συνέπεια την απώλεια της λειτουργίας των φυσικών ανασταλτών της πήξης, όπως η αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C και πρωτεΐνη S. Τα αρχικά αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά αφού εντόπισαν συγγενή βλάβη (έλλειψη ή δυσλειτουργία) στο 15% περίπου των ατόμων που εμφάνιζαν μεμονωμένες ή επαναλαμβανόμενες θρομβώσεις. Μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί η μοριακή αιτιολογία της θρομβοφιλίας σε ποσοστό 85% των περιπτώσεων (23, 24) . Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό ακόμα ποσοστό παραμένει αδιευκρίνιστο ως προς την αιτιολογία. Πιθανολογείται ότι μοριακές βλάβες σε άλλα γονίδια μπορεί να παίζουν ρόλο στην προδιάθεση για θρόμβωση θεωρία, η οποία ενισχύεται συνεχώς λόγω της συσσώρευσης νέων γνώσεων αναφορικά με τον αιμοστατικό μηχανισμό. Η συνεχώς αυξανόμενη γνώση για τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ανωτέρω παράγοντες αλλά και οι συνεχώς βελτιούμενες εργαστηριακές τεχνικές ελέγχου διευκολύνουν τις μελέτες (25). Όλο και περισσότερες μελέτες κάνουν εμφανές ότι η θρόμβωση είναι πολυπαραγοντική νόσος . Άτομα με παραπάνω από έναν κληρονομικό παράγοντα κινδύνου ή με έναν κληρονομικό και έναν επίκτητο παράγοντα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης απ'ότι ένα άτομο με έναν από τους γνωστούς επίκτητους παράγοντες κινδύνου (26, 27). Μελέτες έχουν δείξει αυξημένο σχετικό κίνδυνο όταν συνδυάζονται γενετικοί και επίκτητοι παράγοντες κινδύνου σε ασθενείς που λαμβάνουν αντισυλληπτικά , ή βρίσκονται σε ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση ή έχουν θετικά αντιπηκτικά του λύκου (28). Γενετικοί πολυμορφισμοί συνδεόμενοι ή όχι με θρόμβωση και αρτηριακή νόσο έχουν περιγραφεί για όλες σχεδόν τις πρόσηπτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων του παράγοντα V, προθρομβίνη, ινωδογόνο, παράγοντα VII, XI, XIII .



Στα γραμμοσκιασμένα κουτιά απεικονίζονται οι διάφορες προπηκτικές πρωτεΐνες , πολυμορφισμοί των οποίων έχουν συνδεθεί με αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση

Επιπλέον έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί , σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη θρομβοεμβολικής νόσου, και στο επίπεδο των γλυκοπρωτεϊνών των αιμοπεταλίων, των ινωδολυτικών πρωτεϊνών καθώς και των ενζύμων που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης .

Σε γενικές γραμμές μπορούμε να θεωρήσουμε ότι παράγοντες κινδύνου για φλεβική θρόμβωση σχετίζονται με διαταραχές στο επίπεδο των φυσικών ανασταλτών της πήξης, ενώ πολυμορφισμοί των προπηκτικών πρωτεϊνών συσχετίζονται είτε με φλεβικές είτε με αρτηριακές θρομβώσεις (29, 30).

Οι πολυμορφισμοί στο επίπεδο των γλυκοπρωτεϊνών των αιμοπεταλίων συσχετίζονται κυρίως με αρτηριακή νόσο.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ C			
Πολυμορφισμοί	Φαινότυπος	Φλεβική νόσος	Αρτηριακή νόσος
FV Leiden : 1691G → A (Arg506Gln)	APCR	+++	-
FV Cambridge : Arg306Thr		+/-	NS
FV Hong Kong: Arg306Gly		+/-	NS
FV HR2 haplotype	Ηπια APCR	+/-	?
Thrombomodulin 1418C → T (Ala455Val)	Αγνωστος	-	+/-
Thrombomodulin - 33G → A		+	?
EPCR 23 bp ins. in exon 3		?	?

Πολυμορφισμοί	Φαινότυπος	Φλεβική νόσος	Αρτηριακή νόσος
Μεταβολισμός ομοκυστεΐνης			
Cystathionine β-synthase 833T → C	Ομοκυσταϊναιμία	+/-	Αγνωστο
MTHFR 677C → T	Ελαφρά αύξ. Hcy	πιθανή	πιθανή
Γλυκοπρωτεΐνες αιμοπεταλίων			
GP IIIa Leu33Pro (PL ^{A2})	Αυξ. ενεργοποίηση	-	πιθανή
GP Iba VNTR	Αγνωστος	?	πιθανή
GP Iba 3550C → T	Αγνωστος	?	+/-
GP Ia / Iia, α2 1648A → G	Εκφραση υποδοχέα	?	+/-
Thrombin receptor PAR-1-5061 → D	Αγνωστος	-	Αγνωστο

ΠΡΟΠΗΚΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ				
Πολυμορφισμοί	Φαινότυπος	Φλεβική νόσος	Αρτηριακή νόσος	
Προθρομβίνη 20210G A	Αυξ. FII	+	?	
Ινωδογόνο Bcl-1 αλληλίο β	Αυξ. Ινωδογ.	+/-	+/-	
Ινωδογόνο - 148C T in Bβ	Φυσ. Ινωδογ	?	+/-	
Ινωδογόνο 448G A in Bβ	Αυξ. Ινωδογ.	?	+/-	
Ινωδογόνο Thr312 Ala in α	? FXII	+/-	+/-	
FVII Arg353Gln	} ↓ / κ.φ FVII	?	-	
FVII H7H7		?	-	
FVII G73A		?	-	
FXIII A subunit Val 34Leu	Αυξ. Δραση	-	-	

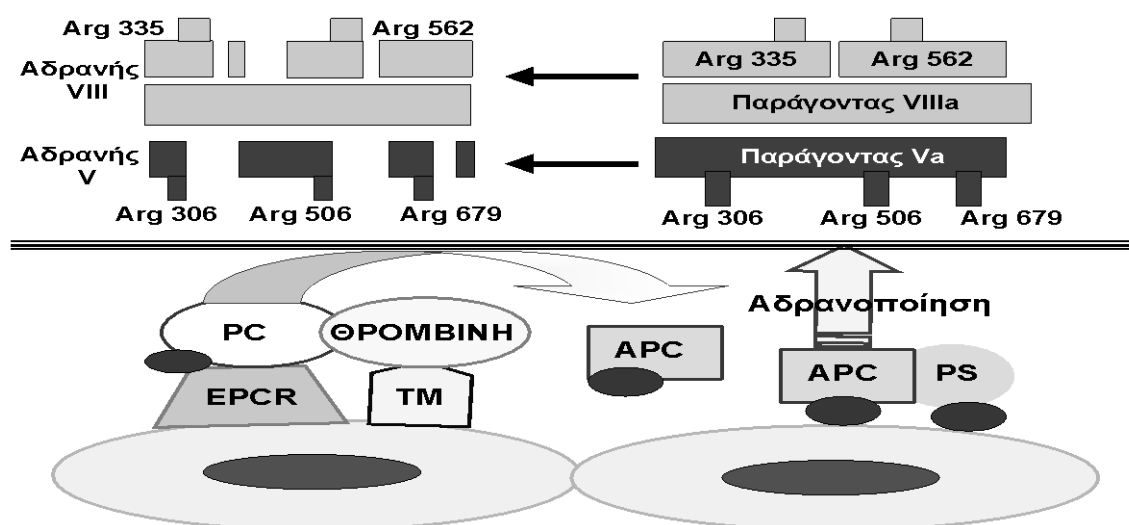
Παρ' όλη την έρευνα γύρω από την θρομβοφιλία θα πρέπει να τονισθεί ότι η θρομβοφιλία είναι απλώς μια προδιάθεση για θρόμβωση. Η παρουσία μιας μοριακής βλάβης πρέπει να εκτιμάται πάντα σαν προδιαθεσικός παράγοντας και να λαμβάνεται υπόψη σε καταστάσεις που προδιαθέτουν σε θρόμβωση (χειρουργείο , κύηση κ.λ.π), σημαίνει μειωμένη δυνατότητα του οργανισμού να αντιμετωπίσει θρομβογόνα ερεθίσματα και μπορεί να μην συνδυαστεί ποτέ με θρόμβωση στη ζωή ενός ατόμου (31).

2.2.2. Αιτίες Θρομβοφιλίας

2.2.2.1 Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C

Το σύστημα της πρωτεΐνης C

Η πρωτεΐνη C είναι μια βιταμίνη –Κ εξαρτώμενη πρωτεΐνη, το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (q13-q14), ενώ ως πρωτεΐνη παράγεται στο ήπαρ (32). Η πρωτεΐνη C αποτελεί μέρος ενός πολύπλοκου συστήματος το οποίο παρεμβαίνει στην ισορροπία του αιμοστατικού μηχανισμού, κυρίως μέσω της αδρανοποίησης των ενεργοποιημένων παραγόντων V και VIII (βλέπε σχήμα)



Η πρωτεΐνη C (PC) αφού προσδεθεί στον υποδοχέα της , που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCR) , αλληλοεπιδρά με το σύμπλεγμα θρομβομοντουλίνη (TM) / θρομβίνη οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνηςC (APC). Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C , αυτή πρέπει να έχει τη δυνατότητα να συνδέει την θρομβίνη, τον υποδοχέα της PC στο ενδοθηλιακό κύτταρο (EPCR) , την θρομβομοντουλίνη, Ca^{+2} , και φωσφολιποειδή (ιδιαίτερα την φωσφατιδυλεθανολαμίνη). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C αποδεσμεύεται από τον ενδοθηλιακό της υποδοχέα και συνδέεται με την πρωτεΐνη S (μια άλλη βιταμίνη-Κ εξαρτώμενη πρωτεΐνη) στο επίπεδο του ενδοθηλιακού κυττάρου ή των αιμοπεταλίων πάνω σε επιφάνειες φωσφολιποειδών. Αυτό το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα πρωτεΐνης C είναι ικανό να αδρανοποιήσει τους ενεργοποιημένους παράγοντες V και VIII ασκώντας την αντιπηκτική της δράση.

Κληρονομική ανεπάρκεια πρωτεΐνης C

Η ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C σαν παράγοντας θρομβοφιλίας στον άνθρωπο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1981 από τους Griffin et al. Κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό χαρακτήρα ενώ έχουν περιγραφεί πάνω από 160 μεταλλάξεις, κάνοντας τη διάγνωση σε γενετικό επίπεδο προβληματική. Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C αρχικά θεωρούταν ότι κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα, με έναν «θρομβωτικό» φαινότυπο στους ετεροζυγώτες. Ακολούθησαν μελέτες οι οποίες κατέδειξαν ότι μόνο 30% των ετεροζυγωτών με ανεπάρκεια PC εμφάνισαν θρόμβωση, οπότε και αμφισβητήθηκε ο αυτοσωματικός κυρίαρχος χαρακτήρας. Αργότερα έγινε φανερό ότι η εμφάνιση ή όχι θρομβώσεως εξαρτάται από την συνύπαρξη και άλλων παραγόντων κινδύνου είτε κληρονομικών είτε επίκτητων, έτσι φαίνεται πιο λογικό να κληρονομείται με αυτοσωματικό χαρακτήρα ποικίλης διεισδυτικότητας (33). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μοριακή βάση της ανεπάρκειας PC είναι πολύ ετερογενής, η ταξινόμηση που έχει προταθεί στηρίζεται στην φαινοτυπική έκφραση, δηλαδή στην βιολογική και αντιγονική δραστηριότητα της πρωτεΐνης στην κυκλοφορία.

Έτσι διακρίνουμε :

- Ανεπάρκεια τύπου I : είναι η πιο συχνή μορφή (76%), χαρακτηρίζεται από παράλληλη έκπτωση των επιπέδων βιολογικής και αντιγονικής δραστηριότητας της PC
- Ανεπάρκεια τύπου II : χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανώμαλου μορίου PC με μειωμένη βιολογική αλλά φυσιολογική αντιγονική δραστηριότητα.

Κλινικές εκδηλώσεις της ανεπάρκειας PC χαρακτηρίζονται κυρίως από την εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης. Έχουν αναφερθεί ασυνήθη σημεία θρόμβωσης όπως : μεσεντέριος, πυλαία φλέβα, σύνδρομο Budd-Chiari, θρόμβωση νεφρικών φλεβών, θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών και θρόμβωση οφθαλμικής. Δεν έχει διευκρινισθεί εάν τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια σχετίζονται με την ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, όμως άλλου τύπου αρτηριακές θρομβώσεις δεν φαίνεται να μπορούν να συσχετισθούν με την ανεπάρκεια αυτής (35). Η παρουσία επίκτητων παραγόντων κινδύνου όπως ακινησία, κύηση, αντισυλληπτικά ή χειρουργικές επεμβάσεις έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην εμφάνιση θρόμβωσης στους ασθενείς με ανεπάρκεια PC. Παρόλα αυτά όχι όλες οι κληρονομούμενες θρομβοφιλικές διαταραχές αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης στους ασθενείς με ανεπάρκεια PC. Έτσι για παράδειγμα σε μια μεγάλη μελέτη (Thromb Haemost.2000;83:366 – 370) η μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης G20210A δεν φάνηκε να επηρεάζει

σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης σε ασθενείς ετερόζυγους για ανεπάρκεια πρωτεΐνης C.

Μια ιδιαίτερη εκδήλωση της ανεπάρκειας PC αποτελεί η εμφάνιση δερματικών νεκρώσεων κυρίως κατά την έναρξη θεραπείας με αντιβιταμίνες K. Σαν αιτία του συνδρόμου αναφέρεται η ταχεία μείωση των επιπέδων της PC, σε σχέση με άλλους βιταμίνο-K εξαρτώμενους παράγοντες, με την έναρξη της θεραπείας (μέσα σε 5 - 10 ώρες) με αντιπηκτικά από το στόμα.

Σε έναν ασθενή με ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, με επίπεδα κυμαινόμενα γύρω στο 50%, μία ταχεία πτώση στο 10 - 20 % μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση θρόμβωσης. Σε αυτούς τους ασθενείς η θρόμβωση αφορά τα αγγεία του δέρματος, οδηγώντας στην εμφάνιση τοπικών ή και εκτεταμένων δερματικών νεκρώσεων.

Ομόζυγος έλλειψη πρωτεΐνης C, είναι ασυνήθης 1 κάθε 500.000 -750.000 γεννήσεις, και συνήθως εμφανίζεται με σοβαρή θρόμβωση κατά την νεογνική περίοδο. Αυτός ο φαινότυπος μπορεί να οφείλεται σε αληθή ομόζυγο κατάσταση ή σε συνδυασμένη ετερόζυγο. Αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν σύνδρομο γνωστό σαν purpura fulminans neonatorum, με εκχυμώσεις, νεκρωτικές δερματικές βλάβες, θρόμβωση K.N.Σ και τύφλωση εμφανιζόμενα 1 ώρα έως 5 ημέρες μετά τη γέννηση εργαστηριακός έλεγχος θα δείξει ευρήματα ΔΕΠ, με μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων, μειωμένο ινωδογόνο, αυξημένα επίπεδα προϊόντων αποδομής του ινωδογόνου και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης C.

Επίκτητη ανεπάρκεια πρωτεΐνης C

Μπορεί να εμφανισθεί :

- ◆ Θεραπεία με αντιπηκτικά από το στόμα
- ◆ Ηπατοπάθεια
- ◆ Διάχυτη ενδαγγειακή πήξη
- ◆ Νεφρική ανεπάρκεια
- ◆ Κοντά σε επεισόδιο οξείας θρόμβωσης
- ◆ Μετεγχειρητικά
- ◆ Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων
- ◆ Θεραπευτική πλασμαφαίρεση
- ◆ Ca μαστού μετά ΧΜΘ
- ◆ Μετά μαζική αιμορραγία και αραιώση με κρυσταλλοειδή διαλύματα
- ◆ Σπάνια επίκτητοι ανασταλτές

Σπάνια τα επίπεδα PC μπορούν να αυξηθούν σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης βρίσκονται μειωμένα (κατά 20 - 30 % των τιμών των ενηλίκων) σε φυσιολογικά νεογνά, ενώ αυξάνονται με την πρόοδο της ηλικίας φτάνοντας τις τιμές των ενηλίκων σε ηλικία 11 έως 16 ετών. Νεαροί ενήλικες ιδιαίτερα άνδρες τείνουν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης συγκρινόμενοι με μεσήλικες ή με ακόμα μεγαλύτερης ηλικίας άνδρες. Τα επίπεδα PC συνήθως αυξάνονται στον Σακχαρώδη Διαβήτη, Ισχαιμική καρδιοπάθεια, εγκυμοσύνη, μετα-εμμηνοπαυσιακή περίοδο, κατά τη διάρκεια θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης και θεραπείας με αντισυλληπτικά. Δεν έχει αξιολογηθεί η κλινική σημασία των αυξημένων τιμών PC πέραν του γεγονότος ότι μπορεί να καλύψει ενδεχόμενη ανεπάρκεια.

2.2.2.2. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S

Η πρωτεΐνη S είναι μια βιταμίνη-Κ εξαρτημένη γλυκοπρωτεΐνη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη S έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 3. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια PrS με ψηλό βαθμό ομολογίας, το ενεργό γονίδιο (PrSa) και το ψευδογονίδιο (PrSb). Η πρωτεΐνη S παράγεται στο ήπαρ, στο ενδοθήλιο, στα αιμοπετάλια, στους οστεοβλάστες και στα κύτταρα Leydig των όρχεων. Κυκλοφορεί συνδεδεμένη κατά 60% με την β αλυσίδα της C4b-BP (αδρανής μορφή), ενώ η ελεύθερη πρωτεΐνη S (ενεργός μορφή 40 %) παίζει ρόλο συμπράγοντα στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Κληρονομείται κατά κυρίαρχο τύπο. Υπάρχουν δύο συστήματα ταξινόμησης, το σύστημα Comp και η πρόταση της επιστημονικής επιτροπής προτύπωσης (SSC) της παγκόσμιας οργάνωσης για τη θρόμβωση και την αιμόσταση (ISTH).

- Τύπος I χαρακτηρίζεται από μείωση της συνολικής αντιγονικής δραστηριότητας της PrS
- Τύπος II ή II b κατά Comp χαρακτηρίζεται από την παρουσία λειτουργικού ανώμαλου μορίου.
- Τύπος III ή II a κατά Comp χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό αντιγόνο PrS αλλά μειωμένα επίπεδα ελεύθερης PrS.

Υπάρχει η εκτίμηση ότι περίπου 5% των ασθενών με θρομβοφιλία έχουν ανεπάρκεια πρωτεΐνης S, ενώ θεωρείται ότι μπορεί να ευθύνεται για υποτροπές φλεβικής θρόμβωσης.

2.2.2.3. Θρομβομοντουλίνη (TM) & Ενδοθηλιακός υποδοχέας της πρωτεΐνης (EPCR)

Θεωρητικά η ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία όλων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σύστημα της πρωτεΐνης C μπορεί να συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο θρομβώσεων. Η ανεπάρκεια της TM και του EPCR μπορεί θεωρητικά να αποτελεί παράγοντα κινδύνου, αλλά είναι δύσκολο να μελετηθούν μιας και πρόκειται για κυτταρικούς υποδοχείς ενώ για την μελέτη της λειτουργίας τους δεν υπάρχει πλήρως αποδεκτή μέθοδος.

Η *θρομβομοντουλίνη* είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με ρόλο διαμεμβρανικού υποδοχέα, που βρίσκεται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και παίζει τον ρόλο του υποδοχέα της θρομβίνης, διευκολύνοντας την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C. Λόγω του σημαντικού ρόλου στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C, γενετικές διαταραχές της θρομβομοντουλίνης που οδηγούν σε ανεπαρκή λειτουργία της, μπορούν θεωρητικά να συνδέονται με την εμφάνιση θρόμβωσης. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την θρομβομοντουλίνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20. Έχουν περιγραφεί μερικές μεταλλάξεις σε ασθενείς και σε οικογένειες με θρομβοεμβολική νόσο, όμως για την επιβεβαίωση των ευρημάτων χρειάζονται πολύ μεγαλύτερες μελέτες. Έχει περιγραφεί διμορφισμός C / T στο νουκλεοτίδιο 1418 που οδηγεί σε υποκατάσταση Ala455Val, ο οποίος συνδέεται με πρόωρο έμφραγμα μυοκαρδίου, όμως αυτός ο διμορφισμός δεν φαίνεται να σχετίζεται με φλεβική θρόμβωση.

Ο *ενδοθηλιακός υποδοχέας της πρωτεΐνης C (EPCR)* πιστεύεται ότι δεσμεύει την πρωτεΐνη C στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων διευκολύνοντας έτσι την ενεργοποίηση της από το σύμπλεγμα θρομβίνη / θρομβομοντουλίνη, έχει περιγραφεί στο ενδοθήλιο των μεγάλων αγγείων. Έχει αναφερθεί μετάλλαξη (εισδοχή στο εξόνιο 3), η οποία μπορεί να έχει σχέση με φλεβική θρόμβωση. Πρόσφατα περιγράφηκε μετάλλαξη, η οποία οδηγεί στην εμφάνιση πρωτεΐνης, η οποία δεν μπορεί να δεσμεύσει την πρωτεΐνη C. Αυτή η μετάλλαξη βρέθηκε σε 2% των ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε 1.5% των ασθενών με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση. Επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων έφερε μελέτη σε πιθήκους, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του EPCR το οποίο εμπόδισε την πρόσδεση της πρωτεΐνης C στο υποδοχέα έχοντας σαν συνέπεια μείωση κατά 88% της κυκλοφορούσας ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν ότι αυτός ο υποδοχέας παίζει σημαντικό ρόλο στο σύστημα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C και ότι μεταλλάξεις σε αυτό το επίπεδο μπορούν να σχετίζονται με την εμφάνιση θρόμβωσης, χρειάζονται όμως ακόμα μεγαλύτερες μελέτες.

2.2.2.4. Παράγοντας V R506Q και αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C

Πριν το 1993 η εργαστηριακή διερεύνηση της κληρονομικής θρομβοφιλίας περιοριζόταν σε λειτουργικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S ή/και της αντιθρομβίνης (36, 37). Ανεπάρκειες οι οποίες βρίσκονται σε λιγότερο του 10% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση. Η εργαστηριακή προσέγγιση της θρομβοφιλίας άλλαξε το 1993 όταν ο Dahlback και οι συνεργάτες του περιέγραψαν μια καινούργια και πολύ συχνή οικογενή θρομβοφιλία, την κληρονομική αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (34), αυτή αποκαλύπτεται προσδιορίζοντας το λόγο μεταξύ χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστικής (aPTT) με και χωρίς την προσθήκη ενεργοποιημένης πρωτεΐνης

C (APC). Η εξωγενής APC που προστίθεται σε μια δοκιμασία aPTT με φυσιολογικό πλάσμα αναμένεται να προκαλέσει παράταση του χρόνου σχηματισμού θρόμβου μια και η APC αναστέλλει τη δράση των Fva και FVIIIa. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η αναμενόμενη χρονική παράταση δεν πραγματοποιείται σε άτομα με ιστορικό θρόμβωσης και σε συγγενείς αυτών, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C οφείλεται σε γενετικό αίτιο (38). Είναι γνωστό ότι η APC αδρανοποιεί τον παράγοντα Va διασπώντας τον στις θέσεις Arg 306, Arg506 και Arg 679 στη βαριά αλυσίδα του μορίου του. Η μετάλλαξη στο γόνιο του παράγοντα V έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση στη θέση 506 της αργινίνης από την γλουταμίνη, τροποποιώντας έτσι το σημείο δράσης της APC. Σαν αποτέλεσμα αυτού ο παράγων V εκφράζει μεν φυσιολογική προπηκτική δραστηριότητα όταν ενεργοποιείται από την θρομβίνη ή τον παράγοντα Xa, όμως η ταχύτητα αδρανοποίησης του από την APC είναι περίπου 10 φορές μικρότερη από αυτήν του φυσιολογικού παράγοντα Va. Αυτή η αντίσταση στην APC σταθεροποιεί το σύμπλεγμα προθρομβίνης και οδηγεί σε αυξημένη θρομβινογένεση και σε κατάσταση υπερπηκτικότητας.

Σε αντίθεση με την μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει τους ασθενείς με ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, S και αντιθρομβίνη, περίπου το 90 – 95 % των ασθενών με αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (προσδιοριζόμενη με την πηξιολογική μέθοδο) έχουν τη χαρακτηριστική μετάλλαξη R506Q (Leiden) (39). Σε σπάνιες περιπτώσεις άλλες γενετικές διαταραχές εκτός της γνωστής μετάλλαξης οδηγούν στον φαινότυπο της αντίστασης στην APC. Έχουν περιγραφεί ασθενείς με αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C αγνώστου αιτιολογίας.

