

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sarah ZLATKOVIČ

**OCENA POSPEŠENEGA STRJEVANJA KRVI PRI  
BOLNIKI Z VENSKO TROMBOZO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sarah ZLATKOVIČ

**OCENA POSPEŠENEGA STRJEVANJA KRVI PRI BOLNIKIHZ  
VENSKO TROMBOZO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF ACCELERATED BLOOD CLOTTING IN  
PATIENTS WITH DEEP-VEIN THROMBOSIS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za hemostazo in aterotrombozo Kliničnega oddelka za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Gordana GLAVAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Gregor BELUŠIČ, recenzent

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marko KREFT, mentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Mojca BOŽIČ MIJOVSKI, spec. med. biokem., somentorica

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Sarah Zlatkovič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK 6:612.115:616.14(043.2)=163.6
- KG hiperkoagulabilnost/venski trombembolizem/celokupni hemostatski potencial/modificirani celokupni hemostatski potencial/spremljanje tvorjenja trombina
- AV ZLATKOVIČ, Sarah
- SA KREFT, Marko (mentor)/BOŽIČ MIJOVSKI, Mojca (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2014
- IN OCENA POSPEŠENEGA STRJEVANJA KRVI PRI BOLNIKIHZ VENSKO TROMBOZO
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP IX, 50 str., 13 pregl., 12 sl., 40 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V raziskavi smo želeli z merjenjem celokupnega hemostatskega potenciala (CHP), modificiranega celokupnega hemostatskega potenciala (mCHP) in s spremljanjem tvorjenja trombina (STT) prepoznati stanja pospešenega strjevanja krvi pri bolnikih, ki so preboleli venski trombembolizem (VTE). V raziskavo smo vključili 178 bolnikov z VTE in 68 navidezno zdravih oseb. Vsem smo odvzeli kri, ki smo jo uporabili za preiskave trombofilije ter meritve CHP, mCHP in STT. Pri meritvah CHP je bil pri bolnikih celokupni koagulacijski potencial (CKP) statistično višji, celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pa nižji kot pri kontrolah. Metoda mCHP ni razlikovala med bolniki in kontrolami, verjetno zaradi zelo slabe ponovljivosti. Pri STT so imele bolnice z VTE v primerjavi s kontrolami statistično značilno večji trombinski vrh in endogeni trombinski potencial (ETP). CHP in STT sta bili premalo občutljivi, da bi zanesljivo prepoznali vse znane oblike trombofilije, po drugi strani pa sta zaznali hiperkoagulabilnost, ki je preiskave trombofilije ne zaznajo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dn

DC 6:612.115:616.14(043.2)=163.6

CX hypercoagulability/venous thromboembolism/overall haemostasis potential/overall haemostasis index/thrombin generation test

AU ZLATKOVIČ, Sarah

AA KREFT, Marko (supervisor)/BOŽIČ MIJOVSKI, Mojca (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2014

TI EVALUATION OF ACCELERATED BLOOD CLOTTING IN PATIENTS WITH DEEP-VEIN THROMBOSIS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 50 p., 13 tab., 12 fig., 40 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of our study was to recognize accelerated blood clotting in patients with venous thromboembolism (VTE) by measuring overall haemostasis potential (CHP), modified haemostasis potential (mCHP) and thrombin generation assay (STT). We included 178 patients with VTE and 68 apparently healthy subjects. From all blood was drawn for thrombophilia testing and measurements of CHP, mCHP and STT. The overall coagulation potential (CKP) was statistically higher and the overall fibrinolytic potential (CFP) lower in patients than in controls. The mCHP method did not distinguish between patients and controls, probably due to very poor reproducibility. With STT patients with VTE had significantly higher thrombin peak and endogenous thrombin potential (ETP) compared to control subjects. CHP and STT were insufficiently sensitive to reliably recognize all forms of thrombophilia, but on the other hand identified hypercoagulability overlooked by the thrombophilia testing.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 HEMOSTAZA	1
1.2 VENSKA TROMBOZA	4
1.3 TROMBOFILIJA	6
1.3.1 Pomanjkanje proteina C	6
1.3.2 Pomanjkanje antitrombina	7
1.3.3 Pomanjkanje proteina S	7
1.3.4 Neodzivnost na aktivirani protein C	8
1.3.5 Faktor V Leiden	8
1.3.6 Protrombin G20210A	8
1.3.7 Prisotnost lupusnih antikoagulantov	9
1.3.8 D-dimer	9
1.4 GLOBALNE KOAGULACIJSKE PREISKAVE	10
1.4.1 Celokupni hemostatski potencial (CHP)	10
1.4.2 Modificiran celokupni hemostatski potencial (mCHP)	11
1.4.3 Spremljanje tvorjenja trombina (STT)	12
1.5 NAMEN IN HIPOTEZE	13
<b>2 METODE IN MATERIALI</b>	<b>15</b>
2.1 PREISKOVANCI	15
2.2 ODVZEM KRVİ IN PRIPRAVA PLAZME	15
2.3 METODE	16
2.3.1 Celokupni hemostatski potencial (CHP)	16
2.3.2 Modificiran celokupni hemostatski potencial (mCHP)	17
2.3.3 Spremljanje tvorjenja trombina (STT)	19
2.4 PREISKAVE TROMBOFILIJE	20
2.4.1 Aktivnost proteina C	20
2.4.2 Aktivnost antitrombina	21
2.4.3 Koncentracija prostega proteina S	21
2.4.4 Neodzivnost na aktivirani protein C	21

<b>2.4.5</b>	<b>Faktor V Leiden</b>	22
<b>2.4.6</b>	<b>Protrombin G20210A</b>	22
<b>2.4.7</b>	<b>Lupusni antikoagulanti</b>	23
<b>2.4.8</b>	<b>Koncentracija D-dimera</b>	24
<b>2.5</b>	<b>STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV</b>	24
<b>3</b>	<b>REZULTATI</b>	26
<b>3.1</b>	<b>DOLOČITEV REFERENČNEGA OBMOČJA ZA GLOBALNE KOAGULACIJSKE PREISKAVE</b>	26
<b>3.2</b>	<b>PONOVLJIVOST GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV</b>	27
<b>3.3</b>	<b>PRIMERJAVA GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV MED KONTROLAMI IN BOLNIKI</b>	28
<b>3.4</b>	<b>PRIMERJAVA GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV MED PREISKOVANCI S TROMBOFILIJO IN BREZ NJE</b>	32
<b>4</b>	<b>RAZPRAVA</b>	39
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	43
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	44
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	46
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Referenčne vrednosti določene pri 68 zdravih osebah za CHP in mCHP .	26
<b>Preglednica 2:</b> Referenčne vrednosti določene pri 63 zdravih ženskah za STT .....	27
<b>Preglednica 3:</b> Koeficient variacije (%) za CHP, mCHP in STT znotraj serije in med serijami .....	27
<b>Preglednica 4:</b> Celokupni koagulacijski potencial (CKP), celokupni hemostatski potencial (CHP) in celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri bolnikih z VTE in kontrolah .....	28
<b>Preglednica 5:</b> Koagulacijski profil (Kp), fibrinolitični profil (Fp) in celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri bolnikih z VTE in kontrolah.....	29
<b>Preglednica 6:</b> Spremljanje tvorjenja trombina (STT) pri bolnicah z VTE in kontrolah...	29
<b>Preglednica 7:</b> Vpliv posamičnih trombofilnih dejavnikov na CHP, mCHP in STT.....	31
<b>Preglednica 8:</b> Pogostost trombofilije pri 178 bolnikih z VTE in 68 kontrolah .....	32
<b>Preglednica 9:</b> Število bolnikov z dvema različnima oblikama trombofilije.....	33
<b>Preglednica 10:</b> Pogostost trombofilije pri bolnikih z znanim sprožilnim dejavnikom za VTE in brez njega.....	33
<b>Preglednica 11:</b> Celokupni koagulacijski potencial (CKP), celokupni hemostatski potencial (CHP) in celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri preiskovancih s trombofilijo in brez nje .....	34
<b>Preglednica 12:</b> Koagulacijski profil (Kp), fibrinolitični profil (Fp) in celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri preiskovancih s trombofilijo in brez nje.....	36
<b>Preglednica 13:</b> Spremljanje tvorjenja trombina (STT) pri preiskovankah s trombofilijo in brez nje .....	37



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shema koagulacije (Austin, 2013: 211).....	3
<b>Slika 2:</b> Tveganje za prvo vensko trombozo glede na starost (Lijfering in sod., 2010: 826)	5
<b>Slika 3:</b> Nastajanje in razgradnja fibrina v času pri CHP (He in sod., 2001: 356) .....	11
<b>Slika 4:</b> Nastajanje in razgradnja fibrina v času pri mCHP (He in sod., 2007: 872) .....	12
<b>Slika 5:</b> Trombogram (Hemker in sod., 2006: 555).....	13
<b>Slika 6:</b> CKP ter CFP pri kontrolah in bolnikih z VTE .....	28
<b>Slika 7:</b> Trombinski vrh ter ETP pri kontrolah in bolnicah z VTE.....	30
<b>Slika 8:</b> Celokupni koagulacijski potencial (CKP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje .....	34
<b>Slika 9:</b> Celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje .....	35
<b>Slika 10:</b> Fibrinolitični profil (Fp) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje.....	36
<b>Slika 11:</b> Celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje .....	37
<b>Slika 12:</b> Endogeni trombinski potencial (ETP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje .....	38

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Abs = absorbanca  
ADP = adenzin difosfat  
APC = aktivirani protein C  
APTČ = aktivirani parcialni tromboplastinski čas  
AT = antitrombin  
CaCl<sub>2</sub> = kalcijev klorid  
CFP = celokupni fibrinolitični potencial  
CHP = celokupni hemostatski potencial  
CHR = celokupno hemostatsko razmerje  
CKP = celokupni koagulacijski potencial  
CV = koeficient variacije  
DD = povišana koncentracija D-dimera  
DNA = deoksiribonukleinska kislina  
ETP = endogeni trombinski potencial  
Fp = fibrinolitični profil  
FII = faktor II, protrombin  
FVL = faktor V Leiden  
FZP = filtrirana zmesna plazma  
GPIa, GPIb = glikoprotein Ia, glikoprotein Ib  
HPE = fosfolipid fosfatidiletanolamin v heksagonalni fazi  
Kp = koagulacijski profil  
LA = lupusni antikoagulanti  
mCHP = modificiran celokupni hemostatski potencial  
NaCl = natrijev klorid  
NZP = normalna zmesna plazma  
OR = odds ratio, razmerje obetov  
PAF = faktor, ki aktivira trombocite  
PC = protein C  
PS = pomanjkanje proteina S  
rTF = rekombinantni tkivni faktor  
SD = standardizirani odklon  
STT = spremljanje tvorjenja trombina  
TF = tkivni faktor  
TFPI = tissue factor pathway inhibitor, zaviralec zunanje poti tkivnega faktorja  
t-PA = tissue plasminogen activator, tkivni aktivator plazminogena  
VTE = venski tromboembolizem  
vWF = von Willebrandov faktor

## 1 UVOD

### 1.1 HEMOSTAZA

Hemostaza (gr. *haimatos* = kri, *statos* = stoječ) zajema vse procese in reakcije, ki prispevajo k učinkovitemu ustavljanju krvi po poškodbi žile (Stegnar, 2005). Hitro preoblikovanje krvi iz tekočega stanja v lokaliziran strdek na mestu poškodovane žile je nadzorovano z zapletenim medsebojnim delovanjem štirih ključnih komponent: žilne stene, trombocitov, koagulacije in fibrinolize (Austin, 2013). Normalna hemostaza vzdržuje pri nepoškodovanih žilah kri tekočo, s čimer je omogočena preskrba organov in tkiv, ob poškodbi žile pa prepreči večjo krvavitev (Stegnar, 2005). Hemostaza poteka v dveh korakih, ločimo jo na primarno in sekundarno reakcijo.

Primarna hemostaza se začne s kontrakcijo žilne stene, adhezijo trombocitov na subendotel in nastankom trombocitnega strdka. Adhezija je odvisna od vezavnih beljakovin, kot so von Willebrandov faktor (vWF), fibrinogen, fibronektin in vitronektin, ki reagirajo s specifičnimi membranskimi glikoproteinskimi receptorji na trombocitih (GPIa, GPIb) (Stegnar, 2005). Pri prilepljanju trombocitov na subendotel pride do njihovega aktiviranja, zaradi vezave različnih agonistov (trombin, tromboksan A<sub>2</sub>, ADP, kolagen, faktor, ki aktivira trombocite (PAF), adrenalin) na specifične receptorje na njihovi površini. Aktiviranje trombocitov vodi do spremembe oblike in sekrecije snovi (ADP, ATP, kalcija, rastnih faktorjev, vezavnih beljakovin...) iz trombocitnih zrn (Austin, 2013).

Sočasno z nastajanjem trombocitnega strdka se aktivira koagulacija, ki privede do nastanka trombina in tako tudi do nastanka fibrina, ki učvrsti strdek. Zaščitni mehanizmi preprečujejo pretirano širjenje strdka, v procesu fibrinolize pa se strdek razgradi. To je sekundarna hemostaza (Stegnar, 2005).

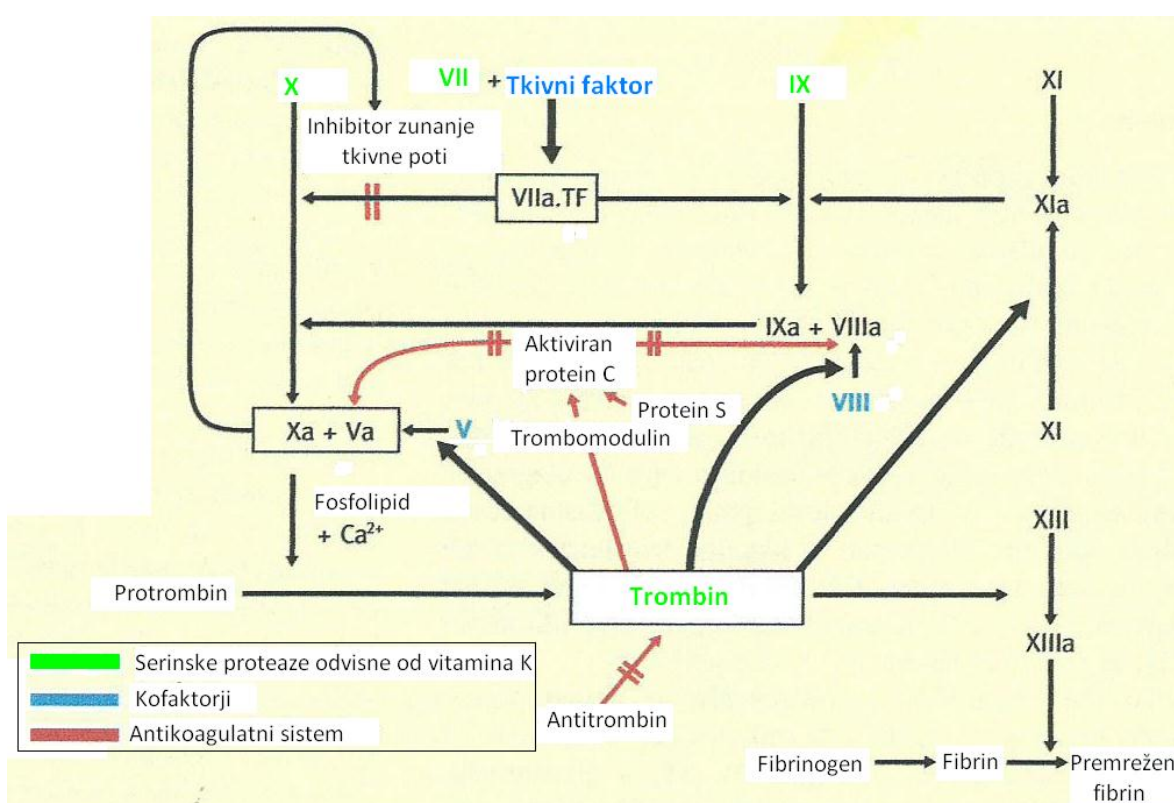
Koagulacijski sistem sestavljajo glikoproteini, ki jim pravimo koagulacijski faktorji. Prisotni so v krvnem obtoku v različnih koncentracijah (Kocijančič in sod., 2005). Koagulacijski faktorji II, VII, IX, X, XI, XII so encimi serinske proteinaze. V krvi so prisotni kot proencimi in se med koagualcijo pretvorijo v aktivno obliko. Aktivirana faktorja V in VIII sta kofaktorja. Faktor XIII je transglutaminaza in s kovalentnimi vezmi premreži polimeriziran fibrin (Stegnar, 2005). Večina koagulacijskih beljakovin se

sintetizira v jetrih, nekatere tudi v makrofagih, megakariocitih, trombocitih in endotelnih celicah.

Koagulacijo delimo na notranjo (intrinzično) in zunanjo (ekstrinzično) pot. Po obeh poteh se koagulacijski faktorji aktivirajo en za drugim, dokler se topni fibrinogen ne pretvori v netopni fibrin. Zunanja pot koagulacije se začne preko faktorja VII, ki kroži v krvi, aktiviran (FVIIa) pa se veže na tkivni faktor (transmembranski glikoprotein), ki se izrazi na površini poškodovanih in stimuliranih celicah (monocitih, makrofagih, endotelnih celicah). Nastane kompleks TF-VIIa, ki aktivira faktorja IX in X. Temu pravimo začetna faza. Faktor Xa se poveže s faktorjem Va (protrombinazni kompleks) in proizvede zadosti trombina (FIIa), da se sproži lokalna agregacija trombocitov ter aktivacija kofaktorja V in VIII. To je faza razmnoževanja. Faza povečanja poteka preko delovanja faktorja IXa, ki se veže na faktor VIIa. Skupaj tvorita tenazni kompleks, ki pospeši aktivacijo faktorja X. Faktor XIa je povezava z notranjo potjo koagulacije in proizvaja dodaten faktor IXa. Ostale komponente notranje poti so pomembne *in vitro*, vendar nimajo pomembne vloge v koagulacijski kaskadi. Trombin hidrolizira vezi arginin – glicin v fibrinogenu, pride do konformacijske spremembe v fibrinskem monomeru, ki omogoča polimerizacijo in tako tvori topni oligomerni fibrin, hkrati pa trombin aktivira faktor XIII, ki premreži fibrin (netopni fibrin), s čimer fibrinski strdek pridobi na trdnosti (Austin, 2013). Prav tako trombin aktivira zaviralce fibrinolize, ki ščitijo strdek pred fibrinolizo (Eyre in Gamlin, 2010).

