



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
МОЛЕКУЛСКА МЕДИЦИНА

УЛОГА НАСЛЕДНИХ ЧИНИЛАЦА У НАСТАНКУ ТРОМБОЗЕ ДУБОКИХ ВЕНА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори: Проф. др Горана Митић
Проф. др Игор Веселиновић Кандидат: Ива Барјактаровић

Нови Сад, 2015. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: RBR	
Идентификациони број: IBR	
Тип документације: TD	Монографска документација
Тип записа: TZ	Текстуални штампани материјал
Врста рада (дипл., маг., докт.): VR	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: AU	Ива Барјактаровић
Ментор (титула, име, презиме, звање): MN	Проф. др Горана Митић, ванредни професор патолошке физиологије Проф. Др Игор Веселиновић, ванредни професор судске медицине
Наслов рада: NR	Улога наследних чинилаца у настанку тромбозе дубоких вена
Језик публикације: JP	Српски
Језик извода: JI	срп. / енг.
Земља публикавања: ZP	Србија
Уже географско подручје: UGP	АП Војводина
Година: GO	2015.
Издавач: IZ	Ауторски репринт
Место и адреса: MA	Медицински факултет, Хајдук Вељкова 1-3, Нови Сад

Физички опис рада: FO	(број поглавља 8 / страница 130 / слика 16/ графикона 28/ референци 246/ прилога 1)
Научна област: NO	Медицина
Научна дисциплина: ND	Хумана генетика
Предметна одредница, кључне речи: PO	Тромбофилија; Недостатак протеина С; Венска тромбоза; Мутација; Ланчана реакција полимеразе у реалном времену; Фактори ризика
UDK	616.14-005.6-056.7 575.113
Чува се: ЃU	Библиотека Медицинског факултета, Хајдук Вељкова 1-3, Нови Сад
Важна напомена: VN	
Извод: IZ	<p>Увод: Бројне генске мутације су у основи наследних склоности ка повећаном згрушавању крви (наследних тромбофилија). Најчешће испитиване наследне тромбофилије су: недостатак антитромбина, недостатак протеина Ц, недостатак протеина С, мутација проакцелерина FV Leiden и мутација протромбина FII G 20210 A. Тромбоза дубоких вена (ТДВ) често се јавља у општој популацији а код великог броја оболелих долази до поновне појаве болести. Стога је важно утврђивање значајности параметара који доприносе ризику за настанак ТДВ.</p> <p>Циљ: Утврђивање учесталости тромбофилних мутација код болесника са венским тромбоемболизмом и код здравих особа у популацији Војводине, испитивање повезаности тромбофилних мутација са локализацијом тромбозе и појавом плућне емболије, утврђивање разлике у времену појављивања ТДВ између оболелих са присуством појединачне и удружене тромбофилије, утврђивање учесталости удружене тромбофилије код оболелих и здравих особа и њен утицај на понављање тромбозног процеса у односу на појединачне тромбофилије и на основу добијених резултата утврђивање у којим случајевима је потребно извршити генетичко испитивање тромбофилије ради одређивања врсте и трајања антитромбозне терапије.</p> <p>Материјал и методе: Испитано је 175 оболелих особа са потврђеном ТДВ и 115 клинички и лабораторијски здравих особа које никад нису доживеле тромбозни инцидент и које су одабране тако да се контролна група поклапа са групом оболелих по полу. Активност антитромбина, протеина Ц и С, резистенција на активирани протеин Ц, ниво фактора VIII и ниво фибриногена одређивани су коагулационим тестовима а присуство мутација FV Leiden, FII G 20210 A, MTHFR C 677 T и MTHFR A 1298 C испитивано је методом алелске дискриминације на Real- Time PCR инструменту.</p>

Оболелима је мерен и крвни притисак и одређиван липидни статус у случајевима сумње на поремећај нивоа липида у крви. Добијени подаци су нумерички обрађивани стандардним процедурама дескриптивне статистике и статистичке анализе.

Резултати: Постојање наследне тромбофилије је утврђено код 57,14% оболелих са ТДВ и 48,21% здравих особа. Код укупно 16,57% оболелих испитаника утврђен је недостатак барем једног од природних инхибитора коагулације: код 4,0% недостатак антитромбина, код 1,71% недостатак протеина Ц, код 10,29% недостатак протеина С и код 0,57% истовремено постојање недостатка протеина Ц и протеина С. Постојање резистенције на активирани протеин Ц утврђено је код 30,38% оболелих. Постојање FV Leiden мутације утврђено је код 21,14% оболелих, код 16,0% у хетерозиготном а код 5,14% у хомозиготном облику и код 10,42% испитаника контролне групе у хетерозиготном облику док хомозиготних носилаца није било. Постојање FII G 20210 А мутације утврђено је код 7,43% оболелих, код 4,0% у хетерозиготном облику а код 3,43% у хомозиготном облику и код 8,18% испитаника контролне групе, код 6,36% у хетерозиготном облику а код 1,82% у хомозиготном облику. Постојање мутације MTHFR C 677 T је утврђено код 50,86% оболелих, код 42,86% у хетерозиготном облику а код 18,0% у хомозиготном облику и код 62,62% испитаника контролне групе, код 43,93% у хетерозиготном облику а код 18,69% у хомозиготном облику. Постојање мутације MTHFR A 1298 C утврђено је код 44,94% оболелих и 25,37% здравих испитаника са MTHFR C 677 T мутацијом. Присуство фактора VIII у повишеној концентрацији утврђено је код 17,71% оболелих а присуство повишених вредности концентрације фибриногена код 9,81% оболелих. Код укупно 84,57% оболелих испитаника утврђено је постојање барем једне тромбофилије.

Закључци: Између постојања недостатака природних инхибитора коагулације, постојања FV Leiden мутације у хомозиготном облику, као и постојања удружене наследне тромбофилије и настанка ТДВ утврђено је постојање статистички значајне повезаности. Недостатак неког од природних инхибитора повезан је са највећим ризиком за настанак ТДВ. Између постојања FII G 20210 А мутације, у хомозиготном или хетерозиготном облику, постојања FV Leiden мутације у хетерозиготном облику, као и постојања MTHFR C 677 T мутације, самостално или истовремено са MTHFR A 1298 C мутацијом и настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности. Између присуства FII G 20210 А мутације или FV Leiden мутације и MTHFR C 677 T мутације у хомозиготном облику, као и удружене наследне тромбофилије и појаве ТДВ у трудноћи или пуерперијуму утврђено је постојање статистички значајне повезаности. Између постојања наследне тромбофилије, појединачне или удружене, и клиничког испољавања венске тромбоемболијске болести код оболелих са ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности. Између постојања наследне тромбофилије, појединачне или удружене, и старости у време настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности. Између присуства MTHFR C 677 T мутације и поновљеног тромбозног процеса утврђено је постојање

статистички значајне повезаности. Између присуства FII G 20210 A мутације и FV Leiden мутације, у хомозиготном или хетерозиготном облику, удружене наследне тромбофилије и поновљеног тромбозног процеса није утврђено постојање статистички значајне повезаности. Између гојазности и повишеног крвног притиска и настанка ТДВ утврђено је постојање статистички значајне повезаности. Између хиперлипопротеинемиије и настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности. На основу добијених резултата можемо закључити да се одлука о испитивању наследне тромбофилије доноси узимајући у обзир старост, пол и присуство пролазних или трајних фактора ризика.

Датум прихватања теме од стране НН већа: DP	22. 03. 2012.
Датум одбране: DO	
Чланови комисије: (име и презиме/ титула/ звање/ назив организације / статус) КО	председник: члан: члан:

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. thesis
Author: AU	Iva Barjaktarović
Mentor: MN	Prof. dr Gorana Mitić, professor Prof. dr Igor Veselinović, professor
Title: TI	The role of hereditary factors in development of deep vein thrombosis
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Medical Faculty, Hajduk Veljkova 1-3, Novi Sad

Physical description: PD	8 chapters/ 130 pages / 16 pictures/ 28 graphs/ references 246/ appendix 1
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Human genetics
Subject, Key words SKW	Thrombophilia; Protein S Deficiency; Venous Thrombosis; Mutation; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Risk Factors
UC	616.14-005.6-056.7 575.113
Holding data: HD	Library of Medical faculty, Hajduk Veljkova 1-3 Novi Sad, Serbia
Note: N	
<p>Abstract: AB</p> <p>Introduction: Numerous mutations are involved in genetic basis of an increased tendency for blood to clot (inherited thrombophilia). Most commonly investigated are: antithrombin deficiency, protein C deficiency, protein S deficiency, proaccelerin gene mutation FV Leiden and prothrombin gene mutation FII G 20210 A. Deep vein thrombosis (DVT) is common in the general population and many patients experience a recurrence of the disease. It is, therefore, important to determine the significance of parameters contributing to the increased risk for DVT development.</p> <p>Objective: The aim of this study was to determine frequencies of thrombophilic mutations in patients with venous thromboembolism and healthy subjects in population of Vojvodina, to evaluate the association between thrombophilic mutations and thrombosis localization including pulmonary embolism, to determine the difference in age of DVT occurrence between patients with single and combined thrombophilic abnormalities, to determine frequencies of combined thrombophilic abnormalities in patients and healthy subjects and their influence on DVT recurrence compared to single thrombophilic abnormalities and on the basis of the results to determine when genetic testing is needed in order to determine the type and duration of anticoagulation therapy.</p> <p>Materials and methods: The study included 175 patients with documented DVT and sex-matched group of 115 healthy subjects without clinical or laboratory abnormalities, never having experienced DVT. Antithrombin, protein C and protein S activity; activated protein C resistance, factor VIII and fibrinogen levels are determined using coagulation tests, while for FV Leiden, FII G 20210 A, MTHFR C 677 T and MTHFR A 1298C mutation detection allelic discrimination assays on Real- Time PCR instrument are performed. Blood pressure is measured on all patients and in case of suspected plasma lipid levels elevation lipid profile is determined.</p>	

The data obtained were subject to descriptive statistic and statistical analysis.

Results: The total incidence of inherited thrombophilia was 57,14% in patients and 48,21% in healthy subjects. Total frequency of natural coagulation inhibitor deficiencies in patients was 16,57%: antithrombin deficiency 4,0%, protein C deficiency 1,71%, protein S deficiency 10,29% and combined proein C and protein S deficiency 0,57%. The incidence of activated protein C resistance in patients was 30,38%. The incidence of FV Leiden mutation was 21,14% in patients, 16,0% were heterozygous and 5,14% were homozygous, and 10,42% in healthy subjects, all of which were heterozygous. The incidence of FII G 20210 A mutation was 7,43% in patients, 4,0% were heterozygous and 3,43% were homozygous, and 8,18% in healthy subjects, 6,36% were heterozygous and 1,82% were homozygous. The incidence of MTHFR C 677 T mutation was 50,86% in patients, 42,86% were heterozygous and 18,0% were homozygous, and 62,62% in healthy subjects, 43,93% were heterozygous and 18,69% were homozygous. The incidence of MTHFR A 1298 C mutation was 44,94% in patients with MTHFR C 677 T mutation and 25,37% in healthy subjects MTHFR C 677 T mutation. At least one thrombophilic abnormalitiy was present in 84,57% patients.

Conclusions: The association between natural coagulation inhibitor deficiencies, FV Leiden mutation in homozygous form and combined thrombophilia and DVT development was statistically significant. Natural coagulation inhibitor deficiencies were associated with greatest risk of DVT development. The association between FII G 20210 A mutation, in homozygous or heterozygous form, FV Leiden mutation in heterozygous form, MTHFR C 677 T mutation alone or combined with MTHFR A 1298 C mutation and DVT development was not statistically significant. The association between FII G 20210 A mutation, FV Leiden mutation and MTHFR C 677 T mutation in homozygous form and DVT development during pregnenancy and puerperium was statistically significant. The association between single or combined inherited thrombophilia and thrombosis localization including pulmonary embolism was not statistically significant. The association between single or combined inherited thrombophilia and the age of DVT occurrence was not statistically significant. The association between MTHFR C 677 T mutation and DVT recurrence was statistically significant. The association between FII G 20210 A mutation and FV Leiden mutation, in homozygous or heterozygous form, combined thrombophilia and DVT recurrence was not statistically significant. The association between obesity and high blood pressure and DVT development was statistically significant. The association between hyperlipoproteinemia and DVT development was not statistically significant. Based on the results we can conclude that decision to perform inherited thrombophilia testing should be based upon age, gender and the presence of transient or permanent risk factors.

Accepted on Scientific Board on: AS	22. 03. 2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

Велику захвалност дугујем својим менторима, проф. др Горани Митић која ми је пружила велику помоћ у сваком сегменту израде овог рада, делећи са мном своје идеје, искуство и знање и проф. др Игору Веселиновићу, који је бројним практичним сугестијама умногоме допринео овом истраживању и мом професионалном развоју уопште.

Захваљуем се и свим запосленима у Центру за судску медицину, токсикологију и молекуларну генетику и у Одељењу за хемостазу, тромбозу и хематолошку дијагностику Центра за лабораторијску медицину, посебно лабораторијском техничару Бранки Смиљанић, дипломираном хемичару Ђурђини Јуришић, службеници Мири Тривунић и др Биљани Вучковић на свој помоћи коју су ми пружили током прикупљања података.

Проф. др Милошу Тасићу, *проф. др Драгану Драшковићу и проф. др*

Браниславу Будакову дугујем посебну захвалност јер су ми омогућили да применим и надоградим стечена знања из области молекуларне дијагностике.

Радоману, Михаилу, Милицу, Радомиру, Лани, Бојани и Вуку од срца се захваљујем на свом стрпљењу и подршци коју су ми свакодневно пружали.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	3
1.1. Физиологија хемостазног система.....	3
1.2. Тромбофилија.....	7
1.3. Венска циркулација доњих и горњих удова	21
1.3.1. Поремећаји венске циркулације доњих и горњих удова....	27
1.3.2. Фактори ризика за настанак ТДВ	28
1.4. Дијагностика и терапија ТДВ.....	32
1.5. Наследна тромбофилија и појава поновљених ТДВ (рецидива).....	35
2. РАДНА ХИПОТЕЗА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	37
2.1. Претпоставке на којима се заснива истраживање.....	37
2.2. Циљеви истраживања.....	37
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊА.....	39
3.1. Лабораторијска дијагностика резистенције на активисани протеин Ц	40
3.2. Лабораторијска дијагностика антифосфолипидног синдрома	40
3.2.1. Утврђивање присуства лупусног антикоагуланса	40
3.2.2. Одређивање нивоа антикардиолипинских антитела и антиβ2 гликопротеин I антитела.....	40
3.3. Одређивање нивоа фактора VIII.....	41
3.4. Одређивање нивоа Ц- реактивног протеина (CRP).....	41
3.5. Одређивање нивоа фибриногена.....	41
3.6. Одређивање нивоа фактора II.....	41
3.7. Одређивање aPTT, PT и TT.....	42
3.8. Одређивање активности антитромбина (АТ).....	43
3.9. Одређивање активности протеина Ц.....	43
3.10. Одређивање активности протеина С.....	43
3.11. Одређивање броја тромбоцита.....	45
3.12. Одређивање нивоа хомоцистеина.....	45
3.13. Детекција мутација FII G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FV G1691A - анализа ДНК.....	45
3.14. Обрада података.....	53
4. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА	54
4.1. Наследна тромбофилија, појава тромбозе у породици и стања удружених са тромбозом у групи оболелих испитаника	58
4.2. Тромбоза дубоких вена у трудноћи и пуерперијуму.....	59
4.3. Недостатак антитромбина, протеина Ц и протеина С.....	60
4.4. Резистенција на активисани протеин Ц	62
4.5. Мутација гена за проакцелерин FV Leiden.....	63
4.6. Мутација гена за протромбин G 20210 A.....	68
4.7. Збирна учесталост мутација FII G 20210 A и FV Leiden.....	71
4.8. Мутација гена за метилентетрахидрофолат редуктазу C 677 T.....	74

4.9. ПОВИШЕН НИВО ФАКТОРА VIII	79
4.10. ПОВИШЕН НИВО ФИБРИНОГЕНА.....	81
4.11. Збирна учесталост свих испитиваних тромбофилија.....	83
4.12. Удружена наследна тромбофилија.....	84
4.13. Старост и настанак ТДВ.....	87
4.14. Наследна тромбофилија и локализација тромбозног процеса.....	96
4.15. Наследна тромбофилија и настанак рецидива тромбоза.....	97
5. ДИСКУСИЈА.....	100
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	121
7. ЛИТЕРАТУРА.....	123

1. Увод

Тромбоза дубоких вена (ТДВ) је често обољење у општој популацији. Може настати у било којем крвном суду венског система али најчешће се јавља у дубоким венама ногу. Могућа компликација ТДВ је плућна емболија која, уколико узрокује зачепљење код више од половине плућних артеријских крвних судова, може довести до смрти. Настанак ТДВ се често може повезати са стањима као што су велике операције и повреде, дуготрајно мировање, трудноћа, примена хормонске терапије која садржи естроген, а неретко је без познатог узрока.

Мутације у многим генима су у основи наследних склоности ка повећаном згрушавању крви (наследних тромбофилија). Осим појединачних, могуће је и присуство две или више различитих мутација код једног болесника а такође је и могуће истовремено постојање наследне и стечене тромбофилије. Код особа са удруженом тромбофилијом ризик за настанак тромбоза је вишеструко већи од простог сабирања ризика сваке појединачне тромбофилије.

Код великог броја оболелих долази до поновног настанка ТДВ, што се може спречити уколико се приступи детаљном испитивању постојања тромбофилије, појаве ТДВ у породичној историји и додатних фактора ризика. Овај рад има за циљ утврђивање значајности параметара који доприносе ризику за настанак ТДВ, што је од велике важности приликом доношења одлуке о врсти и дужини примене превентивне антиромбозне терапије.

1. 1. Физиологија хемостазног система

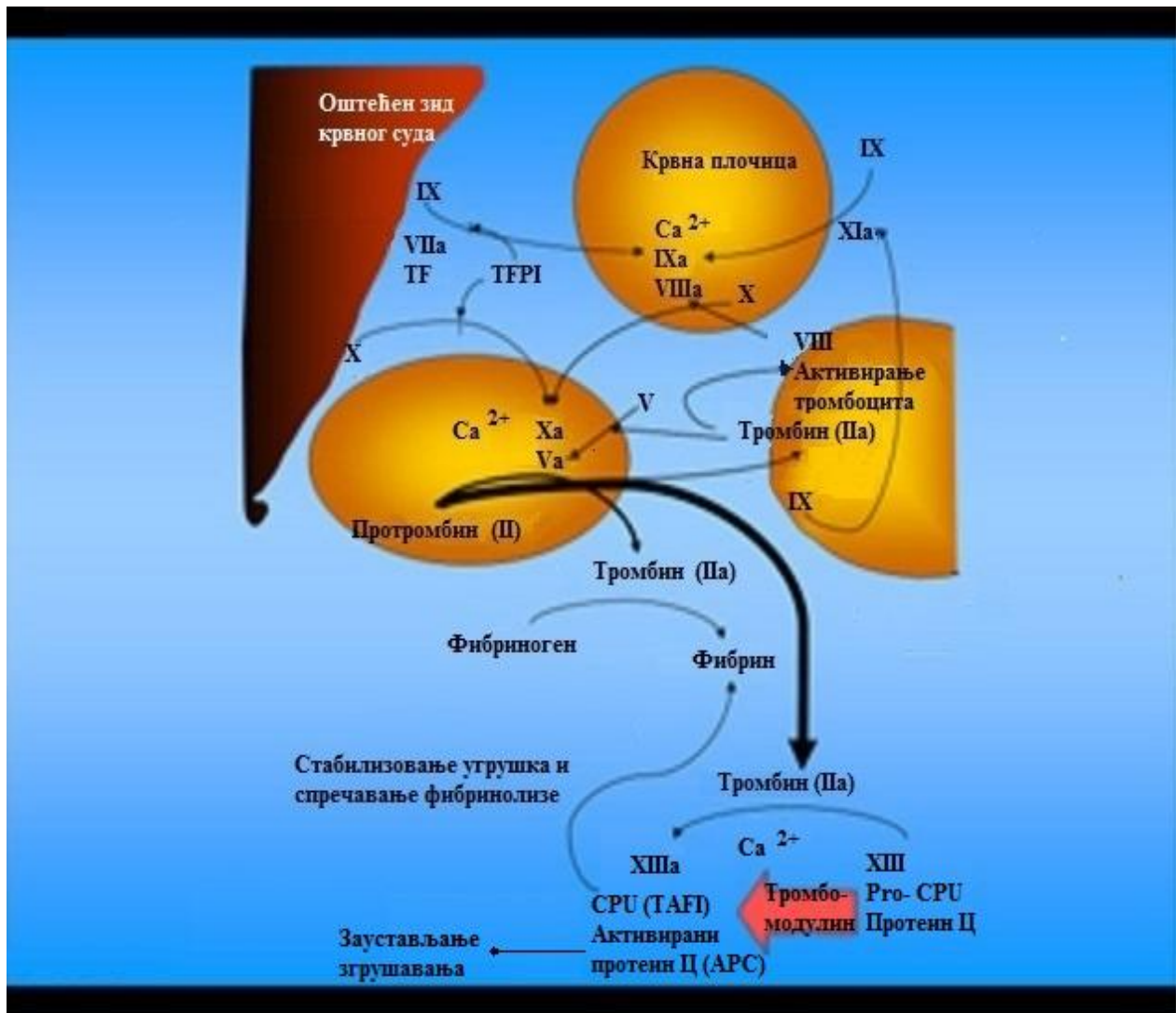
Хемостаза је сложен физиолошки процес неопходан за нормално функционисање организма. У данашње време описује се као динамичан процес у коме постоји равнотежа између тромбоцита и фактора коагулације који спречавају крварење са једне, и фибринолитичког система и инхибитора коагулације који онемогућавају настанак тромбоза са друге стране. Интеракције наведених компоненти хемостазног система одржавају крв у течном стању и омогућавају адекватну циркулацију (нормалан проток

крви и кроз најситније капиларе), што је предуслов за одржавање сталних услова око ћелија ткива и у складу са тим нормалну физиолошку функцију ткива и органа (1).

Коагулација представља компоненту нормалне хемостазе коју чини низ каскадних ензимских реакција. У крви се налазе протеини, неактивни фактори коагулације, од којих се сваки након активације претвара у ензим (активни фактор), који активира следећи неактивни фактор све до крајње реакције претварања фибриногена у фибрин. Фактори коагулације су и ензимски кофактори који убрзавају деловање ензимских фактора (Слика 1).

Повреда крвног суда узрокује крварење а први одговор организма је сужавање крвних судова које је више изражено у артеријама због развијенијег мишићног слоја (2). Сужавање је последица дејства вазоконстрикторних супстанци из повређеног ткива и крвних плочица и нервних рефлекса симпатичког система који узрокују локалну контракцију мишића крвног суда (3). Уколико је повреда крвног суда мала долази до адхезије, агрегације и активације тромбоцита на месту повреде и њиховог повезивања у виду чепа, чиме се зауставља крварење. Уколико је повреда већа, долази до активације система коагулације. Када дође до оштећења крвног суда субендотелне структуре (колаген, фибронектин, ламинин, витронектин, фон Вилебрандов фактор и ткивни фактор) се излажу току крви (4). Тада започиње адхезија тромбоцита (њихово везивање за колаген крвног суда) посредована фон Вилебрандовим фактором (мултимерни гликопротеин који се синтетише у ћелијама ендотела и мегакариоцитима и има улогу носача фактора VIII у плазми и посредника везивања крвних плочица на местима повреде крвног суда) који се везује за тромбоцитни гликопротеин 1б, након чега се тромбоцити активирају— мењају облик и запремину а садржај из њихових цитоплазматичних гранула се излучује у ванћелијски простор. Ове супстанце (тромбоксан А2, аденозиндифосфат, итд) активирају друге тромбоците али и узрокују сужавање крвног суда. Фон Вилебрандов фактор омогућава и агрегацију тромбоцита у условима брзог протока крви, док је у условима спорог протока крви агрегација посредована фибриногеном. Као резултат ових догађаја настаје тромбоцитни чеп што је код малих повреда крвног суда довољно за заустављање крварења (5).

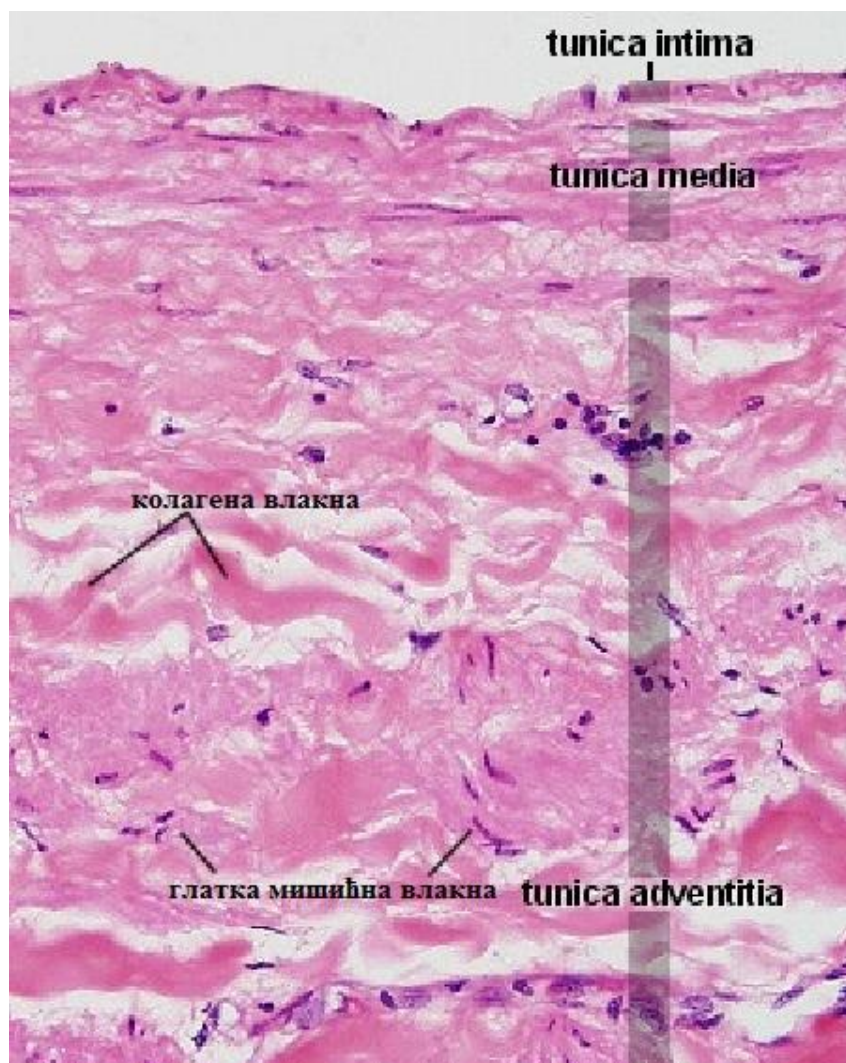
Уколико је повреда крвног суда већа долази до стабиловања тромбоцитног чепа фибринском мрежом, односно до згрушавања крви. Фибринска мрежа настаје као резултат усклађеног и прецизно регулисаног активирања чинилаца коагулације који се у нормалним околностима у циркулацији налазе у неактивном облику (4) Тада започиње каскадна реакција где један ензим активира други а овај следећи док организам не активира неки од система који заустављају процес згрушавања крви.



Слика 1. Шематски приказ процеса згрушавања крви (6)

Активација згрушавања крви почиње приликом повреде крвног суда ослобађањем ткивног фактора (TF, раније фактор III, ткивни тромбoplastин) или његовом експресијом на површини ендотелне ћелије или леукоцита (спољашњи пут активисања згрушавања крви). Овај фактор се нормално налази на површини ћелија субендотелијума у слоју *tunica intima* (слика 2). Липопротеински комплекс ткивног фактора се везује за фактор VII у крви, активира га и овај комплекс TF– VIIa даље активира нове количине FVII да би се убрзао одговор хемостазног система на повреду крвног суда. TF– VIIa заједно са јонима калцијума активира фактор X (FX). Касније се FX активира по настанку малих количина тромбина који активира фактор VIII. Активисани фактор VIII (FVIIIa) активира фактор IX (FIXa) који даље активира фактор X. Активисани фактор X (FXa) гради са активисаним

фактором V (FVa) и ткивним и тромбоцитним фосфолипидима комплекс активатора протромбина. При формирању тромба искористи се 85-90% створеног тромбина и тиме се спречава његово даље циркулисање (5). Фактор V је кофактор за чију је активацију потребан тромбин. Фактор X се може активирати и посредством фактора XII (FXII, Хагеманов фактор) који се активира при контакту крви са колагеном (унутрашњи пут активисања згрушавања крви). FXIIa ензимски активира фактор XI у присуству прекаликреина и кининогена велике молекулске масе. FXIa је серинска протеаза која може настати и директним деловањем тромбина на FXI. Активација FXI преко FXII није значајна за само започињање процеса коагулације, већ за његово убрзавање и ширење. Активисани фактор XI (FXIa) активира фактор IX. Активисани фактор IX делује заједно са фактором VIII и фосфолипидима пореклом из крвних плочица на фактор X активишући га. Активисани фактор X у садејству са кофактором FVa делује на протромбин конвертујући га у серинску протеазу тромбин. Тромбин настаје из протромбина који се синтетише у хепатоцитима у присуству витамина K одакле се ослобађа у циркулацију и стога оштећење јетре или недостатак витамина K може довести до смањене синтезе протромбина и склоности ка прекомерном крварењу (7). Тромбин делује на фибриноген (раније фактор I) тако што катализује раскидање везе између аргинина и глицина у близини N- краја A α и B β ланца фибриногена издвајајући фибринопептиде A и B чиме настају фибрински мономери који се даље полимеризују под дејством FXIIIa и долази до стабилизације фибрина. FXIII је такође активисан деловањем тромбина. Почетна количина тромбина настаје самосталним деловањем FXa на протромбин. Настали тромбин даље активира фибриноген, факторе V, VII, XIII, тромбоците а након везивања за тромбомодулин активира и протеин Ц (PC, енг. protein C). Контрола процеса коагулације у смислу заустављања овог процеса остварује се деловањем инхибитора коагулације из крвне плазме.



Слика 2. Снимак микроскопског препарата дела зида велике вене (хематоксилин/ еозин) (8)

1. 2. Тромбофилија

Тромбофилија је поремећај хемостазног система који карактерише повећана склоност ка згрушавању крви. Према дефиницији Британског хематолошког друштва из

1990. године тромбофилија је урођени или стечени поремећај хемостазног механизма који омогућава настанак поновљених тромбоза. Може бити примарна и секундарна. Код примарне тромбофилије разликују се наследна (урођена) и стечена. Под наследном тромбофилијом сматрају се генетички детерминисане абнормалности хемостатских механизма које резултирају у повећаној склоности ка настанку тромбоза.

Најчешћа клиничка манифестација наследне тромбофилије је венски тромбоемболизам. Обично се испољава као тромбоза дубоких вена (ТДВ) или као плућни емболизам. ТДВ представља повећану локалну продукцију тромбина са таложењем фибрина и агрегацијом тромбоцита у овим крвним судовима без оштећења ендотела (Слика 3). Крвни угрушци који настају у дубоким венама доњих екстремитета и бедреним венама могу довести до потпуног заустављања венске циркулације- оклузије вене.

Уколико тромб са периферије доспе у плућни крвоток, долази до зачепљења плућне артерије или њених мањих грана- плућне емболије (ПЕ), што узрокује нагло заустављање плућног крвотока и враћање крви ка десној комори срца. Плућну емболију могу изазвати масне капљице, гасови, страна тела или микроорганизми а најчешћи узрок су крвни угрушци (тромбови), који настају у дубоким венама доњих екстремитета и карлице и путем венског крвотока доспевају у срце, а одатле у артерије плућа.

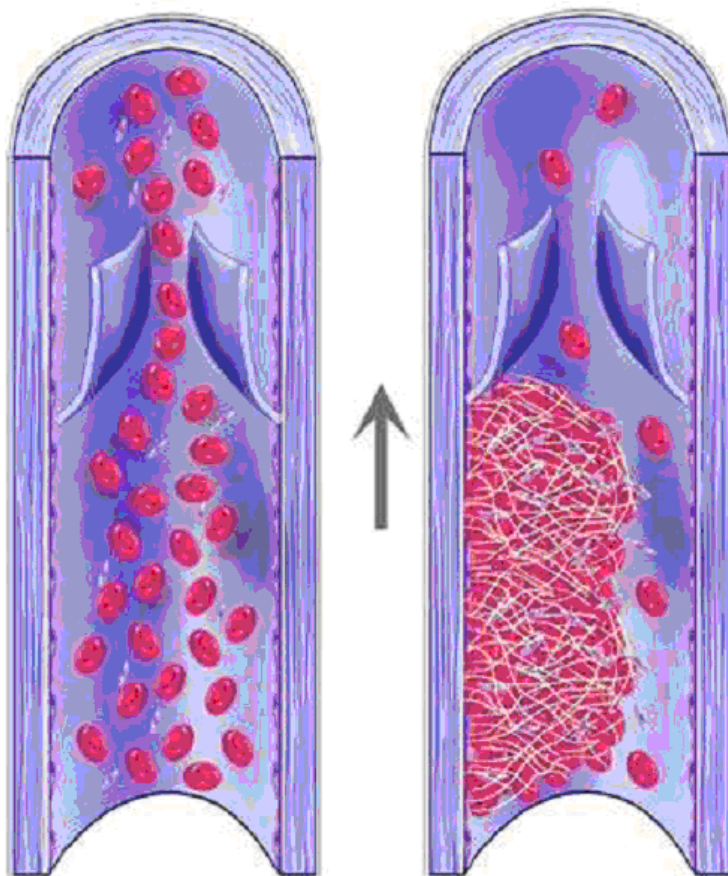
Код особа са присуством наследне тромбофилије тромбозе се обично јављају у млађем животном добу, обично пре 45. године живота, често се понављају и носе ризик за настанак емболије плућа. У последњих 20 година напредак генетике и PCR техника (PCR- енг. polymerase chain reaction, ланчана реакција полимеразе) довео је до пораста сазнања везаних за открића промена на генском нивоу које се испољавају на нивоу фактора коагулације или њихових инхибитора и одговорне су за повећану склоност ка настанку пре свега венских тромбоза. Два су основна механизма којима генске промене најчешће доводе до тромбофилије: код антикоагулантних протеина је то губитак функције а код фактора коагулације пораст синтезе, смањење инхибисања или, у најмањем броју случајева, настанак молекула са повећаном активношћу (9,10).

До сада описане наследне тромбофилије су: недостатак антитромбина, недостатак протеина Ц, недостатак протеина С (PS, енг. protein S), мутација у гену за протромбин FII G 20210 A, мутација у гену за проакцелерин FV Leiden, резистенција на активисани протеин Ц, дисфибриногеменија, недостатак FXII, недостатак плазминогена, дисплазминогеменија, повишен ниво PAI (енг. plasminogen activator inhibitor), недостатак TFPI (енг. tissue factor pathway inhibitor), хомоцистинурија, недостатак активатора плазминогена.

Прва откривена наследна тромбофилија је недостатак антитромбина (антитромбина III, АТ), у једној норвешкој породици са поновљеним тромбозама 1965. године. Тада је први пут указано на значај инхибитора згрушавања крви (11). АТ је једноланчани гликопротеин који припада фамилији инхибитора серинских протеаза (серпина). Његова примарна улога је деактивисање тромбина а деактивише и активисане чиниоце FXa, FIXa, FXIa и FXIIa.

Нормалан ток крви

Тромбоза дубоке вене

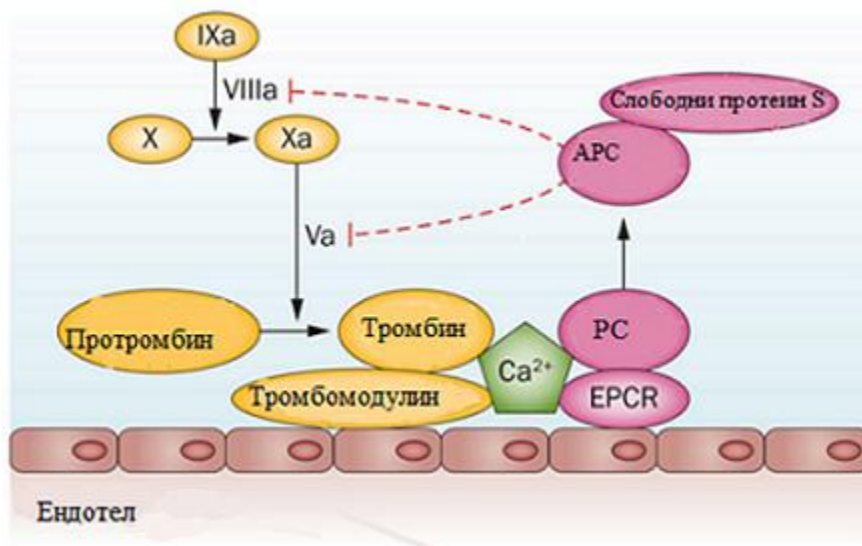


Слика 3. Тромбоза дубоке вене (12)

Инхибиторно дејство АТ остварује формирањем комплекса са аминокиселином серин у активном месту протеазе. Везивање између серина и аргинина у реактивном месту АТ је неповратно. АТ поседује и рецептор за хепарин који када је присутан у крви везивањем за тај рецептор повећава инхибиторну активност АТ убрзавањем везивања АТ за активисане чиниоце коагулације и до 2000 пута. На основу до сада познатог, око 4% свих ТДВ код особа млађих од 40 година последица су наследног недостатка АТ (13). Учесталост носилаца патолошког алела у општој популацији је око 0,03%. Појава тромбоза површинских вена и артеријских тромбоза није карактеристична за овај недостатак. У основи наследног недостатка АТ леже бројне тачкасте мутације. Ове мутације, настале као последица замене појединачних нуклеотида, спадају у посебну класу полиморфизама секвенце чији је општеприхваћен назив SNPs (енг. Single Nucleotide Polymorphisms). Ређе је наследни дефицит последица делеције у гену за синтезу АТ на дугом краку хромозома 1 (q23- q25.1) (14). Као резултат ових мутација недостатак АТ испољава се у два основна облика: тип I, где је смањена синтеза биолошки нормалног

молекула и тип II, са нормалном концентрацијом АТ у плазми али снижене функционалне активности, где може бити оштећено место везивања хепарина, реактивно место везивања за наведене чиниоце коагулације или је у питању вишеструки функционални поремећај. Недостатак АТ је најтежа описана тромбофилија. Венски тромбемболизам се јавља у млађем узрасту код особа са недостатком АТ, а ризик од настанка тромбозних компликација током трудноће као и од губитка плода је веома висок. Међу болесницима са овом тромбофилијом постоји висока учесталост понављања тромбозног процеса (4). Стечени недостатак АТ се јавља код тешких оболења јетре (хепатитис, алкохолизам, оштећења услед злоупотребе дрога), бубрега и црева, током употреба контрацептива који садрже естроген или прогестаген (15) као и током лечења нефракционисаним хепарином.

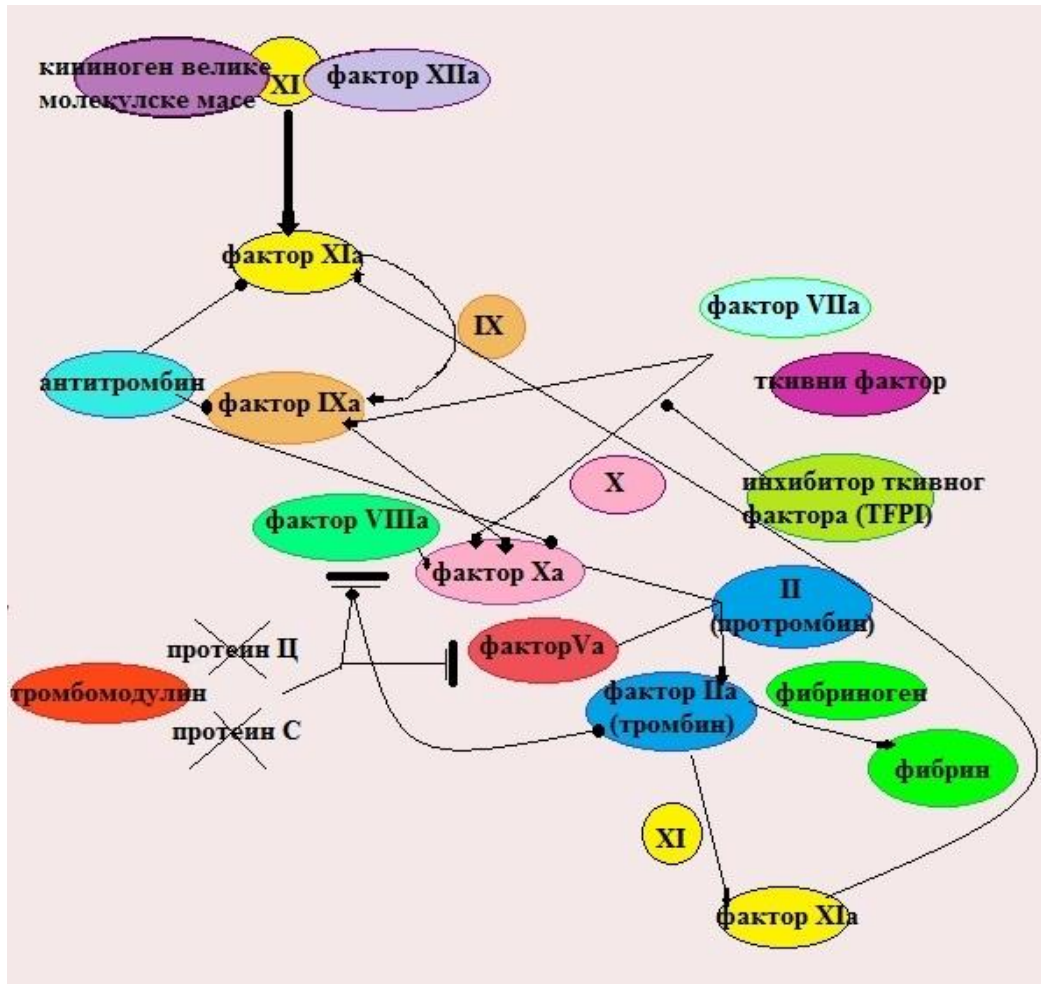
Наследна тромбофилија услед недостатка протеина Ц први пут је описана 1981. године (16). Протеин Ц је витамин К зависан гликопротеин који има улогу у заустављању процеса коагулације и стимулисању фибринолизе. Синтетише се у јетри и Лајдиг-овим ћелијама тестиса и епидидимиса а његова синтеза је под контролом гена на хромозому 2 (2q15-16) (17).



Слика 4. Антикоагулантни механизми PC- PS система (18)

На површини ендотелних ћелија у присуству тромбомодулина тромбин активира протеин Ц и настаје активисани протеин Ц (APC) који инаktivира факторе FVa и FVIIIa уз PS као кофактор. APC на тај начин спречава стварање FXa и тромбина и смањује стварање фибрина (19). Претходно је потребно да се тромбомодулин активира од стране тромбина. Након тога, под дејством активисаног тромбомодулина и тромбина у присуству јона калцијума настаје тромбин- тромбомодулин комплекс који се вез

ује за ендотелни протеин Ц рецептор- EPCR (енг. endothelial protein C receptor). Затим се EPCR веже за PC и активира га (20). За APC се потом везује протеин С на површини крвних плочица (слика 4). Мембрана крвних плочица обезбеђује фосфолипиде који потпомажу заустављању процеса згрушавања тако што омогућавају протеолитичку разградњу активисаних чинилаца Va и VIIIa од стране активисаног протеина Ц, док протеин С учествује као кофактор у овим протеолитичким реакцијама. У разградњи FVIIIa као кофактор учествује и FV. Разградња FVa и FVIIIa има инхибиторно дејство на процес стварања тромбина.



Слика 5. Шематски приказ поремећаја регулације згрушавања крви услед недостатка протеина Ц и протеина С (21)

Услед недостатка протеина Ц, као протеина С, долази до поремећаја регулације процеса згрушавања крви (слика 5). Постоје два облика недостатка протеина Ц: тип I и

тип II. Тип I се испољава као смањена количина протеина Ц у крви. Протеин Ц је у овом случају функционално нормалан али присутан је у концентрацији недовољној да би могао успешно да учествује у регулацији активности фактора FVa и FVIIIa. Тип II се односи на функционалну аномалију молекула протеина Ц. Концентрација присутног протеина Ц је нормална али је он измењен тако да не може да оствари нормалну интеракцију са другим молекулима да би остварио своју антикоагулантну функцију (22). Описане су бројне функционалне измене у протеину Ц које утичу на његове интеракције било са тромбомодулином, фосфолипидима, FVa или FVIIIa.

Учесталост недостатка протеина Ц у здравој популацији је између 0,2% и 0,5% (13,23) док је међу болесницима са венским тромбозама између 1,3% и 8% (24). Пацијенти рођени са обе измењене копије гена за протеин Ц (хомозиготи) имају тежак облик тромбозе познат као *purpura fulminans*. *Purpura fulminans* у основи има стварање угрушака у крвним судовима мањег пречника дуж целог тела, што изазива исхемијску некрозу коже и поткожног ткива (4,5). Испољава се у најранијем узрасту, код новорођенчади и одојчади која без адекватне терапије не преживљавају (25). Стечени недостатак протеина Ц је најчешће последица: терапије антагонистима витамина К, недостатка витамина К, сепсе, дисеминоване интраваскуларне коагулације и хемотерапије L- аспаргиназом (26).

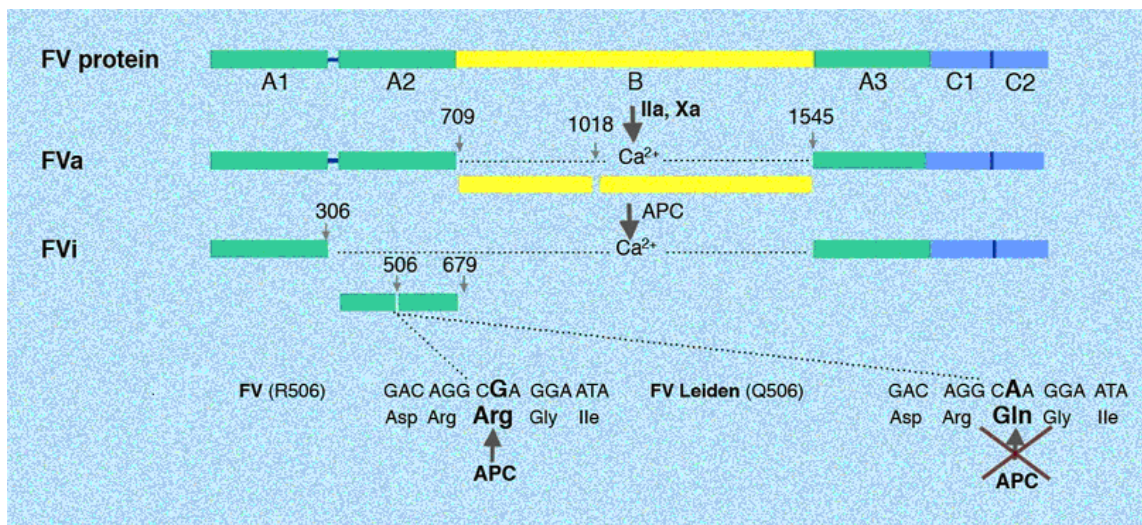
Наследна тромбофилија услед недостатка протеина С први пут је описана 1984. године (27). Протеин С је такође витамин К- зависан гликопротеин који се синтетише у јетри али и у ендотелним ћелијама, мегакариоцитима, Лајдиговим ћелијама тестиса, остеобластима и глатким мишићним ћелијама крвних судова. Ген који кодира протеин С, који се назива *proS1* или PS алфа ген налази се на трећем хромозому у региону 3p13.1- 13.2. У његовој близини се налази псеудоген (*proS2* или PS β ген) што отежава генетичку дијагностику недостатка протеина С (28). Протеин С је кофактор APC у протеолитичкој разградњи FVa и FVIIIa, тако што повећава афинитет активисаног протеина Ц према фосфолипидним површинама на ендотелним ћелијама или тромбоцитима, чиме омогућује формирање комплекса ензим- супстрат (APC и FVa односно APC и FVIIIa (28). Нормално је око 60% циркулишућег PS везано за C4b- везујући протеин, а 40% се у циркулацији налази у слободном облику. Стога промене нивоа C4b протеина у крвној плазми мењају и ниво слободног PS. Пошто је једино у слободном облику PS кофакторски активан, на тај начин C4b- везујући протеин регулише и антикоагулантну активност PC- тромбомодулин- PS система (21). Слободни PS има и антикоагулантно дејство усмерено према FIXa комплексу и FXa комплексу (4). Протеин С такође испољава антикоагулантну активност у одсуству APC тако што стимулише инхибицију ткивног фактора од стране инхибитора ткивног фактора (TFPI, енг. tissue factor pathway inhibitor) у присуству фосфолипида. PS учествује и у регулисању фибринолизног процеса и то убрзавајући неутрализацију инхибитора активатора плазминогена 1 (PAI- 1) активисаним PC и инхибирајући активацију тромбином активирајућег фибринолизног инхибитора (TAFI, енг. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor). TAFI је проензим који након активације тромбином зауставља фибринолизу. Тромбомодулин стимулише активацију TAFI и PC а APC инхибира активацију TAFI заустављањем стварања тромбина. У овом процесу протеин С учествује као кофактор (29). Протеин С инхибира такође почетно стварање тромбина у одсуству APC тако што инхибира активацију TAFI (29). Ово је још један механизам

регулације фибринолизе у раном стадијуму формирања угрушка. Недостатак протеина С стога и на овај начин повећава ризик за настанак венских тромбоза.

Клинички се могу разликовати три типа овог поремећаја: у типу I постоје снижене вредности укупног PS, слободног PS и активности PS. У типу II нормалне су вредности укупног и слободног PS али је активност PS снижена. Тип III подразумева нормалне вредности укупног PS антигена али је снижена вредност слободног антигена и активност (4). Учесталост недостатка протеина С у здравој популацији је између 0,05% и 0,1%. Недостатак протеина С јавља се код болесника са тромбозама са учесталошћу између 2% и 6,9% (30, 31). Код новорођенчади са обе измењене копије гена за PS (хомозиготи) се, слично као код хомозигота за недостатак протеина С, јавља већ у првој години живота *purpura fulminans* (32). Код хетерозигота, са једном нормалном и једном измењеном копијом гена за протеин С, јавља се најчешће тромбоза дубоких вена доњих екстремитета а (за разлику од других тромбофилија) приказани су и бројни случајеви тромбозе вене порте и мезентеричне вене (4). Стечени недостатак протеина С је најчешће последица болести јетре или последица недостатка витамина К.

Савремена схватања као једну од најважнијих наследних тромбофилија наводе резистенцију на активисани протеин Ц (APC резистенција). Резистенција FVa на APC омогућава повећано стварање FXa и тромбина тако да повећава и стварање фибрина. Описана је први пут 1993 (33). Каснијим истраживањима утврђено је да је најчешћи узрок појединачна мутација у гену за фактор V (FV) и то је тзв. фактор V Leiden мутација (FV G 1691 A), где је у аминокиселинској секвенци фактора V аргинин на месту 506 замењен глутамином (Слика 6) што онемогућава хидролизу пептидне везе на том месту и инактивисање FVa (34). FVa је протеински кофактор који са фактором Ха, јонима Ca²⁺ и фосфолипидима гради комплекс протромбиназе, неопходан за брзо стварање тромбина из протромбина (35, 36). Ген који кодира FV смештен је на дугом краку хромозома 1 у региону 1q26.2.

Поред FV Leiden откривене су и нове мутације у гену за FV (FV G 1291 C, тзв. фактор V Cambridge мутација где је у фактору V аминокиселина аргинин на месту 306 замењена треонином и мутација FV A 1290 G где је аргинин на месту 306 замењен глицином, тзв. фактор V Hong Kong). Фактор V Cambridge мутација је повезана са благим обликом APC резистенције док фактор V Hong Kong мутација не изазива APC резистенцију (37, 38). Ни фактор V Cambridge ни фактор V Hong Kong мутација нису потврђене као фактори ризика за настанак венских тромбоза. Такође су описане мутације у фактору V: FV A 4070 G, где је у фактору V хистидин на месту 1499 замењен аргинином и назива се HR2 хаплотип и FV Liverpool мутација код које је у фактору V изолеуцин на 359 месту замењен треонином (37). Присуство HR2 хаплотипа заједно са присуством FV Leiden мутација значајно повећава ризик за настанак венских тромбоза. FV Liverpool мутација сама по себи узрокује резистенцију на APC и повезана је са појавом тромбоза јер успорава разградњу FVa и смањује кофакторску активност FV у процесу инактивације FVIIIa (39).



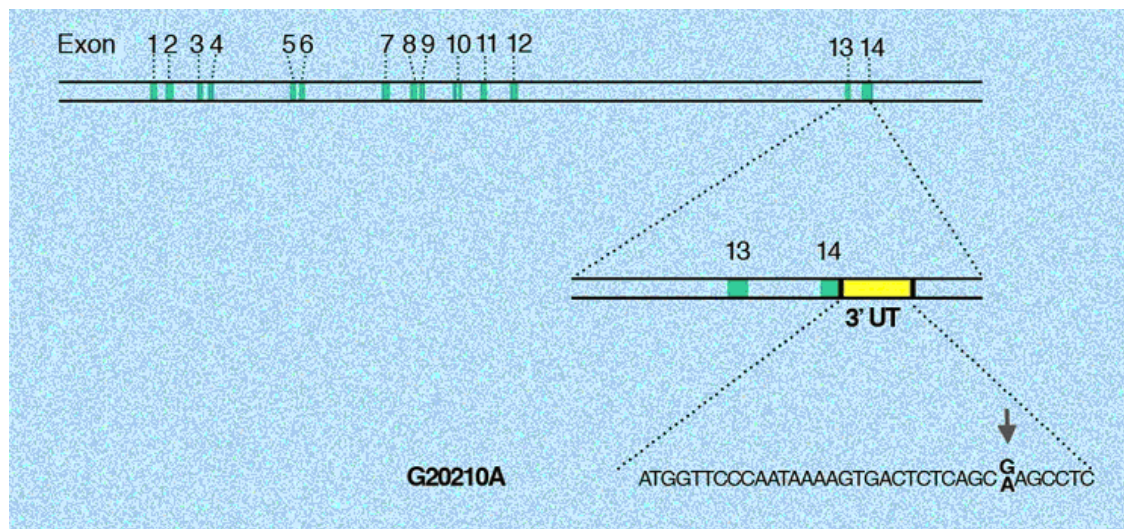
Слика 6. Фактор V Leiden мутација (40)

Око 95% пацијената са APC резистенцијом има FV Leiden мутацију а само у око 5% случајева је APC резистенција стечена или повезана са неком другом мутацијом у фактору V. APC резистенција која нема у основи FV Leiden мутацију у 1/3 случајева повезана је са повишеним нивоом FVIII (39) а јавља се и при повишеном нивоу протромбина услед мутације FII G 20230 A и других разлога (41). Стечена APC резистенција се јавља у трудноћи (42), код неких малигних обољења, током примене хормонске терапије (43) и ретко услед других поремећаја хемостазног система.