Ο παράγοντας V Leiden είναι η πιο κοινή από τις κληρονομικές αιτίες θρομβοφιλίας (40), ανευρίσκεται σε ετερόζυγο μορφή στο 12 – 20 % των ασθενών με φλεβική θρόμβωση και περίπου στο 40 – 50 % σε αυτούς με υποτροπιάζουσες ή οικογενείς εν τω βάθι θρομβοφλεβίτιδες (41). Η κυρίαρχη κλινική εκδήλωση είναι η εν τω βάθι θρομβοφλεβίτιδα με ή χωρίς πνευμονική εμβολή. Η πιθανότητα για θρόμβωση των εγκεφαλικών φλεβών παρουσιάζεται αυξημένη (42). Επίσης υπάρχουν αποδείξεις ότι η μετάλλαξη του παράγοντα V, πιθανώς λόγω θρομβώσεων των αγγείων του πλακούντα, μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στις ανεξήγητες αποβολές και σε μερικές επιπλοκές της κύησης.

Οι ετεροζυγώτες έχει αποδειχθεί ότι διατρέχουν 3 – 7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης ενώ οι ομοζυγώτες εμφανίζουν 50 – 100 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο. Παρόλο τον αυξημένο κίνδυνο για φλεβικές θρομβώσεις δεν υπάρχει απόδειξη ότι η ετεροζυγωτία για τον παράγοντα Leiden αυξάνει την θνησιμότητα.

Οι μελέτες σχετικά με το εάν η παρουσία του παράγοντα Leiden συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής των φλεβικών θρομβώσεων είναι αντικρουόμενες. Δύο τελευταίες μελέτες αναφέρουν ότι ο κίνδυνος υποτροπής αυξάνεται σημαντικά στους ασθενείς με FVL που ήταν ετερόζυγοι και για μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης (σχετικός κίνδυνος 2.6 ή 9.1) ειδικά για εκείνους στους οποίους το πρώτο επεισόδιο εν τω βάθι φλεβοθρόμβωσης εμφανίστηκε αυτόματα . Ο κίνδυνος εμφάνισης υποτροπής είναι 3 φορές μεγαλύτερος στους ομοζυγώτες για Leiden.

Η πιθανότητα να αναπτύξει κάποιος κατά τη διάρκεια της ζωής του θρόμβωση (10 %) καθώς και η βαρύτητα της θρόμβωσης είναι μικρότερη στους ετεροζυγώτες για FVL από ότι σε ασθενείς με άλλες κληρονομούμενες αιτίες θρομβοφιλίας (ανεπάρκεια AT , πρωτεΐνης C, S). Η πλειοψηφία των ετεροζυγωτών για Leiden (90 %) δεν θα αναπτύξει συμπτωματική φλεβική θρόμβωση κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

▪ *Συνδυασμός κληρονομικών θρομβοφιλικών παραγόντων κινδύνου και FVL*

Φαίνεται ότι μεταξύ των ασθενών με θρόμβωση και Leiden υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να βρεθεί και μια δεύτερη θρομβοφιλική μετάλλαξη. Αυτό έχει συσχετισθεί με την ανεπάρκεια AT , πρωτεΐνης C και S, μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης και πιθανά με την μετάλλαξη στο γονίδιο της MTHFR. Φαίνεται ότι οι φορείς δύο βλαβών εμφανίζουν υψηλότερη πιθανότητα για θρόμβωση από ότι οι συγγενείς τους με μία βλάβη. Σε πρόσφατη ανασκόπηση 4 μελετών περίπου το 75 % των μελών οικογενειών που ήταν φορείς δύο βλαβών εμφάνισαν θρόμβωση ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για αυτούς που είχαν μία βλάβη ήταν 10 - 30 % .Η παρουσία δύο βλαβών σε αυτές τις μελέτες αύξησε τον κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης κατά 3 φορές σε σχέση με αυτούς με μία βλάβη..Ο κίνδυνος για θρόμβωση φαίνεται να είναι αυξημένος και όταν συνδυάζεται FVL και υπερομοκυσταϊναιμία. Για παράδειγμα σε μεγάλη προοπτική μελέτη ο σχετικός κίνδυνος για εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης συγκρινόμενος με ασθενείς χωρίς καμία βλάβη ήταν για μεν τους ασθενείς με υπερομοκυσταϊναιμία 3.4, 2.3 για αυτούς με FVLκαι 21.6 για αυτούς και με τις δύο βλάβες.

▪ *Συνδυασμός επίκτητων θρομβοφιλικών παραγόντων κινδύνου και FVL*

Υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ FVL και άλλων παραγόντων κινδύνου για φλεβική θρόμβωση, όπως λήψη αντισυλληπτικών και εγκυμοσύνη . Αξίζει αναφοράς το γεγονός ότι η μετάλλαξη FVLδεν φαίνεται να επιβαρύνει κατά πολύ την πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης στους ασθενείς με καρκίνο, σε αυτούς που πρόκειται να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση ή που ήδη έχουν πνευμονική εμβολή. Δεν έχει ξεκαθαρισθεί σε πιο βαθμό η FVL συμβάλλει στην αύξηση της πιθανότητας

εμφάνισης θρόμβωσης σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε ορθοπεδική επέμβαση.

Η πιθανότητα οι ασθενείς με FVL να εμφανίσουν πνευμονική εμβολή (χωρίς ταυτόχρονη εμφάνιση εν τω βάθι φλεβοθρόμβωσης [DVT]) φαίνεται να είναι μισή σε σχέση με την πιθανότητα να εμφανίσουν DVT μόνη της (odds ratio 6.0) ή σε συνδυασμό με πνευμονική εμβολή (odds ratio 5.2). Η αιτία αυτού του παράδοξου φαινομένου δεν είναι γνωστή , οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι οι ασθενείς με FVL εμφανίζουν σε μικρότερη συχνότητα εν τω βάθι φλεβική θρόμβωση που να αφορά τις μεγάλες φλέβες ή τις λαγονομηριαίες φλέβες που ευθύνονται για την εμφάνιση πνευμονικής εμβολής.

▪ FVL & αρτηριακές θρομβώσεις

Δεν έχει τεκμηριωθεί η συσχέτιση FVL και αρτηριακής θρόμβωσης. Πολλές μελέτες δεν έχουν καταφέρει να αποδείξουν συσχέτιση της μετάλλαξης με έμφραγμα του μυοκαρδίου και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο , έτσι δεν θεωρείται αναγκαία η έναρξη αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς ετερόζυγους για FVL και αρτηριοσκλήρυνση . Μπορεί όμως να υπάρχει ένας μικρός κίνδυνος για εμφάνιση αρτηριακής θρόμβωσης, τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες φορείς του FVL , λόγω και της παρουσίας επιπρόσθετων παραγόντων κινδύνου για νόσο στεφανιαίων . Για παράδειγμα σε μελέτη που αφορούσε νέες γυναίκες ηλικίας 18- 44 ετών, η παρουσία του FVL σχετίζεται με 2.4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου, εφόσον επρόκειτο για καπνίστριες .

▪ FVL & χρήση αντισυλληπτικών

Η χρήση αντισυλληπτικών αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης σε γυναίκες με FVL. Η μετάλλαξη Leiden ανευρίσκεται στο 20 – 30 % των γυναικών με ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης κατά την διάρκεια αγωγής με αντισυλληπτικά. Στην μελέτη Leiden η χρήση αντισυλληπτικών σχετίζεται με αύξηση κατά 4 φορές του κινδύνου εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης, η παρουσία σε ετερόζυγο μορφή της μετάλλαξης συνδυάζεται με αύξηση του κινδύνου κατά 7 φορές, ενώ σε γυναίκες και με τους δύο παράγοντες κινδύνου ο κίνδυνος εμφάνισης θρόμβωσης αυξάνει κατά 35 φορές. Ο αντίστοιχος κίνδυνος για τις ομόζυγες γυναίκες είναι κατά 100 φορές μεγαλύτερος. Στην ίδια μελέτη φαίνεται ότι η χρήση αντισυλληπτικών τρίτης γενεάς (progestagen desogestrel) συνδυάζεται με 2 φορές πιο μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης σε σχέση με αυτά της δεύτερης γενεάς, ενώ ο κίνδυνος είναι ακόμα πιο αυξημένος για τις γυναίκες φορείς της μετάλλαξης . Η αλληλεπίδραση μεταξύ FVL και αντισυλληπτικών πιθανότατα αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι και οι δύο παράγοντες κινδύνου οδηγούν σε αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C.

Υπό ερωτηματικό η αναγκαιότητα διερεύνησης για την μετάλλαξη FVL στις γυναίκες που πρόκειται να χρησιμοποιήσουν αντισυλληπτικά. (σχέση κόστους /ωφέλειας).

▪ *FVL & παράγοντες κινδύνου σχετιζόμενοι με την κύηση*

Ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης είναι 5 – 6 φορές μεγαλύτερος κατά την διάρκεια της κυήσεως, και ακόμη μεγαλύτερος κατά την περίοδο της λοχείας. Η μετάλλαξη FVL ανευρεθεί στο 20 – 46 % των γυναικών με φλεβική θρόμβωση σχετιζόμενη με την κύηση. Τα υπάρχοντα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η παρουσία FVL συνοδεύεται από αύξηση του κινδύνου για θρόμβωση 7 έως 16 φορές κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και της λοχείας. Σε εγκύους γυναίκες με FVL και μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης (G20210A) ο σχετικός κίνδυνος θρόμβωσης είναι 100 φορές μεγαλύτερος. Παρόλο που η παρουσία του FVL αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης στις έγκυες γυναίκες, ο πραγματικός κίνδυνος σε ασυμπτωματικές γυναίκες δεν είναι γνωστός. Προοπτική μελέτη που ήλεγξε μη επιλεγμένο πληθυσμό εγκύων γυναικών και τις παρακολούθησε καθ'όλη την διάρκεια της κυήσεως βρήκε θρομβωτικές επιπλοκές μόνο στο 1.1 % των φορέων FVL. Σε άλλη μεγάλη αναδρομική μελέτη 72000 μη επιλεγμένων εγκύων γυναικών, ο πιθανός κίνδυνος για φλεβική θρόμβωση κατά την διάρκεια της κυήσεως και της λοχείας στις γυναίκες φορείς FVL υπολογίσθηκε στο 1 στις 400 – 500 εγκυμοσύνες .

Τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν ότι η πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης, σχετιζόμενης με την παρουσία του FVL, κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι μικρή γεγονός που δεν δικαιολογεί τον έλεγχο ρουτίνας για την συγκεκριμένη μετάλλαξη σε όλες τις έγκυες γυναίκες.

▪ *FVL & καθ'έξην αποβολές*

Σοβαρές μαιευτικές επιπλοκές συμβαίνουν στο 1 – 5 % των εγκύων γυναικών , μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται υποτροπιάζουσες αποβολές, προεκλαμψία, αποκόλληση πλακούντα. Οι υποτροπιάζουσες αποβολές είναι μία γνωστή επιπλοκή του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, και πιστεύεται ότι οφείλεται σε μικροθρομβώσεις των αγγείων του πλακούντα, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση εμφράκτων.

Τα τελευταία χρόνια κληρονομικοί παράγοντες κινδύνου μεταξύ των οποίων και ο FVL έχουν συνδεθεί με υποτροπιάζουσες αποβολές καθώς και με άλλες μαιευτικές επιπλοκές. Τουλάχιστον 16 μελέτες βρήκαν σε υψηλά ποσοστά την παρουσία της μετάλλαξης FVL μεταξύ γυναικών με ανεξήγητες πολλαπλές αποβολές (30 %) συγκρινόμενες με ομάδα ελέγχου όπου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 1 – 10 % .Σε άλλη μεγάλη μελέτη γυναικών με θρομβοφιλία (συμπεριλαμβανομένων και 141 με FVL), οι φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης είχαν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο of stillbirth , χωρίς όμως να υπάρχει

αυξημένος κίνδυνος αποβολών πριν την 28 εβδομάδα. Γυναίκες ομόζυγες για την μετάλλαξη FVL έχουν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο αποβολής σε σχέση με τις ετερόζυγες γυναίκες. Τα υπάρχοντα μέχρι σήμερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι FVL αποτελεί έναν μετρίου βαρύτητας παράγοντα κινδύνου για πολλαπλές αποβολές και πιθανά και για άλλες μαιευτικές επιπλοκές. Γυναίκες με FVL έχουν 2 έως 3 φορές μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο για αποβολές κυρίως στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης, ο ακριβής όμως κίνδυνος δεν είναι ακόμη γνωστός και χρειάζονται μεγαλύτερες μελέτες.

Επειδή η πιθανότητα μιας επιτυχούς εγκυμοσύνης είναι ακόμα υψηλή και επειδή οι περισσότεροι φορείς FVL δεν θα αναπτύξουν ποτέ κάποια μαιευτική επιπλοκή ο έλεγχος ρουτίνας για FVL των εγκύων γυναικών δεν θεωρείται αναγκαίος. Ο έλεγχος θεωρείται δικαιολογημένος σε επιλεγμένες γυναίκες με ανεξήγητες αποβολές του 2ου και 3ου τριμήνου χωρίς άλλη εμφανή αιτία.

2.2.2.5. Αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C χωρίς FVL

1. Περιγράφονται ασθενείς με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια οι οποίοι παρουσιάζουν αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C χωρίς αυτή να οφείλεται στον παράγοντα Leiden. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι μειωμένη απάντηση στην APC συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αγγειακών εγκεφαλικών, ανεξαρτήτως της παρουσίας του παράγοντα Leiden.

2. Σε μελέτη case control που περιελάμβανε 474 ασθενείς με πρώτο επεισόδιο εν τω βάθι φλεβοθρόμβωσης και 474 controls, και από τις δύο ομάδες αποκλείστηκαν οι φορείς της μετάλλαξης Leiden, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της ευαισθησίας της APC και του κινδύνου για θρόμβωση. Η μειωμένη απάντηση στην APC αντιπροσώπευε παράγοντα κινδύνου (odds ratio for the lowest quartile was 2.5) [A reduced sensitivity for activated protein C in absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. Bertina RM et al. Blood 1999;93:1271-1276]

3. Σε μελέτη με πάνω από 14.000 μετέχοντες, οι οποίοι δεν είχαν τον παράγοντα V Leiden (Vicenza Thrombophilia and Atherosclerosis Project) το adjusted odds ratio για την εμφάνιση εν τω βάθι φλεβοθρόμβωσης ήταν 1.8 σε αυτούς με φαινοτυπική αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C [Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. Ann Intern Med. 1999;130:643 – 650]

2.2.2.6. Άλλες μεταλλάξεις του παράγοντα V & θρομβοφιλία

Σε ασθενείς με ιστορικό θρόμβωσης έχουν περιγραφεί και διάφορες άλλες μεταλλάξεις κυρίως στη θέση Arg306 του παράγοντα V, όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση της

Arg 306 με Θρεονίνη (παράγων V Cambridge) ή με γλυκίνη (Hong Kong). Η κλινική σημασία αυτής της τελευταίας μετάλλαξης είναι αβέβαιη αφού μπορεί να μην συνδυάζεται με αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Εμφανίζεται δε αρκετά συχνά τόσο σε υγιείς Κινέζους αιμοδότες όσο και σε ασθενείς με θρόμβωση (4,5 % και 4,7% αντίστοιχα). Απ'ότι φαίνεται η δυνατότητα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C να απενεργοποιεί τον παράγοντα Va δεν επηρεάζεται στην περίπτωση της αντικατάστασης με Gly306 ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση της αντικατάστασης με Thr 306 , που φαίνεται ότι οδηγεί σε αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C .

2.2.2.7. Μετάλλαξη προθρομβίνης G20210A

Η μετάλλαξη της προθρομβίνης ανακαλύφθηκε το 1996 από τον Poort και συνεργάτες του και αποτελεί μία σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας και επιδημιολογίας της θρομβοφιλίας. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την προθρομβίνη έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 11. Η μετάλλαξη οφείλεται σε μετάθεση G στην A στη θέση 20210 της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου .Στην Ευρώπη η μετάλλαξη ανευρίσκεται στο 2 % του γενικού πληθυσμού (0,7% έως 4.0%) . Η υψηλότερη συχνότητα βρίσκεται στις περιοχές της νότιας Ευρώπης. Η μετάλλαξη είναι ασυνήθης στους Αφροαμερικάνους (0,2%) και σπάνια στους Ασιάτες (43).

Θεωρείται ότι ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της θρόμβωσης σε αυτή την περίπτωση οφείλεται στην υπερπροθρομβιναιμία. Πρόσφατη μελέτη [Nat Genet.2001;28:389-392] αποδεικνύει ότι η μετάλλαξη G –A έχει σαν συνέπεια την συσσώρευση αγγελιαφόρου RNA και αυξημένη σύνθεση προθρομβίνης. Η υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της φλεβικής θρόμβωσης επιβεβαιώνεται από μελέτες των Butenas και συνεργάτες [Blood 1999;94:2169 – 2178], οι οποίοι αποδεικνύουν ότι αύξηση των επιπέδων της προθρομβίνης στο 150% οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση θρομβίνης. Άλλοι πάλι υποστηρίζουν ότι αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης μπορούν να αναστείλουν την απενεργοποίηση του Va από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C με αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρομβίνης.

▪ Μετάλλαξη προθρομβίνης & φλεβική θρόμβωση

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό τη συσχέτιση της μετάλλαξης με την εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης. Ο Poort και συνεργάτες αναφέρουν ότι η μετάλλαξη αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης κατά τουλάχιστον 3 φορές. Πολλές άλλες μελέτες εκτιμούν ότι ο σχετικός κίνδυνος αυξάνεται μεταξύ 2 με 12.Υπάρχουν όμως προς το παρόν λίγες προοπτικές μελέτες που να επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη αποτελεί έναν όχι και τόσο

ισχυρό παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση και σε καμιά περίπτωση δεν είναι τόσο ισχυρός όσο στην περίπτωση της ανεπάρκειας πρωτεΐνης C και S και πιθανά ακόμα και αυτής του FVL

- *Συνύπαρξη μετάλλαξης προθρομβίνης με άλλες αιτίες θρομβοφιλίας & φλεβική θρόμβωση*

Παρόλο που η μετάλλαξη της προθρομβίνης αποτελεί έναν όχι και τόσο ισχυρό παράγοντα κινδύνου για φλεβική θρόμβωση φαίνεται που ο συνδυασμός με άλλα αίτια θρομβοφιλίας αυξάνει κατά πολύ την πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης. Η πιο καλά μελετημένη συνύπαρξη είναι με αυτή του παράγοντα Leiden. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η συνύπαρξη Leiden και μετάλλαξη προθρομβίνης αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι η συνύπαρξη αυξάνει τον κίνδυνο για υποτροπή μετά το πρώτο επεισόδιο θρόμβωσης, γεγονός που ενδεχομένως επιβάλλει τον παράλληλο έλεγχο και για τις δύο μεταλλάξεις σε συμπτωματικούς ασθενείς.

Υπάρχουν επίσης αναφορές και για την συνύπαρξη με υπερομοκυταιϊναιμία, όπου άλλες μελέτες θέλουν να αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης ενώ άλλες μελέτες αδυνατούν να το επιβεβαιώσουν. Προοπτική μελέτη των Key & McGlennen δηλώνει ότι είναι μάλλον απίθανο η συνύπαρξη των δύο παραγόντων να αυξάνει τον κίνδυνο για θρόμβωση.

Η συνύπαρξη της μετάλλαξης της προθρομβίνης με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, S και αντιθρομβίνης είναι δύσκολο να μελετηθεί, λόγω της σπάνιας εμφάνισης τους. Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα.

- *Μετάλλαξη προθρομβίνης και κύηση*

Όπως και στην περίπτωση του παράγοντα Leiden έτσι και στην περίπτωση της μετάλλαξης της προθρομβίνης ο κίνδυνος για φλεβική θρόμβωση στις έγκυες γυναίκες καθώς και κατά τη λήψη αντισυλληπτικών, φαίνεται να αυξάνει. Οι Martinelli και συνεργάτες αναφέρουν ότι ο σχετικός κίνδυνος εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης αυξάνει κατά 16.3 φορές στις γυναίκες με μετάλλαξη της προθρομβίνης που κάνουν χρήση αντισυλληπτικών σε σύγκριση με γυναίκες χωρίς τη μετάλλαξη και χωρίς να κάνουν χρήση αντισυλληπτικών. Η ίδια ομάδα αναφέρει 149 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών στις γυναίκες που παίρνουν αντισυλληπτικά και είναι φορείς της μετάλλαξης. Ο κίνδυνος για φλεβική θρόμβωση φαίνεται μεγαλύτερος κατά τους πρώτους 6 – 12 μήνες της αγωγής.

- *Μετάλλαξη προθρομβίνης & αρτηριακή θρόμβωση*

Η αρτηριακή θρόμβωση είναι στενά συνδεδεμένη με την ρήξη της αρτηριοσκληρυντικής πλάκας. Παρόλο που, κλασσικά θεωρείται ότι ο θρόμβος σε αυτό το σημείο είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια, η αποτελεσματικότητα της αγωγής με ηπαρίνη και ανασταλτές της

θρομβίνης στην στεφανιαία νόσο αποδεικνύει τη συμμετοχή σε σημαντικό βαθμό και του μηχανισμού της πήξης. Έτσι πιθανολογείται ότι η μετάλλαξη της προθρομβίνης ενδεχόμενα να μπορεί να παίξει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της αρτηριακής θρόμβωσης. Υπάρχουν μελέτες που υποδηλώνουν ότι η μετάλλαξη μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη εμφάνιση αθηροσκληρυντικής νόσου ιδιαίτερα όταν καταλήγει σε έμφραγμα του μυοκαρδίου. Δεν συμφωνούν όμως όλες οι μελέτες με αυτά τα ευρήματα. Συζητιέται η πιθανή συνέργια της μετάλλαξης με άλλους επίκτητους παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα και η υπέρταση.

2.2.2.8. Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης

Η αντιθρομβίνη (AT) είναι ο σημαντικότερος φυσιολογικός ανασταλτής της αιμόστασης. Κατατάσσεται στην υπερ-οικογένεια των ανασταλτών του τύπου των σερπινών (serpin protease inhibitors - serpins). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της, έχει ταυτοποιηθεί στο χρωμόσωμα 1 (q23 - 25). Η AT παράγεται στο ήπαρ , δεν αποτελεί όμως πρωτεΐνη οξείας φάσεως και η σύνθεση της δεν επηρεάζεται από τη φλεγμονώδη απάντηση. Αναστέλλει τις ακόλουθες πρωτεάσες (ενεργοποιημένους παράγοντες της πήξης) : FIIa, Fxa, FIXa, FVIIa, FXIa, FXIIa. Η ανασταλτική δράση της AT είναι σχετικά πιο αργή σε σχέση με τις άλλες σερπίνες, όμως η παρουσία της ηπαρίνης και των πολυσακχαριτών (θειϊκή ηπαράνη, πρωτεογλυκάνες κ.λ.π) επιταχύνει έως και 1000 φορές το ρυθμό αναστολής για τις περισσότερες πρωτεάσες.

▪ Κληρονομική ανεπάρκεια

Η ανεπάρκεια AT κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα, παρόλα αυτά παρουσιάζει κάποια γενετική ετερογένεια (44) . Παρουσιάζεται σχεδόν αποκλειστικά σαν ετερόζυγος κατάσταση, η ομόζυγη μορφή είναι πολύ σπάνια και συνήθως θανατηφόρα εμφανιζόμενη ως θρόμβωση στο νεογνό. Έχουν περιγραφεί ασθενείς με ομόζυγο έλλειψη AT , που αφορά την θέση δέσμευσης με την ηπαρίνη(τύπος IIb). Αυτοί παρουσιάζονται με θρόμβωση κατά την νεογνική ή και παιδική ηλικία, και μπορεί να εμφανίσουν είτε αρτηριακή είτε φλεβική θρόμβωση (45). Οι περισσότεροι από τους ετεροζυγώτες (> 50 %) έχουν ένα θρομβωτικό επεισόδιο γύρω στην ηλικία των 30 ετών .

Τελευταίες μελέτες αναφέρουν τη συχνότητα εμφάνισης κληρονομικής ανεπάρκειας AT περίπου στο 2 % των ασθενών με φλεβική θρόμβωση (από 1–8%). Η ανεπάρκεια συνδέεται με την εμφάνιση σχεδόν αποκλειστικά φλεβικής θρόμβωσης , είτε με την μορφή της εν τω βάθη φλεβικής θρόμβωσης των κάτω άκρων , πνευμονικής εμβολής, ή φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις όπως : κάτω κοίλη φλέβα, μεσεντέριος, νεφρική ή εγκεφαλικές φλέβες. Συχνά η φλεβική θρόμβωση εμφανίζεται αυτόματα αλλά

μπορεί και να συνδυάζεται με εγκυμοσύνη , λοίμωξη και χειρουργική επέμβαση. Παράλληλα με τις "κλασσικές " μορφές εμφάνισης (φλεβοθρόμβωση) η ανεπάρκεια AT μπορεί να εκδηλωθεί σαν αντίσταση στην ηπαρίνη. Η συσχέτιση της ανεπάρκειας AT με αρτηριακές θρομβώσεις είναι αβέβαιη.