Pri uravnavanju koagulacije so prisotni različni mehanizmi. V krvi in trombocitih so prisotni naravni antikoagulanti serpini, ki so zaviralci serinskih proteinaz. Delujejo tako, da zavrejo sistemsko aktiviranje in s tem omejijo koagulacijo na področje, kjer je potrebna (Stegnar, 2005). Poznamo sedem serpinov, glavna med njimi pa sta antitrombin, ki zavira faktor IXa, faktor Xa in trombin ter heparinski kofaktor II (Austin, 2013). Aktiviranje zunanje poti zavira zaviralec zunanje tkivne poti (TFPI), ki je proteaza in ga proizvajajo endotelne celice. S faktorjem VII in tkivnim faktorjem tvori kompleks, ki zavira faktor Xa. Zelo pomemben zaviralni mehanizem je tudi preko negativne povratne zanke proteina C, ki vključuje tudi protein S. Oba proteina se sintetizirata v jetrih in sta odvisna od vitamina K. Protein C se skupaj s trombinom veže na trombomodulin, ki je receptor na površini

endotelnih celic in se tako aktivira v aktivni protein C. Aktiviran protein C skupaj s kofaktorjem proteinom S cepi faktorja Va in VIIIa, s čimer zavre nastanek strdka ter pospeši fibrinolizo. Uravnavanje koagulacije poteka tudi z zaviranjem s končnimi produkti. Razgradni produkti fibrina in fibrinogena zavirajo polimerizacijo novonastalega fibrina, agregacijo trombocitov in pospešujejo sproščanje tkivnega aktivatorja plazminogena (t-PA) ter tako aktivirajo fibrinolizo (Stegnar, 2005). Pri koagulaciji sodeluje tudi kalcij, ki omogoča vezavo različnih negativno nabitih koagulacijskih faktorjev na negativno nabito fosfolipidno površino (Austin, 2013).



**Slika 1:** Shema koagulacije (Austin, 2013: 211)

$\text{Ca}^{2+}$  = kalcij, TF = tkivni faktor. Aktivirane oblike faktorjev so označene z malo črko a ob rimski številki.

Fibrinoliza je pomemben fiziološki mehanizem, ki pomaga pri ponovni vzpostavitvi prehodnosti žil, ker omejuje širjenje fibrinskih strdkov in jih razgrajuje. Nastane kot odgovor na poškodbo žile. Fibrinolitični sistem se aktivira sočasno s koagulacijo (Kocijančič in sod., 2005). Glavno vlogo igra plazminogen, ki ga t-PA pretvori v aktivno serinsko proteazo – plazmin (Austin, 2013). Plazmin hidrolizira fibrin, fibrinogen in koagulacijske faktorje v topne produkte razgradnje (Kocijančič in sod., 2005).

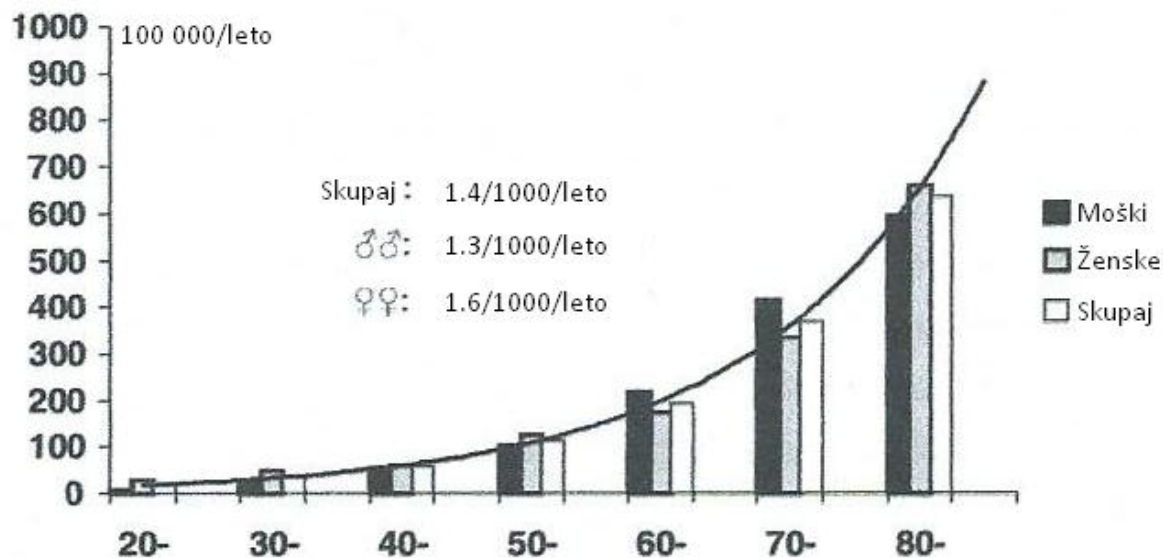
Za regulacijo fibrinolize so potrebni tudi številni zaviralci, ki sodijo v družino serpinov. Antiplazmin je najpomembnejši zaviralec. Veže se na plazmin, poleg tega preprečuje tudi vezavo plazminogena na fibrin. Med zaviralci t-PA je najpomembnejši zaviralec aktivatorja plazmonogena tipa 1. Vloga ostalih zaviralcev ( $\alpha_2$ -makroglobulin, zaviralec C1) je manj pomembna (Stegnar, 2005).

Motnje hemostaze privedejo do krvavitev zaradi počasnega strjevanja krvi, kar imenujemo hipokoagulabilnost, ali do nastanka strdkov v žilah (tromboze) zaradi pospešenega strjevanja krvi oziroma hiperkoagulabilnosti (Stegnar, 2005). Hiperkoagulabilnost je 25 – 50 krat pogostejša od hipokoagulabilnosti. Vzrokov in mehanizmov tromboze ne poznamo tako dobro kot vzrokov in mehanizmov krvavitev. Pogosto ugotovimo trombozo in pljučno embolijo ne da bi s preiskovanjem krvi odkrili posebne spremembe v hemostazi (Kocijančič in sod., 2005). Motnje, ki vodijo do tromboze, so namreč mnogovrstne. Lahko so prirojene ali pridobljene zaradi načina življenja oziroma različnih bolezenskih stanj (Stegnar, 2005).

## 1.2 VENSKA TROMBOZA

Venska tromboza je bolezen, pri kateri nastanek strdka v veni povzroči popolno ali delno zaporo žile. Najpogosteje se razvije kot venska tromboza noge (Kocijančič in sod., 2005), redkeje pride do tromboze v drugih venah (venah roke, mrežnice in mezenterija) (Rosendaal, 1999). Pljučna embolija je zaplet venske tromboze, kjer pride do zamašitve ene ali več pljučnih arterij s krvnim strdkom, ki ga v pljuča zanese tok krvi (Kocijančič in sod., 2005). Vensko trombozo in pljučno embolijo skupno imenujemo venski trombembolizem (VTE). Smrtnost pri VTE je več kot 5 %, glavni vzrok je pljučna embolija (Rosendaal in Reitsma, 2009).

V razvitih državah VTE letno prizadene 1 – 2 osebi na 1000 prebivalcev (Rosendaal, 1999). V Sloveniji ga letno utrpi približno 3000 oseb (Kocijančič in sod., 2005). Pojavnost VTE ostro narašča s starostjo, z 0,00001 % prebivalcev letno v otroštvu do približno 1 % na leto v starosti (Rosendaal, 1999).



**Slika 2:** Tveganje za prvo vensko trombozo glede na starost (Lijfering in sod., 2010: 826)

♂ = moški spol, ♀ = ženski spol.

VTE se pogosto ponovi. Po petih letih je možnost za ponovitev 20 – 25 %. Tveganje za ponovitev je odvisno od prisotnosti ali odsotnosti pridobljenih in prirojenih dejavnikov tveganja (Kyrle in sod., 2010). Možnost za prvi VTE je pri obeh spolih enaka, medtem ko je tveganje za ponovitev VTE višja pri moških (Rosendaal in Reitsma, 2009).

Nastanek VTE si razlagamo z Virchow triado in je lahko rezultat sprememb v sestavi krvi, lastnosti žilne stene ali sprememb v toku krvi. Najbolj znani dejavniki tveganja povzročijo upočasnen pretok krvi in pospešeno strjevanje krvi (Rosendaal, 1999). Vzroke za hiperkoagulabilnost razdelimo na pridobljene in prirojene, čeprav je razlika med njimi zaradi medsebojnega odnosa včasih nejasna (Favaloro in sod., 2009). Ti spremenijo enega ali več dejavnikov Virchow triade (Rosendaal, 1999). Med pridobljene in prirojene dejavnike tveganja prištevamo še veliko drugih potencialnih faktorjev tveganja za VTE, ki povzročajo spremembe v toku krvi. To so dolgotrajno ležanje in sedenje, poškodba, operacija, maligna bolezen, debelost, starost. Za ženske obstajajo še dodatni dejavniki tveganja, kot so nosečnost, porod, poporodna doba in jemanje hormonske kontracepcije ali hormonske nadomestne terapije (Favaloro in sod., 2009).

### 1.3 TROMBOFILIJA

Trombofilija je na splošno definirana kot povečano nagnjenje k hiperkoagulabilnosti in nastanku VTE. Čeprav do tromboze lahko pride tako v arterijah kot venah, trombofilijo pogosteje povezujemo z VTE (Favaloro in sod., 2009).

Med prirojene dejavnike tveganja prištevamo pomanjkanje različnih naravnih antikoagulantov, kot so protein C, protein S in antitrombin, ki so lahko hkrati tudi pridobljeni dejavniki tveganja; številne polimorfizme ali mutacije, vključno s polimorfizmom G20210A v genu za protrombin in polimorfizmom G16910A v genu za faktor V (faktor V Leiden), ki povzroča neodzivnost na aktivirani protein C; ter disfibrinogenemijo (Favaloro in sod., 2009). Povečano tveganje za VTE imajo tudi vsi posamezniki, ki nimajo krvne skupine 0 (Rosendaal in Reitsma, 2009). Pridobljeni dejavniki tveganja so prisotnost lupusnih antikoagulantov (Favaloro in sod., 2009), medtem ko pri hiperhomocisteinemiji in zvišani koncentraciji plazemskih faktorjev VII, IX in XI ne vemo natančno, v kolikšni meri so pridobljene, koliko pa podedovane (Rosendaal, 1999). V nadaljevanju smo opisali samo najpomembnejše dejavnike trombofilije.

#### 1.3.1 Pomanjkanje proteina C

Poznamo dva tipa pomanjkanja proteina C. Tip I je kvantitativno pomanjkanje, pri katerem sta koncentracija in aktivnost proteina C zmanjšani, medtem ko je pri tipu II, ki je kvalitativno pomanjkanje, aktivnost zmanjšana, koncentracija pa normalna. Približno 85 % znanih primerov pomanjkanja proteina C ima tip I in 15 % tip II. Znanih je več kot 160 različnih mutacij, ki povzročijo pomanjkanje (Moll, 2006). Mutacije se večinoma dedujejo avtosomno dominantno (Stegnar, 2005).

Razširjenost podedovanega pomanjkanja proteina C v zdravi populaciji je približno 0,2 – 0,3 %, pri bolniki z VTE pa 3 % (Stegnar, 2005). Pri homozigotnih nosilcih se pojavijo katastrofalni zapleti že ob rojstvu, ki nastopijo kot purpura fulminans. Pogosto se konča s smrtjo novorojenčka v prvih nekaj tednih življenja (Moll, 2006). Pomanjkanje pri heterozigotih lahko vodi v desetkratno povečano tveganje za VTE (Rosendaal in Reitsma, 2009).



### 1.3.2 Pomanjkanje antitrombina

Antitrombin je naravni antikoagulant. Zavira trombin in s tem zavira tvorbo strdka. Njegovo pomanjkanje je močan dejavnik tveganja za VTE (Moll, 2006). V zdravi populaciji je pogostost pomanjkanja antitrombina 0,02 – 0,2 % (Stegnar, 2005), pri bolnikih z VTE pa 1,1 % (Moll, 2006). Tveganje za pojav VTE je 5 – 11 krat večje kot pri ljudeh brez te oblike trombofilije (Stegnar, 2005).

Poznamo dve obliki pomanjkanja antitrombina. Tip I je kvantitativno pomanjkanje, kjer sta znižani tako koncentracija antitrombina kot tudi njegova aktivnost. Pri tipu II je koncentracija normalna, aktivnost antitrombina pa zmanjšana. Več kot 100 mutacij je vzrok za pomanjkanje antitrombina in vse se dedujejo avtosomno dominantno (Moll, 2006).

### 1.3.3 Pomanjkanje proteina S

40 % proteina S je prostega, preostalih 60 % je vezanih v kompleks s transportnim proteinom C4b. V glavnem je prosti protein S tisti, ki deluje kot naravni antikoagulant, tako da je kofaktor aktiviranemu proteinu C in skupaj zavreta koagulacijska faktorja Va in VIIIa (Moll, 2006).

Pomanjkanje proteina S delimo na tip I, kvantitativno pomanjkanje, kjer sta zmanjšani koncentraciji prostega in celokupnega proteina S, tip II, ki je kvalitativno pomanjkanje zaradi nefunkcionalnega proteina, kjer sta koncentraciji prostega in celokupnega proteina S normalni, aktivnost proteina S pa znižana. Ter tip III, ki je kvantitativno pomanjkanje in je koncentracija prostega proteina S znižana, koncentracija celokupnega proteina S pa normalna. Znanih je več kot 131 mutacij, ki povzročajo pomanjkanje proteina S. Deduje se avtosomno dominantno (Moll, 2006).

V zdravi populaciji je razširjenost za pomanjkanje proteina S med 0,03 in 0,13 % (Moll, 2006), med bolniki z VTE pa 1 – 3 % (Stegnar, 2005). Pomanjkanje proteina S je lahko tudi pridobljeno in je posledica jemanja oralne kontracepcije, nosečnosti, jetrnih bolezni, zdravljenja z antagonisti vitamina K, nefrotičnega sindroma. Podedovano pomanjkanje

proteina S poveča tveganje za VTE 2 – 11 krat. Večina homozigotov ima ob rojstvu purpuro fulminans, ki vodi v smrt (Moll, 2006).

### **1.3.4 Neodzivnost na aktivirani protein C**

Neodzivnost na aktivirani protein C (APC) v več kot 90 % povzroča polimorfizem v genu za koagulacijski faktor V (glej 1.3.5 Faktor V Leiden), lahko pa je posledica tudi drugih mutacij v faktorju V (Stegnar, 2005) ali ga najdemo pri osebah, ki imajo druga stanja, ki povečajo tveganje za VTE, kot so nosečnost, jemanje oralne kontracepcije, povečana raven faktorja VIII ali imajo prisotne lopusne antikoagulate. Tako pridobljena stanja povzročajo oslabitev antikoagulacijske poti, ki vključuje protein C in povečajo proizvodnjo trombina (Antovic in sod., 2003).

### **1.3.5 Faktor V Leiden**

Faktor V Leiden je najpogostejši podedovan dejavnik tveganja za VTE (Moll, 2006). Odkrijemo ga pri 20 % bolnikih z VTE in približno 50 % bolnikih, kjer se trombofilija pojavlja v družini. Ima ga tudi približno 5 % zdravih v zahodnem svetu (Rosendaal in Reitsma, 2009). Polimorfizma skoraj ne zasledimo (1 %) v Afriki in Aziji (Moll, 2006). Podatki za Slovenijo kažejo, da je pogostost polimorfizma pri zdravih 6 %, pri bolnikih pa 13 % (Bedenčič in sod., 2008). Pri heterozigotnih nosilcih je tveganje za VTE 3 – 8 krat višje, pri homozigotnih pa 30 – 140 krat višje v primerjavi z osebami brez polimorfizma (Salomon in sod., 1999).

To je točkovni polimorfizem v genu za faktor V (Moll, 2006), kjer gre za zamenjavo gvanina za adenin na mestu 1691, kar ima za posledico zamenjavo arginina z glutaminom na aminokislinskem mestu 506 v faktorju V. Ta zamenjava onemogoča inaktiviranje FVa z aktiviranim proteinom C (Stegnar, 2005).

### **1.3.6 Protrombin G20210A**

Polimorfizem je precej pogost in ga najdemo večinoma samo v zahodnem svetu (Rosendaal in Reitsma, 2009). Zelo redek je med Afričani, Azijci in Afroameričani. Med zdravimi je pogostost polimorfizma 2 % (Moll, 2006), pri bolnikih z VTE približno 6 % (Rosendaal in Reitsma, 2009). Pogostost v Sloveniji je pri zdravih 3 % in bolnikih 6 %

(Bedenčič in sod., 2008). Tveganje za VTE je pri heterozigotnih nosilcih 2 – 3 krat večje, kot pri osebah brez polimorfizma (Rosendaal in Reitsma, 2009).

Pri tem polimorfizmu pride do zamenjave gvanina za adenin na mestu 20210 v genu za faktor II (protrombin) (Moll, 2006). Polimorfizem vodi do večjih koncentracij protrombina v plazmi, kar je povezano večjim tveganjem za VTE (Rosendaal, 1999).

