



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΜΕ ΠΗΚΤΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ»**

**ΚΥΡΙΑΚΗ Ι. ΠΑΝΕΛΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Ο ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΜΕ ΠΗΚΤΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ»**

**ΚΥΡΙΑΚΗ Ι. ΠΑΝΕΛΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ρανέλλου Κυριακής: 18-2-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 551^α/29-3-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 747^α/31-1-2013

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

Μέλη

Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου ΔΠΘ

Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-11-2005

«Έλεγχος θρομβοφιλίας με πηκτικολογικές μεθόδους και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε ασθενείς τριτοβάθμιοι νοσοκομείου».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 775^α/17-3-2015

1. Ευαγγέλου Άγγελος Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Καλφακάκου Βασιλική Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου ΔΠΘ
5. Βεζυράκη Πατρώνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Πέσχος Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

7. Παγωνοπούλου Όλγα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής
του Παν/μίου ΔΠΘ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-6-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΚΑΠΗΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

«Αφιερώνεται στους γονείς μου Γιάννη και Φρόσω
και
στον αδερφό μου Βαγγέλη,
που ΠΑΝΤΑ στηρίζουν τους στόχους μου.....»

Αφιερώνεται στον Άγιο Νεκτάριο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
Συντομογραφίες	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΙΜΟΣΤΑΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	16
Μηχανισμός ινωδόλυσης	18
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ	20
ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ	24
Αιτιολογική ταξινόμηση ισχαιμικών ΑΕΕ	27
Κλινικές εκδηλώσεις ΑΕΕ	31
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΕΕ	32
Κλινική και εργαστηριακή εκτίμηση ΑΕΕ	34
Έλεγχος θρομβοφιλίας και ΑΕΕ	36
Παράγοντες πήξης που υπεισέρχονται στον έλεγχο ΑΕΕ	43
Αντιθρομβίνη ΙΙΙ ή αντιθρομβίνη (ΑΤ)	43
Πρωτεΐνη C (PrC)	50
Πρωτεΐνη S (PrS)	58
Κληρονομούμενη αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APCResistance), / Παράγοντας V Leiden (FVL)	65
Ομοκυστεΐνη και μετάλλαξη στην methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T	71
Παράγοντας ΙΙ και μετάλλαξη G20210A (FIIIG20210A)	78
Μετάλλαξη στην Α υπομονάδα του παράγοντα ΧΙΙΙ (FXIII-AVal34Leu)	79
Αναστολέας του ενεργοποιητού του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) – Πολυμορφισμός -6774G/5G, σημειακή μετάλλαξη -844AG στην περιοχή του προωθητή του γονιδίου	73
ΔΟΜΗ DNA ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ	87

ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	90
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	91
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	92
Υλικά μελέτης και μέθοδοι	92
Κριτήρια αποκλεισμού	92
Στοιχεία Ιστορικού	92
Μάρτυρες	96
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	98
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	98
Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος	98
Απομόνωση γενωμικού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο μαγνητικών σωματιδίων Biorobot EZ1.	99
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	104
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	109
ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: FV, FII ΚΑΙ ΜΤΗFR ΜΕ MULTIPLEX PCR	113
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΜΕΣΩ ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (ASO) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	113
ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (Hybridisation)	117
ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΡΑΙ-1 ΜΕ MULTIPLEX PCR ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (ASO)	121

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: FV, FII ΚΑΙ MTHFR ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS MULTIPLEX PCR)	124
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ Val34Leu ΤΗΣ Α-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XIII (F13A), ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR- RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS (PCR- RFLP)	131
ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PrS ΜΕ STACLOT PROTEIN S	136
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PrC- Με Berichrom Protein C – Siemens	137
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ AT-Με Berichrom Antithrombin (ATIII) – Siemens	137
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ (PT)-Με Thromborel S (Siemens)	138
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΜΕΡΙΚΩΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΛΑΣΤΙΝΗΣ(ΑΡΤΤ)-Με Pathromtin SL (Siemens)	139
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ APC Resistance-Με τη μέθοδο Siemens ProC [®] Global	140
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	141
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	159
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	175
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	177
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ	181
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	185

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η θρομβοφιλία αναφέρεται στην αυξημένη τάση σχηματισμού/υποτροπιάζουσα εμφάνιση ενδαγγειακών θρόμβων, είτε αρτηριακών είτε φλεβικών, κληρονομικής αιτιολογίας.

Ασθενείς με κληρονομική θρομβοφιλία, είναι γνωστό ότι βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης, αλλά η σχέση της θρομβοφιλίας με το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Τα αίτια των ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων παραμένουν άγνωστα σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, παρά τον ενδελεχή εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο. Η αναγνώριση ότι οι υπερπηκτικές καταστάσεις μπορεί κάποιες φορές να θεωρηθούν υπεύθυνες για την εμφάνιση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, έχει οδηγήσει στην διερεύνηση αυτών των σπάνιων καταστάσεων.

Τα δεδομένα που υποστηρίζουν πως η θρομβοφιλία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι περιορισμένα, κυρίως δε ανευρίσκονται σε μεμονωμένα περιστατικά, με ανομοιογενή αποτελέσματα από διάφορες μετααναλύσεις. Παρά το γεγονός πως αρκετοί υποστηρίζουν πως έλεγχος θρομβοφιλίας δε θα πρέπει να διενεργείται ως έλεγχος ρουτίνας, πολλοί άλλοι θεωρούν αναγκαίο τον έλεγχο αυτό, ειδικά σε νέους ασθενείς με ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια.

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με το έλεγχο θρομβοφιλίας σε νέους ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, που νοσηλεύονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε μετά από την ανάθεση του θέματος από τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπίοπουλο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και για την εποπτεία και την αμέριστη βοήθεια και αληθινή στήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης αυτής της διατριβής, αλλά και για την πραγματική στήριξη και αγάπη που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια στο δύσκολο χώρο της Ιατρικής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους επιβλέποντες αυτής της διατριβής, καθηγήτρια κ. Άννα Μπατιστάτου και καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου, ο οποίοι με το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον, την επιστημονική καθοδήγηση και τη

συνεχή υποστήριξή τους συνέβαλλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Η συλλογή του πειραματικού υλικού, η καταγραφή των κλινικών δεδομένων και η εργαστηριακή διερεύνηση των ασθενών για την υλοποίηση της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Ευαγγελισμός των Αθηνών, ενώ η συλλογή των μαρτύρων, η καταγραφή των κλινικών δεδομένων και η εργαστηριακή διερεύνηση των μαρτύρων πραγματοποιήθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Πατησίων Αθηνών.

Ιδιαίτερα επιθυμώ να ευχαριστήσω για την παρότρυνση, το συμβουλευτικό ρόλο και την ουσιαστική βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά την περάτωση αυτής της ερευνητικής εργασίας, τον διευθυντή της Νευρολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός κ. Αντώνη Ταβερναράκη όπως επίσης και τον ιατρό νευρολόγο κ. Παναγιώτη Ζη, την πρώην διευθύντρια κ. Βάνα Χριστοπούλου-Κοκκίνου καθώς και το νυν διευθυντή κ. Θεόδωρο Θεοδωρίδη και την επιμελήτρια Αφροδίτη Καρύδα του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός και τον πρώην διευθυντή του μικροβιολογικού εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Πατησίων κ. Άρη Μπασαγιάννη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον επιμελητή Α΄ Αιματολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός κ. Μαχμούτ Ελ Άλυ, για την ουσιαστική βοήθεια, αλλά και την ενθάρρυνσή του, καθώς και τις πολύτιμες παρατηρήσεις του κατά τη διεκπεραίωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την πρώην διευθύντρια κ. Ιωάννα Παπαγεωργίου, τον επιμελητή Α΄ κ. Ευάγγελο Πόπη καθώς και τη νοσηλεύτρια κ. Λουΐζα Βανδόρου της μονάδας αιμοδοσίας του Γενικού Νοσοκομείου Πατησίων για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των μαρτύρων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στην επίκουρη καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Άντεια Παρασκευά, όχι μόνο για τη μεγάλη και ουσιαστική βοήθεια που μου πρόσφερε κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής, αλλά και για τη συνεχή ενθάρρυνση και προτροπή της στη διεκπεραίωση αυτής της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον τεχνολόγο ιατρικών εργαστηρίων του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών, κ. Παναγιώτη Κυριαζόπουλο για την ουσιαστική βοήθεια που μου πρόσφερε, τόσο σε επίπεδο τεχνικής υποστήριξης, αλλά και για την αμέριστη στήριξη και συμπαράστασή του καθ'ολη τη διάρκεια

περάτωσης της παρούσας εργασίας. Του χρωστάω ένα ειλικρινές και μεγάλο ευχαριστώ.

Τέλος, θα ήταν πραγματική παράλειψη να μην ευχαριστήσω και όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου και πρωτίστως την οικογένειά μου, τους γονείς μου Γιάννη και Φρόσω και τον αδερφό μου Βαγγέλη, αντέχοντας την ένταση και το άγχος μου, σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια των παραπάνω, η εκπόνηση της παρούσας διατριβής δε θα ήταν εφικτή.

«Να αγαπάς την ευθύνη, να λές εγώ, εγώ μονάχος μου θα σώσω τον κόσμο.
Αν χαθεί, εγώ θα φταίω.»

N. Καζαντζάκης

Συντομογραφίες

- A2-AP: A2-antiplasmin, A2-αντιπλασμίνη
- AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome, Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας
- AHA: American Heart Association
- ALP: Alkaline phosphatase
- ANCA: Antineutrophil Cytoplasmic Antibody
- ANA: Antinuclear antibody
- APC: activated protein C
- APCResistance/ APCR: activated protein C resistance, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
- APTT/aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time, χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
- ARMS: Amplification Refractory Mutation System
- ASO: Allele Specific Oligonucleotide hybridization
- AT: Antithrombin, Αντιθρομβίνη
- CBS: Cystathione B Synthetase
- CRP: C-reactin protein, C αντιδρώσα πρωτεΐνη
- CT: Computed Tomography, αξονική τομογραφία
- CVT: Cerebral Vein Thrombosis, θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών
- DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- DMSO: Dimethyl sulfoxide
- DNA: Deoxyribonucleic Acid
- DRVVT: Diluted Russel Viper Venom Time
- DVT : Deep Vein Thrombosis, εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
- EGF: Epidermic Growth Factor
- ELISA: Enzyme Immunosorbent Assay
- FSF: Fibrin Stabilising Factor
- FVNR: FactorV Normalised ratio
- gGT: gamma-glutamyl transferase, γ-γλουταμινική τρανσφεράση
- HCV: Hepatitis C Virus, ιός ηπατίτιδας C
- HCoFII: Heparin co Factor II, συμπαράγοντας II ηπαρίνης

HDL: High Density Lipoprotein

HIT: Heparin Induced Thrombocytopenia, θρομβοπενία προκαλούμενη από ηπαρίνη

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HMWK: High molecular weight Kininogen, υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HRG: Histidine-rich Glycoprotein, γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη

HRT: Hormone Replacement Therapy, Ορμονική Θεραπεία Υποκατάστασης

ICH: Intracerebral hemorrhage, ενδοκράνια αιμορραγία

INR: International Normalised Ratio, Διεθνής Δείκτης Ομαλοποίησης

IS: Ischemic Stroke, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο

LDL: Low Density Lipoprotein

LMWH: Low molecular weight heparin, χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη

MRA: Magnetic Resonance Angiography, Μαγνητική Αγγειογραφία

MRI: Magnetic Resonance Imaging Μαγνητική Τομογραφία

mRNA: messenger Ribonucleic Acid (RNA), αγγελιοφόρο RNA

MTHFR: MethyleneTetrahydroFolate Reductase

NBT/BCIP: Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

OR: Odds Ratio

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1

PCAT: Protein C Activity dependent clotting time

PCR: Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PE: Pulmonary Embolism, Πνευμονική Εμβολή

PEG: Polyethylen Glycol

PNH: Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria, Παροξυσμική Νυχτερινή Αιμοσφαιρινουρία

Pro-UK: pro-Urokinase, προ-ουροκινάση

PT: Prothrombin Time, χρόνος προθρομβίνης

RFLP: RestrictionFragment Length Polymorphism

RNA: Ribonucleic Acid

r-RNA: ribosomal Ribonucleic Acid (RNA), ριβοσωμικό RNA

SACE: Serum Angiotensin-Converting Enzyme

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SGOT: Serum glutamic oxaloacetic transaminase

SGPT: Serum glutamic pyruvic transaminase
SHBG: Sex Hormone Binding Globulin
STR: Short Tandem Repeat
SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism
TAFI: thrombin activated fibrinolysis inhibitor
TEE: Trans-esophageal Echochardiography, διοισοφάγειο ηχοκαρδιογράφημα
TM: Thrombomodulin, θρομβομοδουλίνη
t-PA: tissue Plasminogen Activator, ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
t-RNA: Transfer Ribonucleic Acid (RNA), μεταφορικό RNA
TT: Thrombin Time, χρόνος Θρομβίνης
TTE: Trans Thoracic Echocardiography, διαθωρακικό ηχοκαρδιογράφημα
TTP: Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, Θρομβωτική Θρομβοκυττοπενική Πορφύρα
UV: Ultraviolet
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory
VTE: Venous Thromboembolism, φλεβική θρόμβωση

ΑΥ: Αρτηριακή Υπέρταση
ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή πίεση
ΔΕΠ: Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη
ΕΝΥ: Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ΗΕΓ: Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
ΙΑΕΕ: ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
ΜΕΑ: Μέση εγκεφαλική Αρτηρία
ΟΕΜ: Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου
ΟΝΠ: οσφυνωτιαία παρακέντηση
ΠΙΕ: Παροδικό Ισχαιμικό Επεισόδιο
ΠΟΦ: Πρωτεΐνη Οξείας Φάσης
ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή πίεση
ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης
ΣΕΛ: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
ΤΚΕ: Ταχύτητα καθίζησης Ερυθρών
φτ: φυσιολογικές τιμές

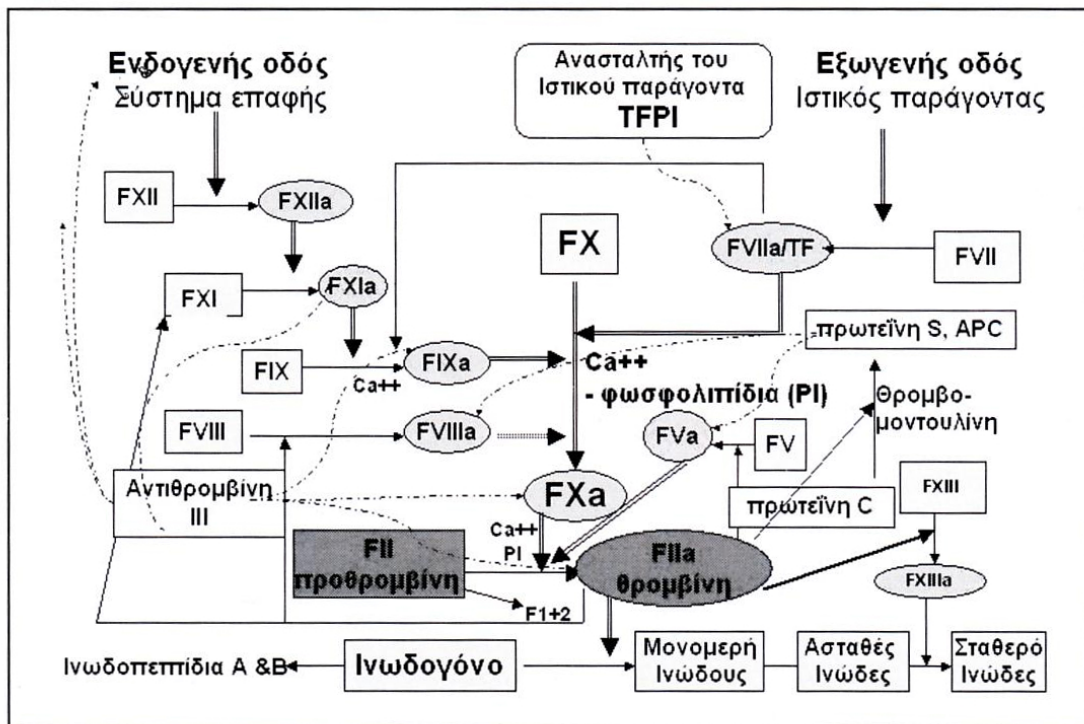
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΙΜΟΣΤΑΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η αιμόσταση είναι ο φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας του οργανισμού, που εμποδίζει την απώλεια αίματος από μικρές ή μεγάλες βλάβες των αιμοφόρων αγγείων και εξασφαλίζει την ομαλή κυκλοφορία του αίματος σ' αυτά. Η ανεπάρκεια αυτού του αιμοστατικού μηχανισμού εκφράζεται κλινικά με τα αιμορραγικά σύνδρομα, ενώ αντίθετα, η εκτροπή του προς την ενδαγγειακή πυροδότηση, οδηγεί κλινικά σε θρόμβωση τοπικά ή και σε γενικευμένο φαινόμενο, που ονομάζεται διάχυτη ενδαγγειακή πήξη.

Η έναρξη της αιμόστασης περιλαμβάνει τη σύσπαση του αγγείου αμέσως μετά τον τραυματισμό του. Ακολουθεί η δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου και στη συνέχεια η ενεργοποίηση του εξωγενούς και ενδογενούς συστήματος της πήξης.

Στην εικόνα 1 απεικονίζεται ο καταρράκτης της πήξης.



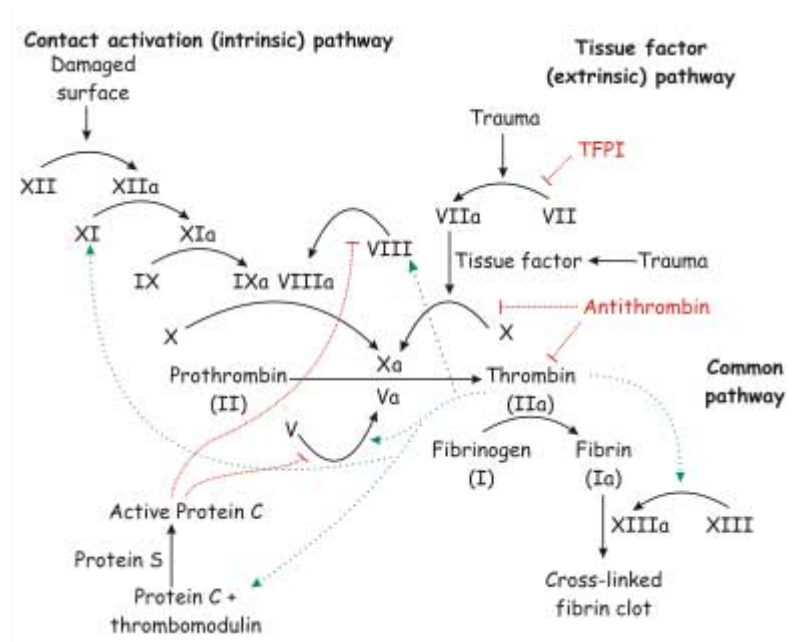
Εικόνα 1: Ο καταρράκτης της πήξης.

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης οδηγεί στη διαδοχική ενεργοποίηση των παραγόντων της πήξης με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό

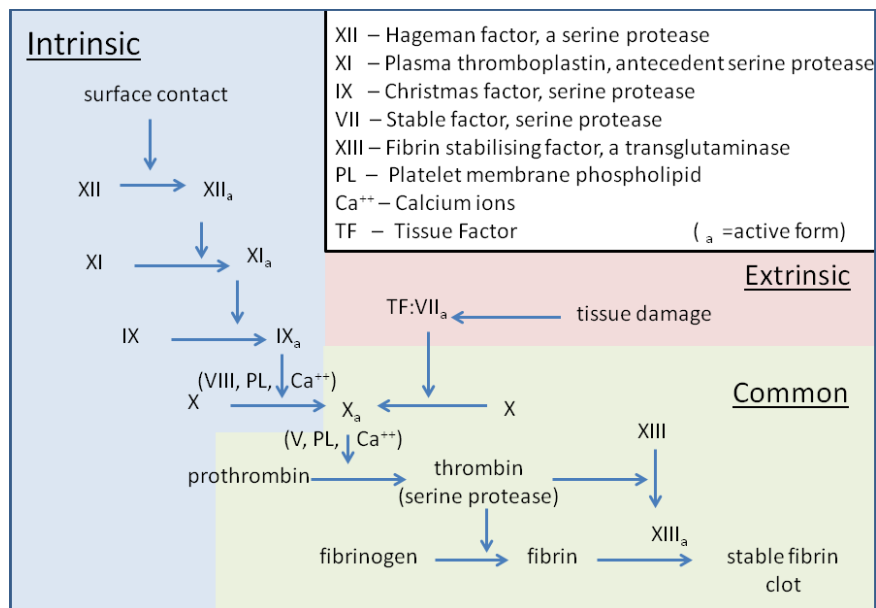
ινώδους, το οποίο, μαζί με τον αιμοπεταλιακό θρόμβο, αποφράσσουν το ραγέν αγγείο και οδηγούν τελικά σε μόνιμη επίσχεση της αιμορραγίας.

Ο μηχανισμός της πήξης ελέγχεται από τρία βασικά στοιχεία:

- Την ικανότητα κάθαρσης των ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης και κυρίως της θρομβίνης από τα κύτταρα Kupffer του ήπατος
- Την παρουσία των φυσικών ανασταλτών, όπως η πρωτεΐνη C, S, αντιθρομβίνη (AT) που εμποδίζουν τη γενίκευσή της
- Τον αυτοκαταλυτικό ρόλο της θρομβίνης, του κύριου δηλαδή πρωτεολυτικού ενζύμου της πήξης, που περιορίζει την υπέρμετρη παραγωγή της.



Εικόνα 2: Μηχανισμός πήξης και φυσικοί ανασταλτές

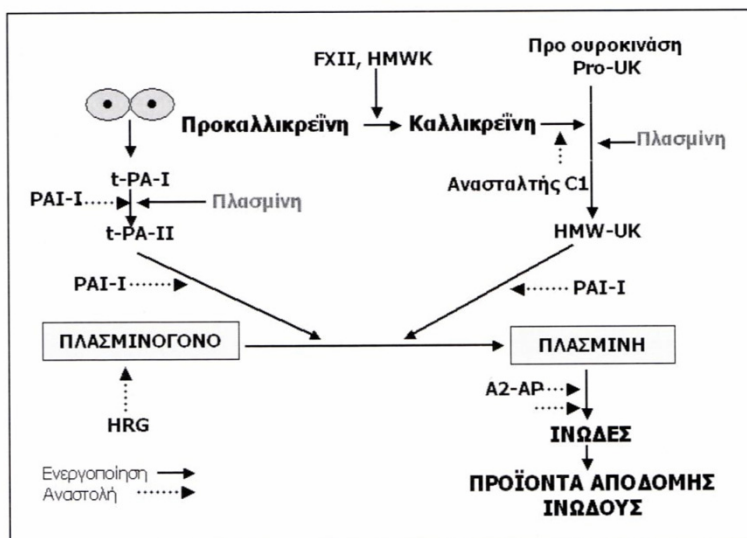


Εικόνα 3: Οι τρεις οδοί που αποτελούν τον κλασικό μηχανισμό της πήξης.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΙΝΩΔΟΛΥΣΗΣ

Ταυτόχρονα με το μηχανισμό της πήξης, ενεργοποιείται και ο μηχανισμός της ινωδόλυσης. Η ινωδόλυση αποτελεί το τελευταίο βήμα της αιμόστασης και, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οδηγεί στην αποκατάσταση των βλαβών, λύοντας το θρόμβο και ομαλοποιώντας το ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων, με την παραγωγή του κύριου ενζύμου της, της πλασμίνης.

Στην εικόνα 4 απεικονίζεται ο μηχανισμός της ινωδόλυσης.



Εικόνα 4: Μηχανισμός ινωδόλυσης

HMWK: χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνο

Pro-UK: προ-ουροκινάση

t-PA-I: ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου

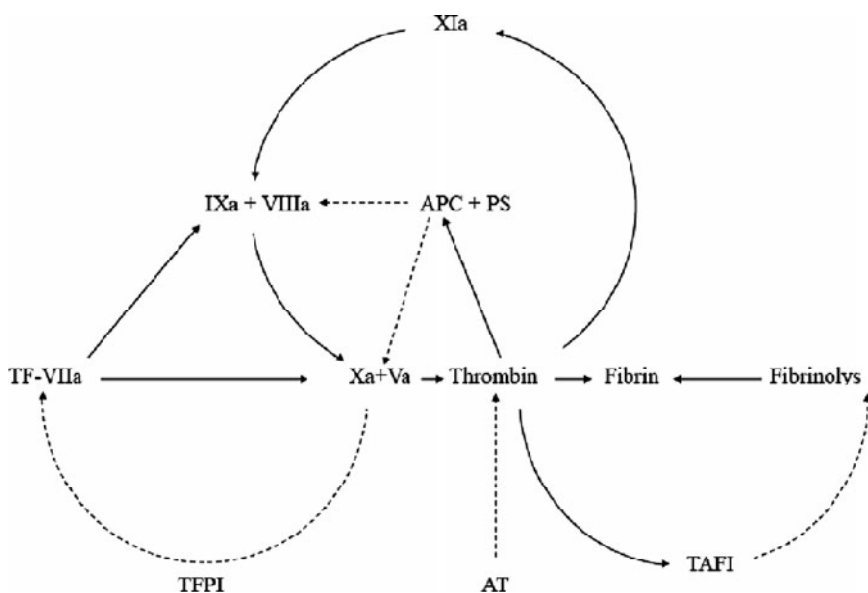
PAI: ανασταλτής του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου

A2-AP: A2 αντιπλασμίνη

HRG: γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη

Όπως και στην περίπτωση του μηχανισμού της πήξης, η ινωδόλυση ελέγχεται από τους φυσικούς ανασταλτές της, την A2 αντιπλασμίνη και τον ανασταλτή του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει δυναμική ισορροπία μεταξύ των παραπάνω μηχανισμών, πήξης και ινωδόλυσης. Ανεπάρκεια του μηχανισμού της πήξης ή υπέρμετρη δράση του μηχανισμού της ινωδόλυσης οδηγεί σε αιμορραγική διάθεση. Αντίστροφα, υπερβολική ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης ή ανεπάρκεια των φυσικών ανασταλτών της ή του ινωδολυτικού μηχανισμού, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε θρομβωτικές εκδηλώσεις.



Εικόνα 5: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση μηχανισμού πήξης και ινωδόλυσης.

ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ

Ο όρος **Θρόμβωση** είναι κλινικός όρος και αφορά στο κλινικό εύρημα, δηλαδή το θρομβοεμβολικό επεισόδιο.

Ο όρος **Θρομβοφιλία** αναφέρεται στην αυξημένη τάση σχηματισμού/υποτροπιάζουσα εμφάνιση ενδαγγειακών θρόμβων, είτε αρτηριακών είτε φλεβικών, κληρονομικής αιτιολογίας.

Έχουν περάσει πάνω από 70 χρόνια από τότε που οι Nygaard και Brown χρησιμοποίησαν τον παραπάνω όρο για να περιγράψουν ασθενείς με μια ανεξήγητη τάση για, κυρίως αρτηριακά, θρομβωτικά επεισόδια. [1]

Στη συνέχεια ο Egerberg χρησιμοποίησε τον όρο το 1965 για να περιγράψει μια νορβηγική οικογένεια που εμφάνιζε μια αξιοσημείωτη ροπή προς φλεβοθρόμβωση, ο οποία όπως αποδείχτηκε οφειλόταν σε μια κληρονομούμενη ανεπάρκεια αντιθρομβίνης. [2]

Στη δεκαετία του 1980, κληρονομικές ανεπάρκειες των PrC και PrS έχουν περιγραφεί. [3] [4] Από τότε και μετά διάφορες διαταραχές σε εργαστηριακές εξετάσεις, προερχόμενες τόσο από κληρονομικά, όσο και από επίκτητα αίτια, έχουν συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης θρόμβωσης.

Σύμφωνα με τους Walker et al με τον όρο θρομβοφιλία αναφερόμαστε στις διαταραχές εκείνες του αιμοστατικού μηχανισμού που είναι πιθανόν να προδιαθέτουν σε θρόμβωση. [5] Ο όρος χρησιμοποιείται σε αντιδιαστολή με τον όρο αιμορροφιλία, ο οποίος ουσιαστικά σημαίνει τάση προς αιμορραγία.

Με βάση τους χαρακτήρες και την ύπαρξη βεβαρημένου ή όχι οικογενειακού ιστορικού, η θρόμβωση διακρίνεται σε **οικογενή ή κληρονομούμενη (θρομβοφιλία) και επίκτητη**. Η διάγνωση της θρομβοφιλίας προϋποθέτει τον αποκλεισμό επίκτητων αιτίων θρόμβωσης.

Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, ο Virchow αναγνώρισε την υπερπηκτικότητα ως μέρος της τριάδας, γνωστής ως τριάδας του Virchow, ως αίτιο που μπορεί να οδηγήσει σε φλεβική θρόμβωση. Έτσι, μελετώντας το μηχανισμό της φλεβικής θρόμβωσης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οφείλεται σε παρατεταμένη στάση του αίματος, αγγειακό τραυματισμό ή και αλλαγές στη σύσταση του αίματος. [6]

Παρ' ολ' αυτά, για τουλάχιστον άλλον έναν αιώνα οι συγκεκριμένες αιτίες υπερπηκτικότητας παρέμεναν ένα μυστήριο. Στη διάρκεια των εκατό αυτών χρόνων,

ο ρόλος της στάσης και του αγγειακού τραυματισμού μελετήθηκαν ευρέως με αποτέλεσμα ν' αναπτυχθούν προληπτικά και θεραπευτικά μέτρα αντιμετώπισης των θρομβοεμβολικών διαταραχών. Οι διερεύνηση των αλλαγών στη σύσταση του αίματος που οδηγούν σε διαταραχές πήκτικότητας αποτελεί χρονικά το πιο σύγχρονο πεδίο μελέτης. Άρχισε με την κατανόηση του καταρράκτη της πήξης και συνεχίστηκε με τη μελέτη διαφόρων παραγόντων θρομβοφιλίας.

Το πρώτο συγκεκριμένο αίτιο θρομβοφιλίας, της τάσης δηλαδή για θρόμβωση λόγω ανωμαλιών στην πήξη, περιγράφηκε το 1965 από τον Egeberg, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Σύμφωνα με τον παραπάνω ερευνητή, η θρομβοφιλία θα μπορούσε να προκληθεί από ανεπάρκεια αντιθρομβίνης (AT), μιας φυσιολογικής κυκλοφορούσης πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί το σημαντικότερο φυσικό αναστολέα της πήξης και αναστέλλει τον καταρράκτη της πήξης μέσω αδρανοποίησης προπηκτικών παραγόντων, όπως της πρωτεΐνης C (PrC) και της πρωτεΐνης S (PrS). [2] Η ανεπάρκεια της AT κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και ανευρίσκεται σε < 1% του πληθυσμού. [7]

Με την εφαρμογή των σύγχρονων γνώσεων και τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας, οι γνώσεις μας αυξήθηκαν σημαντικά τα τελευταία χρόνια, με την πρόσθετη ανακάλυψη νέων γονιδιακών μεταλλάξεων που ενοχοποιούνται για την πρόκληση θρομβώσεων.

Από τότε λοιπόν μέχρι σήμερα, συνεχώς προστίθενται νέοι παράγοντες που ενοχοποιούνται για θρομβοφιλική διάθεση. Στον παρακάτω πίνακα 1 φαίνονται οι σημαντικότεροι από αυτούς.

Πίνακας 1: Αίτια θρομβοφιλίας

<i>Επίκτητη ή δευτεροπαθής θρομβοφιλία</i>	<i>Πρωτοπαθής Θρομβοφιλία</i>
Ενεργός καρκίνος	Ανεπάρκεια AT
Χημειοθεραπεία (l-asparaginase, thalidomide)	Ανεπάρκεια Pr C
Μυελούπερπλαστικά σύνδρομα	Ανεπάρκεια Pr S
HIT	APC resistance απουσία FVL
Θρομβ. Θρομβοκυτ. Πορφύρα (TTP)	FVLeiden
Δρεπανοκυτταρική αναιμία	Prothrombin G20210A mutation
Αντισυλληπτική αγωγή	Ομοκυστινουρία
Οιστρογονοθεραπεία	

Εγκυμοσύνη / Λοχεία	Αυξημένοι παρ. I, II, VIII, IX, XI
Φάρμακα (tamoxifen, raloxifene)	Πολυμορφισμοί XIII 34Val
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	Υπερομοκυστεϊναιμία
Παροξ. Νυχτ. Αιμοσφαιρινουρία (PNH)	Δυσινωδογοναιμία
Κοκκιωμάτωση Wegener	Μειωμένος TFPI
Φλεγμονώδης Νόσος εντέρου	Μειωμένη Πρωτεΐνη Z
Νόσος Buerger	Ανεπάρκεια Tissue Plasminogen Activator
Σύνδρομο Behcet	Αύξηση PAI-1
Κιρσοί	Αύξηση TAFI
ΣΕΛ	Υπό/Δυσ-πλασμινογοναιμία
Θεραπεία με Προγεστερόνη	Υποϊνωδόλυση
Θεραπείες υπογονιμότητας	Ομάδα αίματος non -O
Υπερομοκυστεϊναιμία	Αύξηση PAI-3
HIV λοίμωξη	
Αφυδάτωση	

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, στον κατάλογο των κληρονομικών μορφών θρομβοφιλίας περιλαμβάνονται διαταραχές διάφορες, κάποιες από αυτές πιο συχνές και κάποιες σπάνιες που, είτε αυξάνουν την πηκτικότητα του αίματος, είτε παρεμβαίνουν στην ινωδόλυση. Παρ' όλη την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στην ανεύρεση παραγόντων που προδιαθέτουν σε θρόμβωση, υπάρχουν αρκετές οικογένειες με θρομβοφιλία, στις οποίες δεν έχει ανιχνευτεί κανείς από τους μέχρι τώρα γνωστούς θρομβοφιλικούς παράγοντες.

Η θρομβοφιλία δεν είναι μια νόσος καθεαυτή αλλά μπορεί να σχετίζεται με νόσο, όπως για παράδειγμα καρκίνο, με λήψη φαρμάκων, όπως αντισυλληπτικά, ή με κατάσταση, όπως κύηση ή λοχεία, όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα.

Τα περισσότερα άτομα με θρομβοφιλία δεν αναπτύσσουν νόσο. Μια γενική εικόνα της πιθανότητας κλινικής εμφάνισης θρομβοεμβολικής νόσου, ανάλογα με την κληρονομική ή μη διαταραχή που υπάρχει, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 2.

Πίνακας 2: Πιθανότητα θρομβοεμβολικής νόσου. [8]

Πιθανότητα	Κληρονομική Διαταραχή	Επίκτητη Διαταραχή
ΧΑΜΗΛΗ	Ετεροζυγωτία FVLeiden	Γενικό Χειρουργείο
	Μετάλλαξη Prothrombin 20210	Αντισυλληπτικά από του στόματος/εγκυμοσύνη
	Δρεπανοκυτταρική Αναιμία	Υπερατλαντικό ταξίδι
		Αυξημένος παράγοντας VIII
ΜΕΤΡΙΑ	Ετεροζυγωτία PrC	Χειρουργείο για κακοήθεια
	Ετεροζυγωτία PrS	Σήψη
	Ετεροζυγωτία AT	Παρατεταμένη ακινησία
		Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
		Μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα
		Παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία
ΥΨΗΛΗ	Ομοζυγωτία FVLeiden	Χειρουργείο Ολικής αντικατάστασης ισχίου ή γόνατος
	Ομοζυγωτία Prothrombin 20210	Κάταγμα ισχίου
		Οξεία Προμυελοκυτταρική λευχαιμία
ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΗ	Ομοζυγωτία ή διπλή ετεροζυγωτία σε AT, PrC, PrS	Σύνδρομο Trousseau(mucin-secreting adenocarcinoma)

Κλινικά, η θρομβοφιλία θα μπορούσε να έχει μία ή περισσότερες θρομβωτικές εκδηλώσεις. Η δεσπόζουσα κλινική εκδήλωση θρομβοφιλίας είναι η

φλεβική θρόμβωση. Στον πίνακα 3 φαίνονται οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις θρομβοφιλίας.

Πίνακας 3: Κλινικές εκδηλώσεις θρομβοφιλίας [8]

Κλινικές εκδηλώσεις Θρομβοφιλίας
Επιπολής ή εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (Deep Vein Thrombosis, DVT)
Αιφνίδια πορφύρα (νεογνική ή ενηλίκων)
Πνευμονική εμβολή (Pulmonary Embolism, PE)
Θρόμβωση σε ασυνήθη σημεία (εγκεφαλικές, ηπατικές, μεσεντέριες, νεφρικές φλέβες, χέρι, πυλαία κυκλοφορία) Όχι αμφιβληστροειδική αρτηρία/φλέβα
Νέκρωση δέρματος σχετιζόμενη με κουμαρινικά
Πιθανά αρτηριακή θρόμβωση* (AEE, OEM)
Καθ' ἑξίν αποβολές
Πιθανά Επιπλοκές κύησης (προεκλαμψία, γέννηση νεκρού εμβρύου, αποκόλληση πλακούντα)

*οι περισσότερες κλινικές μελέτες απέτυχαν να δείξουν σαφή συσχέτιση

Στη συνέχεια με τον όρο θρομβοφιλία θα αναφερόμαστε μόνον στην κληρονομική.

ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΑΚΑ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 2, είναι πιθανόν η θρομβοφιλία να σχετίζεται με αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ). Τα ΑΕΕ είναι μεταξύ των κύριων αιτιών νοσηρότητας και θνητότητας τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις ανεπτυγμένες κοινωνίες. [9]

Στις χώρες της Δυτικής Ευρώπης **τα ΑΕΕ σε νέα άτομα** αποτελούν λιγότερο από το 5% του συνόλου των ΑΕΕ, [10] [11] όταν στις αναπτυσσόμενες χώρες το

ποσοστό των ΑΕΕ σε άτομα κάτω των 45 ετών φτάνει το 20-30%. [12] Στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ) το αναφερόμενο ποσοστό είναι περίπου 8-10%. [13]

Τα ΑΕΕ διακρίνονται σε ισχαιμικά και αιμορραγικά. Τα ισχαιμικά ΑΕΕ αποτελούν το 80%-90% του συνόλου των ΑΕΕ. [14]

Τα **αιμορραγικά ΑΕΕ** αποτελούν το 10-20% του συνόλου των ΑΕΕ και οφείλονται σε:

- Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία
- Υπαραχνοειδή αιμορραγία
- Υποσκληρίδιο αιμάτωμα.

Ο διαχωρισμός ενός ΑΕΕ σε ισχαιμικό ή αιμορραγικό είναι σημαντικός, καθώς η πρόιμη θρομβόλυση μειώνει κατά 30% τον κίνδυνο υπολειμματικής βλάβης στο ισχαιμικό ΑΕΕ, αλλά αντενδείκνυται στο αιμορραγικό. [15]

Τα **ισχαιμικά ΑΕΕ** αποτελούν μια σύνθετη πολυπαραγοντική διαταραχή που σχετίζεται με πληθώρα παραγόντων κινδύνου με κυριότερους και γνωστότερους από αυτούς, την αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ), το κάπνισμα, και το Σακχαρώδη Διαβήτη (ΣΔ). Στον Πίνακα 4 φαίνονται παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ.

Πίνακας 4: Παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ [16]

ΕΠΑΡΚΩΣ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΟΙ, ΜΕΤΑΤΡΕΨΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
Δυσλιπιδαιμία
Κάπνισμα
Παχυσαρκία
Καρδιαγγειακή νόσος
Ιστορικό ΠΙΕ
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1
Κολπική Μαρμαρυγή
Θεραπεία Ορμονικής Υποκατάστασης (HRT)
Αρτηριακή Υπέρταση

ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΟΙ, ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΩΣ ΜΕΤΑΤΡΕΨΙΜΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
Ιστορικό ημικρανίας
Κατανάλωση αλκοόλ
Ανοικτό ωοειδές τρήμα
Χρήση Αντισυλληπτικών δισκίων
Σύνδρομο Αποφρακτικής Άπνοιας στον Ύπνο
Μετάλλαξη FVLeiden
Αντιπηκτικό λύκου
Αντικαρδιολιπινικά Αντισώματα
Ενεργός καρκίνος
Χρήση απαγορευμένων ουσιών
Κύηση και περίοδος μετά την κύηση (λοχεία)

Οι παραπάνω παράγοντες κινδύνου εμπλέκονται τόσο σε ΑΕΕ σε άτομα ηλικιωμένα, όσο και σε ΑΕΕ σε νέους ενήλικες.

Έτσι, η **αρτηριακή υπέρταση** θεωρείται από τους πιο, αν όχι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Συμβάλει ακόμη, στην εμφάνιση «σιωπηρών» ΑΕΕ που οδηγούν σε γνωσιακές διαταραχές. [17] Ο κίνδυνος υπέρτασης είναι αθροιστικός, επομένως έναρξη αντιϋπερτασικής αγωγής έγκαιρα, προβλέπεται να έχει μεγάλη επίδραση στην πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ. Κάποιες μελέτες μάλιστα συστήνουν αγωγή σε άτομα με αρτηριακή πίεση πάνω από 115/75 mmHg. [18]

Το **κάπνισμα** επίσης αυξάνει τον κίνδυνο ισχαιμικού ΑΕΕ και ο κίνδυνος αυτός, είναι και εδώ, αθροιστικός. Παρόλο που το κάπνισμα συνδέεται με πιθανότητα εμφάνισης αιμορραγικού ΑΕΕ περισσότερο, η πιθανότητα εμφάνισης ισχαιμικού ΑΕΕ σε καπνιστές είναι 50% μεγαλύτερη και έχει μελετηθεί από παλιά. [19] [20] [21]

Μελέτες δείχνουν πως η **LDL και η ολική χοληστερόλη** έχουν θετική συσχέτιση με εμφάνιση εξωκρανιακής καρωτιδικής νόσου και πως τα αυξημένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης ασκούν προστατευτικό ρόλο. [22]

Αιτιολογική ταξινόμηση ισχαιμικών ΑΕΕ

Η αιτιολογική ταξινόμηση των ισχαιμικών ΑΕΕ βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στους διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς που μπορεί να οδηγήσουν σε ΑΕΕ. Ποσοστό 20% περίπου των ΑΕΕ οφείλεται σε απόφραξη μεγάλης αρτηρίας. Αυτά τα ΑΕΕ ταξινομούνται ως «ΑΕΕ μεγάλων αγγείων». Το κύριο αίτιο αυτής της κατηγορίας είναι η αθηροσκλήρωση των μεγάλων κρανιακών και αυχενικών αγγείων, που οδηγεί σε εμβολή από αθηρωματική πλάκα, ή, λιγότερο συχνά σε υποάρδευση. [15]

Οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας θα έχουν κλινικά και απεικονιστικά ευρήματα είτε από σημαντική (>50%) στένωση ή απόφραξη ενός μείζονος αγγείου πιθανώς λόγω αθηρωμάτωσης. Τα κλινικά ευρήματα περιλαμβάνουν αυτά της βλάβης της φλοιώδους εγκεφαλικής λειτουργίας, όπως για παράδειγμα αφασία, περιορισμό κινητικής δραστηριότητας, ή δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας. Οι βλάβες στο φλοιό ή την παρεγκεφαλίδα ή την υποφλοιώδη περιοχή ή το στέλεχος με διάμετρο πάνω από 1.5 εκατοστά στην αξονική ή μαγνητική τομογραφία οφείλονται πιθανώς σε αθηροσκλήρωση μεγάλου αγγείου.

Μια δεύτερη κατηγορία ΑΕΕ περιλαμβάνει εκείνες τις περιπτώσεις που προέρχονται από βλάβη μικρών αγγείων και ονομάζονται «ΑΕΕ μικρών αγγείων». Σ' αυτή την κατηγορία, τα έμφρακτα αφορούν μικρές κοιλότητες ή κενोटόπια (lacunes-lacunar strokes), ο κύριος δε παθογενετικός μηχανισμός που προκαλεί τη νόσο σ' αυτά τα αγγεία είναι η λιποϋαλίνωση ή οι μικροαθηρωματικές βλάβες των μικρών διατριαινόντων αγγείων μέσα στα εγκεφαλικά ημισφαίρια .

Αποτελούν το 25% των ισχαιμικών ΑΕΕ και παρόλο που ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός είναι η απόφραξη στη συγκεκριμένη θέση, είναι δυνατόν σε κάποια από αυτά, η εμβολή να παίζει επίσης κάποιο ρόλο. [23]

Οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας πρέπει να μην έχουν στοιχεία από βλάβη φλοιώδους εγκεφαλικής λειτουργίας. Ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη ή αρτηριακής υπέρτασης συνηγορεί υπέρ αυτής της διάγνωσης. Ο ασθενής πρέπει επίσης να έχει φυσιολογική εικόνα σε αξονική και μαγνητική τομογραφία ή βλάβη που να μην υπερβαίνει τα 1.5 εκατοστά. Φυσικά, πιθανά αίτια εμβολογόνου καρδιοπάθειας δεν πρέπει να υφίστανται και η απεικόνιση των εξωκρανιακών αρτηριών δεν πρέπει να καταδεικνύει στένωση μεγαλύτερη από 50% σε μονόπλευρη αρτηρία.

Η τρίτη κατηγορία ισχαιμικών ΑΕΕ περιλαμβάνει εκείνα τα περιστατικά που οφείλονται σε εμβολή από την καρδιά ή την αορτή και ονομάζονται **«καρδιοεμβολικά ΑΕΕ» (cardioembolic strokes)**. [15] Διάφορες εμβολογόνες καταστάσεις ή ανατομικές διαφοροποιήσεις (όπως για παράδειγμα κολπική μαρμαρυγή, ανοιχτό ωοειδές τρήμα και άλλα) υπεισέρχονται στην παθογένεια αυτού του τύπου των ΑΕΕ. Οι καρδιακές πηγές εμβολής χωρίζονται σε υψηλού και μέτριου κινδύνου για εμβολή, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Πηγές εμβολογόνου καρδιοπάθειας, υψηλού και μέτριου κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ. [24]

ΥΨΗΛΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΡΙΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΗΓΕΣ ΕΜΒΟΛΟΓΟΝΟΥ ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΑΣ
ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
Μηχανική προσθετική βαλβίδα
Στένωση μιτροειδούς με κολπική μαρμαρυγή
Κολπική μαρμαρυγή
Sick sinus syndrome
Πρόσφατο ΟΕΜ (<4 εβδομάδες)
Διατατική μυοκαρδιοπάθεια
Μύζωμα κόλπου
Σηπτική ενδοκαρδίτις
ΜΕΤΡΙΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
Πρόπτωση Μιτροειδούς
Στένωση μιτροειδούς χωρίς κολπική μαρμαρυγή
Σηπτικό κολπικό ανεύρυσμα
Ανοιχτό ωοειδές τρήμα
Βιοπροσθετική καρδιακή βαλβίδα
Μη βακτηριακή ενδοκαρδίτις
Έμφραγμα μυοκαρδίου (>4 εβδομάδες, < 6 μήνες)

Παράλληλα, ένα 5% των ισχαιμικών ΑΕΕ μπορεί να αποδοθεί σε **ποικίλα αίτια** όπως για παράδειγμα, τις αγγειίτιδες. Σε μια μελέτη που περιλάμβανε 1008 νέα άτομα με ΑΕΕ το 2% φάνηκε να οφείλεται σε αγγειίτιδα. [16]

Συστηματική εμπλοκή μπορεί να είναι ή να μην είναι παρούσα, εξαρτώμενη απ' τη συγκεκριμένη αυτοάνοση διαδικασία. Ανοσολογικής αιτιολογίας αγγειίτιδες με προτίμηση στα ενδοκρανιακά αγγεία αποτελούν η σύφιλη και ο Έρπητας Ζωστήρας. Γι' αυτό το λόγο, στον εργαστηριακό έλεγχο των ΑΕΕ πρέπει να περιλαμβάνονται και εξετάσεις για τον αποκλεισμό των παραπάνω καταστάσεων, όπως θα δούμε παρακάτω. Άλλα σπάνια αίτια είναι η διατομή αγγείων, η Δρεπανοκυτταρική νόσος, οι αιματολογικές κακοήθειες, η πολυκυτταραιμία, η θρομβοκυττάρωση, η παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία, η θρομβωτική θρομβοκυττοπενική πορφύρα, η θρομβοπενία από λήψη ηπαρίνης (heparin-induced thrombocytopenia, HIT). Υποψία για τέτοιες καταστάσεις συνήθως τίθεται από διαταραχές σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας.

Ασυνήθη αίτια ισχαιμικού ΑΕΕ αποτελούν επίσης διάφορες κληρονομικές παθήσεις, όπως πρόσφατα δημοσιεύτηκε συσχέτιση της νόσου Fabry σε νεαρούς ενήλικες με ισχαιμικό ΑΕΕ [25] [26] ή διάφορες παθήσεις αγνώστου αιτιολογίας, όπως η νόσος Moya-Moya. [27] [28] Ωστόσο, αυτές οι καταστάσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες όπως ήδη ειπώθηκε.

Παρά την αναγνώριση πολλών και διαφορετικών παθογενετικών μηχανισμών ως αιτίων ισχαιμικού ΑΕΕ, σε ένα μεγάλο ποσοστό περιστατικών με ΑΕΕ δε μπορεί να αναγνωριστεί και να αποδειχθεί κανένας γνωστός αιτιολογικός παράγοντας. [29] Σε μια μεγάλη Ευρωπαϊκή μελέτη, σε ένα ποσοστό περί το 5% δεν βρέθηκε εμφανής αιτία του ΑΕΕ. [16]

Αυτά τα ΑΕΕ χαρακτηρίζονται **«κρυπτογενή» ΑΕΕ (cryptogenic strokes)** και υπογραμμίζουν τις αυξανόμενες προκλήσεις στη διαγνωστική προσπέλαση, παρά την ύπαρξη νέων και συνεχώς βελτιούμενων τεχνικών στην απεικόνιση αγγειακών, καρδιακών και εγκεφαλικών διαταραχών που, όπως προαναφέρθηκε, κυρίως υπεισέρχονται στην παθογένεια των ΑΕΕ. Σε κάποιες ταξινομήσεις, ασθενείς που παρουσιάζουν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς πρόκλησης ΑΕΕ περιλαμβάνονται σ'αυτούς με ΑΕΕ αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 6. [24]

Πίνακας 6: Ταξινόμηση TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) υπότυπων ισχαιμικού ΑΕΕ. [24]

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ TOAST ΤΩΝ ΥΠΟΤΥΠΩΝ ΟΞΕΟΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΟΥ ΑΕΕ
1. Αθηρωμάτωση μεγάλων αγγείων (εμβολή, θρόμβωση)
2. Εμβολογόνος καρδιοπάθεια
3. Απόφραξη μικρών αγγείων (lacune)
4. ΑΕΕ από άλλη προσδιορισμένη αιτιολογία
5. ΑΕΕ απροσδιορίστου αιτιολογίας <ul style="list-style-type: none"> - δύο ή περισσότερες αιτίες έχουν αναγνωριστεί - αρνητικός έλεγχος - ατελής έλεγχος

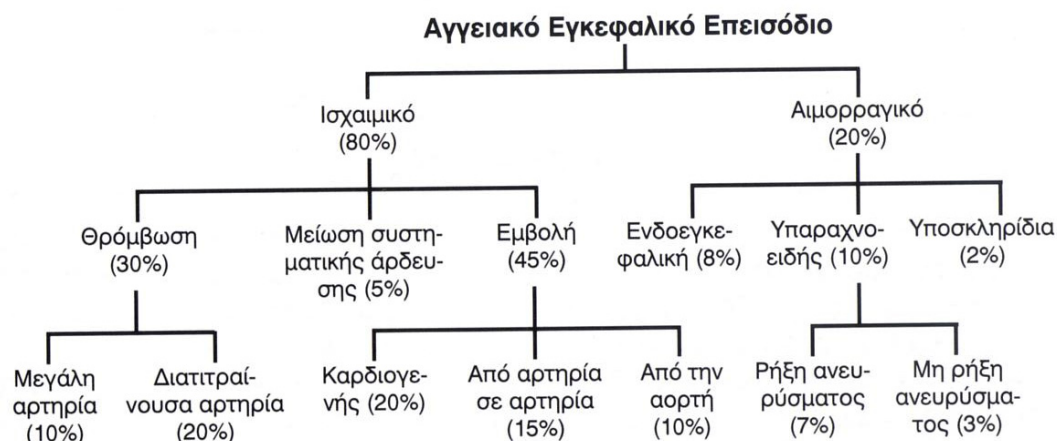
Κάποιες άλλες φορές πάλι, ερευνητές κατατάσσουν τα ΑΕΕ ως κρυπτογενή όταν δεν διεξήχθη όλος ο απαραίτητος έλεγχος. Παρ' ολ' αυτά, ακόμη και αν διεξαχθεί ο πιο ενδελεχής έλεγχος με τα μέχρι σήμερα δεδομένα και μέσα, σε ένα ποσοστό που εγγίζει το 30-35%, δε βρίσκεται σαφής αιτιολογία. [15] Αυτό το ποσοστό φαίνεται να είναι ακόμη μεγαλύτερο μεταξύ ασθενών ηλικίας κάτω των 45 ετών και αναφέρεται ακόμη και ως 43% σε μελέτες όπου εξαιρούνται περιστατικά που η παρουσία διαφόρων μηχανισμών κάνει την ακριβή αιτιολογία ασαφή. [30]

Η θρόμβωση των εγκεφαλικών φλεβών (CVT, cerebral vein thrombosis) είναι ασυνήθης αιτία ΑΕΕ με συχνότητα περίπου 5 ανά 1000000 και συνήθως προσβάλλει νεότερους ανθρώπους. Εκτιμάται ότι αποτελεί το 0.5% όλων των ΑΕΕ. [31] Κάποιοι άλλοι ερευνητές ανεβάζουν το ποσοστό σε 17% και υπολογίζουν πως αποτελεί το 50% των ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία. [32]

Σε περίπτωση θρόμβωσης φλεβών του εγκεφάλου, σημαντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες είναι: η συστηματική λοίμωξη ή η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, η περίοδος μετά την κύηση, η υπερομοκυστεϊναιμία, άλλες καταστάσεις θρομβοφιλίας κληρονομικής αιτιολογίας, η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων. [33]

Ειδικά για τη **θρομβοφιλία ως αίτιο θρόμβωσης εγκεφαλικών φλεβών** υπάρχουν μελέτες που τη θεωρούν ως σημαντικό αίτιο. Σε διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί ποσοστά 15-22% σε ασθενείς με CVT. [34] [35] Σε άλλες μελέτες πάλι, αυτά τα ποσοστά είναι κατά πολύ μικρότερα. [33] [36]

Στην εικόνα 6 φαίνεται η ταξινόμηση των ΑΕΕ.