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες ταξινομήσεις της ανεπάρκειας AT όμως η πιο αποδεκτή είναι αυτή που προτάθηκε το 1977 από την βάση δεδομένων μεταλλάξεων της αντιθρομβίνης (46). Διακρίνουμε :

Ανεπάρκεια τύπου I : παράλληλη έκπτωση βιολογικής και αντιγονικής δραστηριότητας της AT περίπου στο 50%. Έχουν καταγραφεί 80 σημειακές μεταλλάξεις, περίπου 30 frameshift deletions or insertions και 12 ολικές ελλείψεις του γονιδίου.

Ανεπάρκεια τύπου II : χαρακτηρίζεται από φυσιολογική αντιγονική δραστηριότητα, με μειωμένη όμως βιολογική δραστηριότητα λόγω δυσλειτουργικής πρωτεΐνης. Στο 40% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση και ανεπάρκεια AT, βρίσκεται ανεπάρκεια τύπου II. Παρόλα αυτά σε ασυμπτωματικό αιμοδοτικό πληθυσμό που βρέθηκε ανεπάρκεια AT, το 88% παρουσίαζε ανεπάρκεια τύπου II.

Αυτός ο τύπος διακρίνεται περαιτέρω σε 3 υποκατηγορίες :

- Τύπος II a : διαταραχή του ενεργού κέντρου (**Reactive Site**)
- Τύπος IIb : διαταραχή στη θέση σύνδεσης με την ηπαρίνη (**Heparin Binding Site**).

Αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν σε χαμηλότερα ποσοστά θρομβωτικά επεισόδια (6%) συγκρινόμενοι με τους ασθενείς με ανεπάρκεια τύπου I ή τύπου II a. Επιπλέον ασθενείς ομοζυγώτες για τον τύπο IIb εμφανίζουν τόσο φλεβικές όσο και αρτηριακές θρομβώσεις

- Τύπος IIc : χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις με πλειοτροπική επίδραση (**Pleiotropic Effect**), είναι ενδιαφέρον ότι τέτοιες μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται από μειωμένα επίπεδα της μεταλλαγμένης αντιθρομβίνης στο πλάσμα, τα οποία μπορεί να οφείλονται σε μειωμένη σύνθεση και έκκριση καθώς και σε αυξημένο καταβολισμό.

- *Επίκτητη ανεπάρκεια*

Πολλές κλινικές καταστάσεις συνοδεύονται από επίκτητη ανεπάρκεια AT. Διακρίνουμε δύο μεγάλες κατηγορίες : μειωμένη σύνθεση, αυξημένη κατανάλωση.

Μειωμένη σύνθεση : ηπατική νόσος, προωρότης, φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, εκτεταμένα εγκαύματα

Αυξημένη κατανάλωση : διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (σήψη, shock), οξεία μετά μετάγγιση αιμόλυση, θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, κακοήθειες, θεραπεία με L-asparaginase, οξέα θρομβωτικά επεισόδια.

Κατά την θεραπεία με ηπαρίνη μπορεί να βρεθούν χαμηλά επίπεδα αντιθρομβίνης (σχηματισμός συμπλέγματος TAT και αδρανοποίηση της AT). Παρόλα αυτά είναι ασύνηθες τα επίπεδα της AT να πέσουν κάτω από 50 - 60 % κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

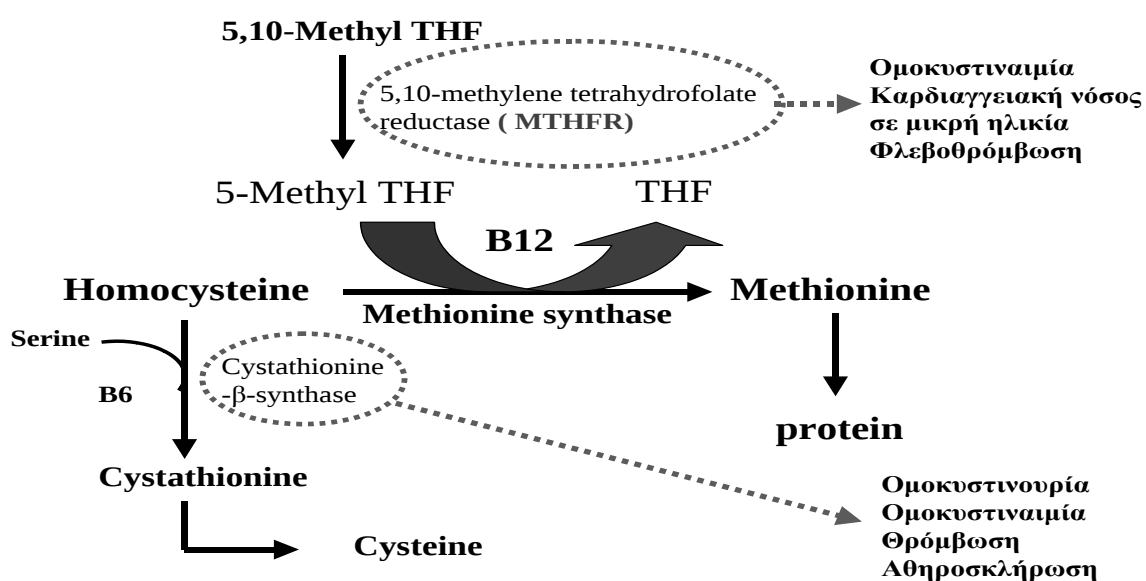
Επίσης έχει παρατηρηθεί απώλεια , μέσω των ούρων, AT σε ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο. Υπάρχουν πολλές ακόμη καταστάσεις που συνοδεύονται από μικρότερου βαθμού ανεπάρκεια AT, αλλά η συσχέτιση τους με θρόμβωση είναι αμφίβολη.

Τέτοιες καταστάσεις περιλαμβάνουν : λοιμώξεις, αγγειίτιδα, αιμοδιάλυση, απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος, δρεπανοκυτταρική νόσος / μεσογειακή, πλασμαφαίρεση ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται υποκατάσταση με λευκωματίνη .

Αυξημένα επίπεδα αντιθρομβίνης παρατηρούνται κατά την εμμηνόπαυση και κατά τη θεραπεία με υψηλές δόσεις αντισυλληπτικών. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι τα επίπεδα αυξάνονται κατά τη θεραπεία με αντιπηκτικά από το στόμα .

2.2.2.9. Υπερομοκυστειναιμία (HHC)

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ με σουλφυδριλική ομάδα , το οποίο σχηματίζεται κατά την μετατροπή της Μεθιονίνης σε Κυστεΐνη . Ο μεταβολισμός της Ομοκυστεΐνης γίνεται μέσω της οδού της διασούλφωσης ώστε να σχηματισθεί κυσταθιόνη ή μέσω της μεταβολικής οδού της επαναμεθυλίωσης ώστε να σχηματισθεί Μεθιονίνη . Κληρονομικές ανεπάρκειες των απαραίτητων ενζύμων που παρεμβαίνουν στον μηχανισμό είτε της επαναμεθυλίωσης είτε της διασούλφωσης έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της Ομοκυστεΐνης στο αίμα. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορούν να έχουν και επίκτητες ανεπάρκειες (π.χ. κοβαλαμίνη)



Ο όρος ομοκυστειναιμία αναφέρεται σε ομάδα διαταραχών με κλινικές και βιοχημικές διαφορές, οφείλεται δε σε έλλειψη ή ελλιπή δραστικότητα κάποιου από τα ένζυμα ή συνένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό της μεθειονίνης αρχικά και της ομοκυστεΐνης (HC) στην συνέχεια. Κοινό χαρακτηριστικό είναι η συσσώρευση ομοκυστίνης στα ούρα και ομοκυστεΐνης στο αίμα. Η ομοκυστινουρία ανευρίσκεται με συχνότητα περίπου 1 στους 200.000 – 300.000 στον γενικό πληθυσμό και οφείλεται κατά 90 – 95 % των περιπτώσεων σε ομόζυγο ανεπάρκεια της κυσταθειονίνο-β-συνθετάσης (CBS). Η ετερόζυγος μορφή της ανεπάρκειας ανευρίσκεται σε ποσοστό 0,3 – 1,0 % του γενικού πληθυσμού. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της CBS εδράζεται στο χρωμόσωμα 21q. Το άλλο ένζυμο που παρεμβαίνει στον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης είναι η αναγωγή του μεθυλεντετραϋδροφολικού οξέος (MTHFR). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση του εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p36. Βαριά ανεπάρκεια του MTHFR σαν αιτία ομοκυστινουρίας είναι πολύ σπάνια. Έχει περιγραφεί μετάλλαξη, με αποτέλεσμα θερμοευσαισθησία της αναγωγής (MTHFR), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μέτρια αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και η οποία εμφανίζεται αρκετά συχνά. Περίπου 12% του πληθυσμού των Ηνωμένων Πολιτειών φέρει αυτή την μετάλλαξη , ενώ μέτρια υπερομοκυσταϊναιμία είναι χαρακτηριστική εκδήλωση χαμηλών τιμών φυλλικού .Προσφάτως έχουν περιγραφεί και άλλες μοριακές βλάβες στο επίπεδο του MTHFR και των άλλων ενζύμων που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης , η κλινική τους όμως σημασία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η υπερομοκυσταϊναιμία μπορεί να ταξινομηθεί :

- Μέσης βαρύτητας : επίπεδα ομοκυστεΐνης 15 – 30 $\mu\text{mol} / \text{L}$
- Ενδιάμεσης βαρύτητας : 31 – 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$
- Βαρεία > 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$

▪ *Υπερομοκυστειναιμία & θρόμβωση*

Εδώ και 40 χρόνια η παρουσία ομοκυστινουρίας έχει συνδεθεί με αυξημένη επίπτωση αθηροθρομβωτικής καρδιαγγειακής νόσου (CVD) αλλά και θρομβοεμβολικής (VTE) νόσου (47). Περίπου το 25 % των ασθενών θα έχουν ένα θρομβωτικό επεισόδιο στην ηλικία των 16 ετών και ένα 50% στην ηλικία των 29 ετών. Αυτά τα ευρήματα κατεύθυναν την έρευνα και προς τις ηπιότερες μορφές υπερομοκυσταϊναιμίας και τη διερεύνηση του ρόλου που ενδεχομένως παίζουν αναφορικά με την ανάπτυξη CVD & VTE.Αποτέλεσμα αυτών των ερευνών ήταν σήμερα να είναι αποδεκτό ότι η υπερομοκυσταϊναιμία αποτελεί παράγοντα κινδύνου τόσο για την αθηροθρομβωτική καρδιαγγειακή νόσο όσο και για την φλεβική θρόμβωση, γεγονός που την διαφοροποιεί από τις άλλες θρομβοφιλικές διαταραχές.

Παρόλα αυτά ο βαθμός συσχέτισης της υπερομοκυσταϊναιμίας με την CVD και VTE ποικίλλει ανάλογα με την μελέτη, ενώ δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί ο ρόλος της υπερομοκυσταϊναιμίας (48). Στην CVD πάνω από 30 αναδρομικές μελέτες έχουν βρει συσχέτιση της νόσου με την υπερομοκυσταϊναιμία. Το ίδιο ισχύει και για την VTE παρόλο που έχουν γίνει λιγότερες μελέτες (49). Αυτό όμως που γίνεται φανερό είναι ότι όλες αυτές οι μελέτες δεν μπορούν να διακρίνουν σαφώς εάν η υπερομοκυσταϊναιμία είναι η αιτία ή το τελικό αποτέλεσμα της CVD ή της VTE (50). Αυτή η αβεβαιότητα επιτείνεται με την παρατήρηση ότι τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης μπορούν να αυξηθούν άγνωστο για πόσο διάστημα μετά από ένα οξύ θρομβωτικό επεισόδιο. Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι διφασικό με μία αρχική πτώση των επιπέδων ακολουθούμενη από παρατεταμένη αύξηση η οποία μπορεί να διαρκέσει μέχρι 6 μήνες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου και για πάνω από ένα έτος στην περίπτωση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Δεν είναι γνωστό εάν το ίδιο ισχύει και για την VTE, πρόδρομα αποτελέσματα της μελέτης LITE (Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology) αναφέρουν ότι ούτε τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, ούτε η ομοζυγωτία C677T στο γονίδιο MTHFR αποτελούν παράγοντες κινδύνου για το πρώτο επεισόδιο φλεβικής θρόμβωσης, το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των υποτροπιαζόντων επεισοδίων, όπου συνδέονται με τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στον γενικό πληθυσμό (51). Χρειάζονται ακόμη πολλές μελέτες προκειμένου να καταδειχθεί η ακριβής σχέση της ομοκυστεΐνης με της υποτροπές της φλεβικής θρόμβωσης. Ακόμη ένας παράγοντας που δυσκολεύει τη ερμηνεία των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης και τη συσχέτιση τους με την CVD είναι το γεγονός ότι μπορούν να αυξηθούν δευτερογενώς σε καταστάσεις που συνδέονται με CVD όπως κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, ανεπάρκεια βιταμινών, νεφρική δυσλειτουργία, έλλειψη φυσικής άσκησης, φύλο (άνδρες και μετά-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες). Πάντως μελέτες που έλαβαν όλους αυτούς του παράγοντες υπόψη τους, συνεχίζουν να θεωρούν την ομοκυστεΐνη σαν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου τουλάχιστον για την CVD. Οι προοπτικές μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την ομοκυστεΐνη σαν παράγοντα κινδύνου στη CVD και VTE είναι σαφώς λιγότερες. Η ετυμηγορία για το εάν η υπερομοκυσταϊναιμία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την αθηρωθρομβωτική νόσο δεν έχει ακόμη κριθεί. Πρόσφατη μετα- ανάλυση υποδηλώνει το περισσότερο μια ασθενή συσχέτιση. Αναφορικά με την VTE οι μελέτες είναι ακόμη λιγότερες. Οι Ridker και συνεργάτες βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ υπερομοκυστεΐναιμίας και ιδιοπαθούς φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου, παρόμοια οι Eichinger και συνεργάτες απέδειξαν ότι στους ασθενείς με υπερομοκυστεΐναιμία υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος υποτροπής VTE.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν το ενδεχόμενο η υπερομοκυστεϊναιμία να προδιαθέτει σε CVD όσο και σε VTE τους ίδιους ασθενείς , όπως θα φαινόταν λογικό εφόσον υπάρχουν σαφείς αναφορές για τον καταλυτικό ρόλο της ομοκυστεϊνης στην εμφάνιση και των δύο νοσημάτων .

ΠΙΘΑΝΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Δράση στο ενδοθήλιο

Η αυτοοξειδωση της ομοκυστεϊνης διεγείρει την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου περιλαμβανομένων των ανιόντων υπεροξειδίου, και των ριζών υδροξυλίου, αυτές με την σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν στην υπεροξειδωση τόσο των LDL όσο και της ενδοθηλιακής μεμβράνης.

Οι αντιθρομβωτικές ιδιότητες του ενδοθηλίου μεταβάλλονται μετά από έκθεση σε ομοκυστεϊνη μέσω της ενεργοποίησης παράγοντα V, μείωση της έκφρασης του υποδοχέα της θρομβομοντουλίνης , καταστολή της σύνθεσης ηπαρινοειδών , καταστολή του ινωδολυτικού μηχανισμού στο επίπεδο της επιφάνειας των κυττάρων, σύνθεση ιστικού παράγοντα. Πρόσφατα έχουν περιγραφεί και προφλεγμονώδεις αλλαγές στο επίπεδο του ενδοθηλίου , όπως η έκφραση μορίων προσκόλλησης -1 (VCAM-1).Δεν έχει ξεκαθαρισθεί εάν όλες αυτές οι τροποποιήσεις των αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων του ενδοθηλίου έχουν σημασία in vivo, καθώς υπάρχουν κάποιες διαφορές μεταξύ των υποτιθέμενων μηχανισμών και των ευρημάτων σε ασθενείς.

Για παράδειγμα έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (και όχι μειωμένα όπως θα περίμενε κανείς) στους ασθενείς με υπερομοκυστεϊναιμία.

Δράση στα λεία μυϊκά κύτταρα

In vitro έκθεση των λείων μυϊκών κυττάρων σε ομοκυστεϊνη έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους καθώς και αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση κολλαγόνου.

Δράση στο σύστημα της πήξης

Η υπερομοκυστεϊναιμία προάγει την σύνθεση ιστικού παράγοντα από τα μονοκύτταρα. Μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και παραγωγή θρομβοξάνης A₂Πρόσφατ έχει αναφερθεί ότι η ομοκυστεϊνη μπορεί να τροποποιεί το μόριο του παράγοντα V και μάλιστα κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο , καθιστώντας τον αδρανή έναντι της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Κατά πόσον αυτή η μορφή επίκτητης αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C συμβαίνει και in vivo στους ασθενείς με υπερομοκυστεϊναιμία είναι κάτι που ακόμη δεν έχει απαντηθεί. Φαίνεται όμως ότι υπάρχει ισχυρή πιθανότητα μιας και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η συνύπαρξη FVLκαι υπερομοκυστεϊναιμίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου για VTE.

2.2.2.10. Δυσινωδογοναιμία

Με τον όρο δυσινωδογοναιμία εννοούμε διαταραχές της δομής του ινωδογόνου που μπορούν ή δεν μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικά μη φυσιολογικό ινωδογόνο. Αυτές οι διαταραχές μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες. Επίκτητες δυσινωδογοναιμίες συνδυάζονται με διάφορα ετερογενή νοσήματα κυρίως όμως με ηπατοπάθειες.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 350 περιπτώσεις οικογενειών με κληρονομική δυσινωδογοναιμία (52). Από αυτές έχει περιγραφεί το είδος της δομικής διαταραχής μόνο στις 150. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για σημειακές μεταλλάξεις. Δοθέντος ότι το μόριο του ινωδογόνου παίζει διπλό ρόλο συμμετέχοντας τόσο στους προπηκτικούς όσο και στους ινωδολυτικούς μηχανισμούς μπορεί κανείς να περιμένει ότι δυσλειτουργικό μόριο ινωδογόνου μπορεί να συνοδεύεται είτε από αιμορραγικές είτε από θρομβωτικές εκδηλώσεις. Από τις κληρονομικές δυσινωδογοναιμίες 55% είναι ασυμπτωματικές, 25% συνοδεύονται από αιμορραγική διάθεση ενώ το υπόλοιπο 20 % συνοδεύεται από θρομβώσεις με ή χωρίς αιμορραγία.

Πριν το 1995 υπήρχαν μόνο σποραδικές αναφορές σε περιστατικά με φλεβική θρόμβωση και κληρονομική δυσινωδογοναιμία. Το 1995 η International Society on Thrombosis and Haemostasis (Subcommittee on Fibrinogen) θέσπισε κριτήρια για την διάγνωση της κληρονομικής δυσινωδογοναιμίας (επηρεασμένες πηξιολογικές μέθοδοι ή ανεύρεση του παθολογικού ινωδογόνου με DNA ανάλυση) βάση των οποίων μελετήθηκαν 26 περιπτώσεις δυσινωδογοναιμίας με θρομβοφιλία παράλληλα με 187 συγγενείς τους (99 με δυσινωδογοναιμία και 88 χωρίς). Είκοσι από τους συγγενείς με δυσινωδογοναιμία παρουσίασαν θρομβωτικό επεισόδιο σε σύγκριση με κανένα από την ομάδα χωρίς δυσινωδογοναιμία. Αυτά τα ευρήματα έπεισαν την ομάδα εργασίας ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ μερικών μορφών δυσινωδογοναιμίας και φλεβικής θρόμβωσης (53, 54). Με σπάνιες εξαιρέσεις κληρονομούνται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα, παρόλα αυτά η συχνότητα θρόμβωσης βρέθηκε μεγαλύτερη στις γυναίκες, και οφείλεται κυρίως στην αυξημένη συχνότητα θρόμβωσης κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα κατά την περίοδο της λοχείας η μέση ηλικία εμφάνισης θρόμβωσης ήταν τα 27 έτη και αφορούσε κυρίως το φλεβικό σύστημα των κάτω άκρων. Οι κληρονομικές ανινωδογοναιμίες και δυσινωδογοναιμίες θεωρούνταν μέχρι σήμερα χωρίς οντότητες σήμερα όμως πιστεύεται ότι αποτελούν και αυτές μέρος των δυσινωδογοναιμιών μια και πολλές από αυτές οφείλονται σε δομικές ανωμαλίες του ινωδογόνου. Μεταξύ των ασθενών με μειωμένο λειτουργικά ινωδογόνο παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος αυτόματων αποβολών. Ενδιαφέρον προκαλεί

το γεγονός ότι διάφορες μεταλλάξεις του ινωδογόνου έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της κληρονομικής αμυλοείδωσης.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η δυσινωδογοναιμία αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης δεν είναι γνωστός και εξαρτάται από τη φύση του παθολογικού ινωδογόνου. Θεωρητικά ένα δυσλειτουργικό ινωδογόνο μπορεί να οδηγήσει σε θρόμβωση είτε λόγω αυξημένης τάσης δημιουργίας θρόμβων είτε λόγω ελαττωματικής λύσης των θρόμβων (ινωδόλυση). Ο Liu και συνεργάτες προτείνουν ότι η θρόμβωση μπορεί να οφείλεται σε ελαττωματική πρόσδεση θρομβίνης από το δυσλειτουργικό ινωδογόνο με συνέπεια τη συσσώρευση θρομβίνης. Ελαττωματική ινωδόλυση έχει επίσης αναφερθεί περιλαμβανομένης της αντίσταση στην λυτική δραστηριότητα της πλασμίνης και ελαττωματική πρόσδεση t-PA .Λίγες περιπτώσεις δυσινωδογοναιμίας έχουν συσχετισθεί άμεσα με θρόμβωση αυτές περιλαμβάνουν τα ινωδογόνα : Marbyrg, Caracas V, Pariw V, Chapel HillIII, Hannover II, Germany-k, New York I, Nigmegen, Ijmuiden, Christchurch II, Christchurch III, London VII,Vlissingen/Frankfurt IV, Melun, Milano III.Παρόλο που έχει γίνει μεγάλη πρόοδος γύρω από τις δυσινωδογοναιμίες δεν έχει ξεκαθαρισθεί απόλυτα πώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη θρομβοφιλίας.

- *Επίκτητες δυσινωδογοναιμίες*

Συναντιόνται πιο συχνά στις ηπατοπάθειες. Οι Francis και Armstrong βρήκαν στοιχεία δυσινωδογοναιμίας στο 80 – 90 % των ασθενών με διάφορες μορφές ηπατικής νόσου. Τις περισσότερες φορές η δυσινωδογοναιμία που συνοδεύει ηπατοπάθειες χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινωδογόνου με αυξημένη ποσότητα σιαλικού οξέως , αυτό έχει σαν συνέπεια ελαττωματικό πολυμερισμό της ινικής .

Έχουν περιγραφεί επίσης σε καρκίνωμα νεφρού, αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών, και με τη χρήση φαρμάκων όπως Μυθραμυκίνη, ισορετινικό και L-ασπαραγινάση. Λίγες περιπτώσεις επίκτητης δυσινωδογοναιμίας έχουν συσχετισθεί με θρομβοφιλία.

2.2.2.11.Αυξημένα επίπεδα παραγόντων

Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα παραγόντων πήξεως σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για θρόμβωση. Αυξημένα επίπεδα των παραγόντων II, VIII,IX και XI είχαν αρχικά συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης, ενώ αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου παράγοντα V,VII von Willebrand είχαν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αρτηριακών θρομβώσεων.

Δεν έχει γίνει ακόμα γνωστό εάν ο αυξημένος παράγοντας είναι από μόνος του η αιτία του αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης ή αποτελεί μία απάντηση σε άλλες αιτίες που προς το παρόν παραμένουν άγνωστες. Επιπλέον για πολλούς από τους παράγοντες δεν είναι

γνωστό ποιές αυξήσεις οφείλονται σε πολυμορφισμούς αυτού καθεαυτού του γονιδίου του παράγοντα ή άλλων ρυθμιστικών παραγόντων. Δεν έχει ακόμα ξεκαθαρισθεί γιατί ορισμένοι παράγοντες σχετίζονται περισσότερο με φλεβική θρόμβωση και άλλοι με αρτηριακή.

▪ **Αύξηση Ινωδογόνου**

Το Ινωδογόνο είναι μια διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συντίθεται αποκλειστικά στο ήπαρ. Το ινωδογόνο τροποποιείται από τη δράση της θρομβίνης έτσι ώστε να παραχθούν μονομερή ινικής, τα οποία αποτελούν το κυρίαρχο συστατικό του θρόμβου ινικής.

Αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου έχουν προταθεί ως δυνητικά θρομβοφιλικό παράγοντες κινδύνου (55), ενώ έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί του ινωδογόνου που οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα. Τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου θεωρητικά προάγουν το σχηματισμό θρόμβου μεταβάλλοντας την κινητική του συστήματος πήξης οδηγώντας σε αυξημένο σχηματισμό ινικής, ενισχύουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων αυξάνοντας τη σύνδεση τους με τους υποδοχείς IIb/IIIa, αυξάνει την οσμωτικότητα του πλάσματος. Επιπλέον το ινωδογόνο διεγείρει τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων και λειτουργεί ως πρωτεΐνη οξείας φάσεως.

Αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου έχουν ισχυρή συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκληρυντικής νόσου. Υπερινωδογοναιμία συσχετίζεται όμως και με πολλούς άλλους παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου όπως το κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης. Σε αυτές της συνθήκες το ινωδογόνο μπορεί να παίζει το ρόλο του άμεσου μεσολαβητή της αρτηριακής θρόμβωσης ή μπορεί απλά να αντιπροσωπεύει έναν δείκτη της υποκείμενης φλεγμονώδους διεργασίας.

Δεν είναι λοιπόν ξεκάθαρο εάν το ινωδογόνο αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την αρτηριακή θρόμβωση, έναν συνεργικό παράγοντα ή απλά έναν δείκτη της παρουσίας αθηροσκλήρυνσης, η οποία έτσι και αλλιώς θεωρείται σαν μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση.

Η υπερिनωδογοναιμία έχει προταθεί να παίζει κάποιο ρόλο και στην φλεβική θρόμβωση, όμως τα υπάρχοντα στοιχεία είναι περιορισμένα.

▪ **Αυξημένος παράγοντας V**

Υποθετικά η αύξηση του παράγοντα V επιταχύνει τον μηχανισμό της πήξης με συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Δύο μελέτες έχουν αξιολογήσει τη σχέση μεταξύ αυξημένων επιπέδων παράγοντα V και του κινδύνου εμφάνισης θρόμβωσης:

α. Οι Redondo και συνεργάτες αναφέρουν ότι αυξημένη δραστηριότητα παράγοντα V συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Συνέκριναν τα επίπεδα παράγοντα V σε 200 επιζήσαντες από έμφραγμα του μυοκαρδίου με αυτά σε 100

υγιείς της ίδιας ηλικίας και ίδιου φύλου. Η μέση τιμή των επιπέδων του παράγοντα V ήταν 103% στους υγιείς έναντι 111% στους εμφραγματίες. Ασθενείς με επίπεδα πάνω από 109 % είχαν 3.3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο συγκρινόμενοι με ασθενείς με κάτω από 96% δραστηριότητα. Η συσχέτιση παρέμεινε και μετά τη διόρθωση για ηλικία, φύλο, κάπνισμα, σακχ.διαβήτη, διαταραχές λιπιδίων, υπέρταση και ινωδογόνο.

b. Οι Kamphuisen και συνεργάτες μέτρησαν επίπεδα αντιγόνου του παράγοντα V σε 474 ασθενείς με ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης μη σχετιζόμενο με την παρουσία κακοήθειας, έναντι 474 υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας και φύλου. Μέση τιμή των επιπέδων παράγοντα V ήταν 134% στους ασθενείς και 132% στην ομάδα ελέγχου. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του αντιγόνου παράγοντα V και φλεβικής θρόμβωσης.

▪ ***Αυξημένος παράγοντας VII***

Αυξημένα επίπεδα παράγοντα VII συναντώνται σε ασθενείς που κάνουν χρήση μερικών τύπων αντισυλληπτικών, εγκυμοσύνη, υπερλιπιδαιμία καθώς και στην παχυσαρκία και το γήρας. Το ενδιαφέρον για τον παράγοντα VII προέκυψε από την μελέτη του Northwick Park Heart Study. Αυξημένα επίπεδα παράγοντα VII που παρατηρήθηκαν κατά την είσοδο στην μελέτη παρουσίασαν ισχυρή συσχέτιση με θάνατο από ισχαιμική καρδιοπάθεια μέσα στα 5 πρώτα χρόνια από την είσοδο στην μελέτη (55). Ο αριθμός των θανατηφόρων επεισοδίων ήταν 2 με 3 φορές μεγαλύτερος για αυτούς που παρουσίασαν επίπεδα πάνω από 120 % .Τελευταίες όμως επιδημιολογικές μελέτες δεν θεωρούν τα αυξημένα επίπεδα παράγοντα VII σαν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου είτε για την αρτηριακή θρόμβωση είτε για την φλεβική.

▪ ***Αυξημένος παράγοντας VIII***

Αυξημένα επίπεδα παράγοντα VIII έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση θρόμβωσης. Αυξημένα επίπεδα παράγοντα VIII μπορεί να οφείλονται και σε επίκτητες καταστάσεις όπως στρες, χρόνια φλεγμονή, λήψη οιστρογόνων ή ακόμη λόγω κακής τεχνικής λήψης του δείγματος (56). Επίσης τα επίπεδα του παράγοντα VIII μπορεί να τροποποιούνται ανάλογα με την ομάδα αίματος, αυτοί που έχουν ομάδα αίματος O έχουν τιμές χαμηλότερες κατά 15% περίπου , σε σχέση με αυτούς της ομάδας A ή B. Οι Koster και συνεργάτες [Lancet 1995;21:152- 155] βρήκαν ότι τα επίπεδα του παράγοντα σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης. Άλλες μελέτες [Thromb Haemost.2000 ;83:5-9] απέδειξαν ότι η συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων παράγοντα VIII με τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης είναι ανεξάρτητη από δευτερογενείς αιτίες αύξησης όπως φλεγμονή . Οι Kyrle και συνεργάτες [N Engl J Med. 2000;343:457-462] βρήκαν ότι ο κίνδυνος υποτροπών φλεβικής θρόμβωσης μεταξύ 340 Αυστριακών ασθενών σχετίζεται με τα

επίπεδα του παράγοντα VIII. Η μελέτη όμως δεν καθόριζε τη χρονική στιγμή προσδιορισμού του παράγοντα VIII, οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η αύξηση να είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους απάντησης, η οποία να επηρεάζει και την έκβαση της μελέτης. Η συσχέτιση με τις αρτηριακές θρομβώσεις είναι πολύ πιο δύσκολο να αποδειχθεί λόγω της μειωμένης συχνότητας εμφάνισης τους (57). Επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι τα επίπεδα του παράγοντα VIII αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου τόσο για την αρτηριακή όσο και για την φλεβική θρόμβωση (58). Παραμένει ανοικτό το θέμα των υποτροπών και της ενδεχόμενης συσχέτισης τους με τα επίπεδα του παράγοντα.

▪ **Αυξημένος παράγοντας IX**

Ο παράγοντας IX είναι μι βιταμίνο –Κ εξαρτώμενη πρωτεΐνη η οποία συντίθεται στο ήπαρ. Ο παρ.IX ενεργοποιείται από τον παράγοντα VIIa ή τον παρ.Xia. Με την σειρά του αυτός μαζί με τον VIIIa ενεργοποιεί τον παράγοντα X.Μείωση του παράγοντα IX έχει σαν συνέπεια την επιβράδυνση του μηχανισμού πήξης οδηγώντας σε αύξηση του κινδύνου για αιμορραγία. Η αντίστοιχη αύξηση υποθετικά μπορεί να οδηγήσει σε επιτάχυνση του φαινομένου της πήξης, οδηγώντας σε αύξηση της πιθανότητας σχηματισμού θρόμβου. Δύο μελέτες αναφέρουν ότι υψηλά επίπεδα παράγοντα IX σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης.

▪ Στην πρώτη μελέτη (59) το αντιγόνο του παράγοντα IX προσδιορίσθηκε με τεχνική ELISA.Συγκρίθηκαν 426 ασθενείς με πρώτο επεισόδιο εν τω βάθι φλεβικής θρόμβωσης έναντι 473 υγιών της ίδιας ηλικίας και φύλου. Το 10 % από την ομάδα ελέγχου έναντι του 20 % της ομάδας των ασθενών είχαν υψηλά επίπεδα αντιγόνου IX (πάνω από 129%) και σχετικό κίνδυνο 2.3 (95% CI).Μετά τη διόρθωση για ηλικία, φύλο, χρήση αντισυλληπτικών, F.VIII, F.XI , και άλλους βιταμίνο-Κ εξαρτώμενους παράγοντες πήξεως , ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης ήταν 2.0 (95% CI). Ο συνδυασμός υψηλού παράγοντα IX και υψηλού παράγοντα VIII συσχετίζεται με αύξηση του σχετικού κινδύνου για φλεβική θρόμβωση στο 8.0

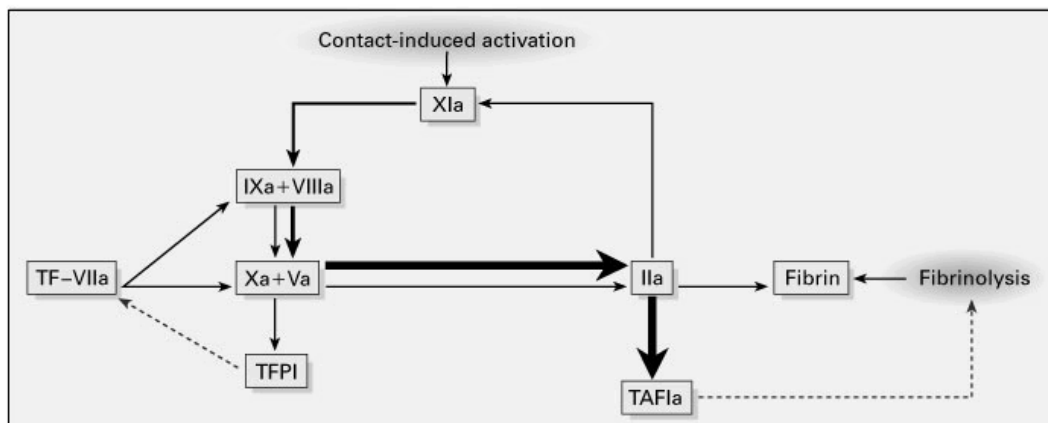
▪ Στη δεύτερη μελέτη (57) έγινε σύγκριση της δραστηριότητας του παράγοντα IX σε 66 γυναίκες με ιστορικό φλεβικής θρόμβωσης έναντι 163 υγιών. Η μέση τιμή του παράγοντα ήταν 150% στις γυναίκες με θετικό ιστορικό έναντι 138% στην ομάδα ελέγχου (p=.07). Όταν χρησιμοποιήθηκε όμως σαν cutoff το 150% , τότε τα επίπεδα του παράγοντα IX βρέθηκαν να συσχετίζονται με σχετικό κίνδυνο για φλεβική θρόμβωση 2.34 (95% CI).

▪ **Αυξημένος παράγοντας XI**

Ο παράγοντας XI συντίθεται στο ήπαρ και στα μεγακαρυοκύτταρα. Τα επίπεδα του στο πλάσμα κυμαίνονται στο 5 μg/ml (30nM).Λόγω του μεγάλου μεγέθους του μορίου του

εντοπίζεται στον ενδαγγειακό χώρο. Χρόνος ημίσειας ζωής στην κυκλοφορία 3 ημέρες. Αυξημένα επίπεδα παράγοντα XI βρέθηκαν σε 474 ασθενείς (κάτω των 70 ετών) με πρώτο επεισόδιο φλεβικής θρόμβωσης συγκρινόμενοι με ομάδα ελέγχου αντίστοιχης ηλικίας. Επίπεδα παράγοντα πάνω από 121% σχετίζονται με 2.2 φορές αύξηση του σχετικού κινδύνου για θρόμβωση. Παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του παράγοντα XI και του κινδύνου για θρόμβωση.

Ο παράγοντας XI αποτελεί μέρος του ενδογενούς μηχανισμού της πήξης(βλέπε σχήμα)



Μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* μετά από επαφή με θρομβογόνες επιφάνειες. Δεν είναι βέβαιο εάν αυτό ισχύει και *in vivo*. Ο παράγοντας XI μπορεί να ενεργοποιηθεί και από την θρομβίνη τόσο με την παρουσία όσο και χωρίς την παρουσία αρνητικών φορτισμένων επιφανειών. Μέσω μηχανισμού *feed back*, τα επίπεδα της θρομβίνης αυξάνονται πράγμα αναγκαίο τόσο για τον σχηματισμό ινικής όσο και για την προστασία έναντι του μηχανισμού της ινωδόλυσης. Η θρομβίνη ελέγχει αυτόν τον μηχανισμό ενεργοποιώντας τον TAFI (thrombin–activatable fibrinolysis inhibitor).

Μόλις ενεργοποιηθεί, αναστέλλει την ινωδόλυση (εμποδίζοντας την πρόσδεση και την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου). Η υπόθεση έχει ως εξής : λόγω των υψηλών επιπέδων παράγοντα XI , ο σχηματισμός θρομβίνης ενισχύεται , ενεργοποιείται ο TAFI με τελικό αποτέλεσμα της αναστολή της ινωδόλυσης και την εμφάνιση θρόμβωσης (60).

3. Νέες ρυθμιστικές πρωτεΐνες- Πρωτεΐνη Z

3.1 Γενικά στοιχεία

Η εκτίμηση ότι η θρομβοφιλία μπορεί να έχει κληρονομική βάση οδήγησε στην έρευνα για ενδεχόμενες γενετικές διαταραχές στο σύστημα της πήξης. Τα αρχικά αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά αφού εντόπισαν συγγενή βλάβη (έλλειψη ή δυσλειτουργία) στο 15% περίπου των ατόμων που εμφάνιζαν μεμονωμένες ή επαναλαμβανόμενες θρομβώσεις. Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό ακόμα ποσοστό παραμένει αδιευκρίνιστο ως προς την αιτιολογία. Όλο και περισσότερες μελέτες κάνουν εμφανές ότι η θρόμβωση είναι πολυπαραγοντική νόσος .

Η πρωτεΐνη Z (PZ) περιγράφηκε για πρώτη φορά στον άνθρωπο το 1984 (61) ως μία βιταμίνο-K εξαρτώμενη πρωτεΐνη του πλάσματος με MB 62-kd και δομή παρόμοια με αυτή των παραγόντων VII, IX,X καθώς και με αυτήν της πρωτεΐνης C (62, 63). Σε αντίθεση με αυτές τις πρωτεΐνες η PZ δεν αποτελεί ζυμογόνο των πρωτεασών της σερίνης καθότι σε αυτή απουσιάζουν τα αμινοξέα His και Ser της καταλυτικής τριάδας (64) . Αποτελείται από 360 αμινοξέα που περιέχουν 13-καρβοξυγλουταμικά (Gla) κατάλοιπα, 2 epidermal growth factor (EGF), και 1 serine protease domain(s). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της PZ εδράζεται στο χρωμόσωμα 13q34 εκεί όπου τα γονίδια των παραγόντων VII και X βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο, έχει μήκος 14 κιλοβάσεις και αποτελείται από 9 εξώνια.

Έχουν περιγραφεί διάφοροι κοινοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (65) , όμως δεν έχει γίνει ακόμη γνωστή η επίπτωση των διαφορετικών γονοτύπων, στην ευρεία διακύμανση των επιπέδων της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα.

Η πρωτεΐνη Z συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι περίπου 2,5 ημέρες και τα επίπεδα της σε αιμοδότες παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις, κυμαινόμενα μεταξύ 2,9 +/- 1,0μg/ml σε δείγματα πλάσματος με αντιπηκτικό EDTA (66) . Χαμηλά επίπεδα ανευρίσκονται στα νεογνά (67) και στους ασθενείς με χρόνια ηπατικά νοσήματα (68)

Η PZ βρέθηκε ότι διαφέρει από τους υπόλοιπους βιταμίνο-K εξαρτώμενους παράγοντες πήξεως σε δύο σημεία :

1. Σημαντικά καθυστερημένη δέσμευση /αποδέσμευση με /από τα φωσφολιποειδή
2. Δραματική μείωση των επιπέδων της κατά τη θεραπεία με κουμαρινικά

3.2. Βιοχημεία

Η ερμηνεία του σχηματισμού των τριών μεγάλων ενζυμικών συμπλεγμάτων που συμμετέχουν στον μηχανισμό της αιμόστασης (δεκάση του ιστικού παράγοντα, δεκάση του ενδογενούς δρόμου και προθρομβινάση) έγινε κατανοητή με την ανακάλυψη της γ-καρβοξυλίωσης, η οποία με τη σειρά της βοήθησε στην ανακάλυψη των πρωτεϊνών C, S και Z (PC, PS και PZ αντίστοιχα) οι οποίες έχουν όμοιες ομολογίες αμινοξέων με αυτές των βιταμίνο-K εξαρτημένων παραγόντων και αναστέλλουν την διαδικασία της πήξης. Η μελέτη της PC οδήγησε στην ανακάλυψη της θρομβομοντουλίνης και στον πολύ σημαντικό αντιπηκτικό ρόλο της θρομβίνης στην οδό της ενεργοποίησης της PC μέσω μιας αρνητικής ανάδρομης δράσης. Η PZ λειτουργεί ως συμπαράγοντας στην απενεργοποίηση του παράγοντα Xa μαζί με μια άλλη πρωτεΐνη, τον αναστολέα πρωτεάσης εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη Z. Όλοι οι παράγοντες πήξεως, με εξαίρεση το ινωδογόνο είναι ή ανενεργές μορφές ενζύμων (προένζυμα) ή συμπαράγοντες. Όλα τα ένζυμα, με εξαίρεση τον παράγοντα XIII, είναι σερίνο-πρωτεάσες, ανήκουν δηλαδή σε εκείνα τα ένζυμα που ο μηχανισμός δράσης τους απαιτεί την ύπαρξη της τριάδας Ser, Asp, His στο καταλυτικό τους κέντρο. Επίσης όλοι οι παράγοντες της πήξεως διακρίνονται σε παράγοντες όδευσης και παράγοντες αναστολής. Κάθε μία από τις πρωτεΐνες πήξεως του αίματος περιέχει πολλαπλές λειτουργικές μονάδες ή περιοχές που προέρχονται από κοινά προγονικά γονίδια και κωδικοποιούνται από μεμονωμένα εξόνια. Παρόλο που οι περιοχές αυτές δεν είναι αρχιτεκτονικά όμοιες έχουν ικανοποιητική ομοιότητα στη δομή και πιθανόν ομοιότητα στις λειτουργίες. Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για τη μετα-μεταφραστική κυκλοφορία και επεξεργασία των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης, για τις ιδιότητες σύνδεσης τους με μεμβράνες και σχηματισμού πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και τέλος για την ενζυμική λειτουργικότητά τους.

Αυτές οι περιοχές είναι:

α) Πεπτιδίο εκκίνησης (signal peptide) : οι αλυσίδες των εκκρινόμενων πρωτεϊνών περιέχουν μια μικρή περιοχή (25-30 υπολειμμάτων αμινοξέων), που επιτρέπει τη μετακίνηση της αυξανόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Όλες οι πηκτικές πρωτεΐνες συντίθενται αρχικά με ένα πεπτιδίο εκκίνησης, το οποίο και αποκόπτεται όταν η πρωτεΐνη διέλθει από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

β) Προπεπτιδίο και γ-Καρβοξυγλουταμινικό οξύ –Rich Domain (Gla domain): Οι βιταμίνο-K πρωτεΐνες περιέχουν μια προπεπτιδική περιοχή μεταξύ του πεπτιδίου εκκίνησης και της γ-καρβοξυγλουταμινικού οξύ-πλούσιας N-τελικής περιοχής. Το προπεπτιδίο περιέχει μια θέση

αναγνώρισης για τη δράση της γ-καρβοξυλάσης και κατευθύνει την προσφορά ενός καρβοξυλίου στη θέση γ όλων των βιταμίνο-Κ εξαρτώμενων παραγόντων-μετατρέποντας τους από ανενεργή α-καρβοξυ-παράγωγα σε δραστικά και πηξιολογικά αποτελεσματικά καρβοξυλιωμένα παράγωγα. Το προπεπτιδίο αποχωρίζεται από τη μητρική πρωτεΐνη αμέσως μετά την καρβοξυλίωση. Ένα κοινό εξώνιο κωδικοποιεί το προπεπτιδίο και τη γ-καρβοξυγλουταμινική-πλούσια περιοχή. Ακριβώς δίπλα από το προπεπτιδίο βρίσκεται η Glu περιοχή (40 υπολείμματα αμινοξέων), που χρησιμεύει ως υπόστρωμα της γ-καρβοξυλάσης. Η καρβοξυλίωση της περιοχής αυτής, που μετατρέπει την Glu περιοχή σε Gla, είναι απαραίτητη για την ασβέστο-εξαρτώμενη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών της πήξης με τις μεμβράνες.

γ) Περιοχή αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Domain-EGF domain) : Η Gla περιοχή ακολουθείται από δύο διαδοχικές περιοχές EGF στους παράγοντες VII, IX, X και PC και τέσσερις στην PS. Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα συχνή σε πολλές πρωτεΐνες. Η περιοχή EGF στις πρωτεΐνες πήξης έχει χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή και συμμετέχει στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Οι ομόλογες περιοχές του EGF των βιταμίνο-Κ εξαρτώμενων παραγόντων πιστεύεται ότι σχηματίζονται με δέσμευση Ca, με εξαρτώμενες από το Ca δομικές αλλαγές στις Gla περιοχές που διευκολύνουν την αλληλεπίδραση με επιφάνειες μεμβρανών και στον τρόπο της αλληλεπίδρασης νε συμπαραγόντες. Μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές οδηγούν σε μη φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών (π.χ. η μετάλλαξη στην EGF περιοχή του FIX προκαλεί την αιμορροφιλία B)

δ) Kringle domain (η ονομασία προέρχεται από την ομοιότητα με τα Δανέζικα ψωμάκια Kringle) : Η περιοχή αυτή έχει χαρακτηριστική τρισδιάστατη διάταξη ενός ελλειψοειδούς με αναδιπλώσεις κοντά στις επαφές ατόμων θείου μεταξύ δυσουλφιδικών δεσμών. Ο ρόλος αυτής της περιοχής σχετίζεται με τη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων.

ε) Ενζυμικές περιοχές : όλες οι περιοχές αυτές της πρωτεάσης των βιταμίνο-Κ εξαρτώμενων πρωτεϊνών έχουν αλληλουχία και τρισδιάστατη ομοιότητα με τις πρωτεάσες της πέψης στον ορό, τρυψίνη και χυμοθριψίνη.

