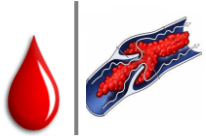




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

*ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ*

Επιστημονική Υπεύθυνη: Ομότιμη Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού

## *Διπλωματική Εργασία*

«ΠΡΩΤΟΓΕΝΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ»

ΟΝΟΜΑ : Ζαπάρα Νίκη

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : Βακαλοπούλου Σοφία

Ακαδημαϊκό Έτος : 2009-2010

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κυρία Βακαλοπούλου Σοφία, για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία περιγράφεται η πρωτογενή αιμόσταση στην οποία παρατηρείται η απάντηση του αγγειακού δικτύου και των αιμοπεταλίων στον αγγειακό τραυματισμό με την αγγειοσύσπασση και το σχηματισμό της αιμοπεταλιακής πλάκας (θρόμβου), με τον οποίο τελικά επέρχεται, παροδικά, η επίσχεση της αιμορραγίας.

Στο σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου βασικό ρόλο παίζουν: α) το αγγειακό τοίχωμα (ενδοθήλιο), β) τα αιμοπετάλια, γ) ο παράγοντας von Willebrand.

Επίσης γίνεται η διερεύνηση των διαφόρων διαταραχών της πρωτογενούς αιμόστασης, στις οποίες περιλαμβάνονται :

A) κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές του αγγειακού τοιχώματος. Οι κληρονομικές διαταραχές του αγγειακού τοιχώματος διακρίνονται στη νόσο Rendu-Weber-Osler, στο γιγάντιο αιμαγγείωμα, στην αταξία – τηλαγγειεκτασία, στις διαταραχές του συνδετικού ιστού, στο σύνδρομο Ehlers – Danlos, στην ατελής οστεογένεση, στο ελαστικό ψευδοξάνθωμα και το σύνδρομο Marfan. Ενώ στις επίκτητες ανήκουν οι αγγειακές πορφύρες.

B) Κληρονομικές και επίκτητες θρομβοπενίες. Οι κληρονομικές διακρίνονται: 1) στις θρομβοπενίες με μικρό μέγεθος αιμοπεταλίων, 2) στις θρομβοπενίες με φυσιολογικό μέγεθος αιμοπεταλίων, 3) στις θρομβοπενίες με μεγάλο μέγεθος αιμοπεταλίων.

Γ) Κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Οι κληρονομικές διακρίνονται: 1) στις διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τις πρωτεΐνες προσκόλλησης, 2) στις διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τους διαλυτούς αγωνιστές, 3) στις διαταραχές των κοκκίων των αιμοπεταλίων, 4) στις διαταραχές των οδών μεταγωγής του σήματος, 5) στις διαταραχές των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων. Ενώ τα φάρμακα, κάποιες τροφές και συστηματικές διαταραχές είναι αιτίες των επίκτητων διαταραχών της λειτουργίας των αιμοπεταλίων.

Δ) Νόσος von Willebrand. Η vWD κατατάσσεται σε τρεις κύριους τύπους: 1, 2 και 3. Οι τύποι 1 και 3 αντιπροσωπεύουν ποσοτικές διαταραχές του vWF. Ο τύπος 2 αποτελεί ποιοτική διαταραχή του vWF και διακρίνονται 4 υπότυποι: 2A, 2B, 2N και 2M.

Η εργαστηριακή διερεύνηση αρχικά περιλαμβάνει κάποιες βασικές εξετάσεις όπως είναι η γενική αίματος, με την μέτρηση MPV (Μέσου Όγκου Αιμοπεταλίων), με επίχρισμα περιφερικού αίματος, με δοκιμασίες χρόνων πήξεως in vitro (PT, αPTT, TT) , με τον προσδιορισμό των αντιγονικών επιπέδων (vWf:Ag) και της δραστικότητας συμπαραγόνα ριστοσεΐνης (vWf:Ristocetin Cofactor activity) για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό της νόσου von Willebrand και τον προσδιορισμός των επιπέδων FXIII. Δευτερευόντως, σε περίπτωση στην οποία τα αποτελέσματα των εξετάσεων της πρώτης φάσης βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων, περιλαμβάνει εξετάσεις με τις οποίες γίνεται η διερεύνηση των διαταραχών του αγγειακού

τοιχώματος και της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Η εργαστηριακή διερεύνηση των διαταραχών της λειτουργίας των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει πρωτίστως τις σφαιρικές δοκιμασίες (χρόνος ροής και PFA-100). Αν οι παραπάνω διαδικασίες δείξουν διαταραχή στη λειτουργία των αιμοπεταλίων τότε χρειάζονται περαιτέρω εξετάσεις, όπως LTA (Light Transmission Aggregometry), WBA (Whole Blood Aggregometry), Lumi-Aggregometry, κυτταρομετρία ροής, παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (TEM).

# SUMMARY

---

This master project describes the primary hemostasis, at which the reaction of vascular system and platelets, on vascular injury, with vasoconstriction and formation of platelet plaque (thrombus), in which finally, occurs, transiently, the retention of bleeding. In the formation of platelet clot, the basic role is played by: a) the vascular wall (endothelium), b) platelets, c) von Willebrand factor.

Also, it is presented the investigation of various disorders of primary hemostasis, including:

- A) Inherited and acquired disorders of vascular wall. The inherited disorders of vascular wall are distinguished: Rendu-Weber-Osler disease, giant hemangioma, ataxia-telangiectasia, connective tissue disorders, Ehlers-Danlos syndrome, incomplete osteogenesis, elastic pseudoxanthoma and Marfan syndrome. In acquired disorders, vascular purpura is included.
- B) Inherited and acquired thrombocytopenies. Some of the inherited thrombocytopenies are: 1) the thrombocytopenies with small platelets, 2) the thrombocytopenies with normal platelet size, 3) the thrombocytopenies with large platelet size.
- C) Inherited and acquired disorders of platelet function. Some of inherited disorders are: 1) disorders of platelet receptors for adhesion proteins, 2) disorders of platelet receptors for soluble agonists, 3) disorders for granules of platelets, 4) disorders of signal transduction pathways, 5) disorders phospholipids of platelets. While acquired disorders of the platelet function are caused by drugs, certain foods and systemic disorders.
- D) Von Willebrand disease. The VWD classified into three main types: 1, 2 and 3. Types 1 and 3 represent quantitative disorders of VWF. Type 2 is a qualitative disorder of VWF and 4 subtypes are distinguished: 2A, 2B, 2N, and 2M.

The laboratory investigation, initially includes, some basic tests, such as Full Blood Count, by measuring MPV (average volume of platelets), with peripheral blood smear, with in vitro coagulation assays (PT, APTT, TT), determining levels of antigenic (VWF:Ag) and ristocetin cofactor activity (VWF) to diagnose or exclude von Willebrand disease and determinate levels FXIII. Secondly, in case the test results of the first phase are within normal limits, testing for disorders of the vascular wall and platelet function are also included. The laboratory investigation of disorders of platelet function,

includes primarily spherical assays (bleeding time and PFA-100). If the above procedures show there is disorder in platelet function, then further tests are needed: LTA (Light Transmission Aggregometry), WBA (Whole Blood Aggregometry), Lumi-Aggregometry, flow cytometry and electron microscopy.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

## **ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....σελ. 1

## **ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ**

• ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ.....σελ.1

• ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ.....σελ.3

## **ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ**

ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΣΗ.....σελ. 4

## **ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ**

- Στο οπτικό μικροσκόπιο.....σελ.6
- Στο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.....σελ.7
- Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....σελ.8
  - Περιφερική ζώνη.....σελ.9
  - Δομική ζώνη.....σελ.15
  - Ζώνη των οργανυλλίων.....σελ.16
  - Μεμβρανικά συστήματα.....σελ.17

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VON WILLEBRAND.....σελ.17

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ**

α) Πρωτογενής (αρχική) αιμόσταση.....σελ.18

β) Δευτερογενής αιμόσταση.....σελ.21

Φυσικοί ανασταλτές της πήξης.....σελ.23

Ινωδόλυση.....σελ.24

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ.....σελ.25**

## **ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ**

### **ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ.**

- Χρόνος ροής.....σελ.31

- PFA-100.....σελ.32

- Θρομβοελαστογραφία.....σελ.35

• Αρχές λειτουργίας της θρομβοελαστογραφίας.....σελ.36

• Παράμετροι της θρομβοελαστογραφίας (TEG).....σελ.36

• Εφαρμογές της θρομβοελαστογραφίας.....σελ.39

- Οπτική (θολωσιμετρική) συσσωματομετρία (Light Transmission Aggregometry – LTA).

• Αρχές της μεθόδου.....σελ.40

• Μέθοδος.....σελ.40

- Αγωνιστές των αιμοπεταλίων.....σελ.42
- Υπολογισμός και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.....σελ.44
- Μελέτη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ολικό αίμα (Whole Blood Aggregometry - WBA -).....σελ.46
- Φωτο – συσσωματομετρία (Lumi-Aggregometry).....σελ.48
- Κυτταρομετρία ροής.....σελ.50
- Αρχές της μεθόδου.....σελ.50
- Εφαρμογές της κυτταρομετρία ροής .....σελ.52
- Παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Transmission Electron Microscopy -TEM -).....σελ.53
- Εργαστηριακή διερεύνηση νόσου von Willebrand.....σελ.54

## **ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ**

### **ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.....σελ.56**

#### **1) Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τις πρωτεΐνες προσκόλλησης**

- Σύνδρομο Bernard- Soulier.....σελ.57
- Θρομβασθένεια Glanzmann.....σελ.58
- Αιμοπεταλιακός τύπος ή νόσος ψευδο - von Willebrand.....σελ.59

#### **2) Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τους διαλυτούς αγωνιστές**

- Διαταραχές των  $\alpha_2$  αδρενεργικών υποδοχέων των αιμοπεταλίων.....σελ.60
- Διαταραχές του υποδοχέα της TXA2 των αιμοπεταλίων.....σελ.60
- Διαταραχές των υποδοχέων του ADP των αιμοπεταλίων.....σελ.60

#### **3) Διαταραχές των κοκκίων των αιμοπεταλίων**

##### **-Διαταραχές των δ- κοκκίων**

- Ανεπάρκεια δ-κοκκίων (storage pool disease).....σελ.60
- -Σύνδρομο Chediak-Higashi.....σελ.61
- -Σύνδρομο Hermansky – Pudlak.....σελ.62
- -Σύνδρομο TAR .....σελ.62
- -Σύνδρομο Wiskott-Aldrich .....σελ.62

##### **-Διαταραχές των α-κοκκίων**

- Σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου .....σελ.63
- Θρομβοκυττοπάθεια Quebec.....σελ.64
- Σύνδρομο Paris-Trousseau/Jacobsen.....σελ.64



#### 4) Διαταραχές των οδών μεταγωγής του σήματος

- Διαταραχές της κυκλοοξυγενάσης (aspirin like defect).....σελ.65

#### 5) Διαταραχές των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων

- Σύνδρομο Scott .....σελ.65

#### ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΕΣ

Ανωμαλία May-Hegglin.....σελ.66

#### ΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ

##### ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ:

-Κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία .....σελ.68

-Γιγάντιο αιμαγγείωμα (σύνδρομο Kasabach-Meritt) .....σελ.68

-Σύνδρομο Ehlers – Danlos.....σελ.69

-Ελαστικό ψευδοζάνθωμα.....σελ.70

##### ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ:

Αγγειακές πορφύρες.....σελ.70

- Γεροντική πορφύρα.....σελ.71
- Ανεπάρκεια βιταμίνης C.....σελ.72
- Γλυκοκορτικοστεροειδή.....σελ.72
- Φαρμακευτική πορφύρα.....σελ.72
- Αμυλοείδωση .....σελ.72

Αγείτιδες .....σελ.73

- Πορφύρα Henoch-Schönlein.....σελ.73

ΝΟΣΟΣ VON WILLEBRAND.....σελ.75

#### ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

##### ΑΙΤΙΑ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Φάρμακα.....σελ.77

Τροφές.....σελ.79

Συστηματικές διαταραχές.....σελ.79

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.81

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ**

- Εικόνα 1:** Δομή του ενδοθηλίου.....σελ.2
- Εικόνα 2:** Παρατήρηση των αιμοπεταλίων στο κοινό μικροσκόπιο (40x) σε επίχρισμα περιφερικού αίματος. Ένα φυσιολογικό αιμοπετάλιο φαίνεται στην άνω αριστερή γωνία της εικόνας (μωβ). Επίσης φαίνονται δύο γιγάντια αιμοπετάλια (χρωματισμένα μωβ). [*Βικπαιδεία, 2013*].....σελ.7
- Εικόνα 3:** Μορφή του αιμοπεταλίου σε ηρεμία.....σελ.7
- Εικόνα 4:** Δενδρική μορφή του αιμοπεταλίου.....σελ.8
- Εικόνα 5:** Απλωμένη μορφή του αιμοπεταλίου.....σελ.8
- Εικόνα 6:** Δομής αιμοπεταλίου.....σελ.9
- Εικόνα 7:** Υποδοχέων των αιμοπεταλίων.....σελ.11
- Εικόνα 8:** Απεικόνιση του μηχανισμού της αιμόστασης.....σελ.21
- Εικόνα 9:** Επίχρισμα περιφερικού αίματος στο σύνδρομο Bernard Soulier .....σελ.27
- Εικόνα 10:** Επίχρισμα περιφερικού αίματος στο σύνδρομο «φαιού αιμοπεταλίου» (Gray Platelet Syndrome) .....σελ.27
- Εικόνα 11:** Χρόνος ροής με τη μέθοδο Duke.....σελ.31
- Εικόνα 12 :** Χρόνος ροής (μέθοδος Ivy).....σελ.32
- Εικόνα 13:** Συσκευή PFA-100.....σελ.33
- Εικόνα 14:** Θρομβοελαστογράφημα (TEG®).....σελ.38
- Εικόνα 15.** Θρομβοελαστομετρία (ROTEM®).....σελ.38
- Εικόνα 16:** Οπτική (θολωσιμετρική) μέθοδος συσσώρευσης αιμοπεταλίων.....σελ.41
- Εικόνα 17:** Lumi – aggregometry: ταυτόχρονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (κόκκινη και μπλε καμπύλη) και απελευθέρωση ATP (πράσινη και μαύρη καμπύλη) σε απάντηση στο κολλαγόνο που χρησιμοποιείται ως αγωνιστής. Η κόκκινη και πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύουν φυσιολογικό μάρτυρα, ενώ η μπλε και μαύρη καμπύλη είναι του ασθενούς. Οι καμπύλες είναι παρόμοιες, ενδεικτικές της φυσιολογικής απάντησης του υπό εξέταση δείγματος στον αγωνιστή (Peter Maslak and Larry Smith, 2009).....σελ.49
- Εικόνα 18:** Lumi – aggregometry: απάντηση στο αραχιδονικό οξύ σε ασθενή που λαμβάνει ασπιρίνη. Η κόκκινη (συσσώρευση αιμοπεταλίων) και η

πράσινη καμπύλη (απελευθέρωση ATP) αντιπροσωπεύουν φυσιολογικό μάρτυρα. Η μπλε (συσσώρευση αιμοπεταλίων) και η μαύρη καμπύλη (απελευθέρωση ATP) αντιπροσωπεύουν τον ασθενή (απουσία απάντησης στον αγωνιστή) (Peter Maslak and Larry Smith, 2009).....σελ.50

**Εικόνα 19:** Κυτταρομετρία ροής.....σελ.51

**Εικόνα 20:** Κυτταρομετρία ροής σε αίμα φυσιολογικού ατόμου. 1) τα αιμοπετάλια έχουν επιλεγεί με βάση της πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης φωτός και περικυκλώθηκαν στο πράσινο 2) σήμανση των αιμοπεταλίων με CD41(GpIIb) και CD61 (GPIIIa) (εκφράζουν και τις δύο γλυκοπρωτεΐνες) 3) σήμανση των αιμοπεταλίων με CD42b (GPIb) και CD61 (GPIIIa) εκφράζουν και τις δύο γλυκοπρωτεΐνες) (David Perry and Tony Todd, 2013).....σελ.53

**Εικόνα 21:** Κυτταρομετρία ροής σε αίμα ασθενούς με θρομβασθένεια Glanzmann. Στις Εικόνες 5 και 6, τα αιμοπετάλια δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα είτε με CD41 ή με CD61 (απώλεια GpIIb-IIIa λόγω της θρομβασθένειας Glanzmann). Στην εικόνα 6 τα αιμοπετάλια εκφράζουν κανονική δραστηριότητα με CD42b (φυσιολογική GPIb). (David Perry and Tony Todd, 2013).....σελ.53

**Εικόνα 22:** Φυσιολογικό αιμοπετάλιο (M: μιτοχόνδριο, MT: μικροσωληνάρια, OCS: ανοικτό καναλικό σύστημα, DB: πυκνά σωματίδια, G: α - κοκκία).....σελ.54

**Εικόνα 23:** Ανεπάρκεια των πυκνών σωματίων (storage pool disease).....σελ.54

**Εικόνα 24:** Γιγαντιαία αιμοπετάλια στο σύνδρομο Bernard – Soulier.....σελ.57

**Εικόνα 25:** Συσσώρευση αιμοπεταλίων στο σύνδρομο Bernard – Soulier.....σελ.58

**Εικόνα 26:** Συσσώρευση αιμοπεταλίων στη θρομβασθένεια Glanzmann.....σελ.59

**Εικόνα 27:** Ουδετερόφιλο στο σύνδρομο Chediak-Higashi .....σελ.62

**Εικόνα 27:** Ουδετερόφιλο στο σύνδρομο Chediak-Higashi .....σελ.62

**Εικόνα 28:** Σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου.....σελ.63

**Εικόνα 29:** Σύνδρομο Paris-Trousseau.....σελ.64

**Εικόνα 30:** Ανωμαλία May-Hegglin.....σελ.67

**Εικόνα 31:** Τηλαγγειεκτασίες γλώσσας .....σελ.68

<b>Εικόνα 32:</b> Γεροντική πορφύρα.....σελ.72
<b>Εικόνα 33:</b> Πορφύρα Henoch-Schönlein.....σελ.74
<b>Εικόνα 34:</b> Μηχανισμός δράσης αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.....σελ.79

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**

<b>Σχήμα 1 :</b> Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας των αιμοπεταλίων.....σελ.6
<b>Σχήμα 2:</b> Απεικόνιση της μεμβράνης των αιμοπεταλίων.....σελ.10
<b>Σχήμα 3:</b> Καταρράκτης της πήξης.....σελ.22
<b>Σχήμα 4:</b> Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού υποδείγματος τη πήξης.....σελ.23
<b>Σχήμα 5:</b> Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού των φυσικών ανασταλτών της πήξης.....σελ.24
<b>Σχήμα 6:</b> Σχηματική απεικόνιση του ινωδολυτικού συστήματος.....σελ.25
<b>Σχήμα 7:</b> Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου PFA-100 σε συνθήκες που μοιάζουν με τις in vivo. ....σελ.34
<b>Σχήμα 8:</b> Θρομβοελαστογραφήματα. A: Φυσιολογικό, B: παράταση χρόνου K (αντιπηκτική αγωγή, έλλειψη παραγόντων πήξης), C: μείωση MA (θρομβοπενία, αντιαιμοπεταλιακή αγωγή), D: ινωδόλυση, E: υπερπηκτικότητα, F: διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, G: τελικό στάδιο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (υποπηκτικότητα). (Raffan-Sanabria F, et al, 2009).....σελ.39
<b>Σχήμα 9:</b> Διφασική καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων.....σελ.42
<b>Σχήμα 10 :</b> Αρχή της μεθόδου WBA (αριστερά) και του in vitro χρόνου ροής (δεξιά).[www.springer.com].....σελ.47

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ**

**Πίνακας 1:** Φάρμακα ή τροφές οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων των αιμοπεταλίων.

**Πίνακας 2:** Διαταραχές των αιμοπεταλίων: αποτελέσματα από την εξέταση με PFA-100.....σελ.35

**Πίνακας 3:** LTA σε κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές των αιμοπεταλίων.....σελ.46

**Πίνακας 4:** Τιμές αναφοράς (*David Perry and Tony Todd,2013*).....σελ.49

**Πίνακας 5:** Εργαστηριακά ευρήματα νόσου von Willebrand.....σελ.76

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

**Παράδειγμα 1.** Νόσος von Willebrand ή σύνδρομο Bernard Soulier...σελ.45

**Παράδειγμα 2.** Θρομβασθένεια Glanzmann ή ανινωδογοναιμία.....σελ.45

**Παράδειγμα 3.** Storage Pool Disease ή ανεπάρκεια των κοκκίων των αιμοπεταλίων.....σελ.46

## ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Η έννοια της ζωής στον άνθρωπο είναι συνυφασμένη με την ανάπτυξη των αγγείων και την κυκλοφορία του αίματος ενώ η φυσιολογική λειτουργία του μηχανισμού αιμόστασης είναι απαραίτητη για την επιβίωση του.

Η αιμόσταση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας του οργανισμού, που διατηρεί την ακεραιότητα των αγγείων και τη ρευστότητα του αίματος στο αγγειακό δίκτυο και προλαμβάνει την απώλεια αίματος, σε περίπτωση τραυματισμού του αγγείου με τον άμεσο σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου.

Στο μηχανισμό αιμόστασης συμμετέχουν:

- α) το τοίχωμα των αγγείων (ενδοθήλιο)
- β) τα αιμοπετάλια
- γ) οι παράγοντες της πήξης
- δ) οι φυσικοί ανασταλτές της πήξης
- ε) οι παράγοντες της ινωδολύσης
- στ) οι φυσικοί ανασταλτές της ινωδολύσης

Στο μηχανισμό αιμόστασης συμμετέχουν επίσης, με έμμεσο τρόπο τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία με την έξοδο τους στον εξωαγγειακό χώρο αιμολύονται ελευθερώνοντας ADP, βασικό ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων καθώς και τα λευκά αιμοσφαίρια, κυρίως τα μονοκύτταρα, τα οποία απελευθερώνουν παράγοντες που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια (Platelet aggregating factor – PAF και λευκοτριένια) ή τον καταρράκτη της πήξης (ιστικός παράγοντας).

Η αιμόσταση διακρίνεται στην:

- Πρωτογενή αιμόσταση στην οποία παρατηρείται η απάντηση του αγγειακού δικτύου και των αιμοπεταλίων στον αγγειακό τραυματισμό με την αγγειοσύσπασση και το σχηματισμό της αιμοπεταλιακής πλάκας (θρόμβου). Στο σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου βασικό ρόλο παίζουν:

A) το αγγειακό τοίχωμα (ενδοθήλιο)

B) τα αιμοπετάλια

Γ) ο παράγοντας von willebrand

- Δευτερογενή αιμόσταση στην οποία, με έναν καταρράκτη αλληλοδιάδοχων αντιδράσεων, το διαλυτό ινωδογόνο μετατρέπεται σε αδιάλυτη ινική η οποία σταθεροποιεί την ασταθή αιμοπεταλιακή πλάκα, που δημιουργήθηκε κατά την αρχική αιμόσταση και σχηματίζεται ο θρόμβος (Furie B, Furie C. , 2007).

## ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ

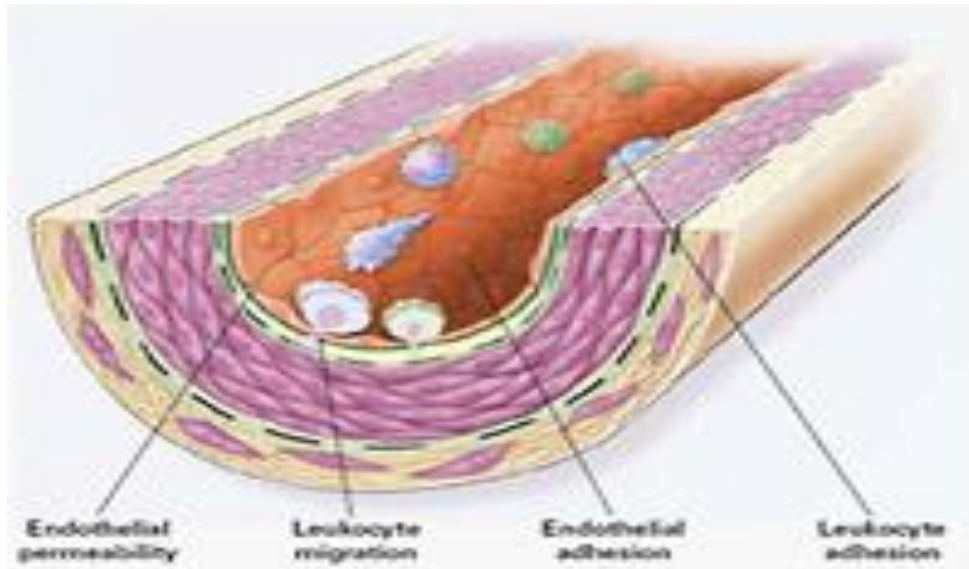
### ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Το αγγειακό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού αποτελείται από ένα εκτεταμένο δίκτυο αρτηριών, τριχοειδών και φλεβών. Στα περισσότερα αγγεία παρατηρούνται τρεις διακριτές περιοχές (χιτώνες).

Ο έσω χιτώνας αποτελείται από μια στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων κάτω από την οποία βρίσκεται η υπενδοθηλιακή στιβάδα και το έσω ελαστικό πέταλο. Η υπενδοθηλιακή στιβάδα αποτελείται κυρίως από ινίδια κολλαγόνου, λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη.

Ο μέσος χιτώνας είναι περισσότερο ανεπτυγμένος στα μεγάλα αγγεία και αποτελείται κυρίως από λείες μυϊκές και ελαστικές ίνες και το έξω ελαστικό πέταλο, το οποίο παρέχει δομική υποστήριξη.

Ο έξω χιτώνας αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από ινοελαστικό συνδετικό ιστό και περιέχει τροφοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα.



**Εικόνα 1:** Δομή του ενδοθηλίου.

Το ενδοθήλιο αποτελείται από μία στιβάδα κυττάρων η οποία βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια όλων των αγγείων και λεμφαγγείων και έρχεται σε επαφή με το αίμα ή τη λέμφο. Αποτελείται περίπου από  $10^{13}$  κύτταρα τα οποία ζυγίζουν 1,5 κιλό και καλύπτουν επιφάνεια  $4.000 - 7.000\text{m}^2$  (Augustin HG, et al,1994.). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδέονται με τη βασική μεμβράνη του αγγείου και παρατάσσονται σαν μωσαϊκό. Έχουν συνήθως κυβοειδές σχήμα, σε συνθήκες χαμηλής ροής, αλλά, σε θέσεις όπου οι αρτηρίες διχάζονται δημιουργώντας κλάδους και η ροή του αίματος γίνεται στροβιλώδης ή αυξάνει η διατμητική τάση, το σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων επιμηκύνεται.

Υπάρχουν δύο τύποι μεσοκυττάρων συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων: α) σταθερές συνδέσεις με αλληλοεπικάλυψη των κυττάρων, που εξασφαλίζουν μια σχετική στεγανότητα και επιτρέπουν μόνο την επιλεκτική διάχυση ουσιών διά μέσω του ενδοθηλίου (εγκέφαλος) και β) συνδέσεις οι οποίες αφήνουν οπές ή χάσματα, τα οποία επιτρέπουν τη διάχυση μακρομορίων, ιόντων και υγρών από και προς τα τριχοειδή (ενδοκρινείς αδένες, νεφροί) ή τα χάσματα συνοδεύονται από ατέλειες της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την ελεύθερη ανταλλαγή ουσιών και κυττάρων μεταξύ αίματος και οργάνων (κολποειδή ήπατος και σπληνός).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εμπύρνηνα κύτταρα και διαθέτουν κυτταρόπλασμα που περιέχει κυστίδια και τα σωμάτια Weibel – Palade. Τα κυστίδια περιέχουν ουσίες ή υγρά τα οποία μεταφέρονται με το μηχανισμό της πινοκυττάρωσης, ενώ τα σωμάτια Weibel – Palade είναι αποθηκευτικά κυστίδια και περιέχουν παράγοντα von Willebrand και P -σελεκτίνη (Dejana E.,1995.).

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Το ενδοθήλιο δεν αποτελεί έναν απλό κυτταρικό χιτώνα αλλά εμφανίζει ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες που σχετίζονται με την ομοιοστασία του αγγείου. Μέσω μεμβρανικών υποδοχέων, έχει την ικανότητα να προκαλεί μεταβολές του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης, με τη σύνθεση και απελευθέρωση ενός μεγάλου αριθμού αγγειοδραστικών μορίων. Επιπλέον εκκρίνει ή εκφράζει διάφορα μόρια τα οποία παίζουν ρόλο στην αγγειογένεση, στην αγγειακή διαπερατότητα, στη διακίνηση των λευκοκυττάρων, στην ανάπτυξη φλεγμονής και αθηροσκλήρωσης και στο μηχανισμό αιμόστασης.

### Ρύθμιση του αγγειακού τόνου

Η ρύθμιση του αγγειακού τόνου επιτυγχάνεται με την έκκριση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ουσιών με αγγειοσυσπαστικές (ενδοθηλίνη, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων –PAF) ή αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (μονοξειδίο του αζώτου –NO, προστακυκλίνη -PGI<sub>2</sub>). Η αγγειοσύσπαση, που ακολουθεί άμεσα κάθε βλάβη του αγγειακού τοιχώματος, περιορίζει την απώλεια αίματος και επιβραδύνει τοπικά τη ροή του αίματος αυξάνοντας έτσι τη προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγείο. Από τις αγγειοσυσπαστικές ουσίες, η ενδοθηλίνη παράγεται από το ενδοθηλιακό κύτταρο και, μέσω υποδοχέων που υπάρχουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στις λείες μυϊκές ίνες, προκαλεί αγγειοσύσπαση και αύξηση του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών ινών. Απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από διέγερσή τους από φυσικούς και χημικούς παράγοντες (υποξία, κυτταροκίνες, διατμητική τάση) (Brunner F, et al, 2006).

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) προέρχεται από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από διέγερση τους από τη θρομβίνη, βραδυκίνη, ATP, ιντερλευκίνες 1 και 8 κλπ. Εκτός από αγγειοσύσπαση προάγει την προσκολλητικότητα των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, την αγγειογένεση και αυξάνει τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου (Imaizumi TA, et al, 1995.).

Την αρχική αγγειοσύσπαση ακολουθεί χάλαση του αγγείου η οποία οφείλεται στους αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες που παράγει το ενδοθήλιο. Το NO είναι ο σημαντικότερος αγγειοδιασταλτικός παράγοντας. Επιπλέον, αναστέλλει την προσκόλληση αιμοπεταλίων και συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Ignarro LJ, et al, 1987.).

Η PGI<sub>2</sub> είναι ένα εικοσανοειδές που παράγεται από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος με τη δράση της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX -2). Προκαλεί αγγειοδιαστολή και αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Αναστέλλει επίσης τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών ινών του αγγειακού τοιχώματος (Vane J, Corin RE., 2003).

### Ο ρόλος του ενδοθηλίου στην αιμόσταση

Το ενδοθήλιο παρότι διαθέτει αντιπηκτικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες, οι οποίες διασφαλίζουν την αγγειακή ομοιοστασία, παίζει συγχρόνως κεντρικό ρόλο σε όλες τα στάδια του μηχανισμού αιμόστασης, δηλαδή στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την πήξη και την ινωδόλυση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ή εκκρίνουν διάφορα μόρια όπως ο παράγοντας von Willebrand (Dong JF., 2005.), η θρομβομοντουλίνη (TM), ο ιστικός παράγοντας (Tissue Factor –TF) ή θρομβοπλασίνη, ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor



-TFPI) (*Ott I, et al., 2000*), ο ιστικού τύπου ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (Tissue Plasminogen Activator - t-PA), ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor -1 -PAI-1) (*Emeis JJ., 1992.*) και οι γλυκοζαμινογλυκάνες θειική ηπαράνη και θειική δερματάνη, οι οποίες ενισχύουν τη δραστηριότητα της αντιθρομβίνης και του συμπαράγοντα II της ηπαρίνης αντίστοιχα.

## ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια είναι απύρνηνα κύτταρα, δισκοειδούς αμφίκυρτου σχήματος, διαμέτρου 2-4μm και όγκου 7fl. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων του περιφερικού αίματος κυμαίνεται από 150.000 - 400.000/ μl και ο χρόνος ζωής τους είναι 7-10 ημέρες. Παράγονται στον μυελό των οστών από τα μεγακαρυοκύτταρα και το 1/3 αποθηκεύεται στο σπλήνα. Οι ενήλικες παράγουν περίπου  $10^{11}$  αιμοπετάλια ημερησίως αλλά η παραγωγή αυτή μπορεί να 20πλασιαστεί σε περιπτώσεις αυξημένης καταστροφής ή κατανάλωσης των αιμοπεταλίων. Καταστρέφονται στα κύτταρα του ΔΕΣ του σπλήνα ή του ήπατος

## ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΣΗ

Ως θρομβοποίηση ορίζεται το σύνολο των διεργασιών που οδηγούν στην παραγωγή των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα, μέσω δέσμευσης του πολυδύναμου προγονικού αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell) για τη μεγακαρυοκυτταρική και ερυθρά σειρά (MEP), πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων και διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από ενδοαναδιπλασιασμό του DNA, ωρίμανση και επέκταση του κυτταροπλάσματος και απελευθέρωση τελικά των θραυσμάτων του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων με τη μορφή κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων. Στη μετάβαση από το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο στα προγονικά κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς εμπλέκεται το ογκογονίδιο c-mpl, το οποίο εμφανίζει υψηλή έκφραση στα κύτταρα αυτά. Η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες, που ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Ο σημαντικότερος μεταγραφικός παράγοντας της μεγακαρυοποίησης είναι ο GATA-1, ο οποίος επάγει την παραγωγή μεγακαρυοκυτταρικών αποικιών με τη δράση του στα αιμοποιητικά stem cells και στα προγονικά κύτταρα της μυελικής σειράς ( CMP, common myeloid progenitors) (*Iwasaki et al, 2003*). Η έκφραση γονιδίων στα αρχικά στάδια της οντογένεσης των μεγακαρυοκυττάρων επηρεάζεται από τον FOG-1. Τα τελικά στάδια της μεγακαρυοποίησης ελέγχονται από την συνεργασία των GATA-1 και FOG-1. Τέλος, ο NF-E2 ρυθμίζει τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων, το σχηματισμό των προ -αιμοπεταλίων (proplatelets) και την απελευθέρωση των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα (*Shivdasani RA, 2001*).

Τα διδύναμα κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής και ερυθράς σειράς (MEP) απαντούν σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως χυμοκίνες και κυτταροκίνες, οι οποίες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το σχηματισμό πρώιμων αποικιών, των BFU - meg (megakaryocyte burst-

forming units) ή πιο ώριμων και μικρότερων κυτταρικών αποικιών, των CFU - meg (megakaryocyte colony-forming units), με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οποίων θα δημιουργηθούν τελικά τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα οι μεγακαρυοβλάστες.

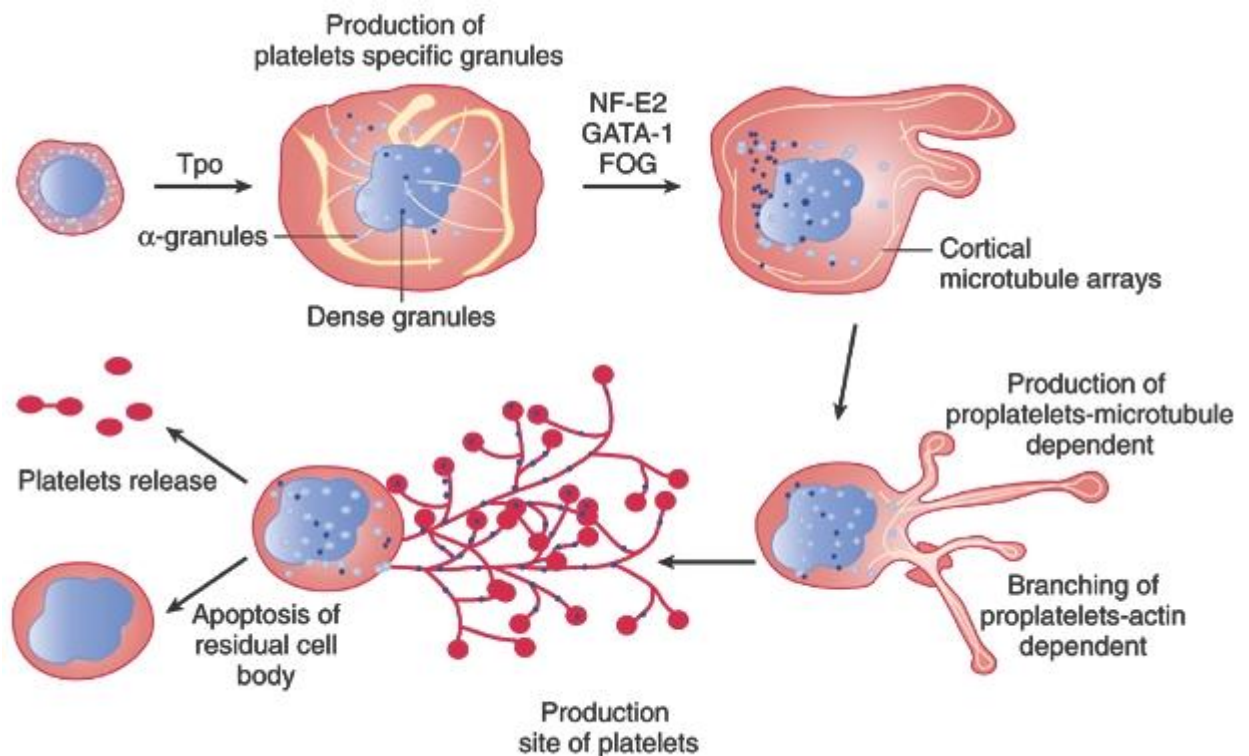
Ο κυριότερος ρυθμιστής της μεγακαρυοποίησης και της θρομβοποίησης είναι η θρομβοποιητίνη (Thrombopoietin, TPO ή Mpl ligand) η οποία δρα σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης, από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο ως τα αιμοπετάλια. Η TPO παράγεται από το ήπαρ και συνδέεται με του υποδοχείς c-mpl στην επιφάνεια των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και προκαλεί πολλαπλασιασμό και ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων. Σε περίπτωση θρομβοπενίας τα επίπεδα της TPO αυξάνουν και αντίθετα (Solar et al, 1998, Wendling F, 1999).

Άλλοι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι μπορεί να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, μόνοι ή σε συνδυασμό με την TPO, είναι η IL-3, ο GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), η IL-6, η IL-11, ο SCF (Stem Cell Factor), ο FGF (Fibroblast Growth Factor), η ερυθροποιητίνη (EPO), κλπ. (Vainchker et al, 1995, Broudy et al 1996).

Παράγοντες που έχουν αρνητική ρυθμιστική δράση και αναστέλλουν τον σχηματισμό αποικιών CFU-Meg, είναι ο TGF-β (Transforming Growth Factor - β), ο TNF-a (Tumor Necrosis Factor-a), η ιντερφερόνη-α (IFN-a), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας-4 (PF4) κλπ (Fortune et al, 2000; Minamigushi et al, 2001; Kaushansky et al, 2002).

Τα αρχέγονα προγονικά κύτταρα μετατρέπονται σε μεγακαρυοβλάστες, οι οποίοι διαφοροποιούνται σε προμεγακαρυοκύτταρα και τελικά σε μεγακαρυοκύτταρα. Οι μεγακαρυοβλάστες χάνουν την ικανότητα διαίρεσης αλλά διατηρούν την ικανότητα αντιγραφής του DNA (ενδοαναδιπλασιασμός, ενδομίτωση) και της ωρίμανσης του κυτταροπλάσματος. Έτσι με τις ενδομιτώσεις διαιρείται ο πυρήνας, χωρίς ταυτόχρονη διαίρεση του πρωτοπλάσματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γιγαντιαίου κυττάρου με πολυπλοειδικό πυκνωτικό πυρήνα και άφθονο πρωτόπλασμα.