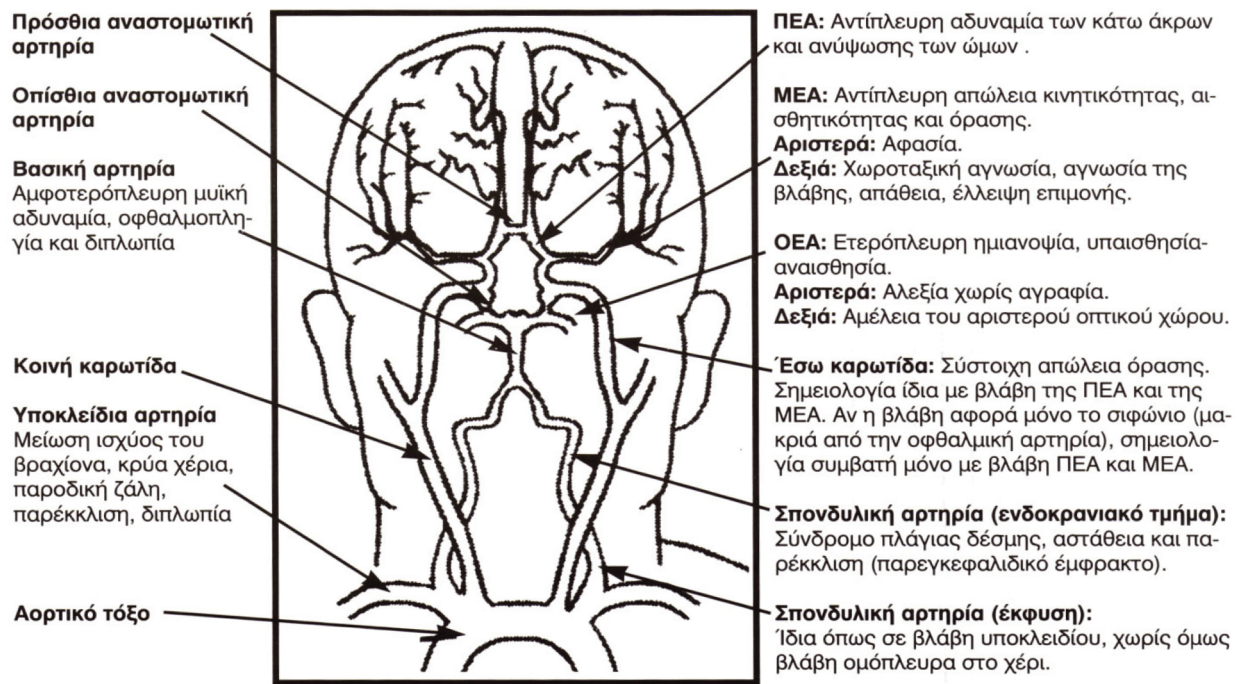


Εικόνα 6: Αιτιολογική ταξινόμηση ΑΕΕ. [37]

Όπως είναι σαφές από όλα τα παραπάνω, τα ισχαιμικά ΑΕΕ είναι μια πολύπλοκη πολυπαραγοντική διαταραχή, των οποίων η συχνότητα αυξάνει ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ καταστάσεων όπως η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα, τα οποία έχουν σαφώς συσχετιστεί με καταστάσεις όπως αθηρωμάτωση, αγγειακή νόσο, καρδιακή νόσο. Από την άλλη μεριά, φαντάζει δελεαστικό να μπορούσε η έρευνα να στραφεί σε αναζήτηση γονιδίων που να θεωρούνται υπεύθυνα για την εμφάνιση ΑΕΕ. Μέχρι στιγμής, τέτοιου είδους έρευνες έχουν αποφέρει αντιφατικά αποτελέσματα εκτός από το γονίδιο που κωδικοποιεί την φωσφοδιεστεράση D (phosphodiesterase D- PDE4D), όπου αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα ως πιθανό αίτιο εγκεφαλικής ισχαιμίας. [38]

Κλινικές εκδηλώσεις ΑΕΕ

Οι κλινικές εκδηλώσεις των συνηθέστερων τύπων ΑΕΕ περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, οι συνηθέστερες από τις οποίες απεικονίζονται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Κλινικές εκδηλώσεις των συνηθέστερων τύπων ΑΕΕ. [37]

Το **οξύ ΑΕΕ** εγκαθίσταται αιφνίδια ως εστιακό νευρολογικό έλλειμμα αγγειακής αιτιολογίας. Για τη διάγνωση απαιτείται αποκλεισμός αιμορραγίας ή μη αγγειακών νόσων, όπως επιληπτικοί σπασμοί, όγκος εγκεφάλου, εγκεφαλικό απόστημα, εγκεφαλίτιδα, επιπλεγμένη ημικρανία, διαταραχή επιπέδων γλυκόζης ορού. Σκοπός της αρχικής εκτίμησης είναι να αναγνωριστεί ο τύπος του ΑΕΕ (ισχαιμικό ή αιμορραγικό) και να καθοριστεί αν ο ασθενής χρήζει θρομβολυτικής ή άλλης θεραπείας.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΕΕ

Το **ιστορικό και η κλινική εξέταση** εκτιμούν επίσης την έκταση της νευρολογικής δυσλειτουργίας και βοηθούν στην αναγνώριση των προδιαθεσικών παραγόντων για θρόμβωση καθώς και τα συνοδά νοσήματα.

Ειδικά για το ιστορικό θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερος ο ρόλος του και κυρίως η λήψη του κληρονομικού αναμνηστικού. Όπως έχει ευρέως αναγνωριστεί, τόσο το ιστορικό ΑΕΕ από την πλευρά του πατέρα, όσο και από την πλευρά της

μητέρας έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. [39] Ένα οικογενειακό ιστορικό από ΑΕΕ που έλαβε χώρα σε ηλικία κάτω των 65 ετών, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ σύμφωνα με μελέτη των Hassan et al. [40]

Ο εργαστηριακός έλεγχος θα βοηθήσει στην αναγνώριση πιθανών αιτιών του ΑΕΕ, καθώς και επιπλοκών ή προδιαθεσικών παραγόντων για αθηροσκλήρωση. Οι απεικονιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και εντόπιση απόφραξης εξαιτίας θρομβοεμβολής.

Κάτι άλλο που θα πρέπει να σημειωθεί, είναι η παρουσία περισσότερων του ενός θρομβοφιλικών παραγόντων στο ίδιο άτομο. Παρά το γεγονός πως «διπλή» υπερπηκτική κατάσταση στον ίδιο ασθενή είναι πολύ σπάνια, [41] αποτελεί επιτακτική ανάγκη **ο έλεγχος του ασθενούς να ολοκληρώνεται**, ακόμη κι αν βρεθεί αίτιο ΑΕΕ. Μελέτες καταδεικνύουν το σκεπτικό της αλληλεπίδρασης γονιδίων ή γονιδίων και περιβάλλοντος σε μεικτές υπερπηκτικές καταστάσεις. [42]

Ένας άλλος παράγοντας πολύ σημαντικός που δε θα έπρεπε να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν είναι η **δευτερογενής πρόληψη ΑΕΕ ειδικά στους νέους ασθενείς**, λόγω του ενδεχόμενου αντίκτυπου ενός δεύτερου ΑΕΕ στην παραγωγικότητα του ατόμου, αλλά κυρίως στην ποιότητα ζωής. Έτσι, στους νέους ασθενείς, εκτός από τους συνηθείς παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ΑΕΕ, θα πρέπει να ελέγχονται και επιπρόσθετοι παράγοντες. [43]

Στην εικόνα 8 φαίνονται οι συνηθέστερες εντοπίσεις καθώς και οι πιθανοί μηχανισμοί των ΑΕΕ. [44]



Εικόνα 8: Συνηθέστερες εντοπίσεις και πιθανοί μηχανισμοί ΑΕΕ [44]

Κλινική και εργαστηριακή εκτίμηση ΑΕΕ

Στον πίνακα 7 αναφέρεται συνοπτικά η κλινική και εργαστηριακή εκτίμηση ασθενούς με ΑΕΕ

Πίνακας 7: Κλινική και εργαστηριακή εκτίμηση ασθενούς με ΑΕΕ

ΙΣΤΟΡΙΚΟ
<ul style="list-style-type: none">• Προηγούμενο ΑΕΕ ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο (ΠΙΕ), χρόνος από την έναρξη συμπτωμάτων, δραστηριότητα κατά την έξοδο του ΑΕΕ
<ul style="list-style-type: none">• Συνοδά συμπτώματα: κεφαλαλγία, έμετος, αυχεναλγία, πτώση επιπέδου συνείδησης
<ul style="list-style-type: none">• Παράγοντες κινδύνου-ιστορικό αγγειακής νόσου: αρτηριακή υπέρταση, έμφραγμα, στηθάγχη, κάπνισμα, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία κλπ
<ul style="list-style-type: none">• Λοιπά: ιστορικό επιληπτικών σπασμών, ημικρανία, όγκοι εγκεφάλου, ανεύρυσμα, τραύμα, χρήση παραισθησιογόνων ουσιών κλπ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ
<ul style="list-style-type: none">• Ζωτικά σημεία
<ul style="list-style-type: none">• Νευρολογική εκτίμηση
<ul style="list-style-type: none">• Οφθαλμολογική εκτίμηση (υπερτασικές αλλοιώσεις, οίδημα οπτικής θηλής)
<ul style="list-style-type: none">• Καρδιολογική εκτίμηση: φύσημα, πρόσθετοι τόνοι, πνευμονική υπέρταση
<ul style="list-style-type: none">• Εξέταση για εκχυμώσεις
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
<ul style="list-style-type: none">• Γενική αίματος
<ul style="list-style-type: none">• Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθρών (ΤΚΕ)- αύξηση σε καρκίνο, λοίμωξη κλπ
<ul style="list-style-type: none">• Γλυκόζη αίματος
<ul style="list-style-type: none">• Ηλεκτρολύτες
<ul style="list-style-type: none">• Λιπιδαιμικό προφίλ
<ul style="list-style-type: none">• Ινωδογόνο
<ul style="list-style-type: none">• Χρόνος προθρομβίνης (PT), χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), Διεθνής Δείκτης Ομαλοποίησης (INR), τόσο για ανίχνευση διαταραχών πήξης όσο και ως τιμές αναφοράς μετά προσθήκη αντιπηκτικών

• Αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης
• RPR για νευροσύφιλη, αντισώματα για Έρπητα Ζωστήρα
• Επί υποψίας έλεγχος ούρων για κοκαΐνη
• Σε επιλεγμένες περιπτώσεις αιματολογικές εξετάσεις για σπάνια γενετικά αίτια AEE (CADASIL, Fabry disease, MELAS)
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ / ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ
• Αξονική Τομογραφία (CT) ή Μαγνητική Τομογραφία (MRI)
• Υπέρηχοι (Doppler) αγγείων Τραχήλου
• Μαγνητική Αγγειογραφία (MRA) ή Αξονική Αγγειογραφία (CTA)
• Αγγειογραφία
• Υπέρηχοι καρδιάς (διαθωρακικό και διοισοφάγειο υπερηχογράφημα)
• Ηλεκτροκαρδιογράφημα
• Holter ρυθμού
• Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ)
• Οσφυονωτιαία Παρακέντηση (ΟΝΠ)

Σε πρόσφατη μελέτη [45] προτείνεται οι εξετάσεις για διάγνωση AEE να γίνονται με συγκεκριμένη σειρά, όπως φαίνεται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Διαγνωστική προσέγγιση AEE, εξετάσεις και σειρά με την οποία πρέπει να διενεργούνται. [45]

ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ (50-55%)
1. Ιατρικό Ιστορικό
2. Παράγοντες κινδύνου
3. Νευρολογική εκτίμηση
4. Εργαστηριακή εκτίμηση (συμπεριλαμβανομένης ΤΚΕ, CRP)
5. Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ECG)
6. Απεικονιστικός έλεγχος εξωκρανιακών αγγείων
7. Αξονική τομογραφία (CT scan)

ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ (10-15%)
1. Διαθωρακικό ηχοκαρδιογράφημα (TTE-transthoracic echocardiography)
2. Doppler ενδοκράνιων αγγείων
3. Compressive ultra-sonography
4. Διοισοφάγειο ηχοκαρδιογράφημα (TEE-trans esophageal echocardiography)
5. Χόλτερ ρυθμού
6. Μαγνητική αγγειογραφία αγγείων εγκεφάλου
ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΡΙΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ (3-4%)
1. Εξετάσεις πηκτικολογικές και εξετάσεις για αυτοάνοσα νοσήματα (αντιπυρηνικά αντισώματα, anti-dsDNA, anti-SM, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, αντιπηκτικό λύκου, ανεπάρκειες PrC, PrS, AT)
2. Αγγειογραφία
3. Οσφουονωτιαία παρακέντηση και ανάλυση ENY
4. Γενετικές μελέτες (μετάλλαξη FVLeiden, prothrombin G20210A, CADASIL, MELAS, Fabry disease...)
5. Βιοψία δέρματος και σκελετικού μυός

Τα ποσοστά αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα να βρεθεί η αιτιολογία του ΑΕΕ με κάθε βήμα της έρευνας.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΑΕΕ

Σήμερα, είναι σχεδόν αναμφισβήτητο γεγονός πως η θρομβοφιλία σχετίζεται με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση [8] όπως έχει ήδη ειπωθεί, αλλά τα περισσότερα άτομα με έναν μόνο γενετικό παράγοντα κινδύνου μπορεί να μην αντιμετωπίσουν στη ζωή τους κάποιο θρομβωτικό επεισόδιο εφόσον δεν υπάρχει και κάποιος περιστασιακός παράγοντας κινδύνου όπως η ακινησία ή η χρήση αντισυλληπτικών δισκίων. [46] Οι ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο (ΠΙΕ) σε νεαρή ηλικία, προερχόμενο από αρτηριακή ή καρδιακή νόσο, βρίσκεται πολλές φορές να πάσχουν από μια υποκείμενη θρομβοφιλική διαταραχή. [47] [48]

Ωστόσο, η δυσκολία στην κλινική πρακτική γενικά δεν βρίσκεται στη διάγνωση της υποκείμενης θρομβοφιλίας, αλλά, στην απόφαση να αποδοθεί η αιτία του ισχαιμικού ΑΕΕ ή ΠΠΕ σ' αυτή, ειδικά όταν και κάποιο άλλο πιθανό αίτιο είναι επίσης παρόν, όπως για παράδειγμα, κολπική μαρμαρυγή ή στένωση καρωτίδας. Ή επίσης, όταν η θρομβοφιλία έχει «επισκιάσει» την όποια εγκεφαλική ισχαιμία έχει προέλθει από συνυπάρχουσα παθολογία, παραδείγματος χάριν αθηρωμάτωση. Ή ακόμη, αν η θρομβοφιλία ουσιαστικά είναι άσχετη και εντελώς συμπτωματική σε σχέση με την αληθινή υποκείμενη αιτία.

Όπως ειπώθηκε παραπάνω, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως οι διαταραχές της πήκτικότητας αποτελούν την κύρια αιτία ισχαιμικού ΑΕΕ μόνον σε ένα πολύ μικρό ποσοστό της τάξης του 1-4% όλων των ισχαιμικών ΑΕΕ, [49] [50] [51] αλλά μπορεί να έχουν σχέση με την παθολογία των ΑΕΕ σε υποομάδες ασθενών, όπως για παράδειγμα στους **ασθενείς κάτω των 45 ετών με ΑΕΕ**. [52] [53] [54].

Στη μελέτη των Hankey et al. φαίνεται πως ο ένας στους επτά ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο ΑΕΕ θα βρεθεί να έχει θρομβοφιλική διαταραχή, αλλά και πάλι είναι μάλλον απίθανο να έχει σχέση με την παθολογία του ΑΕΕ, εκτός ίσως από ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών. Η ίδια μελέτη επίσης, δε φαίνεται να μπορεί να υποστηρίξει την υπόθεση πως αυτοί οι ασθενείς μπορεί να είναι σε αυξημένο κίνδυνο για έναν ή περισσότερους συγκεκριμένους παθογενετικούς τύπους ΑΕΕ. [55]

Έτσι, παρά το γεγονός πως στις υπερπηκτικές καταστάσεις αποδίδεται ένα μικρό ποσοστό των ισχαιμικών ΑΕΕ, κυρίως αυτών με μη σαφώς προσδιορισμένη αιτία, ο προσδιορισμός των κυριότερων τέτοιων καταστάσεων που μέχρι σήμερα φαίνεται να σχετίζονται με ΑΕΕ γίνεται σε επίπεδο ρουτίνας κυρίως σε ασθενείς νέους, κάτω των 45 με ΑΕΕ. [56]

Μολαταύτα, τα δεδομένα που υπάρχουν και που σχετίζουν το ΑΕΕ με θρομβοφιλικούς παράγοντες όπως ο factor V Leiden (FVL), η μετάλλαξη της προθρομβίνης G20210A (FIIIG20210A), οι ανεπάρκειες της πρωτεΐνης C (PrC), πρωτεΐνης S (PrS), αντιθρομβίνης (AT), είναι περιορισμένα και αντικρουόμενα, αλλά σε γενικές γραμμές δεν καταδεικνύουν σαφή συσχέτιση. [57] [58] Ακόμη και όταν συγκρίνονται νέοι ενήλικες με νόσο μεγάλου αγγείου ή ΑΕΕ προερχόμενο από εμβολή, με νέους ενήλικες με κρυπτογενές ΑΕΕ, ο συσχετισμός των γενετικών πολυμορφισμών με τα κρυπτογενή ΑΕΕ δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικός. [59]

Όσο για την περίπτωση της ομοκυστεΐνης, η συσχέτισή της με κίνδυνο για ΑΕΕ είναι εντονότερη, αλλά αποδεικτικά στοιχεία που να συσχετίζουν τη μείωση των επιπέδων της με πρόληψη του ΑΕΕ δεν υπάρχουν ακόμη ή είναι αντικρουόμενα. [60]
[61]

Θα έπρεπε εδώ να τονιστεί πως πολλές από αυτές τις έρευνες αντιμετωπίζουν μεθοδολογικά προβλήματα, κυρίως το γεγονός του συνυπολογισμού πιο ηλικιωμένων ασθενών με ΑΕΕ, οι οποίοι αντιμετωπίζουν τυπικούς αθηροσκληρωτικούς παράγοντες κινδύνου ή άλλους, μη ανήκοντες στους θρομβοφιλικούς μηχανισμούς ΑΕΕ. Από την άλλη μεριά, αυτές οι μελέτες που εστιάζουν σε νέους ασθενείς με ΑΕΕ αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, φαίνεται να συσχετίζουν το ΑΕΕ με υπερπηκτικές καταστάσεις, αλλά με γενικά μικρότερη ισχύ για σαφή συσχέτιση, λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος [62]

Ένα άλλο στοιχείο που θα πρέπει να τονιστεί στις μελέτες αυτές που επιχειρούν να συσχετίσουν τη θρομβοφιλία με τα ισχαιμικά ΑΕΕ είναι ίσως το **αθροιστικό αποτέλεσμα τέτοιων προδιαθεσικών παραγόντων και η αλληλεπίδρασή τους με αναστρέψιμους παράγοντες κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία**. Έτσι λοιπόν, λόγω ακριβώς της πολυπαραγοντικής και πολύπλοκης φύσης της αιτιολογίας του ΑΕΕ, θα έπρεπε να αναζητηθεί συσχετισμός μεταξύ ενός ευρέος φάσματος παθογόνων αλληλομόρφων γονιδίων στη διαμόρφωση διαφόρων παθοφυσιολογικών μηχανισμών εμφάνισης ισχαιμικού ΑΕΕ. Ενώ λοιπόν απλοί πολυμορφισμοί όταν αναλύονται ξεχωριστά μπορεί να έχουν ένα πτωχό αποτέλεσμα στην πιθανότητα εμφάνισης ΑΕΕ, είναι δυνατόν να δίνουν ένα εντελώς άλλο αποτέλεσμα αν αναλυθούν σε σχέση με το ήδη υπάρχον υπόβαθρο, που μπορεί να περιλαμβάνει επιπλέον παράγοντες κινδύνου.

Η γενετική επομένως προδιάθεση για ΑΕΕ μπορεί να προέρχεται από αθροιστικό αποτέλεσμα περισσότερων του ενός «κακών» γονιδίων (gene-dose effect) ή από συνέργεια επιμέρους αλληλεπιδράσεων γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων ή προσωπικών συνηθειών και τρόπων συμπεριφοράς. Επίσης, ένα γονίδιο μπορεί να έχει μια ηλικιο-εξαρτώμενη αθροιστική επίδραση στον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. [40]

Είναι επομένως λογικό να σχεδιάζονται μελέτες με αναλύσεις που να περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις διαφόρων γενετικών πολυμορφισμών τόσο μεταξύ τους, όσο και με συνήθεις προδιαθεσικούς παράγοντες και μάλιστα κυρίως σε ασθενείς νεαρότερης ηλικίας με ισχαιμικό ΑΕΕ. Κάποιες τέτοιες μελέτες ομιλούν για

καλύτερη κατανόηση της πολύπλοκης ούτως ή άλλως αλληλεπίδρασης γονοτύπου-φαινοτύπου στην παθογένεια του ΑΕΕ και δίνουν έμφαση στην ευχερέστερη αναγνώριση από πλευράς κλινικού ιατρού των νέων ατόμων «υψηλού κινδύνου» για ανάπτυξη ΑΕΕ έτσι ώστε η παρέμβαση να είναι τόσο έγκαιρη, όσο και έγκυρη στην τροποποίηση των εξωγενών παραγόντων κινδύνου.

Θα μπορούσε ακόμη κανείς να ισχυριστεί την ικανότητα «ανίχνευσης» νέων ατόμων υψηλού κινδύνου για πιθανό ΑΕΕ και έτσι να καταφύγει σε εξατομικευμένα προγνωστικά και θεραπευτικά μέτρα σε άτομα με βεβαρημένο γενετικό υπόβαθρο και αρτηριακή υπέρταση ή συνήθειες, όπως το κάπνισμα. [63]

Τα τελευταία 10 χρόνια έχει δημοσιευτεί ένας μεγάλος αριθμός πληροφοριών για καταστάσεις που σχετίζονται με την υπερπηκτικότητα και τη συσχέτιση αυτής με διάφορες παθολογικές οντότητες. Αυτές οι διαταραχές ονομάζονται όπως αναφέρθηκε παραπάνω θρομβοφιλικές και το συναρπαστικό, τα τελευταία ειδικά χρόνια, είναι, πως σήμερα ο κλινικός ιατρός μπορεί να επιλέξει ανάμεσα σε ένα ολόκληρο κατάλογο με εξετάσεις για τον εντοπισμό τους στον ασθενή του, όταν αυτός διαγιγνώσκεται κυρίως με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση ή πνευμονική εμβολή, ή ακόμη και με ισχαιμικό ΑΕΕ ειδικά όταν ο ασθενής του είναι νέος χωρίς σαφή αιτία εμφάνισης ΑΕΕ.

Θα έλεγε κανείς όμως, πως παρά την πληθώρα των εξετάσεων που εμφανίζονται, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει απλό εργαστηριακό τεστ που να κυκλοφορεί ελεύθερα στο εμπόριο και να προσδιορίζει εύκολα και γρήγορα όλα τα πιθανά αίτια θρομβοφιλίας. Θα λέγαμε μάλιστα, ότι τα κυκλοφορούντα τεστ είναι μάλλον πολύπλοκα και χρονοβόρα, κάποια δε από αυτά επηρεάζονται από διάφορες καταστάσεις όπως για παράδειγμα, τη λήψη κουμαρινικών αντιπηκτικών, η οποία μειώνει τα επίπεδα Pr C, Pr S.

Παρά επίσης το γεγονός της αίσθησης ικανοποίησης στην περίπτωση αναγνώρισης μιας τέτοιας διαταραχής σε έναν ασθενή, δεν είναι αρκετά σαφές πως ο συγκεκριμένος ασθενής θα επωφεληθεί με κάποιο τρόπο ή πως ο τρόπος διαχείρισης αυτού του ασθενούς αλλάζει.

Επειδή λοιπόν ο έλεγχος θρομβοφιλίας είναι σχετικά απίθανο να είναι αποδοτικός σε ασθενείς με ΑΕΕ άνω των 45 ετών έχει σχεδιαστεί ο παρακάτω αλγόριθμος για εκείνες τις περιπτώσεις που χρήζουν διερεύνησης: FURY (Family history, thrombosis in Unusual location, Recurrent episodes of thrombosis, Young

less than 45 years old). Οικογενειακό ιστορικό, θρόμβωση σε ασυνήθη σημεία, επαναλαμβανόμενα επεισόδια θρόμβωσης, νεαρή ηλικία, κάτω των 45 ετών. [64]

Οι πιο κοινές θρομβοφιλικές διαταραχές που εξετάζονται φαίνονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Οι πιο κοινές θρομβοφιλικές διαταραχές. [65]

ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ/ ΕΠΙΚΤΗΤΗ
Factor V Leiden	3-7%	Κληρονομική
Prothrombin G20210A	1-2%	Κληρονομική
Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C (Pr C)	0.3%	Κληρονομική
Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S (Pr S)	0.1%	Κληρονομική
Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης (AT)	0.1%	Κληρονομική και επίκτητη
Αυξημένος παράγοντας VIII	10%	Επίκτητη
Υπερομοκυστεϊναιμία	5%	Επίκτητη
Αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C χωρίς Factor V Leiden	0.5%	Κληρονομική και επίκτητη
Αντιφωσφολιπιδικά Αντισώματα	1%	Επίκτητη

Η πιο κοινή θρομβοφιλική διαταραχή που αναγνωρίζεται από τους κλινικούς ιατρούς ακόμη και της πρωτοβάθμιας περίθαλψης είναι η κληρονομική διαταραχή Factor V Leiden (FVL). Παρ'ολ'αυτά η πρώτη διαταραχή που περιγράφηκε, όπως ειπώθηκε ήταν η ανεπάρκεια της AT [2] και στη συνέχεια η μερική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C και S. [66]

Πολλές εργασίες έδειξαν ότι ο αριθμός των γενετικών μεταβλητών που οδηγούν σε μη κανονική λειτουργία των πρωτεϊνών C και S καθώς και της AT είναι τόσο μεγάλος, όσο και ετερογενής [67] [68] [69] με μεταλλάξεις που μπορεί να οδηγήσουν σε ποσοστική διαταραχή (μειωμένη παραγωγή, επανομαζόμενη τύπου I ανεπάρκεια) ή σε ποιοτική διαταραχή (διαταραχή της λειτουργίας, επανομαζόμενη τύπου II ανεπάρκεια) [70] [71]

Με δεδομένη αυτή την τεράστια ετερογένεια, είναι πιθανόν οι ασθενείς με διαφορετικές γενετικές διαταραχές να έχουν και σημαντικά διαφορετική πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης.

Οι εργαστηριακές μετρήσεις των πρωτεϊνών πήξης μπορούν να υπολογίσουν είτε τη λειτουργική συνιστώσα της πρωτεΐνης είτε την ποσότητα της πρωτεΐνης (αντιγονικές μετρήσεις). Ως γενικός κανόνας, οι λειτουργικές μετρήσεις των πρωτεϊνών πήξης γίνονται είτε με ηκτικολογικές είτε με χρωμογόνες μεθόδους.

Οι ηκτικολογικές μέθοδοι θα μπορούσαν να είναι προβληματικές, διότι διάφορες μεταβλητές θα μπορούσαν να επηρεάσουν το σχηματισμό του θρόμβου, όπως για παράδειγμα, ανεπάρκειες παραγόντων, παρουσία αναστολέων της πήξης και λήψη διαφόρων φαρμάκων. [72] Σ' αυτές τις περιπτώσεις θα μπορούσαμε να οδηγηθούμε σε λανθασμένα αποτελέσματα αυξημένης ή μειωμένης λειτουργίας του εν λόγω παράγοντα.

Οι χρωμογόνες μέθοδοι τείνουν να έχουν λιγότερη παρεμβολή, αλλά είναι σαφώς πιο δαπανηρές από τις ηκτικολογικές μεθόδους. Για τον αντιγονικό προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών συνήθως διενεργείται μέθοδος ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) αλλά και άλλες ανοσολογικές μέθοδοι, όπως για παράδειγμα ηλεκτροφόρηση ή ανοσολογικές εξετάσεις με Latex (Latex immunoassays). Παρά το γεγονός πως οι περισσότερες αντιγονικές μέθοδοι δεν επηρεάζονται από τους παράγοντες που επηρεάζουν τις λειτουργικές εξετάσεις, η χρήση μόνο των αντιγονικών μεθόδων μπορεί να οδηγήσει σε μη διάγνωση ασθενών με τύπου I (λειτουργική) ανεπάρκεια. [72]

Πριν αναφερθούν οι παράγοντες πήξης με τους οποίους ασχολείται η παρούσα μελέτη, παρατίθεται ο πίνακας 10, στον οποίο συνοψίζονται διάφορα χαρακτηριστικά των επικρατέστερων κληρονομικών διαταραχών που σχετίζονται με θρομβοφιλία.

Πίνακας 10: Συνήθεις κληρονομικοί παράγοντες που σχετίζονται με θρομβοφιλία. [65]

	Factor FVLeiden	Prothrombin mutation	Protein C	Protein S	AT
Αρχική περιγραφή	Dahlback et al, 1993 [73] Griffin et al, 1993 [74] Koster et al, 1993 [75]	Poort et al, 1996 [76]	Griffin et al, 1981 [3]	Comp et al, 1984 [77] Schwartz et al, 1984 [78]	Egeberg, 1965 [2]

Συχνότητα					
Γενικός πληθυσμός	4-7% Καυκάσιοι	2%	0.2%	Αβέβαιη	0.02%
Πρώτη DVT	20%	6%	3%	1-2%	1%
Οικογένειες με Θρομβοφιλία	40%	18%	6%	6%	4%
Γενετικό Υπόβαθρο					
Κληρονομικότητα	Αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας	Αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας	Αυτοσωμικός υπολειπόμενος	Αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας	Αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας
Μετάλλαξη	Εξόνιο 10 (1691 G to A)	3' untranslated (20210 G to A)	Πολλές (>150)	Πολλές (>150)	Πολλές (>150)
	Arg506 to Gln				
Αποτέλεσμα					
Διαταραχή	Μη απενεργοποίηση του FVa	Αυξημένη παραγωγή θρομβίνης	Μη ρυθμιζόμενη πήξη, μειωμένη ινωδόλυση	Μειωμένη λειτουργικότητα της PrC	Μη ρυθμιζόμενη παραγωγή θρόμβου
Βάση	Αντίσταση του Va στην APC	Αυξημένη προθρομβίνη πλάσματος	Μειωμένη απενεργοποίηση των Va, VIIa	Μειωμένη δράση της PrC ως συμπαράγοντα	Μειωμένη απενεργοποίηση των Xa, θρομβίνης
Εργαστηριακά τεστ					
Μέθοδος	PCR για τη μετάλλαξη Leiden, APCResistance	PCR για τη μετάλλαξη 20210, συγκέντρωση προθρομβίνης	Μειωμένη αντιπηκτική δράση του αντιγόνου	Μειωμένη δράση της «ελεύθερης» PrC	Μειωμένη δραστηριότητα (πηκτικολογική ή χρωμογόνος)
Ετεροζυγωτία	PCR-ετεροζυγωτία, APC sensitivity ratio<2.0	PCR-ετεροζυγωτία, Προθρομβίνη 120%	15-70%	Σύμπλεγμα με C4b-BP:60%, Free:40%	30-60%
Παγίδες (λειτουργικές μέθοδοι)	Μη φυσιολογική σε αντιπηκτική αγωγή, κακοήθεια, αντιπηκτικό λύκου,	Η ηπαρίνη μπορεί να παρεμβαίνει στα αποτελέσματα	Επίκτητη έλλειψη σε ηπατική νόσο, ουαρφαρίνη, Διάχυτη	Όπως στην PrS, επιπλέον αυξημένη C4b-BP σε συστηματικό	Μείωση σε νεφρωσικό σύνδρομο, κατανάλωση σε ΔΕΠ, VTE και

	εγκυμοσύνη Χρήση υποστρώματος με έλλειψη FV		Ενδαγγειακή Πήξη (ΔΕΠ), νεφρωσικό σύνδρομο	ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), εγκυμοσύνη	ηπαρινοθεραπεία
Κλινική Εικόνα					
Ομοζυγώτες	Αύξηση σχετικού κινδύνου φλεβικής θρόμβωσης X80	Αυξημένος κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης και επιπλέον πιθανή αύξηση αρτηριακών συμβαμμάτων	Κεραυνοβόλος νεογνική πορφύρα, θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών	Κεραυνοβόλος νεογνική πορφύρα, θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών	Ενδομήτριος θάνατος
Ετεροζυγώτες (σχετικός κίνδυνος για φλεβική θρόμβωση)	X 7	X 3	X 7	X 6	X 5

Στη συνέχεια παρατίθενται οι παράγοντες πήξης καθώς και οι γενετικοί πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις με τους οποίους ασχολείται ή παρούσα μελέτη.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ ΠΟΥ ΥΠΕΙΣΤΕΡΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΑΕΕ

ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΙΝΗ (ΑΤ):

Η αντιθρομβίνη (ΑΤ) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 58000 και με συγκέντρωση στο πλάσμα 150 μg/ml (S.I 170-390 mg/L). Οι τιμές όμως συνήθως δίδονται ως ποσοστό του ποσού που φυσιολογικά αναμένεται στο πλάσμα. Εξ' ορισμού επομένως, η μέση τιμή σε ένα φυσιολογικό πλάσμα είναι 100%. Ανήκει στην υπεροικογένεια των σερπινών (serpins, serine protease inhibitors).

Σήμερα ονομάζεται αντιθρομβίνη, ενώ η παλαιά ονομασία του παράγοντα αυτού ήταν αντιθρομβίνη III. Η ονομασία έχει αλλάξει ορθώς, διότι η διάκρισή της

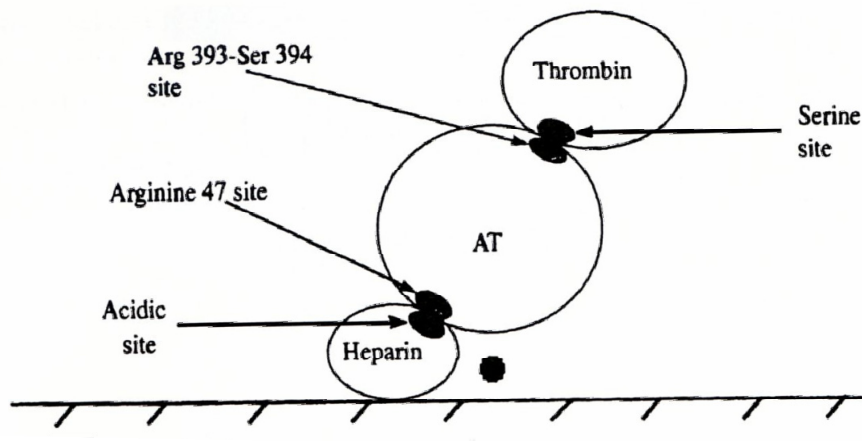
ουσιαστικά θα έπρεπε να γίνει μόνον από την ATIII, η οποία όμως έχει επικρατήσει να λέγεται συμπαράγοντας II της ηπαρίνης (HCoFII). Εξάλλου, ονομάζεται αλλιώς και συμπαράγοντας I της ηπαρίνης. (HCoFI). Η αντιθρομβίνη αποτελεί **το σημαντικότερο φυσικό αναστολέα της πήξης**. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Το γονίδιο της αντιθρομβίνης έχει μέγεθος 19Kb (7 exons, 6 introns) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1(1q23-q25).

Ο μηχανισμός δράσης της AT συνίσταται στη μόνιμη σύνδεση και αναστολή της δραστηριότητας της θρομβίνης, αλλά και του παράγοντα Xa και λιγότερο των παραγόντων IXa, XIa και XIIa, της πλασμίνης, του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA), της ουροκινάσης και της καλλικρεΐνης. Η σύνδεση αυτή γίνεται με το ενεργό τμήμα της AT που περιλαμβάνει το αμινοξύ αργινίνη.

Η σχετικά αργή δράση της AT, ενισχύεται και επιταχύνεται από την κλασσική ηπαρίνη, αυξάνοντας κατά 1000 φορές την αντίδραση AT-θρομβίνης. Η AT είναι το μόριο στο οποίο συνδέεται η ηπαρίνη και αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε μη αναστρέψιμη αναστολή της θρομβίνης με τη δέσμευση της AT στο ενεργό τμήμα της θρομβίνης. Είναι επομένως σαφές πως η μέτρηση των επιπέδων της AT προϋποθέτει τη μη λήψη ηπαρίνης. Παρ'ολ'αυτά, σε περίπτωση λήψης ηπαρίνης, γίνεται εξουδετέρωσή της *in vitro* με θειική πρωταμίνη. Αξίζει εδώ να σημειωθεί, πως τα θεραπευτικά επίπεδα ηπαρίνης μειώνουν τα επίπεδα AT μέχρι και στο 20% λόγω άμεσης σύνδεσης με την AT.

Είναι εμφανές από τα παραπάνω, πως ελάττωση των επιπέδων της AT, οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της θρομβίνης (αφού η AT αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης) και επομένως θρομβοφιλία, λόγω ενεργοποίησης του μηχανισμού πήξης του αίματος.[72]

Στην εικόνα 9 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης της AT.



Εικόνα 9: Μηχανισμός δράσης AT. [79]

Η ανεπάρκεια της AT μπορεί να είναι επίκτητη ή κληρονομική.

Επίκτητη ανεπάρκεια της AT οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα AT και μπορούμε να τη συναντήσουμε σε διάφορες παθολογικές ή και φυσιολογικές καταστάσεις, όπως φαίνεται παρακάτω:

- Στα νεογνά, μέχρι την ηλικία των έξι μηνών, λόγω ανωριμότητας του ηπατικού κυττάρου να παράγει AT
- Σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή (οιστρογόνα). Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα οιστρογόνα, αφενός επιταχύνουν τη σύνθεση ορισμένων παραγόντων της πήξης, αφετέρου ελαττώνουν την παραγωγή AT.
- Σε διάφορες ηπατοπάθειες, που οδηγούν σε βλάβη του ηπατικού κυττάρου, λόγω ακριβώς της βλάβης του και επομένως της διακοπής παραγωγής AT αλλά και λόγω μηχανισμού διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (ΔΕΠ).
- Σε όλες τις καταστάσεις που οδηγούν σε ΔΕΠ, λόγω κατανάλωσης των παραγόντων πήξης και επομένως και AT
- Σε έμφραγμα μυοκαρδίου κυρίως σε εκτεταμένο έμφραγμα, λόγω καταστροφής του αγγειακού ενδοθηλίου, τόπου παραγωγής, όπως ειπώθηκε, AT.
- Στη σήψη ή σε πολυτραυματίες

- Στη μετεγχειρητική περίοδο, κυρίως μετά από εκτεταμένες επεμβάσεις, λόγω καταστροφής του αγγειακού ενδοθηλίου.
- Σε περίπτωση λήψης κλασσικής ηπαρίνης, λόγω δράσης αντιθρομβίνης της κλασσικής ηπαρίνης
- Σε μεταμόσχευση μυελού των οστών, λόγω συμμετοχής του ενδοθηλίου

Σε ασθενείς με επίκτητη ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, όπως ασθενείς πολυτραυματίες, σηπτικούς ή με βαριά ηπατοπάθεια, υψηλές δόσεις ηπαρίνης μπορεί να χρειαστούν για την παράταση του aPTT, οδηγώντας στην αποκαλούμενη αντίσταση στην ηπαρίνη. [80]

Οι πιο κοινές και συνήθως πιο σημαντικές επίκτητες ανεπάρκειες λαμβάνουν χώρα σε καταστάσεις όπως διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (ΔΕΠ, σήψη, Shock), οξεία θρόμβωση, μεγάλη χειρουργική επέμβαση και επιπλοκές της, προεκλαμψία και κακοήθειες. Ανεπάρκεια AT σχετιζόμενη με μη σύνθεση επαρκών ποσοτήτων της, συναντάμε σε κίρρωση, σοβαρή θαλασσαιμία, υποσιτισμό, καθώς και σε πρόωρα νεογνά. Τόσο απώλεια, όσο και μειωμένη σύνθεση AT συναντάμε σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια και νεφρωσικό σύνδρομο. [81]

Κληρονομική ανεπάρκεια της AT μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της AT που κληρονομούνται με τον επικρατούντα αυτοσωμικό χαρακτήρα, ευτυχώς με ανεπαρκή διεισδυτικότητα). Η ανεπάρκεια της AT παρουσιάζεται αποκλειστικά σε ετερόζυγη μορφή. Ομόζυγη μορφή δεν περιγράφεται, προφανώς επειδή μια τέτοια κατάσταση είναι ασυμβίβαστη με τη ζωή, εκτός από ασθενείς με ανεπάρκεια τύπου II λόγω μεταλλάξεων στο σημείο σύνδεσης της ηπαρίνης (heparin-binding mutations). Η ομόζυγη μορφή είναι συνήθως θανατηφόρα με εμφάνιση θρόμβωσης στη νεογνική ηλικία.

Η συχνότητα της ετερόζυγης μορφής ποικίλει ευρέως σε διάφορες μελέτες και γενικά φαίνεται να έχει υπερεκτιμηθεί. Έχει υπολογιστεί πως η συχνότητα της ετερόζυγης ανεπάρκειας της AT είναι γύρω στο 0.02% του πληθυσμού. [82] [7]

Η κλινική εικόνα αυτής της κατάστασης εκδηλώνεται με επεισόδια φλεβοθρόμβωσης σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών. Όπως είναι λογικό, καταστάσεις όπως λήψη αντισυλληπτικών δισκίων, κύηση, χειρουργικές επεμβάσεις επιτείνουν τα επεισόδια. [83]

Εργαστηριακές εξετάσεις όπως ο χρόνος προθρομβίνης (PT), ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), καθώς και ο χρόνος θρομβίνης (TT) και ο αριθμός αιμοπεταλίων παραμένουν φυσιολογικά.

Έχουν περιγραφεί πάνω από 250 μεταλλάξεις και είναι διαθέσιμες σε βάση δεδομένων με άμεση πρόσβαση από το διαδίκτυο (<http://www.med.ic.ac.uk/dd/ddhc>).

Ετεροζυγωτία οδηγεί σε πενταπλάσια αύξηση για φλεβική θρόμβωση. [84]

Στην **κληρονομική ανεπάρκεια** διακρίνουμε δύο τύπους ανεπάρκειας:

Τον **τύπο I**, που είναι και ο συνηθέστερος και ο οποίος εκφράζεται με **ποσοτική ανεπάρκεια** λόγω απάλειψης γονιδίου ή μετάθεσης πλαισίου. Έτσι, ο τύπος I οδηγεί σε ανάλογη μείωση τόσο στην ποσότητα (αντιγονικότητα) όσο και στη λειτουργικότητα της AT, δηλαδή σε έκπτωση τόσο βιολογικής, όσο και της αντιγονικής δραστηριότητας λόγω γενετικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε σιωπηρά αλληλία.

Ο **τύπος II**, που εκφράζεται με **ποιοτική ανεπάρκεια**, δηλαδή φυσιολογική αντιγονική δραστηριότητα με μειωμένη όμως βιολογική (δυσλειτουργική AT), έχει συσχετιστεί με σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν είτε την περιοχή αναστολής της θρομβίνης (serine protease inhibition site for thrombin), είτε την περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη, είτε και τις δύο περιοχές.

Στον πίνακα 11 παρατίθεται η ταξινόμηση των κληρονομούμενων ανεπαρκειών της AT, με παραδείγματα από μοριακές διαταραχές.

Πίνακας 11: Ταξινόμηση κληρονομικών ανεπαρκειών AT και παραδείγματα μοριακών διαταραχών [79]

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΩΝ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ AT
ΤΥΠΟΣ I: Χαμηλή λειτουργική και ανοσοενεργή αντιθρομβίνη
Iα. Φυσιολογικά μόρια AT συντιθέμενα με μειωμένο ρυθμό
Iβ. Χαμηλά ποσά από μη φυσιολογικά μόρια AT
Pro407Leu(Utah)
Arg406Met(Kyoto)
ΤΥΠΟΣ II: Χαμηλή λειτουργικότητα αλλά φυσιολογική αντιγονικότητα AT
IIα: Μειωμένη δραστηριότητα της AT και μειωμένη σύνδεση με την ηπαρίνη
Pro429Leu(Budapest)

IIβ: Μειωμένη δραστηριότητα της AT
Ser394Leu(Denver, Milano 2)
Ala384Pro(Sudbury, Cambridge, Charleville)
IIγ: Μεμονωμένη μειωμένη σύνδεση με την ηπαρίνη
Arg47Cys(Alger, Tours, Toyama, Paris, Amiens, Barcelona 2)
Pro41Leu(Basel, Franconville, Clichy)

Κλινικά, ασθενείς με έλλειψη AT παρουσιάζουν συνήθως θρομβοεμβολικά και όχι αρτηριακά επεισόδια. [85]

Κλινικές εκδηλώσεις της κληρονομικής ανεπάρκειας της AT, περιλαμβάνουν: πρώτο θρομβωτικό επεισόδιο σε νεαρή ηλικία, οικογενειακό ιστορικό θρόμβωσης, επαναλαμβανόμενα επεισόδια φλεβικής θρόμβωσης, επεισόδια θρομβώσεων κατά την εγκυμοσύνη, περιστασιακή αντίσταση στη θεραπεία με ηπαρίνη. Τα συνηθέστερα σημεία εντόπισης των βλαβών αποτελούν: το εν τω βάθει φλεβικό δίκτυο των κάτω άκρων, λαγονομηριαίες, κάτω κοίλη φλέβα, νεφρικές, μασχαλιαίες φλέβες. Θρόμβωση των εγκεφαλικών φλεβών, θρόμβωση των μεσεντερίων φλεβών καθώς και σύνδρομο Budd-Chiari είναι σοβαρά και ασυνήθη προβλήματα που μπορεί επίσης να παρουσιαστούν. Όπως ήδη ειπώθηκε, αρτηριακές θρομβώσεις σπάνια συμβαίνουν. [85]

Τα άτομα με ανεπάρκεια AT παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης θρόμβωσης σε σχέση με άλλες κληρονομικές θρομβοφιλικές καταστάσεις. [72]

Στις **εργαστηριακές μεθόδους προσδιορισμού** της ανεπάρκειας της AT περιλαμβάνονται μέθοδοι που μετρούν τόσο τη λειτουργικότητα, όσο και την αντιγονικότητα της AT.

Η μέτρηση της **λειτουργικότητας** γίνεται είτε με χρωμογόνο μέθοδο, οπότε και το αποτέλεσμα δίδεται φωτομετρικά, από την ένταση του χρώματος, είτε με χρονομετρική μέθοδο, όπου το αποτέλεσμα δίδεται ως ποσοστό % με φυσιολογικές τιμές από 80% μέχρι 120% της φυσιολογικής δραστηριότητας.

Η **χρωμογόνος μέθοδος** χρησιμοποιείται συνήθως και με αυτή τη μέθοδο, η αντιθρομβίνη που υπάρχει στο πλάσμα ενός ασθενούς εξουδετερώνεται εξωγενώς με την προσθήκη θρομβίνης ή ενεργοποιημένου παράγοντα Χα. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί πως ασθενείς με χολερυθριναιμία και λιπαιμία, λόγω ακριβώς της χρωματικής παρεμβολής, είναι δυνατόν να εμφανίζουν ψευδώς χαμηλές τιμές AT. Το

ίδιο μπορεί να συμβεί σε ασθενείς που λαμβάνουν άμεσους αναστολείς της θρομβίνης, όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι προσδιορισμού της AT που βασίζονται στη θρομβίνη.

Η μέτρηση της **αντιγονικότητας** είναι περίπλοκη και η πλέον κατάλληλη μέθοδος θεωρείται η ανοσοδιάχυση κατά Laurell. Και εδώ τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) του φυσιολογικού με χρήση σταθερής καμπύλης. Η παραπάνω μέτρηση λαμβάνει χώρα σπάνια και μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα αναφοράς. Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος, βασίζεται στη χρήση σωματιδίων Latex τα οποία επικαλύπτονται με αντισώματα εναντίον της AT. [86]

Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί πως οι ανοσολογικές μέθοδοι δε διαχωρίζουν την ελεύθερη και ενεργό AT, από τη συνδεδεμένη και ανενεργό. (φ.τ. AT 290 μg/ml)

Η πιο χρήσιμη μέθοδος κάνει χρήση του παράγοντα Xa ως στόχο. Ανιχνεύει διαταραχές τόσο στο ενεργό κέντρο της σερπίνης, όσο και στο σημείο σύνδεσης της ηπαρίνης και δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα του συμπαράγοντα II της ηπαρίνης (HCoFII). [87]

Σε σχέση με άλλους παράγοντες της πήξης, οι διακυμάνσεις στις τιμές είναι σχετικά περιορισμένες. Έτσι, με εξαίρεση τα νεογέννητα φυσιολογικές μεταβολές στις τιμές σπανίως παρατηρούνται. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί πως ελαφρώς μειωμένες τιμές σημειώνονται σε άνδρες ηλικίας άνω των 50 ετών, καθώς και σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Η εγκυμοσύνη και η άσκηση έχουν μικρή επίδραση στις τιμές της AT σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες. [88]

Σημαντικές αλλαγές στις τιμές της AT συναντώνται στα νεογέννητα, ενώ τα επίπεδα των ενηλίκων ήδη αποκτώνται από την ηλικία των έξι μηνών. [89]

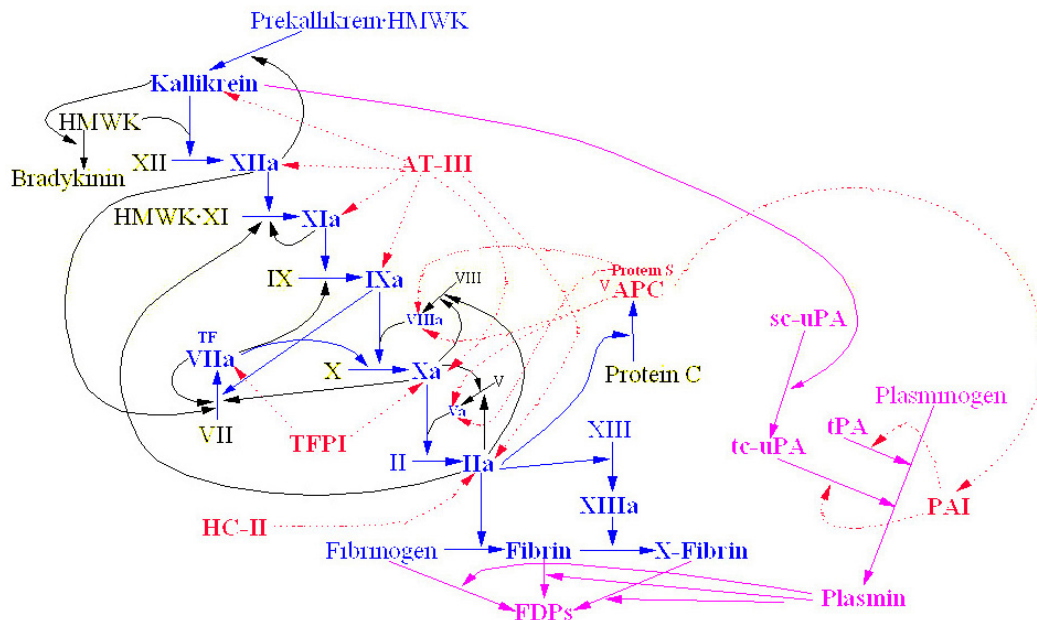
Έχει διαπιστωθεί συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και εμφάνισης θρόμβωσης σε προσβεβλημένες οικογένειες. Η πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης ποικίλει, από μικρή, σε πολύ μεγάλη σε ηλικιωμένα άτομα με ανεπάρκεια AT. [87]

Όπως και σε άλλες περιπτώσεις θρομβοφιλίας, η πιθανότητα, άτομα με κληρονομική ανεπάρκεια να εμφανίσουν θρομβοεμβολικές διαταραχές εξαρτάται και από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως για παράδειγμα, αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων ή αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος. [83]

Παρ' όλ' αυτά, η θνησιμότητα σε οικογένειες με ανεπάρκεια AT δε φαίνεται να αυξάνεται. [90]

Στις περισσότερες περιπτώσεις οξέων θρομβωτικών επεισοδίων λόγω κληρονομικής ανεπάρκειας της AT, δίδεται αγωγή με ηπαρίνη, ακολουθούμενη από

χρόνια προφύλαξη με κουμαρινικά αντιπηκτικά. Η εμφάνιση του συνδρόμου νέκρωσης δέρματος σχετιζόμενου με κουμαρινικά αντιπηκτικά, που απαντάται συνήθως σε ανεπάρκεια PrC, είναι σπάνια στην περίπτωση της κληρονομικής ανεπάρκειας της AT.

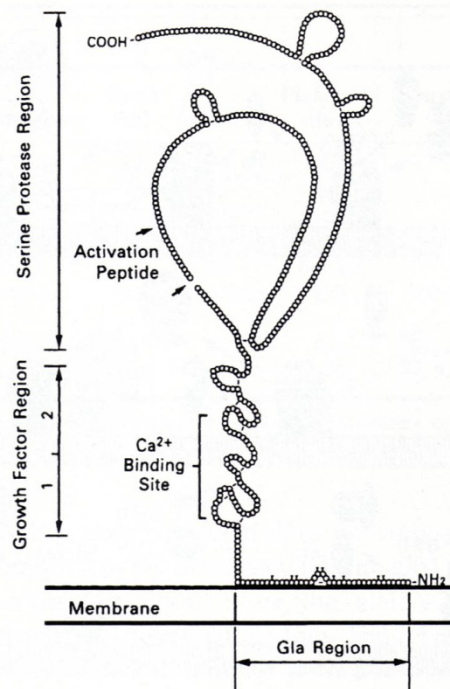


Εικόνα 10: Αντιθρομβίνη-σημεία δράσης

ΠΡΩΤΕΪΝΗ C (PrC):

Η PrC είναι μια βιταμινο-K εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία παράγεται μόνο στα ηπατικά κύτταρα. Το μοριακό βάρος της PrC είναι 62000 (462 αμινοξέα). Το γονίδιο της PrC εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2.

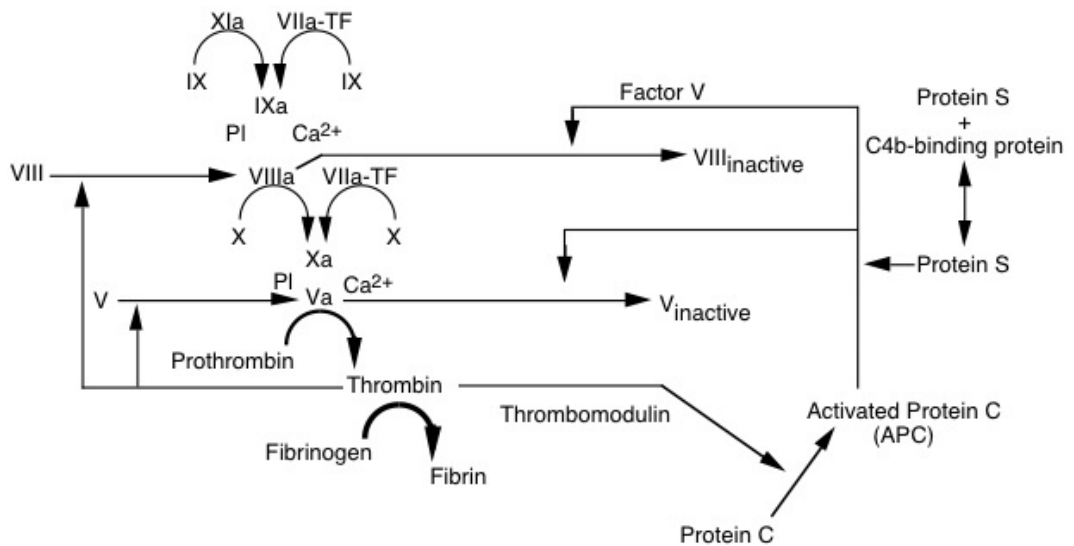
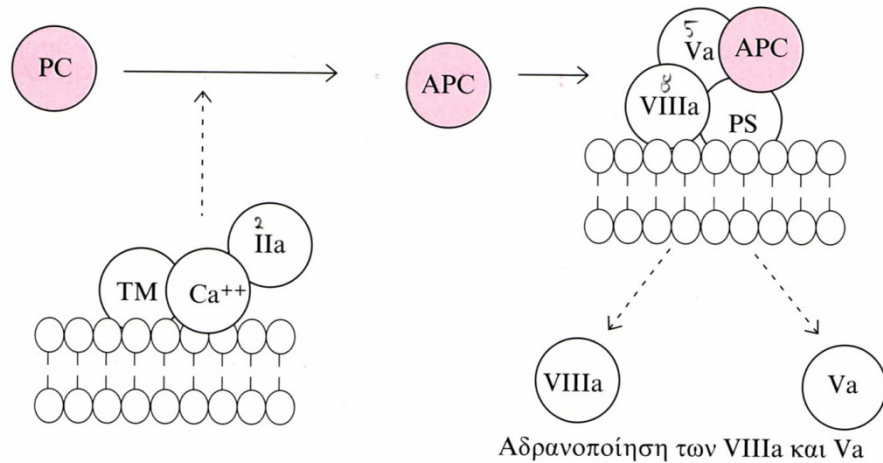
Στην εικόνα 11 φαίνονται η δομή και η λειτουργία του μορίου της PrC.



Εικόνα 11: Μόριο PrC. [65]

Μηχανισμός δράσης: Η αδρανής PrC ενεργοποιείται ταχύτατα από το σύμπλεγμα της πρωτεΐνης C-άσης, δηλαδή θρομβίνη, θρομβομοδουλίνη, ιόντα ασβεστίου και κυτταρική μεμβράνη, και στη συνέχεια δρα πρωτεολυτικά, αδρανοποιώντας τους παράγοντες Va και VIIIa, καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η αντιπηκτική δραστηριότητα της PrC επιτείνεται από την πρωτεΐνη S (PrS), ενώ συζητείται η δράση της στο ινωδολυτικό σύστημα. Ελάττωση λοιπόν της PrC προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα των παραγόντων Va και VIIIa, άρα ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και εμφάνιση θρομβοφιλίας.

