



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Φορέας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα

Ιατρικής

Τίτλος Προγράμματος

Θρόμβωση - Αιμορραγία - Ιατρική των Μεταγγίσεων

“Διαταραχές της αιμόστασης στον καρκίνο παχέος εντέρου”

Διπλωματική Εργασία

Νικολάου Γ. Σίμου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Τα μικροκυστίδια	3
i. Εισαγωγή	3
ii. Ο ρόλος των μικροκυστιδίων	4
iii. Ο φυσιολογικός ρόλος των μικροκυστιδίων	7
iv. Ο ρόλος των μικροκυστιδίων σε παθολογικές καταστάσεις	9
2. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου	11
i. Εισαγωγή	11
ii. Παθογένεση	13
iii. Σταδιοποίηση	15
3.Υπερπηκτικότητα στον καρκίνο	20
i. Εισαγωγή	20
ii. Βιολογικοί μηχανισμοί	22
4. Θρομβοελαστομετρία (ROTEM)	25
i. Εισαγωγή	25
ii. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου	26
iii. Περιοχές Αναφοράς	32
iv. ROTEM® δοκιμασίες	33

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης	36
2. Υλικά και Μέθοδοι	37
3. Αποτελέσματα	45
4. Συμπεράσματα	52

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

54

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΑ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ

Εισαγωγή

Τα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια (MPs) είναι κυστίδια φωσφολιπιδίων διαστάσεων 0,1-1 μm που απελευθερώνονται από το αίμα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την ενεργοποίηση και την απόπτωση [17]. Ο μηχανισμός του σχηματισμού μικροκυστιδίων με αναδίπλωση των εξωτερικών κυτταρικών μεμβρανών τους παρέχει προπηκτική δράση, κυρίως λόγω της έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης και της έκφρασης ιστικού παράγοντα [18,19]. Τα μικροκυστίδια που φέρουν ιστικό παράγοντα είναι σημαντικά για τη δημιουργία θρομβίνης και την πήξη του αίματος *in vitro* [20] καθώς και για τον σχηματισμό θρόμβων *in vivo* [21-23].

Τα μικροκυστίδια είναι παρόντα στο αίμα υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά το επίπεδο των κυκλοφορόντων μικροκυστιδίων ανευρίσκεται αυξημένο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, που συμπεριλαμβάνουν τις λοιμώξεις, αγγειακές βλάβες καθώς και παθολογικές καταστάσεις του ανοσοποιητικού συστήματος [24-27]. Τα μικροκυστίδια είναι ετερογενή σε μέγεθος, σύνθεση, πυκνότητα και κυτταρική προέλευση. Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων έχουν μοναδικές λειτουργικές δυνατότητες λόγω των παραλλαγών των λιπιδίων και των πρωτεϊνών που αποκτώνται από τα γονικά κύτταρα [28-30]. Το κύριο κλάσμα των κυκλοφορόντων μικροκυστιδίων σε άτομα τα οποία δε νοσούν, αναφέρεται ότι είναι μικροκυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια ή από μεγακαρυοκύτταρα [31,32].

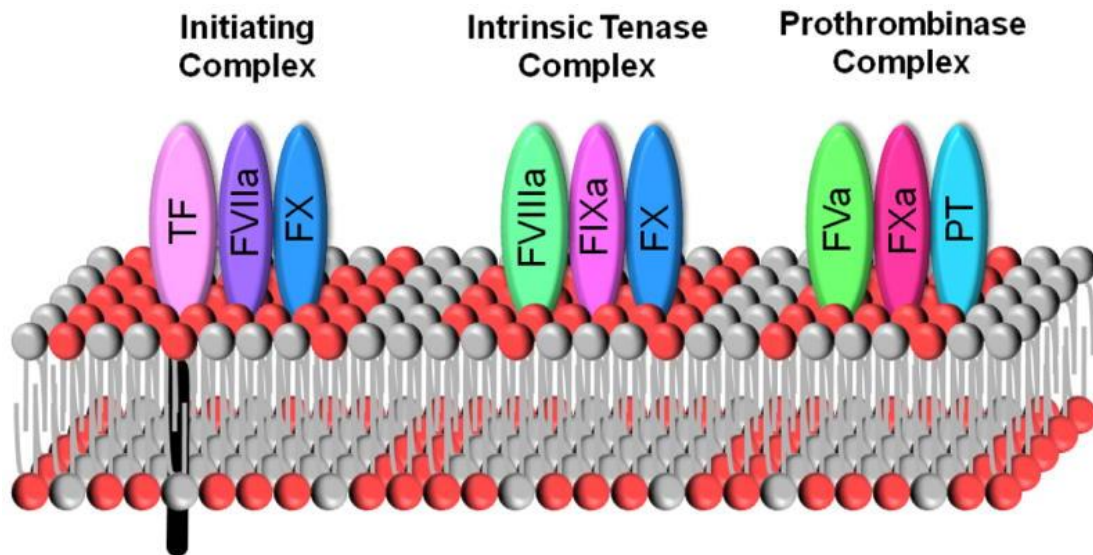
Τόσο τα μεγακαρυοκύτταρα όσο και τα αιμοπετάλια μπορούν να παράγουν μικροκυστίδια. Τα κυκλοφορόντα μικροκυστίδια που προέρχονται από μεγακαρυοκύτταρα διακρίνονται από αυτά που προέρχονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια λόγω της παρουσίας CD62P, LAMP-1. Η προσεκτική εξέταση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων έχει ρίξει φως σε ένα νέο μηχανισμό που οδηγεί

στην παραγωγή μικροκυστιδίων . Υπό φυσιολογικές συνθήκες ροής, τα μικροκυστίδια απομακρύνονται από τις μεγάλες μεμβρανώδεις επιφάνειες που σχηματίζονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την ετερογένεια των μικροκυστιδίων. Τα μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης χαρακτηρίζονται συνήθως από την έκφραση επιφανειακών αντιγόνων αιμοπεταλίων και φωσφατιδυλσερίνης. Στην πραγματικότητα, μόνο ένα κλάσμα μικροκυστιδίων προερχόμενα από αιμοπετάλια φιλοξενεί φωσφατιδυλοσερίνη και ένα ξεχωριστό υποσύνολο περιέχει μιτοχόνδρια ικανά για αναπνοή. Κατά τη διάρκεια της νόσου, η επιφάνεια των μικροκυστιδίων μπορεί να υποβληθεί σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η κιτρουλίωση, υποστηρίζοντας περαιτέρω την έννοια της ποικιλομορφίας των μικροκυστιδίων.[16]

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων

Ο ρόλος της φωσφατιδυλσερίνης

Η μεμβράνη πλασματοκυτταρική μεμβράνη των φυσιολογικών κυττάρων έχει ασύμμετρη κατανομή λιπιδίων στις εσωτερικές και εξωτερικές μεμβράνες. Τα ανιονικά φωσfolιπίδια, όπως η φωσφατιδυλσερίνη, εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στην εσωτερική μονοστιβάδα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των μικροκυστιδίων υπάρχει απώλεια της ασύμμετρης δομής της μεμβράνης με ιονικά φωσfolιπίδια να μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη του μικροκυστιδίου [71]. Η παρουσία φωσφατιδυλσερίνης αυξάνει σημαντικά την προπηκτική δράση των μικροκυστιδίων επειδή διευκολύνει τη σύνθεση των συστατικών του καταρράκτη της πήξης. Αυτό οφείλεται σε ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ θετικά φορτισμένων περιοχών γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος (GLA) στις πρωτεΐνες πήξης και της φωσφατιδυλσερίνης στη μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες της πήξης που περιέχουν περιοχή GLA περιλαμβάνουν τους παράγοντες VII (FVII), IX και X και την προθρομβίνη(Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Συγκέντρωση συμπλοκών πήξης σε φωσφατιδυλσερίνη θετική φωσφολιπιδική μεμβράνη

Τα σύμπλοκα πήξης (TF: FVIIa, FVIIIa: FIXa και FVa: FXa) συναρμολογούνται σε μία μεμβρανική επιφάνεια. Η παρουσία ανιοντικών φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφατιδυλσερίνης (κόκκινο), διευκολύνει τη σύνδεση των FVIIa, FIXa, FXa και προθρομβίνης (PT) μέσω αλληλεπίδρασης με τις περιοχές Gla εντός των πρωτεϊνών. Τα φωσφολιπίδια που προέρχονται από την εξωτερική μεμβράνη πριν από τη διακοπή της ασυμμετρίας της μεμβράνης φαίνονται με γκρι.[72]

Η φωσφατιδυλσερίνη στην επιφάνεια των μικροκυστιδίων μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δημιουργούν φωσφατιδυλσερίνη θετικά μικροκυστίδια, αν και σε μία μελέτη βρέθηκαν τόσο φωσφατιδυλσερίνη θετικά όσο και αρνητικά μικροκυστίδια [73].

Ο ρόλος του ιστικού παράγοντα

Ο ιστικός παράγοντας (TF) είναι ένας υποδοχέας για το FVII / VIIa (Σχήμα 1). Το σύμπλεγμα TF: FVIIa ενεργοποιεί τόσο το FX όσο και το FIX για να ξεκινήσει την πήξη του αίματος [74]. Η παρουσία ιστικού παράγοντα σε μικροκυστίδια αυξάνει δραματικά την προπηκτική δράση τους. Ο ιστικός παράγοντας έχει υψηλή συγγένεια με το FVII / FVIIa και συνεπώς τα TF + μικροκυστίδια στο αίμα θα συνδέονται εύκολα με FVII / FVIIa. Το σύμπλοκο TF: FVIIa ρυθμίζεται από τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI) [75]. Αυτός ο αναστολέας τύπου Kunitz συντίθεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυκλοφορεί στο αίμα για να αποτρέψει την ακατάλληλη ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης [75], αναστέλλει το σύμπλοκο TF:

FVIIa με έναν τρόπο εξαρτώμενος από τον FXa. Επομένως, είναι πιθανό ότι μερικά από τα σύμπλοκα TF: FVIIa που υπάρχουν στα μικροκυστίδια στο αίμα θα ανασταλούν μέσω του TFPI.

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ιστικού παράγοντα, όπως η γλυκοζυλίωση, μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη δράση του [76-78]. Αυτό σημαίνει ότι τα TF + μικροκυστίδια από διαφορετικές κυτταρικές πηγές μπορεί να έχουν διαφορετικές προπηκτικές ιδιότητες. Επιπλέον, το σύμπλεγμα TF: FVIIa μπορεί να βρεθεί σε χαμηλές (επίσης αποκαλούμενες κρυπτογραφημένες) και υψηλές καταστάσεις δραστηριότητας, οι οποίες θεωρείται ότι οφείλονται σε διαφορές στη διαμόρφωση του ιστικού παράγοντα [79]. Οι διαφορετικές περιπτώσεις ανακαλύφθηκαν επειδή η διάσπαση του TF + κυττάρων αύξησε τα επίπεδα της δραστηριότητας του ιστικού παράγοντα χωρίς να μεταβληθεί το αντιγόνο αυτού [80]. Αυτή η αύξηση της δραστηριότητας του ιστικού παράγοντα συσχετίστηκε με μια αύξηση της φωσφατιδυλσερίνης, γεγονός που οδήγησε ορισμένους ερευνητές να προτείνουν ότι η φωσφατιδυλσερίνη μπορεί να προκαλέσει μια μετατροπή στον ιστικό παράγοντα που αυξάνει την ειδική του δραστηριότητα [79]. Άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του ιστικού παράγοντα έχουν προταθεί και είναι πιθανό ότι υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δράση του TF: FVIIa σε μικροκυστίδια που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων [81].

Κάποιοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι τα μικροκυστίδια στο αίμα περιέχουν ιστικό παράγοντα σε κατάσταση χαμηλής δραστηριότητας για να αποτρέψουν την ακούσια ενεργοποίηση του καταρράκτη πήξης. Κατ'αναλογία με τα κύτταρα, αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα φωσφατιδυλσερίνης στα μικροκυστίδια είναι κάτω από το βέλτιστο επίπεδο για πλήρη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα. Αν αυτή η αντίληψη είναι σωστή τότε ψύχοντας τα μικροκυστίδια θα αυξηθούν τα επίπεδα φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη και επίσης θα αυξηθεί η δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα. Ωστόσο, η δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα των μικροκυστιδίων που απομονώθηκαν από το πλάσμα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε ολική αρθροπλαστική του γόνατος δεν αυξήθηκε με θεραπεία με ιονομυκίνη ή ψύξη για αύξηση της έκθεσης της φωσφατιδυλσερίνης [82]. Μια άλλη ομάδα δεν βρήκε επίσης διαφορά στη δράση του ιστικού παράγοντα των φρέσκων μικροκυστιδίων έναντι των παγωμένων μικροκυστιδίων που

απομονώθηκαν από υγιή άτομα και ασθενείς με καρκίνο. Επίσης, τα παγωμένα μικροκυστίδια δεν αύξησαν τα επίπεδα της φωσφατιδυλσερίνης [83].

Ο φυσιολογικός ρόλος των μικροκυστιδίων

Τα κυκλοφορόντα μικροκυστίδια εν απουσία νόσου, πιθανολογείται ότι προέρχονται από τη γήρανση των κυττάρων [33].

Παρά τις πολλές μελέτες σχετικά με το ρόλο των μικροκυστιδίων στη νόσο, η λειτουργική σημασία των παρόντων μικροκυστιδίων σε φυσιολογικές καταστάσεις παραμένει ασαφής. Τα κυκλοφορόντα μικροκυστίδια σε υγιείς μάρτυρες έχει αποδειχθεί ότι υποστηρίζουν την παραγωγή χαμηλής ποιότητας θρομβίνης μέσω του συστήματος επαφής [34]. Εάν τα μικροκυστίδια κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να παρέχουν επαρκή δραστηριότητα για να υποστηρίξουν την πήξη του αίματος παραμένει ασαφές. Ιδιαίτερα λίγα είναι γνωστά για τις πιθανές επιδράσεις των μικροκυστιδίων στο σχηματισμό θρόμβου ινώδους και στην λύση αυτού, τα οποία αποτελούν καθοριστικά στάδια της πήξης του αίματος. Το ινώδες είναι ένα τρισδιάστατο νηματοειδές δίκτυο με μεταβλητή αρχιτεκτονική που καθορίζει τις ιδιότητές του, συμπεριλαμβανομένης της χημικής σταθερότητας, της διαπερατότητας και της ικανότητας να παρέχει ένα παραμορφώσιμου αλλά ανθεκτικού μηχανικού ικριώματος για τους θρόμβους [35]. Τα δομικά χαρακτηριστικά ενός θρόμβου ινώδους, όπως το πορώδες του δικτύου και το πάχος των ινών, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την πορεία και την έκβαση των αιμοστατικών διαταραχών [36-38].

Παρά τους διάφορους τρόπους ανάμειξης των μικροκυστιδίων στην παθοφυσιολογία της πήξης του αίματος, υπάρχουν πολύ περιορισμένες ενδείξεις για οποιεσδήποτε μηχανική σύνδεση μεταξύ μικροκυστιδίων και ινώδους. Η προσθήκη μικροκυστιδίων προερχόμενων από αιμοπετάλια σε φυσιολογικό πλάσμα οδήγησε σε μείωση της διαπερατότητας του ινώδους [39]. Τεχνητά κυστίδια που περιείχαν φωσφατιδυλσερίνη δεσμεύτηκαν σε κεκαθαρμένο ινωδογόνο και άλλαξαν την θολερότητα των θρόμβων ινώδους [40]. Τα μικροκυστίδια που δημιουργήθηκαν *in vitro* συνδέθηκαν καλύτερα με θρόμβους πλάσματος σε σύγκριση με θρόμβους ινώδους από κεκαθαρμένο ινωδογόνο [41]. Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από

διεγερμένα αιμοπετάλια και μονοκύτταρα *in vitro* αποδείχθηκαν ότι ρυθμίζουν τον σχηματισμό θρόμβων [42]. Έχουν βρεθεί ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων των μικροκυστιδίων, της διαπερατότητας του θρόμβου ινώδους και της αντοχής στη λύση σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [43].

Τα φυσιολογικά κυκλοφορόντα μικροκυστίδια έχουν ισχυρή επίδραση στο σχηματισμό ινώδους και στην τελική δομή και τα χαρακτηριστικά των θρόμβων ινώδους μέσω τουλάχιστον δύο μηχανισμών. Ο ένας είναι μια έμμεση κινητική επίδραση βασισμένη στον ρυθμό δημιουργίας θρομβίνης που εξαρτάται από τα μικροκυστίδια. Η άλλη είναι η άμεση δέσμευση των μικροκυστιδίων στις ινώδεις ίνες κατά τη διάρκεια και μετά τη συναρμολόγηση ινώδους. Και οι δύο μηχανισμοί υποκρύπτουν έναν προηγούμενος υποτιμημένο πιθανό ρόλο των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση ως διαμορφωτές του σχηματισμού και των ιδιοτήτων του ινώδους [44].

Ποικίλα φυσιολογικά κύτταρα (κύτταρα αίματος και ενδοθηλιακά κύτταρα) παράγουν μικροκυστίδια, όπως επίσης και τα κακοήγη κύτταρα. Τόσο η χημική (π.χ. κυτοκίνες, θρομβίνη, κυτταροτοξική χημειοθεραπεία[46], η αυξημένη χοληστερόλη [47] και η έκθεση στον καπνό των τσιγάρων[48]) όσο και η φυσική διέγερση (π.χ. το στρες, η υποξία και διαφορά ερεθίσματα[49-51]) πυροδοτούν την απελευθέρωση μικροκυστιδίων. Επιπλέον, τα μικροκυστίδια συμμετέχουν στην απόπτωση των κυττάρων.

Η ενεργοποίηση των κυττάρων οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , με αποτέλεσμα τη διαταραχή της ασυμμετρίας της μεμβράνης και την αυξημένη έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης (PS), η οποία βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς επίσης και στη διόγκωση της μεμβράνης και την επακόλουθη απόρριψη μικροκυστιδίων [52]. Αν και η είσοδος ασβεστίου και οι ακόλουθες ενέργειες παίζουν υποθετικά ένα ρόλο στη διαμόρφωση των μικροκυστιδίων, οι ακριβείς μηχανισμοί που καθορίζουν το σχηματισμό των μικροκυστιδίων παραμένουν ασαφείς. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ενεργοποιούμενες από τη μίτωση πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) εμπλέκονται στη διαδικασία σχηματισμού μικροκυστιδίων μέσω της διερεύνησης των μικροκυστιδίων που παράγονται από ανθρώπινα μακροφάγα όταν εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου[53]. Απαιτούνται συμπληρωματικές μελέτες για τον καλύτερο

προσδιορισμό των μηχανισμών του σχηματισμού των μικροκυστιδίων και για τη διερεύνηση του κατά πόσο υπάρχουν διαφορές στους μηχανισμούς στους οποίους βασίζεται ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων, ανάλογα με το αν η διαδικασία αυτή συνδέεται με την ενεργοποίηση ή την απόπτωση.

Ως κυστίδια μεμβράνης, τα μικροκυστίδια όχι μόνο φέρουν αντιγόνα ενδεικτικά της κυτταρικής τους προέλευσης αλλά διατηρούν επίσης και βιολογικά μόρια. Θεωρείται ότι είναι βασικά χαρακτηριστικά ενός πανταχού παρόντος και πολύ οργανωμένου συστήματος κυτταρικής επικοινωνίας και μεταφοράς ενδοκυτταρικού υλικού [54-57]. Τα μικροκυστίδια μπορούν να επάγουν την κυτταρική σηματοδότηση[58] και να ρυθμίσουν πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες [59] προσδένοντας φλεγμονώδη στοιχεία (LpA και κυτοκινών), αυξητικούς παράγοντες (TGF- β και VEGF) και πρωτεάσες (uPA και MMP) [60,61], επιπροσθέτως της αλλαγής των δραστηριοτήτων του ιστικού παράγοντα(TF) [62] και της φωσφατιδυλσερίνης.

