

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**



**Biljana Vučković**

**POREMEĆAJ FUNKCIONALNOSTI FIBRINOLIZNOG**  
**MEHANIZMA KOD BOLESNIKA SA VENSKOM TROMBOZOM**

*doktorska disertacija*

**Novi Sad, 2014.**

Univerzitet u Novom Sadu  
Asocijacija centara za interdisciplinarne i  
multidisciplinarne studije i istraživanja - ACIMSI  
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:

TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

VR

Doktorska disertacija

Ime i prezime autora:

AU

Biljana Vučković

Mentor (titula, ime, prezime,  
zvanje):

MN

dr sci med Gorana Mitić, vanredni profesor

Naslov rada:

NR

Poremećaj funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma  
kod bolesnika sa venskom trombozom

Jezik publikacije:

JP

srpski

Jezik izvoda:

JI

srpski/engleski

Zemlja publikovanja:

ZP

Srbija

Uže geografsko područje:

UGP

Vojvodina

Godina:

GO

2014.

Izdavač: autorski reprint  
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Hajduk Veljka 11, Srbija  
MA

Fizički opis rada: rad napisan na 124 strane, sadrži 9 poglavlja,  
FO 20 tabela i 14 grafikona, 1 fotografiju,  
bibliografija sadrži 304 naslova

Naučna oblast: medicina  
NO

Naučna disciplina: hemostaza  
DI

Predmetna odrednica/  
ključne reči: Venska tromboza; Fibrinoliza; Faktori rizika; Genetski  
PO: polimorfizam; Inhibitor aktivatora plazminogena 1

UDK: 616-008.855:616.14-005.6

Čuva se: u biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu,  
ČU Hajduk Veljka 11

Važna napomena:  
VN

Izvod:

ID

Tromboza danas, u većini razvijenih zemalja, predstavlja vodeći uzrok obolevanja i umiranja. Poslednjih godina veoma aktuelna su istraživanja venskog tromboembolizma, obzirom da je incidenca ovog oboljenja 2/1000 osoba godišnje, a njegov razvoj posledica udruženog delovanja više genetskih i stečenih faktora rizika. Što preciznije prepoznavanje i sagledavanje što većeg broja ovih faktora osnovni je cilj u borbi, kako protiv prve epizode venske tromboze, tako i protiv recidiva ove bolesti. Brojni faktori rizika već su prepoznati kao sastavne karike patofiziološkog lanca venskog trombotskog procesa, ali je evidentno da otkrića mnogih od njih tek predstoje. Među najaktuelnijim istraživanjima na ovom polju nalazi se i ispitivanje uloge poremećaja fibrinoliznog mehanizma u venskoj tromboembolijskoj bolesti. Iako su već pruženi dokazi da suprimirana fibrinolizna aktivnost povećava rizik od nastanka ovog oboljenja, još uvek postoje brojna otvorena pitanja, koja se pre svega odnose na ulogu pojedinačnih činilaca fibrinoliznog mehanizma u venskoj trombozi, kao i na globalnu ulogu fibrinoliznog mehanizma u različitim tipovima i lokalizacijama venske trombotske bolesti. Pored toga, ispitivanje uticaja pojedinih genskih mutacija na pojedinačne činioce fibrinoliznog mehanizma, njegovu globalnu funkcionalnost i posredno na rizik za nastanak venske tromboze, takođe zaokuplja pažnju stručne javnosti, obzirom na nekonzistentnost rezultata dobijenih studijama koje se bave ovom

problematikom. Cilj ovoga istraživanja je ispitivanje kako globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, tako i njegovih pojedinačnih činilaca, kod bolesnika sa različitim tipovima i lokalizacijama venske tromboze i poređenje ovih parametara sa njihovim vrednostima u zdravoj populaciji. Pored toga, cilj istraživanja je i ispitivanje zastupljenosti 4G/5G PAI-1 polimorfizma kod bolesnika sa venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama. Ispitivanu grupu je sačinjavalo 100 bolesnika koji su doživeli trombozu dubokih vena a kontrolnu grupu je činilo 100 zdravih ispitanika, koji nikada nisu imali trombozni incident. Iz ispitivanja su isključene: osobe sa prethodno dokazanim poremećajem hemostaznog mehanizma, osobe koje uzimaju lekove za koje se zna da mogu imati uticaja na hemostazni mehanizam, osobe koje su imale akutnu bolest u momentu uzorkovanja krvi ili 6 nedelja pre toga, osobe sa malignitetom, trudnice, osobe sa težim duševnim bolestima, bolestima jetre i bubrega, autoimunim bolestima, ispitanici koji su odbili da potpišu pristanak informisanog ispitanika. Kao test za procenu globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma korišteno je euglobulinsko vreme lize koaguluma, dok su od pojedinačnih činilaca određivani: tkivni aktivator plazminogena (t-PA) i trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI) - ELISA metodom, kao i inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) - metodom hromogenog substrata. Genetskim ispitivanjem je utvrđivano prisustvo PAI-1 4G/5G genskog polimorfizma. Prema rezultatima istraživanja kod 56% bolesnika bila je prisutna spontana venska tromboza, dok je 44% njih imalo trombozu provociranu jednim od priznatih faktora rizika. U odnosu na lokalizaciju venskog tromboznog procesa proksimalna venska tromboza bila je prisutna kod 63% bolesnika, izolovana distalna venska tromboza kod 29% bolesnika, a atipično lokalizovana venska tromboza kod 8% bolesnika. Posmatrajući zastupljenost pojedinih faktora rizika uočili smo da je značajno viši procenat osoba sa hipertenzijom bio prisutan u grupi bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena u odnosu na grupu bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena (61% vs. 16%;  $p=0.000$ ). Što se funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma tiče, prema našim rezultatima bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena imaju značajno duže vreme lize koaguluma, odnosno suprimiranu funkcionalnost fibrinolize u poređenju sa zdravim kontrolama ( $204.34 \pm 51.24$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.011$ ), a kada posmatramo podgrupe bolesnika u odnosu na lokalizaciju i vrstu venske tromboze uočavamo da podgrupa bolesnika sa izolovanom distalnom venskom trombozom ima značajno duže euglobulinsko vreme lize koaguluma u odnosu na kontrolnu grupu ( $218.32 \pm 41.12$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.001$ ), kao i bolesnici koji su imali provociranu vensku trombozu u poređenju sa kontrolama ( $208.18 \pm 48.53$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.018$ ). Ispitivanjem pojedinačnih komponenti fibrinoliznog mehanizma došli smo do rezultata da bolesnici koji su doživeli venski trombozni incident imaju značajno više koncentracije TAFI u poređenju sa osobama koje nikada nisu imale vensku trombozu ( $19.70 \text{ ng/ml} \pm 5.17$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ). Poređenjem bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i kontrolnih ispitanika uočili smo da bolesnici iz ove podgrupe imaju značajno više vrednosti plazminogena u poređenju sa zdravim osobama ( $127.14 \% \pm 27.73$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.044$ ), kao i značajno više koncentracije t-PA ( $20.02 \text{ ng/ml} \pm 11.07$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.042$ ). Što se tiče TAFI, bolesnici sa distalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa kontrolama ( $20.72 \text{ ng/ml} \pm 4.96$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ), kao i bolesnici sa proksimalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa kontrolama ( $19.37 \text{ ng/ml} \pm 5.33$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.013$ ) imaju značajno više koncentracije TAFI. Koncentracija ovog inhibitora fibrinoliznog procesa značajno je veća i kod bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim osobama ( $19.93 \text{ ng/ml} \pm 3.97$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.000$ ), kao i kod bolesnika