Στην εικόνα 12 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης της PrC.



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης PrC

Κλινικά, η ανεπάρκεια της PrC προκαλεί θρομβοεμβολικά επεισόδια και μπορεί να είναι επίκτητη ή κληρονομούμενη.

Επίκτητη Ανεπάρκεια: Η επίκτητη ανεπάρκεια έχει συσχετιστεί με ενδαγγειακές διεργασίες κατανάλωσης, συμπεριλαμβανομένης και της διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (ΔΕΠ). Έτσι, επίκτητη ανεπάρκεια PrC με πιθανό επακόλουθο θρομβωτικό επεισόδιο, παρατηρείται στις ακόλουθες φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις:

- Στα νεογέννητα, λόγω ανεπάρκειας του ηπατικού κυττάρου μέχρι την 6^η εβδομάδα

- Σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή (οιστρογόνα), επειδή επιταχύνεται η σύνθεση μ'αυτό τον τρόπο των παραγόντων πήξης, ελαττώνοντας συγχρόνως την παραγωγή PrC, αλλά και AT, όπως ήδη έχει ειπωθεί.
- Στις ηπατοπάθειες, λόγω βλάβης του ηπατικού κυττάρου και μηχανισμού ΔΕΠ
- Στη ΔΕΠ οποιασδήποτε αιτιολογίας λόγω κατανάλωσης των παραγόντων πήξης και της PrC
- Στη βακτηριακής αιτιολογίας σήψη
- Σε λοίμωξη από Varicella Zoster Virus
- Στην προεκλαμψία
- Σε σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας
- Σε παραπρωτεϊναιμία IgG (αναστολέας της PrC)
- Σε περίπτωση λήψης αντιπηκτικής από του στόματος αγωγής (ελάττωση σύνθεσης)
- Σε ανεπάρκεια βιταμίνης K
- Στη μεταμόσχευση μυελού των οστών
- Μετά από χορήγηση L-asparaginase, λόγω αναστολής της σύνθεσής της από τα ηπατοκύτταρα
- Σε θεραπεία με methotrexate/cyclophosphamide/5-fluorouracil σε καρκίνο μαστού

Κληρονομική Ανεπάρκεια: Η μεταβίβαση γίνεται μάλλον κατά τον υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα με ποικίλη διεισδυτικότητα του γονιδίου. Οφείλεται σε μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς του γονιδίου.

Κλινικά εκδηλώνεται με θρομβοεμβολικά επεισόδια σε άτομα ηλικίας κάτω των 40 ετών. Χαρακτηριστική είναι η νέκρωση του δέρματος στα άκρα, στον κορμό, τους μαστούς μετά από λήψη αντιπηκτικού από το στόμα και οφείλεται στην ταχύτατη ελάττωση της δραστηριότητας της PrC.

Ασθενείς με ομοζυγωτική μορφή ή συνδυασμένη ετερόζυγη διαταραχή μπορεί να εμφανιστούν καταρχήν με σοβαρή προσβολή (PrC < 0.01 U/ml). Η κατάσταση αυτή έχει περιγραφεί και είναι συμβατή με την ενδομήτρια ανάπτυξη του εμβρύου, αλλά με ανάπτυξη κεραυνοβόλου πορφύρας από το νεογνό, διάχυτη ενδαγγειακή

πήξη (ΔΕΠ) καθώς και άλλες σοβαρές θρομβωτικές καταστάσεις. Επίσης, μπορεί τα άτομα αυτά να εμφανίζουν μέτρια προσβολή ($PrC=0.05-0.25U/ml$) με επαναλαμβανόμενα θρομβοεμβολικά επεισόδια αργότερα στη ζωή τους.

Θα πρέπει εδώ να τονιστεί πως σε περίπτωση εμφάνισης νεογνικής πορφύρας και λιγότερο συχνά μαζικής φλεβικής θρόμβωσης σε νεογνό, παρόλο που είναι καταστάσεις σπάνιες, θα πρέπει να θεωρείται ότι οφείλονται σε ομόζυγη, ή διπλή ετεροζυγωτία ανεπάρκειας PrC ή PrS , μέχρις αποδείξεως του εναντίου.

Ετερόζυγη ανεπάρκεια PrC (επίπεδα στο πλάσμα $PrC= 0.4-0.6 U/ml$) εμφανίζεται με μια συχνότητα περίπου 1/300 στο γενικό πληθυσμό [91] αλλά τα περισσότερα από αυτά τα άτομα, συμπεριλαμβανομένων και ολόκληρων οικογενειών δε βιώνουν θρομβοεμβολικά επεισόδια. [92]

Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη, λόγω επικάλυψης των φυσιολογικών και παθολογικών τιμών στα κατώτατα φυσιολογικά όρια. Τιμές κάτω των 0.55 U/ml μπορούν με σιγουριά να θεωρηθούν ότι οφείλονται σε ετερόζυγη ανεπάρκεια. Τιμές μεταξύ 0.55-0.65 U/ml, θα μπορούσαν να οφείλονται είτε σε ανεπάρκεια, είτε να είναι απλά στα κατώτατα φυσιολογικά όρια. Αυτή η τελευταία περίπτωση απαιτεί επαναλαμβανόμενες εξετάσεις και ανάλυση όλης της οικογένειας. Όπως είπαμε, οι ομοζυγώτες καθώς και οι διπλοί ετεροζυγώτες έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα, ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου.

Αντίθετα, η συχνότητα ύπαρξης ανεπάρκειας PrC σε συμπτωματικά άτομα είναι περίπου 1/16000. [72] [93]

Φαινοτυπικά, διακρίνεται ο τύπος I και ο τύπος II που εκδηλώνονται με ποσοτική και ποιοτική ανεπάρκεια αντίστοιχα. Οι ασθενείς λοιπόν με ανεπάρκεια PrC μπορεί να έχουν κληρονομική ανεπάρκεια στην ποσότητα της PrC η οποία όμως είναι φυσιολογική λειτουργικά, ή μπορεί να έχουν φυσιολογικά επίπεδα από μια δυσλειτουργική πρωτεΐνη. Πολλές μεταλλάξεις (>160) έχουν περιγραφεί για κάθε διαταραχή. [65] [94]

Η ανεπάρκεια **τύπου I** χαρακτηρίζεται από μείωση εξίσου των επιπέδων τόσο της αντιγονικότητας καθώς και της δραστηριότητας, λόγω είτε μειωμένης σύνθεσης, είτε μειωμένης σταθερότητας των μη φυσιολογικών προϊόντων των αλληλίων.

Στην ανεπάρκεια **τύπου II** τα επίπεδα δραστηριότητας είναι μειωμένα σε μεγαλύτερο βαθμό από τα επίπεδα δραστηριότητας, λόγω παραγωγής και έκκρισης μιας δυσλειτουργικής πρωτεΐνης. Η ανεπάρκεια τύπου II μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω ως εξής: τύπος IIA με χαμηλή πηκτική και χαμηλή αμιδολυτική

δραστικότητα και τύπος ΠΒ με χαμηλή πηκτική αλλά φυσιολογική αμιδολυτική δραστικότητα.

Στον πίνακα 12 φαίνεται η ταξινόμηση της ανεπάρκειας της PrC, με βάση τα αποτελέσματα των εξετάσεων.

Πίνακας 12: Ταξινόμηση της ανεπάρκειας της PrC

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ PrC			
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ			
ΤΥΠΟΙ	ΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΜΙΔΟΛΥΤΙΚΗ	ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ
I (κοινός)	χαμηλή	χαμηλή	χαμηλή
IIA	χαμηλή	χαμηλή	φυσιολογική
ΠΒ	χαμηλή	φυσιολογική	φυσιολογική

Η συχνότητα της ετερόζυγης μορφής φαίνεται, όπως και στην περίπτωση της ανεπάρκειας της AT, να έχει υπερεκτιμηθεί. Σε ασθενείς με θρομβωτικές διαταραχές φαίνεται να ανέρχεται στο 2%, ενώ στο φυσιολογικό πληθυσμό σε ποσοστό κάτω του 0.2%, όπως ειπώθηκε.

Εργαστηριακές Μέθοδοι Προσδιορισμού:

Η μέτρηση της PrC προϋποθέτει τη **μη λήψη κουμαρινικών** φαρμάκων. Ασθενείς που παρουσιάζονται με θρομβοεμβολική νόσο θα έπρεπε να διερευνώνται μετά την παρέλευση 2-3 εβδομάδων από τη λήξη της θεραπείας με ηπαρίνη και κουμαρινικά αντιπηκτικά. Αν οι ασθενείς χρειάζονται μακράς διάρκειας θεραπεία, τότε θα έπρεπε να αλλάξουν την αγωγή τους σε υποδόρια χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη για 3-5 ημέρες, ώστε να γίνει η διόρθωση της επίδρασης των κουμαρινικών και να μετρηθεί η PrC.

Επιπρόσθετα, θα πρέπει να τονιστεί, πως, εξετάσεις που διενεργούνται κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, ακόμη κι αν πραγματοποιηθούν πριν την έναρξη της αγωγής με κουμαρινικά, μπορεί να είναι παραπλανητικές, λόγω αυξημένης κατανάλωσης της PrC.

Μετράται είτε η λειτουργική δραστικότητα, είτε η αντιγονικότητα της PrC.

Η **λειτουργική** δραστικότητα της PrC μετράται με τη μετατροπή της σε ενεργό μορφή με το δηλητήριο του φιδιού *Agkistrodon contortrix* και στη συνέχεια

μέτρησή της με χρονομετρική ή χρωμογόνο μέθοδο (μέτρηση aPTT ή PT). Η επιθυμητή μέθοδος είναι η χρωμογόνο μέθοδος, διότι με αυτή υπάρχει η μικρότερη παρεμβολή από εξωγενείς παράγοντες. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε σχηματισμό θρόμβου (clot-based methods) τυπικά χρησιμοποιούν ένα τροποποιημένο aPTT και υψηλές στάθμες από παράγοντα VIII ή ινωδογόνο, μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς χαμηλά επίπεδα PrC. Από την άλλη, οι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης, το αντιπηκτικό του λύκου και η ηπαρίνη μπορούν εσφαλμένα να αυξήσουν την αναφερόμενη δραστηριότητα της PrC.

Η **αντιγονικότητα** της PrC μετράται με ηλεκτροανοσοδιάχυση κατά Laurell ή με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.

Η διάγνωση της ανεπάρκειας είναι δυνατή και με ανάλυση του DNA με τη μέθοδο DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Η μοριακή ανάλυση είναι ιδιαίτερος χρήσιμη σε περιστατικά με οριακά επίπεδα ανεπάρκειας πρωτεΐνης και βεβαίως όταν αναζητείται ο κληρονομικός χαρακτήρας της νόσου. (φ.τ. πλάσματος 5μg/ml). Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια την υποκείμενη γενετική μετάλλαξη, ή τις μεταλλάξεις και μπορούν να χρησιμεύσουν ιδιαίτερα στη μελέτη οικογενειών με ανεπάρκεια PrC. [95]

Σε περίπτωση ουραιμίας, οι τιμές της PrC είναι εσφαλμένες όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι που βασίζονται σε σχηματισμό θρόμβου (clot-based methods), λόγω ύπαρξης διαλυτού αναστατή της PrC.

Για τις περισσότερες κλινικές περιπτώσεις, μια πηκτικολογική μέθοδος (clotting-based) θα έπρεπε να χρησιμοποιείται, αφού μια τέτοια μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανίχνευση των περισσότερων διαταραχών.

Πρόωρα νεογνά έχουν επίπεδα PrC περίπου 0.30 U/ml, που αυξάνονται και φτάνουν τις τιμές 0.65-140 U/ml στην ηλικία των 4 ετών, τιμές που συναντώνται και κατά την ενηλικίωση. Οι τιμές αυξάνουν με έναν ρυθμό περίπου 4% ανά δεκαετία. [96] Αρχικές μελέτες έδειξαν πως η ανεπάρκεια της PrC οδηγεί σε υψηλό κίνδυνο για εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση. Ωστόσο, μια μελέτη που παρουσιάστηκε από τους Miletich et al. [92] προκάλεσε μεγάλη σύγχυση, διότι μεγάλος αριθμός από αιμοδότες και τα μέλη των οικογενειών τους που είχαν ανεπάρκεια PrC, δεν ανέφεραν αύξηση στην εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει είτε ατελή γενετική διεισδυτικότητα με μόνο κάποιες από τις μεταλλάξεις να οδηγούν σε κίνδυνο θρόμβωσης, είτε πως κάποιος άλλος, δευτερεύων προδιαθεσικός παράγοντας

χρειάζεται για να οδηγήσει σε θρόμβωση. Η επεξήγηση αυτού του γρίφου ήρθε λίγα χρόνια αργότερα, όταν ανακαλύφθηκε πως οι ασθενείς με θρόμβωση, καθώς και οι οικογένειές τους, είχαν ανεπάρκεια PrC μαζί με μια δεύτερη κατάσταση που ονομάστηκε αντίσταση στην ενεργοποιημένη PrC που, στη συνέχεια ανακαλύφθηκε πως οφειλόταν σε μια μετάλλαξη που ονομάστηκε παράγοντας V Leiden (FVLeiden) [73], [74], [75], [97]

Αυτό το εύρημα οδήγησε στην ισχύουσα μέχρι σήμερα άποψη πως οι περισσότεροι ασθενείς με θρομβοεμβολική νόσο κατά πάσα πιθανότητα έχουν

- 2 υποκείμενες προθρομβωτικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα ανεπάρκεια PrC συν FVLeiden
- 1 παροδικό παράγοντα κινδύνου συνδυασμένο με μια θρομβοφιλική διαταραχή
- 1 μόνο, αλλά πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου.

Η λίστα των πιθανών παραγόντων που δρουν συνεργιστικά με την ανεπάρκεια της PrC συνεχώς μεγαλώνει και περιλαμβάνει, εκτός του FVLeiden που ήδη αναφέρθηκε, και την υπερομοκυστεϊναιμία, υψηλά επίπεδα FVIII και συνδυασμό με ανεπάρκεια PrS ή AT. Είναι ενδιαφέρον εδώ να σημειωθεί, πως ο πολυμορφισμός G20210A της προθρομβίνης δε φαίνεται να προσδίδει επιπλέον κίνδυνο θρόμβωσης σε άτομα με ανεπάρκεια PrC. [98]

Σε μη επιλεγμένους ασθενείς με αρχικό θρομβωτικό επεισόδιο, ο σχετικός κίνδυνος θρόμβωσης που σχετίζεται με την PrC είναι 6.5 φορές μεγαλύτερος. [84] Ο σχετικός κίνδυνος είναι αναφορικά υψηλότερος σε οικογένειες με θρομβοφιλία. [99]

Αρτηριακή θρόμβωση, ειδικά σε ενδοκράνια αγγεία λόγω κληρονομικής ανεπάρκειας της PrC είναι σχετικά σπάνια, αλλά περιγράφεται, κυρίως σε νέα άτομα. Γι' αυτό, η συγκέντρωση της PrC θα έπρεπε να προσδιορίζεται σε περιπτώσεις ισχαιμικών ΑΕΕ σε όλους τους νέους ασθενείς χωρίς άλλους μείζονες παράγοντες κινδύνου. [100]

Η εμφάνιση της νέκρωσης του δέρματος-προκαλούμενης από λήψη κουμαρινικών αντιπηκτικών (warfarin-induced skin necrosis) έχει συσχετιστεί με ανεπάρκεια της PrC. [101] [102]

Αυτές οι προοδευτικά επιδεινούμενες βλάβες του δέρματος λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της από του στόματος αντιπηκτικής αγωγής, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της δόσης εφόδου των κουμαρινικών αντιπηκτικών. Αυτό

συμβαίνει λόγω πρόωμης ελάττωσης των επιπέδων της PrC, η οποία έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής 6 ώρες ($t_{1/2}=6h$), σε σχέση με τους άλλους βιταμινο-K εξαρτώμενους παράγοντες, προκαλώντας συνεπώς μια κατάσταση υπερπηκτικότητας. Το σύνδρομο αυτό έχει περιγραφεί σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με οξεία θρομβοεμβολική νόσο και όχι σε ασθενείς που λαμβάνουν προφυλακτική αγωγή με κουμαρινικά για χρόνια κολπική μαρμαρυγή. Σε ασθενείς με γνωστή ανεπάρκεια PrC, ηπαρίνη ή χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH) θα έπρεπε να δοθεί αρχικά, τα κουμαρινικά θα έπρεπε να δοθούν σε χαμηλές δόσεις κατά την έναρξη και βαθμιαία να αυξηθεί η δόση σε θεραπευτικά επίπεδα, μέσα σε διάστημα 2-3 εβδομάδων.

[103] [104]

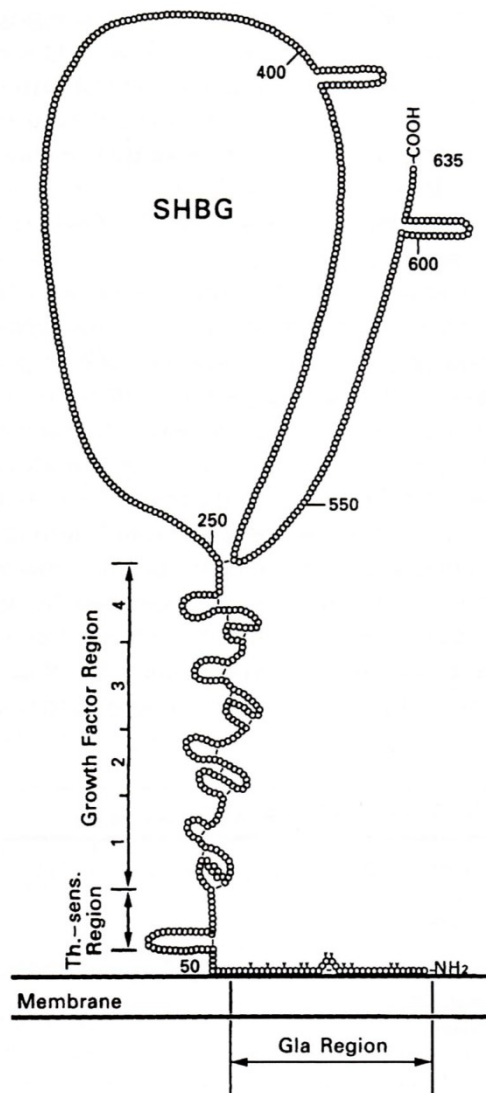
ΠΡΩΤΕΪΝΗ S (PrS)

Η πρωτεΐνη S (PrS) είναι μια βιταμινο-K εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη. Παράγεται στο ήπαρ και στο ενδοθήλιο των αγγείων, στα κύτταρα των όρχεων, των νεφρών και του εγκεφάλου, ενώ ανευρίσκεται και στα αιμοπετάλια. Στη φυσιολογία, η PrS κατέχει βασικό αντιπηκτικό ρόλο. Δρα ως συμπαράγοντας της PrC επιτείνοντας την αντιπηκτική δραστηριότητά της, βοηθώντας έτσι στην αδρανοποίηση του Va και του VIIIa, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

Το γονίδιο της PrS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3.

Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 69000 και εμφανίζεται με τη μορφή μιας μόνο πολυπεπτιδικής αλύσου.

Στην εικόνα 13 φαίνεται η δομή της Pr S.



Εικόνα 13: Μοριακή μοντέλο δομής PrS. [65]

Η PrS απεικονίζεται να είναι συνδεδεμένη με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της Gla (glutamic acid residues) περιοχής του αμινοτελικού άκρου του μορίου(NH₂). Η Th-sens region υποδηλώνει την περιοχή που είναι ευαίσθητη στη δράση της θρομβίνης. Η περιοχή SHBG είναι ομόλογη με την ορμόνη SHBG (sex hormone binding globulin) και χρησιμεύει για σύνδεση της PrS με το C4BP του συμπληρώματος. [65]

Όπως φαίνεται από την εικόνα, η PrS απαρτίζεται από διάφορες περιοχές: από το αμινοτελικό άκρο (NH₂), την περιοχή Gla (περιοχή σύνδεσης με φωσφολιπίδια), την περιοχή που είναι ευαίσθητη στη θρομβίνη, τέσσερις δομές EGF (Epidermal Growth Factor) που είναι περιοχές σύνδεσης με ασβέστιο καθώς και περιοχές με λειτουργία συνενζύμου και τέλος την περιοχή που είναι ομόλογη με τη φυλετική

ορμόνη SHBG (περιοχή σύνδεσης με το C4BP). Παρουσία ασβεστίου, το σύμπλεγμα αυτό προσκολλάται στις επιφάνειες των φωσφολιπιδίων. Ρυθμίζει επομένως τους μηχανισμούς των πηκτικών παραγόντων, διασπώντας με πρωτεόλυση τους παράγοντες V και VIII που ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη [105]. Η PrS ενισχύει τον αντιπηκτικό ρόλο της PrC πιθανά αυξάνοντας τη συγγενείά της με τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. [106]

Η όλη βιοχημεία της PrS είναι πολύπλοκη, λόγω κυρίως του γεγονότος ότι διαμορφώνει μια δυναμική ισορροπία με την πρωτεΐνη που σταθεροποιεί το C4b του συμπληρώματος, την C4b-binding protein (C4b-BP, πρωτεΐνη σύνδεσης με C4b), η οποία υπάρχει στο πλάσμα με τις ακόλουθες μορφές: [106] με τη μορφή χαμηλού μοριακού βάρους (περίπου 20% επί του συνόλου), όπου δεν υφίσταται συγγένεια με την PrS και με τη μορφή υψηλού μοριακού βάρους (περίπου 80% επί του συνόλου), στην οποία μπορεί να σταθεροποιήσει την PrS. Η PrS σχηματίζει ισομοριακό σύμπλεγμα με την προαναφερόμενη πρωτεΐνη στη δεύτερη μορφή της. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία.

Στο πλάσμα υπάρχει σε δύο μορφές:

- ως **ελεύθερη PrS** που δρα ως συμπαράγοντας της PrC (ενεργός μορφή) σε ποσοστό 40%
- ως **συνδεδεμένη** με την C4b-BP πρωτεΐνη και χωρίς δραστηριότητα, σε ποσοστό 60%.(δηλαδή, σ' αυτή τη μορφή δε δρα ως συμπαράγοντας της ενεργοποιημένης PrC)

Το άθροισμα της ελεύθερης και συνδεδεμένης PrS αποτελεί τη συνολική PrS.

Το cDNA για την ανθρώπινη PrS έχει πλήρως χαρακτηριστεί.

Σε καταστάσεις όπου παρατηρείται αύξηση του κλάσματος C4b, το οποίο ως γνωστόν αποτελεί πρωτεΐνη οξειάς φάσης (ΠΟΦ), όπως για παράδειγμα στη κύηση και σε λοιμώξεις, το συνολικό ποσό της PrS που είναι συνδεδεμένο ποικίλει ευρέως και έτσι μπορούμε να οδηγηθούμε σε μειωμένη δραστηριότητα της PrS. Από την άλλη μεριά, η σπάνια διαταραχή οικογενούς ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C4BP δεν έχει συσχετιστεί με τάση για αιμορραγικές διαταραχές.

Τα αίτια της **επίκτητης ανεπάρκειας** είναι τα ίδια με αυτά της ανεπάρκειας της AT, η οποία επίσης παράγεται από τα ηπατικά και ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως

ειπώθηκε παραπάνω. Ελάττωση της PrS έχει παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης.

Στον πίνακα 13 αναφέρονται τα αίτια επίκτητης ανεπάρκειας της PrS.

Πίνακας 13: Καταστάσεις με επίκτητη ανεπάρκεια PrS. [65]

ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ PrS
ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΛΑΣΜΑ C4BP (Πρωτεΐνη Οξείας Φάσης-ΠΟΦ, ορμονική διαταραχή)
Εγκυμοσύνη
Χρήση αντισυλληπτικών δισκίων
Σακχαρώδης Διαβήτης
Φλεγμονή (φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κλπ)
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
Άνδρες καπνιστές
AIDS
Απόρριψη αλλογενούς μεταμόσχευσης νεφρού
Νεφρωσικό σύνδρομο
ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΣΥΝΘΕΣΗ (PrS, C4BP ή και τα δύο)
Πρόωρα νεογνά ή και τελειόμηνα νεογνά
Ηπατική νόσος
Ανεπάρκεια βιταμίνης K
Θεραπεία με κουμαρινικά αντιπηκτικά
Χημειοθεραπεία για καρκίνο μαστού
ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ PrS
Αληθής πολυκυτταραιμία
Δρεπανοκυτταρική νόσος
Ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση

Η ακριβής διάγνωση και ταξινόμηση της κληρονομικής ανεπάρκειας της PrS, λόγω και του μεγάλου αριθμού των καταστάσεων που οδηγούν σε επίκτητη

ανεπάρκεια, όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, είναι πολλές φορές δυσχερής. Η επίκτητη ανεπάρκεια της PrS είναι πιο συχνή από την κληρονομική.

Η ανεπάρκεια της PrS κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο, παρόμοιο με αυτόν της ανεπάρκειας της PrC. Πάνω από 100 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν ήδη περιγραφεί στο γονίδιο της PrS. [107] Η κληρονομική ανεπάρκεια της PrS ανευρίσκεται στο 0.7% του γενικού πληθυσμού. [108]. Σχετίζεται με το 2% από μη επιλεγμένους ασθενείς που εμφανίζουν φλεβική θρόμβωση και με το 7.6% των ασθενών με ηλικία μέχρι 70 ετών και εμφάνιση θρόμβωσης. [99] [109]

Οι συγγενείς ανεπάρκειες της PrS ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: [110]

- **ανεπάρκειες τύπου I.** Χαρακτηρίζονται από μείωση του αντιγονικού επιπέδου της PrS (ολικής και ελεύθερης). Παράγεται φυσιολογική πρωτεΐνη αλλά σε μειωμένη ποσότητα.
- **ανεπάρκειες τύπου II.** Καθορίζονται από τη μείωση της δραστηριότητας της PrS που σχετίζεται με τα φυσιολογικά αντιγονικά επίπεδα της ολικής και ελεύθερης PrS. Στην ανεπάρκεια αυτή δηλαδή, παράγεται φυσιολογική ποσότητα πρωτεΐνης αλλά η πρωτεΐνη είναι ελαττωματική.
- **ανεπάρκειες τύπου III.** Παρατηρούνται μειωμένα αντιγονικά και λειτουργικά επίπεδα ελεύθερης PrS, ενώ τα επίπεδα της ολικής PrS είναι φυσιολογικά.

Οι λειτουργικές μέθοδοι μετρούν τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Η μέθοδος του ολικού αντιγόνου (total antigen assay) μετρά την ολική ποσότητα της πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από τη ποιότητα της λειτουργικότητάς της. Οι μέθοδοι που μετρούν το ελεύθερο αντιγόνο είναι ανοσολογικές μέθοδοι που μετρούν μόνον την ελεύθερη PrS (free protein S), πάλι ανεξάρτητα από τη ποιότητα της λειτουργικότητάς της. Μόνον η ελεύθερη PrS είναι ενεργή. Η PrS που είναι συνδεδεμένη με το C4b (C4b binding protein) είναι ανενεργή.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι ανεπάρκειες τύπου I έχουν μειωμένη PrS και στις δύο μεθόδους. Στην ανεπάρκεια τύπου II έχουμε φυσιολογικά επίπεδα πρωτεΐνης με μειωμένη λειτουργικότητα. Ένας υπότυπος της ανεπάρκειας τύπου II (IIa ή III) χαρακτηρίζεται από μειωμένες τιμές λειτουργικής και ελεύθερης PrS, αλλά με φυσιολογικά επίπεδα ολικής PrS. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις που προκαλούν αυξημένη σύνδεση της PrS με το C4b. Συμπερασματικά, αν

πραγματοποιηθούν μόνον αντιγονικές μέθοδοι προσδιορισμού της PrS, οι ανεπάρκειες τύπου II δεν θα γίνουν αντιληπτές. Επομένως, μια λειτουργική μέθοδος, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως αρχική εξέταση προσδιορισμού της PrS. Αν έχουμε μειωμένες τιμές, τότε θα πρέπει να ακολουθήσουν εξετάσεις προσδιορισμού της ελεύθερης PrS, ώστε να προσδιοριστεί ο τύπος της ανεπάρκειας. Αν η τιμή προκύψει μειωμένη, θα πρέπει να ακολουθήσει ο προσδιορισμός της ολικής PrS.

Η **κλινική εικόνα** της κληρονομούμενης ανεπάρκειας παρουσιάζει χαρακτηριστικά ανάλογα με την ανεπάρκεια της PrC. Άτομα ετερόζυγα για ανεπάρκεια στην PrS εμφανίζουν έναν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρομβώσεων. Ο κίνδυνός αυτός αυξάνεται περαιτέρω από την παράλληλη παρουσία κ άλλου θρομβωτικού παράγοντα. [111] Οι ετεροζυγώτες έχουν γενικά επίπεδα πρωτεΐνης 20-65% [112] ενώ εμφάνιση της θρόμβωσης παρουσιάζεται σε ηλικία 10-50 ετών.

Στην ετερόζυγη μορφή δεν παρατηρείται δερματική νέκρωση, διότι η PrS έχει μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής (ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 36-60 ώρες) από την PrC. Έτσι, οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν υποτροπιάζουσες εν τω βάθει φλεβικές θρομβώσεις, πνευμονική εμβολή, θρομβώσεις σε εγκεφαλικά και μεσεντέρια αγγεία, επιπολής θρομβοφλεβίτιδα, αρτηριακές θρομβώσεις και όλα αυτά πριν την ηλικία των 40 ετών, σπάνια όμως πριν την ηλικία των 15 ετών. Αρτηριακή θρόμβωση φαίνεται να απαντάται πιο συχνά σε ασθενείς με ανεπάρκεια PrS σε σχέση με άλλες θρομβοφιλικές καταστάσεις και έχει συχνά συσχετιστεί με κάπνισμα, παχυσαρκία, ή άλλους επίκτητους παράγοντες κινδύνου. [72]

Εργαστηριακός προσδιορισμός: Επειδή η αξιολόγηση αφορά στην ελεύθερη αλλά και στην ολική PrS, ελέγχεται η λειτουργικότητα αλλά κυρίως η αντιγονικότητα της ελεύθερης. Δηλαδή, η παρουσία των δύο τύπων PrS στο πλάσμα μπορεί να περιπλέξει τις εργαστηριακές πρακτικές. Η ισορροπία μεταξύ των δύο τύπων εξαρτάται από τη λειτουργική ακεραιότητα και των δύο πρωτεϊνών, καθώς και από τη συγκέντρωση του C4BP.

Μια λειτουργική μέθοδος θα πρέπει να γίνει στην αρχή όπως ειπώθηκε παραπάνω, ώστε να μπορέσουν να αναγνωριστούν όλες οι τυχόν υπάρχουσες ανεπάρκειες. Η εξέταση για την ελεύθερη PrS (free antigen assay) χρειάζεται να διενεργηθεί μόνον όταν η λειτουργική εξέταση επιδείξει μειωμένη τιμή, και η εξέταση της ολικής PrS (total antigen assay) μόνον εφόσον η ελεύθερη είναι

μειωμένη, για να προσδιοριστεί ο τύπος της ανεπάρκειας. Αν οι αντιγονικές μέθοδοι διενεργηθούν χωρίς την διενέργεια της λειτουργικής μεθόδου, συγκεκριμένοι τύποι ανεπάρκειας δεν θα αναγνωριστούν, όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 14: Ταξινόμηση κληρονομικής ανεπάρκειας PrS

Τύπος	Λειτουργική Protein S	Ελεύθερη Protein S	Ολική Protein S
		(Free Antigen Assay)	(Total Antigen Assay)
I	Χαμηλή	Χαμηλή	Χαμηλή
II (Επίσης IIb)	Χαμηλή	Φυσιολογική	Φυσιολογική
III (Επίσης IIa)	Χαμηλή	Χαμηλή	Φυσιολογική

Λειτουργικές μέθοδοι (functional-activity assays): Η πρωτεΐνη μετράται με βάση την ικανότητά της να λειτουργεί ως συμπάροντας για την αποδόμηση των ενεργοποιημένων παραγόντων FV και FVIII με τη μεσολάβηση της ενεργοποιημένης PrC. Επομένως οδηγεί σε παράταση του PT, aPTT.

Ελεύθερο αντιγόνο (free antigen-immunoassay): Μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για την ελεύθερη, μη συνδεδεμένη PrS χρησιμοποιούνται σε μέθοδο ELISA (enzyme linked immunoassay). Ανοσολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν διάφορους τρόπους για να διαχωρίσουν (για παράδειγμα επώαση) ή για να απομακρύνουν (polyethylene glycol-PEG, προσρόφηση) τη σύμπλοκη μορφή, επιτρέπουν την ποσοτική μέτρηση της συνδεδεμένης PrS, της ελεύθερης PrS ή και των δύο (ολική PrS). Αυτή η μέθοδος έχει πλέον αντικατασταθεί από την νέα ELISA και τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, οπότε το στάδιο επώασης με PEG δεν είναι πλέον αναγκαίο. Αυτό έχει οδηγήσει σε σημαντική βελτίωσή της.

Η παλιά μέθοδος που χρησιμοποιείται σε αρκετά εργαστήρια ακόμη και σήμερα, περιλαμβάνει καθίζηση του συμπλέγματος PrS/C4b και στη συνέχεια ποσοτικό προσδιορισμό της ελεύθερης PrS με ηλεκτροανοσοδιάχυση κατά Laurell (φτ 70-140%). [113] [114] [115] [116]

Ολικό Αντιγόνο (total antigen, immunoassay): μετράται η ολική, ελεύθερη και συνδεδεμένη PrS. Εναλλακτική μέθοδος χρησιμοποιεί σωματίδια Latex (latex particles).

Τροποποιημένη ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA ή μέθοδοι στηριζόμενοι στο PT, aPTT φαίνεται ότι είναι εξίσου αξιόπιστες. Άτομα με συγγενή έλλειψη PrS έχουν επίπεδα ελεύθερης PrS κάτω από 40% (φτ πλάσματος 15μg/ml)

Φυσιολογικές παραλλαγές συναντάμε στις εξής περιπτώσεις: χαμηλότερες μέσες τιμές ελεύθερου κλάσματος PrS σε φυσιολογικές γυναίκες παρά άνδρες, στην εγκυμοσύνη, σε λήψη αντισυλληπτικής αγωγής. [115] [117] [118] Επίσης χαμηλές τιμές ολικής και ελεύθερης PrS παρατηρούνται σε νεογέννητα. [89] Η τιμή της PrS φτάνει στα επίπεδα των ενηλίκων στην ηλικία των 6 μηνών.

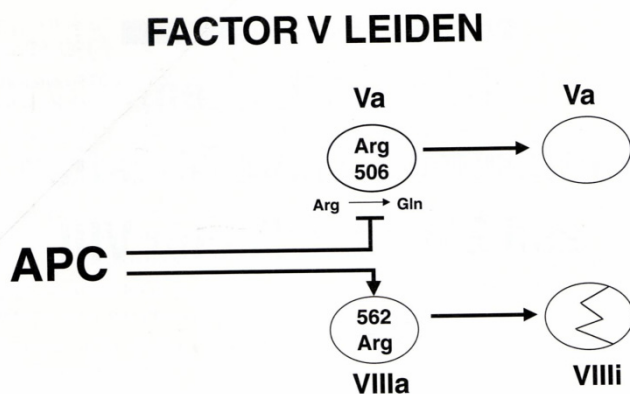
Είναι ασυνήθιστο σε έναν ασθενή να υπάρχουν παράλληλα και οι δύο ανεπάρκειες, δηλαδή ανεπάρκεια PrC και PrS ταυτόχρονα. Αυτές οι δύο καταστάσεις είναι τόσο σπάνιες που είναι σχεδόν απίθανο να βρεθεί ασθενής που να εμφανίζει ταυτόχρονα και τις δύο. Εντούτοις, επειδή η δράση και των δύο εξαρτάται από την καρβοξυλίωση της βιταμίνης K, όταν τα επίπεδα και των δύο πρωτεϊνών βρεθούν χαμηλά στον ίδιο ασθενή, είναι εξαιρετικά πιθανόν ότι αυτό σημαίνει πως ο ασθενής αυτός ελάμβανε κουμαρινικά αντιπηκτικά κατά τη λήψη αίματος για την εξέταση.

Επειδή λοιπόν προκύπτουν διάφορα τέτοιου είδους προβλήματα, ο έλεγχος των ανωτέρω πρωτεϊνών πρέπει να γίνεται 2 με 3 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της αντιπηκτικής αγωγής.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C (APC-R, APCResistance) / ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ V LEIDEN (FVL)

Όπως έχει ήδη ειπωθεί, η πρωτεΐνη C στην ενεργοποιημένη της μορφή, είναι ένας φυσικός αναστολέας της πήξης, ο οποίος διασπά τους ενεργοποιημένους παράγοντες Va και VIIIa, καθιστώντας τους ανενεργούς να συμμετάσχουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X σε Xa καθώς και της προθρομβίνης σε θρομβίνη.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα V βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q23 και ο πιο μελετημένος πολυμορφισμός του FV είναι η σημειακή μετάλλαξη 1691G4A, η οποία οδηγεί στην αλλαγή των αμινοξέων Arg506Gln (rs6025), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C(APCResistance).



Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης FVLeiden.

Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) διασπά τη βαριά αλυσίδα του παράγοντα V (FV) σε τρία σημεία, τα R306, R506 και R679.

Το 1993 οι Dahlback και συν., [73] περιέγραψαν οικογένειες με θρόμβωση, το πλάσμα των μελών των οποίων ήταν ανθεκτικό στην επίδραση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Η κατάσταση αυτή ονομάστηκε **αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated protein C resistance-APCR)** και ενοχοποιείται για εμφάνιση φλεβικών θρομβώσεων. Η κατάσταση αυτή είναι κληρονομούμενη και προέρχεται από σημειακή μετάλλαξη του μορίου του παράγοντα V και συγκεκριμένα από την αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από τη αργινίνη στη θέση 506 (FV506 Gln-Arg). Αυτή η μετάλλαξη αναφέρεται και ως παράγοντας Leiden (FVLeiden-FVL) και πήρε το όνομα από μια πόλη της Ολλανδίας. Σε μοριακό επίπεδο, υπάρχει η εξής αλλαγή: αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη στη θέση 1691 (FV1691G-A). Αυτή λοιπόν η σημειακή μετάλλαξη (missense mutation), μετατρέπει τον παράγοντα Va σε ανθεκτικό στην πρωτεολυτική δράση της ενεργοποιημένης PrC, έτσι ώστε ο Va παραμένει και δεν αδρανοποιείται.

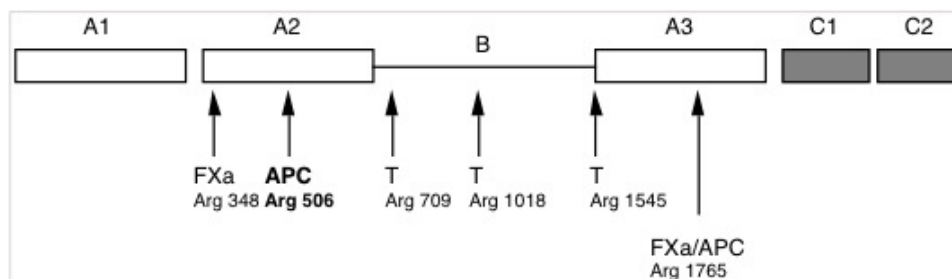
Το 95% των ατόμων που εμφανίζουν APCR, οφείλεται στην παρουσία του FVL. Είναι η πιο κοινή από τις γνωστές γενετικές διαταραχές. Περίπου 3-8% της Καυκάσιας φυλής είναι ετερόζυγοι για τον παράγοντα Leiden, περίπου 1/1000 είναι ομόζυγοι. [119] [120] Ιάπωνες, Ινδιάνοι, Αφρικανοί, Ινδονήσιοι και Εσκιμώοι παρουσιάζουν πολύ χαμηλά ποσοστά. [121] [122]

Μετά από αυτή τη μετάλλαξη βρέθηκαν και άλλες μεταλλάξεις λιγότερο συχνές, όπως μετάλλαξη στο σημείο διάσπασης R306, η οποία αναφέρεται ως

παράγοντας V-Cambridge (FV-Cambridge R306T). Και εδώ υπάρχει παθολογική δοκιμασία και κίνδυνος για θρομβώσεις. [123]

Είναι επομένως σαφές, πως σε ένα ποσοστό ατόμων, περίπου 5%, με παθολογική δοκιμασία APCR δε συνυπάρχει FVLeiden. Πιθανά πρόκειται για άλλη γενετική βλάβη, όπως για παράδειγμα τη μετάλλαξη R306T (FVCambridge) ή άλλη μετάλλαξη που δεν έχει εντοπιστεί ακόμη.

Στο ίδιο σημείο διάσπασης έχει περιγραφεί κι άλλη μετάλλαξη, γνωστή ως παράγοντας Hong-Kong (FV Hong-Kong R306G). Η μετάλλαξη αυτή, αντίθετα με τις άλλες δύο, συνοδεύεται από φυσιολογική δοκιμασία APCR, έχει όμως κι αυτή περιγραφεί σε ασθενείς με θρομβωτικές εκδηλώσεις. [124]



Όπου T: σημείο διάσπασης θρομβίνης

Εικόνα 15: Σημεία διάσπασης/μεταλλάξεις

Εκτός από την κληρονομική αντίσταση στην ενεργοποιημένη PrC, υπάρχει και η επίκτητη διαταραχή. Έτσι, δύναται να υπάρχει σε άτομα με αντιπηκτικό του Λύκου, σε άτομα με αυξημένο τον παράγοντα VIII, γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή, στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, στην εγκυμοσύνη, στη λήψη ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (HRT), καθώς και σε άλλες καταστάσεις. [82] [125] [126] [127]

Θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα πως η παρουσία του FVLeiden δεν αποτελεί ασθένεια από μόνη της. Αποτελεί μια γενετική παραλλαγή, που έχει συσχετιστεί με μια μέτρια αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης (3X-4X) κατά τη διάρκεια της ζωής, σε σχέση με άτομα που δεν εμφανίζουν αυτή την παραλλαγή. [128]

Ωστόσο, ο απόλυτος κίνδυνος εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης είναι μάλλον χαμηλός, με το 80% των ατόμων να μην αναπτύσσουν ποτέ θρομβοεμβολική νόσο μέχρι την ηλικία των 80 ετών. [129]

Σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη που δημοσιεύτηκε το 1995, φάνηκε πως η συχνότητα ύπαρξης FVLeiden σε ασθενείς με ΑΕΕ δεν ήταν μεγαλύτερη από αυτή σε άτομα χωρίς ΑΕΕ. Επίσης, παρόμοια αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν για συσχέτιση του FVLeiden με έμφραγμα του μυοκαρδίου, με αποτέλεσμα οι συγγραφείς να οδηγηθούν στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρχε συσχέτιση του FVLeiden με αυτές τις νόσους. [49]

Επίσης, υπάρχουν και άλλες μελέτες στις οποίες φαίνεται πως η συχνότητα της ύπαρξης FVLeiden κυμαίνεται από 3.8%-8% σε ασθενείς με ΑΕΕ και δε διαφέρει σημαντικά από άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. [130] [131]

Ωστόσο, είναι πιθανόν πως αν ο FVLeiden είναι ένας ασθενής παράγοντας κινδύνου για ΑΕΕ, η επίδραση του οποίου σε πιο ηλικιωμένους ασθενείς κυρίως, ίσως επισκιάζεται από άλλους, πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου, όπως η αρτηριακή υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα.

Ας σημειωθεί εδώ, πως οι περισσότερες συσχετίσεις του FVLeiden και ΑΕΕ έχουν παρατηρηθεί στα παιδιά. [132] [133]

Επειδή ο FVLeiden είναι σχετικά συχνός στο γενικό πληθυσμό, όπως αναφέρθηκε στους Καυκάσιους υπάρχει ετεροζυγωτία σε ποσοστό 3-8%, η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ γονιδίων (δηλαδή δύο ή περισσότερες μεταλλάξεις στο ίδιο άτομο) ή η αλληλεπίδραση γονιδίων-περιβάλλοντος (για παράδειγμα FVLeiden και λήψη αντισυλληπτικών δισκίων) είναι υπερβολικά κοινή. Για την ακρίβεια, η μεγάλη πλειοψηφία θρομβώσεων είναι πιθανότερο να εμφανιστεί σε άτομα με παρουσία διαφόρων διαταραχών. Έχει ήδη καταδειχθεί ότι ο πολυμορφισμός A4070G (FV1299 His-Arg) στο εξόνιο 13 του γονιδίου του FV, που ανήκει στον επονομαζόμενο απλότυπο R2 επηρεάζει τα επίπεδα του FV στο αίμα και στην εμφάνιση της APC resistance. [134]

Διπλή ετεροζυγωτία από FV G1691A και FV A4070G επιφέρει υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικής νόσου από την ύπαρξη μόνο της μετάλλαξης FV G1691A. [135] Έτσι, η παρουσία και δεύτερου κληρονομικού παράγοντα πολλαπλασιάζει την πιθανότητα θρόμβωσης.

Στον πίνακα 15 που παρατίθεται, φαίνεται αυτή η συσχέτιση καθώς και η αύξηση της πιθανότητας θρόμβωσης σε περίπτωση συνύπαρξης περισσότερων του ενός παραγόντων κινδύνου.

Πίνακας 15: Σχετικός κίνδυνος εμφάνισης αρχικού επεισοδίου φλεβικής θρόμβωσης [136]

Κατάσταση	Σχετικός Κίνδυνος (Relative risk)
Υπερομοκυστεϊναιμία	2.5
FVL ετεροζυγωτία	3-10
FVL ομοζυγωτία	79
Μετάλλαξη Prothrombin G20210A	1-5
Μετάλλαξη Prothrombin G20210A + FVL	6-10

Εργαστηριακή διάγνωση APCR: Η κλασσική δοκιμασία (βιολογική μέθοδος) APCR είναι η εξής: εκτελούνται δύο αντιδράσεις aPTT, μία με την παρουσία προσεκτικά ελεγμένης ποσότητας APC (ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C) και μία χωρίς APC. Το αποτέλεσμα μπορεί να εκφραστεί ως επιμηκυσμένος aPTT παρουσία APC ή συνήθως ως λόγος aPTT παρουσία APC προς aPTT απουσία APC. Χαμηλός λόγος, για παράδειγμα 1.6 συνηγορεί για ύπαρξη APCR (φυσιολογικές τιμές:2-2.6). Περιορισμοί αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν: Δείγματα ασθενών με αντιπηκτική αγωγή (ηπαρίνη ή αντιπηκτικά από το στόμα), ύπαρξη αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και αύξηση του παράγοντα VIII-δεν είναι κατάλληλα για δοκιμασία. Μπορούμε όμως στο ηπαρινισμένο δείγμα να εξουδετερώσουμε την ηπαρίνη με θειική πρωταμίνη. Σήμερα χρησιμοποιείται τροποποιημένη βιολογική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στην προσθήκη πλάσματος με έλλειψη του παράγοντα V, έτσι ώστε να προαραιώνεται το πλάσμα του ασθενούς και να διορθώνεται η πιθανή παρουσία αντιβιταμινών K ή να ελαττώνονται πιθανά αυξημένα επίπεδα VIII. Η ευαισθησία της μεθόδου ξεπερνά το 95%.

Επίσης σήμερα χρησιμοποιείται άλλη τροποποιημένη μέθοδος με διαλυτό ιστικό παράγοντα (dilute tissue factor). Η ποσότητα της ενδογενούς παραγωγής θρομβίνης υπολογίζεται με μέτρηση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (area under the thrombin-generation curve). Αυτή η μέθοδος φαίνεται να έχει αυξημένη ευαισθησία.

Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν:

- Τροποποιημένο aPTT με προαραίωση με πλάσμα με ελαττωμένο FV: Προαραίωση (1/4) πλάσματος του ασθενούς με πλάσμα με ελαττωμένο FV πριν την προσθήκη APC και Ca. Μ' αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι εξωγενείς παράγοντες που μπορεί να υπεισέρχονται στις παθολογικές τιμές, όπως για παράδειγμα αυξημένα επίπεδα FVIII και κάνει την εξέταση ειδική για **μεταλλάξεις μόνον του FV**. Παρ' ολ' αυτά, η παρουσία αντιπηκτικού του λύκου μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένους χρόνους, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Αυτή είναι και η κύρια αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, αν το τεστ χρησιμοποιείται ως screening test.
- Russel Viper Venom Assay: Βασίζεται στον dilute Russel Viper Venom Time (DRVVT). Ο DRVVT είναι παρατεταμένος, όταν το δείγμα πλάσματος έχει επωαστεί με ένα δηλητήριο φιδιού (*Agkistrodon contortrix contortrix*) το οποίο έχει ενεργοποιήσει την PrC. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ο λόγος του DRVVT με και χωρίς την προσθήκη του δηλητηρίου.

Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος, επιβάλλεται να ακολουθήσει η μοριακή μέθοδος για την αποκάλυψη του FVLeiden ή του FVCambridge.

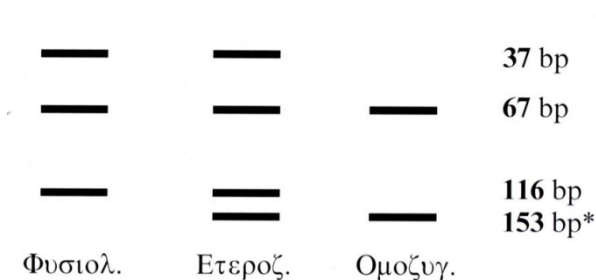
Μοριακή Μέθοδος Ανίχνευσης FVLeiden

Η μοριακή μέθοδος στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Χρησιμοποιούνται εκκινητές (primers) ολιγονουκλεοτίδια μήκους περίπου 20 βάσεων, τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), Taq πολυμεράση και ιόντα μαγνησίου (Mg). Τα στοιχεία αυτά προστίθενται σε κλειστό σωληνάριο που περιέχει το εκχυλισμένο DNA του δείγματος αίματος. Σε αυτόματο θερμοκυκλοποιητή (thermocycler) λαμβάνει χώρα διαδικασία τριών σταδίων σε κάθε κύκλο η οποία μπορεί να χρησιμοποιεί διάφορα πρωτόκολλα. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο είναι και το παρακάτω: Διαχωρισμός της διπλής έλικας DNA στους 91° C για 40 sec, προσκόλληση των primers (primers annealing) δίπλα στην αλληλουχία στόχο στους 55° C για 40 sec και σύνθεση DNA στους 71° C για 2 min με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των dNTPs. Το πρωτόκολλο αυτό ανάλογα με το εργαστήριο επιδέχεται τροποποιήσεις. Όλες οι νέες αλυσίδες χρησιμεύουν ως πρότυπα (templates) για τους επόμενους κύκλους και περιέχουν την αλληλουχία στόχο (target). Μετά από 20 κύκλους η μεγέθυνση της αλληλουχίας στόχου (amplification) είναι

περίπου 1 εκατομμύριο φορές, μέσα σε διάστημα μιας ώρας περίπου. Το στάδιο της ανίχνευσης πραγματοποιείται με ενζυματική διάσπαση του προϊόντος της PCR χρησιμοποιώντας περιοριστικό ένζυμο, το Mnl I. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης (agarose gel) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide). Φυσιολογικά, το ένζυμο αναγνωρίζει δύο αλληλουχίες τις οποίες και κόβει και έτσι παίρνουμε τρία θραύσματα (fragments), ενώ σε ύπαρξη μετάλλαξης, επειδή ακριβώς αλλάζει η αλληλουχία, το συγκεκριμένο ένζυμο αναγνωρίζει μόνον τη μία, την οποία και κόβει και παίρνουμε δύο θραύσματα.



Εικόνα 16: Προϊόντα PCR σε φυσιολογικό και σε άτομο με μετάλλαξη.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε φυσιολογικό, άτομο ετερόζυγο και άτομο ομόζυγο.

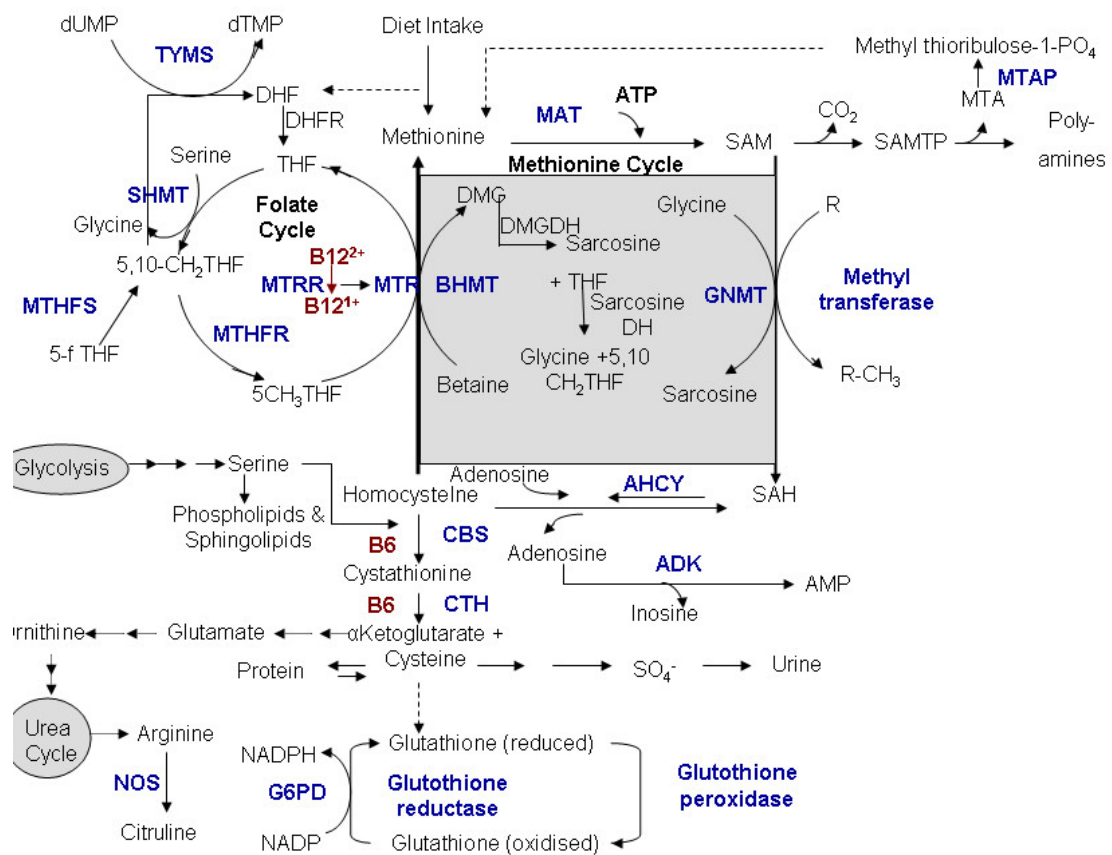
*bp(base pairs): ζεύγη βάσεων

ΟΜΟΚΥΣΤΕΪΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ, παρόν σε όλα τα υγρά του σώματος, που δε λαμβάνεται από την καθημερινή διατροφή και προέρχεται από το μεταβολισμό/απομεθυλίωση του βασικού αμινοξέος μεθειονίνη. Δύο ένζυμα και τρεις βιταμίνες παίζουν ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της κυκλοφορούσας ομοκυστεΐνης στον

οργανισμό. Το πρώτο ένζυμο ονομάζεται CBS (Cystathione B synthetase) και ελέγχει τον καταβολισμό της ομοκυστεΐνης στο μεταβολικό δρόμο της τρανσουλφουρυλίωσης (transsulfuration) και όταν έχει βλαφθεί σοβαρά, οδηγεί στην κληρονομική μεταβολική διαταραχή ομοκυστινουρία.

Το δεύτερο ένζυμο, αναγωγή του μεθυλενο-τετραϋδροφολικού οξέος (MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase) εμπλέκεται στο μεταβολικό δρόμο της επαναμεθυλίωσης (remethylation) στον οποίο η ομοκυστεΐνη μετατρέπεται σε μεθειονίνη.