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων σε παθολογικές καταστάσεις

Υπάρχει έντονη συσχέτιση μεταξύ της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου και του καρκίνου ανεξάρτητα από τους τύπους και τα στάδια αυτού. Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζουν τα μικροκυστίδια στη διαδικασία της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου , η σχέση μεταξύ των μικροκυστιδίων και του καρκίνου έχει αποτελέσει αντικείμενο πρόσφατων μελετών και άρθρων ανασκόπησης, τα οποία προσέφεραν νέες ερμηνείες της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικροκυστιδίων, θρόμβωσης και καρκίνου[63-68]. Μια μελέτη που διερεύνησε τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια και τα θετικά στον ιστικό παράγοντα μικροκυστίδια σε ασθενείς με καρκίνο με και χωρίς φλεβική θρομβοεμβολική νόσο έδειξε στατιστικά σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων μικροκυστιδίων πλάσματος (1019 ± 656 μικροκυστίδια / μL) σε ασθενείς με καρκίνο και φλεβική θρομβοεμβολική νόσο σε σύγκριση με ασθενείς με καρκίνο χωρίς φλεβική θρομβοεμβολική νόσο (755 ± 391 μικροκυστίδια / μL , $P = 0,002$)[63]. Παρ 'όλα αυτά, η πολυπαραγοντική ανάλυση απέτυχε να δείξει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων θετικών στον ιστικό παράγοντα μικροκυστιδίων και της φλεβικής θρομβοεμβολής σε ασθενείς με καρκίνο[63]. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με διαφορετικούς τύπους

καρκίνου που εμφάνισαν επίσης φλεβική θρομβοεμβολή, έδειξαν υψηλότερο αριθμό κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων και ιδιαίτερα υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας των μικροκυστιδίων που φέρουν ιστικό παράγοντα από ότι οι ασθενείς με καρκίνο χωρίς φλεβική θρομβοεμβολή [69], ένα εύρημα επιβεβαιωμένο από άλλες τρεις μελέτες που χρησιμοποίησαν κυτταρομετρία ροής, , και δοκιμασίες προθρομβινάσης[66-68]. Συνολικά, αυτές οι μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ θρόμβωσης και έκφρασης μικροκυστιδίων που φέρουν ιστικό παράγοντα σε ασθενείς με καρκίνο. Ωστόσο, αυτή η αιτιώδης σχέση είναι αμφισβητήσιμη επειδή δεν μπορεί να αποκλειστεί σε ορισμένες περιπτώσεις η πιθανότητα μιας αντίστροφης αιτιώδους σχέσης (δηλ. Θρόμβωση και άλλοι πιθανοί παράγοντες να προκαλούν τη δημιουργία των μικροκυστιδίων). Εν συντομία, τα μικροκυστίδια υποθετικά μεσολαβούν σε μερικές από τις ακόλουθες πτυχές του καρκίνου: η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων που φέρουν ιστικό παράγοντα που προέρχονται τόσο από καρκινικά κύτταρα όσο και από κύτταρα ξενιστές μπορεί να οδηγήσει σε υπερπηκτική κατάσταση σε ασθενείς με καρκίνο. Τα μικροκυστίδια μπορούν να συμβάλλουν στην διάδοση των κακοηθειών προάγοντας τις αγγειογενετικές διεργασίες και μειώνοντας την ανοσολογική απόκριση , γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον απελευθέρωση μικροκυστιδίων. Απαιτούνται συμπληρωματικές μελέτες για την καλύτερη αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ μικροκυστιδίων, καρκίνου και φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου [70].

Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια (PMPs) έχουν συσχετιστεί επίσης με την ενίσχυση των μεταστάσεων και την κακή πρόγνωση στους συμπαγείς όγκους . Τα κυκλοφορόντα αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια μεταφέρουν τα μικροRNA των αιμοπεταλίων (miRNAs) στα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα. Το αγγειακό σύστημα των συμπαγών όγκων είναι εξαιρετικά διαπερατό, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση κυτταρών του όγκου και αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι τα αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια διεισδύουν σε συμπαγείς όγκους τόσο στον άνθρωπο όσο και σε μοντέλα ποντικών και μεταφέρουν RNA προερχόμενο από τα αιμοπετάλια, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, σε καρκινικά κύτταρα *in vivo* και *in vitro*, με αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων του όγκου.

Αυτά τα RNA καταστέλλονται σε κύτταρα όγκου που έχουν υποστεί αγωγή με αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια, έχοντας ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακή

δυσλειτουργία και αναστολή ανάπτυξης, με ένα τρόπο εξαρτώμενο από το miR-24. Έτσι, τα miRNAs που προέρχονται από αιμοπετάλια μεταφέρονται in vivo σε καρκινικά κύτταρα σε συμπαγείς όγκους μέσω διήθησης με μικροκυστίδια, ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων των κυττάρων του όγκου και ρυθμίζουν την εξέλιξη του όγκου. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν νέα γνώση των μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς RNA και προσθέτουν πολλαπλά στρώματα στους ρυθμιστικούς ρόλους των miRNAs και των αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων στην πρόοδο του όγκου. Η μεταβίβαση ρυθμιστικών RNA με τη μεσολάβηση του πλάσματος και η διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό με σημαντικά αποτελέσματα στα πλαίσια της ενισχυμένης αγγειακής διαπερατότητας.[45]

2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΩΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου , ορίζεται ως η ανάπτυξη καρκίνου από το κόλον ή το ορθό (μέρη του παχέος εντέρου) [84]. Ένας καρκίνος είναι η ανώμαλη ανάπτυξη κυττάρων που έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν ή να εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος [85]. Τα σημεία και τα συμπτώματα του καρκίνου του παχέως εντέρου μπορεί να περιλαμβάνουν το αίμα στα κόπρανα, μια αλλαγή της εντερικής κινητικότητας , την απώλεια βάρους και αίσθημα κόπωσης καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας [86]. Οι περισσότερες περιπτώσεις ορθοκολικού καρκίνου οφείλονται σε παράγοντες γήρατος και τρόπου ζωής με μικρό αριθμό περιπτώσεων να οφείλονται σε υποκείμενες γενετικές διαταραχές [87,88]. Ορισμένοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν τη διατροφή, την παχυσαρκία, το κάπνισμα και την έλλειψη σωματικής άσκησης. [87,88] Οι διατροφικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο περιλαμβάνουν το κόκκινο και το επεξεργασμένο κρέας καθώς και το αλκοόλ. [87,89] Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου είναι οι ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΕΝ), η οποία περιλαμβάνει τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα [87]. Ορισμένες από τις κληρονομικές γενετικές διαταραχές που μπορούν να

προκαλέσουν καρκίνο του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση και τον κληρονομικό καρκίνο του παχέος εντέρου χωρίς πολυποδίαση. Ωστόσο, αυτά αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων. [87,88] Αρχίζει συνήθως ως ένας καλοήθης όγκος, συχνά με τη μορφή ενός πολύποδα, ο οποίος με την πάροδο του χρόνου καθίσταται κακοήθης [87].

Ο καρκίνος του εντέρου μπορεί να διαγνωστεί με τη λήψη ενός δείγματος του παχέος εντέρου κατά τη διάρκεια μιας σιγμοειδοσκόπησης ή κολonosκόπησης. [86] Στη συνέχεια ακολουθεί απεικόνιση για να διαπιστωθεί εάν η νόσος έχει εξαπλωθεί σε μεταστατικές εστίες [84]. Ο έλεγχος αυτός είναι απαραίτητος για την πρόληψη και τη μείωση της θνητότητας από καρκίνο του παχέος εντέρου [90]. Ο προληπτικός έλεγχος, με μία από τις πολλές μεθόδους, συνιστάται από την ηλικία των 50 έως την ηλικία των 75 ετών. [90]

Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται για τον καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να περιλαμβάνουν κάποιο συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας, χημειοθεραπείας και στοχοθετημένης θεραπείας. [84] Οι καρκίνοι που περιορίζονται στο τοίχωμα του παχέος εντέρου μπορεί να θεραπευθούν με χειρουργική επέμβαση, ενώ ο καρκίνος που έχει εξαπλωθεί ευρέως συνήθως δεν είναι θεραπεύσιμος, με τη διαχείριση των ασθενών να κατευθύνεται προς τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και των συμπτωμάτων [84]. Το πενταετές ποσοστό επιβίωσης στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι περίπου 65% [91]. Η ατομική πιθανότητα επιβίωσης εξαρτάται από το στάδιο του όγκου, ανεξάρτητα από το εάν μπορεί να αφαιρεθεί όλος ο όγκος με χειρουργική επέμβαση και τη γενική υγεία του ατόμου. [86] Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος συνηθέστερος τύπος καρκίνου, που αποτελεί περίπου το 10% όλων των περιπτώσεων [92]. Το 2012, υπήρχαν 1,4 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 694.000 θάνατοι από τη νόσο [92]. Η νόσος είναι πιο συχνή στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου ανευρίσκεται πάνω από το 65% των περιπτώσεων [87], ενώ είναι λιγότερο συχνή στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες [87].

Παθογένεση

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι μια ασθένεια που προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν το κόλον ή το ορθό τα οποία αποτελούν τμήματα της γαστρεντερικής οδού. Πιο συχνά είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο μονοπάτι σηματοδότησης Wnt που αυξάνει τη δραστηριότητα σηματοδότησης. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες και το πιο πιθανό είναι να εμφανιστούν στο προγονικό κύτταρο των εντερικών κρυπτών [93-95]. Το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο σε όλους τους τύπους καρκίνου του παχέος εντέρου είναι το γονίδιο APC, το οποίο παράγει την πρωτεΐνη APC. Η πρωτεΐνη APC προλαμβάνει τη συσσώρευση της πρωτεΐνης β-κατενίνης. Χωρίς APC, η β-κατενίνη συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα και μετακινείται στον πυρήνα, συνδέεται με το DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή πρωτο-ογκογονιδίων. Αυτά τα γονίδια είναι φυσιολογικά σημαντικά για την ανανέωση και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, αλλά όταν εκφράζονται ακατάλληλα σε υψηλά επίπεδα, μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Ενώ οι APC μεταλλάσσονται στους περισσότερους καρκίνους του παχέος εντέρου, μερικοί καρκίνοι έχουν αυξημένη β-κατενίνη λόγω μεταλλάξεων της β-κατενίνης (CTNNB1) που εμποδίζουν τη δική της διάσπαση ή έχουν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια με λειτουργία παρόμοια με APC όπως AXIN1, AXIN2, TCF7L2, ή NKD1. [96]

Πέρα από τα σφάλματα στην οδό σηματοδότησης Wnt, πρέπει να εμφανιστούν και άλλες μεταλλάξεις για να γίνει το κύτταρο καρκινικό. Η πρωτεΐνη p53, που παράγεται από το γονίδιο TP53, επιβλέπει φυσιολογικά την κυτταρική διαίρεση και σκοτώνει τα κύτταρα αν έχουν ελαττώματα της οδού Wnt. Τελικά, μια κυτταρική γραμμή αποκτά μια μετάλλαξη στο γονίδιο TP53 και μετασχηματίζει τον ιστό από έναν καλοήγη επιθηλιακό όγκο σε έναν επιθετικό καρκίνο επιθηλιακών κυττάρων. Μερικές φορές το γονίδιο που κωδικοποιεί την p53 δεν μεταλλάσσεται, αλλά μεταλλάσσεται μια άλλη προστατευτική πρωτεΐνη που ονομάζεται BAX [96].

Άλλες πρωτεΐνες υπεύθυνες για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο οι οποίες συνήθως απενεργοποιούνται σε καρκίνους του παχέος εντέρου είναι ο TOP-β και το DCC (διαγράφονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου). Ο TOP-β έχει μια απενεργοποιητική μετάλλαξη σε τουλάχιστον το ήμισυ των καρκίνων του παχέος εντέρου. Μερικές φορές ο TGF-β δεν απενεργοποιείται, αλλά μια καταβολική

πρωτεΐνη που ονομάζεται SMAD απενεργοποιείται. [96] Το DCC έχει συνήθως ένα διαγραμμένο τμήμα ενός χρωμοσώματος στον καρκίνο του παχέος εντέρου [97].

Περίπου το 70% όλων των ανθρώπινων γονιδίων εκφράζονται σε καρκίνο του παχέος εντέρου, με μόλις πάνω από 1% να έχουν αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με άλλες μορφές καρκίνου [98]. Ορισμένα γονίδια είναι ογκογονίδια και υπερεκφράζονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες KRAS, RAF και PI3K, οι οποίες φυσιολογικά διεγείρουν το κύτταρο να διαιρείται σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, μπορούν να αποκτήσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερ-ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η χρονολογική σειρά των μεταλλάξεων είναι μερικές φορές σημαντική. Εάν εμφανιστεί προηγούμενη μετάλλαξη APC, μια πρωτεύουσα μετάλλαξη KRAS προχωρεί συχνά στον καρκίνο και όχι σε μια αυτοπεριοριζόμενη υπερπλαστική ή οριακή αλλοίωση. [99] Το PTEN, ένας καταστολέας όγκου, φυσιολογικά αναστέλλει το PI3K, αλλά μερικές φορές μπορεί να μεταλλαχθεί και να απενεργοποιηθεί. [96]

Η ολοκληρωμένη ανάλυση γονιδιώματος έχει αποκαλύψει ότι τα καρκίνωμα του παχέος εντέρου μπορούν να ταξινομηθούν σε υπερμεταλλαγμένους και μη υπερμεταλλαγμένους τύπους όγκου [100]. Εκτός από τις ογκογόνες και αδρανοποιητικές μεταλλάξεις που περιγράφονται για τα παραπάνω γονίδια, μη υπερμεταλλαγμένα δείγματα περιέχουν επίσης μεταλλαγμένα CTNNB1, FAM123B, SOX9, ATM και ARID1A. Προχωρώντας μέσα από ένα ξεχωριστό σύνολο γενετικών συμβάντων, οι υπερμεταλλαγμένοι όγκοι εμφανίζουν μεταλλαγμένες μορφές ACVR2A, TGFBR2, MSH3, MSH6, SLC9A9, TCF7L2 και BRAF. Το κοινό θέμα μεταξύ αυτών των γονιδίων, και στους δύο τύπους όγκων, είναι η συμμετοχή τους σε μονοπάτια σηματοδότησης WNT και TGF-β, με αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα του MYC, ενός κεντρικού παράγοντα στον καρκίνο του παχέος εντέρου [100].

Σταδιοποίηση

Σταδιοποίηση κατά Dukes

Το 1932 ο Βρετανός παθολογοανατόμος Cuthbert Dukes (1890-1977) ανέπτυξε τη διάσημη σταδιοποίηση του για τον ΚΠΕ-Ο και έκτοτε το σύστημα έχει υποστεί διάφορες τροποποιήσεις με την πιο διάσημη αυτή των Αμερικανών Astler-Coller το 1954. Εντούτοις, το σύστημα αυτό έχει αντικατασταθεί κατά ένα μεγάλο μέρος από το πιο λεπτομερές σύστημα TNM (TNM staging), και δεν συνιστάται για χρήση στην κλινική πράξη αλλά ίσως το δείτε ακόμα σε μερικούς Έλληνες ασθενείς.

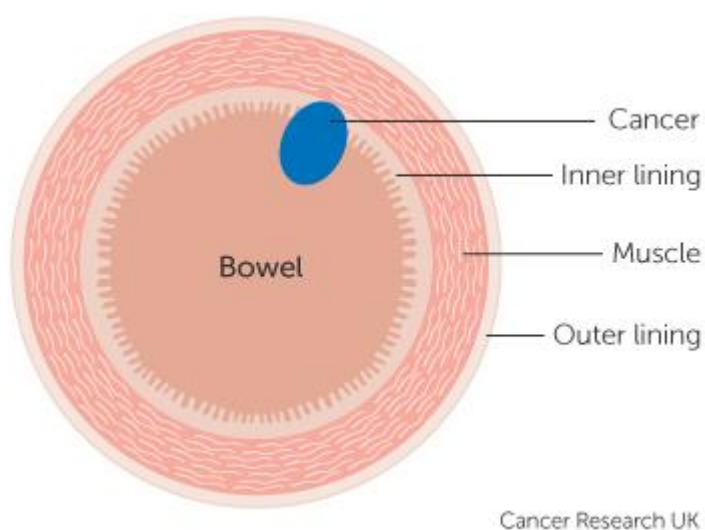
Σύμφωνα με το σύστημα αυτό τα στάδια είναι 4:

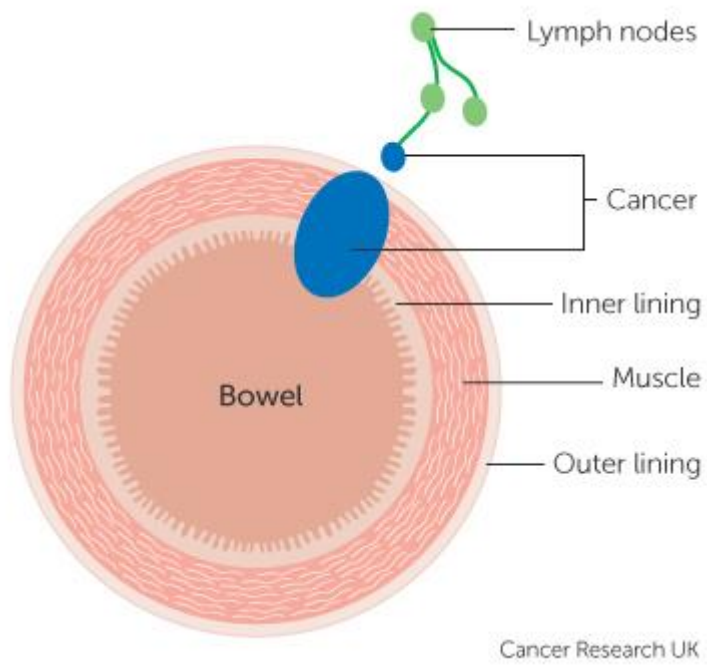
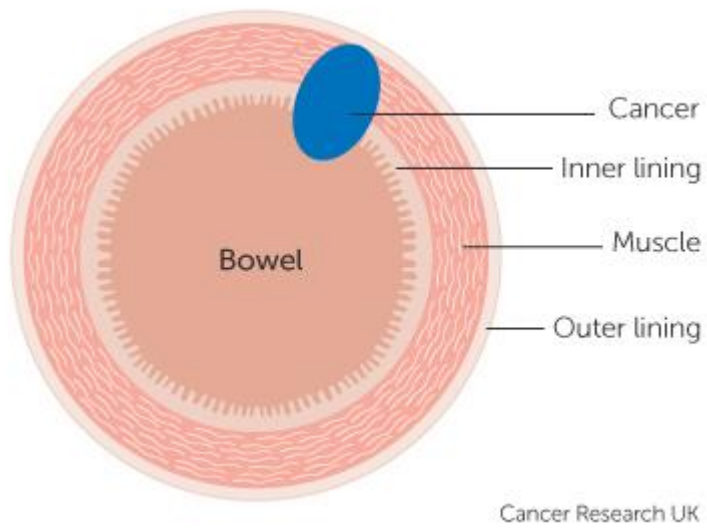
A: Ο όγκος περιορίζεται στο τοίχωμα του εντέρου και δεν επεκτείνεται σε εξωεντερικούς ιστούς και λεμφαδένες. (90% 5 ετής επιβίωση)

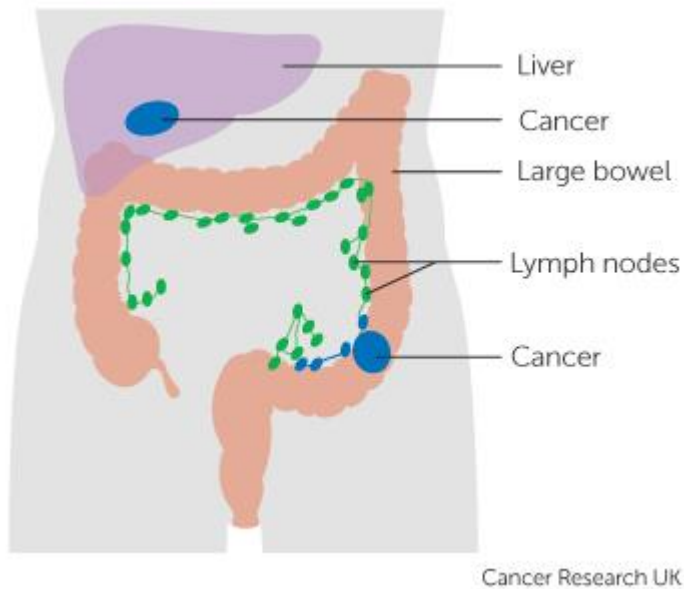
B: Ο όγκος περιορίζεται στους περικολικούς ιστούς χωρίς διήθηση των λεμφαδένων. (70% 5 ετής επιβίωση)

C: Υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις. (30% 5 ετής επιβίωση)

D: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις (το στάδιο είναι κατ' ευφημισμό μια και δεν ανήκει στην σταδιοποίηση κατά Dukes)







Εικόνα 13: Η σταδιοποίηση κατά Duke's

Σταδιοποίηση κατά Astler-Coller

A: Ο όγκος περιορίζεται στον βλεννογόνο και υποβλεννογόνο χιτώνα.

B

B1: Ο όγκος διηθεί και τον μυϊκό χιτώνα.