FV Leiden мутација присутна је код око 20% свих пацијената са тромбозом дубоких вена (43). Ретко се јавља тромбоемболија плућа вероватно због неправилне фибринолизе па је угрушак чвршће везан за зид крвног суда (4, 44). Овај дефект је присутан у око 4- 5% здравих индивидуа у европеидној популацији мада се у неким срединама овај проценат креће и до 15,3% (43). Истовремено, ова наследна тромбофилија је ретка у афричким и азијским популацијама (13, 43). Код хетерозигота ризик за настанак тромбозе је 5- 12 пута већи док је код хомозигота и 50- 120 пута већи јер хетерозиготи поред измењеног FV имају и функционално нормалан FV у једнакој концентрацији (45).

Наследна тромбофилија услед мутације у гену за протромбин- FII G 20210 A је мутација у којој је гуанин на месту 20210 у гену замењен аденином (Слика 7) и описана је 1996 (46). FII G 20210 A је једна од ретких тромбофилних мутација којом настаје протеин који има већу активност од нормалног (46). Повезана је са благо повишеним нивоом протромбина у крвној плазми и сматра се независним фактором ризика за настанак венских и артеријских тромбоза (47,48). Механизам којим ова мутација утиче на ниво протромбина још увек није потврђен и повезује се са обрадом информационе РНК (иРНК) која се преписује са овог гена, тачније са полиаденилацијом- формирањем 3' краја иРНК додавањем полиаденилата (49). Ефикаснија полиаденилација повећава ниво синтезе протеина јер олакшава транспорт иРНК из једра у цитоплазму и одржава њену стабилност (49), мада није искључено ни постојање неког другог ефекта ове мутације који у садејству

утиче на синтезу протромбина. Ова мутација је пример измене у месту исецања иРНК које претходи полиаденилацији и једина до сада позната таква мутација која повећава ниво обраде 3' краја јер се за измењену секвенцу са већим афинитетом везују фактори који учествују у кључним посттранскрипционим процесима (нуклеолин, РТВ-1 (енг. polyurimidine tract binding protein 1), hnRNP-K (енг. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)) (50).



Слика 7. Фактор II G 20210 А мутација (40)

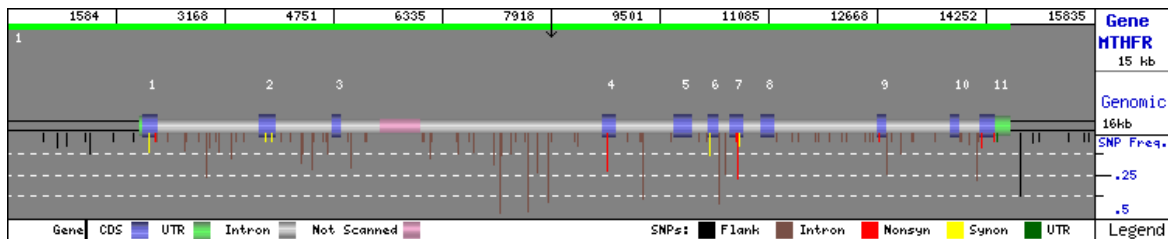
Учесталост ове мутације у општој популацији је око 2,3% а међу болесницима са венским тромбозама око 6,2%. У студији где су обухваћени болесници са поновљеним тромбозама и потврђеном појавом тромбоза у породици учесталост ове мутације је 18%. Код хетерозигота је ризик за настанак тромбоза од 2,8 до 4 пута већи (13, 49) и повећава се током примене хормонске терапије. С обзиром на ниску учесталост ове мутације још увек не постоји тачан податак о томе колико је овај ризик већи код хомозигота у односу на хетерозиготе у општој популацији. Истовремено постојање FII G 19911 А мутације (гуанин је у гену за протромбин на месту 19911 замењен аденином) додатно повећава ризик за настанак тромбоза код носилаца FII G 20210 А мутације (51).

Повишен ниво хомоцистеина у плазми (хиперхомоцистеинемија) је такође фактор ризика за настанак тромбоза. Хомоцистеин је аминокиселина која настаје из метионина и учествује у неколико метаболичких путева. У реакцији са 5-метилентетрахидрофолатом хомоцистеин учествује у поновној синтези метионина. 5-метилентетрахидрофолат настаје из 5,10-метилентетрахидрофолата у присуству редукованог никотинамид аденин динуклеотид фосфата (NADPH) а ову реакцију омогућава ензим метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) (52). Фолна киселина игра кључну улогу у синтези метионина из хомоцистеина. Из метионина настаје S-аденозил-метионин (SAM), који је главни давалац метил-групе у различитим процесима метилације у организму од којих је најважнија метилација ДНК (53).

Овај процес је важан у регулацији генске експресије, одржавања стабилности ДНК, модификацији хроматина и настанку мутација. Метилација ДНК на појединим регулаторним местима узрокује престанак активности одређених гена (тј. престанак синтезе одређених протеина). Смањење активности МТНFR и недостатак фолне киселине доводе до смањења нивоа метионина а грешке у метилацији (услед недостатка метионина) повезане су са настанком неких малигних обољења, између осталог са карциномом дебелог црева (54).

Наследна хиперхомоцистеинемија услед присуства термолабилне варијанте ензима МТНFR је врло распрострањена широм света. У основи овог ензимског функционалног поремећаја је замена цитозина тимином на месту 8750 у МТНFR гену, односно на месту 677 у транскрипту МТНFR гена (МТНFR С 677 Т), што доводи до замене аланина валином на месту 222 у ензиму. Учесталост ове мутације је око 24%- 40% у европеидној популацији, 26%- 37% у јапанској популацији, док је у афричкој популацији знатно мања, око 8% (53,55,56). Недавно је описана и друга мутација, замена аденина у цитозин на 10 652 месту у гену за МТНFR, односно на 1298 месту (А 1298 С) у транскрипту гена за МТНFR- што доводи до замене глутамин аланином на 432 месту у МТНFR протеину (Слика 8) (57). Мутација А 1298 С, као и С 677 Т мутација, резултује у смањењу МТНFR активности али не доводи до стварања термолабилног протеина. Хомоцистеин у концентрацији која је изнад нормалног опсега (изнад 12 $\mu\text{mol/ l}$) појачава експресију ткивног фактора, инхибира експресију тромбомодулина који је главни ендотелни кофактор за активацију РС од стране тромбина и проузрокује бројне промене које ендотел крвних судова претварају у површину која активише тромбоците и стимулише стварање тромбина (58).

Термолабилна МТНFR испољава утицај на повећање нивоа хомоцистеина само ако је ниво фолата у крвној плазми низак, тако да се овај ризик за настанак тромбоза може превенирати адекватним уносом фолата исхраном у комбинацији са витаминима В групе. Најчешћи узроци стечене хиперхомоцистеинемије су: недостатак фолата, витамина В6 и В12, примена лекова који делују на метаболизам фолата, мегалобластна анемија, пушење, хронична бубрежна инсуфицијенција, хемодијализа, хипотиреоидизам и неки малигни тумори (4,55). Такође, с годинама долази до пораста нивоа укупног хомоцистеина у плазми (tHcy) независно од присуства мутација у МТНFR гену (54).



Слика 8. Тачкасте мутације у МТНFR гену

Фибриноген је протеин крвне плазме који се синтетише у јетри. Активира се под дејством тромбина који сече молекула фибриногена на четири мономерна пептидна ланца који се затим повезују (полимеризују) градећи фибринску мрежу. У раној фази полимеризације мономери фибрина су повезани само slabим водоничним везама а под утицајем FXIIIa (фактор стабилизације фибрина) долази до стварања јаким ковалентних веза и до стабиловања крвног угрушка (59). И FXIII се активира под дејством тромбина (FIIa). Дисфибриногеменија је наследни поремећај који се карактерише стварањем структурно, а често и функционално измењених молекула фибриногена. Откривено је више варијанти генетички детерминисане дисфибриногеменије названих по градовима где су по први пут откривене. У зависности од тога каква измена у фибриногену је присутна зависи и клиничко испољавање наследне дисфибриногеменије. У великом броју случајева наследна дисфибриногеменија не даје никакве симптоме. Међутим, у случајевима када услед измене молекула фибриногена формирани фибрински угрушак не може бити успешно стабилован долази до благих поремећаја у заустављању крварења. Постоји и варијанта измењеног фибриногена позната као Осло I која је повезана са благим ризиком за настанак тромбоза. Могући механизми настанка тромбоза су: убрзано одвајање фибринопептида из измењеног молекула фибриногена, повишен ниво тромбина због поремећаја везивања тромбина за измењен фибриноген, као и смањена улога измењеног фибрина у активацији фибринолизног процеса (4). Наследна дисфибриногеменија је до сада описана у око 330 случајева. Учесталост дисфибриногеменије код болесника са венском тромбозом је око 0,8% при чему овај поремећај може да буде и стечен код болесника са тешким оштећењима јетре, када синтетисани фибриноген има повећан садржај угљених хидрата. Ови боленици често имају теже поремећаје у заустављању крварења од оних са наследном дисфибриногеменијом а стање им се погоршава са погоршањем болести јетре (59).

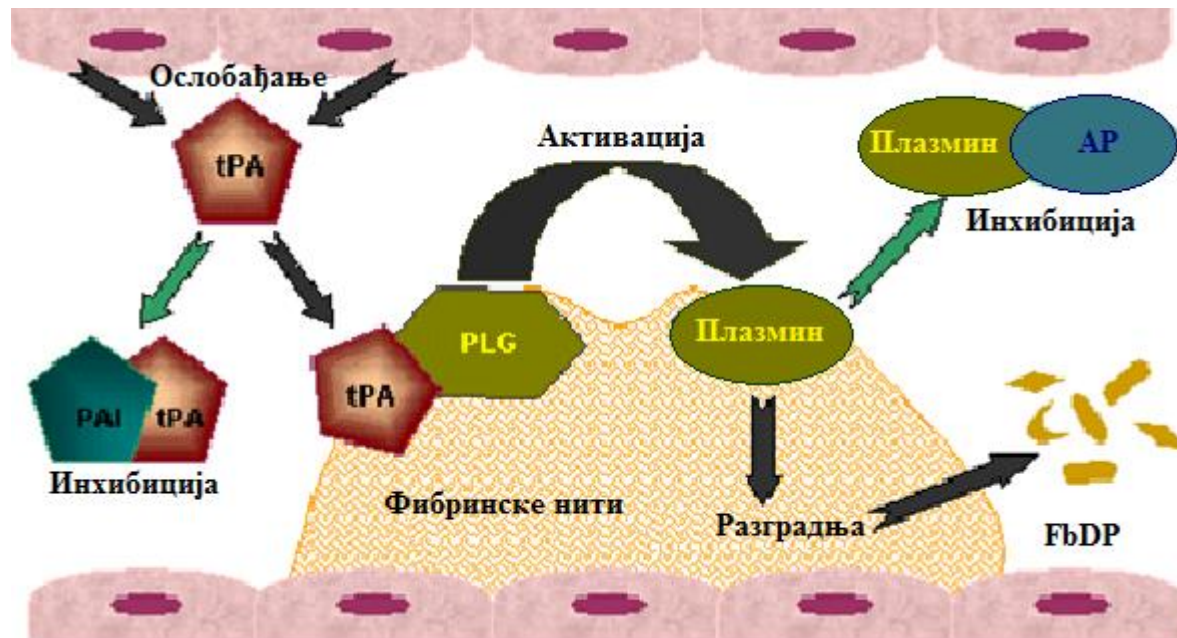
Повишена концентрација фактора VIII честа је код ТДВ и показано је да недвосмислено представља повећање ризика за настанак овог обољења једнако као и недостатак протеина- инхибитора коагулације и резистенција на активисани протеин Ц. За сада није позната генетичка основа овог процеса. Постојање ове тромбофилије је установљено код 11% опште популације и 25% болесника са тромбозама (4). У случајевима изолованог повишеног нивоа FVIII може да се претпостави да је APC систем преоптерећен и да је индукована стечена резистенција FVIII на APC, као и да је појачано стварање тромбина (60). Полиморфизми у гену за FVIII су укључени у регулацију нивоа FVIII у плазми, и са тим удруженог ризика за венску тромбозу (61). Повишен ниво FVIII обично је резултат садејства наследних и ненаследних чинилаца.

Повећање концентрације чиниоца IX и X такође представља ризик за настанак тромбоза али ни овде генетичка основа поремећаја није довољно испитана.

Плазминоген је протеин који се активира у присуству FXIa, FXIIa, каликреина, ткивног активатора плазминогена (tPA) и урокиназе (мокраћни активатор плазминогена, uPA). Активисани плазминоген- плазмин је серинска протеаза која разлаже фибрин (Слика 9). У заустављању процеса фибринолизе најзначајнију улогу има α_2 антиплазмин (AP, α_2 инхибитор плазмина) који се везује за слободни плазмин и плазминоген и спречава њихово везивање за фибрин (62). Недостатак плазминогена се јавља у два облика- тип I, у којем је смањен и ниво плазминогена у крвној плазми и негова функционалност, и тип II

познат као дисплазминогенемија, где је ниво антигена нормалан а смањена је активност. Само је недостатак плазминогена тип I (хипоплазминогенемија) повезан са настанком дубоких венских тромбоза и у литератури се наводи као редак узрок ове болести.

Веома повишен ниво инхибитора активатора плазминогена (РАI- 1) значајно инхибира фибринолизу што може узроковати тромбозу. Генетичка основа овог поремећаја је тзв. РАI- 1 G4/ G5 полиморфизам, односно инсерционо/ делециони полиморфизам гуанина у промоторском региону гена који кодира РАI- 1 G4/ G5 полиморфизам има значајну учесталост у општој популацији, око 51%, и не представља велики ризик за настанак тромбозе (63).



Слика 9. Шематски приказ регулације процеса фибринолизе (64)

Недостатак фактора XII је описан као фактор ризика за настанак венских и артеријских тромбоза. Овај фактор има значајну улогу у фибринолизи јер повећава ослобађање ткивног активатора плазминогена тако да негов недостатак смањује ефикасност фибринолизног процеса. Учесталост измена које се испољавају у гену за фактор XII у општој популацији је 1,5% до 3% (65).

Постоје и наследне тромбофилије које имају изузетно малу учесталост код болесника са венским тромбозама: недостатак тромбомодулина, поремећаји инхибитора ткивног фактора и недостатак протеина Z.

Тромбомодулин (ТМ) игра улогу рецептора за тромбин на ендотелним ћелијама, и након формирања комплекса са тромбином активира протеин Ц који даље инхибира активирање FVa и FVIIIa. Ген за тромбомодулин налази се на хромозому 20. Анализом 5' региона гена за ТМ откривене су мутације удружене са ризиком за артеријску тромбозу али новија испитивања указивала су и на могућност да су ови полиморфизми независан

фактор ризика за настанак венских тромбоза. Међутим, код пацијената са тромбозама није утврђено присуство великог недостатка тромбомодулина. С обзиром на то да је дејство тромбомодулина најзначајније у капиларима претпоставља се да мутације у гену за тромбомодулин, у одсуству недостатка протеина Ц, нису повезане са тромбозом великих вена (66).

Инхибитор ткивног фактора (TFPI) се везује за активисани FXa, а овај комплекс се даље везује за FVIIa, ткивним фактором и јонима Ca²⁺. Снижен ниво TFPI носи благи ризик за настанак тромбоза. Мутација у гену за инхибитор ткивног фактора где је цитозин на месту 536 замењен тиминим (TFPI C 536 T) која доводи до замене пролина леуцином на месту 151 у протеину TFPI је повезивана са ризиком за настанак венских тромбоза, међутим резултати касније студије нису потврдили повезаност (67, 68).

Протеин Z је витамин K- зависни протеин крвне плазме и гради комплекс са протеин Z зависним протеазним инхибитором чија је улога да инхибира FXa и FXIa у присуству протеина Z, фосфолипида и јона Ca²⁺ (69). Ризик од настанка тромбоза је описан само у случајевима када су присутне измене у гену за протеин Z (PROZ ген) које утичу на генску експресију и излучивање протеина Z тако да су његове вредности у плазми веома испод нормалних (мутација у региону промотора PROZ A(-13)G, мутација у интрону F A79G, у мутација у егзону 8 која узрокује замену аргинина хистидином на 225. месту у протеину и друге) мада у неким студијама не постоји директна повезаност ових мутација и настанка венског тромбоемболизма (70). С друге стране, потврђен је синергистички ефекат ових мутација и других наследних и мешовитих тромбофилија (мутација FV Leiden, мутација FII G 20210 A, хиперхомоцистеинемија) (71).

Хомоцистинурија је један од наследних поремећаја у метаболизму метионина и такође је повезана са настанком ТДВ. У основи овог поремећаја су мутације у гену за цистатион β- синтетазу (CBS) које узрокују смањење активности овог ензима. Компликације недостатка функционалног CBS су последица повећања концентрације хомоцистина, хомоцистеина и метионина у плазми а карактеристично је и присуство повећане концентрације хомоцистина у урину (41). Испољавају се код носилаца обе измењене варијанте гена за CBS и ти случајеви су врло ретки, 1: 377 000 у општој популацији (72). Поред тромбоза, за ове болеснике је карактеристична и ментална ретардација, појава неуролошких оштећења, скелетне аномалије, ектопија очног сочива а често и кратковидост. Симптоми недостатка функционалног CBS испољавају се већ у неонаталном добу (73).

С обзиром на то да су мутације у многим генима у основи различитих тромбофилија, такође је могуће и присуство две или више различитих мутација код једног болесника. Осим удруженог постојања две наследне тромбофилије такође је и могуће истовремено постојање наследне и стечене тромбофилије. Код особа са удруженом тромбофилијом ризик за настанак тромбоза је вишеструко већи од простог сабирања ризика сваке појединачне тромбофилије (4).

У стечене тромбофилије се, поред поменутих стечених недостатака AT, PC, PS, убраја и антифосфолипидни синдром (Hughes- ов синдром) (74). То је најчешћа стечена тромбофилија, аутоимуно стање које се одликује постојањем антифосфолипидних антитела (антикардиолипинских антитела, антиβ2 гликопротеин I антитела и лупусног антикоагуланса). По најшире прихваћеној претпоставци ова антитела се заправо не везују

директно за фосфолипиде ћелијске мембране већ за протеине плазме везане за фосфолипиде ћелијске мембране. Највероватнији начин на који ова антитела учествују у поремећајима повећаног згрушавања крви је снижавање нивоа неких протеина плазме, између осталог анексина V, који прави баријеру између фосфолипида и циркулишуће крви. Изложени фосфолипиди тада испољавају прокоагулантно дејство (75, 76).

Постоје и други механизми којима антифосфолипидна антитела доводе до настанка тромбозних компликација: поништавањем инхибиторног дејства које $\beta 2$ гликопротеин I има на процес коагулације, везивањем за хепарин и хепаран сулфат ометају њихово антиромбинско дејство, везивањем за тромбомодулин инхибирају стварање тромбин-тромбомодулин комплекса и активацију протеина Ц а постоје и субпопулације ових антитела које спречавају инактивацију фактора Va посредовану активисаним протеином Ц и тако узрокују стечену APC резистенцију. Такође додатно стимулишу активацију тромбоцита индуковану тромбином и производњу тромбоксана A2 и B2 (52, 53, 54).

Разликује се шест типова антифосфолипидног синдрома: тип I, који је повезан са тромбозом дубоких вена и ПЕ, тип II, повезан са појавом тромбозе коронарних и периферних артерија, тип III, повезан са цереброваскуларним тромбозама, тип IV који има мешовите одлике типова I, II и III, тип V који је повезан са појавом поновљених спонтаних побачаја и тип VI, који се односи на постојање асимптоматских антифосфолипидних антитела и код ових особа углавном не долази до развоја одлика антифосфолипидног синдрома (77). Антифосфолипидни синдром се може јавити у два облика. Примарни се јавља самостално, код особа које не испољавају клиничке симптоме других аутоимуних болести. Када се ово стање развија у оквиру системских аутоимуних болести, најчешће системског еритемског лупуса, означава се као секундарни антифосфолипидни синдром (78).

Дијагностика присуства антифосфолипидног синдрома поставља се уколико је испуњен најмање по један клинички и лабораторијски критеријум. Клинички критеријуми су најмање једна потврђена артеријска или венска тромбоза и компликације у трудноћи које обухватају: најмање један губитак потврђено нормалног фетуса у десетој недељи трудноће или касније, најмање један превремени порођај морфолошки нормалног детета пре 37. недеље трудноће услед еклампсије, тешке прееклампсије или плаценталне инсуфицијенције и најмање три узастопна спонтана побачаја пре десете недеље трудноће који нису праћени хормонским или анатомским аномалијама мајке нити поремећајима у структури мајчиних или очевих хромозома. Лабораторијски критеријуми се односе на: постојање лупусног антикоагуланса у два тестирања са размаком од најмање 12 недеља, постојање антикардиолипинских антитела класе IgG и/или IgM у умереном или великом броју у два узастопна тестирања са размаком од најмање 12 недеља или постојање анти $\beta 2$ гликопротеин I антитела класе IgG и/или IgM у умереном или великом броју у два узастопна тестирања са размаком од најмање 12 недеља (79, 80).

Лабораторијска дијагностика постојања антифосфолипидног синдрома врши се тако што се одређује присуство лупусног антикоагуланса и ниво антикардиолипинских и анти $\beta 2$ гликопротеин I антитела изражен као нормализована вредност. Присуство лупусног антикоагуланса дијагностикује се „скрининг” и потврдним тестовима у чијој је основи одређивање времена коагулације. Одређивање нивоа антикардиолипинских и анти $\beta 2$ гликопротеин I антитела се врши применом имунолошких техника (ELISA-

ензимски имуноесеј). Ризик за настанак тромбозних компликација је већи код болесника са позитивним лупусним антикоагулансом него код болесника са повишеним нивоом антикардиолипинских и анти β 2 гликопротеин I антитела (4). Присуство лупусног антикоагуланса повећава ризик од настанка тромбозе око 11,1 пута, док присуство антикардиолипинских и анти β 2 гликопротеин I антитела у неким студијама показује благу и статистички недовољно значајну повезаност са настанком тромбозе (81, 82). У другим студијама где је обухваћен већи број испитаника се овај ризик процењује на 1,6 код пацијената са умереним нивоом анти β 2 гликопротеин I антитела и на 3,2 код пацијената са високим нивоом ових антитела у серуму тако да њихово присуство ипак директно доприноси повећаној склоности ка згрушавању крви (83). У терапији поремећаја повећаног згрушавања крви повезаних са антифосфолипидним синдромом најчешће се користи нискомолекуларни хепарин и нефракционисани (стандардни) хепарин (84).

Мешовита тромбофилија је склоност ка повећаном згрушавању крви који настаје комбинацијом урођених и стечених утицаја. Мешовите тромбофилије, поред описане хиперхомоцистеинемije, обухватају и повишен ниво фибриногена, фактора VIII и фактора IX. Фибриноген је реактант акутне фазе запаљења, тако да се ниво овог протеина повећава током инфекције. Показано је и да ниво фибриногена расте с годинама и у трудноћи а такође је повишен код пушача, гојазних и особа које користе стероиде и оралне контрацептиве (85).

Фактор VIII је, као и фибриноген, реактант акутне фазе запаљења, тако да се ниво овог фактора повећава током инфекције као и у случају хроничних и малигних болести (86).

Ниво фактора IX расте током живота а повишен је и током коришћења оралних контрацептива (87).

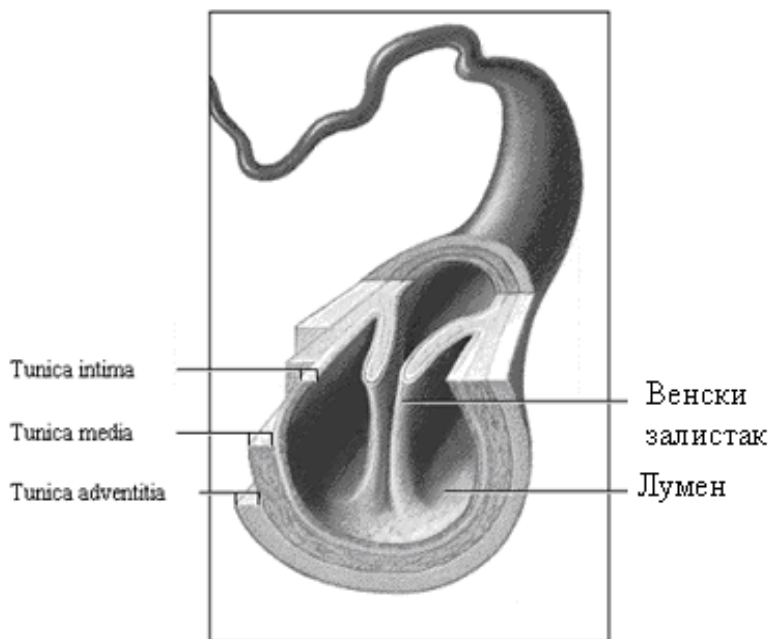
Повишен ниво фактора XI је такође потврђени фактор ризика и око 2,2 пута повећава вероватноћу настанка ТДВ (88).

Учесталост појаве ТДВ је велика, око 0,1% (26) у општој популацији и стога је испитивање присуства наследних тромбофилија у широкој примени у здравственим центрима у свету и код нас.

1. 3. Венска циркулација доњих и горњих удова

Венски крвни судови имају облик цеви и грађени су из три слоја: најдебљег, спољашњег слоја везивног ткива- *tunica adventitia* или *tunica externa*; средишњег слоја који чине глатка мишићна влакна- *tunica media*, који је слабо развијен јер вене не остварују функцију у циркулацији путем контрактилности; и унутрашњег слоја ендотелних ћелија - *tunica intima* који ограничава лумен вена. *Tunica intima* формира израштаје, венске залиске

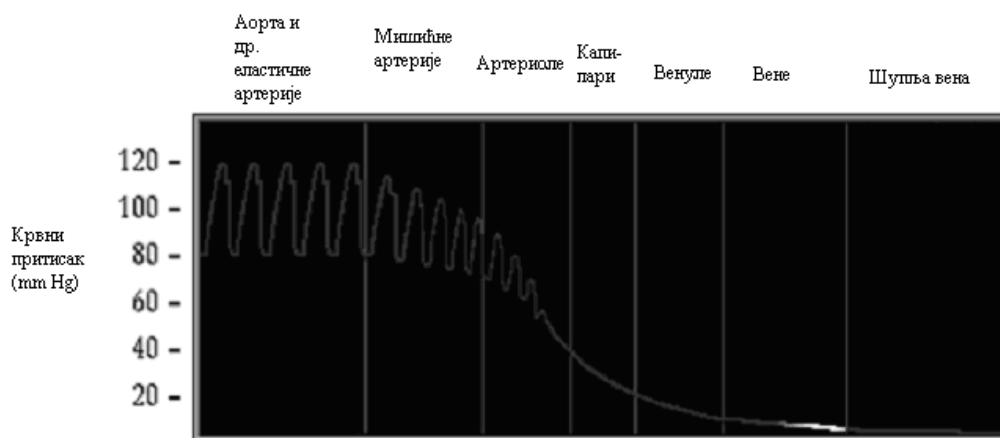
(валвуле), који обезбеђују једносмерни проток крви у венама тако што функционишу по принципу неповратног вентила (Слика 10). Крв одржава цеволик облик вена (65).



Слика 10. Шематски приказ попречног пресека венског крвног суда (89)

Венски крвни судови мањег дијаметра имају функцију акумулације крви док дубоки венски крвни судови већег дијаметра поред способности акумулације имају важну улогу у регулацији протока крви у организму- служе за враћање деоксигенисане крви у срце (90).

Зид венских крвних судова је слабије развијен од артеријског јер је крвни притисак у венама најнижи (Слика 11) и тиме је опасност од пуцања мања. Растегљивост венског зида при повећању трансмуралног притиска (градијента притиска дуж зида крвног суда) је шест до десет пута већа у односу на артеријски зид што омогућава складиштење крви значајне запремине пре настанка високог венског притиска. У венском систему налази се 70 посто укупне запремине крви, с тим да се у свакој ноzi може ускладиштити од 330 до 533 ml крви и према потреби вратити у срце и плућа (нпр. у случају повећане физичке активности). Дубоке вене ногу су смештене између група мишића и у самим мишићима а улога им је враћање деоксигенисане крви у карлицу и даље према десној страни срца.



Слика 11. Графички приказ вредности крвног притиска (mmHg) у крвним судовима (91)

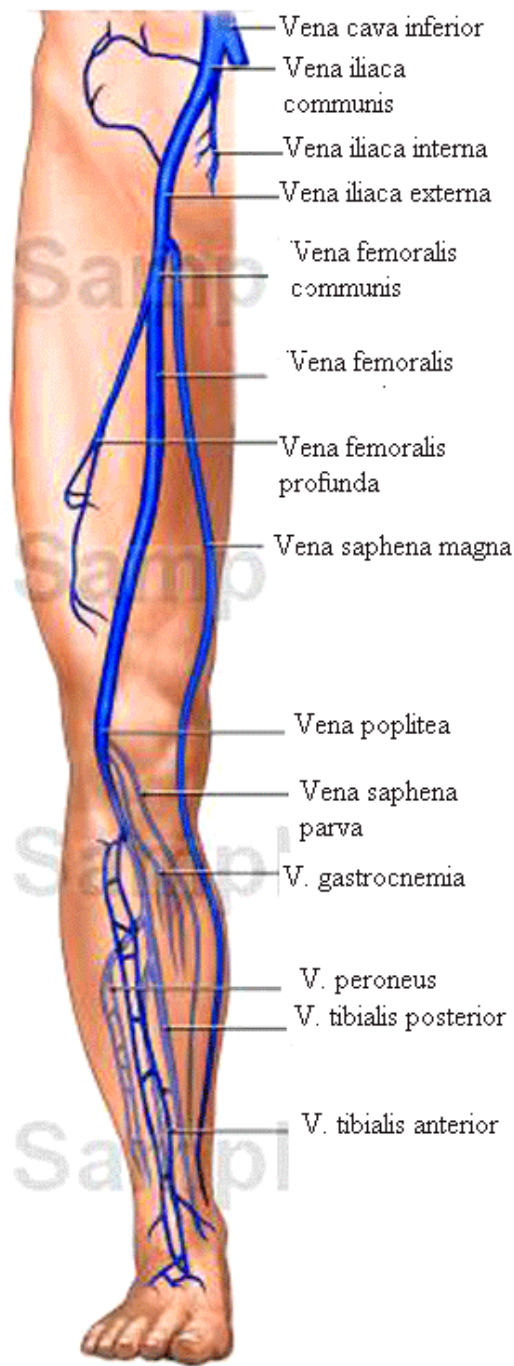
Главне дубоке вене ногу су: вене потколенице- постериорне и anteriорне тибиијалне вене, перонеалне (фибуларне) вене, вене лисног мишића (солеалне вене) и вене двоглавог лисног мишића (вене гастрокнемијуса); коленска (поплитеална) вена и вене натколенице- заједничка бутна (феморална) вена, феморална вена, дубока феморална вена, карличне вене- спољна, унутрашња и заједничка бедрена (илијачна) вена. Лева и десна заједничка бедрена вена се уливају у главну трбушну вену тј. доњу шупљу вену (*vena cava inferior*) (92,93) (Слика 12).

Низак крвни притисак у венама захтева посебне механизме који омогућују нормалан проток крви кроз ове крвне судове (94,95). Проток крви кроз венске крвне судове остварује се под утицајем рада срца, силе гравитације, периферне екстравенске пумпе и венске пумпе. Дејство екстравенске и венске пумпе, као и хидростатички притисак крви у венама и реапсорпција ткивне течности превладавају силу гравитације која се супротставља нормалном току венске крви испод нивоа срца. Периферна екстравенска пумпа је заправо мишићна пумпа и основни је механизам којим се остварује повраћај венске крви ка срцу тако што мишићне контракције врше притисак на вене. Дејство мишићне пумпе омогућава проток крви кроз систем вена ногу који се у нормалним околностима одвија у смеру супротном од смера силе гравитације, као и проток од система површинских вена до система дубоких вена захваљујући венским записцима који дозвољавају ток крви само у том смеру. Током кретања је враћање венске крви поспешено и компресијом венског система стопала. Чине га дубоке, медијалне и латералне плантарне вене које су смештене између мишића стопала и доводе крв до задње тибиијалне вене, али систем укључује и површинске вене горње површине стопала које формирају дорзалну венску мрежу видљиву испод површине коже. Приликом кретања притисак на овај венски систем из којег се испумпава крв ка срцу остварује се деловањем два механизма: покретима мишића ножних прстију и стопала и пребацавањем тежине тела са једног стопала на друго (96).

Мишићна пумпа потколенице и натколенице такође остварује своје дејство током кретања. Мишићи потколенице имају кључну улогу у враћању венске крви у срце.

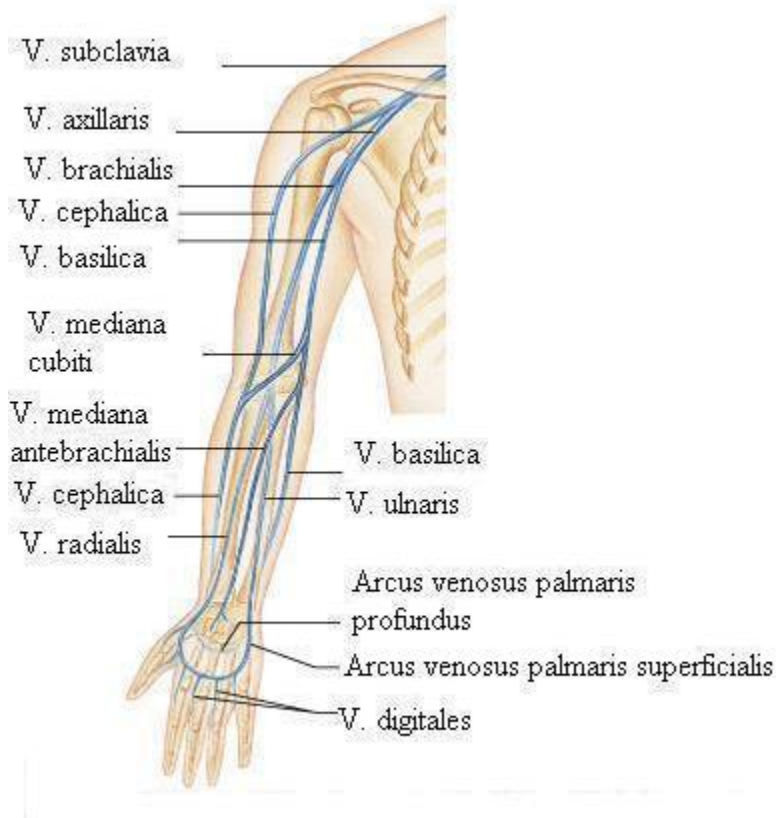
Фасцијална опна мишића потколенице је нерастегљива и стога се током контракције повећава запремина ових мишића и они врше притисак на дубоке вене чији залисци притом усмеравају крв центрипетално, ка срцу. Током контракције проксимални залисци у одређеном венском сегменту се затварају док су дистални отворени тако да се крв истискује у правцу карлице а даљи прилив крви у тај венски сегмент је спречен. Током фазе релаксације мишића проксимални залисци се отварају и крв улази у венски сегмент. На почетку релаксације дистални залисци су затворени али се отварају како се запремина крви и крвни притисак повећавају у том венском сегменту. У овој фази ствара се негативан притисак у дубоким венама што омогућује пражњење површинских вена кроз систем перфорантних вена које пролазе кроз фасцијалну опну и сам мишић до дубоких вена (97).

Проток крви кроз мрежу крвних судова руке (Слика 13) у јединици времена одређују два фактора: градијент притиска од артерија ка венама и отпор мреже крвних судова, пре свега артериола. Количина крви која тече кроз одређену мрежу крвних судова, као и дистрибуција крви у телу, зависи, између осталог, и од контракције глатких мишића крвних судова. Вазкуларни глатки мишић задржава стање делимичне контракције (вазомоторни тонус) јер симпатичка вазоконстрикторна влакна непрекидно одашиљу импULSE који овај тонус одржавају. Вазодилатација се, стога, може индуковати факторима који инхибирају овај основни тонус (97). Вазомоторни центар који покреће симпатички вазомоторни систем се налази у области продужене мождине и понса и преко вагуса емитује парасимпатичке импULSE у срце а симпатичке у готово све крвне судове у телу. У вазомоторном центру постоје вазоконстрикторна, вазодилаторна и сензорна област. Неурони вазоконстрикторне области у кичменој мождини екситују вазоконстрикторне неуроне симпатичког вазомоторног система. Тела нервних ћелија симпатичког вазомоторног система налазе се у грудном и слабинском делу кичмене мождине а шаљу аксоне који пролазе кроз дорзалне коренове и граде синапсе или у ганглијама симпатичког ланца или у придруженим ганглијама. Постганглијски аксони инервишу читав циркулаторни систем изузев капилара, прекапиларних сфинктера и већине метаартериола. Неурони вазодилаторне области инхибишу активност вазоконстрикторне области и тиме узрокују вазодилатацију. Сензорна област прима сиглале преко нерава вагуса и глософарингеуса и контролише и вазоконстрикторну и вазодилаторну област. Области у ретикуларној формацији, хипоталамусу и кори великог мозга могу да активишу или инхибишу вазомоторни центар и утичу на ток крви кроз кардиоваскуларни систем (97). Симпатички вазоконстрикторни нерви луче норадреналин који локално активира екситаторне α_1 и α_2 адренорецепторе глатких мишића крвних судова који узрокују контраховање глатких мишића и вазоконстрикцију. Вазоконстрикција венских крвних судова повећава венски крвни притисак. Норадреналин у мањој мери делује и на β_2 рецепторе и узрокује релаксацију глатких мишића и вазодилатацију. Структуре α_1 и α_2 рецептора доминирају у глатким мишићима вена (као и артериола, бронхија и гастроинтестиналног тракта). Структура β_2 рецептора распрострањена је у глатким мишићима вена, бронхија и артериола (98). Међутим, вазоконстрикторни ефекат симпатичког вазомоторног система је у скелетним мишићима мање изражен у односу на унутрашње органе (98).



Слика 12. Вене ноге (99)

Ендотел лучи низ вазоактивних супстанци које прецизно контролишу активност венске мускулатуре. Најважнији медијатори пореклом из ендотела су: азот-моноксид, затим ендотелни хиперполаришући фактор (EDHF- енг. endothelium derived hyperpolarizing factor), ендотелини и простагландини који имају локално и системско дејство (100). Неки од ових медијатора, пре свега ендотелини, имају локално вазоконстрикторно дејство, а неки вазодилаторно, пре свега азот-моноксид и простагландин PGI₂ који остварује дејство тако што активира ензим гуанилат циклазу, ствара се cGMP (циклични гуанозин монофосфат), долази до активације протеин киназа (PK) које фосфорилишу различите протеине што доводи до пада интрацелуларне концентрације Ca²⁺, релаксације глатких мишића и вазодилатације. Утврђена је повезаност између стимулације α1 и α2 рецептора и ослобађања вазодилатора простагландина PGI₂ који мењају одговор глатке мишићне ћелије на стимулацију ових рецептора (100). Ипак, венска пумпа, односно контраховање венске мускулатуре, има даљеко мањи значај за повраћај венске крви у срце у односу на екстравенску пумпу (101). Кретању крви помаже и пулсирање паравенских артерија које врши притисак на суседне вене чији залисци дозвољавају да се крв креће само у правцу срца (102).



Слика 13. Вене руке (103)

Приликом мишићног рада када је повећано излучивање адреналина сужавају се крвни судови трбушних органа што омогућава отицање веће количине крви у мишиће. Адреналин подједнако делује на α и β_2 рецепторе. Уколико је концентрација адреналина у крви мала, крвни судови скелетних мишића се сужавају, међутим веће концентрације адреналина изазивају ширење крвних судова мишића. Током активности, контракције скелетних мишића руку истискују крв у дубоким венама према срцу а залисци спречавају повратак крви при чему се смањује венски и капиларни притисак у том уду (104). Симпатичка вазоконстрикција се смањује а проток крви се повећава да би се задовољили метаболички захтеви (смањује се притисак се O_2 а повећава CO_2 , снижава се рН, опада концентрација K^+ и KPO_4^{3+} , повећава се концентрација H^+ , аденозин монофосфата, аденозина и NO). Остварује се метаболичка вазодилатација и побољшава повратак венске крви у срце (104).

Површинске вене су смештене испод коже а изнад мишића, у виду мреже и немају улогу у директном усмеравању крви ка срцу. Њихова основна улога је у регулацији телесне температуре и одржавању венског притиска јер се повишен притисак у дубоким венама може регулисати отицањем крви у систем површинских вена (105). Најважније су магистралне површинске вене а повезане су комуникантним венама (106).

3. 1. Поремећаји венске циркулације доњих и горњих удова

Код оштећења залистака (инсуфицијенције валвуларног апарата) нестаје способност спречавања повраћаја крви у смеру гравитације па венска циркулација има супротан смер- рефлукс. Доказано је да је инсуфицијенција валвуларног апарата повезана са инфилтрацијом леукоцита (моноцита, ткивних макрофага, неутрофила и Т- лимфоцита) у залиске и венски зид услед повишеног венског притиска (107, 108).

Инфилтрирани леукоцити ензимски деградирају залиске и венски зид што доводи до оштећења. Крв се задржава у доњим деловима вена а крвни притисак при дуготрајном стајању код оболелих може достићи ниво изнад којег је онемогућено враћање крви у срце, што узрокује несвестицу (109). Ово задржавање крви у тако насталим венским резервоарима је, уз постојање наследне тромбофилије, главни предуслов згрушавања крви односно развоја тромбозе. Тромб релативно брзо расте целом дужином екстремитета а неретко захвати и бедрене вене на истој страни. Тромбови који настају у дубоким венама доњих екстремитета и бедреним венама су најчешћи узрок ПЕ (110).

Површинске вене услед инсуфицијенције валвуларног апарата постају варикозне-проширене и вијугаве. У тежим случајевима варикозитети, као и инсуфицијенције дубоких и перфорантних вена, се компликују настанком венског чира (111). Застој крви (веностаза) манифестује се као оток (едем) ногу. Када се поремети притисак крви у венама, значајно већи притисак у венама (у односу на артерије) доводи до трансудације (излива) и накупљања течности у ткивима због истискивања из циркулације. Фибриноген из капилара се у виду наслага талози перикапиларно и блокира транспорт кисеоника и

нутријената у ткиво што изазива хипоксију и одумирање ткива услед чега настаје отворена рана (венски чир, венски улкус) (112, 113).

Дуготрајно стајање и наследни фактори, као и хормони утичу на настанак и развој примарне венске инсуфицијенције- венске дисфункције услед ненаследне инсуфицијенције валвуларног апарата и слабости венског зида (114). Секундарна венска инсуфицијенција се дијагностикује када је познат узрок дисфункције и деструкције залистак и најчешће је то ТДВ (115).

ТДВ горњих екстремитета је такође значајан клинички проблем са сталним порастом морбидитета. Примарна се карактерише или као идиопатска или као тромбоза услед физичког напора (Paget-Schroetter синдром). Идиопатска нема познат узрок али у неким случајевима се код ових пацијената утврди присуство до тада неоткривеног карцинома (најчешће карцинома плућа или лимфома) (116). Paget-Schroetter синдром се, у највећем броју случајева, развија у доминантној руци после изражене физичке активности код иначе здравих млађих особа. Велики напор проузрокује мала оштећења на слоју *tunica intima* у венама што активира коагулациону каскаду. При поновљеним повредама венског крвног суда, нарочито уз присуство механичког притиска, развија се тромбоза (116). Хроничан механички притисак присутан је код пацијената са сужењем горњег отвора грудног коша, код којих се неретко развија екстензивна тромбоза поткључне или аксиларне вене (117). Сужење је често обострано. Вена је притиснута од стране првог ребра и хипертрофисане тетиве скаленског или поткључног мишића, или између ових тетива, или, у неким случајевима, између кључне кости и цервикалног ребра. Постоје и случајеви са урођеном делимичном оклузијом вене (114).

Секундарна ТДВ горњих екстремитета развија се након постављања интравенског катетера или пејсмејкера или услед притиска изазваног постојањем карцинома у подручју главе и врата (115). Испитивање присуства поремећаја коагулације код пацијената са тромбозом дубоких вена горњих екстремитета се препоручује у случајевима када је тромбоза идиопатска или када у личној или породичној историји постоји појава ТДВ. Основни ризик тромбозе у овом подручју је такође ПЕ али је ретко са смртним исходом. Тромбоза дубоких вена горњих екстремитета се у последњих неколико деценија јавља са све већом учесталости због коришћења централних венских катетера за хемотерапију, трансплантацију коштане сржи, дијализу и парентералну исхрану (114).

3. 2. Фактори ризика за настанак ТДВ

У другој половини XX века тзв. Вирховљев тријас (назван по др Рудолфу Вирхову који се бавио теоријским и практичним проучавањем поремећаја венске циркулације у XIX веку) а који обухвата: оштећење ендотела крвног суда, повећану коагулацију и венску стазу (успорен проток венске крви) био је основа за тумачење патогенезе венског тромбоемболизма а и данас је у широкој примени у процени ризика за настанак овог обољења. Успорен проток крви омогућава локално накупљање фактора коагулације и смањује доток природних антикоагуланаса циркулишуће крви. Напредак у молекуларној биологији и открића на пољу патофизиологије довела су до проширења броја узрочника које треба испитати обухватајући улогу самог ендотела, тромбоцита и сваког фактора коагулације понаособ у настанку тромбозе (118). Поред до сада описаних урођених и

стечених тромбофилија постоје и други, додатни фактори ризика који могу бити пролазног и трајног карактера. У трајне факторе се убрајају: узрапредовала старост, гојазност, претходне тромбозе, у току хормонална терапија која садржи естроген или прогестаген (орални контрацептиви и хормонска супституција у менопаузи), пушење и непокретност.

Бројне студије су указале на повезаност повећања вероватноће за настанак тромбозе са старашћу. Ризик се повећава већ у доби од 40 година а готово да се удвостручава у свакој наредној деценији због појаве додатних фактора ризика као што су промене у зиду крвних судова и саставу крви, као и смањење покретљивости. Стога, процена ризика повезаног са старашћу заснована искључиво на основу тога да ли је особа старија од 40 година не узима у обзир значајно повећање ризика са узрапредовалом старашћу (119).

Гојазност доприноси настанку великог броја обољења, између осталог и венског тромбоемболизма. Гојазним се сматрају особе мушког и женског пола са индексом телесне масе (BMI) од најмање 30 kg/m^2 . Истраживања су недвосмислено показала да је код гојазних особа ризик за настанак ТДВ више него двоструко већи него код особа нормалне телесне масе (BMI 20 to $24,9 \text{ kg/m}^2$). Има више механизма којима се објашњава утицај гојазности на настанак тромбоза а један од њих је физички ефекат масноће у телу који отежава повратак венске крви у срце. Гојазне особе имају хронично повишен интраабдоминални притисак а смањена физичка активност доприноси смањењу брзине протока крви у бутним венама. Такође, масно ткиво лучи протеине адипокине од којих је најзначајнији лептин чија је главна улога у регулисању телесне тежине. Показано је да лептин доприноси агрегацији тромбоцита индукованог аденозин- дифосфатом. Лептин такође индукује активацију гена за PAI-1 који у повишеној концентрацији спречава фибринолизу. Фактор некрозе тумора α (TNF α) и трансформишући фактор раста β (TGF β) синтетисани у масном ткиву такође стимулишу синтезу PAI-1 (120, 121).

Гојазност сама по себи узрокује покретање запаљенских процеса у метаболичким ткивима и повећану синтезу фактора VII, VIII, фибриногена и фон Вилебрандовог фактора а код гојазних особа утврђен је и повишен ниво tPA (122). Повишен ниво фактора VIII и фибриногена значајно повећавају вероватноћу за настанак венског тромбоемболизма. Повећано стварање фибрина, агрегација тромбоцита и повећана вискозност крвне плазме у садејству доприносе стварању тромба. Неколико истраживања је показало да смањење телесне тежине, било услед повећане физичке активности или услед правилне исхране, доводи до смањења концентрације фактора VII, VIII и tPA до нормалног нивоа док је смањење концентрације фибриногена благо и региструје се тек при просечном смањењу телесне масе за око 13,6 kg (123).

Хормоналну терапију у менопаузи и орална контрацептивна средства користи велики број жена у читавом свету. Још од шездесетих година двадесетог века познато је да узимање женских полних хормона повећава ризик од венске тромбозе, možданог и срчаног удара. Овај ризик је и даље присутан и при коришћењу савремених нискодозних оралних контрацептива који заправо представљају најчешћи узрок ТДВ код младих жена. Ризик је већи у првој години коришћења (просечно се код једне од 1000 жена јави ТДВ) при коришћењу прогестагена треће генерације (дезогестрел, гестоден) и код жена код којих је утврђено постојање тромбофилије. Прогестагени друге генерације (нпр. левоноргестрел) носе двоструко мањи ризик за настанак ТДВ у односу на прогестагене треће генерације код жена старијих од 24 године. Код млађих жена, старости 20- 24

године ризик је четири пута мањи а код жена млађих од 20 година чак 7 пута мањи у односу на прогестагене треће генерације (124).

Хормонална супституција у менопаузи такође повећава ризик за настанак ТДВ, нарочито код жена са тромбофилијом у првих неколико година коришћења (124).

Савремена истраживања показују да је пушење фактор ризика за развој бројних обољења са смртним исходом. Пушачи и бивши пушачи имају око 1,5 већи ризик од настанка ТДВ у односу на непушаче, што се сматра умереним ризиком. У процени ризика од настанка неке болести повезаног са пушењем користи се индекс укупне изложености дуванском диму, тзв. пушачке године или укупан пушачки стаж (енг. pack- years).

$$\text{пушачке године} = \frac{\text{број цигарета дневно}}{20} \times \text{године пушења}$$

Већи број пушачких година код младих пушача носи већи ризик од настанка ТДВ. Млади са 20 пушачких година стажа изложени су око 4 пута већем ризику у односу на младе непушаче. Жене пушачи које користе орална контрацептивна средства имају преко 8 пута већи ризик у односу на жене непушаче које их не користе. Пушачи који су и носиоци FV Leiden мутације имају око 5 пута већи ризик а удружено дејство пушења и FII G 20210 A мутације повећава ризик око 6 пута у односу на непушаче који нису носиоци ових мутација (125).

Непокретност се такође сматра независном фактором ризика за настанак венских тромбоза. У студији Гибса и сар. (126) код 15% оболелих који су били везани за кревет мање од недељу дана пре смрти нађена је ТДВ приликом обдукције, а чак код 83% оболелих који су за кревет били везани дуже од недељу дана пре смрти. Утицај непокретности на настанак ТДВ упечатљив је код оболелих од можданог удара са парализом удова. Постоје подаци да ТДВ настаје у око 60% парализованих удова код ових пацијената, у односу на само 7% покретних удова код истих (127).

Последњих година утврђен је и пролазни ризик повезан са дуготрајним авионским летовима- тзв. „синдром економске класе”. Око 10% особа које проведу у авиону најмање 8 часова непрекидно, а притом не носе еластичне компресивне чарапе у циљу спречавања застоја у венској циркулацији, развију асимптоматску ТДВ. Ово је утврђено приликом истраживања где је коришћена доплер ехосонографија приликом прегледа путника након дуготрајних летова (128). У истом истраживању постојање ТДВ није утврђено ни код једне особе која је користила превентивни компресивни третман. Поред овог вида превенције, током дугих летова саветује се често покретање ногу и уношење довољних количина течности (129).

Трудноћа и период од 6 недеља након порођаја такође носе пролазни ризик за настанак ТДВ. Током трудноће коагулациони и фибринолизни систем се мењају тако да доводе до настанка стечене тромбофилије. Ово стање има заштитну улогу у виду смањења ризика од настанка тешких крварења током порођаја али са друге стране повећава ризик од настанка венског тромбоемболизма (4). Потврђен је значајан пораст нивоа бројних фактора коагулације: FVII, FVIII, FIX, FX, FXII, фон Вилебрандовога фактора и фибриногена са максимумом у периоду око термина порођаја. Ова појава повезана је са повећањем нивоа фрагмената протромбина 1+2 и тромбин- антитромбин комплекса.

Долази и до смањења нивоа и активности протеина С а у великом броју случајева и до развоја стечене АРС резистенције. Током трудноће је и снижена укупна фибринолитичка активност али се после порођаја брзо враћа на нормалан ниво а у плазми се може детектовати и инхибитор урокиназе PAI- 2 (енг. plasminogen activator inhibitor type- 2) који се синтетише у ћелијама постелице и излучује се једино у трудноћи и код присуства неких облика леукемије и упала. Максимум коагулационе активности у време порођаја повезује се са одлубливањем и истискивањем постелице и ослобађањем ткивног фактора са места одлубливања што је одговор на нагли губитак извесне количине крви (4, 130). Нивои протеина коагулационог и фибринолизног система у плазми се враћају на нормалне вредности у року од неколико недеља, с тим да ниво слободног протеина С остаје снижен а ниво фрагмената протромбина 1+2 повишен и до 8 недеља након порођаја (4).

Последњих година се скреће пажња и на присуство инфекције као независног фактора ризика за настанак ТДВ. Показано је да се у прве две недеље након инфекције уринарног тракта двоструко повећава вероватноћа за настанак овог обољења и затим постепено опада да би се након годину дана вратила на основни ниво. Респираторне инфекције такође значајно повећавају ризик од настанка ТДВ у прве две недеље, тако да се ове инфекције сврставају у пролазне факторе ризика (131).

Општеприхваћен начин квантификације ризика за настанак ТДВ је тзв. Велсов скор (енг. Wells score) при чему се додељује одређен број бодова свакој присутној карактеристици оболелог (Табела 1). Што је укупан збир виши, већа је могућност за настанак ТДВ. Укупан збир може бити између -2 и 9. Ако је укупан збир мањи од 2, то указује да, у тренутку испитивања, не постоји могућност за појаву ТДВ, док сваки збир већи од 2 указује на вероватну ТДВ.