Εικόνα 18: Μεταβολισμός Ομοκυστεΐνης [137]

Όπως φαίνεται από τα σχήματα του μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης, η αντίδραση είναι αμφίδρομη δυναμική: η ομοκυστεΐνη μετατρέπεται με επαναμεθυλίωση ξανά σε μεθειονίνη με κύριο δότη μεθυλικών ομάδων το 5-methyl tetrahydrofolate και με συνένζυμο τη βιταμίνη B12. Το 5-methyl tetrahydrofolate προέρχεται από το 5-10 methylene tetrahydrofolate με τη δράση του ενζύμου MTHFR. Η ομοκυστεΐνη μετατρέπεται σε κυσταθεινίνη με τη βοήθεια του ενζύμου

CBS (Cystathionine β -synthetase) και την παρουσία της βιταμίνης B6 που δρα ως συνένζυμο προσθέτοντας δισουλφιδικούς δεσμούς τόσο στην ομοκυστεΐνη, όσο και στην κυστεΐνη. [137]

Τα επίπεδα ομοκυστεΐνης ρυθμίζονται μέσω των παραπάνω δύο μεταβολικών οδών: επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη ή επανασουλφυλίωση της ομοκυστεΐνης σε κυστεΐνη. Η τρανσουλφυλίωση είναι σημαντική, όχι μόνο για τη σύνθεση της κυστεΐνης, αλλά και για τον καταβολισμό της περίσσειας της ομοκυστεΐνης από τον κύκλο της μεθειονίνης. Η διαδικασία της παραγωγής ομοκυστεΐνης από τη μεθειονίνη γίνεται ενδοκυτταρίως.

Ο κύκλος του φυλλικού οξέος λαμβάνει χώρα σε όλους τους ιστούς και, όπως φαίνεται από το σχήμα, είναι βιταμινο K-εξαρτώμενος. Στο πλάσμα η ομοκυστεΐνη μπορεί να υπάρχει με τη μορφή της ελεύθερης, της δισουλφιδικής και της μικτής ομοκυστεΐνης, ενώ όλες οι παραπάνω μορφές συναντώνται τόσο ελεύθερες, όσο και συνδεδεμένες με λευκώματα. Η επαναμεθυλίωση, ο κύριος μεταβολικός δρόμος της ομοκυστεΐνης, είναι υπεύθυνη για τα επίπεδα νηστείας ομοκυστεΐνης πλάσματος.

Είναι αξιοσημείωτο δε, πως διαταραχές στη διαδικασία επαναμεθυλίωσης δεν επηρεάζουν τη διαδικασία επανασουλφυλίωσης, ενώ αντίθετα, διαταραχές της επανασουλφυλίωσης μπορούν να επηρεάσουν την επαναμεθυλίωση.

Οι οποιοσδήποτε λοιπόν παρεκκλίσεις στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης συσχετίζονται και με αντίστοιχες διαταραχές. Πρώτος ο Mc Cully το 1969 [138] περιέγραψε συσχέτιση μεταξύ υπερομοκυστεΐναιμίας και αθηροσκλήρωσης στην ομοκυστινουρία. Έκτοτε, πλήθος εργασιών έχουν δει το φως της δημοσιότητας, με διάφορα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και διάφορες ασθένειες. Η αύξηση της ομοκυστεΐνης έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας αυξημένου κινδύνου για θρομβοεμβολική νόσο.

Η μετάλλαξη στη θέση 677 (G677T) για το ένζυμο MTHFR επηρεάζει το ένζυμο και το μετατρέπει σε θερμοευμετάβλητο (thermolabile) με επακόλουθη ήπια απώλεια της ενζυματικής του δράσης κι αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης.

Περίπου 10-15% [139] [140] του γενικού πληθυσμού είναι ομόζυγοι γι' αυτή τη μετάλλαξη, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υπερομοκυστεΐναιμία, σε περίπτωση διαιτητικής μείωσης του φυλλικού οξέος. Αυτή η C677T ομοζυγωτία σχετίζεται με τριπλάσια αύξηση πρώιμης εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με ήπια

ομοκυστεϊναιμία ακόμη και χωρίς την ύπαρξη άλλων γνωστών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης. [139] [141] [142]

Η μετάλλαξη αυτή φαίνεται να είναι πιο συχνή στους Ισπανόφωνους της Αμερικής, φτάνοντας το 25%. [143] Αντίθετα, οι African Americans έχουν τη μικρότερη συχνότητα, 0-1%. [143] [144]

Μια χρόνια διαιτητική ανεπάρκεια φυλλικού οξέος συνήθως απαιτείται προτού μια ομοζυγωτική διαταραχή του MTHFR οδηγήσει σε υπερομοκυστεϊναιμία. Συμπληρώματα διατροφής που εμπεριέχουν φυλλικό και μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα φυλλικού πάνω από το μέσο όρο μπορούν να εμποδίσουν την υπερομοκυστεϊναιμία. Η αύξηση του φυλλικού φαίνεται να σταθεροποιεί το μεταλλαγμένο ένζυμο και να του επιτρέπει να λειτουργήσει φυσιολογικά.[145]

Στις ΗΠΑ, έχουν εμπλουτιστεί με φυλλικό οξύ τα δημητριακά και το αλεύρι, με αποτέλεσμα μια καλή διατροφική συνήθεια όπως η χρήση δημητριακών για το πρωινό γεύμα να οδηγεί σε επίπεδα ομοκυστεϊνης στα φυσιολογικά επίπεδα σε μικρό χρονικό διάστημα. [146]

Ανεπάρκειες σε βιταμίνη B6, B12 ή φυλλικό οξύ λόγω ανεπαρκούς διαιτητικής πρόσληψης ή νόσου μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεϊνης πλάσματος. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης, πως τα επίπεδα ομοκυστεϊνης είναι υψηλότερα στους άνδρες και αυξάνουν με την αύξηση της ηλικίας.

Εκτός από αυτή τη μετάλλαξη, έχουν περιγραφεί διάφορες άλλες σημειακές μεταλλάξεις, οι πιο κοινές των οποίων είναι οι εξής:

- 1068 T/C
- 1178+31T/C
- 1317T/C
- 1298A-C

Η μετάλλαξη του ενζύμου που εντοπίζεται στη θέση 1298 (αντικατάσταση της κυτοσίνης από αλανίνη), δεν έχει συσχετιστεί με υψηλή ομοκυστεϊνη στο αίμα αλλά η ταυτόχρονη συνύπαρξη σε ετερόζυγη κατάσταση των δύο μεταλλάξεων (θέσεις 677 και 1298), έχει τις ίδιες επιπτώσεις όπως η 677T σε ομοζυγωτία.[139] [147] [148] [149] [150] [151] [152]

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που πρέπει να σημειωθεί, έχει σχέση με τις τιμές αναφοράς σε φυσιολογικό πληθυσμό. Σύμφωνα λοιπόν με τα περισσότερα

βιβλιογραφικά δεδομένα, οι τιμές αυτές ποικίλουν και θα έπρεπε να καθορίζονται με βάση τον εκάστοτε πληθυσμό κάθε φορά.

Παθογενετικοί Μηχανισμοί: Μια σειρά από εργαστηριακές μελέτες έχει καταδείξει πως η ομοκυστεΐνη είναι επιβλαβής για το ενδοθήλιο των αγγείων, κυρίως μέσω καταστολής της σύνθεσης του αγγειοδιασταλτικού νιτρικού οξειδίου (NO) με αποτέλεσμα διαταραχή της αγγειοδιαστολής. [153] [154] [155] [156]

Εκτός αυτού έχουν περιγραφεί και άλλοι παθογενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με με αυξημένα επίπεδα TF, παράγοντα VIII [157] ελάττωση έκφρασης θρομβομοδουλίνης (TM) και πρωτεΐνης S (PrS), ελάττωση ινωδολυτικής δραστηριότητας και αύξηση προσκόλλησης αιμοπεταλίων.

Αίτια υπερομοκυστεΐναιμίας: Τα αίτια που μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα είναι πολλά και ετερογενή, ενώ μπορεί να χωριστούν αδρά σε γενετικά και εξωγενή.

Στον πίνακα 16 φαίνονται τα κυριότερα από αυτά.

Πίνακας 16: Παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα ομοκυστεΐνης πλάσματος. [158]

ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΙΤΙΑ
1. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
Δίαιτα
Δυσαπορρόφηση
Μεταβολικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων αλκοόλ και φαρμάκων
Αυξημένες ανάγκες και αυξημένες απώλειες (πχ κύηση)
2. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗΣ
Δίαιτα
Διαταραχές γαστρεντερικού
Μεταβολικές διαταραχές
3. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Β6
Διαταραχές πρόσληψης
Ανταγωνιστές της βιτ. Β6: φάρμακα και φυσικοί ανταγωνιστές
4. ΝΟΣΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΥΠΟΡΟΜΟΚΥΣΤΕΙΝΑΙΜΙΑ
Νεφρική ανεπάρκεια

Καρκίνος
Ψωρίαση
Αυτοάνοσα νοσήματα: ρευματοειδής αρθρίτις, ΣΕΛ
Υποθυρεοειδισμός
5. ΦΑΡΜΑΚΑ
Ορμόνες: ορμόνες αναπαραγωγής, ινσουλίνη
Αντιεπιληπτικά φάρμακα
Νιτρικό οξύ
Υπολιπιδαιμικά φάρμακα
Μετοφορμίνη
D-πενικιλλαμίνη
Γαστρικοί ppi's
Άλλα φάρμακα (L-dopa, σουλφασαλαζίνη, μεγάλες δόσεις βιτ. C)
6. ΔΙΑΦΟΡΑ
Μεγάλη ηλικία
Άρρεν φύλο
Γαστροπλαστική
Σύνδρομο Down
Αυξημένη μυϊκή μάζα
7. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΖΩΗΣ
Άσκηση
Κάπνισμα
Κατανάλωση αλκοόλ
Κατανάλωση καφέ
Κατανάλωση βιταμινούχων και πρωτεϊνούχων σκευασμάτων
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΙΤΙΑ
1. ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CBS(Cystathione β-synthetase)
2. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ
Κληρονομική διαταραχή της απορρόφησης του φυλλικού οξέος
Ανεπάρκεια του ενζύμου MTHFR
Ανεπάρκεια της glutamate forminotransferase

3. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΤ/ΧΕΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ, ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗΣ
Ανεπάρκεια της τρανσκοβαλαμίνης
Ανεπάρκεια ενδογενούς παράγοντα
Διαταραχή μεταφοράς κοβαλαμίνης μέσω των κυττάρων του εντερικού σωλήνα
4. ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗΣ
Ανεπάρκεια adenosyl-κοβαλαμίνης
Συνδυασμένη ανεπάρκεια adenosyl-κοβαλαμίνης και methyl-κοβαλαμίνης
Ανεπάρκεια methyl-κοβαλαμίνης, MTHFR και συνθάσης της μεθειονίνης
5. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΦΥΛΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΟΒΑΛΑΜΙΝΗΣ
MTHFR
Συνθάση μεθειονίνης
Methionine synthase reductase

Εργαστηριακός Προσδιορισμός: Η τιμή της ομοκυστεΐνης του πλάσματος επηρεάζεται από την περιεκτικότητα της τροφής σε πρωτεΐνη, γι' αυτό και η μέτρησή της γίνεται σε δείγμα νηστείας.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης περιλαμβάνουν την υγρή χρωματογραφία υψηλής τάσης (HPLC) με χρήση ισοτόπων, αλλά και ανοσοενζυμικές μεθόδους, είτε κλασσικές (μικρο-ELISA) και μέτρηση με φασματοφωτόμετρο, είτε ανοσοενζυμικές με χρήση πολωμένου ανοσοφθορισμού. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα αναδεικνύουν τις ανοσολογικές μεθόδους ως προτιμότερες, λόγω τόσο κόστους, όσο και ακρίβειας στο αποτέλεσμα.

Τα κύτταρα του αίματος παράγουν συνεχώς ομοκυστεΐνη, με αποτέλεσμα να αυξάνει η τιμή της κατά 10% κάθε ώρα παραμονής του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου. Γι' αυτό και επιβάλλεται άμεση φυγοκέντρηση του δείγματος.

Αυτός ήταν και ο κυριότερος λόγος μη προσδιορισμού της συγκεκριμένης παραμέτρου σε όλα τα δείγματα στην παρούσα μελέτη, ώστε να αποφευχθούν τυχόν λανθασμένα συμπεράσματα λόγω μη έγκαιρης φυγοκέντρησης των δειγμάτων και λήψης εσφαλμένων παθολογικών τιμών.

Η διάγνωση των μεταλλάξεων των διαφόρων γονιδίων γίνεται με μεθόδους PCR.

Αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης έχουν σαφώς συσχετιστεί με πρόωρα εμφανιζόμενη αγγειακή νόσο, τόσο αρτηριακή, όσο και φλεβική. Η σπάνια ομόζυγη

γενετική διαταραχή ομοκυστινουρία απαντάται ως αποτέλεσμα διαφόρων μεταλλάξεων στο ένζυμο-κλειδί CBS του μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης και έχει ως αποτέλεσμα εμφανώς αυξημένα ποσά ομοκυστεΐνης πλάσματος. Αυτή η σοβαρή διαταραχή σχετίζεται με νευρολογικές διαταραχές, μαρφανοειδή χαρακτηριστικά, έκτοπους φακούς, πρόωμη αθηρωμάτωση και, το πιο σημαντικό, αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ II ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ G20210A (FII G20210A)

Ο πολυμορφισμός FII G20210A αποτελεί το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας, σαφώς καθορισμένο θρομβοφιλικό παράγοντα. [159]

Αποτελεί μια σημειακή μετάλλαξη που καταλήγει σε αυξημένα επίπεδα FII ή αλλιώς προθρομβίνης.

Οι Poort και συν., το 1996 [76] περιέγραψαν αυτή τη μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης, η οποία συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης στην κυκλοφορία, όπως έχει ειπωθεί. Η μετάλλαξη αφορά μια μετατροπή της γουανίνης σε αδενίνη στη θέση 20210 σε μια μη μεταφράσιμη περιοχή του γονιδίου και σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρόμβωσης. [160]

Η προθρομβίνη είναι ο πρόδρομος της πρωτεάσης της σερίνης θρομβίνης, που θεωρείται το ένζυμο κλειδί στο μηχανισμό της πήξης.

Εργαστηριακά, η αναζήτηση των επιπέδων της προθρομβίνης δεν είναι η πλέον κατάλληλη αναζήτηση, διότι υπάρχει επικάλυψη μεταξύ φυσιολογικών τιμών αναφοράς και παθολογικών τιμών που ανευρίσκονται σε άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη. [161] Έτσι, η αναγνώριση της παραλλαγής θα γίνει με έλεγχο σε οποιοδήποτε χρόνο με PCR τεχνική.

Ο παθογενετικός μηχανισμός που αναφέρεται στη μετάλλαξη G20210A παραμένει ακόμη άγνωστος. Δηλαδή, ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης και αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης δεν είναι γνωστός. Πιθανά, η απαντώμενη, αν και όχι πάντα, υπερπροθρομβιναιμία, μπορεί να οδηγήσει σε επίκτητη APCR μέσω αναστολής της δράσης της πρωτεΐνης S στην οδό της πρωτεΐνης C.

Πράγματι, έχει διαπιστωθεί μια σημαντική αύξηση της APCR σε ασθενείς με πολυμορφισμό G20210A. Έτσι, η APCR μπορεί να θεωρηθεί ως ένας παθογενετικός

μηχανισμός στον πολυμορφισμό G20210A, ως παράγοντα θρομβοφιλίας. Παρατηρείται περίπου στο 4-8% ασθενών με θρόμβωση [76] και, παρόλο που δεν είναι τόσο συχνή όσο η μετάλλαξη FVLeiden, η συχνότητά της κυμαίνεται στο 1-5% της Καυκάσιας φυλής. [76] [162] [163]

Σε ομοζυγώτες φαίνεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης περισσότερο από 8 φορές, ενώ σε ετεροζυγώτες σχεδόν 3 φορές. [164] [84]

Ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης αυξάνει περεταίρω από την παρουσία ενός επιπλέον παράγοντα κινδύνου. [165] [166]

Μελέτες αυξημένου κινδύνου αρτηριακής θρόμβωσης από τη μετάλλαξη αυτή, αρχικά υπήρξαν αντιφατικές, αν και καθημερινά επιβεβαιώνεται η θρομβοφιλική της ιδιότητα. Έτσι, κάποιες από αυτές κατέδειξαν αυξημένο κίνδυνο αρτηριακής θρόμβωσης [167] ενώ άλλες όχι. [168]

Είναι πιθανό πως ο αυξημένος κίνδυνος αρτηριακής θρόμβωσης υφίσταται μόνον εφόσον υπάρχουν και άλλοι επιπλέον παράγοντες κινδύνου για αρτηριακή θρόμβωση.

Έχει βρεθεί ότι απαντάται συχνά σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου, χωρίς ιδιαίτερη στένωση των στεφανιαίων αγγείων και ασχέτως ηλικίας. Ιδιαίτερα συχνά απαντάται σε νεαρές γυναίκες με OEM και σε παιδιά με ισχαιμικό ΑΕΕ. Στα παιδιά, υπάρχει μελέτη που αποδίδει μια στατιστικά σημαντική πενταπλάσια αύξηση.[169]

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΗΝ Α-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XIII (FXIII)

Val34Leu

Ο παράγοντας XIII (παράγοντας που σταθεροποιεί το ινώδες) αποτελεί ένζυμο, μέλος της οικογένειας των τρανσγλουταμινασών (plasma transglutaminase, FSF). Αποτελεί ένα τετραμερές με ζεύγη αλυσίδων Α και Β (FXIII-A₂B₂), με μοριακό βάρος 309000 D.

Το γονίδιο (160 kb, 15 exons, 14 introns) για την Α αλυσίδα εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 731 αμινοξέα [170] [171] ενώ το γονίδιο για την Β αλυσίδα, στο χρωμόσωμα 1. [172]

Παράγεται στο ήπαρ και υπάρχει στο πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Αποτελεί την μόνη τρανσγλουταμινάση που απαντάται συγχρόνως ενδοκυτταρίως και

εξωκυτταρίως, καθώς και τη μόνη που απαιτεί ασβέστιο και θρομβίνη για την ενεργοποίησή της. Η ενδοκυττάρια μορφή του παράγοντα, που ανευρίσκεται στα αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα, μονοκύτταρα, κύτταρα του πλακούντα, του προστάτη και της μήτρας, είναι ένα διμερές, αποτελούμενο από δύο Α αλυσίδες.

Όπως και σε τόσες άλλες περιπτώσεις, ο παράγοντας XIII αρχικά έγινε γνωστός από τη λειτουργία του, η οποία δεν ήταν άλλη από τη σταθεροποίηση του ινώδους, γι' αυτό και ονομάστηκε αρχικά παράγοντας που σταθεροποιεί το ινώδες (FSF, fibrin stabilizing factor). Ιστορικά, πρώτος ο Robbins παρατήρησε το σχηματισμό μη διαλυτού θρόμβου, λόγω παρουσίας ασβεστίου και ενός «αγνώστου παράγοντα του ορού» [173]

Στη συνέχεια οι Laki και Lorand επιβεβαίωσαν τα ευρήματα του Robbins και συμπέραναν πως αυτός ο παράγοντας είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος, που την ονόμασαν FSF. [174]

Σήμερα, είναι γνωστό πως ο κύριος ρόλος του παράγοντα XIII είναι να μετατρέπει τα χαλαρά πολυμερή του ινώδους, σε σταθερά και οργανωμένα πολυμερή, στενά συνδεδεμένα με το κατεστραμμένο ενδοθήλιο και ανθεκτικά στην ινωδόλυση. Έτσι, η αντίσταση στην ινωδόλυση επιτείνεται με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών γ-γλουταμυλ-γ-λυσίνης μεταξύ των μονομερών του ινώδους, αντίδραση που καταλύεται από την παρουσία του ενεργοποιημένου παράγοντα XIII.[175]

Ο καθαρά ενδοκυττάριος παράγοντας VIII παίζει σημαντικό ρόλο στην επίτευξη αιμόστασης, σχηματισμού θρόμβου και επούλωσης από τα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο των αγγείων.

Η ανεπάρκεια του παράγοντα XIII είναι σπάνια διαταραχή που κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Το σύνολο των ασθενών πάσχει από σοβαρή αιμορραγική διάθεση εφόρου ζωής, με συνεχή κίνδυνο ενδοκρανιακής αιμορραγίας, ήδη από τα πρώτα χρόνια της ζωής.

Η πιο κοινή κληρονομική ανεπάρκεια του XIII ονομάζεται τύπου 2 και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο για την υπομονάδα Α. Έχουν περιγραφεί πάνω από 70 γενετικές διαταραχές, τόσο στην υπομονάδα Α, όσο και στην υπομονάδα Β οι οποίες είναι ετερογενείς και περιλαμβάνουν διαφόρων ειδών μεταλλάξεις (nonsense mutations, missence mutations, small deletions, frameshifts, splicing abnormalities). Οι 67 από αυτές σχετίζονται με την υπομονάδα Α με την πλειοψηφία των οποίων να αποτελεί missence και nonsense μεταλλάξεις. [176] [177]

Συνεχώς δε, προστίθενται νέες μεταλλάξεις, κυρίως για την υπομονάδα A. [178] [179]

Πίνακας 17: Παράγοντας XIII-μεταλλάξεις (missence/nonsense mutations) [180]

Exon	Amino acid change	References
3	Asn60Lys	Anwar R <i>et al.</i> 1995
3	Arg77Cys	Duan <i>et al.</i> 2002
3	Arg77His	Peyvandi <i>et al.</i> 2004
3	Glu102Lys	Anwar 2002
4	Met159Arg	Schroeder <i>et al.</i> 2006
4	Arg171Stop	Standen and Bowen 1993
5	Gly210Arg	Vysokovsky <i>et al.</i> 2004
5	Gly215Arg	Schroeder <i>et al.</i> 2006
6	Leu235Arg	Birben <i>et al.</i> 2003
6	Met242Thr	Mikkola <i>et al.</i> 1994
6	Arg252Ile	Mikkola <i>et al.</i> 1996
6	Arg260Cys	Ichinose 1998
6	Arg260Leu	Vysokovsky <i>et al.</i> 2004
6	Arg260His	Kangsadalampai 1999
6	Gly262Glu	Onland <i>et al.</i> 2005
7	Tyr283Cys	Souri <i>et al.</i> 2001
7	Ser295Arg	Anwar R <i>et al.</i> 2000
7	Val316Phe	Onland <i>et al.</i> 2005
7	Ala318Val	Vysokovsky <i>et al.</i> 2004
8	Arg326Gln	Mikkola <i>et al.</i> 1996
8	Arg326Stop	Anwar 2005
8	Leu354Pro	Anwar <i>et al.</i> [28]
9	Trp375Cys	Schroeder <i>et al.</i> 2006
9	Arg382Ser	Peyvandi <i>et al.</i> 2003
9	Ala394Val	Izumi 1998
9	Thr398Asn	Vysokovsky <i>et al.</i> 2004
9	Gln400Stop	Kangsadalampai <i>et al.</i> 1996
10	Arg408Gln	Anwar R <i>et al.</i> 1995
10	Ser413Leu	Niya <i>et al.</i> 1999
10	Ser413Trp	Duan <i>et al.</i> 2003
10	Val414Phe	Aslam 1997
10	Gly420Ser	Kangsadalampai <i>et al.</i> [52]
10	Tyr441Stop	Anwar 1995
11	Gly501Arg	Board 1993
12	Leu498Pro	Mikkola <i>et al.</i> 1996
12	Asn541Lys	Birben <i>et al.</i> 2002
12	Gly562Arg	Takahashi <i>et al.</i> 1998
14	Leu660Pro	Inbal <i>et al.</i> 1997
14	Arg661Stop	Mikkola <i>et al.</i> 1994
14	Leu667Pro	Aslam 1995
15	Trp691Stop	Anwar 2005
15	His716Arg	Schroeder <i>et al.</i> 2006

Πλήρης λίστα με όλες τις μεταλλάξεις στις υπομονάδες A ή B (missense, nonsense, splicing, insertions, deletions) μπορούν να αναζητηθούν στο Human Gene Mutation Database στο Institute of Medical Genetics στον ιστότοπο του Gardiff: <http://www.Hgmd.cf.ac.uk> καθώς και στον ιστότοπο του παράγοντα XIII: <http://www.f13-database.de>

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί πως η παρουσία ενός πολυμορφισμού μιας μικρής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (short tandem repeat, STR) στο γονίδιο της υπομονάδας A του παράγοντα XIII έχει χρησιμοποιηθεί για προγεννητικό έλεγχο. [181]

Εκτός από την κληρονομική ανεπάρκεια του παράγοντα XIII, υπάρχουν και επίκτητα αίτια ανεπάρκειάς του, όπως φαίνεται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: Επίκτητα αίτια ανεπάρκειας του παράγοντα XIII

ΕΠΙΚΤΗΤΑ ΑΙΤΙΑ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XIII
Νεογνά
Ηπατικά νοσήματα
Λευχαιμίες
Διάχυτη ενδαγγειακή πήξη
Διάφορες κακοήθειες
Σοβαρή ελονοσία από <i>P. falciparum</i>
Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Πορφύρα Henoch-Schonlein

Οι συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις, όπως PT, aPTT, είναι φυσιολογικές, οπότε η νόσος μπορεί να διαφύγει της διάγνωσης.

Η **εργαστηριακή εξέταση** που θα μας βοηθήσει στη διάγνωση αυτής της διαταραχής είναι η δοκιμασία διαλυτότητας του θρόμβου. Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιείται ως διαχωριστικός έλεγχος (screening test).

Θρόμβος ασθενούς που δεν έχει υποστεί τη δράση του παράγοντα XIII, αποτελείται από μονομερή ινώδους που είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους μόνο με χαλαρούς ιοντικούς δεσμούς και μπορεί εύκολα να αποδιοργανωθεί, εάν διαλυθεί με ασθενή οξέα ή βάσεις, όπως 5M ουρία ή 1% μονοχλωροξεϊκό οξύ.

Σ'αυτή ακριβώς την παρατήρηση στηρίζεται η κλασσική δοκιμασία διαλυτότητας του θρόμβου, η οποία είναι ποιοτική και αποβαίνει θετική μόνον εφόσον τα επίπεδα του XIII είναι μηδενικά ή πολύ κοντά στο μηδέν. Όλοι οι ασθενείς όμως με κληρονομική ανεπάρκεια του XIII έχουν σχεδόν ή και μηδενική δραστηριότητα του XIII και έτσι η δοκιμασία παραμένει, λόγω και της απλότητάς της,

ως δοκιμασία επιλογής. Υπενθυμίζεται εδώ, πως τα ελάχιστα απαιτούμενα επίπεδα για λειτουργική έκφραση του XIII είναι 2-3%.

Επίσης να σημειωθεί πως, συνήθως μόνον οι σοβαρές ανεπάρκειες παρουσιάζουν αιμορραγική διάθεση. Και λέμε συνήθως διότι υπάρχει μελέτη όπου υποδεικνύεται πως η αιμορραγική τάση δε σχετίζεται πάντα με τα ευρήματα της ανάλυσης και πως ακόμη και οι ετεροζυγώτες μπορεί περιστασιακά να εμφανίσουν σημαντική αιμορραγία. [182]

Η δραστικότητα του XIII μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά επακριβώς με χρήση φθορισμού ή με φωτομετρικές μεθόδους, ή και με ανοσολογικές μεθόδους.

Το γονίδιο του παράγοντα XIII εμφανίζει πολλές παραλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (single nucleotide variations) που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων. Έχουν περιγραφεί πέντε κοινοί πολυμορφισμοί στην υπομονάδα A (FXIII-A) του παράγοντα XIII:

Val 34Leu

Tyr204Phe

Pro564Leu

Val650Ile

Glu651Gln

ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΩΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ-1-ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

(PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1)

Αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στις σερπίνες (serine protease inhibitors) που συντίθεται στο ήπαρ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εναποτίθεται κυρίως στο ενδοθήλιο. Η φυσιολογική λειτουργία του PAI-1είναι η αναστολή των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Αναστέλλει επομένως, τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου t-PA (tissue plasminogen activator) και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης u-PA (urokinase plasminogen activator). Αποτελεί δηλαδή παράγοντα που αναστέλλει την ινωδόλυση. Ινωδόλυση ονομάζεται το αργό αυτό φαινόμενο που συμβαίνει με τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη, με τη δράση της οποίας απομακρύνεται το ινώδες από τα αγγεία.

Ο PAI-1 ανευρίσκεται στο πλάσμα και σε εξωκυττάρειες θέσεις, ως σύμπλοκο με τη βιτρονεκτίνη. Ανευρίσκεται επίσης στα αιμοπετάλια (α-κοκκία).

Το μοριακό βάρος του PAI είναι 52000 D. Το γονίδιο για τον PAI εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7, κοντά στο γονίδιο για την κυστική ίνωση. Έχει ημιπερίοδο ζωής 12 λεπτά.

Όντας ένας από τους βασικούς αναστολείς της ινωδόλυσης, ο PAI-1 έχει ρόλο κλειδί στο σχηματισμό ενός σταθερού θρόμβου. Αυξημένα επίπεδα PAI συνοδεύουν συχνά θρομβωτικές καταστάσεις, επομένως η μέτρησή της αποτελεί εργαστηριακό δείκτη θρομβοφιλίας.

Αυξημένα επίπεδα PAI-1 στο πλάσμα, έχουν συσχετισθεί με αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση, στεφανιαία νόσο και έμφραγμα του μυοκαρδίου. [183] [184] [185]

Αυξημένα επίπεδα PAI-1 επίσης παρατηρούνται συχνά σε σοβαρά ηπατικά νοσήματα και στον καρκίνο. [186]

Δύο είδη εξετάσεων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του PAI στο πλάσμα. Μία λειτουργική μέθοδος και ανοσολογικές εξετάσεις (ELISA).

Η λειτουργικότητα του PAI ελέγχεται κυρίως με χρωμογόνο μέθοδο που βασίζεται στη χρησιμοποίηση γνωστής ποσότητας t-PA στο πλάσμα του δείγματος. Αυτό επιτρέπει τη δημιουργία συμπλέγματος tPA-PAI, ενώ το εναπομένει tPA μετράται χρωμογονικά. Η ποσότητα του χρώματος του tPA είναι αντιστρόφως ανάλογη με τα επίπεδα PAI του δείγματος. (φτ 50μg/ml) Η μέθοδος δεν είναι ειδική, ενώ απαιτείται άμεση εκτέλεσή της διότι ο PAI δρα ταχύτατα.

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι επίσης σε χρήση, με τα εξής μειονεκτήματα: δε δίνουν πληροφορίες για τη λειτουργικότητα του PAI, δεν υπάρχουν ικανοποιητικές τιμές αναφοράς, κυμαίνονται δηλαδή σε μεγάλο εύρος. Αυτό είναι συμβατό βέβαια και με το γεγονός πως ο PAI-1 αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης.

Οι βιοχημικές εξετάσεις που προαναφέρθηκαν μπορούν να επιβεβαιώσουν την υπερπαραγωγή PAI-1 λόγω γενετικών παραγόντων σε ένα βαθμό μόνο, αφού αυξημένα επίπεδα μπορεί επίσης να εκφράζουν καθημερινές διακυμάνσεις ή να έχουν ως αιτία άλλες συστηματικές καταστάσεις (ηπατική νόσο, καρκίνο, σακχαρώδη διαβήτη).

Κληρονομική ανεπάρκεια του PAI έχει περιγραφεί. Αιμορραγικές εκδηλώσεις, συμπεριλαμβανομένων αιμάθρων, μεγάλων αιματωμάτων,

μηνορραγιών και σοβαρών μετεγχειρητικών αιμορραγιών έχουν περιγραφεί. [187] [188] [189]

Επίκτητη ανεπάρκεια του PAI-1, λόγω παρουσίας αυτοαντισώματος σε αμυλοείδωση έχει επίσης περιγραφεί και έχει συσχετιστεί με τάση προς αιμορραγία.

Γονιδιακός έλεγχος:

Δύο σημαντικοί πολυμορφισμοί έχουν παρατηρηθεί στην περιοχή του promoter του γονιδίου του PAI-1, στο χρωμόσωμα 7:

Ο πολυμορφισμός 4G/5G στην θέση -675 και μια αντικατάσταση βάσης στη θέση -844 (A→G).

Σειρά από 4 ή 5 G μπορεί να υπάρχουν στη θέση -675 ως αποτέλεσμα εισαγωγής (insertion) ή απαλοιφής (deletion), πράγμα το οποίο οδηγεί σε τροποποιημένη έκφραση της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια η ενεργοποίηση της ινωδόλυσης διαταράσσεται. Ομόζυγοι φορείς του 4G αλληλίου εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επίπεδα PAI 1 στο πλάσμα σε σχέση με τους 5G ομόζυγους φορείς και επομένως έχουν ένα αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης, ο οποίος αυξάνει παραπάνω με την ακινησία. [190] [191] [192] [193]

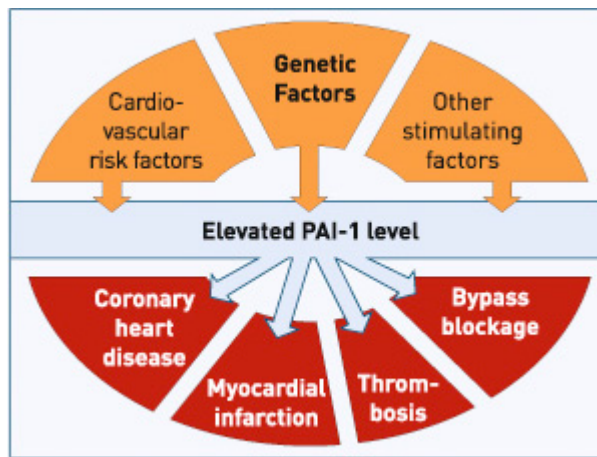
Επιπλέον, περισσότερες επιπλοκές στην εγκυμοσύνη και πρόωρες γεννήσεις έχουν περιγραφεί σε 4G ομόζυγες εγκύους. [194]

Ο πολυμορφισμός στη θέση -844 G/A δε φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα PAI-1 στο πλάσμα, παρά το γεγονός πως και σ'αυτή την περίπτωση έχουμε την παρουσία ενός παράγοντα, ο οποίος μπορεί να προσδεθεί τόσο στα άτομα με το αλληλίο G όσο και στο A, [184] με έναν τρόπο παρόμοιο μ' αυτόν που συναντάμε στον 4G/5G πολυμορφισμό, στον οποίο τα αλληλία 4G και 5G συνδέονται με έναν ενεργοποιητή και το 5G αλληλίο με τη σύνδεσή του αυτή οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά μετάφρασης. [184] [195]

Σχετικά με τον πολυμορφισμό στη θέση A-844G, έχει γίνει μια μελέτη για αν εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού και του κινδύνου φλεβικής θρόμβωσης σε ετεροζυγώτες για τον FVLeiden. Παρατηρήθηκε ότι το αλληλίο A ήταν πιο συχνό σε ετεροζυγώτες για τον FVLeiden που έπασχαν από φλεβική θρόμβωση. Παρ'ολ'αυτά ομοζυγωτία για το αλληλίο G, δεν οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης. Συμπερασματικά, σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, ο γονότυπος -844AA του γονιδίου PAI 1, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για φλεβική θρόμβωση σε ετεροζυγώτες για τον FVLeiden. [196]

Η ταυτόχρονη παρουσία πολυμορφισμών στον PAI 1 που σχετίζονται με κίνδυνο για θρόμβωση όπως περιγράφηκαν παραπάνω, μαζί με άλλους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με θρόμβωση, όπως ο FVLeiden, καθώς και με μεταλλάξεις στα γονίδια της προθρομβίνης ή του MTHFR, αυξάνει τον κίνδυνο θρομβοεμβολικού επεισοδίου επίσης. [197]

Επομένως η συνδυασμένη εξέταση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών θα μπορούσε να θεωρηθεί ορθή.



Εικόνα 19: Συνέπειες των αυξημένων επιπέδων του PAI 1 στο πλάσμα.

ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

Το DNA (δεσοξυρβονουκλεϊκό οξύ) είναι ο δομικός λίθος της ζωής και καταλαμβάνει το 10% του συνολικού κυτταρικού όγκου στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το DNA απομονώθηκε πρώτη φορά το 1869 από τον Miescher, αλλά μόλις το 1944 ο Avery και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι είναι ο φορέας της γενετικής πληροφορίας.

Οι Watson και Crick το 1953 [198] απέδειξαν την τρισδιάστατη δομή του και για την ερευνητική αυτή εργασία τιμήθηκαν το 1962 με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής. Το 1956 οι Bessman και Kornberg [199] απέδειξαν το μηχανισμό σύνθεσης του DNA, ενώ οι Nirenberg, Ochoa και Khorana [200] ανακάλυψαν το γενετικό κώδικα. Όπως είναι φυσικό, όλες αυτές οι ερευνητικές εργασίες απετέλεσαν την αρχή μιας νέας εποχής των βιολογικών επιστημών.

Όλοι οι οργανισμοί, εκτός των RNA ιών, χρησιμοποιούν το DNA για τη φύλαξη και έκφραση της γενετικής πληροφορίας στις επόμενες γενεές.

Το DNA είναι ένα δίκλωνο μόριο, αποτελείται δηλαδή από δύο αλυσίδες, που διατάσσονται υπό μορφή έλικας. Οι δύο αυτοί κλώνοι/αλυσίδες είναι αντιπαράλληλοι/ες. Ο κάθε κλώνος είναι ένα πολυμερές που δομείται από τέσσερα μονομερή, τα νουκλεοτίδια. Το κάθε νουκλεοτίδιο από την πλευρά του, αποτελείται από:

- Ένα σάκχαρο πεντόζης, τη δεσοξυριβόζη
- Μία φωσφορική ομάδα
- Μία οργανική βάση

Οι οργανικές βάσεις του DNA είναι οι πουρίνες, αδερίνη (A) και γουανίνη (G) και οι πυριμιδίνες, κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T).

Τα νουκλεοτίδια συγκρατούνται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ οι βάσεις των δύο κλώνων του DNA προβάλλουν προς την εσωτερική αύλακα του δίκλωνου μορίου και προσανατολίζονται ώστε να ζευγαρώνουν μεταξύ τους και να συγκρατούν τους δύο κλώνους, μέσω ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου είναι σχετικά ασθενείς, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των κλώνων του DNA να επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας ή με την επίδραση αλκαλικού περιβάλλοντος. Το γονιδίωμα του ανθρώπου αποτελείται από 3×10^9 νουκλεοτίδια, τα οποία συνιστούν το DNA.

Οι δύο κλώνοι/αλυσίδες του DNA είναι συμπληρωματικές. Αυτό σημαίνει πως η αδενίνη (A) της μιας αλυσίδας ζευγαρώνει με την θυμίνη (T) της απέναντι αλυσίδας στο δίκλωνο μόριο και αντίστοιχα ζευγαρώνει η γουανίνη (G) με την κυτοσίνη (C). Έτσι, αν γνωρίζουμε την αλληλουχία βάσεων της μιας αλυσίδας του δίκλωνου μορίου του DNA, είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε και την απέναντι συμπληρωματική της.

Οι βάσεις του DNA φέρουν τη γενετική πληροφορία, ενώ η πεντόζη (υδατάνθρακας) και η φωσφορική ομάδα παίζουν δομικό ρόλο και αποτελούν το σκελετό του DNA. Οι γενετικές πληροφορίες φυλάσσονται στη δομή του DNA υπό μορφή αλληλουχίας βάσεων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Δομή DNA

Η γενετική πληροφορία είναι οργανωμένη σε δομικές και λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Εν συντομία, σαν γονίδιο μπορούμε να ορίσουμε το τμήμα εκείνο του γονιδιώματος που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση ενός πολυπεπτιδίου ή ενός μορίου tRNA ή rRNA. Σε κάθε γονίδιο, οι αλληλουχίες βάσεων που μεταφράζονται ονομάζονται εξόνια (exons) ενώ υπάρχουν και αλληλουχίες βάσεων που η λειτουργία τους είναι ρυθμιστική ή παίζουν ρόλο στην ωρίμανση του πρώιμου mRNA και ονομάζονται εσόνια (introns).

Κατά την έκφραση της γενετικής πληροφορίας (σύνθεση μιας πρωτεΐνης), το μόριο του DNA χρησιμεύει σαν εκμαγείο για τη σύνθεση του αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA-mRNA), στο οποίο μεταγράφεται η γενετική πληροφορία με σκοπό την μεταφορά της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου εντοπίζεται η

πρωτεϊνοσυνθετική «μηχανή» (ριβοσώματα). Εκεί, δηλαδή στα ριβοσώματα, θα γίνει η μετάφραση της γενετικής πληροφορίας από τη «γλώσσα» την νουκλεοτιδικών βάσεων στη «γλώσσα» των αμινοξέων σύμφωνα με το γενετικό κώδικα.

Ο γενετικός κώδικας καθορίζει τη μετάφραση των κωδικονίων (τριπλέτες νουκλεοτιδίων) σε αμινοξέα. Τα νουκλεοτίδια είναι τέσσερα, επομένως και οι πιθανοί συνδυασμοί νουκλεοτιδίων σε τριπλέτες είναι 64 (4³), ενώ τα αμινοξέα που μετέχουν στη δόμηση των πρωτεϊνών είναι 20. Κάθε αμινοξύ κωδικοποιείται από περισσότερα από ένα κωδικόνια. Από τα 64 κωδικόνια μόνον τα 61 κωδικοποιούν τη σύνθεση αμινοξέων, τα υπόλοιπα τρία αποτελούν κωδικόνια λήξης και δίνουν το σήμα τερματισμού της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Το DNA των οργανισμών οργανώνεται σε χρωμοσώματα, που βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων. Το ευκαρυωτικό χρωμόσωμα αποτελείται από χρωματινικές ίνες. Θεμελιώδης δομή της χρωματινικής ίνας είναι το νουκλεόσωμα (nucleosome). Το νουκλεόσωμα αποτελείται από ένα συμπαγή πρωτεϊνικό πυρήνα, το οκταμερές των ιστονών, γύρω από το οποίο ελίσσεται δύο φορές η διπλή έλικα του DNA. Το βήμα της έλικας περιλαμβάνει 146 νουκλεοτίδια. Το οκταμερές των ιστονών αποτελείται από οκτώ μόρια ιστονών, δύο από κάθε ιστόνη, την H2A την H2B, την H3 και την ιστόνη H4. Η χρωματινική ίνα μπορεί να ελικοθεί περαιτέρω και να δημιουργηθεί μια ανώτερη χρωματινική δομή που ονομάζεται σωληνοειδές (solenoid). Η υπερέλικα του σωληνοειδούς περιλαμβάνει έξι νουκλεοσώματα. Η υπερέλικα αυτή θεωρείται ως η πιο αντιπροσωπευτική δομή της χρωματίνης των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων.

Η απομόνωση, συνεπώς, καθαρού ευκαρυωτικού DNA απαιτεί την αποδιάταξη (μέσω χαοτροπικών αντιδραστηρίων) και καταστροφή (μέσω πέψης με πρωτεολυτικά ένζυμα), όλων των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση και σύγκριση της συχνότητας των κλασικών θρομβοφιλικών παραγόντων όπως η ανεπάρκεια των PrC, PrS, AT και γενετικών πολυμορφισμών όπως ο FVL, ο FIG20210A, ο MTHFR καθώς και πολυμορφισμών του PAI (-675 4A/5G και -844 G/A) και του FXIII (FXIII Val34Leu) και η επίδραση αυτών των γενετικών μεταλλάξεων στον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού ΑΕΕ σε νέους ενήλικες (άτομα ηλικίας κάτω των 50 ετών).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη έγινε σύμφωνα με την διακήρυξη του Ελσίνκι και κατόπιν έγκρισης από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός στη Αθήνα. (αρ. πρωτ: 751-07/11/2007)

Όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη έδωσαν γραπτή συγκατάθεση, ενώ για εκείνους που δεν ήταν σε θέση να δώσουν συγκατάθεση οι ίδιοι, ένα στενό συγγενικό πρόσωπο υπέγραψε εκ μέρους τους.

Υλικά μελέτης και Μέθοδοι

Επιζήσαντες ασθενείς ηλικίας 18-50 ετών με κλινικά χαρακτηριστικά ισχαιμικού Αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, που εισήχθησαν στη νευρολογική κλινική του νοσοκομείου, μετά από αξιολόγηση των γιατρών της κλινικής, αποτέλεσαν το υλικό αυτής της μελέτης.

Η διάγνωση του ΑΕΕ στηρίχτηκε στο ιστορικό, στην κλινική εικόνα, η οποία αξιολογήθηκε από ειδικό νευρολόγο, καθώς και στα απεικονιστικά ευρήματα αξονικής ή και μαγνητικής τομογραφίας.

Τα κριτήρια για την κλινική διάγνωση περιλάμβαναν: κεφαλαλγία, πτώση του επιπέδου συνείδησης, κρίση επιληψίας, ημιπληγία, τετραπληγία, παρεγκεφαλιδική διαταραχή, διαταραχές οφθαλμοκινητικότητας, ημιανοψία, αμαύρωση, αφασικές διαταραχές, απραξία, αγνωσία, ίλιγγος, έμετοι, ημιυπαισθησία.

Κριτήρια αποκλεισμού

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτέλεσαν τα κάτωθι: ασθενείς με σημαντικές συστηματικές νόσους, οι οποίες προδιαθέτουν σε θρόμβωση, όπως ο καρκίνος, η λοίμωξη, ηπατικές νόσοι, αυτοάνοσα νοσήματα, αιματολογικά νοσήματα που οδηγούν σε διαταραχές πήκτικότητας, όπως και ασθενείς με ιστορικό τραυματισμού στο κεφάλι ή μετά από ιατρογενείς επεμβατικές διαδικασίες.

Στοιχεία ιστορικού

Σε κάθε ασθενή ελήφθη λεπτομερές ιστορικό στο οποίο έγινε καταγραφή των περισσότερων από τα κάτωθι στοιχεία:

Ημερομηνία εισαγωγής

Όνοματεπώνυμο

Φύλο

Έτος γεννήσεως

Επάγγελμα

Οικογενειακή κατάσταση

Καταγωγή

Τόπος διαμονής

Δεξιόχειρας, Αριστερόχειρας αμφίχειρας

Οικογενειακό Ιστορικό

Πατέρας: ΑΕΕ, καρδιοπάθεια, δυσλιπιδαιμία, ΣΔ, ημικρανίες,
ρευματικό νόσημα, φλεβίτιδα, ΑΥ

Μητέρα: ΑΕΕ, καρδιοπάθεια, δυσλιπιδαιμία, ΣΔ, ημικρανίες,
ρευματικό νόσημα, φλεβίτιδα, ΑΥ

Ατομικό Αναμνηστικό

Προηγούμενη συμπτωματολογία ΠΙΕ ή ΑΕΕ

Κεφαλαλγίες/αυχεναλγίες

Αυτόματες αποβολές/φλεβοθρομβώσεις

Αίσθημα παλμών

Κύηση(έως προ 3 μήνες)

Παράγοντες κινδύνου

Αρτηριακή Υπέρταση

Κάπνισμα

Αντισυλληπτικά δισκία

Ημικρανίες

Δυσλιπιδαιμία –υπερχοληστερολαιμία

-υπερτριγλυκαιριδαιμία

-αυξημένες απολιποπρωτεΐνες

-μικτή δυσλιπιδαιμία

Σακχαρώδης διαβήτης

Παχυσαρκία

Αλκοολισμός

Χρήση τοξικών ουσιών

Χρόνια αρτηριοπάθεια κάτω άκρων

Πολυκυτταραιμία

Καρδιοπάθεια

Είδος ισχαιμικού επεισοδίου

Παροδικό (διάρκεια <24 ώρες)

Αναστρέψιμο (διάρκεια <7 ημέρες)

Εγκατεστημένο (διάρκεια >7 ημέρες)

Τοπογραφία εμφράκτου

Ολική ΜΕΑ(μέση εγκεφαλική αρτηρία)

Επιπολής ΜΕΑ –πρόσθια

-οπίσθια

Εν τω βάθει ΜΕΑ

ΠΕΑ (πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία)

ΜΕΑ και ΠΕΑ

Στέλεχος

Παρεγκεφαλίδα

Ολικό ΟΕΑ (οπίσθια εγκεφαλική αρτηρία)

Επιπολής ΟΕΑ

Εν τω βάθει ΟΕΑ(θάλαμος)

Πολλαπλές εντοπίσεις

Πολλαπλά πεδία

Κλινική Εικόνα

Κεφαλαλγία

Διαταραχές επιπέδου συνείδησης

Κρίση επιληψίας (κρίση «ε»)

Ημιπληγία – ομότιμη

-άνω άκρο/πρόσωπο

-κάτω άκρο

Τετραπληγία

Παρεγκεφαλιδική διαταραχή

Αμαύρωση

Διαταραχές οφθαλμοκινητικότητας

Διαταραχές κατώτερων εγκεφαλικών συζυγιών

Αφασικές διαταραχές-Wernicke

-Broca

-ολική

Απραξία

Αγνωσία

Ύλιγγος/έμετοι

Σημείο CBH

Ημιπαισθησία

Άλλα σημεία

CT εγκεφάλου

1^η ημερομηνία, ώρα, ευρήματα

2^η ημερομηνία, ώρα, ευρήματα

MRI εγκεφάλου

ΗΚΓ

Doppler Αγγείων τραχήλου

Διαθωρακικό U/S καρδιάς

Διοισοφάγειο U/S καρδιάς

Holter ρυθμού

Αγγειογραφία

Γενική αίματος

Βιοχημικά

(Σάκχαρο, Ουρία, Κρεατινίνη, K, Na, Ca, P, SGOT, SGPT, γGT, ALP

LDH, CPK, Χολερυθρίνη, Χοληστερόλη, Τριγλυκερίδια, HDL

LDL, Απολιποπρωτεΐνη A, Απολιποπρωτεΐνη B, Lpa, SACE, CRP

VDRL, Vitamin B12, Φυλλικό οξύ)

Καμπύλη ανοχής γλυκόζης

TKE

Πήξη

(PT, aPTT, INR, d-dimers, FII, FVIII, FvW, Πρωτεΐνη C, Πρωτεΐνη S

APC Resistance, Μοριακός έλεγχος παράγοντα Leiden (FVLeiden)

Μοριακός έλεγχος μετάλλαξης παράγοντα II (FIIIG20210A)

Αντιθρομβίνη III (AT), Ομοκυστεΐνη, MTHFR, Αντιπηκτικό λύκου

Ορμόνες

(T3, T4, TSH, PTH)

Ανοσολογικά

(ANA, ANCA, Anti-DNA, Ra-test, Ολικό συμπλήρωμα, C3, C4

antiRo, antiLa, ηλεκτροφόρηση ανοσοσφαιρινών,
Abs εναντίον καρδιολιπινών, Αντιθυρεοειδικά Abs)

HIV

HBsAg

Anti-HCV

Ιολογικός έλεγχος αίματος

Γενική εξέταση ούρων

Γενική εξέταση ENY

Σάκχαρο ENY, Λεύκωμα ENY, VDRL ENY, SACE ENY, Lyme ENY

Ιολογικός έλεγχος ENY, PCR ENY, IgG σύνθεση ENY)

Εξέλιξη

(Βελτίωση, ANE εξόδου, Θεραπεία εξόδου)

Επιπρόσθετα, όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν λεπτομερώς, κλινικά και νευρολογικά.

Άτομα θεωρήθηκαν ότι πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη όταν η γλυκόζη νηστείας υπερέβαινε τα 126 mg/dl ή όταν ελάμβαναν αντιγλυκαιμικά δισκία ή ινσουλίνη.

Ως καπνιστές θεωρήθηκαν τα άτομα εκείνα που κατά τη διάρκεια της αξιολόγησης υπερέβαιναν τα 5 τσιγάρα την ημέρα.

Η συστολική και η διαστολική πίεση μετρήθηκαν σύμφωνα με τις υποδείξεις της Αμερικανικής Εταιρείας καρδιολογίας (American Heart Association, ΑΗΑ). Ως υπερτασικά χαρακτηρίστηκαν τα άτομα με συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ)>160 mmHg και διαστολική αρτηριακή πίεση (ΔΑΠ)>95 mmHg σε δύο διαφορετικές μετρήσεις.

Μάρτυρες

Η ομάδα των μαρτύρων συγκροτήθηκε από 70 υγιείς εθελοντές αιμοδότες παρόμοιας ηλικίας και με την ίδια αναλογία ανδρών/γυναικών, όπως και η ομάδα των ασθενών. Οι μάρτυρες προέρχονταν από την ίδια δημογραφική περιοχή και δεν είχαν ιστορικό ή κλινική εικόνα ισχαιμικής αγγειακής νόσου στην παρούσα φάση.

Και για την ομάδα των μαρτύρων, εκτός από τη γραπτή συγκατάθεση, ελήφθη λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, το οποίο μεταξύ άλλων περιελάμβανε το ατομικό

αναμνηστικό, το οικογενειακό ιστορικό, καθώς και πιθανούς παράγοντες κινδύνου για ΑΕΕ.

Όλοι οι συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη ανήκαν στην Καυκάσια φυλή.

Σε όλους τους συμμετέχοντες διεξήχθη φλεβοκέντηση μετά από 12ωρη νηστεία σε φιαλίδια με Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), citrate καθώς και σε φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό.

Το πλάσμα και ο ορός διαχωρίστηκαν σύντομα μετά τη φλεβοκέντηση με φυγοκέντρηση στα 3500g για 15 λεπτά και φυλάχθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Το φιαλίδιο με το EDTA φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του για την εξαγωγή γενωμικού DNA.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος

Αντιδραστήρια:

1. Διάλυμα λύσης των πυρήνων: 10mM TrisHCl/400mM NaCl/2mM EDTA pH7.4 .
2. Διάλυμα πρωτεΐνης K του μύκητα *Tritirachum album* (10 mg/ml)
3. Διάλυμα 10% κ.β. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).
4. Διάλυμα κρυσταλλικής φαινόλης σε 100 mM TrisCl/200 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, pH 8.0 .
5. Διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1 .
6. Διάλυμα NaCl 6M .
7. Απόλυτη αιθανόλη.

Τεχνική

Η μέθοδος έχει περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία και περιλαμβάνει:

1. Απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αιμόλυσή τους σε υπότονο διάλυμα.
2. Λύση των πυρήνων των λευκών αιμοσφαιρίων και αποδόμηση των πρωτεϊνών τους με διάλυμα πρωτεΐνης K/SDS και επώαση σε 37⁰C.
3. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών με εκχυλίσεις φαινόλης και φαινόλης-χλωροφορμίου ή κατακρήμνισής τους με κορεσμένο διάλυμα NaCl.
4. Καταβύθιση του DNA με απόλυτη αιθανόλη.

Το DNA που λαμβάνεται αναδιαλύεται σε ddH₂O και η συγκέντρωσή του μετράται φασματοφωτομετρικά (Λεπτομέρειες στη βιβλιογραφική αναφορά J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1990)

2. Απομόνωση γενωμικού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο μαγνητικών σωματιδίων Biorobot EZ1.

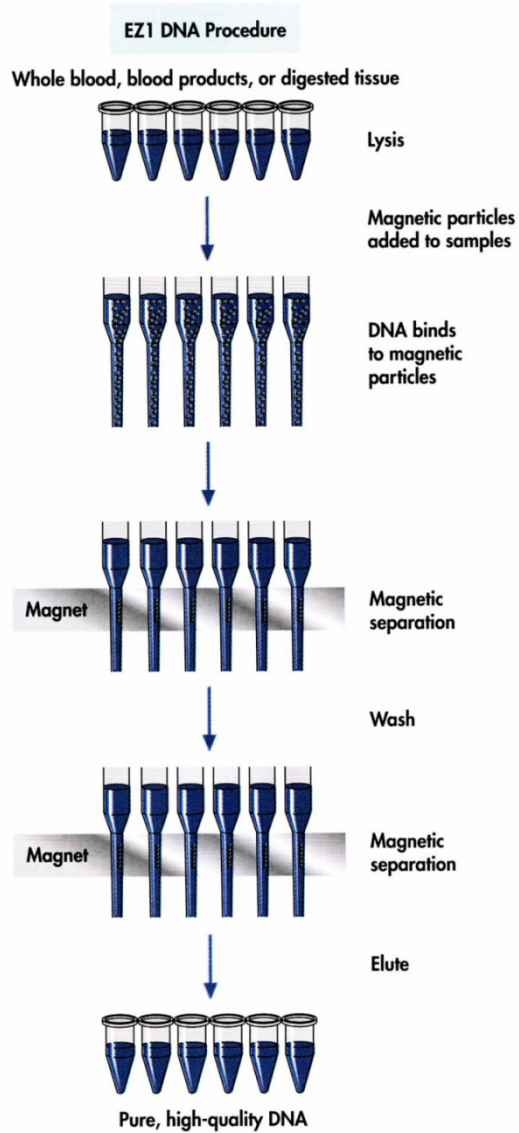
Βασικές αρχές: Ο σταθμός εργασίας Biorobot EZ1 (workstation) εκτελεί πλήρως αυτοματοποιημένο καθαρισμό (purification) νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιώντας μαγνητικά σωματίδια. Τα αυτόματα βήματα που πραγματοποιούνται είναι τα εξής:

- Στάδιο λύσης (lysis) των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών / αποδιάταξης και πέψης των πρωτεϊνικών κυτταρικών συστατικών.
- Στάδιο πρόσδεσης (binding) των νουκλεϊκών οξέων στα μαγνητικά σωματίδια
- Στάδιο έκπλυσης (washing) και έκλουσης (elution) των νουκλεϊκών οξέων

Στο μηχάνημα αρχικά εισάγεται μια κάρτα EZ1, η οποία περιέχει πρωτόκολλα εργασίας, ανάλογα με την εκάστοτε ανάγκη. Αφού καταχωρηθούν τα πλαίσια ρύθμισης, φορτώνονται τα δείγματα, οι θήκες με τα αντιδραστήρια και τα υπόλοιπα σωληνάρια συγκομιδής των νουκλεϊκών οξέων. Το πρωτόκολλο ξεκινά και παρέχονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για την εκτέλεση της αυτοματοποιημένης εξαγωγής και κάθαρσης νουκλεϊκών οξέων.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το EZ1 DNA Blood 200 µl kit. Το συγκεκριμένο kit είναι για τον καθαρισμό γενωμικού DNA από δείγματα ολικού αίματος και παράγωγα αίματος, όγκου 200µl. Η χρήση των μαγνητικών σωματιδίων εξασφαλίζει την υψηλής ποιότητας/καθαρότητας DNA, το οποίο είναι κατάλληλο για χρήση σε διαδικασίες ενίσχυσης (amplification procedures), καθώς και ενζυματικές αντιδράσεις.