Περιλαμβάνει :

- Μία περιοχή υπεύθυνη για τη μετατροπή του ανενεργού προενζύμου σε ενεργό ένζυμο με διάσπαση κάποιου πεπτιδικού δεσμού
- Έναν ενζυμικό μηχανισμό υπεύθυνο για τη διάσπαση αυτών των δεσμών. Όλοι οι παράγοντες δείχνουν μια προτίμηση να διασπούν τα ζυμογόνα υποστρώματα σε υπολείμματα αργινίνης και έτσι αποκτούν ειδικότητα του τύπου της τρυψίνης

- Θέση αναγνώρισης για τα μακρομοριακά υποστρώματα των ενζύμων
- Θέση αλληλεπίδρασης με ειδικούς πρωτεϊνικούς αναστολείς, οι οποίοι επίσης αντιδρούν με τρυψίνη.
- Άλλες περιοχές των πρωτεϊνών της πήξης είναι οι aromatic acid stack domain και οι φιμπρονεκτίνες τύπου I και II. Ο ρόλος τους παραμένει αδιευκρίνιστος

Σε αντίθεση με άλλους βιταμίνο-Κ εξαρτώμενους παράγοντες τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα χαρακτηρίζονται από ευρεία διακύμανση στα φυσιολογικά άτομα καθώς και από δραματική μείωση στην περίπτωση λήψης αντιπηκτικών από το στόμα. (136) Η σημασία του Gla-domain για την έκκριση της PZ είχε γίνει αντιληπτή από την ανάλυση δύο μεταλλάξεων σε αυτή την περιοχή της PZ. Μετάλλαξη E30Q έχει αναφερθεί σε ασθενή με χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z στο πλάσμα (137). Μελέτες έκφρασης αυτής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Z σε νεφρικά κύτταρα hamster έδειξαν ότι αυτή η μετάλλαξη προλαμβάνει της έκκριση αυτής της τροποποιημένης πρωτεΐνης Z, μπορεί όμως να αναστείλει και την έκκριση της φυσιολογικής PZ. Παρόμοια η αντικατάσταση του Gla-30 από Lys (E30K) έχει συσχετιστεί με ελαττωματική έκκριση PZ (138)

Καθώς τα επίπεδα της βιταμίνης K επηρεάζονται άμεσα από την πρόσληψη μέσω της τροφής και τα επίπεδα της στο πλάσμα παρουσιάζουν ευρεία διακύμανση αυτό θα μπορούσε να συνεισφέρει εν μέρει και στην παρατηρούμενη ευρεία διακύμανση των επιπέδων της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα του υγιούς πληθυσμού. Μεταξύ των περιβαλλοντολογικών παραγόντων που μπορεί να επηρεάζουν τα επίπεδα της PZ και PZI, υπάρχει σχεδόν ομοφωνία σχετικά με τη συνεισφορά των οιστρογόνων, αφού έχει αποδειχθεί ότι η 17 α –ethinylestradiol μειώνει το ηπατικό mRNA της PZ και της PZI (93) σε πειραματικά μοντέλα ποντικών. Αντίθετα στους ανθρώπους, η χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών συνδέεται με την παρουσία υψηλότερων επιπέδων PZ και PZI στο πλάσμα (94). Όσον αφορά τα φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων, χαμηλότερες συγκεντρώσεις PZ έχουν αναφερθεί στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες σε μερικές μελέτες(95,96). Οι περισσότερες όμως μελέτες δεν διαπιστώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Οι Heeb et al. αναφέρουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα PZ στις μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με νεότερες γυναίκες (ηλικίας 57 ετών), ενώ δεν διαπιστώνονται διακυμάνσεις μεταξύ νεώτερων και μεγαλύτερων ανδρών (97) υποδηλώνοντας εμμέσως τον ρόλο των οιστρογόνων στη ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης Z. Το πλάσμα περιέχει περίσσεια ZPI σε σχέση με την PZ και όλη η PZ φαίνεται ότι κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με την ZPI. Χρόνια αγωγή με βαρφαρίνη, η οποία μειώνει

δραματικά τα επίπεδα της PZ στο πλάσμα, συνδέεται με μείωση των επιπέδων της ZPI κατά 45% (98) κάτι που ενδεχομένως οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης Z μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της ZPI επιδρώντας είτε άμεσα στην έκκριση της ZPI είτε έμμεσα στην κάθαρση της. Επιβεβαιώνοντας αυτή την υπόθεση, διάφορες κλινικές μελέτες δείχνουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της PZ και αυτών της PZI (94,99). Σε ποντίκια PZ +/- η μείωση της PZI στο πλάσμα ήταν μικρότερη σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται σε ασθενείς υπό αγωγή με βαρφαρίνη (24% μείωση) ενώ σε ZPI/- ποντίκια η μείωση της PZ ήταν μεγαλύτερη - 43% μείωση- **(100)** υποδηλώνοντας ότι η ZPI μπορεί να αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για τον σχηματισμό του συμπλέγματος PZ/PZI. Με αυτό συμφωνεί και η παρατήρηση ότι σε ασθενείς με anti-PZ αντισώματα και χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z τα επίπεδα της ZPI στο πλάσμα παραμένουν ανεπηρέαστα.(99)

3.3.Γενετικός έλεγχος PZ και ZPI

Το γονίδιο της ανθρώπινης PZ εδράζεται στο χρωμόσωμα 13q34, κοντά στα γονίδια του παράγοντα VII και X. Αποτελείται από 9 εξόνια, περιλαμβανομένου και ενός εναλλακτικού εξώνιου (101). Λόγω της ασθενούς ρύθμισης της ηπατικής σύνθεσης της PZ, υπάρχει η υπόθεση ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα ρυθμίζονται γενετικά (102). Η μελέτη της κληρονομικότητας των επιπέδων των παραγόντων πήξεως σε μεγάλη ομάδα Γαλλο-Καναδών απέδειξε σχετική διακύμανση των επιπέδων PZ και PZI, η οποία με υψηλού βαθμού κληρονομικότητα τόσο για την πρωτεΐνη όσο και για την ZPI ($h^2 = 66.7$ και $42,8$ για την PZ και αντίστοιχα για την PZI) (103). Όσον αφορά τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP) έχουν ανακαλυφθεί 110 SNP στο ανθρώπινο γονίδιο της πρωτεΐνης Z και επιπρόσθετα άλλοι 14 σε κοντινή απόσταση από το γονίδιο. Δύο από αυτούς (104) ο A-13G και G79A, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα. Τα χαμηλότερα επίπεδα συνδέονται με τους GG και AA γονότυπους για τους A-13G και G79A πολυμορφισμούς αντίστοιχα (95,105). Επίσης ένας πολυμορφισμός στο ιντρόνιο C (G-42A), μπορεί επίσης να σχετίζεται με διαφορές στα επίπεδα της PZ, με τα χαμηλότερα επίπεδα να συναντώνται στον γονότυπο AA (106). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τρεις πολυμορφισμοί στο γονίδιο της PZ (A-13G, G-103A και G791) σχετίζονται με τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα (107) : Σε πληθυσμό 306 υγιών εθελοντών (Καυκάσια φυλή), 6,9% είχαν σπάνιους γονότυπους, και επίπεδα PZ της τάξεως των 1.53μg/ml έναντι 2,32 μg/ml για τους πιο συχνούς (59,1%) γονότυπους (AA/GG/GG). Οι Nowak-Gottl et al. προσδιόρισαν τρεις απλότυπους SNP (rs3024718, rs3024731 και rs3024772), και εντόπισαν το 97% της γενετικής ποικιλομορφίας του γονιδίου της PZ σε πληθυσμό Καυκάσιων (108).

Οι Rs3024718 και rs3024772 είναι σύμφωνοι με πολυμορφισμούς που είχαν αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες (29,30). Σε άτομα με τον απλότυπο PZ ATG, τα επίπεδα της PZ ήταν σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με αυτά χωρίς αυτόν τον απλότυπο (1,64μg/ml έναντι 1,27 μg/ml $p < 0.001$) Έξι γενετικές διαφορές που αφορούν το γονίδιο της ZPI έχουν συσχετιστεί με πέντε απλότυπους (111) , αλλά η συσχέτιση μεταξύ ZPI απλοτύπων και τα επίπεδα της ZPI στο πλάσμα δεν έχει μέχρι σήμερα δημοσιευθεί

3.4. Μέτρηση της PZ και ZPI

Πρόσφατα περιγράφηκε λειτουργικό τεστ για την ZPI. Η μέθοδος βασίζεται στην δυνατότητα της ZPI να αναστέλλει τον FXIa, αναστολή η οποία είναι ανεξάρτητη από την παρουσία της PZ (126). Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ($p < 0.0001$) μεταξύ του αντιγόνου της ZPI και της δραστηριότητας της, όμως ο συντελεστής συσχέτισης ήταν μόνο 0,68. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες προκειμένου να ξεκαθαρισθεί εάν αυτές οι διακυμάνσεις οφείλονται σε πολυμορφισμούς της ZPI οι οποίοι αναγνωρίζονται με την τεχνική ELISA στερούνται όμως λειτουργικής δραστηριότητας ή ευθύνονται αυτοί οι πολυμορφισμοί για την απώλεια ή ενίσχυση της λειτουργικότητας του μορίου. Παρόλα αυτά καθώς ο FXa αποτελεί τον κύριο στόχο της ZPI , θα ήταν χρήσιμο να υπάρχει μια λειτουργική μέθοδος η οποία να ποσοτικοποιεί την αναστολή του ενεργοποιημένου παράγοντα X (FXa) από το σύμπλεγμα PZ/ZPI. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας του συμπαραγόντα της PZ. Η δυσκολία στο να βρεθεί μια ειδική και αξιόπιστη τεχνική εντοπίζεται στο γεγονός ότι η PZ δεν έχει άμεση ενζυματική δραστηριότητα, η PZ και η ZPI κυκλοφορούν στο πλάσμα με τη μορφή ενός συμπλέγματος και στο εγγόνος ότι αυτό ακριβώς το σύμπλεγμα δρα μόνο στην αρχική φάση του μηχανισμού της πήξης πριν τον σχηματισμό θρομβίνης (112). Επιπλέον υπάρχει η υποψία ότι όπως συμβαίνει και με τον TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor), μερικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της PZ μπορούν να εμπλέκονται στη δραστηριότητα έναντι των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων στις ανοσολογικές μεθόδους (113)

3.5. Πρωτεΐνη Z και πολυμορφισμός-13 A/G

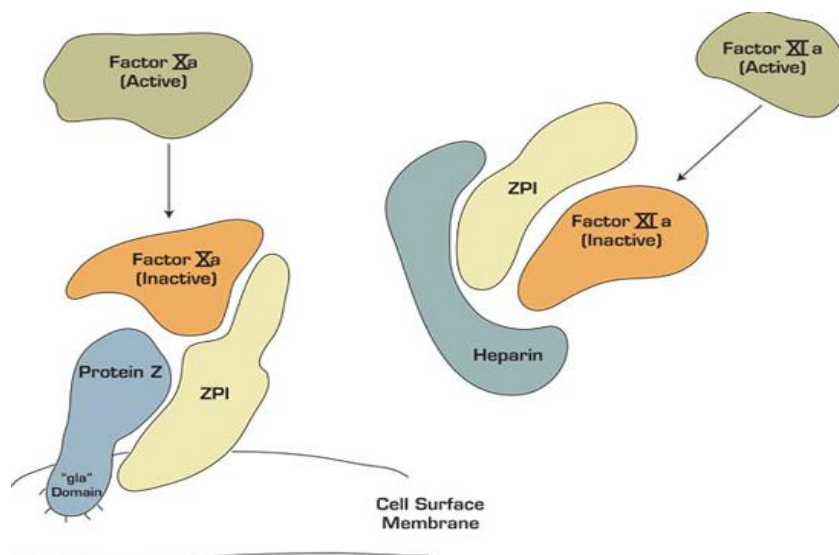
Από τους πολυμορφισμούς που έχουν βρεθεί στο γονίδιο της πρωτεΐνης Z, ξεχωριστή αξία έχει ο πολυμορφισμός 13A/G, διότι εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου και άρα είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει την έκφραση του και κατά συνέπεια και την ποσότητα της πρωτεΐνης Z . Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί πως το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο G (συχνότητα στους Καυκάσιους 6-12%) του παραπάνω πολυμορφισμού σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης Z. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί σε 168 υγιείς μάρτυρες και σε 160 ασθενείς με ΑΚΣ. Στην ομάδα των υγιών ατόμων το μεταλλαγμένο

αλληλόμορφο βρέθηκε σε 0 ομοζυγώτες(0,00%) και σε 21 ετερόζυγα άτομα (12,5%), ενώ στην ομάδα των ασθενών οι ομοζυγώτες ήταν επίσης 0 (0,00%) και οι ετεροζυγώτες 26 (16,25%), συνεπώς καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρουσιάστηκε ανάμεσα στην ομάδα των υγιών μαρτύρων και στην ομάδα των ασθενών. Η ίδια εικόνα, χωρίς δηλαδή στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίστηκε και στη στατιστική μελέτη που έλαβε χώρα ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τις διάφορες υποομάδες των ασθενών

3.6.Πρωτεΐνη Z και Θρόμβωση

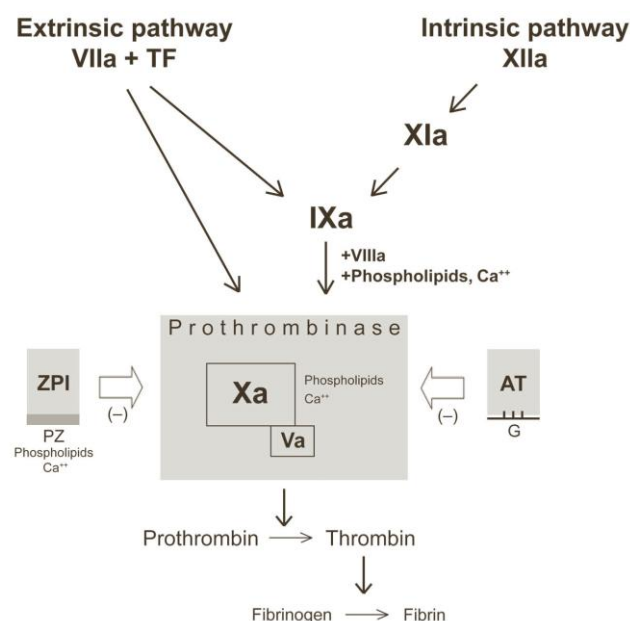
Παρά το ότι η PZ απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα βοοειδή το 1977, και από τον άνθρωπο το 1984 (69) η λειτουργία της παρέμεινε για μεγάλο χρονικό διάστημα αδιευκρίνιστη. Ο ρόλος της στον μηχανισμό της αιμόστασης παρέμεινε αδιευκρίνιστος μέχρι το 1988 όποτε οι Han et al (70) περιέγραψαν τον αναστατή της πρωτεΐνης Z (ZPI).

Σε μελέτες βρέθηκε ότι η προπηκτική δράση του Χα ήταν μειωμένη όταν ο παράγοντας Χα επωαζόταν παρουσία PZ. Αυτή η διαφαινόμενη ανασταλτική δράση ήταν χρόνο-εξαρτώμενη (max 90 – 120 sec) και απαιτούσε την παρουσία Ca^{++} και προπηκτικών φωσφολιποειδών (71) . Η χρονική εξάρτηση συσχετίστηκε κυρίως με τον χρόνο επώασης της PZ με τα φωσφολιποειδή, πιθανότατα αντικατοπτρίζοντας τον σχετικά αργό ρυθμό δέσμευσης της PZ με αυτά (72) . Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υποδηλώνουν αλληλεπίδραση μεταξύ του Χα και της PZ, η οποία επιτελείται σε επιφάνειες φωσφολιποειδών και Ca^{++} .



Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση της PZ στον παράγοντα Χα οφείλεται τουλάχιστον κατά ένα μέρος σε έναν αναστατή ευρισκόμενο στο πλάσμα και ο οποίος αναγνωρίζει το σύμπλεγμα Χα – PZ. Αυτός ο ανασταλής (ZPI) με M.B 72-kd ανήκει στην οικογένεια των σερπινών και κατά ένα μεγάλο μέρος συντίθεται στο ήπαρ (73).

Παρουσία PZ, προπηκτικών φωσφολιποειδών και Ca^{++} ο ZPI προκαλεί ταχεία αναστολή του ενεργοποιημένου παράγοντα X (Xa) (<10 sec.) σε μία διαδικασία που φαίνεται ότι εμπλέκει το σχηματισμό ενός Ca^{++} - εξαρτώμενου συμπλέγματος που περιλαμβάνει παράγοντα Xa , PZ και ZPI σε επιφάνεια φωσφολιποειδών. Το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα από τον παράγοντα VIIa και τον Ιστικό παράγοντα (TF) ή μέσω των ενεργοποιημένων παραγόντων XIIa, XIa, IXa και VIIIa. Δύο συστήματα πρωτεασών (serpins) είναι τα κύρια υπεύθυνα για την εξουδετέρωση της προθρομβινάσης –το σύστημα της αντιθρομβίνης και το σύστημα της πρωτεΐνης Z , όπως απεικονίζεται σχηματικά στο παρακάτω σχήμα.

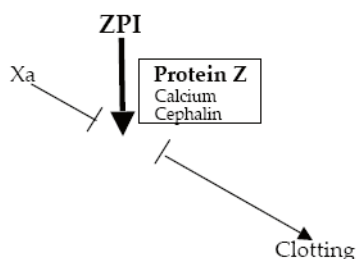


Φαίνεται ότι η PZ καθυστερεί την έναρξη και μειώνει την επαγόμενη από χαμηλές συγκεντρώσεις παράγοντα IXa παραγωγή θρομβίνης στο πλάσμα (74). Ο ρόλος της PZ ως συμπαράγοντα για την αναστολή του Xa μέσω του ZPI, αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη της συμμετοχής της στον μηχανισμό της αιμόστασης (75).

Προκειμένου να διερευνηθούν in vivo οι συνέπειες της έλλειψης PZ δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια χαρακτηριζόμενα από έλλειψη της PZ, στα οποία παρατηρήθηκαν αυξημένες θρομβωτικές εκδηλώσεις όταν αυτή συνυπήρχε με τη μετάλλαξη G1691A του παράγοντα V (FV Leiden) (76). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η έλλειψη PZ μπορεί να αποτελεί έναν καινούργιο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων.

Η ZPI είναι ικανή να αναστείλει εκτός του Xa και άλλους δύο ενεργοποιημένους παράγοντες της πήξης: τον XIa και τον IXa . Ο μηχανισμός αναστολής και των τριών

εμπλέκει διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο Xa αδρανοποιείται από την ZPI και είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η ZPI προκαλεί την αναστολή συνδεδεμένη με ηπαρίνη ανεξάρτητα από την PZ. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας IX αδρανοποιείται από την ZPI χωρίς την παρουσία PZ, ενώ η αδρανοποίηση του Xa από την ZPI διευκολύνεται από την παρουσία πρωτεΐνη Z, Ca^{++} και φωσφολιποειδών.



Η δράση του συμπλέγματος PZ/ZPI φαίνεται να αφορά ειδικά αυτό το σημείο του μηχανισμού της πήξης ενώ δεν συμμετέχει σε άλλα επίπεδα όπως αυτό της πλασμίνης, καλλικρεΐνης, θρυψίνης, ή άλλων παραγόντων της πήξης. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη C και/ή πρωτεΐνη S αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την αδρανοποίηση του ενεργοποιημένου παράγοντα V και VIII. Έλλειψη ή δυσλειτουργία αυτών των πρωτεϊνών αυξάνει τον κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων. Παρόμοια ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης, μπορεί να οδηγήσει σε υπερπηκτικότητα. Το ερώτημα εάν ανωμαλίες ή δυσλειτουργίες της ZPI ή της PZ, οι οποίες έχουν παρόμοιες παθοφυσιολογικές επιδράσεις σε ενεργοποιημένους παράγοντες πήξεως (X, IX, XI), μπορούν να ενοχοποιηθούν για υπερπηκτικότητα απασχολεί ευρέως την διεθνή επιστημονική κοινότητα.

Μελέτες στην φλεβική θρόμβωση ανέδειξαν τόσο χαμηλά όσο και φυσιολογικά επίπεδα PZ (77). Στην αρτηριακή θρόμβωση τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα. Η στεφανιαία νόσος έχει συσχετισθεί με έλλειψη πρωτεΐνης Z (78) αλλά και με φυσιολογικά επίπεδα (79). Στο ισχαιμικό ΑΕΕ η μελέτη των Vasse et al. (80) ήταν η πρώτη που ανέφερε χαμηλά επίπεδα PZ εύρημα το οποίο επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες μελέτες (81, 82). Στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, χαμηλά επίπεδα PZ έχουν συσχετισθεί με 7 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αρτηριακής θρόμβωσης (83, 84). Παράλληλα έλλειψη PZ έχει βρεθεί σε γυναίκες με ιστορικό πολλαπλών αποβολών (85) συνδυασμένη με την παρουσία anti-PZ αντισωμάτων (86). Η πρωτεΐνη Z μοιάζει να παίζει έναν παράδοξο ρόλο στην μηχανισμό της θρόμβωσης (87), επιπλέον η παρουσία της PZ στις αθηροσκληρυντικές βλάβες υποδηλώνει ενδεχομένως και κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της αθηρωματικής νόσου (88). Όμως αυξημένη συχνότητα θρομβώσεων έχει αναφερθεί και σε διάφορες αιμολυτικές αναιμίες, ιδιαίτερα στην

δρεπανοκυτταρική αναιμία (89), στην θαλασσαιμία (90) καθώς και στη παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία (91). Παρά το γεγονός ότι οι διάφορες αιμολυτικές αναιμίες έχουν διαφορετική παθοφυσιολογία η αιμόλυση από μόνη της, ανεξαρτήτως της αιτίας, φαίνεται να αποτελεί έναν προπηκτικό μηχανισμό. Πολλοί μηχανισμοί μπορούν να ενοχοποιηθούν όπως ανωμαλίες της μεμβράνης των ερυθρών, αυξημένη συγκέντρωση μικροσωματιδίων στο πλάσμα, ελεύθερη αιμοσφαιρίνη οδηγώντας σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, αυξημένη συγκέντρωση οξειδωτικών ουσιών στο αίμα και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εκφραζόμενη με αυξημένα επίπεδα ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1, παράγοντας von Willebrand και θρομβομοντουλίνη). Οι ασθενείς με β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζονται από μια χρόνια κατάσταση υπερπηκτικότητας με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Οι θρομβωτικές επιπλοκές είναι συχνότερες στην ενδιάμεση μεσογειακή σε σχέση με τους συστηματικά μεταγγιζόμενους ασθενείς με θαλασσαιμία.

Οι ενοχοποιούμενες παθοφυσιολογικές βλάβες περιλαμβάνουν δομικές ανωμαλίες των ερυθρών, ανωμαλίες των αιμοπεταλίων, ανεπάρκεια φυσικών ανασταλτών της πήξης καθώς και επίκτητες διαταραχές όπως καρδιακή και ηπατική δυσλειτουργία, ορμονική ανεπάρκεια. Η παρατήρηση ότι οι θρομβωτικές επιπλοκές είναι συχνότερες στους θαλασσαιμικούς ασθενείς που δεν ελάμβαναν συστηματικές μεταγγίσεις (ενδιάμεση μεσογειακή ή θαλασσαιμικοί ασθενείς από υποανάπτυκτες χώρες με μειωμένη δυνατότητα αιμοδοσιακής κάλυψης) ή σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς αποτελούσε μέχρι πρόσφατα μία ισχυρή ένδειξη της προπηκτικής δραστηριότητας των κυκλοφορούντων κατεστραμμένων ερυθρών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι συστηματικές μεταγγίσεις μείωναν τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών επιπλοκών στους ασθενείς με θαλασσαιμία. Πρόσφατη όμως μελέτη των Singer et al (92) έδειξε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης πνευμονικής υπέρτασης μεταξύ των μεταγγιζόμενων ασθενών με θαλασσαιμία, οι περισσότεροι των οποίων ήταν σπληνεκτομηθέντες, υποδηλώνοντας ότι οι συστηματικές μεταγγίσεις δεν προλαμβάνουν την εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης ή άλλων θρομβωτικών επιπλοκών.

Η παρουσία διαταραχών στο σύστημα της PZ/PZI σε συνδυασμό με άλλους γνωστούς παράγοντες θρομβοφιλίας, ιδιαίτερα με FV-Leiden ή και προθρομβίνη 20210, μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση ή όχι θρομβωτικών επιπλοκών σε πολλές από αυτές τις κατηγορίες ασθενών. Αυτό το γεγονός προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αδρανοποίηση ή την αναστολή του Χα, ο οποίος αποτελεί κομβικό σημείο στον μηχανισμό της πήξης, αλλά και στην φαρμακολογική προσέγγιση της αντιπηκτικής αγωγής.

Πιθανολογείται ότι μεταβολές αυτής της οικογένειας των σερπινών προκαλούμενες είτε λόγω «φυσικών» μεταλλάξεων είτε λόγω φαρμακευτικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να επηρεάσουν την κλινική εκδήλωση θρόμβωσης όταν συνυπάρχουν και άλλοι παράγοντες υπερπηκτικότητας ή τη συχνότητα εμφάνισης αιμορραγικών εκδηλώσεων κατά τη χρήση συγκεκριμένων αντιπηκτικών.