B2: Ο όγκος διηθεί τον ορογόνο και το περιτολικό λίπος.

B3: Επεκτείνεται σε γειτονικά όργανα.

C

C1: Όταν διηθεί τον μυϊκό χιτώνα αλλά και τους επιχώριους λεμφαδένες.

C2: Όταν διηθεί τον ορογόνο και το περιτολικό λίπος αλλά και τους επιχώριους λεμφαδένες.

C3: Επεκτείνεται σε γειτονικά όργανα και προσβάλλει τους επιχώριους λεμφαδένες.

Σταδιοποίηση κατά TNM (2010)

Το σύστημα TNM (Tumor, Node, Metastases (TNM)) της American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control είναι το σύστημα που σχεδόν όλοι σήμερα προτιμούν για την σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μερικές χώρες ή τμήματα τους όπως η Ολλανδία και η Ιαπωνία που χρησιμοποιούν παλιότερες ή τροποποιημένες εκδόσεις της 7ης έκδοσης του TNM (2010) όπως την 5η ή την 6η.

Πρωτοπαθής όγκος (T)

- T_x Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T₀ Καμία ένδειξη παρουσίας πρωτοπαθούς όγκου
- T_{is} Καρκίνωμα in situ: Ενδοεπιθηλιακός όγκος ή όγκος που διηθεί το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria mucosae)
- T₁ Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα
- T₂ Ο όγκος διηθεί τη μυϊκή στιβάδα
- T₃ Ο όγκος διηθεί όλο το πάχος τις μυϊκής στιβάδας και εισέρχεται στους περικολικούς ή περιορθικούς ιστούς
- T_{4a} Ο όγκος διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο)
- T_{4b} Ο όγκος διηθεί ή συμφύεται με άλλα παρακείμενα όργανα ή δομές (π.χ. κόλπος, προστάτης, ουροδόχος κύστη, νεφρός)

Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

- N_x Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατό να εκτιμηθούν
- N₀ Χωρίς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες
- N₁ Μετάσταση σε 1 έως 3 επιχωρίους λεμφαδένες
- N_{1a} μετάσταση σε ένα επιχώριο λεμφαδένα
- N_{1b} μετάσταση σε 2-3 λεμφαδένες

- N1c δορυφόρες εναποθέσεις (deposit(s) του όγκου στον υπορογόνιο χιτώνα, η στο μεσεντέριο, ή σε μη ορογονικές επιφάνειες περικολικών η περιορθικών ιστών χωρίς μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες
- N2 Μετάσταση σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες
- N2a μετάσταση σε 4-6 επιχωρίους λεμφαδένες
- N2b μετάσταση σε 7 η περισσότερους λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

- M0 Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- Mx Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν
- M1 Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M1a μεταστάσεις σε ένα μόνο όργανο (π.χ., Ήπαρ, Πνεύμονας, Ωοθήκες, μη επιχώριο λεμφαδένα)
- M1b Μεταστάσεις σε περισσότερα από ένα όργανα/περιοχές ή το στο περιτόναιο

[101]

3. ΥΠΕΡΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Εισαγωγή

Οι κακοήθειες χαρακτηρίζονται από διαταραχές του αιμοστατικού συστήματος που μπορούν να οδηγήσουν τους καρκινοπαθείς τόσο προς τη θρόμβωση όσο και προς την αιμορραγία. Αν και παραδοσιακά περιγράφεται περισσότερο σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, τα θρομβωτικά περιστατικά αναγνωρίζονται πλέον ως σημαντικές επιπλοκές και σε αιματολογικές κακοήθειες, με θρομβωτικό ρυθμό παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε σε συμπαγείς όγκους με υψηλό κίνδυνο θρόμβωσης. Αιμορραγίες και φαινόμενα μη αναστρέψιμης διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (DIC) περιπλέκουν περαιτέρω το φάσμα των αιμοστατικών επιπλοκών σε κακοήθειες και μπορεί να είναι θανατηφόρες, όπως παρατηρήθηκε στην οξεία λευχαιμία [103].

Η στενή σχέση μεταξύ του καρκίνου και της θρόμβωσης ήταν γνωστή από το 1865, όταν ο Armand Trousseau πρώτος περιέγραψε μια κλινική σχέση μεταξύ της θρόμβωσης και ενός - έως τότε - αδιάγνωστου καρκίνου. Ο καρκίνος ευνοεί την ενεργοποίηση της αιμόστασης με την εμφάνιση μιας υπερπηκτικής κατάστασης ή χρόνιας ΔΕΠ σε αυτούς τους ασθενείς. Ανωμαλίες σε μία ή περισσότερες δοκιμασίες πήξης είναι συχνές σε ασθενείς με καρκίνο, ακόμη και χωρίς εμφανείς θρομβωτικές και/ή αιμορραγικές εκδηλώσεις. Αποτελέσματα εργαστηριακών δοκιμών αποδεικνύουν ότι η διαδικασία σχηματισμού του ινώδους και η ινωδόλυση παραλληλίζονται με την ανάπτυξη της κακοήθειας, και ιδιαιτέρως στους ασθενείς με μεταστατικούς όγκους [104]. Ιδιαίτερα, παρατηρούνται ανεπαίσθητες αιμοστατικές αλλοιώσεις, όπως υψηλά επίπεδα υποπροϊόντων πλάσματος από αντιδράσεις πήξης (πχ. προθρομβινικά κλάσματα 1 + 2 [103,104], ινωδοπεπτίδιο Α [FPA], σύμπλοκα θρομβίνης αντιθρομβίνης [TAT] και Δ-διμερή), ή επίκτητη αντίσταση στην πρωτεΐνη C, καθώς επίσης και υψηλά επίπεδα κυκλοφορίας μικροκυστιδίων (MP) που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα και αιμοπετάλια [105]. Από την άλλη μεριά, οι αιμοστατικές πρωτεΐνες και αντιδράσεις αλληλεπιδρούν στη διαδικασία ανάπτυξης και διάδοσης του όγκου [106].

Η παθογένεση της ενεργοποίησης της πήξης του αίματος στον καρκίνο είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική. Εν τούτοις, ένα μοναδικό χαρακτηριστικό στην κακοήθεια είναι ο ρόλος που παίζουν οι σχετιζόμενες με τα καρκινικά κύτταρα θρομβωτικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες οδηγούν στην ενεργοποίηση του καταρράκτη θρόμβωσης, με τη δημιουργία θρομβίνης και ινώδους και την διέγερση αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία εκθέτουν τα κυτταρικά προπηκτικά χαρακτηριστικά τους. Αρκετοί από αυτούς τους μηχανισμούς μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου [106], ιδιαίτερα οι εμπλουτισμένοι με μικροκυστίδια προθρομβωτικοί και προαγγειογενετικοί παράγοντες είναι νέοι σημαντικοί παράγοντες στην υποστήριξη της ανάπτυξης του όγκου [107]. Την τελευταία δεκαετία, οι γνώσεις μας αναπτύχθηκαν μετά την ανακάλυψη ενός σύνθετου σεναρίου στο οποίο τα ογκογενετικά γεγονότα οδηγούν στην προπηκτική μετατροπή των καρκινικών κυττάρων [108].

Αν και οι ασθενείς με καρκίνο μπορούν να βιώσουν τόσο φλεβική όσο και αρτηριακή θρόμβωση, οι φλεβικές θρομβώσεις έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης φλεβικής θρομβοεμβολής (VTE) σε αυτόν τον πληθυσμό αυξάνεται μέχρι επτά φορές σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό [109]. Αυτό το ποσοστό έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια ως συνέπεια της βελτίωσης των ογκολογικών θεραπειών και της πιο μακροχρόνιας επιβίωσης των ογκολογικών ασθενών, της χρήση πιο θρομβογόνων θεραπειών, και της γήρανση του πληθυσμού. Τέλος, η θρόμβωση μπορεί να είναι το πρώτο σημάδι μιας κακοήθους νόσου, και να προηγείται της κλινικής ανίχνευση καρκίνου για μήνες ή και χρόνια [110]. Πολλοί παράγοντες μπορεί να αυξήσουν τον θρομβωτικό κίνδυνο σε ασθενείς με καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων των γενικών παραγόντων κινδύνου, όπως η ακινησία, η γήρανση και η χειρουργική επέμβαση, και ειδικών παραγόντων κινδύνου του καρκίνου, όπως ο τύπος του καρκίνου, το προχωρημένο στάδιο νόσου και οι αντικαρκινικές θεραπείες. [111]

Βιολογικοί μηχανισμοί

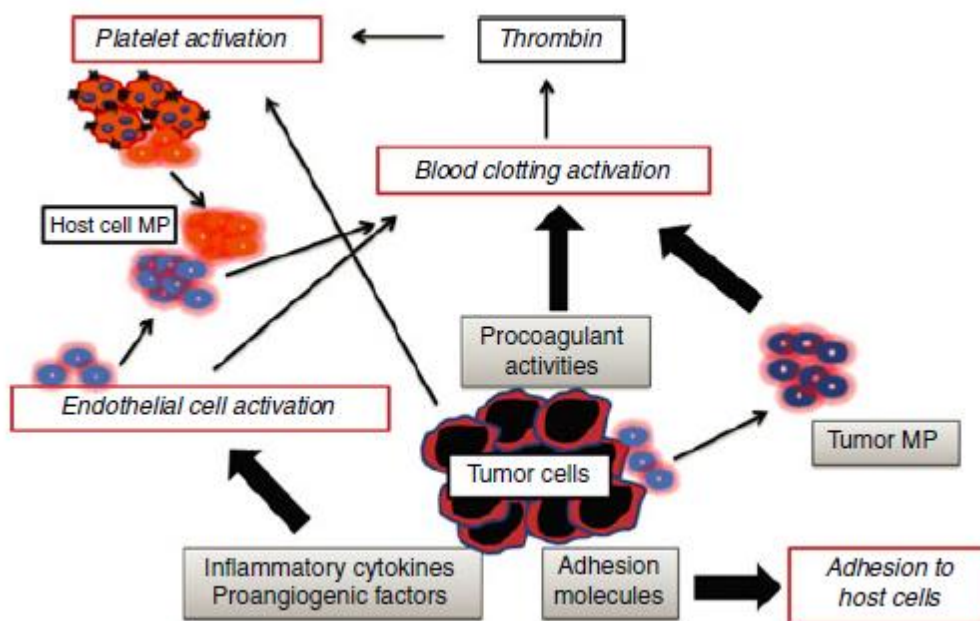
Οι βιολογικές οδοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των αιμοστατικών μεταβολών στον καρκίνο. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν το αιμοστατικό σύστημα μέσω της έκφρασης των προπηκτικών πρωτεϊνών, την έκθεση των προπηκτικών λιπιδίων, την απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτοκινών και των μικροκυστιδίων (MPs) και την προσκόλληση στα αγγειακά κύτταρα του ξενιστή [112] (Εικόνα 1).

Το πλέον χαρακτηριστικό προπηκτικό στοιχείο στους ασθενείς με κακοήθειες είναι ο ιστικός παράγοντας (TF).

Ουσιαστικά εκφρασμένος επί της κακοήθους κυτταρικής επιφάνειας, ο TF μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό τόσο τοπικών όσο και συστημικών προπηκτικών καταστάσεων. Η δράση του TF σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να ενισχυθεί με την έκφραση ανιονικών φωσφολιπιδίων (δηλ. φωσφατυδυλσερίνης, PS) στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης [113,114] και την έκκριση ηπαράνασης. Η κύρια λειτουργία της ηπαράνασης είναι η αποικοδόμηση των θεικών ηπαράνων της εξωκυτταρικής μήτρας, προωθώντας έτσι την εισβολή και τη μετάσταση του όγκου. Ωστόσο, η ηπαράναση μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τον αναστολέα της οδού του TF (TFPI) στην κυτταρική επιφάνεια, με αποτέλεσμα την αποσύνθεση του TFPI από την κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα μία αυξημένη δραστηριότητα TF κυτταρικής επιφάνειας [115].

Ένα άλλο προπηκτικό στοιχείο στους όγκους είναι το προπηκτικό του καρκίνου (CP) το οποίο, σε αντίθεση με τον TF, ενεργοποιεί άμεσα τον FX ανεξάρτητα από το FVII. Το CP έχει ανιχνευθεί σε διάφορα καρκινικά κύτταρα και στους αμνιονχοριονικούς ιστούς αλλά όχι σε φυσιολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα. Σε ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, CP, που εκφράζονται από τα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών κατά την εμφάνιση της νόσου, εξαφανίζονται όταν επιτυγχάνεται υποχώρηση της νόσου [112].

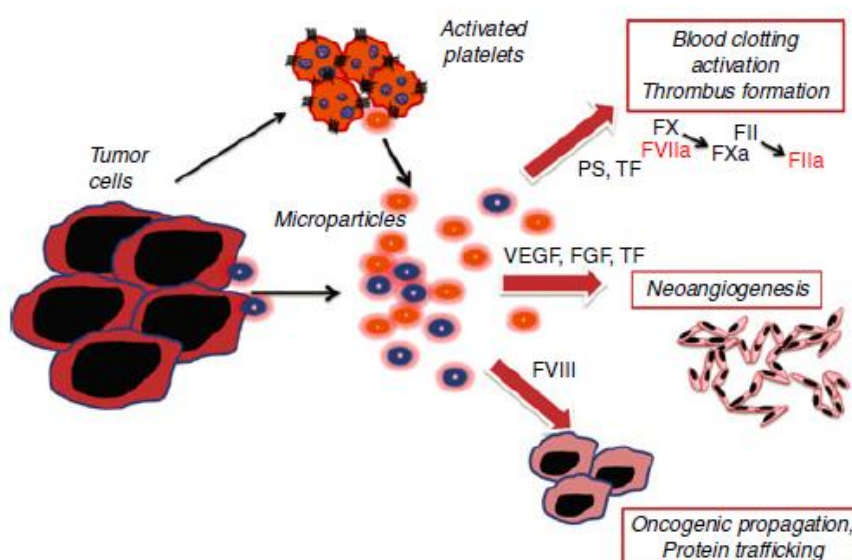
Το CP έχει μελετηθεί επίσης σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους συμπαγών όγκων [116,117].



Εικόνα 1. Οι αλληλεπιδράσεις όγκου-αιμοστατικού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν το αιμοστατικό σύστημα με πολλούς τρόπους. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να απελευθερώσουν προ πηκτικό ιστικό Παράγοντα και μικροκυστίδια (MP) που μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα τον καταρράκτη πήξης. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τα αιμοστατικά κύτταρα του ξενιστή (ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια) είτε με απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων είτε με άμεση συγκόλληση, αυξάνοντας έτσι περαιτέρω την ενεργοποίηση της θρόμβωσης.[111]

Ο TF μπορεί να απελευθερωθεί ενεργά από τα κύτταρα του όγκου σε μια σχετιζόμενη με την κυτταρική μεμβράνη μορφή που αντιπροσωπεύεται από τα MP που φέρουν TF [118]. Τα MPs είναι κυστίδια πλασματοκυτταρικής μεμβράνης διαμέτρου 0,1-1 μm που παράγονται από ενεργό δημιουργία κυστιδίων σχεδόν σε όλους τους τύπους κύτταρων [107]. Τα φωσfolιπίδια που εκφράζονται σε επιφάνειες MP παρέχουν κατάλληλη ανιονική φωσfolιπιδική επιφάνεια για το σχηματισμό του συμπλόκου της τενάσης και της προθρομβινάσης, προάγοντας έτσι την αλληλουχία της πήξης. Η ικανότητα αυτή μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω από την ταυτόχρονη έκφραση του TF (Εικόνα 2). Χαμηλά επίπεδα MP πλάσματος υπάρχουν και σε υγιή άτομα, η πλειονότητα των οποίων είναι αιμοπεταλιακής προέλευσης (> 80%), αλλά σε παθολογικές καταστάσεις συνολικά εμφανίζεται αύξηση των MP και σημαντική ποσότητα MP προερχόμενα από άλλες πηγές, όπως τα κύτταρα των όγκων μπορούν να ανιχνευθούν..

Τα αυξημένα επίπεδα MPs (με ή χωρίς TF) έχουν περιγραφεί σε ασθενείς τόσο με συμπαγείς [107] όσο και αιματολογικές κακοήθειες [119-121]. Τα MP αιμοπεταλιακής προέλευσης βρέθηκαν υψηλότερα στο στάδιο IV έναντι των σταδίων I και II / III σε γαστρικό καρκίνο, που δείχνει την υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια για την πρόγνωση μεταστάσεων [122]. Τέλος, ο παθογενετικός ρόλος των MPs στη σχετιζόμενη με τον καρκίνο θρόμβωση έχει αποδειχθεί από την ανάπτυξη σύνδρομου τύπου DIC σε ποντίκια μετά από ενδοφλέβια έγχυση μικροκυστιδίων θετικών για τον ιστικό παράγοντα προερχόμενα από κύτταρα όγκου [107].



Εικόνα 2. Παραγωγή μικροσωματιδίων (MP) και επίδραση στον καρκίνο. Τα κύτταρα όγκου απελευθερώνουν ενεργά MP αλλά επίσης προάγουν τον σχηματισμό MP από αιμοπετάλια. Ο ιστικός παράγοντας (TF) και η έκφρασης της φωσφατιδυλσερίνης (PS) στις επιφάνειες των MP που προέρχονται από αιμοπετάλια και όγκους εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της πήξης του αίματος και σχηματισμό θρόμβων. Από την άλλη πλευρά, η αυξημένη περιεκτικότητα των προ-αγγειογόνων παραγόντων στα προερχόμενα από αιμοπετάλια MP (VEGF, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, FGF, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, PDGF, αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια), καθιστούν αυτά τα στοιχεία επίσης σημαντικούς μεσολαβητές της διαδικασίας της νεοαγγειογένεσης. Τέλος, διακυτταρική μεταφορά μικροκυστιδίων μπορεί να συμβεί μεταξύ καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε οριζόντια διάδοση ογκογονιδίων και ενίσχυση του αγγειογενετικού φαινοτύπου.[111]

4. ΘΡΟΜΒΟΕΛΑΣΤΟΜΕΤΡΙΑ (ROTEM)

Εισαγωγή

Το αιμοστατικό σύστημα, που αποτελείται από τις διαλυτές πρωτεΐνες πήξης, τα αιμοπετάλια, το ενδοθήλιο, τους φυσικούς αναστολείς της πήξης, το ινωδολυτικό σύστημα και τους αναστολείς του, ρυθμίζεται από διάφορους μηχανισμούς υπεύθυνους για την έναρξη, τη διάδοση, τη σταθεροποίηση και τη λύση του θρόμβου[1].

Η αιμόσταση είναι μια σύνθετη δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει τόσο την αιμορραγία και όσο και τη θρόμβωση. Οι συμβατικές δοκιμασίες πήξης που μετριοούνται στο πλάσμα εξετάζουν μόνο μεμονωμένα τμήματα του καταρράκτη πήξης, κι έτσι δεν έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με σημαντικές αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για την κλινική αξιολόγηση της αιμοστατικής λειτουργίας.[2] Οι συμβατικές δοκιμές πήξης όπως ο χρόνος προθρομβίνης (PT) και ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την αξιολόγηση των διαταραχών της πήξης, έχουν περιορισμένη ακρίβεια για να χαρακτηρίσουν το αιμοστατικό προφίλ και να προβλέψουν τον κίνδυνο αιμορραγίας σε ασθενείς που βρίσκονται σε κρίσιμη κατάσταση[3]. Επιπλέον, οι δοκιμασίες αυτές δεν μπορεί να μας δώσουν πληροφορίες σχετικά με την αντοχή του θρόμβου και τη σταθερότητα του θρόμβου, καθώς διαβάζονται στην αρχή του πολυμερισμού του ινώδους όταν έχει σχηματιστεί μόνο περίπου το 5% της θρομβίνης [6]. Επιπλέον, πραγματοποιούνται σε δείγματα πλάσματος. Συνεπώς, δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, την ινωδόλυση και την υπερπηκτικότητα [7]. Τέλος, για τα αποτελέσματα του κλασικού ελέγχου μπορεί να χρειαστούν μέχρι και 60 λεπτά, αποκλείοντας έτσι μια γρήγορη και δυναμική αξιολόγηση της θρόμβωσης παρά την κλίνη του ασθενούς [8].

Η θρομβοελαστογραφία (TEG), που περιγράφηκε αρχικά το 1948, βελτιώθηκε κατά τη διάρκεια των δεκαετιών και έγινε ένα πολύτιμο εργαλείο στις δοκιμασίες της πήξης λόγω των περιορισμών των κλασικών δοκιμών. Η TEG είναι μια τεχνική που

παρέχει δεδομένα για ολόκληρο το σύστημα πήξης, από την αρχή του σχηματισμού του θρόμβου έως την ινωδόλυση, συμπεριλαμβάνοντας τόσο τα κυτταρικά συστατικά όσο και συστατικά του πλάσματος τα οποία εμπλέκονται στην αιμόσταση[4].