### **1.3.7 Prisotnost lupusnih antikoagulantov**

Lupusni antikoagulanti so avtoprotitelesa proti negativno nabitim fosfolipoproteinom, med katerimi so najpogostejši  $\beta$ 2-glikoproteini I ali nekateri koagulacijski faktorji (Stegnar, 2005). Povezujemo jih z nastankom VTE v sklopu antifosfolipidnega sindroma (Levine in sod., 2002). Ta protitelesa pospešujejo strjevanje krvi tako, da pospešujejo zunanjo pot koagulacije, koncentrirajo protrombin na fosfolipidnih površinah in s tem pospešujejo nastajanje trombina, povzročajo neodzivnost na APC, zmanjšujejo koncentracijo proteina S in pospešujejo lipidno peroksidacijo, kar povzroči povečano nastajanje trombina (Green, 2003).

VTE doživi 30 – 55 % bolnikov z antifosfolipidnim sindromom (Stegnar, 2005). Pogostost antifosfolipidnih protiteles v populaciji je 1 – 5 % (Levine in sod., 2002), pri bolnikih z VTE pa 15 %. Tveganje za VTE povečajo za devetkrat (Stegnar, 2005).

### **1.3.8 D-dimer**

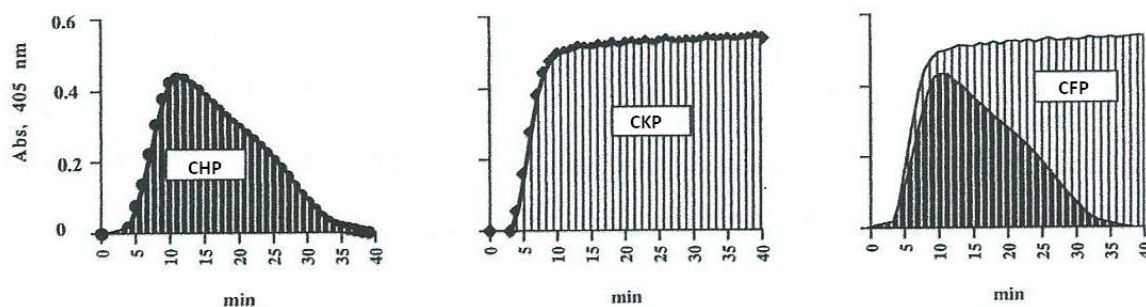
Trombin naredi iz fibrinogena topni fibrin, ki je sestavljen iz fibrinskih oligomerov. Tak fibrin premreži faktor XIIIa. Pride do transpeptidacije in pri tem nastane netopni ali premreženi fibrin. Ob razgradnji premreženga fibrina nastaja med drugimi razgradnimi produkti tudi D-dimer. Povišane koncentracije D-dimera lahko najdemo pri vseh oblikah trombembolične bolezni, pa tudi drugih boleznih in stanjih. Preiskavo D-dimera uporabljamo kot negativno napovedno preiskavo pri sumu na VTE in kot dejavnik tveganja za trombozo.

## 1.4 GLOBALNE KOAGULACIJSKE PREISKAVE

Danes so razvite številne globalne metode s katerimi poskušamo zajeti delovanje prokoagulantov in antikoagulantov, torej aktivacijo trombocitov, koagulacijo in fibrinolizo. Z njimi želimo oceniti celotno hemostazo, namesto da iščemo posamične trombofilne dejavnike. Te metode temeljijo na: merjenju nastanka in razgradnje strdka, merjenju tvorjenja trombina in merjenju elastičnosti tromba (trombelastografija). Tvorjenje trombina lahko merimo z neposrednimi in posrednimi metodami.

### 1.4.1 Celokupni hemostatski potencial (CHP)

He in sodelovci (1999, 2001) so razvili preprosto laboratorijsko metodo za merjenje celokupnega hemostatskega potenciala (CHP) v plazmi bolnikov s hiperkoagulabilnim ali hipokoagulabilnim stanjem. Metoda temelji na spektrofotometričnem merjenju nastajanja in razgradnje fibrina v citratni plazmi v dveh paralelkah. Meritev poteka pri valovni dolžini 405 nm v minutnih intervalih in traja 40 minut. V prvi vzorec dodamo trombin in kalcijev klorid, s čimer sprožimo tvorbo fibrina, tako da se fibrinogen prisoten v plazmi postopno pretvarja v fibrin, zaradi katalitičnega delovanja nastajajočega trombina. Drugemu vzorcu poleg trombina in kalcijevega klorida dodamo še t-PA, s čimer poleg nastajanja fibrina sprožimo še njegovo razgradnjo, saj se aktivira plazminogen in nastaja plazmin, ki razgrajuje fibrin. Vsaka izmerjena absorbanca tako odseva nivo fibrina v trenutku zapisa, površina pod krivuljo pa ravnotežje med nastajanjem in razgradnjo fibrina med vso meritvijo. Površina pod krivuljo z dodatkom t-PA predstavlja celokupni hemostatski potencial (CHP), medtem ko površina pod krivuljo brez dodatka t-PA predstavlja celokupni koagulacijski potencial (CKP). Razlika med obema površinama je celokupni fibrinolitični potencial (CFP) (Antovic in sod., 2005) (slika 3).

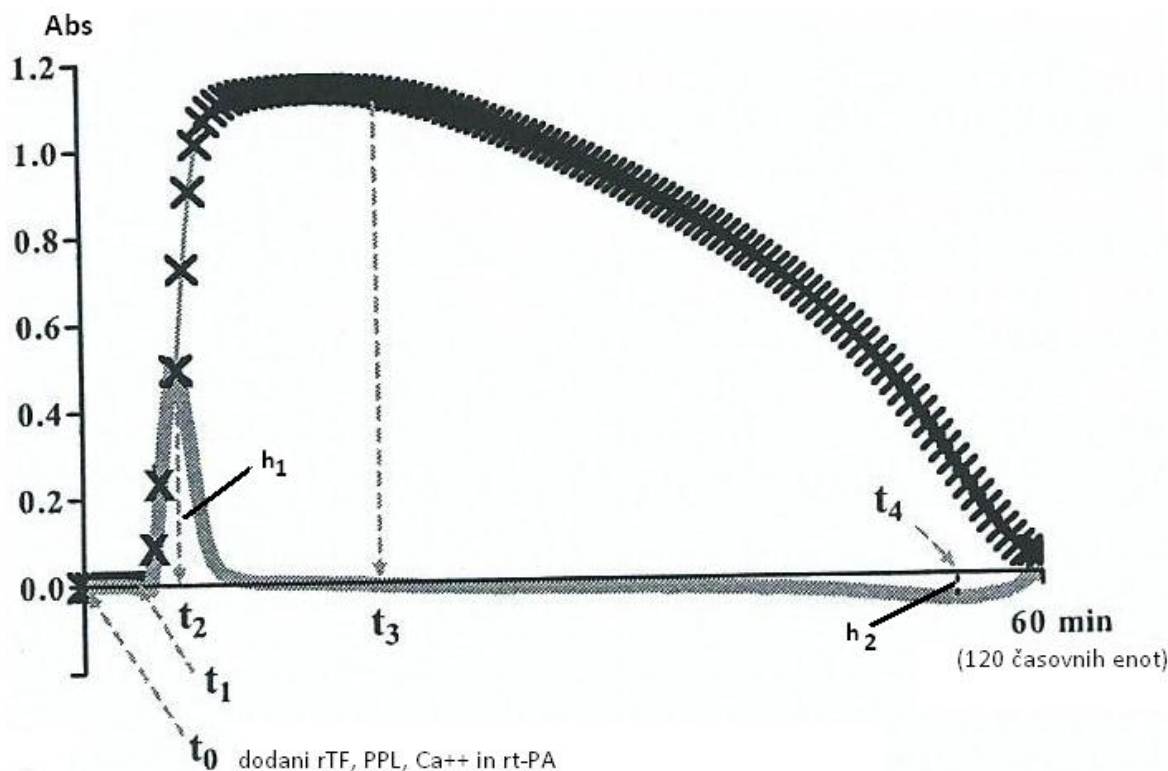


**Slika 3:** Nastajanje in razgradnja fibrina v času pri CHP (He in sod., 2001: 356)

Površina pod krivuljo z dodatkom t-PA predstavlja CHP (celokupni hemostatski potencial), površina pod krivuljo brez dodatka t-PA predstavlja CKP (celokupni koagulacijski potencial), razlika med obema površinama je CFP (celokupni fibrinolitični potencial).

#### 1.4.2 Modificiran celokupni hemostatski potencial (mCHP)

Pri tej metodi za aktiviranje koagulacije v plazmi, revni s trombociti, namesto trombina uporabljamo rekombinantni tkivni faktor (rTF), skupaj s čistimi fosfolipidi namesto fosfolipidov iz trombocitov. rTF skupaj s fosfolipidi in kalcijevim kloridom sproži tvorjenje trombina, ki spremeni fibrinogen v fibrin. V vzorec dodamo še t-PA, ki aktivira plazminogen in pri tem nastaja plazmin, ki razgrajuje fibrin. Zaradi nastajanja in razgradnje fibrina prihaja do naraščanja in padanja optične gostote, ki jo odčitavamo pri 405nm vsakih 30 sekund, reakcija pa traja 60 minut. Iz sekundarne krivulje, ki je odvod primarne, dobimo točko  $t_1$ , ki predstavlja čas, ko opazimo tvorbo fibrina. Ob času  $t_2$  je hitrost tvorbe fibrina ( $h_1$ ) največja. Čas, ko zaznamo začetek razgradnje fibrina predstavlja točka  $t_3$  in ob času  $t_4$  je hitrost razgradnje fibrina ( $h_2$ ) največja. Od časa  $t_1$  do časa  $t_3$  prevladuje koagulacija nad fibrinolizo, po času  $t_3$  pa prevladuje fibrinoliza. Iz naštetih parametrov izračunamo koagulacijski profil (Kp), profil fibrinolize (Fp) in celokupno hemostatsko razmerje (CHR) (He in sod., 2007) (slika 4).



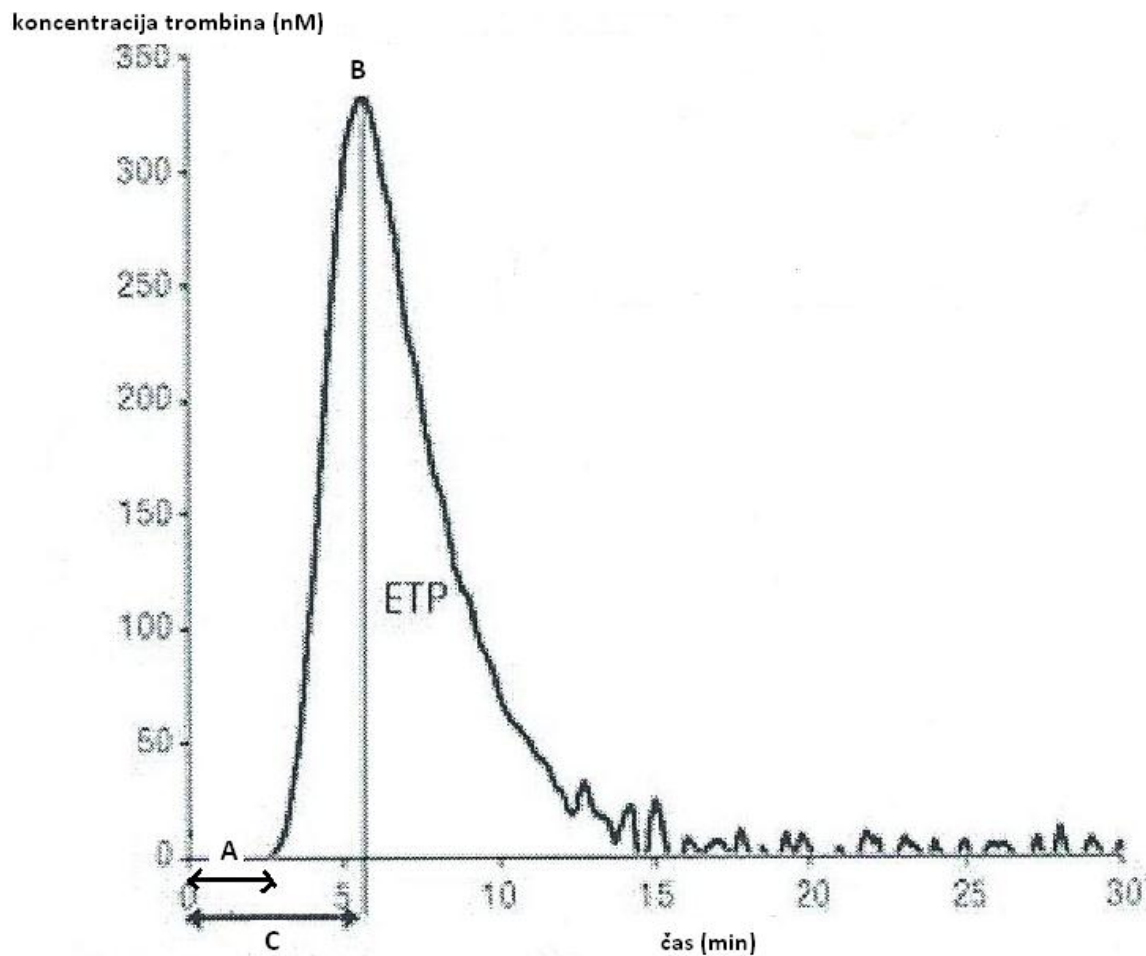
**Slika 4:** Nastajanje in razgradnja fibrina v času pri mCHP (He in sod., 2007: 872)

Sekundarna krivulja (siva črta) je stopnja spremembe v optični gostoti, ki odraža razmerje med nastajanjem in razgradnjo fibrina v trenutku zapisa.  $h_1$  = maksimalna hitrost tvorbe fibrina,  $h_2$  = maksimalna hitrost razgradnje fibrin,  $t_1$  = čas začetka tvorbe fibrina,  $t_2$  = čas, ko je hitrost tvorbe fibrina največja,  $t_3$  = čas začetka razgradnje fibrin,  $t_4$  = čas, ko je hitrost razgradnje fibrina največja.

### 1.4.3 Spremljanje tvorjenja trombina (STT)

Trombin je encim, ki je vključen v pro in antikoagulacijske mehanizme. Njegova tvorba je eden najpomembnejših korakov v koagulaciji. Hemker s sodelavci je razvil metodo merjenja nastajanje trombina, ki jo imenujemo umerjena avtomatska trombografija (Hemker in sod., 2002). Princip preiskave je zaznavanje nastajanja trombina v bolnikovi plazmi, ki ji dodamo tkivni faktor, fosfolipide in kalcij ter s fluorogenim substratom merimo aktivnost nastalega trombina v času. Spremenljivke, ki jih pri tem opazujemo so: faza mirovanja (začetna faza pred eksplozivnim porastom trombina), trombinski vrh, čas do doseženega trombinskega vrha in površino pod nastalo krivuljo, to je ves trombin, ki je nastal v času merjenja in ga imenujemo endogeni trombinski potencial (ETP). Prvi odvod krivulje nastajanja trombina v enoti časa imenujemo trombogram (Hemker in sod., 2002). Obstaja več različic metode (uporaba različnih koncentracij tkivnega faktorja,

fosfolipidov...) (Kluft in Meijer, 2010). Tvorjenje trombina lahko spremljamo tudi v filtrirani plazmi, kjer ugotavljamo vpliv mikrodelcev na nastajanje trombina. Mikrodelci so majhni fragmenti celičnih membran, veliki od 0,1 do 1,0  $\mu\text{m}$ , ki so bogati s fosfolipidi in se luščijo iz trombocitov, endotelnih celic, levkocitov in eritrocitov. Z vezavo koagulacijskih faktorjev pospešujejo koagulacijo (Bucciarelli in sod., 2011).



**Slika 5:** Trombogram (Hemker in sod., 2006: 555)

A – faza mirovanja, B – trombinski vrh, C – čas do trombinskega vrha, ETP – endogeni trombinski potencial.

### 1.5 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil z merjenjem CHP, mCHP in STT prepoznati stanja pospešenega strjevanja krvi pri bolnikih, ki so preboleli VTE ter primerjati vse metode med seboj in tako ugotoviti, katera zanesljiveje zaznava stanja pospešenega strjevanja (hiperkoagulabilnost) krvi.

Kot delovno hipotezo smo postavili, da z CHP, mCHP in STT lahko prepoznamo hiperkoagulabilno stanje pri bolnikih z VTE ter da globalne koagulacijske preiskave lahko nadomestijo preiskave za posamične trombofilne dejavnike.



## 2 METODE IN MATERIALI

### 2.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 178 zaporednih bolnic in bolnikov, ki so se zdravili na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (Univerzitetni klinični center Ljubljana) zaradi VTE in so bili najmanj mesec dni po zaključku antikoagulacijskega zdravljenja napoteni na preiskave trombofilije. Med bolniki je bilo 112 žensk (63 %) in 66 moških (37 %). Stari so bili med 19 in 81 let (povprečno 40 let). 127 izmed vseh bolnikov je imelo znan sprožilni dejavnik za VTE, 46 bolnikov ni imelo znanega sprožilnega dejavnika in za 5 bolnikov tega podatka nismo dobili.

Kontrolno skupino je sestavljalo 68 navidezno zdravih žensk in moških, ki so pristali na sodelovanje v raziskavi. Med zdravimi je bilo 61 žensk (90 %) in 7 moških (10 %). Stari so bili med 21 in 74 let (povprečna starost je bila 38 let).

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 16.1.2007 (št. soglasja 136/01/07).