sa primarnom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim ispitanicima (19.53 ng/ml ± 5.97 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.023). Što se genetskih analiza tiče, u okviru grupe bolesnika imali smo 25% homozigotnih i 58% heterozigotnih nosilaca mutacije gena za PAI-1, dok 17% bolesnika nije imalo pomenutu gensku mutaciju. U okviru kontrolne grupe pak, bilo je 30% homozigotnih i 56% heterozigotnih nosilaca mutacije a 14% ispitanika nije imalo mutaciju. Nije uočena značajna razlika u zastupljenosti 4G/4G genotipa između bolesnika sa različitim lokalizacijama venskog trombotskog procesa (distalna DVT 29% vs. proksimalna DVT 21% vs. DVT retke lokalizacije 12%; p=0.501), kao ni u zastupljenosti ovoga genotipa kod provocirane i spontane tromboze dubokih vena (27% vs. 23%; p=0.642), niti kod izolovane tromboze dubokih vena u poređenju sa plućnom tromboembolijom (25% vs. 33%; p=0.735). Procena rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na postojanje poremećaja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, u odnosu na patološke koncentracije pojedinih komponenti fibrinoliznog mehanizma, kao i u odnosu na postojanje 4G/4G mutacije u genu za PAI-1, pokazala je da suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma trostruko povećava rizik za nastanak tromboze dubokih vena (OR 3.02; CI 1.26-7.22), povišen nivo PAI-1 nema uticaja na rizik od nastanka tromboze dubokih vena, na šta ukazuje OR od 0.86 sa CI 0.59-1.25, povišen nivo t-PA antigena ne utiče na rizik od nastanka tromboze dubokih vena (OR 1.53; CI 0.79-2.94), ali povišena koncentracija TAFI više od dvostruko povećava ovaj rizik (OR 2.25; CI 1.16-4.35). Prema našim rezultatima PAI-1 4G/4G genotip nema uticaja na rizik od nastanka venske tromboze, što potvrđuje OR koji iznosi 0.57 (0.27-1.20). Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da bolesnici sa trombozom dubokih vena imaju suprimiranu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa zdravim osobama, da je nivo t-PA antigena, kao i plazminogena značajno viši kod bolesnika sa provociranom venskom trombozom nego kod zdravih osoba, da nema razlike u koncentraciji PAI-1 između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih osoba, ali da bolesnici sa trombozom dubokih vena, bez obzira na njenu lokalizaciju ili vrstu imaju značajno više nivoe TAFI u poređenju sa zdravim ispitanicima. Pored toga možemo zaključiti da ne postoji razlika u zastupljenosti 4G/5G polimorfizma između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih ispitanika. Konačno, možemo reći da na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma trostruko povećava rizik od nastanka tromboze dubokih vena, a povišen nivo TAFI-a dvostruko povećava ovaj rizik, dok 4G/5G PAI-1 polimorfizam nema uticaja na rizik za nastanak venskog tromboembolizma.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 25. 04. 2014.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime/titula/zvanje/  
naziv organizacije/status)

KO

Predsednik:

član:

član:

član:

član:

University of Novi Sad  
ACIMSI  
Key word documentation

Accession number:  
ANO

Identification number:  
INO

Document type: Monographic publication  
DT

Type of record: Textual printed material  
TR

Contents code: Ph. D. Thesis  
CC

Author: Biljana Vučković  
AU

Mentor: dr sci med Gorana Mitić, associate professor  
MN

Title: Fibrinolytic mechanism disorders in patients with  
venous thrombosis  
TI

Language of text: Serbian  
LT

Language of abstract: Serbian/English  
LA

Country of publication: Serbia  
CP

Locality of publication: Vojvodina  
LP

Publication year: 2007.  
PY

Publisher: authors reprint  
PU

Publication place: Hajduk Veljka 11, Novi Sad, Serbia  
PP

Physical description: 124 pages, 9 chapters, 20 tables, 14 graphs,  
PD 1 photograph, bibliography consists of 304  
citations

Scientific field: medicine  
SF

Scientific discipline: hemostasis  
SD

Subject, Key words: Venous Thrombosis; Fibrinolysis; Risk Factors;  
SKW Polymorphism, Genetic; Plasminogen Activator  
Inhibitor 1

UC: 616-008.855:616.14-005.6

Holding data: Library of Medical School Novi Sad,  
HD Hajduk Veljka 11, Novi Sad, Serbia

Note:  
N

Abstract:  
AB

Thrombosis is nowadays leading cause of morbidity and mortality worldwide. Lately, studies dealing with venous thromboembolism are very actual, since incidence of this disease is 2/1000 persons per year and its development is consequence of joint action of many different inherited and acquired risk factors. Precise recognition and understanding as many of those factors as possible represents imperative in fight against the first episode of venous thrombosis, and also against the recurrence of the disease. Numerous risk factors have been already recognized as constituent links of pathophysiological chain of venous thrombotic process, but it is also clear that the discovery of many of them are yet to come. Investigations of the role of fibrinolytic mechanism disorders in venous thrombosis are topical in the field. Although, we have some evidences that suppressed fibrinolytic activity increases the risk of this disease, still there are many open issues, especially those dealing with the role of individual factors of fibrinolytic mechanism in venous thrombosis, and with the role of global fibrinolytic function in different types and localizations of venous thrombotic disease. Further, investigation of the effects of gene mutations on individual fibrinolytic mechanism components, its global functionality and indirectly to the risk of venous thrombosis, also attracts the attention of experts, given the inconsistency of results obtained from studies dealing with this issue. The aim of this study was to evaluate fibrinolytic mechanism global functionality, as well as functionality of its integral individual components in patients with different venous thrombosis types and localizations, and to compare them with those of the healthy persons. In addition, the aim was to evaluate