Κάθε παράγοντας πιθανότατα χαρακτηρίζεται από διαφορετικό «*δυναμικό κινδύνου*». Σαν «*δυναμικό κινδύνου*» θεωρείται η ικανότητα ή δυνατότητα ενός συγκεκριμένου παράγοντα να προκαλέσει θρομβωτικές επιπλοκές. Το μέγεθος του «δυναμικού κινδύνου» εξαρτάται από τον συγκεκριμένο παράγοντα κινδύνου και την δυνατότητα αλληλεπίδρασης του με άλλους παράγοντες. Οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου παραμένουν σε όλη την διάρκεια της ζωής του ασθενούς, ενώ οι επίκτητοι μπορούν να ελεγχθούν εν μέρη από τον ίδιο τον ασθενή. Η δράση των γενετικών και επίκτητων παραγόντων έχει αθροιστικό αποτέλεσμα αυξάνοντας σημαντικά το «*δυναμικό κινδύνου*» για την θρομβοεμβολική νόσο.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η αβεβαιότητα σχετικά με το ρόλο της PZ μερικώς οφείλεται και στις ευρείες διακυμάνσεις που παρουσιάζουν τα επίπεδα της στο πλάσμα ($1,4 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ εύρος $0,2 - 3,4 \mu\text{g/ml}$). Τα επίπεδα της PZ στο πλάσμα αυξάνονται ταχέως κατά τους πρώτους μήνες της ζωής, ακολουθούμενα από βραδύτερη αύξηση κατά την παιδική ηλικία, φθάνοντας στα επίπεδα των ενηλίκων κατά την εφηβεία. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι επηρεάζουν τα επίπεδα της στο πλάσμα. Η ηλικία δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, υπάρχουν όμως αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά το ρόλο του φύλου. Πρόδρομες αναφορές υποστηρίζουν ότι η PZ συμπεριφέρεται ως αρνητική πρωτεΐνη οξείας φάσεως, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει τις ευρείες διακυμάνσεις των τιμών της στο πλάσμα. Σχετικά πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει αντικρουόμενη συμπεριφορά. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες φαίνεται να ρυθμίζουν, με κυρκαδιακό ρυθμό, τη βιοσύνθεση της PZ. Όπως αναμενόταν για μια βιταμίνο-K εξαρτώμενη πρωτεΐνη τα επίπεδα της PZ μειώνονται με την αντιπηκτική αγωγή, ενώ η χρήση p.o αντισυλληπτικών αυξάνει τα επίπεδα της στο πλάσμα. Παρόμοια, παρατηρείται προοδευτική αύξηση των επιπέδων της PZ στο πλάσμα, με την πρόοδο της φυσιολογικής κυήσεως, και τα οποία επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα μεταξύ 6-12 εβδομάδος μετά τον τοκετό. Τα επίπεδα της PZ παρουσιάζουν ευρεία διακύμανση σε πολλά άλλα νοσήματα. Με τόσο μεγάλο εύρος διακυμάνσεων των επιπέδων της PZ στους υγιείς ανθρώπους και με τόσο μεγάλη γκάμα παραγόντων να επηρεάζουν τα επίπεδα της, οποιοδήποτε αποτέλεσμα συσχετίζει τα επίπεδα της με θρομβωτικές εκδηλώσεις πρέπει να ερμηνεύεται με ιδιαίτερη προσοχή. Είναι βέβαιο ότι είναι σχεδόν αδύνατο να προσδιορίσει κανείς έναν άνθρωπο με ετεροζυγωτία για την ανεπάρκεια της PZ, καθότι το 10% του γενικού πληθυσμού έχουν συγκεντρώσεις PZ κάτω από 50%.

Για όλους αυτούς τους λόγους οι περισσότερες μελέτες έχουν εφαρμόσει διαφορετικά και αυθαίρετα επίπεδα cut-off σε σχέση με τους υγιείς προκειμένου να αξιολογήσουν τη συσχέτιση της ανεπάρκειας της PZ με διάφορα νοσήματα, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση μεταξύ των μελετών. Αυτή η ανομοιογένεια εξηγεί και γιατί η κλινική σημασία των επιπέδων PZ στο πλάσμα είναι αντικρουόμενη.

Η παρούσα μελέτη θα προσπαθήσει να διαλευκάνει τον ρόλο της PZ στον μηχανισμό της αιμόστασης και της θρόμβωσης.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης Z σε 43 ασθενείς με αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση και βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό θρόμβωσης με αρνητικό τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο θρομβοφιλίας, ο οποίος περιελάμβανε έλεγχο : PT, PTT, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S, αντιθρομβίνη III, ανίχνευση μετάλλαξης V-Leiden, ανίχνευση μετάλλαξης προθρομβίνης G20210A, APCR, αντιπηκτικό του λύκου (LAC), ανίχνευση μετάλλαξης ομοκυστεΐνης MTHFR, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (κατά καρδιολιπίνης Cl, φωσφατιδυλοσερίνης PS) . Ως ομάδα ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν 169 υγιείς εθελοντές, οι οποίοι επιλέχθηκαν μετά την λήψη αναλυτικού και λεπτομερούς ιστορικού αναφορικά με ιστορικό θρόμβωσης τόσο ατομικό όσο και οικογενειακό. Αποκλείστηκαν από τη μελέτη όσοι υπήρχε υποψία για βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, όσοι ελάμβαναν οποιοδήποτε φαρμακευτικό σκεύασμα παρεμβαίνει στον μηχανισμό της αιμόστασης συμπεριλαμβανομένων όλων των μη στερινοειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων καθώς και όσες γυναίκες ελάμβαναν αντισυλληπτικά ή ορμονική θεραπεία υποκατάστασης. Βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά ηλικία, φύλο, ατομικό αναμνηστικό με ιδιαίτερη επικέντρωση σε θρομβωτικά ή αιμορραγικά επεισόδια ελήφθησαν και καταχωρήθηκαν στη σχετική βάση δεδομένων.

Από τους συνολικά 212 συμμετέχοντες 161 ήταν άνδρες και 51 γυναίκες. Από την ομάδα των ασθενών (n=43) οι 21 ήταν άνδρες (48,8%) και οι 22 γυναίκες (51,1%) αντίστοιχα η ομάδα των μαρτύρων (controls) περιελάμβανε 140 άνδρες (82,8%) και 29 γυναίκες (17,2%) με μέση ηλικία : 37.05 +/- 9.6 (19 έως 65).

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η συλλογή των δειγμάτων καθώς και η επεξεργασία τους έγινε βάση πρωτοκόλλου. Η συλλογή αίματος έγινε σε σωληνάρια με κενό αέρος, που περιέχουν 1:10 μέρη 0.109 mol/L 3.8% sodium citrate (Becton Dickson). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 1200g για 10 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο πλάσμα αποχωρίζεται και διανέμεται εξ ίσου σε δύο κρυοφιαλίδια προκειμένου να φυλαχτούν στους -80°C.

Η επεξεργασία και η κατάψυξη των δειγμάτων ολοκληρώνεται εντός 5 ωρών από τη συλλογή τους. Τα δείγματα ξεπάγωναν των πρωί της ημέρας κατά την οποία πραγματοποιείται η μέτρηση.

Η συγκέντρωση της PZ στο πλάσμα προσδιορίσθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (Asserachrom Protein Z, Diagnostica Stago, France). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί την ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδο τύπου sandwich.

Βασικές αρχές λειτουργίας της μεθόδου : Η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), κύριος εκπρόσωπος των ανοσοενζυμικών αναλυτικών μεθόδων, αποτελεί μία μέθοδο η οποία, στηριζόμενη στην εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος, επιτρέπει τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ουσιών που κατά την πειραματική διαδικασία κατέχουν το ρόλο αντιγόνου. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες, που αναλύονται παρακάτω, οι οποίες στηρίζονται στην ίδια αρχή και διαφοροποιούνται από τη σειρά με την οποία προστίθενται στην ειδική πλάκα πολυστυρολίου (βλέπε σχήμα) τα αντισώματα και το αντιγόνο.

Ειδικότερα για την ELISA τύπου sandwich :

Στην ELISA αυτή, γίνεται αρχικά επίστρωση των κελίων (coating) με ένα ειδικό, για το προς ανίχνευση αντιγόνο, αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό (1^ο (A) αντίσωμα). Η δέσμευση γίνεται συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το πολυστυρόλιο. Οι ελεύθερες θέσεις στα κελία δεσμεύονται με μια κοινή πρωτεΐνη, συνήθως αλβουμίνη ορού βοός (BSA), για την αποφυγή στα επόμενα στάδια μη ειδικών αντιδράσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με τα δείγματα τα οποία περιέχουν την προς ανάλυση ουσία (αντιγόνο), ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση αντιγόνου αντισώματος. Στην ίδια ακριβώς διαδικασία, καθώς και στις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας, υποβάλλεται γνωστή ποσότητα της προς ανάλυση ουσίας (καθαρό αντιγόνο).

1. Δέσμευση του 1^{ου} (A) αντισώματος στο κελίο



2. Έκπλυση

3. Επώαση με δείγμα που περιέχει το αντιγόνο



4. Έκπλυση

5. Επώαση με το 1^ο (B) αντίσωμα



6. Έκπλυση

7. Επώαση με το 2^ο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο

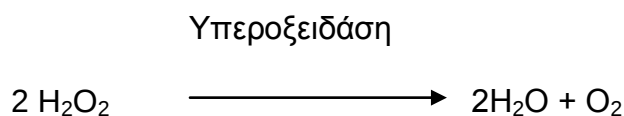


8. Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου και ανάπτυξη του χρώματος

Σχηματική παράσταση των σταδίων μιας ELISA τύπου sandwich

Ακολουθεί το στάδιο της ανίχνευσης με τη χρήση ενός αντισώματος ειδικού για το ίδιο αντιγόνο, για άλλο όμως επίτοπο, (1ο (B) αντίσωμα), το οποίο μπορεί να είναι και συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο, όπως υπεροξειδάση, ή βιοτίνη. Εάν το (1^ο (B) αντίσωμα) δεν είναι σημασμένο ακολουθεί επώαση με το 2ο αντίσωμα, σημασμένο με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος. Εάν το (1ο (B) αντίσωμα) είναι σημασμένο με ένζυμο ακολουθεί κατευθείαν η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος, ενώ εάν είναι σημασμένο με βιοτίνη ακολουθεί επώαση με στρεπταβιδίνη, σημασμένη με ένζυμο, και στη συνέχεια η ενζυμική αντίδραση για την εμφάνιση του χρώματος (βλέπε σχήμα άνωθεν).

Η χρωμοαντίδραση, η οποία είναι κοινή σε όλα τα είδη ELISA, αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης, δηλαδή του H₂O₂, και μιας χρωμογόνου ουσίας που είναι η ο-φαινυλενοδιαμίνη (OPD). Από τη διάσπαση του H₂O₂ παράγεται μοριακό οξυγόνο το οποίο οξειδώνει την OPD προς ένα διαλυτό έγχρωμο παράγωγο με μέγιστο μήκος κύματος 492nm.



Λόγω της ευαισθησίας της OPD στο φως η χρωμοαντίδραση πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, με προσθήκη ίσου όγκου 2N διαλύματος H₂SO₄, ακολουθεί φωτομέτρηση σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA στα 492nm. Όλα τα δείγματα (και το πρότυπο) δοκιμάζονται εις διπλούν και εν συνεχεία υπολογίζονται ο μέσος όρος της απορρόφησης του καθενός, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του περιεχόμενου αντιγόνου. Με βάση την απορρόφηση της πρότυπης ποσότητας του αντιγόνου υπολογίζεται η ποσότητα του αντιγόνου ανά κελίο.

Πιο συγκεκριμένα :

Τα δείγματα και τα standards επωάζονται εις διπλούν σε βοθρία (wells) μικροπλάκας καλυμμένα με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Z. Μετά την επώαση πραγματοποιούνται επανειλημμένα εκπλύσεις προκειμένου να απομακρυνθεί μη δεσμευμένο υλικό και εν συνεχεία προστίθεται ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα προσδεδεμένο με υπεροξειδάση το οποίο κατευθύνεται έναντι ενός άλλου επιτόπου της πρωτεΐνης Z. Ακολουθούν επιπλέον εκπλύσεις και προσθήκη ποσότητας χρωμογόνου, *ortho*-phenylenediamine (OPD) και ως υπόστρωμα υπεροξειδίο

της ουρίας. Με αυτό τον τρόπο ξεκινάει η ανάπτυξη χρώματος, η οποία στη συνέχεια σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή διακόπτεται με την προσθήκη όξινου διαλύματος. Η οπτική πυκνότητα προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 492-620. Κάθε δείγμα πλάσματος μετρήθηκε εις διπλούν. Οι τιμές της πρωτεΐνης Z υπολογίζονται με τη χρήση προτυποποιημένης καμπύλης συγκέντρωσης / οπτικής απορρόφησης και εκφράζονται σε ng/ml πλάσματος. Θεωρήσαμε ως ανεπάρκεια πρωτεΐνης Z επίπεδα στο πλάσμα $< 1000 \text{ ng/ml}$ ¹. Οι τιμές αναφοράς για την πρωτεΐνη Z κυμαίνονται μεταξύ 0.26 έως 3.76 $\mu\text{g/mL}$. Ο συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας (within run) είναι 8% και ο συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας (between run) είναι 5%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη περιελήφθησαν συνολικά 212 άτομα (51 γυναίκες και 161 άνδρες) μέσης ηλικίας $37,05 \pm 9,66$ ετών.

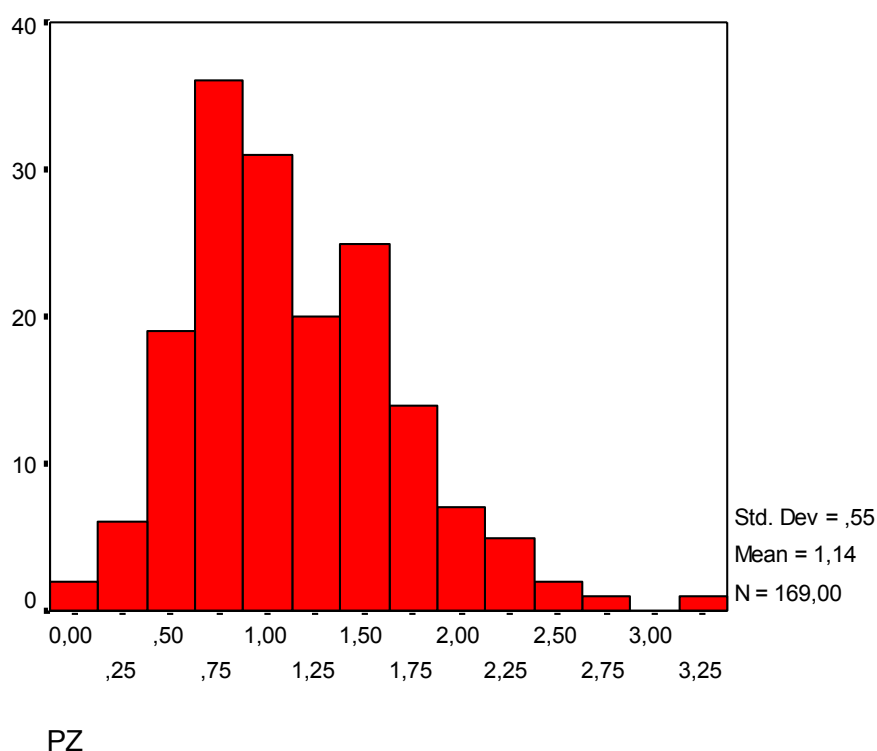
43 άτομα (22 γυναίκες και 21 άνδρες) ήταν ασθενείς με αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση οι οποίοι είχαν επιβαρυνμένο οικογενειακό ιστορικό θρόμβωσης με αρνητικό τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο στην κατεύθυνση της θρομβοφιλίας.

Η μέση ηλικία των ασθενών με θρόμβωση ήταν $38,2 \pm 5,3$ έτη.

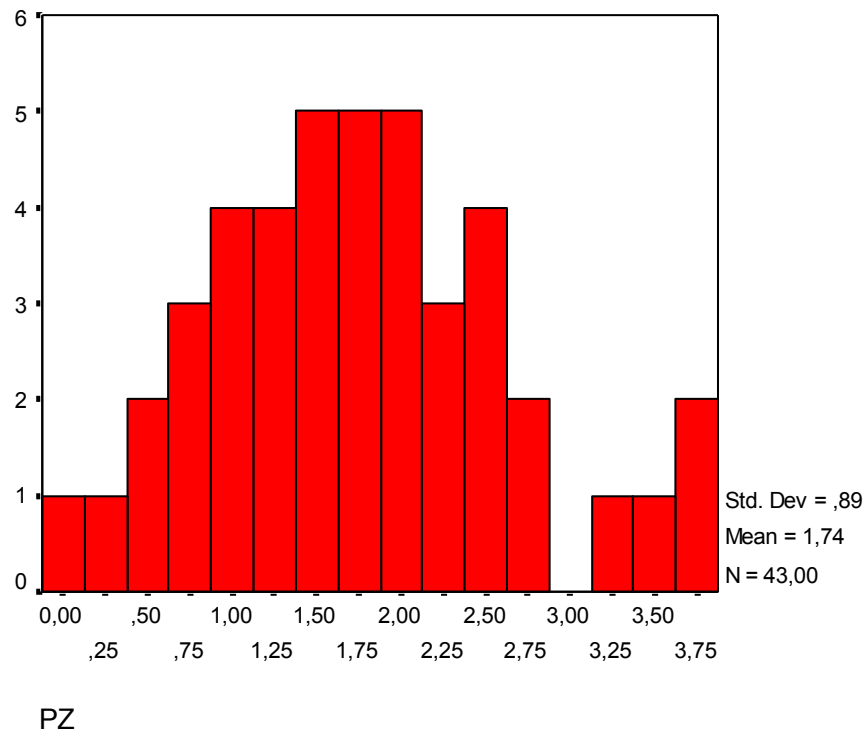
Παράλληλα εξετάστηκε μια ομάδα ελέγχου από 169 ανάλογης μέσης ηλικίας (29 γυναίκες και 140 άνδρες) υγιείς εθελοντές οι οποίοι επιλέχθηκαν μετά την λήψη αναλυτικού και λεπτομερούς ιστορικού αναφορικά με ιστορικό θρόμβωσης τόσο ατομικό όσο και οικογενειακό. Αποκλείστηκαν από τη μελέτη όσοι υπήρχε υποψία για βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, όσοι ελάμβαναν οποιοδήποτε φαρμακευτικό σκεύασμα παρεμβαίνει στον μηχανισμό της αιμόστασης συμπεριλαμβανομένων όλων των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων καθώς και όσες γυναίκες ελάμβαναν αντισυλληπτικά ή ορμονική θεραπεία υποκατάστασης.

Όσον αφορά τις τιμές της PZ στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν έγινε αρχικά η ανάλυση της κατανομής των τιμών με σκοπό να οριστεί η κατάλληλη στατιστική μέθοδος σύγκρισης τους. Όπως φαίνεται στα παρακάτω ιστογράμματα η τιμές της PZ είχαν σχετικά κανονική κατανομή τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των υγιών μαρτύρων.

Εικόνα 1. Ιστογράμμα τιμών PZ στους υγιείς μάρτυρες



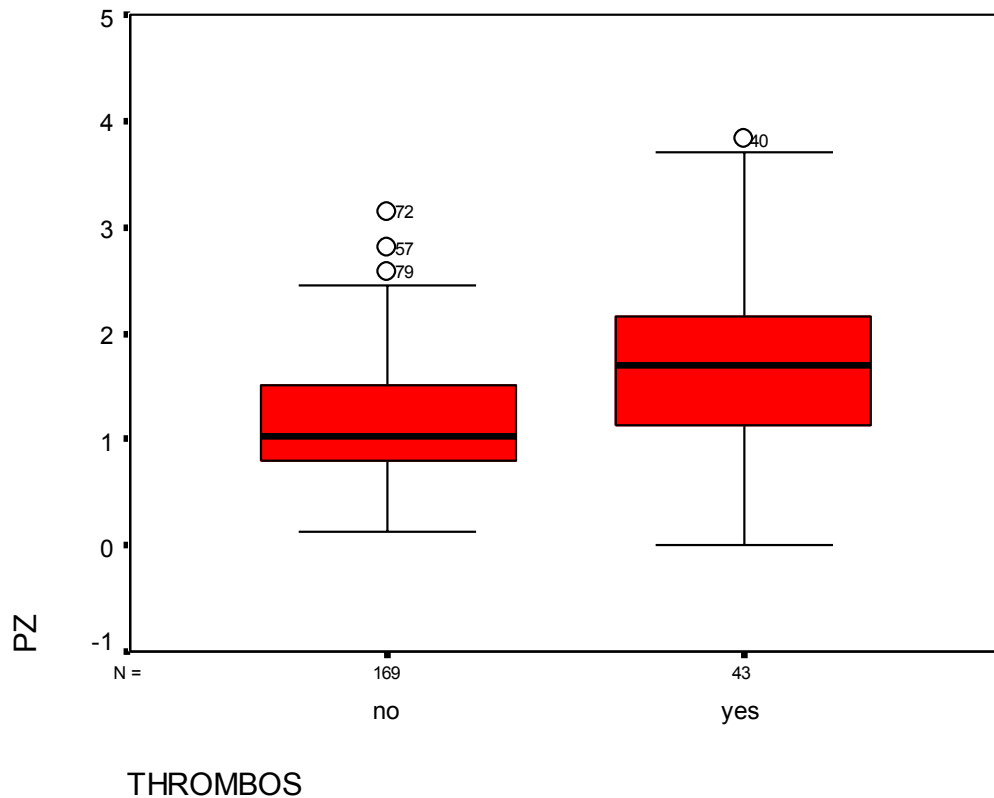
Εικόνα 2: Ιστόγραμμα τιμών PZ στους ασθενείς με θρόμβωση



Η μέση τιμή της πρωτεΐνης Z (PZ) βρέθηκε να παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων (ασθενών vs υγιείς μάρτυρες). Συγκεκριμένα η μέση τιμή PZ στην ομάδα των ασθενών ήταν $1,74 \pm 0,89$ και ανάλογα στην ομάδα ελέγχου ήταν $1,14 \pm 0,89$.

Ανάλογα με την δοκιμασία t-test η διαφορά μεταξύ αυτών των τιμών βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($P=0,000$). Εικόνα 3.

Εικόνα 3: Συνολικά : σημαντική διαφορά μέσης τιμής PZ σε ασθενείς με θρόμβωση σε σχέση με υγιείς μάρτυρες



Λαμβάνοντας υπ όψιν την πιθανότητα διαφοράς στη προδιάθεση για θρόμβωση μεταξύ των διαφορετικών φύλων προέκυψε η ερώτηση αν αυτή η στατιστική σημαντικότητα ισχύει και για της γυναίκες και για τους άνδρες.

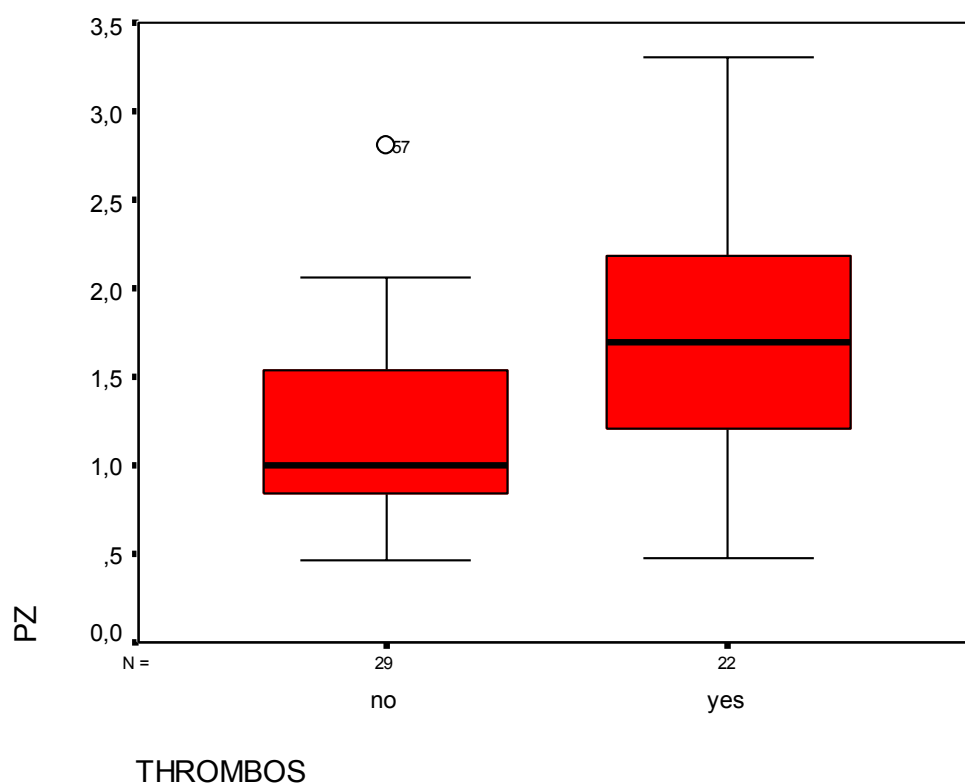
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δυο υποομάδων φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Μέση τιμή PZ σε γυναίκες και άνδρες με θρόμβωση σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες

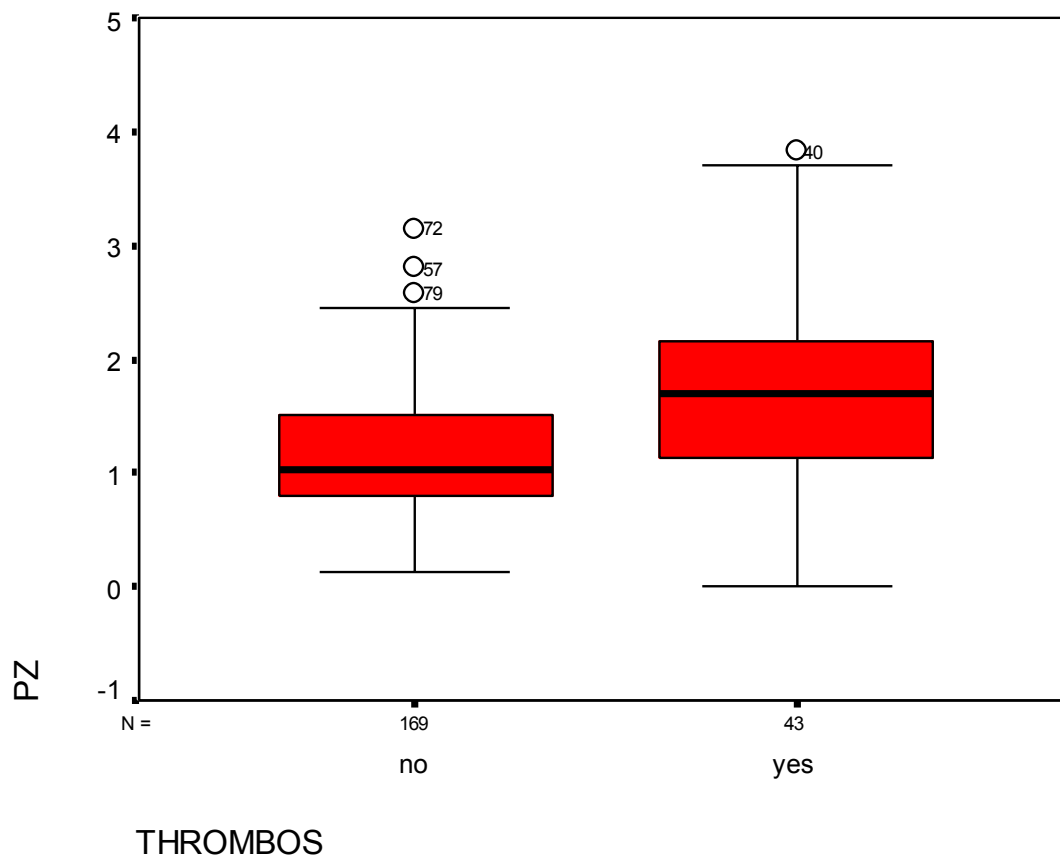
	Θρόμβωση - ΝΑΙ		Θρόμβωση – ΟΧΙ		P
	N	PZ	N	PZ	
Ανδρες	21	1,76±1,03	140	1,13±0,56	0,000
Γυναίκες	22	1,72±0,75	29	1,20±0,5	0,006
Σύνολο	43	1,74±0,89	169	1,14±0,89	0,000

Η σημαντική διαφορά των μέσων τιμών PZ τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες με θρόμβωση απεικονίζονται στις εικόνες 4 και 5.