Με την ενδομίτωση συντίθενται μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση μεμβρανικών και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών καθώς επίσης και με το σχηματισμό των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Στα μεγακαρυοκύτταρα αρχικά δημιουργείται ένα σύμπλεγμα μικροσωληναρίων στο κυτταρόπλασμα, το οποίο συνδέεται με τη πλασματοκυτταρική μεμβράνη και στη ουσία αποτελεί την επιφάνεια των προ - αιμοπεταλίων. Τα μικροσωληνάρια μετατοπίζονται προς στο φλοιό και η δημιουργία των προ - αιμοπεταλίων αρχίζει με το σχηματισμό πυκνών ψευδοποδίων που επιμηκύνονται, ενώ κοκκία και οργανύλια μετακινούνται μέσω των μικροσωληναρίων και συσσωρεύονται στα άκρα των προ - αιμοπεταλίων. Σχηματίζεται έτσι ένα διακλαδιζόμενο σύστημα, από τις άκρες του οποίου μικροσωληνάρια ελευθερώνονται από αυτό παρασύροντας και τμήμα κυτταροπλάσματος του μεγακαρυοκυττάρου. Στη συνέχεια ελίσσονται σχηματίζοντας σπείρες, οι οποίες δίνουν δισκοειδές σχήμα στα αιμοπετάλια και απελευθερώνονται τα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια εισέρχονται στους φλεβοκόλπους και περνούν από εκεί στην κυκλοφορία του αίματος. (Hartwig J et al, 2003). Ο γυμνός πυρήνας που απομένει αποπίπτει και απομακρύνεται από τα μακροφάγα (Li J and Kuter DJ, 2001, de Botton et al, 2002).



Copyright © 2005 Elsevier Inc. (USA) All rights reserved.

**Σχήμα 1 :** Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας των αιμοπεταλίων

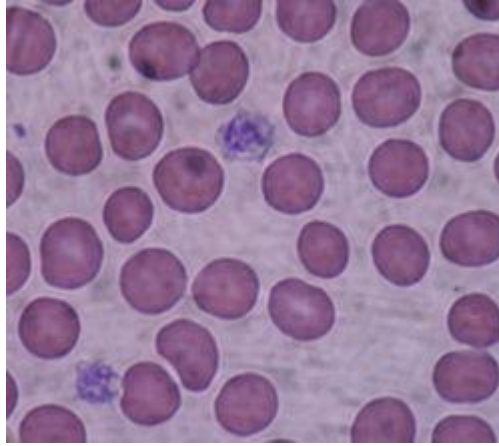
Συνολικά, η εξέλιξη ενός δεσμευμένου προγονικού κυττάρου της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς σε αιμοπετάλια γίνεται σε περίπου 5 έως 7 ημέρες. Τα αιμοπετάλια αθροίζονται στο σπλήνα για 36 ώρες. Ο μυελός των οστών ενός φυσιολογικού ενήλικα περιέχει 100.000.000 μεγακαρυοκύτταρα. Ένα μεγακαρυοκύτταρο παράγει 10-20 προαιμοπετάλια και περίπου 1.000 - 3.000 αιμοπετάλια (Hartwig J and Italiano JR, 2003).

### **ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ**

Η περιγραφή της μορφολογίας των αιμοπεταλίων, εξαρτάται από τα οπτικά μέσα που χρησιμοποιούμε για την παρατήρησή τους. Γι' αυτό και διακρίνεται σ' αυτή που προκύπτει από τη μελέτη τους με: α) απλό μικροσκόπιο, β) μικροσκόπιο αντίθετης φάσης και γ) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

#### Μορφολογία των αιμοπεταλίων στο οπτικό μικροσκόπιο

Στα χρωματισμένα επιχρίσματα του περιφερικού αίματος με τη χρώση Wright, τα αιμοπετάλια φαίνονται ως μικρά γαλαζόφαια σωμάτια με στρογγυλό ή ελλειπτικό σχήμα. Η μέση διάμετρος τους ποικίλει και κυμαίνεται από 1,5 έως 3,0 μm. Η διάμετρος αυτή των αιμοπεταλίων αντιστοιχεί στο 1/4 περίπου της διαμέτρου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα μη διεγερμένα αιμοπετάλια έχουν μορφή αμφίκυρτου δίσκου, με μέσο όγκο περίπου 7μ<sup>3</sup> και διακρίνονται δύο μέρη: το υαλομέρος (hyalomere) που αντιστοιχεί στο κυτταρικό πρωτόπλασμα και το κοκκιομέρος (granulomere) το οποίο αποτελείται από ποικίλα κοκκία και σωματίδια.

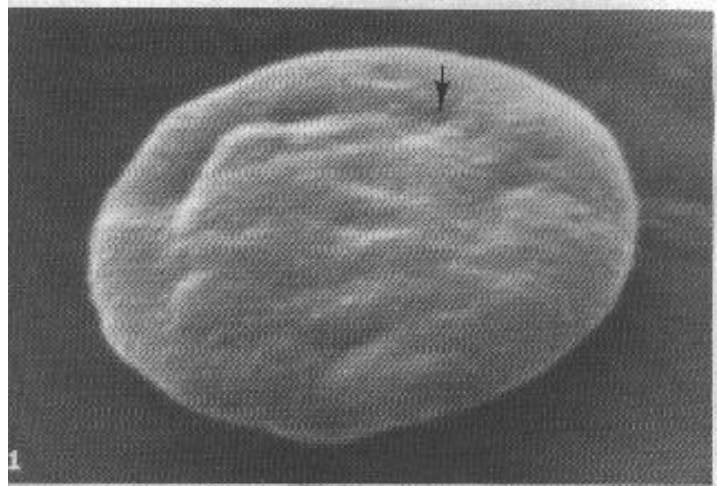


**Εικόνα 2:** Παρατήρηση των αιμοπεταλίων στο κοινό μικροσκόπιο (40x) σε επίχρισμα περιφερικού αίματος. Ένα φυσιολογικό αιμοπετάλιο φαίνεται στην άνω αριστερή γωνία της εικόνας (μωβ). Επίσης φαίνονται δύο γιγάντια αιμοπετάλια (χρωματισμένα μωβ). [Βικπαιδεία, 2013]

#### Μορφολογία των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης

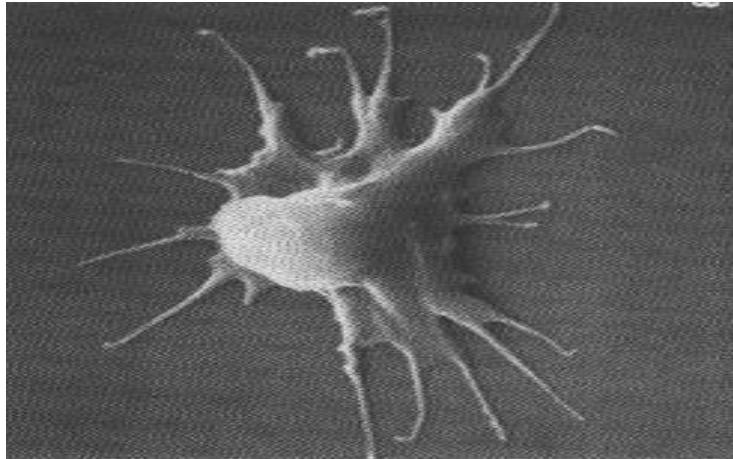
Με τη χρήση του μικροσκοπίου αντίθετης φάσης είναι δυνατή η παρατήρηση αιμοπεταλίων σε νωπά παρασκευάσματα. Με τον τρόπο αυτό, παρατηρείται ότι τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους λαμβάνουν διαδοχικά τρεις διαφορετικές μορφές: 1) μορφή σε ηρεμία, 2) δενδριτική μορφή (dendritic form), και 3) απλωμένη μορφή (spread form).

1) Τα αιμοπετάλια σε ηρεμία (μη ενεργοποιημένα) έχουν τη μορφή με την οποία κυκλοφορούν στο αίμα (circulating form) σε φυσιολογικές συνθήκες. Τα αιμοπετάλια έχουν τρισδιάστατη δισκοειδή όψη με επιφάνεια διάτρητη από οπές. Τα διάφορα σωματίδια βρίσκονται διάσπαρτα μέσα στο κυτταρόπλασμα, ενώ παρατηρούνται ακόμα και στοιχεία από τα δύο καναλικά σωληναρικά συστήματα (ανοικτό και πυκνό).



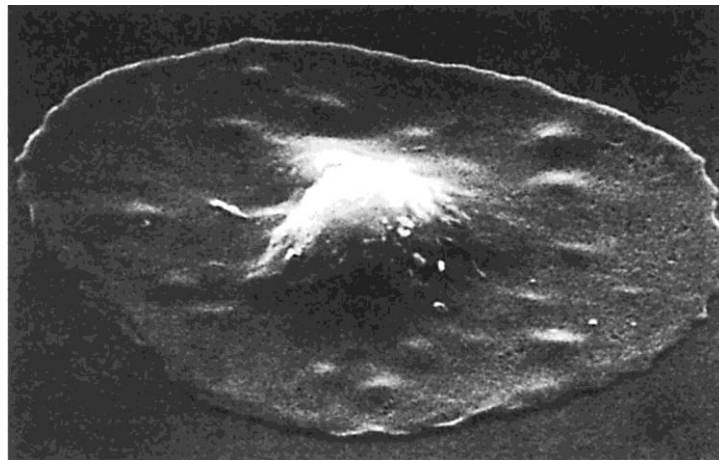
**Εικόνα 3:** Μορφή του αιμοπεταλίου σε ηρεμία.

2) Η δενδριτική είναι η μορφή την οποία παίρνουν τα αιμοπετάλια κατά την αρχική φάση της ενεργοποίησής τους. Τα αιμοπετάλια χάνουν το δισκοειδές σχήμα, αρχικά γίνονται σφαιρικά και στη συνέχεια εμφανίζουν προσεκβολές στην επιφάνειά τους.



**Εικόνα 4:** Δενδριτική μορφή του αιμοπεταλίου.

3) Η απλωμένη είναι η μορφή την οποία παίρνουν τα αιμοπετάλια όταν μία από τις προσεκβολές τους έρθει σε επαφή με τη γυάλινη επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τα αιμοπετάλια χάνουν τις προσεκβολές τους και παίρνουν την μορφή πολύ λεπτής μεμβράνης, που συνεχώς απλώνεται και τελικά προσκολλάται στην επιφάνεια. Τα σωματίδια των αιμοπεταλίων συγκεντρώνονται στο κέντρο των κυττάρων με αποτέλεσμα να παρατηρείται κεντρική αύξηση της πυκνότητάς τους.



**Εικόνα 5:** Απλωμένη μορφή του αιμοπεταλίου.

#### Μορφολογία των αιμοπεταλίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στα αιμοπετάλια διακρίνεται η περιφερική (peripheral) ζώνη, η δομική (structural) ζώνη, η ζώνη των οργανυλλίων (organelle zone) και τα μεμβρανικά συστήματα (membranes systems).

Στην περιφερική ζώνη διακρίνονται:

- Ο γλυκοκάλυκας
- Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων
- Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων

Στη δομική ζώνη διακρίνονται:

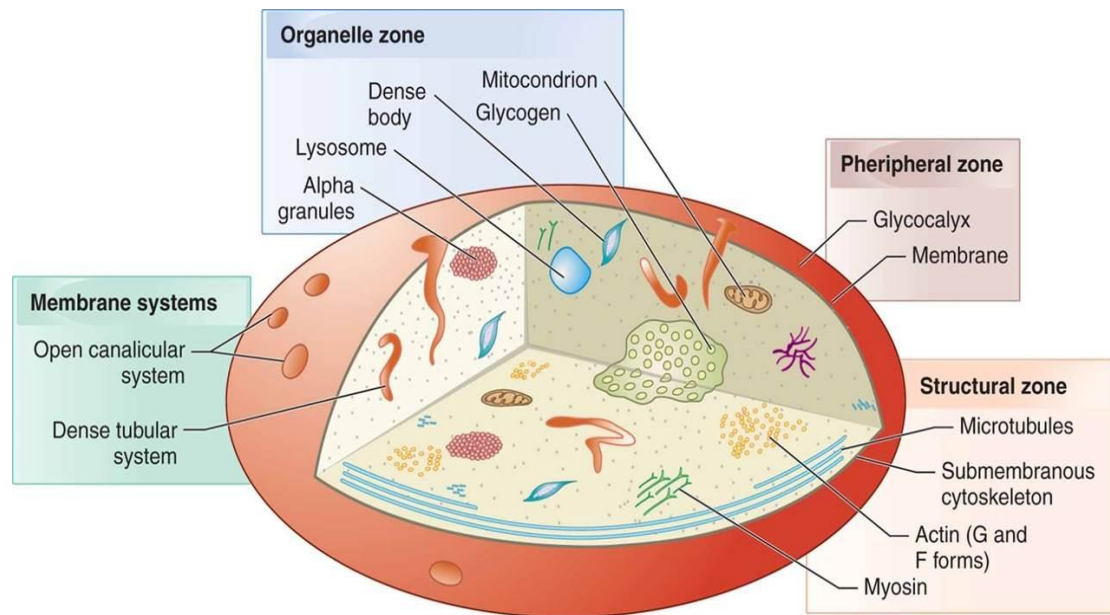
- Ο κυτταροσκελετός
- Μικροϊνίδια και μικροσωληνάρια

Στη ζώνη των οργανυλλίων διακρίνονται:

- Τα πυκνά σωμάτια
- Τα α – κοκκία
- Τα μιτοχόνδρια
- Τα λυσοσωμάτια
- Κοκκία γλυκογόνου

Τα μεμβρανικά συστήματα περιλαμβάνουν:

- Το ανοικτό καναλικό σύστημα
- Το πυκνό καναλικό σύστημα



Εικόνα 6: Δομής αιμοπεταλίου.

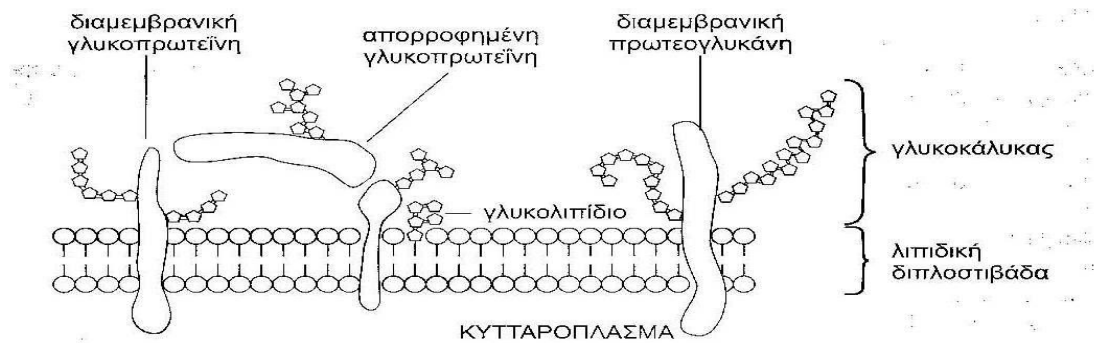
### Περιφερική ζώνη.

Είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αποτελείται από τον γλυκοκάλυκα, τη μεμβράνη και τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Ο γλυκοκάλυκας περιβάλλει το αιμοπετάλιο εξωτερικά, έχει πάχος 10-20nm και αποτελείται κυρίως από γλυκοζαμινογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν υποδοχείς για διάφορες πρωτεΐνες προσκόλλησης και τους αγωνιστές των αιμοπεταλίων (ADP, θρομβίνη, παράγοντας Willebrand, κολλαγόνο, ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, επινεφρίνη, PAF, θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, σεροτονίνη, κλπ) και παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα ή το αγγειακό τοίχωμα. Περιέχει επίσης παράγοντες πήξης (I, V, VIII, XI, XII), οι οποίοι απορροφώνται στην επιφάνειά του (Shattil SJ, 1981).

Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει πάχος 7-9 nm και ομοιάζει με την κυτταρική μεμβράνη των άλλων κυττάρων του αίματος. Αποτελεί το φυσικοχημικό όριο μεταξύ των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων λειτουργιών. Αποτελείται από μια διπλοστιβάδα, πλούσια σε φωσφολιπίδια και περιέχει αντλίες ανιόντων και κατιόντων (π.χ. Na/K – ATPάση, Ca - ATPάση) απαραίτητες για τη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας. Η μεμβράνη είναι ασύμμετρη και αποτελείται από τρεις στοιβάδες, δύο φωσφολιπιδικές και μια



πρωτεϊνική που βρίσκεται ανάμεσα τους. Τα κύρια συστατικά της είναι λιπίδια (35%), πρωτεΐνες (57%) και υδατάνθρακες (8%), ενώ στην εξωτερική της επιφάνεια υπάρχει πλήθος υποδοχέων.



**Σχήμα 11.** Απεικόνιση της μεμβράνης των αιμοπεταλίων.  $\diamond$  = υπολειμματικά σάκχαρα,  $\circ$  = σφιγγομυελίνη ή φωσφατιδυλοχολίνη, | = φωσφατιδυλοσερίνη ή φωσφατιδυλεθανολαμίνη.

### Σχήμα 2: Απεικόνιση της μεμβράνης των αιμοπεταλίων.

Τα φωσφολιπίδια αποτελούν το κύριο δομικό υλικό της μεμβράνης και αποτελούνται κυρίως από φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, σφιγγομυελίνη, φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλινοσιτόλη. Εξωτερικά, η λιπιδική στιβάδα αποτελείται κυρίως από σφιγγομυελίνη, με ουδέτερο ή αρνητικό φορτίο. Κατά τη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια μετατοπίζονται προς την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, διαδικασία απαραίτητη για τη δημιουργία του συστήματος προθρομβινάσης και το σχηματισμό ινικής. Η εντόπιση των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, όταν τα αιμοπετάλια βρίσκονται σε ηρεμία, αποτελεί τρόπο πρόληψης της ανεξέλεγκτης και απρόσφορης ενεργοποίησης της πήξης (Gresele P, 2002, Bevers EM, 1984).

#### Υποδοχείς αιμοπεταλίων

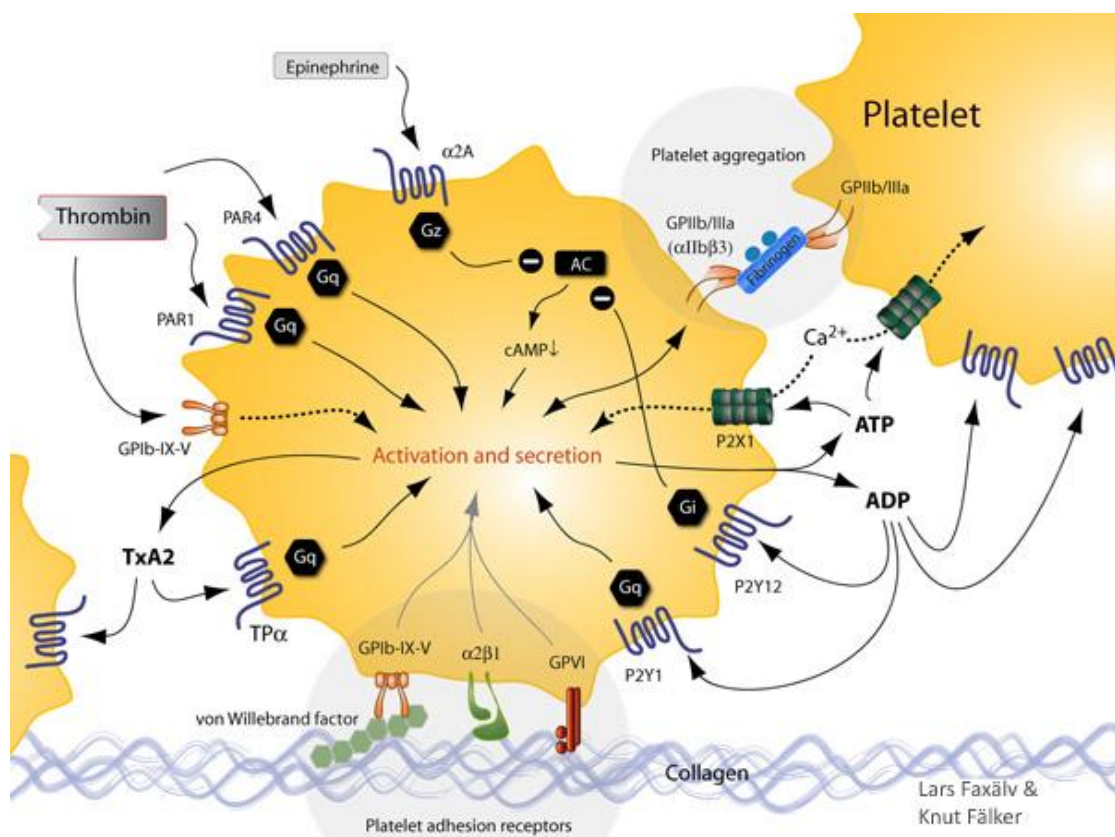
Τα αιμοπετάλια παίζουν βασικό ρόλο στην αιμόσταση. Αρχικά συνδέονται με τα στοιχεία της υπενδοθηλιακής στιβάδας και στη συνέχεια τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια συσσωρεύονται επάνω από τη στιβάδα των προσκολλημένων στο αγγείο αιμοπεταλίων και σχηματίζουν τον αιμοπεταλιακό θρόμβο (αρχική αιμόσταση). Επιπλέον τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε ένα πλήθος φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, όπως η φλεγμονή, η αντιμικροβιακή άμυνα, η ανοσορύθμιση, η νεοπλασματική ανάπτυξη και ο μηχανισμός μεταστάσεων. Απαραίτητη προϋπόθεση για τις διάφορες λειτουργίες των αιμοπεταλίων αποτελεί η ύπαρξη υποδοχέων στην επιφάνεια τους. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ειδικοί για διάφορους αγωνιστές και συγκεκριμένους συνδέτες (ligands) και μπορούν να δέχονται ερεθίσματα από το εξωτερικό περιβάλλον και να τα διαβιβάζουν στο εσωτερικό του κυττάρου και αντίθετα (Beutler E, 2001). Για την ονομασία των υποδοχέων των αιμοπεταλίων, πολλά συστήματα ονοματολογίας έχουν χρησιμοποιηθεί. Ένα από τα πιο διαδεδομένα είναι αυτό που στηρίζει την ονομασία τους στην ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα σε gel πολυακρυλαμίδης. Στην ηλεκτροφόρηση, πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος κινούνται γρηγορότερα από αυτές με υψηλότερο. Έτσι, οι

γλυκοπρωτεΐνες χαρακτηρίστηκαν ως I, II, III, κ.λ.π με πρώτη την GPI, η οποία έχει και το μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

Με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας της ηλεκτροφορητικής μεθόδου, αναγνωρίστηκαν επιπλέον πρωτεΐνες στη ζώνη της GPI, με τη μορφή μη ομοιοπολικών (noncovalent) συμπλεγμάτων, έτσι ώστε κάθε σύμπλεγμα των γλυκοπρωτεϊνών Ib-IX, Ic-IIa και IIb-IIa, να θεωρείται ως μία ενιαία πρωτεΐνη. Επιπλέον ορισμένοι υποδοχείς έλαβαν το όνομα τους από την ειδικότητα και τη λειτουργία την οποία επιτελούν, όπως οι υποδοχείς της βιτρονεκτίνης και της φιβρονεκτίνης (Phillips DR, 1997).

Άλλα συστήματα ονοματολογίας, όπως το VLA (Very Late Antigens), λαμβάνουν υπόψη τους το γεγονός ότι ορισμένοι υποδοχείς ανευρίσκονται και σε άλλα κύτταρα, με προϋπάρχουσα ήδη διαφορετική ονομασία. Η ονοματολογία αυτή όμως δεν έχει επικρατήσει και δεν χρησιμοποιείται για τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων (Hoffman R, 2000).

Σήμερα οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων ταξινομούνται , ανάλογα με τη μοριακή δομή τους, σε τέσσερις κυρίως κατηγορίες, τις ιντεγκρίνες, τους γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς με αλληλουχίες αμινοξέων πλούσιες σε λευκίνη, τις σελεκτίνες και τους **υποδοχείς που ανήκουν στη γονιδιακή υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών.**



**Εικόνα 7: Υποδοχέων των αιμοπεταλίων**

### Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικά γλυκοπρωτεϊνικά ετεροδιμερή συμπλέγματα τα οποία αποτελούνται από μία α και μία β πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι αλυσίδες αυτές κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Τρεις



μείζονες ομάδες ιντεγκρινών έχουν αναγνωρισθεί: η  $\beta 1$ , η  $\beta 2$  και η  $\beta 3$ , ανάλογα με το είδος της  $\beta$  αλυσίδας την οποία φέρουν.

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν έξι τουλάχιστον διαφορετικές ιντεγκρίνες, ( $\alpha 1 \beta 3$  ή  $GP IIb-IIIa$ ,  $\alpha V \beta 3$ ,  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 1$  και  $\alpha L \beta 2$ ) καθεμιά από τις οποίες έχει διαφορετική ειδικότητα και μπορεί να συνδεθεί με μία ή περισσότερες διαφορετικές προσκολλητικές ουσίες (Hynes RO, 1992). Οι ιντεγκρίνες είναι διπλοί υποδοχείς αφού το εξωκυττάριο τμήμα τους είναι υποδοχέας συνδετών της εξωκυττάριας ουσίας ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα είναι υποδοχέας πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος. Ο κυριότερος υποδοχέας είναι το σύμπλεγμα των γλυκοπρωτεϊνών  $IIb-IIIa$ . (Ginsberg MH, 1993, Parise LV, 1989).

#### *$\alpha 1 \beta 3$ (GP IIb-IIIa) ή υποδοχέας ινωδογόνου*

Οι δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες  $\alpha 1 \beta$  και  $\beta 3$  του υποδοχέα  $\alpha 1 \beta 3$  ( $GP IIb-IIIa$ ) συντίθεται στα μεγακαρυοκύτταρα και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, στο χρωμόσωμα 17 (Phillips DR, 1988). Αποτελεί τον πολυπληθέστερο υποδοχέα της μεμβράνης, με 80.000 έως 100.000 μόρια / μη ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο. Ένας επιπλέον αριθμός, που κυμαίνεται από 20.000 με 40.000, βρίσκεται στη μεμβράνη των  $\alpha$ -κοκκίων, στο πυκνό και ανοικτό καναλικό σύστημα. Με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι εσωτερικοί  $GP IIb-IIIa$  υποδοχείς, εξωτερικεύονται και γίνονται μέρος των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης.

Ο υποδοχέας  $GP IIb-IIIa$  μπορεί να μεταφέρει σήματα εντός και εκτός του αιμοπεταλίου, μετά από αλληλεπίδραση με διάφορες ενδοκυττάριας και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως η  $\alpha$  –ακτίνη και η μυοσίνη. Ο κυριότερος συνδέτης της  $GP IIb-IIIa$  είναι το ινωδογόνο. Σε συνθήκες ηρεμίας τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια φέρουν στην επιφάνεια τους μη ενεργοποιημένους υποδοχείς, οι οποίοι δεν μπορούν να συνδεθούν με το διαλυτό ινωδογόνο του πλάσματος. Η ενεργοποίηση όμως των αιμοπεταλίων, προκαλεί ταχείες δομικές μεταβολές του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη θέσεων υψηλής συγγένειας για το ινωδογόνο και τη δημιουργία πολύ ισχυρών συνδέσεων και με τη διαλυτή του μορφή. Το ινωδογόνο δεν παίζει μόνο το ρόλο γέφυρας μεταξύ των αιμοπεταλίων, στη φάση της συσσώρευσης τους, αλλά προκαλεί και τη μεταβίβαση σημάτων από το εξωτερικό στο εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου, μέσω αλληλοδιαδόχων φωσφορυλιώσεων, οι οποίες τελικά οδηγούν σε αλλαγές του κυτταρικού σκελετού.

Εκτός από το ινωδογόνο και άλλες ουσίες αποτελούν, σε μικρότερο βαθμό, συνδέτες του υποδοχέα  $GP IIb-IIIa$ , όπως είναι ο παράγοντας Willebrand, η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη. Η παρουσία του υποδοχέα στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων ανιχνεύεται με τη χρήση των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων  $CD61$  για τις  $\beta$  αλυσίδες και  $CD41$  για τις  $\alpha$  αλυσίδες (Parise LV, 1985, Weisel JW, 1992).

#### *$\beta 1$ -ιντεγκρίνες των αιμοπεταλίων*

Τα αιμοπετάλια διαθέτουν τρεις  $\beta 1$ -ιντεγκρίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο των αγγείων. Οι υποδοχείς αυτοί είναι τα συμπλέγματα:  $\alpha 2 \beta 1$  ( $GP Ia-IIa$ ) ή υποδοχέας του κολλαγόνου,  $\alpha 5 \beta 1$  ( $GP Ic-IIa$ ) ή υποδοχέας της φιβρονεκτίνης και  $\alpha 6 \beta 1$  ( $GP Ic-IIa$ ) ή υποδοχέας της λαμινίνης. Η σύνδεση του κολλαγόνου με τον υποδοχέα  $GP Ia-IIa$ , στην περιοχή της ενδοθηλιακής βλάβης, προκαλεί μετάδοση σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου, τα οποία

ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση και τους GPIIb-IIIa υποδοχείς, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι β1-ιντεγκρίνες ελέγχονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα CD49b, CD49c, για τα τμήματα Ia και Ic αντίστοιχα και με το αντίσωμα CD29 για το τμήμα IIa (Ruoslahti E, 1988, Piotrowicz RS, 1988, Poncz M, 1987).

#### *αVβ3 υποδοχέας ή υποδοχέας βιτρονεκτίνης (Vitronectin receptor)*

Ο υποδοχέας αVβ3 εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb-IIIa. Η β3 αλυσίδα του, είναι εντελώς όμοια με τη β αλυσίδα της GPIIb-IIIa ενώ η αV υποομάδα, είναι ίδια με την GPIIb σε ποσοστό 36%. Μεταξύ των δύο αυτών υποδοχέων όμως, υπάρχει μια σημαντική διαφορά, η οποία σχετίζεται με την πυκνότητα τους στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Έτσι, ενώ η GPIIb-IIIa αποτελεί τον πολυπληθέστερο υποδοχέα της μεμβράνης, η ποσότητα του υποδοχέα αVβ3 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων είναι μόλις 50 έως 100 μόρια. Κύριος συνδέτης του υποδοχέα είναι η βιτρονεκτίνη, μέσω της οποίας τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλώνται στην υπενδοθηλιακή αγγειακή στιβάδα (Fitzgerald LA, 1987). Ο υποδοχέας αυτός αλληλεπιδρά επίσης και με το ινωδογόνο, τον παράγοντα Willebrand και τη θρομβοσπονδίνη και ανευρίσκεται και σε άλλα, πλην των αιμοπεταλίων, κύτταρα. Εκτός από την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, προάγει επίσης και το μηχανισμό της αγγειογένεσης, της απόπτωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που τον εκφράζουν. Η παρουσία του υποδοχέα αVβ3 ελέγχεται με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD51 και CD61 για τα τμήματα αV και β3, αντίστοιχα (Lam SC, 1988).

#### Γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς με αλληλουχίες αμινοξέων πλούσιες σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeat Glycoprotein Receptor)

Τα αιμοπετάλια διαθέτουν στην επιφάνεια τους δύο συμπλέγματα γλυκοπρωτεϊνών, τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία αλληλουχιών αμινοξέων πλούσιων σε λευκίνη στο μόριο τους. Οι υποδοχείς αυτοί είναι το σύμπλεγμα της γλυκοπρωτεΐνης Ib-V-IX και η γλυκοπρωτεΐνη IV.

#### *GPIb-V-IX*

Το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα Ib-V-IX είναι ειδικός υποδοχέας για την πρόσδεση του παράγοντα Willebrand και παίζει κεντρικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις ίνες κολλαγόνου της υπενδοθηλιακής στιβάδας, ακόμη και σε συνθήκες υψηλής διαμητρικής τάσης, που επικρατούν στην αρτηριακή κυκλοφορία. Κάθε υποδοχέας αποτελεί σύμπλεγμα των τεσσάρων υποομάδων, GPIIb, GPIIbβ, GPV και GPIX οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και ελέγχονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα CD42b, CD42c, CD42d και CD42a αντίστοιχα (Lopez JA, 1994, Andrew RK, 1999).

#### *GPIV*

Η ποσοτική έκφραση της GPIV στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ποικίλλει και εκτιμάται ότι κατά μέσο όρο εκφράζονται περίπου 20.000 μόρια / αιμοπετάλιο. Εκτός από τα αιμοπετάλια ανευρίσκεται και σε άλλα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μυϊκά κύτταρα και τα λιποκύτταρα. Ο υποδοχέας GPIV συνδέεται με τη θρομβοσπονδίνη και το κολλαγόνο και ανιχνεύεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα CD36. Μέχρι σήμερα η σημασία της γλυκοπρωτεΐνης αυτής παραμένει ασαφής και φαίνεται ότι ασθενείς με κληρονομική έλλειψη της δεν παρουσιάζουν αιμορραγική διάθεση (Daviet L, 1996).

## Σελεκτίνες

Οι σελεκτίνες είναι ασύμμετρες μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες μεσολαβούν στις αντιδράσεις των λευκών αιμοσφαιρίων με τα αιμοπετάλια και το τοίχωμα των αγγείων. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τρεις τύποι σελεκτινών, η L-σελεκτίνη (LCAM-Leucocyte Cell Adhesion Molecule), η E-σελεκτίνη (ECAM- Endothelial Cell Adhesion Molecule) και η P-σελεκτίνη (PCAM-Platelet Cell Adhesion Molecule ή GMP140).

### *P –σελεκτίνη*

Η P -σελεκτίνη δεν εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων αλλά εντοπίζεται στα α-σωματίδια των αιμοπεταλίων και στα σωμάτια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μετά από την επίδραση διαφόρων διεγερτών (θρομβίνη, ισταμίνη), προκαλείται ταχεία απελευθέρωση της P -σελεκτίνης από τα α-κοκκία και έκφραση της στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά μέσο όρο εκφράζονται περίπου 13.000 μόρια στην επιφάνεια κάθε ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου (McEver RP, 1989). Η P-σελεκτίνη συνδεόμενη με το συνδέτη PSGL -1, προάγει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων (ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων) και των αιμοπεταλίων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και την αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων – λευκοκυττάρων. Με τις διεργασίες αυτές ενεργοποιείται ο μηχανισμός αιμόστασης δεδομένου ότι κατά την ενεργοποίηση κυρίως των μονοκυττάρων απελευθερώνεται ιστική θρομβοπλαστίνη, παράγοντας βασικός για την πυροδότηση της εξωγενούς οδού της πήξης. Η παρουσία P-σελεκτίνης ελέγχεται με τη χρήση του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος CD62P, αυξημένη έκφραση της οποίας αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Geng JG, 1990).

## Γονιδιακή υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin Gene Superfamily, IgSF)

Στους υποδοχείς της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών ανήκουν: ο υποδοχέας PECAM-1, ο υποδοχέας ICAM-2, η GPVI και οι Fc υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Το μόριο των υποδοχέων αυτών έχει επαναλαμβανόμενες περιοχές αντίστοιχες με αυτές των ανοσοσφαιρινών.

### *PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ή CD31)*

Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκτός από τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ανευρίσκεται επίσης και στα ουδετερόφιλα, στα μονοκύτταρα και στα λεμφοκύτταρα. Φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην υπενδοθηλιακή στιβάδα καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα. Ο υποδοχέας ελέγχεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα CD31 (Varon D et al, 1998).

### *ICAM-2 (Intra-Cellular Adhesion Molecule-2 ή CD102)*

Περίπου 2600 μόρια του υποδοχέα βρίσκονται διάσπαρτα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων αλλά και στη μεμβράνη του ανοικτού σωληναριακού συστήματος. Η σημασία του υποδοχέα ICAM-2 δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί, φαίνεται όμως ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκά αιμοσφαίρια. Ο υποδοχέας ελέγχεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα CD102 (Diacono TG, 1994).

### *Υποδοχέας GPVI*

Είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 316 αμινοξέων, το εσωτερικό τμήμα της οποίας συνδέεται με την FcRγ αλυσίδα. Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους υποδοχείς για το κολλαγόνο.

### Fc υποδοχείς των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια διαθέτουν ένα Fc υποδοχέα, τον FcγRIIa, ο οποίος μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όταν αυτά εκτεθούν σε ανοσοσυμπλέγματα ή αυτοαντισώματα, τα οποία στρέφονται κατά των πρωτεϊνών της μεμβράνης τους. Ο FcγRIIa εμπλέκεται επίσης και στη λειτουργία άλλων υποδοχέων, όπως του συμπλέγματος GPIb-IX-V και της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Ειδικότερα, η σύνδεση του υποδοχέα με την ιντεγκρίνη GPIIb-IIIa προκαλεί τη μεταφορά σημάτων προς το εσωτερικό του αιμοπεταλίου, όταν η ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη συνδεθεί με το παράγοντα Willebrand ή το ινωδογόνο. Τα σήματα αυτά είναι απαραίτητα για τη έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων και τη συστολή του θρόμβου (Boylan B, Gao C, Rathore V, et al., 2008.)

### Υποδοχείς θρομβίνης

Η θρομβίνη, εκτός από ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό αιμόστασης, είναι και ισχυρός ενδογενής αγωνιστής των αιμοπεταλίων. Η δράση της θρομβίνης στα αιμοπετάλια πραγματοποιείται μέσω δύο υποδοχέων, οι οποίοι συνδέονται με τις G πρωτεΐνες. Πρόκειται για του υποδοχείς PAR -1 (Protease Activated Receptor -1) και PAR -4 (Protease Activated Receptor -4). Κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών, αρχικά γίνεται πρωτεολυτική διάσπαση της αμινοτελικής περιοχής του υποδοχέα και στη συνέχεια, η αναδιάταξη του μορίου του υποδοχέα επιτρέπει τη σύνδεση των υποδοχέων με τη θρομβίνη. Με τη σύνδεση αυτή μεταφέρονται μηνύματα προς τις G12/18 πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα δραματικές μεταβολές του σχήματος των αιμοπεταλίων, με τη δημιουργία ψευδοποδίων και ρύθμιση της έκκρισης του περιεχομένου των πυκνών κοκκίων (Offermanns S., et al. 1997). Η ενεργοποίηση επίσης των Gq πρωτεϊνών προκαλεί ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης Cβ (PLCβ) ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταροπλασματικού ασβεστίου και ενεργοποίηση των υποδοχέων ινωδογόνου GP IIb/IIIa (Covic L, et al, 2000.).

### Υποδοχείς ADP

Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης εξαρτάται σημαντικά και από τη δράση αυτοκρινών ή παρακρινών παραγόντων όπως, η θρομβοξάνη A2 (TXA2) και το ADP. Η δράση του ADP στα αιμοπετάλια πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων του P2Y1 και P2Y12, οι οποίοι προκαλούν την ενδοκυττάρια ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης Cβ και την αναστολή της δραστηριότητας της αδενυλικής κινάσης, διεργασίες καθοριστικές για την προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Gachet C., 2001).

### **Δομική ζώνη**

Η δομική ζώνη καλείται και ζώνη sol – gel επειδή βρίσκεται σε διαλυτή (sol) φάση ή φάση γέλης ανάλογα με τις μεταβολές πολυμερισμού των μικοϊνιδίων ακτίνης. Ο κυτταροσκελετός (cytoskeleton) των αιμοπεταλίων αποτελείται από την περιφερική δέσμη των μικροσωληναρίων (marginal bundle of microtubules), η οποία αναπτύσσεται ακριβώς κάτω από την υπομεμβρανική περιοχή, μικροϊνίδια (~5nm) ακτίνης και μυοσίνης και τις πρωτεΐνες που συνδέονται με τα ινίδια ακτίνης, όπως η α-ακτίνη, η βινκουλίνη, η ταλίνη, η σπεκτρίνη και η τροπομυοσίνη (Hartwig JH, 1991).

Η περιφερική δέσμη μικροσωληναρίων αποτελείται από 8 με 10 σωληνάκια, διαμέτρου 20-25nm, τα οποία βρίσκονται σε σπειροειδή διάταξη κάτω από την κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου. Δομικό συστατικό των

μικροσωληναρίων αυτών είναι η πρωτεΐνη τουμπουλίνη (tubulin), η οποία υπάρχει με τη μορφή  $\alpha$  και  $\beta$  μονομερών, τα οποία συνδυάζονται σε μικροσωληναριακά πολυμερή. Η περιφερική δέσμη μικροσωληναρίων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων στη φάση ηρεμίας (Shetz MP, 1996).

