

ΑΙΜΟΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ - ΘΡΟΜΒΩΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΥΛΗΣ
ΡΑΝΙΑ ΣΟΥΛΤΟΥΚΗ, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ

Θρομβοφιλία

Ο όρος θρομβοφιλία χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια προδιάθεση για θρόμβωση των αρτηριών ή των φλεβών. Τόσο η φλεβική όσο και η αρτηριακή θρόμβωση αποτελούν πολύπλοκες νοσολογικές οντότητες, όπου διαφορετικοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου (π.χ αρτηριακή υπέρταση, ελαττωμένη ροή, φλεγμονή, αθηρωμάτωση). Παρόλα αυτά, επειδή η παθογένεση της αρτηριακής διαφέρει από αυτή της φλεβικής θρόμβωσης είθισται να τις θεωρούμε δυο ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες.

Σήμερα, στις δυτικές χώρες, η θρομβοφιλία χρησιμοποιείται κυρίως στο πλαίσιο της φλεβικής θρόμβωσης για να περιγράψει ασθενείς με:

- α) νεαρή ηλικία εμφάνισης 1^{ου} θρομβωτικού επεισοδίου
- β) υποτροπιάζοντα θρομβωτικά επεισόδια
- γ) θετικό οικογενειακό ιστορικό
- δ) ασυνήθιστη εντόπιση ή
- ε) αυτόματο επεισόδιο, στο οποίο δεν είναι δυνατό να αναγνωριστεί κάποιος εκλυτικός παράγοντας (Bertina et al, 2001, Lane et al 1996)

Τα τελευταία 35 χρόνια έχουν αναγνωριστεί πολλοί γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες για φλεβική θρόμβωση, με τη βοήθεια οικογενειακών μελετών (έλλειψη AT, PC, PS αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης PC με ή χωρίς τη μετάλλαξη V Leiden ή με πληθυσμιακές μελέτες ασθενών-μαρτύρων (μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης II G20210A).

Η φλεβική θρόμβωση είναι μια επεισοδιακή νόσος. Ένα κλινικό συμβάν θα εκδηλωθεί τότε μόνο, όταν το θρομβωτικό δυναμικό του οργανισμού, που είναι συνάρτηση της ηλικίας, γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι υψηλό.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΦΛΕΒΙΚΗ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

<u>ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</u>	<u>RELATIVE RISK</u>
Έλλειψη AT	Πιο σοβαρός
Έλλειψη PC	Μέσος
Έλλειψη PS	Μέσος
Dysfibrinogenemia	
Αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης PC (με ή χωρίς μετάλλαξη V Leiden)	Λιγότερο σοβαρός
Μετάλλαξη προθρομβίνης G20210A	
Υπερομοκυστεϊναιμία (που οφείλεται σε γενετική έλλειψη CBS, MS και MTHFR)	
<u>ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</u>	
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα	
Υπερομοκυστεϊναιμία (που οφείλεται σε έλλειψη βιταμίνης ή άλλες μη γενετικές αιτίες)	

Αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης PC που δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις	
Έμφραγμα του μυοκαρδίου	
Καρδιακή ανεπάρκεια	
Σακχαρώδης διαβήτης	
<u>ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</u>	
Παρατεταμένη ακινησία	
Χειρουργικές επεμβάσεις	
Τραυματισμοί	
Χρήση αντισυλληπτικών από το στόμα ή σκευασμάτων ορμονικής υποκατάστασης	
Κύηση, λοχεία	
Κακοήθεις παθήσεις	
Κιρσοί κάτω άκρων	
Παχυσαρκία	
<u>ΆΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΣΧΕΣΗ</u>	
Παράγοντας XI > 1200U/L	2,2
IX > 1280U/L	2,5
Ινωδογόνο >5g/L	4
TAFI (Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) >1220 U/L	2

(Tripodi, Clinical Chemistry 2001)

Εδώ, θα έπρεπε να τονιστεί ότι σήμερα η θρομβοφιλία θεωρείται μια πολύπλοκη οντότητα με:

- α) ατελή διεισδυτικότητα, δηλαδή κάποια άτομα με γενετική προδιάθεση μπορεί να μην εκδηλώσουν ποτέ τη νόσο
- β) φαινο-αντιγραφή, δηλαδή άτομα χωρίς γενετική προδιάθεση μπορεί να εκδηλώσουν τη νόσο
- γ) γενετική ετερογένεια, αφού μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα υπεύθυνα γονίδια έχουν σαν αποτέλεσμα παρόμοιους κλινικούς φαινότυπους
- δ) πολυγονιδιακή κληρονομικότητα, δηλαδή κάποιοι κλινικοί ή λειτουργικοί φαινότυποι απαιτούν την ταυτόχρονη παρουσία μεταλλάξεων σε πολλαπλά γονίδια.