Табела 1. Велсов скор

Клиничке карактеристике	Број поена
Малигнитет (најмање 6 месеци од почетка онколошке терапије или присутна палијативна терапија)	1
Отеченост листа ноге за најмање 3 cm у односу на асимптоматски или незахваћен уд	1
Присуство колатералних површинских неварикозних вена	1
Присуство тачкастог едема захваћеног уда	1
Оток целе ноге	1
Локализована осетљивост ноге дуж захваћеног венског система	1
Парализа, пареза или недавна имобилизација доњих удова гипсом	1
Везаност за кревет најмање 3 дана или велике операције у претходних 12 недеља уз примену опште или регионалне анестезије	1
Постојање претходне тромбозе у личној анамнези	1
Могућност постављања алтернативне дијагнозе која је барем једнако вероватна колико и ТДВ	-2

1. 4. Дијагностика и терапија ТДВ

Приликом згрушавања крви долази до стварања фибринске мреже која стабилизује тромбоцитни чеп. Сам фибрин делује као покретач процеса фибринолизе. Фибринске нити везују tPA што га преводи у активни облик који катализује претварање плазминогена у плазмин. Створени плазмин даље разграђује фибриноген и фибрин, при чему је разградња фибрина спорија. Разградњом фибриногена и фибрина настаје фрагмент X. На фрагмент X пореклом од фибриногена (али не и на онај пореклом од фибрина) делује тромбин тако

што узрокује његову полимеризацију. Даљим деловањем плазмина на фрагмент X настају фрагменти Y и D који имају јак антиполимеризујући ефекат и спречавају даље згрушавање (132,133). Фрагмент Y се разлаже на фрагменте D и E који су крајњи производи разградње фибриногена и називају се маркери примарне фибринолизе јер представљају показатеље фибринолитичке активности којој не мора да претходи тромботичка активност. Разградња полимеризованог фибрина је спорија од разградње фибриногена и нестабилног фибрина јер се стварају комплекси фибринских мономера који су отпорни на протеолитичко дејство плазмина. С друге стране, фрагменти D и E се организују тако да се прво формира D- димер, који настаје везивањем два D фрагмента а потом се формира комплекс D- димера и E фрагмента везаних нековалентним везама. Ови фрагменти се називају FbDP- производи деградације фибрина (енг. fibrin degradation products) и, заједно са D- димером, представљају показатеље фибринолитичке активности којој претходи тромботичка активност (134).

Одређивање концентрације D- димера примењује се када је потребно хитно дијагностиковати ТДВ или плућну емболију. Повишен ниво D- димера није специфичан за тромбозу већ је показатељ повећане коагулације *in vivo* уопште, тако да се користи као помоћни метод у сврху искључивања ТДВ (132). За одређивање D- димера се користе имунолошке методе са специфичним моноклонским антителима: ELISA, ласерска нефелометрија и турбидиметрија. У нашем истраживању користили смо имуно-турбидиметријски метод а мерења су вршена на BCS XP System инструменту (Siemens, Ерланген, Немачка). Вредности изнад 230 ng/ml су сматране повишеним. Да би се вредности D- димера истог пацијента поредиле препоручује се да се одређују истом методом а од 2006. године постоји и модел хармонизације вредности D- димера чиме се повећава слагање резултата добијених различитим методама. Клиничка слика ТДВ није довољно специфична да би се само на основу прегледа могла поставити дијагноза.

ТДВ доњих удова обично настаје у венским синусима лисног мишића и у тренутку настанка је без симптома. Може да се прошири на друге потколоне вене, бутне вене, карличне вене и доњу шупљу вену (134). Клинички преглед доњих удова подразумева упоредно посматрање постојања отока, модре пребојености коже, варикозитета, осетљивости отока и осетљивости листа на притисак или савијање стопала према потколеници (Хомансов знак).

Клинички преглед горњих екстремитета подразумева поређење изгледа болесне и здраве руке, уз слушање, додир и преглед пазушних јама. Ултразвучни преглед најчешће се врши применом доплер ехосонографије (енг. color doppler duplex scan) која има високу осетљивост и специфичност код натколених ТДВ, док је код потколених, уз високу осетљивост, специфичност мања. Да би се вене овим прегледом окарактерисале као нормалне морају имати пет обележја: спонтаност, фазичност, Валсалва одговор, аугментација приликом дисталне компресије и усмереност протока у правцу срца. Спонтаност венског протока проверава се узимањем у обзир промена протока због дисања и притиска руком на мишиће у току прегледа. Увек се пореди венски проток у оба уда јер смањен проток у једном уду указује на ефекат посттромботских промена. Респираторна фазичност је приметна у нормалним натколеним венама и подразумева промену брзине протока крви са дисањем. Валсалва одговор проверава функционалност залистака дубоких вена. При дубоком удисају болесника увучени трбушни зид притиска доњу шупљу вену и бедрене вене и зауставља проток крви. При издисају проток се наставља у истом смеру. Ако су залисци оштећени при удисају се проток не зауставља већ је обрнут (венски

рефлукс). Аугментација се односи на повећање брзине протока крви са притиском на доњи део уда или престанком притиска на горњи део уда. Посттромботске неправилности констатују се ако је вена потпуно или делимично некомпресибилна, ако се уочавају хиперехогене зидне калцификације или фиброзне формације у лумену вене (135).

Контрастна венографија (флебографија) је рендгенолошки метод приказивања венских крвних судова уз примену контрастног средства. Најпрецизнија је метода за процену стања вена горњих и доњих удова али се (у односу на доплер ехосонографију) ретко примењује због ризика од компликација услед излагања оболелог зрачењу и употребе јонизованог контрастног средства.

Терапија ТДВ је антикоагулантна или тромболитичка. Антикоагулантна терапија се најчешће спроводи применом стандардних, нефракционисаних хепарина (UFH) и нискомолекуларних хепарина (LMWH) током првих 5 до 7 дана, односно до ишчезавања отока и пораста протромбинског времена у вредности најмање 1,5 пута већој од контролне. Не препоручује се примена хепарина у случају постојања активног крварења, неурохируршке операције и тромбоцитопеније. Орална антикоагулантна терапија обухвата деривате кумарина (етилбискумацетат, аценокумарол, фенпрокумон, варфарин-натријум) и инданциона (фениндион). Обично се уводи након 3 до 5 дана по увођењу хепарина да би се спречила поновна тромбоза или плућна тромбоемболија (9). Орални антикоагуланси су антагонисти витамина К који је кофактор ензима γ -глутамил-карбоксилазе. Овај ензим учествује у синтези протромбина и фактора VII, IX и X тако да орални антикоагуланси своје дејство остварују тако што спречавају синтезу ових фактора коагулације. Оптимално трајање терапије оралним антикоагулансима након тромбозе представља равнотежу између ризика од рецидива тромбозе по завршетку терапије и ризика од крварења услед продужене антикоагулантне терапије. Ризик од рецидива зависи од бројних фактора чија је заступљеност код сваког пацијента различита. Код пацијената код којих је тромбоза повезана са деловањем пролазног фактора ризика (нпр. операције, пролазног обољења, стања принудне непокретности и др.) орална антикоагулантна терапија би могла бити ограничена на три месеца по престанку деловања тог фактора. Код пацијената са присуством трајног фактора ризика, тромбофилије или са тромбозом непознатог узрока препоручује се дужа примена оралне антикоагулантне терапије. Код пацијената са тромбозом непознатог узрока примена оралне антикоагулантне терапије током 12 месеци значајно смањује вероватноћу рецидива. Након овог периода (у неким случајевима већ након 6 месеци) препоручује се смањење дозе. Прелазак на оралну антитромбоцитну терапију која не захтева стално лабораторијско праћење и не носи ризик од крварења у дозама до 103 mg дневно у пракси се показао као неефикасан у превенцији рецидива тромбозе (9,136). У случају постојања тромбофилије разликује се терапијски приступ у односу на врсту. Хетерозиготни носиоци FV Leiden мутације без придружених тромбофилија обично се након прве тромбозе третирају као пацијенти са тромбозом непознатог узрока. У случају присуства FV Leiden мутације у хомозиготном облику, удруженог присуства FV Leiden и FII G 20210 А мутације (137,138), постојања антифосфолипидног синдрома, недостатка АТ, протеина Ц и протеина С препоручује се примена оралне антикоагулантне терапије током најмање 12 месеци или чак неограничено дуго, уз редовне лабораторијске контроле. Уколико је настанак тромбозе повезан са деловањем трајног фактора ризика орална антикоагулантна терапија се примењује неограничено дуго (више година а у неким случајевима и доживотно) а уколико дејство трајног фактора престане требало би наставити са овом терапијом још најмање 6 месеци

(нпр. препоручује се укидање терапије 6 месеци након последње детекције антифосфолипидних антитела у крви пацијената код којих је у време прве тромбозе дијагностикован антифосфолипидни синдром) (9,136). Уколико вена захваћена претходном тромбозом није у потпуности реканализана након обустављања антикоагулантне терапије, рецидиви тромбоза се јављају у већем проценту. Повишене вредности D- димера у току 3 до 4 недеље по обустављању антикоагулантне терапије су такође често запажене код пацијената са рецидивима тромбоза. На основу ових података препоручује се обустављање антикоагулантне терапије само у случајевима потпуне реканализације крвног суда и ако се притом вредности D- димера у последњих месец дана налазе у граници нормале. Орална антикоагулантна терапија се у трудноћи не препоручује због штетних утицаја на развој ембриона. Код трудница лечење треба почети најкасније 24h од настанка тромбозе. У случајевима свеже натколоне тромбозе, не старије од 24h, примењује се оперативно уклањање тромбних маса из вена. У трудноћи се такође примењује терапија хепаринским антикоагулансима (139).

Присуство других обољења, начин исхране и узимање алкохола и неких лекова и препарата утичу на дејство оралних антикоагуланаса што се узима у обзир приликом одређивања терапије.

Тромболитичка терапија има за циљ разградњу угрушка пре него што би могло да дође до његовог померања и настанка плућне емболије. Ова терапија обухвата примену стрептокиназе, урокиназе или tPA који претварају плазминоген у плазмин који разлаже фибрин. Тромболитици се препоручују код масивне натколоне тромбозе због повишеног ризика од крварења. Примена tPA носи најмањи ризик јер tPA има већи афинитет за плазминоген у присуству фибрина у односу на циркулишући плазминоген.

Компресивни третман у виду градуисане еластичне бандаже (еластичних завоја и чарапа) се такође примењује као помоћна терапија у виду спречавања свих облика акутног и хроничног венског застоја (139).

1. 5. Наследна тромбофилија и појава поновљених ТДВ (рецидива)

Иако је вероватноћа настанка рецидива тромбозе највећа у првих 6 месеци, постоји и по истеку тог периода али се смањује са повећањем временског интервала од тромбозног инцидента (137). Укупна учесталост рецидива венског тромбоемболизма код пацијената након годину дана од тромбозног инцидента је 13%, након две године 17%, након пет година 23% и након десет година 30%. Пацијенти који имају тромбозу непознатог узрока, затим они код којих је тромбоза повезана са трајним фактором ризика (нпр. присуство

малигне болести) и пацијенти са тромбофилијом имају већи ризик од рецидива у односу на пацијенте код којих је утврђено деловање пролазног фактора ризика.

Малигни тумори повећавају вероватноћу раног рецидива, док су, поред овог, независни фактори ризика за касни рецидив године старости, повећање телесне масе, антифосфолипидни синдром, недостатак антитромбина, протеина Ц или протеина С (138). Повишена вредност D- димера након повлачења антикоагулантне терапије (139), као и проксимална локализација тромбозе су такође повезане са високим ризиком, док непокретност не представља независни фактор ризика за рецидив тромбозе (140, 141, 142). На основу до сада познатог утицај присуства FII G 20210 A мутације, као и присуства FV Leiden мутације, на настанак рецидива тромбоза је благ- ни једна од ових мутација није сама по себи основа за продужење антикоагулантне терапије (143). Међутим, удружено присуство FII G 20210 A и FV Leiden мутације код пацијената код којих у време прве тромбозе није утврђено садејство пролазног фактора ризика носи два до три пута већи ризик од рецидива тромбоза у поређењу са пацијентима код којих је утврђено само присуство FV Leiden мутације (144).

У досадашњим студијама је утврђено да одређивање нивоа хомоцистеина у плазми има већи значај у превенцији тромбозе и терапији тромбозних компликација него одређивање присуства С 677 Т и А 1298 С мутација у MTHFR гену. Такође, до сада није уочена значајна разлика у нивоу хомоцистеина код пацијената са једним тромбозним инцидентом у односу на оне са рецидивом тромбозе (56).

2. Радна хипотеза и циљ истраживања

На основу досадашњих сазнања о улози коју наследне тромбофилије имају у настанку венског тромбоемболизма извесно је да су особе код којих је утврђено присуство мутација повезаних са наследном тромбофилијом (тромбофилних мутација) ризична категорија за појаву ТДВ.

2. 1. Претпоставке на којима се заснива истраживање

- Тромбофилне мутације имају значајно већу учесталост међу болесницима са тромбозом дубоких вена у односу на популацију здравих особа.
- Изолована ТДВ је значајно чешћа код болесника са FV Leiden мутацијом а ТДВ компликована са ПЕ је значајно чешћа код болесника који имају друге испитиване тромбофилне мутације у геному.
- Ризик за настанак ТДВ није исти за све испитиване тромбофилије.
- Постојање удружене тромбофилије је повезано са појавом ТДВ раније у животном добу у односу на појединачне тромбофилије.
- Постојање удружене наследне тромбофилије повезано је са понављањем тромбозног процеса.

2. Циљеви истраживања

Испитивање маркера тромбофилије код болесника са тромбозом дубоких вена имало је следеће циљеве:

- Утврђивање учесталости тромбофилних мутација код болесника са венским тромбоемболизмом и код здравих особа у популацији Војводине.
- Испитивање повезаности тромбофилних мутација са локализацијом тромбозе и појавом ПЕ.
- Утврђивање разлике у времену појављивања ТДВ између оболелих са присуством појединачне и удружене тромбофилије.
- Утврђивање учесталости удружене тромбофилије код оболелих и здравих особа и њен утицај на понављање тромбозног процеса у односу на појединачне тромбофилије.
- На основу добијених резултата утврђивање у којим случајевима је потребно извршити генетичко испитивање тромбофилије ради одређивања врсте и трајања антиромбозне терапије.

Испитивање присуства мутација повезаних са наследном тромбофилијом код болесника са клинички манифестном појачаном склоношћу ка згрушавању крви се у последњих шест година врши у Центру за судску медицину, токсикологију и молекуларну генетику и Центру за лабораторијску медицину Клиничког центра Војводине. Међутим, још увек не постоје конкретни подаци о улози ових мутација у настанку ТДВ у популацији Војводине.

3. Материјал и методе испитивања

Испитивањем је обухваћено 185 оболелих особа које су имале потврђену ТДВ и 121 здрава особа. Након искључења испитаника код којих је утврђено постојање лупусног антикоагуланса или неког поремећаја хемостазног механизма, испитаника који узимају лекове са утицајем на хемостазни механизам (кортикостероиди, хиполипемиси, анаболици), испитаника који болују од малигнух или мијелопролиферативних болести, испитаника који болују од душевних болести, испитаника који болују од болести јетре и бубрега и испитаника који болују од аутоимуних болести- испитивана група оболелих је садржала 175 особа. Испитаници су се лечили у Служби за превенцију тромбоза Одељења за тромбозу, хемостазу и хематолошку дијагностику Центра за лабораторијску медицину, на Клиници за васкуларну хирургију и Клиници за неурологију Клиничког центра Војводине у периоду од 2009. до 2013. године.

Финална контролна група је обухватала 115 клинички и лабораторијски здравих особа које никад нису доживеле тромбозни инцидент и које су одабране тако да се контролна група поклапа са групом оболелих по полу.

Дијагноза тромбозе је била постављена од стране специјалисте васкуларног хирурга, пулмолога или неуролога и верификована Color doppler duplex scan ултразвуком, флебографијом, магнетном резонанцом или компјутеризованом томографијом. Дијагноза је постављена Color doppler duplex scan- ом код свих испитаника (осим код једне испитанице где је дијагноза постављена на основу клиничке слике).

Лабораторијска дијагностика тромбофилије коагулационим методама рађена је најмање три месеца након акутне фазе тромбозе, обично по укидању антикоагулантне терапије услед њеног утицаја на снижење вредности слободног PS антигена и активности протеина Ц. Узорци крви за испитивање тромбофилних маркера су добијени пункцијом кубиталне вене уз коришћење антикоагуланса 3,2% тринатријум- цитрата у односу 1:9. Цитратна плазма за коагулационе тестове је одвајана након центрифугирања на 2500 обртаја у трајању од 15 минута. Сви коагулациони тестови су рађени помоћу апарата ACL серије произвођача Instrumentation Laboratory (IL), Милано, Италија.

Испитивани су следећи лабораторијски параметри:

- Одређивање резистенције на активисани протеин Ц
- Активисано парцијално тромбопластинско време
- Протромбинско време
- Тромбинско време
- Број тромбоцита
- Лупусни антикоагуланс
- Антикардиолипинска антитета
- Анти $\beta 2$ GPI антитета

- Антитромбин- активност
- Протеин Ц- активност
- Протеин С- мерење вредности слободног PS антигена
- Ниво FVIII
- Ц- реактивни протеин (CRP)
- Ниво протромбина
- Ниво хомоцистеина
- Детекција мутација FII G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FV G1691A

3. 1. Лабораторијска дијагностика резистенције на активисани протеин Ц

Дијагностика резистенције на активисани протеин Ц се заснива на одређивању парцијалног активисаног тромбопластинског времена (аРТТ) испитиване плазме са и без додатог активисаног протеина Ц. Активисани протеин Ц протеолитичком разградњом FVa и FVIIIа узрокује продужење времена коагулације у аРТТ тесту у односу на аРТТ без додатог активисаног протеина Ц. Продужење аРТТ након додатка активисаног протеина Ц је барем двоструко веће у односу на аРТТ без додатка APC. Уколико из било ког разлога активисани протеин Ц не разграђује FVa или FVIIIа или их разграђује спорије него што је нормално, време коагулације одређено аРТТ тестом је скраћено, односно изостаје очекивано продужење времена коагулације.

У истраживању је за дијагностику APC резистенције употребљаван модификовани тест Factor V leiden APC resistance поменутог произвођача IL.

Комерцијални кит се састоји из:

- Реагенса за аРТТ
- Фактор V дефицитарне плазме
- Активисаног протеина Ц
- Калцијум хлорида
- APC нормалне контролне плазме
- APC абнормалне контролне плазме

Након разблаживања испитиване плазме са FV дефицитарном плазмом у односу 1:4 уради се аРТТ без активисаног протеина Ц и са додатком активисаног протеина Ц. Резултат овог теста се изражава као однос два времена коагулације, односно као однос (Ratio) аРТТ са APC и аРТТ без APC:

$APC-R = \frac{\text{аРТТ испитиване плазме са APC}}{\text{аРТТ испитиване плазме без APC}}$

Да би резултат овог теста био поуздан, базални аРТТ испитивање плазме треба да је нормалан. Уколико је базални аРТТ продужен због присуства лупусног антикоагуланса, терапије хепарином, постојања дефеицита чинилаца коагулације, било урођених или стечених, дијагностика резистенције на активисани протеин Ц се врши помоћу модификованог теста. Модификовани тест подразумева разблаживање испитиваног узорка плазме FV дефицитарном плазмом чиме се нормализује концентрација недостајућих чинилаца коагулације, повећава осетљивост теста и омогућава извођење теста код болесника који узимају антикоагулантну терапију. Уколико је продужење аРТТ

узроковано присуством ЛА или хепарина некада је довољно урадити модификовани тест, а у неким случајевима се пре тестирања резистенције на АРС мора извршити неутрализација хепарина или лупусног антикоагуланса у испитиваној плазми. Нормалне вредности АРС- R су преко 2,20 мада се вредности између 2,20 и 2,45 сматрају граничним. Код свих испитаника код којих је добијена вредност испод 2,45 анализа је понављана након поновног вађења крви и уколико је налаз био патолошки урађено је генетичко испитивање постојања мутације FV Leiden.

3. 2. Лабораторијска дијагностика антифосфолипидног синдрома

У истраживању је за дијагностику антифосфолипидног синдрома утврђивано присуство лупусног антикоагуланса, ниво антикардиолипинских антитела и антиβ2 гликопротеин I антитела.

3. 2. 1. Утврђивање присуства лупусног антикоагуланса

За детекцију лупусног антикоагуланса коришћени су следећи тестови:

- АРТТ тест помоћу два различита реагенса високе осетљивости на присуство ЛА: IL АРТТ- SP (Liquid) и IL Synthasil, за одређивање АРТТ
- dRVVT (енг. dilute Russell's Viper Venom Time) тест помоћу LAC Screen i LAC Confirm реагенаса који садрже разблажени Russel змијски отров. У основи теста је одређивање времена коагулације. LAC Screen је "скрининг" тест а LAC Confirm је потврдни тест.
- IL SCT – Silica Clotting Time који садржи "скрининг" реагенс и потврдни реагенс за одређивање лупусног коагуланса: SCT Screen i SCT Confirm.

Испитаници код којих је утврђено постојање лупусног антикоагуланса су искључивани из студије.

3. 2. 2. Одређивање нивоа антикардиолипинских антитела и антиβ2 гликопротеин I антитела

Лабораторијска дијагностика антикардиолипинских антитела и антиβ2 гликопротеин I антитела је обављена на Одељењу за имунолошку дијагностику, Клинике за интерне болести Клиничког центра Војводине. Дијагностика се заснива на ELISA техници а користи се тест Euroimmun Microplate ELISA произвођача Medizinische Labordiagnostika AG (Lübeck, Germany). Тест се заснива на употреби одређеног антигена за који се везују антитела из серума испитаника. Затим се везана антитела детектују анти-људским антителима обележеним пероксидазом. На крају се везана антитела боје коришћењем раствора хромоген/ супстрат. Интензитет произведене боје је пропорционалан концентрацији антитела у испитиваном серуму. Код болесника са позитивним лупусним антикоагулансом ризик за настанак тромбозних компликација је већи у односу на оне са позитивним имунолошким тестовима за детекцију антикардиолипинских антитела (145). Није утврђено постојање непосредне повезаности између тромбоемболијске болести и

нивоа (висине титра) антикардиолипинских антитела (146). Испитаници код којих је утврђено постојање антикардиолипинских антитела су искључивани из студије.

3. 3. Одређивање нивоа фактора VIII

Ниво фактора VIII одређиван је коагулационом методом заснованом на аРТТ реагенсу произвођача IL Италија, аутоматским коагулометром ACL 200.

Принцип анализе је да у сувишку свих осталих чинилаца коагулације (који су садржани у реагенсу за одређивање FVIII), време коагулације испитиване плазме зависи од нивоа FVIII у испитиваној плазми. Продужење времена коагулације је обрнуто пропорционално нивоу испитиваног фактора. Нормалне вредности FVIII су 50- 150 U/ ml.

3. 4. Одређивање нивоа Ц- реактивног протеина (CRP)

CRP је реактант акутне фазе, који је код већине здравих особа присутан у серуму у врло ниским концентрацијама. Серумске концентрације CRP- а постају повишене као одговор на многе запаљенске реакције, повреде ткива и вирусне и малигне неоплазије. Ниво CRP одређиван је имунотурбидиметријском методом на аутоматском биохемијском анализатору Architect с8000 произвођача Abbott Laboratories Diagnostic Division (Eden Prairie, Minnesota). Овом методом се квантитативно одређује CRP у узорку. Принцип анализе је латекс- аглутинација између CRP у узорку и покиклонског анти-CRP антитела апсорбованог на латекс- честице. Аглутинација се детектује променом апсорбанције која је сразмерна количини CRP у узорку. Промена апсорбанције се мери на 572 nm а актуелна концентрација се добија интерполацијом са калибрационе криве. Нормалне вредности CRP су 0- 5 mg/l.

3. 5. Одређивање нивоа фибриногена

Ниво фибриногена одређиван је коагулационом методом по Clauss- у, при чему промена у светлосном расејању или оптичкој густини током формирања коагулума показује константну тенденцију раста од почетног нивоа до формирања платоа. Висина платоа у односу на почетни ниво пропорционална је концентрацији фибриногена. Коришћен је реагенс HemosIL Fibrinogen С произвођача IL.

3. 6. Одређивање нивоа фактора II

Ниво фактора II одређиван је коагулационом методом заснованом помоћу HemosIL Factor II deficient plasma реагенса произвођача IL Италија, аутоматским коагулометром ACL 9000 произвођача IL (Милано, Италија).

Принцип анализе је да у сувишку свих осталих чинилаца коагулације (који су садржани у реагенсу за одређивање FII), време коагулације испитиване плазме зависи од нивоа FII у испитиваној плазми. Продужење времена коагулације је обрнуто пропорционално нивоу испитиваног фактора. Нормалне вредности FII су 50- 150 U/ dl.

3. 7. Одређивање аРТТ, РТ и ТТ

Вредности аРТТ, протромбинског времена (РТ) и тромбинског времена (ТТ) су одређиване помоћу коагулометра ACL 9000. За аРТТ коришћен је реагенс Cephotest произвођача Axis Shield (Осло, Норвешка). Реагенс садржи фосфолипидне честице, активатор фактора XII и калцијум хлорид. Мери се време коагулације по додавању цитратне плазме. Благо продужење времена коагулације може бити последица присуства лупуса, фон Вилебрантове болести и неких других поремећаја хемостазе или последица терапије хепарином. Протромбинско време је одређивано реагенсом РТ Fib recombinant произвођача IL и RecombiPlasTin 2G произвођача IL. Реагенс садржи ткивни тромбoplastин и калцијумове јоне који активирају процес коагулације до стварања фибринског угрушка. Мерено време до стварања угрушка је протромбинско време. Резултат се изражава у односу на средњу вредност РТ референтног опсега и назива се INR (енг. international normalized ratio). Вредност INR израчунава се по формули:

$$INR = (РТ \text{ испитаника} / \text{средња вредност РТ референтног опсега})^{ISI}$$

(ISI- енг. international sensitivity index, интернационални индекс осетљивости, који је карактеристичан за реагенс). Продужење РТ настаје услед примене терапије антагонистима витамина К, недостатка протромбина, недостатка фактора V, недостатка фактора VII, недостатка фактора X или недостатка фибриногена. Тромбинско време је одређивано помоћу реагенса Thrombin Time произвођача IL концентрације 5 U/ ml. Реагенс садржи тромбин а мери се време до стварања угрушка- тромбинско време. Резултат се такође изражава у односу на средњу вредност ТТ референтног опсега. Продужење ТТ настаје услед примене терапије хепарином, недостатка фибриногена, дисеминоване интраваскуларне коагулације и фибринолитичке терапије.

У случају продужених вредности аРТТ осим лупусног коагуланса одређиван је ниво појединачних чинилаца коагулације унутрашњег пута (FVIII, FIX, FXI, FXII). Код болесника који су узимали оралну антикоагулантну терапију и последично имали продужено протромбинско време, одређени су антиромбин, APC резистенција и ниво FVIII, а одређивање протеина Ц и протеина С је обављено по искључивању оралне антикоагулантне терапије. Сваки патолошки или граничан налаз је поновљен најмање два пута из два различита узорка плазме. С обзиром на то да је FVIII реактант акутне фазе код свих болесника са повишеним вредностима фактора VIII (изнад 150%) анализа је понављана уз одређивање нивоа CRP, да би се искључио утицај акутне реакције на вредност FVIII.

3. 8. Одређивање активности антитромбина (АТ)

Одређивање нивоа функционалне активности АТ у плазми вршено је коришћењем реагенса Berichrom® Antithrombin А произвођача Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Њуарк, САД). Тест се заснива на способности хепарина да претвори АТ у инхибитор тромбина у узорку. Преостали тромбин, који није везан за АТ, реагује са супстратом (амидним једињењем) што се огледа у промени апсорбанције ове реакционе смеше на 405 nm. Плазма се инкубира са реагенсом 3 минута на 37° С и анализира на аутоматском коагулометру ACL 9000. Измерени пораст апсорбанције је обрнуто сразмеран активности АТ. Нормалне вредности активности АТ су од 75% до 122%.

3. 9. Одређивање активности протеина Ц

Протеин Ц је одређиван реагенсом Protein С произвођача IL помоћу аутоматског коагулометра ACL 200 произвођача IL. Овај тест је заснован на разградњи хромогеног супстрата активисаним протеином Ц. Активисани протеин Ц је добијен помоћу активатора изолованог из змијског отрова змије Agkistrodon contortrix contrortrix. Одређивање протеина Ц у испитиваној плазми се одвија у две фазе:

- I фаза: инкубација плазме са активатором протеина Ц
- II фаза: квантификација активисаног протеина Ц индиректно преко количине ослобођеног паранитроанилина која је директно пропорционална количини присутног протеина Ц.

Комерцијални кит за одређивање протеина Ц садржи:

- Протеин Ц активатор- лиофилизирана фракција отрова змије Agkistrodon c. contrortrix
- Хромогени супстрат
- Дилуент

Нормалне вредности активности протеина Ц су од 69% до 134%.

3. 10. Одређивање активности протеина С

Активност протеина С је одређивана реагенсом Pro S произвођача IL помоћу коагулометра ACL 200 произвођача IL. Овај тест представља коагулациони функционални тест заснован на протромбинском времену. Њиме се одређује функционална активност слободног протеина С, која се мери као степен продужења времена коагулације одређеног протромбинским временом у присуству ткивног фактора, фосфолипида, јона калцијума и активисаног протеина С. Активисани протеин С је добијен активацијом протеин С дефицитарне плазме Protac- ом. Активност протеина С је пропорционална продужењу времена коагулације. Комерцијални Pro S кит садржи:

- Реагенс за протеин С који се састоји од рекомбинантног зечијег ткивног фактора, синтетичких фосфолипида, калцијума, активисаног протеина Ц

- Протеин С дефицитарне плазме
- Протеин С контролне плазме

Нормалне вредности активности протеина С су од 63% до 135%.

3. 11. Одређивање броја тромбоцита

Број тромбоцита одређиван је на хематолошком бројачу ћелија типа Cell Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics Division, Санта Клара, Калифорнија) аутоматском имунолошком методом употребом флуоресцентно обележених моноклонских антитела CD61 на површинске антигене тромбоцита. Нормалне вредности броја тромбоцита су од 150 до 400 милијарди по литру крви.

3. 12. Одређивање нивоа хомоцистеина

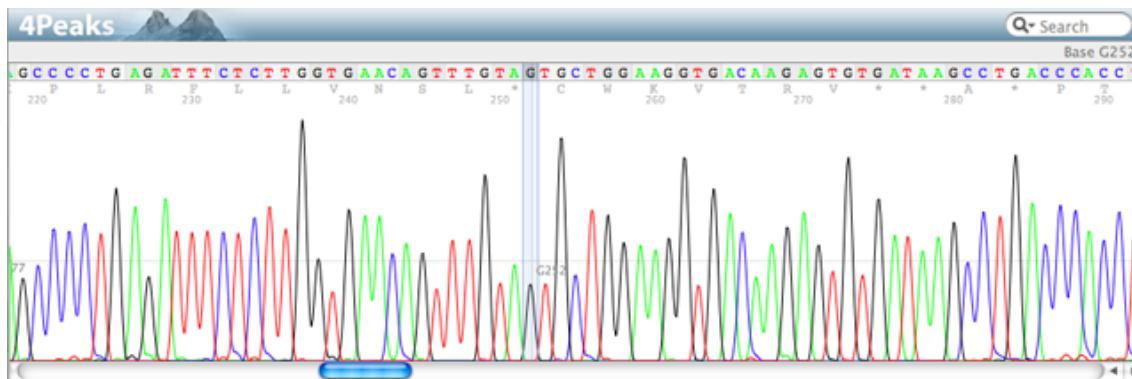
Дијагностика је обављена у лабораторији за биохемију, Центра за лабораторијску медицину Клиничког центра Војводине. Укупни хомоцистеин (tHcy) у плазми мери се “Abbott Homocysteine (HCY) assay” (Abbot Diagnostics, Беркшир, Велика Британија) китом за аутоматизовану имунолошку анализу флуоресцентне поларизације. Дитиотреитол (DTT) редукује хомоцистеин везан за албумин и друге мале молекуле, као и хомоцистин, у слободан хомоцистеин. S- аденозил- хомоцистеин (SAH) хидролаза катализује претварање хомоцистеина у SAH у присуству додатог аденозина. У наредним корацима, специфична моноклонска антитела и флуоресцентни SAH analog tracer чине детекциони систем. Укупна концентрација хомоцистеина у плазми рачуна се на основу калибрационе криве помоћу софтвера за инструмент Abbott AxSYM® (Abbot Diagnostics, Беркшир, Велика Британија).

3. 13. Детекција мутација FII G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FV G1691A - анализа ДНК

Постоје два типа анализе ДНК у погледу врсте полиморфизма чије се присуство испитује. То су анализе полиморфизама секвенце, или редоследа, и анализе полиморфизама дужине, или понављања. Полиморфизми секвенце последица су замене једног или више парова нуклеотида и не доводе до промене дужине сегмента ДНК између дефинисаних крајева локуса (секвенце на хромозому чије се наслеђивање може пратити (147)). Са друге стране, полиморфизми дужине последица су додавања или изостављања појединог или већег броја парова нуклеотида, што доводи до разлике у дужини одређеног сегмента молекула ДНК (148). Анализе ДНК секвенце које су обављане у оквиру испитивања наследне тромбофилије односе се на испитивање присуства полиморфизма секвенце гена који кодирају синтезу фактора II, фактора V и ензима MTHFR, односно детекцију мутација FII G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C и FV G1691A. Ове

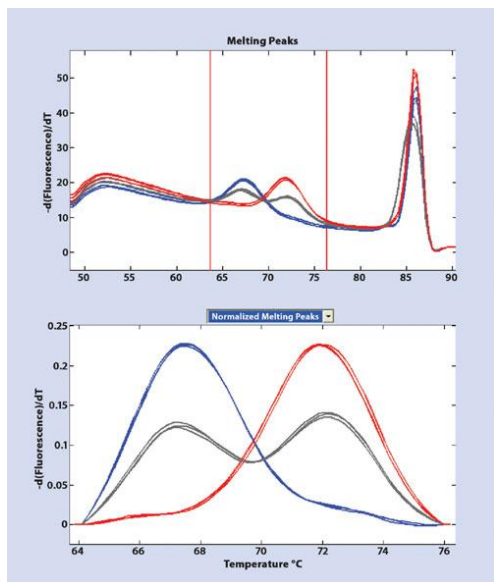
мутације спадају у поменућу класу полиморфизама секвенце SNPs. До сада је утврђено постојање полиморфизама у око 30% гена код човека, док се 70% гена јавља у само једном облику (мономорфни гени) (148). На нивоу секвенце ДНК сваки ген постоји у више варијанти али се само код малог броја гена ова различитост испољава на протеинском нивоу (полиморфни гени). Највећи број полиморфних гена се, на нивоу популације, јавља у две варијанте— међутим постоје и гени који се јављају у више од две варијанте у популацији (149,150). Различите варијанте једног гена настале мутацијама називају се алели, тако да се ова врста ДНК анализе (уколико се врши на Real Time PCR инструменту) назива и алелска дискриминација- испитивање присуства одређених алела у узорку. Постоје и друге методе којима је могуће утврдити присуство неког алела у испитиваном узорку:

- техника ланчане реакције полимеразе са анализом полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената PCR- RFLP (енг. polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism), где се ДНК након умножавања сече применом рестрикционих ензима ендонуклеаза а добијени фрагменти се анализирају електрофоретским раздвајањем на полиакриламидном гелу. У зависности од тога да ли у испитиваној ДНК постоје одређена рестрикциона места која препознаје примењена ендонуклеаза или је присутна мутација услед које се губи постојеће или додаје ново рестрикционо место добијају се фрагменти различите дужине и поређењем са стандардом се утврђују присутне алелске варијанте.
- секвенцирање сегмента ДНК (одређивање редоследа нуклеотида у ДНК ланцу) у циљу утврђивања присуства мутација. Током секвенцирања примењује се принцип умножавања ДНК уз додавање 2', 3'- дидеоксинуклеотида и обележивача. Уколико ензим ДНК полимеразе уместо дидеоксинуклеотида угради дидеоксинуклеотид у новосинтетисани ланац зауставља се даља синтеза ДНК. Производи умножавања се даље анализирају електрофорезом на гелу. Данас се врши аутоматизовано секвенцирање где се производи умножавања боје флуоресцентним бојама уместо раније коришћених радиоактивних обележивача. Коришћењем капиларне електрофорезе, производи умножавања се раздвајају по величини. Најчешће се примењује метода где је сваки од четири дидеоксинуклеотида обележен различитом флуоресцентном бојом. Инструмент читава емитоване сигнале флуоресцентно обележених дидеоксинуклеотида а програм претвара сигнале у информацију о присуству одређеног нуклеотида у ДНК (Слика 14).



Слика 14. Аутоматизовано секвенцирање ДНК

Анализа криве топљења се заснива на томе да свака секвенца ДНК има специфичну температуру топљења (температуру на којој је денатурирано 50% молекула). За анализу криве топљења користи се Real- Time PCR инструмент, међутим, за разлику од алелске дискриминације, примењују се флуоресцентне боје које се везују за дволанчану ДНК. Током PCR- а боја се везује за сваки новосинтетисани молекул ДНК и интензитет флуоресценције се повећава. Програм креира график промене интензитета флуоресценције у јединици времена у зависности од пораста температуре. Облик и позиција максимума на криви топљења одређени су величином умноженог сегмента ДНК и бројчаним односом GC и AT базних парова, тако да се анализом може открити присуство мутације, разликовати хомозиготи од хетерозигота и детектовати друге промене у испитиваној секвенци (Слика 15).



Слика 15. Крива топљења и нормализована крива топљења где се разликују секвенце ДНК хомозигота (плаво) и хетерозигота за мутирани алел (сиво) од секвенце са одсуством мутације (црвено)

Узорци капиларне крви испитаника узети су из јагодице прста на руци коришћењем стерилних ланцета за једнократну употребу (Romed, Холандија). Од узорака су на стерилним филтер папирима 5С (Тоуо Roshi Kaisha Ltd, Јапан) начињене трајне крвне мрље, тако што је микропипетом нанесено 40 μ l крви по површини филтер папира који је потом осушен на ваздуху и чуван на собној температури у обележеном папирном омотачу.

ДНК из сваког узорка добијена је применом хелирајућег агенса Chelex[®]- 100 (BioRad Laboratories, Херкулес, Сједињене Америчке Државе). Chelex[®]- 100 метод подразумева употребу јоноизмењивачке смоле која се, у облику суспензије, директно додаје биолошком узорку (151). Основа Chelex[®]- 100 реагенса је полимер стирен-дивинилбензен који садржи јоне иминодиацетата који везују јоне метала присутне у раствору. Ензими нуклеазе, који за своју функцију захтевају присуство Mg^{2+} јона као кофатора, додатком Chelex[®]- 100 бивају инактивисани и молекули ослобођене ДНК заштићени од разградње.

Изолација ДНК из појединачног узорка вршена је према следећем протоколу: узет је исечак крвне мрље површине око 3x 3 mm² (представља приближно 6 μ l пуне крви) који је инкубиран у епрувети запремине 1,5 ml са 1ml дестиловане и дејонизоване воде на собној температури 45 минута. Потом је узорак промешан 10 секунди на 500 обртаја на Vortex мешалици (Velp scientifica, Усмате, Италија), центрифугиран 3 минута на 12 000 обртаја, супернатант одбачен у запремини од 980 μ l а у талог је додато 170 μ l претходно припремљеног 5% раствора Chelex[®]- 100 реагенса и 10 μ l протеиназе К (Qiagen, Hilden, Germany) која служи за хидролизу протеина у узорку. Након мешања у трајању од 5 секунди на Vortex мешалици и центрифугирања 1 минут на 12 000 обртаја раствор је инкубиран у воденом купатилу на температури од 56°C преко ноћи. Затим је, након мешања 5 секунди на Vortex мешалици и центрифугирања 1 минут на 12 000 обртаја, раствор инкубиран у воденом купатилу на 100°C у трајању од 8 минута, поново мешан 5 секунди на Vortex мешалици и центрифугиран 3 минута на 12 000 обртаја. Излагање температури од 100°C доводи до разарања хелијских мембрана и денатурације протеина, као и до кидања водоничних веза између комплементарних ланаца ДНК. Након центрифугирања, 30 μ l супернатанта је разблажено са 60 μ l дестиловане и дејонизоване воде и раствор је коришћен за испитивање присуства мутираних алела PCR техником.

Присуство мутираних алела испитивано је методом алелске дискриминације, где се након PCR реакције детектују две варијанте испитиване секвенце ДНК. За анализу продуката PCR реакције коришћен је инструмент ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Фостер Сити, Сједињене Америчке Државе). То је Real Time PCR инструмент који читава емитоване сигнале флуоресцентно обележених проба у реакционој смеши у току сваког циклуса PCR реакције. Проба је обележени једноланчани молекул ДНК специфичне примарне структуре који хибридизује са комплементарном једноланчаном секвенцом уколико је присутна у испитиваној ДНК. Једноланчани молекули испитиване ДНК добијају се денатурацијом у току PCR реакције.

TaqMan[®] пробе које су коришћене у овом испитивању, поред флуоресцентне боје која је везана за 5' крај, садрже и молекул пригушивач сигнала везан за 3' крај. Флуоресцентне боје су FAM (6- карбоксифлуоресцеин- амидит) са максимумом апсорпције на 494 nm и VIC[®], слично једињење са максимумом апсорпције на 538 nm. Приликом умножавања сегмента сваког од испитиваних гена коришћено је: 1 μ l

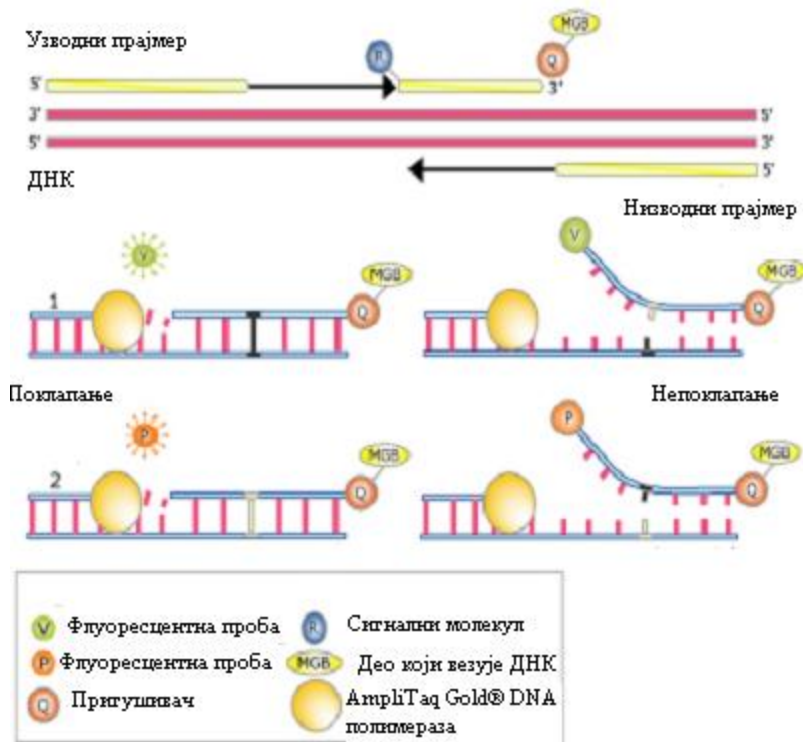
разблаженог узорка изоловане једарне ДНК, 1 μ l смеше специфичних прајмера (граничника циљног сегмента) и проба за алеле тог гена- TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Фостер Сити, Сједињене Америчке Државе), 12,5 μ l Taqman Universal PCR Master Mix- а (Roche, Њу Џерзи, Сједињене Америчке Државе) који представља смешу ензима, дезоксирибонуклеотид трифосфата и кофактора (Mg^{2+} јона који се додају у виду раствора $MgCl_2$) у одговарајућем пуферу и 10 μ l дестиловане и дејонизоване воде. Дезоксирибонуклеотид трифосфати у смеси су: дезоксиаденозин трифосфат (dATP), дезоксигуанозин трифосфат (dGTP), дезоксицитидин трифосфат (dCTP) и дезоксиуридин фосфат (dUTP). dUTP се користи уместо дезокситимидин трифосфата (dTTP) ради каснијег лакшег пречишћавања реакционе смеше.

У посебну епрувету је уместо узорка додато 11 μ l дестиловане и дејонизоване воде, што представља „негативну контролу“, односно флуоресценција измерена у овој реакцији је основна флуоресценција смеше реагенаса и након PCR реакције се одузима од измерене флуоресценције узорка да би се израчунао стварни пораст флуоресценције у узорку који је сразмеран умножавању секвенце одређеног алела.

У умножавању циљног сегмента гена за протромбин коришћени су следећи прајмери и пробе:

- узводни прајмер: C__8726802_20_F
- низводни прајмер: C__8726802_20_R
- проба за детекцију нормалног 20210G алела: 5'- FAM-GTTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCAAGCCTCAATGCTCCCAGTGCTATTTC- 3'
- проба за детекцију мутираног 20210A алела: 5'- VIC-GTTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCGAGCCTCAATGCTCCCAGTGCTATTTC- 3'
- У умножавању циљних сегмената гена за MTHFR коришћени су следећи прајмери и пробе:
- узводни прајмер: C__1202883_20_F
- низводни прајмер: C__1202883_20_R
- проба за детекцију нормалног 677C алела: 5'- VIC - GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCGGCTCCCGCAGACACCTTCTCSTTCAA - 3'
- проба за детекцију мутираног 677T алела: 5'- FAM - GAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCGACTCCCGCAGACACCTTCTCSTTCAA - 3'
- узводни прајмер: C__850486_20_F
- узводни прајмер: C__850486_20_R
- проба за детекцију нормалног 1298A алела: 5'- FAM-AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTTTCTTCACTGGTCAGTCTCSTCCCCCA- 3'
- проба за детекцију мутираног 1298C алела: 5'- VIC-AAGAACGAAGACTTCAAAGACACTTGCTTCACTGGTCAGTCTCSTCCCCCA- 3'
- У умножавању циљног сегмента гена за FV коришћени су следећи прајмери и пробе:
- узводни прајмер: C__111005250_10_F
- низводни прајмер: C__111005250_10_R
- проба за детекцију нормалног 1691G алела: 5'- VIC - TSAAGGACAAAATACSTGTATTCCTCGCCTGTCCAGGGATCTGCTCTTACA- 3'
- проба за детекцију мутираног 1691A алела: 5'- FAM - TSAAGGACAAAATACSTGTATTCCTTGCCTGTCCAGGGATCTGCTCTTACA- 3'

Све компоненте реакционе смеше додате су у епрувете запредине 0,2 μl на реакционој плочи која је постављена у инструмент. Почетно загревање смеше, пре саме PCR реакције, вршено је 2 минута на 50°C да би се омогућило активисање ензима урацил-N- гликозилазе који пречишћава смесу уништавајући евентуално присутне производе претходних умножавања ДНК. Потом је вршено загревање на 95°C у трајању од 10 минута ради активисања ензима полимеразе који катализује реакцију умножавања ДНК и денатурације саме ДНК узорка (раздвајања ланаца). Истовремено је, већ на 55°C, деактивисана урацил- N- гликозилаза да не би могло доћи до разградње новосинтетисаних молекула ДНК. Умножавање је вршено током 40 циклуса од којих се сваки састојао од загревања смеше на 95°C (денатурација) у трајању од 15 секунди и потом хлађења на 60°C у трајању од једног минута. На температури од 60°C прајмери се везују за циљну секвенцу на денатурираној, једноланчаној ДНК (матрици) и потом полимеразе продужава новонастали ланац уграђивањем комплементарних нуклеотида наспрам ланца- матрице. Затим је реакциона плоча загревана још једном на 60°C у трајању од једног минута ради завршавања процеса синтезе нових ланаца ДНК до пуне дужине умноженог фрагмента и мерења укупног пораста флуоресценције на крају PCR реакције.



Слика 16. 5'- нуклеазна активност ДНК полимеразе при поклапању пробе и секвенце ДНК (http://www.snp-genetics.com/sertec/sertec_genotaqman.htm)

Ензим који је коришћен у PCR реакцији је AmpliTaq Gold® ДНК полимераза која има и 5'- нуклеазну активност и у току фазе елонгације (синтезе новог ДНК ланца) сече пробу која је хибридизована са испитиваном ДНК. Тиме се одваја флуоресцентна боја од пригушивача што повећава интензитет измерене флуоресценције.

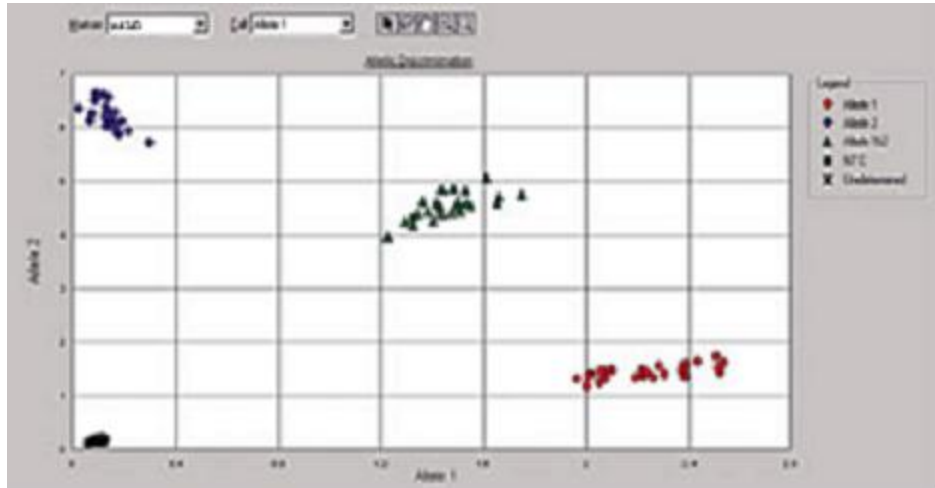
Након разградње пробе синтеза ланца ДНК се наставља. Уколико је подударање пробе и испитиване ДНК непотпуно- температура топљења дволанчаног хибрида је нижа (температура при којој је 50% дволанчане ДНК у узорку денатурисано) и ДНК полимераза у већини случајева само одвоји пробу без разградње. Тек када се проба потпуно подудара са секвенцом испитиване ДНК долази до разградње, одвајања флуоресцентне боје од пригушивача и пораста интензитета флуоресценције који је пропорционалан количини ДНК са датим алелом у узорку (Слика 16).

Пробе за нормални и мутирани алел се разликују по таласној дужини коју емитују за њих везане флуоресцентне боје тако да је употребом одговарајућег програма и даљом анализом установљено који алели су присутни у сваком узорку. Програм аутоматски анализира очитане податке тако што пореди измерене вредности флуоресценције у тубама са узорцима са измереним вредностима флуоресценције за негативне контроле и вредностима специфичним за одређени сигнални молекул и одређује допринос сваког сигнала у укупном мерењу за сваки узорак на основу чега је утврђено присуство одређеног алела (Слика 17, Табела 2).

Табела 2. Флуоресцентни сигнали и присуство алела

МУТАЦИЈА	Повећање флуоресценције	Указује на:
FII G20210A	само FAM обележивача	хомозигот за нормални алел
	само VIC обележивача	хомозигот за мутирани алел
	FAM и VIC обележивача	хетерозигот
MTHFR C677T	само FAM обележивача	хомозигот за мутирани алел
	само VIC обележивача	хомозигот за нормални алел
	FAM и VIC обележивача	хетерозигот
MTHFR A1298C	само FAM обележивача	хомозигот за нормални алел
	само VIC обележивача	хомозигот за мутирани алел
	FAM и VIC обележивача	хетерозигот
FV G1691A	само FAM обележивача	хомозигот за мутирани алел
	само VIC обележивача	хомозигот за нормални алел
	FAM и VIC обележивача	хетерозигот

Ограничење ове методе је у могућности постојања мутације на једном од два хомолога хромозома у секвенци за коју се везује проба, а која није повезана са испитиваном мутацијом, тако да долази до детекције само једног од два алела, чиме се може добити лажно позитиван или лажно негативан резултат. Вероватноћа ове појаве може се проценити на основу просечне стопе мутације једног нуклеотида хаплоидног генома која износи $1,1 \times 10^{-8}$ (152), и износи око 1: 1000000 случајева, тако да се у нашем истраживању може занемарити.



Слика 17. Анализа алелске дискриминације на Real Time PCR инструменту

3. 14. Обрада података

Добијени подаци су нумерички обрађивани стандардним процедурама дескриптивне статистике и статистичке анализе.

У оквиру дескриптивне статистике за категоријална обележја вршено је кодирање могућих вредности обележја и одређивана дистрибуција учесталости по кодовима. За утврђивање повезаности непараметарских обележја у оквиру група испитаника и испитивање хомогености група у односу на присуство појединих наследних тромбофилија коришћен је Пирсонов χ^2 – тест где се упоређују регистроване учесталости са очекиваним које се израчунавају под претпоставком да се групе не разликују. Вредности $p < 0,05$ су сматране статистички значајним.

За испитивање вероватноће настанка ТДВ код појединих наследних тромбофилија рачунат је ризик OR (енг. odds ratio), који представља ризик настанка тромбозе у присуству одређене тромбофилије на основу њене учесталости у испитиваној групи у односу на контролну групу. Уколико у контролној групи није било испитаника са испитиваном тромбофилијом ризик је рачунат на основу процењене учесталости у општој популацији.

За параметарска обележја одређиване су величине: средња вредност, стандардна девијација, медијана, опсег, минимум и максимум.

Тромбофилије и фактори ризика који су на основу поређења групе оболелих и контролне групе били статистички значајно повезани са настанком ТДВ даље су анализирани применом логистичке регресионе анализе ради прилагођавања услед утицаја који делују и на нивоу испољавања одређеног фактора и на нивоу настанка ТДВ.

4. Резултати испитивања

Испитивањем је обухваћено 300 особа оба пола подељених у две групе. Групу испитаника са тромбозом дубоких вена (оболели) чинило је њих 185. Оболели код којих је утврђено постојање лупусног антикоагуланса и антикардиолипинских антитела су искључивани из студије. По искључењу оних код којих је утврђено постојање ових етиолошких чинилаца групу оболелих је сачињавало 175 испитаника.

Старост оболелих испитаника у време настанка ТДВ била је од 7 до 85 година, просечно 40,42 година. За испитанике са рецидивима ТДВ узета је у обзир старост у време прве тромбозе.