Η ακτίνη πολυμερίζεται, κυρίως κατά την προσκόλληση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σχηματίζει νημάτια. Η μυοσίνη σχηματίζει επίσης ινίδια μετά από αλληλεπίδραση με τα ινίδια ακτίνης και τα μόρια της  $\alpha$ -ακτίνης. Οι μεταβολές στις πρωτεΐνες αυτές, σε συνδυασμό με την αναδιοργάνωση της περιφερικής δέσμης μικροσωληναρίων τουμπουλίνης, προκαλούν μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων, από αμφίκυρτο δισκοειδές σε σφαιρικό με ταυτόχρονη προσεκβολή ψευδοποδίων. Επιπλέον, στο εσωτερικό του κυττάρου, παρατηρείται κινητοποίηση και κεντρική συσσώρευση των κοκκίων του κυτταροπλάσματος και τελικά απελευθέρωση του περιεχομένου τους. Οι διεργασίες αυτές γίνονται με κατανάλωση ενέργειας η οποία προέρχεται από την υδρόλυση του ATP (Nachmias VT, 1999, Hartwig JH, 1999).

### **Ζώνη των οργανυλλίων**

Η ζώνη αυτή βρίσκεται στο κέντρο των αιμοπεταλίων και αποτελείται από μιτοχόνδρια, υπεροξεισώματα, πυκνά σωμάτια,  $\alpha$  – κοκκία, λυσοσωμάτια και κοκκία γλυκογόνου.

Τα πλέον πολυάριθμα κοκκία είναι τα  $\alpha$ -κοκκία (50 – 80 /αιμοπετάλιο), διαμέτρου ~300 – 500nm. Το περιεχόμενο των  $\alpha$ -κοκκίων απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στα σημεία της αγγειακής βλάβης και για το λόγο αυτό τα  $\alpha$  -κοκκία παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και στο μηχανισμό πήξης του αίματος αλλά και στη φλεγμονή, την επούλωση τραυμάτων και στη παθογένεια της αθηροσκλήρωσης.

Τα  $\alpha$ -κοκκία περιέχουν:

- πρωτεΐνες προσκόλλησης (ινωδογόνο, παράγοντας von Willebrand, θρομβοσπονδίνη)
- πρωτεΐνες του πλάσματος (IgG, αλβουμίνη)
- αυξητικούς παράγοντες ( $\beta$ -θρομβογλοβουλίνη, Platelet Derived Growth Factor – PDGF, Transforming Growth Factor  $\beta$  –TGF $\beta$ )
- παράγοντες πήξης (παράγοντας V)
- πρωτεάσες (μεταλοπρωτεάσες MMP2, MMP9)
- αναστολείς πρωτεασών ( $\alpha$ 2-μακροσφαιρίνη,  $\alpha$ 2-αντιπ्लाσμίνη),
- αγγειογενετικούς παράγοντες (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF, αγγειογενίνη)
- αντιαγγειογενετικούς παράγοντες (PF4, αγγειοστατίνη)
- υποδοχείς και αντιγόνα της μεμβράνης (P-σελεκτίνη, GPIIb/IIIa)

Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς παράγονται στα μεγακαρυοκύτταρα ενώ άλλοι αποθηκεύονται στα  $\alpha$  –κοκκία μετά από ενδοκύττωση από τα αιμοπετάλια (Harison P, 1993, Whiteheart SW, 2001)

Τα πυκνά ή  $\delta$ -κοκκία (dense bodies) είναι μικρά κοκκία, διαμέτρου 250 nm, τα οποία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν χαρακτηριστική πυκνή εμφάνιση. Αποτελούν την αποθήκη ουσιών που παίζουν ρόλο στην αγγειοσύσπασση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, όπως: σεροτονίνη, ισταμίνη, ιόντα ασβεστίου, ATP, ADP. Η μεμβράνη των πυκνών κοκκίων περιέχει επίσης γλυκοπρωτεΐνες όπως η P –σελεκτίνη, ο GPIIb/IIIa και ο GPIb/IX (McNicol A, 1999).

Τα λυσosώματα (lysosomes) ή λ-κοκκία δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα μορφολογικά γνωρίσματα και έτσι η διάκριση τους από τα πυκνά κοκκία είναι δύσχερης. Περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα (β –εξοζαμινιδάση, β-γλυκουρονιδάση, β –γαλακτοσιδάση, καθεψίνες), τα οποία εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και προκαλούν διάσπαση ουσιών, οι οποίες προσλαμβάνονται με φαγοκυττάρωση ή πινοκυττάρωση (Bentfeld-Barker ME, 1982).

Κάθε αιμοπετάλιο περιέχει περίπου 7 μιτοχόνδρια (mitochondria), τα οποία αποτελούν χώρους αποθήκευσης ασβεστίου και παρέχουν ενέργεια για τις διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις.

Τα υπεροξεισώματα (peroxisomes) είναι πολύ μικρά οργανίδια τα οποία περιέχουν ένζυμα, όπως η καταλάση, τα οποία διασπών με οξειδωση οργανικά μόρια παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο τελικά διασπάται σε οξυγόνο και νερό. Συμμετέχουν επίσης στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων και στη το μεταβολισμό των λιπιδίων (Van Den BH, 1996).

Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης ριβosώματα και αγγελιοφόρο RNA και κοκκία γλυκογόνου, τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας, απαραίτητη για το μεταβολισμό τους.

### **Μεμβρανικά συστήματα**

Η μεμβρανική ζώνη περιλαμβάνει δύο τύπος καναλικών συστημάτων.

Το ανοικτό καναλικό σύστημα (Surface Connected Open Canalicular System - OCS) αποτελεί διείσδυση της πλασματοκυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων στο κυτταρόπλασμα. Το σύστημα αυτό επεκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα και επικοινωνεί με την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Λειτουργεί ως αγωγός μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος των αιμοπεταλίων μεταφέροντας ουσίες από και προς το κύτταρο. Επιπλέον αποτελεί χώρο αποθήκευσης γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης (GPIb/IX , GPIIb/IIIa), οι οποίες αποκαλύπτονται προς το εξωτερικό των αιμοπεταλίων, όταν αυτά ενεργοποιηθούν (White JG, 2000).

Το πυκνό καναλικό σύστημα (Dense Tubular System - DTS) προέρχεται από το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων και αποτελεί κύρια αποθήκη ελεύθερων ιόντων ασβεστίου, τα οποία παίζουν τον κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση και το μεταβολισμού των αιμοπεταλίων. Αποτελεί επίσης τόπο παραγωγής των προσταγλανδινών (Behnke O, 1970).

## **ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VON WILLEBRAND**

Ο παράγοντας von Willebrand είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, η οποία παίζει βασικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση:

α) Δρα ως γέφυρα μεταξύ των αιμοπεταλίων και του αγγειακού τοιχώματος στη φάση προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα σημεία της αγγειακής βλάβης και ειδικά στις αρτηρίες. Ο παράγοντας Willebrand συνδέεται κυρίως με το κολλαγόνο τύπου I, III και IV της υπενδοθηλιακής στιβάδας.

β) Συνδέεται, μετά την προσκόλληση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa των αιμοπεταλίων και έτσι γίνεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ταυτόχρονα ο υποδοχέας συνδέεται και με το ινωδογόνο αλλά ο παράγοντας Willebrand φαίνεται ότι είναι ο σημαντικότερος συνδέτης σε συνθήκες αυξημένης ροής(Reininger AJ., 2008).

γ) Είναι μεταφορέας του παράγοντα VIII της πήξης (FVIII). Ο παράγοντας VIII συντίθεται στα ηπατικά κύτταρα. Μετά την απέκκρισή του από το ήπαρ ο FVIII συνδέεται με το μόριο του παράγοντα Willebrand και αποσυνδέεται από αυτόν μετά από διάσπασή του μορίου του από τη θρομβίνη. Η σύνδεση παράγοντα Willebrand – FVIII προστατεύει τον FVIII από την πρωτεολυτική διάσπαση από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, αυξάνει την ημιπερίοδο ζωής του και προάγει την απελευθέρωση του παράγοντα στην κυκλοφορία (Fay PJ., 2006).

Το γονίδιο του παράγοντα Willebrand βρίσκεται στο χρωμοσώματος 12. Ο παράγοντας Willebrand παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποθηκεύεται στα ενδοκυτταροπλασματικά σωμάτια Weibel – Palade. Παράγεται επίσης και από τα μεγακαρυοκύτταρα και αποθηκεύεται στα α – κοκκία των αιμοπεταλίων.

Το 95% του παράγοντα Willebrand, που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εκκρίνεται στο πλάσμα και το υπόλοιπο αποθηκεύεται στα σωμάτια Weibel – Palade. Ο παράγοντας εκλύεται από τα κοκκία μετά από διέγερση του ενδοθηλίου με διάφορους αγωνιστές (θρομβίνη, ισταμίνη, οιστρογόνα, επινεφρίνη, προστακυκλίνη, DDAVP). Ο παράγοντας Willebrand που βρίσκεται στα α – κοκκία των αιμοπεταλίων εκλύεται μόνο μετά από διέγερσή τους. Από τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγονται πολύ μεγάλα πολυμερή του παράγοντα Willebrand, τα οποία στην κυκλοφορία διασπώνται από τη μεταλλοπρωτεϊνάση ADAMTS13 ("a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif no. 13") σε μικρότερα και λιγότερο δραστικά τμήματα. Μόνο τα μεγάλα (υψηλού μοριακού βάρους) πολυμερή, πριν τη διάσπασή τους, διαθέτουν αυξημένες αιμοστατικές ιδιότητες, επειδή διαθέτουν πολλαπλές θέσεις σύνδεσης με το αγγειακό ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια (Dong JF., 2005;).

Το μόριο του παράγοντα Willebrand αποτελείται από 2050 αμινοξέα και διαθέτει θέσεις σύνδεσης για τον παράγοντα VIII, για τους υποδοχείς GPIIb και GPIIb/IIIa των αιμοπεταλίων και για τις ίνες κολλαγόνου τύπου I III και IV (Ruggeri ZM., 2007).

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ**

### **α) Πρωτογενής (αρχική) αιμόσταση**

Η αρχική αιμόσταση περιλαμβάνει: την αγγειακή απάντηση στον τραυματισμό και λειτουργίες αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου των αγγείων και συγκεκριμένα την προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που οδηγούν στο σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου, με τον οποίο τελικά επέρχεται, παροδικά, η επίσχεση της αιμορραγίας.

Ο αγγειακός τραυματισμός έχει επίσης ως άμεσο αποτέλεσμα την καταστροφή ή απομάκρυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θέση της βλάβης, με συνέπεια την αποκάλυψη των στοιχείων της υποενδοθηλιακής στιβάδας. Η υποενδοθηλιακή στιβάδα είναι γνωστό ότι περιέχει αγγειοδραστικούς και ισχυρά θρομβογόνους παράγοντες, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις θέσεις του αγγειακού τραυματισμού.

Τα αιμοπετάλια, υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν προσκολλώνται στο άθικτο ενδοθήλιο λόγω της δράσης του NO, της PGI<sub>2</sub> και του PECAM-1. Με την καταστροφή του όμως του ενδοθηλίου αποκαλύπτεται η υπενδοθηλιακή στιβάδα, η οποία αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου, λαμινίνη, φμπρονεκτίνη και παράγοντα Willebrand. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στην υπενδοθηλιακή στιβάδα μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων. Οι γλυκοπρωτεΐνες GPIa/IIa, GPIV και GPVI συνδέονται με τις ίνες κολλαγόνου, τη φμπρονεκτίνη, τη θρομβοσπονδίνη, τη βιτρονεκτίνη και τη λαμινίνη και μάλιστα σε συνθήκες χαμηλής διατμητικής ροής που επικρατούν στις φλέβες (Andrews RK and Berndt MC., 2004).

Οι γλυκοπρωτεΐνες GPIb-IX-V συνδέονται με τον παράγοντα Willebrand και ειδικά με τα πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, ενώ παράλληλα ο παράγοντας Willebrand συνδέεται με το κολλαγόνο της υπενδοθηλιακής στιβάδας, λειτουργώντας ως γέφυρα μεταξύ των αιμοπεταλίων και του αγγείου. Η σύνδεση των αιμοπεταλίων με τον παράγοντα Willebrand γίνεται σε συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης, που επικρατούν στις αρτηρίες και στα στενευμένα αγγεία (Rivera J, et al., 2000; Sugimoto and M, Miyata S., 2002.).

Έτσι στη φάση αυτή τα αιμοπετάλια προσκολλώνται, απλώνονται και σχηματίζουν μια μονοστιβάδα στα σημεία της αγγειακής βλάβης.

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα στοιχεία της υπενδοθηλιακής στιβάδας και ιδιαίτερα στο κολλαγόνο προκαλεί αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Στη διαδικασία ενεργοποίησης συμμετέχουν μια σειρά από υποδοχείς για αγωνιστές, όπως το ADP, η επινεφρίνη, η θρομβίνη, το κολλαγόνο, και η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), καθώς και διάφοροι οδοί μεταγωγής σήματος και βιοχημικών αντιδράσεων, όπως ο μεταβολισμός φωσφολιπιδίων, η απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και η μετατροπή του σε TXA<sub>2</sub> και η φωσφορυλίωση ενός αριθμού διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν P –σελεκτίνη, η οποία μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων ενώ η αιμοστατική τους δραστηριότητα οφείλεται στην έκθεση αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης και στην απελευθέρωση και ενεργοποίηση του παράγοντα V των αιμοπεταλίων.

Η σύνδεση των αγωνιστών (ADP, επινεφρίνη, θρομβίνη, TXA<sub>2</sub>) με τους υποδοχείς τους ακολουθείται από ενεργοποίηση είτε ειδικών διαμεμβρανικών GTP-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, είτε κινασών τυροσίνης, η οποία οδηγεί σε μετάδοση ενδοκυτταρίων σημάτων και πυροδοτεί τις ενζυμικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, η σύνδεση του παράγοντα Willebrand και του κολλαγόνου με τους αντίστοιχους υποδοχείς των αιμοπεταλίων καθώς και της θρομβίνης και του ADP με τους υποδοχείς PAR-1, PAR-4 και P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> αντίστοιχα προκαλεί ενεργοποίηση των φωσφολιπινάσων C. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (φωσφατιδυλινοσιτόλη) με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό διακυλγλυκερόλης (DAG) και 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (IP3). Η IP3 προκαλεί κινητοποίηση του Ca<sup>2+</sup> από το ενδοπλασματικό δίκτυο του πυκνού σωληνώδους συστήματος προς το κυτταρόπλασμα. Η ενδοκυττάρια αύξηση του Ca<sup>2+</sup> και της DAG ενεργοποιεί της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>, η οποία υδρολύει τα λιπίδια φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλχολίνη της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή αραχιδονικού οξέος. Το αραχιδονικό οξύ, με τη δράση των ενζύμων κυκλοοξυγενάση -1 (COX-1) και συνθετάση της θρομβοξάνης μετατρέπεται σε θρομβοξάνη A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Η TXA<sub>2</sub> που



παράγεται προκαλεί αγγειοσύσπαση και περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Παράλληλα παράγεται κυκλικό AMP (cAMP) από το ATP, με τη δράση της αδενυλκυκλάσης. Η αύξηση των επιπέδων του cAMP αναστέλλει την ενεργοποίηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων. Η αδενυλκυκλάση ενεργοποιείται από παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, την PGI<sub>2</sub> και το NO και αναστέλλεται από το ADP, την TXA<sub>2</sub> και την επινεφρίνη (Offermanns S., 2006).

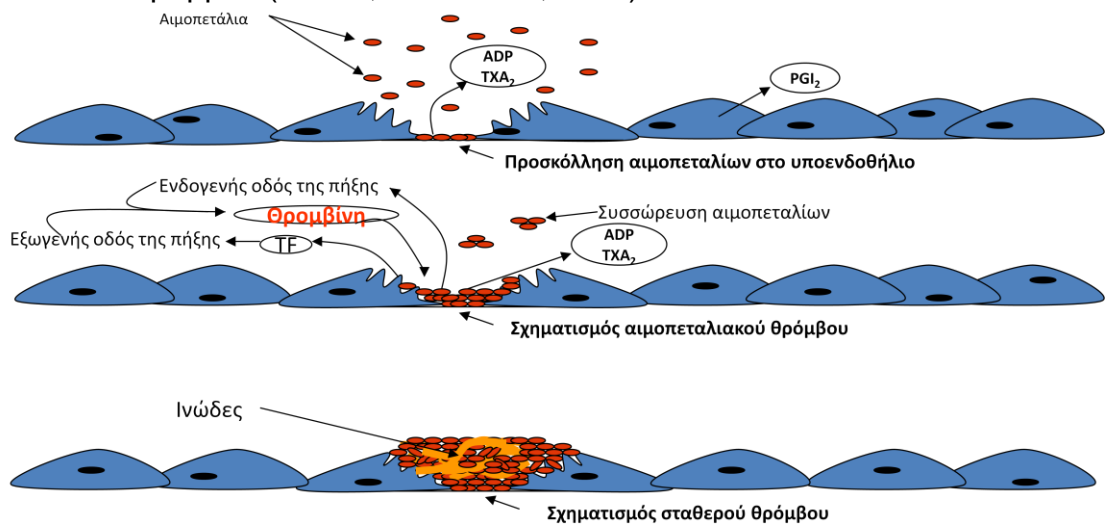
Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκαλεί: α) έκθεση στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων της φωσφατιδυλσερίνης, η οποία προσφέρει θέσεις σύνδεσης στα ένζυμα και τους συμπαράγοντες του πηκτικού μηχανισμού β) αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, γ) έκκριση του περιεχομένου των αποθηκευτικών κοκκίων και δ) συσώρευση των αιμοπεταλίων.

Στο ήρεμο αιμοπετάλιο και με τη δράση διαφόρων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπως σκραμπλάσες, φλιππάσες και φλοππάσες συντηρείται η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης: στην εξωτερική επιφάνεια βρίσκεται κυρίως η φωσφατιδυλοχολίνη ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη και τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup> προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, η οποία γίνεται περισσότερο αρνητικά φορτισμένη. Η έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης μαζί με Ca<sup>2+</sup> προσφέρουν μία επιφάνεια κατάλληλη για την πρόσδεση παραγόντων πήξης και την ανάπτυξη του καταρράκτη της πήξης. Παράλληλα εκλύονται μικροσωματίδια (microparticles, MPs) με φωσφολιπίδια, τα οποία πυροδοτούν το μηχανισμό αιμόστασης (Beveris EM, et al., 1998; Beveris EM, et al, 1991).

Με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup> και της DAG προκαλεί μια σειρά αντιδράσεων (πολυμερισμός της ακτίνης, σύνδεση μυοσίνης - ακτίνης, σύσπαση της περιθωριακής ζώνης), οι οποίες προκαλούν αλλαγή της στερεοδομής του αιμοπεταλίου και τελικά οδηγούν στην αλλαγή του σχήματος τους. Τα αιμοπετάλια χάνουν το δισκοειδές του σχήμα και μετατρέπονται σε ανώμαλες ακανθωτές σφαίρες με ψευδοπόδια (δενδριτική μορφή). Με την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων τα ενδοκυττάρια κοκκία συγκεντρώνονται στο κέντρο του κυττάρου, παρατηρείται σύντηξη της μεμβράνης των κοκκίων με τη μεμβράνη των ενδοκυττάρων σωληναρίων, με αποτέλεσμα την αποκοκκίωση και την έξοδο του περιεχομένου τους στον εξωκυττάριο χώρο. Τα α -κοκκία απελευθερώνουν τους παράγοντες Willebrand, V, XI, XIII, HMWK, ινωδογόνο και β-θρομβογλοβουλίνη ενώ τα δ - κοκκία εκκρίνουν ADP, ATP, σεροτονίνη, κατεχολαμίνες και ιόντα ασβεστίου.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup> κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρίων ενζύμων, που προκαλούν δομικές μεταβολές και έκφραση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{2\text{IIb}}\beta_3$  (GPIIb-IIIa) της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Ο υποδοχέα αυτός στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια προς το ινωδογόνο και τον vWF. Με την ενεργοποίηση όμως το ινωδογόνο και ο vWF καθλώνονται στην επιφάνεια των προσκολλημένων στο αγγειακό τοίχωμα αιμοπεταλίων και λειτουργούν ως γέφυρες ανάμεσα στους GPIIb-IIIa υποδοχείς γειτονικών αιμοπεταλίων. Το συμμετρικό μόριο του ινωδογόνου μπορεί να συνδεθεί με δύο αιμοπετάλια αλλά κάθε αιμοπετάλιο περιέχει

περίπου 50.000 – 80.000 GPIIb-IIIa υποδοχείς στην επιφάνειά του. Η σύνδεση της ιντεγκρίνης GPIIb-IIIa με το ινωδογόνο και τον vWF προκαλεί τη συσσώρευση (συγκόλληση) των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου (Jurk K, Kehrel BE., 2005).



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση του μηχανισμού της αιμόστασης.

### β) Δευτερογενής αιμόσταση

Στη δευτερογενή αιμόσταση βασικό ρόλο παίζουν οι παράγοντες (F) της πήξης (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII), που κυκλοφορούν στο αίμα ως ανενεργά προένζυμα. Οι παράγοντες αυτοί μετατρέπονται από προένζυμα σε ενεργά ένζυμα (Fa), σε ένα «καταρράκτη» αλληλοδιάδοχων αντιδράσεων, με τελικό αποτέλεσμα μια «έκρηξη» παραγωγής θρομβίνης και το σχηματισμό ινικής, η οποία σταθεροποιεί τον αιμοπεταλιακό θρόμβο.

Στον καταρράκτη της πήξης διακρίνουμε δύο οδούς: την εξωγενή και την ενδογενή οδό, που καταλήγουν τελικά στην κοινή οδό, η οποία χαρακτηρίζεται από τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη και του ινωδογόνου σε ινική.

#### Εξωγενής οδός

Ο όρος «εξωγενής» προέρχεται από το γεγονός ότι το στοιχείο που την πυροδοτεί δεν υπάρχει στο πλάσμα. Πρόκειται για τον ιστικό παράγοντα (TF) ή ιστική θρομβοπλαστίνη ο οποίος εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα όχι υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά μετά από καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων ή μετά από διέγερση από ποικίλους παράγοντες, όπως η θρομβίνη, η ενδοτοξίνη, διάφορες κυτταροκίνες και η υποξία. Ο TF ενεργοποιεί τον FVII σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα (TF-FVIIa), το οποίο προκαλεί ενεργοποίηση του FIX και του FX. Ο ενεργοποιημένος FX συνδέεται με το συμπράγοντά του FV και παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  δημιουργείται το σύμπλεγμα προθρομβινάσης.

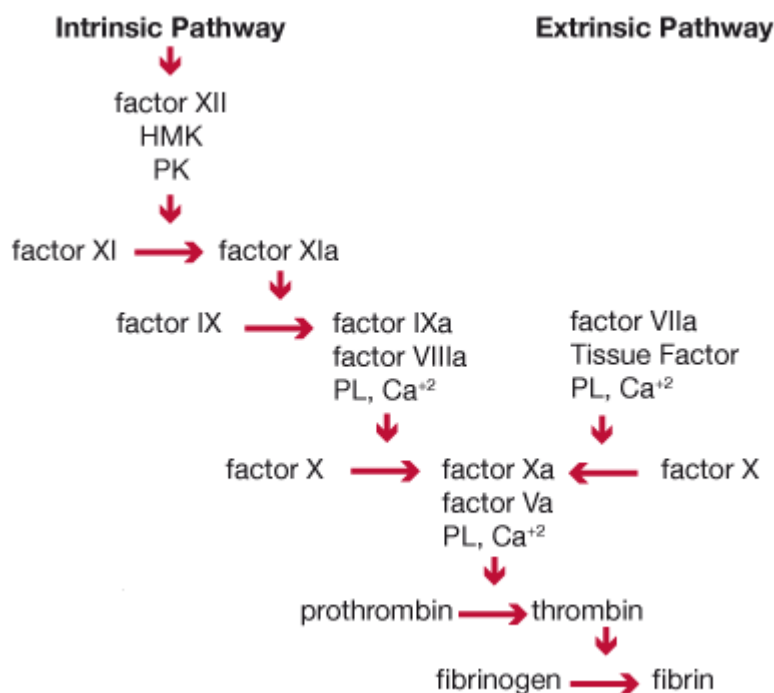
#### Ενδογενής οδός

Η ενδογενής οδός ενεργοποιείται όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες όπως το γυαλί, οι ίνες κολλαγόνου της υπενδοθηλιακής στιβάδας ή η μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Στην ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού συμμετέχουν ο FXII και δύο συμπράγοντες: το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) και προκαλλικρεΐνη. Οι παράγοντες αυτοί σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα και αυτοενεργοποιούνται: η προκαλλικρεΐνη μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη και ο

FXII σε FXIIa. Το σύμπλεγμα FXIIa - καλλικρεΐνης - ΗΜWΚ ενεργοποιεί τον FXI, ο οποίος είναι επίσης προσδεμένος στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια. Ο FXIa προκαλεί ενεργοποίηση του FIX. Ο FIXa και άλλες δύο πρωτεάσες του καταρράκτη, η θρομβίνη και ο ενεργοποιημένος FX, προκαλούν πρωτεολυτική διάσπαση και ενεργοποίηση του FVIII, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται με τον FIXa, με ιόντα  $Ca^{2+}$  και αρνητικά φορτισμένα φωσfolιπίδια της αιμοπεταλιακής μεμβράνης και σχηματίζουν το σύμπλεγμα της *τενάσης* το οποίο ενεργοποιεί τον FX.

#### Κοινή οδός

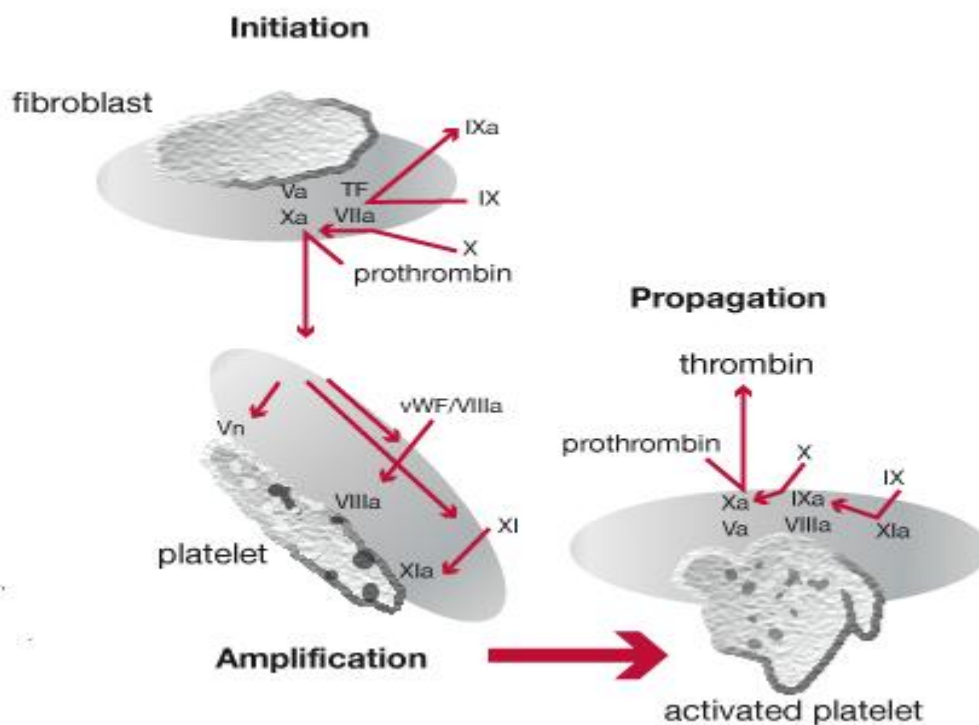
Η κοινή οδός αρχίζει με την ενεργοποίηση του FX, είτε μέσω της ενδογενούς είτε μέσω της εξωγενούς οδού. Ο ενεργοποιημένος FX, παρουσία του FVa, ιόντων  $Ca^{2+}$  και φωσfolιπιδίων, μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τους παράγοντες FV, FXI και VIII αλλά η κύρια λειτουργία της θρομβίνης είναι η πρωτεόλυση του διαλυτού ινωδογόνου σε διαλυτά μονομερή ινικής. Στη συνέχεια τα μονομερή ινικής πολυμερίζονται και σχηματίζουν ένα gel το οποίο παγιδεύει κύτταρα του αίματος. Η θρομβίνη ενεργοποιεί επίσης τον FXIII, ο οποίος στη συνέχεια δημιουργεί πλαγιοτελικούς ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των πολυμερών ινικής και δημιουργεί το δίκτυο σταθερής ινικής το οποίο είναι αδιάλυτο. (Riddel J., et al. 2007).



**Σχήμα 3:** Καταρράκτης της πήξης.

Σήμερα έχει επικρατήσει το κυτταρικό υπόδειγμα της πήξης. Σύμφωνα με το υπόδειγμα αυτό η δευτερογενής αιμόσταση συμβαίνει με διαδοχικά αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενα βήματα στην επιφάνεια κυρίως των αιμοπεταλίων και των κυττάρων τα οποία εκφράζουν τον ιστικό παράγοντα. Στο κυτταρικό μοντέλο αιμόστασης διακρίνουμε τρεις φάσεις: τη φάση έναρξης, τη φάση ενίσχυσης και τη φάση διάδοσης. Η φάση έναρξης συμβαίνει αμέσως μετά την αγγειακή βλάβη, στην επιφάνεια κυττάρων τα οποία εκφράζουν TF, ο οποίος

συνδέεται και ενεργοποιεί τον παράγοντα VII. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην παραγωγή μικρών ποσοτήτων θρομβίνης, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξης που συμμετέχουν στην επόμενη φάση ενίσχυσης. Στη φάση ενίσχυσης το σύμπλεγμα προθρομβινάσης, που αποτελείται από τον ενεργοποιημένο παράγοντα X και τους άλλους παράγοντες του συμπλέγματος, που συνδέονται με την επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, προκαλεί έκρηξη παραγωγής θρομβίνης, η οποία οδηγεί στην τρίτη και τελική φάση της διάδοσης. Στη φάση της διάδοσης το διαλυτό ινωδογόνο μετατρέπεται σε αδιάλυτη ινική με τη δράση της θρομβίνης, η οποία ενεργοποιεί επίσης και τον FXIII. Ο FXIIIa σταθεροποιεί το θρόμβο με τη δημιουργία σταθερού δικτύου ινικής, το οποίο εγκλωβίζει τα στοιχεία του θρόμβου (αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια) (Hoffman M. and Monroe D., 2001).



**Σχήμα 4:** Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού υποδείγματος τη πήξης.

### Φυσικοί ανασταλτές της πήξης

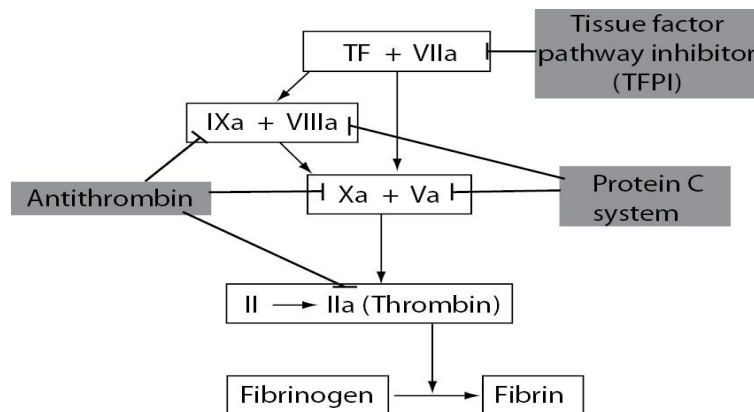
Ο θρόμβος, που δημιουργείται με την πρωτοπαθή αιμόσταση και σταθεροποιείται με την δευτερογενή, περιορίζεται μόνο στο σημείο της βλάβης επειδή υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι ελέγχουν και περιορίζουν την αιμόσταση. Στους μηχανισμούς αυτούς συμμετέχουν:

1. Οι αναστολείς πρωτεασών: αντιθρομβίνη (AT), συμπαράγοντας II της ηπαρίνης, πρωτεΐνη Z και ο ανασταλτής της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI).
2. Το σύστημα πρωτεϊνών C (PC) και S (PS).

Η AT αδρανοποιεί, εκτός από την ελεύθερη θρομβίνη, τους ενεργοποιημένους παράγοντες X, IX, XI, XII και την καλλικρεΐνη. Ο ρυθμός αδρανοποίησης της θρομβίνης και του ενεργοποιημένου FX αυξάνει δραματικά παρουσία ηπαρίνης (Menache D, et al , 1992).

Κατά τη διάρκεια της πήξης η θρομβίνη που παράγεται συνδέεται με την θρομβομοντουλίνη, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όταν συνδέεται με τη θρομβομοντουλίνη η θρομβίνη διασπά και ενεργοποιεί την PC η οποία είναι συνδεδεμένη με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα της PC (EPCR) Στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων η PC συνδέεται με το συμππαράγοντά της PS και το σύμπλεγμα προκαλεί πρωτεολυτική διάσπαση των ενεργοποιημένων παραγόντων V και VIII (Esmon CT., 2003; Heeb MJ, et al, 1994.).

Ο ανασταλτής της οδού του TF (TFPI) αναστέλλει την εξωγενή οδό της πήξης με δύο τρόπους. Αναστέλλει απευθείας τον ελεύθερο ενεργοποιημένο FX και αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα TF-FVIIa-FXa (Lwaleed BA and Bass PS., 2006).



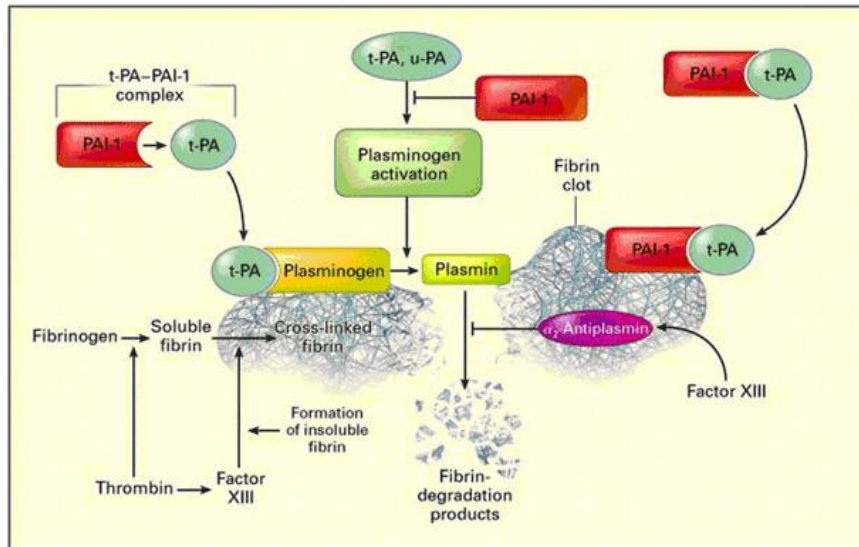
**Σχήμα 5:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού των φυσικών ανασταλτών της πήξης.

### Ινωδόλυση

Η ινωδόλυση αποτελεί έναν επιδιορθωτικό μηχανισμό, μαζί με την αναγέννηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αποκατάσταση του αυλού του αγγείου. Συγκεκριμένα, είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τη διάλυση του θρόμβου μετά την αποκατάσταση της ακεραιότητας του αγγείου. Στην ινωδόλυση η αδιάλυτη ινική αποδομείται και τα προϊόντα αποδόμησης απομακρύνονται από την κυκλοφορία.

Βασικό στοιχείο του ινωδολυτικού συστήματος είναι το πλασμινογόνο (PLG), ένα ανενεργό προένζυμο, το οποίο **ενεργοποιείται μέσω δύο οδών:** με τη δράση του ιστικού τύπου ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA), που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και του τύπου ουροκινάσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (u -PA), που παράγεται από τους νεφρούς και μετατρέπεται στο ενεργό ένζυμο πλασμίνη. Η πλασμίνη διασπά την ινική σε προϊόντα διάσπασης της ινικής (FDPs) και τελικά σε D διμερή (D -dimers). Και η ινωδόλυση έχει φυσικούς ανασταλτές τους ανασταλτές του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI -1 και PAI - 2) και τους ανασταλτές

της πλασμίνης ( $\alpha_2$  –αντιπλασμίνη και  $\alpha_2$  –μακροσφαιρίνη) (Lijnen HR, and Collen D., 1995).



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση του ινωδολυτικού συστήματος.

## ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

Στις διαταραχές της πρωτογενούς αιμόστασης περιλαμβάνονται:

- A) Κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές του αγγειακού τοιχώματος
- B) Κληρονομικές και επίκτητες θρομβοπενίες
- Γ) Κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων
- Δ) Νόσος von Willebrand

Για τη διερεύνηση των διαταραχών της πρωτογενούς αιμόστασης είναι απαραίτητη:

1. Η λεπτομερής λήψη του **ατομικού και οικογενειακού ιστορικού** αιμορραγικής διάθεσης.