Εικόνα 4: Γυναίκες με θρόμβωση : σημαντική διαφορά μέσης τιμής PZ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες



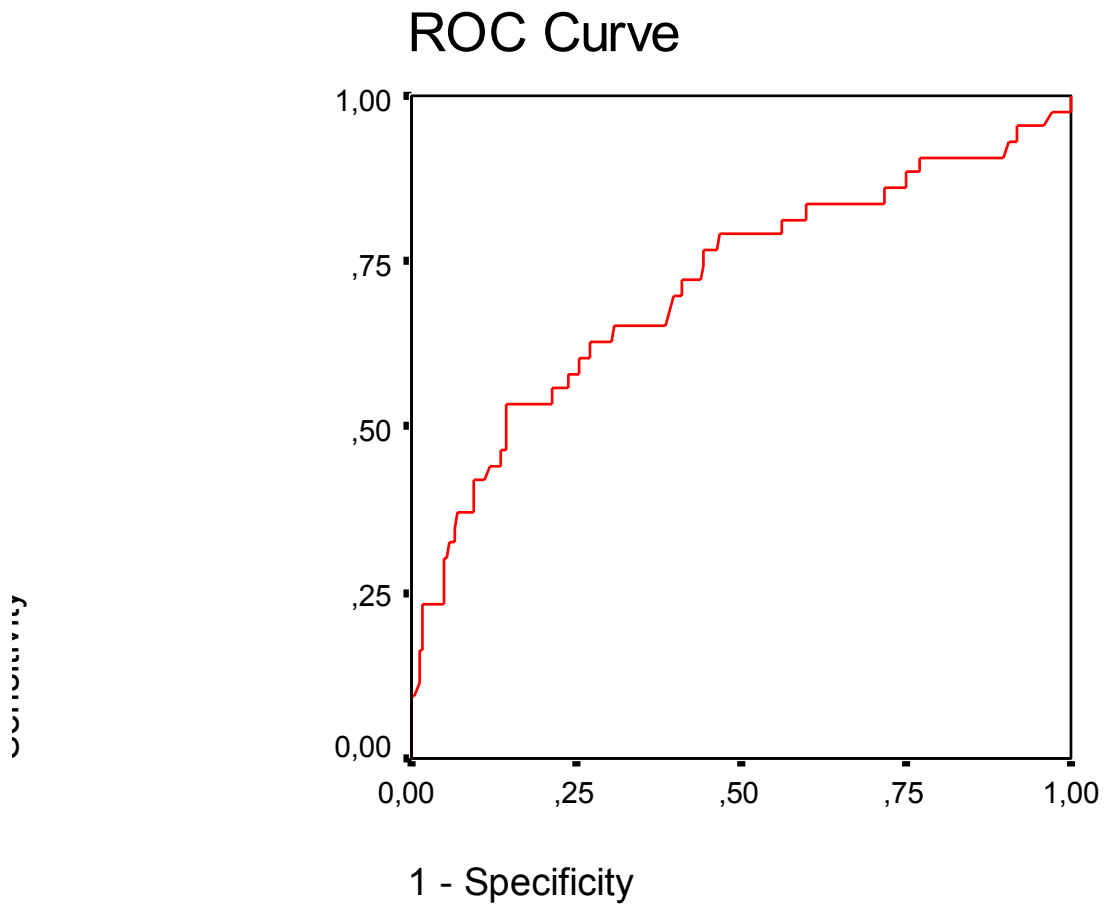
Εικόνα 5: Άνδρες με θρόμβωση : σημαντική διαφορά μέσης τιμής PZ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες



Προκειμένου να καθοριστεί η διαγνωστική σημασία της μεθόδου (PZ ως παράγοντας κινδύνου για θρόμβωση) χρησιμοποιήθηκε η σχετική αναλογία της ευαισθησίας της μεθόδου με την ειδικότητα της βάση των καμπύλων ROC.

Στην **Εικόνα 6** απεικονίζεται η καμπύλη ROC συνολικά . Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη αποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα της μεθόδου με τιμή AUROC (area under the curve) = 0,714 (p=0,00)

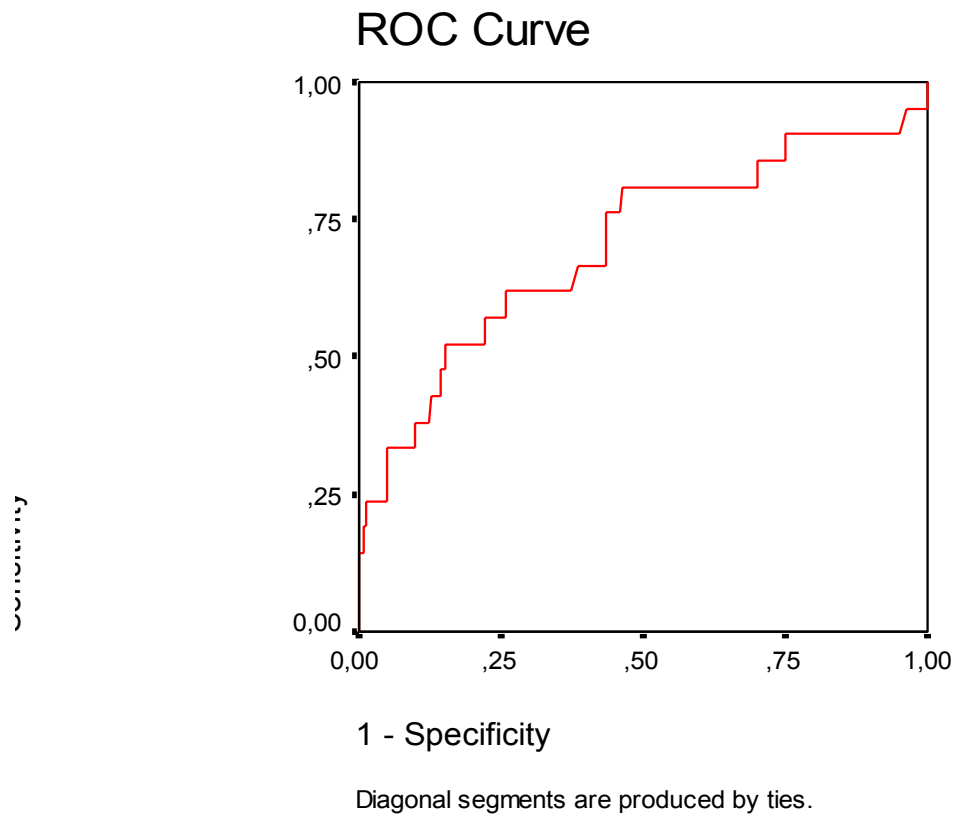
Εικόνα 6: Σημασία της PZ ως διαγνωστικό εργαλείο για ασθενείς με θρόμβωση



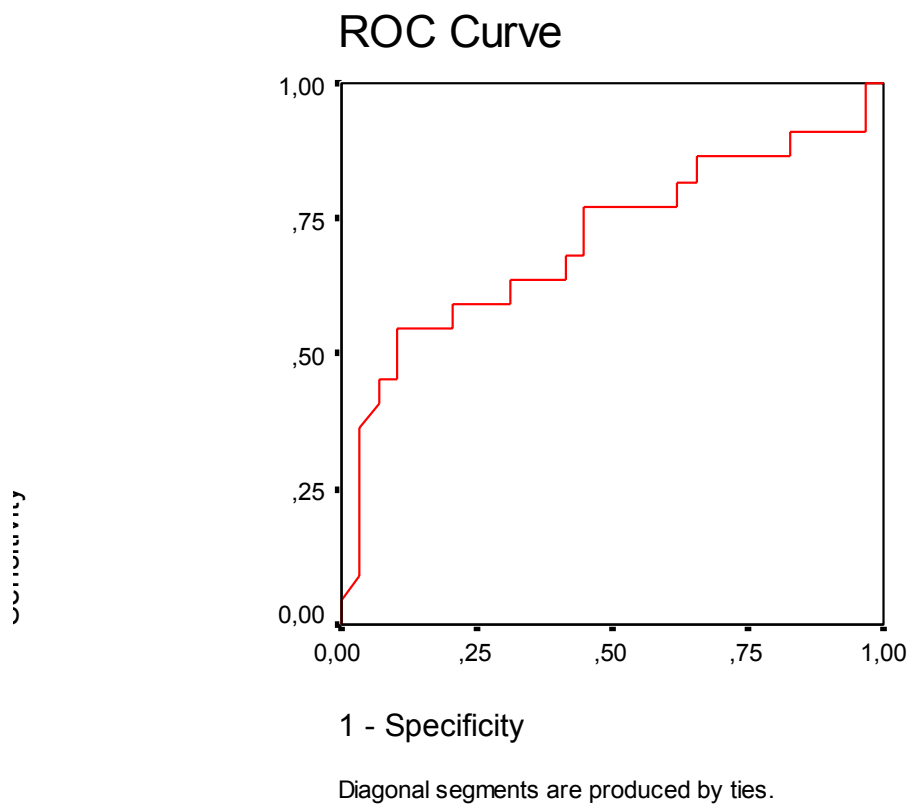
Diagonal segments are produced by ties.

Το γεγονός αυτό φαίνεται να ισχύει τόσο για τους άνδρες όσο και για τις γυναίκες με AUROC 0,703 ($p=0,03$) για άνδρες και αντίστοιχα 0,708 ($p=0,01$) για της γυναίκες (Εικόνες 7 και 8)

Εικόνα 7: Σημασία της PZ ως διαγνωστικό εργαλείο για άνδρες με θρόμβωση



Εικόνα 8: Σημασία της PZ ως διαγνωστικό εργαλείο για γυναίκες με θρόμβωση



Με δεδομένο ότι η PZ αποτελεί μέρος του αιμοστατικού μηχανισμού και ανιχνεύεται και υπο φυσιολογικές συνθήκες στο πλάσμα η επόμενη ερώτηση ήταν ποια είναι η τιμή που θα μπορούσε να οριστεί ως όριο για να θεωρηθεί παθολογική και διαγνωστική για προδιάθεση για θρόμβωση.

Προκειμένου να απαντηθεί το σχετικό ερώτημα έγινε η ανάλυση της βέλτιστης ευαισθησίας και ειδικότητας για κάθε ξεχωριστή τιμή.

Στο σύνολο βρέθηκε ότι η τιμή 1,48 έχει ευαισθησία 60% και ειδικότητα 75% και θα μπορούσε να οριστεί ως cut off της μεθόδου.

Ανάλογα για τις γυναίκες η τιμή 1,48 αποδεικνύει ευαισθησία 63% και ειδικότητα 69% , όμως στους άνδρες η τιμή 1,29 έχει την καλύτερη ευαισθησία 66% και ειδικότητα 62%.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά τις πρώτες αναφορές που συσχέτισαν την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Z σε νέους ασθενείς με ιστορικό ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου αλλά όχι με φλεβικές θρομβώσεις (114) ακολούθησαν πολλές μελέτες που προσπάθησαν να διερευνήσουν τον ρόλο της πρωτεΐνης Z στη θρομβοεμβολική νόσο, με αντικρουόμενα αποτελέσματα (113). Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα αποδίδονται τουλάχιστον κατά ένα μέρος στον μικρό αριθμό ασθενών που ελάμβαναν μέρος στις μελέτες καθώς και στην επιλογή της ομάδας (υγιείς ομάδες ελέγχου ή ομάδες σταθμισμένες κατά ηλικία και φύλο) .

Οι Sofi et al (115) πραγματοποίησαν μετα-ανάλυση που περιελάμβανε 2054 ασθενείς με επεισόδια αρτηριακών θρομβώσεων (ομάδα ελέγχου 3033 άτομα) και 1297 ασθενείς με φλεβική θρόμβωση (ομάδα ελέγχου 1399 άτομα). Οι μελετητές κατέληξαν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της πρωτεΐνης Z και των αρτηριακών θρομβώσεων (OR 2.67, 95% CI 1.6–4.48, $p = 0.0002$) και της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου (OR 2.18, 95% CI 1.19–4, $p = 0.01$). Σημαντικός περιορισμός αυτής της μετα-ανάλυσης είναι ότι βασίσθηκε μόνο σε μελέτες «ασθενών-μαρτύρων» (case-control studies), και για αυτόν τον λόγο η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή. Βασιζόμενος κανείς στη διεθνή βιβλιογραφία θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι η συσχέτιση της φλεβικής θρόμβωσης με την ανεπάρκεια PZ φαίνεται να είναι ασθενέστερη σε σύγκριση με αυτή της αρτηριακής θρόμβωσης. Είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη μας ότι στην τελευταία σχετική μετα-ανάλυση περιελήφθησαν ασθενείς με φλεβική θρόμβωση σε επιλεγμένο πληθυσμό ασθενών (ασθενείς με FV Leiden μετάλλαξη (116) ή ασθενείς με ασυνήθη συχνότητα παραγόντων κινδύνου για θρόμβωση (117). Ενώ, ένα επιπλέον σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μελέτης αποτέλεσε το γεγονός ότι δεν μπόρεσε να καταλήξει σε μία τιμή cut-off που να ορίζει την ανεπάρκεια της PZ.

Οι Martinelli et al (118) υποστηρίζουν ότι εάν μόνο τα πολύ χαμηλά επίπεδα PZ μπορούν να θεωρηθούν ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για φλεβική νόσο, τότε σίγουρα μέτρια ανεπάρκεια της PZ θα αύξανε το «δυναμικό κινδύνου» για θρομβοεμβολική νόσο άλλων συνυπαρχόντων προθρομβωτικών παραγόντων κινδύνου.

Στην προσπάθεια λογικής ερμηνείας των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών έγιναν αρκετές προσπάθειες μελέτης και αξιολόγησης των διαφόρων πολυμορφισμών των γονιδίων της πρωτεΐνης Z, αφού αρκετοί από αυτούς θεωρούνται ότι παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στα επίπεδα της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα. Άλλες πάλι μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z μπορούν να επηρεαστούν και από άλλους παράγοντες όπως παρουσία δυσλιπιδαιμίας (119) ή φλεγμονής (120, 121).

Λαμβάνοντας αυτές τις παραμέτρους υπόψη αντιλαμβάνεται κανείς ότι η ερμηνεία των επιπέδων της PZ στο πλάσμα και η συσχέτιση τους με αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή αφού αρκετά συχνά σε ασθενείς κυρίως με αρτηριακή νόσο συνυπάρχει και υπερλιπιδαιμία αλλά και φλεγμονώδης αντίδραση. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη λίγες είναι οι μελέτες που προσπαθούν να ερευνήσουν/αξιολογήσουν ταυτόχρονα τόσο την ύπαρξη πολυμορφισμών της PZ όσο και τα επίπεδα της στο πλάσμα (106, 122,123). Αυτές οι μελέτες επιβεβαιώνουν τον ρόλο των πολυμορφισμών A-13G και G79A στη ρύθμιση των επιπέδων της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα. Σε αυτή την κατεύθυνση στην μελέτη των Cesari F et.al. (122) και μεν αναφέρονται χαμηλότερα επίπεδα PZ στους ασθενείς με επεισόδια αρτηριακών θρομβώσεων, όμως η συχνότητα των πολυμορφισμών του γονιδίου της PZ βρέθηκε παρόμοια μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, υποδηλώνοντας εμέσως ότι η ανευρεθείσα μειωμένη τιμή PZ στο πλάσμα ήταν ενδεχομένως επίκτητη, και θα μπορούσε να αποτελεί δείκτη αυτής καθεαυτής της αγγειακής νόσου.

Αντίθετα οι Nowak-Gottl et al. (108) στην δική τους μελέτη αναφέρουν ότι συγκεκριμένος απλότυπος (ATG), συνοδευόταν από υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης Z, σχετιζόμενα άμεσα με ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε παιδιά. Μετα-ανάλυση 131 ενηλίκων δεν κατόρθωσε να επιβεβαιώσει τα αντίστοιχα ευρήματα σαν παράγοντα κινδύνου στη εγκεφαλική φλεβική θρόμβωση (124). Σημαντικό μειονέκτημα όμως της μελέτης έχει να κάνει με το γεγονός ότι δεν καταγράφονται σε αυτήν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z. Αντίστοιχα μικρός είναι και ο αριθμός μελετών που αξιολογούν τα επίπεδα της ZPI στο πλάσμα είτε σε σχέση με αρτηριακή είτε με φλεβική νόσο (94, 99, 125,126, 127). Καθώς τα αποτελέσματα για αυτήν καθευατή την PZ είναι αντικρουόμενα, θα πρέπει να παραγματοποιηθούν μελέτες που να εστιάζονται στον πιθανό ρόλο της ZPI και την όποια συσχέτιση της με την θρομβοεμβολική νόσο. Σε αυτή την κατεύθυνση οι van de Water et al. (128) προσδιόρισαν στην κωδικοποιούσα περιοχή της ZPI 16 μεταλλάξεις/πολυμορφισμούς και δύο μεταλλάξεις στα R67 και W303 ,τις οποίες συσχετίζουν με φλεβική θρόμβωση. Ο ρόλος αυτών των πολυμορφισμών στην φλεβική νόσο αναλύθηκε περαιτέρω πάλι όμως με αντικρουόμενα αποτελέσματα (111, 129), ενώ πρόσφατη μετα-ανάλυση πάνω από 2000 περιπτώσεων και 3000 controls απέτυχε να αναδείξει πιθανό ρόλο αυτών των μεταλλάξεων στην φλεβική νόσο (130). Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι δεν υπάρχουν μελέτες που να αναλύουν τόσο τα επίπεδα της ZPI στο πλάσμα σε σχέση με αυτές τις μεταλλάξεις, και κατά συνέπεια δεν είναι γνωστό εάν αυτές οι μεταλλάξεις συνοδεύονται από χαμηλά επίπεδα ZPI στο πλάσμα. Επιπλέον δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς

της ZPI με την αρτηριακή ισχαιμικό νόσο. Μία ιδιαίτερη αναφορά αξίζει στον ρόλο της PZ στη φλεγμονή, αφού αυτή συχνά συνοδεύει την θρομβοεμβολική νόσο και μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσει οποιαδήποτε προσπάθεια συσχέτισης. Ο ρόλος της φλεγμονής στα επίπεδα της πρωτεΐνης Z και της ZPI στο πλάσμα είναι αμφισβητούμενος. Μερικές μελέτες αναφέρουν χαμηλά επίπεδα PZ σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα IL-6 ή ινωδογόνου (120, 131) ενώ έχει περιγραφεί σημαντική αύξηση (από 1.54 ng/ml σε 1.91 ng/ml, $p < 0.04$) της PZ στο πλάσμα 72 ώρες μετά από αγγειοπλαστική στεφανιαίων (132), ενισχύοντας τον θεωρία για πιθανό ρόλο της φλεγμονής στα επίπεδα της πρωτεΐνης Z κατά τη διάρκεια οξέων αγγειακών επεισοδίων (121). In vitro μελέτες δεν κατάφεραν να αναδείξουν ρόλο των φλεγμονωδών κυτταροκινών στην βιοσύνθεση της PZ σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων (102), ενώ παρουσία Oncostatin M, κυτταροκίνη της οικογένειας της IL-6, οδήγησε σε αύξηση της βιοσύνθεσης της PZ από ενδοθηλιακά κύτταρα (133) υποδηλώνοντας πιθανή αλλά όχι και τόσο ισχυρή επαγωγή σύνθεσης της PZ μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των κλινικών μελετών μπορεί να οφείλονται στην παρουσία υποκείμενων νοσημάτων των ασθενών που συμμετείχαν στις μελέτες. Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ IL-6 και των επιπέδων της PZ στο πλάσμα σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία ή λέμφωμα (120) μπορεί να οφείλεται σε ήπιες διαταραχές της αιμόστασης (συχνή σε αιματολογικές κακοήθειες) που οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα PZ (134) ανεξάρτητα από την άνοδο των επιπέδων της IL-6, που αποτελεί έναν δείκτη επιθετικής νόσου στα λεμφώματα (135). Κατά παρόμοιο τρόπο η αύξηση των τριγλυκεριδίων έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα PZ (119). Στην μελέτη των McQuillan *et al.*, 26% των ασθενών έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τη στιγμή της διάγνωσης (121), πάθηση που πολύ συχνά συνοδεύεται από υπερτριγλυκεριδαιμία. Παρόλα αυτά, στην μελέτη δεν αναφέρονται τα ποσοστά αυτών των ασθενών. Κατά συνέπεια το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της PZ αυξάνονται κατά την οξεία φάση των ισχαιμικών επεισοδίων θα μπορούσαν να αποδοθούν κατά κύριο λόγο στο συχνότερο επιπολασμό της υπεργλυκεριδαιμίας σε αυτή την ομάδα ασθενών παρά στη φλεγμονή.

Πρόσφατα όμως δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης Z, όπως της PC και PS είναι ο περιορισμός της υπερπηκτικής ανταπόκρισης: Οι πρώτες μελέτες σε ποντίκια έδειξαν – σε αντίθεση με τις μελέτες σε ανθρώπους με αιμορραγία- ότι οι καταστάσεις ανεπάρκειας της PZ αυξάνουν δραματικά την θρομβωτική διάθεση του παράγοντα V Leiden (FVL). Όπως αποδείχθηκε σε διαγονιδιακά ποντίκια μεμονωμένη ανεπάρκεια της PZ ήταν συμβατή με φυσιολογική επιβίωση προσφέροντας ένα φαινομενικά φυσιολογικό φαινότυπο.

Όταν όμως συνδυάστηκε με ομόζυγο FVL γονότυπο, η ανεπάρκεια της PZ προκάλεσε ενδομητρική και περιγεννητική θρόμβωση και μια διαταραχή της πήξης που οδηγούσε σε σχεδόν απόλυτη θνητότητα (138,140,141). Μελέτες σε ανθρώπους επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις του Yin και συν.(142) όπου χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z σχετίστηκαν με πρώιμη εμφάνιση φλεβοθρόμβωσης σε ασθενείς με FVL. Επιπλέον οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα PZ φάνηκε να πάσχουν από σοβαρότερες θρομβοεμβολικές επιπλοκές από ότι οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα. (116, 118). Η επίπτωση της εγγύς φλεβοθρόμβωσης βρέθηκε να είναι συχνότερη στους ασθενείς με χαμηλά σε σχέση με αυτούς με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z (75% στους ασθενείς με επίπεδα πρωτεΐνης Z<1000μg/l έναντι 41% στους ασθενείς με επίπεδα πρωτεΐνης Z>1000μg/l). Επίσης σε ασθενείς που συνυπήρχε R255H αντικατάσταση στο γονίδιο της πρωτεΐνης Z επιπλέον της μεταλλαγής του FVL παρουσίαζαν συχνότερα θρομβοεμβολικά επεισόδια σε σχέση με τους ασθενείς με FVL αλλά χωρίς R255H αντικατάσταση (116). Κάποια σχέση έχει παρατηρηθεί επίσης μεταξύ χαμηλών επιπέδων PZ και αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL). Σε άλλη μελέτη ο επιπολασμός χαμηλών επιπέδων πρωτεΐνης Z (κάτω της 5ης εκατοστιαίας θέσης των μαρτύρων) ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και aPL αντισώματα (24.3%) σε σχέση με τους ασθενείς με aPL αντισώματα αλλά απουσία αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου και τους υγιείς μάρτυρες (10.3% και 4.6% αντίστοιχα). Μάλιστα ταυτόχρονη ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Z φάνηκε να αυξάνει κατά επτά φορές τον κίνδυνο αρτηριακής θρόμβωσης στους ασθενείς με aPL αντισώματα στην ίδια μελέτη (143). Επίσης η PZ έχει μελετηθεί σε γυναίκες με ανεξήγητες ή καθ' έξιν εκτρώσεις. Σε μια σύγκριση 200 γυναικών με ένα ανεξήγητο επεισόδιο πρώιμου εμβρυικού θανάτου (μεταξύ 10ης και 15ης ηλικίας κυήσεως) και 200 υγιών μαρτύρων με φυσιολογικές εγκυμοσύνες, ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Z βρέθηκε σημαντικά συχνότερα στις γυναίκες με απώλεια του εμβρύου (22 έναντι 4 τοις εκατό) (144).