presence of 4G/5G PAI-1 polymorphism in patients with venous thrombosis compared with healthy subjects. The case group consisted of 100 patients with deep vein thrombosis and the control group consisted of 100 healthy subjects who had never had thrombotic incident. Exclusion criteria were: documented haemostatic disease, taking drugs proven to affect fibrinolytic function, acute illness within 6 weeks before blood sampling, malignancy, pregnancy, severe mental illness, kidney or liver diseases, autoimmune diseases, examinee refusal to sign the informed consent. We used euglobulin cloth lysis time test as test for global fibrinolytic mechanism function estimation, and also determined: t-PA and TAFI concentrations using ELISA method and PAI-1 concentrations using chromogenic substrate method. The presence of PAI-1 4G/5G gene polymorphism was determined by genetic testing. According to results 56% of patients had unprovoked and 44% had provoked venous thrombosis. Proximal venous thrombosis was present in 63% of cases, distal venous thrombosis in 29% of cases and atypical venous thrombosis in 8% of them. Significantly higher frequency of hypertension was present in patients with primary deep vein thrombosis than in the group of patients with provoked deep vein thrombosis (61% vs. 16%,  $p = 0.000$ ). Patients who have experienced deep vein thrombosis had a significantly longer clot lysis time, and suppressed fibrinolysis function compared with healthy controls ( $204.34 \pm 51.24$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ,  $p = 0.011$ ). Also, this parameter was significantly longer in patients with isolated distal deep vein thrombosis compared with healthy controls ( $218.32 \pm 41.12$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.001$ ), such as in patients with provoked venous thrombosis compared with controls ( $208.18 \pm 48.53$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.018$ ). Patients with venous thrombosis had significantly higher TAFI concentrations in comparison with healthy volunteers ( $19.70$  ng/ml  $\pm 5.17$  vs.  $17.13$  ng/ml  $\pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ). Patients with provoked venous thrombosis had significantly higher concentrations of plasminogen ( $127.14$  %  $\pm 27.73$  vs.  $117.09$  %  $\pm 24.49$ ;  $p= 0.044$ ) and t-PA ( $20.02$  ng/ml  $\pm 11.07$  vs.  $16.78$  ng/ml  $\pm 8.08$ ;  $p=0.042$ ), in comparison with controls. Regarding TAFI, we noticed that patients with isolated distal deep vein thrombosis have higher values of this parameter compared with healthy people ( $20.72$  ng/ml  $\pm 4.96$  vs.  $17.13$  ng/ml  $\pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ), such as patients with proximal deep vein thrombosis ( $19.37$  ng/ml  $\pm 5.33$  vs.  $17.13$  ng/ml  $\pm 4.25$ ;  $p=0.013$ ). The same was obtained when compared patients with provoked venous thrombosis and controls ( $19.93$  ng/ml  $\pm 3.97$  vs.  $17.13$  ng/ml  $\pm 4.25$ ;  $p=0.000$ ), and patients with unprovoked venous thrombosis and controls ( $19.53$  ng/ml  $\pm 5.97$  vs.  $17.13$  ng/ml  $\pm 4.25$ ;  $p=0.023$ ). As far as genetic analysis, in the group of patients we had 25% homozygous and 58% heterozygous carriers of PAI-1 gene mutation, whereas 17% of patients didn't have this mutation. In controls, we had 30% homozygous and 56% heterozygous carriers of mutation and 14% of those without mutation. There was no significant difference in the frequency of 4G/4G genotype between patients with different localization of venous thrombotic process (distal DVT 29% vs. proximal DVT 21% vs. rare localization DVT 12%,  $p = 0.501$ ), as well as the representation of this genotype in provoked and unprovoked deep vein thrombosis (27% vs. 23%,  $p = 0.642$ ), or in isolated deep vein thrombosis compared to pulmonary thromboembolism (25% vs. 33%,  $p = 0.735$ ). Finally, our results show that suppressed fibrinolytic functionality threefold increases risk of venous thrombosis (OR 3.02, CI 1.26-7.22), elevated levels of PAI-1 have no effect on the risk of deep vein thrombosis, as evidenced by OR of 0.86 with CI 0.59-1.25, elevated levels of t-PA antigen do not affect the risk of deep venous thrombosis (OR 1.53; CI 0.79-2.94), but increased concentration of TAFI increases more than twice this risk (OR 2.25; CI 1.16-4.35). PAI-1 4G/4G genotype does not affect venous thrombotic risk (OR 0.57; CI 0.27-1.20). Based on these results, we conclude



that patients with deep vein thrombosis have suppressed fibrinolytic mechanism functionality compared to healthy subjects, the levels of t-PA antigen and plasminogen are significantly higher in patients with provoked venous thrombosis than in healthy subjects, there is no difference in PAI-1 concentration in patients with venous thrombosis and healthy persons, but the patients with deep vein thrombosis, regardless of its localisation or the type have a significantly higher level of TAFI as compared with healthy subjects. In addition, we can conclude that there is no difference in the prevalence of 4G/5G polymorphism in patients with venous thrombosis and healthy persons. Finally, we can say that suppressed fibrinolytic mechanism functionality threefold increases risk of deep vein thrombosis, elevated level of TAFI-a double increases this risk, while PAI-1 4G/5G polymorphism has no influence on the risk of venous thromboembolism.

Accepted on Scientific Board on:  
AS

25. 04. 2014.

Defended:  
DE

Thesis Defend Board:  
DB

President:  
member:  
member:  
member:  
member:

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1. HEMOSTAZNI MEHANIZAM</b>	<b>3</b>
<b>2. FIBRINOLIZNI SISTEM</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Razvoj saznanja na polju fibrinolize</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Uloga i značaj fibrinoliznog sistema</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Činioci fibrinoliznog sistema</b>	<b>8</b>
2.3.1. Plazminogen	9
2.3.2. Plazmin	10
2.3.3. Tkivni aktivator plazminogena (t-PA)	10
2.3.4. Mokraćni aktivator plazminogena, urokinaza (u-PA)	11
2.3.5. Inhibitor plazmina, antiplazmin (PI)	12
2.3.6. Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1)	12
2.3.7. Inhibitor aktivatora plazminogena-2 (PAI-2)	13
2.3.8. Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI)	13
2.3.9. Ostali inhibitor fibrinolize	14
2.3.10. Trombospondin	15
<b>2.4. Mehanizam fibrinoliznog procesa</b>	<b>15</b>
2.4.1. Fiziološka regulacija fibrinoliznog procesa	16
<b>3. VENSKA TROMBOZA</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Osnovne karakteristike</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Faktori rizika</b>	<b>19</b>
3.2.1. Stečeni faktori rizika	20
3.2.1.1. Životno doba	20
3.2.1.2. Imobilizacija	20
3.2.1.3. Trudnoća i puerperijum	20
3.2.1.4. Hirurške intervencije i trauma	21
3.2.1.5. Malignitet	21
3.2.1.6. Antifosfolipidna antitela	21
3.2.1.7. Duža putovanja	22