Φυσιολογική κύηση και αιμοστατικές μεταβολές

Η φυσιολογική κύηση συνοδεύεται από αλλαγές στην αιμοστατική λειτουργία. Παρατηρείται:

α) αύξηση της συγκέντρωσης των προπηκτικών παραγόντων VIII, V και ινωδογόνου

β) παράλληλη ελάττωση φυσικών αντιπηκτικών (πρωτεΐνη S - PS)

γ) αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C – PC (activated protein C resistance – aPC-r)

δ) ελαττωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα, λόγω αύξησης της συγκέντρωσης των αναστολέων των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen activator inhibitors, PAI 1/2).

Όλες αυτές οι φυσιολογικές προσαρμογές του οργανισμού σχετίζονται με την ανάπτυξη επαρκούς πλακούντιας κυκλοφορίας, ενώ παρέχουν κι ένα προστατευτικό μηχανισμό αιμόστασης κατά τη διάρκεια του τοκετού.

Παράλληλα, όμως, δημιουργούν και μια υπερπηκτική κατάσταση κατά την κύηση και την επακόλουθη περίοδο της λοχείας και κατά συνέπεια έναν αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο. Είναι επόμενο ότι ο κίνδυνος αυτός είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες με θρομβοφιλική διάθεση (Alonso et al, 2002).

Επιπλέον γυναίκες με θρομβοφιλική διάθεση μπορούν ευκολότερα να έχουν διαταραχή της πλακούντιας κυκλοφορίας με επακόλουθη αυτόματη αποβολή (Kupferminc et al, 2003).

ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΗ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ (Press et al, 2002)

Θρομβοφιλική βλάβη	Τυχαίο VTE	Υποτροπιάζον VTE	Φυσιολογικός πληθυσμός	Σχετικός κίνδυνος	Γενετικές βλάβες
Ανεπάρκεια AT	1 - 2%	2 - 5%	0,02 - 0,04	5 φορές	Ετερογενείς
Ανεπάρκεια PC	2 - 5%	5 - 10%	0,2 - 0,5	6 - 10	Ετερογενείς
Ανεπάρκεια PS	1 - 3%	5 - 10%	0,1 - 1	3 - 7	Ετερογενείς
APC-r / FVL	20%	5 - 10%	3 - 7	ετεροζυγώτες	SNP
G20210A	3 - 8%	5 - 10%	1 - 3	50 - 100 ομοζυγώτες 2 - 8 ετεροζυγώτες	SNP

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΩΝ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ (Kunfermann 2002)

	ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ 1ΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ	ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ 2ΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ
<p>AT= αντιθρομβίνη, PC= πρωτεΐνη C, PS= πρωτεΐνη S, APC-r= αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, FVL= παράγοντας V Leiden, VTE= φλεβική θρομβοεμβολική νόσος (venous thromboembolic disease), SNP= μονός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism)</p>		
<i>MTHFR C677T</i>		
<i>Υπερομοκυστεΐναιμία</i>	++	++
<i>G20210A</i>	++	++
<i>Συνδυασμένη θρομβοφιλία</i>	++	++
<i>Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</i>	++	++

++ σημαίνει τεκμηριωμένη συσχέτιση

Έλεγχος θρομβοφιλίας

Ενδείξεις

- Φλεβική θρόμβωση σε ηλικία < 50 ετών
- Γυναίκες πριν πάρουν αντισυλληπτικά ή ορμονικά σκευάσματα
- Ασθενείς ανεξαρτήτου ηλικίας με ιστορικό θρόμβωσης καθώς και τα μέλη της οικογένειάς τους
- Μέλη οικογένειας, όπου ανιχνεύτηκε μετάλλαξη FV Leiden ή MTHFR ή μετάλλαξη προθρομβίνης
- Ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών (ΕΑΑ)
- Αποκόλληση πλακούντα
- Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη
- Τοξιναιμία κύησης
- Ενδομήτριος θάνατος
- Ελλειποβαρή νεογνά