Η τεχνολογία των μαγνητικών σωματιδίων συνδυάζει την ταχύτητα και την αποδοτικότητα του καθαρισμού του DNA. Το DNA απομονώνεται από ένζυμα λύσης, με τη δέσμευσή του σε επιφάνεια χαλαζία (διοξείδιο του πυριτίου – silica surface) παρουσία άλατος. Τα σωματίδια διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Το DNA στη συνέχεια ξεπλένεται ενδελχώς και εξάγεται.



Εικόνα 21: Διαδικασία εκχύλισης DNA με το μηχανήμα Biorobot EZ1 (Qiagen)

Στην εικόνα 22 φαίνεται το μηχάνημα της Qiagen Biorobot EZ1 που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση (extraction) DNA από ολικό αίμα (σε EDTA).



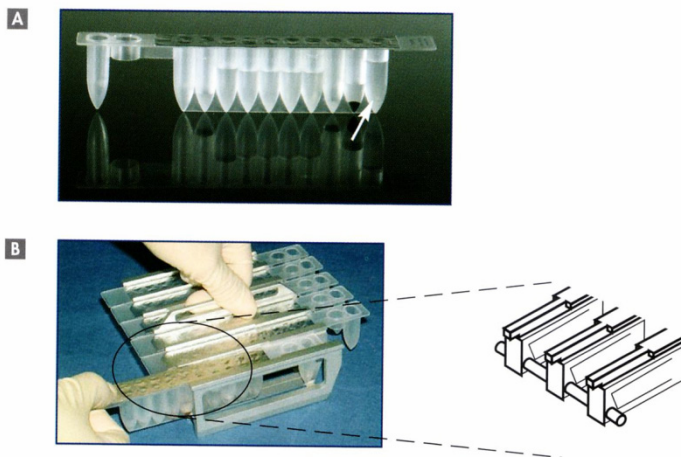
Εικόνα 22: Μηχάνημα Biorobot EZ1 (Qiagen)

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από ολικό αίμα σε φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA. Τα δείγματα αυτά είχαν καταψυχθεί στους -80°C και για να χρησιμοποιηθούν έπρεπε πρώτα να αποψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$) με ήπια ανάδευση, προτού ξεκινήσει η διαδικασία, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διαδικασία: Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Ξεπαγώνουμε τα δείγματα του αίματος, αφήνοντάς τα σε θερμοκρασία δωματίου ($15-25^{\circ}\text{C}$)
- Εισάγουμε την κάρτα EZ1 που περιέχει το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο
- Ανοίγουμε το μηχάνημα και ρυθμίζουμε το πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί
- Ανοίγουμε την πόρτα του μηχανήματος
- Αναμιγνύουμε τα φυσίγγια για να αναμειχθούν τα μαγνητικά σωματίδια
- Φορτώνουμε τα φυσίγγια στο ειδικό πλαίσιο
- Φορτώνουμε τα σωληνάρια για τη συγκομιδή του DNA
- Φορτώνουμε σε συγκεκριμένη θέση τα σωληνάρια με τα δείγματα που περιέχουν 200 μl ολικό αίμα

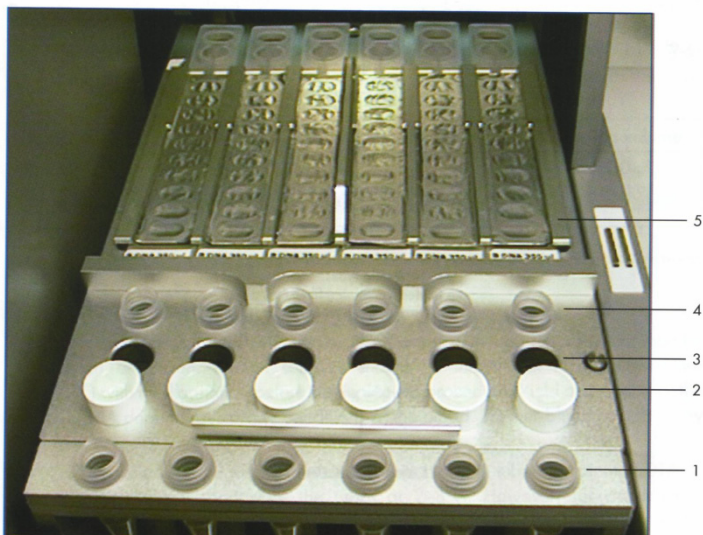
- Κλείνουμε την πόρτα του μηχανήματος
- Πατάμε το κουμπί start
- Όταν τελειώσει το πρωτόκολλο, ανοίγουμε την πόρτα και αφαιρούμε τα σωληνάρια με το DNA, ενώ απορρίπτουμε τα απόβλητα προσεκτικά.



Εικόνα 23

A: Ένα αεροστεγώς κλεισμένο, προγεμισμένο με αντιδραστήρια, φυσιγγίο. Με το βέλος υποδεικνύεται το πρώτο σωληνάριο

B: Φόρτωση των φυσιγγίων με αντιδραστήριο στη βάση.



Εικόνα 24: Τα σωληνάρια με το υγρό έκλουσης φορτώνονται στη θέση 1.

Θέση 2: Συσκευή συγκράτησης tips

Θέση 4: Σωληνάρια με το δείγμα προς εξέταση

Θέση 5: Φυσιγγία με αντιδραστήρια

Η ποσότητα DNA που εκλούεται είναι περίπου 200μl, ενώ η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από τον αριθμό των εμπύρηνων κυττάρων που υπάρχουν στο συγκεκριμένο δείγμα.

Έτσι, για όγκο αίματος 200μl που χρησιμοποιήθηκε στις μετρήσεις μας, το DNA που αποδίδει η διαδικασία, είναι περίπου 4 με 8 μg. Μπορεί να γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο στα 260 nm (A_{260}). Χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με ουδέτερο pH για διάλυση των δειγμάτων και για βαθμονόμηση (calibration) του φασματοφωτόμετρου.

Η μέτρηση γίνεται ως εξής:

- Αρχικά χρησιμοποιείται συσκευή διαχωρισμού των μαγνητικών σωματιδίων ή γίνεται φυγοκέντρηση του σωληναρίου με το DNA, για 1 λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο, ώστε να καθιζάνουν τυχόν εναπομείναντα μαγνητικά σωματίδια.
- Εφόσον ο διαχωρισμός ολοκληρωθεί, με προσοχή αφαιρούμε 10-50μl του DNA και τα διαλύουμε μέχρι να φτάσουμε σε τελικό όγκο 100μl, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα με ουδέτερο pH.
- Μετράται η απορρόφηση στα 320nm και στα 260nm. Αφαιρούμε την απορρόφηση που διαβάζουμε στα 320nm από την απορρόφηση που λαμβάνουμε στα 260nm, για επίτευξη διόρθωσης από την παρουσία μαγνητικών σωματιδίων.

Η καθαρότητα του DNA μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας την αναλογία της διορθωμένης απορρόφησης στα 260nm με τη διορθωμένη απορρόφηση στα 280 nm, ως εξής:

$$(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320}).$$

Το καθαρό DNA έχει αναλογία A_{260}/A_{280} περίπου 1.7-1.9.

Το kit της αντίδρασης περιέχει πρωτεϊνάση K (proteinase K) ένζυμο που απομονώνεται από το σαπροφυτικό μύκητα *Tritirachum album* και είναι εξαιρετικά κατάλληλος για μικρής διάρκειας πέψη. Έχει υψηλή ειδική δραστηριότητα, που παραμένει σταθερή σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και τιμών pH, με σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η δραστηριότητα του διαλύματος της πρωτεϊνάσης K είναι 600 μAU/ml (ή 40mAU/mg πρωτεΐνης). Η

πρωτεΐνάση K, η οποία ανήκει στις πρωτεάσες σερίνης, είναι χρήσιμη για την πρωτεολυτική απενεργοποίηση των νουκλεασών κατά την απομόνωση του DNA.

Το κεκαθαρισμένο DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 2-8° C για 24 ώρες ή στους -20° C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι ουσιαστικά μια γρήγορη και απλή μέθοδος αντιγραφής και πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) μιας συγκεκριμένης περιοχής του DNA με καθορισμένο μήκος και αλληλουχία, κατά την οποία χρησιμοποιείται ακόμη και απειροελάχιστη ποσότητα υποστρώματος. Το μήκος του πολλαπλασιαζόμενου DNA κυμαίνεται από 50 μέχρι και πάνω από 2000 ζεύγη βάσεων.

Αρχή της μεθόδου: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός προεπιλεγμένου τμήματος DNA το οποίο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Η τεχνική βασίζεται στη χρήση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά προς περιοχές που κείνται σε αντιπαράλληλες αλυσίδες του DNA υποστρώματος ένθεν και ένθεν της προεπιλεγμένης περιοχής και δεν είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά εκκινούν μια σειρά αντιδράσεων που καταλύονται από μία DNA πολυμεράση.

Η όλη αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (thermocyclers). Το σωληνάριο της αντίδρασης περιέχει:

- Το **DNA υπόστρωμα (template)** που περιέχει την προς ενίσχυση αλληλουχία. Κάθε αλυσίδα του DNA λειτουργεί ως υπόστρωμα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής του αλυσίδας. Οι μονές αλυσίδες DNA δημιουργούνται από τη θέρμανση του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασίες που βρίσκονται κοντά στο σημείο βρασμού (αποδιάταξη DNA, denaturation). Το αρχικό DNA μπορεί να προέρχεται από οποιαδήποτε πηγή (αίμα, επιθηλιακά κύτταρα, σπέρμα, παθολογοανατομικό υλικό και άλλα) και αρκεί ακόμη και απειροελάχιστη ποσότητα αυτού.

- **Εκκινητές (primers).** Είναι μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μήκους 20-30 βάσεων) λειτουργούν ως εκκινητές (primer) για να ξεκινήσει η αντιγραφή του DNA-στόχου. Οι εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του προς ενίσχυση DNA και οριοθετούν την περιοχή του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.
- **DNA πολυμεράση (DNA polymerase).** Στις αρχικές εφαρμογές της PCR χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράση της E.coli. Το ένζυμο αυτό είναι θερμοασταθές, αδρανοποιείται στους 94° C και είναι αναγκαία η προσθήκη ενζύμου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, μετά το στάδιο της αποδιάταξης. Η απομόνωση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq polymerase) και η χρησιμοποίησή της στις αντιδράσεις PCR απλοποίησε σημαντικά τη μέθοδο, διότι απαιτούσε την προσθήκη του ενζύμου αυτού μόνο μια φορά στην αρχή της αντίδρασης. Έτσι, η Taq polymerase βοήθησε στην αυτοματοποίηση της PCR και στη δυνατότητα ευρείας εφαρμογής της.
- **Μείγμα τεσσάρων δεσοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs).** Για την παραγωγή της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA στην PCR, όπως και στη διαδικασία αντιγραφής του DNA στο κύτταρο, χρησιμοποιείται μείγμα τεσσάρων δεσοξυροβονουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP, GTP) που εφαρμόζουν στη μήτρα και πολυμερίζονται, με τη βοήθεια της πολυμεράσης κατά το στάδιο επέκτασης των εκκινητών. Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να έχουν ισομοριακή συγκέντρωση στο σωληνάριο της αντίδρασης.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα με χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂).** Το σωληνάριο της αντίδρασης PCR περιέχει το κατάλληλο για την εκάστοτε Taq polymerase ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς και συγκεκριμένη κατά περίπτωση συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου, που συμβάλλει στη σταθεροποίηση των εκκινητών στα σημεία σύνδεσης με το εκμαγείο DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20-100μl. [201] [202]

Στάδια-Συνθήκες PCR: Κατά την αντίδραση λαμβάνουν χώρα τα στάδια της αποδιάταξης, της κυρίως αντίδρασης που περιλαμβάνει τρεις φάσεις και της τελικής επέκτασης των συντιθέμενων μορίων DNA.

- **Αρχική αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA:** 90-95° για 5-15 λεπτά

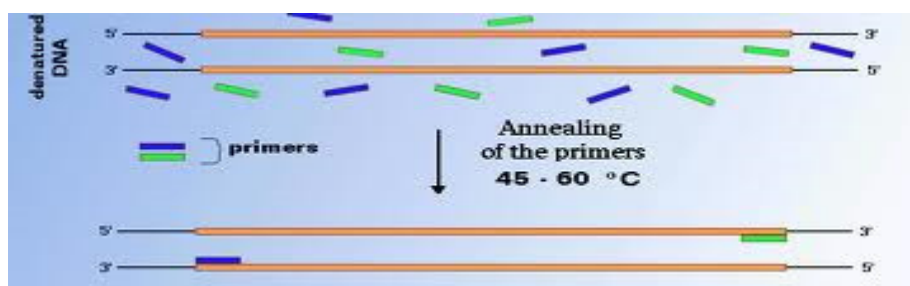
Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των θερμοκυκλοποιητών. Θέρμανση στους 90-95°, επιφέρει πλήρη αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, δηλαδή διάσπαση των υδρογονικών δεσμών με αποτέλεσμα τη δημιουργία μονών αλυσίδων. Η φάση αυτή λαμβάνει χώρα μόνο μία φορά, κατά την έναρξη της PCR, πριν από την έναρξη του πρώτου κύκλου της κύριας αντίδρασης.

- **Κυρίως αντίδραση:** διεξάγεται σε 25-40 κύκλους και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τη φάση αποδιάταξης, τη φάση σύνδεσης των εκκινητών, τη φάση επέκτασης.

Η **φάση αποδιάταξης (Template denaturation)** διαρκεί 30-60'' σε θερμοκρασία 90-95° C και επιφέρει τον τελικό διαχωρισμό των αλυσίδων της διπλής έλικας κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου της αντίδρασης. Μετά το τέλος του πρώτου κύκλου, αλλά και μετά τις διαδοχικές αντιγραφές του DNA, η φάση αυτή βοηθά στο διαχωρισμό των αρχικών αλυσίδων του DNA-στόχου από τα νεοσυντιθέμενα τμήματα DNA.

Η **φάση σύνδεσης των εκκινητών (primer annealing)** διαρκεί 30-60'' σε θερμοκρασία 50-65° C.

Σ' αυτό το δεύτερο στάδιο της κυρίως αντίδρασης επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών στις θέσεις των αποδιαταγμένων αλυσίδων του DNA, που έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με αυτούς.



Εικόνα 25: Primer Annealing

Επομένως, για τη σύνθεση κατάλληλων εκκινητών πρέπει να γνωρίζουμε την ακριβή αλληλουχία της θέσης αυτής.

Η θερμοκρασία επώασης στο στάδιο αυτό εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του εκκινητή. Η θερμοκρασία επώασης ($50-65^{\circ}\text{C}$ για $30''-60''$), πρέπει να είναι ελαφρώς μικρότερη από την T_m του εκκινητή.

Η T_m του κάθε εκκινητή υπολογίζεται ως εξής:

$$T_m = [4X(G+C)] + [2X(A+T)]^{\circ}\text{C}.$$

Η ακρίβεια σ' αυτό το στάδιο είναι καθοριστική για την ειδικότητα της τελικής αντίδρασης και των προϊόντων της PCR.

Η **φάση επέκτασης των μορίων (primer extension)** διαρκεί $60''-120''$ σε θερμοκρασία 72°C .

Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει τη σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών.

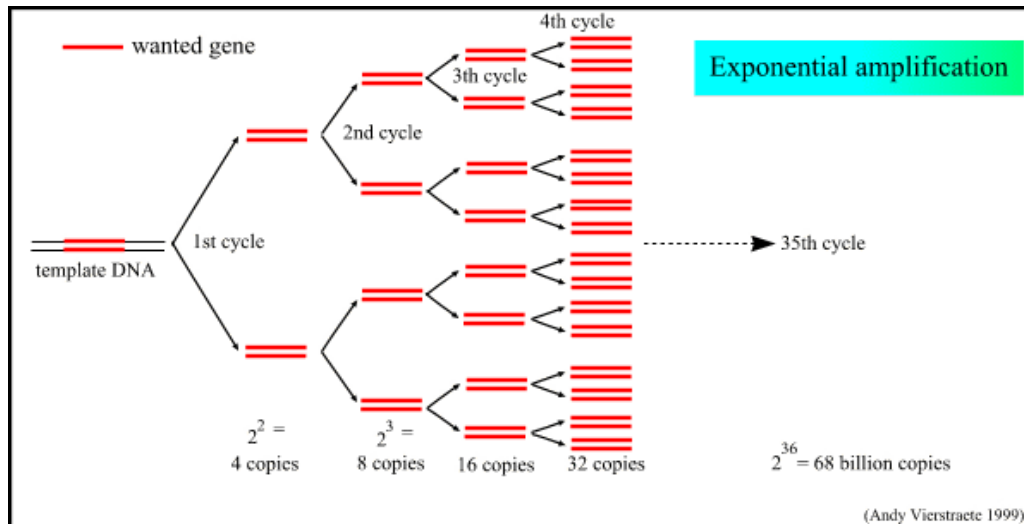
Η θέρμανση για $1'-2'$ στους 72°C ευνοεί τη σύνδεση της πολυμεράσης στις θέσεις που έχουν υβριδισθεί οι εκκινητές με σκοπό τη σύνθεση των συμπληρωματικών DNA-αλληλουχιών. Στη φάση αυτή χρειάζονται, εκτός από τους συμπληρωματικούς με τις δύο περιοχές του DNA-στόχου εκκινητές, η παρουσία περίσσειας δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (μίγμα dNTPs) και Taq πολυμεράσης, ώστε η πολυμεράση να αντιγράψει το μονόκλωνο DNA με κατεύθυνση $5'-3'$ και να συνθέσει το θυγατρικό κλώνο επεκτείνοντας τους εκκινητές, προσθέτοντας τα νουκλεοτίδια ένα-ένα στη θέση $3'$ της δίκλωνης περιοχής.

Μετά από κάθε κύκλο PCR, το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή αποτελεί υπόστρωμα για τους επόμενους κύκλους.

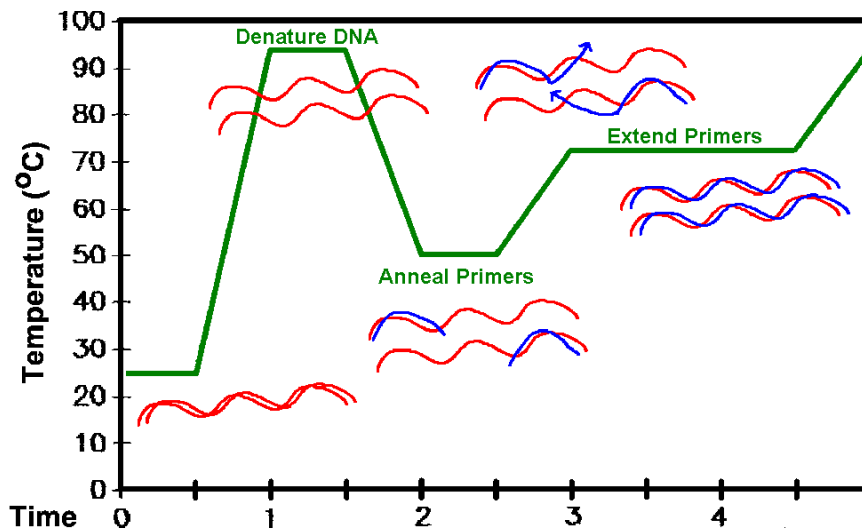
Σε κάθε κύκλο, ο αριθμός των μορίων διπλασιάζεται (εκθετική αύξηση). Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης, είναι ένα δίκλωνο DNA που τα άκρα του ορίζονται από τα $5'$ - άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση μεταξύ των εκκινητών. Σαν παράδειγμα, μετά από 32 κύκλους σχηματίζονται 2^{32} ($1.073.741.824$) τμήματα διπλής έλικας DNA. Αυτά τα μόρια είναι αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που εμπεριέχεται ανάμεσα στους δύο εκκινητές.

- **Τελική επέκταση συντιθέμενων μορίων DNA:** στους 72°C επί $10'$.

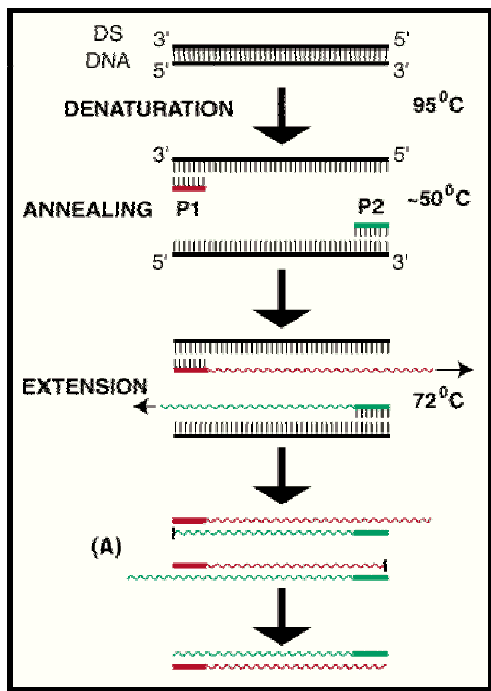
Μετά τον τελευταίο κύκλο της κυρίως αντίδρασης PCR, το προϊόν αφήνεται στους 72° C για 10'. Μ' αυτόν τον τρόπο το ένζυμο ολοκληρώνει τη σύνθεση όλων των αλυσίδων μέχρι το 3' άκρο κάθε αλυσίδας.



Εικόνα 26: Επέκταση συντιθέμενων μορίων DNA



Εικόνα 27: θερμοκρασίες και στάδια PCR



Εικόνα 28: Στάδια PCR

Αναγνώριση του προϊόντος της PCR

Η επιτυχία της PCR πιστοποιείται με ηλεκτροφόρηση μικρού κλάσματος του προϊόντος (το 1/10 του αρχικού όγκου της αντίδρασης), σε πήκτωμα αγαρόζης και μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Παράλληλα ηλεκτροφορείται ένας δείκτης μοριακού μεγέθους, όπως για παράδειγμα το DNA του φάγου ΦΧ174 που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HaeII, ο οποίος παρέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους .

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, το DNA κωδικοποιεί με τη μορφή γονιδίων όλες τις απαραίτητες για τη ζωή πληροφορίες. Παρά όμως την ύπαρξη μηχανισμών ελέγχου/επιδιόρθωσης συμβαίνουν λάθη τα οποία προκαλούν αλλαγές (μεταλλάξεις), είτε στη νουκλεοτιδική σύσταση, είτε στην ποσότητα του DNA. Οι αλλαγές αυτές είναι είτε ποσοτικές και αφορούν ελλείμματα ή προσθήκες τμημάτων DNA είτε ποιοτικές και αφορούν αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από κάποιο άλλο (σημειακές μεταλλάξεις).

Μια ιδιαίτερη περίπτωση αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι οι πολυμορφισμοί, οι οποίοι αφορούν αλλαγές μιας νουκλεοτιδικής βάσης στην αλληλουχία του DNA χωρίς την πρόκληση κάποιου παθολογικού φαινοτύπου. Η συχνότητά τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται σε 1: 250-300 βάσεις.

Ειδικότερα στη γενετική, μια γονιδιακή θέση χαρακτηρίζεται πολυμορφική, όταν το γονίδιο που αντιστοιχεί στη θέση αυτή εμφανίζεται διαφορετικό στα διάφορα μέλη μιας πληθυσμιακής μονάδας. Για να χαρακτηριστεί μια γονιδιακή θέση ως πολυμορφική θα πρέπει, σύμφωνα με τον νόμο Hardy-Weinberg [203] τουλάχιστον το 2% του πληθυσμιακού δείγματος να είναι ετερόζυγοι για αυτή τη θέση.

Στο μοριακό επίπεδο ο πολυμορφισμός κυμαίνεται από την αλλαγή μιας μόνο βάσης ενός μόνο νουκλεοτιδίου μέχρι την αλλαγή ενός αριθμού τυχαία επαναλαμβανομένων μονάδων πάνω στο DNA (δορυφόροι). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να μην έχουν ανιχνεύσιμες φαινοτυπικές συνέπειες, να είναι δηλαδή «σιωπηλές». Μπορεί όμως να κατευθύνουν τη σύνθεση διαφορετικών τύπων του ίδιου ενζύμου που να έχουν διαφορετική δράση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH ή στη θερμοκρασία (ισοένζυμα).

Ένα παράδειγμα σιωπηλών αλλαγών είναι οι μεταλλάξεις που τροποποιούν ή απαλείφουν τις θέσεις αναγνώρισης δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών (ενζύμων). Πιο συγκεκριμένα, αν πάνω στο DNA υπάρχει συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων που είναι εξειδικευμένη για τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης, τότε η ενδονουκλεάση, αναγνωρίζοντας τη θέση δράσης της, διασπά στο σημείο εκείνο το DNA δημιουργώντας δύο κλάσματα DNA συγκεκριμένου μεγέθους. Αν όμως η θέση αυτή αναγνώρισης λείπει ή έχει τροποποιηθεί π.χ. ή μέσω μεθυλίωσης ή σημειακής μετάλλαξης, τότε θα προκύψουν κλάσματα DNA διαφορετικού μεγέθους από το αναμενόμενο. Η έννοια του πολυμορφισμού σ' αυτή την περίπτωση εκφράζεται με τον όρο «πολυμορφισμός κλασμάτων μεγέθους DNA από την δράση περιοριστικής ενδονουκλεάσης» (restriction fragment length polymorphism, RFLPs).

Σήμερα υπάρχουν πολλές μέθοδοι μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών:

- Ο υβριδισμός με ιχνηθετημένα ολιγονουκλεοτίδια (allele specific oligonucleotides hybridization, ASO)

- Με το σύστημα ARMS (Amplification Refractory Mutation System), για την ταυτοποίηση σημειακών μεταλλάξεων, που βασίζεται στην ανάγκη απόλυτης συμπληρωματικότητας του εκκινητή (για το μεταλλαγμένο και του άγριου τύπου αλληλόμορφο) για επιτυχή: α) σύνδεση με το DNA-στόχο και β) τη σύνθεση των θυγατρικών μορίων DNA.
- Οι πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs)
- Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα κλίσης πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)
- Οι πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand conformation Polymorphism, SSCP)
- Η προστασία ριβονουκλεάσης (RNA protection)
- Ο άμεσος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (DNA sequencing)
- καθώς και άλλες μέθοδοι.

Στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στα γονίδια των προθρομβωτικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις πρώτες μέθοδοι (ASO, RFLP και ARMS).

Silent mutation

Wild Type DNA	TAC	GGG	AAA	GTC	CGT	GGC
Wild Type mRNA	AUG	CCC	UUU	CAG	GCA	CCG
Amino acids	Met	-Pro-	Phe-	Gln-	Ala-	Pro
Mutated DNA	TAC	GGG	AAG	GTC	CGT	GGC
Mutated mRNA	AUG	CCC	UUC	CAG	GCA	CCG
Amino acids	Met	-Pro-	Phe-	Gln-	Ala-	Pro

Σιωπηρή Μετάλλαξη: Αν η μετάλλαξη επισυμβεί σε περιοχή ιντρονίων (introns-μέρη που δεν κωδικοποιούνται), τότε η μετάλλαξη αυτή είναι γνωστή ως σιωπηρή. Τα ιντρόνια αποκόπτονται από το mRNA. Επίσης η μετάλλαξη μπορεί να είναι σιωπηρή λόγω της φύσης του γενετικού κώδικα, να κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ, ακόμη και με διαφορετικές τριπλέτες βάσεων. Έτσι, στο γενετικό κώδικα, περισσότερο από ένα κωδικόνια κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ. Αν η μετάλλαξη επισυμβεί και το καινούριο κωδικόνιο που προκύπτει κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ, τότε η μετάλλαξη αυτή καλείται σιωπηρή. Όπως φαίνεται και στο παράδειγμα, αν η μετάλλαξη επισυμβεί στο τρίτο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας UUU και η τριπλέτα μετατραπεί σε UUC, τότε δε θα έχουμε αλλαγή στο πολυπεπίδιο που παράγεται από το mRNA, λόγω του γεγονότος πως και οι δύο τριπλέτες, UUU και UUC κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ, τη φαινυλαλανίνη (Phenylalanine)

Mis sense mutation

Wild Type DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	ATC
Wild Type mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	UAG
Amino acids	Met	-Val-	Gly-	Arg-	Stop
Mutated DNA	TAC	GAC	CCC	GCC	ATC
Mutated mRNA	AUG	CUG	GGG	CGG	UAG
Amino acids	Met	-Leu-	Gly-	Arg-	Stop

Missense mutation: Αν η μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, τότε η μετάλλαξη είναι γνωστή ως missense. Μπορεί να συμβεί οπουδήποτε στο DNA και σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο οποιουδήποτε κωδικονίου.

Nonsense mutation

Wild Type DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	CTT	CAC	ACC	ATT
Wild Type mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	GAA	GUG	UGG	UAA
Amino acids	Met	- Val-	Gly-	Arg-	Glu-	Val-	Trp-	Stop
Mutated DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	<u>ATT</u>	CAC	ACC	ATT
Mutated mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	<u>UAA</u>			
Amino acids	Met	- Val-	Gly-	Arg-	Stop			

Nonsense mutation: όταν η μετάλλαξη καταλήγει στο σχηματισμό κωδικονίου λήξης. Υπάρχουν τρία κωδικόνια λήξης στο γενετικό κώδικα τα UAA, UAG και UGA. Η διαδικασία παραγωγής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σταματά όταν η «μηχανή» μετάφρασης συναντήσει ένα κωδικόνιο λήξης.

Με λίγα λόγια,

Missense mutation: η μετάλλαξη κατά την οποία, αλλαγή σε ένα κωδικόνιο καταλήγει στο να κωδικοποιείται διαφορετικό αμινοξύ.

Nonsense point mutation: μετάλλαξη κατά την οποία αλλαγή του κωδικονίου οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης.

2. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: FV, FII ΚΑΙ MTHFR ΜΕ MULTIPLEX PCR

3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΜΕΣΩ ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (ASO) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

Αρχή της μεθόδου. Το συγκεκριμένο test βασίζεται στην τεχνολογία του ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization). Οι σχετικές γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούν για τους προθρομβωτικούς παράγοντες (*FII* , *FV* και *MTHFR*) ενισχύονται ταυτόχρονα μέσω μιας πολυπλεκτικής PCR (multiplex PCR) με τη χρήση εκκινητών ιχνηθετημένων με βιοτίνη. Τα βιοτινυλιομένα προϊόντα ενίσχυσης της PCR υβριδίζονται με ειδικούς (τόσο για τα «άγριου τύπου» όσο και των μεταλλαγμένα αλληλόμορφα) ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (allele specific oligonucleotide probes), οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι σε παράλληλες γραμμές πάνω σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που έχουν το σχήμα ταινίας (strips). Μετά το στάδιο του υβριδισμού και το «αυστηρό ξέπλυμα», προστίθεται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση, η οποία προσδένεται πάνω σε οποιοδήποτε σχηματισμένο (κατά το στάδιο υβριδισμού), βιοτινυλιομένο υβρίδιο.

Περιλαμβάνει τα βήματα:

- Εξαγωγή γενωμικού DNA (genomic DNA extraction). Έγινε με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω
- Ταυτόχρονη ενίσχυση με πολυπλεκτική PCR των 5 προεπιλεγμένων γονιδιακών περιοχών . Οι εκκινητές είναι ιχνηθετημένοι με βιοτίνη, άρα και τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR.
- Τα ενισχυμένα και ιχνηθετημένα προϊόντα ενίσχυσης, υβριδίζονται με τους ειδικούς για τα αλληλόμορφα ανιχνευτές (allele specific probes) που βρίσκονται ακινητοποιημένοι σε ταινίες νιτροκυτταρίνης ή νάιλον (στερεά φάση).
- Πραγματοποιούνται εκπλύσεις των μη υβριδισμένων ιχνηθετημένων προϊόντων PCR και τελικό «αυστηρό» ξέπλυμα (stringent washing).
- Προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση
- Αντίδραση εμφάνισης χρώματος με σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης μετά την προσθήκη του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης : BCIP/NBT (χρωμογόνο).
- Οπτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Αντιδραστήρια:

Χρησιμοποιήθηκε το kit RHYMA test CVD, (Euroclone, Human Diagnostics). Το kit αυτό ανιχνεύει τις παρακάτω 5 μεταλλάξεις:

- *Factor V*:
 1. R506Q (Factor V Leiden)
 2. H1299R (haplotype HR2)
- *Factor II* (prothrombin):
 3. G20210A
- *MTHFR*
 4. C677T
 5. A1298C

Το kit μπορεί να διακρίνει άτομα ομόζυγα ή ετερόζυγα για τις παραπάνω μεταλλάξεις.

Για τη multiplex PCR

- Μίγμα αντιδραστηρίων ενίσχυσης: περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα, κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων Mg, dNTPs, TaqDNA πολυμεράση και H₂O.
- Μίγμα ιχνηθετημένων με βιοτίνη ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών), ειδικών ως προς τα μεταλλαγμένα και τα «άγριου τύπου» (wild type) αλληλόμορφα, σε κατάλληλη συγκέντρωση.

Για τον ανάστροφο υβριδισμό

- Αντιδραστήριο αποδιάταξης του προϊόντων της multiplex PCR (DNAT): περιέχει 1.6% NaOH.
- Διάλυμα υβριδισμού (hybridization buffer).
- Διάλυμα εκπλύσεων (wash buffer A), χρησιμοποιείται και για το τελικό «αυστηρό ξέπλυμα».
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (conjugate solution)
- Διάλυμα έκπλυσης B.

- Διάλυμα υποστρώματος του ενζύμου- αλκαλική φωσφατάση (chromogenic solution): NBT/BCIP (Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate).
- Ταινίες νιτροκυτταρίνης με ακινητοποιημένους ανιχνευτές, ειδικούς των υπό έλεγχο αλληλομόρφων (ASO).

Διαδικασία multiplex PCR:

Για κάθε πείραμα, παρασκευάζουμε ένα κύριο μείγμα (master mix) για τα δείγματα προς εξέταση. Τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται με την παρακάτω αναλογία:

Αντιδραστήρια master mix	Όγκος (μl)
Μείγμα ενίσχυσης (amplification mix)	$22.5 \times (N+1)^*$
Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (oligo mix)	$22.5 \times (N+1)$
Γενομικό DNA	5

*όπου N : αριθμός των υπό εξέταση δειγμάτων

Μετά την παρασκευή του μείγματος, διαχωρίζουμε 45μl από αυτό το κύριο μείγμα, σε σωληνάρια PCR (100μl) και στη συνέχεια προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο 5μl από το DNA του κάθε δείγματος προς εξέταση (που αντιστοιχούν σε 200-500ng).

Στη συνέχεια βάζουμε τα σωληνάρια στο θερμοκυκλοποιητή (MJ Research, PTC-0150, Massachusetts. USA), εφόσον έχει φτάσει στη θερμοκρασία 94° C. Ξεκινούμε το πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή, το οποίο έχει ως εξής:

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΘΕΡΜΟΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗ		
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	94° C, 5 min	
Κυρίως αντίδραση		
Αποδιάταξη (denaturation)	94° C, 15 sec	35 κύκλοι
Πρόσδεση εκκινητών (annealing)	58o C, 30 sec	
Επέκταση (extension)	72o C, 30 sec	
Τελική επέκταση (final extension)	72o C, 5 min	

Στο τέλος του προγράμματος, μεταφέρουμε τα σωληνάρια και τα φυλάσσουμε στους 4° C ή σε πάγο, εφόσον συνεχίσουμε τη διαδικασία άμεσα.

Μπορεί, σ' αυτό το στάδιο της ανάλυσης, να ηλεκτροφορήσουμε τα προϊόντα ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης στο οποίο έχει ενσωματωθεί βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) και με την συνηλεκτροφόρηση δείκτη μοριακών μεγεθών, κλίμακας 100 base pairs (bp) (ladder), να αναγνωριστεί η επιτυχής ενίσχυση και τα μοριακά βάρη των προϊόντων, τα οποία είναι: FV1299 / MTHFR1298 / FII Prothrombin / MTHFR677 / FVLeiden αντίστοιχα: 308 bp /232 bp /190 bp /142 bp /119 bp.

ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (Hybridization)

Το ζευγάρι των βάσεων μιας αλυσίδας νουκλεϊκού οξέος με μια άλλη, με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας ενοείται θερμοδυναμικά και σχηματίζεται αυθόρμητα κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης αλάτων και pH, όταν υπάρχει συμπληρωματικότητα των βάσεων. Αυτό το φαινόμενο καλείται αναδιάταξη (denaturation) ή υβριδισμός (hybridization).

Η μέθοδος του υβριδισμού χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη γονιδιακών περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ειδικότερα η μελέτη του DNA διευκολύνεται σημαντικά με τη χρήση ειδικών ενζύμων, των περιοριστικών ενδονουκλεασών, που τέμνουν το DNA σε μικρότερα τμήματα, κατά απόλυτα αναπαραγωγίμο τρόπο.

Διαδικασία ανάστροφου υβριδισμού

Ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία στο υδατόλουτρο στους 44° C.

Προθερμαίνουμε τα φιαλίδια με το διάλυμα υβριδισμού, και το διάλυμα εκπλύσεων A. Συγχρόνως, αφήνουμε τα υπόλοιπα διαλύματα: το DNAT, διάλυμα στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (conjugate solution), διάλυμα έκπλυσης B, χρωμογόνο διάλυμα (chromogenic solution) σε θερμοκρασία δωματίου.

Είναι πολύ σημαντικό να μην αγγίζουμε με γυμνά χέρια τις ταινίες νιτροκυτταρίνης που φέρουν τους ακινητοποιημένους ανιχνευτές. Αριθμούμε τις ταινίες με μολύβι (δε χρησιμοποιούμε στυλό).

Οι διαδικασίες υβριδισμού, εκπλύσεων και ανάπτυξης των χρωματικών αντιδράσεων, πραγματοποιούνται σε πλαστικά λεκανίδια τα οποία φέρουν μεμονωμένες αύλακες για την τοποθέτηση της κάθε ταινίας νιτροκυτταρίνης που αντιστοιχούν στα επιμέρους προς έλεγχο δείγματα.

- Αριθμούμε τις αύλακες του λεκανιδίου, ανάλογα με τα προς έλεγχο δείγματα .
- Με πιπέττα βάζουμε 20μl από το αντιδραστήριο αποδιάταξης (DNAT) σε κάθε αριθμημένη αύλακα.
- Προσθέτουμε 20μl από το προϊόν ενίσχυσης της multiplex PCR και αναμειγνύουμε με πιπεττάρισμα. Το διάλυμα πρέπει να είναι μπλε.
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθέτουμε σε κάθε αύλακα, (δηλαδή σε κάθε δείγμα) 1ml από το διάλυμα υβριδισμού, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 44° C και στη συνέχεια αναμειγνύουμε απαλά. Το διάλυμα τώρα πρέπει να είναι άχρωμο.
- Τοποθετούμε μέσα σε κάθε αύλακα μία ταινία, εμβυθίζοντάς την ολόκληρη, με τη σημειωμένη πλευρά που φέρει τους ακινητοποιημένους ανιχνευτές, προς τα πάνω.
- Επωάζουμε για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο, στους 44° C, σε συνθήκες ανάδευσης (περίπου 100rpm).
- Βγάζουμε το λεκανίδιο από το υδατόλουτρο και αφαιρούμε το υγρό, χρησιμοποιώντας μια πιπέττα Pasteur ή αντλία κενού (vacuum). Είναι πολύ σημαντικό να μην επιτρέψουμε την ξήρανση των ταινιών (strips) καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Εκπλύσεις:

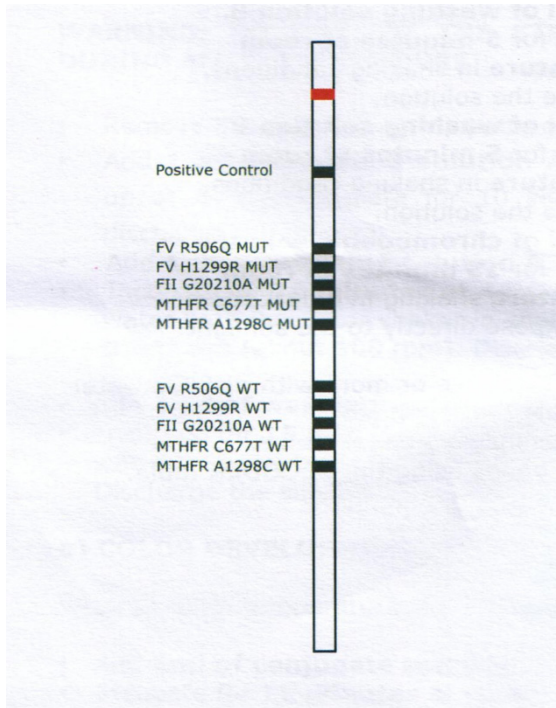
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης A, το οποίο το είχαμε ήδη προθερμάνει στους 44° C.
- Επωάζουμε για 10 δευτερόλεπτα και αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης A.
- Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 44° C στο υδατόλουτρο σε συνθήκες ανάδευσης (περίπου 100rpm).

- Αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης Α.
- Επωάζουμε για 15 λεπτά στους 44° C στο υδατόλουτρο σε συνθήκες ανάδευσης (περίπου 100rpm).
- Αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.

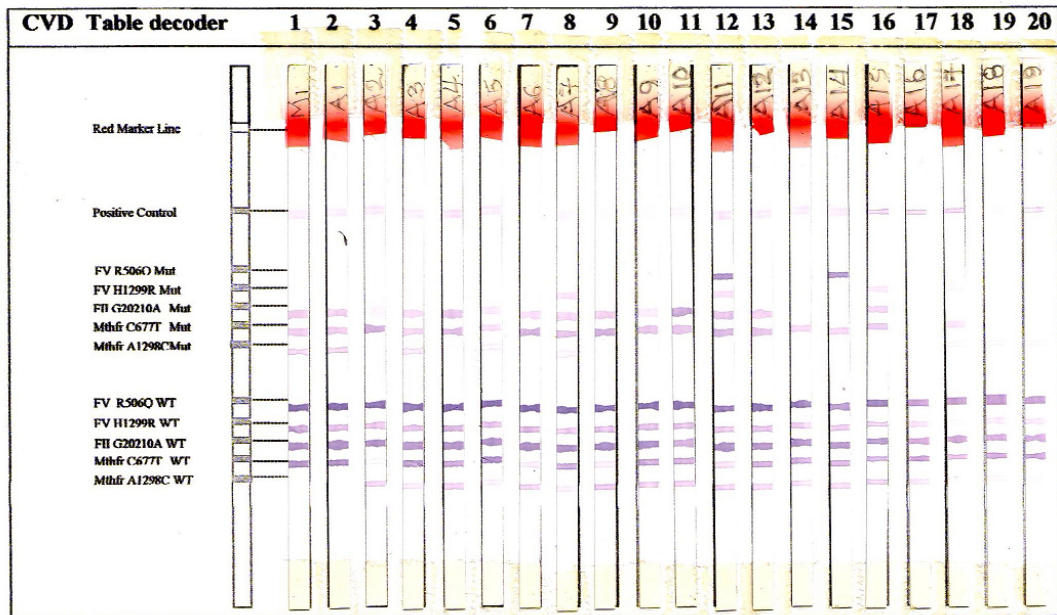
Εμφάνιση χρώματος:

Όλες οι εργασίες γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκες ανάδευσης.

- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα σύζευξης (conjugate solution). Επωάζουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκες ανάδευσης.
- Αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης Β.
- Επωάζουμε για 10 δευτερόλεπτα και αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης Β.
- Επωάζουμε για 5 λεπτά και αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.
- Προσθέτουμε 1ml από το διάλυμα έκπλυσης Β.
- Επωάζουμε για 5 λεπτά και αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur
- Προσθέτουμε 1 ml από το χρωμογόνο διάλυμα (chromogenic solution)
- Επωάζουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκες ανάδευσης και σε σκοτεινό χώρο. Δεν πρέπει να εκθέσουμε τις ταινίες στο άμεσο ηλιακό φως.
- Αφαιρούμε το υγρό με πιπέττα Pasteur.
- Ξεπλένουμε τις ταινίες μία ή και περισσότερες φορές με απεσταγμένο νερό (water for injection) ή με EDTA 1mM.
- Στεγνώνουμε τις ταινίες, ανάμεσα σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσδιορίζουμε τις ζώνες υβριδισμού πάνω στις ταινίες, χρησιμοποιώντας την ταινία-πρότυπο αποκωδικοποίησης (Εικόνα 29) που παρέχει με το kit ο κατασκευαστής.



Εικόνα 29: Σχηματική εικόνα της ταινίας-πρότυπο για την αποκωδικοποίηση / ταυτοποίηση των ζωνών- υβριδισμού.



Εικόνα 30: Αποτελέσματα παρούσας μελέτης για FVL, FII G20210A, MTHFR

4. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ PAI-1 ΜΕ MULTIPLEX PCR ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ (ASO)

Χρησιμοποιήθηκε το kit Geno Type® PAI-1 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), το οποίο χρησιμοποιεί την ίδια τεχνολογία και την ίδια αρχή μεθόδου με το προαναφερόμενο kit RHYMA test CVD, της Euroclone. Το Geno Type® PAI-1, επιτρέπει το συνδυασμένο μοριακό και γενετικό χαρακτηρισμό (ομοζυγωτία, ετεροζυγωτία), των θέσεων -675 και -844 στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου, του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1).

Αντιδραστήρια

1. Μείγμα (PNM): εκκινητών, ειδικών για τους γονιδιακούς τόπους που περιβάλλουν τις θέσεις -675 και -844 του PAI-1, τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων και χρωστική (για την Multiplex PCR).
2. Μεμβράνες σε μορφή ταινίας (STRIPS), που φέρουν ακινητοποιημένους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (probes), ειδικούς για τα επιμέρους αλληλόμορφα των θέσεων, -675 : 4G/5G και -844: A/G. Επίσης, οι μεμβράνες φέρουν ζώνες Conjugate Control (CC), Specificity Control (Spec-C), Sensitivity Control -675 4G/5G (Sens-675) και Sensitivity Control A-844G (Sens-844).
3. Διάλυμα αποδιάταξης: περιέχει χρωστική και < 2% NaOH (DEN).
4. Buffer υβριδισμού (HYB): περιέχει 8-10% ανιονικά τασιενεργά.
5. Διάλυμα για το κριτικό ξέπλυμα (STR, Stringent Wash Solution): περιέχει χρωστική, >25% κάποια ένωση του τεταρτοταγούς αμμωνίου και <1% ανιονικά τασιενεργά.
6. Διάλυμα εκπλύσεων (RS, Rinse Solution): περιέχει buffer, <1% NaCl και <1% ανιονικά τασιενεργά.
7. Πυκνό διάλυμα Conjugate (CON-C): περιέχει χρωστική και στρεπταβιδίνη συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση.
8. Buffer αραίωσης του CON-C: περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 1% blocking reagent και <1% NaCl.

9. Πυκνό διάλυμα υποστρώματος (SUB-C): περιέχει διάλυμα υποστρώματος και διμεθυλ σουλφοξείδιο (DMSO).

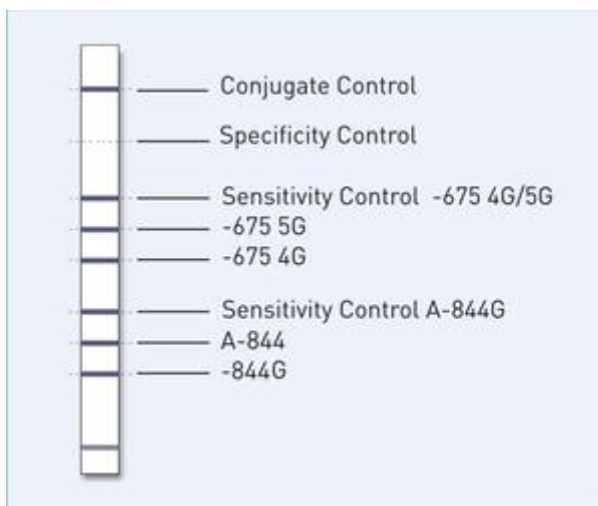
10. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του SUB-C: περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, < 1% MgCl₂ και < 1% NaCl.

Διαδικασία

Η διαδικασία του ανάστροφου υβριδισμού των προϊόντων της Multiplex PCR με τους ακινητοποιημένους ανιχνευτές επί των μεμβρανών (STRIPS), είναι σε γενικές γραμμές όμοια με αυτή που παρουσιάστηκε παραπάνω για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στα γονίδια των παραγόντων : *FV*, *FII* και *MTHFR*, και γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

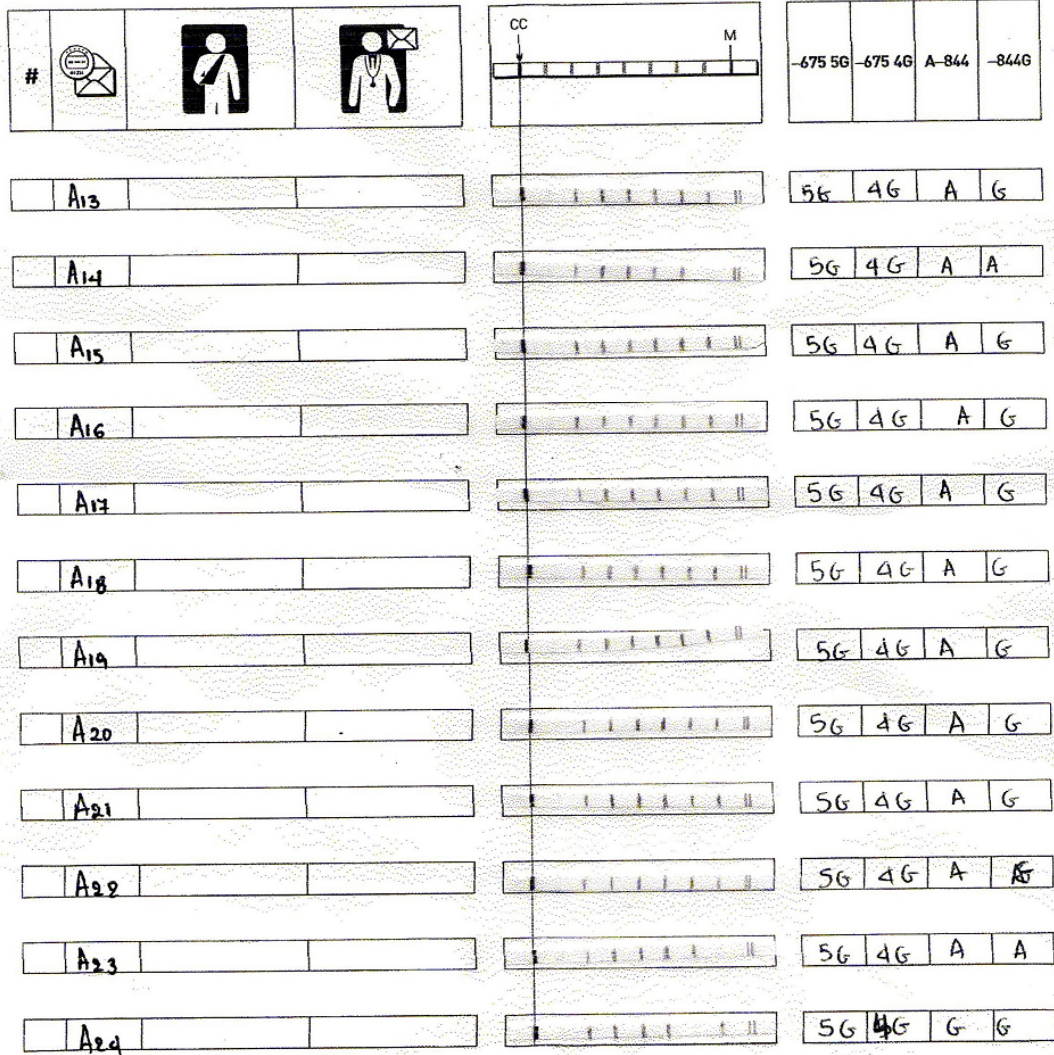
Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες αξιολόγησης και το πρότυπο ερμηνείας (evaluation sheet) που παρέχει ο κατασκευαστής με το kit. Κάθε ταινία (strip) έχει ένα σύνολο 8 ζωνών (όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 31)



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση ταινίας (strip)

GenoType® PAI-1 12

VER 2.0
00222-0407-02-6



Εικόνα 32: Αποτελέσματα παρούσας μελέτης για τους πολυμορφισμούς του PAI

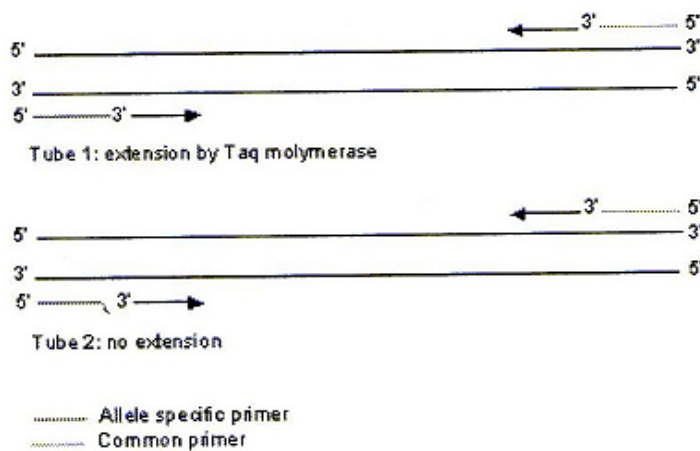
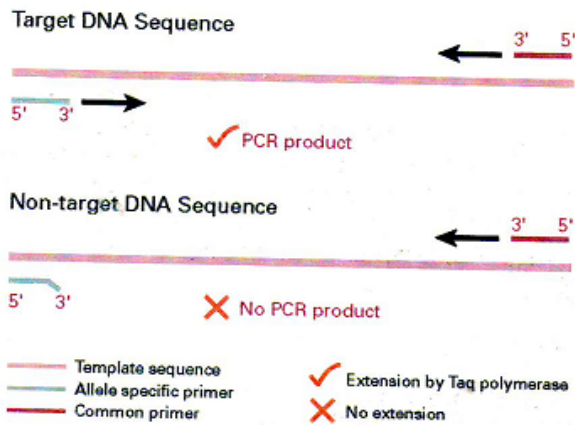
5. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: FV, FII ΚΑΙ MTHFR ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS MULTIPLEX PCR)

Αρχή μεθόδου. Η τεχνολογία ARMS εφαρμόζεται για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (point mutations) ή μικρών ελλείψεων (deletions). Η βασική μεθοδολογία ARMS PCR αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αντιδράσεις PCR (που πραγματοποιούνται σε δύο ξεχωριστά σωληνάρια) και χρησιμοποιεί τρεις εκκινητές .

Ο ένας εκκινητής είναι σταθερός και συμπληρωματικός για το υπόστρωμα DNA και στις δύο αντιδράσεις, ενώ οι άλλοι εκκινητές διαφέρουν στα 3΄ακραία νουκλεοτιδικά υπολείμματα τους και είναι ειδικοί είτε ως προς την «άγριου τύπου» αλληλουχία DNA είτε ως προς τη μεταλλαγμένη αλληλουχία για μια δεδομένη βάση (μόνο ένας από αυτούς τους εκκινητές χρησιμοποιούνται ανά σωληνάριο). Τα προϊόντα PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο.