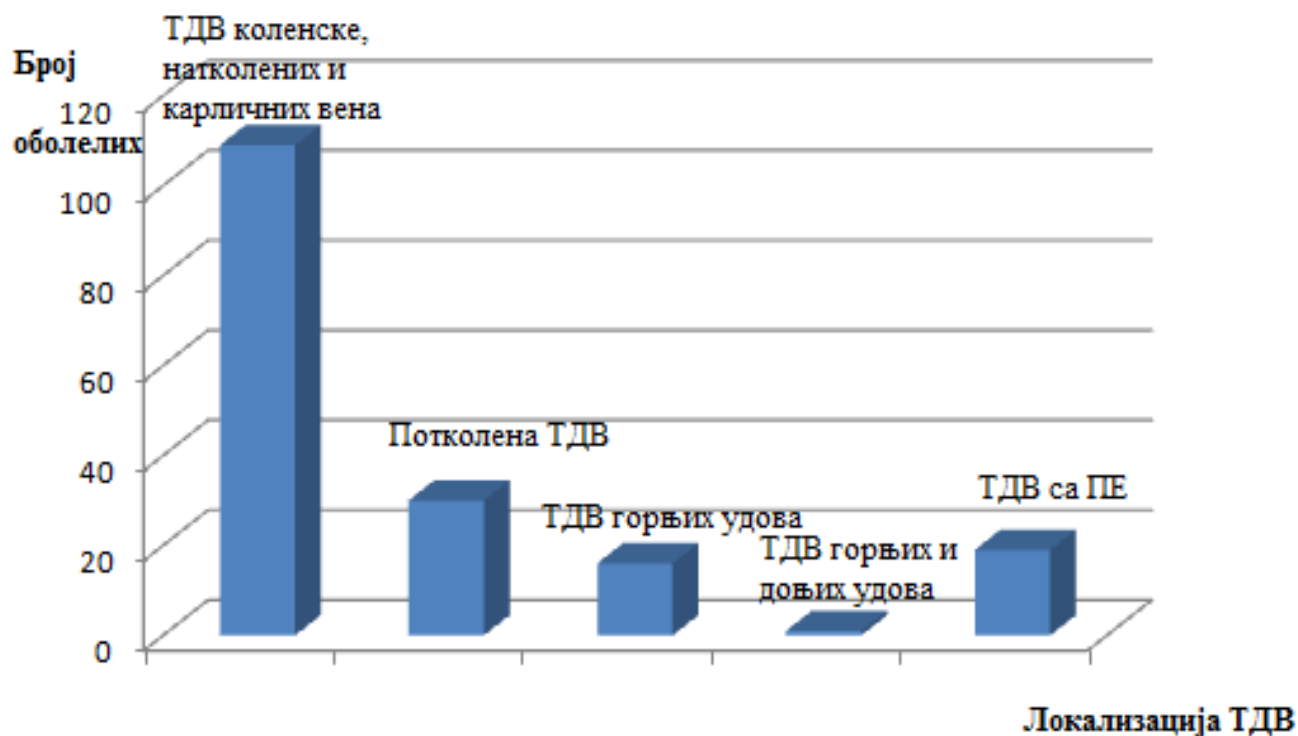
Контролну групу сачињавало је 115 особа која се поклапала са групом оболелих по полној и старосној структури. Старост испитаника контролне групе у време прикупљања података била је од 5 до 68 година, просечно 40,01 година.

Група оболелих је током анализе резултата дељена на подгрупе на основу неколико критеријума. Поделом на подгрупе на основу пола подгрупу испитаника женског пола сачињавало је 117 испитаница (65,14% оболелих) а подгрупу испитаника мушког пола сачињавало је 61 (34,86%) оболелих. Поделом на подгрупе на основу присуства наследне тромбофилије подгрупу испитаника са наследном тромбофилијом сачињавао је 121 оболели (69,14%) док је подгрупу испитаника без наследне тромбофилије сачињавало 54 оболела (30,86%).

Поделом контролне групе на подгрупе на основу пола подгрупу испитаника женског пола сачињавало је 74 испитанице (66,07%) а подгрупу испитаника мушког пола сачињавало је 38 (33,93%) испитаника. Поделом на основу присуства наследне тромбофилије подгрупу испитаника са наследном тромбофилијом сачињавало је њих 79 (70,54%) док је подгрупу испитаника без наследне тромбофилије сачињавало њих 33 (29,46%).

У групи испитаника са тромбозама највише је било оних са проксималном локализацијом тромбозе доњих удова (тромбозом карличне, бутне и/ или коленске вене)- чак 112 (62,29%). Тромбоза дисталне локализације (тромбоза потколених вена) настала је код 30 испитаника (17,14%). ТДВ горњих удова настала је код 16 (9,14%) испитаника а ТДВ компликована ПЕ је настала код њих 19 (10,86%). Један испитаник (0,57%) имао је ТДВ горњих и доњих удова. Локализација тромбозног процеса у групи испитаника представљена је графиконом 1. Рецидив тромбозног процеса настао је код укупно 13 (7,43%) оболелих, код 3 оболела са потколеним тромбозом (1,71%) и код 10 оболелих (5,71%) са тромбозом коленске вене, вена натколенице и карличних вена.

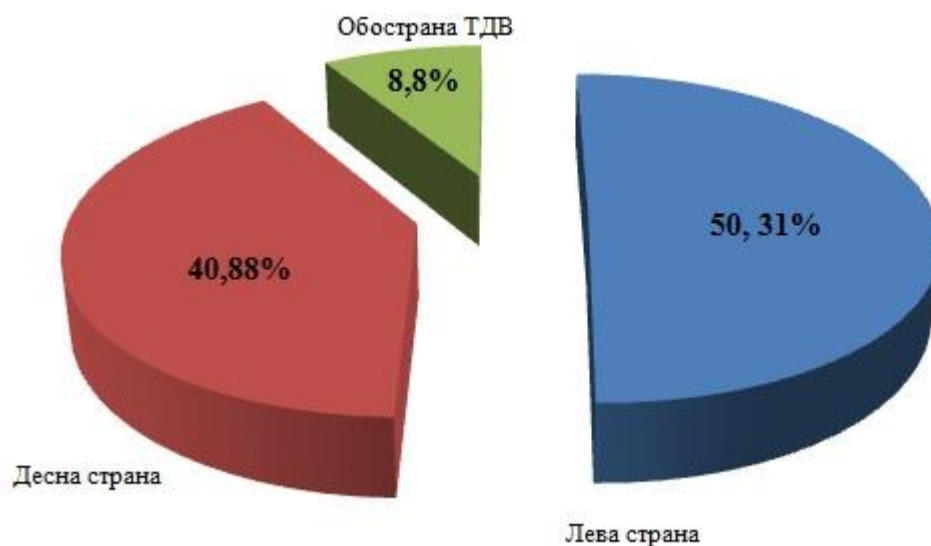
Графикон 1. Локализација тромбозног процеса



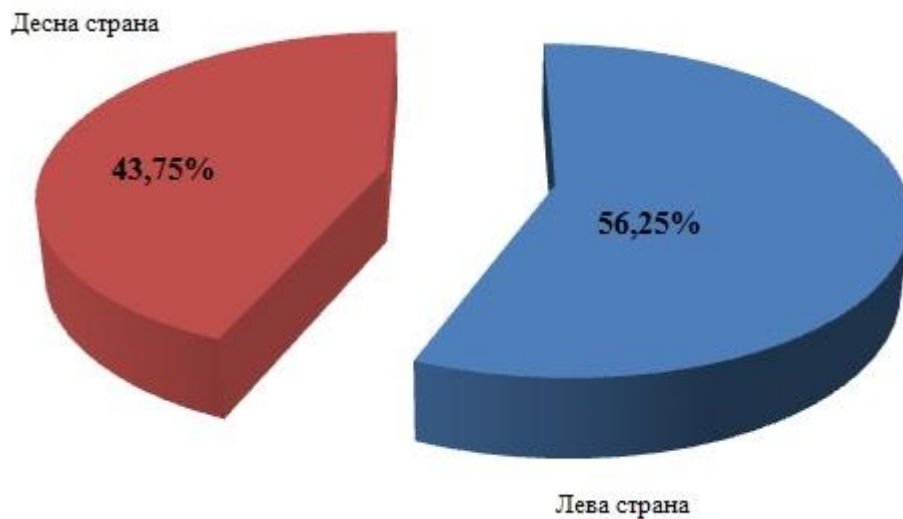
Од 159 оболелих са ТДВ доњих удова, код њих 80 (50,31%) тромбозним процесом је била захваћена лева страна, а код њих 65 (40,88 %) десна страна. Код 14 испитаника (8,80%) била је присутна обострана ТДВ доњих удова (Графикон 2).

Од 16 оболелих са ТДВ горњих удова, код њих 9 (56,25%) тромбозним процесом је била захваћена лева страна, а код њих 7 (43,75%) десна страна. Обострана ТДВ горњих удова није присутна ни код једног испитаника (Графикон 3).

Графикон 2. Локализација ТДВ доњих удова



Графикон 3. Локализација ТДВ горњих удова



Код 19 пацијената је ТДВ искомпликована тромбоемболијом плућа, при чему је код њих 63,16% дијагностикована проксимална а код 36,84% дистална ТДВ доњих удова. Ни код једног пацијента са ПЕ није утврђено постојање ТДВ горњих удова (Табела 3). Разлика у учесталости јављања ПЕ код оболелих са проксималном локализацијом тромбозног процеса у односу на дисталну постоји али није статистички значајна ($p=0,15$).

Табела 3. Локализација тромбозног процеса удруженог са ПЕ

Локализација	Број испитаника
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	12
Потколена тромбоза	7
ТДВ горњих удова	0
Укупно	19

У оквиру подгрупе од 117 испитаника са ТДВ, код њих 65 (57,02%) тромбозни процес је настао на левој страни, код њих 45 (39,47%) на десној страни а њих 4 (3,51%) имале су обострану ТДВ.

У оквиру подгрупе са 61 испитаником мушког пола, код њих 24 (39,34%) тромбозни процес је настао на левој страни, код њих 27 (44,26%) на десној а њих 10 (16,40%) су имали обострану ТДВ.

Настанак ТДВ на левој страни био је статистички значајно чешћи у групи оболелих жена, док се код мушкараца ТДВ чешће јављала на десној страни или обострано ($p=0,004$).

Резултати општих тестова за процену функционалности хемостазног система (аРТТ, РТ, ТТ) у групи од 175 испитаника са ТДВ су били унутар физиолошког опсега код 156 (89,14%) испитаника.

Средња вредност активисаног парцијалног тромбопластинског времена у групи оболелих је 99,7%, распон вредности 71- 155%, стандардна девијација 13,6%. Код седам оболелих (4,49%) утврђено је скраћење овог параметра.

Средња вредност протромбинског времена у групи оболелих је 99,1%, распон вредности 81- 164%, стандардна девијација 12,3%. Код једног оболелог (0,64%) утврђено је скраћење овог параметра.

Средња вредност тромбинског времена у групи оболелих је 104,7%, распон вредности 76,5- 181%, стандардна девијација 17,9%. Код четири оболела (2,56%) утврђено је скраћење овог параметра.

Број тромбоцита у групи оболелих био је унутар физиолошког опсега код 158 (99,93%) од 163 оболела за које постоји овај податак. Од преосталих је код њих четворо (2,45%) био повишен. Средња вредност броја тромбоцита у групи оболелих је $263,5 \times 10^9$ по литру крви, распон вредности 145- $573 \times 10^9 / l$, медијана $249 \times 10^9 / l$ а стандардна девијација $72,10^2 \times 10^9 / l$. Средње вредности основних лабораторијских параметара хемостазе у групи оболелих испитаника и одговарајући физиолошки опсег приказани су у табели бр 4.

Табела 4. Средње вредности броја тромбоцита, аРТТ, РТ и ТТ у групи оболелих испитаника и физиолошки опсег

Параметар	Група испитаника са ТДВ	Физиолошки опсег
Број тромбоцита $\times 10^9/l$	263,5	150- 400
аРТТ (%)	99,7	80- 120
РТ (%)	99,1	70- 140%
ТТ (%)	104,7	75- 125%

4. 1. Наследна тромбофилија, појава тромбозе у породици и стања удружених са тромбозом у групи оболелих испитаника

Код 121 оболелог испитаника (69,14%) утврђено је присуство барем једне наследне тромбофилије, као и код 80 испитаника контролне групе (71,43%). Испитивање присуства наследне тромбофилије у групи оболелих и контролној групи показало је да нема значајне разлике у учесталости наследне тромбофилије у групи оболелих ($p= 0,680$). Уколико се из поређења изузму испитаници са присуством МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном стању без удруженог присуства МТНFR А 1298 С мутације, барем једна наследна тромбофилија нађена је код 103 (57,14%) оболелих и 54 (48,21%) здравих испитаника али разлика у учесталости није статистички значајно већа ($p= 0,10$). Удружена наследна тромбофилија утврђена је код 37 испитаника групе оболелих (21,14%) и 6 испитаника контролне групе (5,36%). Испитивање присуства удружене наследне тромбофилије у групи оболелих и контролној групи показало је статистички значајно већу учесталост удружене наследне тромбофилије у групи оболелих ($p < 0,001$).

Испитивање истовременог присуства наследне и мешовите тромбофилије показало је да у групи оболелих има 42 (24,0%) особе са истовремено присутним наследним и мешовитим узроцима тромбофилија.

У групи оболелих жена њих 78 (68,42%) имало је неку од наследних тромбофилија, а у групи оболелих мушкараца њих 43 (70,49%). Поређење учесталости присуства наследне тромбофилије у групи оболелих жена и групи оболелих мушкараца показало је да нема разлике у учесталости између ове две групе ($p= 0,777$).

Удружена наследна тромбофилија у групи оболелих жена утврђена је код њих 26 (22,81%) а у групи оболелих мушкараца код њих 11 (18,0%). Већа учесталост удружене наследне тромбофилије у групи оболелих жена није била статистички значајна ($p= 0,369$).

Позитивна породична анамнеза, односно историја појаве тромбоза у породици постоји код 51 оболелих испитаника (29,14%), што је додатни фактор ризика чији утицај на настанак ТДВ зависи од степена сродства са оболелим особама у породици. Код 34 испитаника ове подгрупе (66,67%) утврђено је присуство наследне тромбофилије. Није утврђена статистички значајна повезаност између присуства наследне тромбофилије и

позитивне породичне анамнезе ($p = 0,649$). Удružена наследна тромбофилија присутна је код 11 испитаника у овој подгрупи и није статистички значајно чешћа у односу на подгрупу оболелих без појаве тромбоза у породици ($p = 0,795$).

Код 111 од 175 оболелих (61,71%) утврђено је постојање стања или болести повезаних са повећаним ризиком за настанак тромбоза. У овој групи болесника наследна тромбофилија је присутна код њих 78 (72,20%). Код 48 (71,64%) од 67 испитаника код којих није утврђено постојање стања или болести повезаних са ризиком за настанак тромбоза је присутна наследна тромбофилија.

Наследна тромбофилија се код ових испитаника јавља са приближно једнаком учесталošћу као код оболелих од ТДВ непознатог узрока ($p = 0,777$).

Плућну тромбоемболију имало је 11 (10,2%) испитаника са присуством стања или болести повезаних са тромбозама и 8 (13,4%) испитаника у групи са ТДВ непознатог узрока. Тромбоемболијске компликације се јављају са приближно једнаком учесталošћу код оболелих код којих постоје стања или болести повезане са повећаним ризиком за настанак тромбоза и код оболелих од ТДВ непознатог узрока ($p = 0,671$).

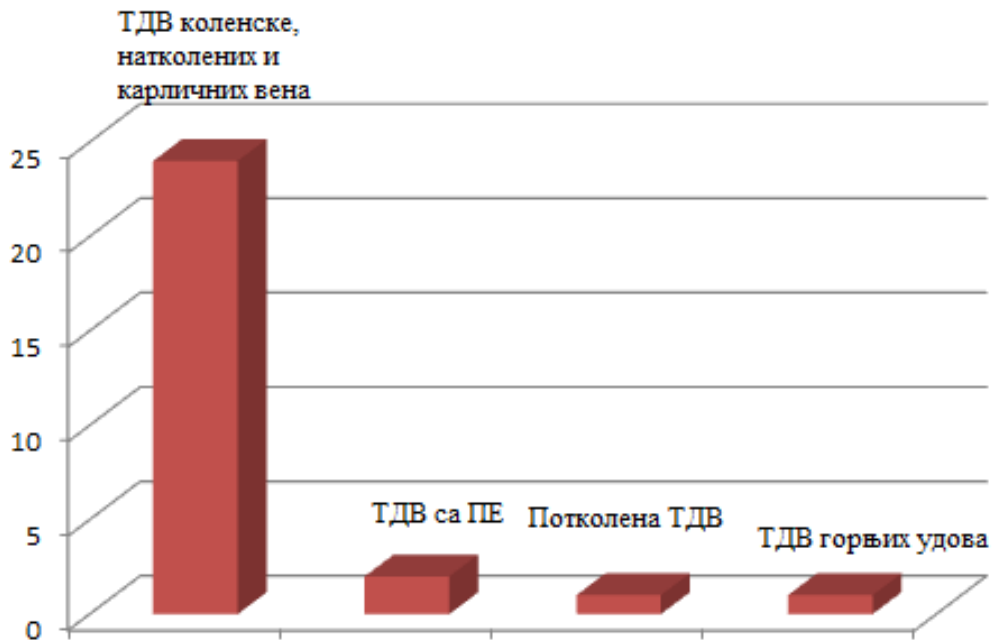
Потколелу тромбозу имало је 23 (21,3%) испитаника са присуством стања или болести повезаних са тромбозама и 9 (13,4%) испитаника са ТДВ непознатог узрока. Испитивање повезаности локализације тромбозног процеса и стања и болести удружених са појавом тромбозе показало је да потколелу ТДВ доњих удова немају статистички значајно већу учесталост у групи оболелих са провоцираним тромбозама ($p = 0,195$).

4. 2. Тромбоза дубоких вена у трудноћи и пуерперијуму

Код највећег броја испитаница групе са ТДВ насталим у периоду трудноће и пуерперијума, њих 24 (85,71%), тромбозом су биле захваћене коленске, карличне и вене натколенице. Код једне испитанице (3,6%) тромбозом су биле захваћене вене потколенице. ТДВ горњих удова настала је код једне испитанице а код две испитанице (7,12%) ТДВ настала у десној натколеници је компликована емболијом плућа. Групу је сачињавало укупно 28 испитаница. Локализација ТДВ насталих у периоду трудноће и пуерперијума приказана је графиконом 4.

Ман- Витни U тестом је испитано постојање статистички значајне повезаности између места настанка ТДВ и периода трудноће и пуерперијума. ТДВ коленске, натколених и карличних вена била је значајно чешћа у подгрупи оболелих испитаница са ТДВ насталим у трудноћи или пуерперијуму у односу на подгрупу испитаника код којих настанак ТДВ није повезан са овим стањима ($p = 0,011$).

Графикон 4. Локализација ТДВ у трудноћи и пуерперијуму



Од 25 испитаница са ТДВ доњих удова, код њих 14 (56,0%) тромбозним процесом је била захваћена лева страна а код њих 10 (40,0%) десна страна. Једна испитаница (4,0%) је имала обострану тромбозу бутних вена са ширењем тромбозног процеса у карличне вене на левој страни. Нема статистички значајне разлике између заступљености ТДВ доњих удова леве и десне стране код испитаница са ТДВ насталом у периоду трудноће и пуерперијума у односу на остале оболеле испитанике ($p= 0,614$). Код једне од 28 испитаница (3,57%) тромбозом је захваћена поткључна вена на левој страни. Од укупно 28 испитаница са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму, код њих 19 (67,86%) ТДВ је настала после порођаја а код њих 9 (32,14%) у току трудноће. Код једне испитанце са поновљеним тромбозама у оба случаја ТДВ је настала у пуерперијуму.

4. 3. Недостатак антитромбина, протеина Ц и протеина С

Укупан број оболелих испитаника са недостатком барем једног природног инхибитора коагулације био је 29 (16,57%). Код 7 оболелих испитаника (4,0%) утврђено је постојање недостатка антитромбина, од којих је код два испитанка ниво активности био испод 40%.

Код три испитаника (1,71%) утврђено је постојање недостатка протеина Ц и оба су имала ниво активности испод 50%.

Постојање недостатка протеина С утврђено је код 18 оболелих (10,29%), од којих је код 8 ниво активности био испод 50%. Код једног оболелог (0,57%) утврђено је истовремено постојање недостатка протеина Ц и протеина С а ниво активности оба је био испод 50% (Графикон 5).

Графикон 5. Учесталост недостатка природних инхибитора коагулације у групи оболелих испитаника



Код 18 (64,29%) испитаника са недостатком неког од природних инхибитора коагулације ТДВ се јавила у коленим, венама натколенице или карличним венама. Код 4 (14,29%) оболела у овој групи ТДВ се јавила у потколеним венама, код две (7,14%) у венама горњих удова а код 4 је ТДВ искомпликована тромбоемболијом плућа. Није утврђено постојање статистички значајне разлике у локализацији ТДВ код оболелих са недостатком неког од природних инхибитора и осталих испитаника из групе оболелих ($p=0,989$).

Локализација тромбозног процеса у групи оболелих испитаника са недостатком неког од природних инхибитора коагулације приказана је у табели 5.

Уколико се ризик за настанак ТДВ рачуна на основу учесталости дефицита антитромбина у општој популацији, која је 0,03%, добије се вредност OR (енг. odds ratio-унакрсни ризик, однос шанси) од 138,85, на основу чега се недостатак антитромбина сврстава у тешке тромбофилије.

Ризик за настанак ТДВ код особа са недостатком протеина Ц израчунат на основу учесталости ове тромбофилије од 0,4% у општој популацији OR је 4,35.

Ризик за настанак ТДВ код особа са недостатком протеина С израчунат на основу учесталости ове тромбофилије од 0,08% у општој популацији OR је 128,57.

Табела 5. Учесталост недостатка антитромбина, протеина Ц и протеина С у подгрупама групе оболелих

Локализација ТДВ	Број испитаника са недостатком АТ, РС, PS n (%)	Број испитаника без недостатка АТ, РС, PS	p
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	18 (64,29)	90 (62,07)	0,989
Потколена тромбоза	4 (14,29%)	26 (17,95)	
ТДВ горњих удова	2 (7,14%)	14 (9,66)	
ТДВ са ПЕ	4 (14,29%)	15 (10,34)	

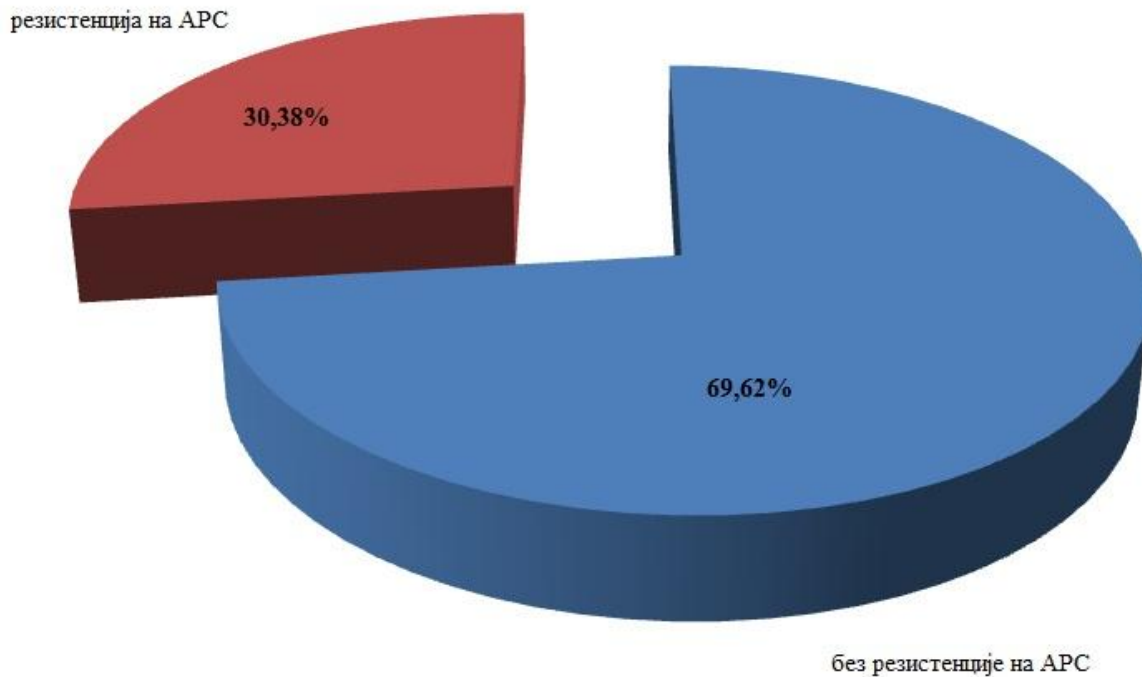
Од 28 испитаница са ТДВ насталом у трудноћи или пуерперијуму код њих 13 је утврђено постојање недостатка неког од природних инхибитора коагулације. Код 5 (38,46%) од ових 13 испитаница ТДВ је настала у трудноћи а код 8 (61,54%) у пуерперијуму. χ^2 тестом је испитано постојање статистички значајне повезаности између постојања недостатка природних инхибитора коагулације са временом појављивања ТДВ. Код ових испитаница нема статистички значајно чешће појаве ТДВ у послепорођајном периоду у односу на период трудноће ($p= 0,505$).

4. 4. Резистенција на активисани протеин Ц

У групи оболелих испитаника код њих 48 (30,38%) од 158 којима је рађена ова анализа је утврђено постојање резистенције на активисани протеин Ц (Графикон 6).

Од 28 испитаница са ТДВ насталом у трудноћи или пуерперијуму постојање АРС резистенције је утврђено код њих 8 (28,57%). Испитивањем повезаности између постојања АРС резистенције и настанка ТДВ у трудноћи или пуерперијуму није утврђена статистичка значајност ($p= 0,823$).

Графикон 6. Учесталост резистенције на APC у групи оболелих испитаника



Од 19 оболелих са тромбоемболијом плућа њих 5 (26,32%) је имало APC резистенцију. Испитивањем повезаности између постојања APC резистенције и клиничког испољавања тромбоемболије плућа код испитаника са ТДВ није утврђена статистичка значајност ($p=0,955$).

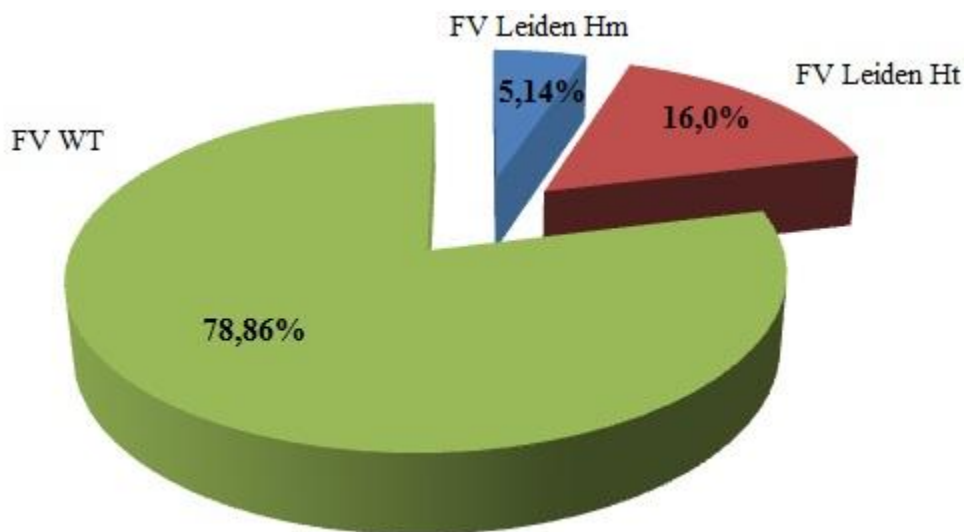
4. 5. Мутација гена за проакцелерин FV Leiden

Од 175 оболелих испитаника њих 37 (21,14%) је имало FV Leiden мутацију, 28 (16,0%) у хетерозиготном а 9 (5,14%) у хомозиготном стању. Од 48 оболелих са APC резистенцијом постојање ове мутације утврђено је код њих 36 (76,60%) од којих је код њих 27 у хетерозиготном стању а њих 9 су хомозиготни носиоци ове мутације (Графикон 7).

Од 99 испитаника контролне групе којима је утврђивано присуство FV Leiden мутације, њих 10 (10,42%) су били хетерозиготни носиоци ове мутације док хомозиготних носилаца није било (Графикон 8).

Учесталост присуства FV Leiden мутације у обе испитиване групе приказана је у табели 6.

Графикон 7. Учесталост FV Leiden мутације у групи оболелих испитаника

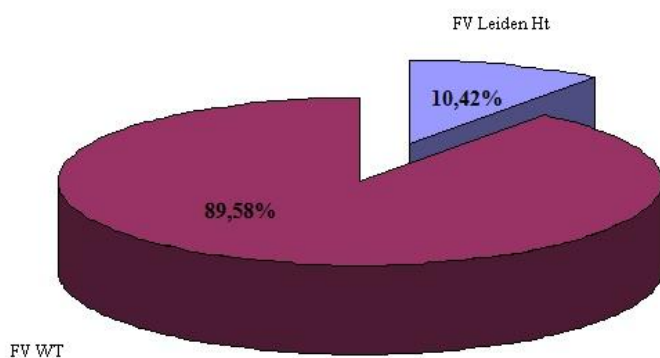


WT- (енг. wild type) нормалан алел

Hm- хомозиготни носилац мутираног алела

Ht- хетерозиготни носилац мутираног алела

Графикон 8. Учесталост FV Leiden мутације у контролној групи



Табела 6. Учесталост FV Leiden мутације у групи оболелих испитаника и контролној групи

Група	Број испитаника са FV Leiden мутацијом n (%)	Број испитаника без FV Leiden мутације n (%)	p
Оболели	37 (21,14)	138 (78,86)	0,026
Контроле	10 (10,42)	86 (89,58)	

Код 11 оболелих испитаника са APC резистенцијом није утврђено присуство FV Leiden мутације. Троје њих, са вредностима APC- R од 2,1, 2,2 и 2,4, су гојазни са вредностима индекса телесне масе 30,82, 40,12 и 31,1, тим редоследом, с тим да је последњи од наведених и хомозиготни носилац FII G 20210 A мутације. Једна испитаница са послепорођајном ТДВ имала је вредност APC- R од 2,14 и повишен ниво протромбина (148%) и хетерозиготни је носилац FII G 20210 A мутације. Једна испитаница са послепорођајном ТДВ имала је вредност APC- R од 2,15 и снижену активност антитромбина од 31%. Једна испитаница са послепорођајном ТДВ имала је вредност APC- R од 2,29, утврђену снижену активност протеина С од 50%, повишен ниво FVIII од 275% и присуство мутације MTHFR C 677 T у хетерозиготном стању. Једна испитаница је имала вредност APC- R од 2,43 и хетерозиготни је носилац мутација MTHFR C 677 T и MTHFR A 1298 C.

Две испитанице са вредностима APC- R од 2,4 и 2,3 имале су и скраћено активисано парцијално тромбoplastинско време и у току испитивања код њих није утврђен узрок APC резистенције.

Однос између резултата коагулационог теста за утврђивање APC резистенције и присуства мутација FV Leiden и FII G 20210 A код оболелих са APC резистенцијом приказан је у табели 7.

Испитивањем повезаности постојања FV Leiden мутације са појавом ТДВ утврђена је статистичка значајност везе између постојања ове мутације било у хомозиготном или хетерозиготном облику и настанка ТДВ ($p= 0,026$).

Ризик за појаву ТДВ код носилаца FV Leiden мутације, било у хомозиготном или хетерозиготном облику, OR, рачунат је на основу присуства ове мутације у групи оболелих и контролној групи и износи 2,306. Ризик за појаву ТДВ код хетерозиготних носилаца FV Leiden мутације, OR износи 1,745.

Ризик за појаву ТДВ код хомозиготних носилаца FV Leiden мутације није било могуће израчунати због тога што у контролној групи није било хомозиготних носилаца ове мутације. Ризик је стога израчунат на основу учесталости хомозигота за ову мутацију у општој популацији, која је 0,155% и износи 34,92 на основу чега присуство FV Leiden мутације у хомозиготном облику треба сврстати у тешке тромбофилије.

Највећи број испитанка са FV Leiden мутацијом, њих 26 (70,27%), имало је тромбозу коленске вене, вена натколенице и/ или карличних вена. Код 3 испитаника са овом мутацијом (8,11%), тромбозом су биле захваћене вене потколенице а код двоје испитаника (5,41%) дубоке вене горњих удова. Један испитаник је имао ТДВ и горњих и доњих удова а код њих 5 ТДВ је била искомпликована плућном тромбоемболијом (Табела 8). Помоћу Ман- Витни U теста је испитивана веза између присуства FV Leiden мутације и места настанка ТДВ. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између присуства ове мутације и локализације тромбозног процеса ($p= 0,47$).

Табела 7. Упоредни преглед вредности APC- R и присуства мутација FII G 20210 A и FV Leiden

	APC-R	Резултати анализе ДНК	
		FII G20210A	FV G1691A
1	1,31	Hm	Ht
2	1,88	WT	Ht
3	2,1	WT	WT
4	1,91	WT	Hm
5	2,2	WT	Ht
6	1,83	WT	Ht
7	1,78	WT	Ht
8	2,4	WT	WT
9	1,8	WT	Ht
10	1,56	WT	Hm
11	1,57	WT	Ht
12	1,66	WT	Ht
13	2,02	WT	Ht
14	1,42	WT	Ht
15	1,44	WT	Ht
16	2,14	Ht	WT
17	2,3	WT	WT
18	1,45	WT	Ht
19	2,15	WT	WT
20	2,29	WT	WT
21	2,43	WT	WT
22	1,61	WT	Ht
23	1,62	WT	Ht
24	2,41	Hm	WT
25	2,2	WT	WT
26	1,41	WT	Hm
27	1,76	WT	Hm
28	1,9	WT	WT
29	2,15	WT	Ht
30	1,89	WT	Ht
31	1,87	WT	Ht
32	1,51	WT	Hm
33	1,63	WT	Hm
34	1,45	WT	Hm
35	1,83	WT	Ht
36	2,06	WT	Ht
37	1,98	WT	Ht
38	2,36	WT	WT
39	1,88	WT	Ht
40	1,44	WT	Ht
41	1,77	WT	Ht
42	1,74	WT	Hm
43	1,27	WT	Hm
44	1,62	WT	Ht
45	1,69	WT	Ht
46	1,91	WT	Ht
47	1,57	WT	Ht

Табела 8. Локализација тромбозног процеса код испитаника са FV Leiden мутацијом

Локализација ТДВ	Број испитаника са FV Leiden мутацијом n (%)	Број испитаника без FV Leiden мутације n (%)	p
Тромбоза колненске вене, вена натколенице и карличних вена	26 (70,27)	83 (57,24)	0,47
Потколена тромбоза	3 (8,11)	27 (18,62)	
ТДВ горњих удова	2 (5,41)	14 (9,66)	
ТДВ горњих и доњих удова	1 (2,70)	0 (0)	
ТДВ са ПЕ	5 (13,51)	14 (9,66)	

У групи испитаница са ТДВ насталом у периоду трудноће или пуерперијума њих 4 (14,30%) је имало FV Leiden мутацију. У контролној групи је код 6 (7,50%) жена утврђено присуство ове мутације. Поређењем групе жена са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму са групом жена без тромбозних компликација у овом периоду није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања FV Leiden мутације и појаве ТДВ ($p= 0,54$). Једна испитаница у овој подгрупи је била носилац FV Leiden мутације у хомозиготном облику и ни једна испитаница у контролној групи тако да је статистичка значајност процењена на основу учесталости хомозигота за ову мутацију у општој популацији, 0,155%. Хомозиготно стање FV Leiden мутације има статистички значајну повезаност са настанком ТДВ у овој групи ($p= 0,029$). Статистичким прорачуном добијен ризик за настанак ТДВ у овом периоду код жена хомозиготних носилаца FV Leiden мутације OR износи 23,86 и на основу тог резултата овај фактор ризика има јак утицај на настанак ТДВ у овој подгрупи, међутим остаје дилема да ли се услед малог броја испитаника овај закључак може прихватити.

Код 9 испитаница код којих је ТДВ настала у периоду трудноће није нађена FV Leiden мутација. Од 19 испитаница код којих је ТДВ настала после порођаја, њих 3 је имало FV Leiden мутацију у хетерозиготном а једна у хомозиготном облику. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања FV Leiden мутације и периода настанка ТДВ у овој групи ($p= 0,364$). Учесталост FV Leiden мутације у подгрупама испитаница код којих је ТДВ настала пре и после порођаја приказана је у табели 9.

Табела 9. Учесталост FV Leiden мутације у подгрупама групе са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму

Подгрупа	Број испитаница са FV Leiden мутацијом n (%)	Број испитаница без FV Leiden мутације n (%)	p
ТДВ у трудноћи	0 (0)	9 (105)	0,364
ТДВ после порођаја	4 (21,05)	15 (78,100)	

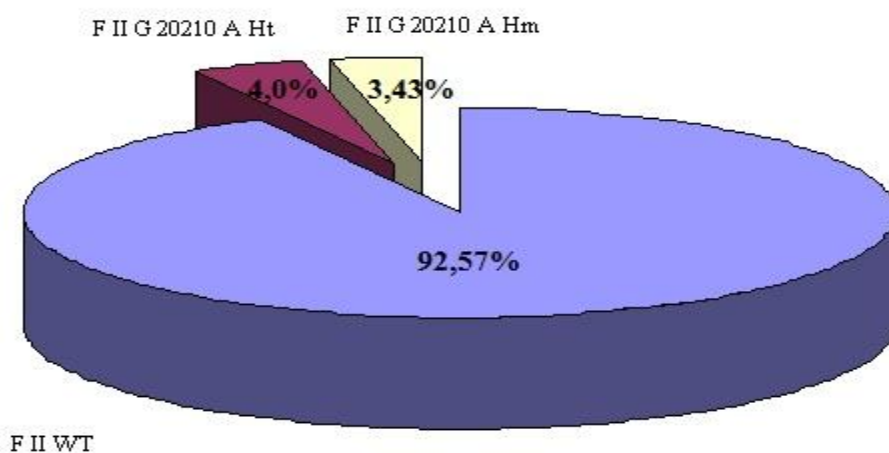
Код једног испитаника са FV Leiden мутацијом дошло је до рецидива ТДВ. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања ове мутације и појаве рецидива ($p=0,447$).

Од 51 испитаника са појавом ТДВ у породици њих 13 (25,5%) има FV Leiden мутацију али ова мутација нема значајно већу учесталост у тој подгрупи испитаника у односу на групу оболелих без присуства ТДВ у породици ($p=0,366$).

4. 6. Мутација гена за протромбин G 20210 A

Присуство мутације у гену за протромбин G 20210 A (FII G 20210 A) је утврђено код 13 (7,43%) оболелих испитаника, код њих 7 (4,0%) у хетерозиготном облику а код њих 6 (3,43%) у хомозиготном облику (Графикон 9).

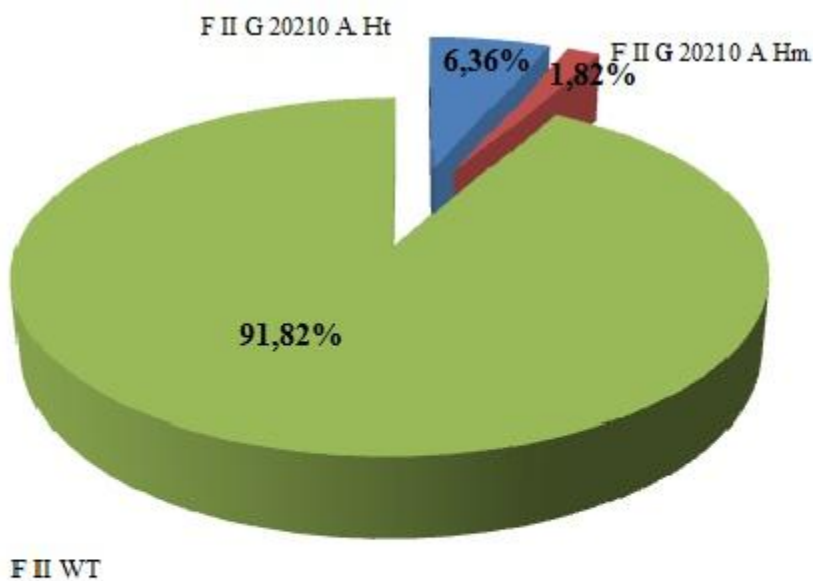
Графикон 9. Учесталост FII G 20210 A мутације у групи оболелих испитаника



Од 113 испитаника контролне групе којима је утврђивано присуство мутације FII G 20210 A, њих 9 (8,18%) су били носиоци ове мутације. Код њих 7 (6,36%) мутација FII G 20210 A је нађена у хетерозиготном облику а код њих двоје (1,82%) у хомозиготном облику (Графикон 10).

Није утврђена статистички значајна повезаност између присуства ове мутације и настанка ТДВ ($p=0,817$).

Графикон 10. Учесталост FII G 20210 A мутације у контролној групи



У групи испитаника са ТДВ код којих је утврђена мутација FII G 20210 A тромбозом су најчешће биле захваћене бутна и карлична вена, код 8 (61,54%) испитаника. Један испитаник (7,69%) је имао тромбозу вена потколенице, а по двоје испитаника (15,38%) су имали тромбозу вена горњих удова и ТДВ са тромбоемблијом плућа. Не постоји статистички значајна повезаност између ове мутације и локализације тромбозног процеса ($p=0,731$).

Локализација тромбозног процеса код испитаника са мутацијом FII G 20210 A приказана је у табели 10.

Табела 10. Локализација тромбозног процеса код испитаника са мутацијом FII G 20210 A

Локализација ТДВ	Број испитаника са FII G 20210 A мутацијом n (%)	Број испитаника без FII G 20210 A мутације n (%)	p
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	8 (61,54)	104 (62,73)	0,731
Потколена тромбоза	1 (7,69)	29 (18,01)	
ТДВ горњих удова	2 (15,38)	14 (8,70)	
ТДВ са ПЕ	2 (15,38)	17 (10,56)	

Код 5 испитаника са повишеним нивоом протромбина није утврђено присуство FII G 20210 A мутације. Један од ових испитаника је имао повишен ниво хомоцистеина (12,8 $\mu\text{mol/l}$), недостатак протеина C (65,6%), повишен ниво FVIII (162%) и пушио је преко 20 цигарета дневно. Једна испитаница је имала недостатак протеина C (52,1%) и скраћено активисано парцијално тромбопластинско време. Једна испитаница је имала недостатак антитромбина (68%) и повишен ниво FVIII (370%). Једна испитаница је имала недостатак протеина Ц (41%), повишен ниво фибриногена (8,513 g/l) и хомозигот је за MTHFR C 677 T мутацију. Једна испитаница је имала вредности свих испитиваних параметара у референтном опсегу и у току испитивања код ње није утврђен могући узрок повишеног нивоа протромбина.

У групи од 28 испитаница са тромбозама насталим у периоду трудноће или пуерперијума код њих 6 (21,43%) је утврђено постојање мутације FII G 20210 A, код две испитанице из ове групе утврђен је хетерозиготни облик а код њих 4 (14,29%) хомозиготни облик. У контролној групи је присуство ове мутације утврђено код 7 (9,2%) жена, код њих 5 у хетерозиготном а код две у хомозиготном облику. Поређењем групе жена са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму са групом жена без тромбозних компликација у овом периоду није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања FII G 20210 A мутације и појаве ТДВ у трудноћи или пуерперијуму ($p=0,187$). Даљом анализом испитивана је повезаност присуства хетерозиготног облика FII G 20210 A мутације и настанка ТДВ у овој групи и статистичка значајност није утврђена ($p=0,104$). Испитивањем повезаности хомозиготног облика FII G 20210 A мутације и настанка ТДВ у овој групи такође није утврђена статистичка значајност ($p=0,074$).

Код 3 испитанице из ове групе које су носиоци FII G 20210 A мутације тромбоза је настала током трудноће и код 3 у послепорођајном периоду (Табела 11). Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања ове мутације и периода настанка тромбозе ($p=0,573$).

Табела 11. Учесталост FII G 20210 A мутације у подгрупама групе са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму

Подгрупа	Број испитаница са FII G 20210 A мутацијом n (%)	Број испитаница без FII G 20210 A мутације n (%)	p
ТДВ у трудноћи	3 (0,33)	6 (0,67)	0,573
ТДВ после порођаја	3 (15,79)	16 (84,21)	

Од 13 испитаника са поновљеним ТДВ само код једне испитанице је утврђено присуство FII G 20210 A мутације. Није утврђена статистички значајна повезаност између постојања ове мутације и појаве поновљене ТДВ ($p= 0,99$).

Код четворо носилаца ове мутације у породици постоји појава венских тромбоза. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања FII G 20210 A мутације и појаве ТДВ у породици ($p= 0,99$).

4. 7. Збирна учесталост мутација FII G 20210 A и FV Leiden

У групи оболелих испитаника мутација FII G 20210 A присутна је код њих 13 (7,43%) а мутација FV Leiden код њих 37 (21,14%). Код двоје испитаника (1,14%) је утврђено удружено присуство обе мутације. Један испитаник је двоструки хетерозигот а једна испитаница је хомозигот за FII G 20210 A мутацију и хетерозигот за FV Leiden мутацију (Графикон 11).

Код 48 (27,43%) оболелих испитаника утврђено је присуство барем једне од ове две најзначајније тромбофилне мутације.

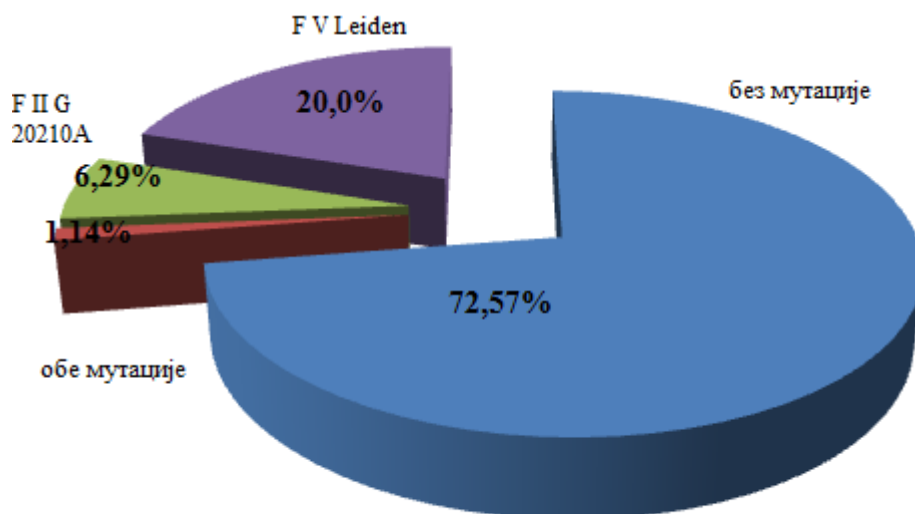
У контролној групи је код 95 испитаника урађено испитивање обе тромбофилне мутације. Код њих 19 (20,0%) утврђено је присуство барем једне од ове две мутације а ни код једног испитаника није утврђено истовремено присуство обе мутације (Графикон 12, Табела 12).

Упоређивањем групе оболелих испитаника и контролне групе није установљена статистички значајна повезаност између постојања барем једне од ове две мутације и појаве ТДВ ($p= 0,183$). Није установљена статистички значајна повезаност ни између постојања обе ове мутације и појаве ТДВ ($p= 0,762$). Овакав резултат је последица приближно једнаке учесталости FII G 20210 A мутације у групи оболелих и контролној групи.

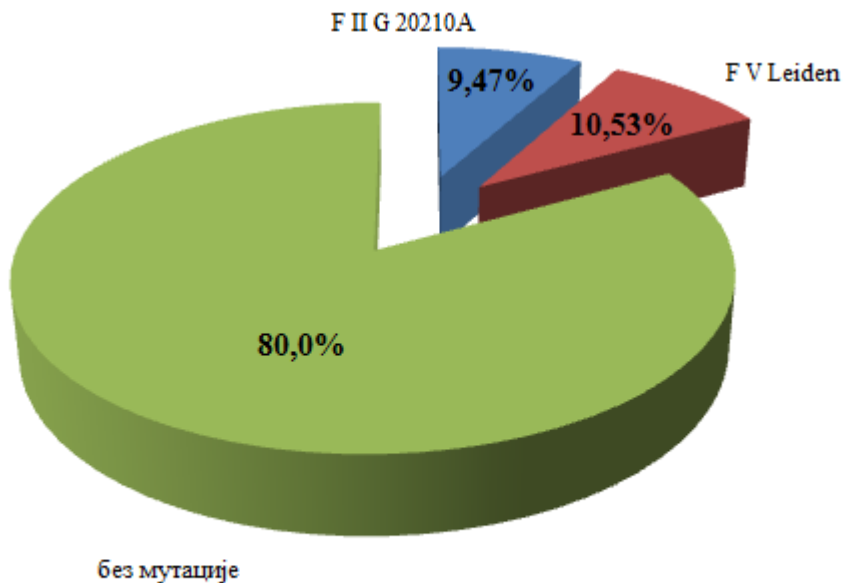
Табела 12. Учесталост FII G 20210 A и FV Leiden мутације у групи оболелих испитаника и контролној групи

Група	Број испитаника са FII G 20210 A или FV Leiden мутацијом n (%)	Број испитаника без FII G 20210 A или FV Leiden мутације n (%)	p
Оболели	48 (27,43)	127 (72,57)	0,177
Контроле	19 (20,0)	76 (80,0)	

Графикон 11. Учесталост мутација FII G 20210 A и FV Leiden у групи оболелих испитаника



Графикон 12. Учесталост мутација FII G 20210 A и FV Leiden у контролној групи



У групи од 28 испитаница са тромбозама насталим у трудноћи или периоду после порођаја код њих 10 (35,71%) је утврђено постојање барем једне од ове две мутације. У контролној групи жена без ТДВ у трудноћи и послепорођајном периоду њих 13 (17,1%) је имало једну од ове две мутације. Поређењем је утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања барем једне од ове две мутације и појаве ТДВ у трудноћи или пуерперијуму ($p = 0,043$). Ризик за настанак ТДВ у овом периоду код носилаца барем једне од ове две мутације OR износи 2,69 (Табела 13). У овој подгрупи није било оболелих испитаница које су носиоци обе мутације.

Табела 13. Учесталост FII G 20210 A и FV Leiden мутације у групи са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму и контролној групи

Група	Број испитаника са FII G 20210 A или FV Leiden мутацијом n (%)	Број испитаника без FII G 20210 A или FV Leiden мутације n (%)	p	OR
Оболели	10 (27,43)	18 (64,29)	0,043	2,69
Контроле	13 (17,1)	63 (82,89)		

Појава поновљеног тромбозног процеса је настала код троје испитаника који су носиоци барем једне од ове две мутације, док њих 45 нису имали поновљену ТДВ до тренутка када је завршено испитивање. Постојање FII G 20210 A или FV Leiden мутације није се могло статистички значајно повезати са понављањем тромбозног процеса ($p=0,998$).

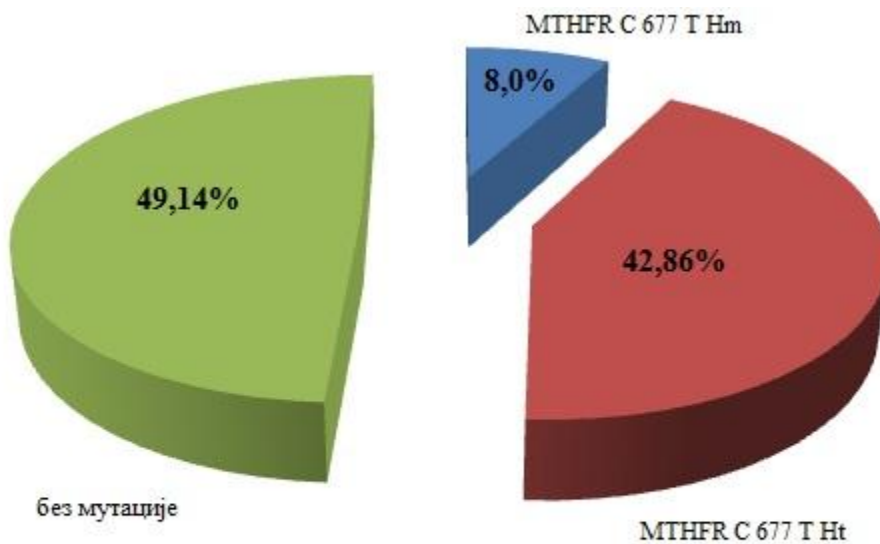
Код 13 испитаника који су били носиоци барем једне од ове две мутације постојала је појава тромбозе у породици. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања неке од ових мутација и појаве тромбозе у породици ($p=0,712$).

4. 8. Мутација гена за метилентетрахидрофолат редуктазу C 677 T

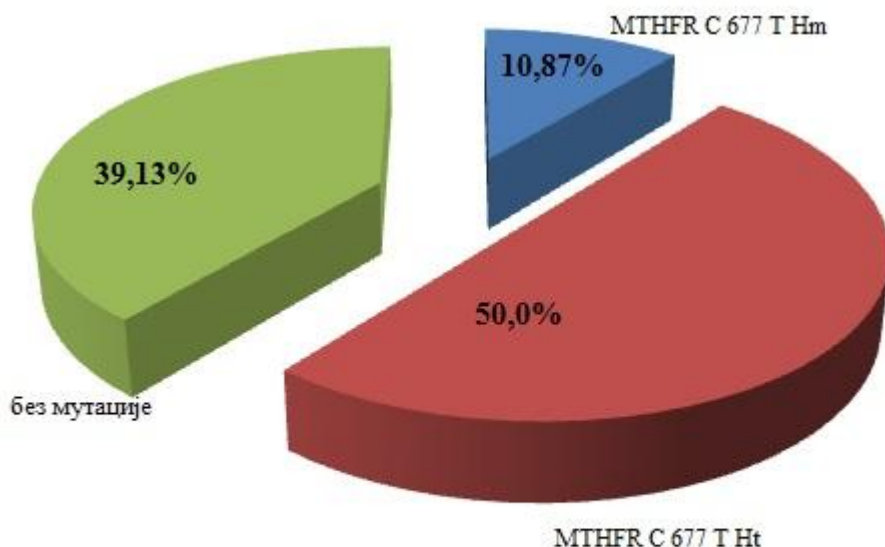
Присуство мутације у гену за метилентетрахидрофолат редуктазу C 677 T (MTHFR C 677 T) је утврђено код 89 (50,86%) оболелих испитаника, код њих 75 (42,86%) у хетерозиготном облику а код њих 14 (8,0%) у хомозиготном облику (Графикон 13).

Од 46 оболелих са хиперхомоцистеинемијом постојање ове мутације утврђено је код њих 28 (60,87%). Код њих 23 (50,0%) MTHFR C 677 T је присутна у хетерозиготном стању а њих 5 (10,87%) су хомозиготни носиоци ове мутације (Графикон 14).

Графикон 13. Учесталост мутације MTHFR C 677 T у групи оболелих испитаника



Графикон 14. Учесталост мутације МТНFR С 677 Т у групи оболелих са хиперхомоцистеинемијом



Од 110 испитаника контролне групе којима је утврђивано присуство МТНFR С 677 Т мутације, њих 67 (62,62%) су били носиоци ове мутације. Код њих 47 (43,93%) мутација МТНFR С 677 Т је нађена у хетерозиготном облику а код њих 20 (18,69%) у хомозиготном облику (Графикон 15).