### 2.2 ODVZEM KRVI IN PRIPRAVA PLAZME

Pri vseh preiskovancih smo odvzem krvi in pripravo plazme opravili po standardnih postopkih. Pred odvzemom krvi so morali biti preiskovanci tešči, alkohola niso smeli piti vsaj 24 ur, vsaj eno uro prej niso smeli kaditi ali piti pravega čaja in kave. Kri smo odvzeli v dopoldanskem času med 8.00 in 10.00 uro. Uporabili smo 4 4,5-mililitrske vakuumske plastične epruvete, v katerih je bilo antikoagulantno sredstvo 0,11 M natrijev citrat (Becton Dickinson). Razmerje med krvjo in antikoagulantom je bilo 9:1. Kri smo takoj po odvzemu mešali z natrijevim citratom tako, da smo epruvete petkrat previdno obrnili. Kri je bila vzeta iz komolčne vene brez zažema ali smo nadlaket prevezali za največ dve minuti pri 15 mmHg (2kPa). Žilo smo prebodli samo enkrat in igle v žili nismo premikali, da ni prišlo do večje poškodbe žile ali prepočasnega toka krvi skozi iglo, ki bi lahko aktivirala koagulacijo in tako povzročila nastanek trombina v epruveti. Kri smo centrifugirali v roku 4 ur, in sicer 30 minut pri 2000 g in 4 °C, da smo dobili plazmo revno s trombociti (v plazmi je lahko največ  $20 \times 10^9/L$  trombocitov). En alikvot plazme (za določitev lupusnih antikoagulantov)

smo filtrirali skozi 0,2  $\mu\text{m}$  filter, da smo popolnoma odstranili trombocite. Plazmo smo nato razpipetirali v manjše plastične epruvete, jih zmrznili s tekočim dušikom in shranili v zmrzovalniku pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vzorce smo uporabili za preiskave trombofilije, meritve celokupnega hemostatskega potenciala, modificiranega celokupnega hemostatskega potenciala in spremljanje tvorjenja trombina. Med preiskave trombofilije sodijo aktivnost proteina C, aktivnost antitrombina, koncentracija prostega proteina S, neodzivnost na aktivirani protein C, polimorfizem v koagulacijskem faktorju V (faktor V Leiden), polimorfizem v protrombinu G20210A, prisotnost lupusnih antikoagulantov ter koncentracija D-dimera.

## 2.3 METODE

### 2.3.1 Celokupni hemostatski potencial (CHP)

To je posredna metoda merjenja tvorjenja trombina. Meritev je potekala na spektrofotometru (Sunrise, Tecan) s pomočjo programske opreme Magellan (Tecan). Pri meritvi smo uporabili naslednje reagente:

- Goveji trombin (Sigma Chemical Company), 400 NIH enot. Vsebino stekleničke smo raztopili z vodo do 100 NIH/mL, ga razpipetirali v porcije po 50  $\mu\text{L}$  in shranili pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Rekombinantni t-PA (Actilyse, Boehringer Ingelheim) v koncentraciji 1 mg/mL. Razdelili smo ga v porcije po 50  $\mu\text{L}$  in ga shranili pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- $\text{CaCl}_2$  (Lekarna UKCL) v koncentraciji 320 mM, ki smo ga hranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Tris-HCl (Fluka BioChemika) pH=7,4.
- NaCl (Sigma Aldrich).
- Destilirana voda (Lekarna UKCL).

Delovni pufer Tris-HCl smo pripravili tako, da smo zatehtali 5,0 g Tris-HCl in 3,8 g NaCl in dolili do 500 mL destilirane vode. S 4 M HCl smo naravnali pH na 7,5. Pri hranjenju na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  je uporabnost pufra 1 mesec.

Zamrznjene vzorce in normalno zmesno plazmo (NZP), ki smo jo uporabili kot kontrolo, smo odtajali na termomešalcu (5 min pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), jih dobro zavrtinčili in jih nato

napipetirali v vdolbinice na plošči v dvojniku ali trojniku (odvisno od količine plazme, ki je bila na voljo) po 60  $\mu\text{L}$ .

Delovni pufer smo vzeli iz hladilnika in počakali, da se je segrel na sobno temperaturo. V dve plastični epruveti za pufer s t-PA in pufer brez t-PA smo napipetirali v vsako po 1750  $\mu\text{L}$  Tris-HCl pufra in 235  $\mu\text{L}$  320 mM  $\text{CaCl}_2$ . Potem smo odmrznili t-PA in trombin (v termomešalniku za 2 min pri 37  $^{\circ}\text{C}$ ). V obe epruveti smo napipetirali še po 18  $\mu\text{L}$  razredčenega trombina s končno koncentracijo 0,04 NIH/mL v vzorcu (predhodno smo 100 NIH/mL trombina redčili 1:10 - 50  $\mu\text{L}$  trombina in 450  $\mu\text{L}$  Tris-HCl - na 10 NIH/mL) in na koncu v epruveto za pufer s t-PA napipetirali še 15  $\mu\text{L}$  t-PA, ki smo ga pred tem redčili 1:10 (10  $\mu\text{L}$  t-PA in 90  $\mu\text{L}$  Tris-HCl), da je bila končna koncentracija v vzorcu 348 ng/mL.

Pripravili smo dve kadički, eno za pufer brez in eno za pufer s t-PA. Ko sta bila pufra dobro premešana, smo ju prelili v ustrezni kadički in z večkanalno pipeto napipetirali na ploščo. V stolpce 1, 3 in 5 smo napipetirali po 50  $\mu\text{L}$  pufra brez t-PA, v stolpce 2, 4 in 6 pa po 50  $\mu\text{L}$  pufra s t-PA. Ploščo smo ročno premešali z rahlim stresanjem in jo vložili v aparat. Takoj smo pričeli z merjenjem.

Absorbanco smo odčitavali vsako minuto pri 405 nm, reakcija pa je trajala 40 minut pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nato smo rezultate iz Magellana izvozili v Excel (Microsoft), kjer so se avtomatično izračunali CHP, CKP in CFP kot površina pod absorpcijsko krivuljo (slika 3).

$$CFP = \frac{CKP - CHP}{CKP} \times 100 (\%) \quad \dots (1)$$

### 2.3.2 Modificiran celokupni hemostatski potencial (mCHP)

Tudi pri tej metodi, ki je posredna metoda merjenja tvorjenja trombina, smo meritev opravili s pomočjo spektrofotometra (Sunrise, Tecan) s programsko opremo Magellan (Tecan). Uporabili smo naslednje reagente:

- Rekombinantni človeški tkivni faktor (rTF) (Innovin, Dade Behring). Eno stekleničko smo raztopili v 10 mL destilirane vode (založna raztopina približno 6000 pM), alikvotirali in shranili na -20  $^{\circ}\text{C}$ . rTF vsebuje tudi sintetične fosfolipide in kalcij.
- Rekombinantni t-PA, (Actilyse, Boehringer Ingelheim) v koncentraciji 1 mg/mL. t-PA smo razdelili v majhne porcije po 50  $\mu\text{L}$  in ga shranili pri -70  $^{\circ}\text{C}$ .

- Emulzija fosfolipidov (Rossix): 250  $\mu\text{M}$  založna raztopina, ki vsebuje sintetični fosfatidilholin in fosfatidilserin v kombinaciji z visoko prečiščenim sfingomielinom iz jajc. Stabilnost odprte stekleničke je 1 mesec na 2 – 8  $^{\circ}\text{C}$ .
- $\text{CaCl}_2$  (Lekarna UKCL) v koncentraciji 300 mM.
- Tris-HCl (Fluka BioChemika)  $\text{pH}=7,4$ .
- NaCl (Sigma Aldrich).
- Goveji trombin (Sigma Chemical Company), 400 NIH enot. Vsebino stekleničke smo raztopili z vodo do 100 NIH/mL, ga razpipetirali v porcije po 50  $\mu\text{L}$  in shranili pri -70  $^{\circ}\text{C}$ .

Delovni pufer TNA smo pripravili tako, da smo Tris (hidroksimetil-aminometan), NaCl in goveji albumin redčili z destilirano vodo do koncentracij 66 mM, 130 mM in 12 mg/mL in s pomočjo HCl uravnali pH na 7,4.

Založno raztopino rTF (6000 pM) smo redčili 1:10 (10  $\mu\text{L}$  rTF in 90  $\mu\text{L}$  TNA pufru), da smo dobili raztopino rTF s koncentracijo 600 pM. Dobro smo premešali. Nato smo v plastični epruveti naredili reakcijsko raztopino, v kateri je bilo 1320  $\mu\text{L}$  TNA pufru, 555  $\mu\text{L}$  300 mM  $\text{CaCl}_2$ , 33  $\mu\text{L}$  600 pM rTF in 94  $\mu\text{L}$  fosfolipidov. V raztopini je bila koncentracija fosfolipidov 11,7  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  83,3 mM in rTF 10 pM. Uporabili smo jo za sprožitev koagulacijske kaskade. Reakcijsko raztopino smo dobro premešali in jo zlili v banjico, kjer je ostala vse do pipetiranja na ploščo.

Zamrznjene vzorce in normalno zmesno plazmo (NZP), ki smo jo uporabili kot kontrolo, smo odtajali na termomešalcu (5 min pri 37  $^{\circ}\text{C}$ ), jih dobro zavrtinčili in jih nato napipetirali v vdobinice na plošči v dvojniku ali trojniku (odvisno od količine plazme, ki je bila na voljo) po 150  $\mu\text{L}$ .

Potem smo v termomešalcu odtajali zamrznjeno raztopino t-PA (2 min pri 37  $^{\circ}\text{C}$ ), močno zavrtinčili in redčili 1:10 (10  $\mu\text{L}$  t-PA in 90  $\mu\text{L}$  TNA) do koncentracije 0,1 mg/mL. Ponovno smo močno zavrtinčili in nato 16  $\mu\text{L}$  razredčenega t-PA dodali v 1970  $\mu\text{L}$  TNA pufru, da je bila končna koncentracija t-PA v vzorcu 811 ng/mL. Po pripravi smo razredčeno t-PA raztopino takoj z večkanalno pipeto napipetirali na ploščo po 40  $\mu\text{L}$  in ploščo stresali 1 minuto. Zatem smo dodali v vdobinice z večkanalno pipeto še 50  $\mu\text{L}$

reakcijske raztopine, tako da je bil končni volumen v vdolbinicah 240  $\mu\text{L}$ , končne koncentracije pa 2,1 pM rTF, 135 ng/mL t-PA, 2,5  $\mu\text{M}$  fosfolipidov in 17,5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Ploščo smo vložili v aparat in takoj pričeli z merjenjem. Aparat je ploščo stresal 5 sekund, optično gostoto smo odčitavali vsakih 30 sekund v času 60 minut (120 časovnih enot) na sobni temperaturi in valovni dolžini 405 nm.

Iz vrednosti optične gostote (Abs) med celotnim intervalom odčitavanja smo dobili primarno krivuljo (fibrin time curve). Nato smo rezultate iz Magellana izvozili v Excel (Microsoft), kjer smo z odvodom dobili sekundarno krivuljo. Iz sekundarne krivulje smo odčitali čas začetka tvorbe fibrina ( $t_1$ ); čas, ko je hitrost tvorbe fibrina največja ( $t_2$ ); maksimalno hitrost tvorbe fibrina ( $h_1$ ); čas začetka razgradnje fibrina ( $t_3$ ); čas, ko je hitrost razgradnje fibrina največja ( $t_4$ ); maksimalno hitrost razgradnje fibrina ( $h_2$ ). S formulami smo izračunali koagulacijski profil (Kp), profil fibrinolize (Fp) in celokupno hemostatsko rzmerje (CHR) (slika 4).

$$Kp = (t_1)^{-1} \times \frac{|h_1|}{(t_2 - t_1)} \quad \dots(2)$$

$$Fp = t_1 \times \frac{|h_2|}{(t_4 - t_3)} \quad \dots(3)$$

$$CHR = \frac{Kp}{Fp} \quad \dots(4)$$

### 2.3.3 Spremljanje tvorjenja trombina (STT)

Tvorjenje trombina smo merili z reagenčnim kompletom Technothrombin TGA (Technoclone). Koagulacijo in nastajanje trombina smo v vzorcu plazme revne s trombociti sprožili s tkivnim faktorjem, dodatkom micelov z negativno nabitimi fosfolipidi in  $\text{CaCl}_2$ . Preiskava temelji na spremljanju fluorescence, ki nastane ob cepitvi fluorogenega substrata z nastajajočim trombinom. Iz spremembe fluorescence skozi čas lahko s pomočjo umiritvene krivulje izračunamo koncentracijo trombina v vzorcu. Naraščanje koncentracije trombina v času pa omogoča izračun nastajanja trombina v vzorcu na minuto in prikaz za cel potek meritve, kar ponazarja različne stopnje tvorbe krvnega strdka. Za prikaz rezultatov smo uporabili programsko opremo Magellan s fluorimetrom. Podal nam je vrednosti v obliki Excelove tabele. Z datoteko Technothrombin TGA Evaluation Software

(Excel, Microsoft) pa smo dobili najprej umeritveno krivuljo trombina, nato še koncentracije trombina v vzorcu glede na čas. Za vsakega preiskovanca smo izmerili fazo mirovanja (min), trombinski vrh (nM), čas do trombinskega vrha (min) in ETP (nM × min) (slika 5).

Za določanje od mikrodolcev odvisnega nastajanja trombina smo uporabili plazmo revno s trombociti in plazmo brez mikrodolcev, ki smo jo pripravili s filtracijo. V obeh smo sočasno izmerili nastajanje trombina. Razlika v nastajanju trombina med plazmo revno s trombociti in filtrirano plazmo je povezana z aktivnostjo trombogenih mikrodolcev. Rezultat smo izrazili kot odstotek trombina, ki je nastal zaradi vpliva mikrodolcev. Izračunali pa smo ga tako, da smo razliko med vrednostma trombinskega vrha pred in po filtraciji delili z vrednostjo trombinskega vrha pred filtracijo in pomnožili s 100.

Spremljanja tvorjenja trombina nismo izmerili pri vseh preiskovancih, ampak pri 32 ženskah, ki so doživele VTE z znanim sprožilnim dejavnikom (ob jemanju oralne kontracepcije) in pri 26 zdravih ženskah primerljive starosti, ki v času odvzema krvi niso jemale oralnih kontraceptivov.

## 2.4 PREISKAVE TROMBOFILIJE

### 2.4.1 Aktivnost proteina C

Aktivnost proteina C smo določali s kinetično spektrofotometrično metodo s kromogenim substratom z reagenčnim kompletom Berichrom Protein C (Siemens). Protein C iz preiskovančevega vzorca smo aktivirali s specifičnim aktivatorjem iz kačjega strupa (*Agkistrodon contortrix*, bronasti glavež). Aktivirani protein C spremeni substrat v obarvan produkt, zato smo njegovo aktivnost merili iz porasta absorpcije pri 405 nm. Koagulacijski analizator (CS2100i, Siemens) je izmeril vrednosti absorbance pri 405 nm ter iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s plazmo z znano aktivnostjo proteina C, odčital aktivnost proteina C v testnih vzorcih. Patološke so bile vrednosti pod 70 %.

#### **2.4.2 Aktivnost antitrombina**

Merili smo s kromogeno preiskavo, kjer smo uporabili reagenčni komplet Innovance Antithrombin (Siemens). V prvem koraku se je heparin iz reagenta vezal na antitrombin v vzorcu. Reagent vsebuje tudi presežek faktorja Xa. Antitrombin je zavrl določeno količino faktorja Xa. Preostalo aktivnost faktorja Xa smo izmerili s pomočjo specifičnega kromogenega substrata. Meritev je potekala na koagulacijskem analizatorju (CS2100i, Siemens), ki je izmeril vrednosti absorbance pri 405 nm ter iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s plazmo z znano aktivnostjo antitrombina (Standard Human Plasma, Siemens), odčital aktivnosti antitrombina v testnih vzorcih. Izmerjena sprememba optične gostote je bila torej obratno sorazmerna aktivnosti antitrombina. Patološke vrednosti so bile pod 75 %.

#### **2.4.3 Koncentracija prostega proteina S**

Koncentracijo prostega proteina S smo merili z imunoturbidimetrično metodo, kjer smo uporabili delce lateksa, prevlečene z monoklonskimi protitelesi proti prostemu proteinu S (STA-Liatest Free Protein S, Diagnostica Stago). Pri tem so se protitelesa povezala s prostim proteinom S v preiskovančevem vzorcu, tako da je prišlo do zlepljanja delcev lateksa in povečala se je motnost (turbidnost) vzorca. Povečana motnost se je odražala v povečani absorbanci. Preiskavo smo izvedli na koagulacijskem analizatorju (Behring Coagulation Timer, Dade Behring), ki je izmeril absorbance pri 540 nm ter iz umeritvene krivulje odčital vrednosti prostega proteina S v testiranih vzorcih. Patološke vrednosti so bile pri ženskah pod 55 % in pri moških pod 60 %.

#### **2.4.4 Neodzivnost na aktivirani protein C**

Preiskava je osnovana na aktiviranem parcialnem tromboplastinskem času (APTČ). Merili smo čas do nastanka strdka ob prisotnosti ali odsotnosti aktiviranega proteina C, v vzorcih plazme, ki smo jo predhodno redčili s plazmo brez faktorja V. Pot strjevanja krvi v merjenem vzorcu smo sprožili z dodajanjem koloidne silike in sintetičnih fosfolipidov, strjevanje pa smo sprožili z dodatkom CaCl<sub>2</sub>. Meritve smo naredili v koagulacijskem analizatorju (Behring Coagulation Timer, Dade Behring). Rezultate smo podali kot razmerje med aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom (APTČ) plazme z dodanim

aktiviranim proteinom C in plazme brez aktiviranega proteina C. Patološke vrednosti so bile razmerje enako ali manjše od 1,93 in taki preiskovanci so neodzivni na APC in imajo verjetno Faktor V Leiden.

#### **2.4.5 Faktor V Leiden**

Preiskavo smo izvedli pri vseh preiskovancih, pri katerih smo v okviru preiskave neodzivnost na aktivirani protein C, določili vrednost razmerja APC-V pod 2,2. Uporabili smo metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Del DNA, ki vsebuje zapis za faktor V, smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo. V reakcijsko mešanico smo dodali dva fluorescenčno označena oligonukleotida (sondi). Sonda z vezanim fluorescenčnim označevalcem VIC se je vezala na zaporedje, ki ima na mestu 1691 nukleotid G (alel G), sonda s označevalcem FAM pa se je vezala na zaporedje, ki ima na istem mestu nukleotid A (alel A). Glede na obarvanost produkta smo ločili, ali gre za nepolimorfnega homozigota GG, heterozigota ali homozigota s polimorfizmom AA. Analiza je bila izvedena na aparatu za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Za kontrolne vzorce smo uporabili kontrolne vzorce z znanimi genotipi (GG, GA, AA) in negativno kontrolo, ki ne vsebuje DNA. Trombofilna genotipa sta bila GA in AA.