3.2.1.8. Životne navike	22
3.2.1.9. Hormonska terapija	22
3.2.2. Nasledni faktori rizika	23
3.2.2.1. Deficit prirodnih inhibitora koagulacije	23
3.2.2.2. Faktor V Leiden	23
3.2.2.3. Protrombin 20210A	23
3.2.2.4. Novootkrivene genske mutacije	23
3.2.2.5. Krvna grupa	23
3.2.3. Ostali faktori rizika	24
3.2.3.1. Povišen nivo faktora koagulacije	24
3.2.3.2. Poremećaj fibrinoliznog mehanizma	24
<b>3.3. Kliničke manifestacije</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Dijagnostički pristup</b>	<b>26</b>
3.4.1. Dijagnostički pristup pri sumnji na postojanje tromboze dubokih vena	26
3.4.1.1. Procena kliničke verovatnoće	26
3.4.1.2. Određivanje D-dimera	27
3.4.1.3. Imaging tehnike	27
3.4.1.4. Preporučeni dijagnostički algoritam	29
3.4.2. Dijagnostički pristup pri sumnji na postojanje plućne tromboembolije	30
<b>3.5. Prevencija venskog tromboembolizma</b>	<b>32</b>
3.5.1. Mehaničke metode prevencije	33
3.5.1.1. Elastična kompresivna bandaža	33
3.5.1.2. Intermitentna pneumatska kompresija	33
3.5.1.3. Aktuelne preporuke	34
3.5.2. Medikamentozna prevencija	34
3.5.2.1. Stratifikacija rizika	34
3.5.2.2. Opšta hirurgija	35
3.5.2.3. Ortopedske hirurške procedure	35
3.5.2.4. Laparoskopske hirurške procedure	36
3.5.2.5. Trauma	36
3.5.2.6. Trudnoća i puerperijum	37
3.5.2.7. Dugotrajna putovanja	37

3.5.2.8. Hospitalizovani pacijenti	37
3.5.2.9. Prethodne epizode venske tromboze	38
3.5.2.10. Trombofilija	38
<b>3.6. Lečenje venskog tromboembolizma</b>	<b>38</b>
3.6.1. Inicijalni terapijski pristup u lečenju tromboze dubokih vena	39
3.6.2. Dugoročni terapijski pristup u lečenju tromboze dubokih vena	41
3.6.3. Neželjeni efekti antikoagulantne terapije	42
3.6.3.1. Krvarenje	42
3.6.3.2. Heparinom indukovana trombocitopenija (HIT)	43
3.6.3.3. Heparinom indukovana osteoporoza	43
3.6.3.4. Hepatotoksičnost	43
3.6.4. Terapijski pristup u lečenju plućne tromboembolije	43
<b>4. ULOGA FIBRINOLIZNOG MEHANIZMA U NASTANKU VENSKE TROMBOZE</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Uticaj pojedinačnih činilaca fibrinoliznog mehanizma na nastanak venske tromboze</b>	<b>45</b>
4.1.1. Plazminogen	45
4.1.2. Tkivni aktivator plazminogena	45
4.1.3. Inhibitor aktivatora plazminogena	46
4.1.4. Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor	47
<b>4.2. Ukupni fibrinolizni potencijal i rizik od nastanka venske tromboze</b>	<b>48</b>
<b>5. RADNA HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>50</b>
<b>6. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA</b>	<b>52</b>
<b>6.1. Odabir i grupisanje ispitanika</b>	<b>52</b>
6.1.1. Bolesnici	53
6.1.2. Kontrolna grupa	53
6.1.3. Klasifikovanje ispitanika	53
<b>6.2. Metode ispitivanja</b>	<b>55</b>
6.2.1. Analize hemostaznog mehanizma	55
6.2.1.1. Određivanje nivoa TAFI	56
6.2.1.2. Određivanje nivoa PAI	58
6.2.2. Analize krvnih lipida i Lp(a) lipoproteina	59
6.2.2.1. Lipidski status	59

6.2.2.2. <i>Lp(a) lipoprotein</i>	59
6.2.3. Genetska analiza	59
<b>6.3. Obrada podataka</b>	<b>60</b>
6.3.1. Statistička analiza	60
6.3.2. "Confounding"	61
<b>7. REZULTATI ISPITIVANJA</b>	<b>62</b>
7.1. Selekcija i opšte karakteristike ispitanika	62
7.2. Rezultati ispitivanja zastupljenosti faktora rizika za nastanak tromboze u okviru različitih bolesničkih podgrupa	65
7.3. Rezultati ispitivanja fibrinoliznog mehanizma	68
7.3.1. Ukupni fibrinolizni potencijal	68
7.3.2. Komponente fibrinoliznog mehanizma	73
7.3.3. Rezultati genetskih analiza	83
<b>8. DISKUSIJA</b>	<b>90</b>
<b>9. ZAKLJUČCI</b>	<b>106</b>
<b>DODATAK 1</b>	<b>107</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>109</b>

## Uvod

Tromboza je danas, u većini razvijenih zemalja, vodeći uzrok obolevanja i smrtnosti. Iako je naučna javnost dugo akcentirano stavljala na istraživanja na polju arterijske tromboze, poslednjih godina veoma aktuelna su i istraživanja venskog tromboembolizma. Incidenca venskih tromboza je 2/1000 osoba godišnje, a razvoj ovoga oboljenja posledica je udruženog delovanja više genetskih i stečenih faktora rizika. Udruživanje ovih faktora rizika povećava rizik za nastanak venske tromboze tako da on višestruko prevazilazi prost zbir pojedinačnih činilaca. Na taj način svaka osoba ima sebi svojstven "trombozni profil" a njegovo što preciznije sagledavanje osnovni je cilj u borbi kako protiv prve epizode venske tromboze, tako i protiv recidiva ove bolesti.

Brojni faktori rizika već su prepoznati kao sastavne karike patofiziološkog lanca venskog trombotskog procesa, ali je evidentno da otkrića mnogih od njih tek predstoje. Među najaktuelnijim istraživanjima na ovom polju nalazi se i ispitivanje uloge poremećaja fibrinoliznog mehanizma u venskoj tromboembolijskoj bolesti.

Iako su već pruženi dokazi da suprimirana fibrinolizna aktivnost povećava rizik od nastanka ovog oboljenja, još uvek postoje brojna otvorena pitanja, koja se pre svega odnose na ulogu pojedinačnih činilaca fibrinoliznog mehanizma u venskoj trombozi, kao i na globalnu ulogu fibrinoliznog mehanizma u različitim tipovima i lokalizacijama venske trombotske bolesti. Pored toga, ispitivanje uticaja pojedinih genskih mutacija na pojedinačne činioce fibrinoliznog mehanizma, njegovu globalnu funkcionalnost i posredno na rizik za nastanak venske tromboze, takođe zaokuplja pažnju stručne javnosti, obzirom na nekonzistentnost rezultata dobijenih studijama koje se bave ovom problematikom.