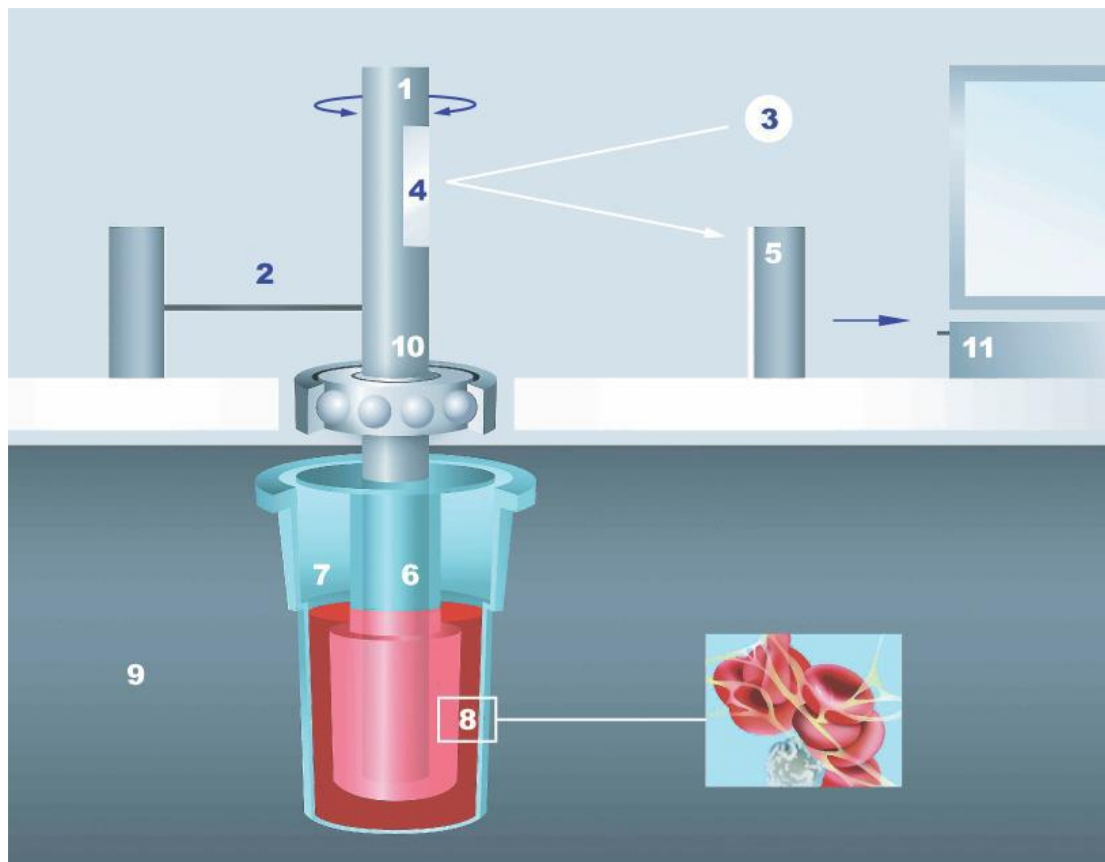
Η περιστροφική θρομβοελαστομετρία (ROTEM) που αποτελεί μετεξέλιξη της τεχνολογίας TEG υπερνικά αρκετούς περιορισμούς της κλασικής TEG διατηρώντας παράλληλα μια καλή συσχέτιση με τον συμβατικό προσδιορισμό TEG[5]. Η περιστροφική θρομβοελαστομετρία (ROTEM) επιτρέπει τη δυναμική αξιολόγηση των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του θρόμβου μέσω γραφικής αναπαράστασης σχηματισμού θρόμβων, δημιουργίας θρομβίνης, πολυμερισμού ινώδους και λύσης του θρόμβου.[9] Το ROTEM εκτελείται σε δείγμα ολικού αίματος, ως εκ τούτου, η ανάλυσή λαμβάνει υπόψη τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων κυττάρων του αίματος και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους, και παρέχει πρόσβαση στο αιμοστατικό προφίλ του αίματος σε πραγματικό χρόνο στο κρεβάτι του ασθενή[10]. Οι αναλύσεις ROTEM είναι χρήσιμες για την ταχεία αξιολόγηση της λειτουργίας της πήξης σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως μεταμόσχευση ήπατος, καρδιοχειρουργική, μαιευτική, τραύμα, αιμορροφιλία και ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα. Το ROTEM έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι χρήσιμο στην αναγνώριση διαφόρων υπερπηκτικών καταστάσεων, περιλαμβανομένης της μεγάλης χειρουργικής επέμβασης, των κακοηθειών και της νόσου του Behcet.[2]

Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Το σύστημα ROTEM® αποτελεί μια περαιτέρω εξέλιξη της κλασικής θρομβοελαστογραφίας, που αναπτύχθηκε από την Hartert.

Τα συστήματα θρομβοελαστομετρίας ROTEM® delta είναι σχεδιασμένα για in vitro διαγνωστική χρήση στο Σημείο Περίθαλψης [POC (Point of Care)] ή σε νοσοκομειακά εργαστήρια. Το σύστημα προορίζεται για την παροχή ποσοτικής και ποιοτικής ένδειξης της πήκτικης κατάστασης ενός δείγματος αίματος. Το σύστημα καταγράφει τις κινητικές μεταβολές σε δείγμα αίματος που έχει ληφθεί με αντιπηκτικό κιτρικό, κατά τη διάρκεια σχηματισμού θρόμβου, όπως επίσης και όταν ο θρόμβος ενός δείγματος υπαναχωρεί ή και λύεται (θρύπτεται). Διαφορετικές παράμετροι της πήξης

μετρώνται, αναλύονται, παρακολουθούνται, διερμηνεύονται, και αναπαρίστανται γραφικά για αυτό το σκοπό. Η γραφική παρουσίαση αντανακλά τα διάφορα φυσιολογικά αποτελέσματα, τα οποία περιγράφουν την αλληλεπίδραση μεταξύ συστατικών όπως παράγοντες και αναστολείς της πήξης, ινωδογόνο, θρομβοκύτταρα, και το σύστημα ινωδόλυσης. Επιπλέον, διαφορετικά φάρμακα που επηρεάζουν την αιμόσταση, επί συγκεκριμένου αντιπηκτικά, μπορούν να ανιχνευθούν. Η πατενταρισμένη τεχνολογία ROTEM® βασίζεται σε μια στερεωμένη κυλινδρική κυψελίδα και σε έναν μονίμως ταλαντούμενο κάθετο άξονα.



Αρχή της θρομβοελαστομετρίας με το ROTEM® delta

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. Άξονας (+/- 4.75 °) | 7. Κυψελίδα πλήρης αίματος |
| 2. Ελατήριο | 8. Ινίδια ινώδους και |
| συσσωμάτωμα θρομβοκυττάρων | |
| 3. Πηγή φωτός/δίοδος | 9. Θερμαινόμενο στήριγμα |
| κυψελίδας | |
| 4. Κάτοπτρο | 10. Ρουλεμάν |
| 5. Συσκευή ανίχνευσης (ηλεκτρική κάμερα) | 11. Επεξεργασία |
| 6. Έμβολο αισθητήρα | |

Ο άξονας υποστηρίζεται από ένα ρουλεμάν υψηλής ακριβείας και ταλαντώνεται δεξιά και αριστερά κατά γωνία 4.75° . Η περιστροφή του άξονα οδηγείται από έναν κινητήρα, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον άξονα μέσω ενός ελαστικού ελατηρίου.

Για τη μέτρηση, ένα αναλώσιμο πλαστικό έμβολο διαμέτρου 6 mm τοποθετείται σφικτά επί του άξονα και το δείγμα αίματος γεμίζει μια αναλώσιμη, διαμέτρου 8 mm κυψελίδα και τότε τοποθετείται στο κανάλι μέτρησης. Έτσι, το πλαστικό έμβολο είναι εμβαπτισμένο στο δείγμα αίματος.

Η περιστροφή ανιχνεύεται οπτικά μέσω μιας κατοπτρικής πλάκας στο άνω άκρο του άξονα, μια δίοδο λυχνία ως πηγή φωτός και έναν φωτοευαίσθητο αισθητήρα (CCD ολοκληρωμένο). Αν η πήξη δεν λαμβάνει χώρα, η κίνηση δεν παρεμποδίζεται. Όταν σχηματίζεται θρόμβος και προσκολλάται μεταξύ των επιφανειών εμβόλου και κυψελίδας, η κίνηση παρεμποδίζεται.

Το αποτέλεσμα είναι μια ισορροπία ανάμεσα στην τάση του ελατηρίου και την τάση του θρόμβου. Καθώς ο θρόμβος γίνεται όλο και συνεκτικότερος, το εύρος περιστροφής του άξονα ελαττώνεται.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων διερμηνεύονται με τη χρήση ειδικού λογισμικού. [12,13]

Καμπύλη αντίδρασης και παράμετροι στη θρομβοελαστομετρία

Όπως στην κλασσική θρομβοελαστογραφία, το σύστημα ROTEM® παράγει μια καμπύλη αντίδρασης και υπολογίζει διαφορετικές αριθμητικές (κινητικές και συνεκτικότητας) παραμέτρους σε μια μαθηματική ανάλυση αυτής της καμπύλης.

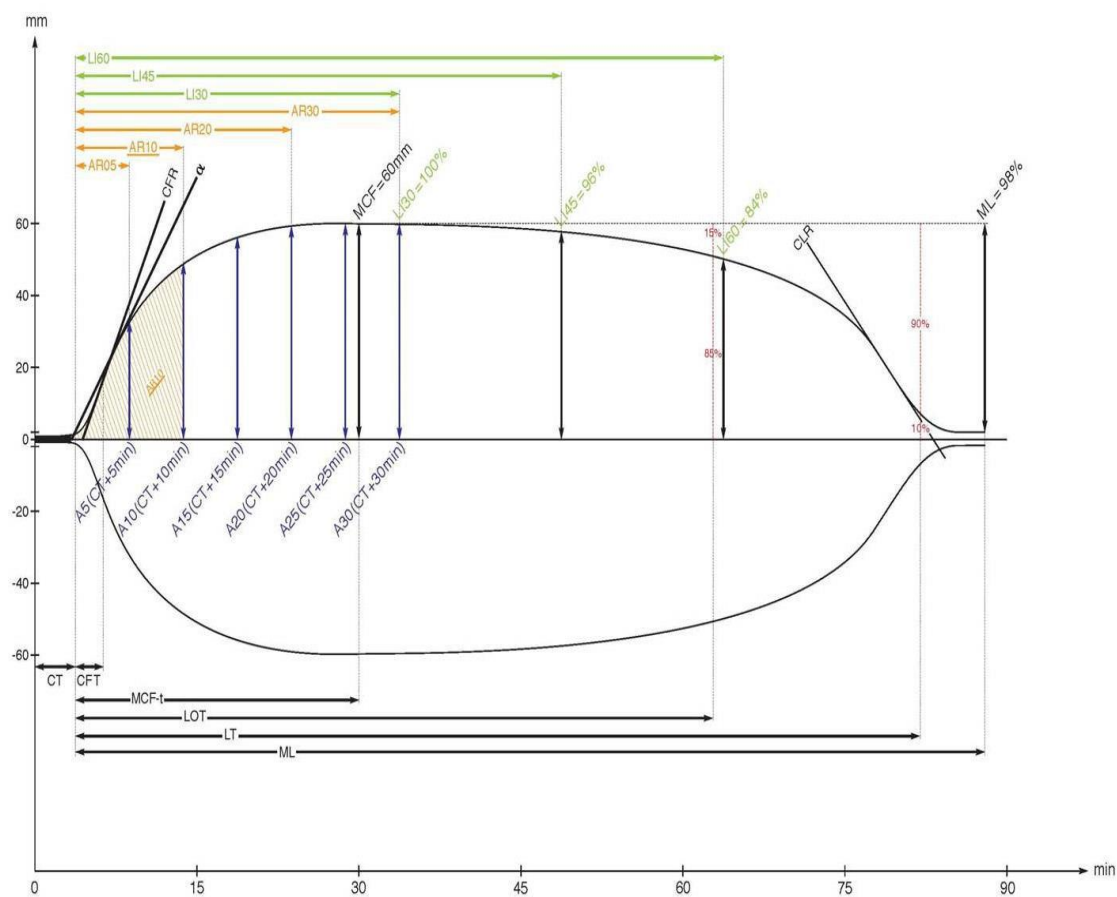
Καμπύλη αντίδρασης

Το λογισμικό ROTEM® χρησιμοποιεί έναν εξελιγμένο αλγόριθμο εξομάλυνσης καμπύλης και φίλτρο θορύβου το οποίο προλαμβάνει πιθανά σφάλματα λόγω μηχανικού ή ηλεκτρονικού θορύβου. Οι παράμετροι προσδιορίζονται σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια εκτέλεσης των εξετάσεων, υπολογίζονται, και παρουσιάζονται γραφικά, υπό τη μορφή θρομβοελαστογραμμάτων.

Το εύρος περιστροφής του εμβόλου μετατρέπεται σε ένα γραφικό εύρος, ενώ ο επόμενος ορισμός έχει εφαρμογή στο σύστημα ROTEM®:

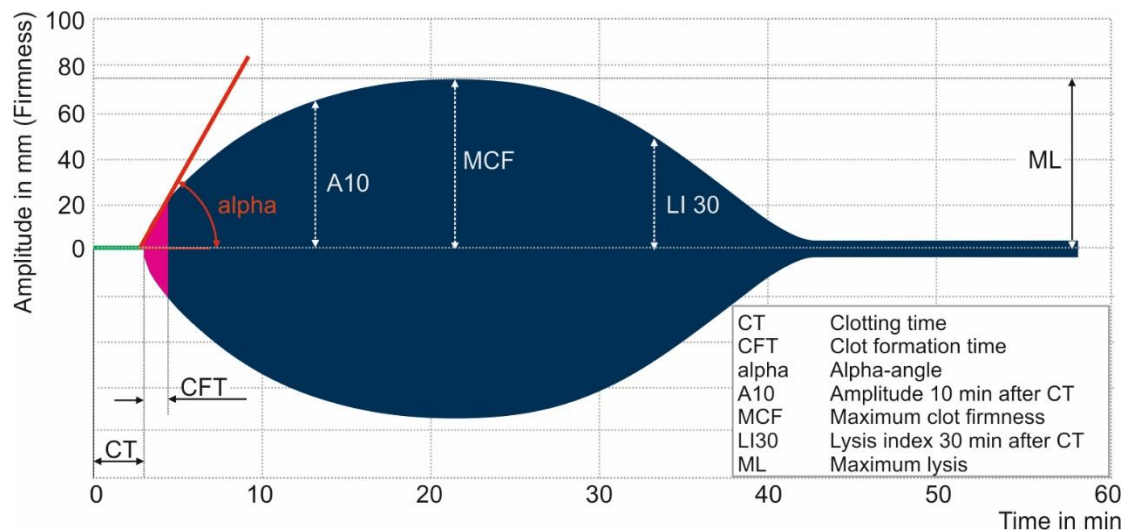
Γραφικό εύρος σε mm	Περιστροφή της ακίδας	Πήξης
0	Ελεύθερη περιστροφή εμβόλου	Όχι πήξη
100	Χωρίς περιστροφή του εμβόλου	Μέγιστη δυνατή συνοχή πηγματος

Οι πιο σημαντικές φάσεις της πήξης με τις αντίστοιχες παραμέτρους, σε ένα θρομβοελαστογράμμα απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Οι πιο σημαντικές παράμετροι ρουτίνας

Γενικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων διερμηνεύονται με τις παραμέτρους ρουτίνας. Η παρακάτω εικόνα δείχνει τις σημαντικότερες παραμέτρους ρουτίνας. Ο άξονας y δείχνει το εύρος σε mm, ο άξονας x δείχνει το χρόνο σε λεπτά [min]. [12]



Χρόνος Πήξης [Clotting time CT, (s)]

Ο χρόνος πήξης CT είναι ο χρόνος από την έναρξη της δοκιμασίας (με προσθήκη του ενεργοποιητή πήξης) έως τη χρονική στιγμή επίτευξης πλάτους ταλάντωσης ίσου με 2 mm. Ο CT περιγράφει πόσο γρήγορα ξεκινά ο σχηματισμός ινώδους. Αυτή η παράμετρος είναι ανάλογη με το χρόνο πήξης σε μια κλασσική δοκιμασία πήξης στο εργαστήριο. Δεν είναι όμως όμοιες, καθώς περισσότερο ινώδες σχηματίζεται και πρέπει να σταθεροποιηθεί, για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη συνεκτικότητα θρόμβου, που να συνδέσει επαρκώς τα δύο κινούμενα μέρη της κυψελίδας μέτρησης. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το χρόνο πήξης είναι οι παράγοντες της πήξης καθώς επίσης και η λήψη αντιπηκτικών. Στην κλινική πράξη η παράμετρος CT διευκολύνει την απόφαση υποκατάστασης παραγόντων πήξης (π.χ. μέσω φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος, συμπυκνωμάτων παραγόντων, συμπυκνώματα ενεργοποιημένων παραγόντων ή αναστολέων αντιπηκτικών (π.χ. Πρωταμίνη)).[12]

Χρόνος Σχηματισμού Θρόμβου [Clot Formation Time, CFT, (s)]

Ο CFT είναι ο χρόνος μεταξύ πλάτους 2 mm και πλάτους 20 mm του σήματος πήξης. Ο CFT περιγράφει την επόμενη φάση της πήξης: την κινητική σχηματισμού ενός σταθερού θρόμβου μέσω της δράσης ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και ινώδους. Οι κύριοι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται είναι ο αριθμός των αιμοπεταλίων και η συμβολή τους στη σταθερότητα του θρόμβου, τα επίπεδα ινωδογόνου και η ικανότητα πολυμερισμού αυτού. Κλινικά η παράμετρος CFT διευκολύνει την απόφαση να χορηγηθούν υποκατάστατα όπως συμπύκνωμα

αιμοπεταλίων ή ινωδογόνου (όπως κρυοκαθίζημα, φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα, συμπύκνωμα ινωδογόνου) ή και τα δύο. Ένα σύντομο CFT είναι ενδεικτικό υπερπηκτικότητας (καθώς και μια υψηλή MCF και άλφα γωνία). Σε δείγματα με πολύ χαμηλό σχηματισμό θρόμβου, ο CFT δεν μπορεί να επιτευχθεί και κατά συνέπεια δεν πρέπει να αναφέρεται. [12]

Γωνία Alpha (α , [°])

Η γωνία alpha ορίζεται ως η γωνία ανάμεσα στο μέσο άξονα και την εφαπτομένη της καμπύλης πήξης μέσω του σημείου εύρους 2 mm και περιγράφει την κινητική της πήξης. Η διαγνωστική πληροφορία αυτής της παραμέτρου είναι παρόμοια με της CFT. Μια μειωμένη γωνία άλφα υποδεικνύει μια υποπηκτική κατάσταση.[12]

Μέγιστη συνοχή θρόμβου [Maximum Clot Firmness, MCF, (mm)]

Το MCF είναι το μέτρο για τη σταθερότητα του θρόμβου και ως εκ τούτου της ποιότητας του. Είναι το μέγιστο πλάτος που έχει επιτευχθεί προτού ο θρόμβος αρχίσει να διαλύεται από τον ινωδολυτικό μηχανισμό. Οι κύριοι παράγοντες που το επηρεάζουν είναι τα αιμοπετάλια, το ινωδογόνο (συγκέντρωση και ικανότητα πολυμερισμού), ο FXIII και η ινωδολυτική δράση. Ένα χαμηλό MCF δείχνει χαμηλή σταθερότητα θρόμβου και ως εκ τούτου πιθανό κίνδυνο αιμορραγίας. Η τιμή MCF χρησιμοποιείται για να διευκολυνθεί η απόφαση να χορηγηθούν υποκατάστατα συμπύκνωματος αιμοπεταλίων ή ινωδογόνου(συμπυκνώμα, κρυοκαθίζημα ή φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα). Η υπερिनωδόλυση πρέπει αναγκαστικά να αποκλειστεί πριν από τη θεραπεία με πηγή ινωδογόνου, επειδή μπορεί να οδηγήσει σε έναν ασταθή θρόμβο. Μια υψηλή τιμή MCF μπορεί να υποδεικνύει μια κατάσταση υπερπηκτικότητας. [12]

A(x)-τιμές ([mm])