#### **2.4.6 Protrombin G20210A**

Tudi tukaj smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Del DNA, ki vsebuje zapis za polimorfizem faktorja II, smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). V reakcijsko mešanico smo dodali dva specifična fluorescenčno označena oligonukleotida (sondi). Sonda z vezanim fluorescenčnim označevalcem FAM se je vezala na zaporedje, ki ima na mestu 20210 nukleotid G (alel G), sonda z označevalcem VIC pa se je vezala na zaporedje, ki ima na istem mestu nukleotid A (alel A). Glede na obarvanost produkta smo ločili ali gre za nepolimorfnega homozigota (GG), heterozigota (AG) ali homozigota s polimorfizmom (AA). Analiza je bila izvedena na aparatu za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Za kontrolne vzorce smo uporabili kontrolne vzorce z znanimi genotipi (GG, GA, AA) in negativno kontrolo, ki ne vsebuje DNA. Trombofilna genotipa sta bila GA in AA.



### 2.4.7 Lupusni antikoagulant

Opravili smo dve vrsti preiskave. Pri prvi smo uporabili metodo s strupom Russellovega gada (dRVVT). Preiskava je posebej občutljiva na prisotnost lupusnih antikoagulantov odvisnih od  $\beta$ 2-glikoproteina I. Uporabili smo reagenčni komplet LA Screen/LA Confirm (Life Diagnostics, Division of Life Therapeutics). Strup Russellovega gada iz reagenta LA Screen je sprožil strjevanje krvi, tako da je neposredno aktiviral faktor X. Na ta način smo zaobšli faktor VII (ekstrinzična pot) in faktorje XII, XI in IX (intrinzična pot). LA Screen je tako v primerjavi z APTČ bolj specifičen, saj motnje v omenjenih faktorjih, kot tudi pomanjkanje ali protitelesa proti faktorju VIII, ne vplivajo na rezultate. Če so bili v preiskovančevem vzorcu prisotni lupusni antikoagulant, je bil čas strjevanja krvi z reagentom LA Screen podaljšan. Reagent LA Confirm je po sestavi podoben LA Screen, le da vsebuje presežek fosfolipidov. Presežek fosfolipidov je izničil učinek lupusnih antikoagulantov in je skrajšal (popravil) čas strjevanja krvi. Tudi to preiskavo smo opravili na koagulacijskem analizatorju (Behring Coagulation Timer, Dade Behring), ki je izmeril čas strjevanja krvi z reagentom LA Screen in LA Confirm. Potem smo za testirane vzorce in FZP (filtrirana zmesna plazma) izračunali razmerje med časom LA Screen in LA Confirm (LA razmerje), nato pa smo izračunali še normalizirano razmerje LA.

$$LA \text{ razmerje} = \frac{LA \text{ Screen (s)}}{LA \text{ Confirm (s)}} \quad \dots(5)$$

$$LA \text{ normalizirano razmerje} = \frac{LA \text{ razmerje vzorca}}{LA \text{ razmerje FZP}} \quad \dots(6)$$

Vrednost LA normaliziranega razmerja  $\geq 1,2$  smo upoštevali kot prisotnost lupusnih antikoagulantov.

Pri drugi metodi smo ugotavljali ali je čas strjevanja podaljšan zaradi prisotnosti lupusnih antikoagulantov ali zaradi pomanjkanja koagulacijskih faktorjev. Vzorec preiskovančeve plazme smo inkubirali s HPE (fosfolipid fosfatidiletanolamin v heksagonalni fazi) ali brez njega in nato z občutljivim tromboplastinom izmerili APTČ. Če so bili v vzorcu lupusni antikoagulant, so fosfolipidi občutno skrajšali koagulacijski čas. Podaljšanje APTČ zaradi morebitnega pomanjkanja posameznih koagulacijskih faktorjev, smo preprečili z dodatkom normalne plazme. Meritev je potekala v avtomatskem koagulacijskem analizatorju

(Behring Coagulation Timer, Dade Behring), ki je izračunal razliko med APTČ brez dodanih HPE (LA1) in APTČ z dodanimi HPE (LA2). Patološke vrednosti so bile pri razliki 9 sekund ali več.

#### **2.4.8 Koncentracija D-dimera**

Izvedli smo turbidimetrično preiskavo, pri kateri smo uporabili delce lateksa prevlečene s protitelesi proti D-dimeru. V prisotnosti D-dimera so se delci lateksa zlepili in povečali motnost vzorca. Razpršenost svetlobe je bila tako sorazmerna količini D-dimera v vzorcu. Preiskavo smo izvedli na avtomatskem koagulacijskem analizatorju (CS2100i, Siemens), merili pa smo s pomočjo reagenčnega kompleta TriniLIA Auto Dimer (Trinity Biotech). Analizator je izmeril vrednosti absorbance in iz umeritvene krivulje odčital vsebnost D-dimera v testnih vzorcih. Patološke vrednosti so bile nad 250 µg/L.

### **2.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV**

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili statistični program Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). Normalnost porazdelitve spremenljivk smo testirali s Kolmogorov-Smirnovim testom. Če so se vrednosti spremenljivk razporejale normalno, smo to prikazali z aritmetično sredino in standardnim odklonom. Vrednosti spremenljivk, ki se niso razporejale normalno, pa smo prikazali z mediano in razponom med prvim in tretjim kvartilom. Referenčne vrednosti smo podali kot spodnjo in zgornjo mejo, ki smo ju za spremenljivke, ki so se razporejale normalno, izračunali kot aritmetična sredina  $\pm$  2 standardizirana odklona. Za spremenljivke, ki so se razporejale nenormalno, smo za spodnjo mejo vzeli 5. centil, za zgornjo pa 95. centil. Za testiranje razlik med skupinama smo pri normalni porazdelitvi uporabili Studentov t- test, pri nenormalni porazdelitvi pa Mann-Whitneyev U-test. Razlike med skupinami kontrol s trombofilijo in brez nje ter bolnikov s trombofilijo in brez nje smo računali z analizo variance (ANOVA). Za normalno porazdeljene spremenljivke smo uporabili one-way ANOVO (Scheffejev post-hoc test), za nenormalno porazdeljene pa neparametrsko ANOVO (Kruskal-Wallis ANOVA rangov). Razlike med bolniki z znanim sprožilnim dejavnikom za VTE in brez njega smo računali s testom  $\chi^2$ . Za statistično značilno vrednost smo imeli  $p < 0,05$ . Povezave med spremenljivkami, ki so se razporejale normalno, smo testirali s Pearsonovim

korelacijskim koeficientom. Tiste spremenljivke, ki so se razporejale nenormalno, pa s Spearmanovo korelacijo. Razmerje obetov (OR) smo izračunali s programom Medcalc (Mariakerke), s katerim smo pri določeni razmejivni vrednosti dobili razmerje obetov s 95-odstotnim intervalom zaupanja. Ponovljivost za globalne koagulacijske preiskave znotraj serije in med serijami smo izračunali kot koeficient variacije (CV, %) v programu Excel (Microsoft).

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots(7)$$

### 3 REZULTATI

#### 3.1 DOLOČITEV REFERENČNEGA OBMOČJA ZA GLOBALNE KOAGULACIJSKE PREISKAVE

Lastne referenčne vrednosti za CHP in mCHP smo določili pri 68 zdravih osebah (61 žensk, 7 moških), starih med 21 in 74 let, s povprečno starostjo 38 let.

**Preglednica 1:** Referenčne vrednosti določene pri 68 zdravih osebah za CHP in mCHP

metoda	5. centil	95. centil
<b>CHP</b>		
CKP (Abs-vsota)	6,3	26,1
CHP (Abs-vsota)	7,2	23,9
CFP (%)	32	68
<b>mCHP</b>		
Kp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-1}$ )	0,1	1,7
Fp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-3}$ )	0,1	1,8
CHR ( $\times 10^{-2}$ )	0,1	11,7

CKP = celokupni koagulacijski potencial, CHP = celokupni hemostatski potencial, CFP = celokupni fibrinolitični potencial, mCHP = modificiran celokupni hemostatski potencial, Kp = koagulacijski profil, Fp = fibrinolitični profil, CHR = celokupno hemostatsko razmerje, Abs = absorbanca.

Za nobeno spremenljivko ni bilo statistično značilnih razlik med spoloma. Korelacija s starostjo je bila pri spremenljivkah CKP (Spearmanov koeficient  $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ), CHP (Spearmanov koeficient  $r = -0,32$ ,  $p < 0,05$ ), CFP (Spearmanov koeficient  $r = -0,35$ ,  $p < 0,05$ ), Fp (Spearmanov koeficient  $r = -0,32$ ,  $p < 0,05$ ), in CHR (Spearmanov koeficient  $r = 0,30$ ,  $p < 0,05$ ), pri Kp pa korelacije ni bilo.

Za metodo STT smo lastne referenčne vrednosti določili pri 63 zdravih ženskah, starih med 22 in 47 let, povprečna starost pa je bila 34 let.

**Preglednica 2:** Referenčne vrednosti določene pri 63 zdravih ženskah za STT

spremenljivke	$\bar{x} \pm SD$	mediana (1. - 3. kvartil)	spodnja meja	zgornja meja
faza mirovanja (min)		7,0 (5,0 - 10,0)	4,5	15,5
trombinski vrh (nM)	376 ± 106		164	588
čas do trombinskega vrha (min)		11 (8,5 - 14,5)	7,5	23,0
ETP (nM × min)	4015 ± 421		3173	4857
% mikrodelcev	39,9 ± 11,8		16,3	63,5

ETP = endogeni trombinski potencial,  $\bar{x}$  = aritmetična sredina, SD = standardizirani odklon. Spodnja in zgornja meja sta za normalno porazdelitev definirani kot  $\bar{x} \pm 2SD$ , za nenormalno porazdelitev pa kot 5. in 95. centil.

Med STT in starostjo ni bilo korelacije.

### 3.2 PONOVLJIVOST GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV

Ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije znotraj in med serijami.

**Preglednica 3:** Koeficient variacije (%) za CHP, mCHP in STT znotraj serije in med serijami

metoda	CV % znotraj serije	CV % med serijami
CHP		
CKP	5,9	11,7
CHP	11	17,2
CFP	14,1	25,5
mCHP		
Kp	13	45
Fp	30	47
CHR	38	99
STT		
faza mirovanja	1,9	11,5
trombinski vrh	2,2	14,1
čas do trombinskega vrha	2,8	12,5
ETP	1,8	5,6
% mikrodelcev	40,4	11,6

CKP = celokupni koagulacijski potencial, CHP = celokupni hemostatski potencial, CFP = celokupni fibrinolitični potencial, mCHP = modificiran celokupni hemostatski potencial, Kp = koagulacijski profil, Fp = fibrinolitični profil, CHR = celokupno hemostatsko razmerje, STT = spremljanje tvorjenja trombina, ETP = endogeni trombinski potencial, CV = koeficient variacije.

### 3.3 PRIMERJAVA GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV MED KONTROLAMI IN BOLNIKI Z VTE

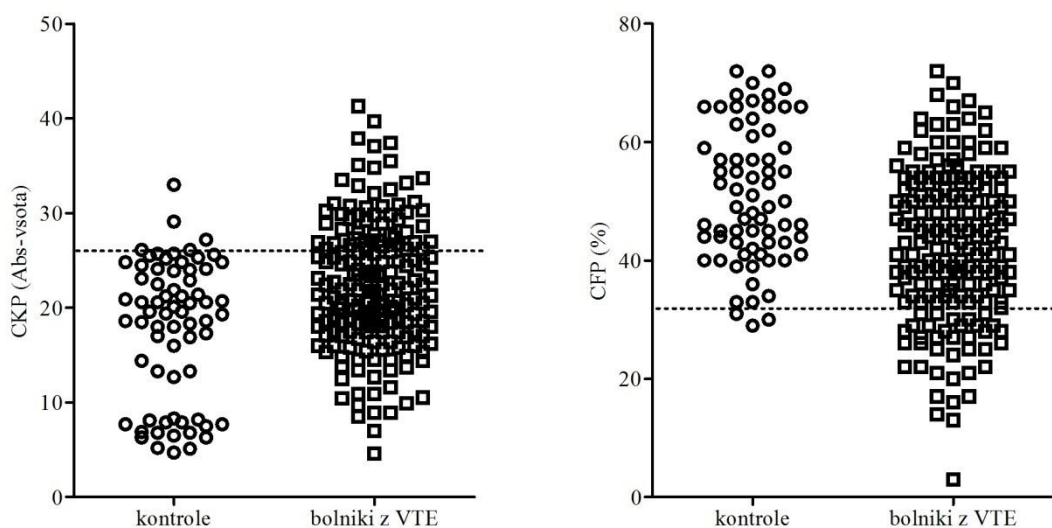
Bolniki z VTE so imeli v primerjavi s kontrolami statistično značilno večji CKP ter statistično značilno manjši CFP, medtem ko ni bilo statistično značilne razlike za CHP (preglednica 4, slika 6).

**Preglednica 4:** Celokupni koagulacijski potencial (CKP), celokupni hemostatski potencial (CHP) in celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri bolnikih z VTE in kontrolah

Vrednosti so predstavljene kot mediana in razpon med 1. in 3. kvartilom. Krepko so napisane statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ).

spremenljivke	kontrole (N = 68)	bolniki z VTE (N = 178)	p
CKP (Abs-vsota)	19,6 (10,5 - 24,0)	21,9 (17,5 - 26,9)	= <b>0,0005</b>
CHP (Abs-vsota)	13,8 (10,7 - 17,9)	14,7 (11,8 - 20,4)	= 0,09
CFP (%)	48,8 (42,3 - 60,0)	42,5 (33,5 - 52,0)	< <b>0,0001</b>

Abs = absorbanca, N = število oseb, p = statistična značilnost (Mann-Whitney U-test).



**Slika 6:** CKP ter CFP pri kontrolah in bolnikih z VTE

Črtkana črta pomeni zgornjo mejo referenčnega območja za CKP in spodnjo mejo referenčnega območja za CFP, Abs = absorbanca, CKP = celokupni koagulacijski potencial, CFP = celokupni fibrinolitični potencial.

Izračunali smo razmerje obetov (tveganje) za VTE. Preiskovanci s CKP > 22,1 Abs-vsota so imeli 1,9 - krat (95 % interval zaupanja 1,1 – 3,4) večje tveganje za VTE kot preiskovanci z vrednostmi CKP ≤ 22,1. Pri vrednostih CKP > 26,1 je bilo tveganje za VTE

9,2 – krat (95 % interval zaupanja 2,8 – 30,5) večje. Preiskovanci s CFP < 39 % so imeli 4,5 – krat (95 % interval zaupanja 2,1 – 9,5) večje tveganje za VTE kot preiskovanci z vrednostmi CFP  $\geq$  39 %.

Iz preglednice 5 lahko vidimo, da pri metodi mCHP za nobeno spremenljivko ni bilo statistično značilne razlike med bolniki z VTE in kontrolami.

**Preglednica 5:** Koagulacijski profil (Kp), fibrinolitični profil (Fp) in celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri bolnikih z VTE in kontrolah

Vrednosti so predstavljene kot mediana in razpon med 1. in 3. kvartilom.

spremenljivke	kontrole (N = 68)	bolniki z VTE (N = 178)	p
Kp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-1}$ )	0,4 (0,2 - 0,8)	0,4 (0,2 - 0,7)	= 0,74
Fp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-3}$ )	0,5 (0,2 - 0,9)	0,4 (0,2 - 0,8)	= 0,23
CHR ( $\times 10^{-2}$ )	0,8 (0,2 - 3,1)	0,8 (0,3 - 3,0)	= 0,64

Abs = absorbanca, N = število oseb, p = statistična značilnost (Mann-Whitney U-test).

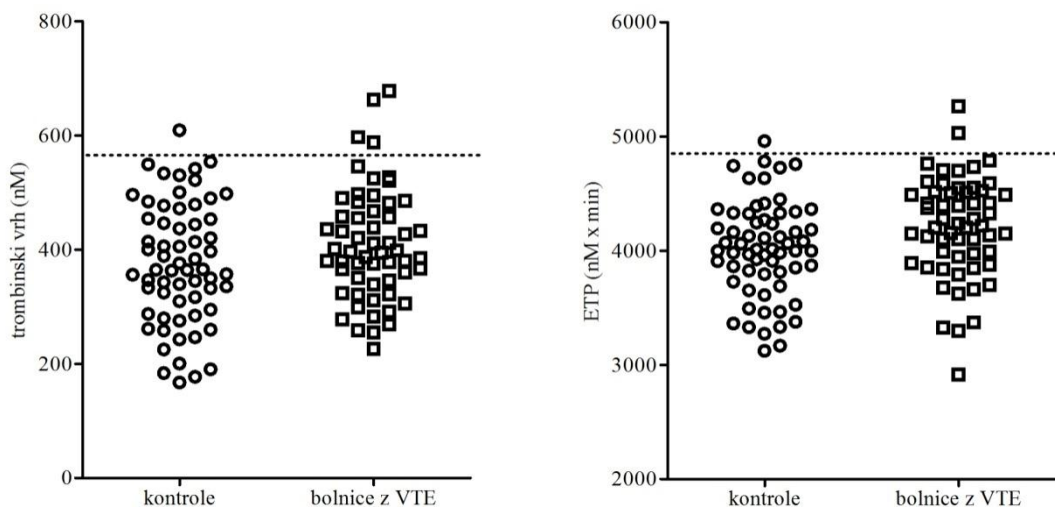
Pri metodi STT imamo za bolnice z VTE v primerjavi s kontrolami statistično značilno večji trombinski vrh in endogeni trombinski potencial, za ostale spremenljivke ni bilo statistično značilnih razlik, kar je vidno iz preglednice 6, (slika 7).