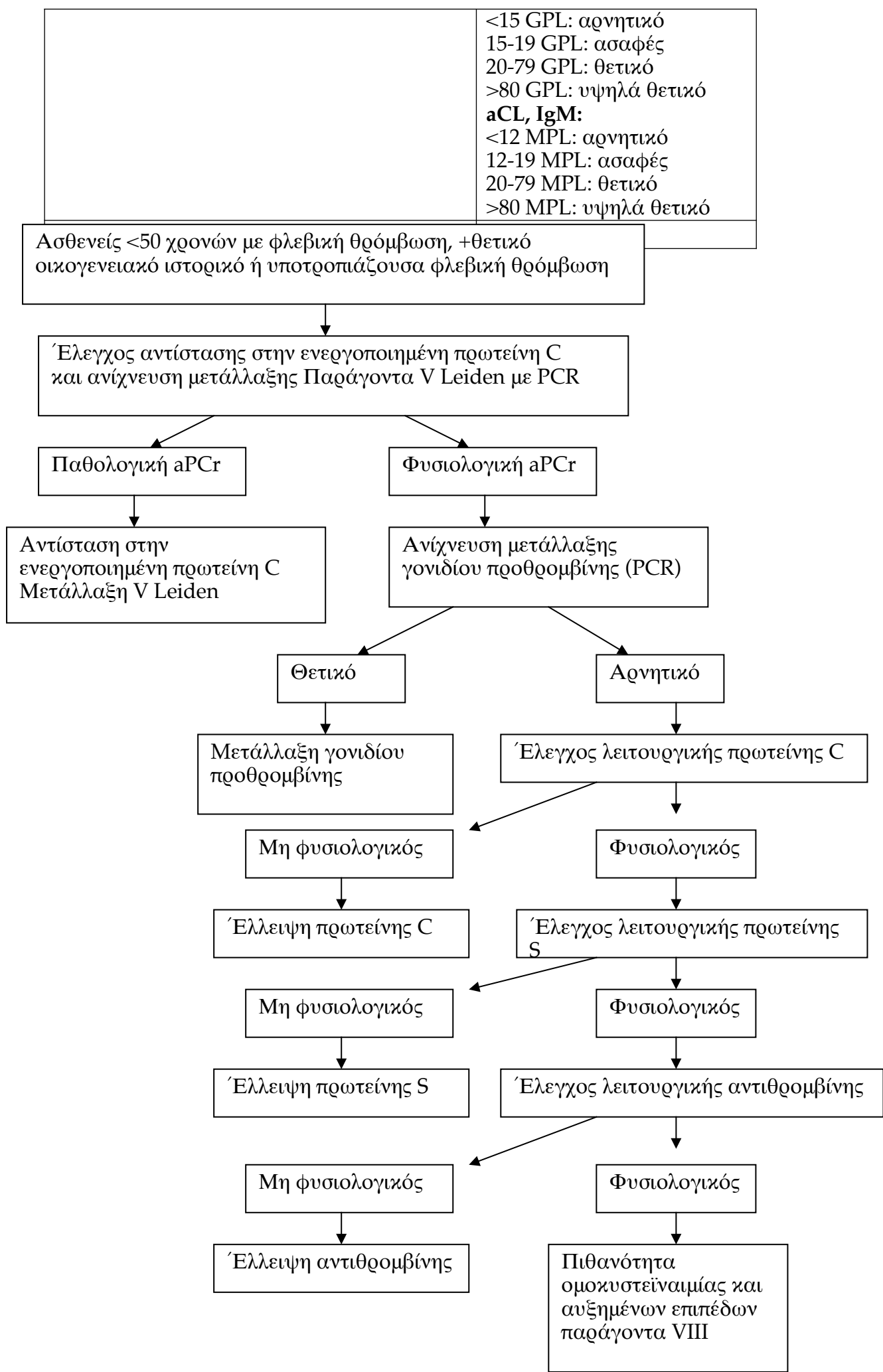
- Πρόωρα νεογνά
- Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Πότε πρέπει να γίνεται ο έλεγχος

- Επειδή το οξύ περιστατικό μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα (εκτός από την ανάλυση DNA) η εξέταση πρέπει να γίνεται στο πλάσμα τουλάχιστον 6 μήνες μετά το θρομβωτικό επεισόδιο.
- Αντιπηκτικά επηρεάζουν το αποτέλεσμα της εξέτασης για PC, PS, aPCr. Άρα η εξέταση πρέπει να γίνεται 2 εβδομάδες τουλάχιστον μετά την παύση της χορήγησης των αντιπηκτικών φαρμάκων.