Οι A (x)-τιμές αντιπροσωπεύουν τη σταθερότητα του θρόμβου. A (x)-τιμή είναι το πλάτος μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα X μετά από το CT (π.χ. A10 μετά από 10 λεπτά). Τους κύριοι παράγοντες που το επηρεάζουν αποτελούν τα αιμοπετάλια, το ινωδογόνο (συγκέντρωση και ικανότητα πολυμερισμού) και ο FXIII ενώ η κλινική εφαρμογή του είναι αντίστοιχη αυτής του MCF.[12]

Δείκτης Λύσης στα 30 min [Lysis index at 30 min (LI30)] και σχετικές παράμετροι ([%])

Η τιμή LI30 αντιπροσωπεύει την ινωδόλυση 30 λεπτά μετά το CT. Είναι η σχέση του πλάτους προς τη μέγιστη σταθερότητα θρόμβου (% εναπομένουσα σταθερότητα

θρόμβου). Οι παράμετροι LI45 και LI60 περιγράφουν το ίδιο 45 και 60 λεπτά μετά την CT. Κλινικά, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των αναστολέων της ινωδόλυσης, σχεδόν καθόλου ινωδόλυση δεν δύναται να παρατηρηθεί σε δείγματα από υγιή άτομα. Μία παθολογική τιμή LI30 δείχνει ως επί το πλείστο υπερινωδόλυση. Συνεπώς, η παράμετρος LI30 μπορεί να διευκολύνει την απόφαση υπέρ ή κατά μιας θεραπείας με αντι-ινωδολυτικά φάρμακα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αναπτυχθεί υπερινωδόλυση σχετικά αργά. Σε τέτοιες περιπτώσεις, επίσης τα LI 45 ή LI60 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη αποφάσεων.[12]

Μέγιστη Λύση [Maximum lysis (ML, [%])]

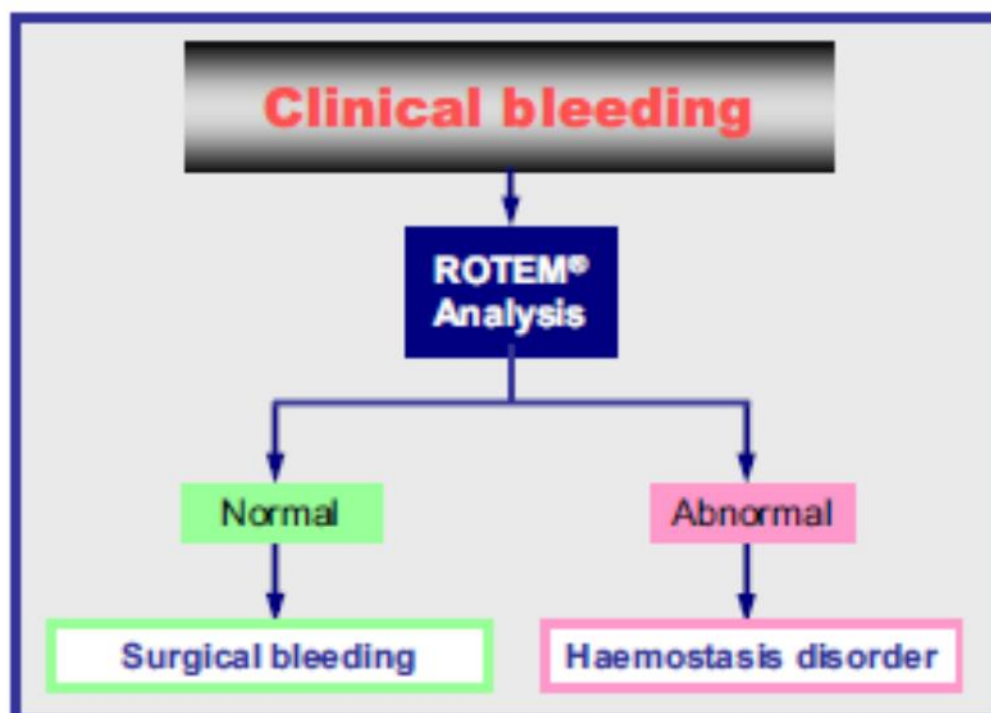
Η παράμετρος της μέγιστης λύσης (ML) περιγράφει το βαθμό της ινωδόλυσης σε σχέση με τη μέγιστη σταθερότητα θρόμβου (MCF) που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της μέτρησης. (% χαμένης σταθερότητας θρόμβου). Μια τιμή ML 5% σημαίνει ότι, κατά την περίοδο της δοκιμασίας, η MCF έχει μειωθεί κατά 5%. Δεδομένου ότι η μέγιστη λύση δεν υπολογίζεται ως ένα καθορισμένο χρονικό σημείο, αλλά ορίζεται ως % λύση στο τέλος της μέτρησης, ο συνολικός χρόνος μέτρησης της δοκιμασίας και ο χρόνος μετά το MCF θα πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη. Στην κλινική πράξη η χρήση του είναι αντίστοιχη του LI(X).[12]

Περιοχές Αναφοράς

Οι καμπύλες αντίδρασης και οι κινητικές παράμετροι κάθε δείγματος ενός ασθενούς μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα μετρήσεων σε υγιή άτομα αναφοράς. Οι τιμές αναφοράς περιγράφονται σε μια πολυκεντρική μελέτη για όλες τις δοκιμασίες που γίνονται με τα συστήματα ROTEM®[14] . Τα αποτελέσματα για καθένα από τα αντιδραστήρια των δοκιμασιών δείχνονται στις αντίστοιχες οδηγίες χρήσης. Όμως, παράγοντες που προηγούνται της ανάλυσης (δειγματοληψία, περίοδος φύλαξης και φυσική καταπόνηση, όπως ανακίνηση των σωληναρίων) μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.[15] Αυτές οι τιμές αναφοράς πρέπει να νοούνται ως κατευθυντήριες και πρέπει να ελέγχονται σε κάθε νοσοκομείο βάσει του καταλλήλου πληθυσμού ατόμων αναφοράς.

ROTEM® δοκιμασίες

Η οξεία αιμορραγία κατά ή μετά το χειρουργείο απαιτεί ταχεία διαφορική διάγνωση μεταξύ της χειρουργικής επαχθείσας αιμορραγίας και των διαταραχών της αιμόστασης. Ο συνδυασμός του ROTEM® delta με επιπλέον διαγνωστικές μεθόδους, δεδομένων των δοθέντων περιορισμών (η πρωτογενής αιμόσταση, για παράδειγμα, δε μετριέται με το ROTEM®), διευκολύνει τις περαιτέρω διαφορετικές θεραπευτικές στρατηγικές.



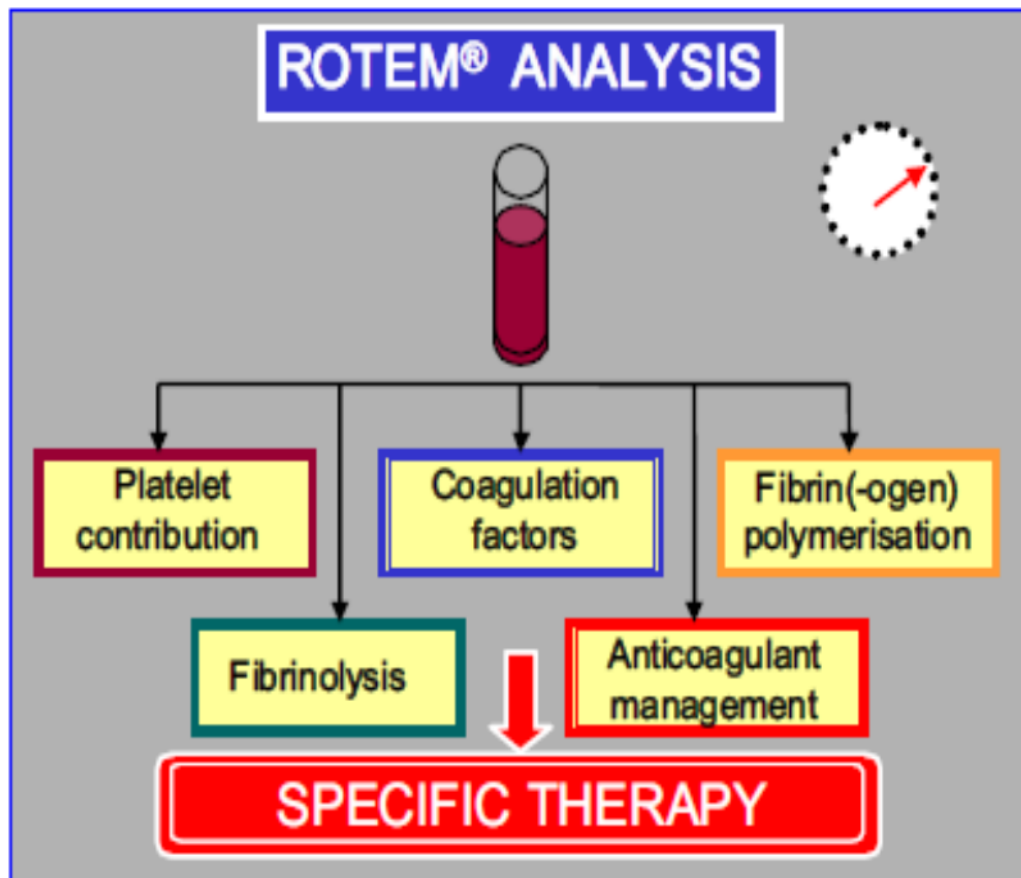
Διαφοροδιάγνωση της χειρουργικής αιμορραγίας από τη διαταραχή της αιμόστασης με την ανάλυση ROTEM

Σε αντίθεση με την κλασσική θρομβοελαστομετρία, που εκτελείται χωρίς αντιδραστήρια, η ανάλυση αιμόστασης ολικού αίματος ROTEM® με τα ειδικά αντιδραστήρια συστήματος επιτρέπει τη χρήση εκτεταμένης διαγνωστικής ως βάση θεραπευτικών αποφάσεων [11].

Οι διαγνωστικές ικανότητες του ROTEM επεκτείνονται από μια σειρά πρόσθετων δοκιμασιών και παραμέτρων που:

- Συνοτρεύουν το χρόνο αντίδρασης
- Αυξάνουν την ακρίβεια

- Αναστέλλουν ορισμένους παράγοντες (π.χ ηπαρίνη)
- Επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ συνεισφοράς ινώδους και αιμοπεταλίων στον συνολικό αιμοστατικό θρόμβο



EXTEM : Ενεργοποίηση του σχηματισμού Θρόμβου με θρομβοπλαστίνη (ιστικός παράγοντας). Αξιολόγηση των παραγόντων VII, X, V, II, I, των Αιμοπεταλίων και της Ινωδόλυσης.

INTEM : Ενεργοποίηση του σχηματισμού θρόμβου μέσω του συστήματος επαφής . Αξιολόγηση των παραγόντων XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I, των Αιμοπεταλίων και της Ινωδόλυσης.

APTEM : Ενεργοποίηση όπως στο EXTEM με προσθήκη απροτινίνης, ενός αναστολέα της ινωδόλυσης. Συγκρίνοντας το APTEM με το EXTEM μπορεί να αναγνωριστεί μαζική υπερινωδόλυση μέσα σε 10-20 λεπτά.

FIBTEM : Ενεργοποίηση όπως στο EXTEM με προσθήκη κυτοχλασίνης D, μια ουσία αποκλεισμού των αιμοπεταλίων. Στην δοκιμασία FIBTEM τα επίπεδα ινωδογόνου και πολυμερισμού της ινικής μπορούν να εκτιμηθούν με λειτουργικό τρόπο.

HEPTEM : Ενεργοποίηση όπως στο INTEM με την προσθήκη της ηπαρινάσης. Η Ηπαρινάση αποικοδομεί την ηπαρίνη. Όταν τα αποτελέσματα HEPTEM συγκριθούν με του INTEM, μπορούν να ανιχνευθούν διαταραχές πήξης που συνδέονται με την ηπαρίνη.[12]

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η Θρομβοελαστομετρία (ROTEM) αποτελεί μια σφαιρική δοκιμασία που παρέχει ποσοτικές και ποιοτικές ενδείξεις της δράσης του αιμοστατικού μηχανισμού.

Ο εργαστηριακός έλεγχος σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους με τη χρήση περιστροφικής θρομβοελαστομετρίας (ROTEM) και η συσχέτιση των παραμέτρων ROTEM με κλασικές δοκιμασίες πήξης δείχνουν θρομβοελαστομετρικά σημάδια υπερπηκτικότητας.

Μετρήσεις περιστροφικής Θρομβοελαστομετρίας σε ασθενείς με ενδοκοιλιακές κακοήθειες φαίνεται να καταδεικνύουν σημαντικές ενδείξεις υπερπηκτικότητας σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (123).

Επίσης, ασθενείς με καρκίνο που διατρέχουν κίνδυνο για VTE μπορούν να ταυτοποιηθούν με μια παρακλινία δοκιμασία ROTEM και μπορούν να ωφεληθούν από πρόσθετη αντιπηκτική αγωγή. Οι βιοδείκτες που αντανakλούν διάφορες λειτουργικές ομάδες δραστηριότητας αιμόστασης (ινωδόλυση, παραγωγή θρομβίνης και ενδοθηλιακή ενεργοποίηση) επιβεβαιώνουν τη συνεχιζόμενη προθρομβωτική κατάσταση. Το ROTEM έδειξε σημεία υπερπηκτικότητας μετεγχειρητικά, η οποία επέστρεψε στην αρχή της μακροπρόθεσμης παρακολούθησης. Η αναστροφή της επαγόμενης από καρκίνο υπερπηκτικότητα εμφανίστηκε σε μερικούς ασθενείς και διέφερε με την ιστολογία και τη θέση του όγκου.

Ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, ειδικά προχωρημένου σταδίου, παρουσιάζουν επίσης αυξημένα επίπεδα προθρομβωτικών μικροκυστίδων (microparticles, MPs) αιμοπεταλιακής (platelet microparticles, PMPs) και άλλης προέλευσης.

Τα μικροκυστίδια (MPs) θεωρούνται σημαντικοί βιολογικοί τελεστές διαφόρων φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις για το ρόλο τους στην αιμόσταση και θρόμβωση, καθώς και για τη σημασία τους την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, την διεισδυτικότητα και τη μετάσταση. Τα επίπεδα των κυκλοφορόντων μικροκυστιδίων έχουν αξιολογηθεί σε πολλές

διαφορετικές ασθένειες και υπάρχουν αναφορές ότι οι ασθενείς με κακοήθεια και οι ασθενείς με θρόμβωση έχουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας μικροκυστιδίων και εξαρτώμενο από τα μικροκυστίδια θρομβογενές δυναμικό.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος των μικροκυστιδίων στον in-vitro σχηματισμό θρόμβου όπως αυτός απεικονίζεται σε γράφημα θρομβοελαστομετρίας σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 30 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου ,16 άντρες και 14 γυναίκες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν $68,6 \pm 10,25$ έτη. Οι ασθενείς διαγνώσθηκαν, υποβλήθηκαν σε θεραπεία και παρακολουθήθηκαν στο τμήμα Αιμοδοσίας του Αρεταίειου Νοσοκομείου Αθηνών.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 11 υγιείς ενήλικες ,6 άντρες και 5 γυναίκες, μέσης ηλικίας $68,6 \pm 12,2$ έτη, χωρίς κάποιο ιστορικό κακοήθειας.

Δείγματα πλάσματος ελήφθησαν από όλους τους ασθενείς, καθώς επίσης και από τους υγιείς ενήλικες της ομάδας ελέγχου μετά από έγγραφη συγκατάθεσή τους.

Μέθοδοι

Μετρήθηκαν σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP), τα επίπεδα ινωδογόνου με μεθοδολογία κατά Clauss και εκπονήθηκαν δοκιμασίες θρομβοελαστομετρίας με ενεργοποιητή ιστικό παράγοντα (EX-TEM) σε αναλυτή ROTEM Delta (TEM Diagnostics, WERFEN Group) για την παρακολούθηση των παραμέτρων CT (χρόνος πήξης), CFT (χρόνος σχηματισμού θρόμβου), α angle και MCF (μέγιστος σχηματισμός θρόμβου). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών με γνωστό αριθμό μικροκυστιδίων (MPs), ταυτοποιημένα σε μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης (PMPs), θετικά ή αρνητικά στην ανεξίνη (ANXPOS.MPs και ANXNEG.MPs), με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής και τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Συλλογή δειγμάτων

Δείγματα τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς και μάρτυρες σε φιαλίδια που περιείχαν ως αντιπηκτική ουσία κιτρικό νάτριο φυγοκεντρήθηκαν σε δύο φάσεις με σκοπό την εξαγωγή πλάσματος πτωχού σε αιμοπετάλια (PPP). Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 15min, λήφθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε σωληνάρια τύπου Eppendorf. Στη συνέχεια ακολούθησε μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 2min. Εκ νέου, λήφθηκε το υπερκείμενο και στη συνέχεια όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι την ημέρα της διεξαγωγής των μετρήσεων.

Μέτρηση μικροκυστιδίων

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν σε κυτταρικό επίπεδο τα μικροκυστίδια ασθενών από κακοήθειες. Με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής και τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων προσδιορήθηκε η κυτταρική ταυτότητα (CD41α) των μικροκυστιδίων (Anti-Hu, CD41a, FITC, κλώνος HIP8, ισότοπο Mouse IgG1, k, Thermofisher scientific), και η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης (annexin-V, Annexin V, FITC, Annexin V, PE). Τέλος, με τη βοήθεια ειδικού τυποποιημένου κιτ θα προσδιοριστεί η ικανότητα των μικροκυστιδίων να προσκολλούνται στο ενδοθήλιο (Zymorphen).

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μέθοδο αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, με την οποία επιτυγχάνεται η μέτρηση βιοχημικών και βιοφυσικών παραμέτρων μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κλπ), όταν αυτά αιωρούνται εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή και διέρχονται από ένα σταθερό σημείο που προσπίπτει μία ακτίνα laser. Οι παράμετροι αυτοί προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα οπτικής-ηλεκτρονικής σύζευξης, το οποίο καταγράφει πως το κύτταρο ή το σωματίδιο σκεδάζει το προσπίπτον φως και εκπέμπει φθορισμό.

Ένα κυτταρόμετρο αποτελείται από 3 βασικά μέρη:

Το ρευστό σύστημα: Είναι τα μέρη που αφορούν την είσοδο, μεταφορά του δείγματος στο σημείο ανάλυσης (δέσμη φωτός) και έξοδο του δείγματος από το όργανο. Περιλαμβάνουν τις αντλίες πίεσης, το υγρό περιρροής.

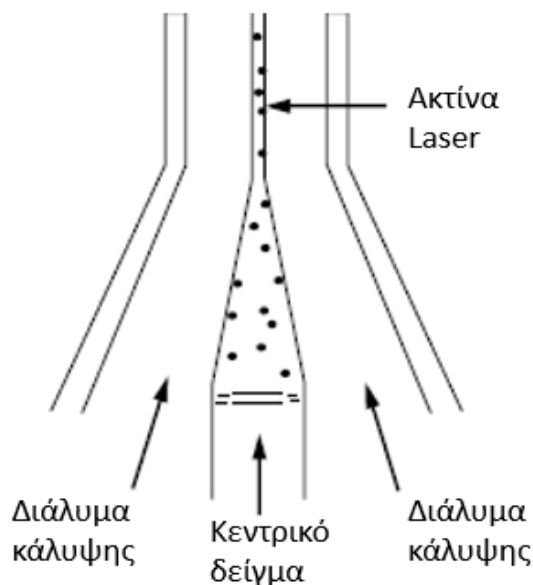
Το οπτικό σύστημα: Περιλαμβάνει τη φωτεινή πηγή, η οποία προσπίπτει πάνω στα σωματίδια του δείγματος, αλλά και τα οπτικά φίλτρα τα οποία οδηγούν τα παραγόμενα φωτεινά σήματα στους ανιχνευτές.

Το ηλεκτρονικό σύστημα: Μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρονικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργασθούν από Η/Υ. Συνήθως περιλαμβάνουν την αναγνώριση των παραμέτρων, τη σύνθεση των δεδομένων και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω κατάλληλου λογισμικού.