**Preglednica 6:** Spremljanje tvorjenja trombina (STT) pri bolnicah z VTE in kontrolah

Vrednosti so predstavljene kot aritmetične sredine  $\pm$  standardizirani odklon. Krepko so napisane statistično značilne razlike (p < 0,05).

spremenljivke	kontrole (N = 26)	bolnice z VTE (N = 32)	p
faza mirovanja (min)	10,0 $\pm$ 5,0	8,5 $\pm$ 2,6	= 0,26
trombinski vrh (nM)	354 $\pm$ 107	414 $\pm$ 111	= <b>0,043</b>
čas do trombinskega vrha (min)	14,1 $\pm$ 6,1	12,2 $\pm$ 2,8	= 0,13
ETP (nM $\times$ min)	3927 $\pm$ 442	4183 $\pm$ 474	= <b>0,04</b>
% mikrodelcev	42,7 $\pm$ 10,4	41,7 $\pm$ 10,9	= 0,71

ETP = endogeni trombinski potencial, N = število oseb, p = statistična značilnost (Studentov t-test).



**Slika 7:** Trombinski vrh ter ETP pri kontrolah in bolnicah z VTE

Črtkana črta predstavlja zgornjo mejo referenčnega območja za trombinski vrh in ETP, ETP = endogeni trombinski potencial.

Preiskovanci s trombinskim vrhom  $> 366$  nM so imeli 2,7 - krat (95 % interval zaupanja 0,9 – 7,7) večje tveganje za VTE kot preiskovanci z vrednostmi trombinskega vrha  $\leq 366$  nM, vendar ni dosegel statistične značilnosti. Preiskovanci z ETP  $> 4083$  nM  $\times$  min so imeli 3,6 – krat (95 % interval zaupanja 1,2 – 10,7) večje tveganje za VTE kot preiskovanci z vrednostmi ETP  $\leq 4083$  nM  $\times$  min.

Preverili smo tudi, kako posamičen trombofilni dejavnik vpliva na spremenljivke vseh treh metod. Ugotovili smo, da ni statistično značilnih razlik za pomanjkanje proteina C, pomanjkanje antitrombina in proteina S. Vsi ostali trombofilni dejavniki so vplivali vsaj na eno spremenljivko, kar je vidno iz preglednice 7.



**Preglednica 7:** Vpliv posamičnih trombofilnih dejavnikov na CHP, mCHP in STT

Vrednosti so predstavljene kot mediana ter razpon med 1. in 3. kvartilom in aritmetične sredine  $\pm$  standardizirani odklon, p je statistično značilen ( $p < 0,05$ ).

TF dejavnik	metoda	kontrola	bolniki z določenim TF dejavnikom	p
neodzivnost na APC	CHP			
	CKP (Abs-vsota)	19,6 (10,5 - 24,0)	23,7 (18,6 - 27,3)	= 0,003
	CFP (%)	48,8 (42,3 - 60,0)	45,6 (35,9 - 54,8)	= 0,03
	mCHP			
	Fp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-3}$ )	0,5 (0,2 - 0,9)	0,3 (0,2 - 0,5)	= 0,02
	CHR ( $\times 10^{-2}$ )	0,8 (0,2 - 3,1)	1,8 (0,6 - 5,7)	= 0,04
	STT			
	ETP (nM $\times$ min)	3927 $\pm$ 442	4463 $\pm$ 414	= 0,007
protrombin G20210A	CHP			
	CKP (Abs-vsota)	19,6 (10,5 - 24,0)	24,4 (18,3 - 27,3)	= 0,006
	CFP (%)	48,8 (42,3 - 60,0)	42,8 (31,0 - 54,0)	= 0,01
	STT			
	ETP (nM $\times$ min)	3927 $\pm$ 442	4528 $\pm$ 445	= 0,005
lupusni antikoagulanti	CHP			
	CKP (Abs-vsota)	19,6 (10,5 - 24,0)	20,8 (16,4 - 27,9)	= 0,04
	CHP (Abs-vsota)	13,8 (10,7 - 17,9)	16,8 (12,1 - 26,0)	= 0,01
	CFP (%)	48,8 (42,3 - 60,0)	41,0 (33,0 - 54,0)	= 0,006
	mCHP			
	Kp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-1}$ )	0,4 (0,2 - 0,8)	0,3 (0,2 - 0,4)	= 0,007
	Fp ( $\Delta$ Abs/min $\times 10^{-3}$ )	0,5 (0,2 - 0,9)	0,8 (0,5 - 1,3)	= 0,02
	CHR ( $\times 10^{-2}$ )	0,8 (0,2 - 3,1)	0,3 (0,2 - 0,6)	= 0,008
povišana koncentracija D-dimera	CHP			
	CKP (Abs-vsota)	19,6 (10,5 - 24,0)	23,6 (19,4 - 29,8)	= 0,0006
	CFP (%)	48,8 (42,3 - 60,0)	39,9 (29,0 - 50,0)	= 0,0006

CKP = celokupni koagulacijski potencial, CHP = celokupni hemostatski potencial, CFP = celokupni fibrinolitični potencial, mCHP = modificiran celokupni hemostatski potencial, Kp = koagulacijski profil, Fp = fibrinolitični profil, CHR = celokupno hemostatsko razmerje, STT = spremljanje tvorjenja trombina, ETP = endogeni trombinski potencial, Abs = absorbanca, APC = aktiviran protein C, p = statistična značilnost (Studentov t-test za metodo STT in Mann-Whitney U-test za metodi CHP, mCHP).

### 3.4 PRIMERJAVA GLOBALNIH KOAGULACIJSKIH PREISKAV MED PREISKOVANCI S TROMBOFILIJO IN BREZ NJE

Od 178 bolnikov in bolnic je bilo 88 takih, ki ni imelo nobene od oblik trombofilije, preostalih 90 pa je imelo eno ali več oblik trombofilije (preglednica 8). Neodzivnost na aktivirani protein C (APC) je imelo 30 bolnikov in pri vseh ga je povzročil faktor V Leiden. Od vseh bolnikov in bolnic s trombofilijo jih je 18 imelo dve obliki trombofilije (preglednica 9) in 4 so bili taki, ki so imeli tri oblike trombofilije: 1 bolnik je imel povišano koncentracijo D-dimera, lupusne antikoagulate in polimorfizem v faktorju II; 1 je imel pomanjkanje proteina S in bil dvojni heterozigot (heterozigot II + heterozigot FVL); 1 je imel povišano koncentracijo D-dimera in bil dvojni heterozigot; 1 je imel povišano koncentracijo D-dimera, lupusne antikoagulate in polimorfizem v faktorju V Leiden.

Od 68 kontrol jih 52 ni imelo nobene od oblik trombofilije, preostalih 16 pa je imelo eno ali več oblik trombofilije (preglednica 8). Od vseh kontrol s trombofilijo sta 2 imeli dve obliki trombofilije: 1 kontrola je imela neodzivnost na APC in pomanjkanje proteina S ter 1 kontrola je imela pomanjkanje proteina C in povišano koncentracijo D-dimera.

**Preglednica 8:** Pogostost trombofilije pri 178 bolnikih z VTE in 68 kontrolah

trombofilija	bolniki z VTE N (%)	kontrole N (%)
pomanjkanje proteina C	4 (2,2)	2 (3,0)
pomanjkanje antitrombina	2 (1,1)	0 (0)
pomanjkanje proteina S	2 (1,1)	2 (3,0)
neodzivnost na APC	30 (16,9)	2 (3,0)
faktor V Leiden	30 (16,9)	ni podatka
protrombin G20210A	15 (8,4)	ni podatka
prisotnost lupusnih antikoagulantov	29 (16,3)	6 (8,8)
povišana koncentracija D-dimera	34 (19,1)	6 (8,8)
nobene	88 (49,4)	52 (76,5)

APC = aktivirani protein C, VTE = venski tromboembolizem.

**Preglednica 9:** Število bolnikov z dvema različnima oblikama trombofilije

	PC	AT	PS	APC, FVL	FII	LA	DD
PC		1	0	1	0	1	0
AT	1		0	0	0	0	0
PS	0	0		0	0	0	0
APC, FVL	1	0	0		3	0	3
FII	0	0	0	3		0	2
LA	1	0	0	0	0		7
DD	0	0	0	3	2	7	

PC = pomanjkanje proteina C, AT = pomanjkanje antitrombina, PS = pomanjkanje proteina S, APC = neodzivnost na aktivirani protein C, FVL = polimorfizem v faktorju V Leiden, FII = polimorfizem v faktorju za protrombin, LA = prisotnost lupusnih antikoagulantov, DD = povišana koncentracija D-dimera.

Bolniki z znanim sprožilnim dejavnikom za VTE in brez njega so se enakomerno razporejali v obeh skupinah – v skupini bolnikov brez trombofilije (TF-) in skupini bolnikov s trombofilijo (TF+),  $\chi^2=1,34$ ,  $p=0,3$  (preglednica 10).

**Preglednica 10:** Pogostost trombofilije pri bolnikih z znanim sprožilnim dejavnikom za VTE in brez njega

	bolni TF- (N = 88)	bolni TF+ (N = 90)
bolniki z znanim sprožilnim dejavnikom	67	60
bolniki brez znanega sprožilnega dejavnika	19	27
ni podatka	2	3

VTE = venski tromboembolizem, TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo.

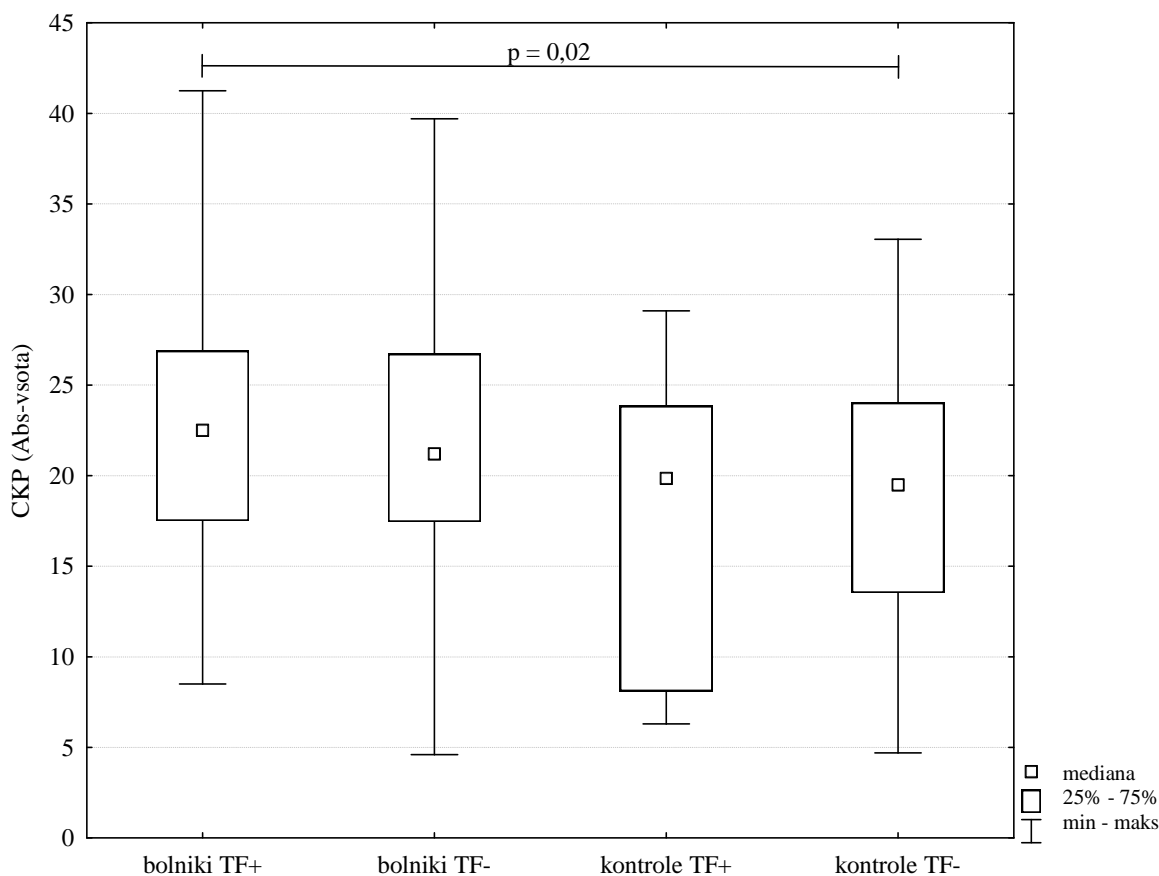
Primerjava preiskovancev s trombofilijo in brez nje je pokazala statistično značilno razliko za CKP in CFP (preglednica 11). Spremenljivka CKP je bila statistično višja pri bolnikih s trombofilijo kot pri kontrolah brez trombofilije. Med ostalimi skupinami za CKP ni bilo statistično značilnih razlik (slika 8). Medtem ko je bila spremenljivka CFP statistično višja pri kontrolah s in brez trombofilije v primerjavi z bolniki s in brez trombofilije (slika 9).

**Preglednica 11:** Celokupni koagulacijski potencial (CKP), celokupni hemostatski potencial (CHP) in celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri preiskovancih s trombofilijo in brez nje

Vrednosti so predstavljene kot mediana in razpon med 1. in 3. kvartilom. Krepko so napisane statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ).

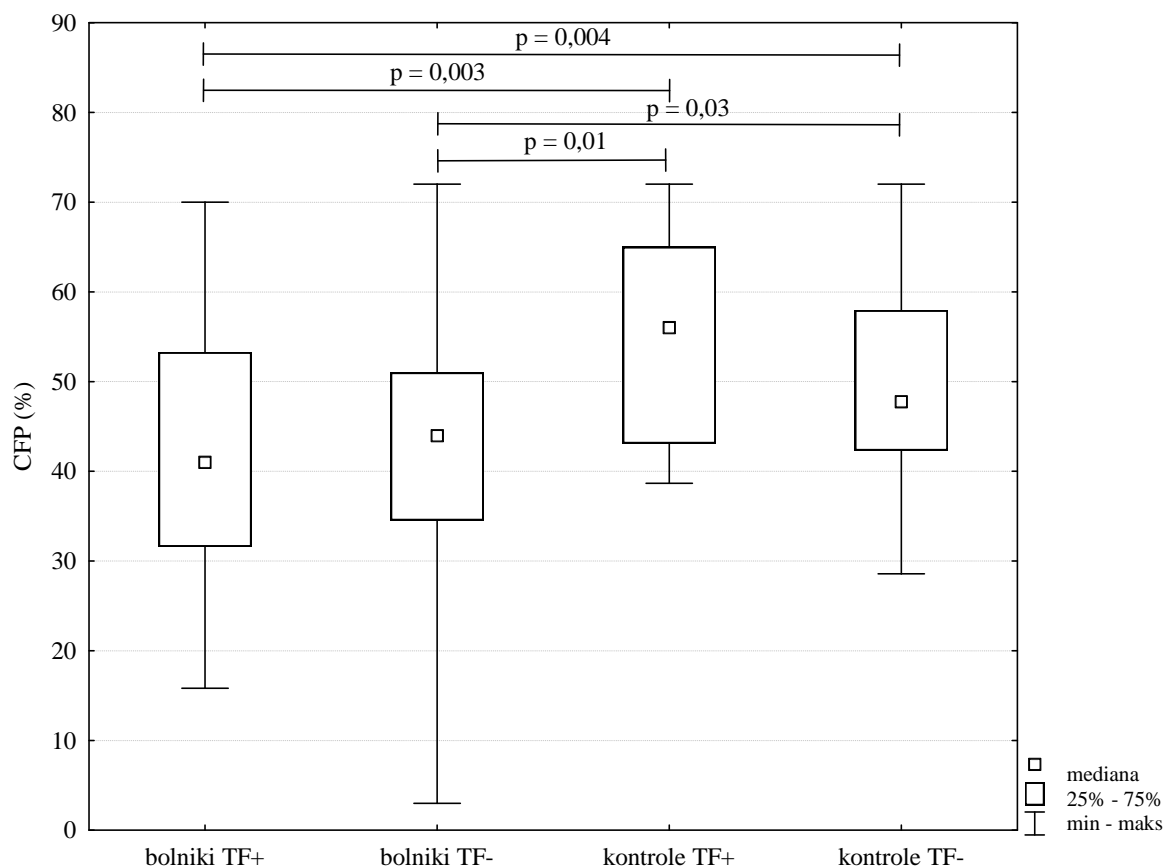
spremenljivke	bolni TF+ (N = 90)	bolni TF- (N = 88)	kontrolne TF+ (N = 16)	kontrolne TF- (N = 52)	p
CKP (Abs-vsota)	22,5 (17,5 – 26,9)	21,2 (17,5 – 26,7)	20,2 (6,3 – 29,1)	19,4 (5,2 – 26,1)	= <b>0,006</b>
CHP (Abs-vsota)	15,4 (11,9 – 21,5)	14,2 (11,0 – 18,8)	13,8 (5,9 – 24,0)	13,8 (7,6 – 23,9)	= 0,1
CFP (%)	41,0 (31,6 – 53,3)	44,0 (34,5 – 51,0)	55,5 (38,7 – 68,8)	48,5 (30,6 – 70,0)	= <b>0,0001</b>

Abs = absorbanca, N = število oseb, TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).



**Slika 8:** Celokupni koagulacijski potencial (CKP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje

TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).



**Slika 9:** Celokupni fibrinolitični potencial (CFP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje  
 TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).