Ovaj rad predstavlja pokušaj doprinosa rasvetljavanju veoma značajne, ali još uvek nedovoljno ispitane problematike koja se odnosi na ulogu fibrinoliznog mehanizma u venskoj trombozi.



## 1. Hemostazni mehanizam

Uloga hemostaznog mehanizma u održavanju homeostaze ljudskog organizma ogleda se u ostvarivanju besprekornog balansa između održavanja krvi u tečnom stanju unutar vaskularnog korita, efikasne produkcije hemostatskog ugruška u slučaju nastanka povrede ali i sprečavanja prekomernog zgrušavanja kako bi se izbegle neželjene komplikacije fiziološkog odgovora. Narušavanje pomenutog balansa dovodi do nastanka krvarenja ili tromboze koje možemo posmatrati kao dve strane istog biološkog novčića.

Ovako delikatna, a ponekad i nezahvalna uloga ostvaruje se izbalansiranim i usklađenim delovanjem velikog broja činilaca kroz tri faze: primarnu hemostazu, koagulaciju i fibrinolizu. Obzirom da su pored uloge mehaničke barijere koja razdvaja komponente hemostaznog sistema i visokoreaktivne subendotelijalne strukture, endotelnim ćelijama na sceni hemostaze dodeljene i brojne druge uloge, u smislu produkcije mnoštva aktivatora i inhibitora, kako koagulacije tako i fibrinolize, njihovo oštećenje vodeći je preduslov za aktivaciju primarne hemostaze. Ona pak predstavlja kompleksnu interakciju između zida krvnog suda, trombocita i adhezivnih proteina koja za cilj ima saniranje povrede krvnog suda formiranjem belog, trombocitima bogatog tromba [1]. Inicijalna faza aktivacije trombocita je adhezija čija je posledica formiranje jednoslojnog ćelijskog pokrivača koji oblaže oštećenu endotelnu površinu. U osnovi ovog procesa je vezivanje trombocita za ogoljeni subendotelni matriks bogat kolagenom, fibronektinom, vonWillebrand-ovim faktorom (vWF) i drugim proteinima ili pak za arteficialne površine poput vaskularnih graftova, a sama efikasnost procesa u najvećoj meri zavisi od prisutnosti glikoproteina površine trombocita koji vezuju vWF, kao i od adekvatne plazmatske i subendotelne koncentracije polimera vWF-a. Nakon adhezije sledi faza agregacije trombocita koja podrazumeva udruživanje većeg broja trombocita sa ciljem formiranja trombocitnog ugruška, a ova faza posredovana je interakcijom fibrinogena sa glikoproteinskim receptorima na trombocitnoj površini. Tek nakon ovoga trombociti pokazuju svoj raznovrsan potencijal tako što oslobađanjem sadržaja trombocitnih granula u ekstracelularni prostor značajno utiču na porast lokalne koncentracije supstanci koje doprinose formiranju stabilnog ugruška aktivacijom koagulacione komponente hemostaznog mehanizma [2].

Sve do relativno skoro koagulacioni proces predstavljan je interakcijom proteina u obliku dobro poznate "Y šeme" sa jasno razgraničenim "unutrašnjim" i "spoljašnjim" putem koagulacije u čijoj aktivaciji presudnu ulogu igraju FXII koagulacije ukoliko posmatramo unutrašnji put i kompleks aktivirani FVII koagulacije-ktivni faktor u slučaju spoljašnjeg puta. Pomenuta dva puta sjedinjuju se u takozvani "zajednički" put koagulacije na nivou formiranja kompleksa protrombinaze (aktivirani FX/aktivirani FV). Iako nikada ni nije predloženo da se ovakva šema koagulacije posmatra kao doslovni model hemostatskih zbivanja *in vivo*, nepostojanje drugog, boljeg koncepta praktično je značilo da su mnoge generacije lekara i naučnika stasale doživljavajući pomenutu šemu kao realan fiziološki model. No, kao što je to u medicini često slučaj, klinička zapažanja su bacila svetlo na



limitiranost koju sa sobom nosi ovakav model i nametnula zaključak da unutrašnji i spoljašnji put koagulacije ni na koji način ne mogu funkcionisati nezavisno jedan od drugog *in vivo*, kao što je to slučaj u kaskadnom modelu [3,4,5].

Početakom devedesetih godina prošlog veka otvaraju se nove perspektive u shvatanju funkcionisanja hemostaznog mehanizma koje se zasnivaju na saznanju o neophodnosti preciznijeg sagledavanja uloge ćelija u ovom sistemu [6]. Umesto doživljavanja koagulacije isključivo kao "kaskade" proteoliznih reakcija na nju se u novije vreme gleda kao na mnoštvo sinhronizovanih koraka na ćelijskoj površini koji se međusobno preklapaju. Za komponente starog "spoljašnjeg" i "unutrašnjeg" puta koagulacije danas se zna da učestvuju u inicijaciji i propagaciji koagulacionih reakcija, igrajući različite ali komplementarne uloge. Dobro je poznato da je osnovna uloga hemostaznog mehanizma formiranje nepropustljivog trombocitno-fibrinskog ugruška na mestu povrede ali da je podjednako važno da se obezbedi lokalizovanost procesa, odnosno ograniči izražena prokoagulantna snaga supstanci aktiviranih u procesu zaustavljanja krvarenja. Ovo se postiže upravo odvijanjem reakcija na specifičnim ćelijskim površinama. Različite ćelije imaju različite uloge u procesu koagulacije, obzirom na to da poseduju različite prokoagulantne i antikoagulantne sposobnosti. Na primer, trombociti igraju glavnu ulogu u promovisanju prokoagulantnih reakcija a vaskularne endotelne ćelije imaju ključnu ulogu u promovisanju antikoagulantnih svojstava vaskulature. Na osnovu eksperimentalnih istraživanja zasnovanih na pomenutom ćelijskom konceptu hemostaze prihvaćeno je da koagulacioni proces sadrži tri različita koraka koji se međusobno preklapaju i oni su nazvani:

- faza inicijacije,
- faza amplifikacije i
- faza propagacije [7].