Κατά τη λήψη του ιστορικού είναι απαραίτητη η απάντηση των παρακάτω ερωτημάτων:

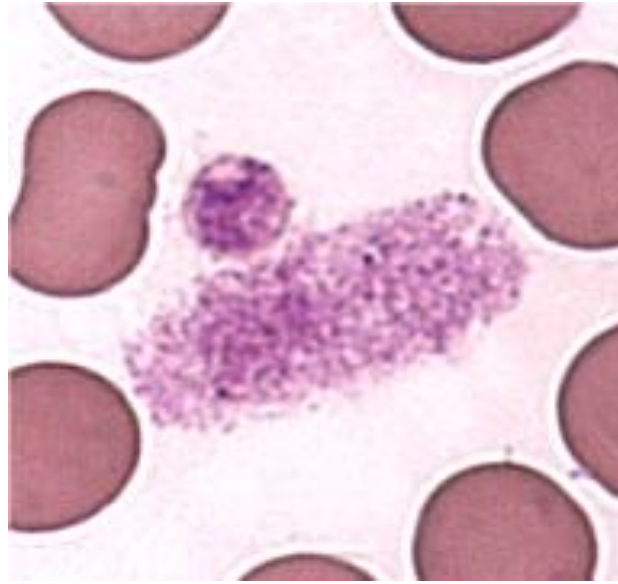
- Οι αιμορραγικές εκδηλώσεις είναι αυτόματες ή προκλητές;
- Η αιμορραγικές εκδηλώσεις είναι κληρονομικές ή επίκτητες; Υπάρχει δηλαδή προηγούμενο ατομικό ή οικογενειακό αιμορραγικό ιστορικό; Οι ασθενείς με κληρονομικές διαταραχές έχουν οικογενειακό ιστορικό αιμορραγιών μόνο όταν η διαταραχή κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο (νόσος von Willebrand) ή φυλοσύνδετο χαρακτήρα (αιμορροφιλία A και B) και εμφανίζουν συμπτώματα από την νεογνική ή παιδική τους ηλικία. Στις επίκτητες διαταραχές οι ασθενείς έχουν αρνητικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, τα συμπτώματα εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ηλικία και συνδυάζονται με κάποιο υποκείμενο νόσημα.
- Οι αιμορραγικές εκδηλώσεις οφείλονται σε διαταραχές της πρωτογενούς (πετέχιες, εκχυμώσεις, αιμορραγίες βλεννογόνων) ή της δευτερογενούς αιμόστασης (αιματώματα, αίμαρθρα, καθυστερημένες αιμορραγίες);

- Λαμβάνει ο ασθενής φάρμακα (αντιπηκτικά, αντιαιμοπεταλιακά, αντιφλεγμονώδη κλπ), τα οποία προκαλούν οι επιδεινώνουν τις αιμορραγικές εκδηλώσεις;
  - Έχει ο ασθενής συστηματική νόσο η οποία προκαλεί την αιμορραγική διάθεση;
2. Την **κλινική εξέταση** για την αναζήτηση αιμορραγικών εκδηλώσεων (πετεχιών, αιμάθρων ή αιματωμάτων, αιμορραγιών των βλεννογόνων ή ενδοκοιλιακών αιμορραγιών με αξονική τομογραφία) αλλά και διογκωμένων λεμφαδένων, διόγκωση ήπατος ή σπλήνα για τη διάγνωση συστηματικού νοσήματος που προκαλεί την αιμορραγική διάθεση.
  3. Την **εργαστηριακή διερεύνηση**. Η διερεύνηση των ασθενών με διαταραχές της πρωτογενούς αιμόστασης είναι συχνά δύσκολη και χρονοβόρα. Η διαγνωστική προσέγγιση περιλαμβάνει αρχικά εξετάσεις για τον αποκλεισμό άλλων και μάλιστα συνηθέστερων διαταραχών της αιμόστασης και στη συνέχεια εξετάσεις οι οποίες αποκαλύπτουν τυχόν διαταραχές της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων:

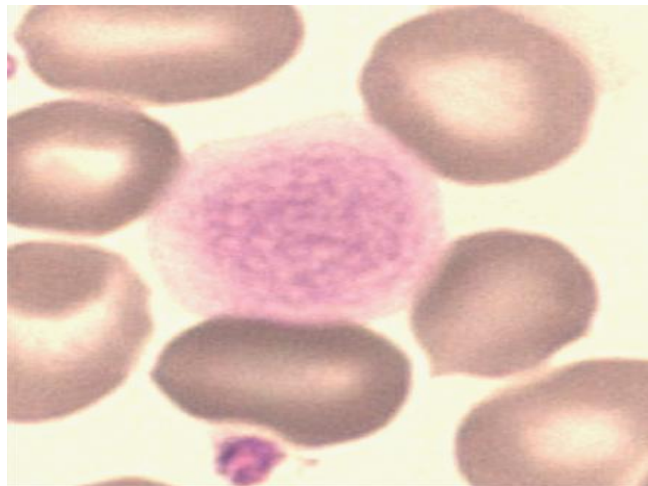
Η **πρώτη φάση** της διερεύνησης της αιμορραγικής διάθεσης περιλαμβάνει τις βασικές εξετάσεις:

- Γενική εξέταση αίματος γίνεται για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό θρομβοπενίας (φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων ~150.000-400.000/μl). Αριθμός αιμοπεταλίων <20.000/μl ενέχει τον κίνδυνο αυτόματης και μερικές φορές θανατηφόρου αιμορραγία. Οι αιμορραγικές εκδηλώσεις εμφανίζονται με τη μορφή πορφυρικού εξανθήματος, ρινορραγιών, ουλορραγιών, μηνο- ή μητρορραγιών, αιμορραγιών από το πεπτικό ή το ΚΝΣ. Ήπια αιμορραγική διάθεση έχουν ασθενείς με χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων αλλά με καλή λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο και υψηλό αριθμό αιμοπεταλίων (>500.000/μl) μπορεί να εμφανίζουν αιμορραγική διάθεση λόγω διαταραχών της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων.
- Με την ανάπτυξη των αυτόματων αναλυτών, μπορεί να αξιολογηθεί η κατανομή και το μέγεθος τους (Μέσος Όγκος Αιμοπεταλίων - MPV-). Ο MPV είναι μια σημαντική παράμετρος, που δίνει σημαντικές πληροφορίες, π.χ. χαμηλές τιμές MPV παρατηρούνται σε διαταραχές όπως τα σύνδρομα Bernard Soulier ή Wiskott-Aldrich. Ο έλεγχος επιχρίσματος του περιφερικού αίματος στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητος για να επιβεβαιωθούν οι διαταραχές και να διενεργηθεί περαιτέρω έλεγχος.
- Επίχρισμα περιφερικού αίματος. Με τη μελέτη του περιφερικού επιχρίσματος γίνεται ακριβέστερη εκτίμηση του αριθμού των αιμοπεταλίων σε περίπτωση ψευδοθρομβοπενίας και παρατηρείται η παρουσία γιγαντιαίων ή παθολογικών αιμοπεταλίων.





**Εικόνα 9:** Επίχρισμα περιφερικού αίματος στο σύνδρομο Bernard Soulier



**Εικόνα 10:** Επίχρισμα περιφερικού αίματος στο σύνδρομο «φαιού αιμοπεταλίου» (Gray Platelet Syndrome)

- Χρόνοι πήξης in vitro (χρόνος προθρομβίνης - PT -, χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης - aPTT -, χρόνος θρομβίνης - TT -). Οι παρατεταμένοι χρόνοι πήξης κατά κανόνα συνδέονται με διαταραχές (ανεπάρκειες) των παραγόντων πήξης. Σε περίπτωση παράτασης των χρόνων πήξης η διερεύνηση επεκτείνεται στον:
  - Προσδιορισμό των επιπέδων του παράγοντα VII (FVII) της πήξης (σε παράταση του PT)
  - Προσδιορισμό των επιπέδων των παραγόντων FVIII, FIX, FXI, FXII της πήξης, διερεύνηση για επίκτητους ανασταλτές της πήξης ή προσδιορισμό του αντιπηκτικού του λύκου (σε παράταση του aPTT).
  - Προσδιορισμό των επιπέδων των παραγόντων FVII, FX, FV και ινωδογόνου (σε παράταση των PT και aPTT).



- Προσδιορισμός των επιπέδων του ινωδογόνου, για τη διάγνωση ή των αποκλεισμό υπο- ή ανινωδογοναιμίας (σε παράταση του TT).
- Προσδιορισμός των αντιγονικών επιπέδων (vWf:Ag) και της δραστηριότητας συμπαράγοντα ριστοσεΐνης (vWf:Ristocetin Cofactor activity) για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό της νόσου von Willebrand.
- Προσδιορισμός των επιπέδων FXIII.

Η **δεύτερη φάση** της διερεύνησης της αιμορραγικής διάθεσης, σε περίπτωση στην οποία τα αποτελέσματα των εξετάσεων της πρώτης φάσης βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων, περιλαμβάνει εξετάσεις με τις οποίες γίνεται η διερεύνηση των διαταραχών του αγγειακού τοιχώματος και της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων.

### Προαναλυτικές μεταβλητές

Οι προαναλυτικές μεταβλητές είναι πολύ σημαντικές για τη διασφάλιση της ποιότητας των προς εξέταση δειγμάτων αίματος, διότι τα αιμοπετάλια είναι επιρρεπή σε in vitro ενεργοποίηση λόγω της ενδογενούς ευαισθησίας τους και κάποιες in vivo παραμέτρους καθώς μπορεί να επηρεάσουν τα εργαστηριακά ευρήματα.

### In vivo παράμετροι

- Πιθανά υποκείμενα νοσήματα.
- Σε λήψη φαρμάκων, όπως η ασπιρίνη, τα αντιφλεγμονώδη, αντιπηκτικά ή αντισυλληπτικά φάρμακα, τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Για το λόγο αυτό συστήνεται αποχή από τα φάρμακα αυτά για 10-14 ημέρες πριν από την εκτέλεση των εργαστηριακών εξετάσεων.
- Έντονη φυσική δραστηριότητα.
- Η βραχεία παραμονή στο κρύο αυξάνει ενώ παρατεταμένη ελαττώνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων.
- Η συστηματική άσκηση δημιουργεί παροδική αύξηση των αιμοπεταλίων και αύξηση στην προσκόλλησις και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
- Το σωματικό και ψυχικό στρες δρα με τρόπο ανάλογο της άσκησης.
- Η συσχέτιση της διατροφής και συγκεκριμένα της καφεΐνης, των λιπαρών οξέων, του σκόρδου και άλλων αρωματικών βοτάνων με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι τεκμηριωμένη. Γι αυτό οι δοκιμασίες θα πρέπει να γίνονται μετά από νηστεία.
- Η επίδραση του καπνίσματος φαίνεται από την μείωση του χρόνου ζωής των αιμοπεταλίων, την αυξημένη προσκόλλησις και αντίδραση απελευθέρωσης τους, την αυξημένη απελευθέρωση του παράγοντα von Willebrand, την αύξηση του ινωδογόνου αλλά και του t-PA. Γι' αυτό συστήνεται αποχή από το κάπνισμα την ημέρα της αιμοληψίας.
- Η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ (μέθη) οδηγεί σε αναστρέψιμη διαταραχή, της αιμόστασης, με παρατεταμένο χρόνο ροής και θρομβοπενία. Επίσης η χρήση <40 ml αλκοόλ ημερησίως έχει ανασταλτική δράση στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και της προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>) (George JN. and Shattil SJ., 1991).

Φάρμακα ή τροφές οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων των αιμοπεταλίων φαίνονται στον πίνακα 1.

### Πίνακας 1

- Αναστολείς κυκλοοξυγενάσης 1 (COX -1)
  - Μη αναστρέψιμη αναστολή της λειτουργικότητας (ασπιρίνη)
- Αναστολείς κυκλοοξυγενάσης 1 και 2 (COX -1, COX -2)
  - Αναστρέψιμη αναστολή της λειτουργικότητας (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα)
- Ibuprofen
- Indomethacin, naproxen
- Mefenamic acid
- Αναστολείς των υποδοχέων των αιμοπεταλίων
  - Abciximab, tirofiban, eptifibatide (GPIIb-IIIa)
  - Ticlopidine, clopidogrel, prasugrel (μη αναστρέψιμη), cangrelor (αναστρέψιμη), ticagrelor (αναστρέψιμη) (P2Y12)
- Αναστολείς φωσφοδιεστεράσης
  - Dipyridamole
  - Cilostazole
- Αντιπηκτικά
  - Ηπαρινοειδή
  - Ανταγωνιστές βιταμίνης K
  - Άμεσοι αναστολείς θρομβίνης
- Φάρμακα για καρδιαγγειακά νοσήματα
  - α- blockers (propranolol)
  - αγγειοδιασταλτικά (nitroprusside, nitroglycerin)
  - διουρητικά (furosemide)
  - αναστολείς διαύλων ασβεστίου
- Αντιμικροβιακά
  - β- λακτάμες (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες)
  - αντιμυκητιασικά (αμφοτερικίνη)
- ανθελονοσιακά (υδροχλωροκίνη)
- νιτροφουραντοΐνη
- Χημειοθεραπευτικά
  - Asparaginase
  - Pllicamycin
  - Vincristine
- Ψυχοτρόπα και αναισθητικά
  - τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (imipramine)
  - φαινοθειαζίδες (chlorpromazine)
  - τοπικά και γενικά αναισθητικά (halothane)
- Θρομβολυτικά φάρμακα
  - Στρεπτοκινάση
  - ουροκινάση
  - ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t-PA)
- Διάφορα φάρμακα
  - Clofibrate
  - δεξτράνες
  - Guaifenesin

- ακτινογραφικά σκιαστικά
- Τροφές /αρωματικά
  - αλκοόλ
  - καφεΐνη
  - κύμινο
  - σκόρδο, κρεμμύδι, ginger
  - dong quai
  - fenugreek
  - ginseng
  - ιχθυέλαια
  - tamarind
  - turmeric
  - βιταμίνες C και E
  - κινέζικα μανιτάρια (Black Tree Fungus).(Kottke-Marchant, and Corcoran G., 2002)

Στην καθημερινή κλινική πρακτική είναι δύσκολο να αποφευχθούν αυτές οι μεταβλητές και έτσι οι εξετάσεις γίνονται λαμβάνοντας τις υπ' όψιν. Αν όμως το αποτέλεσμα είναι παθολογικό συνιστάται επανέλεγχος με νέα αιμοληψία ώστε να τηρηθούν όλες τις προϋποθέσεις.

## **In vitro παράμετροι**

### **Συλλογή δειγμάτων**

- Φλεβοκέντηση. Το δείγμα του αίματος πρέπει να συλλέγεται από περιφερική φλέβα με βελόνα 19-21g για να αποφεύγεται ο τραυματισμός της φλέβας ή η επιβράδυνση της ροής του αίματος που προκαλούν ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται η παρατεταμένη περιδίεση η οποία προκαλεί ενεργοποίηση της αιμόστασης. Σε περίπτωση σύμπτωσης των τοιχωμάτων της φλέβας ή διακοπής της ροής του αίματος κατά την αιμοληψία το δείγμα πρέπει να απορρίπτεται και να επιχειρείται αιμοληψία από άλλο σημείο. Αν το δείγμα ληφθεί από ενδοφλέβιο καθετήρα, θα πρέπει τα πρώτα 5 ml να απορρίπτονται.
- Χρήση κατάλληλου αντιπηκτικού. Οι περισσότεροι αναλυτές λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων απαιτούν τη συλλογή αίματος σε πλαστικά σωληνάρια με αντιπηκτικό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 3.2%. Τα σωληνάρια πρέπει να γεμίζουν ακριβώς μέχρι τη ένδειξη έτσι ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη αναλογία αίματος / αντιπηκτικού η οποία πρέπει να είναι 9:1. Διαταραχή της αναλογίας αυτής μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα κατά τη μελέτη λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Δείγματα αίματος αιμολυμένα, λιπιδαιμικά, ικτερικά ή αυτά που περιέχουν πήγματα πρέπει να απορρίπτονται επειδή επηρεάζουν τα φωτοοπτικά συστήματα των αναλυτών. Τα δείγματα πρέπει να αναδεύονται ήπια με αναστροφή μετά την αιμοληψία τουλάχιστον 6 φορές.
- Εκτέλεση της δοκιμασίας. Για κάποιες από τις δοκιμασίες των αιμοπεταλίων συστήνεται η παραμονή των δειγμάτων ολικού αίματος για 30 λεπτά στο εργαστήριο πριν την εκτέλεση της εξέτασης, επειδή τα αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν κατά την αιμοληψία επανέρχονται στη φάση ηρεμίας μετά 30 λεπτά. Τα δείγματα πρέπει να παραμένουν σε θερμοκρασία 18 – 24°C, να μη ψύχονται ή καταψύχονται, να μην ανακινούνται και να μη μεταφέρονται με πνευματικό ταχυδρομείο.

- Οι δοκιμασίες πρέπει να εκτελούνται εντός 3 – 4 ωρών [Harrison P, et al., 2011]

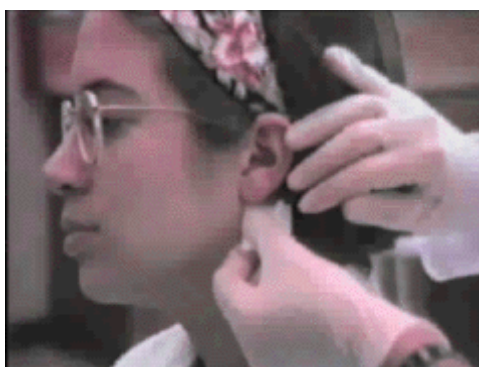
## ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η εργαστηριακή διερεύνηση περιλαμβάνει πρωτίστως τις σφαιρικές δοκιμασίες (χρόνος ροής και PFA-100) οι οποίες προσδιορίζουν συνολικά την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και δίνουν τις αρχικές κατευθύνσεις για πιο ειδικό έλεγχο. Δεν εντοπίζονται εξειδικευμένες διαταραχές αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον αποκλεισμό κάποιας διαταραχής. Εάν το αποτέλεσμα των δύο αυτών δοκιμασιών είναι εντός των φυσιολογικών ορίων, είναι μάλλον απίθανο ότι κάποια διαταραχή των αιμοπεταλίων είναι υπεύθυνη για την αιμορραγική διάθεση. Αν οι παραπάνω διαδικασίες δείξουν διαταραχή στη λειτουργία των αιμοπεταλίων τότε χρειάζονται περαιτέρω εξετάσεις. Οι κυριότερες μέθοδοι ελέγχου της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων είναι:

### ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

#### Χρόνος ροής

Ο χρόνος ροής (BT) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον **Duke** (1910) και μέχρι τις αρχές του 1990 αποτελούσε τη μοναδική δοκιμασία εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. [Lind SE., 2002.] Κατά την δοκιμασία αυτή μετράται ο χρόνος που απαιτείται μέχρις ότου σταματήσει η ροή του αίματος, μετά από προτυποποιημένη τομή με ειδική βελόνα ή νυστέρι, στο λοβό του αυτιού, βάθους περίπου 3 - 4mm, και σκουπίζοντας το αίμα κάθε 30 δευτερόλεπτα με διηθητικό χαρτί. Συνήθως ο χρόνος είναι περίπου 2-5 min.



**Εικόνα 11:** Χρόνος ροής με τη μέθοδο *Duke*.

Μια άλλη μέθοδος μέτρησης του χρόνου ροής που περιγράφηκε από τον **Ivy** (1941). Στη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται τομή ορισμένου μήκους και βάθους στο δέρμα της πρόσθιας επιφάνειας του αντιβραχίου, μετά από εφαρμογή πίεσης 40mmHg με αεροθάλαμο στο βραχίονα με νυστέρι ή αργότερα με ειδικές συσκευές (φυσιολογικός χρόνος 2-10 min).



**Εικόνα 12 :** Χρόνος ροής (μέθοδος Ivy)

### **Πλεονεκτήματα**

- In vivo έλεγχος της αιμόστασης, χωρίς την εμπλοκή άλλων ουσιών.
- Φθηνή μέθοδος που δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμός.

### **Μειονεκτήματα**

- Φτωχή επαναληψιμότητα.
- Χρονοβόρα.
- Χαμηλή ευαισθησία
- Δεν είναι ειδική εξέταση αφού παράταση του χρόνου ροής παρατηρείται στις διαταραχές λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων όπως θρομβοασθένεια Glanzmann, σύνδρομο Bernard-Soulier αλλά και σε διαταραχές των αγγείων και στη νόσο von Willenrand.
- Δεν είναι πρακτική κατά τη διαδικασία χειρουργικών επεμβάσεων.
- Απαιτεί έμπειρους χειριστές.
- Υποκειμενική εκτίμηση του αποτελέσματος.

Το αποτέλεσμα επηρεάζεται από τη συνεργασία του ασθενή, την ποιότητα του δέρματος, τη θερμοκρασία, την ηλικία του ασθενή, τον αριθμό των αιμοπεταλίων και το βάθος της τομής. [Rodgers RP, and Levin J., 1990.]

### **PFA-100**

Το PFA-100 είναι μια συσκευή που εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1996 που εκτιμά τη συνολική λειτουργία των αιμοπεταλίων κάτω από συνθήκες υψηλής διαμητικής τάσης και ελέγχει την ικανότητα των αιμοπεταλίων να προσκολλώνται και να συσσωρεύονται σε συνθήκες που προσομοιάζουν με αυτές in vivo.



**Εικόνα 13:** Συσκευή PFA-100

Στη μέθοδο αυτή ολικό αίμα, μετά από συλλογή με κιτρικό νάτριο αναρροφάται υπό συνθήκες συνεχούς αρνητικής πίεσης από το σωληνάριο μέσω ενός τριχοειδούς και μιας οπής (147 $\mu$ m) στην επιφάνεια μιας μεμβράνης, η οποία επικαλύπτεται με κολλαγόνο και επινεφρίνη (CEPI) ή κολλαγόνο και ADP (CADP). Η παρουσία των αγωνιστών των αιμοπεταλίων σε συνδυασμό με τις συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης (5000 – 6000s<sup>-1</sup>) προκαλεί προσκόλληση, ενεργοποίηση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων, σχηματισμό αιμοπεταλιακής πλάκας και απόφραξη της οπής. Αξιολογείται ο χρόνος κλεισίματος (Closure Time -CT), στον οποίο τα αιμοπετάλια αποφράζουν την οπή της μεμβράνης, η οποία αναπαριστά το τραυματισμένο ενδοθήλιο.

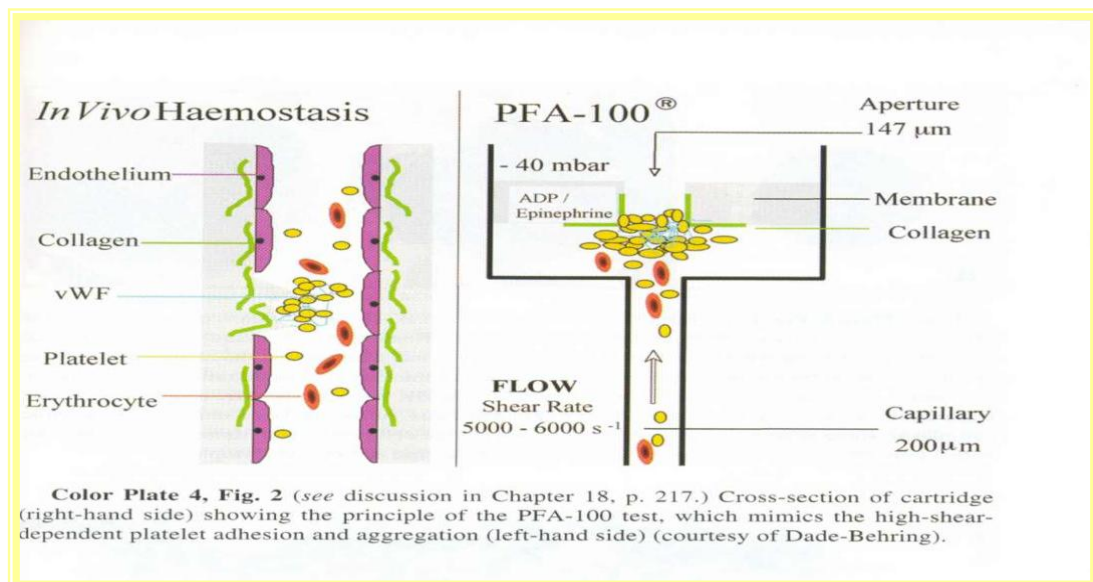
Πλεονεκτήματα:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό.
- Ταχεία εξέταση (μέγιστος χρόνος σύγκλισης 300 sec).
- Απαιτεί μικρή ποσότητα ολικού αίματος (0.8ml/ σωληνάριο) και ιδιαίτερα χρήσιμη για την αξιολόγηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων σε παιδιά.
- Το PFA-100 θεωρείται καλύτερη εξέταση από το χρόνο ροής για την ανίχνευση των διαταραχών της πρωτογενούς αιμόστασης.
- Δεν επηρεάζεται από τους παράγοντες πήξεως και τις διαταραχές του αγγειακού τοιχώματος.

Μειονεκτήματα:

- Τα αποτελέσματα του PFA-100 επηρεάζονται από τις εξής μεταβλητές:
- Συγκέντρωση του κιτρικού νατρίου στο σωληνάριο αιμοληψίας. Σε συγκέντρωση κιτρικού νατρίου 3.2% αντί 3.8% παρατηρείται μείωση του χρόνου κλεισίματος, οπότε πρέπει να χρησιμοποιείται από τα εργαστήρια μια σταθερή συγκέντρωση κιτρικού και καθορισμός τιμών αναφοράς. Οι φυσιολογικές τιμές αναφοράς για συγκέντρωση κιτρικού 3.2% είναι:  
CT: 79 – 164 για το φυσίγγιο CEPI και  
CT: 55-112 για το φυσίγγιο CADP.
  - Η εξέταση πρέπει να πραγματοποιείται εντός των 4 ωρών από την αιμοληψία.

- Τα αποτελέσματα της εξέτασης επηρεάζονται από τον αιματοκρίτη και από τον αριθμό των αιμοπεταλίων. Σε Hct<25% και PLTs<100000/μl, ο CT αυξάνεται προοδευτικά, χωρίς αυτό να σημαίνει απαραίτητα αιμοπεταλιακή διαταραχή.
- Επηρεάζεται από την ομάδα αίματος. Έτσι παρατηρείται παράταση του CT σε ασθενείς με ομάδα αίματος O, επειδή τα άτομα αυτά έχουν χαμηλότερα επίπεδα vWf και καθώς ο CT είναι αντιστρόφως ανάλογος των επιπέδων της δραστηριότητας του vWf στο πλάσμα.
- Επηρεάζεται ακόμη από φάρμακα (ασπιρίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα που αναστέλλουν την κυκλοοξυγενάση A2 και παρατείνουν το CT για το CEPI αλλά όχι για το CADP.
- Η ηλικία φαίνεται να επηρεάζει το CT (νεογνά: μικρός CT λόγω υψηλού Hct και παρουσίας υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών του παράγοντα vWf).
- Μερικά τρόφιμα δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ιδιαίτερα για το CEPI.
- Δεν είναι ευαίσθητη μέθοδος για τη διάγνωση των αιμορροφιλιών (ελλείψεις των FVIII, FIX, FV, FXI και FXII αλλά είναι ευαίσθητη στη διάγνωση της νόσου von Willebrand.
- Μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε διαταραχές των αιμοπεταλίων όπως στη storage pool disease, στο σύνδρομο Hermansky Rudlak, κλπ.



**Σχήμα 7:** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου PFA-100 σε συνθήκες που μοιάζουν με τις *in vivo*.

[Francis JL., 2004, Favaloro EJ., 2001, Posa E, 2003]

**Πίνακας 2: Διαταραχές των αιμοπεταλίων: αποτελέσματα από την εξέταση με PFA-100.**

	<b>CADP</b>	<b>CEPI</b>
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΑΙΜΑ	N	N
Ασπιρίνη, μη στεροειδή N αντιφλεγμονώδη φάρμακα		↑
Διαταραχές υποδοχέα Clopidogrel	ADP, N ή ↑	N ή ↑
BSS	↑	↑
GTT	↑	↑
VWD	↑	↑
Αιμοπεταλιακός τύπος vWD	↑	↑
Ανεπάρκεια πυκνών κοκκίων	N ή ↑	N ή ↑
Πρωτογενής διαταραχή έκκρισης	N ή ↑	N ή ↑
Σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου	↑	↑
Διαταραχές MYH9	N	↑
Σύνδρομο Scott	N	N
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	N ή ↑	N ή ↑
Ηπατοπάθειες	↑ (λόγω αναιμίας)	↑ (λόγω αναιμίας)
Ουραιμία	↑ (λόγω αναιμίας)	↑ (λόγω αναιμίας)

### **Θρομβοελαστογραφία**

Η τεχνική της θρομβοελαστογραφίας πρωτοεφαρμόστηκε από τον Hellmut Hartert το 1948, αλλά η χρήση της παρέμεινε περιορισμένη μέχρι τη δεκαετία του 1980, όταν επαναχρησιμοποιήθηκε στη διαχείριση των προβλημάτων της αιμόστασης, στη διάρκεια μεταμοσχεύσεων ήπατος και καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων με καρδιοπνευμονικό by pass (Jackson GNB, et al, 2009).

Είναι μία εργαστηριακή μέθοδος η οποία μετρά τις μεταβολές στην γλοιότητα και ελαστικότητα του αίματος κατά τη διάρκεια της πήξης και της δημιουργίας του θρόμβου. Η μέθοδος αυτή εκτελείται με δείγμα ολικού αίματος και παρέχει δυνατότητα εκτίμησης των φυσικών ιδιοτήτων του θρόμβου, οι οποίες εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων, του ινωδογόνου και των πρωτεϊνών του πλάσματος. Είναι επομένως εργαστηριακή εξέταση η οποία αφορά και καταγράφει όλες τις φάσεις της αιμόστασης (ενεργοποίηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων, σχηματισμός, σταθεροποίηση, συστολή και τη λύση του θρόμβου - ινωδόλυση -), οι οποίες αντικατοπτρίζουν την αιμόσταση in vivo. Σήμερα είναι διαθέσιμες δύο συσκευές που χρησιμοποιούν τις αρχές της θρομβοελαστογραφίας η TEG (θρομβοελαστογραφία, thromboelastograph - TEG® - ) και η ROTEM (περιστροφική θρομβοελαστομετρία, rotation thromboelastometry - ROTEM® -). Οι αρχές λειτουργίας των δύο μεθόδων είναι παρόμοιες, δεδομένου ότι και δύο μέθοδοι καταγράφουν πληροφορίες σχετικές με τις ιξωδοελαστικό προφίλ του



σχηματιζόμενου θρόμβου, στη διάρκεια της πήξης του αίματος και της ινωδόλυσης, αλλά η ROTEM αποτελεί εξελιγμένη μορφή της TEG και διαφέρει από αυτή στον τρόπο καταγραφής των μεταβολών, στη διάρκεια της διαδικασίας της πήξης, στην ονοματολογία των παραμέτρων και στις φυσιολογικές τιμές.

#### Αρχές λειτουργίας της θρομβοελαστογραφίας

Οι μετρήσεις στις συσκευές θρομβοελαστογραφίας γίνονται σε αυτούσιο ολικό αίμα, χωρίς την προσθήκη αντιπηκτικών και δίνουν τα πλέον αξιόπιστα αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά συχνά χρησιμοποιείται και αίμα η συλλογή του οποίου έγινε σε φιαλίδια τα οποία περιέχουν κιτρικό νάτριο ως αντιπηκτικό. Στις περιπτώσεις αυτές επιβάλλεται η προσθήκη ασβεστίου για την ενεργοποίηση της πήξης πριν την έναρξη της εξέτασης.

Η βασική λειτουργία της TEG περιλαμβάνει την επώαση 360 μl ολικού αίματος στους 37°C, σε ένα θερμαινόμενο κυλινδρικό πλαστικό σωληνάριο. Μέσα στο σωληνάριο βυθίζεται μια ακίδα η οποία συνδέεται με ένα σύστημα ανίχνευσης. Το σωληνάριο και η ακίδα κινούνται συνδυασμένα, με αργή ταλάντωση σε γωνία 4° 45' και με περιοδικό χρόνο 10 κύκλων /λεπτό, με τη διαφορά ότι στην TEG κινείται το σωληνάριο ενώ στη ROTEM κινείται η ακίδα και το σωληνάριο παραμένει σταθερό. Η περιστροφική κίνηση του σωληναρίου μεταδίδεται στην ακίδα μόνο όταν ινίδια αιμοπεταλίων – ινικής που σχηματίζονται στη διάρκεια πήξης του αίματος συνδέσουν μεταξύ τους το σωληνάριο με την ακίδα. Με το σχηματισμό των ινιδίων ινικής η κίνηση του σωληναρίου μεταδίδεται στην ακίδα (TEG) ή παρεμποδίζεται η κίνηση της ακίδας (ROTEM). Η ισχύς των ινιδίων αυτών επηρεάζει το μέγεθος των κινήσεων της ακίδας. Έτσι οι ισχυροί θρόμβοι προκαλούν ταυτόχρονη κίνηση της ακίδας με την κίνηση του σωληναρίου. Καθώς οι θρόμβοι διαλύονται οι συνδέσεις μεταξύ σωληναρίου και ακίδας διασπώνται και η μεταφορά της κίνησης από το σωληνάριο στην ακίδα μειώνεται. Οι κινήσεις της ακίδας, οι οποίες αντανakλούν τις μεταβολές ελαστικότητας του θρόμβου, μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα, από έναν μηχανο - ηλεκτρικό μετατροπέα, το οποίο καταγράφεται σε ένα πρόγραμμα υπολογιστή και γίνεται αυτόματη ανάλυση των αποτελεσμάτων και αποτύπωση σε γράφημα.

Οι συσκευές TEG και ROTEM διαθέτουν έναν αριθμό ανεξάρτητων καναλιών, μέσω των οποίων επιτρέπεται η ταυτόχρονη ή διαδοχική επεξεργασία διαφορετικών δειγμάτων αίματος.

#### Παράμετροι της θρομβοελαστογραφίας (TEG)

- **Χρόνος αντίδρασης (reaction - R - time):** αντιπροσωπεύει το χρόνο από την έναρξη της δοκιμασίας μέχρι τη έναρξη δημιουργίας του θρόμβου και συγκεκριμένα μέχρι τη δημιουργία γραφήματος 2 mm (φ.τ. 15 – 23 min στο αυτούσιο αίμα και 5 – 7 min μετά από προσθήκη καολίνης). Αντικατοπτρίζει τα επίπεδα των παραγόντων χωρίς να σχετίζεται πάντα με τις τιμές των PT ή aPTT.

Αντίστοιχη παράμετρος στη μέθοδο ROTEM: Χρόνος πήξης (Clotting time - CT -)

Παρατείνεται σε:

- Ανεπάρκεια παραγόντων πήξης
- Αντιπηκτική αγωγή

- Σοβαρή υποϊνωδογοναιμία
- Σοβαρή θρομβοπενία

\*Υψηλές τιμές R time είναι ένδειξη χορήγησης FFP.

Μειώνεται σε:

- Σύνδρομα υπερπηκτικότητας

Σε περιπτώσεις στις οποίες απαιτείται ταχεία εκτίμηση της αιμόστασης, στο δείγμα του αίματος προστίθεται ιστικός παράγοντας (tissue factor), ο οποίος προκαλεί ταχεία δημιουργία του μέγιστου μεγέθους του θρόμβου σε 10 min αλλά και βράχυνση του χρόνου R.

Ο χρόνος R είναι ευαίσθητος σε παρουσία ακόμη και ιχνών ηπαρίνης γι' αυτό η χρήση σωληναρίων επικαλυμμένων με ηπαρινάση επιτρέπει την εκτίμηση της αιμόστασης με θρομβοελαστογραφία σε ασθενείς υπό θεραπεία με ηπαρίνη.

- **Χρόνο K (K time):** είναι ο χρόνος που απαιτείται για την διάσπαση του ινωδογόνου από τη θρομβίνη και το σχηματισμό ινικής με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου ορισμένης σταθερότητας (φ.τ. 5 – 10 min στο αυτούσιο αίμα και 1 – 3 min μετά από προσθήκη καολίνη). Αντιστοιχεί στο διάστημα δημιουργίας γραφήματος 2mm – 20mm.

Αντίστοιχη παράμετρος στη μέθοδο ROTEM: Χρόνος σχηματισμού του θρόμβου (Clot formation time - CFT -)

Παρατείνεται σε:

- Ανεπάρκεια παραγόντων πήξης
- Υποϊνωδογοναιμία
- Θρομβοπενία
- Θρομβοκυττοπάθεια

\*Υψηλές τιμές K time είναι ένδειξη χορήγησης κρυσταλλικού (περιέχει παράγοντες VIII, XIII, VWF και ινωδογόνο).

Μειώνεται σε:

- Σύνδρομα υπερπηκτικότητας

- **Γωνία α (α angle):** είναι η γωνία μεταξύ της οριζόντιας γραμμής και της εφαπτόμενης στην καμπύλη στο σημείο εύρους του γραφήματος 2 mm (φ.τ. 22° – 38° στο αυτούσιο αίμα και 53° – 67° μετά από προσθήκη καολίνη). Αντιπροσωπεύει το ρυθμό σχηματισμού του θρόμβου και μετρά την ταχύτητα σχηματισμού της ινικής και της σταθεροποίησης του θρόμβου με τη δημιουργία πλαγιοτελικών δεσμών μεταξύ των ινιδίων ινικής.

Αντίστοιχη παράμετρος στη μέθοδο ROTEM: Γωνία α

Αύξηση της γωνίας α είναι ενδεικτική ταχύτερου σχηματισμού του θρόμβου και παρατηρείται σε:

- Υπερπηκτικές καταστάσεις

Μείωση της γωνίας α παρατηρείται σε:

- Υποϊνωδογοναιμία
- Θρομβοπενία

\* Μείωση της γωνίας α είναι ένδειξη χορήγησης κρυσταλλικού.

- **A5,A10,A15** κλπ: είναι το εύρος που απέκτησε ο θρόμβος σε χρόνους 5,10,15 min
- **Μέγιστο μέγεθος του θρόμβου πριν την ινωδόλυση (maximum amplitude - MA -):** αντιπροσωπεύει τη μέγιστη ισχύ της τελικής αιμοστατικής πλάκας η οποία αποτελείται από ινίδια ινικής και αιμοπετάλια, τα οποία συνδέονται μέσω των GPIIb-IIIa υποδοχέων τους

και σχετίζεται με τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων (φ.τ. 47 – 58 min στο αυτούσιο αίμα και 59 – 68 min μετά από προσθήκη καολίνη). Αντίστοιχη παράμετρος στη μέθοδο ROTEM: Μέγιστη σταθερότητα του θρόμβου (Maximum clotting firmness - MCF -).

Αύξηση του MA παρατηρείται σε:

- Υπερπητικές καταστάσεις

Μείωση του MA παρατηρείται σε:

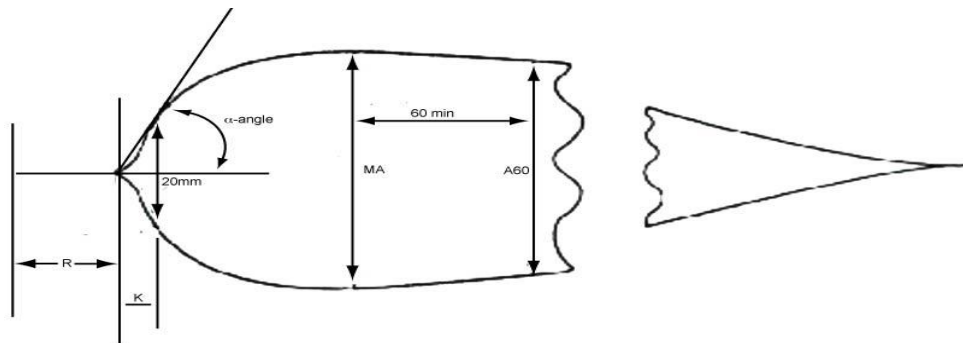
- Υποϊνωδογοναιμία
- Θρομβοπενία
- Θρομβοκυττοπάθεια

\* Μείωση του MA είναι ένδειξη χορήγησης αιμοπεταλίων.

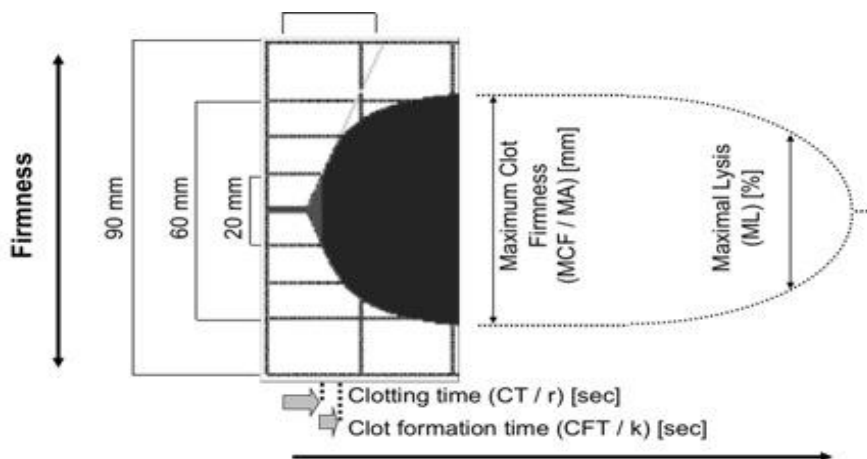
- **Ποσοστό λύσης του θρόμβου σε δεδομένο χρόνο, 30 ή 60 min (Clot lysis, CL30, CL60):** είναι η % μείωση του μεγέθους του θρόμβου 30 ή 60 min μετά την δημιουργία του MA και αποτελεί μέτρο εκτίμησης της ινωδολύσης (φ.τ. <7.5% στο αυτούσιο αίμα).

Αντίστοιχη παράμετρος στη μέθοδο ROTEM: Λύση (Lysis, L30, L45, L60)

\* Αύξηση του CL30 είναι ένδειξη χορήγησης αντινωδολυτικών φαρμάκων.



**Εικόνα 14:** Θρομβοελαστογράφημα (TEG®)



**Εικόνα 15.** Θρομβοελαστομετρία (ROTEM®)

Με τη μέθοδο ROTEM υπάρχει η δυνατότητα εκτέλεσης επιπλέον δοκιμασιών: INTEM: Περιέχει, ως ενεργοποιητές, φωσφολιπίδια και ελλαγικό οξύ και παρέχει πληροφορίες παρόμοιες με αυτές του APTT.

EXTEM: Περιέχει ιστικό παράγοντα, ως ενεργοποιητή και παρέχει πληροφορίες παρόμοιες με αυτές του PT.