Στο ρευστό σύστημα οφείλεται η μεταφορά των σωματίδιων στο σημείο που προσπίπτει η ακτίνα laser («σημείο εξέτασης»). Τα σωματίδια κινούνται προς αυτό το σημείο μέσα σε ένα διάλυμα που ονομάζεται «κεντρικό δείγμα» (sample core) και ο σωλήνας ο οποίος τα εμπεριέχει ονομάζεται «σωλήνας ροής». Μέσα ωστόσο στο σωλήνα ροής, το κεντρικό δείγμα περιβάλλεται από ένα άλλο διάλυμα που ονομάζεται «διάλυμα κάλυψης» (sheath fluid). Ο σωλήνας ροής έχει τέτοιο σχήμα ώστε το κεντρικό δείγμα να κινείται στο κέντρο του διαλύματος κάλυψης. Βάσει των αρχών της νηματικής ροής, το κεντρικό δείγμα παραμένει διαχωρισμένο από το διάλυμα κάλυψης, η ροή του οποίου επιταχύνει τα σωματίδια και τα περιορίζει στο κέντρο του κεντρικού δείγματος. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως υδροδυναμική εστίαση και έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση των κυττάρων το ένα πίσω από το άλλο μέσα στο σωλήνα ροής. Το κεντρικό δείγμα πρέπει να έχει πάντα μεγαλύτερη πίεση από το δείγμα κάλυψης. Το κυτταρόμετρο ροής μας δίνει τη δυνατότητα να μεταβάλλουμε την πίεση του κεντρικού δείγματος και έτσι να αυξηθεί ή να ελαττωθεί η διάμετρός του καθώς αυτό ρέει μέσα στο διάλυμα κάλυψης, και έτσι μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί ο ρυθμός ροής των κυττάρων.

Μόλις τα σωματίδια περάσουν από το σημείο που προσπίπτει η ακτίνα laser τη σκεδάζουν και οποιοδήποτε φθορίζον μόριο που βρίσκεται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορεί να διεγερθεί και να εκπέμψει ακτινοβολία άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Ο σκεδασμός μπορεί να γίνει σε 2 κατευθύνσεις, μία παράλληλη ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία (forward scatter-εμπρόσθιος

σκεδασμός) και σε μια κατεύθυνση κάθετη στην προσπίπτουσα ακτινοβολία (side scatter-πλευρικός σκεδασμός). Ο εμπρόσθιος σκεδασμός εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου. Όσο μεγαλύτερο το μέγεθος του κυττάρου τόσο μεγαλύτερη η τιμή του εμπρόσθιου σκεδασμού. Όσον αφορά τον πλευρικό σκεδασμό, αυτός εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου. Όσο πιο πολύπλοκο είναι το εσωτερικό ενός κυττάρου τόσο μεγαλύτερη η τιμή του πλευρικού σκεδασμού.



Εικόνα 1. Διάταξη των μερών του ρευστού συστήματος ενός κυτταρόμετρου

Το σύστημα οπτικής συλλογής κατευθύνει την σκεδάζουσα και τη φθορίζουσα ακτινοβολία, δηλαδή την εκπεμπόμενη ακτινοβολία (emission light) στους ανιχνευτές (detectors) ακτινοβολίας. Το σύστημα οπτικής συλλογής αποτελείται από φακούς που κατευθύνουν την εκπεμπόμενη ακτινοβολία σε οπτικές ίνες. Οι οπτικές ίνες μεταδίδουν την ακτινοβολία σε φίλτρα και κάτοπτρα που στη συνέχεια μεταδίδουν ακτινοβολίες συγκεκριμένου μήκους κύματος στους ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές παράγουν ηλεκτρονικά σήματα τα οποία είναι ανάλογα των σημάτων που δέχονται και μετά από επεξεργασία τους μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, τη φυσική και χημική δομή των σωματιδίων.

Σχετικά με τη διάκριση των σωματιδίων-κυττάρων, πέρα από τους 2 τύπους σκεδασμών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, μπορεί να πραγματοποιηθεί και με βάση τις διαφορετικές αντιγονικές ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα που

συνδέονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο του κυτταρικού τύπου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Τα αντισώματα είναι επίσης συνδεδεμένα και με μία φθορίζουσα χρωστική. Όταν η ακτινοβολία laser του κυτταρομέτρου προσπέσει σε ένα κύτταρο στο οποίο έχει συνδεθεί το συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική αντίσωμα, τότε θα προκύψει φθορίζουσα ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, και άρα μια αντίστοιχη τιμή που θα δείχνει ότι το κύτταρο ανήκει σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής αναφέρονται στα κύτταρα που έχουν επιλεχθεί-οριοθετηθεί και είναι συμπληρωματικά των ευρημάτων της μορφολογίας των κυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την σωστή αξιολόγηση του δείγματος είναι η πλήρης γνώση της έκφρασης των δεικτών στα διάφορα στάδια της φυσιολογικής εξέλιξης και διαφοροποίησης των κυττάρων.

Η κυτταρομετρία ροής δίνει την δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής εκτίμησης της έκφρασης των αντιγόνων σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό. Η ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων δίνει κατανομές (patterns) της έκφρασης των αντιγόνων στον πληθυσμό των παθολογικών κυττάρων (π.χ. λευχαιμικών). Έτσι, εκτός από την διαπίστωση για την παρουσία ή απουσία ενός αντιγόνου, λαμβάνονται πληροφορίες για το ποσό της έκφρασης του αντιγόνου ανά κύτταρο και την κατανομή (ομοιογενής ή ετερογενής) της έκφρασής του.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως τα MPs φέρουν στην επιφάνειά τους μια πληθώρα αντιγόνων τα οποία είναι και χαρακτηριστικά των κυττάρων προέλευσής του. Η κυτταρομετρία ροής σήμερα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους ανίχνευσης του τύπου των MPs αλλά και του αριθμού τους στο βιολογικό δείγμα που λαμβάνουμε .

Rotem-Extem

Το ROTEM είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα "all-in-one" με τέσσερα ανεξάρτητα κανάλια μέτρησης που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της κατάστασης πήξης ενός δείγματος (102).

Σχήμα 1 : Το Σύστημα ROTEM



Ένα δείγμα αίματος 300 μl και διάλυμα δοκιμασίας 40 μl τοποθετούνται σε ένα σταθερό κύπελλο ενώ μια ακίδα αιωρείται στο αίμα. Οι δοκιμές ξεκινούν με επανασβεστοποίηση του δείγματος και επιταχύνονται με την προσθήκη ενός ενεργοποιητή. Η ακίδα ταλαντεύεται 4,75 ° κάθε πέντε δευτερόλεπτα. Όταν το αίμα αρχίσει να πήζει, η περιστροφή του πύρου παρεμποδίζεται και ανιχνεύεται από ένα οπτικό σύστημα. Το ROTEM αξιολογεί την κινητική, την αντοχή του θρόμβου και την ινωδόλυση με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 4). Με τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων για την ενεργοποίηση του καταρράκτη θρόμβωσης, τα αποτελέσματα ROTEM μπορούν να ερμηνευτούν μετά από 10-15 λεπτά. Αυτό είναι εν μέρει επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί η αρχική σταθερότητα του θρόμβου (mm) σε πέντε ή 10 λεπτά (A5 ή A10) μετά τον χρόνο πήξης (CT) για να καθοδηγήσει τη θεραπεία χωρίς να περιμένει μέγιστη σφριγηλότητα θρόμβου (MCF) .12

Το σύστημα χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό δοκιμασιών για τον χαρακτηρισμό του προφίλ πήξης. Γενικά, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες δοκιμασίες είναι EXTEM, INTEM, FIBTEM και APTEM.

STARTEM

Το star-tem® είναι ένα αντιδραστήριο για τον αναλυτή ROTEM® για την επανασβεστοποίηση αίματος με κιτρικό. Το επανασβεστωμένο αίμα μπορεί να αναλυθεί στον αναλυτή ROTEM® με τη χρήση της δοκιμασίας NATEM ή με τα ενεργοποιημένα INTEM και EXTEM. Η δοκιμασία NATEM (χωρίς επιταχυντές ενεργοποιητές) συνίσταται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς

Αρχή Μέτρησης:

Το star-tem® χρησιμοποιείται για την επανασβεστοποίηση του αίματος με κιτρικό. Στην θρομβοελαστογραφική μέτρηση με τον ROTEM®, η διαδικασία σχηματισμού του θρόμβου αρχίζει μετά τη προσθήκη του αντιδραστηρίου στο δείγμα αίματος και παρακολουθείται συνεχώς με τον αναλυτή ROTEM®. Γίνεται αυτόματος υπολογισμός του χρόνου πήξης (CT), του χρόνου σχηματισμού θρόμβου (CFT), της γωνίας A (α), του πλάτους σχηματισμού θρόμβου σε σταθερά χρονικά διαστήματα (π.χ. A10), της μέγιστης σταθερότητας του θρόμβου (MCF), του δείκτη λύσης του θρόμβου (π.χ. LI60) και άλλων παραμέτρων που περιγράφονται στον Οδηγό Χειριστή του ROTEM®I. Οι παραπάνω παράμετροι περιγράφουν την αιμόσταση από την ενεργοποίηση της πήξης, τον σχηματισμό του θρόμβου, τον πολυμερισμό και την σταθερότητα του μέχρι την ινωδόλυση.

Τιμές που διαφέρουν από τα καθιερωμένα εύρη αναφοράς των παραμέτρων υποδεικνύουν πιθανή διαταραχή της αιμόστασης.

Συστατικά:

CaCl₂, συντηρητικά και ρυθμιστικό διάλυμα.

EX-TEM

Το r ex-tem® είναι ένα αντιδραστήριο του συστήματος ROTEM® για την εξέταση της εξωγενούς οδού πήξης και της αλληλεπίδρασης της με τα αιμοπετάλια σε αίμα με κιτρικό. Χρησιμοποιείται πάντα σε συνδυασμό με το star-tem.

Αρχή Μέτρησης:

Στη δοκιμασία EXTEM το r ex-tem® ενεργοποιεί την εξωγενή οδό πήξης μετά από επανασβεστοποίηση με το αντιδραστήριο star-tem®.

Στην θρομβοελαστογραφική μέτρηση με τον ROTEM®, η διαδικασία σχηματισμού του θρόμβου αρχίζει μετά τη προσθήκη του αντιδραστηρίου στο δείγμα αίματος και παρακολουθείται συνεχώς με τον αναλυτή ROTEM®. Γίνεται αυτόματος υπολογισμός του χρόνου πήξης (CT), του χρόνου σχηματισμού θρόμβου (CFT), της γωνίας A (α), του πλάτους σχηματισμού θρόμβου σε σταθερά χρονικά διαστήματα (π.χ. A10), της μέγιστης σταθερότητας του θρόμβου (MCF), του δείκτη λύσης του θρόμβου (π.χ. LI60) και άλλων παραμέτρων που περιγράφονται στον Οδηγό Χειριστή του ROTEM®I. Οι παραπάνω παράμετροι περιγράφουν την αιμόσταση από την ενεργοποίηση της πήξης, τον σχηματισμό του θρόμβου, τον πολυμερισμό και την σταθερότητα του μέχρι την ινωδόλυση.

Τιμές που διαφέρουν από τα καθιερωμένα εύρη αναφοράς των παραμέτρων υποδεικνύουν πιθανή διαταραχή της αιμόστασης

Συστατικά:

Ανασυνδυασμένος ιστικός παράγοντας και φωσφολιπίδια, αναστολέας ηπαρίνης, συντηρητικά και ρυθμιστικό διάλυμα.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του ειδικού στατιστικού προγράμματος IBM, SPSS v.24(Statistical Package for Social Sciences). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά, όταν η τιμή $p < 0,05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($\text{mean} \pm \text{SE}$), εκτός κι εάν αυτό ορίζεται διαφορετικά.

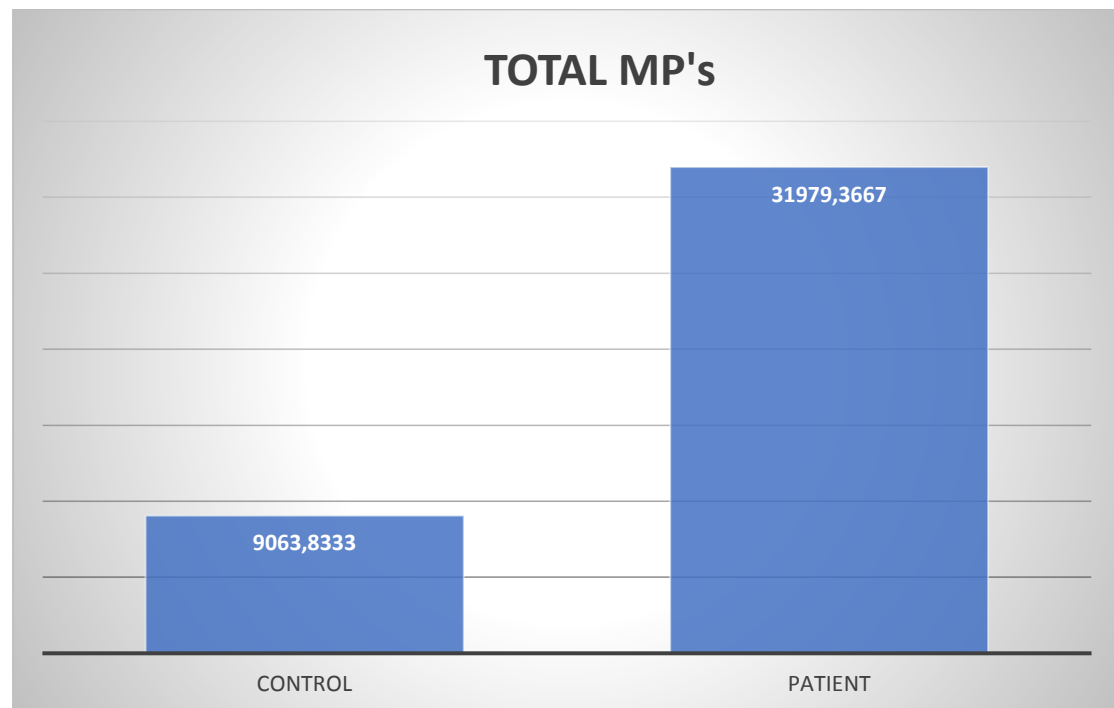
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο αριθμός των μικροκυστιδίων MPs, PMPs, ANXPOS.MPs και ANXNEG.MPs ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. ($p<0.001$, $p=0.002$, $p=0.003$ και $p=0.019$ αντίστοιχα). Βρέθηκε επίσης ότι ο CFT ήταν μειωμένος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0.535$), η α angle και ο MCF ήταν αυξημένα χωρίς όμως η αύξηση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,55$, $p=0.126$). Το ινωδογόνο βρέθηκε αυξημένο στους ασθενείς και τα D-Dimers θετικά σε περισσότερους ασθενείς ($p=0,009$, $p=0,09$ αντίστοιχα). (Πίνακας 1)

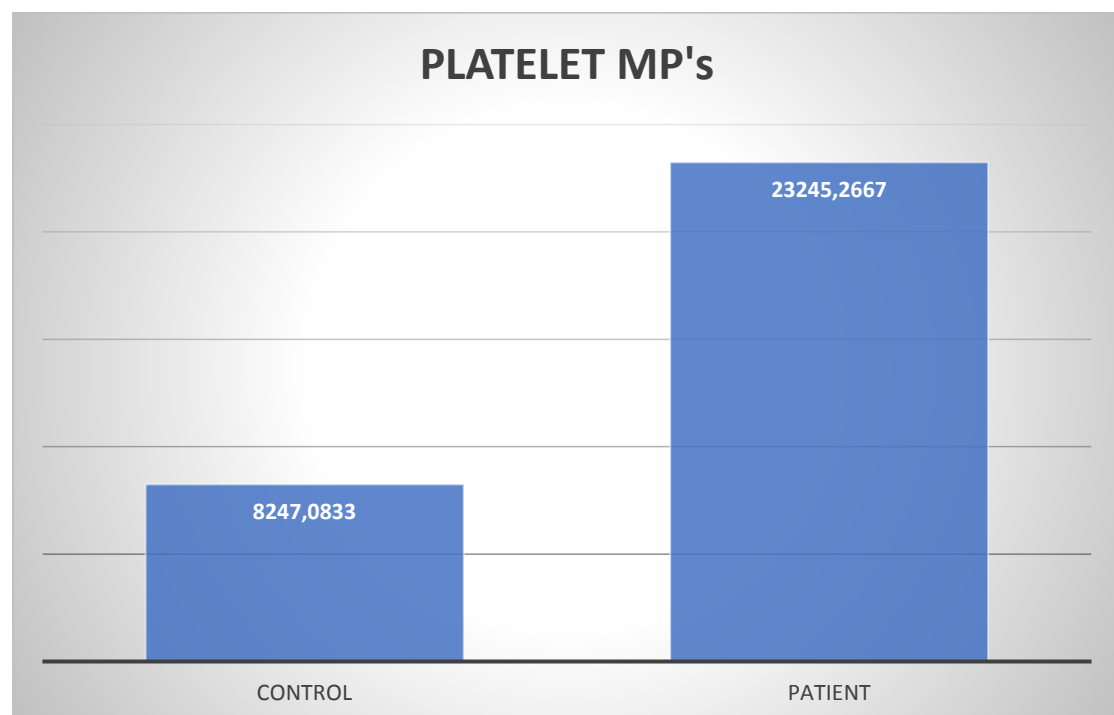
Οι παράμετροι του ROTEM CFT, α angle και MCF βρέθηκε να σχετίζονται σημαντικά με τις τιμές του Ινωδογόνου τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες ($p<0.001$ για όλες τις περιπτώσεις). Η συσχέτιση των CT, α angle, CFT και MCF με τα επίπεδα του συνολικού αριθμού των MPs, των PMPs των ANXPOS.MPS και ANXNEG.MPs δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.05$ για όλες τις περιπτώσεις).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1									
	CT (sd)	CFT (sd)	α angle (sd)	MCF (sd)	MPs (sd)	PLT.M PS (sd)	ANXPOS.MPS (sd)	ANXNEG.MPS (sd)	FIBRINOGEN (sd)
Controls (n=11)	51,25 (4,45)	154,09 (297,5)	81,5 (4,46)	28,41 (6,94)	9063,83 (14973)	8247,08 3 (4015)	5214,66 (9250)	3032,5 (4903)	336,83 (81,02)
Patients (n=30)	54,83 (6,35)	110,43 (148,50)	82 (1,70)	31,83 (6,18)	31979,3 (14716)	23245,2 (12812)	16783,17 (11393)	6462,03 (3733)	423,63 (85,00)
p value	0,083	0,535	0,55	0,126	<0,001	0,002	0,003	0,019	0,009

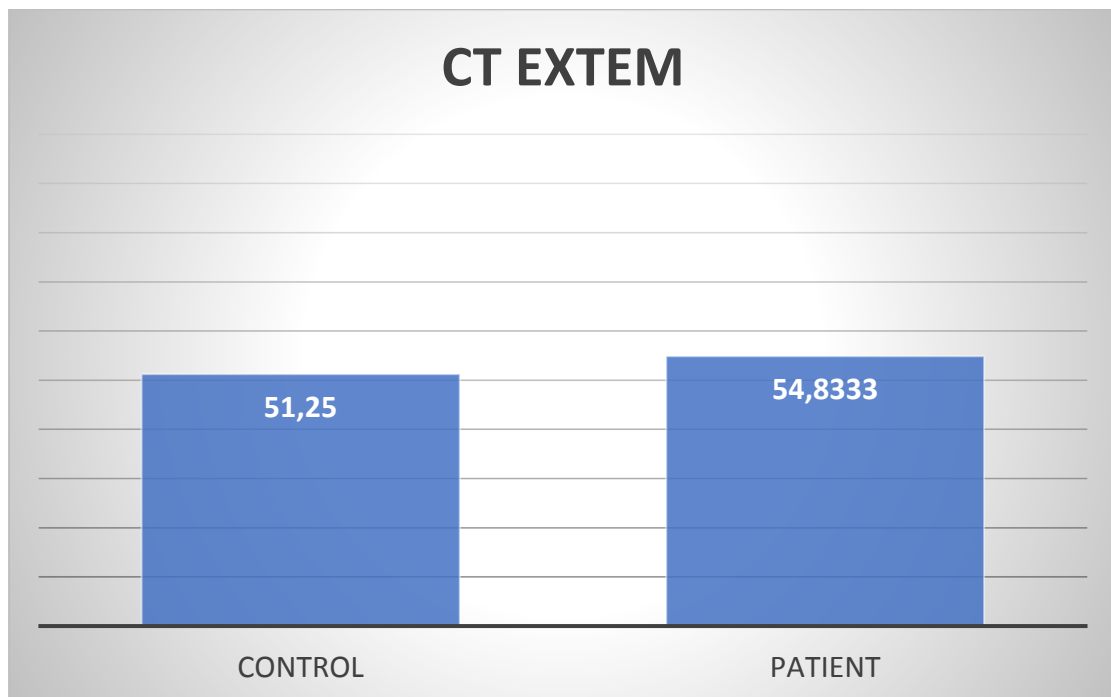
Ο αριθμός των μικροκυστιδίων MPs, ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$)