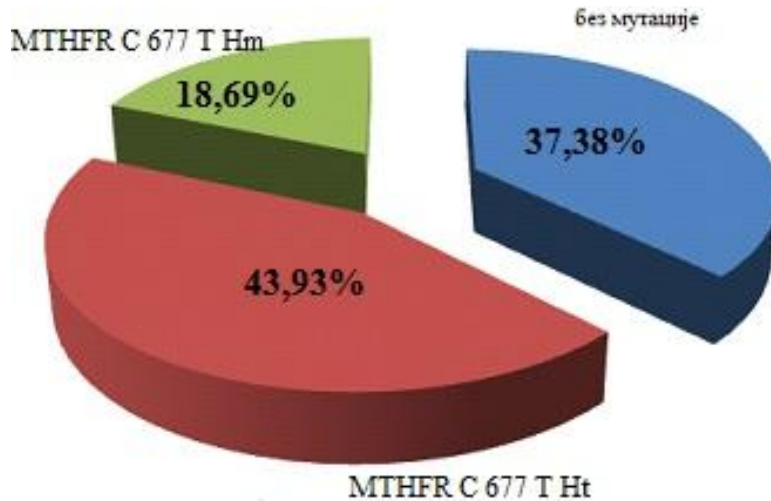
Присуство МТНFR С 677 Т мутације није се могло повезати са настанком ТДВ ($p=0,054$).

Учесталост присуства МТНFR С 677 Т мутације групи оболелих испитаника и контролној групи приказана је у табели 14.

Табела 14. Учесталост мутације МТНFR С 677 Т у групи оболелих испитаника и контролној групи

Група	Број испитаника са МТНFR С 677 Т мутацијом n (%)	Број испитаника без МТНFR С 677 Т мутације n (%)	p
Оболели	89 (50,86)	86 (49,14)	0,054
Контроле	67 (62,62)	40 (37,38)	

Графикон 15. Учесталост мутације МТНFR С 677 Т у контролној групи



Од 89 оболелих испитаника са МТНFR С 677 Т мутацијом, код њих 40 (44,94%) је утврђено и присуство МТНFR А 1298 С мутације. Од 67 испитаника контролне групе са МТНFR С 677 Т мутацијом њих 17 (25,37%) су били и носиоци МТНFR А 1298 С мутације. Истовремено присуство МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С мутације могло се статистички значајно повезати са настанком ТДВ ($p=0,012$) (Табела 15). Ризик за настанак ТДВ код носилаца МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С мутације OR износи 2,40.

Табела 15. Учесталост мутације МТНFR А 1298 С у групи оболелих и здравих испитаника са МТНFR С 677 Т мутацијом

Група	Број испитаника са МТНFR А 1298 С мутацијом n (%)	Број испитаника без МТНFR А 1298 С мутације n (%)	p	OR
Оболели	40 (44,96)	49 (55,06)	0,012	2,40
Контроле	17 (25,37)	50 (74,63)		

Од 46 оболелих са хиперхомоцистеинемијом код њих 11 (23,91%) је утврђено истовремено присуство МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С мутације. Присуство ових

мутација није статистички значајно повезано са појавом хиперхомоцистеинемije код оболелих ($p=0,843$).

Од 18 оболелих са хиперхомоцистеинемijом који нису носиоци МТНFR С 677 Т мутације њих 13 (72,22%) су мушкарци а 5 (27,78%) жене. Њих 3 су носиоци МТНFR А 1298 С мутације и гојазни, њих две су носиоци МТНFR А 1298 С мутације и старије од 60 година, један испитаник је носилац МТНFR А 1298 С и FV Leiden мутације и бивши пушач, један испитаник је носилац МТНFR А 1298 С мутације, одстрањен му је леви бубрег и има повишен крвни притисак, један испитаник је носилац МТНFR А 1298 С мутације, пушач и има шећерну болест а њих 4 су носиоци МТНFR А 1298 С мутације без утврђеног додатног могућег узрока хиперхомоцистеинемije. У овој подгрупи 6 испитаника нису носиоци испитиваних мутација у МТНFR гену, од којих су 5 мушкарци. Један од њих је гојазан и носилац FII 20210 А мутације, један је гојазан и оболео од шећерне болести, један је пушач, један има повишен крвни притисак а код једног до момента када је завршено испитивање није утврђен могући узрок хиперхомоцистеинемije. Оболела испитаница са хиперхомоцистеинемijом без испитиваних мутација у МТНFR гену је у време настанка ТДВ имала 61 годину.

Просечна вредност нивоа хомоцистеина код оболелих хетерозигота без присуства МТНFR А 1298 С мутације била је 13,73 mmol/l, распон вредности је био од 12,1 до 17,74 mmol/l, док је код оболелих хомозигота или оболелих са удруженим присуством МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С мутације просечна вредност била 15,75 mmol/l, распон вредности је био од 12,5 до 23,4 mmol/l. Носиоци МТНFR С 677 Т мутације у хомозиготном стању или удружене са МТНFR А 1298 С мутацијом имали су виши ниво хомоцистеина у односу на оболеле са хиперхомоцистеинемijом код којих је МТНFR С 677 Т мутација у хетерозиготном стању присутна самостално али ова корелација није статистички значајна ($p=0,057$).

У групи испитаника са ТДВ код којих је утврђена МТНFR С 677 Т мутација тромбозом су најчешће биле захваћене бутне и карлична вена, код 57 (64,04%) испитаника. Тромбозу вена потколенице имало је 15 испитаника (16,85%), 9 испитаника (10,11%) су имали тромбозу вена горњих удова а њих 8 (9,0%) ТДВ са тромбоемблијом плућа.

Локализација тромбозног процеса код испитаника са мутацијом МТНFR С 677 Т приказана је у табели 16. Применом Крускал- Волисовог теста утврђено је да не постоји статистички значајна повезаност између присуства ове мутације и локализације тромбозног процеса ($p=0,756$).

У групи од 28 испитаника са тромбозама насталим у трудноћи или периоду после порођаја код њих 15 (53,57%) је утврђено постојање мутације МТНFR С 677 Т, код 11 (39,29%) испитаника из ове групе утврђен је хетерозиготни облик а код њих 4 (14,29%) хомозиготни облик. Код 42 (61,76%) жене у контролној групи без ТДВ у трудноћи и послепорођајном периоду је утврђено постојање ове мутације. Поређењем са контролном групом жена није утврђено постојање повезаности између постојања МТНFR С 677 Т мутације и појаве ТДВ у трудноћи или пуерперијуму ($p=0,458$). Хомозиготни облик мутације је утврђен код 10 (14,71%) жена контролне групе. Присуство хомозиготног облика ове мутације такође се не може статистички значајно повезати са настанком ТДВ у овом периоду ($p=0,99$).

Табела 16. Локализација тромбозног процеса код испитаника са мутацијом МТНFR С 677 Т

Локализација ТДВ	Број испитаника са МТНFR С 677 Т мутацијом n (%)	Број испитаника без МТНFR С 677 Т мутације n (%)	p
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	57 (64,04)	52 (61,18)	0,756
Потколена тромбоза	15 (16,85)	15 (17,65)	
ТДВ горњих удова	9 (10,11)	7 (8,24)	
ТДВ са ПЕ	8 (9,0)	11 (5,79)	

Код 4 испитанице из ове групе које су носиоци МТНFR С 677 Т мутације тромбоза је настала током трудноће а код њих 11 у послепорођајном периоду. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања ове мутације и периода настанка тромбозе ($p= 0,796$). Код све 4 испитанице код којих је утврђен хомозиготни облик ове мутације тромбоза је настала у периоду трудноће. Од 11 жена хетерозиготних носилаца код њих 10 је тромбоза настала у послепорођајном периоду. Присуство МТНFR С 677 Т мутације у хомозиготном облику може се статистички значајно повезати са настанком ТДВ у трудноћи ($p= 0,01$). Релативни ризик за настанак ТДВ у трудноћи у односу на послепорођајни период код жена хомозиготних носилаца ове мутације је 4,80 (Табела 17).

Од 13 испитаника са поновљеним ТДВ код њих 6 (46,15%) је утврђено присуство МТНFR С 677 Т мутације, код њих 4 у хетерозиготном а код двоје у хомозиготном облику. Није утврђена статистички значајна повезаност између постојања ове мутације и појаве поновљене ТДВ ($p= 0,724$). Међутим, самостално присуство МТНFR С 677 Т мутације се статистички значајно чешће јавља код оболелих са рецидивима (код њих 9, односно 69,23%) у односу на оболеле без рецидива ТДВ (50 од 162, тј. 30,86% испитаника, $p= 0,01$). Ризик за поновни настанак ТДВ код носилаца МТНFR С 677 Т мутације OR износи 5,04.

Табела 17. Учесталост МТНFR С 677 Т мутације у подгрупама групе са ТДВ насталом у трудноћи и пуерперијуму

Подгрупа	Број испитаница хетерозиготних за МТНFR С 677 Т мутацију n (%)	Број испитаница хомозиготних за МТНFR С 677 Т мутацију n (%)	Број испитаница без МТНFR С 677 Т мутације n (%)	p
ТДВ у трудноћи	1	4	4	0,01 RR= 4,80
ТДВ после порођаја	10	0	9	

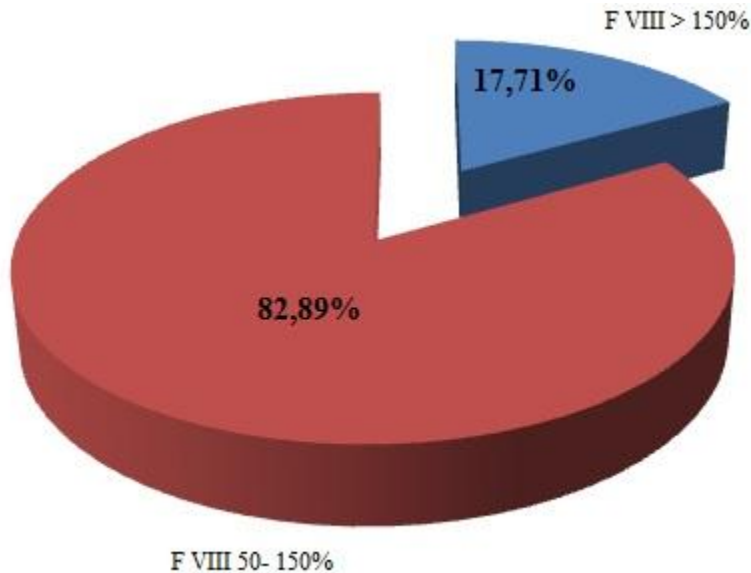
Код 25 (49,0%) носилаца ове мутације у породици постоји појава венских тромбоза, од којих су 16 хетерозиготни а 9 хомозиготни носиоци. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности измеђи постојања МТНFR С 677 Т мутације и појаве ТДВ у породици ($p= 0,755$).

4. 9. Повишен ниво фактора VIII

У групи оболелих испитаника ниво FVIII је био од 32% до 370%, средња вредност 141,91%. Повишене вредности (изнад 150%) су утврђене код 36 испитаника. Одређивањем нивоа Ц- реактивног протеина (CRP) искључени су испитаници код којих је ниво FVIII повишен у оквиру реакције акутне фазе и по искључењу ових испитаника ниво FVIII је био повишен код 31 испитаника (17,71%) (Графикон 16). На основу учесталости ове тромбофилије у општој популацији од 11% (6), није утврђено постојање статистичке значајности између постојања повишеног нивоа FVIII и настанка ТДВ ($p= 0,136$).

У групи испитаница са ТДВ насталим у трудноћи и пуерперијуму ниво FVIII је био од 103% до 370%, средња вредност 145,0%. Повишене вредности су утврђене код 6 (21,43%) испитаница. Код једне испитанице са повишеним нивоом FVIII ТДВ је настала током трудноће а код њих 5 после порођаја. Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације није установљено постојање статистичке значајности између нивоа FVIII и времена настанка тромбозног инцидента ($R= 0,227$, $p= 0,245$).

Графикон 16. Учесталост повишеног нивоа FVIII у групи оболелих испитаника



Највећи број испитаника са повишеним нивоом FVIII имао је тромбозу натколених или карличних вена, њих 20. Код 5 испитаника тромбозом су биле захваћене вене потколенице а код њих троје вене горњих удова. Троје испитаника су имала плућну тромбоемболију.

Локализација ТДВ код испитаника са повишеним нивоом FVIII приказана је у табели 18.

Табела 18. Локализација ТДВ код испитаника са повишеним нивоом FVIII

Локализација ТДВ	Број испитаника са повишеним нивоом FVIII n (%)	Број испитаника без повишеног нивоа FVIII n (%)	p
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	20 (64,52)	89 (64,03)	0,455
Потколена тромбоза	5 (16,12)	25 (17,104)	
ТДВ горњих удова	3 (9,68)	13 (9,35)	
ТДВ са ПЕ	3 (9,68)	16 (11,51)	

Коришћењем Ман- Витни U теста није утврђено постојање статистички значајне повезаности између повишеног нивоа FVIII и локализације тромбозног процеса (p= 0,455).

Појава поновљеног тромбозног процеса је настала код две испитанице (7,14%) које су имале повишен ниво FVIII, док њих 26 нису имали поновљену ТДВ до тренутка када је завршено испитивање. Постојање повишеног нивоа FVIII није се могло статистички значајно повезати са понављањем тромбозног процеса ($p=0,100$).

Код 8 (28,58%) испитаника са повишеним нивоом FVIII постојала је појава тромбозе у породици. Није се могло са статистичком значајношћу повезати постојање повишеног нивоа FVIII и појаве тромбозе у породици ($p=0,942$).

4. 10. Повишен ниво фибриногена

У групи оболелих испитаника ниво фибриногена је одређен код 163 испитаника и вредности су биле у опсегу од 0,72 до 8,513 g/l, средња вредност 3,813 g/l. Повишене вредности (изнад 4 g/l) су утврђене код 20 испитаника. Одређивањем нивоа Ц-реактивног протеина (CRP) искључени су испитаници код којих је ниво фибриногена повишен у оквиру реакције акутне фазе и по искључењу ових испитаника ниво фибриногена је био повишен код 16 испитаника (9,81%) (Графикон 17). Код три оболела у овој подгрупи је истовремено био повишен и ниво хомоцистеина.

У групи испитаница са ТДВ насталим у трудноћи и пуерперијуму ниво фибриногена је био од 0,72 до 8,513 g/l, средња вредност 4,13 g/l. Повишене вредности су утврђене код 7 (25,0%) испитаница, код којих су вредности CRP биле у референтном опсегу. Код 5 испитаница са повишеним нивоом фибриногена ТДВ је настала током трудноће а код њих две после порођаја. Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације није установљено постојање статистичке значајности између нивоа фибриногена и времена настанка тромбозног инцидента ($R=-0,537$, $p=0,217$).

Највећи број испитаника са повишеним нивоом фибриногена имао је тромбозу натколених или карличних вена, њих 9 (60,0%). Код 6 (37,5%) испитаника тромбозом су биле захваћене вене потколенице а код једне испитанице (6,25%) вене горњих удова. Нико од испитаника у овој подгрупи није имао плућну тромбоемболију.

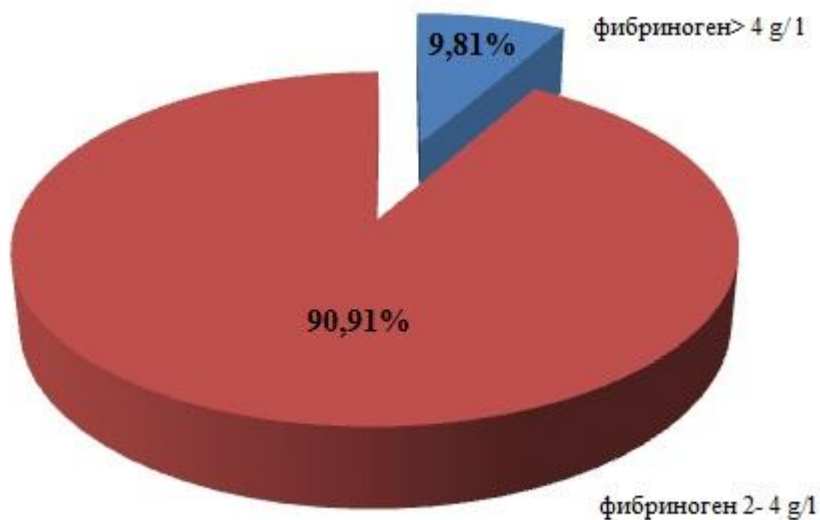
Локализација ТДВ код испитаника са повишеним нивоом фибриногена приказана је у табели 19.

Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између повишеног нивоа фибриногена и локализације тромбозног процеса ($p=0,737$).

Појава поновљеног тромбозног процеса је настала код двоје испитаника који су имали повишен ниво фибриногена, док њих 13 нису имали поновљену ТДВ до тренутка када је завршено испитивање. Постојање повишеног нивоа фибриногена није се могло статистички значајно повезати са понављањем тромбозног процеса ($p=0,693$).

Код 4 испитаника са повишеним нивоом фибриногена постојала је појава тромбозе у породици. Није се могло са статистичком значајношћу повезати постојање повишеног нивоа фибриногена и појаве тромбозе у породици ($p=0,104$).

Графикон 17. Учесталост повишеног нивоа фибриногена у групи оболелих испитаника



Табела 19. Локализација ТДВ код испитаника са повишеним нивоом фибриногена

Локализација ТДВ	Број испитаника са повишеним нивоом фибриногена n (%)	Број испитаника без повишеног нивоа фибриногена n (%)	p
Тромбоза коленске вене, вена натколенице и карличних вена	9 (56,25)	75 (58,59)	0,737
Потколена тромбоза	6 (37,5)	23 (17,101)	
ТДВ горњих удова	0 (0)	15 (11,72)	
ТДВ са ПЕ	1 (6,25)	15 (11,72)	

4. 11. Збирна учесталост свих испитиваних тромбофилија

Посматрањем појаве свих испитиваних наследних тромбофилија: недостатка антитромбина, протеина Ц, протеина С, мутација FII G 20210 A, MTHFR C 677 T и FV Leiden у групи оболелих испитаника, код њих 121 (68,14%) је утврђено постојање барем једне наследне тромбофилије.

Уколико посматрамо збирно све испитиване тромбофилије, односно поред наследних и мешовите- повишен ниво FVIII и повишен ниво фибриногена у случајевима где нису повезани са присуством акутне фазе запаљења (што је утврђено одређивањем нивоа CRP), затим хиперхомоцистеинемију, повишен ниво протромбина и резистенцију на APC, код 148 (84,57%) оболелих испитаника је утврђено постојање барем једне тромбофилије.

Учесталост свих испитиваних тромбофилија у групи оболелих испитаника, постојање статистички значајне повезаности и релативни ризик за настанак ТДВ код присуства појединих тромбофилија су приказани у табели 20. Укупан број испитаника са тромбофилијама је мањи од оног који се добија простим сабирањем носилаца појединачних тромбофилија због постојања оболелих са удруженом тромбофилијом. Вредности ризика које су израчунате на основу учесталости одређене тромбофилије у општој популацији означене су са *.

У групи испитаница са ТДВ насталим у трудноћи и послепорођајном периоду постојање барем једне тромбофилије је утврђено код њих 25 (89,29%). У контролној групи жена без тромбозних компликација у трудноћи и послепорођајном периоду постојање барем једне тромбофилије је утврђено код њих 51 (68,0%). Постојање тромбофилије се може статистички значајно повезати са настанком ТДВ током трудноће и послепорођајног периода ($p=0,029$).

Од 9 испитаница код којих је ТДВ настала током трудноће код њих 8 (88,89%) је утврђено присуство наследне тромбофилије. Од 19 испитаница код којих је ТДВ настала у послепорођајном периоду постојање наследне тромбофилије утврђено је код њих 15 (78,95%). Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између периода настанка тромбозе и постојања наследне тромбофилије ($p=0,909$).

Табела 20. Збирна табела учесталости испитиваних тромбофилија у групи оболелих испитаника

Врста тромбофилије	Број оболелих испитаника n (%)	Контролна група n (%)	p	OR
Недостатак АТ	8 (4,57)	0	-	138,85*
Недостатак РС	2 (2,86)	0	-	4,35*
Недостатак PS	18 (10,28)	0	-	128,57*
Укупно са недостатком АТ, РС, PS	29 (16,57)	0	-	-
FV Leiden	37 (21,14)	10 (10,42)	0,026	2,31
APC- R	48 (30,38)	-	-	-
FII G 20210 A	13 (7,43)	9 (8,18)	0,817	-
MTHFR C 677 T	89 (50,86)	67 (62,62)	0,054	-
tHcy > 12 μ mol/l	46 (26,29)	-	-	-
FVIII > 150%	31 (17,71)	-	-	-
фибриноген > 4 g/l	15 (8,57)	-	-	-

4. 12. Удружена наследна тромбофилија

Постојање удружене наследне тромбофилије само по себи значајно повећава ризик од настанка ТДВ који постаје још већи уколико постоји садејство неког од стечених фактора ризика. Очекивано је да се код великог броја оболелих утврди присуство удружене наследне тромбофилије с обзиром на значајну учесталост мутација FII G 20210 A, MTHFR C 677 T и FV Leiden мутације понаособ у општој популацији тако да није ретко њихово удружено наслеђивање и наслеђивање ових мутација са другим мутацијама које носе ризик за настанак ТДВ.

У групи оболелих постојање удружене наследне тромбофилије је утврђено код 37 испитаника (21,14%).

Постојање две наследне тромбофилије је утврђено код 28 (16,0%) испитаника а код 9 (5,14%) је утврђено постојање три наследне тромбофилије. Једна испитаница је носилац FII G 20210 A мутације у хомозиготном облику уз хетерозиготну FV Leiden мутацију. Код две испитанице и два испитаника (2,29%) утврђено је истовремено присуство FII G 20210 A и MTHFR C 677 T мутације. Једна испитаница је двоструки хомозигот а преосталих троје су двоструки хетерозиготи. Код 12 испитаница и 6 испитаника (укупно 10,29%) утврђено је истовремено присуство MTHFR C 677 T и FV Leiden мутације. По три испитаника и три испитанице су носиоци мутације MTHFR C 677 T у хетерозиготном облику уз хомозиготну FV Leiden мутацију а преосталих 3 испитаника и 9 испитаница су

двоструки хетерозиготи. Једна испитаница (0,57%) је уз дефицит протеина Ц имала МТНFR С 677 Т мутацију у хомозиготном облику. Два испитаника (1,14%) су уз дефицит антитромбина имала МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику. Једна испитаница (0,57%) је уз дефицит протеина С имала FV Leiden мутацију у хомозиготном облику. Код три испитанице (1,71%) утврђено је истовремено присуство FII G 20210 А и МТНFR С 677 Т мутације и дефицита протеина С, од којих су две биле двоструки хомозиготи а једна двоструки хетерозигот за FII G 20210 А и МТНFR С 677 Т мутацију. Код једног испитаника (0,57%) утврђено је истовремено присуство FII G 20210 А, МТНFR С 677 Т и FV Leiden мутације у хетерозиготном стању. Две испитанице и један испитаник (1,71%) су уз дефицит протеина С имали МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику. Једна испитаница (0,57%) је уз дефицит антитромбина имала МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику и резистенцију на активисани протеин С без FV Leiden мутације. Код једне испитанице (0,57%) је уз дефицит протеина С нађена МТНFR С 677 Т мутација у хетерозиготном облику и резистенција на активисани протеин С без FV Leiden мутације. Једна испитаница (0,57%) је уз дефицит протеина Ц и протеина С имала МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику. Код две испитанице (1,14%) је, уз дефицит протеина С, нађена МТНFR С 677 Т мутација у хетерозиготном облику као и FV Leiden мутација, код једне у хетерозиготном а код друге у хомозиготном облику.

У ову подгрупу није убројано двоје испитаника (1,14%) који су, уз резистенцију на активисани протеин Ц без FV Leiden мутације, имали и FII G 20210 А мутацију- један испитаник у хомозиготном облику и једна испитаница у хетерозиготном облику, као и две испитанице и један испитаник (1,71%), који су уз резистенцију на активисани протеин Ц без FV Leiden мутације имали и МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику јер APC- резистенција не мора нужно имати наследну основу (23- 26).

У контролној групи било је 6 испитаника (5,36%) са удруженом наследном тромбофилијом. Код три испитанице и једног испитаника (3,57%) утврђено је истовремено присуство FII G 20210 А и МТНFR С 677 Т мутације. Две испитанице су биле двоструки хомозиготи а једна двоструки хетерозигот. Један испитаник био је носилац FII G 20210 А мутације у хетерозиготном и МТНFR С 677 Т мутације у хомозиготном облику. Код две испитанице (1,75%) утврђено је истовремено присуство FV Leiden и МТНFR С 677 Т мутације. Једна испитаница је била двоструки хетерозигот а једна хомозигот за МТНFR С 677 Т мутацију и хетерозигот за FV Leiden мутацију.

Постојање удружене наследне тромбофилије генерално се може статистички значајно повезати са настанком ТДВ ($p= 0,001$) а процењени ризик OR износи 4,60.

Уколико се рачуна ризик за настанак ТДВ код носилаца FII G 20210 А и FV Leiden мутације на основу процењене учесталости удруженог присуства ових мутација у нашој популацији од 0,61% добија се вредност OR од 1,91.

Уколико се посматра учесталост носилаца FII G 20210 А и МТНFR С 677 Т мутације у групи оболелих и контролној групи не уочава се статистичка значајна повезаност између присуства обе ове мутације и настанка ТДВ ($p= 0,781$).

Уколико се посматра учесталост носилаца МТНFR С 677 Т и FV Leiden мутације у групи оболелих и контролној групи присуство обе мутације се може статистички значајно повезати са настанком ТДВ ($p= 0,007$). Ризик за настанак ТДВ код носилаца обе мутације OR износи 6,029.

Уколико се посматра учесталост носилаца МТНFR А 1298 С мутације у групи оболелих и контролној групи испитаника са МТНFR С 677 Т мутацијом може се утврдити

статистичка значајна повезаност између присуства обе ове мутације и настанка ТДВ ($p=0,012$). Ризик за настанак ТДВ код носилаца МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С мутације OR износи 2,40 (Табела 21). Вредности рачунате у односу на подгрупе носилаца МТНFR С 677 Т мутације у групи оболелих и контролној групи означене су са **.

Табела 21. Збирна табела ризика удружених наследних тромбофилија у групи оболелих у односу на контролну групу

Врста тромбофилије	Број оболелих испитаника n (%)	Контролна група n (%)	p	OR
МТНFR С 677 Т и МТНFR А 1298 С	40 (44,96) **	17 (25,37) **	0,012	2,40
МТНFR С 677 Т и FV Leiden	19 (10,86)	2 (2,15)	0,007	6,029

Постојање удружене тромбофилије (изузевши МТНFR С 677 Т мутацију у хетерозиготном облику) нађено је код 6 (21,43%) испитаница са ТДВ насталим у трудноћи и послепорођајном периоду и код 5 (6,67%) здравих жена и може се статистички значајно повезати са настанком ТДВ током трудноће и послепорођајног периода ($p=0,04$). Ризик OR за за настанак ТДВ у овом периоду код жена са удруженом тромбофилијом износи 3,76 (Табела 22).

Табела 22. Присуство удружене наследне тромбофилије у групи испитаница са ТДВ насталом у периоду трудноће и пуерперијума у односу на контролну групу жена

Група	ТДВ у трудноћи и пуерперијуму n (%)	Контролна група n (%)	p	OR
Присуство удружене тромбофилије	8 (28,6%)	5 (6,6%)	0,04	3,76

Удружено постојање наследних тромбофилија и повишеног нивоа хомоцистеина без присуства МТНFR С 677 Т мутације утврђено је код 14 оболелих (8,0%). Постојање две тромбофилије установљено је код 10 испитаника, постојање три тромбофилије код три испитаника а постојање четири тромбофилије код једног испитаника.

Уколико се посматра удружено постојање повишеног нивоа FVIII (без повишеног нивоа CRP) и наследних тромбофилија, код 19 (10,86%) оболелих је утврђено постојање више од једне тромбофилије. Постојање две тромбофилије утврђено је код 12 оболелих испитаника, постојање три тромбофилије код два испитаника, постојање четири тромбофилије код три испитаника а код једног оболелог је утврђено постојање чак пет

тромбофилија (недостатак протеина С, мутације FII G 20210 А и MTHFR C 677 T, повишен ниво FVIII и фибриногена без повишеног нивоа CRP).

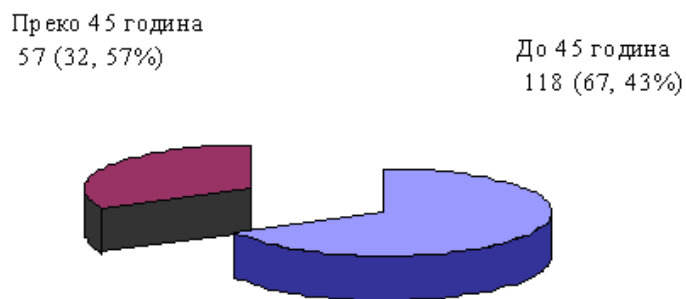
Удружено постојање наследних тромбофилија и повишеног нивоа фибриногена (без повишеног нивоа CRP) утврђено је код 12 оболелих (6,86%). Постојање две тромбофилије утврђено је код 5 испитаника, постојање три тромбофилије код три испитаника, постојање четири тромбофилије код три испитаника и постојање пет тромбофилија код једног испитаника. Присуство удружене тромбофилије утврђено је код укупно 67 оболелих испитаника (38,29%).

4. 13. Старост и настанак ТДВ

У оквиру подгрупе оболелих жена и подгрупе оболелих мушкараца извршена је подела на подгрупу старости до 45 година и подгрупу старости преко 45 година у време настанка ТДВ. Подгрупу жена старости до 45 година сачињавало је 83 испитанице (72,8%) а подгрупу жена старости преко 45 година сачињавало је 31 испитаница (27,2%). Подгрупу мушкараца старости до 45 година сачињавало је 35 (57,38%) испитаника а подгрупу мушкараца старости преко 45 година сачињавало је 26 (42,62%) испитаника. Укупан број испитаника који су у време настанка ТДВ имали до 45 година био је 118 (67,43%) а преко 45 година имало је 57 испитаника (32,57%) (Графикони 18,19 и 20).

Анализом старости оболелих испитаника издвајају се три старосне групе са већом учесталашћу ТДВ: 26- 35 година, 36- 45 и 46- 55 година, при чему је ТДВ најчешћа у доби од 36 до 45 година (код њих 49,односно 28,0% укупног броја испитаника) (Табела 23, Графикон 21). Најприсутнији пролазни и трајни фактори ризика повезани са појавом ТДВ у овој старосној подгрупи били су: гојазност, трудноћа и пуерперијум, операције, повреде и пушење. Код 31 од 49 испитаника ове подгрупе (63,27%) био је присутан најмање један од фактора ризика. Њих 8 (16,33%) су били гојазни, један испитаник (2,04%) је био истовремено пушач, код једног гојазног испитаника је ТДВ настала после операције а код једног након повреде. Једна гојазна испитаница је имала хиперлиппротеинемiju уз снижен ниво ХДЛ холестерола, једна повишен крвни притисак а код ње је ТДВ настала после порођаја. Њих 7 (14,29%) били су пушачи, 6 у тренутку настанка ТДВ и једна бивши пушач. Од ових 7 испитаника две испитанице су имале и спонтани побачај, један испитаник је уједно био оперисан и имао запаљење плућа а један је имао повреду и повишен крвни притисак. Код 4 испитанице ове подгрупе (8,16%) ТДВ је настала у периоду трудноће или пуерперијума а једна од њих је имала и повишен крвни притисак. Код њих две (4,08%) ТДВ је настала након повреде, код троје (6,12%) након операције од којих је један уједно имао и повишен притисак, код две испитанице (4,08%) у току примене хормоналне терапије. Троје испитаника (6,12%) имало је повишен крвни притисак без утврђеног присуства других фактора ризика. Једна испитаница (2,04%) у овој подгрупи је имала хиперлиппротеинемiju а једна (2,04%) мијелофиброзу.

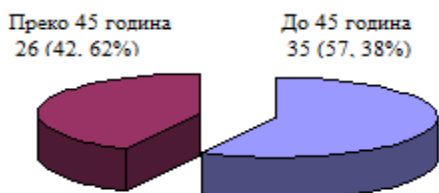
Графикон 18. Старост испитаника у време настанка ТДВ



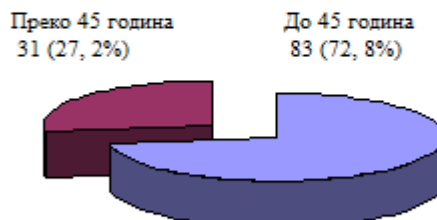
Табела 23. Старост испитаника у време настанка ТДВ

Старост испитаника (године)	Број оболелих испитаника n (%)
5- 15	1 (0,57)
16- 25	30 (17,14)
26- 35	39 (22,29)
36- 45	49 (28,0%)
46-55	29 (16,57)
56- 65	19 (10,86)
66- 75	6 (3,43)
76- 85	2 (1,14)

Графикон 19. Старост оболелих мушкараца у време настанка ТДВ



Графикон 20. Старост оболелих жена у време настанка ТДВ



Графикон 21. Старост испитаника у време настанка ТДВ



У подгрупи испитаника старости 26- 35 година најприсутнији пролазни и трајни фактори ризика повезани са појавом ТДВ били су: трудноћа и пуерперијум, примена хормоналне контрацепције, операције, повреде, пушење и гојазност. Најмање један од ових фактора био је присутан код 25 од 39 испитаника ове подгрупе (64,10%). Код 8 испитаница (20,51%) ТДВ је настала у периоду трудноће или пуерперијума, код 5 испитаница (12,82%) у току примене хормоналне терапије, код 2 испитаника (5,13%)

после повреде, код њих 2 (5,13%) после операције, од којих је једна уједно и пушач. Њих троје (7,69%) били су гојазни, а један од њих је претходно имао срчани удар и инфекцију Коксаки вирусом. Две испитанице (5,13%) су имале хипотиреозу, једна од њих је имала и хиперлиппротеинемију и повишен ниво пролактина а друга хипофибриногенемију и Жилберов синдром. Један испитаник (2,56%) је имао повишен крвни притисак, једна (2,56%) је била пушач и једна (2,56%) бивши пушач без присуства других фактора ризика у време настанка ТДВ.

Најприсутнији пролазни и трајни фактори ризика повезани са појавом ТДВ у подгрупи испитаника старости 46- 55 били су: гојазност, операције, примена хормоналне терапије, повреде и пушење а у овој групи је значајна и појава шећерне болести као и повишеног крвног притиска. Најмање један од ових фактора био је присутан код 24 од 29 испитаника ове подгрупе (82,76%). 10 од 29 испитаника ове подгрупе (34,48%) су били гојазни. Од њих су двоје имали и повишен крвни притисак (тј. једна испитаница је имала повишен крвни притисак и спонтани побачај а један испитаник је имао повишен крвни притисак и бивши је пушач). Двоје гојазних испитаника имало је шећерну болест а од њих једна и хипотиреозу. Двоје гојазних испитаника је имало и повреду пре тромбозе, једна операцију а једна спонтани побачај. Четворо од преосталих испитаника у овој старосној подгрупи је оперисано пре настанка ТДВ, од којих су троје имали повишен крвни притисак а двоје су уједно и бивши пушачи. Један од њих има уједно и хиперлиппротеинемију и снижен ниво ХДЛ холестерола. Од преосталих две испитанице су имале шећерну болест од којих је једна уједно била пушач а друга у време ТДВ примала хормонску терапију. Од преосталих две испитанице су имале повреду пре настанка ТДВ а једна од њих је пушач. Од преосталих испитаника троје је имало повишен крвни притисак од којих је једна испитаница уједно пушач и имала је карцином грлића материце а један испитаник је уједно имао мождани удар. Од преосталих троје су пушачи од којих једна бивши. Једна испитаница болује од реуматоидног артритиса а код једне је честа појава упале површинских вена.

У подгрупи испитаника старости 16- 25 година најприсутнији пролазни и трајни фактори ризика повезани са појавом ТДВ били су трудноћа и пуерперијум, гојазност, примена хормоналне терапије, операције, пушење и инфекције. Најмање један од ових фактора био је присутан код 22 од 30 испитаника ове подгрупе (73,33%). Њих петоро (16,67%) били су гојазни, један од њих је пре настанка ТДВ оперисан и уједно је оболео од наследне сензорне и моторне неуропатије а код две гојазне испитанице је ТДВ настала у периоду после порођаја. Код 10 испитаница (33,33%) ТДВ је настала у периоду трудноће или пуерперијума (код једне у трудноћи и код 8 после порођаја), од којих су две уједно и пушачи. Код 3 испитанице (10,0%) ТДВ је настала у току примене хормоналне терапије, а код једне од ових испитаница је присутан и Pagett- Schrötter синдром. Код два испитаника (6,67%) ТДВ је настала после операције, два испитаника (6,67%) су имала инфекцију у време настанка ТДВ а једна испитаница глауком.

Најзаступљенији пролазни и трајни фактори ризика повезани са појавом ТДВ у подгрупи испитаника старости 56- 65 били су: гојазност, операције, пушење, инфекције као и појава повишеног крвног притиска. Код 14 од 19 испитаника ове подгрупе (73,68%) био је присутан најмање један од фактора ризика. Такође, у овој старосној подгрупи је значајно више оболелих мушкараца у односу на жене (63,16% : 36,84%) ($p=0,006$). Пет испитаница и један испитаник (31,58%) били су гојазни, троје од ових шесторо су имали и повишен крвни притисак, један је уједно имао хиперлиппротеинемију тип II а једна од

њих је уз ове факторе ризика пре настанка ТДВ оперисана. Пет испитаника (26,32%) су пушачи, од којих су три бивша. Један бивши пушач је имао уједно инфекцију, зачепљење бутне артерије и повишен крвни притисак, један псоријазу, алергијску кијавицу и повишен крвни притисак, један је након ТДВ добио и исхемијски мождани удар а један пушач анеуризму трбушне аорте, камен у жучи, варикозитете и проширење бубрежне карлице и чашице. Код двоје од преосталих испитаника (10,23%) ТДВ је настала после инфекције а код једног (5,26%) после повреде.

У подгрупи испитаника старости 66- 75 година фактори ризика били су хиперлиппротеинемија и операције (код 4 од 6 тј. 66,67%) испитаника. Две испитанице (33,33%) су имале хиперлиппротеинемију од којих код једне уједно постоји срчана мана у виду непотпуног затварања митралног и трикуспидалног залиска. Код два испитаника (33,33%) ТДВ је настала после операције а један од њих је уједно гојазан.

ТДВ се најређе јавља у групи испитаника млађих од 15 година и старијих од 75 година. Једна испитаница (0,57%) је имала 85 година и повишен крвни притисак а једна испитаник (0,57%) је имао 77 година, мождани удар, убрзан рад срца и емболију артерије у време тромобзе.

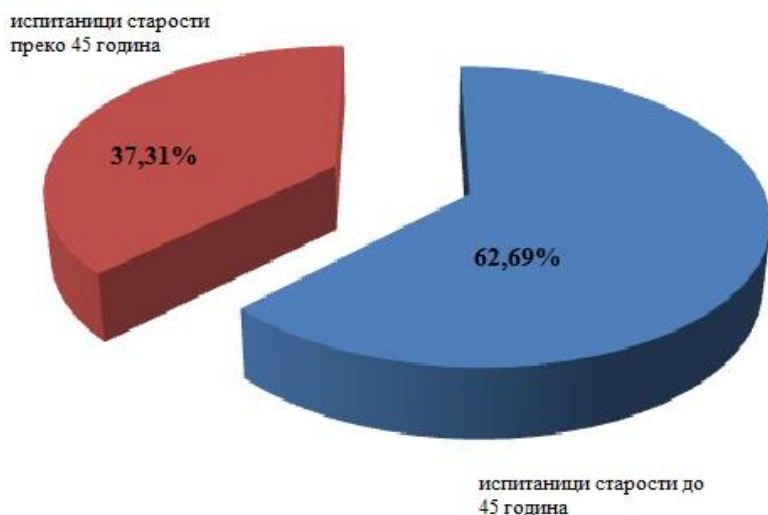
Један испитаник (0,57%) имао је 7 година и у време настанка ТДВ код њега није утврђено присуство фактора ризика.

У групи оболелих њих 38 (21,71%) су били гојазни у време настанка ТДВ. У контролној групи гојазност је утврђена код 3 (2,68%) испитаника. Гојазност је статистички значајно повезана са настанком ТДВ ($p < 0,001$). Ризик OR за настанак ТДВ код гојазних особа је 10,078, што гојазност сврстава у умерено јаке факторе ризика за настанак ТДВ.

Присуство удружене тромбофилије утврђено је код укупно 67 оболелих испитаника (38,29%). Жена је више него мушкараца (61,19%: 38,81%) али ова разлика у заступљености полова није статистички значајна ($p = 0,388$).

Просечна старост испитаника ове подгрупе је 43,27 година, медијана 41,0 година. 42 испитаника (62,69%) су старости до 45 година а 25 испитаника (37,31%) су старији од 45. Заступљеност испитаника млађих од 45 година у овој подгрупи не разликује се значајно у односу на групу оболелих уопште ($p = 0,294$) (Графикон 22).

Графикон 22. Старост оболелих испитаника са присуством удружене тромбофилије



У групи оболелих постојање удружене наследне тромбофилије је утврђено код 40 (22,86%) испитаника. У овој подгрупи оболелих више је жена него мушкараца (70,0% : 30,0%) али ова разлика у заступљености полова није статистички значајна ($p= 0,463$).

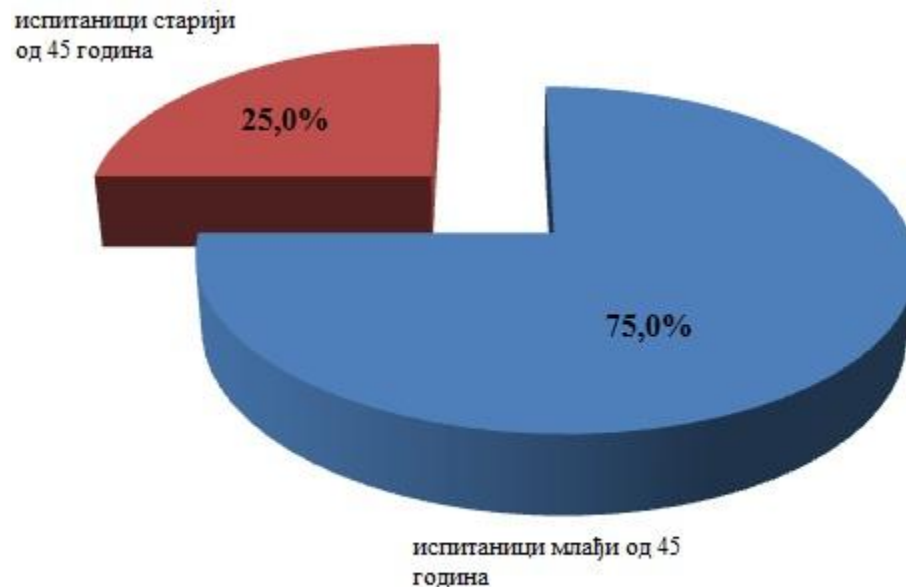
Просечна старост испитаника ове подгрупе је 39,53 године, медијана 36,5 година. 30 испитаника (75,0%) су старости до 45 година а 10 испитаника (25,0%) су старији. Заступљеност испитаника млађих од 45 година у овој подгрупи не разликује се значајно у односу на групу оболелих уопште ($p= 0,245$) (Графикон 23).

Код укупно 65 оболелих испитаника (37,14%) утврђено је присуство само једне наследне тромбофилије без удруженог присуства неке од мешовитих или наследних тромбофилија. У овој подгрупи оболелих више је жена него мушкараца (67,69% : 32,31%) али ова разлика у заступљености полова није статистички значајна ($p= 0,586$).

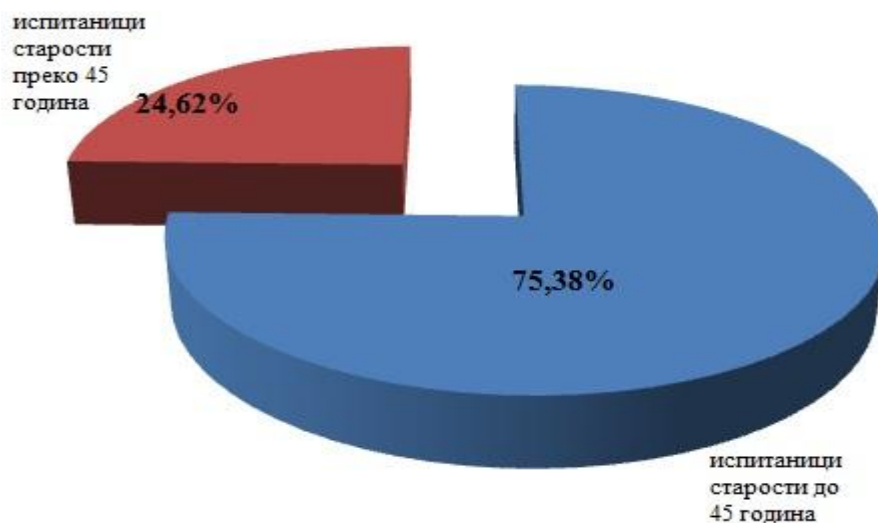
Просечна старост испитаника ове подгрупе је 37,62 године, медијана 36,0 година. 49 испитаника (75,38%) су старости до 45 година а 16 испитаника (24,62%) су старији. Заступљеност испитаника млађих од 45 година у овој подгрупи не разликује се значајно у односу на групу оболелих уопште ($p= 0,084$) (Графикон 24).

Код 148 (84,57%) оболелих испитаника је утврђено постојање барем једне тромбофилије. И у овој подгрупи већа је заступљеност жена (63,51% : 36,49%) али разлика није статистички значајна ($p= 0,29$).

Графикон 23. Старост оболелих испитаника са присуством удружене наследне тромбофилије



Графикон 24. Старост оболелих испитаника са присуством једне наследне тромбофилије



Просечна старост испитаника ове подгрупе је 40,27 година, медијана 38,5 година. Број испитаника старости до 45 година је 104 (68,24%) а 47 испитаника (31,76%) су старији од 45. Заступљеност испитаника млађих од 45 година у овој подгрупи приближно је једнака оној у групи оболелих уопште ($p=0,59$) (Графикон 25).

Графикон 25. Старост оболелих испитаника са присуством најмање једне тромбофилије



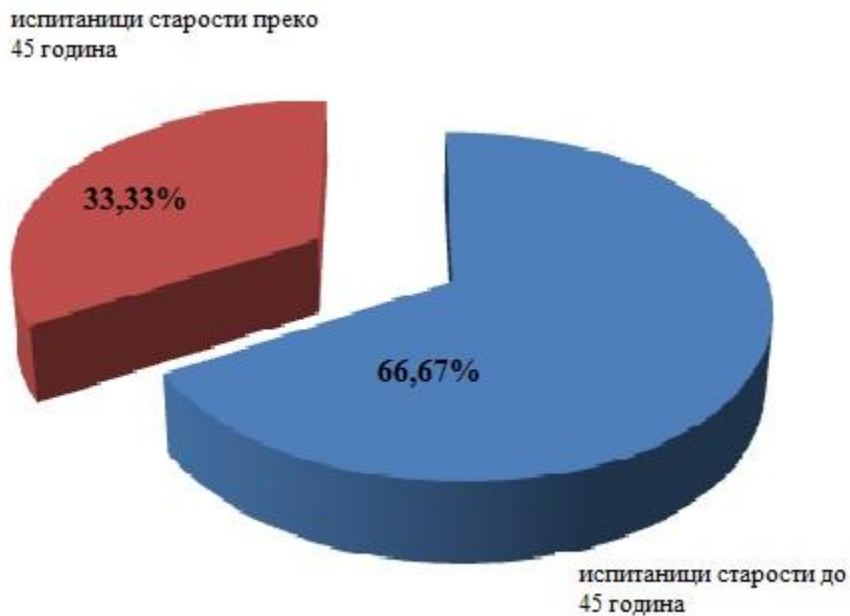
Код 27 оболелих испитаника није утврђено присуство тромбофилије. И у овој подгрупи већа је заступљеност жена (74,07%: 25,93%) али разлика није статистички значајна ($p=0,29$).

Просечна старост испитаника ове подгрупе је 40,85 година, медијана 42,0 године. 18 испитаника (66,67%) су старости до 45 година а 9 испитаника (33,33%) су старији од 45. Учесталост испитаника до 45 година старости у овој подгрупи није се разликовала од оне у групи оболелих уопште ($p=0,927$) (Графикон 26).

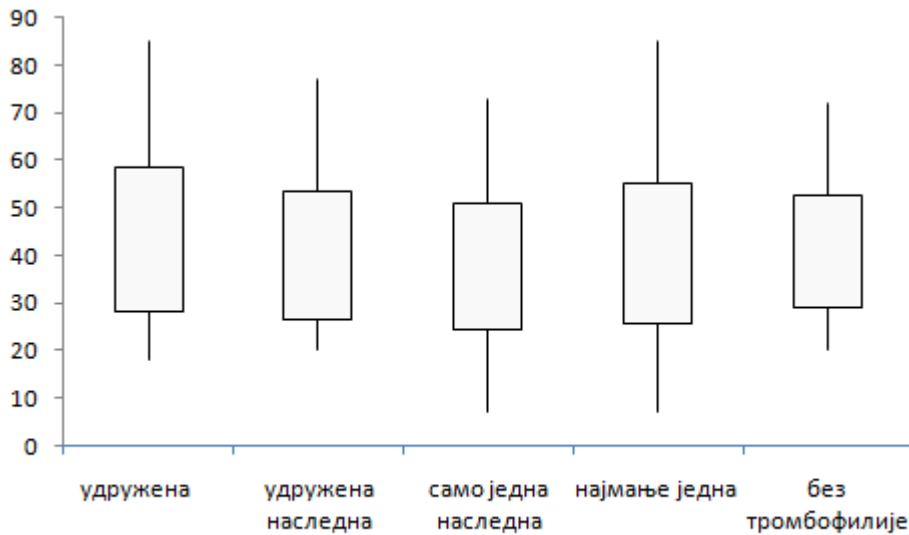
Поређењем подгрупа групе оболелих запажа се да је просечна старост највећа у подгрупи испитаника са удруженом тромбофилијом, потом у подгрупи без тромбофилије, са најмање једном тромбофилијом, са удруженом наследном тромбофилијом и са само једном наследном тромбофилијом, тим редоследом (Графикон 27).

Уколико се графички прикажу вредности медијане у подгрупама (јер ова мера централне тенденције није осетљива на екстремне вредности у свакој подгрупи) мења се редослед подгрупа у односу на претходни начин поређења. Запажа се да је медијана старости највећа у подгрупи оболелих без тромбофилије (Графикон 28).

Графикон 26. Старост оболелих испитаника без утврђене тромбофилије

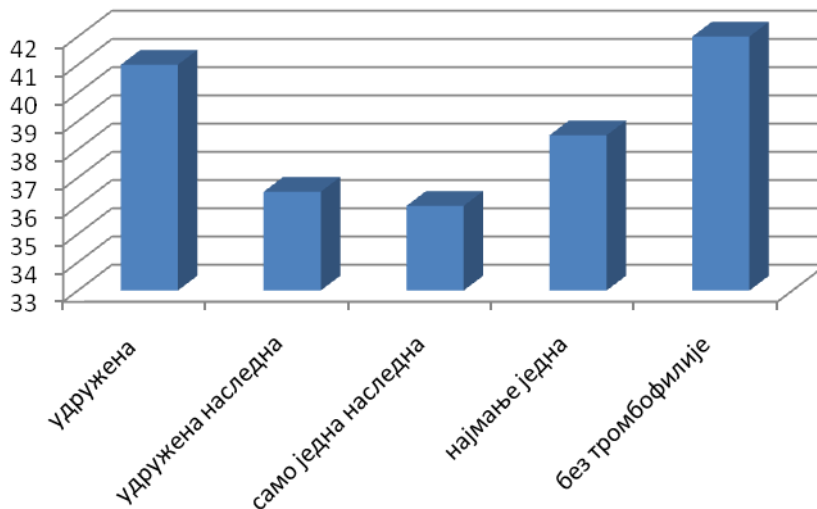


Графикон 27. Просечна старост оболелих испитаника у подгрупама са и без утврђене тромбофилије



Тромбозе се код испитаника са наследном тромбофилијом јављају у млађем старосном добу у односу на испитанике са удруженом тромбофилијом и на испитанике без тромбофилије али применом Крускал- Волисовог теста запажа се да ова разлика није статистички значајна ($p= 0,303$).

Графикон 28. Медијана старости оболелих испитаника у подгрупама са и без утврђене тромбофилије



Поређењем групе оболелих мушког и женског пола запажа се да се у доби до 45 година ТДВ значајно чешће јавља код жена (70,34%: 29,66%) ($p= 0,038$). Овакав резултат је очекиван с обзиром на чињеницу да трудноћа и период од 6 недеља после порођаја, као и употреба хормонске терапије која садржи естроген или прогестаген, носе повишен ризик од настанка ТДВ. Након поређења групе оболелих жена код којих ТДВ није повезана са трудноћом, пуерперијумом или узимањем поменуте хормонске терапије и групе оболелих мушкараца, нема значајне разлике у појави ТДВ у доби до 45 година између ове две групе ($p= 0,784$).

Код жена код којих је ТДВ настала у периоду трудноће и пуерперијума тромбозом је чешће била захваћена лева страна (59,26%: 40,74%). С обзиром и на појаву изоловане тромбозе карличних вена у трудноћи највероватније објашњење је да у овом периоду ређе долази до, иначе уобичајеног, механизма настанка ТДВ у доњим удовима, који подразумева стварање тромба у потколеници и његов евентуални раст ка венама натколенице и карлице. Настанку ТДВ карличних и вена натколенице на левој страни доприноси притисак увећане материце на леву карличну вену (117).

4. 14. Наследна тромбофилија и локализација тромбозног процеса

Уколико се посматрају само испитаници са тромбозом коленске вене, вена натколенице и карличних вена, којих је у групи оболелих 112, присуство наследне тромбофилије је утврђено код њих 76 (69,72%). Од тог броја, њих 56 имало је МТНFR С 677 Т мутацију, самостално или удружену са другим наследним тромбофилијама, најчешће са FV Leiden мутацијом (код 19 испитаника). Изузевши присуство МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном облику, код 18 испитаника из ове подгрупе утврђено је присуство удружене наследне тромбофилије.

У групи од 30 испитаника који су имали потколону тромбозу постојање наследне тромбофилије утврђено је код 18 (60,0%) испитаника. Од тога, код њих 15 била је присутна МТНFR С 677 Т мутација и то најчешће самостално, код 11 испитаника. Не рачунајући присуство МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном облику, удружена наследна тромбофилија била је присутна код једног испитаника из ове подгрупе.

ТДВ доњих удова укупно је имало 139 испитаника а код њих 94 (67,63%) је утврђено постојање наследне тромбофилије.