HEPTEM: Περιέχει λυοφιλοποιημένης ηπαρίνας για την εξουδετέρωση της ηπαρίνης

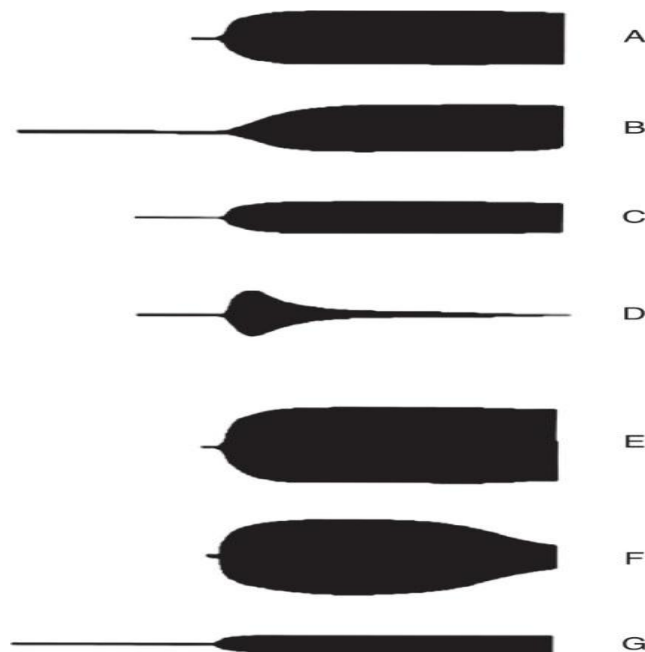
APTEM: Περιέχει απροτινίνη, που εξουδετερώνει την ινωδόλυση.

FIBTEM: Χρησιμοποιείται κυτοχλασίνη D, αναστολέας ο οποίος παρεμποδίζει τη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό του θρόμβου και επιτρέπει την ποιοτική ανάλυση του ινωδογόνου.

ECATEM: Περιέχει Εκαρίνης (Ecarin) και είναι παρόμοιος με το χρόνο πήξης Εκαρίνης. Η δοκιμασία είναι ευαίσθητη στη παρουσία άμεσων ανασταλτών της θρομβίνης (practical-haemostasis.com).

#### Εφαρμογές της θρομβοελαστογραφίας

Η θρομβοελαστογραφία είναι έγκυρη και αξιόπιστη μέθοδος εκτίμησης της αιμόστασης. Παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου «παρά την κλίνη» του ασθενούς ή μέσα στο χειρουργείο και δίνει τη δυνατότητα συνολικής εκτίμησης του αιμοστατικού μηχανισμού εντός 30 λεπτών. Χρησιμοποιείται ευρέως στις μεταμοσχεύσεις ήπατος, τις καρδιοχειρουργικές, νευροχειρουργικές, αγγειοχειρουργικές και μαιευτικές επεμβάσεις, στους πολυτραυματίες καθώς και για την παρακολούθηση και την αξιολόγηση της δράσης ειδικών φαρμάκων όπως οι ανταγωνιστές της γλυκοπρωτεΐνης IIb-IIIa (GPIIb-IIIa antagonists). Με τη μέθοδο αυτή αναγνωρίζεται έγκαιρα ο αιμορραγικός κίνδυνος (μειωμένη σταθερότητα θρόμβου, υπερινωδόλυση) και προβλέπονται ακριβέστερα οι ανάγκες μετάγγισης αίματος ή άλλων παραγώγων αίματος (αιμοπετάλια, FFP). Επιπλέον εφαρμόζεται και στη διερεύνηση του θρομβωτικού κινδύνου σε υπερπηκτικές καταστάσεις και στη χορήγηση ανασυνδυασμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VII (rFVIIa) ή προθρομβινικού συμπλέγματος σε ασθενείς με αιμορροφιλία.



**Σχήμα 8:** Θρομβοελαστογραφήματα. A: Φυσιολογικό, B: παράταση χρόνου K (αντιπηκτική αγωγή, έλλειψη παραγόντων πήξης), C: μείωση MA (θρομβοπενία, αντιαιμοπεταλιακή αγωγή), D: ινωδόλυση, E: υπερπηκτικότητα,

*F: διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, G: τελικό στάδιο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (υποπηκτικότητα). (Raffan-Sanabria F, et al, 2009).*

## **Οπτική (θολωσιμετρική) συσσωματομετρία (Light Transmission Aggregometry - LTA -)**

### **Αρχές της μεθόδου**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, *in vivo*, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο κολλαγόνο της υπενδοθηλιακής στιβάδας, συσσωρεύονται και εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους. Για τη διαδικασία αυτή απαιτείται, εκτός από αιμοπετάλια με ακέραια μεμβράνη και ο παράγοντας von Willebrand (προσκόλληση), το ινωδογόνο του πλάσματος και η φυσιολογική έκκριση του περιεχομένου των οργανυλλίων των αιμοπεταλίων (συσώρευση). Η προσκόλληση, συσώρευση και έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων μελετάται με τη μέθοδο συσώρευσης των αιμοπεταλίων (aggregometry).

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Born και O' Brien το 1962 και έκτοτε αποτελεί το 'gold standard' στη μελέτη της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Μελετά την ικανότητα διαφόρων αγωνιστών να προκαλούν ενεργοποίηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro*. Σήμερα υπάρχει δυνατότητα η μελέτη αυτή να γίνεται σε ολικό αίμα και να συνδυάζεται με μέτρηση της έκκρισης του ADP από τα πυκνά σωμάτια των αιμοπεταλίων (Born GVR., 1962).

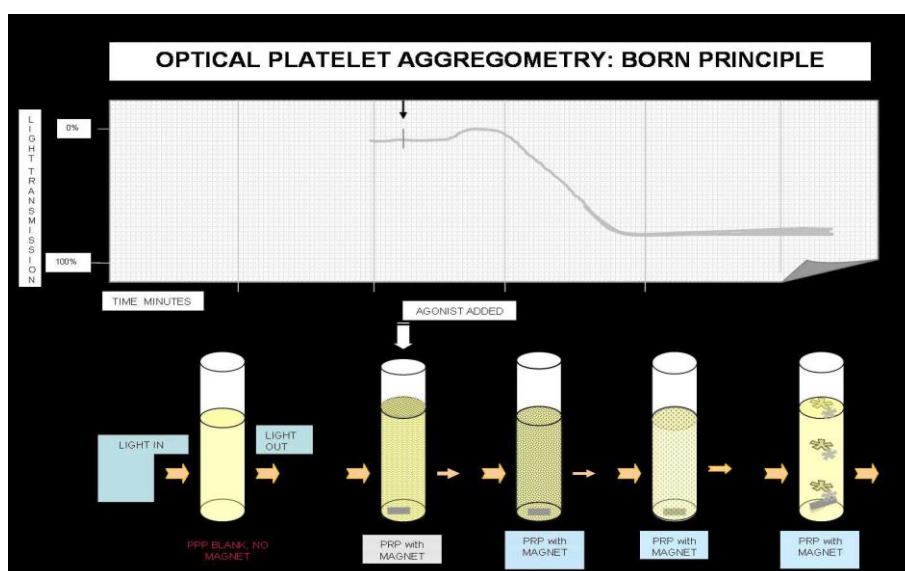
Στην κλασσική μέθοδος του Born χρησιμοποιείται δείγμα αίματος (~12 – 15ml) το οποίο συλλέγεται σε φιαλίδια που περιέχουν κιτρικό νάτριο 03.2%, σε αναλογία 1:9 και διατηρείται σε θερμοκρασία 18° - 24°C. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 170 - 200g για 10 - 15 λεπτά και από αυτό αποχωρίζεται και χρησιμοποιείται το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma - PRP), που περιέχει ~ 200 – 400 x 10<sup>9</sup>/L αιμοπετάλια. Το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma - PPP) λαμβάνεται από το υπόλοιπο αίμα το οποίο φυγοκεντρείται στα 1500g για 15 λεπτά. PPP και PRP μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια και παραμένουν για τουλάχιστον 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο PRP είναι υψηλός, η μέτρηση γίνεται μετά από προσαρμογή των τιμών στις ~ 200 – 400 x 10<sup>9</sup>/L, που επιτυγχάνεται με αραιώση του PRP στο PPP του ασθενούς. Το PRP πρέπει πάντα να αποθηκεύεται σε ερμητικά πωματισμένα σωληνάκια, τα οποία τα γεμίζουμε εντελώς, ώστε να αποφευχθούν αλλαγές του pH, που επηρεάζουν τη συσώρευση των αιμοπεταλίων και τις δοκιμασίες απελευθέρωσης των νουκλεοτιδίων. Οι μετρήσεις πρέπει να γίνονται εντός 3 ωρών από την αιμοληψία και τουλάχιστον 30 λεπτά μετά την παρασκευή του PRP (Christie DJ, et al. ) Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι οι συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων απορροφούν λιγότερο φως από το PRP και επομένως η μετάδοση του αυξάνει και ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα της συσκευής. Το μέγεθος και ο ρυθμός μεταβολής της οπτικής πυκνότητας εξαρτάται από το είδος του αγωνιστή που προκαλεί τη συσώρευση των αιμοπεταλίων.

### **Μέθοδος**

Η μελέτη γίνεται με τη χρήση ειδικού συσσωματομέτρου (aggregometer), που είναι ένα φωτόμετρο και φέρει μια πηγή φωτός, υποδοχείς δοκιμαστικών σωληναρίων, περιστροφικό μαγνήτη συνδεδεμένο με μια μεταλλική ράβδο ανάδευσης, που τοποθετείται μέσα στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων,

θερμοστάτη για διατήρηση της θερμοκρασίας του δείγματος στους 37°C και οπτικό σύστημα, το οποίο υποδέχεται το φως και το μετατρέπει σε ηλεκτρονικό σήμα, που αποθηκεύεται ή εκτυπώνεται με γραφίδα υπό μορφή καμπύλης.

Το PRP (0.5 – 1 ml) τοποθετείται στη συσκευή, η οποία έχει προθερμανθεί στους 37°C, σε κυβελίδα η οποία βρίσκεται μεταξύ της φωτεινής πηγής και του ανιχνευτή φωτός και περιέχει μία ράβδο ανάδευσης. Η ράβδος περιστρέφεται μαγνητικά στα 800 - 1200 rpm και η μετάδοση του φωτός διαμέσου του πλάσματος καταγράφεται από το φωτόμετρο ως 0% για το PRP και 100% για PPP. Μετά από θέρμανση του PRP στους 37°C για 2 λεπτά προστίθενται οι αγωνιστές, αρχικά σε χαμηλές δόσεις και στη συνέχεια, αν δεν υπάρχει απάντηση, σε υψηλότερες. Με την προσθήκη των αγωνιστών (κολλαγόνο, ADP, θρομβίνη, αδρεναλίνη, ριστοσετίνη, κλπ), τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, αλλάζουν σχήμα και μετατρέπονται από αμφίκιcloι δίσκοι σε ακανθωτές σφαίρες.



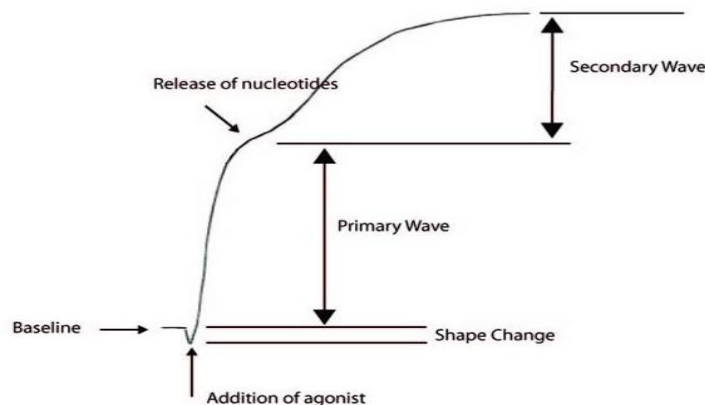
**Εικόνα 16:** Οπτική (θολωσιμετρική) μέθοδος συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Η αλλαγή σχήματος προκαλεί παροδική μείωση της μετάδοσης (απορρόφησης) του φωτός, η οποία όμως ακολουθείται από μεγάλη αύξηση της μετάδοσης (100%) λόγω του σχηματισμού των συσσωρευμάτων των αιμοπεταλίων.

Η καταγραφόμενη απάντηση των αιμοπεταλίων στους αγωνιστές περιλαμβάνει: τη λανθάνουσα φάση (lag phase), την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, την πρωτογενή και τη δευτερογενή συσσώρευση των αιμοπεταλίων ενώ οι παράμετροι οι οποίοι μετρώνται είναι ο ρυθμός (slope) της συσσώρευσης και το μέγεθος ή το ποσοστό (επί τοις %) της συσσώρευσης σε μία ορισμένη χρονική περίοδο (Hayward CP, et al., 2008).

## Αγωνιστές των αιμοπεταλίων

Υπάρχουν δύο τύποι αγωνιστών των αιμοπεταλίων: οι ισχυροί (κολλαγόνο, θρομβίνη, TXA<sub>2</sub>) που προκαλούν άμεσα συσώρευση των αιμοπεταλίων, σύνθεση TXA<sub>2</sub> και έκκριση των κοκκίων και οι ασθενείς (ADP, επινεφρίνη), που προκαλούν συσώρευση, χωρίς έκκριση των κοκκίων. Οι ισχυροί αγωνιστές, όταν χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, δρουν ως ασθενείς αγωνιστές, ενώ οι ασθενείς αγωνιστές ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν δρουν ως ισχυροί αγωνιστές. Με την προσθήκη μερικών ασθενών αγωνιστών, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η καμπύλη συσώρευσης είναι διφασική και αποτελείται από ένα πρωτογενές κύμα, το οποίο είναι αναστρέψιμο και ένα δευτερογενές που είναι μη αναστρέψιμο και οφείλεται στην απελευθέρωση του περιεχομένου των πυκνών κοκκίων και κυρίως του ADP. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των αγωνιστών τα δύο αυτά κύματα συνδυάζονται σε ένα. Επιπλέον, η συσώρευση που προκαλείται από ένα αγωνιστή ενισχύεται από την παραγόμενη από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης TXA<sub>2</sub> και από το εκκρινόμενο από τα πυκνά κοκκία ADP.



Σχήμα 9: Διφασική καμπύλη συσώρευσης αιμοπεταλίων

- ADP (χαμηλές δόσεις: 1, 2.5, 5  $\mu\text{mol/L}$ , υψηλή δόση: 10  $\mu\text{mol/L}$ )  
Το ADP συνδέεται με τον υποδοχέα P2Y<sub>1</sub> στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, προκαλεί μεταβολές του σχήματος των αιμοπεταλίων, κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και τη δημιουργία διφασικής καμπύλης συσώρευσης. Η καμπύλη αποτελείται από ένα πρωτογενές κύμα συσώρευσης (αναστρέψιμο) και ένα δευτερογενές κύμα (μη αναστρέψιμο) που είναι αποτέλεσμα της έκκρισης ADP από τα αποθηκευτικά κοκκία. Η σύνδεση του ADP με τον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> προκαλεί συσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω αναστολής της αδενυλκυκλάσης. Ο P2Y<sub>12</sub> είναι υποδοχέας – στόχος της κλοπιδογρέλης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγεται ένα ενιαίο αναστρέψιμο πρωτογενές κύμα με προσθήκη  $\leq 1 \mu\text{mol/l}$  ADP, διφασική συσώρευση με προσθήκη 2.5  $\mu\text{mol/l}$  και ένα ενιαίο μη αναστρέψιμο κύμα με προσθήκη 5 ή 10  $\mu\text{mol/l}$ .
- Κολλαγόνο (1, 4  $\mu\text{g/mL}$ )  
Το κολλαγόνο συνδέεται με τους υποδοχείς GpVI and GPIa-IIa των αιμοπεταλίων και προκαλεί έκκριση των αποθηκευτικών κοκκίων, παραγωγή TXA<sub>2</sub>, ενεργοποίηση των GPIIb-IIIa υποδοχέων και συσώρευση των αιμοπεταλίων. Με την προσθήκη 1 ή 4  $\mu\text{g/mL}$  κολλαγόνου παρατηρείται μονοφασική (χωρίς πρωτογενές κύμα) απάντηση μετά από μια φάση

υστέρησης (lag phase), η οποία δε διαρκεί περισσότερο από 1 λεπτό. Αναστολή της συσσώρευσης με προσθήκη κολλαγόνου παρατηρείται σε διαταραχές της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, σε διαταραχές έκκρισης των κοκκίων και σε λήψη ασπιρίνης ή μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Zhou L, Chmaier A., 2005).

- Ριστοσεΐνη (χαμηλές δόσεις: 0.5 mg/mL / υψηλή δόση: 1.5, 5 mg/mL)

Η ριστοσεΐνη προκαλεί συγκόλληση των αιμοπεταλίων, μέσω του VWF και του υποδοχέα GPIIb-IX-V, χωρίς μεταβολή του σχήματος τους, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις η συσσώρευση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσω του ινωδογόνου να των υποδοχέων GPIIb-IIIa. Μονοφασική ή διφασική απάντηση παρατηρείται σε προσθήκη 1.2 mg/ mL ριστοσεΐνης. Η απάντηση σε χαμηλή συγκέντρωση ριστοσεΐνης (0.5 mg/ mL) είναι παθολογική και χαρακτηρίζει τη νόσο von Willebrand τύπου IIB. Τα αιμοπετάλια ασθενών με νόσο von Willebrand, πλην αυτών με νόσο τύπου IIB εμφανίζουν μικρή ή μηδενική απάντηση ακόμη και σε υψηλές δόσεις ριστοσεΐνης και φυσιολογική απάντηση στους υπόλοιπους αγωνιστές. Η διαταραχή διορθώνεται μετά την προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος (εξωγενής προσθήκη παράγοντα von Willebrand). Στο σύνδρομο Bernard-Soulier παρατηρείται επίσης μειωμένη απάντηση στη ριστοσεΐνη, η οποία δεν διορθώνεται με την εξωγενή προσθήκη πλάσματος (Budde U, et al. ,2002).

- Αδρεναλίνη (επινεφρίνη) (5, 10 μmol/L)

Η αδρεναλίνη συνδέεται με τους  $\alpha_2$  – αδρενεργικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, προκαλεί αναστολή της αδενυλκυκλάσης, αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και τελικά συσσώρευση των αιμοπεταλίων, παρόμοια με αυτή που προκαλεί το ADP. Όπως και με το ADP, η συσσώρευση αναστέλλεται από την ασπιρίνη και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Διφασική συσσώρευση παρατηρείται με προσθήκη 5 - 10 μmol/L αδρεναλίνης. Τα αιμοπετάλια περίπου 10% των φυσιολογικών ατόμων δεν ανταποκρίνονται στην αδρεναλίνη.

- Αραχιδονικό οξύ (500 μg/mL)

Το αραχιδονικό οξύ είναι πρόδρομη ουσία της TXA<sub>2</sub>. Μετατρέπεται σε TXA<sub>2</sub> με τη δράση των ενζύμων κυκλοξυγενάση και συνθετάση της θρομβοξανθίνης. Η TXA<sub>2</sub> προκαλεί έκκριση των κοκκίων, περεταίρω παραγωγή TXA<sub>2</sub> και ενεργοποίηση των GPIIb-IIIa υποδοχέων. Μονοφασική ή διφασική απάντηση παρατηρείται μετά από προσθήκη 500 μg/mL αραχιδονικού οξέος. Ελαττωμένη απάντηση στο αραχιδονικό παρατηρείται σε λήψη φαρμάκων τα οποία αναστέλλουν την κυκλοοξυγενάση (ασπιρίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα).

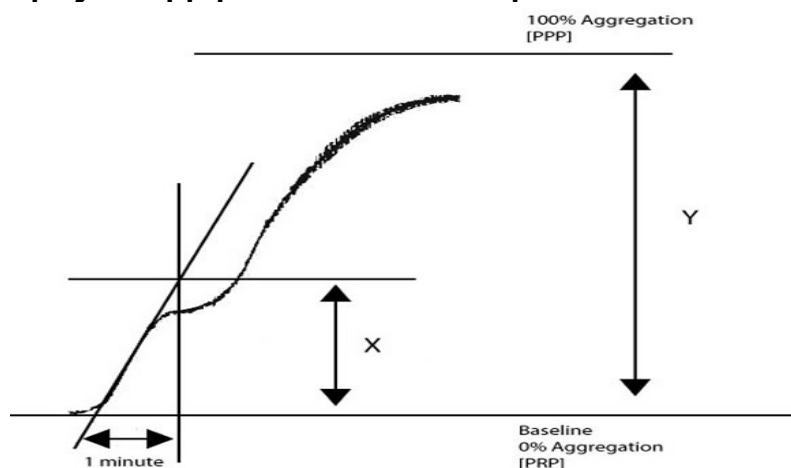
- Θρομβίνη (χαμηλή δόση: 50nm/L, υψηλή δόση: 100nm/L)

Η θρομβίνη συνδέεται με του υποδοχείς PAR1 και PAR4 των αιμοπεταλίων. Σε χαμηλές δόσεις προκαλεί αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων ενώ σε υψηλές πλήρη συσσώρευση τους (Laffan MA, Bradshaw AE., 1995).

Σε εξειδικευμένα εργαστήρια χρησιμοποιούνται περισσότεροι και πλέον εξειδικευμένοι αγωνιστές όπως η γ θρομβίνη και το U-46619, που στοχεύουν τους υποδοχείς θρομβίνης και θρομβοξανθίνης αντίστοιχα, τα πεπτιδία TRAP που στοχεύουν τους υποδοχείς PAR-1 (SFLLRN) και PAR-4 (AYPGKF), Calcium ionophore – A23187 και phorbol 12-myristate 13 acetate, που ανιχνεύουν διαταραχές της κινητοποίησης του ασβεστίου και της πρωτεϊνικής κινάσης C αντίστοιχα (Harrison P, et al. ,2011).



## Υπολογισμός και ερμηνεία των αποτελεσμάτων



Το ποσοστό (%) της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξάγεται από το πηλίκο της διαίρεσης της απόστασης μεταξύ της βασικής γραμμής (baseline), δηλαδή της συσσώρευσης στο PRP (0%) και της συσσώρευσης στο PPP (100%), προς τη μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

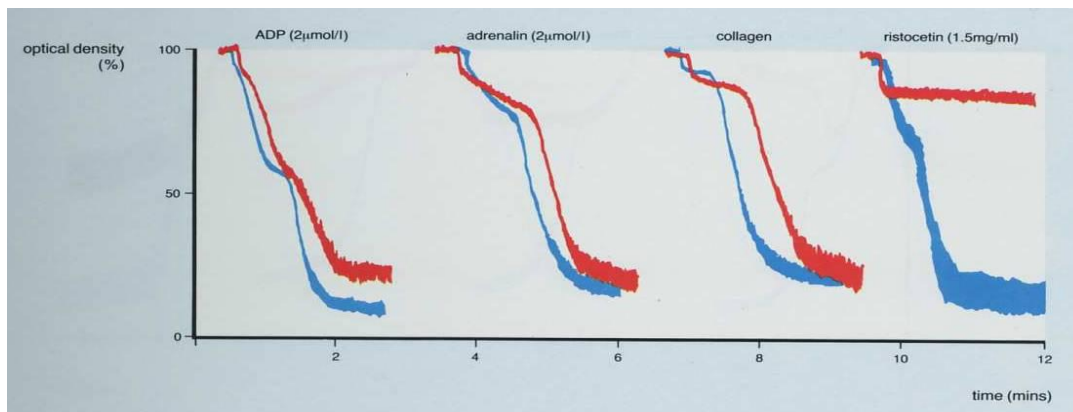
Ο υπολογισμός του ρυθμού (slope) της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων γίνεται ως εξής:

- Σχεδιάζουμε μια γραμμή εφαπτόμενη της καμπύλης συσσώρευσης
- Μετράμε πόσα mm καταγράφει η καταγραφική συσκευή σε 1 λεπτό
- Μετράμε, σε mm, από το σημείο όπου η εφαπτόμενη τέμνει τη βασική γραμμή (baseline) μέχρι την απόσταση ίση με ένα λεπτό
- Σχεδιάζουμε μια γραμμή κάθετη στη βασική γραμμή από το σημείο «1 λεπτό» μέχρι το σημείο τομής της εφαπτόμενης και μετράμε, σε mm, την απόσταση από τη βασική γραμμή μέχρι το σημείο τομής της εφαπτόμενης (X)
- Υπολογίζουμε το μέγιστο ύψος συσσώρευσης στον άξονα y (Y)
- Ο ρυθμός συσσώρευσης (slope) των αιμοπεταλίων είναι το πηλίκο της διαίρεσης  $X/Y$ .

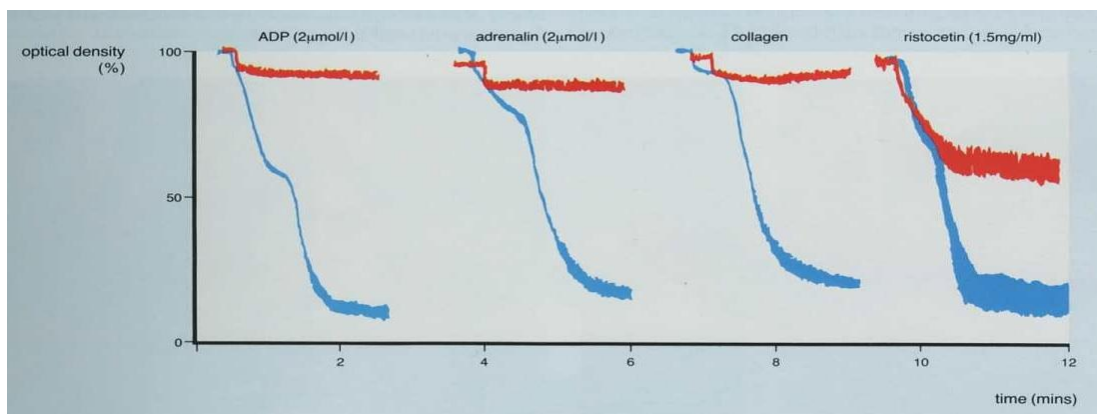
Η LTA είναι διαγνωστική κυρίως:

- Στην θρομβασθένεια Glanzmann και στην ανινωδογοναιμία, όπου παρατηρείται διαταραχή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στην προσθήκη όλων των αγωνιστών πλην της ριστοσετίνης (μόνο πρωτογενές κύμα) (παράδειγμα 1).
- Στο σύνδρομο Bernard Soulier και στη νόσο von Willebrand, όπου δεν παρατηρείται συσσώρευση παρουσία ριστοσετίνης (παράδειγμα 2).
- Στην ανεπάρκεια υποδοχέων κολλαγόνου παρατηρείται ανεπαρκής συσσώρευση με την προσθήκη κολλαγόνου.
- Στην ανεπάρκεια των υποδοχέων  $TXA_2$  τα αιμοπετάλια δεν συσσωρεύονται παρουσία  $TXA_2$  ή αραχιδονικού οξέος.
- Στην ανεπάρκεια των δ-κοκκίων (Storage Pool Disease) παρατηρείται αναστρέψιμη και μονοφασική συσσώρευση αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές (αδρεναλίνη, ADP, κολλαγόνο), γεγονός που υποδηλώνει αδυναμία έκκρισης του περιεχομένου των κοκκίων ή ανεπάρκεια των κοκκίων των αιμοπεταλίων (παράδειγμα 3).

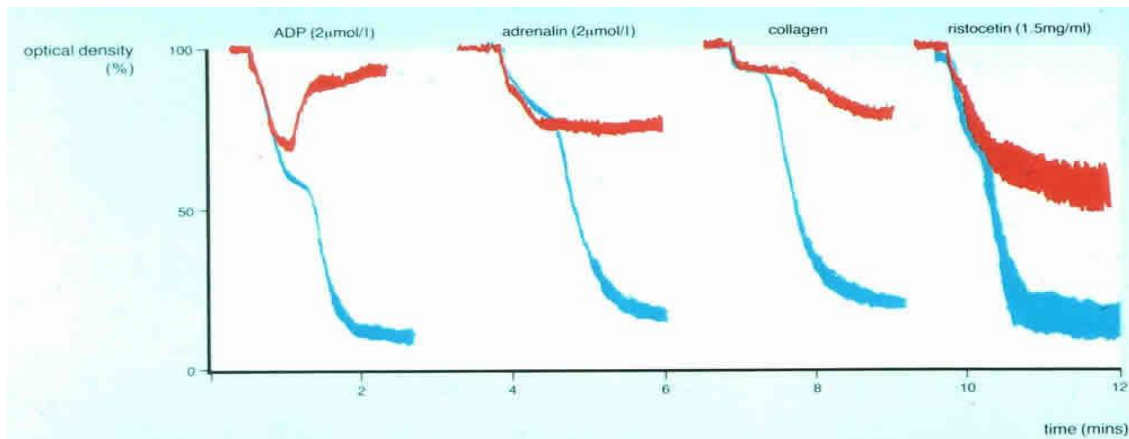
- Στην ανεπάρκεια των P2Y<sub>12</sub> υποδοχέων παρατηρείται αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από προσθήκη ADP.
- Στο σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου (gray platelet syndrome) παρατηρείται μείωση της συσσώρευσης στο κολλαγόνο, την θρομβίνη και το ADP.
- Σε λήψη ασπιρίνης ή διαταραχές της οδού της κυκλοοξυγενάσης παρατηρείται απουσία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από προσθήκη αραχιδονικού οξέος, πρωτογενές κύμα μετά από προσθήκη ADP και μειωμένη ή μηδενική συσσώρευση παρουσία κολλαγόνου.
- Σε λήψη κλοπιδογρέλης παρατηρείται απουσία της συσσώρευσης παρουσία ADP.
- Στον τύπο IIB της νόσου von Willebrand παρατηρείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές δόσεις ριστοσεΐνης π.χ. 0.5 mg/mL.



**Παράδειγμα 1.** Νόσος von Willebrand ή σύνδρομο Bernard Soulier.



**Παράδειγμα 2.** Θρομβασθένεια Glanzmann ή ανινωδογοναιμία.



**Παράδειγμα 3.** *Storage Pool Disease* ή ανεπάρκεια των κοκκίων των αιμοπεταλίων.

Disorder	Aggregation Response						Other Features
	Primary ADP	Secondary ADP	Epinephrine	AA	Collagen	Ristocetin	
<i>Inherited disorders</i>							
GT	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Normal	
BSS	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Absent	Macrothrombocytopenia
Dense granule SPD	Normal	Decreased or Absent	Variable	Normal	Normal	Normal	Deficiency of dense granules seen with platelet electron microscopy. May be syndromic or occur in isolation.
<i>Acquired disorders</i>							
Aspirin	Normal	Decreased or Absent	Decreased or Absent	Absent	Decreased or Absent	Normal	Inherited aspirin-like defects in AA metabolism show a similar pattern
P2Y <sub>12</sub> inhibitors (e.g. clopidogrel)	Decreased or Absent	Absent	Normal	Normal	Normal	Normal	
Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Normal	
Uremia	Normal	Decreased	Variable	Decreased	Normal or Decreased	Normal	

GT=Glanzmann thrombasthenia; BSS=Bernard-Soulier syndrome; SPD=storage pool disorder; ADP=adenosine diphosphate; AA=arachidonic acid

**Πίνακας 3:** *LTA* σε κληρονομικές και επίκτητες διαταραχές των αιμοπεταλίων

### Μελέτη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ολικό αίμα (Whole Blood Aggregometry - WBA -)

Στην οπτική θολωσιμετρική μέθοδο συσσώρευσης αιμοπεταλίων η εκτίμηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων γίνεται με τη χρήση PRP και έτσι δεν υπολογίζεται η συμμετοχή των υπολοίπων στοιχείων του αίματος, τα οποία πιθανόν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Στη μελέτη

συσσώρευσης στο ολικό αίμα (Whole Blood Aggregometry - WBA -) εκτιμάται η λειτουργικότητα (συσσώρευση) των αιμοπεταλίων σε δείγμα ολικού αίματος. Σήμερα είναι διαθέσιμες σύγχρονες και αυτοματοποιημένες συσκευές οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα ταχείας και εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας με τη χρήση ολικού αίματος. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες από τις συσκευές αυτές είναι:

Ο αναλυτής VerifyNow® με τον οποίο εκτιμάται η ανταπόκριση στη θεραπεία με αναστολείς της COX -1 (ασπιρίνη), της GPIIb-IIIa (abciximab) και του υποδοχέα P2Y12 (θειενοπυριδίνες). Οι αρχές λειτουργίας της μεθόδου είναι ίδιες με αυτές της κλασικής μεθόδου θολωσιμετρική συσσωρευσης των αιμοπεταλίων, δηλαδή προσδιορίζεται η ικανότητα συσσωρευσης των αιμοπεταλίων σε απάντηση στη δράση αγωνιστών, όπως το αραχιδονικό οξύ, το ADP, κλπ.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας το ολικό αίμα αναμιγνύεται με ειδικά σφαιρίδια, επικαλυμμένα με ινωδογόνο και η συσσωρευση των αιμοπεταλίων, μέσω της GPIIb-IIIa, στα σφαιρίδια οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας του φωτός, η οποία καταγράφεται από τη συσκευή (Sinha AR, Aylward PE., 2013)

Ο αναλυτής Multiplate® εκτιμά τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων στο ολικό αίμα με τη χρήση ηλεκτρικής αντίστασης. Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση του ρυθμού και του βαθμού μεταβολής της ηλεκτρικής αντίστασης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων καθώς τα αιμοπετάλια προσκολλώνται σ' αυτά και συσσωρεύονται μετά τη δράση κατάλληλων αγωνιστών (Fritsma GA., 2007).

Ο αναλυτής Cone Plate(let) εκτιμά την προσκόλληση και τη συσσωρευση των αιμοπεταλίων του ολικού αίματος σε ειδική πλάκα πολυστυρενίου, σε συνθήκες υψηλής ροής που προσομοιάζουν με αυτές της αρτηριακής ροής. Ακολουθεί χρώση των προσκολλημένων στην πλάκα αιμοπεταλίων και το ποσοστό και το μέγεθος της επιφάνειας που καλύπτεται από τα χρωματισμένα στοιχεία αναλύεται από αναλυτή εικόνας (Rand ML., et al, 2003)

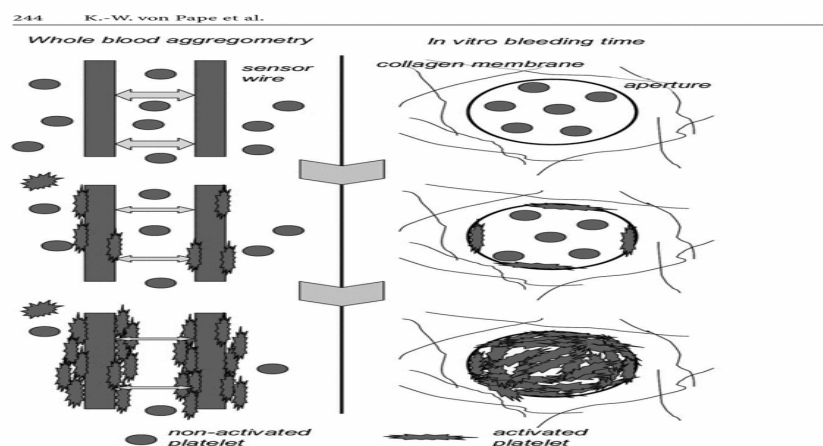


Fig. 1. Principle of whole blood aggregometry (left) and in vitro bleeding time (right): platelets get stimulated by either arachidonic acid, ADP, collagen or TRAP-6 (whole blood aggregation), or by a combination of shear stress, contact with collagen and ADP or epinephrine (in vitro bleeding time). In whole blood aggregometry platelets adhere and aggregate on metal sensor wires via their GPIIb/IIIa receptor and enhance the electrical resistance between them. In IVBT activated platelets adhere and aggregate on the collagen membrane surrounding the aperture and gradually reduce blood flow, until the closure time is reached.

**Σχήμα 10 :** Αρχή της μεθόδου WBA (αριστερά) και του in vitro χρόνου ροής (δεξιά). [www.springer.com]

Τα πλεονεκτήματα της WBA είναι ότι:

- Δεν απαιτεί την χρονοβόρο παρασκευή PRP.
- Οι μετρήσεις μπορεί όμως να γίνονται σε λιπαιμικά ή ικτερικά δειγμάτων αίματος, τα οποία δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες σχετικές με τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων στην LTA.
- Μπορεί να ανιχνεύσει την αντιαιμοπεταλιακή δραστικότητα φαρμάκων τα οποία δεν είναι δραστικά στο PRP (διπυριδαμόλη).
- Προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης του συνδρόμου Bernard – Soulier (χωρίς απώλεια των μεγάλων αιμοπεταλίων)

Τα μειονεκτήματα της WBA είναι ότι:

- Οι μετρήσεις επηρεάζονται από τον αριθμό των αιμοπεταλίων, τον αιματοκρίτη, και τον υψηλό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (Mackie IJ, et al, 1984).

### **Φωτο – συσσωματομετρία (Lumi-Aggregometry)**

Οι θρομβοκυττοπάθειες που χαρακτηρίζονται από έλλειψη (storage pool disease) ή διαταραχές της έκκρισης του περιεχομένου των πυκνών σωματίων (δ - κοκκία) των αιμοπεταλίων, με ή χωρίς συνοδό διαταραχή της συσσώρευσης, είναι συνήθεις και ετερογενείς κληρονομικές αιμορραγικές διαθέσεις. Για τη διάγνωση των διαταραχών αυτών χρησιμοποιούνται συνήθως μέθοδοι βιοφωταύγειας με τις οποίες προσδιορίζεται η απελευθέρωση του αποθηκευμένου στα αιμοπετάλια ATP, με τη χρήση φωτο – συσσωματομέτρου (Lumi-Aggregometer), PRP ή σπανιότερα ολικού αίματος (Cattaneo M. , 2009).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Reinman το 1976, ως παραλλαγή της LTA , η οποία εκτός από τη συσσώρευση, μελετά και την έκκριση ATP από τα δ-κοκκία των αιμοπεταλίων. Η δοκιμασία εκτελείται με την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου λουσιφερίνης-λουσιφεράσης (εκχυλίσματα πυγολαμπίδας) και ενός αγωνιστή, που προκαλεί την απελευθέρωση του περιεχομένου των δ – κοκκίων των αιμοπεταλίων στο δείγμα, το οποίο υποβάλλεται σε ανάδευση με σκοπό την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ο αγωνιστής είναι συνήθως θρομβίνη, η οποία προκαλεί πλήρη έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων κατά την δευτερογενή φάση της συσσώρευσης. Το ATP που απελευθερώνεται αντιδρά με τη λουσιφερίνη και η χημική αντίδραση, που καταλύεται από λουσιφεράση, λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: αρχικά η λουσιφερίνη αντιδρά με το ATP και μετατρέπεται σε αδενυλική λουσιφερίλη (luciferyl adenylate), η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται και μετατρέπεται σε οξυλουσιφερίνη και AMP με ταυτόχρονη εκπομπή φωτός το οποίο ανιχνεύεται, ενισχύεται και καταγράφεται από ανιχνευτή φωτός της συσκευής (Dyszkiewicz-Korpaniy AM, et al, 2005).

Η μέτρηση τόσο των ολικών νουκλεοτιδίων αδενίνης όσο και των νουκλεοτιδίων που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια παρέχει, σε συνδυασμό με τη συσσωματομετρία, ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση διαταραχών του αριθμού, του περιεχομένου (storage pool disease) και της απελευθέρωσης των πυκνών κοκκίων. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να διαλάθουν αν η διερεύνηση γίνει μόνο με τη συσσωματομετρία (Hayward CP, et al, 2009).