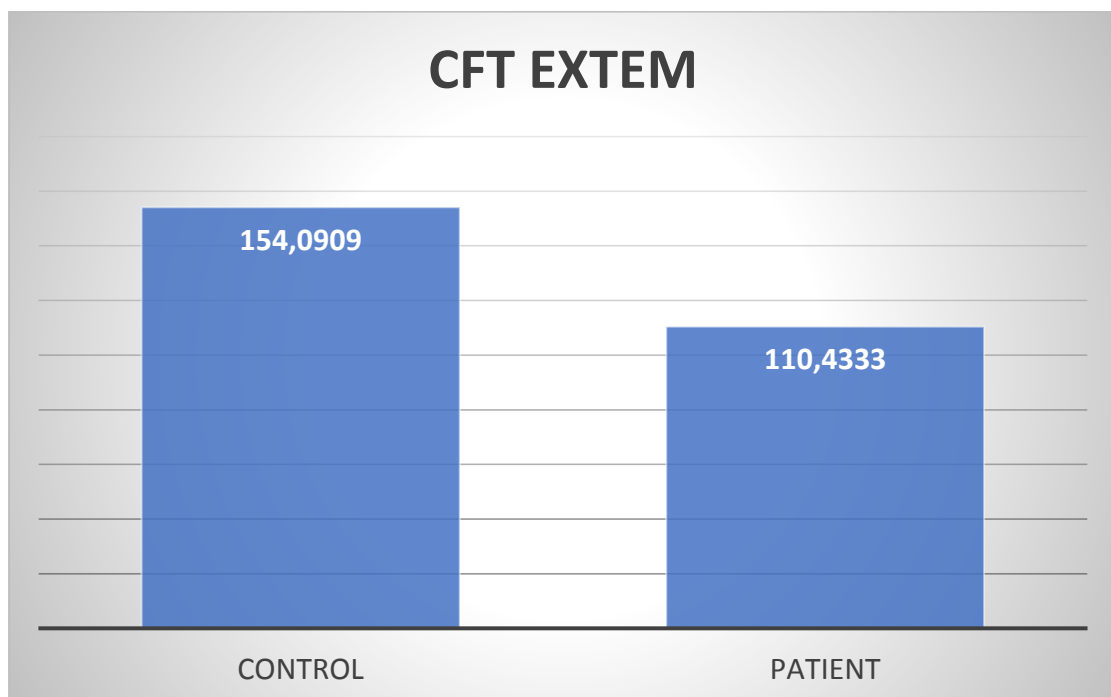
Ο αριθμός των μικροκυστιδίων αιμοπεταλιακής προέλευσης PLT MPs, ήταν επίσης σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.002$)



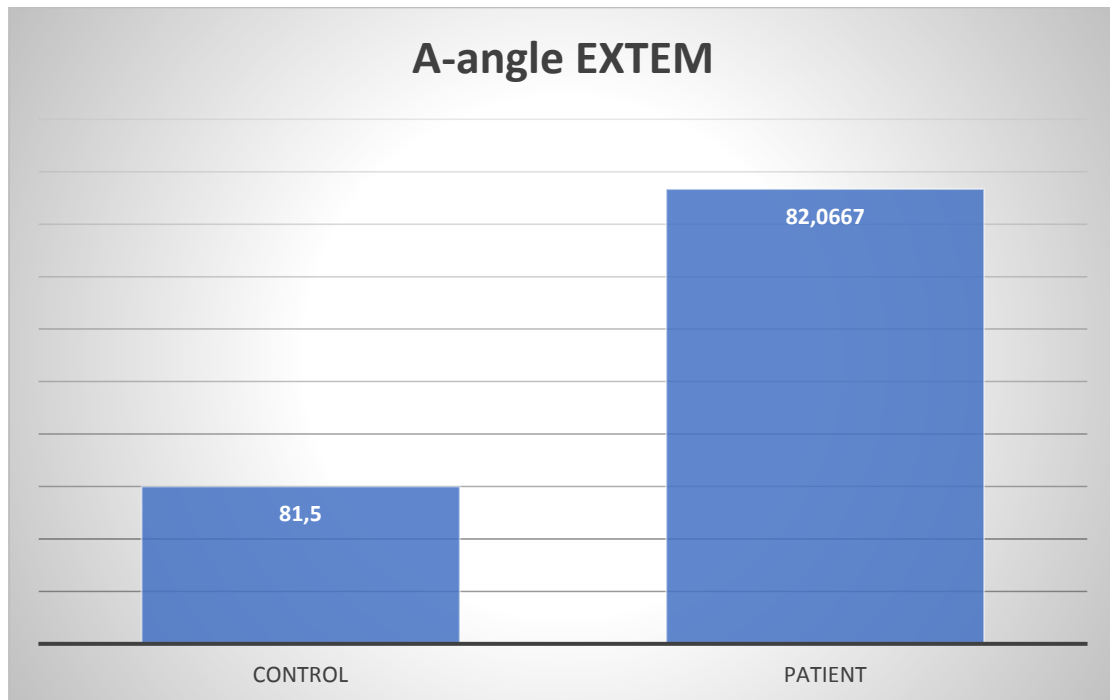
Το CT ήταν παρόμοιο, μεγαλύτερες τιμές παρατηρήθηκαν στους ασθενείς



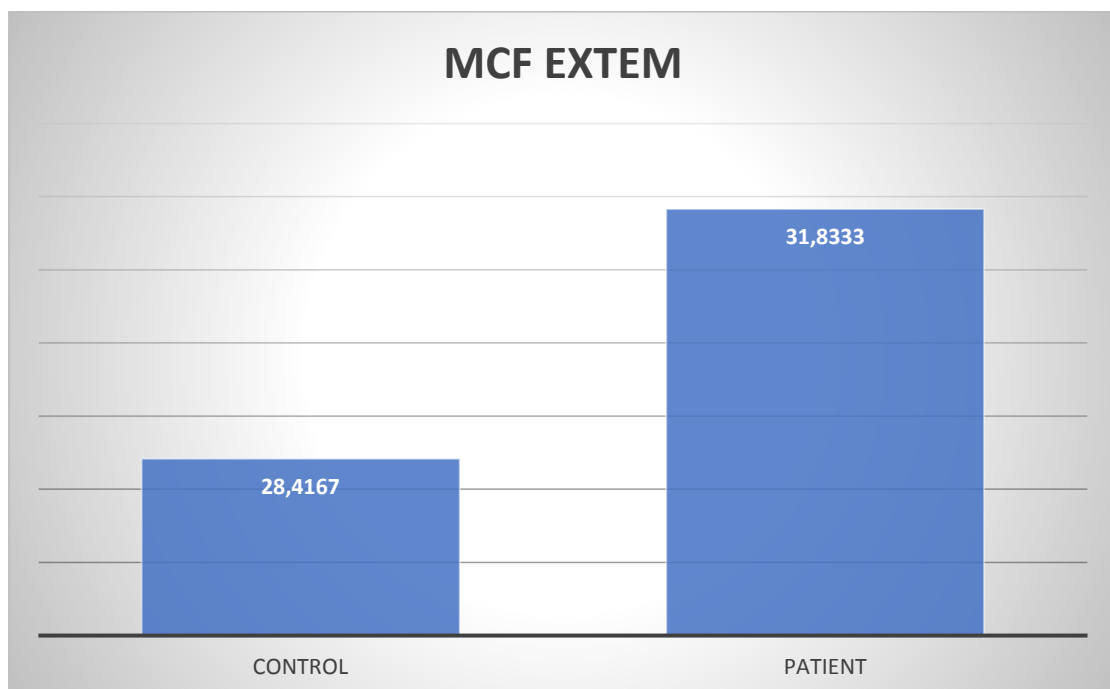
Ο CFT ήταν μειωμένος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0.535$)



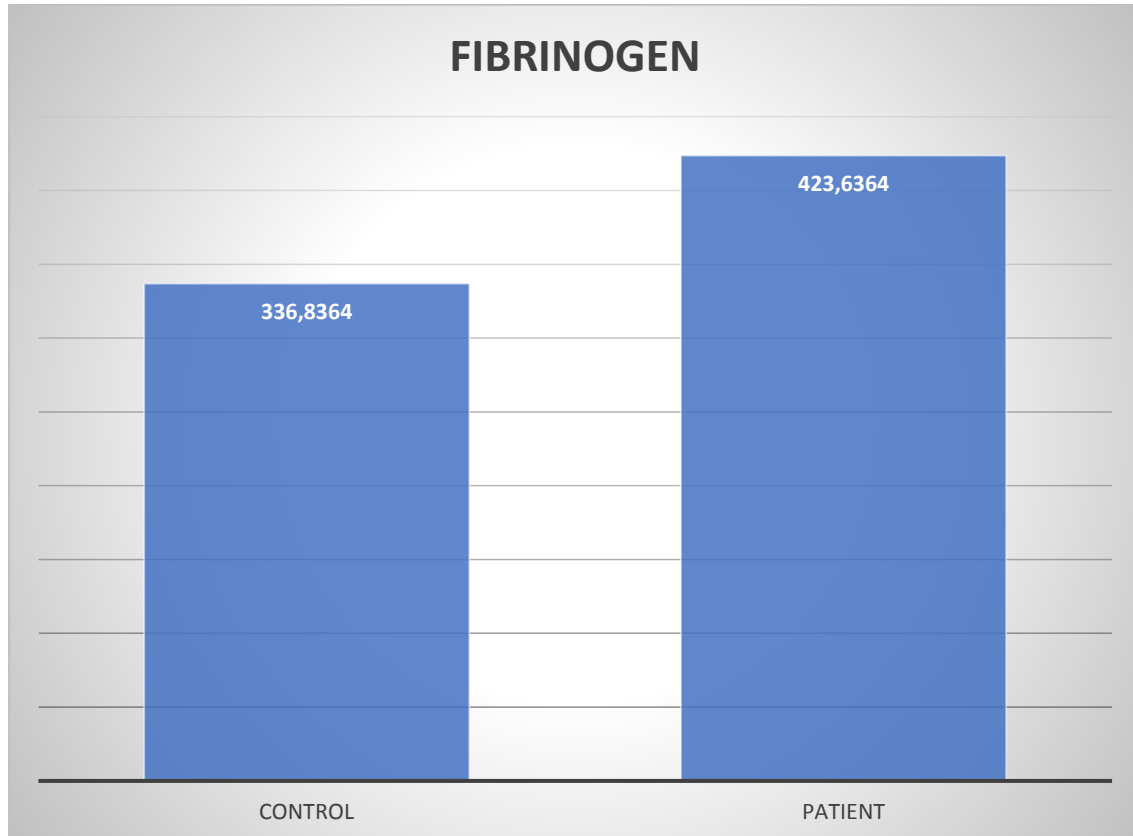
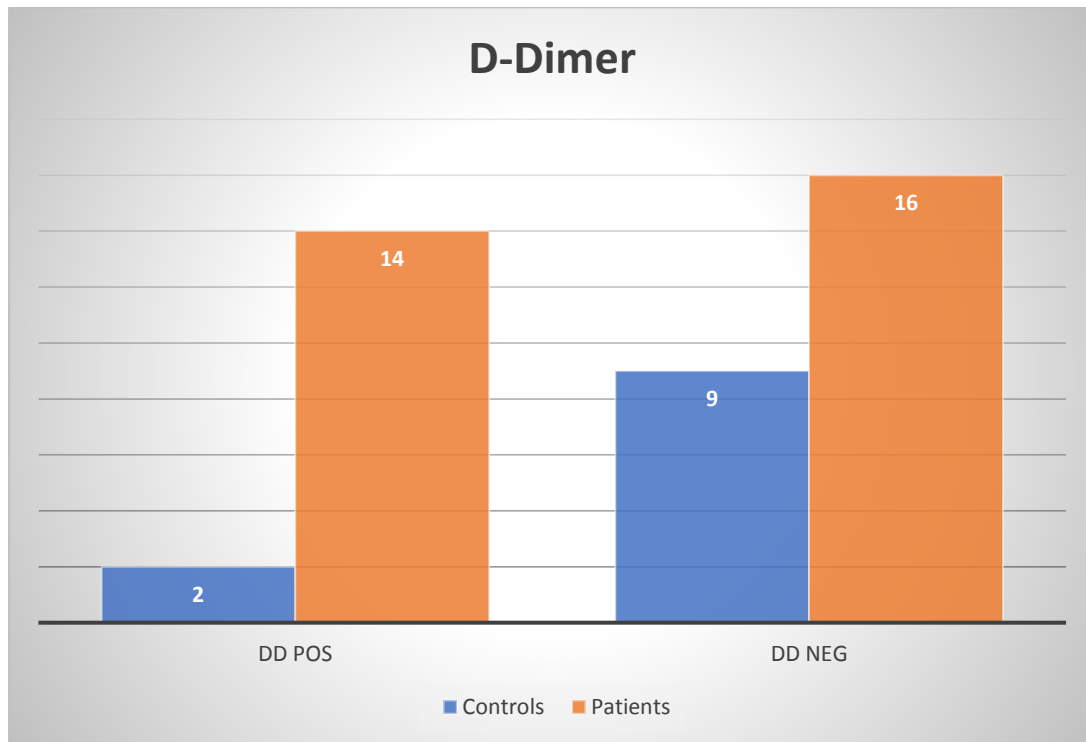
Η α γωνία (a angle) ήταν αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,55$)



Ο MCF ήταν αυξημένος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0.126$)



Το ινωδογόνο ήταν αυξημένο ($p=0.009$) στους ασθενείς και τα D-Dimers θετικά ($p=0.09$) στους περισσότερους ασθενείς



Οι παράμετροι CFT, α angle και MCF βρέθηκε να σχετίζονται σημαντικά με τις τιμές του Ινωδογόνου στο σύνολο των δειγμάτων.

Σημειώνεται ότι οι τιμές CFT, α angle και MCF βρέθηκε να σχετίζονται μεταξύ τους παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε PPP ($p < 0.001$ για όλες τις περιπτώσεις)

Correlations (N=42)					
		CFT	Aangle	MCF	FIBRINOGEN
CT	Pearson Correlation	0,22	-0,183	-0,242	0,069
	Sig. (2-tailed)	0,166	0,246	0,123	0,705
CFT	Pearson Correlation	1	-,494**	-,634**	-,539**
	Sig. (2-tailed)	-	0,001	<0,001	0,001
α ANGLE	Pearson Correlation	-,494**	1	,737**	,593**
	Sig. (2-tailed)	0,001	-	<0,001	<0,001
MCF	Pearson Correlation	-,634**	,737**	1	,812**
	Sig. (2-tailed)	<0,001	<0,001	-	<0,001
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).					
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).					

Η συσχέτιση των CT, α angle, CFT και MCF με τα επίπεδα του συνολικού αριθμού των MPs, των PMPs των ANXPOS.MPS και ANXNEG.MPs δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$ για όλες τις περιπτώσεις).

Σημαντικότερη συσχέτιση αυτή ανάμεσα σε MCF και συνολικό αριθμό MP's ($p = 0.094$)

Correlations (N=42)					
		MPs	PLT.MPS	ANXPOS.MPS	ANXNEG.MPS
CT	Pearson Correlation	0,189	0,169	0,208	-0,001
	Sig. (2-tailed)	0,232	0,285	0,187	0,993
CFT	Pearson Correlation	-0,131	-0,104	-0,063	-0,179
	Sig. (2-tailed)	0,413	0,516	0,697	0,263
Aangle	Pearson Correlation	0,128	0,165	0,188	0,039
	Sig. (2-tailed)	0,421	0,297	0,233	0,805
MCF	Pearson Correlation	0,262	0,248	0,225	0,219
	Sig. (2-tailed)	0,094	0,113	0,152	0,164
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).					
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).					

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Η σχέση μεταξύ του καρκίνου και της θρόμβωσης έχει επικυρωθεί σε μελέτες που καταδεικνύουν υψηλό ποσοστό φλεβικών θρομβομβολικών επεισοδίων σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο. Εργαστηριακές ενδείξεις μη φυσιολογικής αιμόστασης έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με καρκίνο, συμπεριλαμβανομένης της σύντμησης του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης, αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών πήξης (ινωδογόνο, παράγοντες V, VIII, IX και XI), θρομβοκυττάρωση, αυξημένη αποικοδόμηση ινικής / προϊόντα αποικοδόμησης [124].

Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να απελευθερώσουν προπηκτικό ιστικό Παράγοντα και μικροκυστίδια (MP) που μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα τον καταρράκτη πήξης. Τα κύτταρα όγκου απελευθερώνουν ενεργά MP αλλά επίσης προάγουν τον σχηματισμό MP από αιμοπετάλια. Ο ιστικός παράγοντας (TF) και η έκφραση της φωσφατιδυλσερίνης (PS) στις επιφάνειες των MP που προέρχονται από αιμοπετάλια και όγκους εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της πήξης του αίματος και σχηματισμό θρόμβων [111].

Ωστόσο, η υπερπηκτικότητα είναι μια παθολογική κατάσταση του αιμοστατικού μηχανισμού δύσκολο να ανιχνευθεί με κλασικές δοκιμές πήξης σε ασθενείς με καρκίνο. Η Θρομβοελαστομετρία είναι μια ευαίσθητη μέθοδος που είναι σε θέση να δείξει σημάδια υπερπηκτικότητας με τη μορφή γραφημάτων, τα οποία δεν μπορούν να ανιχνευθούν με κλασικές εργαστηριακές δοκιμασίες αιμόστασης.

Οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες του θρόμβου που δημιουργείται σε μια δοκιμασία θρομβοελαστομετρίας, και η δυνατότητα του αναλυτή ROTEM να μπορεί να τις καταγράψει με τη μορφή γραφήματος, είναι ο κύριος βοηθητικός παράγοντας του εργαστηριακού στην κατανόηση και αποτύπωση μια παθολογικής-υπερπηκτικής κατάστασης του αιμοστατικού μηχανισμού.

Στην παρούσα μελέτη δοκιμασίες θρομβοελαστομετρίας πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια για να αναδειχθεί ο πιθανός αιμοστατικός ρόλος των μικροκυστιδίων σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Επιλέχθηκαν δείγματα με υψηλό αριθμό μικροκυστιδίων ώστε να αξιολογηθεί η συνεισφορά των μικροκυστιδίων - κυρίως αιμοπεταλιακής προέλευσης - στη

δημιουργία του θρόμβου όπως αυτή απεικονίζεται σε ένα γράφημα θρομβοελαστομετρίας. Το Ινωδογόνο όπως ήταν βιολογικά αναμενόμενο σχετίζεται με τις παραμέτρους CFT, α γωνία και MCF. Το αυξημένο ινωδογόνο και τα θετικά D-Dimers υποδεικνύουν πιθανότατα μια συνεχή ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού στους ασθενείς αυτούς. Ο αυξημένος απόλυτος αριθμός των μικροκυστιδίων τόσο των συνολικών όσο και των αιμοπεταλιακής προέλευσης, θετικών και αρνητικών στην ανεξίνη (MPs, PMPs, ANXNEG.MPs και ANXPOS.MPs) φαίνεται να επηρέασε τις παραμέτρους της θρομβοελαστομετρίας στους ασθενείς της παρούσας μελέτης με εμφανείς τις διαφορές στις παραμέτρους CFT και MCF που εκφράζουν ουσιαστικά τις διαφορές στις ιξωδοελαστικές ιδιότητες των παραγόμενων θρόμβων των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η συσχέτιση αυτή ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στον μικρό αριθμό του δείγματος.

Επιπρόσθετα, παρότρυνση του συγγραφέα αλλά και της επιστημονική ομάδας που συνέβαλε στην παρούσα, είναι ο περαιτέρω έλεγχος δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και με υψηλό αριθμό αιμοπεταλιακής και άλλης προέλευσης μικροκυστιδίων. Αναλογιζόμενοι την αποδεδειγμένα αυξημένη έκφραση ιστικού παράγοντα στα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια ενδεχομένως η ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού με επιλογή διαφορετικού ενεργοποιητή και όχι ιστικού παράγοντα μέσω του αντιδραστηρίου επιλογής (ex-tem) να μπορέσει να δώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο έκφρασης της υπερπηκτικότητας σε διαγράμματα θρομβοελαστομετρίας.

Τέλος, μελέτη περισσότερων ασθενών αναμένεται να διαλευκάνει τον τελικό ρόλο των μικροκυστιδίων στην θρομβοελαστομετρία ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Overview of the coagulation system.

Palta S, Saroa R, Palta A

Indian J Anaesth. 2014 Sep; 58(5):515-23.

2. Clin Appl Thromb Hemost. 2018 Jan 1:1076029618772336. doi: 10.1177/1076029618772336.

The Double Hazard of Bleeding and Thrombosis in Hemostasis From a Clinical Point of View: A Global Assessment by Rotational Thromboelastometry (ROTEM).