Πάνελ εξετάσεων για θρομβοφιλία

	Φυσιολογικές τιμές
• PT	12-15,5 sec
• PTT	26-36 sec
• Πρωτεΐνη C	70-140%
• Πρωτεΐνη S	60-130% αντισυλληπτικά 52-118%
• Αντιθρομβίνη III	75-125%
• Factor VIII	70-150%
• Factor IX	70-120%
• Ομοκυστεΐνη	Γυναίκες: 4-10μmol/L Άνδρες: 4-12μmol/L
• Ανίχνευση μετάλλαξης V-Leiden	
• Ανίχνευση μετάλλαξης ομοκυστεΐνης MTHFR	
• Ανίχνευση μετάλλαξης προθρομβίνης G20210A	
• APCR	> ή = 1,5
• D Dimmers	0-0,4 μg/ml
• Αντιπηκτικό του λύκου (LAC)	34-42 sec
• Αντιφωσfolιπιδικά αντισώματα	aCL, IgG:



ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Υπολογισμός PT

Χρήση αντιδραστηρίου THROMBOREL S:

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

- Έλεγχος ανωμαλιών του εξωγενούς μονοπατιού πήξης
- Παρακολούθηση αντιπηκτικής αγωγής
- Έλεγχος της ηπατικής συνθετικής λειτουργίας
- Έλεγχος επί υποψίας μεμονωμένης έλλειψης παραγόντων πήξης (F II, V, VII, X)

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ THROMBOREL S

- Το αντιδραστήριο THROMBOREL S έχει καλιμπραριστεί με την British Comparative Thromboplastin (BCT), τη διεθνώς αναγνωρισμένη θρομβοπλαστίνη. Αυτό σημαίνει ότι είναι η μόνη θρομβοπλαστίνη που μπορεί να εκφραστεί αυτομάτως στο σύστημα INR (International Normalized Ratio). Είναι ανεξάρτητη από το ISI, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες θρομβοπλαστίνες της αγοράς και γι' αυτό μπορεί να εκφραστεί απόλυτα στο σύστημα INR.
- Η THROMBOREL S είναι μια ανθρώπινη θρομβοπλαστίνη, γι' αυτό εγγυάται απόλυτα τον έλεγχο ασθενών είτε αυτοί προσέρχονται για παρακολούθηση της αντιπηκτικής αγωγής είτε για έλεγχο της ηπατικής συνθετικής λειτουργίας.
- Ως μέθοδος screening εξασφαλίζει την ανίχνευση δυσλειτουργιών και μειώσεων σε όλους τους παράγοντες του μονοπατιού πήξης (F II, V, VII, X).
- Περίπου 19 δευτερόλεπτα χωρίζουν το ανώτερο από το κατώτερο όριο θεραπευτικής δόσης. Αυτό παρέχει στο γιατρό ένα αρκετά αξιόπιστο εύρος για την παρακολούθηση της αντιπηκτικής αγωγής, μειώνοντας τον κίνδυνο θρόμβωσης.
- Η ηπαρίνη χορηγείται σε συμβατικές θεραπευτικές δόσεις (μέχρι 0.6U/ml). Αυτό επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο της μετάβασης από την ηπαρίνη

στα παράγωγα της κουμαρίνης κατά τη διάρκεια της αντιπηκτικής αγωγής.

ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

	<u>ΔΕΥΤΕΡΟΛΕΠΤ</u> <u>A</u>
Εύρος αναφοράς	9,8 – 12,7
Θεραπευτικό εύρος	27 – 47
Παθολογικές τιμές για ηπατική νόσο	>13,8

INR Ή ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΠΙ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ

Υπάρχουν πίνακες για μετατροπή των αποτελεσμάτων σε δευτερόλεπτα είτε σε INR είτε σε ποσοστό επί του φυσιολογικού. Καθώς οι τιμές αυτές διαφέρουν από εργαστήριο σε εργαστήριο, για τον ασθενή θα πρέπει όλες οι τιμές να μετατρέπονται σε INR. Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας του αντιδραστηρίου, η καμπύλη αναφοράς διαθέτει ένα μεγάλο θεραπευτικό εύρος.

	ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ	ΣΤΟΧΟΣ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ
Προ- και μετεγχειρητική αντιπηκτική θεραπεία	2	2,5	3
Επεμβάσεις στο λαγόνιο οστού	1,5	2	3,5
Προφύλαξη από πρώτο και δεύτερο θρομβωτικό επεισόδιο	2	2,5	3
Έναρξη φλεβίτιδας, πνευμονική εμβολή	2	3	4
Προφύλαξη από τεχνητές βαλβίδες καρδιάς	3	3,5	4,5

Ανεπάρκεια Πρωτεΐνης C (PC)

- Φυσιολογία

Η πρωτεΐνη C είναι μια βιταμινο-K εξαρτώμενη πρωτεΐνη, η οποία συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Είναι βασικός ρυθμιστής της αιμοστατικής λειτουργίας. Μετατρέπεται σε μια ενεργή πρωτεΐνάση, την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (aPC) και αφού ενωθεί με την πρωτεΐνη S διασπά πρωτεολυτικά τους ενεργοποιημένους παράγοντες πήξης V (Va) και VIII (VIIIa).

Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C προκαλεί υπερπηκτική κατάσταση.

Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 160 μεταλλάξεις, οι οποίες διακρίνονται σε μεταλλάξεις τύπου I και II:

ΤΥΠΟΥ I	ΤΥΠΟΥ II
Πιο συχνές (75% των περιπτώσεων) Ελάττωση αντιγόνου Ελάττωση δραστηριότητας PC	Σύνθεση δυσλειτουργικών μορίων PC Φυσιολογικά αντιγονικά επίπεδα Ελάττωση δραστηριότητας PC

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Ποσοτικός προσδιορισμός της λειτουργικά δραστηρικής πρωτεΐνης C (με τη χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων).

Ανεπάρκεια Πρωτεΐνης S (PS)

- Φυσιολογία

Η πρωτεΐνη S είναι μια βιταμινο-K εξαρτώμενη πλάσματική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία παράγεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά έχει ανιχνευθεί και σε άλλα κύτταρα. Στο χρωμόσωμα 3 έχουν ανιχνευθεί ομόλογα γονίδια, ένα ενεργό και ένα ψευδογονίδιο. Το 60-70% της PS στο πλάσμα κυκλοφορεί συνδεδεμένη με την C4 binding protein (C4BP, ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος) με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης.

Μόνο η ελεύθερη PS έχει αντιπηκτική δράση

Η ανεπάρκεια πρωτεΐνης S προκαλεί υπερπηκτική κατάσταση.

Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 120 μεταλλάξεις, οι οποίες διακρίνονται σε μεταλλάξεις τύπου I, II και III:

ΤΥΠΟΥ I	ΤΥΠΟΥ II	ΤΥΠΟΥ III
(2/3 των ασθενών) Ελάττωση ολικού αντιγόνου Ελάττωση ελεύθερου αντιγόνου Ελάττωση δραστηριότητας PS	(σπάνια) Φυσιολογικό ολικό αντιγόνο Φυσιολογικό ελεύθερο αντιγόνο Ελάττωση δραστηριότητας PS	(1/3 των ασθενών) Φυσιολογικό ή χαμηλό ολικό αντιγόνο Ελάττωση ελεύθερου αντιγόνου Ελάττωση δραστηριότητας PS

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Προσδιορισμός λειτουργικής πρωτεΐνης S, ως συμπαράγοντας της aPC, με πηξιολογικές μεθόδους βασιζόμενες στο χρόνο APTT, PT.

Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης (AT)

- Φυσιολογία

Η αντιθρομβίνη ανήκει στην οικογένεια των σερπινών και συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Είναι συμπαράγοντας της ηπαρίνης και δρα ως φυσιολογικός αναστολέας των σερινο-πρωτεασών θρομβίνη και Χα ενώ μπορεί να αναστέλλει τους παράγοντες IXa, XIa, XIIa, καλλικρεΐνη και πλασμίνη. Ανήκει στις πρωτεΐνες οξείας φάσης.

Η ανεπάρκεια αντιθρομβίνης προκαλεί υπερπηκτική κατάσταση.

Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 150 μεταλλάξεις, οι οποίες διακρίνονται σε μεταλλάξεις τύπου I και II:

ΤΥΠΟΥ I	ΤΥΠΟΥ II
Ελάττωση αντιγόνου Ελάττωση δραστικότητας	Φυσιολογικά αντιγονικά επίπεδα Ελαττωμένη δραστηριότητα

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Ποσοτικός προσδιορισμός λειτουργικότητας αντιθρομβίνης III (με τη χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων).

Προσδιορισμός παραγόντων πήξης VIII, IX

- Φυσιολογία

Ο προσδιορισμός των παραγόντων πήξης στο πλάσμα ενδείκνυται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- για να διευκρινιστεί η αιτία παρατεταμένου χρόνου θρομβοπλαστίνης
- για τη διάγνωση συγγενών ή επίκτητων ανωμαλιών των παραγόντων πήξης
- για την παρακολούθηση αντιπηκτικής θεραπείας

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Προσδιορισμός λειτουργικότητας παραγόντων πήξης με πηξιολογικές μεθόδους.

Αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης PC

- Φυσιολογία

Η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C σχετίζεται με σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του παράγοντα V. Η μετάλλαξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα ο παράγοντας V να απενεργοποιείται 10 φορές αργότερα από την

PC με αποτέλεσμα να κυκλοφορεί περισσότερος ενεργοποιημένος παράγοντας στο πλάσμα, προκαλώντας μια κατάσταση υπερπηκτικότητας.

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Προσδιορισμός αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C με εξέταση λειτουργικής πήξης.