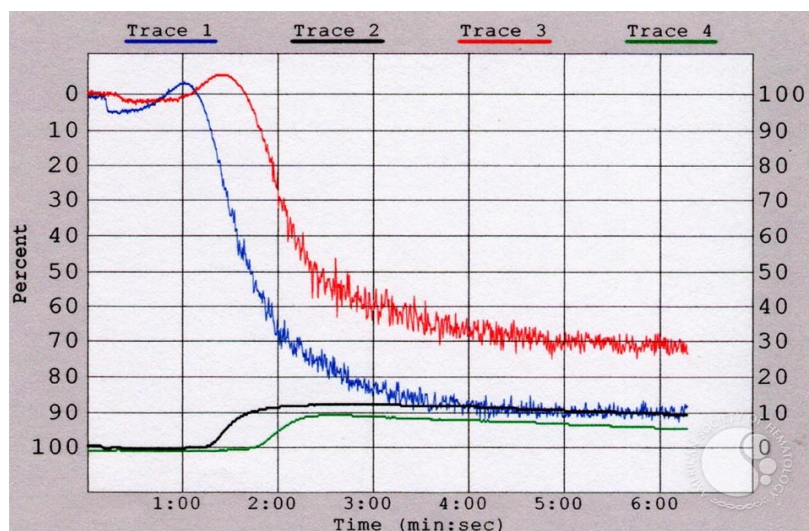
Στα αιμοπετάλια 60% των νουκλεοτιδίων αποθηκεύεται στα πυκνά κοκκία και δεν είναι μεταβολικά ενεργά ενώ το 40% των νουκλεοτιδίων αποτελεί τη μεταβολική δεξαμενή των αιμοπεταλίων και παρέχει στα αιμοπετάλια την απαιτούμενη ενέργεια για τις διάφορες λειτουργίες τους. Οποιαδήποτε διαταραχή αποθήκευσης (storage pool disease) συνοδεύεται από ελάττωση της ποσότητας



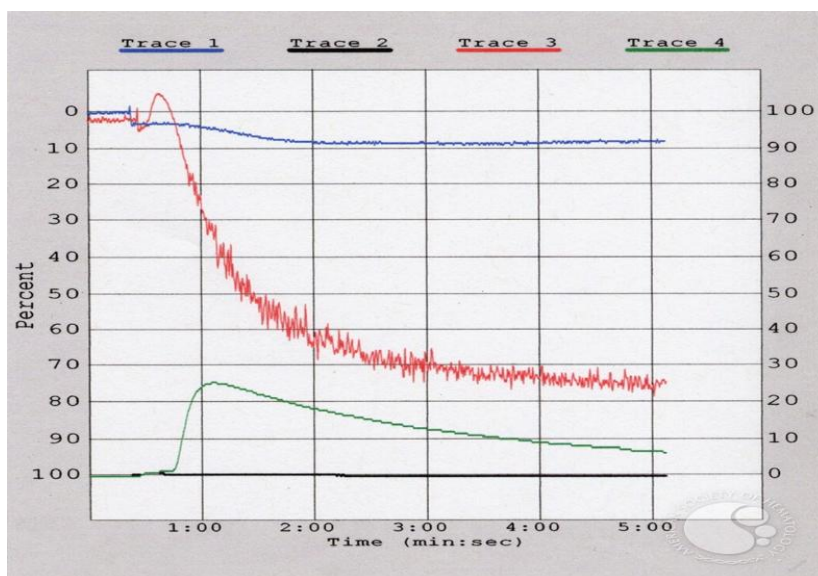
τόσο του αποθηκευμένου όσο και του εκλυόμενου ADP, με ταυτόχρονη αύξηση της αναλογίας ATP:ADP. Φυσιολογικά επίπεδα ADP και της αναλογίας ATP:ADP αλλά μειωμένη έκλυση ADP είναι ενδεικτική διαταραχής της έκκρισης του περιεχομένου των αιμοπεταλίων ([White MM, et al, 1992](#)).

Νουκλεοτιδίο	Εύρος τιμών αναφοράς
Συνολικό περιεχόμενο νουκλεοτιδίων αιμοπεταλίων	5,5 - 9,6 nmol/10 <sup>8</sup> αιμοπετάλια
Περιεχόμενο ATP των αιμοπεταλίων	3,5 - 5,9 nmol/10 <sup>8</sup> αιμοπετάλια
Περιεχόμενο ADP των αιμοπεταλίων	1,9 - 3,8 nmol/10 <sup>8</sup> αιμοπετάλια
Αναλογία:	Φυσιολογική: 1,3 - 2,0 Παθολογική: > 2

**Πίνακας 4:** Τιμές αναφοράς (David Perry and Tony Todd,2013)



**Εικόνα 17:** *Lumi – aggregometry*: ταυτόχρονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (κόκκινη και μπλε καμπύλη) και απελευθέρωση ATP (πράσινη και μαύρη καμπύλη) σε απάντηση στο κολλαγόνο που χρησιμοποιείται ως αγωνιστής. Η κόκκινη και πράσινη καμπύλη αντιπροσωπεύουν φυσιολογικά μάρτυρα, ενώ η μπλε και μαύρη καμπύλη είναι του ασθενούς. Οι καμπύλες είναι παρόμοιες, ενδεικτικές της φυσιολογικής απάντησης του υπό εξέταση δείγματος στον αγωνιστή (Peter Maslak and Larry Smith, 2009)



**Εικόνα 18:** *Lumi – aggregometry*: απάντηση στο αραχιδονικό οξύ σε ασθενή που λαμβάνει ασπιρίνη. Η κόκκινη (συσσώρευση αιμοπεταλίων) και η πράσινη καμπύλη (απελευθέρωση ATP) αντιπροσωπεύουν φυσιολογικό μάρτυρα. Η μπλε (συσσώρευση αιμοπεταλίων) και η μαύρη καμπύλη (απελευθέρωση ATP) αντιπροσωπεύουν τον ασθενή (απουσία απάντησης στον αγωνιστή) [Peter Maslak and Larry Smith, 2009]

### Κυτταρομετρία ροής

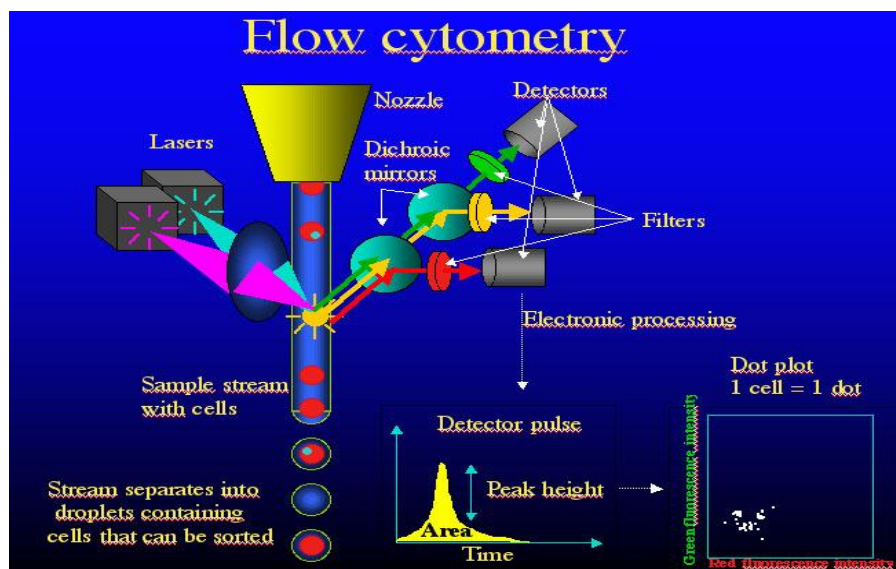
Η σήμανση των αιμοπεταλίων με αντισώματα τα οποία στρέφονται κατά γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας της μεμβράνης τους και η ανάλυση της σύνδεσης αυτής με κυτταρομετρία ροής είναι μία ταχεία και ευαίσθητη τεχνική για τη διερεύνηση των διαταραχών των αιμοπεταλίων.

#### Αρχές της μεθόδου

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε ολικό αίμα, σε PRP ή σε πλυμένα αιμοπετάλια και απαιτεί μικρή ποσότητα αίματος, οπότε μπορεί να εφαρμοστεί και σε νεογνά. Το κατάλληλο αντιπηκτικό για τη συλλογή του αίματος είναι ένας συνδυασμός κιτρικού νατρίου, θεοφυλλίνης, αδενοσίνης και διπυριδαμόλης. Τα αιμοπετάλια σημαίνονται με ειδικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες - ανιχνευτές όπως η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC), η περιδινινχλωροφυλπρωτεΐνη (PerCP) και η φυκοερυθρίνη (PE).

Στον κυτταρομετρητή ροής το εναιώρημα των κυττάρων, το οποίο περιέχει τα σεσημασμένα αιμοπετάλια, διαπερνά δια μέσου ενός θαλάμου νηματοειδούς ροής και κατά μήκος μίας εστιασμένης ακτίνας laser, με ρυθμό 1.000 – 10.000 κύτταρα/ λεπτό. Η ακτίνα laser έχει μήκος κύματος παρόμοιο με αυτό που απαιτείται για τη διέγερση του μορίου της φθορίζουσας ουσίας. Το φως που εκπέμπεται από κάθε τύπο φθορίζοντος μορίου έχει χαρακτηριστικό μήκος κύματος και ανιχνεύεται από έναν ειδικό ανιχνευτή φωτός. Τα φωτεινά σήματα ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή και τροποποιούνται, μέσω ενός συστήματος τροποποίησης, από αναλογικά σε ψηφιακά. Το σύστημα αυτό μετατρέπει τα σήματα εμπρόσθιας σκέδασης

(Forward Scatter - FSC -), που δίνουν πληροφορίες σχετικές με το μέγεθος των σωματιδίων, τα σήματα πλάγιας σκέδασης (Side Scatter - SSC -), που δίνουν πληροφορίες σχετικές με τη περιεκτικότητα σε κοκκία και τα σήματα φθορισμού σε ηλεκτρικά σήματα. Τα ηλεκτρικά σήματα αναλύονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Givan AL, 1992).



Εικόνα 19: . Κυτταρομετρία ροής

Η εφαρμογή κυτταρομετρίας ροής στο ολικό αίμα πλεονεκτεί σε σχέση με αυτή στο PRP επειδή:

- Ελαχιστοποιείται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων λόγω των λιγότερων χειρισμών
- Μπορεί να αναλύονται ταυτόχρονα πολλοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων
- Απαιτούνται μικρότεροι όγκοι αίματος προς εξέταση (2μL)
- Μπορεί να εφαρμοστεί σε ασθενείς με θρομβοπενία

Στην κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα πολλαπλά σεσημασμένα αντισώματα και να προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων. Έτσι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσδιορίζοντας τις μεταβολές στο σχήμα και στην κοκκίωση των αιμοπεταλίων, την έκφραση ειδικών αντιγόνων στην επιφάνεια τους (P – σελεκτίνη, GPIIb-IIIa) και πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την επιφάνεια (ινωδογόνο). Επιπλέον η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μικροσωματίδια (microparticles) που αποσπώνται από την επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και συσσωματώματα αιμοπεταλίων – λευκών αιμοσφαιρίων (Lazarus AH, et al. 1995, Ruf A and Patscheke H., 1995).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία χρησιμοποιούνται ως δείκτες στη μελέτη των αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής είναι:

Δείκτες της επιφάνειας των αιμοπεταλίων σε ηρεμία:

- CD41 – GPIIb
- CD42a – GPIX
- CD42b – GPIb
- CD61 – GPIIIa

Δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων



Πρωτεΐνες της μεμβράνης των κοκκίων των αιμοπεταλίων

- CD62p (P-selectin) (πρωτεΐνη της μεμβράνης των α –κοκκίων, μεσολαβεί στην προσκόλληση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα)
- CD63 (πρωτεΐνη της μεμβράνης των πυκνών κοκκίων και λυσοσωματίων)
- LAMP -1, LAMP -2

Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια

- Θρομβοσπονδίνη
- Μουλτιμερίνη
- sCD40L
- Ιστικός παράγοντας (TF)

Δείκτες προπηκτικής επιφάνειας των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων

- Αννεξίνη V
- FVa
- FVIII
- Ιστικός παράγοντας (TF)

Δείκτες μεταβολής του υποδοχέα GP IIb-IIIa κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

- PAC-1 (μονοκλωνικό αντίσωμα που στρέφεται κατά της θέσης σύνδεσης του ινωδογόνου, η οποία εκτίθεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων μετά από τις μεταβολές της διαμόρφωσης του υποδοχέα GP IIb-IIIa στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια)

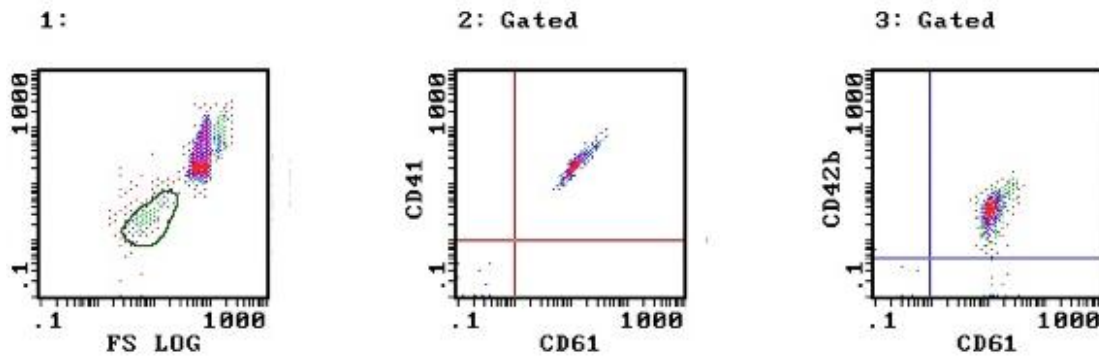
Άλλοι δείκτες

- Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (microparticles)
- Συσσωματώματα αιμοπεταλίων - λευκοκυττάρων

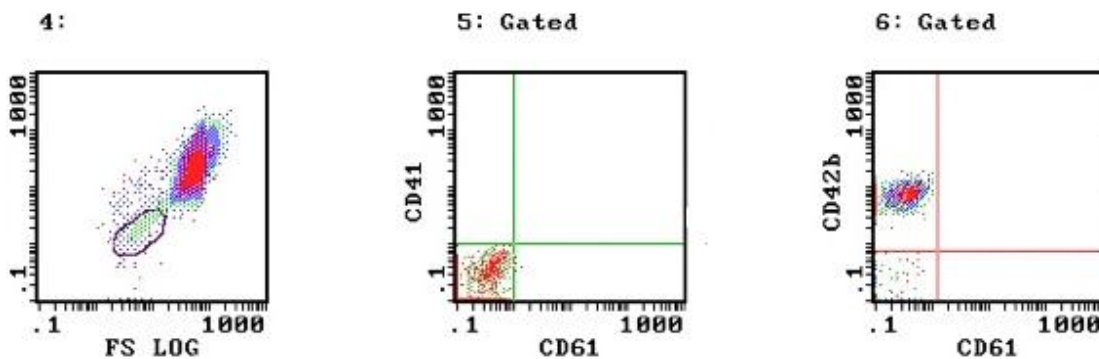
### **Εφαρμογές της κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόζεται:

- Στη διάγνωση κληρονομικών διαταραχών των αιμοπεταλίων (σύνδρομο Bernard – Soulier, θρομβασθένεια Glanzmann, storage pool disease, σύνδρομο Scott) (Cohn RJ, et al, 1997; Lindahl TL, et al., 1992).
- Στην παρακολούθηση της θεραπείας με ανταγωνιστές των υποδοχέων GPIIb-IIIa (ασπιρίνη κλοπιδογρέλη)
- Στη διάγνωση της θρομβοπενίας από ηπαρίνη (HIT) και της ανοσολογικής θρομβοπενίας (ανίχνευση αλλοαντισωμάτων)
- Στην ανίχνευση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (CD62p, CD63, CD40L, μεταβολές GPIIb-IIIa, έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην επιφάνεια, μικροσωματίδια, συσσωματώματα αιμοπεταλίων ή αιμοπεταλίων – λευκοκυττάρων) σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, ή ασταθής στηθάγχη, η αγγειοπλαστική, η εγκεφαλική ισχαιμία, η προεκλαμψία, κλπ) (Furman MI, et al., 1998; Grau AJ, et al., 1998).



**Εικόνα 20:** Κυτταρομετρία ροής σε αίμα φυσιολογικού ατόμου. 1) τα αιμοπετάλια έχουν επιλεγεί με βάση της πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης φωτός και περικυκλώθηκαν στο πράσινο 2) σήμανση των αιμοπεταλίων με CD41(GpIIb) και CD61 (GPIIIa) (εκφράζουν και τις δύο γλυκοπρωτεΐνες) 3) σήμανση των αιμοπεταλίων με CD42b (GPIb) και CD61 (GPIIIa) εκφράζουν και τις δύο γλυκοπρωτεΐνες) (David Perry and Tony Todd, 2013).



**Εικόνα 21:** Κυτταρομετρία ροής σε αίμα ασθενούς με θρομβασθένεια Glanzmann. Στις Εικόνες 5 και 6, τα αιμοπετάλια δεν παρουσιάζουν δραστηριότητα είτε με CD41 ή με CD61 (απώλεια GpIIb-IIIa λόγω της θρομβασθένειας Glanzmann). Στην εικόνα 6 τα αιμοπετάλια εκφράζουν κανονική δραστηριότητα με CD42b (φυσιολογική GPIb). (David Perry and Tony Todd, 2013)

### Παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Transmission Electron Microscopy -TEM -)

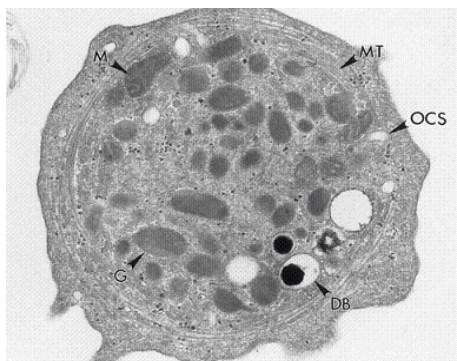
Η μελέτη της μορφολογίας των αιμοπεταλίων με το οπτικό μικροσκόπιο είναι δύσκολη, λόγω του μικρού τους μεγέθους, συγκριτικά με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με μεγέθυνση της τάξης  $10^5$  και ανάλυση 0,2nm, είναι ένα εξελιγμένο εργαλείο που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για τη βασική έρευνα. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται η άμεση παρατήρηση της μεμβράνης, του κυτταροσκελετού και των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι πολύτιμες για την μελέτη της φυσιολογίας των αιμοπεταλίων (ενεργοποίηση, αλλαγή σχήματος, έκκριση αποθηκευτικών κοκκίων, συσσώρευση) αλλά και για την κλινική διάγνωση των κληρονομικών διαταραχών των αιμοπεταλίων. Για παράδειγμα, στην ανεπάρκεια των πυκνών σωματίων (storage pool disease)

η παρατήρηση των αιμοπεταλίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προσφέρει ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση της διαταραχής περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη μέθοδο.

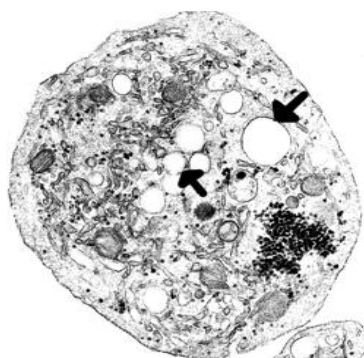
Μερικές φορές για τη διάκριση διαφορετικών κυτταρικών στοιχείων χρησιμοποιούνται τεχνικές χρώσης ή φθορίζοντες ανιχνευτές, οι οποίοι στοχεύουν ορισμένα τμήματα του κυττάρου.

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να γίνει η διαφορική διάγνωση των σπάνιων κληρονομικών διαταραχών των αιμοπεταλίων, η οποία είναι δύσκολη με τις υπόλοιπες δοκιμασίες. Τέτοιες διαταραχές είναι:

- Ανεπάρκεια των α-κοκκίων (σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου, σύνδρομο Paris-Trousseau/Jacobsen, θρομβοκυττοπάθεια Quebec)
- Ανεπάρκεια των δ-κοκκίων (storage pool disease, σύνδρομο Chediak-Higashi και Hermansky-Pudlak)
- Διαταραχές του κυτταροσκελετού (MYH9, σύνδρομο Wiskott-Aldrich)
- Σύνδρομο Bernard Soulier ([White JG.](#), 1998).



**Εικόνα 22:** Φυσιολογικό αιμοπετάλιο (M: μιτοχόνδριο, MT: μικροσωληνάρια, OCS: ανοικτό καναλικό σύστημα, DB: πυκνά σωμάτια, G: α-κοκκία)



**Εικόνα 23:** Ανεπάρκεια των πυκνών σωμάτων (storage pool disease)

### Εργαστηριακή διερεύνηση νόσου von Willebrand

Η εργαστηριακή διερεύνηση της νόσου von Willebrand περιλαμβάνει τις ακόλουθες εξετάσεις:

- Χρόνος ροής
- Μελέτη με αναλυτή λειτουργικότητας αιμοπεταλίων (PFA-100)
- Επίπεδα του παράγοντα VIII

Ο παράγοντα von Willebrand (vWf) είναι μεταφορέας του παράγοντα VIII (FVIII) της πήξης και με τη σύνδεση vWf – FVIII αυξάνει σημαντικά η ημιπερίοδος ζωής του FVIII στο πλάσμα. Επομένως τα χαμηλά επίπεδα του vWf στο πλάσμα συνοδεύονται από χαμηλά επίπεδα του FVIII. Τα επίπεδα της λειτουργικής δραστηριότητας του FVIII προσδιορίζονται συνήθως στον αυτόματο αναλυτή με μέθοδο η οποία βασίζεται στον aPTT (μέθοδος ενός σταδίου) ή με χρωμογονική μέθοδο (μέθοδος δύο σταδίων). Η ποσοτική μέτρηση των αντιγονικών επιπέδων του FVIII προσδιορίζονται με την ανοσολογική μέθοδο ELISA.

- **Αντιγονικά επίπεδα του παράγοντα von Willebrand (vWf:Ag)**

Προσδιορίζονται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA με τη χρήση αντι-vWf αντισωμάτων, την ποσοτική ανοσοηλεκτροφόρηση (μέθοδος Laurell) ή με ανοσοθολοσιμετρική μέθοδο με τη χρήση μικροσωματιδίων latex (Liatest). Οι μέθοδοι μετρούν μόνο τη συνολική ποσότητα του vWf στο πλάσμα.

- **Δραστηκότητα του συμπαράγοντα της ριστοσετίνης (Ristocetin Co-Factor Activity – vWf:RCo)**

Η μέθοδος αυτή είναι απαραίτητα για τη διάγνωση της νόσου και τον καθορισμό του τύπου της νόσου. Είναι λειτουργική μέθοδος και μετράει την ικανότητα συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, μέσω του vWf, παρουσία ριστοσετίνης. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα πλυμένα αιμοπετάλια δεν συγκολλούνται, παρουσία του αντιβιοτικού ριστοσετίνη, χωρίς την προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος που περιέχει τον vWf. Η εξέταση πραγματοποιείται σε αυτόματους αναλυτές και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε vWf του πλάσματος που προστέθηκε. Η % δραστηκότητας του συμπαράγοντα ριστοσετίνης του υπό εξέταση πλάσματος μετρείται με βοήθεια πρότυπης καμπύλης γνωστής περιεκτικότητας vWf:RCo.

- **Συγκόλληση αιμοπεταλίων με ριστοσετίνη (Ristocetin induced platelet agglutination – RIPA)**

Η μέθοδος εφαρμόζεται στο συσσωματόμετρο και μελετάται την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ριστοσετίνης στο PRP του ασθενούς. Συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο φυσιολογικό PRP παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις ριστοσετίνης (>1,2mg/ml) αλλά όχι σε χαμηλές (0,3 – 0,5mg/ml)..

- **Μέτρηση της σύνδεσης του παράγοντα von Willebrand με το κολλαγόνο (vWf:CB)**

Προσδιορίζεται με τη μέθοδο ELISA και μετρείται in vitro η ικανότητα σύνδεσης του vWf με το κολλαγόνο που καλύπτει πλαστικές επιφάνειες (μικροκυψέλες). Η ποσότητα του συνδεδεμένου vWf με το κολλαγόνο προσδιορίζεται ανοσολογικά με την προσθήκη αντι – vWf αντισωμάτων. Η vWf:CB είναι μέθοδος περισσότερο ευαίσθητη από την vWf:RCo και κατάλληλη για τη διάκριση μεταξύ των τύπων 1 και 2 της νόσου.

- **Μέτρηση της σύνδεσης του παράγοντα von Willebrand με τον παράγοντα VIII (vWf:FVIII B)**

Η εξέταση προσδιορίζει in vitro την ικανότητα σύνδεσης του vWf με τον FVIII. Πραγματοποιείται με τη μέθοδο ELISA και η ποσότητα του συνδεδεμένου FVIII με τον vWf προσδιορίζεται ανοσολογικά ή χρωμογονικά. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται διάκριση μεταξύ του τύπου 2N της vWD και της αιμορροφιλίας.

- **Ανάλυση των πολυμερών του παράγοντα von Willebrand**

Η ανάλυση γίνεται με ηλεκτροφόρηση του πλάσματος σε gel αγαρόζης, επώαση με ραδιοσημασμένο αντίσωμα έναντι του vWF και λήψη

αυτοραδιογραφίας με την οποία γίνονται ορατά τα πολυμερή του παράγοντα. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και είναι απαραίτητη για τη διάγνωση και τον καθορισμό του τύπου της νόσου.

- **Ανάλυση της αλληλουχίας του DNA**

(Federici AB and Canciani MT., 2009; Torres R and Fedoriw Y., 2009).

## ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

### ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Οι κληρονομικές διαταραχές των αιμοπεταλίων διακρίνονται σε διαταραχές προσκόλλησης, ενεργοποίησης, έκκρισης και συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Επειδή όμως υπάρχουν διαταραχές οι οποίες επηρεάζουν περισσότερες από μία λειτουργίες των αιμοπεταλίων η ταξινόμηση είναι ορθότερο να γίνεται με βάση τα στοιχεία των αιμοπεταλίων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά:

1. Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τις πρωτεΐνες προσκόλλησης
  - Διαταραχές του υποδοχέα GPIb/V/IX (Σύνδρομο Bernard – Soulier)
  - Διαταραχές του υποδοχέα GPIIb/IIIa – αIIbβ3 – (Θρομβασθένεια Glanzmann)
  - Αιμοπεταλιακού τύπου ή ψευδο –Willerand νόσος
  - Διαταραχές του υποδοχέα GPIa/IIa
  - Διαταραχές του υποδοχέα GPV
2. Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τους διαλυτούς αγωνιστές
  - Διαταραχές των υποδοχέων του ADP των αιμοπεταλίων
  - Διαταραχές του υποδοχέα της TXA2 των αιμοπεταλίων
  - Διαταραχές των α2 αδρενεργικών υποδοχέων των αιμοπεταλίων
3. Διαταραχές των κοκκίων των αιμοπεταλίων
  - Διαταραχές των δ – κοκκίων*
    - ανεπάρκεια των δ – κοκκίων
    - σύνδρομο Hermansky – Pudlak
    - σύνδρομο Chediak – Higashi
    - σύνδρομο θρομβοπενίας με απουσία κερκίδας (TAR)
    - σύνδρομο Wiskott - Aldrich
  - Διαταραχές των α – κοκκίων*
    - ανεπάρκεια των α – κοκκίων (σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου)
    - θρομβοκυττοπάθεια Quebec
    - σύνδρομο (θρομβοπενία) Paris – Trousseau / σύνδρομο Jacobsen
  - Διαταραχές των α,δ – κοκκίων*
    - ανεπάρκεια των α,δ – κοκκίων
4. Διαταραχές των οδών μεταγωγής του σήματος
  - διαταραχές απελευθέρωσης αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης
  - διαταραχές της κυκλοοξυγενάσης (aspirin like defect)
  - διαταραχές της συνθετάση της θρομβοξάνης

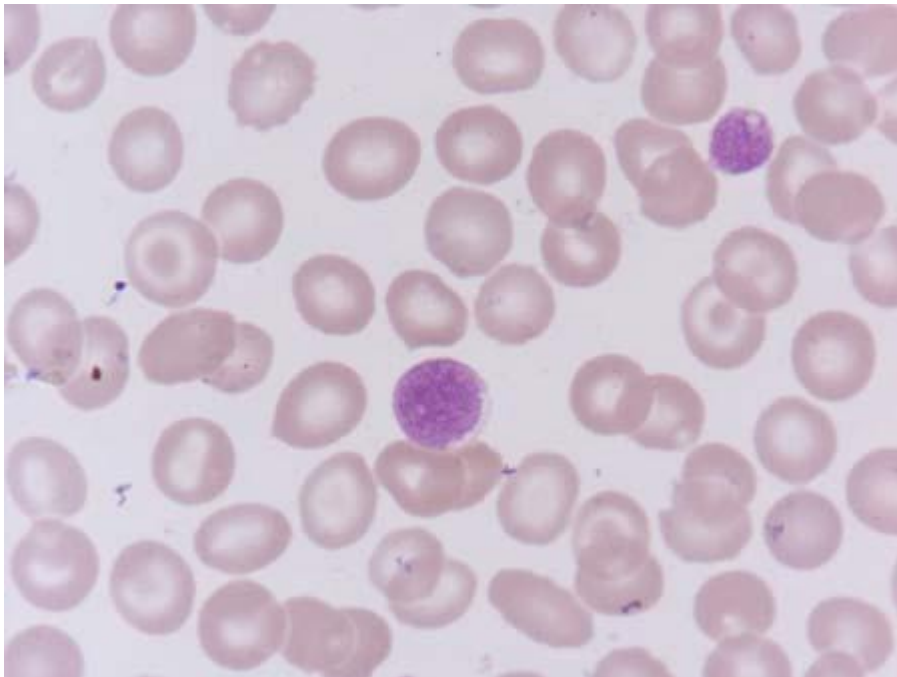
- διαταραχές των GTP δεσμευτικών πρωτεϊνών
  - διαταραχές της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης
5. Διαταραχές των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων
- Σύνδρομο Scott
- Σύνδρομο Stormorken (Cattaneo M., 2008).

Οι κυριότερες από τις διαταραχές αυτές είναι οι:

### 1) Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τις πρωτεΐνες προσκόλλησης

#### **Σύνδρομο Bernard- Soulier**

Το σύνδρομο Bernard Soulier (BSS) περιγράφηκε για πρώτη φορά, από τους Γάλλους Jean Bernard και Jean Piere Soulier, το 1948. Είναι σπάνιο νόσημα με συχνότητα 1/1.000.000 στο γενικό πληθυσμό. Κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τύπο και χαρακτηρίζεται από θρομβοπενία, παρουσία αιμοπεταλίων μεγάλου μεγέθους και αιμορραγική διάθεση.



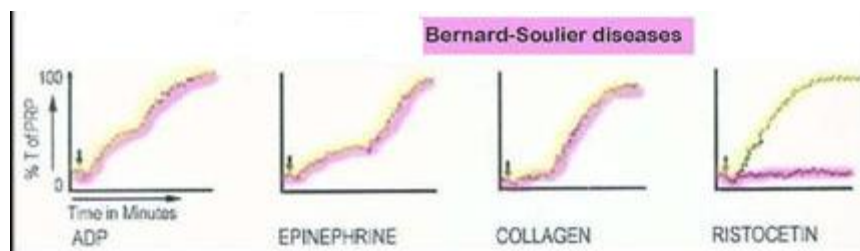
**Εικόνα 24:** Γιγαντιαία αιμοπετάλια στο σύνδρομο Bernard - Soulier

Τη δεκαετία του 1970 βρέθηκε ότι το σύνδρομο οφείλεται στην απουσία ή τη μειωμένη έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών του συμπλέγματος Ib /IX /V, στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η γλυκοπρωτεΐνη είναι υποδοχέας του παράγοντα von Willebrand και απαραίτητη για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο κατά την πρωτογενή αιμόσταση. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 47 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου υποδοχέα GpIb/IX/V, που ευθύνονται για το BSS , οι περισσότερες από τις οποίες αφορούν τη γλυκοπρωτεΐνη Ia και οι περισσότερες είναι μοναδικές σε κάθε άτομο (Pham A and Wang J., 2007).

Η αιμορραγικές εκδηλώσεις αρχίζουν από τη παιδική ηλικία και συνεχίζονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Οι εκδηλώσεις αυτές είναι: εκχυμώσεις, ρινορραγίες, αιμορραγίες βλεννογόνων, μηνορραγίες, αιμορραγίες ΓΕΣ και αιμορραγίες, μερικές φορές σοβαρές, σε τραυματισμούς ή χειρουργικές επεμβάσεις.

#### Εργαστηριακή διάγνωση

- Ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι συνήθως φυσιολογικός και στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος παρατηρούνται γιγαντιαία αιμοπετάλια
- Ο χρόνος ροής είναι συνήθως παρατεταμένος.
- Στη μελέτη της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με PFA-100 παρατηρείται παρατεταμένος (> 200 sec) χρόνος κλεισίματος (closure time), στην εξέταση με CEPI και CADP ([Harrison P, et al., 1999](#)).
- Δεν παρατηρείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στη ριστοσετίνη, ενώ η συσσώρευση με ADP, αδρεναλίνη, θρομβίνη και κολλαγόνο είναι φυσιολογική.
- Η διάγνωση τίθεται με κυτταρομετρία ροής (ανεπάρκεια GPIb/IX/V). ([Berndt MC and Andrews RK., 2011](#)).



**Εικόνα 25:** Συσσώρευση αιμοπεταλίων στο σύνδρομο Bernard - Soulier

#### **Θρομβασθένεια Glanzmann**

Η θρομβασθένεια Glanzmann περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1918, από τον E. Glanzmann. Είναι μια σπάνια κληρονομική νόσος, που κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οφείλεται σε ποσοτική ή ποιοτική ανεπάρκεια του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIb-IIIa στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Τα γονίδια των γλυκοπρωτεϊνών του συμπλέγματος GPIIb-IIIa βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17 και 50% της δραστικότητας των γλυκοπρωτεϊνών είναι αρκετή για τη φυσιολογική αιμόσταση. Μεταλλάξεις (>70) στα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα προκαλούν ανεπάρκεια των γλυκοπρωτεϊνών, η οποία προκαλεί διαταραχές στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά το σχηματισμό του αρχικού αιμοπεταλιακού θρόμβου και αιμορραγική διάθεση ([George JN, et al , 1990](#)).

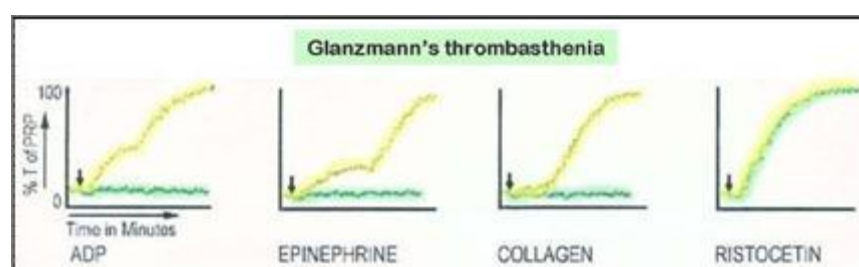
Η νόσος διακρίνεται σε δύο τύπους:

Στον τύπο 1, οι ασθενείς έχουν αριθμό υποδοχέων GP IIb-IIIa <5% του φυσιολογικού και σοβαρή αιμορραγική διάθεση και στον τύπο 2 έχουν 10 – 20% των υποδοχέων και ηπιότερη αιμορραγική διάθεση. Η νόσος εκδηλώνεται με ουλορραγίες, μηνορραγίες, ρινορραγίες, αιματουρίες, αιμορραγίες ΓΕΣ, σπάνια αίμαθρα και αιμορραγίες σε τραυματισμούς ή χειρουργικές επεμβάσεις ([Toogeh G, et al., 2004](#)).



### Εργαστηριακή διάγνωση

- Ο αριθμός των αιμοπεταλίων και το μέγεθος των αιμοπεταλίων είναι φυσιολογικός.
- Ο χρόνος ροής είναι παρατεταμένος.
- Στη μελέτη της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με PFA-100 παρατηρείται παρατεταμένος (> 200 sec) χρόνος κλεισίματος (closure time), στην εξέταση με CEPI και CADP ([Harrison P, et al., 1999](#)).
- Δεν παρατηρείται συσσώρευση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στο ADP, την αδρεναλίνη, το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ ενώ η απάντηση στη ριστοσετίνη είναι φυσιολογική.
- Η διάγνωση τίθεται με κυτταρομετρία ροής (ανεπάρκεια GP IIb-IIIa) και με αναζήτηση των μεταλλάξεων με τεχνικές μοριακής βιολογίας ([Ali N, et al., 2008](#)).



Εικόνα 26: Συσσώρευση αιμοπεταλίων στη θρομβασθένεια Glanzmann

### Αιμοπεταλιακός τύπος ή νόσος ψευδο - von Willebrand

Ο αιμοπεταλιακός τύπος ή νόσος ψευδο - von Willebrand, είναι μία σπάνια διαταραχή των αιμοπεταλίων, η οποία κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγγένεια του υποδοχέα GPIIb της επιφάνειας των αιμοπεταλίων και του παράγοντα von Willebrand του πλάσματος. Οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *GP1BA*, που κωδικοποιεί τον υποδοχέα GPIIb. Η διαταραχή προκαλεί υπερβολική και μη αναγκαία αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών του παράγοντα von Willebrand, με αποτέλεσμα τη απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία, θρομβοπενία και ήπια αιμορραγική διάθεση, η οποία επιδεινώνεται στην κύηση και στη θεραπεία με ασπιρίνη ή άλλα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα (Othman M., 2011).

Η νόσος έχει πολλά κοινά κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά με τον τύπο 2B της νόσου von Willebrand (θρομβοπενία, χαμηλά λειτουργικά και φυσιολογικά αντιγονικά επίπεδα του παράγοντα von Willebrand, αυξημένη συγκόλληση των αιμοπεταλίων παρουσία ριστοσετίνης) και η διαφορική διάγνωση μεταξύ τους γίνεται με την κυτταρομετρία ροής και την γονιδιακή ανάλυση. Στη νόσο ψευδο - von Willebrand αναγνωρίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *GP1BA*, ενώ στο τύπο 2B στο γονίδιο του παράγοντα von Willebrand ([Enayat MS, et al., 2006](#)).



## **2) Διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τους διαλυτούς αγωνιστές**

Οι διαταραχές των υποδοχέων αιμοπεταλίων για τους διαλυτούς αγωνιστές είναι σπάνιες κληρονομικές θρομβοκυττοπάθειες και οφείλονται σε διαταραχές των αιμοπεταλιακών υποδοχέων επινεφρίνης, ADP ή TXA<sub>2</sub>. Έχουν περιγραφεί σε ελάχιστους ασθενείς και συνοδεύονται από αιμορραγική διάθεση.

### **Διαταραχές των α<sub>2</sub> αδρενεργικών υποδοχέων των αιμοπεταλίων**

Έχουν περιγραφεί δύο οικογένειες με ανεπάρκεια των α<sub>2</sub>-αδρενεργικών αιμοπεταλιακών υποδοχέων. Οι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή παρουσιάζουν παθολογική συσσώρευση και έκκριση των κοκκίων, ως απάντηση στην αδρεναλίνη (επινεφρίνη) και φυσιολογική απάντηση στο ADP και στο κολλαγόνο (Rao AK, *et al.*, 1988).

### **Διαταραχές του υποδοχέα της TXA<sub>2</sub> των αιμοπεταλίων**

Έχουν περιγραφεί τέσσερις ασθενείς με διαταραχή των υποδοχέων TXA<sub>2</sub>, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του υποδοχέα. Οι ασθενείς αυτοί συνθέτουν TXA<sub>2</sub>, μετά εξωγενή χορήγηση αραχιδονικού οξέος, αλλά παρουσιάζουν διαταραχές στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές, εξαιτίας διαταραχής της σύζευξης των υποδοχέων TXA<sub>2</sub> με τις G πρωτεΐνες και τη φωσφολιπάση (Ushikubi F, *et al.*, 1987).

### **Διαταραχές των υποδοχέων του ADP των αιμοπεταλίων**

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί κληρονομικές διαταραχές μόνο των P2Y<sub>12</sub> υποδοχέων, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και συνοδεύονται από αιμορραγική διάθεση. Οι ασθενείς με τη διαταραχή αυτή παρουσιάζουν παράταση του χρόνου ροή, ελαττωμένη και αναστρέψιμη συσσώρευση στη θρομβίνη και το κολλαγόνο και ελάχιστη και ταχέως αναστρέψιμη συσσώρευση ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις ADP (>10 μM). Οι διαταραχές οφείλονται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τους υποδοχείς P2Y<sub>12</sub> (Remijn JA, *et al.*, 2007).