Плућну тромбоемболију имало је 19 испитаника са ТДВ а у овој подгрупи присуство наследне тромбофилије је утврђено код њих 16 (84,21%). Присуство МТНFR С 677 Т мутације утврђено је код 9 испитаника из ове подгрупе, код њих 6 самостално.

У групи од 16 испитаника који су имали ТДВ горњих удова постојање наследне тромбофилије утврђено је код 11 (68,75%) испитаника. Од тога код њих 8 је утврђено присуство МТНFR С 677 Т мутације а самостално је била присутна код њих 6 у овој подгрупи. Изузевши присуство МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном облику, удружена наследна тромбофилија била је присутна код једног испитаника из ове подгрупе.

Код једног испитаника са ТДВ горњих и доњих удова такође је утврђено присуство наследне тромбофилије, мутације FII 20210 А у хомозиготном облику.

Применом Ман- Витни U теста није утврђено постојање статистички значајне разлике у учесталости присуства наследне тромбофилије између подгрупа са различитом локализацијом ТДВ ($p= 0,848$). Истим тестом није утврђено ни постојање статистички значајне повезаности између присуства удружене наследне тромбофилије и локализације тромбозног процеса ($p= 0,078$).

4. 15. Наследна тромбофилија и настанак рецидива тромбоза

Рецидив тромбозног процеса настао је код укупно 13 (7,43%) оболелих. Испитивање је обављено проспективно и започето је 2010. године, тако да је код 6 од ових 13 испитаника за време испитивања настао други тромбозни инцидент а први у ранијем периоду. Код једне испитанице рецидив је настао након 30 година, код једне испитанице након 10 година, код једне испитанице након 8 година, код једног испитаника након 6 година, код једне испитанице након 4 године, код једне након три године, код једног испитаника након две године а код 6 испитаника друга тромбоза је настала унутар годину дана од прве тромбозе.

Код 9 испитаника ове подгрупе (5,14%) рецидив је настао унутар 5 година од прве тромбозе а од тога је код њих 8 настао унутар три године од чега код 6 унутар годину дана од прве тромбозе.

Наследна тромбофилија присутна је код 10 (76,92%) испитаника са рецидивима (5,71% оболелих). Резистенцију на активирани протеин Ц имало је троје оболелих са рецидивом а код двоје је у основи ове тромбофилије FV Leiden мутација. Један испитаник има удружену наследну тромбофилију, поред FV Leiden мутације у хомозиготном облику има и МТНFR С 677 Т мутацију. Код једне испитанице утврђено је присуство FII 20210 А мутације, код једног испитаника недостатак антитромбина и код 8 испитаника присуство МТНFR С 677 Т мутације. Једино се самостално присуство МТНFR С 677 Т мутације статистички значајно чешће јавља код оболелих са рецидивима у односу на оболеле без рецидива ТДВ. Ризик за поновни настанак ТДВ код носилаца МТНFR С 677 Т мутације OR износи 5,04. Учесталост присуства појединих наследних тромбофилија код оболелих испитаника са и без рецидива ТДВ приказана је у табели 24. Тромбофилије које су код одређене групе испитаника присутне самостално означене су са *.

Код 4 оболела са рецидивима (30,78%) постојала је појава тромбозе у породици, од којих је код њих две утврђено присуство МТНFR С 677 Т мутације а код једног испитаника удружено присуство FV Leiden и МТНFR С 677 Т мутације.

Двоје испитаника из ове подгрупе (15,38%) имало је повишен крвни притисак, две су биле гојазне а њих четворо (30,78%) пушачи, двоје у време тромбозе а двоје бивши. Није утврђена статистички значајна повезаност између повишеног крвног притиска и настанка рецидива ($p= 0,6102$) ни између гојазности и настанка рецидива ($p= 0,779$) нити између пушења и настанка рецидива ТДВ ($p= 0,402$).

Дужина праћења 13 оболелих са рецидивима ТДВ била је укупно 69 болесничких година, а дужина праћења 162 оболелих код којих до испитивања тромбофилије није дошло до рецидива ТДВ била је укупно 459 болесничких година. Просечна дужина праћења у групи са рецидивима била је 5,31 годину а у групи без рецидива 2,85 година. Између дужине праћења ове две групе не постоји статистички значајна разлика ($p= 0,407$).

Табела 24. Учесталост наследних тромбофилија у групи оболелих са и без рецидива ТДВ

Врста тромбофилије	Број испитаника без рецидива ТДВ n (%)	Број испитаника са рецидивом ТДВ n (%)	p	OR
Недостатак АТ	7/ 162 (4,32)	1/ 13 (7,69)	0,577	-
FV Leiden*	15/ 162 (9,26)	1/ 13 (7,69)	0,851	-
FII 20210 А	12/ 162 (7,4)	1/ 13(7,69)	0,100	-
МТНFR С 677 Т*	50/ 162 (30,86)	9/ 13 (69,23)	0,012	5,04
FV Leiden и МТНFR С 677 Т	19/ 162 (11,73)	1/ 13 (7,69)	0,661	-

4. 16. Повишен крвни притисак и хиперлипопротеинемија као додатни фактори ризика за настанак ТДВ

Поређењем групе оболелих и контролне групе запажа се да је у групи оболелих повишен крвни притисак (изнад 140/90 mmHg) у време настанка ТДВ био присутан код 21 (12,0%) испитаника. У контролној групи двоје (1,78%) испитаника је имало повишен крвни притисак. Уколико се посматрају само оболели код којих није утврђено присуство било наследне било мешовите тромбофилије, којих је укупно 27, код њих четворо (14,81%) је у време настанка ТДВ крвни притисак био повишен. Утврђена је статистички значајна повезаност између повишеног крвног притиска и настанка ТДВ ($p < 0,001$). Уколико се из разматрања искључи испитаник који је уз повишен крвни притисак пре настанка ТДВ имао срчани удар и уграђен му је стент, и даље се запажа статистички значајна повезаност између повишеног крвног притиска и настанка ТДВ ($p < 0,001$). Ризик за настанак ТДВ код особа са повишеним крвним притиском OR у овом случају износи 11,379 што повишен крвни притисак сврстава у јаке факторе ризика за настанак ТДВ.

Хиперлипопротеинемија је у групи оболелих у време настанка ТДВ била присутна код 7 (4,0%) испитаника а у контролној групи није било испитаника са хиперлипопротеинемијом. У групи оболелих код којих није утврђено присуство било наследне било мешовите тромбофилије, код двоје од њих 27 (7,41%) је постојала хиперлипопротеинемија. Утврђена је статистички значајна повезаност између присуства хиперлипопротеинемије и настанка ТДВ ($p = 0,045$). Вредност OR у овом случају износи 5,48, тако да хиперлипопротеинемија такође представља умерено јак фактор ризика за настанак ТДВ (Табела 25).

Табела 25. Додатни фактори ризика за настанак ТДВ

Фактор	Број испитаника без тромбофилије са присуством додатног фактора n (%)	Број испитаника без тромбофилије без присуства додатног фактора n (%)	p	OR
Крвни притисак > 140/90 mmHg	3 (11,54)	23 (88,46)	0,004	11,379
Хиперлиппротеинемија	2 (7,41)	25 (92,59)	0,045	5,48

Благе и умерено јаке тромбофилије и фактори ризика који су на основу досадашњег поређења групе оболелих и контролне групе статистички значајно повезани са настанком ТДВ даље су анализирани применом логистичке регресионе анализе ради прилагођавања услед утицаја који делују и на нивоу испољавања одређеног фактора и на нивоу настанка ТДВ и стога могу довести до грешака у процени значајности (енг. confounding factors). Ова анализа је показала да се једино мутација FV Leiden у хомозиготном стању ($p=0,05$), гојазност ($p<0,001$) и повишен крвни притисак ($p<0,001$), када су присутни без садејства других фактора ризика, могу статистички значајно повезати са настанком ТДВ (Табела 26). Вредност OR у случају повишеног крвног притиска износи 9,219 а у случају гојазности 14,878 на основу чега је гојазност јак фактор ризика за настанак ТДВ. Вредност OR за носиоце FV Leiden мутације у хомозиготном стању није било могуће израчунати у овој анализи јер их није било у контролној групи.

Табела 26. Независни фактори ризика за настанак ТДВ

Фактор	p	OR
Крвни притисак > 140/90 mmHg	<0,001	9,219
Гојазност	<0,001	14,878
FV Leiden Hm	0,05	-

5. Дискусија

Тромбоза дубоких вена је, на основу до сада познатих чињеница, болест која настаје као резултат заједничког деловања бројних стечених и наследних чинилаца. Учесталост појаве ТДВ је велика, најмање један случај на 1000 особа годишње (26) у општој популацији. Најчешће се испољава као ТДВ доњих удова, ређе као ТДВ горњих удова а у оба случаја може да се искомпликује емболијом плућа. Најређе се јављају ТДВ вена којима крв из црева долази до јетре (мезентеријалних вена), самих вена јетре, венских синуса главе и вена мрежњаче (9).

Најпознатији стечени фактори ризика за настанак ТДВ су: антифосфолипидни синдром, узрапредовала старост, гојазност, претходне тромбозе, трудноћа, хормонална терапија која садржи естроген или прогестаген, повреде, операције, непокретност, малигне болести, инфекције и пушење.

Прве откривене наследне тромбофилије, недостатак АТ 1965. године, недостатак протеина Ц 1981. и недостатак протеина С 1984. испитиване су на протеинском нивоу, одређивањем количине функционално активног инхибитора у плазми. Напретком молекуларно биолошких техника крајем XX века омогућено је утврђивање присуства наследне тромбофилије на нивоу гена. Тако је 1994. научник Роџер Бертина са групом сарадника открио мутацију FV Leiden а 1996. и мутацију FII G 20210 A (34, 46) а касније су откривене и бројне друге мутације у генима који кодирају факторе згрушавања а које су од мањег значаја за настанак ТДВ.

Утврђивање присуства наследне тромбофилије код оболелих од ТДВ омогућава избор врсте, интензитета и дужине трајања терапије за сваког пацијента појединачно.

Испитивањем је обухваћено укупно 300 особа оба пола подељених у две групе. Групу испитаника са тромбозом дубоких вена (оболели) чинило је њих 185. Оболели код којих је утврђено постојање лупусног антикоагуланса и антикардиолипинских антитела су искључивани из студије. По искључењу оних код којих је утврђено постојање ових етиолошких чинилаца групу оболелих је сачињавало 175 испитаника.

Контролну групу сачињавало је 115 особа која се поклапала са групом оболелих по полној и старосној структури.

Групу оболелих сачињавало је 117 испитаница и 61 испитаник а контролну групу је сачињавало 74 испитанице и 38 испитаника.

Просечна старост оболелих испитаника била је 40,42 године а испитаника контролне групе 40,01 година. Слична полна и старосна структура групе оболелих и контролне групе искључује утицај пола и година живота при упоређивању ове две групе у циљу процене фактора ризика за настанак ТДВ.

Број испитаника у нашем истраживању нешто је већи од оног у истраживањима Суехисе и сар. (25) и Мартинели и сар. (153) и знатно већи од броја испитаника у истраживањима Шина и Парка (154), Жирара и сар. (155) и Кера и сар. (156), док су Ким и сар. (157) у свом истраживању испитали готово троструко већи број оболелих с обзиром

на то да је и популација Јужне Кореје у оквиру које су испитаници изабрани вишеструко бројнија (50,22 милиона становника) у односу на популацију Војводине (1,9 милион становника).

У групи испитаника са тромбозама највише је било оних са тромбозом карличне, бутне и/ или коленске вене, 62,29%. Тромбоза потколених вена настала је код 17,14% оболелих, ТДВ горњих удова настала је код 9,14% испитаника, горњих и доњих удова код 0,57% а ТДВ компликована ПЕ је настала код њих 10,86%. Испитивање на 267 оболелих од ТДВ у северној Шведској од стране Јохансон и сар. (158) из 2014. показује већу учесталост ТДВ коленске вене, вена натколенице и карличних вена (чак 74,2%) и нешто мању учесталост потколоне ТДВ и ТДВ горњих удова. Исма са сарадинцима (159) описује сличну учесталост појављивања тромбоза у студији из 2009. која је обухватала 954 оболела испитаника из Малмеа (јужна Шведска), с тим што је у тој студији учесталост потколених тромбоза нешто већа а ТДВ компликованих емболијом мања. У студији Ал Захранија и сар. (160) из 1993. на 54 оболела из Џеде (Саудијска Арабија) учесталост потколених тромбоза је слична оној у јужној Шведској (27,78%) док је учесталост тромбозе горњих удова знатно већа (18,52%). У истраживању Спенсера и сар. (161) из 2007. које је обухватало 483 оболела од ТДВ из Масачусетса (САД) без присуства емболије плућа, такође се наводи већа учесталост тромбозе горњих удова од 14,29% (Табела 27).

Табела 27. Однос учесталости ТДВ одређене локализације у различитим истраживањима

Резултати истраживања	ТДВ коленске вене, вена натколенице и карличних вена Процент испитаника (%)	Потколена ТДВ Процент испитаника (%)	ТДВ горњих удова Процент испитаника (%)	ТДВ горњих и доњих удова Процент испитаника (%)	ТДВ са ПЕ Процент испитаника (%)
Наши резултати	62,29	17,14	9,14	0,57	10,86
Исма и сар. (2009.)	62,62	26,17	<5,61	-	5,61
Јохансон и сар. (2014.)	74,2	15,2	6,8	-	-
Ал Захрани и сар. (1993.)	53,70	27,78	18,52	-	-
Спенсер и сар. (2007.)	85,71		14,29	-	-

Код 50,31% оболелих са ТДВ доњих удова у нашем истраживању тромбозним процесом је била захваћена лева страна, код њих 40,88 % десна страна а код 8,80% била је присутна обострана ТДВ доњих удова. Наши резултати приказују нешто мању учесталост ТДВ леве ноге а знатно већу учесталост обостране ТДВ у односу на резултате које су добили Исма и сар. (159). Ал Захрани и сар. (160) навели су приближно једнаку учесталост оболелих са ТДВ леве и десне ноге али без тачног податка и знатно већу учесталост

обостране ТДВ, од чак 18,91%. У раду Чена и сар. из 2014. где је испитано 740 оболелих од ТДВ доњих удова у кинеској популацији, код чак 78,65% њих је тромбозним процесом била захваћена лева страна (162) а у истој студији се не наводи постојање оболелих са обостраном ТДВ (Табела 28). У раду Тонгија и Паохароена (163) са 157 оболелих са ТДВ из Тајланда утврђено је да је оток леве ноге статистички значајно чешће повезан са присуством ТДВ у односу на оток десне ноге (OR= 2,59).

Код 56,25% оболелих са ТДВ горњих удова у нашем истраживању тромбозним процесом је била захваћена лева страна, а код њих 43,75% десна страна, док оболелих са обостраном ТДВ горњих удова није било. Ал Захрани и сар. (160) су описали приближно једнаку учесталост ТДВ леве и десне руке, док наши резултати слични онима које су приказали Кер и сар. (156) у студији из 1990. на 85 испитаника са ТДВ горњих удова из Охаја (САД), 58,0% испитаника са ТДВ леве руке, 42,0% са ТДВ десне руке а обострана ТДВ није нађена ни код једног испитаника.

Табела 28. Однос учесталости ТДВ леве и десне ноге у различитим истраживањима

Резултати истраживања	ТДВ леве ноге	ТДВ десне ноге	ТДВ леве и десне ноге
	Процент испитаника (%)	Процент испитаника (%)	Процент испитаника (%)
Наши резултати	50,31	40,88	8,80
Исма и сар. (2009.)	56,57	42,40	0,7
Чен и сар. (2014.)	78,65	21,35	-
Ал Захрани и сар. (1993.)	81,08		18,91

Од 19 пацијената код којих је ТДВ искомпликована тромбоемболијом плућа, код њих 63,16% дијагностикована је проксимална а код 36,84% дистална ТДВ доњих удова. Ни код једног пацијента са ПЕ није утврђено постојање ТДВ горњих удова. У студији Спенсера и сар. (161) код 92,31% пацијената са ПЕ утврђено је постојање ТДВ доњих удова (без навођења тачне анатомске локализације), а код 7,69% пацијената са ПЕ утврђено је постојање ТДВ горњих удова. Наши резултати слични су онима објављеним у студији Жирара и сар. из 1999. (155) која је обухватала 213 оболелих са ПЕ из Париза (Француска). Постојање ТДВ доњих удова утврђено је код њих 174, код 60,1% дијагностикована је проксимална а код 36,84% дистална ТДВ доњих удова (130). Слично се наводи и у резултатима Барелијеа и сар. (163) из 2001.: код 60 оболелих од ПЕ из Кана (јужна Француска) је утврђена ТДВ и то код 58,3% оболелих проксимална а код 26,7% дистална ТДВ доњих удова.

У оквиру подгрупе од 114 испитаника са ТДВ у нашем истраживању, код њих 57,02% тромбозни процес је настао на левој страни, код њих 39,47% на десној страни а њих 3,51% имале су обострану ТДВ. Од 61 испитаника мушког пола, код њих 39,34%

тромбозни процес је настао на левој страни, код њих 44,26% на десној а њих 16,40% су имали обострану ТДВ. У нашој студији настанак ТДВ на левој страни био је статистички значајно чешћи у групи оболелих жена, док се код мушкараца ТДВ чешће јављала на десној страни или обострано.

Наши резултати слични су онима добијеним у истраживању Шина и Парка из 2014. (154) на 65 оболелих са ТДВ из Бусана (јужна Кореја) када су у питању испитаници мушког пола- код 44,1% ТДВ је настала на левој страни, код 14,7% обострано а код 41,2% на левој страни. И у овом истраживању је код оболелих жена ТДВ чешће настајала на левој страни али је учесталост левостраних тромбоза у овој подгрупи знатно већа него у нашем узорку- 74,20% док је ТДВ на десној страни ређа- 22,6%, а учесталост обостраних тромбоза код жена готово иста као у нашој студији, 3,2%. Чен наводи другачије резултате, 89,64% жена са левостраном и 10,36% са десностраним тромбозом а чак 66,67% мушкараца са левостраном и 33,33% са десностраним ТДВ (162). Јохансон и сар. (158) такође наводе чешћу појаву ТДВ на левој страни и код мушких и код женских испитаника. Подаци прикупљени у укупно три истраживања Росен- Андреу и сар. из 2008. (165) на 1838 оболелих са ТДВ из Хамилтона (Канада) показују да 60,80% оболелих мушкараца има левострану, 31,40% десностраним и 7,80% обострану ТДВ. Неочекивано, код оболелих жена је учесталост левостране ТДВ нижа, 51,90%, док су десностраним ТДВ заступљене код 40,60% а обостране код 7,60% оболелих испитаница (Табела 29).

Табела 29. Однос учесталости ТДВ леве и десне стране код мушког и женског пола у различитим истраживањима

Резултати истраживања	Процент испитаника са ТДВ леве стране (%)		Процент испитаника са ТДВ десне стране (%)		Процент испитаника са ТДВ леве и десне стране (%)	
	Мушкарци	Жене	Мушкарци	Жене	Мушкарци	Жене
Наши резултати	39,34	57,02	44,26	39,47	16,40	3,51
Шин и Парк (2014.)	44,1	74,20	41,2	22,6	14,7	3,2
Чен и сар. (2014.)	66,67	89,64	33,33	10,36	-	-
Росен- Андреу и сар. (2008.)	60,80	51,90	31,40	40,60	7,80	7,60

У нашем истраживању утврђено је да је код жена код којих је ТДВ настала у периоду трудноће и пуерперијума тромбозом чешће била захваћена лева страна (59,26%). У подгрупи жена код којих ТДВ није повезана са периодом трудноће и пуерперијума такође је значајно чешћа ТДВ на левој страни (55,81%) у односу на оболеле мушкарце (39,34%). У овој подгрупи се јављала и изолована тромбоза карличних вена јер у трудноћи настанку ТДВ на левој страни доприноси притисак увећане материце на леву карличну вену (166). Друга истраживања дају нешто другачије резултате од наших када је у питању проценат левостраних тромбоза насталих у трудноћи и пуерперијуму. У студији МекКола и сар. из 1997. (167) наводи се 84,0% левостраних тромбоза, у истраживању Бланко-

Молина из 2007. (168) је удео левостраних тромбоза насталих у овом периоду 78,0%, код Германа и сар. 81,0% (169) а код Чена и сар. (169) чак 88,9%. Левостране тромбозе у овом периоду су чешће и услед тога што увећана материца врши притисак на дубоке вене доњих удова (9, 166). Такође, заједничка и десна илијачна артерија и артерије јајника због свог анатомског положаја врше додатни притисак на леву илијачну вену што може узроковати венску стазу (170).

Овим истраживањем је код 121 оболелог испитаника утврђено присуство барем једне наследне тромбофилије, као и код 80 испитаника контролне групе. Уколико се не рачунају испитаници са присуством МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном стању без удруженог присуства МТНFR А 1298 С мутације, барем једна наследна тромбофилија нађена је код 100 оболелих и 54 здрава испитаника али разлика у учесталости није статистички значајна.

Укупан број оболелих испитаника са недостатком барем једног природног инхибитора коагулације био је 28 (16,0%). Код 7 оболелих испитаника (4,0%) утврђено је постојање недостатка антитромбина, код три испитаника (1,71%) утврђено је постојање недостатка протеина Ц а код 18 испитаника (10,29%) утврђено је постојање недостатка протеина С. Код једног оболелог (0,57%) утврђено је истовремено постојање израженог недостатка протеина Ц и протеина С (ниво активности оба је био испод 50%). Два испитанка су имала изражен недостатак АТ, недостатак протеина Ц био је изражен код оба испитаника са овом тромбофилијом а недостатак протеина С био је изражен код њих 8. У студији Костера и сар. из 1995. (171) на 474 оболела са ТДВ из Лајдена, Амстердама и Ротердама у Холандији недостатак неког од природних инхибитора утврђен је код њих 55 (11,6%). Недостатак антитромбина утврђен је код 4,2%, недостатак протеина Ц код 4,6% а недостатак протеина С код 3,1%. Мартинели и сар. су у студији из 1998. на 116 оболелих са ТДВ из Милана у Италији (153) утврдили недостатак неког од природних инхибитора код њих 37,0%; од тога код 16,67% недостатак антитромбина, код 15,33% недостатак протеина Ц и код 10,0% недостатак протеина С. Ким и сар. у студији из 2014. на 500 оболелих са ТДВ из Јужне Кореје (157) су применом коагулационих тестова утврдили недостатак неког од природних инхибитора код њих 133 (25,4%). Код 5,6% је утврђен недостатак антитромбина, код 12,4% недостатак протеина Ц а код 7,4% недостатак протеина С. Суехиса и сар. су у свом истраживању из 2001. испитали 113 оболелих од ТДВ у Јапану (25) и код њих 32 (28,3%) утврдили недостатак неког од природних инхибитора. Недостатак антитромбина утврђен је код 1,77%, недостатак протеина Ц код 7,96% а недостатак протеина С код 17,7%. У контролној групи од 112 здравих особа у нашем истраживању није утврђено присуство недостатка неког од природних инхибитора што се може повезати са ретком појавом ових тромбофилија у општој популацији. Код Костера и сар. (171) је контролна група обухватала 474 здраве особе а недостатак неког од природних инхибитора утврђен је код њих 25 (5,27%). Недостатак антитромбина утврђен је код 2,1%, недостатак протеина Ц код 1,5% а недостатак протеина С код 1,9%. Ким и сар. (157) су у оквиру контролне групе испитали 3046 особа и утврдили недостатак неког од природних инхибитора код њих 93 (3,05%). Њих 0,94% имало је недостатак антитромбина, њих 1,05% недостатак протеина Ц а њих 1,06% недостатак протеина С. Учесталост здравих особа са недостатком неког од природних инхибитора код Суехисе и сар. (25) износила је 2,07% (10 од 392 испитаника контролне групе). У овој групи није било испитаника са недостатком антитромбина, недостатак протеина Ц је нађен код 0,5% а недостатак протеина С код 2,02% (Табела 30).

У нашој и холандској популацији оболелих слична је укупна учесталост недостатка неког од природних инхибитора као и учесталост недостатка антитромбина док постоје разлике у учесталости недостатка протеина Ц и С. Наша и италијанска популација (153) оболелих су сличне по учесталости недостатка протеина С док се разликују по учесталости недостатка антитромбина, протеина Ц и укупној учесталости недостатка неког од природних инхибитора. Између наше и јужнокорејске популације оболелих (157) постоје сличности у учесталости недостатка антитромбина и протеина С док се укупна учесталост недостатка неког од природних инхибитора као и учесталост недостатка протеина Ц разликују. Наша и јапанска популација оболелих се разликују, како по укупној тако и по појединачним учесталостима недостатка неког од природних инхибитора.

Табела 30. Однос учесталости недостатка природних инхибитора у различитим истраживањима

Резултати истраживања	Процент испитаника са недостатком АТ (%)		OR	Процент испитаника са недостатком РС (%)		OR	Процент испитаника са недостатком PS (%)		OR	Укупно (%)	
	Оболели	Контроле		Оболели	Контроле		Оболели	Контроле		Оболели	Контроле
Наши резултати	4,57	-	138,85	1,71	-	4,35	10,29	-	134,57	16,57	-
Костер и сар. (1995.)	4,2	2,1	5,0	4,6	1,5	3,17	3,1	2,1	1,6	11,6	5,27
Мартинели и сар. (1998.)	16,67	-	-	15,33	-	-	10,0	-	-	37,0	-
Ким и сар. (2014.)	5,6	0,94	6,25	12,4	1,05	13,34	7,4	1,06	31,78	25,4	3,05
Суехиса и сар. (2001.)	1,77	-	-	7,96	0,5	17,21	17,7	2,02	10,32	28,3	2,07

Ризик за настанак ТДВ код особа са недостатком антитромбина у нашем истраживању није било могуће израчунати јер у контролној групи није било испитаника са овом тромбофилијом, али уколико се рачуна на основу познате учесталости недостатка антитромбина у општој популацији добије се вредност OR од 138,85. Добијена вредност је знатно већа од оне коју су добили Костер и сар. (171) поређењем групе оболелих и контролне групе (5,0) и оне коју су добили Ким и сар.(157) на исти начин (6,25).

Ризик за настанак ТДВ код особа са недостатком протеина Ц у нашем истраживању је такође израчунат на основу учесталости ове тромбофилије од 0,4% у општој популацији и добијена вредност OR је 4,35 и близу је вредности 3,17 коју су добили Костер и сар. (171) али мања од вредности OR од 13,34 коју су навели Ким и сар. (157) и вредности 17,21 која се добија на основу података које су навели Суехиса и сар. (25).

Ризик за настанак ТДВ код особа са недостатком протеина С у нашем истраживању израчунат на основу учесталости ове тромбофилије од 0,08% у општој популацији OR је 134,57; далеко већа од вредности OR од 1,6 коју су навели Костер и сар. (171) и знатно

већа од вредности OR од 31,78 коју су израчунали Ким и сар. (157) и вредности OR од 10,32 која се добија на основу података из истраживања Суехисе и сар (25).

Овако велике разлике у процени ризика за настанак ТДВ код особа са недостатком АТ и PS могу се објаснити не само већом учесталошћу ових тромбофилија у холандској и популацији Јужне Кореје (171,157) већ и критеријумима за укључивање у истраживање Костера и сар. (171), где су из контролне групе искључиване само особе са претходним венским тромбоемболизмом и малигним обољењима а недостатак АТ и PS се, мада врло ретко, јавља и код особа са артеријским тромбозама (172,173,174), као и код особа са обољењима јетре које су код нас искључиване из контролне групе. Недостатак PS се јавља и код особа са обољењима бубрега и црева (173) које су код нас такође искључиване из контролне групе.

Ризик за настанак ТДВ за збирни недостатак природних инхибитора у нашем истраживању израчунат у односу на збир учесталости природних инхибитора у општој популацији износи 38,74, знатно већи од OR 2,36 који се добија на основу података Костера и сар. (171), од OR од 9,3 који се добија на основу података из студије Кима и сар. (157) и од OR од 15,09 који се добија на основу података које су приказали Суехиса и сар. (25). Према нашим резултатима постојање недостатка антитромбина и постојање недостатка протеина С су тешке тромбофилије, док је недостатак протеина Ц умерено тешка тромбофилија. Код већине оболелих са недостатком АТ (57,14%) се ТДВ јавила у млађем животном добу, пре 40. године. Код 3 од 4 жене са недостатком АТ ТДВ се јавила у трудноћи што је у складу са претпоставком да садејство ове тромбофилије и раније описаних промена у хемостазном систему током трудноће носе високи ризик за настанак ТДВ. Недостатак протеина Ц је и према резултатима Костера и сар. (171) умерено тешка тромбофилија, као и према резултатима Кима и сар. (157) и Суехисе и сар. (25) а већи ризик добијен за азијске популације може се повезати са нешто нижом учесталошћу ове тромбофилије. Код свих троје оболелих са недостатком протеина Ц ТДВ се јавила у млађем животном добу, пре 40. године. Код једне жене са овом тромбофилијом ТДВ се јавила у трудноћи а код друге за време примене терапије естрогеном. Код оболелог мушкарца са овом тромбофилијом ТДВ је искомпликована плућном тромбоемболијом. Код 88,89% оболелих са недостатком протеина С ТДВ се јавила пре 45. године. Код 9 (53,33%) жена са недостатком PS ТДВ се јавила у трудноћи а код једне за време примене терапије естрогеном. Код једног од три оболела мушкарца са овом тромбофилијом ТДВ је искомпликована плућном тромбоемболијом а код једног артеријском тромбозом. Није утврђено постојање статистички значајне разлике у локализацији ТДВ код оболелих са недостатком неког од природних инхибитора и осталих оболелих испитаника. Плућна емболија се јавила код укупно 4 оболела са недостатком неког од природних инхибитора и није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања ових наследних тромбофилија и чешће појаве ПЕ у односу на оболеле са нормалним вредностима природних инхибитора, за разлику од истраживања Росијеве и сар. из 2008. (175) на 911 оболелих са ТДВ из Италије, што се може објаснити већим бројем испитаника у том истраживању.

Постојање резистенције на активирани протеин Ц утврђено је код 48 (30,38%) оболелих испитаника. Њих 37 (21,14%) је имало FV Leiden мутацију што је у сагласности са до сада познатим подацима да се ова мутација јавља код око 20% свих пацијената са ТДВ (43,44). Од овог броја њих 16,0% имало је мутацију у хетерозиготном а 5,14% у хомозиготном стању. Код једног оболелог са FV Leiden мутацијом у хетерозиготном

стању није утврђено постојање APC- R. Код 4 од 12 оболелих код којих није нађена FV Leiden мутација APC- R се може повезати са трудноћом, код једне оболеле са хормоналном терапијом, један је био носилац FII G 20210 A мутације у хомозиготном облику, двоје су били гојазни са повишеним нивоом FVIII а за осталих четворо из ове подгрупе може се претпоставити да је у основи испољавања ове тромбофилије нека од раније поменутих мутација у гену за FV коагулације (37,39) која није испитивана у оквиру овог истраживања. И у истраживању Кристијансена и сар. из 2012. (176) показана је повезаност између гојазности и појаве стечене APC- R јер је код гојазних особа присутно хронично запаљенско стање у оквиру којег је повишен и ниво FVIII коагулације. У нашем истраживању код 97,3% оболелих са FV Leiden мутацијом је коагулационим тестом потврђено постојање APC- R, као и постојање корелације између вредности коагулационог теста и присуства мутације у једној или две копије у генотипу. Просечна вредност овог теста за хомозиготне носиоце FV Leiden мутације износила је 1,56, распон вредности је био од 1,27 до 1,91; просечна вредност за хетерозиготне носиоце ове мутације износила је 1,78, распон вредности од 1,42 до 2,15 док је просечна вредност теста за оболеле без мутације била 2,74, распон вредности од 1,91 до 3,30.

Највећи број испитанка са FV Leiden мутацијом, њих 70,27% имало је тромбозу коленске вене, вена натколенице и/ или карличних вена. Код 8,11% испитаника са овом мутацијом тромбозом су биле захваћене вене потколенице а код 5,41% испитаника дубоке вене горњих удова. Један испитаник (2,70%) је имао ТДВ и горњих и доњих удова а код њих 13,51% ТДВ је била искомпликована плућном тромбоемболијом. Тромбоза дисталне локализације јесте ређа код носилаца ове мутације у односу на оболеле са другим тромбофилијама и оне којима није утврђено постојање тромбофилије али није утврђено постојање статистички значајне повезаности између присуства ове мутације и локализације тромбозног процеса, што се може објаснити релативно малим бројем оболелих испитаника који су носиоци ове мутације. И у другим истраживањима се наводи нижа учесталост дисталне локализације ТДВ код оболелих са овом мутацијом (177, 178). Међутим, у истраживању Бјоргела и сар. (179) на 105 оболелих из Малмеа (Шведска) наведено је да је учесталост проксималних тромбоза нижа код носилаца ове мутације у односу на остале оболеле. У нашем истраживању 9,76% оболелих са овом мутацијом биле су трудне жене, а с обзиром да није наведен податак постоји могућност да их је у шведском истраживању било мање те да је стога мања учесталост проксималних тромбоза. Друга могућност је већа заступљеност неких фактора ризика у шведској популацији у односу на нашу који узрокују чешћу појаву дисталних тромбоза. У нашем истраживању није утврђено постојање статистички значајне повезаности између постојања FV Leiden мутације и ређе појаве ПЕ у односу на оболеле без ове мутације, а недостатак повезаности утврђен је и истраживањем Еласала и сар. (180). Роси и сар. наводе мању учесталост ПЕ код оболелих са овом мутацијом (175) а ова разлика се вероватно јавља услед мањег броја испитаника у нашем истраживању.

У нашем истраживању учесталост FV Leiden мутације се разликује у односу на резултате истраживања других аутора. Ђорђевић и сар. у испитивању 175 оболелих са ТДВ налазе присуство ове мутације у хетерозиготном стању код 29,3% и у хомозиготном стању код 0,6% (181). У истраживању Свенсона и сар. (182) на 99 испитаника са ТДВ из Шведске присуство FV Leiden мутације у хетерозиготном стању утврђено је код њих 21,21% а у хомозиготном стању код њих 7,07%. Код оболелих од ТДВ у Јапану, Кини и на Тајланду ова мутација се среће врло ретко (183,184,185). Истраживање Низанковске и сар.

даје податак о 19,46% оболелих хетерозигота и 0,6% оболелих хомозигота у Кракову (Пољска) (186). Франсес и сар. су од 493 оболела од ТДВ у Шпанији нашли ову мутацију у хетерозиготном стању код 3,82% док хомозигота није било (187). Паломо и сар. нашли су такође само хетерозиготне носиоце ове мутације међу оболелима у Чилеу, њих 6,5% (188). Истраживање Паија и сар. на 289 оболелих од ТДВ из Мумбаја (Индија) приказује присуство ове мутације код 8,3% (189). У испитивању Шредера и сар. од 183 оболела са севера Немачке њих 25,4% били су хетерозиготи а 1,7% хомозиготи (190). Еренфорт и сар. (191) у истраживању које обухвата 1200 оболелих из целе Немачке приказују учесталост хетерозигота од 32,1% и хомозигота од 4,1%. Симкова и сар. (192) у испитивању 350 оболелих у Словачкој налазе 33,71% хомозигота и 2,86% хетерозигота за ову мутацију. Алфиревић и сар. (193) испитивањем 100 оболелих у Хрватској нашли су ову мутацију у хетерозиготном стању код њих 16,0% док хомозигота није било. Арсов и сар. (194) су ову мутацију нашли код 11,05% од 190 испитаника у Македонији у хетерозиготном стању а код 1,1% у хомозиготном стању. Буазиз- Борги и сар. (195) утврдили су присуство ове мутације у хетерозиготном стању код чак 44,4% оболелих Либанаца, док су хомозиготи у истом истраживању били заступљени са 7,6%.

На основу података из досадашњих студија (196,197) присутна је код око 4- 5% здравих индивидуа у европеидној популацији а знатно је ређа у афричким и азијским популацијама (185,198,199). У нашем истраживању присутна је код 10,42% здравих особа. Најниже вредности, приближно 0%, наводе Бодуер и сар. (185) за јапанску, кинеску, корејску и монголску популацију здравих особа, затим Ангчаисуксири и сар. (198), који наводе да је учесталост ове мутације мања од 0,2% у тајландској популацији. У студији Хермана и сар. (196) која је обухватала узорке из популација: Варшаве (Пољска), Буенос Ајреса (Аргентина), Валенсије (Венецуела), Сан Хозеа (Костарика) и Панџаба (Индија) добијени су следећи подаци: учесталост FV Leiden мутације у Варшави и Буенос Аиресу око 5%, у Валенсији, Сан Хозеу и Панџабу 1,3- 2%. Касније Адлер и сар. (200) након испитивања већег узорка наводе да је учесталост ове мутације у Пољској и југоисточној Европи 2- 2,5% а у Чешкој двоструко виша. Браун и сар. (197) приликом испитивања 180 особа из јужне Немачке налазе ову мутацију код њих 7,8% док је у популацијама на северу Немачке учесталост нижа- 3,0- 5,8% (201). Просечна учесталост хетерозигота у Немачкој је 7,5% (191). Студија Божикове и сар. (202) на 269 здравих особа из источне Словачке утврдила је присуство ове мутације код њих 2,97%. Паломо и сар. (203) у истраживању које је обухватило 1200 здравих особа са југа Чилеа наводе присуство FV Leiden мутације код 1,25% испитаника, као и податке о нижој учесталости ове мутације и у другим јужноамеричким државама у односу на европске популације. Ридкер и сар. (199) су у свом истраживању утврдили присуство ове мутације код 1,23% од 650 америчких црнаца и код 1,25% од 80 америчких Индијанаца који нису боловали од кардиоваскуларних обољења. Прегледни рад Акара који сабира податке истраживања на укупно 4276 здравих особа из свих региона Турске даје податак о просечној учесталости ове мутације од 7,9% (204). Ирани- Хакиме и сар. (205,206) утврдили су присуство ове мутације код 14,37% од 174 здравих Либанаца, што је учесталост слична оној у Сирији (13,6%), у грчкој популацији Кипра (13,4%) и Јордану (12,3%). Ова мутација је честа и у популацији Шведске (нађена код укупно 11,1% здравих особа, од тога 0,7% хомозигота и 10,4% хетерозигота) (182). Ликот и Мерсије (207) у прегледном раду наводе да је учесталост ове мутације 3,14% на Исланду, 1,46% у Финској, 2,81% у Ирској, 1,39- 5,0% у Енглеској, 1,48% у Холандији, 1,73- 2,6% у Француској, 2,4% у Аустрији, 5,68% у

Мађарској, 0,89- 1,49% у Италији, 0,49% у Португалу и 1,67% у Шпанији (по Франсесу 2,03%) док је на Гренланду нема. На основу ових података може се закључити да је ова мутација настала у Анадолији у Турској и одатле се путем миграција ширила преко Грчке и Средње Европе у Западну Европу и из Средње Азије на Далеки Исток а такође је честа у државама повезаним са значајним миграцијама из Мале Азије и Грчке (Аргентина, Аустралија, Велика Британија, Шпанија) (204,207). У истраживању Ђорђевић и сар. (181) на 120 здравих особа из Београда и околине ова мутација нађена је код њих 5,8%. Алфировић и сар. (193) налазе ову мутацију код 2,9% од 106 здравих особа у Хрватској.

Разлика у учесталости ове мутације у различитим популацијама узрокује различиту учесталост код оболелих са ТДВ. Учесталост носилаца FV Leiden мутације је најнижа у јапанској, кинеској, корејској, монголској и тајландској популацији а највиша у либанској популацији (Табела 31).

Ризик за настанак ТДВ за носиоце FV Leiden мутације, било у хомозиготном или хетерозиготном облику, OR, рачунат је на основу присуства ове мутације у групи оболелих и контролној групи и износи 2,306. Ризик за појаву ТДВ код хетерозиготних носилаца FV Leiden мутације, OR износи 1,745 а ризик за појаву ТДВ код хомозиготних носилаца FV Leiden мутације није било могуће израчунати због тога што их у контролној групи није било. Ризик је стога израчунат на основу учесталости хомозигота за ову мутацију у општој популацији, која је 0,161%, и износи 34,92 на основу чега присуство FV Leiden мутације у хомозиготном облику треба сврстати у тешке тромбофилије. Међутим, примена мултиноминалне логистичке регресионе анализе је показала да се мутација FV Leiden само уколико је у хомозиготном стању може, као независни фактор ризика, статистички значајно повезати са настанком ТДВ.

Табела 31. Однос учесталости FV Leiden мутације у различитим истраживањима

Резултати истраживања	FV Leiden хомозиготи		FV Leiden хетерозиготи		OR
	Оболели	Контроле	Оболели	Контроле	
Наши резултати	5,14%	0,0%	16,0%	10,42%	-
Ђорђевић и сар. (2004.)	0,6%	0,0%	29,3%	5,8%	6,6
Свенсон и сар (1997.)	7,07%	0,7%	21,21%	10,4%	3,1
Низанковска и сар. (2003.), Адлер и сар. (2012.)	0,6%	0,0%	19,46%	2,0%	12,33
Франсес и сар. (2006.)	0,0%	0,0%	3,82%	2,03%	-
Буазиз- Борги и сар. (2006.), Ирани-Хакиме и сар. (2000.)	7,6%	0,57%	44,4%	13,79%	6,46

Мутација FII 20210 А повезана је са повишеним нивоом протромбина у крвној плазми. Недовољне количине протромбина ометају процес згрушавања и узрокују прекомерно крварење а повишен ниво протромбина узрокује повећану склоност ка

згрушавању (хиперкоагулабилност). Показано је да особе код којих је ниво протромбина изнад 115% имају два пута већи ризик од појаве ТДВ (46) док ова мутација код носиоца узрокује повећање нивоа протромбина и до 139% услед повећане експресије гена (208).

Присуство мутације FII G 20210 A је утврђено код 13 (7,43%) оболелих испитаника, код њих 7 (4,0%) у хетерозиготном облику а код њих 6 (3,43%) у хомозиготном облику. У контролној групи њих 9 (8,18%) су били носиоци ове мутације, њих 7 (6,36%) у хетерозиготном облику а њих двоје (1,82%) у хомозиготном облику. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између присуства ове мутације и настанка ТДВ. У групи испитаника са ТДВ код којих је утврђена мутација FII G 20210 A тромбозом су најчешће биле захваћене бутна и карлична вена, код 8 (61,54%) испитаника. Један испитаник (7,69%) је имао тромбозу вена потколенице, а по двоје испитаника (15,38%) су имали тромбозу вена горњих удова и ТДВ са тромбоемблијом плућа. У нашем истраживању не постоји статистички значајна повезаност између ове мутације и локализације тромбозног процеса. Појава ПЕ није статистички значајно чешћа код оболелих са FII G 20210 A мутацијом што је у сагласности са истраживањем Еласала (180), а за разлику од резултата Русија и сар. (175), где је испитано пет пута више оболелих испитаника. Може се претпоставити да резултат зависи од величине узорка у истраживању и да постоји могућност да бисмо испитивањем већег броја оболелих у нашој популацији добили статистички значајну повезаност између FII G 20210 A мутације и појаве ПЕ.

Учесталост ове мутације у европеидној популацији оболелих од ТДВ креће се између 3 и 17% (209). Подаци о заступљености у овом опсегу добијени су у испитивању 119 оболелих са ТДВ са подручја Београда (210), испитивању 521 оболелих са ТДВ у Италији (211), испитивању 323 оболела млађа од 45 година у Пољској (212), испитивању 137 оболела са ТДВ у Шпанији (187), као и у испитивању оболелих у Чилеу (188) и Хрватској (193). Нешто чешће се јавља код оболелих са ТДВ у Холандији (46) и Либану (195) а ређе у Румунији (213). У истраживању на 213 оболелих са ТДВ и 102 здраве особе из Кине није било носилаца ове мутације ни у једној групи испитаника (184) и изузетно ретко се среће и у другим азијским земљама (185) (Табела 32).

FII G 20210 A мутација јавља се код 0 до 8% здравих особа у европеидној популацији (209). Уочава се да ова мутација има већу заступљеност у земљама јужне Европе у односу на северну. Такође је врло ретка или се ни не налази у далекоисточним, афричким и популацијама америчких Индијанаца. Учесталост у здравој популацији Финске је 1,1% (214) а слична је и у другим земљама северне Европе- Холандији (46), Пољској (212), као и у Великој Британији, Ирској, Шведској, Белорусији, Русији и Данској где учесталост код здравих особа не прелази 2,9% (209). У испитивању Ројнера и сар. на 354 здраве особе у Немачкој њих 2,3% били су хетерозиготи за ову мутацију (215). Испитивањем на 498 здравих особа у Шпанији нађено је 5,3% хетерозигота за ову мутацију (187) а слична учесталост нађена је испитивањем 1389 здравих особа из Италије (211), као и код здравих Либанаца (195) и здравих Београђана (181), док је двоструко нижа у здравој популацији Чилеа (188) и Румуније (213) а нешто виша код здравих особа у Хрватској (193). Јадаон на основу прикупљених података из неколико студија наводи такође највећу учесталост ове мутације у земљама јужне Европе, Блиског Истока и северне Африке. Ове чињенице упућују на закључак да је мутација настала у некој од европеидних популација у региону Медитерана (209) (Табела 32). Најзначајније миграције које су допринеле ширењу ове мутације у друге делове Европе су: насељавање Феничана на целој територији

Медитерана, грчка, римска и турска освајања као и крсташки ратови (209). С обзиром на веома малу учесталост мутације у земљама северне Европе, мала је и вероватноћа образовања хомозиготног генотипа, те их стога није било у испитиваним групама са тог подручја.

Табела 32. Однос учесталости FII 20210 А мутације у различитим истраживањима

Резултати истраживања	FII G20210 А хомозиготи		FII G20210 А хетерозиготи		OR
	Оболели	Контроле	Оболели	Контроле	
Наши резултати	3,43%	1,82%	4,0%	6,36%	-
Ђорђевић и сар. (2004.), (2011.)	0,8%	0,0%	12,6%	4,2%	3,57
Порт и сар. (1996.)	0,0%	0,0%	18,0%	1,0%	2,8
Биковска и сар. (2000.)	0,0%	0,0%	6,5%	1,8%	2,2
Франсес и сар. (2006.)	0,0%	0,0%	5,4%	5,3%	-
Паломо и сар. (2005.)	0,0%	0,0%	8,1%	2,5%	2,0
Маргаљоне и сар (2000.)	0,0%	0,0%	13,6%	4,4%	2,8
Буазиз- Борги 2006.	0,5%	0,0%	18,7%	3,3%	6,67
Хотолану и сар. (2014.)	0,0%	0,0%	2,77%	2,77%	-

Постојање хиперхомоцистеинемije утврђено је код 26,29% оболелих. Код њих 60,87% из ове подгрупе утврђено је постојање MTHFR C 677 T мутације- 50,0% су били хетерозиготи а 10,87% хомозиготи. Код 39,13% оболелих са хиперхомоцистеинемijом није нађена MTHFR C 677 T, њих 44,45% из ове подгрупе су носиоци MTHFR A 1298 C мутације уз садејство других фактора ризика а њих 22,22% су носиоци MTHFR A 1298 C мутације без утврђеног додатног могућег узрока хиперхомоцистеинемije. У овој подгрупи 33,33% испитаника нису носиоци испитиваних мутација у MTHFR гену (стр. 72-78). Познато је да се овај поремећај може повезати са исхраном сиромашном фолатима и/или витамином B12 (216), применом лекова који делују на метаболизам фолата, мегалобластном анемијом, пушењем, хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, хипотиреоидизмом, старошћу и неким малигним туморима (4,56). Већа учесталост хиперхомоцистеинемije код мушкараца запажена је и у другим популацијама и може се повезати са просечно нижим нивоом витамина B12 код мушкараца у односу на жене (217, 218) а узрок ове појаве је још увек непознат. У нашем истраживању просечна вредност нивоа хомоцистеина код оболелих хетерозигота без присуства MTHFR A 1298 C мутације била је 13,73 mmol/l, распон вредности је био од 12,1 до 17,74 mmol/l, док је код оболелих хомозигота или оболелих са удруженим присуством MTHFR C 677 T и MTHFR A 1298 C мутације просечна вредност била 15,75 mmol/l, распон вредности је био од 12,5 до 23,4

mmol/l. Уочено је да носиоци МТНFR С 677 Т мутације у хомозиготном стању или удружене са МТНFR А 1298 С мутацијом имају виши ниво хомоцистеина у односу на оболеле са хиперхомоцистеинемijом код којих је МТНFR С 677 Т мутација у хетерозиготном стању присутна самостално али ова разлика није статистички значајна ($p=0,057$).

Испитаници са ТДВ код којих је утврђена МТНFR С 677 Т мутација најчешће су имали тромбозу бутне и карличних вена (64,04%). Тромбозу вена потколенице имало је 16,85% ових испитаника, 10,11% су имали тромбозу вена горњих удова а њих 9,0% ТДВ са тромбоемблијом плућа. Није утврђено постојање статистички значајне повезаности између присуства ове мутације и локализације тромбозног процеса. Између присуства МТНFR С 677 Т мутације у хомозиготном или хетерозиготном облику, самостално или удружене са МТНFR А 1298 С мутацијом, и чешће појаве ПЕ није утврђено постојање статистички значајне повезаности, а недостатак повезаности утврђен је и у истраживању Еласала и сар. (180).

Добијена учесталост МТНFR С 677 Т мутације од 50,86% у групи оболелих испитаника је у сагласности са нашом проценом на основу познатих података из досадашњих истраживања да се ова мутација јавља код више од половине свих пацијената са ТДВ у европеидној популацији (210,219,220,222,223). Слични резултати добијени су у истраживању на 119 оболелих са ТДВ на подручју Београда (181,211), 198 оболелих из Либана (219), 117 оболелих из Пољске (220), 107 оболелих из Шпаније (221), као и испитивањем оболелих у Италији (222), Румунији (213), Хрватској (193) и Кини (223), док је испитивањем оболелих у Македонији добијена нешто нижа учесталост (224). У истраживању Гросмана и сар. на 300 оболелих из Немачке нађено је 13,3% хомозигота док учесталост хетерозигота није приказана (225). Знатно нижа учесталост ове мутације утврђена је код оболелих са ТДВ из Тајланда, свега 15% хетерозигота док хомозиготи нису нађени (226) (Табела 33).

На основу до сада познатог укупна заступљеност хетерозигота и хомозигота за МТНFR С 677 Т мутацију у општој европеидној популацији је 50- 60% а слична је и у Јапану док је у Африци нижа (око 16%) (53,54). Учесталост у овом опсегу утврђена је у здравој популацији са подручја Београда (181), Пољске (220), Шпаније (221), Хрватске (193), Македоније (224). На основу података приказаних у метаанализи Јанга и Ботоа (57) може се израчунати да је учесталост хомозигота у здравој популацији В. Британије 13,19% а хетерозигота 44,46%, у Холандији је присутно 8,95% хомозигота и 46,52% хетерозигота, у Немачкој има 7,78% хомозигота и 33,46% хетерозигота, у Шведској 10,32% хомозигота и 39,68% хетерозигота, у Италији 18,02% хомозигота и 51,49% хетерозигота, у Северној Африци хомозигота међу испитаницима није било док су хетерозиготи заступљени са 13,25%, а у Јапану је присутно 11,49% хомозигота и 47,37% хетерозигота. У Колумбији је учесталост хомозигота 25,33% а хетерозигота 46,67%, код белаца у Северној Америци учесталост хомозигота је 11,86% а хетерозигота 44,64% а код црнаца има 1,21% хомозигота и 25,60% хетерозигота (227). Приликом испитивања 122 здраве особе из Кине добијена је нешто нижа учесталост (223), као и испитивањем 697 здравих Либанаца (219), и испитивањем 72 здрава Румуна (213) док је на Тајланду ова мутација двоструко ређа у односу на европеидну популацију (226) (Табела 33).

Може се претпоставити да довољан унос фолата у некој популацији омогућава повећање учесталости ове мутације, односно да недовољан унос смањује учесталост. Тако је ова мутација више присутна у јужној Европи у односу на северну услед већег удела

фолне киселине у намирницама медитеранског порекла. Такође, ова мутација је врло ретка у Африци делом услед недостатка фолата у исхрани (што за последицу има, између осталог, понављане губитке плода код жена носилаца услед хиперхомоцистеинемije и самим тим повећање учесталости потомства без мутације) (53). Претпоставља се да је ова мутација настала пре око 100 000 година у Африци, пре миграција становништва на друге континенте али да је учесталост у земљама око екватора мала услед деловања природне селекције. Наиме, генотип без мутације ефикасније користи фолну киселину, чија је фотолиза у организму изазвана деловањем УВ зрака који су изразито јаки у овом подручју што је један од разлога за постојећу расподелу учесталости ове мутације у свету (228).

У групи оболелих испитаника, након искључења испитаника у акутној фази запаљења, повишене вредности нивоа FVIII (изнад 150%) су утврђене код 17,71% испитаника. Учесталост ове тромбофилије у општој популацији је 11% (4), тако да за нашу популацију оболелих није утврђена статистички значајна повезаност између повишеног нивоа FVIII и настанка ТДВ. Постоји могућност да би требало повисити горњу границу опсега нормалних вредности активности овог фактора изнад 150% да би се повишене вредности могле повезати са ризиком за појаву ТДВ (4). У групи испитаника са ТДВ насталим у трудноћи и пуерперијуму повишене вредности су утврђене код њих 6. Током трудноће долази до физиолошког пораста нивоа FVIII (4) а у неким случајевима и преко граничне вредности што повећава ризик од настанка ТДВ (229).

Табела 33. Однос учесталости MTHFR C 677 T мутације у различитим истраживањима

Резултати истраживања	MTHFR C 677 T хомозиготи		MTHFR C 677 T хетерозиготи		OR
	Оболели	Контроле	Оболели	Контроле	
Наши резултати	8,0%	18,69%	43,93%	42,86%	-
Ђорђевић и сар. (2004.), (2011.)	11,6%	11,2%	46,22%	39,2%	-
Ђанг и сар. (2000.)	18,9%	12,3%	48,1%	30,7%	-
Ангчаисуксири и сар. (2000.)	0,0%	1,4%	15,0%	25,6%	-
Алмави и сар. (2005.)	20,7%	11,0%	38,9%	38,7%	1,49*
Палко-Лабус и сар. (2010.)	6,0%	11,6%	45,3%	43,0%	-
Гонзалес- Ордонез и сар. (1999.)	12,1%	10,0%	44,0%	44,0%	-
Катанео и сар. (1997.), Бото и Јанг (2000.)	20,8%	18,02%	46,8%	51,49%	-
Алфиревић и сар. (2010.)	9,0%	8,0%	45,0%	59,0%	-
Спироски и сар. (2008.)	16,4%	13,2%	31,3%	44,6%	-

*-ризик се односи само на MTHFR C 677 T хомозиготе

По искључењу испитаника код којих је ниво фибриногена повишен у оквиру реакције акутне фазе, повишене вредности овог параметра утврђене су код њих 9,81%. Костер и сар. (230) су у истраживању из 1994. показали да повишен ниво фибриногена значајно повећава вероватноћу појаве ТДВ, као и да особе са концентрацијом фибриногена у плазми од преко 5 g/l имају скоро четири пута већи ризик од настанка овог обољења. у групи оболелих испитаника, код њих 121 (68,14%) је утврђено постојање барем једне наследне тромбофилије.