Εάν το δείγμα είναι ομόζυγο για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία ή ομόζυγο για την «άγριου τύπου» αλληλουχία, φαινόμενο ενίσχυσης των αλληλουχιών αυτών, θα συμβεί μόνο σε έναν από τα δύο σωληνάρια:

Εάν το δείγμα είναι ετερόζυγο για τη μεταλλαγμένη αλληλουχία, ενίσχυση θα φανεί και στα δύο σωληνάρια. Τα προϊόντα ενίσχυσης (τόσο της αλληλουχίας «άγριου τύπου» όσο και της μεταλλαγμένης είναι εκ των προτέρων γνωστού μοριακού μεγέθους και «τρέχουν» σε διαφορετικό σημείο κατά την ηλεκτροφόρηση όταν αναζητούνται περισσότερες από μία μεταλλάξεις (όπως στην περίπτωση της παρούσας μελέτης) με τη χρήση μιας ARMS Multiplex PCR.



Εικόνα 33: Αρχή της μεθόδου ARMS multiplex PCR

Αντιδραστήρια:

Για την ARMS Multiplex PCR

Χρησιμοποιήθηκε το kit ELUCIGEN™ TPR (Thrombosis Risk Panel) της Terpel Diagnostics Ltd (Oxfordshire UK), το οποίο ανιχνεύει την πιθανή ύπαρξη 3 μεταλλάξεων στους παράγοντες *FV* (R506Q), *FII* (20210A) και *MTHFR* (667T), σε δείγματα ολικού αίματος και μπορεί να διακρίνει μεταξύ ατόμων που είναι ετερόζυγα και ομόζυγα για όλες τις μεταλλάξεις.

1. Μείγμα (TA): ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση των αλληλομόρφων «άγριου τύπου», εκκινητών ελέγχου επιτυχούς ενίσχυσης και τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα.
2. Μείγμα (TB): ειδικών εκκινητών για την ενίσχυση των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, εκκινητών ελέγχου επιτυχούς ενίσχυσης και τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του ενζύμου ενίσχυσης (DB).
4. Χρωστική φόρτωσης στο πήκτωμα αγαρόζης (LD).
5. Platinum® DNA πολυμεράση (Invitrogen, CA. USA).

Διαδικασία ARMS Multiplex PCR

1. Τα δείγματα της μελέτης ελέγχθηκαν ανά δεκάδες. Με οδηγό τον παρακάτω πίνακα γίνεται κατάλληλη αραίωση του ενζύμου ενίσχυσης με το Buffer αραίωσης (DB), τη χρωστική φόρτωσης (LD) και αποσταγμένο νερό, ανάλογα με τον αριθμό των υπό εξέταση δειγμάτων.

Αραίωση Ενζύμου Ενίσχυσης.

	Αριθμός πραγματοποιούμενων δοκιμασιών		
	5	10	20
Όγκος στείρου απεσταγμένου νερού (μl)	21	42	84
Όγκος χρωστικής φόρτωσης (μl)	30	60	120
Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης (μl)	6	12	24
Όγκος ενζύμου ενίσχυσης (μl)	3	6	12
Τελικός όγκος (μl)	60	120	240

2. Με οδηγό τον παρακάτω πίνακα, παρασκευάζονται δύο διαφορετικές αντιδράσεις (A,B) σε δύο ξεχωριστά σωληνάρια. Στα αντίστοιχα σημασμένα σωληνάρια προσθέτονται οι κατάλληλες ποσότητες, από το μείγμα εκκινητών TA στο σωληνάριο A και από το μείγμα εκκινητών TB στο σωληνάριο B. Χρησιμοποιώντας , άλλα ακροφύσια (tips) για τις αυτόματες πιπέττες, προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα αραιωμένου ενζύμου (βήμα 1) σε κάθε σωληνάριο (A,B). Ήπια ανάμειξη με την πιπέττα ή με αναδευτήρα (vortexing) και φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 10 sec στα 10 000 rpm (short spin).

Παρασκευή μειγμάτων των αντιδράσεων A και B.

	Αριθμός πραγματοποιούμενων δοκιμασιών					
	5		10		20	
	A	B	A	B	A	B
Όγκος μείγματος εκκινητών A (μl)	82,5		165		330	
Όγκος μείγματος εκκινητών B (μl)		82,5		165		330
Όγκος αραιωμένου ενζύμου (μl)	27,5	27,5	55	55	110	110
Τελικός όγκος (μl)	110	110	220	220	440	440

3. Σήμανση φιαλιδίων PCR τύπου eppendorff (50μl) με τις ενδείξεις A και B. Σε καθένα από αυτά προστίθενται 20μl παρασκευασμένο μείγμα αντίδρασης A και αντίδρασης B αντίστοιχα.
4. Ακολουθεί προσθήκη 5μl DNA σε κάθε ζεύγος φιαλιδίων PCR A και B.
5. Σε ένα χωριστό ζεύγος φιαλιδίων PCR που φέρει μείγμα αντιδραστηρίων A και B αντίστοιχα, στη θέση του DNA, προστίθεται απεσταγμένο νερό και εξυπηρετεί ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων.
6. Φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο (MiniSpin® plus, Eppendorf Hamburg, Germany), των φιαλιδίων PCR για 10 sec στα 10 000 rpm.

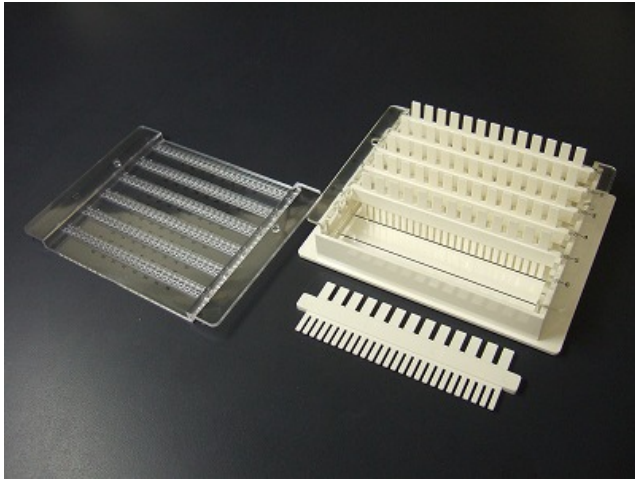
7. Τοποθέτηση των φιαλιδίων PCR σε θερμοκυκλοποιητή (TECHNET C-512, Barloworld Scientific, Staffordshire. UK) με θερμαινόμενο καπάκι και κεφαλή κατάλληλη για φιαλίδια PCR των 50μl.
8. Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή είναι το παρακάτω: Αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 7 min και σύνδεση με πρόγραμμα κυκλικής ενίσχυσης (35 κύκλων): 30 sec στους 94° C, 2 min στους 58° C και 1 min στους 72° C. Ακολουθεί, σύνδεση του παραπάνω προγράμματος με ένα τελικό κύκλο 20 min στους 72° C (τελική επέκταση).
9. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος ενίσχυσης τα δείγματα μπορούν να φυλαχτούν στους 2-8° C μέχρι 7 ημέρες πριν την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

1. Αγαρόζη NuSieve® 3:1 (Cambrex BioScience)
2. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE Buffer/EtBr : Παρασκευάζεται από την ανάμειξη 134 mM (16.2g/L) Tris-base, 74.9 mM (4.63g/L) βορικού οξέος, 2.55 mM (0.95g/L) EDTA buffer με 0.1 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο.
3. Δείκτης μοριακών μεγεθών 50bp ladder (Invitrogen, CA. USA).
4. Διάλυμα χρωστικής «φόρτωσης» των δειγμάτων στο πήκτωμα (Gel Loading Dye).

Διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης

1. Ζύγιση 3g αγαρόζης NuSieve® 3:1 και διάλυση αυτής σε 100ml TBE/EtBr buffer με τη βοήθεια θέρμανσης σε φούρνο μικροκυμάτων.
2. Η διαλυμένη αγαρόζη αδειάζεται σε συσκευή διαμόρφωσης οριζόντιου πηκτώματος (horizontal gel casting tray), διαστάσεων 15×12 cm και τη χρήση «κτενίου» για το σχηματισμό βοθρίων (wells) διαστάσεων 1.5mm×5mm×1mm (Εικόνα 33). Η διαδικασία αυτή καθώς και το επόμενο στάδιο παραμονής για την στερεοποίηση της αγαρόζης, πραγματοποιείται σε απαγωγό.



Εικόνα 34: Horizontal gel casting tray

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της ARMS Multiplex PCR

3. Το παρασκευασμένο πήκτωμα, αφού αφαιρεθεί το «κτένι» και απομακρυνθεί από τη συσκευή διαμόρφωσης πηκτώματος (gel former), τοποθετείται σε οριζόντια συσκευή (tank) ηλεκτροφόρησης, βυθισμένο σε TBE buffer.

4. 15 μ l προϊόντος PCR, από κάθε φιαλίδιο PCR «φορτώνονται» σε καθορισμένα βοθρία του πηκτώματος. Επιπλέον, παράλληλα, «φορτώνεται» και ποσότητα ενός δείκτη μοριακών μεγεθών σε ξεχωριστό βοθρίο του πηκτώματος, σε παρακείμενη θέση με τα προϊόντα PCR: 50 bp ladder (Invitrogen, CA. USA).

5. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό τάση 5-6 V/cm, μέσω της σύνδεσης της οριζόντιας συσκευής ηλεκτροφόρησης με κατάλληλο τροφοδοτικό τάσης (EPS608, GIBCO BRL), μέχρι η χρωστική «φόρτωσης» των δειγμάτων, να φτάσει 4cm από το πέρας του πηκτώματος (60-90 min).

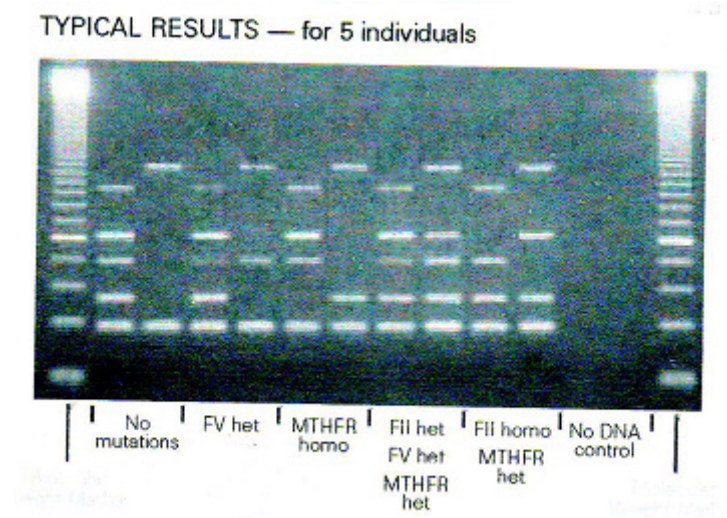
6. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (με ακτινοβολία μήκους κύματος 260 nm) (UVItec, Cambridge. UK), ώστε να γίνουν ορατά τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR καθώς και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της και στη συνέχεια να φωτογραφηθούν με φωτογραφικό σύστημα (Polaroid GelCam, MA, USA).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

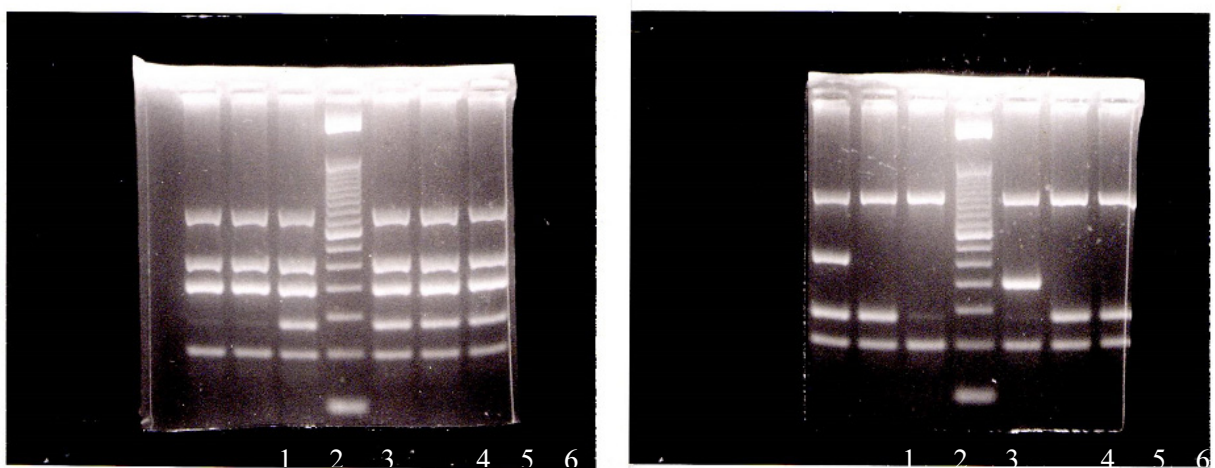
Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit και όπως απεικονίζεται διαγραμματικά στις Εικόνες 35 και 36



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων ARMS PCR



Εικόνα 36: Αποτελέσματα ARMS PCR



Εικόνα 37: Αποτελέσματα ARMS PCR παρούσας μελέτης

Δείγμα 1: MTHFR ομοζυγωτία, FII ετεροζυγωτία

Δείγμα 2: MTHFR ομοζυγωτία

Δείγμα 3: όχι μετάλλαξη

Δείγμα 4: FVL ετεροζυγωτία

Δείγμα 5: MTHFR ετεροζυγωτία

Δείγμα 6: MTHFR ετεροζυγωτία

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ Val34Leu ΤΗΣ Α-ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ XIII (F13A), ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR- RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS (PCR- RFLP)

Αρχή της μεθόδου. Βασίζεται, αρχικά, στην ενζυματική ενίσχυση της περιοχής του ανθρώπινου γενωμικού DNA που περικλείει τη θέση 34 της Α- υπομονάδας του παράγοντα πήξης XIII και ακολούθως στην ανάλυση πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών κλασμάτων (PCR-RFLP), με τη χρήση κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου, για την πέψη του προϊόντος της PCR, το οποίο αναγνωρίζει την παρουσία του πολυμορφισμού Leu34. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πήκτωμα 3% αγαρόζης πραγματοποιείται ώστε να διακριθούν τα ειδικά περιοριστικά κλάσματα για κάθε πολυμορφικό αλληλόμορφο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το kit AmpliKit F13A (Sacace™ Biotechnologies).

Αντιδραστήρια

Για την PCR

1. Διπλά απεσταγμένο νερό
2. Master mix (περιέχει τους εκκινητές και dNTPs)
3. 10 x PCR buffer
4. 25 mM MgCl₂
5. Buffer αραίωσης της Taq πολυμεράσης (ένζυμο ενίσχυσης)
6. Taq πολυμεράση (5 U/μl)
7. Mineral oil

8. Θετικοί μάρτυρες για όλους τους γονότυπους : F13A(-/-) , (Val/Val)
F13A (+/-), (Leu/Val)
F13A (+/+), (Leu/Leu)

Για την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο

9. Buffer περιοριστικού ενζύμου
10. Περιοριστικό ένζυμο

Για την ηλεκτροφόρηση

11. Αγαρόζη υψηλής διακριτικής ικανότητας MetaPhor® (Lonza, Rockland, ME. USA)
12. × 10 TBE buffer
13. GelRed™ (Biotium, CA. USA) (χρησιμοποιείται αντί του βρωμιούχου αιθιδίου σαν λιγότερο τοξικό και με μεγαλύτερη ευαισθησία και ενσωματώνεται εντός του πηκτώματος κατά την παρασκευή του).
14. Διάλυμα «φόρτωσης» με κυανό της βρωμοφαινόλης.

Διαδικασία της PCR

Πριν από την εκτέλεση της PCR, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας της Taq πολυμεράσης, με αραίωση του αντιδραστηρίου 6 με το buffer αραίωσης (αντιδραστήριο 5):

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο PCR (τύπου eppendorff) προσθέτονται διαδοχικά 10 μl αντιδραστηρίου 5 και 2μl του αντιδραστηρίου 6 (αυτή η ποσότητα είναι αρκετή για 10 αντιδράσεις)
2. Τα παραπάνω αναμιγνύονται με vortex και συγκεντρώνονται στον πυθμένα του σωληναρίου με στιγμιαία φυγοκέντρωση (quick spin), σε μικροφυγόκεντρο.
3. Το παραπάνω διάλυμα εργασίας θα πρέπει να αποθηκεύεται στους – 20° C, όχι για περισσότερες από 3 εβδομάδες.
4. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο PCR προσθέτονται τα αντιδραστήρια στις ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω και οι οποίες αφορούν ένα δείγμα:

Αντιδραστήριο 1- 5,0 μl × Αριθμός δειγμάτων

Αντιδραστήριο 2- 5,0 μl × Αριθμός δειγμάτων

Αντιδραστήριο 3- 1,5 μl × Αριθμός δειγμάτων

Αντιδραστήριο 4- 0,6 μl × Αριθμός δειγμάτων

Αντιδραστήριο 6 (διάλυμα εργασίας)- 1,0 μl × Αριθμός δειγμάτων

5. Ακολουθεί ανάμιξη και στιγμιαία φυγοκέντρηση.
6. Το μίγμα μοιράζεται ανά 13 μl σε κάθε σωληνάριο PCR ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
7. Στη συνέχεια προστίθεται 2μl δείγματος DNA στο αντίστοιχο σωληνάριο PCR.
8. Γίνεται προσθήκη μίας σταγόνας mineral oil, πωματίζονται τα σωληνάρια και τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή.
9. Ο θερμοκυκλοποιητής έχει προγραμματιστεί ως εξής: (95⁰ C – 3min, 55⁰ C- 50sec, 72⁰ C- 50sec) για ένα (1) κύκλο, (95⁰ C- 50sec, 55⁰ C - 50sec, 72⁰ C- 50sec) για 39 κύκλους, (72⁰ C- 2min) για ένα (1) κύκλο.

Πέψη των προϊόντων PCR με περιοριστική ενδονουκλεάση

1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο παρασκευάζεται ένα μίγμα (stock) με τα παρακάτω αντιδραστήρια (εδώ, οι ποσότητες δίνονται ανά δείγμα):

Αντιδραστήριο 9 : 5,0 μl × αριθμός δειγμάτων

Αντιδραστήριο 10 : 0,2μl × αριθμός δειγμάτων

2. Ανάμιξη του μίγματος και στιγμιαία φυγοκέντρηση ώστε να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
3. Διαμοίραση από 5 μl μίγματος σε κάθε σωληνάριο με τα προϊόντα PCR (πάνω από το mineral oil).
4. Στιγμιαία φυγοκέντρηση των σωληναρίων PCR και επώαση αυτών στους 50-55⁰ C για 2-4 h.

Ανάλυση των περιοριστικών κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

1. Παρασκευάζεται 3% πήκτωμα αγαρόζης, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.
2. Προσθήκη 5μl διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης σε κάθε σωληνάριο PCR.
3. Φυγοκέντρηση για 10-13 sec.

4. Φόρτωση 10 μl μίγματος στα βοθρία (wells) του πηκτώματος.
5. Πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης (90 Volt), μέχρι η χρωστική να φτάσει 3-4 cm πριν από το πέρας του πηκτώματος.
6. Παρατήρηση των αποτελεσμάτων με τοποθέτηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV- transilluminator).
7. Φωτογράφιση των αποτελεσμάτων με φωτογραφικό σύστημα Polaroid με σκοπό την αρχειοθέτησή τους.

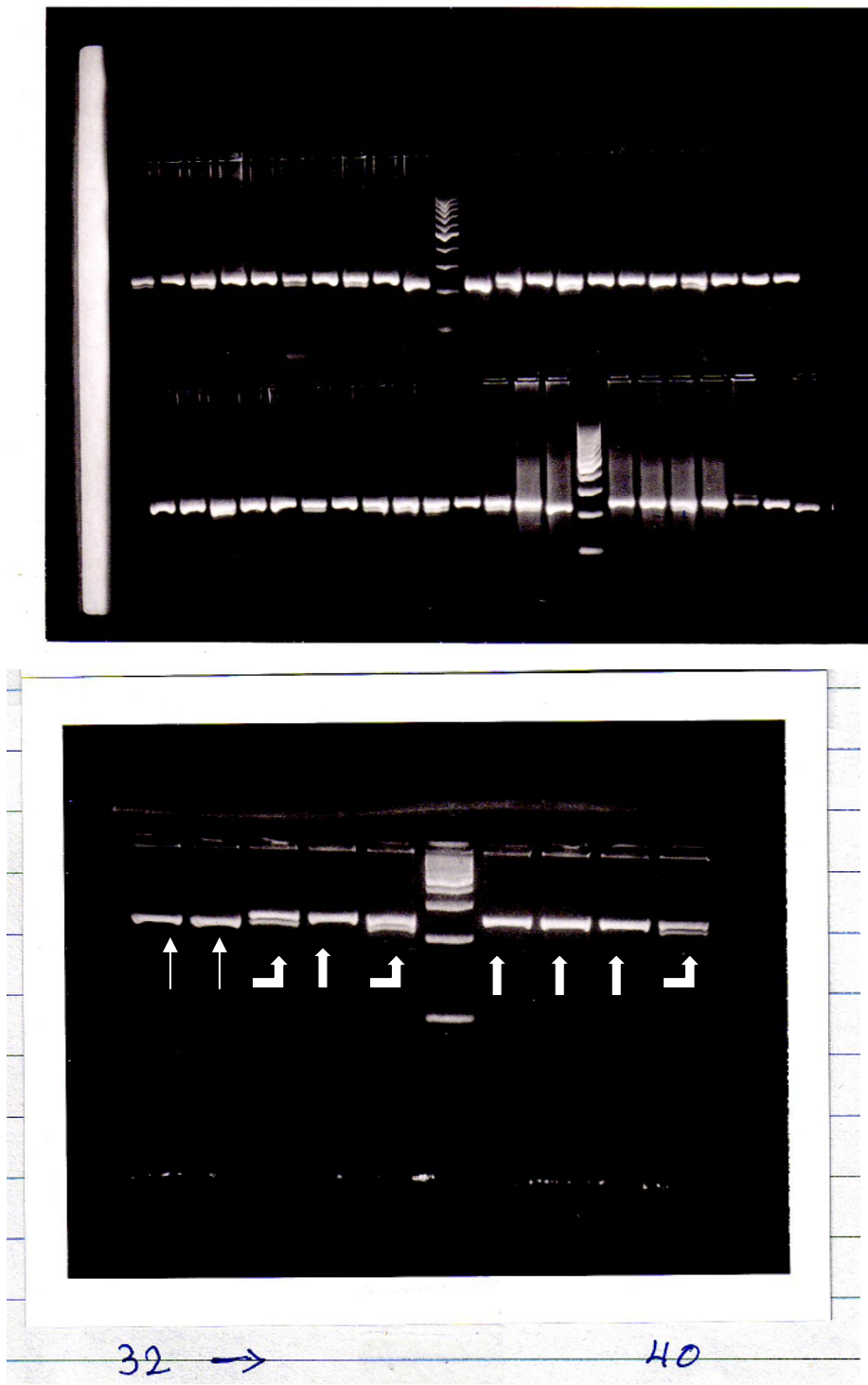
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Το μοριακό μέγεθος του προϊόντος PCR, μετά τη χρησιμοποίηση kit AmpliKit F13A (Sacace™ Biotechnologies), είναι 245 ζεύγη βάσεων (bp). Εάν στο υπό εξέταση δείγμα DNA είναι παρόν το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για Leu34, τότε το προϊόν PCR των 245 bp, υφίσταται πέψη από το περιοριστικό ένζυμο, δίνοντας ως προϊόντα πέψης : κλάσματα 225 bp και 20 bp (το τελευταίο είναι δύσκολο να γίνει ορατό στο πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση).

Επομένως. Η ανίχνευση μόνο του κλάσματος 245 bp (προϊόν PCR που δεν υφίσταται πέψη από το ένζυμο), αντιστοιχεί στο γονότυπο Val/Val της α- υπομονάδας του παράγοντα XIII .

Η ανίχνευση και των δύο κλασμάτων πέψης 245 bp και 225 bp στο πήκτωμα, αντιστοιχεί στο γονότυπο Val/Leu.

Όταν το δείγμα DNA περιέχει το αλληλόμορφο που κωδικοποιεί για Leu34 σε ομόζυγη μορφή/κατάσταση (γονότυπος Leu/Leu), τότε στο πήκτωμα θα πρέπει να είναι παρόν μόνο το κλάσμα πέψης των 225 bp (πλήρης πέψη).



Εικόνα 38: Αποτελέσματα παρούσας μελέτης για FXIII-A Val34Leu
 Λεπτό βέλος: Leu/Leu ομοζυγωτία (225bp)
 Κυρτό βέλος: Val/Leu ετεροζυγωτία (245 και 225 bp)
 Χοντρό βέλος: Val/Val ομοζυγωτία (245 bp)

ΧΡΟΝΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PrS ΜΕ STACLOT PROTEIN S

Αρχή της μεθόδου: Η αρχή του ποσοτικού προσδιορισμού βασίζεται στη δραστηριότητα συμπαράγοντα της πρωτεΐνης S που ενισχύει την αντιπηκτική δράση της πρωτεΐνης C, η οποία αντικειμενικοποιείται από την παράταση του χρόνου πήξης ενός συστήματος εμπλουτισμένου σε παράγοντα V, φυσικό υπόστρωμα αυτού του αναστολέα.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος: Γίνεται αιμοληψία σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 0.109M. Χρησιμοποιείται 1 vol κιτρικού νατρίου για 9 vol αίματος.

Διατήρηση του πλάσματος στους -80°C .

Για τη διαδικασία του ποσοτικού προσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε αναλυτής της σειράς STA[®] που δέχεται τα αντιδραστήρια της εταιρείας.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της PrS στα εξεταζόμενα πλάσματα πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα κατά τη διαδοχική φόρτωση των δειγμάτων, αφού προηγηθεί βαθμονόμηση του μηχανήματος σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αν για ένα πλάσμα, το αποτέλεσμα που προκύπτει βρίσκεται εκτός του εύρους μέτρησης, τότε το μηχάνημα πραγματοποιεί αυτόματα την κατάλληλη αραιώση για το συγκεκριμένο δείγμα και επαναλαμβάνει τη μέτρηση.

Αποτελέσματα: Το ποσοστό της PrS των υπό εξέταση δειγμάτων εμφανίζεται σε πραγματικό χρόνο σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) στον πίνακα ελέγχου του μηχανήματος. Φυσικά, τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται σε σχέση με την κλινική και βιολογική κατάσταση του ασθενούς.

Αναμενόμενες τιμές: Τα επίπεδα της ολικής καθώς και της ελεύθερης PrS είναι χαμηλότερα στη γυναίκα, απ' ό,τι στον άνδρα. [204] Επιπλέον, στο γυναικείο πληθυσμό, παρατηρούνται διακυμάνσεις ανάλογα με την ορμονική κατάσταση. [205] Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές αναφοράς, όπως αναγράφονται από τον κατασκευαστή, είναι:

Άνδρες: 65-130 % του φυσιολογικού.

Γυναίκες: 60-118% του φυσιολογικού.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ PrC

Με Berichrom Protein C – Siemens

Βασική Αρχή της μεθόδου: Η PrC στο δείγμα του ασθενούς ενεργοποιείται από έναν ειδικό ενεργοποιητή δηλητηρίου φιδιού. Η πρωτεΐνη Ca που προκύπτει προσδιορίζεται σε εξέταση κινητικής μέσω της μέτρησης της αύξησης της απορρόφησης στα 405 nm. Ο προσδιορισμός βασίζεται στις ακόλουθες αντιδράσεις:

PrC (δείγματος) ----- ενεργοποιητής PrC----- PrCa

p-Glu-Pro-Arg-MNA----- PrCa----- p-Glu-Pro-Arg-OH + MNA

Ενεργοποιητής PrC: εκχύλισμα από δηλητήριο της Έχιδνας της Ανατολικής Αμερικής *Agkistrodon contortrix*.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος: Γίνεται αιμοληψία σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.11 mol/l). Χρησιμοποιείται 1 vol κιτρικού νατρίου για 9 vol αίματος.

Διατήρηση του πλάσματος στους -80° C.

Αναμενόμενες Τιμές: Είναι 70-140% του φυσιολογικού.

Το πεδίο τιμών μέτρησης μ' αυτή τη μέθοδο είναι από 0 μέχρι 140% του φυσιολογικού.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ AT

Με Berichrom Antithrombin (ATIII) – Siemens

Βασική αρχή της Δοκιμασίας: Η AT στο δείγμα μετατρέπεται από την ηπαρίνη σ' έναν άμεσο αναστολέα και αδρανοποιεί την υπάρχουσα θρομβίνη. Η περιεχόμενη υπολειπόμενη θρομβίνη προσδιορίζεται με εξέταση κινητικής που μετρά την αύξηση της απορροφητικότητας στα 405nm σύμφωνα με τα παρακάτω:

AT (δείγματος) + θρομβίνη (περίσσεια) → ηπαρίνη --- [AT-θρομβίνη] + θρομβίνη (υπολειπόμενη)

Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA --- υπολειπόμενη θρομβίνη -- Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA

Η μεταβολή στην απορρόφηση είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ενεργότητα της AT του δείγματος.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος: Γίνεται αιμοληψία σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.11mol/l). Χρησιμοποιείται 1 vol κιτρικού νατρίου για 9 vol αίματος. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων.

Αναμενόμενες Τιμές: Είναι 80-120% του φυσιολογικού, για ενήλικες. [89] [206]

Το πεδίο τιμών μέτρησης μ' αυτή τη μέθοδο είναι από 0 μέχρι 140% του φυσιολογικού.

Σημείωση: Για όλους τους παραπάνω προσδιορισμούς, έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στο φιαλίδιο με αντιπηκτικό citrate στα 3500g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φύλαξη του πλάσματος στους -80°C μέχρι την εξέταση.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ (PT)

Με Thromborel S (Siemens)

Βασική Αρχή της μεθόδου: Η διαδικασία πήξης πυροδοτείται μέσω της επώασης του πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα θρομβοπλαστικής και ασβεστίου. Στη συνέχεια μετράται ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος: Γίνεται αιμοληψία σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.11mol/l). Χρησιμοποιείται 1 vol κιτρικού νατρίου για 9 vol αίματος.

Περιορισμοί της διαδικασίας: Η επιλογή του αντιπηκτικού και η κατάσταση του δείγματος (αιμόλυση, παρεντερική σίτιση, λιπαιμικό δείγμα και άλλα) ενδέχεται να

επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν υπήρξαν ακατάλληλα δείγματα.

Η ιρουδίνη και οι άλλοι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης σε θεραπευτικές δόσεις οδηγούν σε παρατεταμένους χρόνους προθρομβίνης. Κανείς από τους υπό εξέταση ασθενείς ή μάρτυρες δεν υποβαλλόταν σε θεραπεία με ιρουδίνη.

Αναμενόμενες Τιμές: Κυμαίνονται από 9.8 ως 12.1 δευτερόλεπτα. [207]

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΜΕΡΙΚΩΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΛΑΣΤΙΝΗΣ(ΑΡΤΤ)

Με Pathromtin SL (Siemens)

Βασική Αρχή της μεθόδου: Η επώαση πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα φωσφολιπιδίων και έναν επιφανειακό ενεργοποιητή οδηγεί στην ενεργοποίηση παραγόντων του ενδογενούς συστήματος πήξης. Η προσθήκη ιόντων ασβεστίου πυροδοτεί τη διαδικασία πήξης. Στη συνέχεια, μετράται ο χρόνος μέχρι το σχηματισμό θρόμβου ινώδους.

Λήψη και χειρισμός του δείγματος: Γίνεται αιμοληψία σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.11mol/l). Γίνεται προσεκτική ανάμειξη ενός μέρους διαλύματος κιτρικού νατρίου με 9 μέρη φλεβικού αίματος, ώστε να μη σχηματιστεί αφρός.

Περιορισμοί της διαδικασίας: Η ιρουδίνη και οι άλλοι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης σε θεραπευτικές δόσεις ενδέχεται να οδηγήσουν σε παρατεταμένους χρόνους.

Η επιλογή του αντιπηκτικού και η κατάσταση του δείγματος (αιμόλυση, παρεντερική σίτιση, λιπαιμικό δείγμα και άλλα) ενδέχεται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

Στην παρούσα μελέτη δεν υπήρξαν δείγματα που να υπόκεινταν στους παραπάνω περιορισμούς.

Η προενεργοποίηση του δείγματος λόγω ακατάλληλης τεχνικής φλεβοτομίας μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελέσματα. Σύμφωνα με τους κανόνες του CLSI H21-A5, όπου περιγράφονται λεπτομερώς οι διαδικασίες για τη συλλογή, μεταφορά και επεξεργασία δειγμάτων αίματος για εξετάσεις πήξης και απόδοση προσδιορισμών

πήξης [208] συνιστάται η χρήση δοκιμαστικών σωληναρίων με μη διαβρεχόμενες επιφάνειες (όπως για παράδειγμα πλαστικό) αντί για γυάλινα δοκιμαστικά σωληνάρια, πράγμα το οποίο ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Αναμενόμενες Τιμές: Κυμαίνονται μεταξύ 26 και 37 δευτερόλεπτα. [207]

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ APC Resistance

Με τη μέθοδο Siemens ProC[®] Global

ProC Global: Η ProC Global σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ελέγχει όλη την οδό της PrC (έλλειψη C, S, FVLeiden). Αυτό γίνεται ενεργοποιώντας με ενεργοποιητή (Russel Viper Venom) την οδό της PrC στο πλάσμα προς έλεγχο. Παθολογικές τιμές ProC Global σημαίνουν έλλειψη C, S ή FVLeiden. Από μελέτες που έγιναν με τη μέθοδο αυτή, διαπιστώθηκε ότι έχει μεγάλη ευαισθησία για περιπτώσεις δειγμάτων με έλλειψη PrC και FVLeiden, αλλά μικρότερη ευαισθησία για έλλειψη PrS. Η προσθήκη όμως FV deficient plasma κάνει την εξέταση ειδική για την ανίχνευση του FVLeiden.

Αρχή της μεθόδου: Επώαση του προς εξέταση πλάσματος με ενεργοποιητή της PrC (δηλητήριο Agkistrodon contortrix) οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού της PrC και της ενδογενούς οδού πήξης (intrinsic coagulation cascade). Η διαδικασία πυροδοτείται με την προσθήκη ιόντων ασβεστίου. Η ενεργοποιημένη PrC με τη συνδρομή της ενδογενούς PrS, απενεργοποιεί τους παράγοντες VIIIa και Va. Αυτό επιβραδύνει το σχηματισμό θρόμβου. Ο χρόνος που χρειάζεται για το σχηματισμό θρόμβου μετράται. (PCAT=Protein C Activity-dependent Clotting Time).

Η παρουσία ανεπάρκειας παράγοντα ή μεγάλων ποσοτήτων ηπαρίνης θα πρέπει να αποκλείονται, αφού θα οδηγήσουν σε επιμήκυνση του χρόνου πήξης και επιπλέον θα αποκρύψουν μια ανεπάρκεια στην οδό της PrC.

Αναμενόμενες τιμές: Με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, οι φυσιολογικές τιμές για την εξέταση PCGlob FV NR είναι: 0.7-1.3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (n=51) και των μαρτύρων (n=70) συνοψίζονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19: Περιγραφικά Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και μαρτύρων της παρούσας μελέτης.

	Ασθενείς		Μάρτυρες	
	n	%	n	%
Φύλο, άρρενες	25/51	49	38/70	54
Υπέρταση	8/51	15.7	0/70	0
Σακχαρώδης Διαβήτης	1/51	2	0/70	0
Κάπνισμα	18/51	35.3	25/70	35.7
Υπερχοληστερολαιμία	5/51	9.8	2/70	2.8
Οικογενειακό ιστορικό ΑΕΕ	3/51	5.9	1/70	1.4

	Ασθενείς		Μάρτυρες	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ηλικία	37.30	7.98	38.02	6.32

Στην παρούσα μελέτη, όπως ήδη έχει αναφερθεί, έλαβαν μέρος 51 ασθενείς και 70 μάρτυρες.

Η ομάδα των ασθενών αποτελούνταν από 25 (25/51, 49%) άρρενες, ηλικίας 18-50 ετών (μέση ηλικία 37.3±7.9 έτη) ενώ η ομάδα των μαρτύρων αποτελούνταν από 38 άρρενες (38/70, 54%), ηλικίας 18-50 ετών (μέση ηλικία 38±6.3 έτη). Οι μάρτυρες που επελέγησαν προέρχονταν από την ίδια γεωγραφική περιοχή και ήταν σταθμισμένοι ως προς το φύλο (p=0.567) και την ηλικία (p=0.876).

Αρτηριακή υπέρταση καταγράφηκε σε 8 ασθενείς (8/51, 15.7%) αλλά σε κανένα μάρτυρα (0/70, 0%). Από τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς με υπέρταση και στους μάρτυρες (p=0.0001).

Καπνιστές δήλωσαν ότι είναι 18 ασθενείς (18/51, 35.3%) καθώς και 25 μάρτυρες (25/70, 35.7%). Όσον αφορά στο κάπνισμα δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν συγκρίθηκαν οι ασθενείς καπνιστές και οι μάρτυρες ($p=0.559$).

Αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης παρουσίασαν 5 ασθενείς (5/51, 9.8%) καθώς και 2 μάρτυρες (2/70, 2.8%) Και εδώ, η διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων με υπερχοληστερολαιμία δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.112$)

Υπήρξε ένας ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη (1/51, 2%), ενώ στην ομάδα των μαρτύρων κανείς δεν έπασχε από σακχαρώδη διαβήτη.

Οικογενειακό ιστορικό ΑΕΕ (μητέρα ή πατέρα πάσχων από ΑΕΕ) ανέφεραν 3 ασθενείς (3/51, 5.9%) καθώς και 1 μάρτυρας (1/70, 1.4%). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη μεταβλητή αυτή ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0.20$)

Όσον αφορά επίσης στο **οικογενειακό ιστορικό**, 16 ασθενείς (31.4%) αναφέρουν ελεύθερο ιστορικό και των δύο γονέων, 16 αναφέρουν έναν γονέα με θετικό ιστορικό (ως θετικό ιστορικό θεωρείται η παρουσία ΑΕΕ, καρδιοπάθειας, δυσλιπιδαιμίας, σακχαρώδους διαβήτη, ημικρανιών, ρευματικού νοσήματος, φλεβοθρόμβωσης ή αρτηριακής υπέρτασης) και 8 (15.7%) ασθενείς αναφέρουν και τους δύο γονείς με θετικό ιστορικό, ενώ δεν κατέστη δυνατό να υπάρξει σαφές οικογενειακό ιστορικό για 11 ασθενείς (21.6%)

Στην ομάδα των ασθενών πραγματοποιήθηκε απεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου (αξονική τομογραφία εγκεφάλου-CT και μαγνητική τομογραφία-MRI) στους 33 ασθενείς (64.7%). Σε κάποιους ασθενείς έγινε απεικονιστικός έλεγχος μόνο με μία μέθοδο, ενώ σε άλλους έγινε τόσο CT, όσο και MRI, ενώ υπήρξαν και ασθενείς στους οποίους είτε δεν έγινε έλεγχος, είτε δεν κατέστη δυνατόν να βρεθούν οι εν λόγω εξετάσεις.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε σχέση με το **ατομικό αναμνηστικό**, είναι τα ακόλουθα:

- χωρίς ευρήματα ήταν 26 ασθενείς (51%).
- 9 (17.6%) ασθενείς ανέφεραν συμπτώματα-καταστάσεις όπως κεφαλαλγία, αυχεναλγία, αίσθημα παλμών, κύηση,

- ενώ 5 ασθενείς (9.8%) ανέφεραν συμπτώματα βαρύνουσας σημασίας, όπως παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, φλεβική θρόμβωση, αποβολή.

Σε σχέση με τους **παράγοντες κινδύνου**, η λήψη του ιστορικού κατέδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα:

- οι ασθενείς που δεν ανέφεραν παράγοντες κινδύνου ήταν 11 (21.6%),
- αυτοί που ανέφεραν μέχρι έναν παράγοντα κινδύνου ήταν 12 (23.5%),
- ενώ οι ασθενείς με πάνω από έναν παράγοντα κινδύνου ήταν 15 (29.4%).

Οι παράγοντες κινδύνου που ελέγχθησαν αναγράφονται λεπτομερώς στη σελίδα 74, όπου αναφέρονται όλοι οι παράγοντες που περιελήφθησαν στο έντυπο καταγραφής που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα μελέτη.

Δεν κατέστη δυνατή η εύρεση στοιχείων σε σχέση με τους παράγοντες κινδύνου σε 13 ασθενείς (13/51, 25.5%)

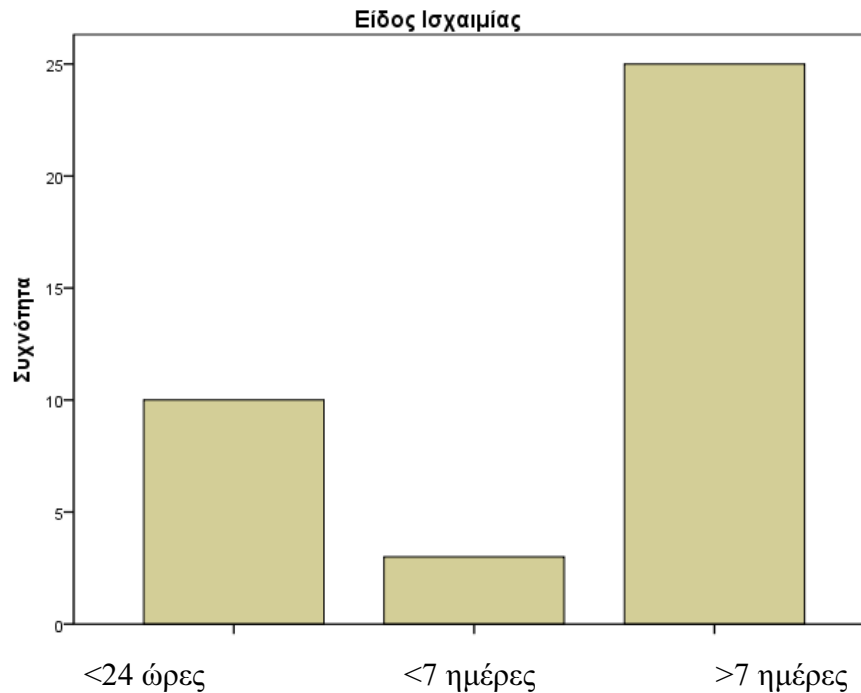
Όσον αφορά στον **τύπο του εμφράκτου**, τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν είναι τα εξής:

- ισχαιμικό έμφρακτο με διάρκεια εγκεφαλικής ισχαιμίας μικρότερη από 24 ώρες, παρουσίασαν οι 10 (19.6%) εκ των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη,
- οι 3 (5.9%) εκ των ασθενών είχαν διάρκεια ισχαιμίας μικρότερη των 7 ημερών,
- ενώ οι 25 (49%) εκ των ασθενών είχαν διάρκεια ισχαιμίας μεγαλύτερη των 7 ημερών.

Δεν υπάρχουν δεδομένα για τον τύπο του εμφράκτου σε 13 ασθενείς (25.5%).

Πίνακας 20: Διάρκεια ισχαιμικού ΑΕΕ

Διάρκεια	Αριθμός	Ποσοστό %
<24ώρες	10	19.6
<7 ημέρες	3	5.9
>7 ημέρες	25	49.0
Σύνολο	38	74.5
Χωρίς Δεδομένα	13	25.5
Σύνολο	51	100.0



Ηχοκαρδιογράφημα Doppler τραχήλου πραγματοποιήθηκε σε 38 ασθενείς εκ των οποίων οι 32 δεν είχαν ευρήματα, ενώ οι 6 παρουσίασαν θετικά ευρήματα. Σε 13 (13/51, 25.5%) ασθενείς είτε η εξέταση δεν πραγματοποιήθηκε, είτε δεν κατέστη δυνατή η εύρεση της εξέτασης.

Πίνακας 21: Ηχοκαρδιογράφημα Doppler

Ευρήματα	Αριθμός Ασθενών	Ποσοστό (%)
Χωρίς ευρήματα	32	62.7
Θετικά ευρήματα	6	11.8
Σύνολο	38	74.5
Χωρίς στοιχεία	13	25.5
Γενικό Σύνολο	51	100.0

Υπερηχογράφημα καρδιάς πραγματοποιήθηκε επίσης σε 38 (38/51, 74.5%) ασθενείς, εκ των οποίων οι 29 (29/51, 56.9%) είχαν αποτελέσματα εντός φυσιολογικών ορίων, οι 9 (9/51, 17.6%) είχαν ευρήματα από τον υπέρηχο καρδιάς, ενώ η εξέταση είτε δεν πραγματοποιήθηκε, είτε δεν βρέθηκαν τα αποτελέσματά της σε 13 (13/51, 25.5%) ασθενείς.

Πίνακας 22: Υπερηχογράφημα καρδιάς

Ευρήματα	ασθενείς	Ποσοστό %
Κατά φύσιν	29	56.9
παθολογικά	9	17.6
Σύνολο	38	74.5
Χωρίς στοιχεία	13	25.5
Γενικό Σύνολο	51	100.0

Αγγειογραφία έγινε σε 38 (38/51, 74.5%) ασθενείς εκ των οποίων οι 23 (60.5%) δεν εμφάνισαν παθολογική εικόνα στην εν λόγω εξέταση, ενώ οι 15 (39.5%) παρουσίασαν παθολογικά ευρήματα.

Η εξέταση είτε δεν πραγματοποιήθηκε, είτε δεν βρέθηκαν τα αποτελέσματά της σε 13 (13/51, 25.5%) ασθενείς.

Πίνακας 23: Αγγειογραφία τραχήλου

Ευρήματα	Ασθενείς	Ποσοστό %
Κατά φύσιν	23	45.1
παθολογικά	15	29.4
Σύνολο	38	74.5
Χωρίς στοιχεία	13	25.5
Γενικό Σύνολο	51	100.0

Οι 34 (34/51, 94.4%) από τους 36 ασθενείς είχαν φυσιολογικό INR και aPTT ενώ ένας ασθενής (1/51, 2%) είχε τιμή παθολογική. Όλοι οι μάρτυρες είχαν τιμές INR και aPTT εντός φυσιολογικών ορίων.

Όπως ειπώθηκε η τιμή της ομοκυστεΐνης δεν προσδιορίστηκε σε μεγάλο δείγμα ασθενών και μαρτύρων, λόγω πολύ ειδικών συνθηκών μέτρησής της (τα κύτταρα του αίματος παράγουν συνεχώς ομοκυστεΐνη, με αποτέλεσμα να αυξάνει η τιμή της κατά 10% κάθε ώρα παραμονής του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου, γι' αυτό και επιβάλλεται άμεση φυγοκέντρηση του δείγματος, πράγμα που δεν κατέστη δυνατό στο σύνολο των δειγμάτων) και στην προσπάθεια να αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα από τυχόν λανθασμένες τιμές. Έτσι, η τιμή αυτής της μεταβλητής δεν συμπεριλήφθηκε στην παρούσα μελέτη.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας έρευνας ήταν οι ακόλουθες:

- Χρησιμοποιήθηκαν πίνακες συχνοτήτων και ποσοστών καθώς και διάφορα διαγράμματα για την περιγραφική ανάλυση κάθε ερώτησης του ερωτηματολογίου της παρούσας έρευνας.
- Επίσης χρησιμοποιήθηκαν πίνακες συνάφειας στους οποίους έγιναν και οι κατάλληλοι έλεγχοι chi-square για διαπιστώσουμε αν υπάρχουν σχέσεις μεταξύ διαφόρων κατηγορικών μεταβλητών του ερωτηματολογίου. Περαιτέρω για κάθε πίνακα συνάφειας υπολογίσθηκαν και τα odds ratio ώστε ο ερευνητής να είναι σε θέση να δει τις αναλογίες μεταξύ κατηγοριών των κατηγορικών μεταβλητών. Αξίζει να αναφερθεί πως στην περίπτωση των 2x2 πινάκων συνάφειας η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ελέγχου Fisher's exact test. Σημειώνουμε στο σημείο αυτό πως οι συγκεκριμένοι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=0,05$.
- Τελικώς διενεργήθηκε ο παραμετρικός έλεγχος t-test και ο μη-παραμετρικός ανάλογος του t-test έλεγχος Mann Whitney, στοχεύοντας στην στατιστική σύγκριση μέσων όρων συνεχών πεδίων ανά τις κατηγορίες κατηγορικών μεταβλητών.

Τέλος αξίζει στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι η στατιστική ανάλυση, με την μορφή των μεθόδων και των αποτελεσμάτων αυτών που παρουσιάσαμε πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics v21.

Βάσει των ανωτέρω περιγραφέντων τεχνικών μεθόδων εξειδικευμένα εφαρμόστηκε ο έλεγχος Chi-Square στις ακόλουθες περιπτώσεις:

Σε ότι αφορά τα γονίδια FVR506Q, FIIG20210A, και APCResistance διενεργήθηκε ο στατιστικός έλεγχος Fisher's exact test όπου ελέγχθηκε το κατά πόσον οι κατηγορίες των συγκεκριμένων γονιδίων συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά ή όχι με τις δύο ομάδες, των μαρτύρων και των ασθενών. Επιπροσθέτως ελέγχθηκαν για πιθανή ανεξαρτησία ή συσχέτιση στις δυο ομάδες μαρτύρων και ασθενών, οι μεταβλητές MTHFR, FXIII, PAI1-675 4G/5G, PAI1-844A/G, PrC, PrS, AT, με την χρησιμοποίηση του στατιστικού ελέγχου Pearson X^2 . Γίνεται εμφανές

από τα ανωτέρω πως ακριβώς επειδή είχαμε κατηγορικές μεταβλητές τις οποίες θέλαμε να ελέγξουμε για πιθανή ανεξαρτησία ή συσχέτιση, η ενδεικνυόμενη στατιστικώς μεθοδολογία για αυτό το βήμα είναι η χρησιμοποίηση του ελέγχου Pearson's X^2 . Σημειώνουμε πως στην περίπτωση όπου ο πίνακας συνάφειας ήταν ένας πίνακας 2x2 έγινε η χρησιμοποίηση του fisher's exact test.

Πέραν των συσχετίσεων που περιγράψαμε ένα εκ των κυρίων βασικών ερευνητικών ερωτημάτων ήταν ο έλεγχος της υπόθεσης του κατά πόσον η ηλικία διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ή όχι ανάμεσα στους μάρτυρες και στους ασθενείς. Επιστημονικά το συγκεκριμένο ερώτημα μπορεί να ελεγχθεί με την διενέργεια του στατιστικού ελέγχου independent t-test. Αφού ελέγχθηκε η υπόθεση της κανονικότητας του συγκεκριμένου t-test με το τεστ Kolmogorov-Smirnoff και σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=5\%$ η υπόθεση της κανονικότητας απορρίπτεται, προχωρήσαμε στην διενέργεια του ανάλογου στο t-test έλεγχου, στον μη παραμετρικό έλεγχο Mann Whitney. Η χρήση αυτού του ελέγχου είναι επιτακτική ως προς την απάντηση του συγκεκριμένου ερευνητικού ερωτήματος εφόσον οι στατιστικές υποθέσεις ισχύος του t-test δεν είναι στατιστικώς αποδεκτές και ισχύουσες.

Μια άλλη ανάλυση την οποία εφαρμόσαμε ήταν ο υπολογισμός των odds ratio για κάθε περίπτωση του ελέγχου X^2 που περιγράψαμε παραπάνω. Με τον υπολογισμό των odds ratio και των αντίστοιχων 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης αυτών, ο ερευνητής είναι σε θέση να γνωρίζει και να συγκρίνει τις αναλογίες μεταξύ των κατηγοριών των δυο υπό εξέταση κάθε φορά κατηγορικών μεταβλητών. Με άλλα λόγια είναι σε θέση να γνωρίζει στατιστικώς ποιο ζεύγος ενδεχομένων είναι πιθανότερο ή λιγότερο πιθανό, σε σχέση με το έτερο. Λεπτομερέστερα, τα odds ratio υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την ακόλουθη λογική ομαδοποίησης-σύγκρισης:

- Για τις μεταβλητές FVL και FIIG20210A: υπολογισμός των odds ratio για ασθενείς ετερόζυγους σε σχέση με ετερόζυγους μάρτυρες (GA vs GG και GA vs GG αντίστοιχα).
- Για τις μεταβλητές MTHFR, FXIII-A Val34Leu, PAI1-675 4G/5G, PAI1-844A/G: υπολογισμός των odds ratio για τις ομαδοποιήσεις των γονιδίων CT+TT vs CC, Val/Leu+Leu/Leu vs Val/Val, 4G/4G+4G/5G vs 5G/5G, GA+AA vs GG αντίστοιχα. (πίνακας 36).

Στην συνέχεια του κεφαλαίου παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα με την μορφή των στατιστικών πινάκων των ελέγχων που διενεργήθηκαν και επίσης πραγματοποιείται ο σχολιασμός των τελικών αποτελεσμάτων.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα μετάλλαξης FV R506Q.

	FV(R506Q)		Σύνολο
	Χωρίς μετάλλαξη	Μετάλλαξη-Ετεροζυγωτία (R506Q)	
ασθενείς	44	7	51
μάρτυρες	66	4	70
Σύνολο	110	11	121

($p=0.199$)

Χωρίς τη μετάλλαξη βρέθηκαν να είναι 44 (44/51, 86.3%) ασθενείς και 66 (66/70, 94.3%) μάρτυρες.

Ετεροζυγώτες (GA) για τη μετάλλαξη FVLeiden (FV R506Q) προέκυψαν 7 (7/51, 13.7%) ασθενείς και 4 (4/70, 5.7%) μάρτυρες. (ασθενείς ετεροζυγώτες σε σχέση με μάρτυρες ετεροζυγώτες, OR=2.625; 95% CI=0.725-9.501) (πίνακας 36)

Όταν έγινε η σύγκριση των επιπέδων της μεταβλητής της μετάλλαξης (Χωρίς Μετάλλαξη ή Με Ετεροζυγωτία) με τα επίπεδα των ασθενών και των μαρτύρων, σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=5\%$ δε βρέθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0.199$) (πίνακας 35). Άρα είμαστε σε θέση να ισχυριστούμε πως οι δυο μεταβλητές δεν συσχετίζονται μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματα για τη μεταβλητή prothrombin FII G20210A φαίνονται στον πίνακα 25

Πίνακας 25: Αποτελέσματα μετάλλαξης prothrombin FII G20210A

	prothrombin (FII) G20210A		Σύνολο
	Χωρίς μετάλλαξη (Wild type GG)	Μετάλλαξη-Ετεροζυγωτία (GA)	
ασθενείς	49	2	51
μάρτυρες	65	5	70
Σύνολο	114	7	121

($p=0.698$)

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, οι ασθενείς χωρίς τη μετάλλαξη ήταν 49 (49/51, 96.1%) ενώ οι μάρτυρες που δεν έφεραν τη μετάλλαξη ήταν 65 (65/70, 92.9%). Ετεροζυγώτες (GA) ασθενείς για τη μετάλλαξη FIIIG20210A ήταν 2 (2/51, 3.9%) ενώ ετεροζυγώτες μάρτυρες ήταν 5 (5/70, 7.1%). (OR=0.531; 95%CI=0.099-2.851) (πίνακας 36)

Κανείς εκ των δύο ομάδων δεν ήταν ομοζυγώτης (AA).

Από τη σύγκριση των τιμών μεταξύ των δύο ομάδων, προκύπτει μη στατιστικά σημαντική διαφορά για τη μεταβλητή prothrombin FIIIG20210A (p=0.698) (πίνακας 35)

Στον πίνακα 26 αναγράφονται τα αποτελέσματα για τη μεταβλητή 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).

Πίνακας 26: Αποτελέσματα μετάλλαξης 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)			Σύνολο
	Χωρίς μετάλλαξη	Ετεροζυγωτία (CT)	Ομοζυγωτία (TT)	
ασθενείς	16	28	7	51
μάρτυρες	26	36	8	70
Σύνολο	42	64	15	121

(p=0.788)

Για τη μετάλλαξη MTHFR προέκυψαν τα εξής δεδομένα:

Χωρίς μετάλλαξη (wild type) μετρήθηκαν 16 ασθενείς (16/51, 31.4%) και 26 μάρτυρες (26/70, 37.2%).