Προσδιορισμός D-Dimers

- Φυσιολογία

Ο θρόμβος ινώδους σχηματίζεται από τη διάσπαση του διαλυτού ινώδογονου μέσω κατάλυσης από τη θρομβίνη σχηματίζοντας μονομερή ινώδους. Τα μονομερή ινώδους συγκεντρώνονται σχηματίζοντας νήματα ινώδους, τα οποία πηκτωματοποιούνται σχηματίζοντας το θρόμβο ινώδους. Κατά τη φάση αυτή του πολυμερισμού, η θρομβίνη ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII σε δραστικό ένζυμο, τον παράγοντα XIIIa. Στη συνέχεια, ο παράγοντας XIIIa μετατρέπει το διαλυτό ινώδες σε αδιάλυτο θρόμβο ινώδους μέσω σταυροειδούς σύνδεσης παρακείμενων μορίων ινώδους στην D-περιοχή. Η λύση του ινώδους από την πλασμίνη δημιουργεί παράγωγα τα οποία περιέχουν τη σταυροειδώς συνδεδεμένη D-περιοχή (D-διμερές). Επομένως, τα παράγωγα ινώδους στο πλάσμα που περιέχουν D-διμερές είναι δείκτης ινωδόλυσης.

- Βιολογικό υλικό

Πλάσμα

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Ποιοτικός ή ημιποσοτικός προσδιορισμός κυκλοφορούντων παραγώγων του σταυροειδούς συνδεδεμένου ινώδους με κατάλληλο μονοκλωνικό αντίσωμα.

Ανίχνευση της κύριας μετάλλαξης του γονιδίου της ομοκυστεΐνης (MTHFR)

- Φυσιολογία

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα σουλφυδρυλικό αμινοξύ, που σχηματίζεται από την ενδοκυττάρια απομεθυλίωση της μεθειονίνης της τροφής. Το ένζυμο MTHFR περιορίζει τη συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στο αίμα, εμποδίζοντας έτσι την τοξική της δράση προς το ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων. Η μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, που προκύπτει από αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 677, προκαλεί αύξηση της ομοκυστεΐνης στο αίμα και αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα θρομβοφιλίας.

- Επιδημιολογικά δεδομένα

Περίπου 5-15% του πληθυσμού είναι ομόζυγο για τη μετάλλαξη αυτή. Οι ομοζυγώτες έχουν αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης και αγγειοπάθειας του πλακούντα.

- Βιολογικό υλικό

Περιφερικό αίμα σε στείρο σωληνάριο γενικής με αντιπηκτικό EDTA.

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Γίνεται απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα με EDTA και ακολουθεί ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου MTHFR με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας Taq πολυμεράση και βιοτινυλιωμένους εκκινητές. Το ενισχυμένο προϊόν, μεγέθους 223 βάσεων, αφού επιβεβαιώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, υβριδοποιείται με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και η ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης MTHFR C677T ανιχνεύεται με τη χρήση χρωμοφόρων ουσιών.

Ανίχνευση της κύριας μετάλλαξης του παράγοντα πήξης του αίματος V (FV-Leiden)

- Επιδημιολογικά δεδομένα

Περίπου 1 στους 7 Έλληνες πάσχει από θρομβοφιλία. Η σημειακή μετάλλαξη FV-Leiden (G1691A ή R506Q) αποτελεί τον κυριότερο γενετικό παράγοντα θρομβοφιλίας στο γενικό πληθυσμό. Το μεταλλαγμένο γονίδιο ανακαλύφθηκε το 1994. Βρίσκεται στο 20% των ιδιοπαθών φλεβικών θρομβώσεων και στο 60% των φλεβικών θρομβώσεων στις έγκυες γυναίκες.

Φυσιολογικά, ο ενεργοποιημένος παράγοντας V απενεργοποιείται διασπώμενος στις θέσεις αργινίνη 506 και αργινίνη 306 από την ενεργοποιημένη PC, που έχει συμπαράγοντα την PS. Αν υπάρχει η μετάλλαξη στη θέση 506, ο παράγοντας απενεργοποιείται 10 φορές αργότερα από την PC με αποτέλεσμα να κυκλοφορεί περισσότερος ενεργοποιημένος παράγοντας στο πλάσμα και αυξημένη προπηκτική δραστηριότητα. Ο φαινότυπος αυτής της κατάστασης ονομάζεται αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης PC. Περισσότερο από το 95% των περιπτώσεων με μειωμένη αντίσταση στη δράση της APC οφείλεται στη μετάλλαξη αυτή.