Уколико посматрамо збирно све испитиване тромбофилије, како наследне тако и мешовите- повишен ниво FVIII и повишен ниво фибриногена у случајевима где нису повезани са присуством акутне фазе запаљења, хиперхомоцистеинемиију, повишен ниво протромбина и резистенцију на APC, код 84,57% оболелих испитаника је утврђено постојање барем једне тромбофилије.

Раније је наведено да је код особа са удруженом тромбофилијом ризик за настанак тромбоза вишеструко већи од простог сабирања ризика сваке појединачне тромбофилије а додатно се повећава присуством пролазног или трајног фактора ризика. С обзиром на наведене учесталости појединачних тромбофилија међу оболелима и у општој популацији постојање удружене тромбофилије није реткост.

У нашем истраживању постојање удружене наследне тромбофилије утврђено је код 21,14% оболелих испитаника. Постојање две наследне тромбофилије је утврђено код 16,0% испитаника а код 5,14% је утврђено постојање три наследне тромбофилије (стр. 82-85).

Учесталост испитаника са удруженом наследном тромбофилијом у истраживању Браун и сар. (231) на 504 оболела из југоисточне Енглеске је 0,6% и сви су носиоци FII G 20210 A и FV Leiden мутације у хетерозиготном стању док присуство удружене наследне тромбофилије није утврђено ни код једне од 508 здравих особа. Испитивано је присуство FII G 20210 A и FV Leiden мутације, као и недостатака природних инхибитора коагулације. Маргальоне и сар. (211) испитују присуство истих параметара и наводе 4,0% оболелих хетерозигота за FII G 20210 A и FV Leiden мутацију, 0,6% оболелих хетерозигота за FV Leiden мутацију уз недостатак протеина C, 0,2% хетерозигота за FV Leiden мутацију уз недостатак антитромбина, 0,2% хетерозигота за FII G 20210 A мутацију уз недостатак протеина C и 0,4% хетерозигота за FII G 20210 A мутацију уз недостатак протеина Ц. Ђорђевић и сар. (232) у испитивању 100 оболелих из Београда наводе 9,5% хетерозигота за FII G 20210 A и FV Leiden мутацију, 8,4% хомозигота за MTHFR C 677 T и хетерозигота FV Leiden мутацију, 1% хомозигота за обе ове мутације и 2,1% хетерозигота за FII G 20210 A и FV Leiden мутацију уз истовремено присуство MTHFR C 677 T мутације у хомозиготном стању.

У контролној групи у нашем раду било је 6 (5,36%) испитаника са удруженом наследном тромбофилијом (стр 84- 85).

У нашем испитивању израчунат је ризик за настанак ТДВ код носилаца FII G 20210 A и FV Leiden мутације на основу процењене учесталости удруженог присуства обе мутације у популацији на основу података о појединачној учесталости и добијена је вредност OR од 1,35, тако да удружено присуство ових мутација представља веома благ фактор ризика за настанак ТДВ, што је случај и са удруженим присуством FII G 20210 A и MTHFR C 677 T и FV Leiden мутације, где вредност OR износи 1,43. Нешто већи ризик OR израчунат је за носиоце MTHFR A 1298 C мутације у групи оболелих са MTHFR C 677 T мутацијом и износи 2,40.

На основу учесталости носилаца МТНFR С 677 Т и FV Leiden мутације у групи оболелих и контролној групи израчунат је ризик за настанак ТДВ код носилаца обе мутације OR и износи 6,029 (стр. 83). Може се закључити да је истовремено присуство ових мутација јак фактор ризика за настанак ТДВ.

Ризик за настанак ТДВ на основу учесталости удруженог присуства недостатка протеина Ц и МТНFR С 677 Т у хомозиготном стању у групи оболелих и процењене учесталости у општој популацији OR износи 19,15, тако да удружено присуство ових тромбофилија представља врло јак фактор ризика за настанак ТДВ.

Ризик OR за удружено присуство недостатка протеина С и FV Leiden мутације рачунат на основу учесталости у групи оболелих и процењене учесталости у општој популацији од 0,01% износи 57,46, што такође представља врло јаку склоност ка настанку ТДВ а исто важи и у случају удруженог присуства недостатка протеина С и МТНFR С 677 Т мутације, где на овај начин израчунат ризик OR износи 58,46

Удружено присуство недостатка антитромбина и МТНFR С 677 Т мутације носи још већи ризик, на исти начин добијена вредност OR износи 87,19.

Изразито јак ризик јавља се у случају удруженог присуства недостатка протеина Ц, протеина С и МТНFR С 677 Т мутације, где је OR 287,35, као и у случају удруженог присуства недостатка протеина С, МТНFR С 677 Т и FV Leiden мутације (OR је 289,01).

На исти начин израчунат ризик OR за удружено присуство недостатка протеина С, FII G 20210 А и МТНFR С 677 Т мутације износи 581,38, а то је и највећа вредност OR добијена у овом истраживању.

У истраживању Браун и сар. (231) ризик OR за носиоце FII G 20210 А и FV Leiden мутације израчунат на основу наведених учесталости ових мутација у општој популацији југоисточне Енглеске је 7,48. На основу података у студији Ђорђевић и сар. ризик OR код носилаца обе мутације је 43,5 (232). Маргальоне и сар. (211) су у својој студији дали податак о 21 оболелом са ТДВ (4,03%) и једној здравој особи (0,08%) који су носиоци обе мутације и на основу тога израчунат ризик OR износи 55,78 (Табела 34). У нашој популацији здравих особа учесталости наведених мутација су двоструко веће од оних које Маргальоне и сар. наводе за италијанску популацију и оних које Ђорђевић и сар. (232) наводе за укупну популацију Србије и Црне Горе и више него троструко веће од оних које Браун и сар. (231) наводи за популацију југоисточне Енглеске, те је стога и процењени ризик за настанак ТДВ код носилаца обе мутације у нашем истраживању мањи.

Уколико се не рачунају оболели са присуством МТНFR С 677 Т мутације у хетерозиготном стању без удруженог присуства МТНFR А 1298 С мутације укупан број оболелих са удруженом тромбофилијом је четвороструко већи од броја оних са удруженим постојањем FII G 20210 А и FV Leiden мутације. У истраживању Маргальонеа укупан број испитаника са удруженом наследном тромбофилијом је 1,33 пута већи од броја оболелих са удруженим постојањем FII G 20210 А и FV Leiden мутације услед малог броја испитаника са недостатком неког од природних инхибитора коагулације.

Табела 34. Учесталост удруженог постојања FII G 20210 A и FV Leiden мутације у различитим истраживањима

Резултати истраживања	FII G 20210 A и FV Leiden		OR
	Оболели	Контроле	
Наши резултати	1,14%	0,0%	1,35
Ђорђевић и сар. (2005.)	9,47%	0,24%	43,5
Браун и сар. (1998.)	0,6%	0,0%	7,48
Маргаљоне и сар. (2000.)	4,03%	0,08%	55,78

Наши резултати приказују учесталост удружене наследне тромбофилије код испитаница са ТДВ насталом у трудноћи или пуерперијуму од 35,71%, а изузевши MTHFR C 677 T мутацију у хетерозиготном стању 21,43%, на основу чега се удружена наследна тромбофилија може статистички значајно повезати са настанком ТДВ током трудноће и слепопорођајног периода. Ризик OR за настанак ТДВ у овом периоду код жена са удруженом тромбофилијом износи 3,76. Удружену тромбофилију имало је 33,33% испитаница код којих је ТДВ настала у периоду трудноће и 26,19% испитаница са ТДВ насталом у пуерперијуму. Разлика у времену настанка ТДВ у нашем истраживању није статистички значајна али истраживање Митић и сар. (4) на већем броју испитаница показује да код испитаница са удруженом тромбофилијом ТДВ значајно чешће настаје у трудноћи. Стога се код оболелих жена са удруженом тромбофилијом (као и код особа код којих је удружена тромбофилија дијагностикована пре трудноће) започиње са превенцијом тромбозе током наредне трудноће раније у односу на особе са појединачним тромбофилијама (4). Учесталост удружене тромбофилије код оболелих са ПЕ је 31,56% али није утврђена статистички значајна повезаност између присуства удружене тромбофилије и настанка ПЕ код оболелих са ТДВ. Маргаљоне и сар. (211) наводе повезаност удружене тромбофилије и ПЕ као компликације ТДВ. С обзиром на то да је број испитаника у студији Маргаљонеа и сар. готово троструко већи у односу на број испитаника у нашем истраживању постоји могућност да би се даљим испитивањем већег броја оболелих са ПЕ у популацији Војводине утврдила значајна повезаност удружене тромбофилије и ПЕ.

У нашем испитивању, поређењем оболелих мушког и женског пола запажа се да се у доби до 45 година ТДВ значајно чешће јавља код жена (70,34%: 29,66%). Овакав резултат је очекиван с обзиром на чињеницу да трудноћа и период од 6 недеља после порођаја, као и употреба хормонске терапије која садржи естроген или прогестаген, носе повишен ризик од настанка ТДВ. Након поређења групе оболелих жена код којих ТДВ није повезана са трудноћом, пуерперијумом или узимањем поменуте хормонске терапије и групе оболелих мушкараца, нема значајне разлике у појави ТДВ у доби до 45 година између ове две групе. Поређењем медијане старости у свакој подгрупи (са једном наследном тромбофилијом, са удруженом наследном тромбофилијом, са најмање једном

тромбофилијом и без тромбофилије), утврдили смо да се тромбоза најраније у животном добу јављала код испитаника са наследном и удруженом наследном тромбофилијом а најкасније код испитаника без тромбофилије. С обзиром на то да разлика у просечној старости није статистички значајна не може се закључити да код особа са наследном тромбофилијом треба раније започети превентивни антиромбозни третман у ситуацијама присуства пролазног или трајног фактора ризика у односу на особе без тромбофилије.

Учесталост оболелих са наследном тромбофилијом највећа је у подгрупи где је поред ТДВ присутна и плућна тромбоемболија, код њих 84,21%, затим у подгрупи са тромбозом коленске вене, вена натколенице и карличних вена, код њих 69,72%, нешто нижа је у подгрупи са тромбозом горњих удова, код њих 68,75% а најнижа је у подгрупи са потколеним тромбозом, 60,0%. С обзиром на то да МТНFR С 677 Т мутација у хетерозиготном стању када је присутна самостално није повезана са настанком ТДВ, изузети су оболели код којих није присутна ни једна друга наследна тромбофилија и у том случају је учесталост оболелих са наследном тромбофилијом највећа у подгрупи са тромбозом коленске вене, вена натколенице и карличних вена, код њих 60,55%, затим у подгрупи са плућном тромбоемболијом, код њих 57,89%, затим у подгрупи са тромбозом горњих удова, код њих 56,25% а остаје најнижа у подгрупи са потколеним тромбозом, 46,67%. Може се закључити да се наследна тромбофилија повезује пре свега са појавом тромбозе коленске вене, вена натколенице и карличних вена а да на настанак тромбоза друге локализације други узроци имају значајнију улогу.

Код 7,43% оболелих настао је рецидив тромбозног процеса, а код 5,14% рецидив је настао унутар 5 година од прве тромбозе. 76,92% испитаника са рецидивима имало је барем једну наследну тромбофилију од којих је једино самостално присуство МТНFR С 677 Т мутације статистички значајно чешће код оболелих са рецидивима у односу на оболеле без рецидива ТДВ. Ризик за настанак ТДВ код носилаца МТНFR С 677 Т мутације OR износи 5,04. Код оболелих са најмање једним тромбозним инцидентом присуство МТНFR С 677 Т мутације статистички значајно повећава вероватноћу за настанак рецидива.

У групи оболелих је у време настанка ТДВ крвни притисак био повишен (изнад 140/90 mmHg) код 12,0% испитаника а у контролној групи код њих 1,78%. Код 14,81% испитаника из подгрупе оболелих код којих није утврђено присуство ни наследне ни мешовите тромбофилије крвни притисак је био повишен у време настанка ТДВ а након искључења оболелог којем је пре настанка ТДВ уграђен стент услед срчаног удара и даље је присутна статистички значајна повезаност између повишеног крвног притиска и настанка ТДВ. Ризик за настанак ТДВ код особа са повишеним крвним притиском OR у овом случају износи 11,379 што повишен крвни притисак сврстава у јаке факторе ризика за настанак ТДВ. Котоне и сар. су у истраживању из 2006. на 83 испитаника са примарно повишеним крвним притиском из Палерма (Италија) показали да код овог стања долази до пораста нивоа CRP и молекула који су повезани са активацијом ендотела (233). Активација ендотела је низ процеса који укључују повећану експресију површинских антигена и ћелијских адхезивних молекула као што су Е- селектин, ICAM-1 (енг. Intercellular Cell Adhesion Molecules -1) и VCAM-1 (енг. Vascular Cell Adhesion Molecules-1) који омогућавају адхезију леукоцита за ендотел и њихов улазак у ткиво. Дешавају се и бројне протромботске промене: губитак површинских антикоагуланаса тромбомодулина и хепаран- сулфата, смањење фибринолитичког потенцијала услед повишеног ослобађања PAI- 1, губитак антиагрегационог ефекта ADP- аза и простацikliна, производња NO и

експресија ткивног фактора (234). Можемо да претпоставимо да су ове промене у основи повезаности између повишеног крвног притиска и настанка ТДВ установљене у нашем истраживању.

Хиперлипипропротеинемија је у групи оболелих у време настанка ТДВ била присутна код 4,0% испитаника а у контролној групи није било испитаника са хиперлипипропротеинемијом. Међу оболелима код којих није утврђено присуство ни наследне ни мешовите тромбофилије, код њих 7,41% је постојала хиперлипипропротеинемија. Вредност OR у овом случају износи 5,48, тако да хиперлипипропротеинемија представља умерено јак фактор ризика за настанак ТДВ. Постоје докази да липопротеини плазме улазе у интеракцију са тромбоцитима и утичу на њихову функцију. Код оболелих са хиперхолестеролемијом примећено је постојање тромбоцита са измењеном функцијом услед везивања липопротеина за површинске рецепторе, пре свега оксидисаног LDL (енг. low-density lipoprotein) холестерола. Повишен ниво холестерола у плазми такође утиче на састав ћелијске мембране тромбоцита, повећавајући однос холестерола и фосфолипида што узрокује промене у вискозности и утиче на везивање рецептора и трансмембранску сигнализацију. Тромбоцити на површини експримирају гликопротеин CD36 који је рецептор за лиганде тромбоспондин- 1 и оксидисани LDL. Они везивањем за CD36 стимулишу адхезију тромбоцита тако што CD36 тада активира тирозин- киназу Syk која учествује у сигналном путу којим се активирају интегрини и експримира P- селектин. Ове промене стимулишу повећано згрушавање крви након везивања тромбоцита за колаген из субендотела (235). Ови подаци указују на важност одржавања липопротеина у оквиру референтних вредности одговарајућом исхраном и терапијом (236).

Након примене логистичке регресионе анализе на благе и умерене тромбофилије и факторе ризика који су на основу досадашњег поређења групе оболелих и контролне групе статистички значајно повезани са настанком ТДВ утврђено је да се једино мутација FV Leiden у хомозиготном стању, гојазност и повишен крвни притисак, када су присутни без садејства других фактора ризика, могу статистички значајно повезати са настанком ТДВ. Вредност OR у случају повишеног крвног притиска износи 9,219 а у случају гојазности 14,878 на основу чега је гојазност јак фактор ризика за настанак ТДВ. Вредност OR за носиоце FV Leiden мутације у хомозиготном стању није било могуће израчунати у овој анализи јер их није било у контролној групи.

Испитивање повезаности тромбофилије са настанком ТДВ има за крајњи циљ доношење одлуке о превентивној примени антикоагулантне терапије и смањењу вероватноће поновне појаве тромбозног процеса. За носиоце FV Leiden мутације у хомозиготном стању препоручује се дуготрајна примена оралне антикоагулантне терапије (најмање годину дана а у неким случајевима и доживотно) уз редовно периодично праћење због повећаног ризика од крварења тј. редовно мерење PT и одређивање INR. У току лечења оралним антикоагулансима терапијски опсег INR треба да буде 2- 3. Примена оралних антикоагуланаса није дозвољена у трудноћи због штетних утицаја на развој ембриона већ се примењују хепарински антикоагуланси (139). У нашем истраживању FV Leiden мутација у хетерозиготном стању није потврђена као самостални узрок настанка ТДВ тако да се код ових носилаца препоручује примена оралне антикоагулантне терапије у трајању од најмање шест месеци у зависности од појединачне процене ризика од поновне појаве тромбозе (143).

У свим случајевима се на самом почетку лечења уз антагонисте витамина К (аценокумарол или варфарин) истовремено примењује и неки од хепаринских

антикоагуланаса поткожно, јер антагонисти витамина К спречавају синтезу PC и PS (237). Дозирање је индивидуално а овакав терапијски режим траје до постизања вредности INR од око 2,0 када се обуставља примена хепаринских антикоагуланаса. Код болесника са недостатком AT, PC или PS препоручује се дуготрајна примена оралне антикоагулантне терапије (најмање годину дана или неограничено дуго) (139). Осетљивост оболелих на ове антикоагулансе јако варира (238) тако да је неопходно редовно лабораторијско праћење. Код осталих оболелих са једном тромбофилијом након прве тромбозе се такође препоручује примена оралне антикоагулантне терапије у трајању од најмање шест месеци уз одржавање терапијског опсега INR 2- 3. Истраживање Ридкера и сар. (239) је показало да се на овај начин ризик од поновне појаве тромбозе смањено за 75% у односу на оболеле којима је након 6,5 месеци укинута терапија. Код жена са претходном ТДВ и FV Leiden мутацијом у хомозиготном облику примењује се препоручени превентивни третман за жене са једном наследном тромбофилијом у следећем периоду у трајању од 4 до 8 недеља (240).

Код оболелих са различитим удруженим тромбофилијама ризик за поновну појаву тромбозе већи је него код постојања појединачне тромбофилије тако да се саветује продужење оралне антикоагулантне терапије на најмање годину дана, нарочито уз присуство додатних фактора ризика (трудноћа, непокретност итд) (142, 206). Такође се не препоручује примена оралних контрацептивних средстава која садрже естроген као ни оралне хормонске супституције у менопаузи, док примена хормонске супституције преко коже код оболелих са једном тромбофилијом није значајно повећала ризик од појаве ТДВ, (241) с обзиром на то да на овај начин врло мала количина естрадиола пролази кроз јетру и утиче на метаболизам хепатоцита, тако да је утицај на згрушавање крви минималан (242, 243). Података о ризику за настанак ТДВ код примене ових средстава преко коже код особа са удруженом тромбофилијом још увек нема али се на основу наведених чињеница може закључити да је њихова употреба и у овим случајевима безбедна.

Гојазност помоћу бројних механизма утиче на настанак ТДВ: масно ткиво отежава повратак венске крви у срце (123), лучи лептин који повећава згрушавање крви тако што доприноси агрегацији тромбоцита, стимулише синтезу PAI-1, покреће запаљенске процесе и синтезу F VII, F VIII, фибриногена, фон Вилебрандовог фактора и tPA. Смањење телесне масе и одржавање нормалних вредности BMI доводи до смањења концентрације фактора VII, VIII и tPA до нормалног нивоа док је смањење концентрације фибриногена благо и региструје се тек при просечном смањењу телесне масе за око 13,6 kg (120,123).

С обзиром на значај наследне тромбофилије у настанку ТДВ потребно је одредити кога све је потребно испитати на присуство ових поремећаја хемостазног система. Свакако би требало испитати млађе особе са ТДВ, без обзира на то да ли је настала без познатог узрока или је изазвана дејством неког фактора ризика. Испитивање треба извршити и код женских чланова породице оболелог са ТДВ, поготово оних у репродуктивном периоду и менопаузи да би се особе са тромбофилијом упознале са ризицима употребе средстава за оралну контрацепцију и оралну хормонску супституцију која садрже естроген. Уколико је код оболелог члана породице нађена одређена тромбофилија тада се код женских чланова испитује присуство те тромбофилије. Женама са тромбофилијом је потребно редовно праћење у трудноћи и евентуална примена нискомолекуларног хепарина. Жене са тромбофилијом имају и повишен ризик од настанка ТДВ током припреме за вантелесну оплодњу (9). Испитивање на присуство наследне тромбофилије треба извршити и код

жена са најмање једним спонтаним побачајем који је настао после десете недеље трудноће (244, 245). Баглин и сар. у клиничком водичу за испитивање наследне тромбофилије (246) наводе да је на присуство наследне тромбофилије (недостатка протеина Ц и С) потребно испитати и децу са *purpura fulminans*, а да је на присуство недостатка природних инхибитора коагулације потребно испитати и особе са појавом венског тромбоемболизма у породици, док лежеће болеснике без ТДВ не треба испитивати на присуство наследне тромбофилије већ ризик од настанка тромбозе код њих треба проценити на основу клиничких параметара. Уколико је код оболелог пре пријема на болничко лечење утврђено присуство тромбофилије тада то треба узети у обзир приликом процене ризика (246).

6. Закључци

Резултати испитивања наследне тромбофилије код оболелих са тромбозом дубоких вена показали су високу учесталост наследне тромбофилије у овој испитиваној групи. Такође су утврђени и други фактори ризика који самостално, или у садејству са другим генетичким и срединским факторима доприносе настанку ТДВ. Резултатима спроведеног испитивања радна хипотеза је потврђена великим делом мада не у потпуности. На основу добијених и обрађених података можемо извести следеће закључке:

1. Постојање наследне тромбофилије је утврђено код 57,14% оболелих са ТДВ и 48,21% здравих особа. Добијене су следеће вредности учесталости тромбофилних мутација код оболелих и здравих особа:
 - Постојање FV Leiden мутације утврђено је код 21,14% оболелих, код 16,0% у хетерозиготном а код 5,14% у хомозиготном облику и код 10,42% испитаника контролне групе у хетерозиготном облику док хомозиготних носилаца није било
 - Постојање FII G 20210 A мутације утврђено је код 7,43% оболелих, код 4,0% у хетерозиготном облику а код 3,43% у хомозиготном облику и код 8,18% испитаника контролне групе, код 6,36% у хетерозиготном облику а код 1,82% у хомозиготном облику
 - Постојање мутације MTHFR C 677 T је утврђено код 50,86% оболелих, код 42,86% у хетерозиготном облику а код 18,0% у хомозиготном облику и код 62,62% испитаника контролне групе, код 43,93% у хетерозиготном облику а код 18,69% у хомозиготном облику
 - Постојање мутације MTHFR A 1298 C утврђено је код 44,94% оболелих и 25,37% здравих испитаника са MTHFR C 677 T мутацијом
2. Између постојања недостатака природних инхибитора коагулације, постојања FV Leiden мутације у хомозиготном облику, као и постојања удружене наследне тромбофилије и настанка ТДВ утврђено је постојање статистички значајне повезаности. Недостатак неког од природних инхибитора повезан је са највећим ризиком за настанак ТДВ.
3. Између постојања FII G 20210 A мутације, у хомозиготном или хетерозиготном облику, постојања FV Leiden мутације у хетерозиготном облику, као и постојања MTHFR C 677 T мутације, самостално или истовремено са MTHFR A 1298 C мутацијом и настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности.

4. Између присуства FII G 20210 A мутације или FV Leiden мутације и MTHFR C 677 T мутације у хомозиготном облику, као и удружене наследне тромбофилије и појаве ТДВ у трудноћи или пуерперијуму утврђено је постојање статистички значајне повезаности.
5. Између постојања наследне тромбофилије, појединачне или удружене, и клиничког испољавања венске тромбоемболијске болести код оболелих са ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности.
6. Између постојања наследне тромбофилије, појединачне или удружене, и старости у време настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности.
7. Између присуства MTHFR C 677 T мутације и поновљеног тромбозног процеса утврђено је постојање статистички значајне повезаности.
8. Између присуства FII G 20210 A мутације и FV Leiden мутације, у хомозиготном или хетерозиготном облику, удружене наследне тромбофилије и поновљеног тромбозног процеса није утврђено постојање статистички значајне повезаности.
9. Између гојазности и повишеног крвног притиска и настанка ТДВ утврђено је постојање статистички значајне повезаности.
10. Између хиперлиппротеинемije и настанка ТДВ није утврђено постојање статистички значајне повезаности.

Одлука о испитивању наследне тромбофилије доноси се узимајући у обзир старост, пол и присуство пролазних или трајних фактора ризика. Препоручује се испитивање млађих особа са ТДВ, без обзира на то да ли је настала без познатог узрока или је изазвана дејством неког фактора ризика. Испитивање треба извршити и код женских чланова породице оболелог са ТДВ у репродуктивном периоду и менопаузи да би се благовремено упознале са ризицима употребе средстава за оралну контрацепцију и оралну хормонску супституцију која садрже естроген. Уколико је код оболелог члана породице нађена одређена тромбофилија тада се код женских чланова испитује присуство те тромбофилије. Женама са тромбофилијом је потребно редовно праћење у трудноћи и евентуална примена нискомолекуларног хепарина а имају и повишен ризик од настанка ТДВ током припреме за вантелесну оплодњу. Испитивање на присуство наследне тромбофилије треба извршити и код жена са најмање једним спонтаним побачајем који је настао после десете недеље трудноће.

7. Литература

1. Milic D. Disorders of the coagulation system in the patients with deep vein thrombosis of lower extremities. *Acta biologica iugoslavica* 2000; 1: 43-56.
2. McCall RE, Tankersley C. Phlebotomy exam review. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2004; 106.
3. Morefocus group, Inc. Coagulation factors [Internet]. [citirano 8. februara 2010] Dostupno na <http://www.coagulation-factors.com/>
4. Mitic G. Nasledna trombofilija i trombozne komplikacije u trudnoći [disertacija]. [Novi Sad]: Univerzitet u Novom Sadu; 2008; 163.
5. Guyton AC, Hall EH. Text book of medical physiology. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 419-29.
6. Ramström S. Clotting time analysis of citrated blood samples is strongly affected by the tube used for blood sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:447-52
7. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet*. 1987; 13(3): 285-92.
8. School of Anatomy and Human Biology- The University of Western Australia [Internet]. [citirano 7. februara 2010] Dostupno na <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/vascular/vascular.htm>
9. Maksimović Ž i sar. Klasifikacija i klinička slika akutnih i hroničnih vaskularnih oboljenja. Osnove vaskularne hirurgije i angiologije. CIBID, Medicinski fakultet Beograd; 2004; 117-123.
10. Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Briët E, Blann AD. Role of clotting factor VIII in effect of Von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *The Lancet* 1995; 345: 152- 55.
11. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965; 13: 516-30.
12. Society of Interventional Radiology ©2003 [Internet]. [citirano 8. februara 2010] Dostupno na <http://www.sirweb.org>
13. Bakić M. Trombofilije dijagnostika i tretman. *Acta Fac Med Naiss*. 2002; 19: 120-7.
14. Pallotta R, Dalprà L, Miozzo M, Ehresmann T, Fusilli P. A patient defines the interstitial 1q deletion syndrome characterized by antithrombin III deficiency. *Am. J. Med. Genet*. 2001; 104: 282-6
15. Hathaway WE. Clinical aspects of antithrombin III deficiency. *Semin Hematol* 1991; 28: 19-23
16. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal of Clinical Investigation* 1981; 68(5):1370-3)
17. Knoebl PN. Severe congenital protein C deficiency. The use of protein C concentrates (human) as replacement therapy for life-threatening blood-clotting complications. *Biologics* 2008; 2: 285-96
18. Martinelli I, De Stefano V, Manucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2013; 211
19. Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 135- 45.
20. Esmon CT. The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(5): 382-5
21. University of Illinois- Urbana/Champaign Carle Cancer Center Hematology Resource Page [Internet]. [citirano 8. februara 2010] Dostupno na <http://www.med.illinois.com/>
22. Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74(1): 81- 9
23. Francis JL. An algorithmic approach to laboratory diagnosis of thrombotic risk factors. *Laboratory Hematology* 2003; 9: 82-83.

24. Pabinger I, Brücker S, Kyrle PA, Schneider B, Korninger HC, Niessner H, Lechner K. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1992; 3: 547- 554.
25. Suehisa E, Nomura T, Kawasaki T, Kanakura Y. Frequency of natural coagulation inhibitor (antithrombin III, protein C and protein S) deficiencies in Japanese patients with spontaneous deep vein thrombosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2001; 2: 95-99.
26. Marlar RA, Mastovich S. Hereditary protein C deficiency: a review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1990; 3: 319-330.
27. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest.* 1984; 74(6): 2082–8
28. Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ, Preston FE. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 2000; 95(6):1935–41
29. Mosnier LO, Meijers JCM, Bouma BN. The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and regulation of fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 4: 1039-40
30. Walker CPR, Royston D. Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies. *Br J Anaesth.* 2002; 88: 848–63.
31. Looney MR, Matthay MA. The role of protein C in sepsis. *Current Infectious Disease Reports* 2001; 3: 413-41.
32. Rosing LFA, Maurissen SN, Tchaikovski G, Hackeng TM. Massive DIC and purpura fulminans in the newborn period, morbidity and mortality. *Thrombosis Research* 2008; 122: S60-S63.
33. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad Sci.* 1993; 90: 1004-8
34. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369: 64–7.
35. Rizk N, Toon PG, Watson D, Jones V. Protein S deficiency and factor V Leiden gene in pregnancy. *Journal of obstetrics & gynaecology* 1998; 2: 178-9.
36. van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Tans G, Rosing J, Vos HL, Bertina RM. The activated protein C (APC)- resistant phenotype of APC cleavage site mutants of recombinant factor V in a reconstituted plasma model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13(3): 207-15.
37. Steen M, Norström EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH, Tuddenham EG, Dahlbäck B. Functional characterization of factor V- Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004; 103(9): 3381-7.
38. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 2003; 101: 20- 30.
39. de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 1271- 6.
40. www.pathologyoutlines.com [Internet]. [citirano 8. februaru 2010] Dostupno na <http://www.pathologyoutlines.com/topic/coagulationacquiredhypercoaggeneral.html>
41. Castaman G, Tosetto A, Simioni M, Ruggeri M, Madeo D, Rodeghiero F. Phenotypic APC resistance in carriers of the A 20210 prothrombin mutation is associated with an increased risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 804- 8.
42. Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Hay CR. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Br J Haematol* 1995; 90: 725- 7.
43. Tosetto A, Missaglia E, Gatto E, Rodeghiero F. The VITA project: phenotypic resistance to activated protein C and FV Leiden mutation in the general population. Vicenza thrombophilia and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 859- 63.
44. Corral J, Roldan V, Vicente V. Deep venous thrombosis or pulmonary embolism and factor V Leiden: enigma or paradox. *Haematologica* 2010; 95: 863- 866.
45. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;85:1504–1508.
46. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'- untranslated region of prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698– 703.
47. Colman RW. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006; 428- 785.

48. Gardemann A, Arsic T, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 81:208–13.
49. Wickens M, Anderson P, Jackson RJ. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Current opinion in genetics and development* 1997; 7(2): 220– 32.
50. Liu X, Jiang Y, Russell JE. A potential regulatory role for mRNA secondary structures within the prothrombin 3'UTR. *Thromb Res.* 2010; 126:130– 6.
51. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJM. The association of prothrombin A 19911.G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population– based case control study. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 2587– 92.
52. Mirković D, Majkić- Singh N, Ignjatović S. Homocysteine: chemistry, metabolism and roles in pathophysiology processes. *Jugoslav Med Biochem* 2003; 22: 127–40.
53. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opere-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in Whites, Japanese, and Africans. *J Hum Genet.* 2002; 70(3): 758- 62.
54. Young- In Kim. Folate and DNA methylation: A mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13: 511.
55. El-Sammak M, Kandil M, El- Hifni S, Hosni R, Ragab M. Elevated plasma homocysteine is positively associated with age independent C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Egyptian subjects. *Int J Med Sci.* 2004; 1(3): 181-19.
56. Vučković BA, Čabarkapa VS, Ilić TA, Salatić IR, Lozanov- Crvenković ZS, Mitić GP. Clinical significance of determining plasma homocysteine as opposed to mthfr 677 genotyping. *Croatian medical journal* 2013; 54(5): 480- 8.
57. Yang Q, Botto LD. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(9): 862- 75.
58. Martinelli I, Battaglioli T, Pedotti P, Cattaneo M, Mannucci PM. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood* 2003;102:1363-6.
59. Cunningham MT, Brandt JT, Laposata M, Olson JD. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126: 499- 505.
60. Kreuz W, Stoll M, Junker R, Heinecke A, Schobess R, Kurnik K, et al. Familial elevated factor VIII in children venous thrombosis and post thrombotic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 2006; 26: 1901- 1906
61. Viel KR, Machiah DK, Warren DM, Khachidze M, Bull A, Fernstrom K, et al. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) activity levels. *Blood* 2007; 109(9): 3713- 2444. Meltzer ME. The role of the fibrinolytic system in arterial and venous thrombosis. [disertacija]. [Utrecht]: University Medical Center; 2010; 20.
62. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Lee KN, Christiansen VJ, McKee PA. Evidence that alpha2-antiplasmin becomes covalently ligated to plasma fibrinogen in the circulation: a new role for plasma factor XIII in fibrinolysis regulation. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:1565– 70.
63. Kathiresan S, Gabriel SB, Yang Q, Lochner AL, Larson MG, Levy D, Tofler GH, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ. Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels. *Circulation* 2005; 112: 1728–35.
64. www.eclinpath.com [Internet]. [citirano 8. marta 2010] Dostupno na <http://www.eclinpath.com/hemostasis/physiology/fibrinolysis/fibrinolysis-2/>
65. Halbmayr WM, Haushofer A, Schön R, Mannhalter C, Strohmer E, Baumgarten K, Fischer M. The prevalence of moderate and severe FXII (Hageman factor) deficiency among the normal population: evaluation of the incidence of FXII deficiency among 300 healthy blood donors. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 71(1): 68- 72.
66. Anastasiou G, Gialeraki A, Merkouri E, Politou M, Travlou A. Thrombomodulin as a regulator of the anticoagulant pathway: implication in the development of thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012; 23: 1- 10.
67. Kleesiek K, Schmidt M, Gotting C, Schwenz, B; Lange, S; Muller-Berghaus, G; Brinkmann, T; Prohaska, W. The 536 C to T transition in the human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene is statistically associated with a higher risk for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 1- 5.
68. Gonzalez- Conejero R, Lozano ML, Corral J, Martinez C, Vincente V. The TFPI 536C→T mutation is not associated with increased risk for venous or arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 787- 8.
69. Bafunno V, Santacroce R, Margaglione M. The risk of occurrence of venous thrombosis: focus on protein Z. *Thromb Res.* 2011; 128 (6): 508- 15.

70. Almawi WY, Al-Shaikh FS, Melemedjian OK, Almawi AW: Protein Z, an anticoagulant protein with expanding role in reproductive biology. *Reproduction* 2013, 146: R73–R80.
71. Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005;3:2817–9.
72. Moat SJ, Bao L, Fowler B, Bonham JR, Walter JH. The molecular basis of cystathionine β - synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria. *Human Mutation* 2004; 23 (2): 6.
73. Kraus JP, Janosik MJ, Kozich V, Mandell R, Shih V, et al. Cystathionine β - synthase mutations in homocystinuria. *Human Mutation* 1999; 13 (5): 362- 75.
74. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and lupus anticoagulant. *BMJ* 1983;287:1088- 9.
75. Bick RL, Baker WF. Antiphospholipid syndrome and thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 1999; 25(3): 333- 350.
76. Rand JH. The pathogenic role of annexin- V in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2000; 2(3): 246- 51.
77. Mackworth- Young C. Antiphospholipid antibodies: more than just a disease marker? *Immunology Today* 1990; 11
78. Asherson RA, Khamashta M, Ordi- Jos J, Derksen RHW, Machin SJ, Path F, Barquinero J, Outt HH, Harris E, Phil M, Vilardell- Torres M, Hughes GRV. The "Primary" Antiphospholipid Syndrome: Major Clinical and Serological Features. *Medicine* 1989; 68 (6): 366- 74.
79. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, BoumaBN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81(10): 2618- 25.
80. Martinuzzo ME, Maclouf J, Carreras LO, Lévy- Toledano S. Antiphospholipid antibodies enhance thrombin- induced platelet activation and thromboxane formation. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 667- 71.
81. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. (Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Selingson U.) *Williams' Hematology.* 6th ed. New York: McGraw- Hill; 2000: 1715-1733.
82. Farmer- Boatwright MK, Roubey RAS. Venous thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 321- 25.
83. Wahl DG, Guillemin F, de Maistre E, Perret-Guillaume C, Lecompte T, Thibaut G. Meta- analysis of the risk of venous thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies without underlying autoimmune disease or previous thrombosis. *Lupus* 1998; 7: 15– 22.
84. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and infections. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 388- 93.
85. Acevedo M; Tagle R, Simpfendorfer C. Non- traditional risk factor for atherosclerosis. *Rev. méd. Chile.* 2001; 129: 1212-1221
86. Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Bertina RM. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001; 21: 731- 738.
87. van Hylckama VA, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95: 3678- 3682.
88. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2000; 342: 696- 701.
89. www.phschool.com [Internet]. [citirano 28. januara 2011] Dostupno na http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cardio2/venousreturn.html
90. Seifter J, Sloane D, Ratner A. Concepts in medical physiology. Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown 2005; 142- 187.
91. www.cram.com [Internet]. [citirano 29. januara 2011] Dostupno na <http://www.cram.com/flashcards/organization-of-the-heart-and-circulation-3369118>
92. Dimić S, Petrović D, Dimić I, Vučinić B, Janković R. CEAP klasifikacija hronične venske insuficijencije. *Praxis Medica* 2008; 36: 77- 81.
93. Bergan JJ. The vein book. Academic Press, Maryland Heights 2007; 22- 504.
94. Rushmer RF. Cardiovascular dynamics. W. B. Saunders Company, Philadelphia 1976; 28- 238.
95. Corley GJ, Broderick BJ, Nestor SM, Breen PP, Grace PA, Quondamatteo F and O'laighin G. The anatomy and physiology of the venous footpump. *The Anatomical Record* 2010; 293: 370- 378.
96. Klabunde RE. Cardiovascular physiology concepts. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2011; 110- 137.

97. Guyton AC. Textbook of medical physiology. W. B. Saunders Company, Philadelphia 1986; 238.
98. Izzo R, Cipolletta E, Ciccarelli M, Campanille A, Santulli G, Palumbo G, Vasta A. Enhanced GRK2 expression and desensitisation of β AR vasodilatation in hypertensive patients. *Clinical and translational science* 2008; 1(3): 215- 220.
99. www.doereport.com [Internet]. [citirano 19. februaru 2011] Dostupno na <http://www.doereport.com/generateexhibit.php?ID=14220&ExhibitKeywordsRaw=&TL=&A=>
100. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 3(1): 1- 15.
101. Callow ID, Campisi P, Lambert LM, Feng Q, Arnold JMO. Enhanced in vivo 1- and 2-adrenoceptor-mediated venoconstriction with indomethacin in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1998; 275: H837– 43.
102. Rohilla N. AIIMS PG entrance examination. Reed Elsevier India Private Limited, Noida 2008; 13
103. jb004.k12.sd.us [Internet]. [citirano 28. februaru 2011] Dostupno na <https://jb004.k12.sd.us/my%20website%20info/human%20anatomy/chapter%2018/DIAGRAM%20PAGE/arm%20veins.htm>
104. Burton DA, Stokes K, Hall GM. Physiological effects of exercise. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain.* 2004; 4(6): 185- 8.
105. Caggiati A, Bergan JJ, Gloviczki P, Jantet G, Wendell- Smith CP, Partsch H. Nomenclature of the veins of the lower limbs: An international interdisciplinary consensus statement. *J Vasc Surg.* 2002; 36: 416- 22.
106. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Color atlas and textbook of human anatomy, vol. 2. Internal organs. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 1993; 76.
107. Schmid- Schoenbein GW. Triggering mechanisms of venous valve incompetence. *Medicographia* 2008; 30(2): 121- 6.
108. Ono T, Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Takase S. Monocyte infiltration into venous valves. *Journal of vascular surgery* 1998; 27: 158- 66.
109. Pramanik D. Principles of physiology. B. K. Dhur of academic publishers, Kolkata 2007; 199
110. Elgazzar AH. The pathophysiologic basis of nuclear medicine. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg 2006; 309.
111. Maksimović ZV. Ulcus venosum cruris - etiopathogenesis, clinical features and surgical treatment. *Srp Arh Celok Lek.* 2008; 136(2): 97– 108.
112. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *The American Journal of Surgery* 2004; 187: S65- 70.
113. Karatepe O, Unal O, Orcun L, Ugurlucan M, Kemik A, Karahan S, Aksoy M, Kurtoglu M. The impact of valvular oxidative stress on the development of venous stasis ulcer valvular oxidative stress and venous ulcers. *Angiology* 2010; 61(3): 283- 288.
114. Joffe HV, Goldhaber SZ. Upper- extremity deep vein thrombosis. *Circulation* 2002; 106: 1874- 80.
115. Girolami A, Prandoni P, Zanon E, Bagatella P, Girolami B. Venous thromboses of upper limbs are more frequently associated with occult cancer as compared with those of lower limbs. *Blood Coag Fibrinol.* 1999; 10: 455–7.
116. Zell L, Kindermann W, Marschall F, Scheffler P, Gross J, Buchter A. Paget-Schroetter syndrome in sports activities: case study and literature review. *Angiology* 2001; 52: 337– 342.
117. Davidović LB, Kostić DM, Jakovljević NS, Kuzmanović IL, Simić TM. Vascular thoracic outlet syndrome. *World J Surg.* 2003; 27(5): 545- 50.
118. Kumar DR, Hanlin E, Glurich I, Mazza JJ, Yale SH. Virchow contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology. *Clin Med Res.* 2010; 8(3-4): 168- 172.
119. Frederick A. Anderson, Jr. and Frederick A. Spencer. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107: 9- 16.
120. Singh P, Peterson TE, Barber KR, Kuniyoshi FS, Jensen A, Hoffmann M, et al. Leptin upregulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2010; 392(1): 47–52.
121. Macfelda K, Weiss TW, Kaun C. Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β and oncostatin M in human cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002; 34(12): 1681– 91.
122. Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Schattauer Verlagsgesellschaft mbH* 1997; 78(1): 1- 6.
123. Allman-Farinelli MA. Obesity and venous thrombosis: a review. *Semin Thromb Hemost.* 2011; 37: 903– 907.

124. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis disease in young women. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 112– 23.
125. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJM. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol.* 2008; 83: 97–102.
126. Gibbs NM. Venous thrombosis of the lower limbs with particular reference to bedrest. *Br J Surg.* 1957; 45: 209– 236.
127. Warlow C, Ogston D, Douglas AS. Venous thrombosis following strokes. *Lancet.* 1972; 1:1305– 1306.
128. Anderson FAJ, Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107: 9- 16.
129. Schroder WA, Major L, Suhrbier A. The role of serpin B2 in immunity. *Crit Rev Immunol.* 2011; 31(1): 15- 30.
130. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004; 114(5-6): 409- 14.
131. Smeeth L, Cook C, Thomas S, Hall AJ, Hubbard R, Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet* 2006; 367: 1075– 79.
132. Milić D, Živić S, Pejić M, Stojiljković D, Karanikolić A, Mihajlović D, Ignjatović N, Zlatić A, Višnjić A. D- dimer u ranom otkrivanju tromboze dubokih vena donjih ekstremiteta. *Acta chirurgica iugoslavica* 2003; 50: 100- 102.
133. Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population- based cohort study. *Arch Intern Med.* 2000; 160(6): 761-8.
134. Browse N, Burnard L, Thomas LM. Disease of the veins. Pathology, diagnosis and treatment. Edward Arnold, London, 1988; 603- 625.
135. Gillet JL. Duplex ultrasonography protocol for investigation of patients presenting with recurrent varicose veins after surgery. *Phlebology* 2009; 16: 295.
136. Agnelli G, Prandoni P, Santamaria MG, Bagatella P, Iorio A, Bazzan M, et al. Three months versus one year of oral anticoagulant therapy for idiopathic deep venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001; 345: 165-9.
137. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801- 6.
138. Elezović I. FV Leiden, FII G 20210 A i MTHFR C 677 T mutacije u venskom tromboembolizmu. Materijal sa edukacionog kursa. Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu 2012. 25- 37.
139. Maksimović Z, Milić D, Davidović L, Radak Đ, Činara I, Vasić D, Dunić I, Zoranović U, Matić M, Novaković B. Akutna i hronična oboljenja vena [Internet]. [citirano 18. marta 2014] Dostupno na <http://www.zdravlje.gov.rs/>
140. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G, Pancani C, Coccheri S. Risk of venous thromboembolism recurrence: high negative predictive value of D- dimer performed after oral anticoagulation is stopped. *Thrombosis and haemostasis* 2002; 87(1): 7-12.
141. Hansson P, Sörbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med.* 2000; 160(6): 769- 74.
142. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol.* 2012; 87 (1) S63- 7.
143. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1222– 31.
144. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2006; 166: 729– 36.
145. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med.* 1995; 332: 993–7.
146. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; 86: 3685- 91.
147. Ромац С, Вукосавић С, Стојковић О, Чуљковић Б. PCR у клиничкој дијагностици. Биолошки факултет, Београд 1999; 108.
148. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in medicine.* Saunders Elsevier, Philadelphia 2007; 116.
149. Shukla AN. *Genetic Material And Analysis 1,* New Delhi, Discovery Publishing House, 2009; 204.
150. Hartl DL, Ruvolo M. *Genetics: analysis of genes and genomes.* Jones& Bartlett Learning Burlington 2012; 105.

151. Walsh BS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex® - 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10: 506- 13.
152. Roach JC, Glusman G, Smit AF, Huff CD, Hubley R, Shannon PT et al. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole- genome sequencing. *Science* 2010; 328: 636– 9.
153. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: A study of 150 families. *Blood* 1998; 92: 2353- 8.
154. Shin HS, Park JK. Laterality of deep vein thrombosis in the pelvic and lower extremity veins. *Vasc Spec Int.* 2014; 30(2): 56- 61.
155. Girard P , Musset D, Parent F, Maitre S, Phlippoteau C, Simonneau G. High prevalence of detectable deep venous thrombosis in patients with acute pulmonary embolism. *Chest* 1999; 116: 903– 8.
156. Kerr TM, Lutter KS, Moeller DM, Hasselfeld AK, Roedersheimer RL, McKenna PJ, et al. Upper extremity venous thrombosis diagnosed by duplex scanning. *The American Journal of Surgery* 1990; 160: 202- 6.
157. Kim HJ, Seo JY, Lee KO, Bang SH, Lee ST, Ki CS, Kim JW, Jung CW, Kim DK, Kim SH. Distinct frequencies and mutation spectrums of genetic thrombophilia in Korea in comparison with other Asian countries both in patients with thromboembolism and in the general population. *Haematologica* 2014; 99(3): 561- 9.
158. Johansson M, Johansson L, Lind M. Incidence of venous thromboembolism in northern Sweden (VEINS): a population- based study. *Thrombosis Journal* 2014;12: 6.
159. Isma N, Svensson PJ, Gottsäter A, Lindblad B. Prospective analysis of risk factors and distribution of venous thromboembolism in the population-based Malmö Thrombophilia Study (MATS). *Thrombosis Research* 2009; 124 (6): 663-6.
160. al Zahrani H, Gart M, Sejent S. Pattern of deep venous thrombosis in Jeddah area, Western Saudi Arabia. *Path Int Angiol.* 1993; 12: 54-8.
161. Spencer FA, Emery C, Lessard D, Goldberg RJ. Upper extremity deep vein thrombosis: A community-based perspective. *Am J Med.* 2007; 120(8): 678– 84.
162. Chen F, Xiong JX, Zhou WM. Differences in limb, age and sex of Chinese deep vein thrombosis patients. *Phlebology* 2014; 29 (2): 76 – 139.
163. Tongyoo A, Paocharoen V. The risk factors of deep vein thrombosis in Thammasat. *University Hospital Thammasat Medical Journal* 2010; 10 (3): 252- 62.
164. Barrellier MT, Lezin B, Landy S, Le Hello C. Prevalence of duplex ultrasonography detectable venous thrombosis in patients with suspected or acute pulmonary embolism. *J Mal Vasc.* 2001; 26(1): 23- 30.
165. Roseann Andreou E, Koru- Sengul T, Linkins L, Bates SM, Ginsberg JS. Differences in clinical presentation of deep vein thrombosis in men and women. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1713– 9.
166. Chan WS, Spencer FA, Ginsbergm JS. Anatomic distribution of deep vein thrombosis in pregnancy. *Canadian medical association journal* 2010; 182(7): 657– 60.
167. McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, Carty MJ, Greer IA. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 1183– 8.
168. Blanco-Molina A, Trujillo-Santos J, Criado J, Lopez L, Lecumberri R, Gutierrez R, Monreal M. Venous thromboembolism during pregnancy or post-partum: findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 186– 90.
169. Gherman RB, Goodwin TM, Leung B, Byrne JD, Hethumumi R, Montoro M. Incidence, clinical characteristics, and timing of objectively diagnosed venous thromboembolism during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1999; 94: 730– 4.
170. Martinelli I, Battaglioli T, Mannuccio Mannucci P. Pregnancy and thrombosis. In: Arnout J, Hoylaerts M, DeGaetano G. *Thrombosis: fundamental and clinical aspects.* Leuven University Press, Leuven 2003; p.461- 75.
171. Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85(10): 2756- 61.
172. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008; 14: 1229– 39.
173. Soare AM, Popa C. Deficiencies of proteins C, S and antithrombin and factor V Leiden and the risk of ischemic strokes. *J Med Life* 2010; 3(3): 235- 8.
174. Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T. Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26(1): 11- 6.
175. Rossi E, Za T, Ciminello A, Leone G, De SV. The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of inherited thrombophilia. *Thromb Haemost.* 2008; 99(6): 1030– 4.

176. Christiansen SC, Lijfering WM, Naess IA, Hammerstrøm J, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Cannegieter SC. The relationship between body mass index, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(9): 1761- 7.
177. Martinelli I, Battaglioli T, Razzari C, Mannucci PM. Type and location of venous thromboembolism in patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and in those with no thrombophilia. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(1): 98-101.
178. Manten B, Westendorp RG, Koster T, Reitsma PH, Rosendaal FR. Risk factor profiles in patients with different clinical manifestations of venous thromboembolism: a focus on the factor V Leiden mutation. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 76(4): 510- 3.
179. Björgell O, Nilsson PE, Nilsson JA, Svensson PJ. Location and extent of deep vein thrombosis in patients with and without FV: R 506Q mutation. *Thromb Haemost.* 2000; 83(5): 648- 51.
180. Elassal G, Hamed H, Elgamel R. Study of some genetic predisposition in pulmonary embolism. *Egyptian journal of chest diseases and tuberculosis* 2014; 63(4): 1039- 104.
181. Đorđević V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, Savic A. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic serbian populations. *Acta Haematol.* 2004; 112: 227– 9.
182. Svensson PJ, Zoller B, Mattiasson I, Dahlback B. The factor VR506Q mutation causing APC resistance is highly prevalent amongst unselected outpatients with clinically suspected deep venous thrombosis. *J Intern Med.* 1997; 241: 379- 85.
183. Takamiya O, Ishida F, Kodaira H, Kitano K. APC-resistance and Mnl I genotype (Gln 506) of coagulation factor V are rare in Japanese population. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 996.
184. Jun ZJ, Ping T, Lei Y, Li L, Ming SY, Jing W. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Chinese patients with deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Clinical & Laboratory Haematology* 2006; 28 (2): 111– 6.
185. Bauduer F, Lacombe D. Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T, and population genetics. *Mol Genet Metab.* 2005; 86(1-2): 91- 9.
186. Nizankowska-Mogilnicka E, Adamek L, Grzanka P, Domagala TB, Sanak M, Krzanowski M, Szczeklik A. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Eur Respir J.* 2003; 21: 25– 30.
187. Francès F, Portolès O, Gabriel F, Corella D, Sorlí JV, Sabater A, et al. Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina- G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española. *Rev méd Chile.* 2006; 134(1): 13- 20.
188. Palomo I, Pereira J, Alarcón M, Pinochet C, Vélez T, Hidalgo P, et al. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Rev méd Chile.* 2005; 133 (12): 1425- 43.
189. Pai N, Shetty S, Kulkarni B, Ghosh K. Differences in etiological and clinical manifestations in upper extremity and lower limb deep venous thrombosis patients from India. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010; 16(6): 698- 700.
190. Schröder W, Konrad H, Grimm R, Schuster G, Herrmann FH. Factor V variants- FV Leiden, FV R2 polymorphism (ex 13), FV Ddel polymorphism (int 16) - risk factors for venous thrombosis? Results of a pilot study. 30th Hemophilia Symposium Hamburg 1999. 2001; 9: 261- 5.
191. Ehrenforth S, Klinker S, von Depka Prondzinski M, Kreuz W, Ganser A, Scharer I. Activated protein C resistance and venous thrombophilia: molecular genetic prevalence study in the German population. *Dtsch med Wochenschr* 1999; 124(25/26): 783- 7.
192. Simkova M, Batorova A, Dostalova K, Pozgayova S, Simko F, Kovacs L. Factor V Leiden in patients with venous thrombosis in slovak population. *Gen physiol biophys.* 2004; 23: 435- 42.
193. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, Vucicevic Z, Topic E. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochemia Medica* 2010; 20(2): 229-35.
194. Arsov T, Miladinova D, Spiroski M. Factor V Leiden is associated with higher risk of deep venous thrombosis of large blood vessels. *Croat Med J.* 2006; 47(3): 433– 9.
195. Bouaziz- Borgi L, Almawi WY, Mtiraoui N, Nsiri B, Keleshian SH, Kreidy R, Louzir B, Hezard N, Mahjoub T. Distinct association of factor V- Leiden and prothrombin G20210A mutations with deep venous thrombosis in Tunisia and Lebanon. *Am J Hematol.* 2006; 81: 641– 3.
196. Herrmann FH, Koesling M, Schoeder W, Altman R, Jiménez Bonilla R, Lopaciuk S, Perez- Requejo JL, Singh JR. Prevalence of Factor V Leiden variant in various populations. *Genet Epidemiol.* 1997; 14: 403– 11.