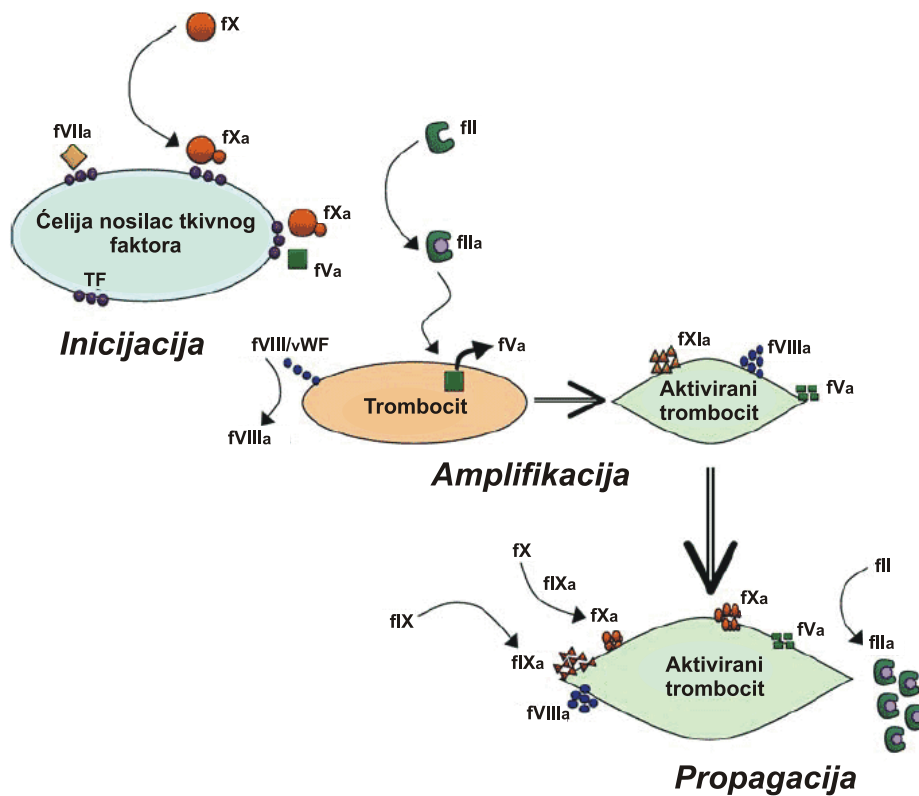
Preduslov za odvijanje čitavog procesa podrazumeva postojanje dva tipa ćelija: ćelija koje nose TF i trombocita, a ključni način regulisanja procesa je da se izbegne njihov kontakt sve do momenta dok povreda ne postavi imperativ aktivacije koagulacije.

**Faza inicijacije** lokalizovana je na ćelije koje ekspimiraju TF. Kompleks FVIIa/TF aktivira male količine FIX i FX. Nakon toga se FX udružuje sa FVa formirajući kompleks protrombinaze na pomenutim ćelijama. Aktivisani faktor X koji je lokalizovan na ćelijskoj površini je relativno dobro zaštićen od inaktivacije plazmatskim proteaznim inhibitorima. Međutim, bilo koja količina FXa koja se oslobodi sa površine ćelija koje nose TF ubrzano se inhibiše u krvotoku, pod uticajem inhibitora puta tkivnog faktora (TFPI) ili antitrombina (AT). Na taj način, prisustvo inhibitora efikasno lokalizuje aktivnost FXa na ćelijsku površinu na kojoj je i formiran. Nasuprot ovome, aktivisani FIX koagulacije može se kretati od ćelija koje sadrže TF do okolnih trombocita ili drugih ćelijskih površina, obzirom da ga TFPI ne inhibira a AT inhibira znatno sporije nego što to čini u slučaju FXa [8]. Izvestan nivo aktivnosti puta tkivnog faktora verovatno je konstantno prisutan u ekstravaskularnom prostoru [9]. Koagulacioni proteini napuštaju vaskularno korito, prolaze kroz tkiva i mogu se naći u limfi u količini grubo proporcionalnoj njihovoj molekularnoj veličini [10]. Na taj način, FVII je

najverovatnije vezan za ekstravaskularni TF, čak i u odsustvu povrede a ekstravaskularni FX i FIX mogu biti aktivirani pri prolasku kroz tkiva. Ove pretpostavke su u skladu sa otkrićem da su niski nivoi koagulacionih aktivacionih peptida prisutni u krvi zdravih osoba, što je nazvano "bazalnom koagulacijom" ili "praznim hodom", što ne vodi formiranju ugruška pod fiziološkim okolnostima, obzirom da su veoma važne komponente koagulacionog procesa kao što su trombociti i kompleks FVIII koagulacije/vonWillebrand-ov faktor sekvestrovani u vaskulaturi. Koagulacija se događa samo u slučaju da oštećenje zida krvnog suda dozvoli trombocitima i FVIII/vWF da se "izliju" u ekstravaskularno tkivo [11] (Slika 1).

**Faza amplifikacije** podrazumeva ostvarivanje uloga trombina. Treba istaći da mala količina trombina generisanog na ćelijama koje eksprimuju TF ima više uloga. Jedna od vodećih je aktivacija trombocita. Iako su trombociti već adherisali na mesto povrede i postali delimično aktivirani, dodatni trombin indukuje značajno viši nivo prokoagulantne aktivnosti nego same adhezivne interakcije. Kada se jednom formira, trombin se može premeštati sa ćelija koje eksprimuju tkivni faktor na okolne trombocite, na kojima se vezuje za svoj visokoafinitetni receptor GPIIb. Ovaj protein omogućava interakciju trombina sa substratom na površini trombocita, uključujući: cleaving protease-activated protein 1 (PAP-1) koji igra ključnu ulogu u aktivaciji trombocita, aktiviranje FVIII i njegovo oslobađanje iz kompleksa sa vWF, kao i aktiviranje FXI [12,13,14]. Još jedna funkcija trombina formiranog tokom ove faze je aktivacija kofaktora V i VIII na površini trombocita, kao i aktivacija FXI. Tako je na kraju faze amplifikacije sve spremno za produkciju trombina velikih razmera koje se dešava u fazi propagacije [15] (Slika 1).

**Faza propagacije** započinje na aktivisanim trombocitima. Tokom ove faze FIXa aktiviran tokom inicijacije vezuje se za FVIIIa na površini trombocita a dodatni FIXa obezbeđuje FXIa vezan za trombocite. Kako FXa ne može biti efikasno premešten sa ćelija koje eksprimuju tkivni faktor na trombocite, on mora biti direktno obezbeđen na površini trombocita od strane FIXa/VIIIa kompleksa nakon čega se ubrzano udružuje sa FVa sa površine trombocita i proizvodi pravu eksploziju u produkciji trombina, dovoljnu da dovede do zgrušavanja fibrinogena. Trombociti su verovatno jedine ćelije na kojima je propagacija koagulacije efikasna obzirom da je površina trombocita specijalizovana da koordinira uklapanje FIXa/VIIIa i FXa/Va kompleksa. Dodatna pogodnost je što veliki broj trombocita može biti regrutovan na mesto povrede kako bi se obezbedila dovoljno velika površina za stvaranje trombina velikih razmera (Slika 1).