Ετεροζυγώτες (CT) ήταν 28 ασθενείς (28/51, 54.9%) και 36 μάρτυρες (36/70, 51.4%).

Ομοζυγωτία (TT) εμφάνισαν 7 άτομα από την ομάδα των ασθενών (7/51, 13.7%) καθώς και 8 άτομα από τη ομάδα των μαρτύρων (8/70, 11.4%).

(CT+TT vs CC: OR=1.293; 95% CI=0.602-2.777) (πίνακας 36)

Από τη σύγκριση των τιμών προκύπτει μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ' αυτή των μαρτύρων όσον αφορά στη

μεταβλητή 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) ($p=0.788$) (πίνακας 35)

Ο πίνακας 27 περιέχει τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανίχνευση του πολυμορφισμού Val34Leu της A-υπομονάδας του παράγοντα XIII(FXIII).

Πίνακας 27: Αποτελέσματα ανίχνευσης πολυμορφισμού Val34Leu της A-υπομονάδας του παράγοντα XIII(FXIII)

	Πολυμορφισμός Val34Leu της A-υπομονάδας του παράγοντα XIII(FXIII)			Σύνολο
	Γονότυπος (Val/Val)	Γονότυπος (Val/Leu)	Γονότυπος (Leu/Leu)	
ασθενείς	18	19	1	38
μάρτυρες	38	22	6	66
Σύνολο	56	41	7	104

($p=0.160$)

Όσον αφορά στη μετάλλαξη FXIIIVal 34Leu, στα άτομα με γονότυπο Val/Val ανήκαν 18 ασθενείς (18/38, 47.4%) και 38 μάρτυρες (38/66, 57.6%). Ασθενείς με γονότυπο Val/Leu ήταν 19 (19/38, 50%), ενώ μάρτυρες ήταν 22 (22/66, 33.3%). Γονότυπο Leu/Leu εμφάνισαν 1 ασθενής (1/38, 2.6%) καθώς και 6 μάρτυρες (6/66, 9.1%)

(Val/Leu+Leu/Leu vs Val/Val: OR= 1.319; 95% CI=0.598-2.912) (πίνακας 36)

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υπό εξέταση ομάδες και γι' αυτή τη μεταβλητή ($p=0.160$) (πίνακας 35)

Στους πίνακες 28 και 29 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την αναζήτηση πολυμορφισμών στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1).

Πίνακας 28: Αποτελέσματα πολυμορφισμού περιοχής υποκινητού (θέση -675) του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1).

	PAI1-675:4G/5G			Σύνολο
	Γονότυπος (5G/5G)	Γονότυπος (4G/5G)	Γονότυπος (4G/4G)	
ασθενείς	2	36	2	40
μάρτυρες	17	44	4	65
Σύνολο	19	80	6	105

(p=0.02)

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, σε σύνολο 40 ασθενών, 4G/5G στη θέση -675 στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου, του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) φέρουν οι 36 (36/40, 90%), ενώ οι δύο (2/40, 5%) παρουσιάζουν το αλληλίο 4G/4G και μόλις 2 (2/40, 5%) εμφανίζονται να φέρουν το αλληλίο 5G/5G.

Στην ομάδα των μαρτύρων, με το αλληλίο 5G/5G εμφανίζονται οι 17 σε σύνολο 65 (17/65, 26.1%), ενώ φέροντες το αλληλίο 4G/5G είναι οι 44 (44/65, 67.7%) και το αλληλίο 4G/4G έχουν οι 4 (4/65, 6.1%).

(4G/4G+4G/5G vs 5G/5G: OR=6.09; 95% CI=1.329-27.955) (πίνακας 36)

Μετά από στατιστική ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, στην περίπτωση του πολυμορφισμού στη θέση -675 προκύπτει ότι οι ασθενείς είχαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό του αλληλίου 4G/5G καθώς και σημαντικά μικρότερο ποσοστό του αλληλίου 5G/5G σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η διαφορά αυτή, όπως προκύπτει από την διενέργεια του αντίστοιχου ελέγχου χ^2 είναι στατιστικώς σημαντική ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ' αυτή των μαρτύρων (p=0.02) (πίνακας 35).

Άρα είμαστε σε θέση να συμπεράνουμε πως, σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=5\%$, οι δυο μεταβλητές, αυτή του τύπου των πολυμορφισμών και αυτή του τύπου των ομάδων ελέγχου (ασθενείς, μάρτυρες) συσχετίζονται σημαντικά.

Φαίνεται επίσης εκ των ανωτέρω, και είναι στατιστικώς αποδεκτό και έγκυρο βάσει του παραπάνω ελέγχου το συμπέρασμα, πως ο γονότυπος 5G/5G παίζει έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι στην εμφάνιση ΑΕΕ, αφού οι μάρτυρες που εμφανίζουν αυτό το γονότυπο είναι 17 (17/65, 26.1%) ενώ οι ασθενείς με γονότυπο 5G/5G είναι μόνο 2 (2/40,5%).

Πίνακας 29: Αποτελέσματα πολυμορφισμού περιοχής υποκινητού (θέση -844) του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1).

	PAI1-844A/G			Σύνολο
	Γονότυπος (A/A)	Γονότυπος (A/G)	Γονότυπος (G/G)	
ασθενείς	10	24	6	40
μάρτυρες	18	32	15	65
Σύνολο	28	56	21	105

($p=0.493$)

Αντίθετα, στην περίπτωση της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων για τη μεταβλητή του πολυμορφισμού περιοχής υποκινητού (θέση -844) του αναστολέα 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών κ σ' αυτή των μαρτύρων ($p=0.493$) (πίνακας 35)

Εδώ, στην ομάδα των ασθενών, το αλληλίο A/A φέρουν οι 10 (10/40, 25%), το αλληλίο A/G, οι 24 (24/40, 60%), ενώ το αλληλίο G/G φέρουν οι 6 (6/40, 15%). Οι μάρτυρες αντιστοίχως είναι 18 (18/65, 27.7%), 32 (32/65, 49.2%) και 15 (15/65, 23.1%). (GA+AA vs GG: OR=1.038; 95% CI=0.425-2.539) (πίνακας 36)

Πίνακας 30: Αποτελέσματα μεταβλητής APCResistance (ProCGlobal)

	APCResistance(PCGlob FV NR)		Σύνολο
	Φυσιολογικές Τιμές(0.7-1.3)	Μειωμένη Τιμή (<0.70)	
ασθενείς	43	7	50
μάρτυρες	28	3	31
Σύνολο	71	10	81

($p=0.733$)

Από τη σύγκριση των τιμών προκύπτει μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ' αυτή των μαρτύρων όσον αφορά στη μεταβλητή APCResistance (ProCGlobal), $p=0.734$

Όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες με παθολογική APCResistance (ProCGlobal FV NR) ελέγχθηκαν με PCR και έφεραν τη μετάλλαξη FVLeiden.

Επίσης, όπως φαίνεται στον πίνακα 31, μη στατιστικά σημαντική διαφορά έχουμε και από τη σύγκριση των τιμών για τη μεταβλητή PrC. ($p=0.495$)

Πίνακας 31: Αποτελέσματα μεταβλητής PrC

	PrC			Σύνολο
	Φυσιολογική Τιμή (70-140%)	Μειωμένη Τιμή (<70%)	Αυξημένη Τιμή (>140 %)	
ασθενείς	45	1	2	48
μάρτυρες	30	1	0	31
Σύνολο	75	2	2	79

(p=0.495)

Στην περίπτωση της PrC, οι ασθενείς με φυσιολογική τιμή PrC ήταν 45 (45/48, 93.7%), ενώ με μειωμένη τιμή ήταν 1 (1/48, 2.1%).

Οι μάρτυρες με φυσιολογική τιμή ήταν 30 (30/31, 96.8%), ενώ βρέθηκε και ένας μάρτυρας με ανεπάρκεια PrC (1/31, 3.2%).

Στον πίνακα 32 αναγράφονται τα αποτελέσματα για τη μεταβλητή PrS.

Φυσιολογική τιμή PrS είχαν 40 (40/48, 83.3%) ασθενείς και 28 (28/31, 90.3%) μάρτυρες. Ανεπάρκεια PrS μετρήθηκε να έχουν 7 ασθενείς (7/48, 14.6%) και 3 (3/31, 9.7%) μάρτυρες.

Και στην περίπτωση της μεταβλητής αυτής, από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας των μαρτύρων. (p=0.574)

Πίνακας 32: Αποτελέσματα μεταβλητής PrS

	PrS			Σύνολο
	Φυσιολογική Τιμή (60-130%)	Μειωμένη Τιμή (<60)	Αυξημένη Τιμή (>130)	
ασθενείς	40	7	1	48
μάρτυρες	28	3	0	31
Σύνολο	68	10	1	79

(p=0.574)

Τέλος, στον πίνακα 33 φαίνονται τα αποτελέσματα της μεταβλητής AT σε ασθενείς και μάρτυρες.

Πίνακας 33: Αποτελέσματα μεταβλητής AT

	AT			Σύνολο
	Φυσιολογική Τιμή (80-120%)	Μειωμένη Τιμή (<80%)	Αυξημένη Τιμή (>120%)	
ασθενείς	46	1	1	48
μάρτυρες	29	2	0	31
Σύνολο	75	3	1	79

(p=0.449)

Εδώ οι ασθενείς και οι μάρτυρες με φυσιολογική τιμή AT ήταν αντίστοιχα 46 (46/48, 95.8%) και 29 (29/31, 93.5%), ενώ ανεπάρκεια AT παρουσίασαν 1 ασθενής (1/48, 2.1%) και 2 μάρτυρες (2/31, 6.5%).

Όταν συγκρίθηκαν οι τιμές της μεταβλητής AT στους ασθενείς με τις αντίστοιχες στους μάρτυρες, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.449)

Συνδυασμοί αλληλομόρφων

Στον πίνακα 34 αναγράφονται οι συχνότητες των συνδυασμών αλληλομόρφων σε ασθενείς και μάρτυρες.

Πίνακας 34: Συχνότητες συνδυασμών αλληλομόρφων

	Ασθενείς n, (%)	Μάρτυρες n, (%)	p
FVL+MTHFR ετεροζυγωτία	3/51, (5.9)	2/70, (2.8)	0.409
FIIG20210A+MTHFR ετεροζυγωτία	1/51, (1.9)	3/70, (4.3)	0.306
FVL ετεροζυγωτία+MTHFR ομοζυγωτία	4/51, (7.8)	0/70, (0)	0.017
FIIG20210A ετεροζυγωτία+MTHFR ομοζυγωτία	1/51, (1.9)	1/70, (1.4)	0.821

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, 3 ασθενείς (3/51, 5.9%) και 2 (2/70, 2.8%) μάρτυρες είχαν διπλή ετεροζυγωτία για FVL και MTHFR. Η ύπαρξη αυτής της διπλής ετεροζυγωτίας δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ'αυτή των μαρτύρων (p=0.409).

Διπλή ετεροζυγωτία FIIG20210A και MTHFR βρέθηκε να έχουν 1 ασθενής (1/51, 1.9%) και 3 μάρτυρες (3/70, 4.3%). Και σ'αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (p=0.306).

Ετεροζυγωτία για FIIG20210A παράλληλα με ομοζυγωτία για MTHFR προέκυψε πως έφεραν 1 ασθενής (1/51, 1.9%) και 1 μάρτυρας (1/70, 1.4%). Και εδώ, μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0.821$).

Τέλος, ετεροζυγωτία για FVL με ταυτόχρονη ομζυγωτία για MTHFR έφεραν 4 ασθενείς (4/51, 7.8%), αλλά κανένας από την ομάδα των μαρτύρων. Εδώ, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ' αυτή των μαρτύρων ($p=0.017$).

Ωστόσο, εξειδικευμένα στους παραπάνω ελέγχους αλλά και γενικότερα σε όλους στατιστικούς ελέγχους στην παρούσα ερευνητική εργασία, ιδανικά από στατιστικής απόψεως, θα ήταν επιθυμητό να είχαμε μεγαλύτερο ποσοτικά δείγμα ασθενών και μαρτύρων, ώστε να είμαστε περισσότερο ακριβείς, λιγότερο μεροληπτικοί αλλά και περισσότερο ασφαλείς ως προς την ισχύ και την αξιοπιστία των εξαχθέντων αποτελεσμάτων. Ωστόσο, αξίζει να αναφέρουμε πως στην παρούσα έρευνα εξαντλήθηκε κάθε περιθώριο απόκτησης περαιτέρω δείγματος αλλά λόγω χαμηλού ποσοστού ασθενών που πλοιορούν τους περιορισμούς και τα κριτήρια της έρευνας, δεν κατέστη δυνατή η συλλογή επιπρόσθετου δείγματος.

Λόγω του μικρότερου αριθμού τόσο ασθενών, όσο και μαρτύρων που εξετάστηκαν για τις μεταβλητές FXIIIVal34Leu, -675 4G/5G PAI-1, -844 A/G PAI-1, δεν μελετήθηκαν συνδυασμοί των παραπάνω μεταβλητών με τις μεταβλητές FVL, FIIG20210A και MTHFR, αφού το μικρό δείγμα των εξετασθέντων δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Ελλειπίες τιμές μεταβλητών

Θα πρέπει να υπογραμμιστεί πως, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω δεδομένα, υπάρχουν ελλειπίες τιμές για διάφορες μεταβλητές, τόσο σε κάποιους ασθενείς (FXIIIVal34Leu, PAI-675 4G/5G, PAI-844 A/G), όσο κυρίως και σε κάποια άτομα από την ομάδα των μαρτύρων, ιδιαιτέρως όσον αφορά στις μεταβλητές Prc, PrS, AT και ProCGlobal. Αυτό οφείλεται σε διάφορα τεχνικά προβλήματα που προέκυψαν και δεν κατέστη δυνατή η μελέτη των μεταβλητών αυτών σε όλους του συμμετέχοντες.

Στον πίνακα 35 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα σε σχέση με τις μεταλλάξεις και τους πολυμορφισμούς των γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 35: Γονότυποι και συχνότητα αλληλίων στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα των μαρτύρων, των πολυμορφισμών και των μεταλλάξεων των FVL, FIIG20210A, MTHFRC677T, FXIII-AVal34Leu, PAI-675 4G/5G, PAI-844 A/G

Γονίδιο	Γονότυπος	Ασθενείς		Μάρτυρες		p
		n	(%)	n	(%)	
FVLeiden G1691A	GG	44/51	86.3	66/70	94.3	0.199
	GA	7/51	13.7	4/70	5.7	
	AA	0/70	0	0/70	0	
FIIG20210A	GG	49/51	96.1	65/70	92.9	0.698
	GA	2/51	3.9	5/70	7.1	
	AA	0/51	0	0/70	0	
MTHFR C677T	CC	16/51	31.4	26/70	37.2	0.788
	CT	28/51	54	36/70	51.4	
	TT	7/51	13.7	8/70	11.4	
FXIII-A Val34Leu	Val/Val	18/38	47.4	38/66	57.6	0.160
	Val/Leu	19/38	50	22/66	33.3	
	Leu/Leu	1/38	2.6	6/66	9.1	
PAI-675 4G/5G	4G/4G	2/40	5	4/65	6.1	0.02
	4G/5G	36/40	90	44/65	67.7	
	5G/5G	2/40	5	17/65	26.1	
PAI -844 A/G	GG	6/40	15	15/65	23.1	0.493
	GA	24/40	60	32/65	49.2	
	AA	10/40	25	18/65	27.7	

Πίνακας 36: Odds Ratios (ORs) Confidence Intervals (CIs)

	OR	95% CI
FVL (GA vs GG)	2.625	0.725-9.501
FIIG20210A (GA vs GG)	0.531	0.099-2.851
C677T MTHFR (CT+TT vs CC)	1.293	0.602-2.777
FXIII-A Val34Leu (Val/Leu+Leu/Leu vs Val/Val)	1.319	0.598-2.912
PAI-675 4G/5G (4G/4G +4G/5G vs 5G/5G)	6.09	1.329-27.955
PAI-844 A/G (GA+AA vs GG)	1.038	0.425-2.539

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

FVLeiden

Όσον αφορά στον FVLeiden, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και των μαρτύρων (p value=0.199).

Σε πολλές μελέτες όπως αναφέρθηκε ο FVL έχει συσχετιστεί με φλεβική θρόμβωση σε ενήλικες και με AEE σε παιδιά. [209] [210]

Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις, ακόμη και πρόσφατες, με συμπεράσματα που άλλοτε υποστηρίζουν συσχέτιση με AEE και άλλοτε όχι. Μετά-αναλύσεις από μελέτες ασθενών-μαρτύρων (case-control) σε νεαρούς ενήλικες με ισχαιμικό AEE, δείχνουν μια αρχικά θετική συσχέτιση, παρόλο που κάποιες από αυτές περιείχαν ασθενείς με γενετική προδιάθεση προθρομβωτικού παράγοντα, λόγω του τρόπου επιλογής των ασθενών.

Έτσι, για παράδειγμα, κάποιες μελέτες χρησιμοποίησαν ασθενείς από ένα υποσύνολο ασθενών που παραπέμφθηκαν για έλεγχο θρομβοφιλίας, πράγμα το οποίο υποδεικνύει μια προϋπάρχουσα υποψία προθρομβωτικής κατάστασης σ' αυτούς τους ασθενείς. [133] [211] [212] [213] [214]

Μια μεγάλη μεταανάλυση μάλιστα που περιελάμβανε 120 μελέτες και η οποία, για να επιτευχθεί ομογενοποίηση, περιέλαβε μόνον λευκούς ενήλικες, περίπου 18000 ασθενείς και 58000 μάρτυρες, αναφέρει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ FVL και AEE. [215]

Άλλη πρόσφατη μεταανάλυση συνδέει επίσης τον FVL με AEE σε νέους ενήλικες, αλλά αυτή η συσχέτιση κυρίως ισχύει για ασθενείς που παραπέμπονται για έλεγχο θρομβοφιλίας και όχι σε «μη-επιλεγμένους» ασθενείς. [216]

Αν όμως περιοριστεί κανείς σε μελέτες που συμπεριέλαβαν ασθενείς από διαδοχικές εισαγωγές σε νοσοκομεία ή νευρολογικές κλινικές, η συσχέτιση δεν ήταν πλέον στατιστικά σημαντική. [63] [217] [218] [219] [220] [221] [222] [223] [224] [225]

Άλλη μελέτη που περιελάμβανε 468 ασθενείς ηλικίας κάτω των 60 ετών, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος, στατιστικά σημαντικός,

εμφάνισης AEE σε γυναίκες καπνίστριες που φέρουν τη μετάλλαξη FVL, όχι όμως και σε άνδρες. [226]

Σε μελέτη που αναζητήθηκε συσχέτιση FVLeiden και υποτύπων ισχαιμικού επεισοδίου, φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με απόφραξη μεγάλων αγγείων και μαρτύρων, οπότε ίσως θα μπορούσε να προδιαθέτει σε τέτοιου είδους ισχαιμικά AEE. Παρ' ολ' αυτά και εδώ δε φάνηκε να αποτελεί παράγοντα κινδύνου γενικά. [227]

Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη που περιελάμβανε 830 νέους ασθενείς και 907 μάρτυρες, επίσης δε στάθηκε δυνατός ο συσχετισμός μεταξύ της μετάλλαξης στον FVLeiden και ισχαιμικού επεισοδίου. Και σ' αυτή τη μελέτη οι ασθενείς προέρχονταν από διαδοχικές εισαγωγές σε νοσοκομεία και όχι από ασθενείς στους οποίους πιθανολογούνταν προδιάθεση για προθρομβωτική κατάσταση. [228]

Υπάρχουν φυσικά διάφοροι περιορισμοί, όπως το γεγονός πως η συχνότητα της μετάλλαξης στον υπό εξέταση πληθυσμό είναι χαμηλή, οπότε έτσι περιορίζεται η δυνατότητα ανίχνευσης συσχέτισης. Επίσης, επειδή στη μελέτη μας είχαμε μόνον ετεροζυγώτες, τα αποτελέσματα δεν ισχύουν σε ομοζυγώτες.

Σε άλλες, πρόσφατες επίσης μελέτες γίνεται προσπάθεια συσχέτισης Factor V Leiden και ισχαιμικού επεισοδίου σε άτομα με ανοιχτό ωοειδές τρήμα, όπου μάλιστα, σε μια μεγάλη μεταανάλυση φαίνεται μια τάση για θετική συσχέτιση [229]

Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης αυτής στο γενικό πληθυσμό, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η συχνότητα της ετεροζυγωτίας είναι 5.7% (4/70) και βρίσκεται γενικά σε συμφωνία με άλλες δημοσιεύσεις, είτε από τον Ελλαδικό χώρο [230]

είτε από την υπόλοιπη Ευρώπη. Η συχνότητα στη Γερμανία είναι 7.8%, ελαφρώς υψηλότερη από την αντίστοιχη δική μας τιμή, [231] ενώ στη Σλοβακία έχει εκτιμηθεί στο 4%, ελαφρώς χαμηλότερη από του Ελλαδικού χώρου. [232]

Παρά το γεγονός πως η παρουσία μεταλλάξεων στα προθρομβωτικά γονίδια εμφανίζει μεγάλη γεωγραφική και εθνική ετερογένεια, ο FVL, καθώς και ο FIIIG20210A κυρίως περιορίζονται στην Καυκάσια φυλή. [233]

Έτσι γενικά η συχνότητα στην ευρωπαϊκή ήπειρο κυμαίνεται μεταξύ 2-15% [119] [120]

Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί πως στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν περιστατικά με ισχαιμικά AEE που ήταν μη θανατηφόρα, επομένως δε μπορεί να

αποκλειστεί η συσχέτιση του FVLeiden με πρόκληση θανατηφόρων ΑΕΕ, παρόλο που κάτι τέτοιο είναι λιγότερο πιθανό αν λάβει κανείς υπόψη του τη χαμηλή θνητότητα σε σχέση με την ηλικία αυτών των ασθενών.

Επειδή τα δεδομένα παραμένουν ακόμη και σήμερα διφορούμενα, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες μελέτες βασίζονται σε μάλλον μικρό αριθμό δείγματος, αλλά και των διαφορών στα κριτήρια επιλογής των ασθενών, μειώνοντας έτσι την ικανότητα να μπορούν να διακρίνουν συσχετίσεις μικρής κλίμακας, παραθέτουμε τα δικά μας αποτελέσματα, μετά την αξιολόγηση της συγκεκριμένης μεταβλητής.

Συμπερασματικά, και η παρούσα μελέτη έρχεται να προστεθεί σ' εκείνες που δεν δείχνουν συσχέτιση του FVLeiden με ισχαιμικά ΑΕΕ σε νέους ενήλικες, αφού τα ποσοστά ετεροζυγωτίας κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα για ασθενείς και μάρτυρες. Ενδεχομένως τα αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των διάφορων ερευνητών να οφείλονται στην διαφορετική συχνότητα των αλληλίων στους διάφορους πληθυσμούς.

Επομένως, τα αποτελέσματά μας, σε συμφωνία και με άλλες δημοσιεύσεις, δεν υποστηρίζουν τον έλεγχο ρουτίνας για FVLeiden σε ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενο ΑΕΕ. [234]

FII

Ο Franco και συν. εξετάζοντας την επίδραση της μετάλλαξης FIIIG20210A σε 400 μάρτυρες και 263 ασθενείς με αθηρωμάτωση οδηγήθηκε στο συμπέρασμα πως η ετεροζυγωτία στη μετάλλαξη FIIIG20210A, έχει συσχετιστεί με 25% αύξηση των επιπέδων προθρομβίνης [167] ένα εύρημα που συνέβαλε στην κατανόηση του ρόλου της στην αρτηριακή νόσο.

Ακολουθώντας αυτή την ανακάλυψη, διάφορες μελέτες που περιελάμβαναν και μάρτυρες (case-control studies) έχουν διερευνήσει τη σχέση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με το ΑΕΕ, με αντικρουόμενα αποτελέσματα ωστόσο. Ο Margaglione et al. δε βρήκε συσχέτιση στατιστικά σημαντική όταν διερεύνησε 202 ασθενείς που ελέχθησαν για θρομβοφιλία, ανεξάρτητα από την παθογένεση του ΑΕΕ. [133]

Επιπλέον, άλλες μελέτες που περιελάμβαναν νέους ασθενείς με ΑΕΕ, δε συσχέτισαν τον πολυμορφισμό αυτό με ΑΕΕ. [235]

Από την άλλη μεριά, άλλες επιδημιολογικές μελέτες εκτιμούν πως υπάρχει μια μέτρια αλλά όχι στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης της προθρομβίνης και ισχαιμικού ΑΕΕ. [168] [218] [223]

Αντιθέτως, άλλες μελέτες, επικεντρωμένες σε νέους ασθενείς ξανά, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση με την παραπάνω μεταβλητή [226]

Επιπλέον ο Aznar et al. αφού μελέτησε 49 ασθενείς κάτω των 50 ετών με κρυπτογενές ΑΕΕ, κατέληξε πως για τους μεσογειακούς πληθυσμούς, η μετάλλαξη αυτή αποτελεί παράγοντα κινδύνου γι' αυτό το συγκεκριμένο υποσύνολο ασθενών. [236]

Έτσι, στον πίνακα 37 παρατίθεται η συχνότητα της μετάλλαξης της προθρομβίνης σε ασθενείς με ΑΕΕ σε σχέση με την ηλικία.

Πίνακας 37: συχνότητα της μετάλλαξης της προθρομβίνης σε ασθενείς με ΑΕΕ σε σχέση με την ηλικία. [131] [169] [212]

ΗΛΙΚΙΑ (Μέσος όρος)	% ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ
5	6.0
34	7.6
64	1.0

Από τον πίνακα αυτό, γίνεται εμφανές πως υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ ηλικίας και συχνότητας της μετάλλαξης σε ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ.

Η δική μας εργασία έρχεται να προστεθεί σ' αυτές που δε συσχετίζουν τον πολυμορφισμό FIIG20210A με τα ισχαιμικά ΑΕΕ σε νέους ενήλικες. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν στο μέλλον, ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για τη συσχέτιση ή μη του εν λόγω πολυμορφισμού με τα ισχαιμικά ΑΕΕ σε ασθενείς νεαρής ηλικίας.

Όσον αφορά στη συχνότητα της μετάλλαξης αυτής στον υγιή πληθυσμό, θα θέλαμε αρχικά να παραθέσουμε την Ευρωπαϊκή επίπτωση για τους ετεροζυγώτες, η

οποία κυμαίνεται μεταξύ 1-5%. [237] Χώρες όπως η Γερμανία δίνουν ποσοστά ετεροζυγωτίας για τον πληθυσμό τους γύρω στο 3.5% [231] ενώ άλλες μελέτες από Μεσογειακούς πληθυσμούς, δίνουν ποσοστά ετεροζυγωτίας 2.1-2.5% [238] [239] ή όπως ειπώθηκε προηγουμένως μεταξύ 1-5% [237]

Είναι ενδιαφέρον λοιπόν, πως στη δική μας μελέτη, τα ποσοστά ετεροζυγωτίας για τη μετάλλαξη F11G20210A εμφανίζονται υψηλότερα από τα δημοσιευθέντα και είναι 7.1% (5/70). Ο λόγος της συγκεκριμένης διαφοράς θα μπορούσε να είναι απλά το γεγονός πως η μελέτη μας αφορούσε σε μικρό αριθμό μαρτύρων, επομένως, αν θέλουμε ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με τη συχνότητα της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον Ελλαδικό χώρο, θα έπρεπε να διεξάγουμε μελέτες που να περιλαμβάνουν αφενός περισσότερους μάρτυρες, αφ' ετέρου μάρτυρες από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

MTHFR

Το 1969 ο παθολόγος ιατρός Dr Kilmer Mc Cully που μελετούσε παιδιά με ομοκυστινουρία, εισηγήθηκε τη θεωρία πως η ήπια με μέτρια ομοκυστεϊναιμία μπορεί επίσης να σχετίζεται με πρώιμη στεφανιαία νόσο ή AEE σε κατά τ' άλλα υγιείς ενήλικες, όπως προαναφέρθηκε. [138]

Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1976, οι Wilcken & Wilcken παρουσίασαν νέα στοιχεία για τη σχέση ομοκυστεϊνης και στεφανιαίας νόσου. [240] Η πρωτοποριακή τους εργασία οδήγησε σε άλλες διαδοχικές μελέτες, οι οποίες απέδιδαν συσχέτιση μεταξύ ήπιας ομοκυστεϊναιμίας, στεφανιαίας νόσου, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και περιφερικής αρτηριακής νόσου. [241] [242] [243]

Τα επόμενα χρόνια όμως, υπήρξαν διαφωνίες για το κατά πόσον η υπερομοκυστεϊναιμία είναι όντως ένας παράγοντας κινδύνου ή απλά ένα επιφανινόμενο, ένα σύμπτωμα στην αθηρωμάτωση. [244] [245]

Μια μεγάλη μελέτη, η ARIC, δεν κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ επιπέδων ομοκυστεϊνης και επακόλουθων επεισοδίων αγγειακής νόσου σε ομάδες φαινομενικά υγιών ασθενών, οι οποίοι παρακολουθούνταν για χρόνια. [246]

Μια άλλη μελέτη, των Perry και συν., εξέτασε τη συχνότητα AEE σε σχέση με τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεϊνης. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα

πως η ομοκυστεΐνη αποτελεί έναν σημαντικό και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου σε μεσήλικες ασθενείς. [247]

Παρ' ολ' αυτά η σχέση της ομοκυστεΐνης με την αθηρωμάτωση, είναι ισχυρότερη στις αναδρομικές, παρά στις προοπτικές μελέτες. [248]

Αξιοσημείωτο είναι επίσης, πως ενώ η μετάλλαξη MTHFR C677T που είναι μια από τις βασικές αιτίες ήπιας/μέτριας υπερομοκυστεϊναιμίας, δεν αυξάνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [249] [250]

Μελέτη σε γερμανικό πληθυσμό δεν κατόρθωσε να δείξει συσχέτιση μεταξύ εγκεφαλικής ισχαιμίας και μετάλλαξης C677T του MTHFR. [251]

Η ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη αυτή, ήταν όμως συχνή σε παιδιά με ΑΕΕ. [132]

Επιπλέον, εκφράζονται αμφιβολίες κατά πόσον η κατανάλωση φυλλικού οξέος παρεμποδίζει, μέσα από τη μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης που προκαλεί, την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Σε μια πολύ μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη που ολοκληρώθηκε πριν λίγα χρόνια αναζητήθηκε η συσχέτιση μεταξύ συμπληρωμάτων φυλλικού οξέος και μείωσης του κινδύνου OEM, ΑΕΕ. Παρά την αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης, δεν υπήρξε μείωση του κινδύνου εμφάνισης OEM, ΑΕΕ. [252] [253]

Στο ίδιο συμπέρασμα κατηλύγει και μια πολύ πρόσφατη μεγάλη μεταανάλυση που περιέλαβε 59995 μάρτυρες και 20885 ασθενείς με ΑΕΕ. [254]

Συμπερασματικά, η πλειοψηφία των ερευνών επιδεικνύει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ αρτηριακής νόσου και αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης. Η επίδραση της ήπιας ομοκυστεϊναιμίας είναι λιγότερο επιβεβαιωμένη, παρά το γεγονός πως υπάρχουν και εδώ αρκετές μελέτες που να συσχετίζουν την ήπια ομοκυστεϊναιμία με αγγειακή νόσο. Ωστόσο, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ξανά πως δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως πως η μείωση των επιπέδων ομοκυστεΐνης μέσω θεραπειών με βιταμινούχα συμπληρώματα διατροφής (που περιέχουν Β6, Β12, φυλλικό οξύ) οδηγεί και σε προοδευτική μείωση της αθηρωμάτωσης ή μείωση της πιθανότητας θρόμβωσης.

Σε σχέση τώρα με τα ισχαιμικά ΑΕΕ, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών διάφορες μελέτες (case-control, prospective studies) [247] [255] [256] [257] έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη συσχέτιση υπερομοκυστεϊναιμίας και κινδύνου εμφάνισης ισχαιμικού ΑΕΕ. Μια μεταανάλυση αυτών των μελετών κάνει λόγο για αύξηση κατά 2.5 φορές του κινδύνου εμφάνισης ΑΕΕ. [146]

Όσον αφορά τώρα στη συσχέτιση του πολυμορφισμού C677T MTHFR με ΑΕΕ, τα αποτελέσματα είναι επίσης αντιφατικά όπως περιγράφηκε.

Υπάρχουν πολλές αναφορές που δε συσχετίζουν το ΑΕΕ με τον πολυμορφισμό, είτε αναφερόμαστε σε ηλικιωμένους, [223] [250] είτε σε νέους ασθενείς. [258] [259]

Επίσης, δε βρέθηκε συσχέτιση ούτε σε υποομάδες νέων ασθενών με κρυπτογενές ΑΕΕ, όπως φαίνεται από την μελέτη των Calambro et al., η οποία περιελάμβανε 101 ασθενείς. [260]

Θα θέλαμε ωστόσο να παραθέσουμε εδώ τα αποτελέσματα μιας πολύ πρόσφατης μελέτης η οποία υποδεικνύει ότι ο πολυμορφισμός C677T MTHFR αντιπροσωπεύει έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ιδιοπαθές ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία. [261]

Στην παρούσα μελέτη έγινε ανάλυση μόνον της μετάλλαξης, ενώ δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης. Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προκύπτει μη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων όσον αφορά στη μεταβλητή MTHFR.

Μελετήθηκε επίσης και συγκρίθηκε με τα δημοσιευμένα στοιχεία η συχνότητα αυτής της μετάλλαξης στον υγιή πληθυσμό. Σε αντίθεση με το FVL, ο πολυμορφισμός C677T MTHFR δεν εμφανίζεται μόνον στην Ευρώπη σε υψηλά ποσοστά, αλλά παρουσιάζει μια πιο ευρεία γεωγραφική εξάπλωση. Βιβλιογραφικές αναφορές δίνουν ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 30-50% για τους ετεροζυγώτες και 5-20% για τους ομοζυγώτες. [139]

Αυτό έχει καταδειχθεί και με μια μεγάλη μελέτη με δείγματα από πάνω από 7000 νεογνά, διαφόρων εθνικοτήτων και γεωγραφικών περιοχών. [140]

Η συχνότητα του TT γονότυπου (ομοζυγωτία) σε περιοχές κοντινές με την Ελλάδα, όπως η Νότια Ιταλία, φαίνεται να είναι στα υψηλότερα αναμενόμενα ποσοστά, σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα, περίπου γύρω στο 20%. [140]

Στην παρούσα μελέτη, τα ποσοστά των ετεροζυγωτών και των ομοζυγωτών στους μάρτυρες βρέθηκαν να είναι 51% (36/70) και 11% (8/70) αντίστοιχα.

FXIII

Ο πολυμορφισμός Val34Leu είναι ένας από τους πιο σημαντικούς λειτουργικούς πολυμορφισμούς που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα στον τομέα της αιμόστασης και ένας από τους πιο μελετημένους. Προέρχεται όπως αναφέρθηκε από τη σημειακή μετάλλαξη G σε T στο κωδικόνιο 34 (codon 34) του εξονίου 2, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αντικατάσταση της βαλίνης με λευκίνη. [262]

Αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει αυτή τη βαλίνη σε θέση κλειδί, τρία μόλις αμινοξέα μακριά από το σημείο που γίνεται η διάσπαση της θρομβίνης. Αυτό, έχει σαφώς περιγραφεί ότι οδηγεί σε γρηγορότερη ενεργοποίηση του παράγοντα XIII. [263] Ακόμη, θολοσιμετρικές μελέτες έχουν δείξει και μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία λεπτότερου ινώδους και μειωμένης πόρωσης στην περίπτωση Leu34. [263]

Ο πολυμορφισμός αυτός υπάρχει στο 20% περίπου των λευκών Ευρωπαίων, στο 40% των αυτοχθόνων Αμερικανών και στο 13% των πληθυσμών της Νότιας Ασίας. [264] [265] [266]

Στον Ιαπωνικό πληθυσμό από την άλλη, ο πολυμορφισμός αυτός είναι εξαιρετικά σπάνιος. (www.hapmap.org) [267]

Η συχνότητα των αλληλίων στη μελέτη μας, στην ομάδα των μαρτύρων, είναι: για το αλληλίο Val/Val: 57.6% (38/66), 33.3% (22/66) για το αλληλίο Val/Leu και 9% (6/66) για το αλληλίο Leu/Leu. Η συχνότητα αυτή διαφέρει σχετικά από άλλες μελέτες από την περιοχή της Μεσογείου (65%, 32%, 3% αντίστοιχα). [266]

Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, μελέτες που θα ελέγχουν μεγαλύτερο πληθυσμό, είναι αναγκαίες για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με τη συχνότητα του πολυμορφισμού αυτού στο γενικό πληθυσμό.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν εκτιμήσει τη συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Val34Leu της A-υπομονάδας του παράγοντα FXIII (FXIII-A) και ισχαιμικού ΑΕΕ. Η υπόθεση παραμένει η ίδια: γονίδια που εμπλέκονται στο σύστημα αιμόστασης, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ΑΕΕ.

Έτσι, όλο και περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σχέση μεταξύ αυτού του πολυμορφισμού και καρδιαγγειακής νόσου, φλεβικής θρόμβωσης και ΑΕΕ. Παλαιότερες αλλά και σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει πως η μετάλλαξη αυτή, Val34Leu, στην υπομονάδα A του παράγοντα XIII έχει συσχετιστεί με προστασία ενάντια σε έμφραγμα [268] [269] [270] και προδιάθεση για ενδοκράνια

αιμορραγία (intracerebral hemorrhage, ICH) στους ετεροζυγώτες. Το ενδιαφέρον είναι πως οι ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη φαίνονται να είναι προστατευμένοι για φλεβοθρόμβωση. [271] [272]

Υπάρχει η υπόθεση πως ο πολυμορφισμός FXIII-A Val34-Leu μπορεί ίσως να παίζει προστατευτικό ρόλο απέναντι στην εμφάνιση ισχαιμικού ΑΕΕ. Παρ' ολ' αυτά, τα αποτελέσματα δε φαίνονται να συγκλίνουν προς τη μια ή την άλλη άποψη. [273] [274] [275] [276] [277]

Υπάρχουν επομένως αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το ρόλο αυτού του πολυμορφισμού, με μελέτες να ομιλούν για παραδόξως σχετικά μικρή προστατευτική δράση στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση. [263] [278] [279]

Έχει ενδιαφέρον να σημειωθεί πως ο ρόλος του πολυμορφισμού στις θρομβωτικές διαδικασίες ίσως να επηρεάζεται από προκαθορισμένους γενετικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. [280]

Επίσης, ενώ ο πολυμορφισμός φαίνεται να προστατεύει για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, και να υπερκεράζει τη δράση του καπνίσματος, [281] αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου. [29] [282]

Από μια μεγάλη μετα-ανάλυση του 2004 [215] αλλά κ μεταγενέστερες δημοσιεύσεις [276] [283] [284] [285] δεν προκύπτει συσχέτιση του πολυμορφισμού με ΑΕΕ, ακόμη και σε παιδιατρικούς πληθυσμούς. [286]

Μια πολύ πρόσφατη μάλιστα μελέτη επιχείρησε να διερευνήσει την επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, σε σχέση με τα αθηροθρομβωτικά ισχαιμικά ΑΕΕ και όχι σε σχέση με τα καρδιοεμβολικά. Και σ' αυτή την περίπτωση δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ πιθανότητας εμφάνισης αθηροθρομβωτικού ισχαιμικού ΑΕΕ και πολυμορφισμού FXIII A Val34Leu και στα δύο φύλα. [287]

Επίσης, σε μια μεγάλη μεταανάλυση του 2011, όπου χρησιμοποιήθηκαν και ερμηνεύθηκαν αποτελέσματα από 16 μελέτες, οι οποίες περιλάμβαναν 3807 ασθενείς και 4993 μάρτυρες, το αποτέλεσμα ήταν να μην τεκμηριώνεται τελικά συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό FXIII A Val34Leu και στο ισχαιμικό ΑΕΕ. [288]

Ένα άλλο στοιχείο που προκύπτει από μελέτες είναι πως η προστατευτική δράση του πολυμορφισμού του παράγοντα XIII στον κίνδυνο εμφάνισης φλεβοθρόμβωσης εξαρτάται από τα επίπεδα του ινωδογόνου. [289]

Επιπλέον, ακόμη και η ίδια η θρομβολυτική θεραπεία σε ασθενείς με ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικούς, όσο και από γενετικούς παράγοντες, όπως τον πολυμορφισμό του

παράγοντα XIII. Έτσι, θα ήταν χρήσιμη η αναζήτηση ασθενών με ισχαιμικό ΑΕΕ και παρουσία αυτού του πολυμορφισμού στον παράγοντα XIII, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος παρενεργειών από την αγωγή. [290]

Η δικιά μας μελέτη έρχεται να προστεθεί σ' αυτές που δεν τεκμηριώνουν συσχέτιση. Παρ' ολ' αυτά, περισσότερες μελέτες, με περισσότερους ασθενείς και μάρτυρες, διαφόρων εθνικοτήτων θα έπρεπε να γίνουν, ώστε να έχουμε στο μέλλον μια πιο σαφή εικόνα, όσον αφορά σ' αυτή τη συσχέτιση ή μη.

PAI-1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο PAI-1 σχηματίζει ένα σύμπλεγμα μη αναστρέψιμο με τον t-PA και αποτελεί έναν σημαντικό αναστολέα της ινωδολύσης. Η δυναμική ισορροπία μεταξύ πηκτικού και ινωδολυτικού συστήματος αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα της θρομβωτικής διαδικασίας. Αυξημένα επομένως επίπεδα PAI-1 μπορεί να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική εκκαθάριση της θρομβίνης και, σε έναν αθηροσκληρωτικό περιβάλλον, να προάγουν την υπέρμετρη εναπόθεση θρομβίνης και την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων. [291] [292]

Όπως αναφέρθηκε, τα επίπεδα του PAI-1 έχουν συσχετιστεί με έναν κοινό πολυμορφισμό στη θέση -675 του υποκινητή του γονιδίου (single base pair insertion 5G/ deletion 4G polymorphism). Το αλλήλιο 4G, δηλαδή ο γονότυπος 4G/4G, έχει σχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα PAI-1, συγκρινόμενος με το γονότυπο 5G/5G σε διάφορες μελέτες. Αυτό συμβαίνει διότι το αλλήλιο 5G περιέχει μια επιπλέον περιοχή μειωμένης πρόσδεσης της πρωτεΐνης, η οποία απουσιάζει στην περίπτωση του αλληλίου 4G. Ως συνέπεια, ο γονότυπος 4G παράγει έως και 6 φορές περισσότερο mRNA in vitro και επομένως έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα και υψηλότερη δραστηριότητα PAI-1 στο πλάσμα. [190]

Επίσης αναφέρεται πως η ομοζυγωτία για το αλλήλιο 5G σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα PAI-1 στο πλάσμα, ενώ η ετεροζυγωτία 4G/5G με ενδιάμεσες τιμές. [293]

Η συσχέτιση επιπέδων PAI-1 στο πλάσμα, καθώς και ο πολυμορφισμός 4G/5G έχουν μελετηθεί σε υγιείς ενήλικες και σε ασθενείς με OEM. Μια μεταανάλυση που περιελάμβανε 9 μελέτες, έδειξε μια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης OEM της τάξης του 20% στα άτομα που έφεραν το αλλήλιο 4G/4G. [294]

Μια πιο πρόσφατη μεταανάλυση που περιελάμβανε 37 μελέτες, επίσης έδειξε θετική συσχέτιση, αλλά λιγότερο σημαντική. [295]

Το αλλήλιο 4G έχει επίσης συσχετισθεί με τα επίπεδα χοληστερόλης και LDL σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. [296] Πολλές άλλες μελέτες επίσης καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο γονότυπος 4G/4G οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. [294]

Η μειωμένη ινωδολυτική ικανότητα σχετίστηκε με στεφανιαία νόσο, κυρίως λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του PAI-1. Αυτά τα αυξημένα επίπεδα PAI-1 φαίνεται να επηρεάζουν διαδικασίες πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών ινών και της αθηρωματικής πλάκας προς την κατεύθυνση της αθηροσκλήρωσης. [297]

Ωστόσο, η συσχέτιση που βρέθηκε στην περίπτωση αυτή, δεν φαίνεται να ισχύει, ή είναι ακόμη αμφιλεγόμενη στα ισχαιμικά ΑΕΕ. Σε κάποιες μελέτες ο πολυμορφισμός 4G/4G οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. [298] [299] [300]

Έτσι, ο Bang et al βρήκε πως η συχνότητα του αλληλίου 4G/4G ήταν σημαντικά υψηλότερη σε 60 ασθενείς με αθηροθρομβωτικό ΑΕΕ σε σχέση με τους 100 μάρτυρες που συμπεριέλαβε στη μελέτη του. [301]

Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν στοιχειοθετείται συσχέτιση [302] [303] [304] [305] [306] ή αναφέρεται ακόμη και αρνητική συσχέτιση. [307] [308] [309] [310] Ο Endler et al. μάλιστα, βρήκε αρνητική συσχέτιση σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 60 ετών, δηλαδή κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο συγκεκριμένος γονότυπος είναι προστατευτικός σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ σε νέους. [311]

Μια μεταανάλυση των Tsantes AE et al, δεν κατάφερε να καταδείξει σημαντική συσχέτιση, τόσο θετική, όσο και αρνητική, ανάμεσα στον πολυμορφισμό 4G/5G και στο ΑΕΕ. [312] Σ αυτή τη μεταανάλυση οι περισσότερες μελέτες εξέτασαν τον αντίκτυπο της παρουσίας του αλληλίου σε ασθενείς με ΑΕΕ καθώς και σε μάρτυρες, σε βασικές συνθήκες.

Αντιθέτως, 2 μελέτες που αφορούσαν οξείες διαταραχές, έδειξαν ότι το 4G αλλήλιο οδηγούσε σε αυξημένο κίνδυνο ΑΕΕ. [313] [314]

Σε οξείες διαταραχές, ο PAI-1 φαίνεται πως «λειτουργεί» ως παράγοντας οξείας φάσης. Επιπλέον, μπορεί να θεωρηθεί πως η αύξηση των επιπέδων του PAI-1 μετά από στρεσογόνες καταστάσεις, όπως για παράδειγμα σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις, γίνεται πιο γρήγορα ίσως σε άτομα που φέρουν το αλλήλιο 4G, με αποτέλεσμα την διαταραγμένη ινωδόλυση. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, ο

σηματισμός μικροθρόμβων δεν εξουδετερώνεται επιτυχώς από το ινωδολυτικό σύστημα.

Μια άλλη πολύ πρόσφατη μελέτη με 516 ασθενείς και 513 μάρτυρες κατέδειξε πως άτομα με διαφορετικούς γονοτυπικούς συνδυασμούς tPA(tissue plasminogen activator) και PAI-1 είχαν σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ, υποδεικνύοντας κατ'αυτόν τον τρόπο πως η αλληλεπίδραση γονιδίων μπορεί να αλλάξει την «ευαισθησία» συγκεκριμένων ατόμων απέναντι στη νόσο. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί, πως η συγκεκριμένη μελέτη καταλήγει επίσης στο συμπέρασμα πως ο πολυμορφισμός 4G/5G από μόνος του δεν σχετίστηκε με κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ. [315]

Φαίνεται πως ο PAI-1 εμπλέκεται τόσο σε επιβλαβείς, όσο και σε προστατευτικές βιολογικές διαδικασίες οι οποίες οδηγούν σε ΑΕΕ. Ο μάλλον μη ξεκάθαρος ρόλος του 4G αλληλίου στο ΑΕΕ, σε αντίθεση με τον επιβλαβή ρόλο του στο OEM, θα μπορούσε να είναι ένδειξη διαφορετικών οδών παθογένειας για τις δύο αυτές νόσους.

Από όλα τα παραπάνω, είναι σαφές ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια αποτελεσμάτων για τη συσχέτιση αυτή στις διάφορες μελέτες. Υπάρχουν πολλοί λόγοι που υπεισέρχονται στην εξήγηση αυτής της ετερογένειας: μη σωστή συλλογή των ασθενών (μη χρησιμοποίηση αποτελεσμάτων από ασθενείς που κατέληξαν λόγω του ΑΕΕ), μη σωστή επιλογή των μαρτύρων ή λάθος κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων. Ανεπαρκές δείγμα επίσης, μπορεί να οδηγεί σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Μπορεί επίσης να υπάρχουν διαφορές μεταξύ πληθυσμών (ετερογένεια αλληλομόρφων).

Στη δική μας μελέτη, προκύπτει πως ο γονότυπος 5G/5G φαίνεται να παίζει έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι στην εμφάνιση ΑΕΕ, αφού οι μάρτυρες που εμφανίζουν αυτό το γονότυπο είναι 17 (17/65, 26.1%) ενώ οι ασθενείς με γονότυπο 5G/5G είναι μόνο 2 (2/40,5%). Επίσης, οι ασθενείς με γονότυπο 4G/5G είναι 36 (36/40, 90%) ενώ οι μάρτυρες με τον ίδιο γονότυπο είναι 17 (17/65, 26.1%).

Παραμένει επομένως αβέβαιη, ή τουλάχιστον συζητήσιμη η προστατευτική ή μη δράση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στον κίνδυνο εμφάνισης ΑΕΕ σε νέους ασθενείς, λόγω της ομολογουμένως πιο πολύπλοκης δράσης του PAI-1 στα ΑΕΕ. Αν θέλουμε να προβλέψουμε τις επιδράσεις αυτού του πολυμορφισμού με μεγαλύτερη βεβαιότητα στις διάφορες ομάδες ασθενών με ΑΕΕ, συμπεριλαμβανομένων και των νεαρών ενηλίκων, θα πρέπει να διερευνηθούν και να κατανοηθούν οι υποκείμενοι

μηχανισμοί, που φαίνονται να είναι ιδιαίτερος πολύπλοκοι, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους. Αυτό θα μπορούσε να συντελέσει στην αναγνώριση ασθενών, στους οποίους η εκτίμηση αυτού του πολυμορφισμού θα μπορούσε να εμπεριέχει μια προγνωστική αξία.

Όσον αφορά στη σημειακή μετάλλαξη -844 G/A της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου του PAI-1, από την παρούσα εργασία δεν προκύπτει συσχέτιση αυτής της μεταβλητής με τα ισχαιμικά ΑΕΕ σε νέους ενήλικες. Υπάρχουν λιγοστές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία σε σχέση μ' αυτή τη συσχέτιση.

Μια πρόσφατη μελέτη του 2009, [316] δε στοιχειοθετεί συσχέτιση, σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Είναι ωστόσο φανερό, πως χρειάζεται να μελετηθεί μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και μαρτύρων, ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για την συγκεκριμένη μεταβλητή.

Συχνότητες στο γενικό πληθυσμό

-675 4G/5G

Από διάφορες μελέτες φαίνεται πως η συχνότητα της ομοζυγωτίας 4G/4G είναι αρκετά υψηλή στον Ευρωπαϊκό χώρο. Για παράδειγμα, στη Γερμανία σε μελέτη που περιλάμβανε 282 άτομα, οι συχνότητες που βρέθηκαν είναι: για το αλλήλιο 4G/4G 29.4%, για το αλλήλιο 4G/5G, 48.2% και για το αλλήλιο 5G/5G, 22.3% [231]

Στη δική μας εργασία, οι συχνότητες που βρέθηκαν, όσον αφορά στον πληθυσμό των μαρτύρων, για τα αλλήλια 4G/4G, 4G/5G και 5G/5G: 6.1% (4/65), 67.7% (44/65) και 26.1% (17/65) αντίστοιχα. Και σ' αυτή τη μεταβλητή υπάρχει διαφορά, η οποία μπορεί απλά να υποδεικνύει μια γεωγραφική ανισοκατανομή του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην Ευρώπη. Παρόμοιες μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού, θα βοηθήσουν στην αποσαφήνιση.

-844 G/A

Στη μελέτη μας οι γονοτυπικές συχνότητες στους μάρτυρες ήταν: A/A 18/65 (27.7%), AG 32/65 (49.2%) και GG 15/65 (23.1%)

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά από τα δημοσιευμένα δεδομένα. [316]

Ωστόσο, μελέτες που να περιλαμβάνουν μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού είναι απαραίτητες ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη συχνότητα του πολυμορφισμού στο γενικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δε δείχνουν να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού στους δύο εξετασθέντες πληθυσμούς των νέων ασθενών και των μαρτύρων. Τα λιγοστά δημοσιευμένα δεδομένα για τη σχέση αυτού του πολυμορφισμού με τα ΑΕΕ, επίσης δε στοιχειοθετούν συσχέτιση. [316]

APCResistance

Στο περίπου 95% των ασθενών με παθολογική τιμή APCR ανευρίσκεται η μετάλλαξη FVL. [317]

Στη συγκεκριμένη μελέτη, όλοι οι ασθενείς και οι μάρτυρες που είχαν παθολογική τιμή APCR, ελέγχθησαν με PCR και βρέθηκαν να έχουν τη μετάλλαξη FVL.

PrC, PrS, AT

Η επίπτωση των PrC, PrS, AT στα ΑΕΕ φτάνει μέχρι και το 23% σε κάποιες μελέτες. [318]

Ωστόσο, δε φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω μεταβλητών και ισχαιμικού ΑΕΕ σε νέα άτομα. [319]

Μολαταύτα, επειδή λόγω τεχνικών προβλημάτων δεν κατέστη δυνατή η μελέτη των προαναφερθέντων μεταβλητών σε ασφαλή αριθμό ασθενών και μαρτύρων, τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης δε μπορούν να θεωρηθούν ασφαλή για τις συγκεκριμένες μεταβλητές.

Επίσης, η συχνότητα της ανεπάρκειας των μεταβλητών PrC, PrS και AT στους μάρτυρες που μετρήθηκε στο εν λόγω δείγμα, λόγω του μικρού δείγματος που τελικά εξετάστηκε, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ώστε να εξαχθούν ασφαλή

συμπεράσματα σε σχέση με τη συχνότητα της ανεπάρκειας των παραγόντων αυτών στο γενικό πληθυσμό.

Η συχνότητα της ανεπάρκειας της PrS έχει εκτιμηθεί σε λιγότερο από 0.5% στο γενικό Ευρωπαϊκό πληθυσμό [320] ενώ η αντίστοιχη της PrC είναι 0.2-0.4% [321] [322]

Σε μια μεγάλη μετα-ανάλυση του 2003 αναφέρεται πως η ανεπάρκεια της PrC έχει σποραδικά ενοχοποιηθεί με ΑΕΕ. Αυτή η μεταανάλυση αναφέρει άλλες αναλύσεις όπου η συχνότητα της ανεπάρκειας της PrC είναι 4%,5%, μέχρι και 21%, σε ομάδες ασθενών με ΑΕΕ, ανάλογα με τα κριτήρια εισαγωγής στην εκάστοτε μελέτη. Αυτοί οι ασθενείς ήταν μικρότερης ηλικίας από άλλους χωρίς ανεπάρκεια PrC. Το συμπέρασμα αυτής της εργασίας ήταν πως η ανεπάρκεια της PrC μπορεί ασθενώς να συσχετιστεί με ΑΕΕ. [323]

Από την άλλη, η ανεπάρκεια της PrS έχει συσχετιστεί με ΑΕΕ πιο συχνά σε σχέση με την ανεπάρκεια της PrC. Ωστόσο, αντικρουόμενες μελέτες μειώνουν την αξιοπιστία αυτής της συσχέτισης. Έτσι, υπάρχουν αναφορές για συχνότητα αυτής της ανεπάρκειας σε ποσοστό από 13.8% μέχρι και 23% σε ομάδα ασθενών ηλικίας μικρότερης των 45 ετών, και 6% σε ασθενείς με ΑΕΕ μεγαλύτερης ηλικίας. [323] Αντίθετα, άλλες μελέτες δείχνουν πολύ μικρότερη συσχέτιση.

Ανεπάρκεια της AT σπάνια έχει συσχετιστεί με ΑΕΕ κι επομένως δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να συνδέουν την AT με τα ΑΕΕ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ύπαρξη γενετικής θρομβοφιλικής κατάστασης per se, δε φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ισχαιμικό ΑΕΕ σε νεαρούς ενήλικες όσον αφορά στις μεταβλητές FVL, FIIIG20210A, C677T MTHFR, -844 G/A PAI-1 και FXIII-A Val34Leu. Είναι όμως πιθανό, πως η επίδραση αυτών των μεταλλάξεων/πολυμορφισμών να σχετίζεται με άλλους, μη γνωστούς ακόμη γενετικούς τόπους που να υπεισέρχονται στην εμφάνιση ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία.

Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα του αλληλίου 5G/5G του πολυμορφισμού -675 4G/5G PAI-1 είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα των μαρτύρων σε σχέση με αυτή των ασθενών. Επιπλέον, η συχνότητα του αλληλίου 4G/5G του ίδιου γενετικού τόπου, είναι σημαντικά πιο υψηλή στην ομάδα των ασθενών, σε σύγκριση με αυτή των υγιών μαρτύρων.

Φαίνεται επομένως, και είναι στατιστικώς αποδεκτό και έγκυρο βάσει του παραπάνω ελέγχου το συμπέρασμα, πως ο γονότυπος 5G/5G παίζει έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι στην εμφάνιση ΑΕΕ, αφού οι μάρτυρες που εμφανίζουν αυτό το γονότυπο είναι περισσότεροι από τους ασθενείς με γονότυπο 5G/5G. Τα ποσοστά εμφάνισης του αλληλίου 4G/4G δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Επίσης η ετεροζυγωτία για FVL με ταυτόχρονη ομοζυγωτία για MTHFR παρατηρήθηκε σε περισσότερους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Εδώ, επίσης προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και σ' αυτή των μαρτύρων. Ωστόσο, απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και μαρτύρων, ώστε να εξαχθούν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σχέση με την επίδραση αυτής της συνύπαρξης ετεροζυγωτίας FVL και ομοζυγωτίας MTHFR στην εμφάνιση ΑΕΕ σε νέους ενήλικες.

Η εργαστηριακή διερεύνηση με έλεγχο θρομβοφιλίας δε φαίνεται να αλλάζει τον κλινικό χειρισμό ασθενών νεαρής ηλικίας με ισχαιμικό ΑΕΕ.

Θα πρέπει να τονιστεί πως η παρούσα μελέτη ήταν μια cross sectional μελέτη και επομένως δεν ελέγχει αιτιότητα. Αν θέλουμε να ελέγξουμε αιτιότητα, θα πρέπει να οργανωθούν μεγάλες προοπτικές κοορτικές μελέτες (prospective cohort studies) ώστε να ελεγχθεί ο πιθανός αυξημένος κίνδυνος για ισχαιμικό ΑΕΕ που μπορεί να σχετίζεται με τον πολυμορφισμό 4G/5G στη θέση -675 του promoter του PAI-1.

Είναι επίσης προφανές πως, στο ΑΕΕ, όπου υπάρχουν σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών, κοινωνικών και περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και τρόπου ζωής, οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να έχουν διαφορετικό αντίκτυπο, που σχετίζεται με την επιβάρυνση του πληθυσμού με μη γενετικούς παράγοντες κινδύνου. Ομοίως, λαμβάνοντας υπόψη τη γεωγραφική ετερογένεια της συχνότητας των αλληλίων για διαφόρους πολυμορφισμούς/μεταλλάξεις, θα μπορούσε να υποθεθεί πως οι εν λόγω πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις θα μπορούσαν να έχουν μια διαφορετική αξία πρόβλεψης, σε σχέση με τα ΑΕΕ σε νεαρή ηλικία στους διάφορους πληθυσμούς της γης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΙΑΕΕ) αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές αιτίες θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες. Η συχνότητα τους, σε νέους ενήλικες κυμαίνεται μεταξύ 3% και 5%.

Η πιθανή μείωση της ποιότητας ζωής, όπως επίσης και οι προφανείς μακροχρόνιες κοινωνικοοικονομικές συνέπειες, προτρέπουν σε αποτελεσματική πρωτοβάθμια, αλλά και δευτεροβάθμια πρόληψη, ώστε να οδηγηθούμε στην πιθανότητα αύξησης των παραγωγικών χρόνων, καθώς και της καλής ποιότητας ζωής.

Τα ΙΑΕΕ αποτελούν μια ετερογενή, πολυπαραγοντική νόσο, προκαλούμενη τόσο από τυπικούς παράγοντες κινδύνου, όσο και γενετικούς παράγοντες.

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες, ώστε να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί ενός ισχαιμικού συμβάματος. Αποδεδειγμένοι παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση, ενοχοποιούνται για μικρό μόνον ποσοστό ΙΑΕΕ.

Κοινές παραλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τον παράγοντα V της πήξης, την προθρομβίνη, το ένζυμο 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), τον παράγοντα XIII, καθώς και τον αναστολέα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αποτελούν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς των παραγόντων πήξης που σχετίζονται με αυξημένη τάση προς θρόμβωση. Ο ρόλος τους στον κίνδυνο εμφάνισης ΙΑΕΕ παραμένει υπό αμφισβήτηση/συζήτηση.

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να ελέγξουμε και να συγκρίνουμε την επίπτωση των προαναφερθέντων κλασικών παραγόντων κινδύνου και πολυμορφισμών, δηλαδή του FVLeiden (R506Q ή G1691A), της μετάλλαξης της προθρομβίνης (FIIIG202104), της C677TMTHFR μετάλλαξης στο ένζυμο MTHFR, της παραλλαγής «εισαγωγή-διαγραφή» -6754G/5GPAI-1 στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του PAI-1, της απλής σημειακής μετάλλαξης -844G/APAI-1 στην περιοχή του προωθητή του γονιδίου του PAI-1, του πολυμορφισμού FXIII-AVal34Ileu της A-υπομονάδας του παράγοντα XIII καθώς και τη σημασία τους στο συνολικό κίνδυνο εμφάνισης ΙΑΕΕ σε νεαρούς ενήλικες κάτω των 50 ετών. Επίσης αξιολογήσαμε τη σημασία των επιπέδων πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S και αντιθρομβίνης και των πιθανών ανεπαρκειών αυτών των παραγόντων πήξης.

Γι' αυτό το λόγο, διεξήχθη η παρούσα μελέτη, η οποία περιελάμβανε 51 επιζήσαντες ασθενείς με ΙΑΕΕ, ηλικίας κάτω των 50 ετών και 70 μάρτυρες. Σε αυτές τις δύο ομάδες εξετάστηκαν οι προαναφερόμενοι παράγοντες με μοριακές τεχνικές, καθώς και με πηκτικολογικές μεθόδους, και έπειτα μετρήθηκε και συγκρίθηκε η συχνότητά τους.

Τα στοιχεία που αφορούν ΙΑΕΕ σε νέους ενήλικες από τον Ελλαδικό χώρο είναι σπάνια. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη με σκοπό να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση των προαναφερθέντων παραγόντων με τα ΙΑΕΕ στο συγκεκριμένο αυτό πληθυσμό της Νότιας Ευρώπης.

Οι μάρτυρες που επελέγησαν προέρχονταν από την ίδια γεωγραφική περιοχή και ήταν σταθμισμένοι ως προς το φύλο ($p=0.567$) και την ηλικία ($p=0.876$).

Οι ασθενείς επίσης δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς το κάπνισμα, ($p=0.559$), την ύπαρξη υπερχοληστερολαιμίας ($p=0.112$) ή το οικογενειακό ιστορικό ΑΕΕ ($p=0.20$). Η υπέρταση ήταν πιο συχνή στην ομάδα των ασθενών (8/51, 15.7%) σε σχέση με τους μάρτυρες (0/70, 0%) ($p=0.0001$). Τόσο οι ασθενείς, όσο και οι μάρτυρες ανήκαν στην Καυκάσια φυλή.

Καθώς η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη αυτών των παραγόντων στο συγκεκριμένο πληθυσμό στον ελλαδικό χώρο, ένας επιπλέον στόχος ήταν να εκτιμηθεί η σημασία αυτών των μεταβλητών στους ΙΑΕΕ σε νέους ενήλικες, αλλά και η συχνότητά τους στο γενικό πληθυσμό.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν για τον εξετασθέντα πληθυσμό, από την παρούσα μελέτη είναι: δεν κατεδείχθη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των ασθενών και αυτής των μαρτύρων σε σχέση με τις μεταβλητές FVL ($p=0.199$), PT20210 ($p=0.410$), MTHFR ($p=0.788$), -844G/A PAI-1 ($p=0.493$) και FXIII-AVal34Ieu ($p=0.160$). Τα παραπάνω δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με διάφορες διεθνείς αναφορές, στις οποίες καταδεικνύεται πως οι παραπάνω μεταβλητές δεν σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΙΑΕΕ σε νεαρούς ενήλικες. Παρ' όλ' αυτά υπάρχουν και δημοσιεύσεις που καταδεικνύουν συσχέτιση.

Η συχνότητα του αλληλίου 4G/5G του πολυμορφισμού -675 4G/5G του PAI-1 ήταν σημαντικά πιο αυξημένη στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης η συχνότητα του αλληλίου 5G/5G ήταν σημαντικά πιο ελαττωμένη στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με αυτή των μαρτύρων. ($p=0.02$)

Επομένως, αυτή η μελέτη υποδεικνύει πως ο πολυμορφισμός -675 4G/5G της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου του παράγοντα PAI-1, αποτελεί γενετικό

παράγοντα κινδύνου για ΙΑΕΕ σε νεαρή ηλικία, ενώ οι υπόλοιποι από τους κληρονομικούς θρομβοφιλικούς παράγοντες που μελετήθηκαν, δεν φαίνεται να αποτελούν παράγοντες κινδύνου.

Επιπλέον μελέτες οι οποίες θα περιλαμβάνουν όλους τους νέους ασθενείς που θα εισάγονται σε νοσοκομείο για ΙΑΕΕ, είναι απαραίτητες, ώστε να εκτιμηθεί η σημασία αυτών των μεταβλητών στον κίνδυνο εμφάνισης ΙΑΕΕ σε νέους ενήλικες. Επιπρόσθετα, άλλοι καινούριοι γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες που δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί, θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου και θα έπρεπε να μελετηθούν στο μέλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ - ENGLISH SUMMARY

Ischemic stroke (IS) is a leading cause of death in developed countries; its prevalence among young adults (aged 18 to 50 years) ranges from 3% to 5%.

The potential reduction in quality of life, as well as the obvious long-term significant socioeconomic consequences urges for efficient primary and secondary prevention so as to facilitate the likelihood of an increased number of productive years with good quality of life. IS is a heterogenous, multifactorial disease caused by conventional vascular risk factors and genetic factors.

Over the last years several studies have been performed to elucidate the mechanisms of this ischemic event. The well-established risk factors of hypertension, obesity and smoking, account for only a small percentage of cerebrovascular events.

Common variations in the genes encoding factor V, prothrombin, 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), factor XIII and plasminogen activator inhibitor-1 are clotting factor mutations or polymorphisms that are associated with an increased tendency towards thrombosis. The evidence of a role for these variants in the risk of ischemic stroke is controversial.

In young adults with a history of ischemic stroke, we evaluated the role of these inherited prothrombotic factors.

The aim of the study was to investigate and compare the prevalence of the aforementioned classic vascular risk factors and polymorphisms, that is FVLeiden R506Q (FVL), the prothrombin variant (allele 20210A, FIIG20210A), C677T MTHFR (C677TMTHFR) polymorphism, the insertion/deletion (4G/5G) variation (-6754G/5GPAI-1) as well as the single nucleotide polymorphism -844G/A of in the plasminogen activator inhibitor-1 (-844G/APAI-1) gene promoter and factor XIII A Val34Leu polymorphism (FXIII-AVal34leu) and the impact of these gene mutations and classic vascular risk factors on the overall stroke risk in individuals aged 50 years or younger. We also evaluated the role of Protein C (PrC), Protein S (PrS) and Antithrombin (AT) deficiencies.

In this respect, we conducted a case control study of 51 hospital cases of first-ever ischemic stroke in patients and 70 community-based controls.

Patients and controls did not differ regarding age ($p=0.876$), sex ratios ($p=0.567$), smoking ($p=0.559$), hypercholesterolemia ($p=0.112$) or family history of stroke ($p=0.20$). Hypertension was more frequent in patients (8/51, 15.7%)

($p=0.0001$) than in the controls (0/70, 0%) ($p=0.0001$). All the patients and all the control subjects were of Caucasian origin (same ethnic background population).

The prevalence of FVL, FIIG20210A, C677T MTHFR gene mutations, -675 4G/5GPAI, -844G/A PAI-1 and FXIII-AVal34leu polymorphisms, as well as the plasma levels of PrC, PrS and AT were assessed (after being tested by Polymerase Chain Reaction/molecular techniques and clotting assays) and compared with controls.

As data regarding strokes in young adults from Greece is scarce, the present study has been carried out with the aim to test the possible association between -675 4G/5G PAI-1 polymorphism, FVL, FIIG20210A, MTHFR C677T, the -844G/A PAI-1 single nucleotide polymorphism (SNP) and polymorphism FXIIIA Val34leu with ischemic stroke in the young age in this specific South European population. We further evaluated the role of plasma levels of PrC, PrS and AT.

As this is the first study of this kind in Greek population, the additional goal was to evaluate the importance of these mutations as risk factors for development of IS in the young age as well as the prevalence of these mutations to the general population.

In our setting of patients with young adult ischemic stroke, we came to the following conclusions:

No significant difference was found between patients and controls regarding the distribution of FVL ($p=0.199$), FIIG20210A ($p=0.410$), MTHFR ($p=0.788$), -844G/A PAI-1 ($p=0.493$) and FXIII-AVal34leu ($p=0.160$) mutations/polymorphisms.

These data are compatible with several reports showing that the presence of the abovementioned variants is not associated with an increased risk of ischemic stroke in the young age. However, they are at variance with other studies which showed some association.

The 4G/5G genotype of the -675 4G/5G was significantly more frequent among patients as compared to controls. Moreover, we found a significantly lower frequency of the 5G/5G genotype in patients as compared to control subjects. ($p=0.02$)

Hence, this study suggests that the polymorphism of the PAI-1 gene promoter is a genetic risk factor for IS in the young age.

We failed to demonstrate a significant association between patients and controls regarding the rest of the inherited thrombophilia risk factors screened. Thus,

those factors were not found to increase the risk of IS among the group of young patients of Caucasian origin we studied.

Further studies including all incoming young patients with IS are necessary to evaluate the impact of those variants as risk factors in IS in the young age. Moreover, other novel genetic defects and/or environmental factors could play a role and need to be investigated.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Nygaard KK, Brown GE Essential thrombophilia: report of five cases. *Arch Intern Med* 1937; 59(1):82-106
2. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965; 13:516-530
3. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68(5):1370-1373
4. Comp PC, Esmon CT Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S *N Engl J Med* 1984; 311(24):1525-1528
5. Walker ID, Greaves M, Preston FE, on behalf of the Haemostasis and thrombosis task force British Committee for Standards in Hematology. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114:512-528
6. Virchow R. *Gesammelte Abh, dlungen zur Wissenschaftlichen Medtzin.* Frankfurt, Germany: Medinger Sohn; 1856:219-732
7. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al, "Prevalence of Antithrombin Deficiency in the Healthy Population, *Br J Haematol*, 1994, 87(1):106-12.
8. Heit JA. Thrombophilia: Common questions on laboratory assessment and management. *Hematology* 2007; 127-135
9. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1498-1504.
10. Marini C, Totaro R, De Santis F, Ciancarelli I, Baltassare M, Carolei A. Stroke in the young adults in the community based L'Aquila registry: incidence and prognosis. *Stroke* 2001; 32: 52-56
11. Gandolfo G, Conti M. Stroke in young adults: epidemiology. *Neurol Sci* 2003; 24:S1-S3
12. Al Rajeh S, Awada A. Stroke in Saudi Arabia. *Cerebrovasc Dis* 2002; 13: 3-8
13. Jacobs BS, Boden-Albala B, Lin I-F, Sacco RL. Stroke in the young in the northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 2002; 33: 2789-2796
14. Rosamond W, Flegal K, Go A, Greenlund K, Haase N et al. Heart disease and stroke statistics – 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117: e25-e46

15. Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest* 2008; 133: 630S-669S.
16. Putaala J, Metso TM, et al. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15 to 49 with first ever ischemic stroke: the Helsinki Young Stroke Registry. *Stroke* 2009; 40: 1195-1203
17. Liao D, Cooper L, Cai J et al. Presence and severity of cerebral white matter lesions and hypertension, its treatment and its control. The ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 1996; 27(12): 2262-2270
18. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR et al. The seventh report of the Joint National Committee on prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289(19): 2560-2572
19. Wolf PA D'Agostino RB, Kannel WB et al. Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. *JAMA* 1988; 259(7): 1025-1029
20. Kawachi I Colditz GA, Stampfer MJ et al. Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. *JAMA* 1993; 269(2): 232-236
21. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ* 1989; 298: 789-794
22. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R et al. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 250-256
23. Ay H, Oliveira-Filho J, Buonanno FS, Ezzeddine M, Schaefer PW, Rondorf G et al. Diffusion-weighted imaging identifies a subset of lacunar infraction associated with embolic source. *Stroke* 1999; 30: 2644-2650.
24. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24:35-41.
25. Wozniak M, Kittner SJ, Tuhurin S, Cole JW, Stern B, Dobbins M, Grace ME, Nazarenco I, Dobrovolsky R, McDade E, Desnick R. Frequency of unrecognized Fabry Disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. *Stroke* 2010; 41: 78-81

26. Rolfs A, Bottcher T, Zschesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P, Walter U, Mix E, Lohr M, Harzer K, Strauss U, Pahnke J, Grossmann A, Benecke R. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet* 2005; 366: 1794-1796
27. Derdeyn CP. Moyamoya disease and Moyamoya syndrome. *N Engl J Med*, 2009; 361(1):97
28. Suzuki J, Kodama N: Moyamoya disease – a review. *Stroke*, 1983; 14(1):104–9
29. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischemic stroke. *Brain* 2000; 123: 1784-1812
30. Leys D, Bandu L, Henon H, Lucas C, Mounier-Vehier F, Rondepierre P, Godefroy O. Clinical outcome in 287 consecutive young adults (15-45 years) with ischemic stroke. *Neurology* 2002; 59: 26-33
31. Bousser MG, Ferro JM. Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol* 2007; 6: 162-170
32. Panagariya A, Maru A. Cerebral venous thrombosis in pregnancy and puerperium –a prospective study. *J Assoc Physicians India* 1997; 45: 857-859
33. Khealani BA, WasayM, Saadah M, Sultana E, Mustafa S, Khan FS, Kamal AK. Cerebral venous thrombosis: A descriptive multicenter study of patients in Pakistan and Middle East. *Stroke* 2008; 39: 2707-2711
34. Ferro JM, Canhao P, Stem J, Bousser MG, Barinagarrementeria F for ISCVT Investigators. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis. Results of the international study of cerebral vein and dural sinus thrombosis (ISCVT). *Stroke* 2004; 35: 664-670
35. Deschiens MA, Conard J, Horellou MH, Ameri A, Preter M, Chedru F, Samama MM, Bousser MG. Coagulation studies, factor V Leiden and anticardiolipin antibodies in 40 cases of cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1996; 27: 1724-1730
36. Kizer JR. Evaluation of the patient with unexplained stroke. *Coron Art Dis* 2008; 19: 535-540
37. Warlow CP, Dennis MS, van Gijn J, Hankey GJ, Sandercock PAG, Bamford JM. *Stroke: A practical guide to Management*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Productions; 1996
38. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST et al. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet* 2003; 35: 131-138
39. Kiely DK, Worf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH. Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke* 1993; 24: 1366-1371

40. Hassan A, Sham PC, Marcus HS. Planning genetic studies in human stroke: sample size estimates based on family history data. *Neurology* 2002; 58: 1483-1488
41. Potti A, Rabadi K, Wilardsen D. Thrombophilia in ischemic stroke. *West J Med* 1998; 169: 385-386
42. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk and interaction. *Semin Haematol* 1997; 34: 171-187
43. Ning MM, Furie KL. Preventing a second stroke in the young. *Top Stroke Rehabil* 2004; 11: 40-50
44. 6th ACCP Consensus Conference on antithrombotic therapy. *Chest* 2001; 119: 30-230
45. Guercini C, Acciarresi M, Agnelli G, Paciaroni M. Cryptogenic stroke: time to determine the aetiology. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 549-554
46. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet* 2000; 355: 1627-1632
47. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, et al for the atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation* 1999; 100: 736-742
48. Marcus HS, Hambley H. Neurology and the blood: haematological abnormalities in ischemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 150-159
49. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich J. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J M* 1995; 332: 912-917
50. Haberl RL, Biniash O, Ott M, Peinemann A, Wick M, Kempter B. Infrequency of stroke caused by specific coagulation disorders. *Cerebrovasc Dis* 1995; 5: 391-396
51. Press RD, Liu X, Beamer N, Coull BM. Ischemic stroke in the elderly: role of the common factor V mutation causing resistance to activated protein c. *Stroke* 1996; 27: 44-48
52. Martinez HR, Rangel Guerra RA, Marfil LJ. Ischemic stroke due to deficiency of coagulation inhibitors: report of 10 young adults. *Stroke* 1993; 24: 19-25
53. Munts AG, van Genderen PJ, Dippel DW, van Kooten F, Koudstaal PJ. Coagulation disorders in young adults with acute cerebral ischemia. *J Neurol* 1998; 245: 21-25
54. Markus HS, Zhang Y, Jeffery S. Screening for the factor V Arg 506 Gln mutation in patients with TIA and stroke. *Cerebrovasc Dis* 1996; 6: 360-362

55. Hankey GH, Eikelboom JW, van Bockxmeer FM, Lofthouse E, Staples N, Baker RI. Inherited thrombophilia in ischemic stroke and its pathogenic subtypes. *Stroke* 2001; 32: 1793-1799
56. Bushnell CD, Siddiqi Z, Goldstein LB. Improving patient selection for coagulopathy testing in the setting of acute ischemic stroke. *Neurology* 2001; 57: 1333-1335.
57. Boeckholdt SM, Kramer MHH. Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 588-596
58. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146: 948-957
59. Austin H, Chimowitz M, Hill H, Chaturvedi S, Wechsler L, Wityc R, Walz E, Wilterdink J, Coull B, Sila C, Mitsias P, Evatt B, Hooper WC for the Genetics and Stroke in the Young Study Group. *Stroke* 2002; 33: 2762-2769
60. Spence JD. Homocysteine-lowering therapy: a role in stroke prevention? *Lancet Neurol* 2007; 6: 830-838
61. Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveira S, Plomaritoglou A, Furie K. Homocysteine MTHFR 677C-T polymorphism and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology* 2002; 59: 529-536
62. Cucchiara BL. Evaluation and management of stroke. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009
63. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Archetti S, Spezi R, Vergani V, Assanelli D, Caimi L, Padovani A. Cumulative effect of predisposing Genotypes and their interaction with modifiable factors on the risk of ischemic stroke in young adults. *Stroke* 2005; 36: 533-539
64. Green D. Thrombophilia and stroke. *Top Stroke Rehabil* 2003; 10: 21-33
65. Marder VJ & Matei, DE. Hereditary and Acquired Thrombophilic Syndromes. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (eds.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 2001; 1243-1275.
66. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1993; 119: 819-827

67. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007; 98: 543-556
68. Gandrille S, Borgel D, Sala N et al. Protein S deficiency: a database of mutations-summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000; 84:918
69. Michiels JJ, Hamulyak K. Laboratory diagnosis of hereditary thrombophilia. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24: 309-320
70. Bick RL. Hereditary and acquired thrombophilic disorders. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; 12: 125-135
71. Haemostasis and thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114: 512-528
72. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical syndromes and management. *Blood* 1996; 87(9):3531-3544
73. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(3):1004-8
74. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82:1889
75. Koster T, Rosendaal RF, de Ronde H et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342:1503
76. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703
77. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial Protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74:2082
78. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P et al. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64:1297
79. Goodnight SH Jr, Hathaway WE. Disorders of Hemostasis and Thrombosis, a Clinical Guide. Second Edition, The McGraw-Hill Companies, Medical Editions, 2001

80. Eisele B, Lamy M. Clinical experience with antithrombin III concentrates in critically ill patients with sepsis and multiple organ failure. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24(1):71-80
81. Rao AK, Niewiarowski S, Guzzo J et al. Antithrombin III levels during heparin therapy. *Thromb Res* 1981; 24:181-186
82. Deitcher SR, Gomes MP. Hypercoagulable state testing and malignancy screening following venous thromboembolic events. *Vasc Med* 2003; 8: 33-46
83. Van Boven HH, Vandenbrouche JPBriet E et al. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* 1999; 94:2590-2594
84. Van der Meer FJM, Koster T, Vanderbroucke JP et al. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78(1):631-635
85. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J et al. Thrombosis in antithrombin III-deficient persons: report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116(9):754-761
86. Laroche P, Plassart V, Amiral J. Rapid quantitative latex immunoassays for diagnosis of thrombotic disorders. *Thromb Haemost* 1989; 62:379
87. Demers C, Henderson P, Blajchman MA et al. An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemost* 1993; 69:231-235
88. Meade TW, Dyer S, Howarth DJ et al. Antithrombin III and procoagulant activity: Sex differences and effects of the menopause. *Br H Haematol* 1990; 74(1):77-81
89. Andrew M, Paes B, Milner R et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70(1):165-172
90. Rosendaal FR, Heijboer H, Briët E et al. Mortality in hereditary Antithrombin III deficiency-1830 to 1989. *Lancet* 1991; 337: 260-262
91. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995; 73(1):87-93
92. Miletich J, Sherman L, Broze G Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317:991-996
93. van Der Meers FJ, Koster T, Vandenbrouche JP et al. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78(1):631-635.

94. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the subcommittee on plasma Coagulation Inhibitors of the scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876
95. Gandrille S, Vidaud M, Aiach M, Alhenc-Gelas M, Fischer AM, Gouault-Heilman M, Toulon P, Fiessinger JN, Goossens M.
Two novel mutations responsible for hereditary type I protein C deficiency: characterization by denaturing gradient gel electrophoresis.
Hum Mutat. 1992; 1(6):491-500
96. Andrew M, Vegh P, Johnston M et al. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80(8):1998-2005
97. Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk for thrombosis in protein C deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-1035
98. Bovill EG, Hasstedt SJ, Callas PW et al. The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred. *Thromb Haemost* 2000; 83: 366-370
99. Melissari E, Monte G, Lindo VS et al. Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagul fibrinolysis* 1992; 3(6):749-758
100. Yang FC, Hsu CH, Lin JC, Chen CY, Lee JT. Inherited protein C deficiency with acute ischemic stroke in a young adult: a case report. *Blood Coag Fibrinol* 2008; 19: 601-604
101. Kozac N, Schattner A. Warfarin-induced skin necrosis. *J Gen Intern Med.* 2014; 29(1):248-9
102. Parsi K, Younger I, Gallo J. Warfarin-induced skin necrosis associated with acquired protein C deficiency. *Australas J Dermatol.* 2003; 44(1):57-61.
103. Bilen O, Teruya J. Complications of anticoagulation. *Dis Mon.* 2012; 58(8):440-7
104. Schofield KP, Thompson JM, Poller R. Protein C response to induction and withdrawal of oral anticoagulant treatment. *Clin Lab Hematol* 1987; 9(3):255-262
105. Griffin JR, Heeb MG, Schwartz SP. Plasma protein S deficiency and thromboembolic disease. *Prog Hematol* 1987; 15: 39-49
106. Dahlback B. Protein S and C4b binding protein: components involved in the regulation of the Protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1991; 66: 49-61

107. Borgel D, Grandrille S, and Aiach M, "Protein S Deficiency," *Thromb Haemost*, 1997, 78(1):351-6.
108. Rodeghiero F, Tosetto A. The Epidemiology of Inherited Thrombophilia: The VITA Project. *Thromb Haemost*, 1997, 78(1):636-40.
109. Heijboer H, Brandjes DPM, Buller HR, et al, "Deficiencies of Coagulation-Inhibiting and Fibrinolytic Proteins in Outpatients with Deep-Vein Thrombosis," *N Engl J Med*, 1990, 323:1512-6.
110. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulijencov V, Chandy M, Dahlback B. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-662
111. Simioni P, Sanson BJ, Prandoni P, et al, "Incidence of Venous Thromboembolism in Families with Inherited Thrombophilia," *Thromb Haemost*, 1999, 81(2):198-202.
112. Finazzi G, Barbui T. "Different Incidence of Venous Thrombosis in Patients With Inherited Deficiencies of Antithrombin III, Protein C and Protein S," *Thromb Haemost*, 1994, 71:15-8
113. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15:45-52, 1966.
114. Laurell CB. Electroimmunoassay. *Scand J Clin Lab Invest [suppl]* 29:21, 1977(suppl 124)
115. Leroy-Matheron C, Duchemin J, Levent M, et al, "Influence of the nt 2148 A to G Substitution (Pro 626 Dimorphism) in the PROS1 Gene on Circulation Free Protein S Levels in Healthy Volunteers - Reappraisal of Protein S Normal Ranges," *Thromb Haemost*, 2000, 83(5):798-9.
116. Edson JR, Vogt JM, and Huesman DA, "Laboratory Diagnosis of Inherited Protein S Deficiency," *Am J Clin Pathol*, 1990, 94(2):176-86.
117. Malm J, Laurell m, Dahlback B. Changes in the plasma levels of vitamin-K dependent proteins C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br J Hematol* 1988; 68:437
118. Henkens CM, Bom VJ, van der Schaaf W, et al, "Plasma Levels of Protein S, Protein C and Factor X: Effects of Sex, Hormonal State and Age," *Thromb Haemost*, 1995, 74(5):1271-5.
119. Lucotte G, Mercier G: Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:362-367

120. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica*. 2002; 87:1095–1108.
121. Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Hematol* 1996; 95: 579-586)
122. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening. *JAMA*. 1997; 277:1305–1307
123. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306--> Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*. 1998; 91(4):1140-4.
124. Norström E, Thorelli E, Dahlbäck B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood*. 2002; 100(2):524-30.
125. Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Yoong A, Keeny S, Hay CR. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Br J Hematol* 1995; 90: 725-727
126. Henkens CM, Bom VJ, Seinen AJ, van der Meer J. Sensitivity to activated protein C; Influence of oral contraceptives and sex. *Thromb & Hemost* 1995; 73: 402-404
127. Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, Corrocher R. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Br J Hematol*. 1995; 91: 465-470
128. Nicolaidis AN, Breddin HK, Carpenter P et al. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol* 2005; 24: 1-26.
129. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Factor V leiden and the risk of venous thromboembolism in the adult Danish population. *Ann Intern Med* 2004; 140: 330-337
130. Catto A, Carter A, Ireland H et al. Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation in relation to the development of acute stroke. *Atheroscl Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 783-785
131. Lalouschek W, Aull S, Series W, Zeiler K, The prothrombin G20210A mutation and the factor V Leiden mutation in patients with cerebrovascular disease. *Blood* 1998; 92: 704-705.

132. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94: 3678-3682
133. Margaglione M, D'Andrea G, Giuliani N et al. Inherited prothrombotic conditions and premature ischemic stroke. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1751-1756
134. Akar N, Yilmaz E, Akar E, Deda G, Sipahi T. Factor V (His 1299 Arg) in young Turkish patients with cerebral infarct. *Haemostasis.* 2000; 30(3):118-22.
135. Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691A mutation. *Lancet* 1994; 344: 694-695.
136. Dalen JE. Should patients with venous thromboembolism be screened for thrombophilia? *Am J Med* 2008; 121(6):458-463
137. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19:217-46).
138. Mc Cully KS Vascular pathology of homocysteinemia; implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1969; 56: 111-28)
139. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Gouette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, Den Heijer M, Kluijtmans CA, Van Der Heuvel LP et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10(1):111-3).
140. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet.* 2003; 40(8):619-25
141. Franco RF Araújo AG, Guerreiro JF et al. Analysis of the 677 C-T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 119-121
142. Matsuo K, Hamajima N, Suzuki R, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Yasue T, Mueller NE, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K. Reductase gene

(MTHFR) polymorphisms and reduced risk of malignant lymphoma. *Am J Haematol.* 2004; 77: 351-357

143. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, et al. Maternal vitamin use: genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase and risk for spinal bifida. *Am J Epidemiol.* 1998; 148: 30-7.

144. Motulsky AG. Nutritional ecogenics: homocysteine -related atherosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58:17-20)

145. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98:2174-83

146. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-1057

147. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe MTHFR deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1052-9

148. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, et al. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase gene and description of 5 novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 1268-75

149. van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1046-51

150. Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, et al. Loss of heterozygosity at the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75; 1105-10

151. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase associated with decreased enzyme activity. *Mol Gen Metab.* 1998; 64:169-72

152. Kang S, Wong PW, Susmano A, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 536-45

153. Durand P, Prost M, Loreau N, et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81: 645-72

154. Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, et al. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999; 99: 1156-60
155. Visioli F, Smith A, Zhang W, et al. Lipoic acid and vitamin C potentiate nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells independently of cellular glutathione status *Redox Rep.* 2002; 7: 223-7
156. Welch G et al. Homocysteine, oxidative stress and vascular disease *Hosp Pract* 1997; 32: 81-92
157. Lijfering WM, Veeger NJ, Brouwer JL, et al. The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels. *Hematologica* 2007; 92:1703-6
158. Carmel R, Jacobsen DW. *Homocysteine in health & disease*. New York, NY: Cambridge University Press; 2001
159. Florell SR, Rodgers GM. Inherited thrombotic disorders: an update. *Am J Hematol.* 1997; 54(1):53-60.
160. Soria JM, Almasy L, Souto JC et al. Lincage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; 95(9):2780-2785
161. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thomb Haemost* 2006; 4: 2587-2592
162. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovich DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Hemost* 1998; 79: 706-708
163. Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH, Hay CR. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. *Br J Haematol* 1997; 98: 353-355
164. Meyer M, Kutscher G, Vogel G. The prothrombin nt20210 A allele as a risk factor for venous thromboembolism: detection of heterozygous and homozygous carriers by alternative methods. *Thromb Res* 2000; 97(5): 359-363

165. Martinelli I, Taiori E, Bucciarelli P et al. Interaction between the G20210 mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep venous thrombosis. *Arterioscler Thromb vasc Biol.* 1999; 19(3):700-703
166. Martinelli I, Sacchi E, Landi G et al. High risk of cerebral vein thrombosis in carriers of a prothrombin gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998; 338(25):1793-1797
167. Franco RF, Trip MD, ten Gate H et al. The 20210A/G mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Hematol* 1999; 104(1):50-54
168. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99(8):999-1004
169. Gottl-Nowak U, Strater R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, von Eckardstein A. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94: 3678-3682
170. Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulase factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24-p25. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 48: 25-27
171. Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the A subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85 (16): 5829-5833
172. Webb GC, Coggan M, Ichinose A, Board PG. Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet* 1989; 81: 157-160
173. Robbins KC. A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Am J Physiol* 1944; 142: 581-588
174. Laki K, Lorand L. On the solubility of fibrin clots. *Science* 1948; 108: 280
175. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 2000; 94: 271-305
176. Mikkola H, Palotie A. Gene defects in congenital factor XIII deficiency. *Sem Thromb Haemost* 1996; 22:393

177. Mikkola H, Muszbek L, Laiho E, et al. Molecular mechanism of a mild phenotype in coagulation factor XIII (FXIII) deficiency: a splicing mutation permitting partial correct splicing of FXIII-A subunit mRNA. *Blood* 1997; 89: 1279
178. Ivaskevicius V, Biswas A, Bevans C, Schroeder V, Kohler HP, Rott H, Halimeh S, Petrides PE, Lenk H, Krause M, Mitterski B, Harbrecht U, Oldenburg J. Identification of eight novel coagulation factor XIII subunit A mutations: implied consequences for structure and function. *Haematologica* 2010; 95: 956-962
179. Sourì M, Biswas A, Misawa M, Omura H, Ichinose A. Severe congenital factor XIII deficiency caused by novel W187X and G273V mutations in the F13A gene; diagnosis and classification according to the ISTH/SSC guidelines. *Haemophilia*. 2013 Nov 29. doi: 10.1111/hae.12298[Epub ahead of print]
180. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia* 2008; 14: 1190-1200
181. Killick CJ, Barton CJ, Aslam S, et al. Prenatal diagnosis in factor XIII-A deficiency. *Arch Dis Child Fetal Neonol Ed* 1999; 80: F238
182. Seitz R, Duckert F, Lopaciuk S, et al. ETRO working party on factor XIII questionnaire on congenital factor XIII deficiency in Europe: status and perspectives. *Sem Thromb Haemost* 1996; 22: 415
183. Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, Belik E, Shurygina E, Barbarash O. Plasminogen activator inhibitor-1, free fatty acids, and insulin resistance in patients with myocardial infarction. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013; 6:293-301
184. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 1996; 84(6):431-43
185. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, Patrassi GM, Girolami A. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2003; 9(4):299-307
186. Kruithof EKO, Gudinchet A, Bachmann F. Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. *Thromb Haemost* 1988; 59(1): 7-12
187. Takahashi Y, Tanaka T, Minowa H et al. Hereditary partial deficiency of plasminogen activator inhibitor -1 associated with a lifelong bleeding tendency. *Int J haematol* 1996; 64(1):61-68
188. Icematsu S, Fukutake K, Aoki N. Heterozygote for plasmin inhibitor deficiency developing hemorrhagic tendency with advancing age. *Thromb Res* 1996; 82(2): 129-6

189. Dieval J, Nguyen G, Gross S, et al. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood* 1991; 77(3):528-532
190. Festa A, D'Agostino R Jr, Rich SS, Jenny NS, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype and plasminogen activator inhibitor-1 levels in blacks, Hispanics, and non-Hispanic whites: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2003; 107(19):2422-7
191. Dawson, S.J., William, B., Hamsten, A., Green, F., Humphires, S., Henney, A.M., The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differentially to interleukin-1 in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (15), 739-745
192. Erikson, P., Kallin, B., Van'T Hooft, F.M., Bovenholm, P., Hamsten, A., Allele-specific increase in basal transcription of plasminogen activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92: 1851–1855
193. Stegnar, M, Uhrin P, Peternel P, et al., The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor –1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thrombo embolism. *Thromb. Haemost.* 1998; 79(5): 975–979
194. Jeon YJ, Kim YR, Lee BE, Choi YS, Kim JH, Shin JE, Rah H, Cha SH, Lee WS, Kim NK. Genetic association of five plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss in Korean women. *Thromb Haemost.* 2013; 110(4):742-50
195. Verschuur M, Jellema A, Bladbjerg EM et al. The plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) promoter haplotype is related to PAI-1 plasma concentrations in lean individuals. *Atherosclerosis* 2005; 181:275-284
196. Morange PE, Henry M, Tregouët D, Granel B, Aillaud MF, Alessi MC, Juhan-Vague I. The A -844G polymorphism in the PAI-1 gene is associated with a higher risk of venous thrombosis in factor V Leiden carriers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5):1387-91.
197. Miranda-Vilela AL. Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β -synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. *Mini Rev Med Chem.* 2012 Sep 1; 12(10):997-1006

198. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1953; 18:123-31
199. Bessman MJ, Kornberg A, Lehman IR et al. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. Biochim Biophys Acta. 1956 Jul; 21(1):197-8
200. Martin RG, Matthaei JH, Jones OW et al. Ribonucleotide composition of the genetic code. Biochem Biophys Res Commun. 1962; 6:410-4
201. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 1987; 155: 335-350
202. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487
203. Edwards AW. [G. H. Hardy \(1908\) and Hardy-Weinberg Equilibrium](#). Genetics. 2008; 179(3):1143-1150
204. Wolf M, Boyer-Neumann C, Leroy-Matheron C, Martinoli JL, Contant G, Amiral J, Meyer D, Larrieu MJ. Functional assay of protein S in 70 patients with congenital and acquired disorders. Blood Coag Fibrinol 1991; 2: 705-712
205. Beeck H, Hellstern P, Hubbuch A. Effects of sex and oral contraceptives on the reference ranges of protein S and protein C. Haemostasis 2000; 30 suppl 1: 127
206. Frantzen Handeland G, Abildgaard U, Aasen AO. Simplified assay for antithrombin III activity using chromogenic peptide substrate. Scand J haematol 1983; 31: 427-436
207. Wagner C, Dati F. Prothrombin time (PT) test. In Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt, TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998: 599-601
208. CLSI Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved guideline-Fifth edition. CLSI document H21-A5 (ISBN 1-56238-657-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19087-1898, 2008
209. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). Blood. 1995; 85:1504–1508.
210. Barnes C, Deveber G. Prothrombotic abnormalities in childhood ischaemic stroke. Thromb Res. 2006; 118:67–74.
211. De Paula Sabino A, Ribeiro DD et al. Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young Brazilian patients. Blood Coag Fibrinolysis 2006; 17:271-5

212. de Stefano V, Chiusolo P, Pacaroni K, et al. Prothrombin G20120A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998; 91: 3562-5
213. Madonna P, de Stefano V, Coppola A, et al. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33:51-56
214. Martinelli I, Battaglioli T et al. Oral contraceptive use, thrombophilia and their interaction in young women with ischemic stroke. *Hematologica* 2006; 91:844-7
215. Casas JP, Hingorami AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* 2004; 61:1652–1662
216. Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, Kittner SJ .Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke*. 2010; 41(8):1599-603.
217. D’Amico D, Moschiano F et al. genetic abnormalities of the Protein C system: Shared risk factors in young adults with migraine with aura and with ischemic stroke? *Cephalalgia* 1998; 18:618-621
218. Longstreth WT Jr, Rosendaal FR et al. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: FVLeiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke* 1998; 29:577-580
219. Nabavi DG, Junker R, Wolff E et al. Prevalence of Factor V Leiden mutation in young adults with cerebral ischaemia: A case control study on 225 patients. *J Neurol* 1998; 245:653-8
220. Pongracz E, Andrikovics H, Csornai M et al. Contribution of the -455G/A polymorphism at beta-fibrinogen gene and of the factor V Leiden mutation to hemorheological parameters in ischemic stroke patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35:75-82
221. Rubattu S, Speranza R, Ferrari M et al. A role of TNF-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: A case control study. *Eur J Neurol* 2005; 12:989-993
222. Slioter AJ, Rosendaal FR, Tanis BC, et al. Prothrombotic conditions, oral contraceptives and the risk of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1213-7
223. Voetsch B, Damanesco BP, Camargo EC, et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. *Thromb Haemost* 2000; 83:229-233

224. Soare AM, Popa C. Deficiencies of proteins C, S and Antithrombin and Factor V Leiden and the risks of ischemic strokes. *J of Med and Life* 2010; 3(3):235-8
225. Shi C, Kang X, Wang Y, Zhou Y. The coagulation factor V Leiden, MTHFR C677T variant and eNOS 4a polymorphism in young Chinese population with ischemic stroke. *Clin Chim Acta*. 2008; 396(1-2):7-9.
226. Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Tentschert S, Lang W, Cheng S, Mannhalter C. Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. *Stroke*. 2005; 36(7):1405-9
227. Szolnoki Z, Somogyvari F et al. Evaluation of the roles of the FV Leiden mutation and ACE I/D polymorphism in subtypes of ischemic stroke. *J Neurol* 2001; 248(9):756-761
228. Hamedani AG, Cole JW et al. Factor V Leiden and ischemic stroke risk: The genetics of Early Onset Stroke (GEOS) study. *J Stroke and Cerebrovasc Dis* 2013; 22(4):419-423
229. Pezzini A, Grassi M, Zotto ED et al. Do common prothrombotic mutations influence the risk of cerebral ischemia in patients with patent foramen ovale? Systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 2009; 101:813-7
230. Gialeraki A, Politou M, Rallidis L, Merkouri E, Markatos C, Kremastinos D, Travlou A. Prevalence of prothrombotic polymorphisms in Greece. *Genet Test*. 2008 Dec; 12(4):541-7
231. Hoppe B, Tolou F, Dornert T, Kiesewetter H, Salama A. Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population. *Thromb Haemost* 2006; 96: 465-470,
232. Honzak R: Faktor V Leiden and Slovak population. *Prakt Lek* 1999; 12: 845-850,
233. Ferreira-Fernandes H, Costa PN, Fernandes HF, Araújo-Neto AP, Motta FJ, Canalle R, Yoshioka FK, Guerreiro JF, Burbano RR, Rey JA, Pinto GR. Prevalence of variants that confer risk for venous thromboembolism in an elderly population of northeastern Brazil. *Genet Mol Res*. 2013; 12(3):3698-707.
234. Morris JG, Singh S, Fischer M. Testing for inherited thrombophilias in arterial stroke: Can it cause more harm than good? *Stroke* 2010; 41: 2985-2990

235. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Mickielewicz A, Czlonkowska A, Mendel T, Kuczynska-Zardzewialy A, Szelagowska D, Windyga J, Schröder W, Herrmann FH, Jedrzejowska H. Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001 Oct; 7(4):346-50.
236. Aznar J, Mira Y, Vayá A, Corella D, Ferrando F, Villa P, Estellés A. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in young adults with cryptogenic ischemic stroke. *Thromb Haemost*. 2004; 91(5):1031-4
237. Bertina RM. The prothrombin 20210 G to A variation and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 1998; 5(5):339-42
238. Fatini C, Conti L, Turillazzi V, Sticchi E, Romagnuolo I, Milanini MN, et al. Unexplained infertility: Association with inherited thrombophilia. *Thromb Res* 2012; 129:e185-8.
239. Kvasnička T, Hájková J, Bobčíková P, Cverhová V, Malíková I, Ulrych J, Bříza J, Dušková D, Poletínová S, Kieferová V, Kvasnička J. The frequencies of 6 important thrombophilic mutations in a population (n 1527) of the Czech Republic. *Physiol Res*. 2014; Jan 8 [Epub ahead of print]
240. Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-82.
241. Graham IM, Daly LE, Refsum HM et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775-81
242. Kottke-Marchant K et al. High plasma homocysteine: a risk factor for arterial and venous thrombosis in patients with normal coagulation profiles. *Clin Appl Thromb Hemost* 1997; 3: 239-44
243. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc*. 1995; 274:1049-57
244. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 315-323
245. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, et al. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 324-332.
246. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic

- polymorphisms and B vitamins. The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1998; 98: 204-210.
247. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995; 346:1395-1398
248. Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2002; 288: 2015-22.
249. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677CT polymorphism and coronary artery disease: does totality of evidence support a casual role of homocysteine and preventive potential of folate? *Br Med J* 2005; 331:1053
250. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998; 98:2520-2526
251. Reuner KH, Rug A, Kaps M, Druschky KF, Patscheke H. The mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene and stroke. *Thromb Haemost* 1998; 79: 450-451
252. Bonna KH, Njølstad I, Ueland PM et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infraction. *N Engl J M* 2006; 354: 1578-88
253. Ray JG, Kearon C, Yi Q et al. Homocysteine lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 761-767
254. Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet*. 2011 Aug 13; 378(9791):584-94
255. Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, deGarmo P elevated plasma homocysteine concentrations a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21:572-576
256. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Gahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia; an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-1155

257. Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ. A prospective study of plasma homocysteine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:1924-1930
258. Chatterjee T, Gupta N, Choudhry VP, Behari M, Saxena R, Ashraf MZ. Prediction of ischemic stroke in young Indians: is thrombophilia profiling a way out? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013; 24(4):449-53
259. Giusti B, Saracini C, Bolli P, Magi A, Martinelli I, Peyvandi F, Rasura M, Volpe M, Lotta LA, Rubattu S, Mannucci PM, Abbate R. Early-onset ischaemic stroke: analysis of 58 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism. *Thromb Haemost*. 2010; 104(2):231-42
260. Calabrò RS, La Spina P, Serra S, Laganà A, Postorino P, Savica R, Mammi C, Laganà C, Musolino R. Prevalence of prothrombotic polymorphisms in a selected cohort of cryptogenic and noncryptogenic ischemic stroke patients. *Neurol India*. 2009; 57(5):636-7
261. Isordia-Salas I, Barinagarrementería-Aldatz F, Leñanos-Miranda A, Borrayo-Sánchez G, Vela-Ojeda J, García-Chávez J, Ibarra-González I, Majluf-Cruz A. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with idiopathic ischemic stroke in the young Mexican-Mestizo population. *Cerebrovasc Dis*. 2010; 29(5):454-9
262. Mikkola H, Syrjala M et al. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994; 84:517-25
263. Kobbervig C, Williams E. FXIII polymorphisms fibrin clot structure and thrombotic risk. *Biophys Chem* 2004; 112:223-228
264. McCormack LJ, Kain K, Catto AJ, Kohler HP, Stickland MH, Grant PJ. Prevalence of FXIII V34L in populations with different cardiovascular risk. *Thromb Haemost* 1998; 80: 523-524
265. Attie-Castro FA, Zago MA, Lavinha J et al. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost* 2000; 84: 601-603
266. Corral J, González-Conejero R, Iniesta JA, Rivera J, Martínez C, Vicente V. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica*. 2000; 85(3):293-7
267. Muszbek I. Deficiency causing mutations and common polymorphisms in the factor XIII A gene. *Semin Thromb Haemost* 2000; 84:524-7

268. Kohler HP, Stickland LH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infraction. *Thromb Haemost* 1998; 79: 8-13
269. Hancer VS, Diz-Kucukkaya R, Bilge AK et al. The association between factor XIII Val 34Leu polymorphism and early myocardial infraction. *Circ J* 2006; 70: 239-242
270. Voko Z, Bereczky Z, et al. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 2007; 97:458-463
271. Catto AJ, Kohler HP, Coore J et al. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999; 93:906-909
272. Franco RF, Reitsma PH, Lourenço D et al. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 676-679
273. Smith NL, Bis JC, Biagiotti S, et al. Variation in 24 hemostatic genes and association with non-fatal myocardial infraction and ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2008; 6:45-53
274. Pongracz E, Shemirami AH et al. Factor XIII a subunit (FXIII-A) LAL34LEU polymorphism in patients surviving or not surviving ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2010; 29(suppl 2):169
275. Endler G, Funk M, Haering D, et al. Is the factor XIII34Val/Leu polymorphism a protective factor for cerebrovascular disease? *Br J Haemetol* 2003; 120:310-4
276. Slowik A, Dziedzic T, Pera J, et al. Coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism in patients with small vessel disease or primary intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2005; 19:165-70
277. Moscau S, Smolka K, Semmler A, et al. Common genetic coagulation variants are not associated with ischemic stroke in a case control study. *Neurol Res* 2010; 32:519-22
278. Wells P, Anderson J, Scarvelis D, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val 34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 101-109
279. Alecsic N, Ahn C, Wang YW et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 348-352

280. Berezcky Z, Katona E, Muszbek L. Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2004; 33: 430-437
281. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infraction. *Blood* 2000; 95: 586-591
282. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val 34Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998; 29: 813-816
283. Rubattu S, Di Angelantonio E, Nitsch D, Gigante B, Zanda B, Stanzione R, Evangelista A, Pirisi A, Rosati G, Volpe M. Polymorphism in prothrombotic genes and their impact on ischemic stroke in a Sardinian population. *Thromb Haemost.* 2005; 93:1095–1100.
284. Li B, Zhang L, Yin Y, Pi Y, Yang Q, Gao C, Fang C. Lack of evidence for association between factor XIII-A Val34Leu polymorphism and ischemic stroke: A meta-analysis of 8800 subjects. *Thromb Res* 2012; 130(4):654-66
285. Bagoly Z, Koncz Z, Hársfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 2012; 129(3):382-7
286. Komitopoulou A, Platokouki H, Kapsimali Z, Pergantou H, Adamtziki E, S. Mutations and polymorphisms in genes affecting hemostasis proteins and homocysteine metabolism in children with arterial ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22:13–20.
287. Shemirami AH, Pongracz E et al. Factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism in patients suffering atherothrombotic ischemic stroke. *Thromb Res* 2010; 126:159-62
288. Binghu Li, Zhang L et al. Lack of evidence for association between factor XIII A Val34Leu polymorphism and ischemic stroke: A meta-analysis of 8800 subjects. *Thromb Res* 2012; 130(4):654-660
289. Vossen CY, Rosendaal FR. The protective effect of the factor XIII Val 34Leu mutation on the risk of deep venous thrombosis is dependent on the fibrinogen level. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1102-1103
290. Gonzalez-Conejero R, Fernandez-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabin J, Vincente V, Corral J, Montaner J. Role of fibrinogen levels and factor XIII polymorphism in thrombolytic therapy in stroke patients. *Stroke* 2006; 37: 2288-2293

291. Kohler HP, Grant PJ. Mechanisms of disease: plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342:1792-1801
292. van Meijer M, Panekoek H. Structure of plasminogen activator inhibitor type 1 and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 1995; 9:263-276
293. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes. *Thromb Haemost* 1995; 74:1032-1034
294. Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AHM et al. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104:3063-3068
295. Ye Z, Liu EHC, Higgins JPT et al. Seven hemostatic gene polymorphisms in coronary disease: metaanalysis of 66155 cases and 91307 controls. *Lancet* 2006; 367:651-658
296. Song J, Yoon YM, Jung HJ, Hong SH, Park H, Kim JQ. . Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and coagulation factor VII Arg 353-Gln polymorphism in Korean patients with coronary artery disease. *J Korean Med Sci* 2000; 15:146-152
297. Roest M, Banga JD. Editorial comment: Genetic make-up for increased PAI-1 expression protects against stroke. *Stroke* 2003; 34:2828-2829
298. Wiklund PG, Nilsson L, Ardnor Sn. Plasminogen activator inhibitor -1 4G/5G polymorphism and risk of stroke: replicated findings in two nested case-control studies based on independent cohorts. *Stroke* 2005; 36:1661-1665
299. Crainich P, Jenny NS, Tang Z et al. Lack of association of the Plasminogen activator inhibitor -1 4G/5G promoter polymorphism with cardiovascular disease in the elderly. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1799-1804
300. Attia J, Thakkinstian A, Wang Y, Lincz L, Parsons M, Sturm J, McGettigan P, Scott R, Meldrum C, Levi C. The PAI-1 4G/5G polymorphism in ischemic stroke: an association study and metaanalysis. *J Stroke and Cerebrovasc Dis* 2007; 16(4):173-179
301. Bang CO, Park HC, Ahn MY et al. 4G/5G polymorphism of Plasminogen activator inhibitor -1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11:294-299

302. Jood K, Ladenvall P, Tjarnlund-Wolf A et al. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36:2077-2081
303. Hindorff LA, Schwartz SM, Siscovick DS et al. The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9:131-137
304. van Goor ML, Garcia EG, Leebeek F et al. The Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke: A case control study. *Thromb Haemost* 2005; 93:92-96
305. Catto AJ, Carter AM, Stickland M et al. Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 1997; 77; 730-734
306. Chen CH, Eng HL, Chang CJ et al. 4G/5G promoter polymorphism of Plasminogen activator inhibitor -1, lipid profiles and ischemic stroke. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 100-105
307. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C et al. 4G/5G genotype of PAI-1 is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke* 2003; 34: 2822-2828
308. Petrovic D, Milananez T, Kobal J et al. Prothrombotic gene polymorphisms and atherothrombotic cerebral infarction. *Acta Neurol Scan* 2003; 108:109-113
309. Kain K, Young J, Bamford J et al. Determinants of Plasminogen activator inhibitor -1 in South Asians with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2002; 14:77-83
310. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000; 101:67-70
311. Endler G, Lalouschek W, Exner M et al. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promoter region of the Plasminogen activator inhibitor -1(PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol* 2000; 110:469-471
312. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18:497-504
313. Vergouen MDI, Frijns CJM, Roos YB et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G allele in the 4G/5G promoter polymorphism increase the occurrence of cerebral ischemia after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004; 35:1280-1283

314. Sirgo G, Perez-Vela JL, Morales P et al. Association between 4G/5G polymorphism of the Plasminogen activator inhibitor-1 gene with stroke or encephalopathy after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2006; 32:668-675
315. Babu MS, Prabha PS, Kaul S et al. Association of genetic variants of fibrinolytic system with stroke and stroke subtypes. *Gene* 2012; 495:76-80
316. Adamski MG, Turaj W, Slowik A, Wloch-Kopec D, Wolkow P, Szczudlik A. A-G-4G haplotype of PAI-1 gene polymorphisms -844 G/A, Hind III G/C and -6754G/5G is associated with increased risk of ischemic stroke caused by small vessel disease, *Acta Neurol Scand* 2009; 120:94-100
317. Griffin JH, Heeb MJ, Kojima Y, Fernandez JA, Kojima K, Hackeng TM, Greengard JS. Activated protein C resistance: molecular mechanisms. *Thromb Haemost.* 1995; 74:444–448.
318. Bushnell CD, Goldstein LB. Diagnostic testing for coagulopathies in patients with ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:3067-3078
319. Hart RG, Kanter MC. Hematologic disorders and ischemic stroke: a selective review. *Stroke* 1990; 21:1111-1121
320. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N: Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007; 98: 543–556
321. Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114:512–528.
322. Caspers M, Pavlova A, Driesen J, Harbrecht U, Klamroth R, Kadar J, Fischer R, Kemkes-Matthes B, Oldenburg J:Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb Haemost* 2012; 108:247–57.
323. Moster M. Coagulopathies and arterial stroke. *Journ of Neuroophthalmol.*2003; 23(1):63-71