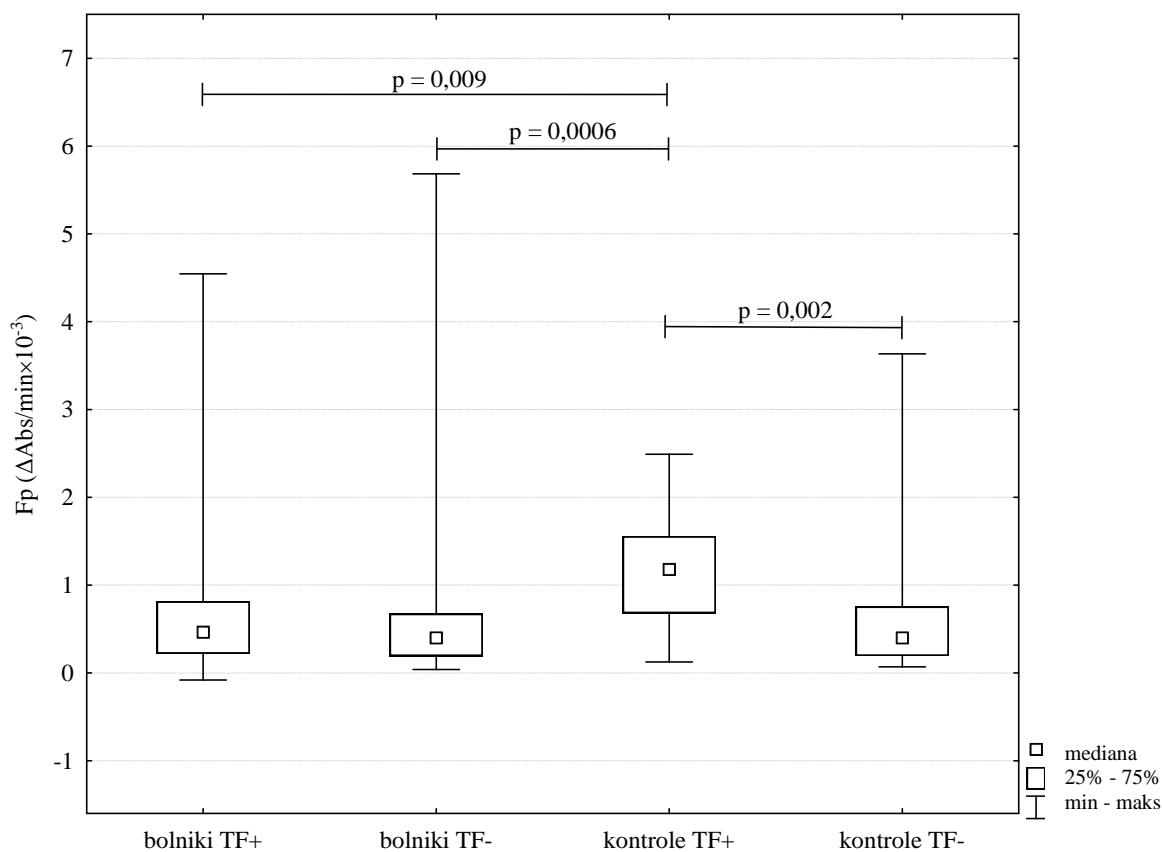
Za metodo mCHP se je pokazala statistično značilna razlika pri vseh treh spremenljivkah (preglednica 12). Spremenljivka Fp je bila statistično višja pri kontrolah s trombofilijo v primerjavi z bolniki s in brez trombofilije in tudi višja od kontrol brez trombofilije (slika 10). CHR je bil pri kontrolah s trombofilijo statistično nižji od bolnikov in kontrol brez trombofilije (slika 11).

**Preglednica 12:** Koagulacijski profil (Kp), fibrinolitični profil (Fp) in celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri preiskovancih s trombofilijo in brez nje

Vrednosti so predstavljene kot mediana in razpon med 1. in 3. kvartilom. Krepko so napisane statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ).

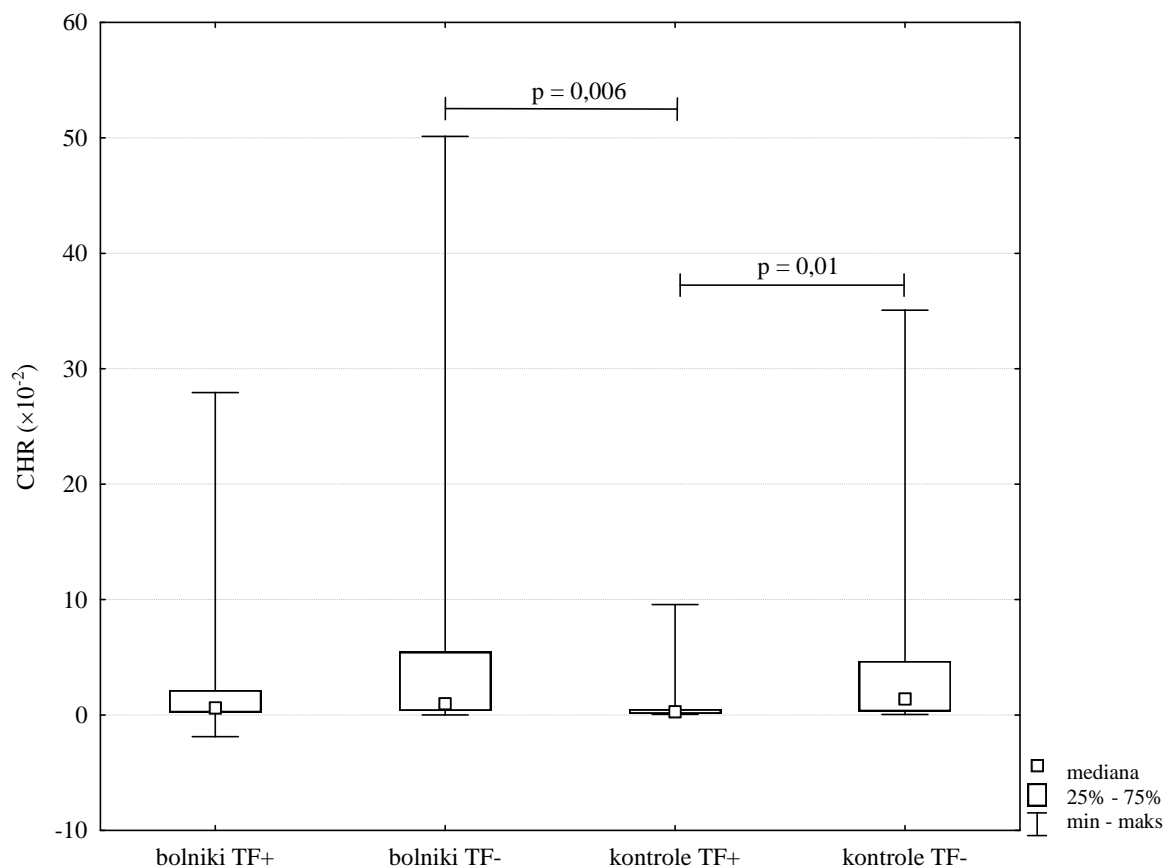
spremenljivke	bolni TF+ (N = 90)	bolni TF- (N = 88)	kontrole TF+ (N = 16)	kontrole TF- (N = 52)	p
Kp ( $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 10^{-1}$ )	0,3 (0,2 – 0,6)	0,4 (0,2 – 1,0)	0,3 (0,1 – 1,2)	0,5 (0,1 – 1,9)	= <b>0,04</b>
Fp ( $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times 10^{-3}$ )	0,5 (0,2 – 0,8)	0,4 (0,2 – 0,7)	1,1 (0,1 – 2,5)	0,4 (0,1 – 1,6)	= <b>0,001</b>
CHR ( $\times 10^{-2}$ )	0,6 (0,2 – 2,2)	1,0 (0,4 – 5,5)	0,3 (0,1 – 9,6)	1,3 (0,1 – 14,2)	= <b>0,0025</b>

Abs = absorbanca, N = število oseb, TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).



**Slika 10:** Fibrinolitični profil (Fp) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje

TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).



**Slika 11:** Celokupno hemostatsko razmerje (CHR) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje  
 TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Kruskal-Wallis ANOVA rangov).

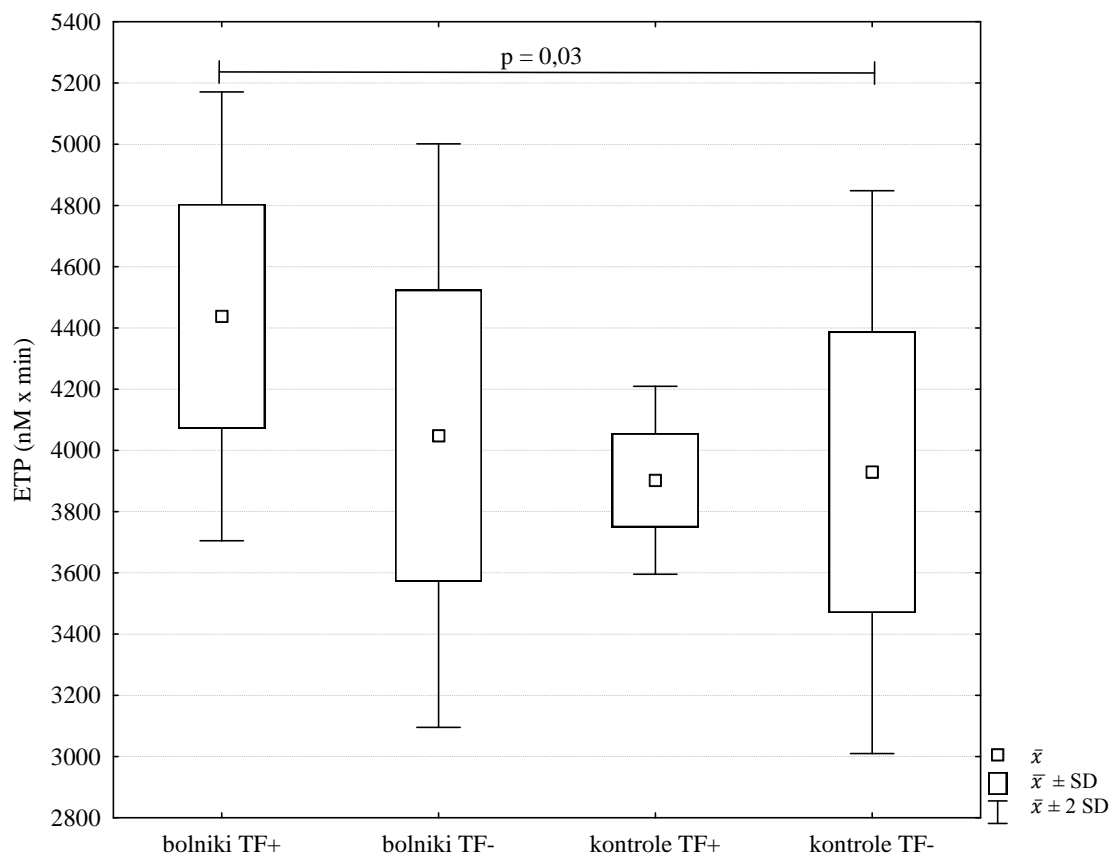
Pri metodi STT se je pojavila statistična razlika samo pri ETP (preglednica 13). Ta je bil pri bolnikih s trombofilijo statistično višji kot pri kontrolah brez trombofilije (slika 12).

**Preglednica 13:** Spremljanje tvorjenja trombina (STT) pri preiskovankah s trombofilijo in brez nje

Vrednosti so predstavljene kot aritmetične sredine ± standardizirani odklon. Krepko so napisane statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ).

spremenljivke	bolnice TF+ (N = 11)	bolnice TF- (N = 21)	kontrole TF+ (N = 2)	kontrole TF- (N = 24)	P
faza mirovanja (min)	8,6 ± 2,7	8,5 ± 2,6	5,0 ± 0,7	10,0 ± 4,6	= 0,2
trombinski vrh (nM)	423 ± 111	409 ± 114	345 ± 16,2	354 ± 112	= 0,3
čas do trombinskega vrha (min)	12,6 ± 2,8	12,1 ± 3,0	8,3 ± 1,1	14,5 ± 6,1	= 0,1
ETP (nM × min)	4442 ± 363	4048 ± 476	3903 ± 153	3929 ± 460	= <b>0,02</b>
% mikrodelcev	40,5 ± 10,2	42,3 ± 11,4	37,5 ± 9,2	43,2 ± 10,6	= 0,8

ETP = endogeni trombinski potencial, TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, N = število oseb, p = statistična značilnost (one-way ANOVA).



**Slika 12:** Endogeni trombinski potencial (ETP) pri bolnikih in kontrolah s trombofilijo in brez nje  
TF- = brez trombofilije, TF+ = s trombofilijo, p = statistična značilnost (Scheffejev post-hoc test),  $\bar{x}$  = aritmetična sredina, SD = standardizirani odklon.



## 4 RAZPRAVA

V prvem delu raziskave smo določili referenčno območje za globalne koagulacijske preiskave. Za CHP so bile naše referenčne vrednosti primerljive z vrednostmi, ki so jih dobili v svoji raziskavi He in sod. (2001). Enako velja za referenčne vrednosti pri mCHP (He in sod., 2007). Referenčne vrednosti za STT smo težko primerjali z vrednostmi, ki so jih dobili drugi avtorji, ker preiskava ni standardizirana, zato različni avtorji uporabljajo različne koncentracije fosfolipidov in tkivnega faktorja, različne vzorce (plazma bogata s trombociti, plazma revna s trombociti in plazma brez trombocitov) (Chantarangkul in sod., 2003) in različne matematične izračune dejanskih meritev ali teoretične modele (Dargaud in sod., 2007). Naše referenčne vrednosti so se ujemale z matematičnim modelom (Brummel-Ziedins in sod., 2005).

Preverili smo, če se rezultati globalnih koagulacijskih preiskav povezujejo s starostjo ali spolom. Pri metodi CHP je spremenljivka CKP pozitivno korelirala s starostjo, spremenljivki CHP in CFP pa negativno. Naš rezultat naraščanja hiperkoagulabilnosti in upadanje fibrinolitične aktivnosti s starostjo se ujema z epidemiološkimi podatki o naraščanju pogostosti VTE s starostjo (Rosendaal, 1999). Avtorica metode v svoji raziskavi ni našla povezave s starostjo, vendar je verjetno razlog v drugačni obdelavi statističnih podatkov, saj starosti niso upoštevali kot zvezno spremenljivko, pač pa so preiskovance glede na starost razdelili le na dve skupini (He in sod, 2001). Pri mCHP je Fp koreliral s starostjo negativno, CHR pa pozitivno, kar ponovno podpira epidemiološke podatke (Rosendaal, 1999). Podatkov o tem, kako spremenljivke za metodo mCHP korelirajo s starostjo, v literaturi nismo našli. Povezava med STT in starostjo je v literaturi opisana (Haidl in sod., 2006; Kremers in sod., 2013). V naši raziskavi te povezave nismo potrdili, verjetno zaradi majhnega števila preiskovancev (STT smo lahko izmerili le v podskupini ne pa pri vseh preiskovancih) in majhnega starostnega razpona (22 - 47 let). Pri nobeni od metod nismo našli razlik med spoloma, podobno kot so za metodo CHP ugotovili He in sod. (2001).

Za metodo CHP so bile ponovljivosti znotraj serije in med serijami dobre, saj smo za večino spremenljivk dobili vrednosti pod 15 %. Naši rezultati so bili primerljivi z že objavljenimi (Antovic in sod., 2005), nekoliko slabša je bila samo ponovljivost

spremenljivk CHP in CFP med serijami, vendar je verjetno razlog za slabšo ponovljivost to, da smo analizo opravljali v daljšem časovnem obdobju (3 leta). Za metodo mCHP je bila ponovljivost tako znotraj serije, še posebej pa med serijami zelo slaba in neprimerljiva z opisano (He in sod., 2007). Vzroka za tako slabo ponovljivost nismo mogli ugotoviti. Razen podatkov avtorjev metode (He in sod., 2007) drugih podatkov v literaturi nismo našli. Morda je ravno slaba ponovljivost razlog, da metoda ni v širši uporabi. Ponovljivost za STT je bila enaka ali boljša kot pri drugih avtorjih (Hemker in sod., 2003; Van Veen in sod., 2008). Dobro ponovljivost smo pripisali dejstvu, da je v naši raziskavi analize izvajala ena oseba z eno serijo predpripravljenih reagentov.

Bolniki z VTE so imeli statistično značilno višji CKP ( $p < 0,001$ ) in nižji CFP ( $p < 0,0001$ ) kot kontrole. Razlika v CHP ni dosegla statistične značilnosti ( $p = 0,09$ ), morda zaradi premajhne kontrolne skupine. Podobno so ugotovili že drugi pri bolnikih z arterijsko trombozo (Anžej in sod., 2007; Curnow in sod., 2007) ali VTE (Anžej s sod., 2013; Curnow in sod., 2007). V naši raziskavi so že vrednosti znotraj referenčnega območja povezovale z večjim tveganjem za VTE. Tako je CKP višji od 22,1 Abs-vsota povečal tveganje za VTE približno dvakrat, pri vrednostih nad 26,1 Abs-vsota pa kar za devetkrat. CFP nižji od 34 % je pomenil 4,5 - krat večje tveganje za VTE. Podobne rezultate je opisala Anžej s sod. (2013) pri skupini bolnic, ki so VTE utrpeli ob jemanju oralnih kontraceptivov.

mCHP se med bolniki z VTE in kontrolami ni razlikoval. Razlik morda nismo ugotovili zaradi nesprejemljivo slabe ponovljivosti metode. Podatkov v literaturi na to temo nismo našli.