Slika 1. Čelijski model koagulationog mehanizma

Iz do sada navedenog, logično proizilazi da je od izuzetnog značaja postojanje efikasnog sistema koji na odgovarajući način prilagođava mesto i količinu stvaranja trombina stepenu težine povrede. Ovaj sistem obuhvata mehanizme čiji je osnovni imperativ da se koagulacioni proces lokalizuje na mesto povrede, kao što su: efikasna adhezija trombocita, obzirom da se na taj način otklanja barijera kretanju prokoagulantnih proteaza sa površine inicirajućih ćelija ka površini trombocita [16], znatno manja aktivnost plazmatskih proteaznih inhibitora u inaktivisanju koagulacionih proteaza na površini ćelija nego u krvotoku, brza inhibicija aktiviranih faktora koji se udalje od mesta povrede. Sa druge strane, niz antitrombotskih mehanizama trudi se da prevenira propagaciju koagulacije duž zdravog, intaktnog endotelijuma. Ovi mehanizmi uključuju endotelijalni trombomodulin (TM)/protein C/protein S sistem koji je zadužen za inaktivaciju faktora Va i VIIIa, ekto-ADP-azu koja suprimira trombocitnu aktivaciju oslobađanjem ADP-a i heparanoide endotelijalne površine koji mogu da vežu i poboljšaju aktivnost antitrombina. Nivo ekspresije ovih mehanizama varira među različitim vaskularnim lokalizacijama i može biti modifikovan pod uticajem inflamatornih stimulusa i vaskularne patologije [17,18,19].

Iako se ugrušak formira gotovo odmah nakon što počne "eksplozija" formiranja trombina na trombocitnoj površini, struktura ugruška nastavlja da se menja, u zavisnosti od brzine formiranja trombina i brzine proticanja krvi. Ako je inicijalna brzina formiranja trombina spora, ugrušak ima labavu strukturu sastavljenu od debelih fibrinskih vlakana sa malom strukturnom rigidnošću. Nasuprot tome, ugrušci koji nastanu u zenitu formiranja

trombina, imaju gušću i rigidniju strukturu i otporniji su na mehaničku i enzimsku destrukciju. Iako ne možemo biti sigurni da li je brzina ili maksimalni nivo trombinske aktivnosti ono što determiniše strukturu ugruška, jasno je da su ovi parametri važniji od ukupne količine trombina koja se produkuje. Takođe, najverovatnije je upravo struktura ugruška presudna u definisanju njegove osetljivosti prema fibrinolizi kao komponenti koja poslednja stupa na scenu hemostaznog procesa.

## **2. Fibrinolizni sistem**

### **2.1. Razvoj saznanja na polju fibrinolize**

Priča o fibrinoliznom mehanizmu počinje davne 1794. godine, zapažanjem Huntera da kod životinja koje su umrle od iznenadne smrti nema spontane koagulacije krvi [20]. Ovaj fenomen delimično je 1906. godine objasnio Morawitz, utvrdivši da u krvi žrtava iznenadne smrti nema fibrinogena. Obzirom da je uočio i da takva krv može razoriti fibrinogen i fibrin u normalnoj krvi pretpostavio je da se objašnjenje može naći u postojanju enzima koji ima sposobnost razaranja fibrina [21]. Dastre je 1893. godine kvantifikovao razlaganje fibrina i taj događaj označio imenom fibrinoliza, što je ujedno i prvi put da se pojavljuje ovaj termin [22]. U razumevanju fibrinoliznog procesa veoma su značajna i zapažanja Nolfi, s' početka dvadesetog veka, koji pretpostavlja da se kao krajnji rezultat procesa koagulacije javlja liza stvorenog ugruška pod dejstvom proteoliznih enzima [23], a treba istaći i to da je osnovnu konturu današnjeg shvatanja spontane fibrinolizne aktivnosti pružio Macfarlane 1937. godine dokazujući da se kod čoveka ona može izazvati operativnim zahvatom [24].

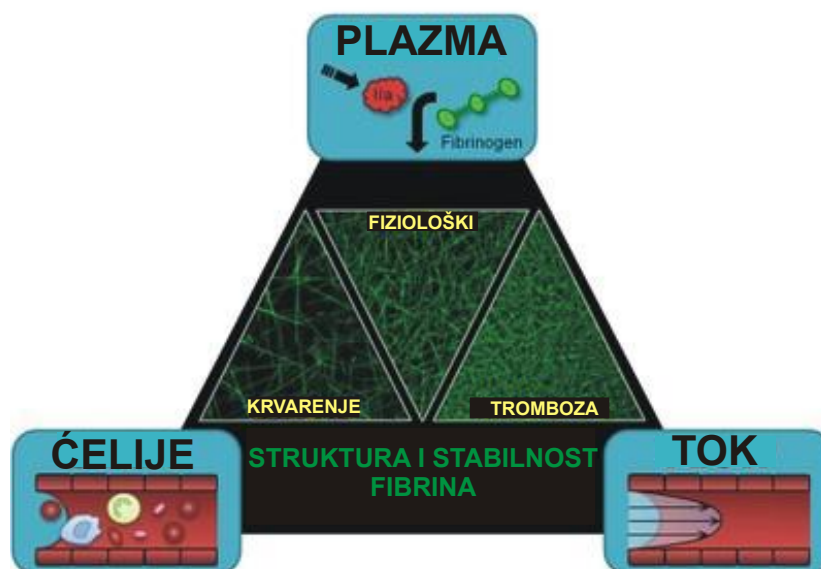
Za otkriće fibrinoliznih inhibitora najzaslužniji su Opie i Barker, a za rasvetljavanje njihove uloge Schmitz [25,26]. Tillet i Garner 1933. godine dolaze do otkrića da jedan produkt hemolitičkog streptokoka ima uticaj na odvijanje fibrinoliznog procesa [27], a ubrzo nakon toga je Milston došao do zaključka da ovaj produkt prvo stupa u vezu sa izvesnim "litičkim" faktorom, pa tek takav kompleks razlaže fibrin [28]. Od tog momenta se pretpostavlja da je za razgradnju fibrina neophodno da se enzim koji je za nju odgovoran pretvori iz proenzima u aktivnu formu. Proenzim je nazvan plazminogenom, dok je aktivan enzim dobio ime plazmin. Inhibitor plazmina je označen kao antiplazmin, a spomenuti streptokokni aktivator kao streptokinaza. Za ovu terminologiju, koja je i danas važeća, zaslužni su Christensen i MacLeod [29]. Konačno, sredinom prošlog veka izolovan je plazminogen, a otkriveni su i aktivatori fibrinoliznog procesa koji su prisutni u samom organizmu, tzv. endogeni aktivatori fibrinolize [30].