Akay OM.

3. Thromboelastometry guided therapy of severe bleeding. Essener Runde algorithm.

Lier H, Vorweg M, Hanke A, Görlinger K

Hamostaseologie. 2013; 33(1):51-61.

4. Indian J Crit Care Med. 2018 Apr; 22(4): 238–242.

doi: 10.4103/ijccm.IJCCM_486_17

PMCID: PMC5930527

PMID: 29743762

Thromboelastographic Analysis of Hemostatic Abnormalities in Dengue Patients Admitted in a Multidisciplinary Intensive Care Unit: A Cross-sectional Study

V. K. Sureshkumar, Deepak Vijayan, Shamim Kunhu, Zuhail Mohamed, 1 Sujith Thomas, and Muraleedharan Raman

5. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2018 May;28(3):201-212. doi: 10.1111/vec.12710. Epub 2018 Mar 31.

Multicenter in vitro thromboelastography and thromboelastometry standardization.

Goggs R1, Borrelli A2, Brainard BM3, Chan DL4, de Laforcade A5, Goy-Thollot I6, Jandrey KE7, Kristensen AT8, Kutter A9, Marschner CB8, Rannou B6, Sigrist N9, Wagg C10.

6. Coagulation biomarkers in critically ill patients.

Levi M, Schultz M, van der Poll T

Crit Care Clin. 2011 Apr; 27(2):281-97.

7. Point-of-care coagulation management in intensive care medicine.

Meybohm P, Zacharowski K, Weber CF

Crit Care. 2013 Mar 19; 17(2):218.

8. Thromboelastometry guided therapy of severe bleeding. Essener Runde algorithm.

Lier H, Vorweg M, Hanke A, Görlinger K

Hamostaseologie. 2013; 33(1):51-61.

9. Viscoelastic Methods of Blood Clotting Assessment - A Multidisciplinary Review.

Benes J, Zatloukal J, Kletecka J

Front Med (Lausanne). 2015; 2():62.

10. PLoS One. 2018 Feb 20;13(2):e0192965. doi: 10.1371/journal.pone.0192965.
eCollection 2018.

Thromboelastometry profile in critically ill patients: A single-center, retrospective, observational study.

Crochemore T1, Corrêa TD1, Lance MD2, Solomon C3,4, Neto AS1, Guerra JCC5, Lellis PS5, Bernz LM1, Nunes N1, Mancio CM1, Yokoyama APH6, Silva E1

11. Calatzis A., Haas S. et al.: Thromboelastographic coagulation monitoring during cardiovascular

surgery with the ROTEG coagulation analyzer. In: Pfarr, R., ed. Management of Bleeding in Cardiovascular

Surgery, 2000, Hanley Belfus Inc, Philadelphia

12. Rotem® delta operating manual, Tem Innovations GmbH, Martin-Kollar-Str. 13-15, D-81829 Munich/Germany, Version 2.6.0.02 EN

13. Sørensen B., Johansen P., Christiansen K., Woelke M., Ingerslev J.: Whole blood coagulation

thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. J Thromb Haemost 2003;1:551-8

14. Lang T., Bauters A., Braun S.L., Potzsch B., von Pape K.W., Kolde H.J., Lakner M.: Multi-centre

investigation on reference ranges for ROTEM® thromboelastometry. Blood Coagul Fibrinolysis 2005;16:301–310.

15. Böhner J., von Pape K.-W.: Method Dependent Reference Values and Pre-analytical Influences in

Rotation Thrombelastography. Ann Haematol 2003;82(S1):13

16. Curr Opin Hematol. 2015 Sep;22(5):437-44. doi: 10.1097/MOH.0000000000000166.

The diversity of platelet microparticles.

Boilard E1, Ducheze AC, Brisson A.

17. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop.

Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, ISTH SSC Workshop.

J Thromb Haemost. 2010 Nov; 8(11):2571-4.

18. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles.

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Jan; 31(1):15-26.

19. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis.

Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F

J Thromb Haemost. 2013 Jun; 11 Suppl 1():24-35.

20. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A.

Hrachovinová I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH Jr, Schaub RG, McEver RP, Wagner DD

Nat Med. 2003 Aug; 9(8):1020-5.

21. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?

Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S

J Thromb Haemost. 2007 Mar; 5(3):520-7.

22. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa.

Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, ten Cate H, Spronk HM

J Thromb Haemost. 2012 Jul; 10(7):1355-62.

23. Microparticles in hemostasis and thrombosis.

Owens AP 3rd, Mackman N

Circ Res. 2011 May 13; 108(10):1284-97.

24. Platelets and platelet-derived microparticles in vascular inflammatory disease.

Vasina E, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR

Inflamm Allergy Drug Targets. 2010 Dec; 9(5):346-54.

25. Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein.

Cui Y, Zheng L, Jiang M, Jia R, Zhang X, Quan Q, Du G, Shen D, Zhao X, Sun W, Xu H, Huang L

Mol Biol Rep. 2013 Nov; 40(11):6437-42.

26. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia.

Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, Panova-Noeva M, Leuzzi A, Rambaldi A, Finazzi G, Woodhams B, Falanga A

Am J Hematol. 2014 Jan; 89(1):68-73.

27. Altered profile of circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients.

Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Carro-Esteban SR, Ballina-García FJ, Suárez A

Clin Sci (Lond). 2015 Apr; 128(7):437-48.

28. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis.

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS

Thromb Res. 2003 Feb 15; 109(4):175-80.

29. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer.

Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS

Cytometry A. 2007 Jan; 71(1):38-45.

30. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability.

Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS

J Thromb Haemost. 2011 Nov; 9(11):2251-61.

31. Platelet microparticles: a wide-angle perspective.

Horstman LL, Ahn YS

Crit Rev Oncol Hematol. 1999 Apr; 30(2):111-42.

32. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles.

Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr

Blood. 2009 Jan 29; 113(5):1112-21.

33. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton.

Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW

FEBS Lett. 2006 Oct 2; 580(22):5313-20.

34. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A

Thromb Haemost. 2001 Apr; 85(4):639-46.

35. Bridge K. I., Philippou H. & Ariens R. Clot properties and cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 112, 1–8

36. A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots.

Collet JP, Montalescot G, Lesty C, Weisel JW

Circ Res. 2002 Mar 8; 90(4):428-34.

37. Structure of fibrin: impact on clot stability.

Weisel JW

J Thromb Haemost. 2007 Jul; 5 Suppl 1():116-24.

38. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications.

Weisel JW, Litvinov RI

Blood. 2013 Mar 7; 121(10):1712-9

39. Atorvastatin has antithrombotic effects in patients with type 1 diabetes and dyslipidemia.

Tehrani S, Mobarrez F, Antovic A, Santesson P, Lins PE, Adamson U, Henriksson P, Wallén NH, Jörneskog G

Thromb Res. 2010 Sep; 126(3):e225-31.

40. Evidence of a phospholipid binding species within human fibrinogen preparations.

Cunningham MT, Citron BA, Koerner TA

Thromb Res. 1999 Sep 15; 95(6):325-34.

41. Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis.

Siljander P, Carpen O, Lassila R

Blood. 1996 Jun 1; 87(11):4651-63.

42. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability.

Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS

J Thromb Haemost. 2011 Nov; 9(11):2251-61.

43. Correlation between the number and origin of circulating microparticles and fibrin clot properties in patients with coronary artery disease.

Stępień E, Konkolewska M, Kapusta M, Żurkowski A

Int J Cardiol. 2015 Feb 15; 181():147-8.

44. Sci Rep. 2015 Dec 4;5:17611. doi: 10.1038/srep17611.

Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots.

Zubairova LD1, Nabiullina RM1, Nagaswami C2, Zuev YF3, Mustafin IG1, Litvinov RI2,4, Weisel JW2.

45. Blood. 2017 Aug 3;130(5):567-580. doi: 10.1182/blood-2016-11-751099. Epub 2017 May 12.

Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth.

Michael JV1,2, Wurtzel JGT1,2, Mao GF2, Rao AK2,3, Kolpakov MA4,5, Sabri A4,5, Hoffman NE6,7, Rajan S6,7, Tomar D6,7, Madesh M6,7, Nieman MT8, Yu J9,10, Edelstein LC9,10, Rowley JW11,12, Weyrich AS11,12,13, Goldfinger LE1,2,14.

46. Plasma microparticles and vascular disorders.

Lynch SF, Ludlam CA

Br J Haematol. 2007 Apr; 137(1):36-48.

47. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles.

Liu ML, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE, Williams KJ

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Feb; 27(2):430-5.

48. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages.

Li M, Yu D, Williams KJ, Liu ML

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Sep; 30(9):1818-24.

49. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles.

Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S

Blood. 1996 Nov 1; 88(9):3456-64.

50. Microparticles in cardiovascular diseases.

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R

Cardiovasc Res. 2003 Aug 1; 59(2):277-87.

51. Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles.

Wiedmer T, Sims PJ

Blood. 1991 Dec 1; 78(11):2880-6.

52. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles.

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Jan; 31(1):15-26.

53. Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke.

Li CJ, Liu Y, Chen Y, Yu D, Williams KJ, Liu ML

Am J Pathol. 2013 May; 182(5):1552-62.

54. Microvesicles in health and disease.

Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, Kholia S, Antwi-Baffour SS, Jorfi S, Lange S

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2012 Apr; 60(2):107-21

55. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'.

Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J

Semin Immunopathol. 2011 Sep; 33(5):455-67.

56. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis.

- Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F*
Semin Immunopathol. 2011 Sep; 33(5):469-86.
57. The role of microvesicles in tissue repair.
Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Camussi G
Organogenesis. 2011 Apr-Jun; 7(2):105-15.
58. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors.
Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM
Curr Opin Hematol. 2004 May; 11(3):156-64.
59. [Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes].
Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie P, Freyssinet JM, Toti F
Ann Fr Anesth Reanim. 2006 Sep; 25(9):955-66.
60. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors.
Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM
Curr Opin Hematol. 2004 May; 11(3):156-64.
61. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?
Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec; 26(12):2594-604.
62. Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis.
Bastida E, Ordinas A, Escolar G, Jamieson GA
Blood. 1984 Jul; 64(1):177-84.
63. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism.
Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bulato C, Castelli M, Gavasso S, Simioni P
Thromb Res. 2011 May; 127(5):473-7.
64. Membrane microparticles in VTE and cancer.
Key NS, Chantrathammachart P, Moody PW, Chang JY
Thromb Res. 2010 Apr; 125 Suppl 2():S80-3
65. Malignant transformation in melanocytes is associated with increased production of procoagulant microvesicles.

Lima LG, Oliveira AS, Campos LC, Bonamino M, Chammas R, Werneck C, Vicente CP, Barcinski MA, Petersen LC, Monteiro RQ

Thromb Haemost. 2011 Oct; 106(4):712-23.

66. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism.

Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N

Thromb Res. 2010 Jun; 125(6):511-2.

67. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients.

Thaler J, Ay C, Weinstabl H, Dunkler D, Simanek R, Vormittag R, Freyssinet JM, Zielinski C, Pabinger I

Ann Hematol. 2011 Apr; 90(4):447-53.

68. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy.

Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B

Clin Cancer Res. 2009 Nov 15; 15(22):6830-40.

69. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis.

Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S

J Thromb Haemost. 2009 Aug; 7(8):1421-3.

70. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 Sep;35(9):1103-10. doi: 10.1038/aps.2014.73. Epub 2014 Aug 25.

Microparticles: new light shed on the understanding of venous thromboembolism.

Zhou L1, Qi XL2, Xu MX2, Mao Y1, Liu ML3, Song HM1.

71. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles.

Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Jan; 31(1):15-26.

72. *Circ Res.* 2011 May 13;108(10):1284-97. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056.

Microparticles in hemostasis and thrombosis.

Owens AP 3rd1, Mackman N.

73. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer.

Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS

Cytometry A. 2007 Jan; 71(1):38-45.

74. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis.

Mackman N, Tilley RE, Key NS

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Aug; 27(8):1687-93.

75. Tissue factor pathway inhibitor.

Broze GJ Jr

Thromb Haemost. 1995 Jul; 74(1):90-3.

76. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When?

Butenas S, Orfeo T, Mann KG

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Dec; 29(12):1989-96.

77. Egorina EM, Sovershaev MA, Osterud B. Regulation of tissue factor procoagulant activity by post-translational modifications. *Thromb Res*. 2008;122:831–837.

78. Krudysz-Amblo J, Jennings ME, 2nd, Mann KG, Butenas S. Carbohydrates and activity of natural and recombinant tissue factor. *J Biol Chem*. 2010;285:3371–3382.

79. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:456–461

80. Bach RR, Moldow CF. Mechanism of tissue factor activation on hl-60 cells. *Blood*. 1997;89:3270–3276.

81. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry*. 2006;45:12020–12028.

82. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR. Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost*. 2009;102:728–734

83. *Circ Res*. 2011 May 13;108(10):1284-97. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056. Microparticles in hemostasis and thrombosis.

Owens AP 3rd1, Mackman N.

84. "Colon Cancer Treatment (PDQ®)". NCI. May 12, 2014. Archived from the original on July 5, 2014. Retrieved June 29, 2014.

85. "Defining Cancer". National Cancer Institute. Archived from the original on June 25, 2014. Retrieved June 10, 2014.

86. "General Information About Colon Cancer". NCI. May 12, 2014. Archived from the original on July 4, 2014. Retrieved June 29, 2014.

87. World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.5. ISBN 9283204298.
88. "Colorectal Cancer Prevention (PDQ®)". National Cancer Institute. February 27, 2014. Archived from the original on July 5, 2014. Retrieved June 29, 2014.
89. Theodoratou, E; Timofeeva, M; Li, X; Meng, X; Ioannidis, JPA (August 2017). "Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer". *Annual Review of Nutrition* (Review). 37: 293–320. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-051004. PMID 28826375
90. Bibbins-Domingo, Kirsten; Grossman, David C.; Curry, Susan J.; Davidson, Karina W.; Epling, John W.; García, Francisco A. R.; Gillman, Matthew W.; Harper, Diane M.; Kemper, Alex R.; Krist, Alex H.; Kurth, Ann E.; Landefeld, C. Seth; Mangione, Carol M.; Owens, Douglas K.; Phillips, William R.; Phipps, Maureen G.; Pignone, Michael P.; Siu, Albert L. (21 June 2016). "Screening for Colorectal Cancer". *JAMA*. 315 (23): 2564–75. doi:10.1001/jama.2016.5989. PMID 27304597.
91. "SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer". NCI. Archived from the original on June 24, 2014. Retrieved June 18, 2014
92. World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 9283204298.
93. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis". *Nature*. 363 (6429): 558–61. doi:10.1038/363558a0. PMID 8505985.
94. Srikumar Chakravarthi; Baba Krishnan; Malathy Madhavan (1999). "Apoptosis and expression of p53 in colorectal neoplasms". *Indian J. Med. Res.* 86 (7): 95–102.
95. Khalek FJ, Gallicano GI, Mishra L (May 2010). "Colon Cancer Stem Cells". *Gastrointest. Cancer Res. (Suppl 1)*: S16–S23. PMC 3047031 Freely accessible. PMID 21472043.
96. Markowitz SD, Bertagnolli MM (December 2009). "Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer". *N. Engl. J. Med.* 361 (25): 2449–60. doi:10.1056/NEJMra0804588. PMC 2843693 Freely accessible. PMID 20018966.
97. Mehlen P, Fearon ER (August 2004). "Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis". *J. Clin. Oncol.* 22 (16): 3420–8. doi:10.1200/JCO.2004.02.019. PMID 15310786.

98. Uhlen, Mathias; Zhang, Cheng; Lee, Sunjae; Sjöstedt, Evelina; Fagerberg, Linn; Bidkhori, Gholamreza; Benfeitas, Rui; Arif, Muhammad; Liu, Zhengtao (2017-08-18). "A pathology atlas of the human cancer transcriptome". *Science*. 357 (6352): eaan2507. doi:10.1126/science.aan2507. ISSN 0036-8075. PMID 28818916.
99. Vogelstein, B; Kinzler, KW (2004). "Cancer genes and the pathways they control". *Nature Medicine*. 10 (8): 789–99. doi:10.1038/nm1087. PMID 15286780.
100. Muzny, DM.; Bainbridge, MN.; Chang, K.; Dinh, HH.; Drummond, JA.; Fowler, G.; Kovar, CL.; Lewis, LR.; Morgan, MB.; Newsham, Irene F.; Reid, Jeffrey G.; Santibanez, Jireh; Shinbrot, Eve; Trevino, Lisa R.; Wu, Yuan-Qing; Wang, Min; Gunaratne, Preethi; Donehower, Lawrence A.; Creighton, Chad J.; Wheeler, David A.; Gibbs, Richard A.; Lawrence, Michael S.; Voet, Douglas; Jing, Rui; Cibulskis, Kristian; Sivachenko, Andrey; Stojanov, Petar; McKenna, Aaron; Lander, Eric S.; Gabriel, Stacey (Jul 2012). "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer". *Nature*. 487 (7407): 330–7. doi:10.1038/nature11252. PMC 3401966 Freely accessible. PMID 22810696.
101. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma.
Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C.
Int J Clin Exp Med. 2014 Sep 15;7(9):2828-35. eCollection 2014.
PMID: 25356145 Free PMC Article
102. Kirchner C, Dirkmann D, Treckmann JW, Paul A, Hartmann M, Saner FH, Görlinger K. Coagulation management with factor concentrates in liver transplantation: a single-center experience. *Transfusion*. 2014 Oct;54(10 Pt 2):2760-8
103. Falanga A, Marchetti M. Venous thromboembolism in the hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4848–57.
104. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D. Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1: 673–8.
105. Falanga A, Russo L. Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer. *Hamostaseologie* 2012; 32: 115–25.
106. Rickles FR, Falanga A. Activation of clotting factors in cancer.

Cancer Treat Res 2009; 148: 31-41.

107. Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. Thromb Res 2012; 129(Suppl. 1): S132-6.

108. Garnier D, Magnus N, D_AstiE, Hashemi M, Meehan B, Milsom C, Rak J. Genetic pathways linking hemostasis and cancer. Thromb Res 2012; 129(Suppl. 1): S22-9.

109. Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. Circulation 2003; 107: 117-21.

110. Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. Lancet Oncol. 2005; 6: 401-10.

111. A. Falanga, M. Marchetti and A. Vignoli. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 11: 223-233 DOI: 10.1111/jth.12075

112. Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. Best Pract Res Clin Haematol 2009; 22: 49-60.

113. Pickering W, Gray E, Goodall AH, Ran S, Thorpe PE, Barrowcliffe TW. Characterization of the cell-surface procoagulant activity of T lymphoblastoid cell lines. J Thromb Haemost 2004; 2: 459-67.

114. Fernandes RS, Kirszberg C, Rumjanek VM, Monteiro RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. J Thromb Haemost 2006; 4: 1546-52.

115. Nadir Y, Brenner B, Gingis-Velitski S, Levy-Adam F, Ilan N, Zcharia E, Nadir E, Vlodavsky I. Heparanase induces tissue factor pathway inhibitor expression and extracellular accumulation in endothelial and tumor cells. Thromb Haemost 2008; 99: 133-41.

116. Kozwicz DL, Kramer LC, Mielicki WP, Fotopoulos SS, Gordon SG. Application of cancer procoagulant as an early detection tumor marker. Cancer 1994; 74: 1367-76.

117. Molnar S, Guglielmone H, Lavarda M, Rizzi ML, Jarchum G. Procoagulant factors in patients with cancer. Hematology 2007; 12: 555-9.

118. Horstman LL, JyW, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 2004; 53: 210-30.
119. van Aalderen MC, TrappenburgMC, van SchilfgaardeM, Molenaar PJ, ten Cate H, Terpstra WE, Leyte A. Procoagulant myeloblastderived microparticles in AML patients: changes in numbers and thrombin generation potential during chemotherapy. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 223-6.
120. Auwerda JJ, Yuana Y, Osanto S, deMaatMP, Sonneveld P, Bertina RM, Leebeek FW. Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *ThrombHaemost* 2011; 105: 14-20.
121. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, Terpstra WE, Falanga A. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2009; 94: 911-8.
122. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; 39: 184-91.
123. Chad M Thorson, MD, MSPH, Robert M Van Haren, MD, Mark L Ryan, MD, Emiliano Curia, MD, Danny Sleeman, MD, FACS, Joe U Levi, MD, FACS, Alan S Livingstone, MD, FACS, Kenneth G Proctor, PhD
Persistence of Hypercoagulable State after Resection of Intra-Abdominal Malignancies
124. O. Meltem Akay Æ Zeki Ustuner Æ Zerrin Canturk Æ Fezan Sahin Mutlu Æ Zafer Gulbas - Laboratory investigation of hypercoagulability in cancer patients using rotation thrombelastography