## **3) Διαταραχές των κοκκίων των αιμοπεταλίων**

### **Διαταραχές των δ- κοκκίων**

#### **Ανεπάρκεια δ-κοκκίων (storage pool disease).**

Οι ασθενείς με ανεπάρκεια των δ - κοκκίων παρουσιάζουν ήπια ή μέτρια αιμορραγική διάθεση με αιμορραγικές εκδηλώσεις από το δέρμα και τους βλεννογόνους. Είναι μία σπάνια διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από μείωση του περιεχομένου των δ – κοκκίων, αλλά η παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή με φθορισμό έδειξαν ότι η διαταραχή είναι μάλλον ποιοτική παρά ποσοτική, δεδομένου ότι ο αριθμός των δ – κοκκίων είναι ελαφρώς μειωμένος αλλά απουσιάζει ο πυκνός πυρήνας των κοκκίων (κενά κοκκία).

Κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο ή κυρίαρχο χαρακτήρα και τα άτομα εμφανίζουν προδιάθεση στην ανάπτυξη οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, λόγω γεινίασης των υπεύθυνων γονιδίων καθώς. Εμφανίζουν επίσης προδιάθεση στην ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης, λόγω των υψηλών επιπέδων σεροτονίνης του πλάσματος, εξαιτίας της έλλειψης των δ – κοκκίων που είναι οργανύλλια αποθήκευσης της σεροτονίνης ([Gerrard JM](#) and [McNicol A](#),1992; Herve P, et al.,1990).

#### Εργαστηριακή διάγνωση

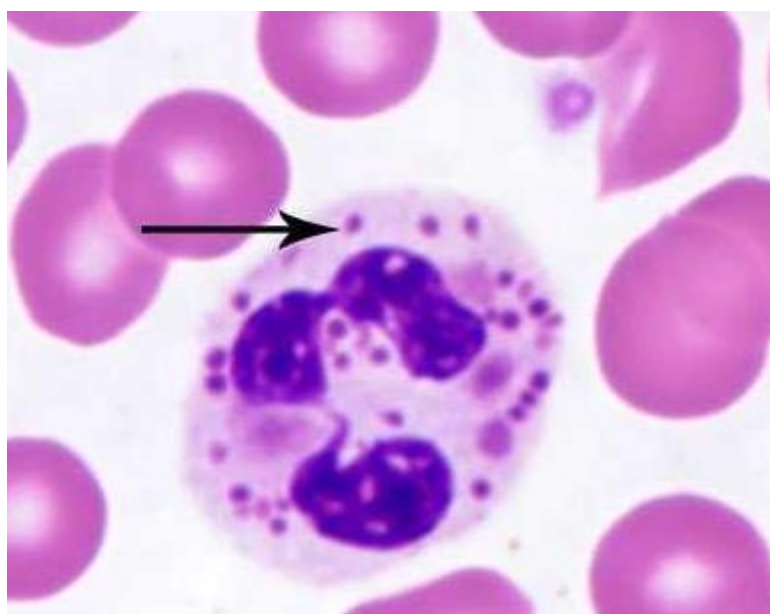
Παράταση του χρόνου ροής

- Παθολογική έκκριση των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση διαφόρων αγωνιστών
- Διαταραχές στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων
- Φυσιολογική πρωτογενής συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ADP και στην επινεφρίνη
- Ελάττωση ή πλήρης απουσία του δευτερογενούς κύματος και της συσσώρευσης στο κολλαγόνο
- Η διάγνωση τίθεται με τη φωτο-συσσωματομετρία και την κυτταρομετρία ροής (Cattaneo M., 2008).

#### **Σύνδρομο Chediak-Higashi**

Περιγράφηκε το 1995 και χαρακτηρίζεται από οφθαλμοδερματικό αλφισμό, ουδετεροπενικές υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, περιφερική νευροπάθεια και αιμορραγική διάθεση, λόγω ελάττωσης του αριθμού των δ -κοκκίων και παρουσία γιγάντιων κυτταροπλασματικών κοκκίων στο πρωτόπλασμα των ουδετεροφίλων, μεγακαρυοκυττάρων αλλά και μη αιμοποιητικών κυττάρων (νευρώνες). Κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και οι ασθενείς καταλήγουν συνήθως στην 1η δεκαετία της ζωής τους.

Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου CHS1 υπεύθυνου για την παραγωγή πρωτεΐνης που ρυθμίζει τη μεταφορά τοξικών ουσιών στα λυσοσωμάτια (Karlan J, De et al, 2008).9



## Εικόνα 27: Ουδετερόφιλο στο σύνδρομο Chediak-Higashi

### Σύνδρομο Hermansky – Pudlak

Το σύνδρομο περιγράφηκε το 1959 και είναι σπάνια διαταραχή (1/500.000 στο γενικό πληθυσμό). Κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από αλφισμό και αιμορραγική διάθεση, λόγω απουσίας ή σημαντικής ελάττωσης των δ - κοκκίων. Οφείλεται σε μεταλλάξεις σε 8 γονίδια (HPS – 1 – 8), οι οποίες προκαλούν διαταραχή στο σχηματισμό κυτταρικών οργανυλίων, όπως των μελανοσωματίων (Carmona-Rivera C, et al., 2011).

### Σύνδρομο TAR (Thrombocytopenia Absent Radius syndrome - TAR -)

Το σύνδρομο TAR (σύνδρομο θρομβοπενίας με απουσία κερκίδας) είναι κληρονομική νόσος, που μεταβιβάζεται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρη απουσία κερκίδας, διαταραχές της ανάπτυξης οστών, δομικές ανωμαλίες καρδιάς και νεφρών, θρομβοπενία με υποπλασία των μεγακαρυοκυττάρων και ανεπάρκεια δ – κοκκίων και σοβαρή αιμορραγική διάθεση. Οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXD11*, τα οποία ρυθμίζουν τη εμβρυονική ανάπτυξη (Fleischman RA, et al., 2002).

### Σύνδρομο Wiskott-Aldrich

Το σύνδρομο Wiskott-Aldrich (WAS) χαρακτηρίζεται από το μικρό μέγεθος των αιμοπεταλίων, θρομβοπενία, σημαντική μείωση των δ – κοκκίων και σπάνια και των α – κοκκίων, ήπια ή σοβαρή αιμορραγική διάθεση, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω ανοσοανεπάρκειας και έκζεμα. Κληρονομείται με φυλοσύνδετο χαρακτήρα και η συχνότητά του στην Ευρώπη είναι 1/250.000 γεννήσεις αρρένων. Το σύνδρομο οφείλεται σε μετάλλαξη στο γονίδιο WAS στο χρωμόσωμα X (Xp11.22), που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη WASP, η οποία ρυθμίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Binder V, et al., 2006).

### Διαταραχές των α-κοκκίων

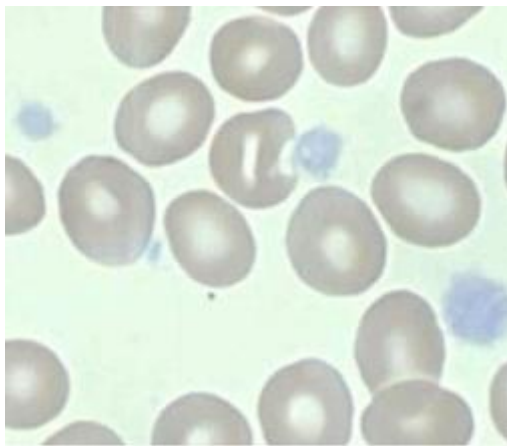
#### Σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου (Gray-Platelet Syndrome - GPS)

Το σύνδρομο του φαιού αιμοπεταλίου περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1971. Είναι σπάνια διαταραχή, κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο ή κυρίαρχο χαρακτήρα και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *GATA-1*. Χαρακτηρίζεται από ήπια θρομβοπενία, μεγάλα και κενοτοπιώδη αιμοπετάλια, απουσία των α – κοκκίων και ήπια ή μέτρια αιμορραγική διάθεση.

#### Εργαστηριακή διάγνωση

- Παράταση του χρόνου ροής
- Ήπια θρομβοπενία (αιμοπετάλια 50.00-100.000/mm<sup>3</sup>)

- Αιμοπετάλια με γκρίζα απόχρωση και άκοκκα στην παρατήρηση με στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση May-Grunwald/Giemsa
- Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων με το ADP και την αδρεναλίνη είναι φυσιολογική
- Σε ορισμένες περιπτώσεις διαταραχή στη συσσώρευση με ADP, χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης ή κολλαγόνου
- Ήπια μυελοϊνώση σε ορισμένους ασθενείς, αποτέλεσμα της πληθώρας των κυτταροκινών, οι οποίες εκκρίνονται από τα υποκοκκιώδη αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα
- Αυξημένα επίπεδα του PF4 και της β-TG του πλάσματος (Nurden AT, Nurden P.,2007).



**Εικόνα 28:** Σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου

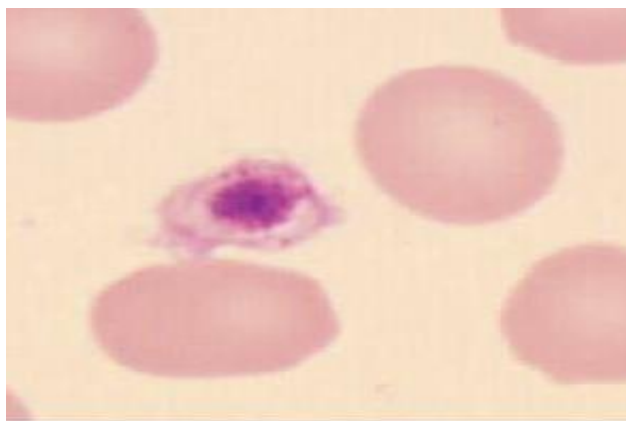
### **Θρομβοκυττοπάθεια Quebec**

Η θρομβοκυττοπάθεια Quebec μεταβιβάζεται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα και οφείλεται σε ανεπάρκεια της πολυμερίνης και ανώμαλη πρωτεόλυση του παράγοντα V και άλλων πρωτεϊνών του περιεχομένου των α-κοκκίων, με συνέπεια την ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση των επιπέδων του ενδοαιμοπεταλιακού ενεργοποιητή του ινωδογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA). Στη διαταραχή αυτή παρατηρείται απουσία αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε χαμηλές δόσεις επινεφρίνης και φυσιολογική ή μειωμένη συγκόλληση σε ADP και κολλαγόνο. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι διατηρείται η δομή των α – κοκκίων αλλά υπάρχει σημαντική ελάττωση των πρωτεϊνών τους. Οι ασθενείς με θρομβοκυττοπάθεια Quebec εμφανίζουν σοβαρές αιμορραγίες, λόγω υπερिनωδόλυσης αιμοπεταλιακής προέλευσης και ανταποκρίνονται μόνο στα αντιινωδολυτικά φάρμακα (Diamandis M, et al., 2008).

## Σύνδρομο Paris-Trousseau/Jacobsen

Το σύνδρομο Paris-Trousseau/Jacobsen, που πρωτοπεριγράφηκε το 1993 και οφείλεται στην απώλεια του τελικού τμήματος του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 11( del 11q), στο οποίο εντοπίζεται το γονίδιο Fli.1. Χαρακτηρίζεται από θρομβοπενία και ήπια αιμορραγική διάθεση. Στο περιφερικό αίμα υπάρχουν αιμοπετάλια με γιγαντιαία α – κοκκία, τα οποία όμως δεν εκκρίνουν το περιεχόμενό τους μετά από διέγερση με θρομβίνη ενώ στο μυελό παρατηρούνται μεγακαρυοκύτταρα, πολλά από τα οποία δείχνουν σημεία παθολογικής ωρίμανσης ή ενδομυελικής κυτταρόλυσης (Breton-Gorius, et al., 1995).

Το σύνδρομο Jacobsen χαρακτηρίζεται επίσης από έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 1, αλλά σοβαρότερο αιμορραγικό φαινόμενο και συνδυάζεται με συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες, νοητική υστέρηση, καθυστέρηση της ανάπτυξης και της κινητικότητας, τριγωνικεφαλία και δυσμορφίες του προσώπου και προβλήματα από τους οφθαλμούς, το ΓΕΣ και το ουρογεννητικό σύστημα ([Mattina T](#), et al, 2009).



**Εικόνα 29:** Σύνδρομο Paris-Trousseau

### **4) Διαταραχές των οδών μεταγωγής του σήματος**

#### **Διαταραχές της κυκλοοξυγενάσης (aspirin like defect)**

Οι διαταραχές της κυκλοοξυγενάσης είναι σπάνιες και κληρονομούνται συνήθως με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα. Προκαλούν ήπια αιμορραγική διάθεση και παραμένουν αδιάγνωστες στις περισσότερες περιπτώσεις. Τα αιμοπετάλια των ασθενών με διαταραχές της κυκλοοξυγενάσης συμπεριφέρονται όπως αυτά των ασθενών που λαμβάνουν ασπιρίνη, η οποία προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή της κυκλοοξυγενάσης. Για το λόγο αυτό, πριν προχωρήσουμε στην εργαστηριακή διερεύνηση, πρέπει να αποκλείεται η λήψη ασπιρίνης ή παραγώγων του σαλικυλικού οξέος από το ασθενή.

#### **Εργαστηριακή διάγνωση**

- Παθολογική συσσώρευση και έκκριση μετά από διέγερση των αιμοπεταλίων με:

- ADP
- Επινεφρίνη
- Κολλαγόνο
- Αραχιδονικό οξύ
- Φυσιολογική απάντηση στη TXA2
- Απουσία παραγωγής TXA2 από τα αιμοπετάλια

Η διαταραχή χαρακτηρίζεται ως τύπου 1 όταν τα επίπεδα της κυκλοοξυγενάσης είναι μη ανιχνεύσιμα και ως τύπου 2 σε περίπτωση παρουσίας φυσιολογικών επιπέδων δυσλειτουργικής πρωτεΐνης του ενζύμου (Rolf N, et al., 2009).

## **5) Διαταραχές των φωσφολιπιδίων των αιμοπεταλίων**

### **Σύνδρομο Scott**

Στο σύνδρομο Scott παρατηρείται διαταραχή της ασυμμετρίας της λιπιδική διπλοστιβάδας της μεμβράνης των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την ανεπαρκή έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στη εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και αιμορραγική διάθεση συχνά πολύ σοβαρή. Η διαταραχή κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα και στον εργαστηριακό έλεγχο ενώ ο αριθμός, η δομή, η προσκόλληση, η συσσώρευση, η έκκριση, το περιεχόμενο των κοκκίων και ο μεταβολισμός των αιμοπεταλίων είναι φυσιολογικά, η κατανάλωση προθρομβίνης και συνεπώς και η παραγωγή θρομβίνης κατά την πήξη του αίματος είναι ελαττωμένη (Zwaal FA, et al, 2004).

## **ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΕΣ**

Οι κληρονομικές θρομβοπενίες είναι σπάνιες και πολλές φορές ανακαλύπτονται τυχαία. Υπάρχουν διαταραχές οι οποίες εκδηλώνονται με σοβαρή αιμορραγική διάθεση από τη βρεφική ηλικία, ενώ άλλες παραμένουν αδιάγνωστες και στην ενήλικη ζωή.

Οι κληρονομικές θρομβοπενίες διακρίνονται σε:

1. Θρομβοπενίες με μικρό μέγεθος αιμοπεταλίων
  - Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
  - *X-linked θρομβοπενία*
2. Θρομβοπενίες με φυσιολογικό μέγεθος αιμοπεταλίων
  - *Συγγενής αμεγακαρυοκυτταρική θρομβοπενία*
  - Σύνδρομο θρομβοπενίας με απουσία κερκίδας
3. Θρομβοπενίες με μεγάλο μέγεθος αιμοπεταλίων
  - Μεσογειακή μακροθρομβοπενία

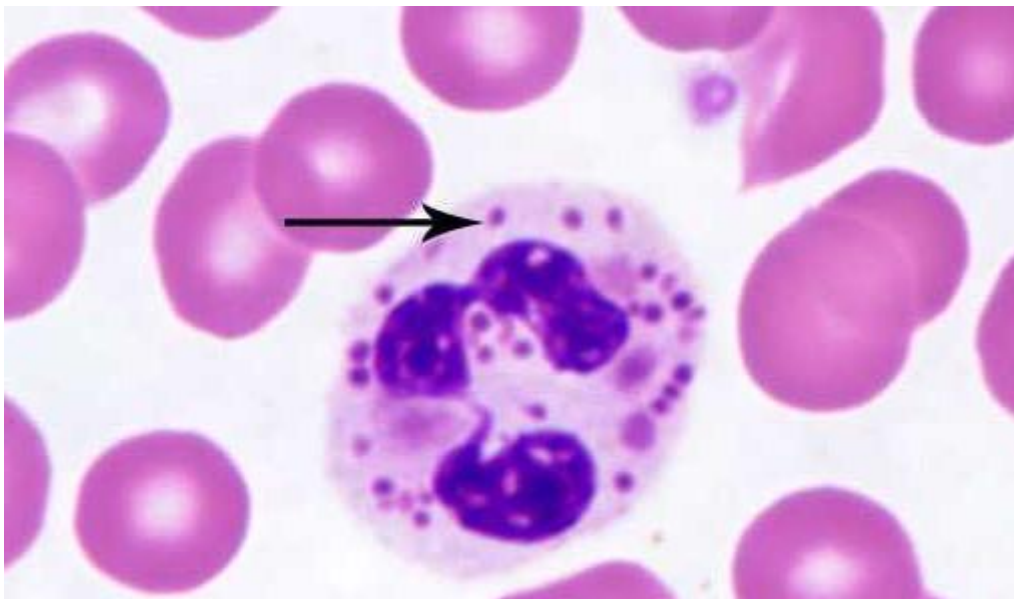
- Σύνδρομο DiGeorge ή velocardiofacial σύνδρομο
- Αιμοπεταλιακού τύπου ή νόσος ψευδο – von Willerand
- Ανωμαλία May-Hegglin
- Σύνδρομο Paris-Troussau / Jacobsen (Cattaneo M., 2008).

Η κυριότερη από τις διαταραχές αυτές είναι η:

### **Ανωμαλία May-Hegglin**

Η ανωμαλία May-Hegglin (σύνδρομο Fechtner ή Sebastian ή Epstein ) κληρονομείται με τον αυτοσωματικό κυρίαρχο. Σήμερα είναι γνωστή και ως MYH9 – RD (myosin heavy chain 9 – related disorder) και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *MYH9* στο χρωμόσωμα 22, το οποίο κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα τη μυοσίνης, η οποία εκφράζεται σε διαφορετικούς ιστούς (αιμοπετάλια, νεφροί, λευκά αιμοσφαίρια).

Χαρακτηρίζεται από αιμορραγική διάθεση, ήπια ή σοβαρή θρομβοπενία, μεγάλα αιμοπετάλια, βασεόφιλα έγκλειστα στα ουδετερόφιλα (“Döhle-like” σωματία), τα οποία αποτελούν ενδοκυττάρια καθιζήματα της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης, ορατά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και φυσιολογική συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ADP, κολλαγόνο και ριστοσετίνη. Συνοδεύεται από κώφωση, νεφρίτιδα και καταρράκτη (Saito H and Kunishima S., 2008).



**Εικόνα 30:** Ανωμαλία May-Hegglin

## **ΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ**

Οι αγγειακές αιτίες που προκαλούν αιμορραγική διάθεση είναι κληρονομικές ή επίκτητες και οφείλονται σε αγγειοϋπερπλαστικές διαταραχές (αγγειογένεση εύθραυστων αγγείων), σε δομικές διαταραχές του περιαγγειακού ιστού, σε αγγειακούς τραυματισμούς και σε φλεγμονώδεις διαταραχές.

Οι αγγειακές διαταραχές εκδηλώνονται συνήθως με αυτόματες ή εύκολες δερματικές αιμορραγίες, στις οποίες παρατηρείται εξαγγείωση αίματος στο δέρμα και σχηματισμός πετεχιών ή πορφυρικού εξανθήματος και εκχυμώσεων. Σπανιότερα μπορεί να προκαλέσουν σοβαρότερες αιμορραγίες, όπως στην κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία.

### **Ταξινόμηση αγγειακών αιτιών αιμορραγίας**

#### ***Κληρονομικές διαταραχές***

- Κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία (νόσος Rendu-Weber-Osler)
- Γιγάντιο αιμαγγείωμα (Kasabach-Meritt)
- Αταξία – τηλαγγειεκτασία
- Διαταραχές του συνδετικού ιστού
- Σύνδρομο Ehlers – Danlos
- Ατελής οστεογένεση
- Ελαστικό ψευδοξάνθωμα
- Σύνδρομο Marfan

#### ***Επίκτητες διαταραχές***

- Επίκτητες αγγειακές πορφύρες

Οι επίκτητες αγγειακές πορφύρες προκαλούνται αιμοστατικές διαταραχές (ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των αιμοπεταλίων, διαταραχές των παραγόντων της πήξης) και από διαταραχές των αγγείων.

Οι σημαντικότερες από τις κληρονομικές διαταραχές είναι οι εξής:

#### ***Κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία (νόσος Rendu-Weber-Osler)***

Η νόσος είναι σπάνια αγγειοϋπερπλαστική διαταραχή (συχνότητα: 1/5.000 - 10.000 στο γενικό πληθυσμό), η οποία κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα. Συνδέεται αιτιολογικά με μεταλλάξεις στα γονίδια *ENG* (ενδογλίνη), στο χρωμόσωμα 9 και *ALK1* (activin receptorlike kinase type I), στο χρωμόσωμα 12. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν υποδοχείς για τον TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta), που παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των αγγείων (Prigoda NL, et al., 2006).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η τοπική διάταση των μετατριχοειδικών φλεβιδίων. Οι δυσπλασίες αυτές οδηγούν στο σχηματισμό εύθραυστων αρτηριοφλεβικών shunts, τηλαγγειεκτασιών ή ανευρυσμάτων. Οι τηλαγγειεκτασίες εντοπίζονται στο ρινοφάρυγγα, τα χείλη, τη γλώσσα, το ΚΝΣ, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τον σπλήνα, τον ουρογεννητικό σύστημα, το ΓΕΣ, το δέρμα, τον επιπεφυκότα, κλπ. Οι συχνότερες εκδηλώσεις είναι η ρινορραγίες και οι αιμορραγίες του πεπτικού σωλήνα, οι οποίες μπορεί να απαιτήσουν μεταγγίσεις ερυθρών ή να προκαλέσουν σταδιακά σιδηροπενική αναιμία (Giordano P, et al., 2013).





**Εικόνα 31:** Τηλαγγειεκτασίες γλώσσας

### **Γιγάντιο αιμαγγείωμα (σύνδρομο Kasabach-Meritt)**

Το σύνδρομο Kasabach-Meritt είναι μία σπάνια διαταραχή και εμφανίζεται στην βρεφική και παιδική ηλικία. Πρόκειται αγγειακούς όγκους (αιμαγγειώματα), που προέρχονται από ένα αιμαγγειοενδοθηλίωμα ή άλλο αγγειακό όγκο και συχνά χρονολογούνται από τη γέννηση. Εμφανίζονται με τη μορφή εμφανούς δερματικού γιγαντιαίου αιμαγγειώματος ή πολλαπλών μικρότερων αιμαγγειωμάτων, που εντοπίζονται κυρίως στα άκρα, τον κορμό, τον τράχηλο, το πρόσωπο ή τον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο.

Τα αιμαγγειώματα αυτά συνδυάζονται με θρομβοπενία και διαταραχές της πήξης, λόγω τοπικής ενεργοποίησης της πήξης και κατανάλωσης των παραγόντων πήξης και του ινωδογόνου, που μπορεί να οδηγήσουν σε διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και αιμορραγική διάθεση συχνά απειλητική για τη ζωή. Μπορεί επίσης να προκαλέσουν αιμολυτική αναιμία, λόγω μηχανικής καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η διάγνωση των αγγειακών βλαβών γίνεται με αξονική ή μαγνητική τομογραφία και αγγειογραφία και αντιμετωπίζονται με χειρουργική αφαίρεση ή εμβολισμό (Hall G., 2001).

### **Σύνδρομο Ehlers - Danlos**

Το σύνδρομο Ehlers - Danlos είναι μία ομάδα έντεκα διαφορετικών κληρονομικών διαταραχών του συνδετικού ιστού που προκαλούνται από διαταραχές στην παραγωγή και τη δομή του κολλαγόνου και των πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο. Οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων [COL5A](#) ή [COL3A](#) και κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο ή υπολειπόμενο χαρακτήρα (Mayer K, et al, [2012](#), Eur J , 2013).

Οι διαταραχές του κολλαγόνου επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες του δέρματος, των αρθρώσεων, των συνδέσμων, των σπλάχνων και των αγγείων και προκαλούν υπερελαστικότητα και ευθραυστότητα του δέρματος, αγγειακή και σπλαχνική ευθραυστότητα, αιμορραγική διάθεση και υπερεκτασιμότητα και υπερευλυγισία των αρθρώσεων. Οι σημαντικότερες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι:

- Υπερεκτασιμότητα του δέρματος με συχνές ρήξεις
- Πτωχή επούλωση χειρουργικών τραυμάτων, ανώμαλη ουλοποίηση και εμφανείς ουλές
- Σοβαρή υπερευλυγισία των αρθρώσεων με αυτόματες εξάρθρωσεις
- Κιρσοί και τερμινθοειδείς ψευδοόγκοι
- Κυφοσκολίωση, μεγάλος βλαισός δάκτυλος, πλατυποδία
- Δερματικές εκχυμώσεις και ρήξη αγγείων
- Καρδιακές ανωμαλίες, πρόπτωση της μιτροειδούς βαλβίδας, αρτηριακά ανeurύσματα

Σύμφωνα με τη νεότερη ταξινόμηση διακρίνονται 6 κύριοι τύποι του συνδρόμου:

- Κλασικός τύπος (τύπος I και II στην παλαιότερη ταξινόμηση)
- Υπερευλύγιστος τύπος (τύπος III)
- Αγγειακός τύπος (τύπος IV)
- Κυφοσκολιωτικός τύπος (τύπος VI)
- Αρθροχάλαση (VIIA και B)
- Δερματοσπάρραξη (τύπος VIIC)
- Άλλοι τύποι (V, VIII, IX, X και XI)

Ο αγγειακός (IV), είναι ο τύπος του συνδρόμου στον οποίο παρατηρούνται ιδιαίτερα σοβαρά αιμορραγικά επεισόδια, όπως ρήξη και διαχωριστικά ανeurύσματα αρτηριών στο θώρακα, την κοιλιά και την κεφαλή και εκδηλώνονται με αιμορραγίες του ΚΝΣ, του ΓΕΣ, οπισθοπεριτοναϊκές αιμορραγίες, ρήξεις οργάνων, σοβαρές μετεγχειρητικές ή μετατραυματικές αιμορραγίες και αιφνίδιο θάνατο (De Paere A and [Malfait F.](#),2012).

### **Ελαστικό ψευδοξάνθωμα**

Το ελαστικό ψευδοξάνθωμα είναι μία σπάνια κληρονομική διαταραχή η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική ασβεστοποίηση και κατακερματισμό των ελαστικών ινών κυρίως του δέρματος, των αγγείων του αμφιβληστροειδούς και του καρδιαγγειακού συστήματος. Οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *ABCC6*, στο χρωμόσωμα 16, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη – μεταφορέα που βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Chassaing N, et al., 2005). Εκδηλώνεται με τη μορφή ξανθοχρωματικών βλατίδων διαμέτρου 1 – 5mm στο τράχηλο, τις βουβωνικές περιοχές, τις μασχάλες, το στόμα και το βλεννογόνο του κόλπου και του πρωκτού. Οι αποτιτανώσεις του μέσου και έσω ελαστικού χιτώνα στη νεφρική αρτηρία, τα στεφανιαία αγγεία και τα αγγεία του βλεννογόνου του ΓΕΣ και του ΚΝΣ, μπορεί να προκαλέσουν αιματουρία, στηθάγχη ή έμφραγμα μυοκαρδίου, γαστρεντερικές αιμορραγίες και αιμορραγίες του ΚΝΣ (Bercovitch L and Terry P., 2004.).

### **Αγγειακές πορφύρες**

Οι αιμορραγίες του δέρματος οφείλονται σε εξαγγείωση αίματος από το αγγειακό δίκτυο προς το δέρμα ή το υποδόριο ιστό. Ανάλογα με την ποσότητα του αίματος που εξαγγειώνεται, οι βλάβες διακρίνονται σε πετέχιες (αιμορραγίες μεγέθους κεφαλής καρφίτσας) μεγέθους <2mm, πορφυρικές βλάβες, όταν οι δερματικές αιμορραγίες είναι μεγέθους 2mm - 1cm και

εκχυμώσεις όταν οι αιμορραγίες είναι μεγέθους >1cm. Παρότι η διάκριση των αιμορραγικών εκδηλώσεων του δέρματος είναι σαφής, στη βιβλιογραφία οι εκδηλώσεις αυτές αλλά και οι διαταραχές που τις προκαλούν αναφέρονται με το γενικό όρο «πορφύρα». Η διαφορική διάγνωση των αιμορραγικών βλαβών από τις τηλαγγειεκτασίες και το ερύθημα γίνεται με εφαρμογή πίεσης στο σημείο της βλάβης. Με την πίεση οι αιμορραγικές βλάβες δεν εξαφανίζονται, σε αντίθεση με τις άλλες βλάβες.

Η εξαγγείωση του αίματος εξαρτάται άμεσα εκτός από την ακεραιότητα των αγγείου και του περιβάλλοντος ιστού, από την ικανότητα του αιμοστατικού μηχανισμού να αντιμετωπίσει την απώλεια αίματος, σε περίπτωση τραυματισμού του αγγείου και από το μέγεθος της διατοιχωματικής πίεσης, η οποία ωθεί το αίμα εκτός του αγγείου (Champion RA:, 1992).

Η αντίσταση των τριχοειδών προσδιορίζεται με μία απλή δοκιμασία, τη δοκιμασία ευθραυστότητας των τριχοειδικών αγγείων (Rumpel-Leede test). Στη δοκιμασία αυτή εφαρμόζεται μέση πίεση (μεταξύ συστολικής και διαστολικής πίεσης) στο βραχίονα, με τη βοήθεια ενός σφυγμομανόμετρου, για 5 λεπτά. Μετά από τη διακοπή της εφαρμοζόμενης πίεσης μετρείται ο αριθμός των πετεχιών, που σχηματίζονται σε μια κυκλική περιοχή διαμέτρου 2,5cm, κάτω από την περιοχή της πίεσης. Αν ο αριθμός των πετεχιών στη προκαθορισμένη περιοχή, είναι > 20, η δοκιμασία θεωρείται παθολογική. (Phuong CXT., et al., 2002).

Οι αγγειακές πορφύρες διακρίνονται σε ψηλαφητές και μη ψηλαφητές και ταξινομούνται ανάλογα με την αιτιολογία τους ως εξής:

### Μη ψηλαφητή πορφύρα

- Πορφύρα από αυξημένη διατοιχωματική πίεση
  - Οξεία (δοκιμασία Valsava, βήχας, εμετός, άρση βάρους)
  - Χρόνια (φλεβική στάση)
- Διαταραχές ακεραιότητας των αγγείων και του περιαγγειακού ιστού
  - Γεροντική πορφύρα
  - Ακτινική πορφύρα
  - Σκορβούτο (έλλειψη βιταμίνης C)
  - Μακροχρόνια λήψη ή τοπική χρήση κορτικοστεροειδών, σύνδρομο Cushing
  - Αμυλοείδωση
- Αγγειακός τραυματισμός
  - Τραύματα
  - Ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία (ηλιακό έγκαυμα)
  - Λοιμώδεις πορφύρες (μηνιγγιτιδοκοκαιμία, τύφος, σηψαιμία, ρικέτσιες, ενδοκαρδίτιδα, μυκητιασικές λοιμώξεις)
  - Φαρμακευτικής αιτιολογίας
  - Θρόμβωση (ΔΕΠ, δερματική νέκρωση από κουμαρινικά, κεραυνοβόλος πορφύρα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο)

## Ψηλαφητή πορφύρα

- Αγγειίτιδες
  - Δερματικές αγγειίτιδες (συστηματικές, παρανεοπλασματικές, πορφύρα Henoch - Schönlein)
  - Κρυσφαριναιμία, κρυσινωδογοναιμία, σύνδρομο υπεργλοιότητας
  - Δυσπρωτεΐναιμία

Οι σημαντικότερες από τις αγγειακές πορφύρες είναι οι εξής:

### **Γεροντική πορφύρα**

Η γεροντική πορφύρα οφείλεται στην αγγειακή ευθραυστότητα και την ατροφία του δέρματος, που δημιουργείται από διαταραχές του συνδετικού ιστού του χορίου του δέρματος λόγω της χρόνιας έκθεσης στον ήλιο, της γήρανσης και των φαρμάκων. Παρατηρείται σε άτομα μεγάλης ηλικίας και εκδηλώνεται με τη μορφή σκουρόχρωων εκχυμώσεων κυρίως στα χέρια και στα αντιβράχια. Συχνά εμφανίζονται νέες βλάβες, χωρίς απαραίτητα προηγούμενο τραυματισμό, οι οποίες εξαφανίζονται σε λίγες ημέρες και αφήνουν καφεοειδείς κηλίδες λόγω εναπόθεσης αιμοσιδηρίνης και μπορεί να είναι μόνιμες. Οι βλάβες επιδεινώνονται με τη λήψη ορισμένων φαρμάκων (κορτικοστεροειδή, αντιπηκτικά και αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα). Η γεροντική πορφύρα δημιουργεί μόνο αισθητικό πρόβλημα (*Fisher GJ, et al., 2002*).



**Εικόνα 32: Γεροντική πορφύρα**

### **Ανεπάρκεια βιταμίνης C**

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης C (σκορβούτο) προκαλεί διαταραχή της σύνθεσης του κολλαγόνου εξαιτίας μειωμένης υδροξυλίωσης του προκολλαγόνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό εύθραυστων τριχοειδών. Εκδηλώνεται με πορφύρα στα άκρα, τη ράχη και τους γλουτούς, εκχυμώσεις και αιμορραγικά έλκη στα άκρα και στους βλεννογόνους. Οι αιμορραγίες στον επιπεφυκότα, τους μύες, τις αρθρώσεις και τα οστά προκαλούν επιπεφυκίτιδα, μυαλγίες, αρθραλγίες και οστικά άλγη (*Levine NA and Greer KE., 2000*).

## **Γλυκοκορτικοστεροειδή**

Οι κηλίδες πορφύρας είναι χαρακτηριστικές εκδηλώσεις στο σύνδρομο Cushing. Είναι ερυθρόχρες βλάβες, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στα άκρα. Παρόμοιες βλάβες προκαλούν τα κορτικοστεροειδή χορηγούμενα από του στόματος, παρεντερικά, εισπνεόμενα ή τοπικά υπό μορφή δερματικών αλοιφών και προκαλούνται λόγω λέπτυνση της επιδερμίδας από απώλεια του συνδετικού ιστού του χορίου (Champion RA:, 1992).

## **Φαρμακευτική πορφύρα**

Ορισμένα φάρμακα προκαλούν φλεγμονώδη διήθηση των αγγείων και αγγειίτιδα, πιθανόν λόγω αλλεργικής υπερευαισθησίας που εκδηλώνεται με πετέχιες και πορφύρα. Στα φάρμακα αυτά περιλαμβάνονται: η ασπιρίνη, η αλλοπουρινόλη, η σιμετιδίνη, οι πενικιλίνες, το μεφенаμικό οξύ, οι σουλφοναμίδες, η κινίνη, η κινιδίνη, η μορφίνη, η ινδομεθακίνη, τα άλατα χρυσού, η ατροπίνη, τα βαρβιτουρικά, η χλωραμφενικόλη, η ισονιαζίδη, ο υδράργυρος, κλπ (Bruinsma W., 1990).

## **Αμυλοείδωση**

Στην αμυλοείδωση παρατηρούνται εναποθέσεις αμυλοειδούς στ αγγεία του δέρματος και στον υποδόριο ιστό, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευθραυστότητας των αγγείων και την εμφάνιση πετεχιών και πορφυρικού εξανθήματος. Οι αιμορραγικές εκδηλώσεις, ιδιαίτερα στην περιστοματική περιοχή και τα βλέφαρα, επιδεινώνονται σε κάθε περίπτωση αύξησης της διατοίχωματικής πίεσης (Kumar S, et al., 2013).

## **Αγγειίτιδες**

Οι αγγειίτιδες αποτελούν ετερογενή σύνδρομα τα οποία χαρακτηρίζονται από φλεγμονώδη διήθηση και καταστροφή του τοιχώματος των αγγείων, με επακόλουθη ισχαιμία και αιμορραγικές εκδηλώσεις. Διακρίνονται σε πρωτοπαθείς (κοκκιωμάτωση Wegener) ή δευτεροπαθείς σε νοσήματα συνδετικού ιστού, λοιμώξεις και από φάρμακα.

Η δερματική αγγειίτιδα και κυρίως η λευκοκυτταροκλαστική αγγειίτιδα είναι κύρια κλινική εκδήλωση πολλών συστηματικών αγγειιτιδικών συνδρόμων. Εκδηλώνεται με ψηλαφητή πορφύρα, urticaria, διηθητικό ερύθημα, πετέχιες, πορφυρικό εξάνθημα, αιμορραγικές κύστες, έλκη ή γάγγραινα ([Chen KR](#), and [Carlson JA.](#), 2008). Οφείλεται σε εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων στο τοίχωμα των αγγείων από αντισώματα τα οποία δημιουργούνται από διάφορους παράγοντες, όπως νοσήματα του συνδετικού ιστού (ρευματοειδής αγγειίτιδα, κοκκιωμάτωση Wegener, σύνδρομο Churg-Strauss, νόσος Behcet), φάρμακα (υδραλαζίνη, CSFs, αλλοπουρινόλη, μινουκυκλίνη, D – πενικιλλαμίνη, φαινυντοΐνη, μεθοτραξάτη), λοιμώξεις (σταφυλοκοκκικές και στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις, ενδοκαρδίτιδα, HIV, ηπατίτιδες) και νεοπλασμάτα (καρκίνος πνευμόνων, ουροποιητικού και ΓΕΣ, λευχαιμία τριχτών κυττάρων, λεμφο- και μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα). Τα ανοσοσυμπλέγματα στην επιφάνεια των αγγείων ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και στη συνέχεια τα

ενδοθηλιακά κύτταρα, με τη μεσολάβηση διαμεσολαβητών φλεγμονής και μορίων προσκόλλησης. Επιπλέον, μερικές φορές, αυτοαντισώματα, όπως τα ANCA συνδέονται με τα ουδετερόφιλα και προκαλούν προσκόλληση των ουδετεροφίλων στο αγγειακό τοίχωμα και κυτταρική ενεργοποίηση (Gonzalez-Gay MA, et al, 2005).

### **Πορφύρα Henoch-Schönlein**

Η αναφυλακτοειδής πορφύρα Henoch-Schönlein είναι μια οξεία γενικευμένη λευκοκυτταροκλαστική αγγειίτιδα η οποία προσβάλλει τα μικρά αγγεία (φλεβίδια, ατηριόλια, τριχοειδή) του δέρματος, του ΓΕΣ, των αρθρώσεων, των νεφρών και σπανιότερα των πνευμόνων και του ΚΝΣ. Η ανοσοσφαιρίνη IgA παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου δεδομένου ότι ανοσοσυμπλέγματα της IgA ανιχνεύονται στο πλάσμα και εναποτίθενται στο τοίχωμα των αγγείων. Οι εναποθέσεις των ανοσοσυμπλεγμάτων προκαλούν ινδοειδή καταστροφή των αγγείων (νεκρωτική αγγειίτιδα). Αλλεργιογόνα, όπως τροφές, δείγματα εντόμων, έκθεση στο κρύο και φάρμακα (πενικιλίνες, αμπικιλίνη, ερυθρομυκίνη, κινίνη, κινιδίνη) μπορεί να διεγείρουν την παραγωγή IgA. Επιπλέον λοιμώξεις από βακτηρίδια (αιμόφιλος, μυκόπλασμα, λεγεονέλλα, γερσίνια, σαλμονέλλα), ιούς (αδενοϊοί, ιός Epstein Barr, και έρπητα ζωστήρα), εμβόλια καθώς και μεταβολές στην παραγωγή ιντερλευκινών και αυξητικών παραγόντων, μπορεί να προκαλέσουν την αγγειίτιδα (Helander SD, et al, 1995).

Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα ηλικίας 2-11 ετών και εκδηλώνεται αρχικά με συμπτώματα λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, πυρετό, μυαλγίες και κεφαλαλγία. Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου είναι πορφυρικό εξάνθημα ή εκχυμώσεις, αρθραλγίες, κοιλιαλγία και νεφροπάθεια. Το πορφυρικό εξάνθημα αρχικά εντοπίζεται στα άκρα και στους γλουτούς και στη συνέχεια γίνεται κνησμώδες, με κεντρική νέκρωση. Οι αρθραλγίες αφορούν συνήθως τα γόνατα και τις ποδοκνημικές. Κοιλιαλγία εμφανίζεται σε περίπου 50% των περιπτώσεων και μπορεί να συνοδεύεται από εμέτους, διάρροιες και αιματοχεσία, ενώ σπάνια μπορεί να παρατηρηθεί εντερικό εγκολεσμός. Η νεφρική προσβολή εκδηλώνεται με πρωτεϊνουρία, αιματουρία ή σπειραματονεφρίτιδα ενώ περίπου 1% των ασθενών μπορεί να αναπτύξουν χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Σπάνια οι ασθενείς παρουσιάζουν ηπατοσπληνομεγαλία, έμφραγμα μυοκαρδίου, πνευμονική αιμορραγία και εκδηλώσεις από το ΚΝΣ (διαταραχές συμπεριφοράς, σπασμοί, κεφαλαλγία ή μονονευρίτιδες).

Η νόσος υφίεται αυτόματα σε περίπου 8 εβδομάδες χωρίς να αποκλείονται και οι περιπτώσεις υποτροπής της νόσου (Szer IS., 1994; Causey AL, et al. 1994).





**Εικόνα 33:** Πορφύρα Henoch-Schönlein

## ΝΟΣΟΣ VON WILLEBRAND

Η νόσος von Willebrand (vWD) είναι η πιο συχνή κληρονομική διαταραχή του αιμοστατικού μηχανισμού με συχνότητα ~ 1% στο γενικό πληθυσμό. Η νόσος οφείλεται σε ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία του παράγοντα von Willebrand (vWF), που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του vWF στο χρωμόσωμα 12 και συνεπάγεται διαταραχή της πρωτογενούς αιμόστασης.

Η vWD κατατάσσεται σε τρεις κύριους τύπους: 1, 2 και 3. Οι τύποι 1 και 3 αντιπροσωπεύουν ποσοτικές διαταραχές του vWF. Ο τύπος 2 αποτελεί ποιοτική διαταραχή του vWF και διακρίνονται 4 υπότυποι: 2A, 2B, 2N και 2M.

- Ο τύπος 1 της νόσου είναι ο συχνότερος, κληρονομείται με το σωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από ήπια ή μέτρια ποσοτική ανεπάρκεια του vWF.

- Ο τύπος 2A κληρονομείται με σωματικό κυρίαρχο ή υπολειπόμενο χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται από μειωμένη προσκόλληση των αιμοπεταλίων, μέσω του vWF, στο αγγειακό τοίχωμα και απώλεια των πολυμερών υψηλού MB.
- Ο τύπος 2B κληρονομείται με σωματικό κυρίαρχο ή υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από απώλεια των πολυμερών υψηλού MB και αυξημένη τάση σύνδεσης των αιμοπεταλίων με τον vWF, με αποτέλεσμα θρομβοπενία.
- Ο τύπος 2M κληρονομείται με σωματικό κυρίαρχο ή υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από μειωμένη σύνδεση των αιμοπεταλίων με τον vWF.
- Ο τύπος 2N κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται από μειωμένη σύνδεση του FVIII με τον vWF, χαμηλά επίπεδα του FVIII και αιμορραγικές εκδηλώσεις παρόμοιες με αυτές της ήπιας αιμορροφιλίας.
- Ο τύπος 3 κληρονομείται με σωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται από σχεδόν πλήρη απουσία του vWF, χαμηλά επίπεδα του FVIII και αιμορραγικές εκδηλώσεις παρόμοιες με αυτές της αιμορροφιλίας.

Τα εργαστηριακά ευρήματα των διαφόρων τύπων της νόσου φαίνονται στον πίνακα 5.

	Normal	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2M	Type 2N	Type 3	PLT-VWD*
VWF:Ag	N	L, ↓ or ↓↓	↓ or L	↓ or L	↓ or L	N or L	absent	↓ or L
VWF:RCo	N	L, ↓ or ↓↓	↓↓ or ↓↓↓	↓↓	↓↓	N or L	absent	↓↓
FVIII	N	N or ↓	N or ↓	N or ↓	N or ↓	↓↓	1-9 IU/dL	N or L
RIPA	N	often N	↓	often N	↓	N	absent	often N
LD-RIPA	absent	absent	absent	↑↑↑	absent	absent	absent	↑↑↑
PFA-100® CT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
BT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
Platelet count	N	N	N	↓ or N	N	N	N	↓
VWF multimer pattern	N	N	abnormal	abnormal	N	N	absent	abnormal



## Πίνακας 5: Εργαστηριακά ευρήματα νόσου von Willebrand

Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι: επιστάξεις, ρινορραγίες, ουλορραγίες, αιμορραγίες του ΓΕΣ, μηνορραγίες στις γυναίκες, αυτόματες εκχυμώσεις, αιμορραγίες μετά από τραυματισμό, εξαγωγή δοντιών ή χειρουργικές επεμβάσεις, ενώ αιματώματα και τα αίμαρθρα είναι σπάνια, με εξαίρεση τον τύπο 3 της νόσου. Γενικά, οι αιμορραγικές εκδηλώσεις της vWD είναι συνήθως ήπιες σε ασθενείς με νόσο τύπου 1 και 2N, σοβαρότερες σε ασθενείς με τους τύπους 2M, 2A και 2B και ιδιαίτερα σοβαρές σε ασθενείς με τύπου 3 vWD (Laffan MA, et al., 2014).

Η επίκτητη vWD είναι μια σπάνια διαταραχή της αιμόστασης (συχνότητα 0,04%) και συνδέεται αιτιολογικά με λεμφο- ή μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, υποθυρεοειδισμό, καρδιαγγειακά νοσήματα, πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες, μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, νεοπλάσματα, αυτοάνοσα νοσήματα και φάρμακα. Οφείλεται στην ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων κατά του vWF ή στην απορρόφηση του παράγοντα από κακοήγη κύτταρα ή αιμοπετάλια, ή στην αυξημένη πρωτεόλυση των υψηλού μοριακού MB πολυμερών ή στη μειωμένη σύνθεση του παράγοντα. Τα εργαστηριακά ευρήματα και κλινικές εκδηλώσεις παρόμοιες με αυτές της κληρονομικής vWD αλλά οι αιμορραγικές εκδηλώσεις παρατηρούνται σε άτομα χωρίς ατομικό και οικογενειακό αιμορραγικό ιστορικό (Tefferi A. and Nichols WL., 1997).

### ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η εμφάνιση βλεννοδερματικών αιμορραγιών με απουσία κληρονομικού ιστορικού σε ασθενή, με φυσιολογικό αριθμό αιμοπεταλίων, μπορεί να οδηγήσει στη διάγνωση επίκτητης θρομβοπάθειας. Οι επίκτητες διαταραχές των αιμοπεταλίων είναι συχνότερες των κληρονομικών. Για τις διαταραχές αυτές είναι υπεύθυνα ευθύνονται φάρμακα, τροφές και συστηματικές διαταραχές.

Η διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών με επίκτητες διαταραχές των αιμοπεταλίων φαίνεται στο παρακάτω αλγόριθμο:

#### ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ

Αρνητικό οικογενειακό ιστορικό

Δύο εστίες αιμορραγίες

Μία εστία αιμορραγίας + μεταγγίσεις

Μία εστία αιμορραγίας (×3 φορές)



-/+ Χρόνος ροής

-/+ PFA100

Αποκλεισμός νόσου von Willebrand



Μελέτη συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (οπτική συσσωματομετρία)  
(ιδιαίτερα με ADP και αραχιδονικό)



Φωτοσυσσωματομετρία  
Κυτταρομετρία ροής  
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

## ΑΙΤΙΑ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

### Φάρμακα

Τα φάρμακα είναι η συχνότερη αιτία επίκτητων διαταραχών της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων επηρεάζει την λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα φάρμακα αυτά είναι:

- Αντ αιμοπεταλιακά
  - Αναστολείς COX -1 (ακετυλοσαλικυλικό οξύ – ασπιρίνη -)
  - Ανταγωνιστές των υποδοχέων του ADP (θειενοπυριδίνες: κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη, τικλοπιδίνη, ticagrelor)
  - Αποκλειστές των υποδοχέων GPIIb-IIIa των αιμοπεταλίων (abciximab, eptifibatide, tirofiban)
  - Αποκλειστές φωσφοδιεστεράσης (διπυριδαμόλη)
- Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη
- β -λακταμικά αντιβιοτικά (κεφαλοσπορίνες, πενικιλλίνες)
- Καρδιολογικά (προπρανόλη, νιφεδιπίνη, κινιδίνη)
- Αντιπηκτικά (δικουμαρόλη, ηπαρίνη)
- Ινωδολυτικά (rtPA, APSAC)
- Αντιπινωδολυτικά (τρανεξαμικό οξύ, ε –αμινοκαπρωϊκό οξύ),
- Δεξτράνες
- Ψυχοτρόπα
- Αναισθητικά
- Ναρκωτικά
- Αντιισταμινικά
- Σκιαστικά
- Στατίνες
- Χημειοθεραπευτικά, κλπ

Από τα φάρμακα αυτά τα κυριότερα είναι:

Η *ασπιρίνη* έχει αντιθρομβωτική δράση επειδή προκαλεί μη αναστρέψιμη ακετυλίωση της σερίνης 529 της κυκλοοξυγενάσης (COX) -1, που οδηγεί στην αναστολή της σύνθεσης των προσταγλανδινών PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> και της TXA<sub>2</sub> από τα αιμοπετάλια, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή ενεργοποίησης και συσσώρευσης τους. Επειδή τα αιμοπετάλια δεν έχουν τη δυνατότητα δημιουργίας νέας κυκλοοξυγενάσης, η αναστολή του ενζύμου διαρκεί για όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Καθημερινά παράγονται και αντικαθίστανται 10% των αιμοπεταλίων οπότε η φυσιολογική πρωτογενής αιμόσταση αποκαθίσταται σε τουλάχιστον 5 ημέρες μετά τη διακοπή της ασπιρίνης.

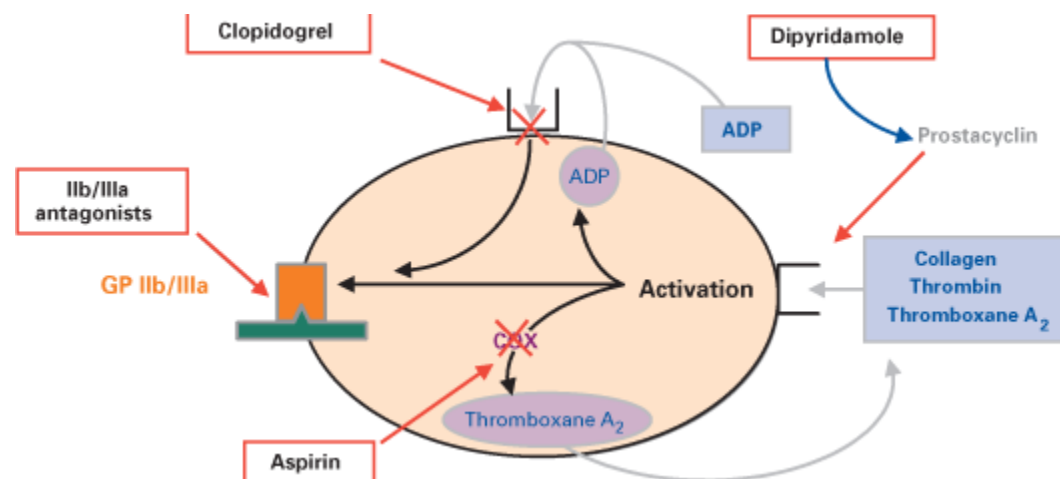
Η ασπιρίνη προκαλεί παράταση του χρόνου ροής και παράταση του χρόνου κλεισίματος στην εξέταση με PFA-100, αν και υπάρχουν αρκετοί ασθενείς που ενώ λαμβάνουν ασπιρίνη έχουν φυσιολογικούς χρόνους στην εξέταση με

PFA-100. Στη εξέταση με LTA, η ασπιρίνη αναστέλλει σχεδόν εντελώς τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ και το κολλαγόνο αλλά η ανταπόκριση στο ADP και την επινεφρίνη αναστέλλεται μόνο μερικώς(παρουσία μόνο πρωτογενούς κύματος). (Catella-Lawson F, et al., 2001).

Οι *θειενοπυριδίνες* (κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη, τικλοπιδίνη, ticagrelor) συνδέονται, μη αναστρέψιμα, με τον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> και προκαλούν αναστολή της απάντησης των αιμοπεταλίων τόσο στο εξωγενές ADP όσο και στο ADP που εκλύεται από τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την αναστολή ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η αντ αιμοπεταλιακή δράση των φαρμάκων αυτών παραμένει για 7 ημέρες μετά τη διακοπή τους. Η δράση της κλοπιδογρέλης στα αιμοπετάλια μπορεί να εκτιμηθεί με την LTA, στην οποία η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αναστέλλεται παρουσία ADP, ενώ η εξέταση με PFA -100 δεν είναι αρκετά ευαίσθητη μέθοδος για την παρακολούθηση της αντ αιμοπεταλιακής δράσης των φαρμάκων αυτών. (Savi P and Herbert JM., 2005).

Οι *αποκλειστές των υποδοχέων GP IIb-IIIa* των αιμοπεταλίων (abciximab, eptifibatid, tirofiban) αναστέλλουν τη σύνδεση υποδοχέα IIb-IIIa με το ινωδογόνο ή τον παράγοντα von Willebrand με αποτέλεσμα την αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Proimos GJ., 2001).

Η *διπυριδαμόλη* αναστέλλει τη φωσφοδιεστεράση, ένζυμο που προκαλεί διάσπαση του cAMP και αναστέλλει την απάντηση των αιμοπεταλίων στο ADP. Επιπλέον αναστέλλει την επαναπρόσληψη της αδενosίνης από τα αιμοπετάλια με αποτέλεσμα την αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από την επίδραση διαφόρων αγωνιστών.



**Εικόνα 34:** Μηχανισμός δράσης αντ αιμοπεταλιακών φαρμάκων

Τα *μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα* προκαλούν αναστρέψιμη αναστολή της COX -1 των αιμοπεταλίων και η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων αποκαθίσταται λίγες μέρες μετά τη διακοπή λήψης του φαρμάκου.

Κατά τη θεραπεία με *β –λακταμικά αντιβιοτικά* (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες) παρατηρείται σύνδεση του αντιβιοτικού με τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα διαταραχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ

υποδοχέων και ενδογενών ή εξωγενών αγωνιστών. Η αναστολή λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων είναι δόσοεξαρτώμενη, αρχίζει 2 – 3 ημέρες μετά την έναρξη της χορήγησης και αναστρέφεται 7 – 10 ημέρες μετά τη διακοπή του φαρμάκου (Hassan AA. Kroll MH., 2005).

### **Τροφές**

Η λειτουργία των αιμοπεταλίων επηρεάζεται επίσης από διάφορες τροφές όπως είναι τα ιχθυέλαια και τα ω3 λιπαρά οξέα, τα οποία προκαλούν μείωση της σύνθεσης της ΤΧΑ<sub>2</sub>, η βιταμίνη Ε, το κρεμμύδι και διάφορα καρυκεύματα (κύμινο, κιτρινόριζα), που προκαλούν αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και μείωση της σύνθεσης της ΤΧΑ<sub>2</sub> και το σκόρδο, που προκαλεί αναστολή της σύνδεσης των αιμοπεταλίων με το ινωδογόνο (συσσώρευση).

### **Συστηματικές διαταραχές**

Στην *ουραιμία*, παθολογικές ουσίες που κυκλοφορούν στο πλάσμα προκαλούν διαταραχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ αιμοπεταλίων - αγγειακού τοιχώματος. Η σημαντικότερη από τις ουσίες αυτές είναι το ΝΟ, το οποίο διαχέεται στα αιμοπετάλια, προκαλεί ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης και αναστολή της προσκόλλησης, ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η αύξηση των επιπέδων του ΝΟ οφείλεται κυρίως στην αύξηση του γουανιδινισουκινικού οξέος (προϊόν μεταβολισμού L – αργινίνης), λόγω της ανασταλτικής δράσης υψηλών επιπέδων ουρίας στα ένζυμα του κύκλου της ουρίας. Η ουραιμία προκαλεί επίσης μείωση των πολυμερών υψηλού ΜΒ του παράγοντα von Willebrand, με αποτέλεσμα τη διαταραχή προσκόλλησης αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα, τη μείωση σύνθεσης του αραχιδονικού οξέος και ΤΧΑ<sub>2</sub> από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και αναστολή της συσσώρευσης και έκκρισης περιεχομένου α κοκκίων και των πυκνών σωματίων. Στους ασθενείς με ουραιμία ο χρόνος ροής είναι παρατεταμένος (>30 min) ενώ τα προϊόντα του μεταβολισμού που αθροίζονται στην κυκλοφορία αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ADP, κολλαγόνο και επινεφρίνη. (Boccardo P, et al , 2004).

Τα *μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα* είναι μια ετερογενής ομάδα από νοσήματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή των κυττάρων του αίματος. Τα νοσήματα αυτά (ιδιαίτερα η αληθής πολυκυτταραιμία και η πρωτοπαθής θρομβοκυτταραιμία) χαρακτηρίζονται από αιμορραγίες ή θρομβώσεις, εξαιτίας διαταραχών της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια έχουν ανώμαλο σχήμα και μειωμένο αριθμό Ib και IX υποδοχέων. Επιπλέον, όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι >1.500.000/μL παρατηρείται σύνδεση των πολυμερών υψηλού ΜΒ του παράγοντα von Willebrand με τα αιμοπετάλια και επίκτητη νόσος von Willebrand. Στα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα η αιμοπεταλιακή δυσλειτουργία οφείλεται σε: μειωμένη σύνθεση του αραχιδονικού οξέος και μετατροπή του σε προσταγλανδινικά υπεροξειδία και ΤΧΑ<sub>2</sub>, μειωμένη απάντηση των αιμοπεταλίων στη θρομβοξάνη, ελάττωση των α –κοκκίων και των πυκνών σωματίων και ελάττωση των α<sub>2</sub> –αδρενεργικών υποδοχέων. Το συχνότερο εύρημα στον εργαστηριακό έλεγχο είναι η απουσία του δευτερογενούς

κύματος στη συσσώρευση με επινεφρίνη και ADP, ενώ ο χρόνος ροής και η μελέτη συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με PFA-100 δεν είναι σε θέση να προβλέψουν τον αιμορραγικό κίνδυνο.

Στα *μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα* και τις *οξείες λευχαιμίες* παρατηρείται διαταραχή του σχηματισμού των σωληναρίων και διαστολή του καναλικού συστήματος των αιμοπεταλίων, μείωση ή παρουσία γιγαντιαίων κοκκίων, τα οποία σχηματίζονται από σύντηξη των ενδοκυττάρων κοκκίων καθώς και επίκτητες διαταραχές της μεμβράνης και της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνών.

Στις *παραπρωτεϊναιμίες* παρατηρείται προσρόφησης της παραπρωτεϊνής στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και διαταραχή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αιμοπεταλίων. Συχνά παρατηρείται επίσης επίκτητη νόσος von Willebrand, λόγω αύξησης της κάθαρσης του παράγοντα ή αλληλεπίδρασης του παράγοντα με την παραπρωτεΐνη (Hassan AA. and Kroll MH., 2005).

Η αιτιολογία της αιμορραγικής διάθεσης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του *καρδιοπνευμονικού bypass* είναι πολυπαραγοντική. Οφείλεται στη χρήση ηπαρίνης, στη μείωση των επιπέδων των παραγόντων της πήξης, στην αυξημένη ινωδόλυση, τη θρομβοπενία και τις διαταραχές της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Οι διαταραχές της λειτουργικότητας οφείλονται σε ενεργοποίηση, αποκοκκίωση και κατακερματισμό των αιμοπεταλίων, που προκαλούνται από την προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ινωδογόνο, που απορροφάται από το πλάσμα και εντοπίζεται πάνω στις τεχνητές επιφάνειες των συσκευών εξωσωματικής κυκλοφορίας καθώς και στο μηχανικό τραυματισμό, στο διατμητικό stress, την υποθερμία κλπ (Paparella D, et al, 2004).

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. [Ali N](#), [Moiz B](#), [Shaikh U](#), [Adil S](#), et al. Diagnostic tool for Glanzmann's thrombasthenia clinicopathologic spectrum. *J Coll Physicians Surg Pak* 2008 ;18:91-94.
2. **Andrews RK**, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, Lopez JA, Berndt MC The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling *Thomb Haemost* 1999, 82:357-364.
3. **Andrews RK**, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004;114:447-453).
4. **Augustin HG**, Kozian DH, Johnson A. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioassays* 1994;16:901–906.
5. **Behnke O**. The morphology of blood platelet membrane systems. *Ser Haematol* 1970, 3:3-16.
6. **Bentfeld-Barker ME**, Bainton DF. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* 1982, 59:472-481.
7. **Berndt MC**, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2011; 96: 355–359.
8. **Bercovitch L**, Terry P. [Pseudoxanthoma elasticum 2004](#). *J Am Acad Dermatol* 2004;51:S13-4.
9. **Beutler E**, Lichtman M, Coller B, Kipps T, Seligsonhn U Williams Hematology, McGraw-Hill, 6<sup>th</sup> edition 2001.

10. **Beyers EM**, Tilly RH, Senden JM. Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid complex *J Biol Chem* 1984; 28:2382-2389.
11. **Beyers EM**, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev* 1991;5:146-154.
12. **Beyers EM**, Comfurius P, Dekkers DW, et al. Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol Chem* 1998;379:973-986,
13. **Binder V**, Albert MH, Kabus M, et al. H. The Genotype of the Original Wiskott Phenotype. *New England Journal of Medicine* 2006;355:1790-1793.
14. **Boccardo P**, Remuzzi G, Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:579–589.
15. **Born GVR**. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962;194:927-929.
16. **Boylan B**, Gao C, Rathore V, et al. Identification of FcγRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* 2008;112:2780-2786.
17. **Breton-Gorius J**, Favier R, Guichard J, et al. A new congenital dysmegakaryopoietic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet α-granules and chromosome 11 deletion at 11q23. *Blood* 1995; 85:1805-1814.
18. **Bruinsma W**: A guide to drug eruption. Brussels, The Free University Press, 1990.
19. **Brunner F**, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006;111(2):508-31.
20. **Budde U**, Drewke E, Mainusch K, et al. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:173-90.
21. **Catella-Lawson F**, Reilly MP, Kapoor SC, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Eng J Med.* 2001;345:1809–1817.
22. **Cattaneo M**. Congenital disorders of platelet function. In Gresele P, Fuster V, Lopez J, Page C, Vermynen J (eds). Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2008:201-224.
23. **Cattaneo M**. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:158–167.
24. **Causey AL**, Woodall BN, Wahl NG, et al. Henoch-Schönlein purpura: four cases and a review. *J Emerg Med* 1994;12:331-341.
25. **Chassaing N**, Martin L, Calvas P, et al. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet* 2005;42:881-892.

26. **Champion RA**: Purpura. In Champion RH, Burton JL(eds): Textbook of Dermatology. Oxford Blackwell Scientific, 1992, pp 1881-1892.
27. **Chen KR, Carlson JA**. Clinical approach to cutaneous vasculitis. [Am J Clin Dermatol](#) 2008;9:71-92.
28. **Christie DJ**, Avari T, Carrington LR, et al. Platelet function testing by aggregometry: approved guideline. *Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*, 28, 1 - 45.
29. **Covic L**, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000; 39: 5458–5467.
30. **Cohn RJ**, Sherman GG, Glencross DK. Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome. *Pediatr Hematol Oncol* 1997;14:43–50,
31. **Daviet L**, McGregor JL. Functional roles of membrane glycoprotein CD 36. *Platelets* 1996, 7:117-124.
32. **De Botton S**, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N: Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100:1310-1317.
33. **De Paepe A, Malfait F**. The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clin Genet* 2012;82:1-11.
34. **Dejana E**. Endothelial cell to cell junctions. *FASEB J* 1995;9:910-918.
35. **Diamandis M**, Veljkovic DK, Maurer-Spurej E, et al. Quebec platelet disorder: features, pathogenesis and treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:109-119.
36. **Diacovo TG**, De Fougerolles AR, Baiton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: Intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994, 24:1243.
37. **Dong JF**: Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1710–1716.
38. **Dyszkiewicz-Korpanry AM**, Frenkel EP, Sarode R. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11:25-35.
39. **Emeis JJ**. Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. *Ann NY Acad Sci* 1992;667:249–58.
40. **Enayat MS, Guillatt AM, Lester W**, et al. Distinguishing between type 2B and pseudo-von Willebrand disease and its clinical importance. [Br J Haematol](#) 2006;133:664-666.
41. *Eur J Hum Genet* 2013;21(1).



42. **Favaloro EJ.** Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia* 2001;7:170–9.
43. [Fay PJ.](#) Factor VIII structure and function. *Int J Hematol* 2006;83:103-108.
44. **Federici AB,** Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009;94(5):610-615,
45. *Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002;138:1462-1470.
46. **Fitzgerald LA,** Poncz M Steiner B, Rall JR SC, Bennett JS, Phillips DR. Comparison of Cdna-derived protein sequences of the human fibronectin and vitronectin receptor a subunits and platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry* 1987, 26:8158.
47. [Fleischman RA,](#) [Letestu R,](#) [Mi X,](#) et al. Absence of mutations in the HoxA10, HoxA11 and HoxD11 nucleotide coding sequences in thrombocytopenia with absent radius syndrome. *Br J Haematol* 2002;116:367-375.
48. **Fortunel NO,** Hatzfeld A, Hatzfeld JA: Transforming growth factor- $\beta$ : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blod* 2000, 96:2022-2036.
49. **Francis JL.** Platelet Function Analyzer (PFA-100). In: Michelson AD, editor. *Platelets*. San Diego: Academic Press; 2004.p. 325–35.
50. **Fritsma GA.** Platelet function testing: aggregometry and lumiaggregometry. *Clin Lab Science*, 2007;20:32-37).
51. **Furie B,** Furie C. In vivo thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 12–17.
52. **Furman MI,** Benoit SE, Bernard MR, et al. Increased platelet reactivity and circulated monocyte - platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:352-358,
53. *Gachet C.* *ADP receptors of platelets and their inhibition.* *Thromb Haemost.* 2001;86: 222-232.
54. **Geng JG,** Bevilacqua P, Moore KL. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990, 343:757-763..
55. **George JN,** Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990;75:1383-1395.
56. **George JN,** Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*, 1991;324:27-39.
57. [Gerrard JM,](#) [McNicol A.](#) Platelet storage pool deficiency, leukemia, and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1992;8:277-2781,
58. **Ginseberg MH,** Du X, O'Toole. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1993, 70:87-95.
59. **Givan AL:** *Flow Cytometry. First Principles*, New York, NY, Wiley-Liss, 1992.

60. **Giordano P**, Lenato GM, Suppressa P, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: arteriovenous malformations in children. *J Pediatr* 2013;163:179-186.
61. **Gonzalez-Gay MA**, Garcia-Porrúa C, Pujol RM. Clinical approach to cutaneous vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:56-61.
62. **Grau AJ**, Ruf A, Vogt A, et al. Increased fraction of activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost* 1998;80:298-301.
63. **Gresele P**, Page C, Fuster V, Vermynen J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. Cambridge University Press, 2002.
64. Hall G. Kasabach–Merritt syndrome: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2001;112:851–62).
65. **Harison P**, Cramer EM. Platelet a granules. *Blood Rev* 1993, 7:52-62.
66. [Harrison P](#), [Robinson MS](#), [Mackie IJ](#), et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:25-31.
67. **Harrison P**, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. British Committee for Standards in Haematology, 2011]
68. **Hartiwig JH**, Desisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol* 1991, 112:407-425.
69. **Hartiwig JH**, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: Signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost* 1999, 82:392-400.
70. **Hartiwig J**, Italiano JR: The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1580-1586.
71. **Hassan AA**. Kroll MH. Acquired disorders of platelet function. *Hematology (Am Soc Hematol Educational Program)* 2005;403-408).
72. **Hayward CP**, Moffat KA, Pai M, et al. An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb Haemost*, 2008;100:134 - 145.
73. **Hayward CP**, Pai M., Liu Y, et al. (b) Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb.Haemost* 2009;7:676-684.
74. **Heeb MJ**, Rosing J, Bakker HM. Protein S binds to and inhibit factor Xa. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:2728-2732.
75. **Helander SD**, De Castro FR, Gibson LE. Henoch-Schönlein purpura: clinicopathologic correlation of cutaneous vascular IgA deposits and the relationship to leukocytoclastic vasculitis. *Acta Derm Venereol* 1995; 75:125-112.
76. **Herve P**, [Drouet L](#), [Dosquet C](#), et al. Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin. *Am J Med* 1990;89:117-120.

77. **Hoffman R**, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, McGlave P. Hematology Basic Principles and Practice. Churchill Livingstone 3<sup>rd</sup> edition, 2000.
78. **Hoffman M**, Monroe D. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-965.
79. **Hynes RO**. Integrins:Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69:11-25.
80. **Ignarro LJ**, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9.
81. **Imaizumi TA**, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995;238:5–20.
82. **Iwasaki H**, Mizuno S, Wells RA, Cantor AB, Watanade S, Akashi K: GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages *Immunity* 2003, 19:451-462.
83. **Jackson GNB**, Ashpole KJ, Yentis SM. The TEG vs the ROTEM thromboelastography/thromboelastometry systems. *Anaesthesia* 2009;64:212-215.
84. **Jurk K**, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:381-392.
85. **Kaplan J**, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008;15:22-29).
86. **Kaushansky K**, Drachman JG: The molecular and cellular biology of thrombopoietin; the primary regulator of platelet production. *Oncogene* 2002, 21:3359-3367.
87. **Kottke-Marchant**, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:133-146.
88. **Kumar S**, Sengupta RS, Kakkar N, et al. [Skin involvement in primary systemic amyloidosis](#). *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013;5:e2013005.
89. **Laffan MA**, Bradshaw AE. Investigation of a bleeding tendency. In DAcie JV, Lewis SM (eds). *Practical Haematology*. Hong Kong: Churchill Livingstone, 1995:317-350
90. **Laffan MA**, Lester W, O'Donnell JS, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014.
91. **Lam SC**, Plow EF, D' Souza SE, Cheresch DA, Frelinger AL, Ginsberg MH. Isolation and characterization of a platelet membrane protein related to the vitronectin receptor. *J Biol Chem* 1989, 264:3742-3751.

92. **Lazarus AH**, Wright JF, Blanchette V, et al. Analysis of platelets by flow cytometry. *Transfus Sci* 1995;16:353-361,
93. **Levine NA**, Greer KE. Scurvy is an unrepentant carnivore. *Cutis* 2000;66:39.
94. **Li J** and Kuter DJ: The end is just the beginning:megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 2001, 74:365-374.
95. **Lijnen HR**, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8:277-90.
96. **Lind SE**. The bleeding time. In: Michelson AD, editor. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002. p. 283–289]
97. **Lindahl TL**, Lundahl J, Netre C, et al. Studies of the platelet fibrinogen receptor in Glanzmann patients and uremic patients. *Thromb Res* 1992;67:457–466.
98. **Lopez JA**. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994, 5:97-119.
99. **Lwaleed BA**, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* 2006;208:327-339).
100. **Mackie IJ**, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in the whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol*, 1984;37:874-878.
101. [Mattina T](#), [Perrotta CS](#), [Grossfeld P](#). Jacobsen syndrome. [Orphanet J Rare Dis](#) 2009 ;4:9.
102. **McEver RP**, Beckstead JH, Moore KL. GMP-140, a platelet-granule membrane protein is also synthesized by vascular endothelia cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989, 84:92-99.
103. **McNicol A**, Israels SJ. Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 1999, 95:1-12.
104. **Mayer K**, Kennerknecht I, Steinmann B [Clinical utility gene card for: Ehlers-Danlos syndrome types I-VII and variants - update 2012.](#)
105. **Menache D**, Grpssman BJ, Jackson CM. Antithrombin III: physiology, deficiency, and replacement therapy. *Transfusion* 1992;32:580-588 ).
106. **Minamigushi H**, Kimura T, Urata Y, Miyazaki H, Bamba T, Abe T, Sonoda Y: Simultaneous signaling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the P13-K, PKC and MAPK pathways. *Br J Haematol* 2001, 115:175-185.
107. **Nachmias VT**, Yoshida K. The cytoskeleton of the blood platelets: A dynamic structure. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1999, 2:181-191.
108. **Nurden AT**, Nurden P. [The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease.](#) *Blood Rev* 2007;21: 21–36.

109. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, et al. Defective platelet activation in  $G\alpha_q$ -deficient mice. *Nature*. 1997; 389: 183–186.
110. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99:1293-1304.
111. Ott I, et al. Reversible regulation of tissue factor-induced coagulation by glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:874–82.
112. Othman M. Platelet-Type Von Willebrand Disease: A Rare, Often Misdiagnosed and Underdiagnosed. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:464-469.
113. Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med*. 2004;30:1873–1881.
114. Parise LV, Phillips DR. Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1985, 260:10698-106707.
115. Parise LV. The structure and function of platelet integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1:947-954.
116. Pham A, Wang J. Bernard-Soulier syndrome: an inherited platelet disorder. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1834-1836.
117. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988, 71:831-843.
118. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins: Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1997, 272:2121-1230.
119. Phuong CXT, Nihan NT, Willa B, et al. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam. *Trop Med Int Health* 2002; 7:125-132.
120. Piotrowicz RS, Orchekowski RP, Nugent DJ, Yamada KY, Kunicki TJ. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent Ribronectin receptor on human platelets. *J Cell Biol* 1988, 106:1359-1366.
121. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb: Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 1987, 262:8476.
122. Posan E, McBane RD, Grill DE, et al. Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. *Thromb Haemost* 2003;90:483–90]
123. Prigoda NL, Savas S, Abdalla SA, et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: mutation detection, test sensitivity and novel mutations. *J Med Genet* 2006;43:722-728.

124. **Proimos GJ.** Platelet aggregation inhibition with glycoprotein IIb--IIIa inhibitors. *Thromb Thrombolysis* 2001; 11:99-110.
125. **Raffan-Sanabria F,** Amaya W, Manrique-Peñuela F. Tromboelastografía como guía de decisión para terapia transfusional en sangrado postamigdalectomía secundario a pseudoaneurisma. *Revista Mexicana de Anestesiología* 2009;32:67-71.
126. **Rand ML,** Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 2003;28:307.
127. **Rao AK,** Willis J, Kowalska MA, et al. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood* 1988;71: 494-501.
128. **Reininger AJ.** Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 2008; 14 Suppl 5:11-26.
129. **Remijn JA,** IJsseldijk MJ, Strunk AL, et al. [Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y12 of a patient with haemorrhagic diathesis.](#) *Clin Chem Lab Med* 2007;45(2):187-9.
130. **Riddel J,** Aouizerat B, Miaskowski C, et al. Theories of Blood Coagulation. *J Ped Oncol Nurs* 2007;24:123-131).
131. **Rivera J,** Lozano ML, Corral J, et al. Platelet GP Ib/IX/V complex: physiological role. *J Physiol Biochem* 2000;56:355-365,
132. **Rodgers RP,** Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:1–20.]
133. **Rolf N,** [Knoefler R,](#) [Bugert P,](#) et al. Clinical and laboratory phenotypes associated with the aspirin-like defect: a study in 17 unrelated families. *Br J Haematol* 2009;144:416-424.
134. **Ruf A,** Patscheke H. Flow cytometry detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding and P –selectin expression. *Seminar Thromb Hemost* 1995;21:146-151.
135. **Ruoslahti E.** Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 1988, 57:375.
136. **Ruggeri ZM.** Von Willebrand factor: looking back and looking forward. *Thromb Haemost* 2007;98(1):55-62.
137. **Saito H,** Kunishima S. Historical hematology: May-Hegglin anomaly. *Am J Hematol* 2008;83:304-306.
138. **Savi P,** Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:174–183.
139. **Shattil SJ,** Bennett JS. Platelets and their membranes in hemostasis: Physiology and pathology. *Ann Intrem Med* 1981, 94:108-118.
140. **Sheetz MP.** Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struct Funct* 1996, 21:369-377.
141. **Shivdasami RA:** Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* 2001, 19:397-407.



142. **Sinhal AR**, Aylward PE. New antiplatelet agents and the role of platelet function testing in acute coronary syndromes. *Clin Ther* 2013;35:1064-1068
143. **Solar GP**, Kerr WJ, Zeigler FC, Hess P, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL: Role of c-mpl in early hematopoiesis *Blood* 1998, 92:4-10.
144. **Sugimoto M**, Miyata S. Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 2002;75:19-24..
145. **Szer IS**. Henoch-Schonlein purpura. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6:25–31,
146. **Tefferi A**, Nichols WL. Acquired von Willebrand Disease: Concise Review of Occurrence, Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. *Am J Med* 1997;103:536-540.
147. **Toogeh G**, Sharifian R, Lak M, et al. Presentation and pattern of symptoms in 382 patients with Glanzmann thrombasthenia in Iran. *Am J Hematol* 2004;77:198-199.
148. **Torres R**, Fedoriw Y. Laboratory testing for von Willebrand disease: toward a mechanism – based classification. *Clin Lab Med* 2009;29:193-228.
149. **Ushikubi F**, Okuma M, Kanaji K, et al. Hemorrhagic thrombocytopathy with platelet thromboxane A2 receptor abnormality: defective signal transduction with normal binding activity. *Thromb Haemost* 1987;57:158-164.
150. **Vainchker W**, Debili N, Mouthon MA, Wendling F: Megakaryocytopoiesis: Cellular aspects and regulation. *Crit Rev Oncol/Hematol* 1995, 20:165-192.
151. **Van Den BH**, De Vet EC, Zomer AW. The role of peroxisomes in either lipid synthesis. Back of the roots of PAF. *Adv Exp Med Biol* 1996, 416:433.
152. **Vane J**, Corin RE. Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26:571-578.
153. **Varon D**, Jackson DE, Shenkman B. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a co-stimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. *Blood* 1998, 91:500-512.
154. **Weisel JW**, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem* 1992, 267:16637-16643.
155. **Wending F**: Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999, 84:158-166.
156. **White JG**. Platelet secretion during clot retraction. *Platelets* 200, 11:331-343.
157. [White MM](#), [Foust JT](#), [Mauer AM](#), [Robertson JT](#), et al. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. [Thromb Haemost](#) 1992;67:572-577.



158. **Whiteheart SW**. Platelet granules: surprise packages. *Blood*, [2011;118 \(5\)](#).
159. **Zhou L**, Chmaier A. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. *Am J Clin Pathol* 2005;123:172-183.
160. **Zwaal FA**, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochem Bioph Acta* 2004;1636:119-128.

#### **ΑΝΑΦΟΡΑ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΩΝ:**

1. Βιπαδεία, ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια. Αιμοπετάλιο, ([www.el.wikipedia.org/wiki/Αιμοπετάλιο](http://www.el.wikipedia.org/wiki/Αιμοπετάλιο)), 2013.
2. David Perry and Tony Todd. Platelet Function Testing. A Practical Guide to Laboratory Haemostasis. ([www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com)), 2013.
3. Peter Maslak and Larry Smith. Disorders of platelet number and function. American Society of Hematology, ASH Image Bank. ([www.imagebank.hematology.org](http://www.imagebank.hematology.org)), 2009
4. [www.springer.com](http://www.springer.com)