Η σχέση μεταξύ επιπέδων πρωτεΐνης Z και AEE στους ανθρώπους δεν είναι ξεκάθαρη και παραμένει αμφιλεγόμενη: Αυξημένη συχνότητα ανεπάρκειας της πρωτεΐνης Z βρέθηκε σε 169 ασθενείς με ισχαιμικό AEE σε σχέση με 88 υγιείς μάρτυρες (20% έναντι 5%) ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας σε 56 ασθενείς με φλεβική θρομβοφιλία που υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση με την αρτηριακή αλλά όχι τη φλεβική νόσο. Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ επιπέδων PZ ή ZPI και φλεβοθρόμβωσης σε μελέτη 426 περιπτώσεων με φλεβοθρόμβωση και 471 φυσιολογικών μαρτύρων (147).

Η παρουσία της πρωτεΐνης Z στις αθηροσκληρωτικές αγγειακές βλάβες υποδηλώνει ότι αυτή η πρωτεΐνη λαμβάνει μέρος στην αρτηριακή νόσο (147). Ο πιθανός ρόλος της PZ στην εμφάνιση αρτηριακής θρόμβωσης φαίνεται να ενισχύεται και από μελέτη σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Σε σύγκριση 223 ασθενών και 265 υγιών μαρτύρων χαμηλά επίπεδα PZ βρέθηκαν στο 15.7 και 4.9% αντίστοιχα (148). Χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης Z έχουν βρεθεί επίσης να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ, ιδιαίτερα σε άντρες και επί απουσίας διαβήτη. Αντίθετα, αυξημένα επίπεδα PZ βρέθηκαν σε νέους ασθενείς με ισχαιμικά ΑΕΕ, ενώ ισχυρή σχέση μεταξύ αυξημένων επιπέδων στο αίμα της πρωτεΐνης Z κατά την οξεία φάση και ισχαιμικού ΑΑΕ ιδιαίτερα όταν αυτό οφειλόταν σε αθηροθρομβοεμβολισμό μεγάλων αρτηριών (148) παρατηρήθηκε σε άλλη μελέτη.

Η δική μας μελέτη, επιβεβαιώνει καταρχήν την ευρεία διακύμανση των τιμών της πρωτεΐνης Z στο πλάσμα των υγιών που αναφέρεται σε όλες τις σχετικές μελέτες έτσι όπως απεικονίζεται και στον σχετικό πίνακα :

Αριθμός Ελεγχθέντων	Mean +/- SD (εύρος), μg/ml	Μέθοδος	Reference
88	2.29+/- 0.64 (1.01-3.57)	Asserachrom Protein Z, Diagnostica Stago,USA	Vasse et al (80)
125	1.77+/-0.61 (ND)	Asserachrom Protein Z	Van Goor et al (149)
443	1.79+/-ND (0.25-7.82)	Asserachrom Protein Z	Martinell et al (77)
197	1.44+/-0.64 (0.21-3.44)	Asserachrom Protein Z	Santacroc e et al (106)

Μέση τιμή πρωτεΐνης Z σε υγιείς εθελοντές

Η προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων της πρωτεΐνης Z με την εμφάνιση θρόμβωσης έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών με θρόμβωση έναντι αυτών που δεν παρουσίαζαν θρόμβωση, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων για τις δύο ομάδες (ασθενής με θρόμβωση vs υγιείς). Το γεγονός ότι οι ομάδα των ασθενών με θρόμβωση παρουσίαζε υψηλότερες τιμές πρωτεΐνης Z σε σχέση με την ομάδα των υγιών έχει παρατηρηθεί και στις μελέτες των Staton et al (109) καθώς και σε αυτή των Lichy et al, όπου επιχειρείται να συσχετιστεί με την ύπαρξη συγκεκριμένων

πολυμορφισμών του γονιδίου της PZ, και την εμφάνιση ισχαιμικών θρομβωτικών επεισοδίων κυρίως σε νέους. Δυστυχώς η μελέτη μας δεν κατέσται δυνατόν να συνεχιστεί με την μελέτη των συγκεκριμένων πολυμορφισμών. Από την άλλη πλευρά αυτό το εύρημα θα πρέπει να ερμηνευτεί με ιδιαίτερη προσοχή αφού αντίστοιχε υψηλές τιμές έχουν παρατηρηθεί και στην ομάδα χωρίς θρόμβωση, ενώ παράλληλα δεν θα πρέπει να διαφεύγει της προσοχής μας ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Z επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία τις περισσότερες φορές συνοδεύει το φαινόμενο της θρόμβωσης ιδιαίτερα της αρτηριακής, όπου έχει αποδειχθεί ότι οι δείκτες φλεγμονής είναι από τους τελευταίους που υποχωρούν.

Το πεδίο της αιμόστασης ήταν πάντοτε ιδιαίτερα πολύπλοκο. Καινούργιοι παράγοντες περιγράφονται συνέχεια τη στιγμή που οι παλαιότεροι έχουν μόλις αρχίσει να διευκρινίζονται. Στις ημέρες μας φαίνεται ότι η οικογένεια των σερπινών παίζει τον κεντρικό ρόλο. Μία τέτοια ομάδα, το σύστημα PZ/PZI, μπορεί να προσδώσει μία καινούργια διάσταση στο μηχανισμό της αιμόστασης, αφού ο συνδυασμός με άλλους παράγοντες υπερπηκτικότητας μπορεί να εξηγήσει την εμφάνιση ή όχι θρομβωτικών επιπλοκών.

Η έννοια του παράγοντα κινδύνου στο μοντέλο της θρόμβωσης έχει αρχίσει να τροποποιείται τα τελευταία χρόνια, παίρνοντας τη μορφή ενός πολυπαραγοντικού μοντέλου, στο οποίο γενετικοί, περιβαλλοντολογικοί και επίκτητοι παράγοντες κινδύνου παίζουν σημαντικό ρόλο. Η βασική ιδέα βρίσκεται στο γεγονός ότι ένας ασθενής με θρομβοφιλία έχει τουλάχιστον έναν ή και πολλές φορές περισσότερους γενετικούς παράγοντες κινδύνου για θρομβοεμβολική νόσο, οι οποίοι αυξάνουν το δυνατότητα εμφάνισης θρόμβωσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bombelli T, Schwatz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells : evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin and GPIba. J Exp Med 1998;187:329-339
2. Charo IF, Kieffel N, Philips DR. Platelet membrane glycoproteins. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. Hemostasis and thrombosis. JB Lippincott Company, Philadelphia 1994;489-507
3. Collier BS. GPIIb/IIIa antagonists: pathophysiologic and therapeutic insight from studies of c7E3 Fab. Thromb Haemost 1997;78:730-735
4. Henn V, Slupsky JR, Grofe M, et al. CD40 ligand on activated platelets trigger, an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature 1998; 391:591-594
5. Hynes RO, Bader BL. Targeted mutations in integrins and their ligands:their implications for vascular biology. Thromb Haemost 1997, 78:83-87.
6. Shattil SJ. Function and regulation of the $\beta 3$ integrins in hemostasis and vascular biology. Thromb Haemost 1995;74:149-155
7. Bauer AK. Activation of the factor VII-tissue factor pathway. Thrombosis and Haemostasis, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 1997;78(1):108-111.
8. Davie WE. Biochemical and Molecular Aspects of the Coagulation cascade, Thrombosis and Haemostasis, FK Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 1995;74(1):1-6
9. Davie WE, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 1964;145:1310-1312
10. Hemker HC, Kahn MJ. Reaction sequence of blood coagulation. Nature 1967; 215:1201-1202
11. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. Nature 1964;202:498- 499
12. Morrissey HJ, Neuenschwander FP, Huang Q, McCallum DC, Su Band Johnson EA. Factor VIIa-Tissue factor :Functional Importance of Protein membrane Interactions, Thrombosis and Haemostasis FK Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 1997;78 (1):112-116

13. Rao LVM, Rapaport SI. Studies of a mechanism inhibiting the initiation of extrinsic pathway of coagulation. *Blood* 1987;69:645-651
14. Rapaport IS, Rao LVM. The tissue Factor Pathway: How It has Become a "Prima Ballerina". *Thrombosis and Haemostasis*, FK Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 1995;74(1):7-17
15. Schmaier HA. Contact Activation: A Revision, *Thrombosis and Haemostasis*, FK Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 1997;78(1):101-107
16. Linjnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clinical Hematology* 1995; 8(2):277-290
17. Redlitz A.P, Low EF. Receptors for Plasminogen and t-PA : an update. *Baillieres Clinical Hematology* 1995;8(2):313-327
18. Binder BR. Physiology and Pathophysiology of the fibrinolytic system. *Fibrinolysis* 1995;9 (Suppl 1):3-8
19. Collen D, Linjen HR. Basic and clinical Aspects of fibrinolysis and Thrombolysis. *Blood* 12: 3114-3124
20. Salwa Khan and Joseph D Dickerman. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal* 2006, 4:15
21. Feero WG. Genetic Thrombophilia. *Primary care* 2004, 31(3):685-709
22. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA et al. Inherited thrombophilia: part I, *Thromb. Haemost* 1996, 76-651
23. Breeener BR, Nowak-Gottl U, Kosch A, Manco-Johnsos M, Laposata M. Diagnostic studies for Thrombophilia in woman on hormonal therapy and during pregnancy, and in children. *Arch Pathol Lab Med* 2002, 126 (11): 296-303
24. John A Heit. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management. *Hematology* 2007
25. Valerio De Stefano, Elena Rossi, Katia Paciaroni, Giuseppe Leone. Screening for inherited thrombophilia : indications and therapeutic implications. *Haematologica* 2002;87:1095-1108
26. Susan Murin, Gregory P. Marelich, Alejandro C. Arroliga, Richard A. Matthay. Hereditary Thrombophilia and venous thromboembolism. *Ann J Respir Crit Care Med* vol 158pp1369-1373, 1998
27. Brian R Jackson, Kyland Holmes, Amit Phansalkar, George M Rodgers. Testing for hereditary thrombophilia; a retrospective analysis of testing referred to a national laboratory. *BMC Clinical pathology* 2008, 8:3

28. Thomas Bombelli, Adila Basic, Joerg Fehr. Prevalence of hereditary thrombophilia in patients with thrombosis in different venous systems. *American Journal of Hematology* 70:126-132.2002
29. Bertina MR. Introduction: Hypercoagulable States. *Sem.Hematol* 1997;34:167-70
30. Martinelli I et al. Risk factors in venous thromboembolism . *Thromb Haemost* 2002;86:39-403
31. Bertina MR Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2002;86:92-103
32. Kisiel W. Human plasma protein C.Isolation, characterization and mechanism of activation by thrombin. *J Clin Invest* 1979;64:761-769
33. Bertina MR et al. Factor V Leiden and other risk factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem* 1997;43:1678-83
34. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67
35. Allaart CF et al.Increasd risk of venous thrombosis in carriers of protein C deficiency defect. *Lancet* 1993;341:134-8
36. Zoller B et al.Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995;85:35 18-23
37. Engesser L et al.. Hereditary protein S deficiency: clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1987;88 106:677
38. Dahlback B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenetic factor for venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-14
39. Rees DC et al. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-4
40. Rosendaal FR et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C).*Blood* 1995;85: 154-8
41. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial Thrombophilia due to Previously Unrecognized Mechanism Characterized by Poor Anticoagulant Response to Activated Protein C: Prediction of a cofactor to Activated Protein C. *Proc Nat Acad Sci* 1993;90:1004-1008
42. Ridker PM et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;332:912-7
43. Rosendaal FR et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-8.

44. Finazzi G et al. Different incidence of venous thrombosis in patients with inherited deficiencies of antithrombin III, protein, protein S. *Thromb Haemost* 1994;71:15-8
45. Carrell R, Skinner R, Jin L, Abrahams JP. Structural mobility of antithrombin and its modulation by heparin. *Thromb Haemost* 1997;78:516-519
46. Lane DA, Baystob T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Emmerich J, Thein SL. Antithrombin mutation database:2nd (1997) update. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211
47. Den Heijer M et al. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995;334:759-62
48. Simioni P et al. Hyperhomocysteinemia and deep vein thrombosis: a case control study. *Thromb Haemost* 1996;76:883-6
49. Falcon CR et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1080-3
50. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;81:165-76
51. Frosst P et al. A candidate risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995;10:111-3
52. Samama M.M, Haverkate F. Hereditary dysfibrinogenemia, afibrinogenemia, hypofibrinogenemia and thrombosis. *Hypercoagulable States*, CRC Press, 379-388,1996
53. Van Tilburg HN et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000;95:2855-9
54. Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990;323:1512-1516
55. Koster T et al. Factor VII and fibrinogen levels as a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1994;71:719-22
56. O'Donnell J et al. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost* 1997;77:825-8
57. Kraaijenhagen RA et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000;83:5-9
58. Kyrle PA et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:457-62

59. Van Hylckama VA et al. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000;95:3678-82
60. Meijers VMJ et al. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000;342:696-702
61. Broze Jr GJ, Miletich JP. Human Protein Z *Clin Invest* 1984;73(4):933-8.
62. Sejima H, Hayashi T, Deyashiky Y, Nishioka J, Suzuki K. Primary structure of vitamin k-dependent human protein Z. *Biochem.Biophys Res Commun* 1990;171(2):661-8.
63. Ichinose A, Takeya H, Espling E, Iwanaga S, Kisiel W, Davie EW. Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172(3):1139-44.
64. Sejima, H., Hayashi, T., Deyashiki, Y., Nishioka, J. & Suzuki, K. (1990)*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 661–668.
65. Rice GI, Futers TS, Grant PJ. Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost.* 2001;85:1123–1124.
66. Miletich JP, Broze GJ Jr. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and the effect of warfarin therapy. *Blood.* 1987;69:1580-1586.
67. Yurdakok M, Gurakan B, Ozbag E, et al. Plasma protein Z levels in healthy newborn infants. *Am J Hematol.* 1995;48:206-207.
68. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. *Haemostasis.*1995;25:312-316.
69. Broze GJ Jr, Miletich JP. Human protein Z. *J Clin Invest.* 1984;73:933-938.
70. Hann X, Fiehler R, Broze Jr GJ. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(16):9250-5.
71. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9250-9255.
72. McDonald JF, Shah AM, Schwalbe RA, Kisiel W, Dahlback B, Nelsestuen GL. Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochemistry.* 1997;36:5120-5127.
73. Han X, Huang Z-F, Fiehler R, Broze GJ Jr. Protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry.* 1999;38:11073-11078

74. Yin Z-F, Huang Z-F, Cui J, et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6734-6738.
75. Heeb MJ, Cabral KM, Ruan L. Down regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem* 2005;280(40):33819-25.
76. Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Flehier R, Lasky N, Ginburg D et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6734-8.
77. Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005;3 (12): 2817-9.
78. Fedi S, Sofi F, Brogi D, Tellini I, Cesari F, Sestini I, et al. Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2003;90 (6): 1173-8.
79. Morange PE, Juhan-Vague I. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of coronary heart disease: the Prime Study. *J Thromb Haemost* 2004;2 (11):2050-1
80. Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001;357(9260):933-4
81. Heeb MJ, Paganini-Hill A, Griffin JH, Fisher M. Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29(2):139-44.
82. Ayoub N, Esposito G, Barete S, Soria C, Piette JC, Frances C. Protein Z deficiency in antiphospholipid-negative Sneddon's syndrome. *Stroke* 2004;35(6):1329-32.
83. McColl MD, Deans A, Maclean P, Tait RC, Greer IA, Walker ID. Plasma protein Z deficiency is common in women with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 2003;120(5):913-4.
84. Forasterio RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost* 2003;1(8):1764-70.
85. Gris JC, Quere I, Dechaud H, Mercier E, Pincon C, Hoffet M, et al. High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained fetal loss. *Blood* 2002;99(7):2606-8.
86. Gris JC, Amadio C, Mercier E, Lavigne-Lissalde G, Dechaud H, Hoffet M, et al. Anti-protein Z antibodies in women with pathologic pregnancies. *Blood* 2003 ;101(12) :4850-2.

87. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27:551–556.
88. Greten J, Kreis I, Liliensiek B, et al. Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *Vasa*. 1998;27:144–148.
89. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med*. 2003;115:721-728.
90. Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, Coppola R, Fiorelli G, Mannucci PM. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. 2000;111:467-473.
91. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome: an overview. *J Thromb Haemost*. 2007;5:642-645.
92. Singer ST, Kuypers FA, Styles L, Vichinsky EP, Foote D, Rosenfeld H. Pulmonary hypertension in thalassemia: association with platelet activation and hypercoagulable state. *Am J Hematol*. 2006;81:670-675
93. Cleuren AC, Van der Linden IK, De Visser YP et al. 17 α -Ethinylestradiol rapidly alters transcript levels of murine coagulation genes via estrogen receptor α . *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1838–1846.
94. Al-Shanqeeti A, van Hylckama Vlieg A, Berntorp E et al. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005; 93: 411–413.
95. Santacroce R, Cappucci F, Di Perna P et al. Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1197–1199.
96. Ravi S, Mauron T, Lammle B et al. Protein Z in healthy human individuals and in patients with a bleeding tendency. *Br J Haematol* 1998; 102: 1219–1223.
97. Heeb MJ, Fisher M, Paganini-Hill A. Association of low protein Z levels with ischemic stroke in young women. *Thromb Haemost* 2007; 97: 495–496.
98. Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ Jr. Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 85: 655–660
99. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L et al. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1764–1770.

100. Zhang J, Tu Y, Lu L et al. Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood* 2008; 111: 4973–4978.
101. Fujimaki K, Yamazaki T, Taniwaki M et al. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry* 1998; 37: 6838–6846.
102. Vasse M, Denoyelle C, Legrand E et al. Weak regulation of protein Z biosynthesis by inflammatory cytokines. *Thromb Haemost* 2002; 87: 350–351.
103. Vossen CY, Hasstedt SJ, Rosendaal FR et al. Heritability of plasma concentrations of clotting factors and measures of a prethrombotic state in a protein C-deficient family. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 242–247.
104. Rice GI, Futers TS, Grant PJ. Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1123–1124.
105. Lichy C, Kropp S, Dong-Si T et al. A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. *Stroke* 2004; 35: 40–45.
106. Santacroce R, Sarno M, Cappucci F et al. Low protein Z levels and risk of occurrence of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2417–2422.
107. Le Cam-Duchez V, Barbay V, Bal Dit Sollier C et al. Haplotypic or genotypic combinations of three protein Z polymorphisms influence protein Z plasma level. *Thromb Haemost* 2009; 101: 212–214.
108. Nowak-Gottl U, Frohlich B, Thedieck S et al. Association of the protein Z ATG haplotype with symptomatic nonvascular stroke or thromboembolism in white children: a family-based cohort study. *Blood* 2009; 113: 2336–2341.
109. Staton J, Sayer M, Hankey GJ et al. Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations, and ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 1123–1127.
110. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ, Souri M et al. R255h amino acid substitution of protein Z identified in patients with factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 2005; 128: 248–252.
111. Corral J, Gonzalez-Conejero R, Soria JM et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 2006; 108: 177–183.

112. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049–3055.
113. Vasse M. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost* 2008; 100: 548–556.
114. Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY et al. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001; 357: 933–934.
115. Sofi F, Cesari F, Abbate R et al. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost* 2010; 103: 749–756.
116. Kemkes-Matthes B, Nees M, Kuhnel G et al. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in factor V Leiden patients. *Thromb Res* 2002; 106: 183–185.
117. Pardos-Gea J, Ordi-Ros J, Serrano S et al. Protein Z levels and anti-protein Z antibodies in patients with arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; 121: 727–734.
118. Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E et al. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2817–2819.
119. Heeb MJ, Paganini-Hill A, Griffin JH et al. Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 139–144.
120. Undar L, Karadogan I, Ozturk F. Plasma protein Z levels inversely correlate with plasma interleukin-6 levels in patients with acute leukemia and non- Hodgkin's lymphoma. *Thromb Res* 1999; 94: 131–134.
121. McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ et al. Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke* 2003; 34: 2415–2419.
122. Cesari F, Fatini C, Sticchi E et al. Protein Z gene polymorphisms (intron F 79 G>A; –13 A>G) are not associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2006; 96: 98–99.
123. Le Cam-Duchez V, Soria C, Dit Sollier CB et al. Rare genotypes of protein Z gene are a risk factor for premature myocardial infarction but not protein Z plasma level. *Thromb Haemost* 2009; 102: 131–136.
124. Marjot T, Yadav S, Hasan N et al. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. *Stroke* 2011; 42: 913–918.

125. Le Cam-Duchez V, Bagan-Triquenot A, Barbay V et al. The G79A polymorphism of protein Z gene is an independent risk factor for cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 2008; 255: 1521–1525.
126. Sofi F, Cesari F, Tu Y et al. Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 731–735.
127. Refaai MA, Ahn C, Lu L et al. Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1628–1629.
128. Van de Water N, Tan T, Ashton F et al. Mutations within the protein Z-dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol* 2004; 127: 190–194.
129. Razzari C, Martinelli I, Bucciarelli P et al. Polymorphisms of the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) gene and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2006; 95: 909–910.
130. Dentali F, Gianni M, Lussana F et al. Polymorphisms of the Z protein protease inhibitor and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Br J Haematol* 2008; 143: 284–287.
131. Fedi S, Sofi F, Brogi D, Tellini I et al. Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2003; 90: 1173–1178.
132. Cesari F, Gori AM, Fedi S et al. Modifications of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 85–86.
133. Vasse M, Denoyelle C, Corbiere C et al. Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependent inhibitor. *Thromb Haemost* 2006; 95: 519–523.
134. Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 8–13.
135. Aydin F, Yilmaz M, Ozdemir F et al. Correlation of serum IL-2, IL-6 and IL-10 levels with International Prognostic Index in patients with aggressive non- Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 570–572.
136. Miletich JP, Broze GJ Jr. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarine therapy. *Blood* 1987; 69: 1580–1586.

137. Souri M, Koseki-Kuno S, Iwata H et al. A naturally occurring E30Q mutation in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood* 2005; 105: 3149–3154.
138. Iwata H, Souri M, Kemkes-Matthes B et al. An additional Glu30Lys substitution in the Gla domain of the protein Z gene is not a common polymorphism but a rare mutation, which would cause its deficiency. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2360–2361
139. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* 2000; 106: 873–878.
140. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 1481–1488.
141. Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN et al. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* 2009; 114: 2307–2314.
142. Yin Z-F, Huang ZF, Cui J et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6734–6738.
143. Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev* 2001; 184: 258–274.
144. Gris JC, Amadio C, Mercier E et al. Anti-protein Z antibodies in women with pathologic pregnancies. *Blood* 2003; 101: 4850–4852.
145. Sater MS, Finan RR, Al-Hammad SA et al. High frequency of anti-protein Z IgM and IgG autoantibodies in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 526–531.
146. Topalidou M, Effraimidou S, Farmakiotis D et al. Low protein Z levels, but not the intron F G79A polymorphism, are associated with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res* 2009; 124: 24–27.
147. Greten J, Kreis I, Liliensiek B et al. Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *Vasa* 1998; 27: 144–148.
148. Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova YV. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 231–251.
149. van Goor MP, Dippel DW, Jie KS, de Maat MP, Koudstaal PJ, Leebeek FW. Low protein Z levels but not the protein Z gene G79A polymorphism are a risk factor for ischemic stroke. *Thromb Res* 2008; 123: 213–8.

150. Lichy C, Kropp S, Dong-Si T, Genius J, Dolan T, Hampe T, Stoll F, Renner K, Grond-Ginsbach C, Grau A. A common polymorphism of the protein Z gene is associated with proteinZ plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young, Stroke. 2004;35:40-45
-