Za STT so se pokazale statistično značilne razlike med bolniki z VTE in kontrolami v trombinskem vrhu in ETP. Tudi Anžej in sod. (2013) so opisali statistično značilno višji ETP pri bolnicah z VTE, ne pa tudi statistično značilne razlike v trombinskem vrhu. Morda je naša ugotovitev slučajna zaradi majhnega števila preiskovank ( $n = 58$ ). V naši raziskavi so imeli preiskovanci s trombinskim vrhom nad 366 nM 2,7-krat večje tveganje za VTE, vendar ta rezultat ni dosegel statistične značilnosti, za kar je lahko bil razlog premajhno število preiskovank (95 - odstotni interval zaupanja 0,9 – 7,7). So pa v eni izmed raziskav, kjer so zajeli več kot 900 bolnikov in bolnic po preboleli VTE dokazali, da je pri

trombinskem vrhu med 300 in 400 nM relativno tveganje za ponovitev VTE 0,42, pod 300 nM pa 0,37 (Hron in sod., 2006). V naši raziskavi so vrednosti ETP nad 4083 pomenile 3,6 - krat večje tveganje za VTE. Višje vrednosti ETP so že bile opisane kot dejavnik tveganja tako za prvo VTE (Hylckama Vlieg in sod., 2007), kot za njeno ponovitev (Tripodi in sod., 2007).

Zanimalo nas je, kako posamezni trombofilni dejavniki vplivajo na globalne koagulacijske preiskave. Pogostost trombofilije pri naših preiskovancih je bila primerljiva s podatki iz literature (Mavri in sod., 2013). V vseh primerih neodzivnosti na aktivirani protein C je bila le-ta povzročena s faktorjem V Leiden, zato v nadaljevanju omenjamo le neodzivnost na aktivirani protein C. Pomanjkanje proteina C, proteina S ali antitrombina ni vplivalo na nobeno preiskavo, verjetno zaradi zelo majhnega števila preiskovancev s temi trombofilnimi dejavniki. STT (ETP) je zanesljivo prepoznal pomanjkanje antitrombina v raziskavi z večjim številom bolnikov s to trombofilno motnjo, medtem ko pomanjkanja proteina C in S podobno kot v naši raziskavi ni prepoznal (Andresen in sod., 2004). Vendar so že prej opisali, da ob dodatku trombomodulina postane metoda dobro občuljiva tudi za pomanjkanje teh dveh trombofilnih dejavnikov (Hemker in sod., 2002). Morda bi tudi modifikacija metod CHP in mCHP z dodatkom trombomodulina pripomogla k boljši občutljivosti. Ostale trombofilne dejavnike, ki so se pojavljali pogosteje, smo z globalnimi koagulacijskimi preiskavami zaznali, in sicer je neodzivnost na aktivirani protein C statistično značilno zviševala CKP, CHR in ETP ter zniževala CFP in Fp; polimorfizem v faktorju II je zvišal CKP in ETP ter znižal CFP; lupusni antikoagulantni so zvišali CKP in CHP ter znižali CFP, Kp, Fp in CHR; povišana koncentracija D-dimera pa je bila povezana z višjim CKP in nižjim CFP. Hiperkoagulabilnost so z CHP opisali že pri bolnicah z VTE kot posledica nosečnosti z neodzivnostjo na aktiviran protein C in faktorjem V Leiden (Antovic in sod., 2003) in pri bolnikih z VTE, ki so imeli prisotnost lupusnih antikoagulantov (Curnow in sod., 2007). Za ostale trombofilne dejavnike objav nismo našli. Tudi drugi raziskovalci so zaznali z metodo STT povišan ETP pri polimorfizmu v faktorju II in pri neodzivnosti na aktiviran protein C (Hézar in sod., 2006).

Da bi ugotovili vpliv trombofilnih dejavnikov na hemostatsko ravnovesje kot ga lahko merimo z globalnimi koagulacijskimi preiskavami, smo preiskovance razdelili v štiri

skupine (glej stran 32). Pri metodi CHP je prisotnost VTE bolj kot prisotnost trombofilije zviševala CKP in zniževala CFP, saj nismo našli razlike med bolniki s trombofilijo in brez nje niti med kontrolami s trombofilijo in brez nje. Da CHP ne loči med bolniki z VTE s trombofilijo ali brez nje je opisala že Anžej s sod. (2013), da ni razlik med zdravimi preiskovanci s trombofilijo in brez nje pa Andresen in sod. (2002). Zaključimo lahko, da je metoda premalo občutljiva za prisotnost znanih trombofilnih dejavnikov oz. zaznava druge vzroke hiperkoagulabilnosti in hipofibrinolitičnosti.

Razlike med skupinami preiskovancev, ki smo jih zaznali z metodo mCHP, so nepričakovane in nelogične. Glede na veliko sipanje rezultatov zaradi zelo slabe ponovljivosti metode so dobljene razlike lahko naključne. To še posebej velja za maloštevilno kontrolno skupino. Dobljenih rezultatov ne moremo primerjati z rezultati drugih avtorjev, ker jih v literaturi ni.

Pri STT smo izmerili značilno večji ETP pri bolnicah s trombofilijo v primerjavi s kontrolami brez nje. Ker pa STT nismo izmerili pri vseh preiskovancih, ampak le na manjšem številu, ne moremo trditi, da razlike med bolnicami oz. kontrolami s trombofilijo in brez nje ni (slika 11).

## 5 SKLEPI

Z metodo CHP lahko prepoznamo stanje pospešenega strjevanja krvi oziroma hiperkoagulabilnost pri bolnikih z VTE, saj so bile vrednosti CKP statistično višje, CFP pa statistično nižje pri bolnikih kot pri kontrolah.

Metoda mCHP se je izkazala za zelo slabo ponovljivo in neuporabno za prepoznavanje hiperkoagulabilnosti.

Z metodo STT (ETP) smo zanesljivo ugotovili hiperkoagulabilno stanje pri bolnikih po preboleli VTE.

CHP in STT sta bili premalo občutljivi, da bi zanesljivo prepoznali vse znane oblike trombofilije, zato vseh preiskav trombofilije ne moreta nadomestiti. Očitno pa metodi prepoznavata še druge vzroke hiperkoagulabilnosti, ki jih s preiskavami trombofilije ne zaznamo. Te vzroke hiperkoagulabilnosti bi bilo potrebno razjasniti z nadaljnjimi preiskavami.

## 6 POVZETEK

Hemostaza zajema vse procese in reakcije, ki prispevajo k učinkovitemu ustavljanju krvi po poškodbi žile. Motnje hemostaze privedejo do krvavitev, kar imenujemo hipokoagulabilnost ali do nastanka strdkov v žilah oziroma hiperkoagulabilnosti (Stegnar, 2005). Motnje hemostaze, ki vodijo do nastanka strdkov (tromboze) so 25 – 50 krat pogostejše (Kocijančič in sod., 2005) in so mnogovrstne. Lahko so prirojene ali pridobljene zaradi načina življenja oziroma različnih bolezenskih stanj (Stegnar, 2005). Venska tromboza je bolezen, pri kateri nastanek strdka v veni povzroči popolno ali delno zaporo žile in se najpogosteje razvije kot venska tromboza noge ali pljučna embolija (venski tromboembolizem, VTE) (Kocijančič in sod., 2005). Najpogosteje se pojavlja pri ljudeh, ki imajo eno od oblik trombofilije, ki povečujejo nagnjenje k hiperkoagulabilnosti. Med trombofilije prištevamo pomanjkanje antitrombina, proteina C in proteina S, neodzivnost na aktivirani protein C, polimorfizem v faktorju V Leiden, polimorfizem v genu za protrombin G20210A, prisotnost lupusnih antikoagulantov in povišano koncentracijo D-dimera.

Težko je prepoznati bolnike s hiperkoagulabilnim stanjem in oceniti verjetnost za nastanek VTE z merjenjem posameznega trombofilnega dejavnika ali določanjem genskih nepravilnosti, zato so razvili številne globalne metode s katerimi poskušamo zajeti aktivacijo trombocitov, koagulacijo in fibrinolizo. V tej diplomski nalogi smo uporabili metodo celokupnega hemostatskega potenciala (CHP), metodo modificiranega celokupnega hemostatskega potenciala (mCHP) in spremljanje tvorjenja trombina (STT), s katerimi smo želeli prepoznati stanja pospešenega strjevanja krvi pri bolnikih, ki so preboleli VTE, ter primerjati vse metode med seboj in ugotoviti katera zanesljiveje zaznava hiperkoagulabilnost krvi.

V raziskavo smo vključili 178 zaporednih bolnic in bolnikov, ki so se zdravili na Kliničnem oddelku za žilne bolezni (Univerzitetni klinični center Ljubljana) zaradi VTE in so bili najmanj mesec dni po zaključku antikoagulacijskega zdravljenja napoteni na preiskave trombofilije in kontrolno skupino, ki jo je sestavljalo 68 navidezno zdravih žensk in moških, ki so pristali na sodelovanje v raziskavi. Pri vseh preiskovancih smo vzeli kri in pripravili plazmo po standardnih postopkih. Uporabili smo jo za preiskave trombofilije,

meritve CHP, mCHP in STT. Dobljene rezultate smo primerjali med bolniki in kontrolami in na dodatnih podskupinah: bolniki s trombofilijo/bolniki brez trombofilije/kontrola s trombofilijo/kontrola brez trombofilije. Izračunali smo še tveganje za VTE, ponovljivost za globalne koagulacijske preiskave znotraj serije in med serijami, referenčne vrednosti in kako posamezen trombofilni dejavnik vpliva na spremenljivke vseh treh metod.

Pri metodi CHP je bil CKP statistično višji, CFP pa nižji pri bolnikih v primerjavi s kontrolami, za CHP statistične razlike ni bilo. Pri mCHP za nobeno spremenljivko ni bilo statistično značilne razlike med bolniki z VTE in kontrolami. Pri metodi STT so imele bolnice z VTE v primerjavi s kontrolami statistično značilno večji trombinski vrh in ETP. Vsi trombofilni dejavniki, razen pomanjkanje proteina C, S in antitrombina vpliva vsaj na eno spremenljivko. Pri primerjavi vseh štirih skupin smo opazili naslednje: spremenljivka CKP je bila statistično višja pri bolnikih s trombofilijo kot pri kontrolah brez trombofilije, medtem ko je bila spremenljivka CFP statistično višja pri kontrolah s in brez trombofilije v primerjavi z bolniki s in brez trombofilije. Spremenljivka Fp je bila statistično višja pri kontrolah s trombofilijo v primerjavi z bolniki s in brez trombofilije in tudi višja od kontrol brez trombofilije, CHR je bil pri kontrolah s trombofilijo statistično nižji ob bolnikov in kontrol brez trombofilije. Pri STT se je pojavila statistična razlika samo pri ETP, ki je bil pri bolnikih s trombofilijo statistično višji kot pri kontrolah brez trombofilije.

Z metodo CHP lahko prepoznamo stanje pospešenega strjevanja krvi oziroma hiperkoagulabilnost pri bolnikih z VTE, medtem ko se je metoda mCHP izkazala za zelo slabo ponovljivo in neuporabno za prepoznavanje hiperkoagulabilnosti. Z metodo STT, predvsem z ETP, smo ugotovili hiperkoagulabilno stanje pri bolnikih z VTE. Nobena od metod ni razlikovala preiskovancev z znanimi trombofilnimi dejavniki in brez njih, vendar ne moremo trditi, da so metode premalo občutljive, saj lahko prepoznavajo še druge vzroke hiperkoagulabilnosti.

## 7 VIRI

- Andresen M.S., Iversen N., Abildgaard U. 2002. Overall haemostasis potential assays performed in thrombophilic plasma: the effect of preactivating protein C and antithrombin. *Thrombosis Research*, 108: 323-328
- Andresen M.S., Abildgaard U., Liestøl S., Sandset P.M., Mowinckel M.C., Ødegaard O.R., Larsen M.L., Diep L.M. 2004. The ability of three global plasma assays to recognize thrombophilia. *Thrombosis Research*, 113,6: 411-417
- Antovic A., Blombäck M., Bremme K., Van Rooijen M., He S. 2003. Increased hemostasis potential persists in women with previous thromboembolism with or without APC resistance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1: 2531-2535
- Antovic A., Blombäck M., Sten-Linder M., Petrini P., Holmström M., He S. 2005. Identifying hypocoagulable states with a modified global assay of overall haemostasis potential in plasma. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 16, 8: 585-596
- Anžej S., Božič M., Antovič A., Peternel P., Gašperšič N., Rot U., Tratar G., Stegnar M. 2007. Evidence of hypercoagulability and inflammation in young patients long after acute cerebral ischaemia. *Thrombosis Research*, 120: 39-46
- Anžej Doma S., Vučnik M., Božič Mijovski M., Peternel P., Stegnar M. 2013. Enhanced thrombin generation in women with a history of oral contraception-related venous thrombosis. *Thrombosis Research*, 132: 621-626
- Austin S.K. 2013. Haemostasis. *Medicine*, 41, 4: 208-211
- Bedenčič M., Božič M., Peternel P., Stegnar M. 2008. Major and potential prothrombotic genotypes in patients with venous thrombosis and in healthy subjects from Slovenia. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 36: 58-63
- Brummel-Ziedins K., Vossen C.Y., Rosendaal F.R., Umezaki K., Mann K.G. 2005. The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 1472-1481



- Bucciarelli P., Martinelli I., Artoni A., Passamonti S.M., Previtali E., Merati G., Tripodi A., Mannucci P.M. 2011. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thrombosis Research*, 129: 591-597
- Chantarangkul V., Clerici M., Bressi C., Giesen P.L.A., Tripodi A. 2003. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*, 88: 547-554
- Curnow J.L., Morel-Kopp M.C., Roddie C., Aboud M., Ward C.M. 2007. Reduced fibrinolysis and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 528-534
- Dargaud Y., Luddington R., Gray E., Negrier C., Lecompte T., Petros S., Hogwood J., Bordet J.C., Regnault V., Siegemund A., Baglin T. 2007. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *British Journal of Haematology*, 139: 303–309.
- Eyre L., Gamlin F. 2010. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 11, 6: 244-246
- Favaloro E.J., McDonald D., Lippi G. 2009. Laboratory investigation of thrombophilia: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 35, 7: 695-710
- Green D. 2003. Thrombophilia and stroke. *Topics in Stroke Rehabilitation*, 10, 3: 21-33
- Haidl H., Cimenti C., Leschnik B., Zach D., Muntean W. 2006. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 95, 5: 772-775
- Hézard N., Bouaziz-Borgi L., Remy M.G., Nguyen P. 2006. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clinical Chemistry*, 52, 4: 665-670

- He S., Bremme K., Blombäck M. 1999. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thrombosis Research*, 96: 145-156
- He S., Antovic A., Blombäck M. 2001. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thrombosis Research*, 103: 355-361
- He S., Zhu K., Skeppholm M., Vedin J., Svensson J., Egberg N., Blombäck M., Wallen H. 2007. A global assay of haemostasis which uses recombinant tissue factor and tissue-type plasminogen activator to measure the rate of fibrin formation and fibrin degradation in plasma. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 98: 871-882
- Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., De Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Béguin S. 2002. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 32: 249-263
- Hemker H.C., Giesen P., Al Dieri R., Regnault V., De Smedt E., Wagenvoord R., Lecompte T., Béguin S. 2003. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33: 4-15
- Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E., Béguin S. 2006. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 96: 553-561
- Hron G., Kollars M., Binder B.R., Eichinger S., Kyrle P.A. 2006. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*, 296, 4: 397-402
- Kluft C., Meijer P. 2010. External quality assessment for thrombin generation tests: an exploration. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36: 791-796

- Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D. 2005. Interna medicina. 3. izdaja. Ljubljana, Littera picta: 1171-1314 str.
- Kremers R., Bloemen S., Al Dieri R., Hemker H.C., Karlaftis V., Attard C., De Laat B., Monagle P., Ignjatovic V. 2013. Alpha-2-macroglobulin is a major determinant of a lower thrombin generation in infants and children compared to adults. *Blood*, 122, 21: 2344
- Kyrle P.A., Rosendaal F.R., Eichinger S. 2010. Risk assessment for recurrent venous thrombosis. *Lancet*, 376: 2032-2039
- Levine J.S., Branch D.W., Rauch J. 2002. The antiphospholipid syndrome. *New England Journal of Medicine*, 346: 752-763
- Lijfering W.M., Rosendaal F.R., Cannegieter S.C. 2010. Risk factors for venous thrombosis – current understanding from an epidemiological point of view. *British Journal of Haematology*, 149: 824-833
- Mavri A., Vižintin Cuderman T., Štalc M., Božič M., Tratar G., Gubenšek M., Boc A., Miklič M., Vene N. 2013. Clinical guidelines for thrombophilia testing in patients with venous thromboembolism. *Zdravniški Vestnik*, 82: 65-79
- Moll S. 2006. Thrombophilias – practical implications and testing caveats. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 21, 1: 7-15
- Rosendaal F.R. 1999. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, 353: 1167-1173
- Rosendaal F.R., Reitsma P.H. 2009. Genetics of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 1: 301-304
- Salomon O., Steinberg D.M., Zivelin A., Gitel S., Dardik R., Rosenberg N., Berliner S., Inbal A., Many A., Lubetsky A., Varon D., Martinowitz U., Seligsohn U. 1999. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 511-518

- Stegnar M. 2005. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center
- Tripodi A., Martinelli I., Chantarangkul V., Battaglioli T., Clerici M., Mannucci P.M. 2007. The endogenous thrombin potential and risk of venous thromboembolism. *Thrombosis Research*, 121, 3:353-359
- Van Hylckama Vlieg A., Christiansen S.C., Luddington R., Cannegieter S.C, Rosendaal F.R., Baglin T.P. 2007. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *British Journal of Haematology*, 138, 6: 769-774
- Van Veen J.J., Gatt A., Makris M. 2008. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology*, 142, 6: 889 - 903

## **ZAHVALA**

Najlepše bi se zahvalila somentorici dr. Mojci Božič Mijovski, spec. med. biokem. za potrpljenje, prijazno pomoč, strokovne nasvete in temeljit pregled diplomskega dela.

Zahvala za temeljit pregled in nasvete gre tudi mentorju prof. dr. Marku Kreftu.

Hvala tudi vsemu osebju Kliničnega oddelka za žilne bolezni, ki so mi nudili pomoč in posredovali rezultate trombofilije.

Hvala vsem prostovoljcem, ki so se odločili za sodelovanje v raziskavi.

Zahvala gre tudi mojim staršem in partnerju za vso podporo in potrpljenje.