Η ανίχνευσή της μετάλλαξης ενδείκνυται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- ◆ φλεβική θρόμβωση σε ηλικία <50 ετών
- ◆ γυναίκες πριν πάρουν αντισυλληπτικά ή ορμονικά σκευάσματα
- ◆ ασθενείς ανεξαρτήτου ηλικίας με ιστορικό θρόμβωσης
- ◆ μέλη οικογένειας ατόμου με ανίχνευση FV-Leiden
- ◆ γυναίκες με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών, αποκόλληση πλακούντα, ΔΕΠ, τοξιναιμία, ενδομήτριος θάνατος, ελλειποβαρή νεογνά, προωρότητα, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

- Βιολογικό υλικό

Περιφερικό αίμα σε στείρο σωληνάριο γενικής με αντιπηκτικό EDTA.

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Γίνεται απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα με EDTA και ακολουθεί ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου του παράγοντα V με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας Taq πολυμεράση και βιοτινυλιωμένους εκκινητές. Το ενισχυμένο προϊόν, μεγέθους 173 βάσεων, αφού επιβεβαιώνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, υβριδοποιείται με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και η ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης FV G1691A (Leiden) ανιχνεύεται με τη χρήση χρωμοφόρων ουσιών.

Ανίχνευση της κύριας μετάλλαξης της προθρομβίνης (G20210A)

- Φυσιολογία

Η 20210A μετάλλαξη στο γονίδιο της προθρομβίνης περιγράφηκε από τους Poort et al το 1996. Μελέτες οικογενειών με τη μετάλλαξη 20210A έδειξαν ότι υπάρχει στενή σύνδεση μεταξύ ενός γονιδιακού τόπου που καθορίζει τα επίπεδα της προθρομβίνης και της μετάλλαξης 20210A (Soria et al, 2000). Τα αυξημένα επίπεδα της προθρομβίνης στο πλάσμα έχουν σαν αποτέλεσμα θρόμβους με λεπτότερα ινίδια ινικής, οι οποίοι θα είναι πιο ανθεκτικοί στην ινωδόλυση (Wolberg et al, 2003).

- Επιδημιολογικά δεδομένα

Η ετεροζυγωτία στο αλληλόμορφο 20210A αυξάνει τον κίνδυνο για φλεβική θρόμβωση, περίπου 3 φορές, ενώ αλληλεπιδρά και με άλλους παράγοντες (π.χ κάπνισμα) και αυξάνει τον κίνδυνο για αρτηριακή θρόμβωση (Mc Glennen et al, 2002). **Ο έλεγχος της μετάλλαξης κρίνεται απαραίτητος πριν δοθούν αντισυλληπτικά ή ορμονικά σκευάσματα.** Όσον αφορά στις καθ' έξι αποβολές, υπάρχουν δεδομένα από μελέτες που δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των καθ' έξι αποβολών πριν τη 13^η εβδομάδα ή πριν την 25^η εβδομάδα και της μετάλλαξης 20210A. Η συσχέτιση είναι σημαντική όταν οι ασθενείς έχουν δυο ή περισσότερες αποβολές.

- Βιολογικό υλικό

Περιφερικό αίμα σε στείρο σωληνάριο γενικής με αντιπηκτικό EDTA.

- Εργαστηριακή διερεύνηση

Επειδή η ποσότητα της προθρομβίνης στο πλάσμα εμφανίζει μεγάλες φυσιολογικές διακυμάνσεις, η μέτρηση της δε θεωρείται αρκετά ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση της μετάλλαξης 20210A. Έτσι, προτιμούνται τα γενετικά τεστ, τα οποία βασίζονται στη μέθοδο PCR, με ενίσχυση τμήματος κοντά στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της προθρομβίνης, που περιλαμβάνει και τον 20210A πολυμορφισμό.

Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα

• Φυσιολογία

Το Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS) είναι μια πολυσυστηματική νόσος με κυριαρχούντα χαρακτηριστικά φλεβικές και αρτηριακές θρομβώσεις μικρών αγγείων σε οποιοδήποτε ιστό ή όργανο, αυτοάνοση θρομβοπενία, επανειλημμένες αποτυχίες κύησης (>3 αλλεπάλληλες προ ή εμβρυονικές απώλειες ή ≥ 1 ανεξήγητους θανάτους εμβρύου >10 εβδομάδων) και παρουσία αντισωμάτων έναντι φωσφολιπιδίων (antiphospholipid antibodies – APA). Οι αποβολές οι οποίες εντάσσονται στα πλαίσια του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, είναι οι πλέον αποδεκτές ως ανοσολογικής αιτιολογίας αποβολές και αποτελούν το 7 – 25% των ΕΑΑ (επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές).