197. Braun A, Müller B, Rosche A. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Hum Genet.* 1996; 97(2): 263- 4.
198. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Aryuchai K, Busabaratana M, Sura T, Atichartakarn V, et al. Prevalence of the G1691A mutation in the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the Thai population. *Am J Hematol.* 2000; 65(2): 119- 22.
199. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277(16): 1305- 7.
200. Adler G, Clark JS, Loniewska B, Czarska E, Salkic NN, Ciechanowicz A. Prevalence of 1691G>A FV mutation in Poland compared with that in other Central, Eastern and South- Eastern European countries. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012; 12(2): 82– 7.
201. Schwender S, Großmann R, Keller F. High prevalence of factor V Leiden mutation is detected in a north to south axis through Germany. *Laboratoriums Medizin* 1997; 21 (6): 347.
202. Bôžiková A1, Gabriková D, Sovičová A, Behulová R, Mačeková S, Boroňová I, Petrejčiková E, Soták M, Bernasovská J, Bernasovský I. The frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Slovak and Roma (Gypsy) ethnic group of Eastern Slovakia. *J Thromb Thrombolysis.* 2012; 34(3): 406- 9.
203. Palomo I, Segovia F, Parra D, Alarcón M, Rojas E. Low prevalence of Factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in a healthy population from the central- south region of Chile. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(3): 144- 146.
204. Akar N. Factor V 1691 G-A mutation distribution in a healthy Turkish population. *Turk J Hematol* 2009; 26: 9- 11.
205. Irani- Hakime N, Tamim H, Elias G, Finan R, Daccache J, Almawi W. High prevalence of factor V mutation (Leiden) in the eastern Mediterranean. *Clinical Chemistry* 2000; 46 (1): 134- 136.
206. Irani-Hakime N, Tamim H, Kreidy R, Almawi WY. The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese. *Am J Hematol.* 2000; 65: 45– 9.
207. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27: 362– 7.
208. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'- end formation. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(1): 119-27.
209. Jadaon MM. Epidemiology of prothrombin G20210A mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011; 3(1): e2011054.
210. Đorđević V, Pruner I, Rakičević L, Kovač M, Miković D, Miljić P, Radojković D, et al. FV Leiden, FII G20210A and MTHFR C677T mutations in patients with lower or upper limb deep vein thrombosis. *Genetika* 2011; 43.2: 371- 80.
211. Margaglione M, Brancaccio V, De Lucia D, Martinelli I, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest* 2000; 118: 1405- 11.
212. Bykowska K, Vertun-Baranowska B, Windyga J, Łopaciuk S. Prevalence of G20210A prothrombin gene mutation in Poland. *Pol Arch Med Wewn.* 2000; 104: 729– 33.
213. Hotoleanu C, Popp R, Trifa A. Factor V Leiden, prothrombin G20210A and MTHFR C677T mutations in Romanian patients with deep venous thrombosis. *HVM Bioflux* 2014; 6(1): 15- 9.
214. Petäjä J, Hiltunen L, Fellman V. Increased risk of intraventricular hemorrhage in preterm infants with thrombophilia. *Pediatr Res.* 2001; 49: 643– 6.
215. Reuner KH, Ruf A, Grau A, Rickmann H, Stolz E, Jüttler E, Druschky KF, Patscheke H. Prothrombin gene G20210→A transition is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1998; 29: 1765- 9.
216. Herrman W. Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab Med.* 2006; 52: 367– 74.
217. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70 (5): 904- 91.
218. Carmel R, Mallidi PV, Vinarskiy S, Brar S, Frouhar Z. Hyperhomocysteinemia and cobalamin deficiency in young Asian Indians in the United States. *Am J Hematol.* 2002; 70: 107– 14.
219. Almawi WY, Tamim H, Raghid Kreidy R, Timson G, Rahal E, Nabulsi M, Finan RR, Irani-Hakime N. A case control study on the contribution of factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2005; 19(3): 190- 6.
220. Palko- Łabuz A, Sadakierska-Chudy A, Pilecki W. The genetic background of thrombosis– the distributions of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T polymorphisms. *Adv Clin Exp Med.* 2010; 19(1): 51– 5.

221. Gonzalez Ordonez AJ, Fernandez Alvarez CR, Rodriguez JM, Garcia EC, Alvarez MV. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and venous thromboembolism: a case-control study. *Haematologica* 1999; 84: 190- 1.
222. Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep- vein thrombosis in patients with mutant factor V (Factor V:Q506). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17: 1662- 6.
223. Zheng YZ, Tong J, Do XP, Pu XQ, Zhou BT. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. *British Journal of Haematology* 2000; 109 (4): 870- 4.
224. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Kostovska S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR- 677 and MTHFR- 12100) genetic polymorphisms with occlusive artery disease and deep venous thrombosis in Macedonians. *Croat Med J.* 2008; 49(1): 39- 49.
225. Grossmann R, Schwender S, Geisen U, Schambeck C, Merati G, Walter U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res.* 2002; 107: 13-5.
226. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Sura T, Aryuchai K, Busabaratana M, Atichartakarn V. Prevalence of the C677T methylenetetra- hydrofolate reductase mutation in Thai patients with deep vein thrombosis. *Acta Haematol.* 2000; 103(4): 191- 6.
227. Torres JD, Cardona H, Álvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda SA, Quintero-Rivera F, Cadavid A, Bedoya G, Tobón L. Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. *Am J Hematol.* 2006; 81: 933- 7.
228. Yafei W, Lijun P, Jinfeng W Xiaoying Z. Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? *Journal of Human Genetics* 2012; 1- 7.
229. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, Hamulyák K, Van Pampus ECM, Koopman MMW, Prins MH, Van Der Meer J, Büller HR. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3: 79- 84.
230. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briet E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 71(6): 719- 22.
231. Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene. *British Journal of Haematology* 1997; 98 (4): 907- 9.
232. Đorđević V, Rakićević Lj, Miljić P, Milojković D, Kovač M, Radojković D, Savić A. Impact of acquired and genetic factors on thrombophilic phenotype in FV Leiden mutation carriers. *Jugoslav Med Biochem* 2005; 24: 141- 6.
233. Cottone S, Mulè G, Nardi E, Vadalà A, Guarneri M, Briolotta C, Arsena R, Palermo A, Riccobene R, Cerasola G. Relation of C- reactive protein to oxidative stress and to endothelial activation in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2006; 19 (3): 313- 8.
234. Hunt BJ. Endothelial cell activation- a central pathophysiological process. *BMJ* 1998; 316(7144): 1328- 9.
235. Gasser JA, Betteridge DJ. 10 lipids and thrombosis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 4: 923- 8.
236. Nergiz- Unal R, Lamers MM, Van Kruchten R, Luiken JJ, Cosemans JM, Glatz JF, Kuijpers MJ, Heemskerk JW. Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low- density lipoprotein. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(9): 1835- 46.
237. Novaković I, Maksimović N, Cvetković D. Pharmacogenetics and the treatment of thrombophilia, pregnancy thrombophilia- The unsuspected risk. InTech 2013; [Internet]. [citirano 15. septembra 2014] Dostupno na [http://www.intechopen.com/books/pregnancy-thrombophilia-the-unsuspected-risk/ pharmacogenetics-and-the-treatment-of-thrombophilia](http://www.intechopen.com/books/pregnancy-thrombophilia-the-unsuspected-risk/pharmacogenetics-and-the-treatment-of-thrombophilia)
238. Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of natural anticoagulants, protein C, protein S, and antithrombin. *Circulation* 2011; 124: 365- 8.
239. Ridker PM, Goldhaber SZ, Danielson E, Rosenberg Y, Eby CS, Deitcher SR, et al. Long term, low-intensity warfarin therapy for the prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1425- 34.
240. Mitić G, Považan Lj, Lučić AM. Terapija venskog tromboembolizma tokom trudnoće. *Med Pregl.* 2009; 62 (7-8): 346- 51.
241. Pernoda G, Biron-Andreanib C, Morangec PE, Boehlend F, Constanse J, Couturaudf F, Drouetg L, Judeh B, Lecomptei T, Le Galj G, Trilloth N, Wahlk D. Recommendations on testing for thrombophilia in venous thromboembolic disease: a French consensus guideline. *Journal des maladies vasculaires* 2009; 34: 156- 203.

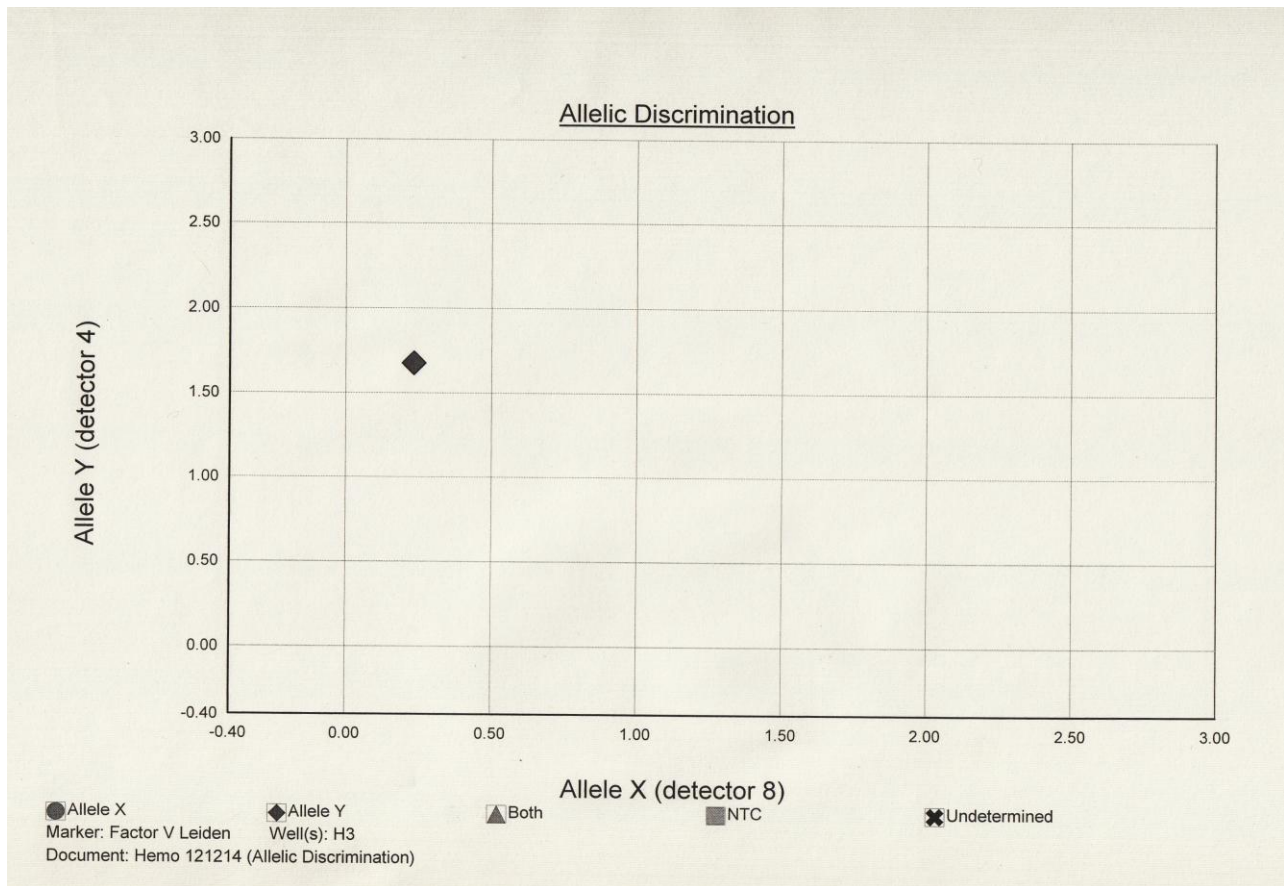
242. Straczek C, Oger E, Yon de Jonage-Canonico M, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G, et al. Prothrombotic mutations, hormone therapy, and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration. *Circulation* 2005; 112: 3495– 500.
243. Mošković T. Klasična hormonska supstitucionna terapija u menopauzi: indikacije i rizici. *Timočki medicinski glasnik* 2011; 36 (2): 103- 14.
244. Battaglioli T, Martinelli I. Hormone therapy and thromboembolic disease. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14: 488– 93.
245. Lissalde- Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E, Mercier E. Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case–control ‘NOHA first’ study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (10): 2178- 84.
246. Baglin T, Gray E, Greaves M, Hunt BJ, Keeling D, Machin S, Mackie I, Makris M, Nokes T, Perry D, Tait RC, Walker I, Watson H. Recommendations for laboratory practice are given toward the end of the document under the section on laboratory methodology and testing strategy. *Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia.* *British Journal of Haematology* 2010; 149: 209– 20.

8. Прилог

**Оригинални извештаји са апарата ABI PRISM 7000 Sequence
Detection System**

factor II	detector 1	FAM	(none)
factor II	detector 5	VIC	(none)
mthfr C 677 T	detector 2	FAM	(none)
mthfr C 677 T	detector 6	VIC	(none)
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM	(none)
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC	(none)
Factor V Leiden	detector 4	FAM	(none)
Factor V Leiden	detector 8	VIC	(none)

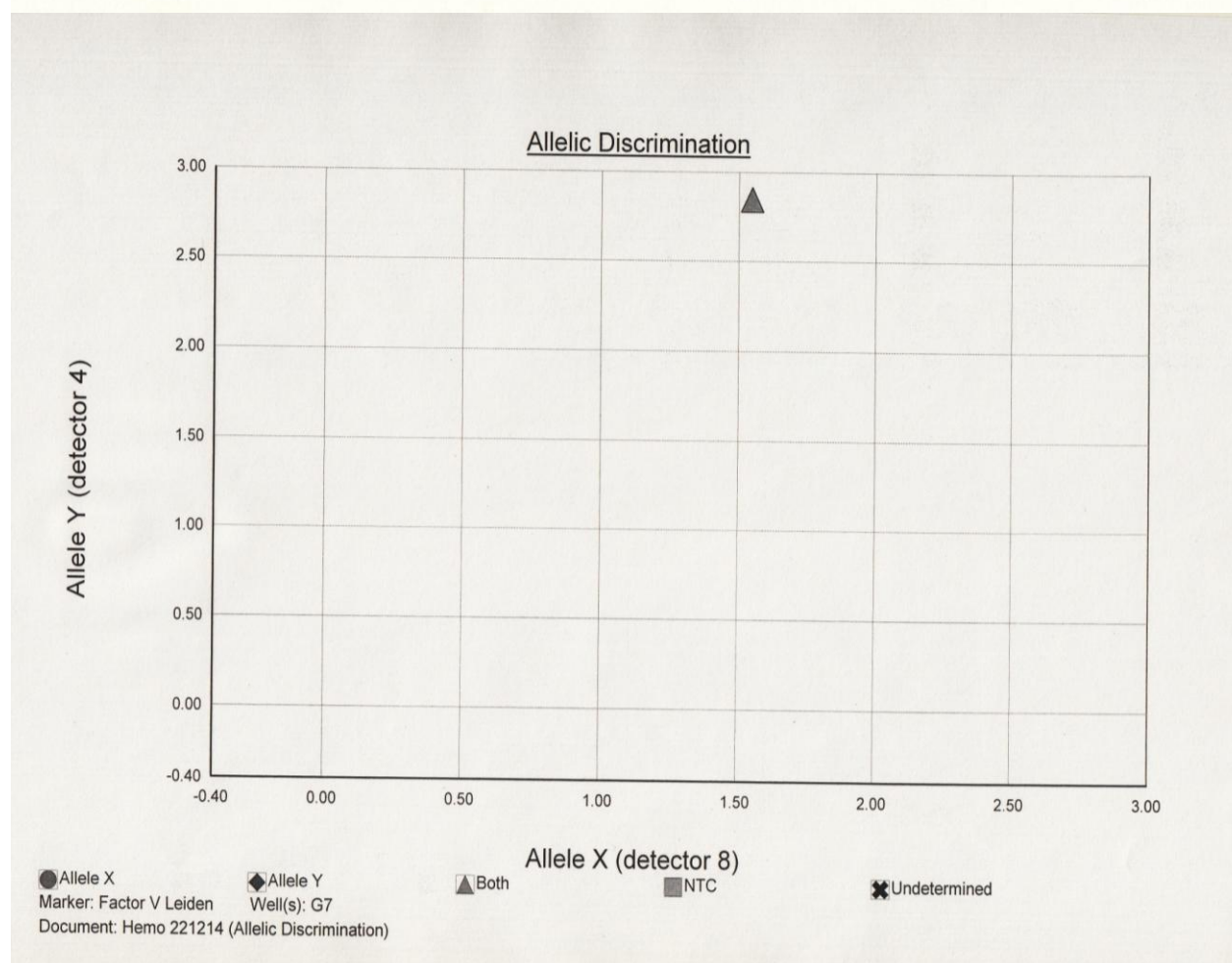
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
H3		Factor V Leiden	Unknown	-142.953	0.234	1.676	detector 4	100.00	Manual Call



Фотографија 1: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, FV Leiden хомозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mthfr C 677 T	detector 2	FAM
mthfr C 677 T	detector 6	VIC
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

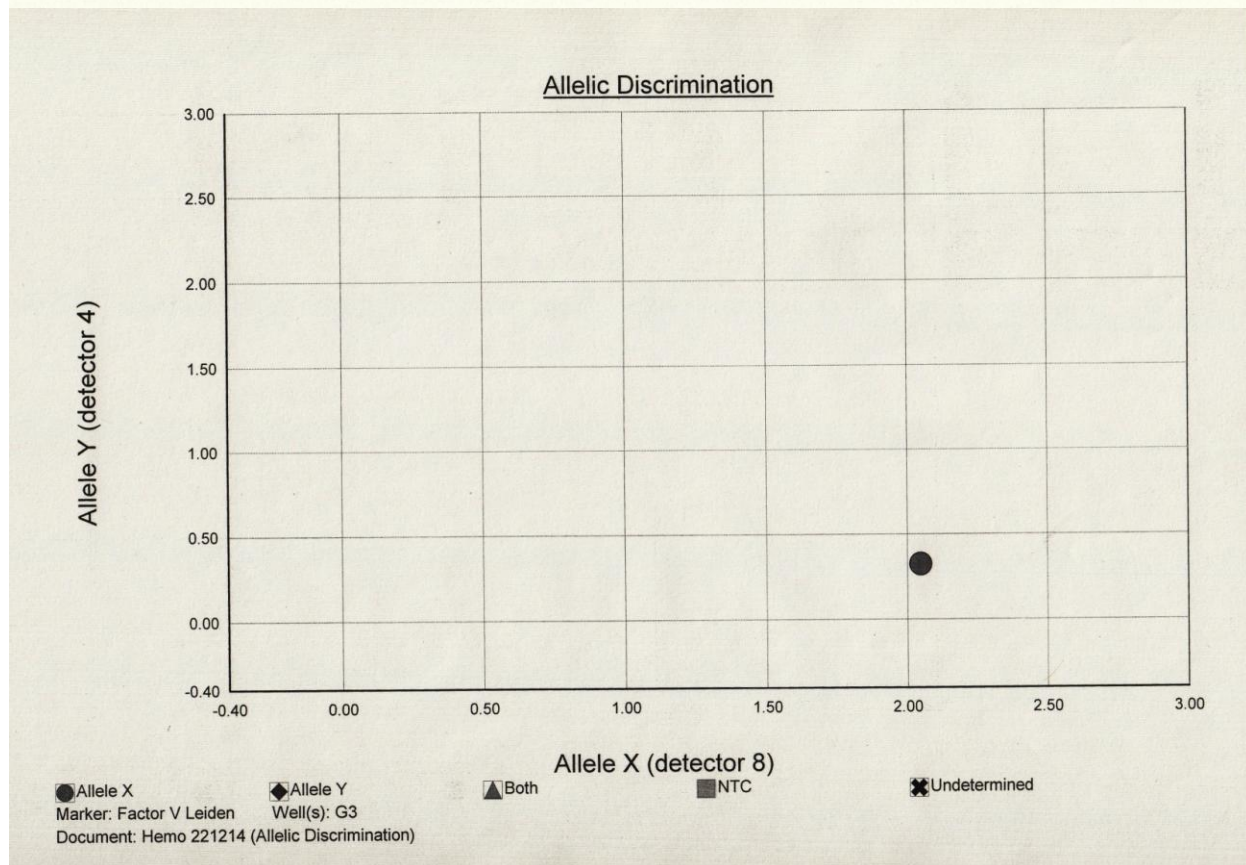
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
G7		Factor V Leiden	Unknown	-56.553	1.548	2.847	Both	100.00	Manual Call



Фотографија 2: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, FV Leiden хетерозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mthfr C 677 T	detector 2	FAM
mthfr C 677 T	detector 6	VIC
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

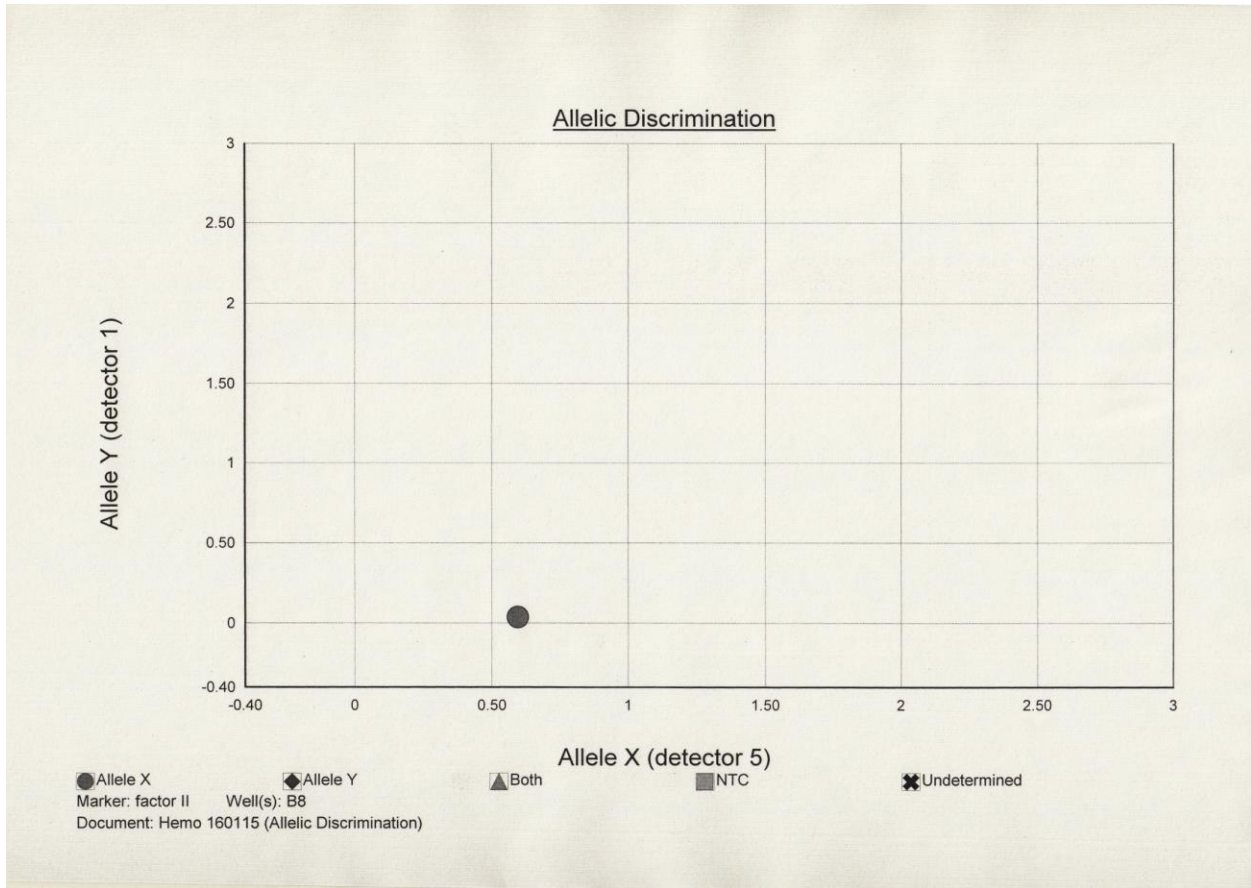
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
G3		Factor V Leiden	Unknown	34.228	2.047	0.325	detector 8	100.00	Manual Call



Фотографија 3: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, није носилац FV Leiden мутације

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
B8		factor II	Unknown	161.786	0.594	0.038	detector 5	100.00	Manual Call

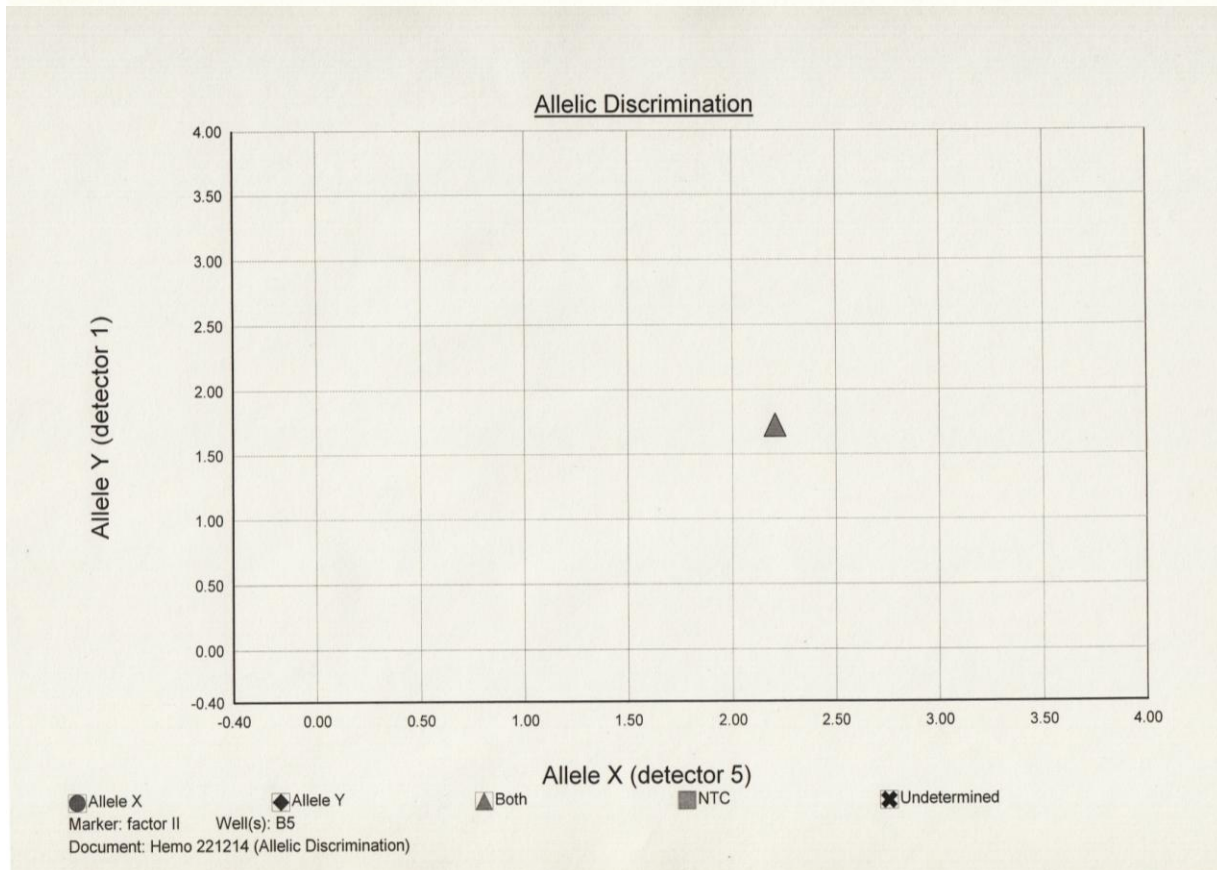
factor II	detector 1	FAM	(none)
factor II	detector 5	VIC	(none)
mthfr C 677 T	detector 2	FAM	(none)
mthfr C 677 T	detector 6	VIC	(none)
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM	(none)
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC	(none)
Factor V Leiden	detector 4	FAM	(none)
Factor V Leiden	detector 8	VIC	(none)



Фотографија 4: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, FII G 20210 A хомозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mthfr C 677 T	detector 2	FAM
mthfr C 677 T	detector 6	VIC
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

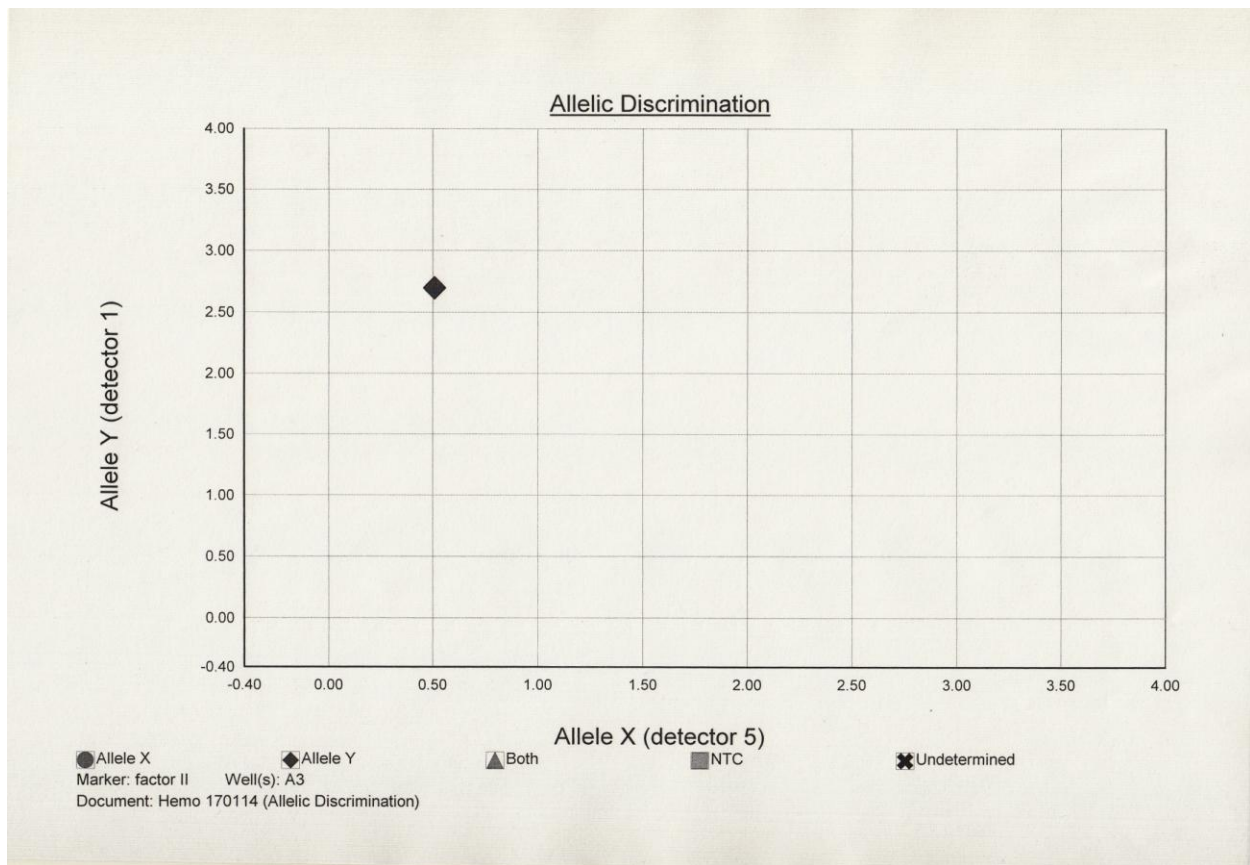
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
B5		factor II	Unknown	-95.953	2.205	1.727	Both	100.00	Manual Call



Фотографија 5: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, FII G 20210 A хетерозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM	(none)
factor II	detector 5	VIC	(none)
mtHfr C 677 T	detector 2	FAM	(none)
mtHfr C 677 T	detector 6	VIC	(none)
mtHfr A 1298 C	detector 3	FAM	(none)
mtHfr A 1298 C	detector 7	VIC	(none)
Factor V Leiden	detector 4	FAM	(none)
Factor V Leiden	detector 8	VIC	(none)

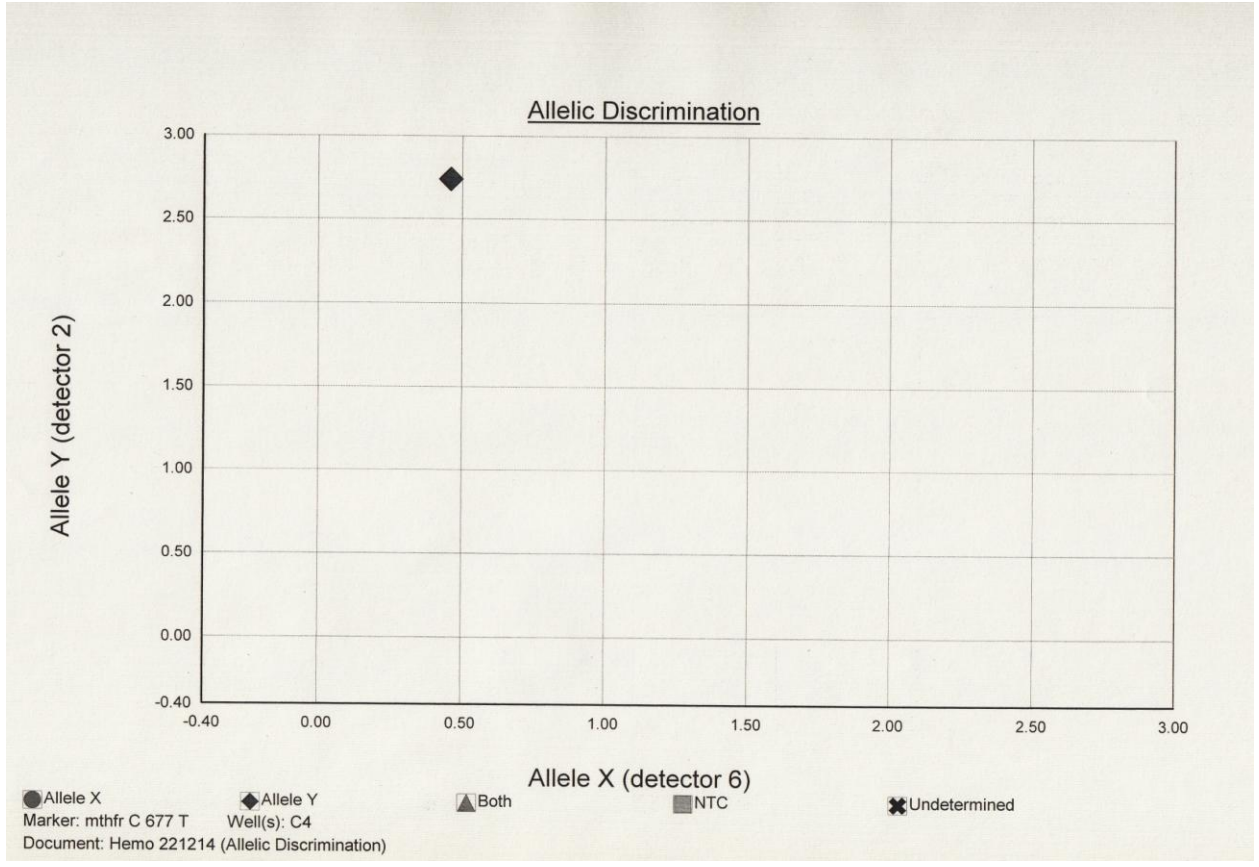
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
A3		factor II	Unknown	-26.216	0.508	2.697	detector 1	100.00	Manual Call



Фотографија 6: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, није носилац FII G 20210 A мутације

factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mthfr C 677 T	detector 2	FAM
mthfr C 677 T	detector 6	VIC
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

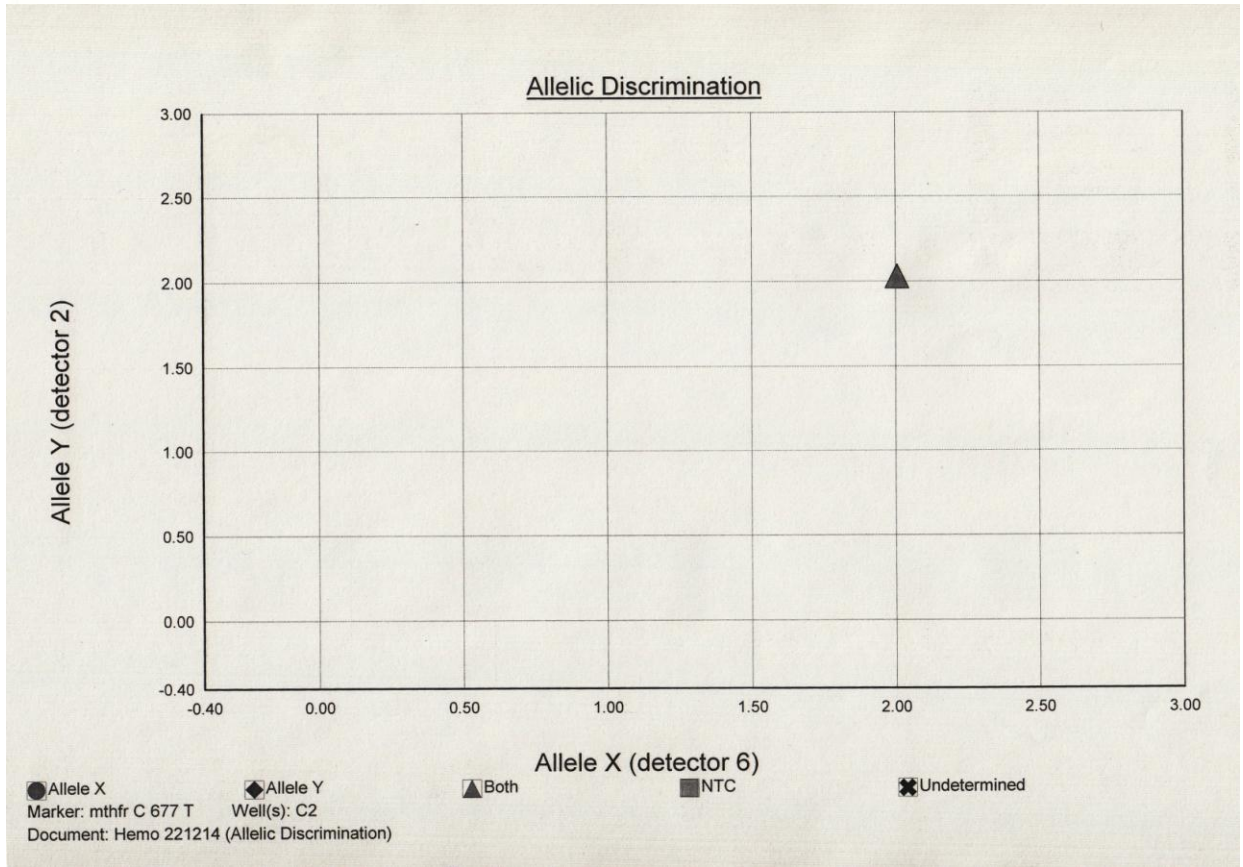
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
C4		mthfr C 677 T	Unknown	-193.999	0.460	2.739	detector 2	100.00	Manual Call



Фотографија 7: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, МТНFR С 677 Т хомозигот за мутирани алел

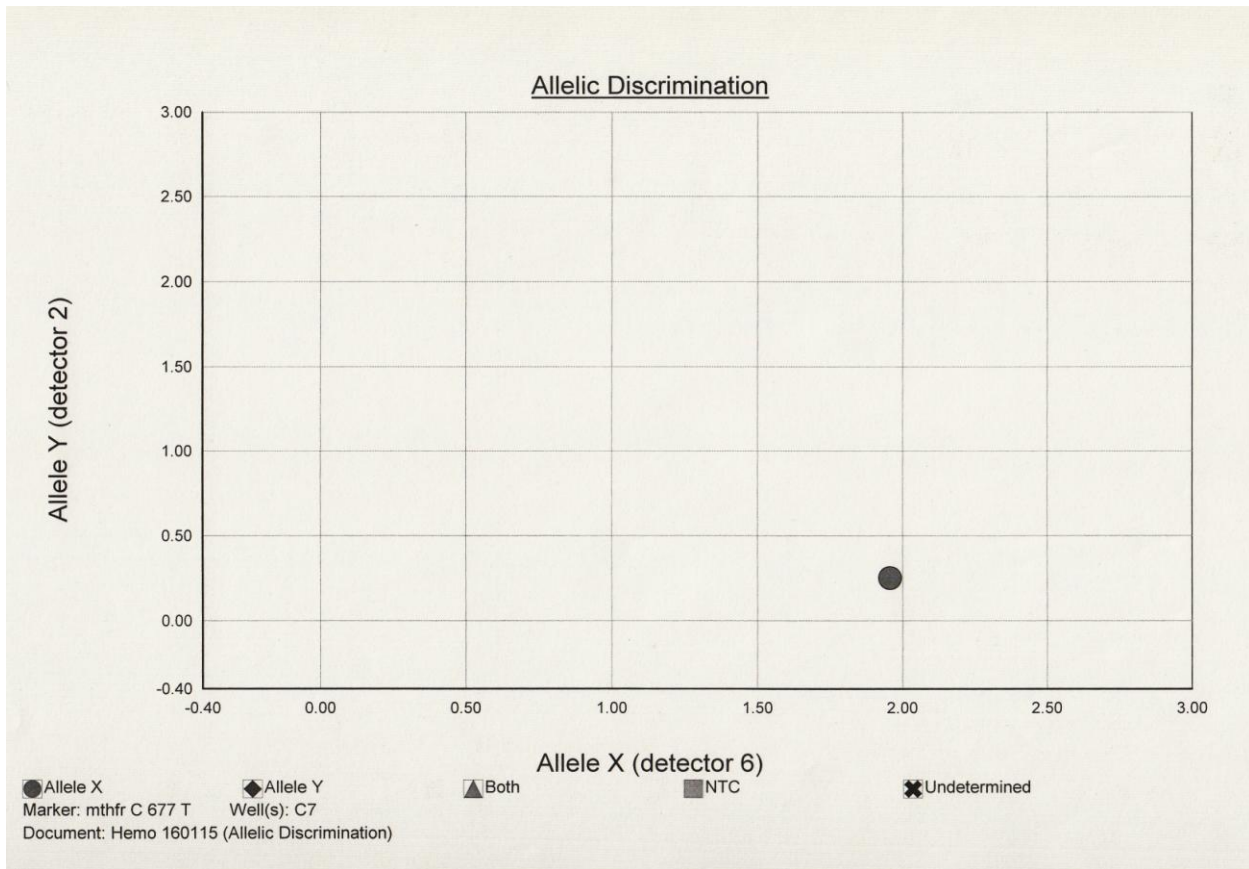
factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mtfr C 677 T	detector 2	FAM
mtfr C 677 T	detector 6	VIC
mtfr A 1298 C	detector 3	FAM
mtfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
C2		mtfr C 677 T	Unknown	-166.906	2.005	2.030	Both	100.00	Manual Call



Фотографија 8: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, MTHFR C 677 T хетерозигот за мутирани алел

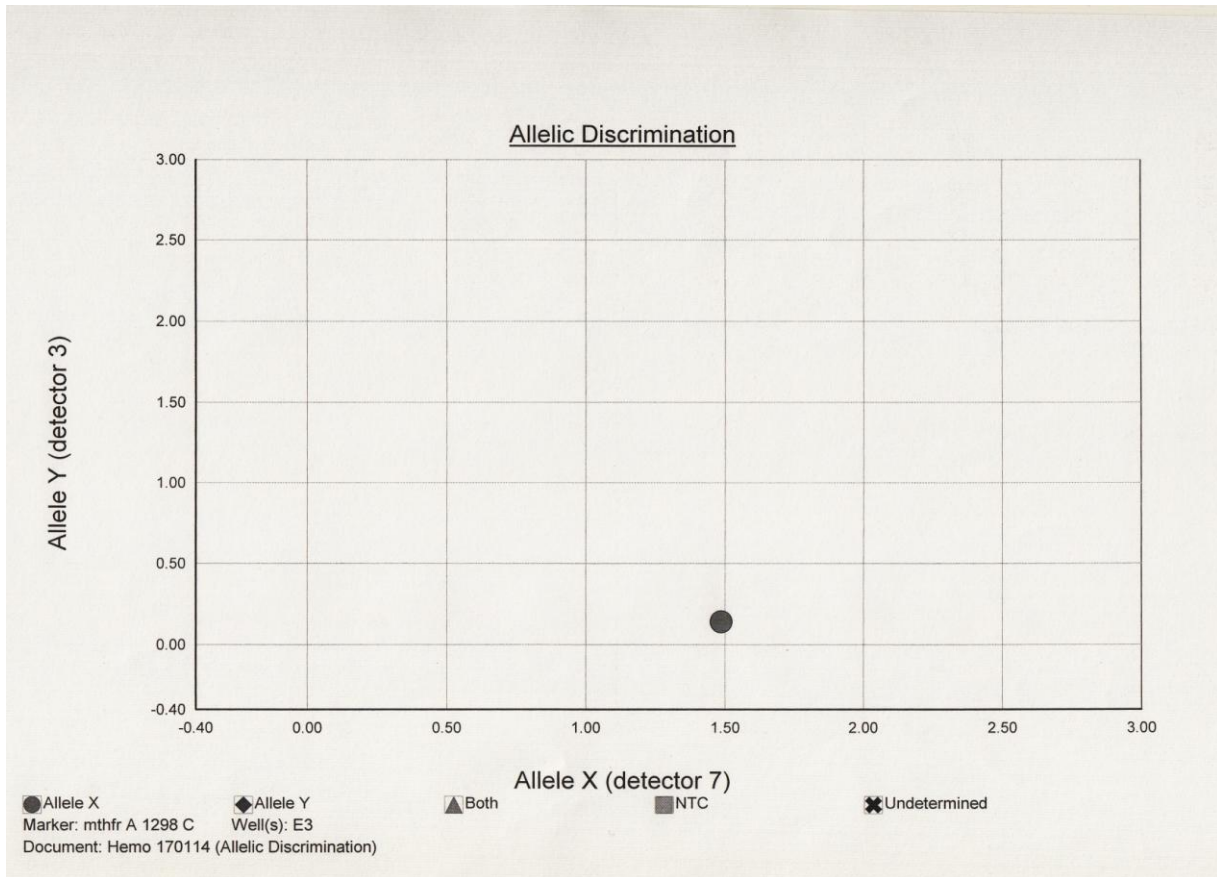
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
C7		mthfr C 677 T	Unknown	-277.422	1.956	0.252	detector 6	100.00	Manual Call



Фотографија 9: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, није носилац МТНФР С 677 Т мутације

factor II	detector 1	FAM	(none)
factor II	detector 5	VIC	(none)
mthfr C 677 T	detector 2	FAM	(none)
mthfr C 677 T	detector 6	VIC	(none)
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM	(none)
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC	(none)
Factor V Leiden	detector 4	FAM	(none)
Factor V Leiden	detector 8	VIC	(none)

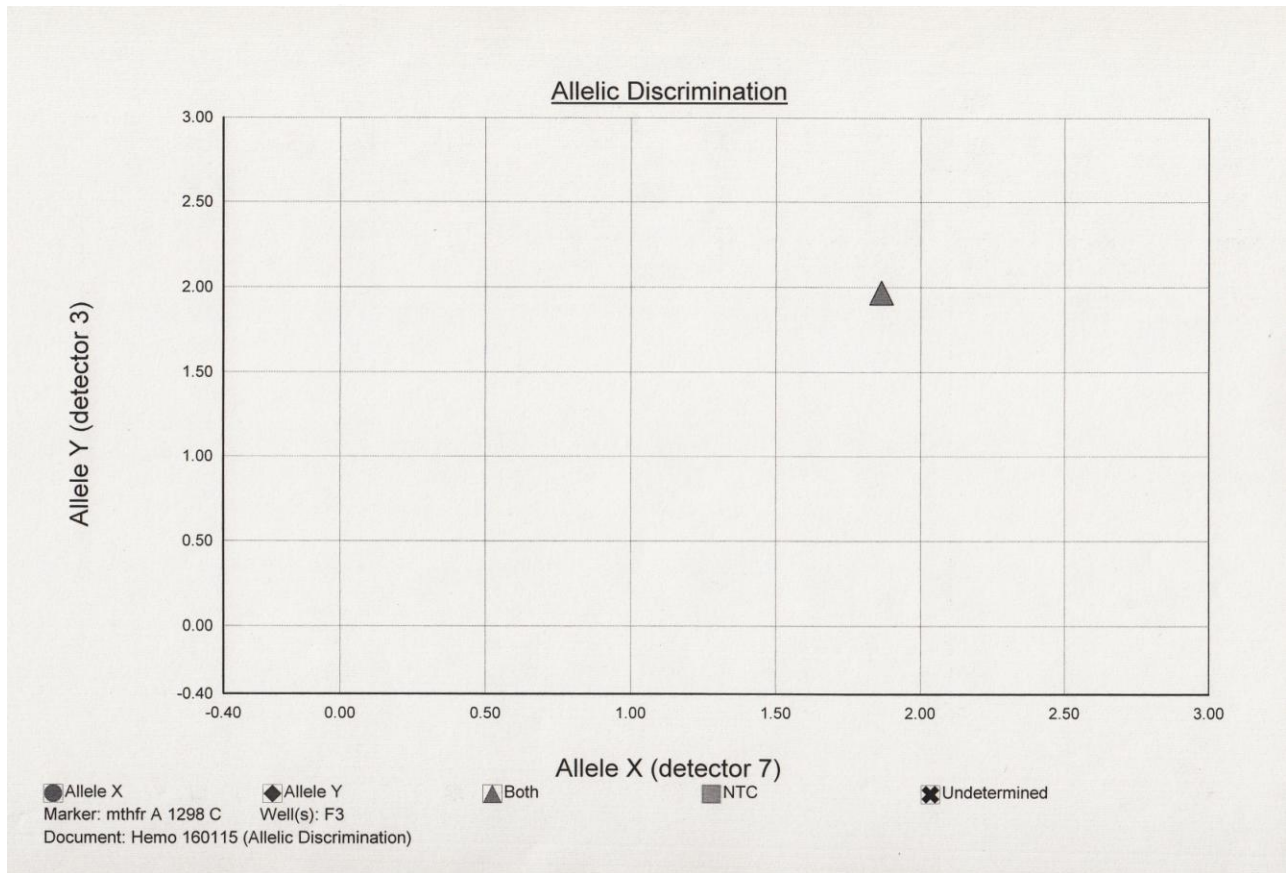
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
E3		mthfr A 1298 C	Unknown	-17.792	1.485	0.141	detector 7	100.00	Manual Call



Фотографија 10: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, MTHFR A 1298 C хомозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM	(none)
factor II	detector 5	VIC	(none)
mthfr C 677 T	detector 2	FAM	(none)
mthfr C 677 T	detector 6	VIC	(none)
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM	(none)
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC	(none)
Factor V Leiden	detector 4	FAM	(none)
Factor V Leiden	detector 8	VIC	(none)

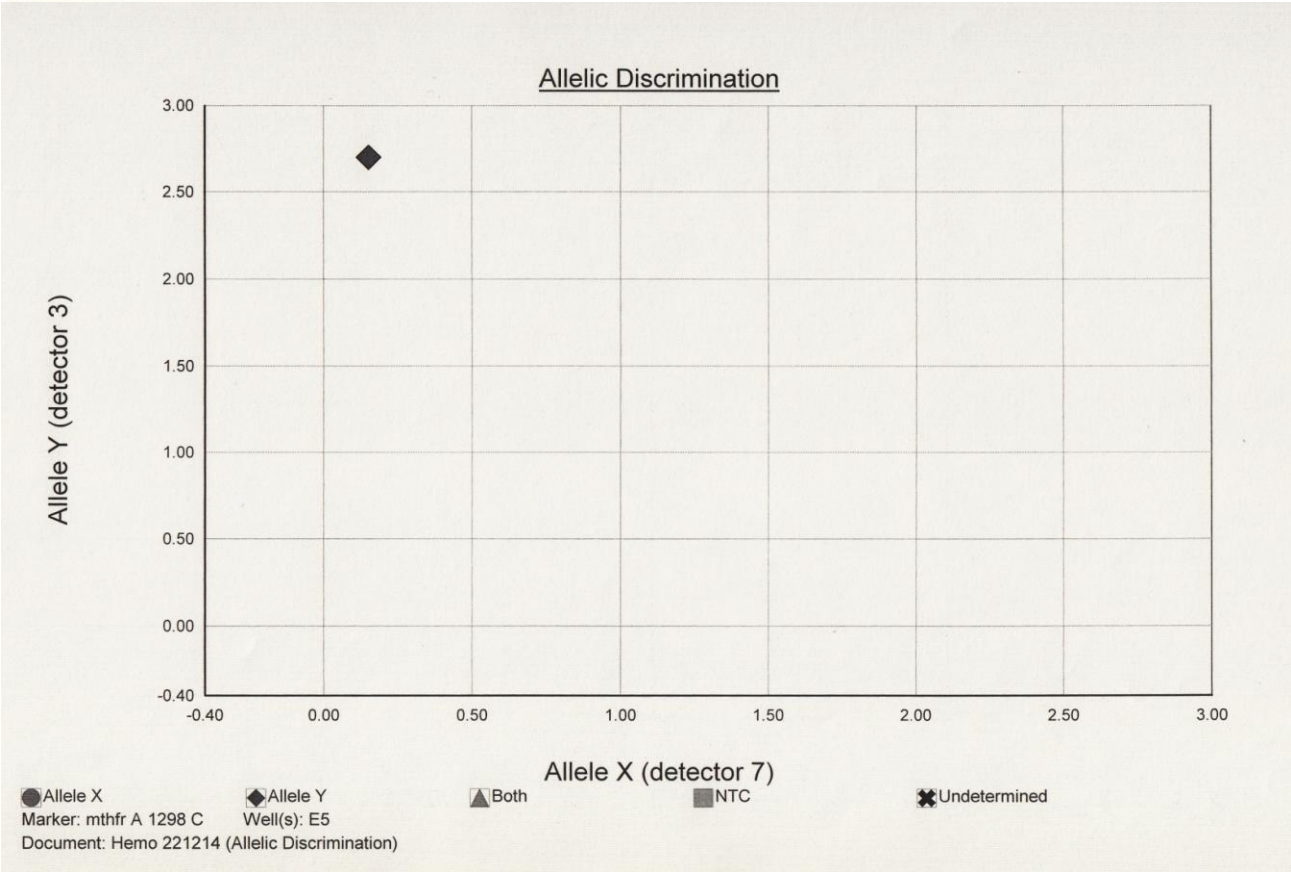
Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
F3		mthfr A 1298 C	Unknown	-131.108	1.864	1.968	Both	100.00	Manual Call



Фотографија 11: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, MTHFR A 1298 C хетерозигот за мутирани алел

factor II	detector 1	FAM
factor II	detector 5	VIC
mthfr C 677 T	detector 2	FAM
mthfr C 677 T	detector 6	VIC
mthfr A 1298 C	detector 3	FAM
mthfr A 1298 C	detector 7	VIC
Factor V Leiden	detector 4	FAM
Factor V Leiden	detector 8	VIC

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Delta Rn	Allele Y Delta Rn	Call	Quality	Method
E5		mthfr A 1298 C	Unknown	-78.606	0.152	2.700	detector 3	100.00	Manual Call



Фотографија 12: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, није носилац MTHFR A 1298 C мутације