Τα παρακάτω είναι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (APA), που είναι δυνατόν να ανιχνευτούν σε περιπτώσεις αυτοάνοσων συνδρόμων αναπαραγωγής:

- Αντιπηκτικό Λύκου (Lupus Anticoagulant – LA ή LAC).
- Αντισώματα κατά καρδιολιπίνης (Cardiolipine – CL).
- Αντισώματα κατά φωσφατιδυλοσερίνης (Phosphatidylserine – P).
- Αντισώματα κατά φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (Phosphatidylethanolamine – PE).
- Αντισώματα κατά φωσφατιδυλοinositol (Phosphatidylinositol – PI).
- Αντισώματα κατά φωσφατιδυλοχολίνης (Phosphatidylcholine – PC).
- Αντισώματα κατά φωσφατοδυλογλυκερόλης (Phosphatidylglycerol – PG).
- Αντισώματα κατά φωσφατιδικού οξέος (Phosphate Acid – PA).

Σύμφωνα με μελέτες αρκετών ερευνητών, για τη διερεύνηση γυναικών με αποβολές έχει αξία η εκτέλεση ενός πάνελ APA (CL, PI, PG, PS, PE, PC) αντισωμάτων και όχι μόνο των CL (Yetman και Kuttech, 1996). Γυναίκες με αποβολές (3) είχαν θετικά αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (ACA) IgG και

IgM σε ποσοστό 17%, ωστόσο σ' ένα επιπλέον ποσοστό 10% γυναίκες με ACA αρνητικά, ήταν θετικές σ' ένα άλλο από την ομάδα των APA.

Όπως φαίνεται στον πίνακα I για τη διάγνωση των αυτοάνοσων διαταραχών (APS) απαιτείται συνεκτίμηση κλινικών και εργαστηριακών κριτηρίων. Απαιτούνται τουλάχιστον ένα κλινικό και ένα εργαστηριακό κριτήριο για τη διάγνωση του APS. Επειδή τα ACA (αντικαρδιολιπινικά) και τα APA, μπορεί να είναι παροδικά θετικά και να ανιχνεύονται και σε φυσιολογικά άτομα, η εξέτασή τους πρέπει να επαναλαμβάνεται σε 6 εβδομάδες.

- Η ελάττωση των ACA (IgG) κατά την εγκυμοσύνη, συμβαδίζει με επιτυχημένη έκβαση, ενώ η διατήρηση υψηλού τίτλου τους, με αποτυχία της κύησης.
- Σε ορισμένες γυναίκες με αποβολές τα APA (LA, ACA) συνυπάρχουν μαζί με άλλα αυτοαντισώματα, όπως τα αντιθυρεοειδικά (ATA), τα αντιπυρηνικά και τα αντιτροφοβλαστικά. Τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα μπορεί να είναι και τα μοναδικά ευρήματα σε γυναίκες με ανεξήγητες αποβολές και που έχουν φυσιολογική λειτουργία του θυρεοειδούς. Τα ΤΡΟ έχουν μεγαλύτερη συσχέτιση με αποβολές απ' ότι τα TG.
- Τα αντιενδοθηλιακά αντισώματα επίσης μπορεί ν' ανιχνεύονται σε περιπτώσεις αποβολών. Επηρεάζουν τα φυσιολογικά αντιπηκτικά συστήματα, που υπάρχουν στο ενδοθήλιο, τα οποία το προστατεύουν από το σχηματισμό εκτεταμένου θρόμβου.

I. Κλινικά και εργαστηριακά κριτήρια για τη διάγνωση του APS

Διάγνωση	Τουλάχιστον ένα κλινικό και ένα εργαστηριακό κριτήριο, επανάληψη σε 6 εβδομάδες τα ACA.
Κλινικά κριτήρια	
• Αναπαραγωγή	Μία ή περισσότερες απώλειες κύησητος > 10 εβδ., χωρίς φανερό άλλη αιτία. >3 επανειλημμένες αποβολές <10 εβδ.
• Θρόμβωση	Επανειλημμένες θρομβώσεις, φλεβικές και αρτηριακές. θρομβοκυτοπενία μετά από αποκλεισμό άλλου αιτίου.
• Αυτοάνοση θρομβοκυτοπενία	
Εργαστηριακά κριτήρια	
• Αντιπηκτικό Λύκου (LAC)	Παράταση δοκιμασιών πήξης, που δε διορθώνεται με πλάσμα, αλλά με περίσσεια φωσφολιπιδίων.
• Αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (ACA)	Τάξης IgG ή IgM > 20 GPL ή MPL, με προτυπωμένη μέθοδο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