Drugu polovinu dvadesetog i početak dvadeset prvog veka karakteriše kako otkriće novih činilaca fibrinoliznog procesa, poput trombinom aktivirajućeg fibrinolitičkog inhibitora (TAFI), tako i rasvetljavanje mehanizama putem kojih su pojedinačni fibrinolizni činioci ukomponovani u skladnu i uravnoteženu celinu.

## 2.2. Uloga i značaj fibrinoliznog sistema

Kao integralni deo kompleksnog hemostaznog mehanizma, fibrinolizni sistem za svoje osnovne uloge ima, kao što mu i samo ime kaže, razgradnju fibrina, kako intravaskularno, tako i van krvnog suda, u tkivima u kojima se on istaloži ali i sprečavanje formiranja fibrinskih ugrušaka u cirkulaciji. Danas se zna da je degradacija fibrina samo jedna od mnogih važnih uloga ovog sistema, među kojima su: aktivacija metaloproteaza zaduženih za razgradnju ekstracelularnog matriksa, remodeliranje tkiva, kao što je slučaj u zarastanju rana, stimulacija ćelijske migracije, usađivanje embriona ali i maligna proliferacija [31].

Treba istaći da fibrinolizni sistem obuhvata veliki broj činilaca čije se uloge neprestano međusobno prepliću, a čiji je zajednički zadatak da se obezbedi stabilna dinamska ravnoteža između procesa zgrušavanja krvi i razgradnje koagulumu. Kako upravo fibrinolizni sistem predstavlja onaj tas na vagi koji je drži uravnoteženom dok se sa druge strane nalazi koagulacioni mehanizam, u slučaju eventualne prevage aktivatora fibrinolize može doći do nastanka hemoragijskog sindroma, a dominacija inhibitora za posledicu može imati razvoj tromboze, te je dakle usklađeno i harmonično delovanje svih činilaca ovog kompleksnog sistema od izuzetnog značaja za neometano funkcionisanje hemostaznog mehanizma i održavanje homeostaze organizma (Slika 2).



Slika 2. Promena strukture fibrina u sklopu poremećaja funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma

## 2.3. Činioci fibrinoliznog sistema

Vekovna istraživanja fibrinoliznog procesa omogućila su da danas raspoložemo sa mnoštvom podataka o strukturi i funkciji svih glavnih fibrinoliznih proteina, što podrazumeva serinske proteaze, njihove inhibitore i aktivatore, kao i podacima o njihovim receptorima. Za sada se ispitivanje dinamičkih molekularnih interakcija među njima vrši u *in*

*vitro* istraživanjima uzoraka pune krvi, ali je i razvoj genetski modifikovanih miševa deficitarnih u jednom ili više fibrinoliznih proteina od velikog značaja za razumevanje uloge ovih činilaca u intra i ekstravaskularnim događajima. Svakako treba napomenuti da su i genetske analize humanih sindroma deficijencije, koji su uzrokovani specifičnim mutacijama, a za posledicu imaju bilo fibrinoliznu inhibiciju, bilo stimulaciju, još jedan važan izvor informacija o komponentama fibrinoliznog mehanizma [32].

### **2.3.1. Plazminogen**

Plazminogen predstavlja proenzim aktivnog fibrinoliznog enzima - plazmina. Sintetiše se u jetri, pod kontrolom gena na dugom kraku hromozoma 6, a u plazmi nalazi u koncentraciji od oko 100-150 mg/l. Njegovo poluvreme života u cirkulaciji iznosi 2,8 dana. U svojoj intaktnoj formi, plazminogen je 791-aminokiselinski, jednolančani glikoprotein iz familije  $\beta$ -globulina, molekulske mase 88.000 Da. Aktivatori konvertuju plazminogen u dvolančanu molekulu plazmina raskidajući Arg<sub>56</sub>-Val<sub>561</sub> vezu na mestu spoja teških i lakih lanaca.

Postoji nekoliko formi plazminogena u plazmi, a dve najznačajnije su tzv. "nativna" i "modifikovana" forma [33,34]. Nativna forma sadrži 791 aminokiselinu i počinje sa glutaminom na aminoterminalnom kraju signalne sekvence, te se još naziva i Glu-plazminogen. Izdvajanjem takozvanog peptida aktivacije nastaje "modifikovana" forma plazminogena koja se još naziva i Lys-plazminogen, obzirom da njen aminoterminalni deo uglavnom započinje sa lizinom. Iza signalne sekvence sledi regija molekule koja sadrži pet odvojenih područja trostruko savijenih lanaca, sa 80-114 aminokiselina, međusobno povezanih disulfidnim vezama, koji su obzirom na sličnost sa jednom vrstom danskog peciva po njemu i nazvani "kringles", odnosno "perecne" strukture (K1-K5) [35]. Iza njih sledi regija proteaza. Svaki od pet "perecnih" domena je kodiran od strane dva odvojena egzona između kojih se nalazi jedan intron, u genu za plazminogen. Ovi domeni plazminogena sadrže lizin-vezujuća mesta, odgovorna za specifično vezivanje plazminogena za fibrin i interakciju plazmina sa  $\alpha_2$ -antiplazminom. Nuklearna magnetna spektroskopija ukazuje na to da je K1 područje kompaktna, globularna struktura izgrađena oko jezgra koje čine hidrofobne aromatične aminokiseline, a hemijska istraživanja ukazuju na to da su specifične aminokiselinske rezidue ovog područja uključene u vezivanje za fibrin. Smatra se da su rezidue 1-442 esencijalne za proenzimske karakteristike plazminogena, rezidue 1-77 igraju značajnu ulogu u održavanju strukture i određuju brzinu aktivacije, dok rezidue 562-791 imaju presudan značaj u vezivanju streptokinaze. K1-K3 regija poseduje inicijalna vezujuća mesta za brzodelujući inhibitor plazminogena,  $\alpha_2$ -antiplazmin, dok je K4 plazminogena odgovorna za njegovo vezivanje za tetranektin [36].

Aktivaciono mesto plazminogena čini "katalitička trijada" sastavljena od serina, asparagina i histidina. Ovo mesto je smešteno na COOH terminalnom području proteaze. Aktivacija plazminogena može se odigrati na dva načina. Prvi podrazumeva unutrašnji put aktivacije plazminogena, koji pokreću činioci koji se nalaze u plazmi, poput XII faktora

koagulacije, prekalikreina, visoko-molekularnog kininogena ili trombina. Drugi se odnosi na spoljašnji put aktivacije plazminogena za čije pokretanje su odgovorni aktivatori koji se stvaraju u tkivima i endotelnim ćelijama, na prvom mestu tkivni i mokraćni aktivator plazminogena [37].

### **2.3.2. Plazmin**

Ključnu ulogu u odvijanju fibrinoliznog procesa igra upravo plazmin, proteolizni enzim koji se sastoji iz lakog i teškog polipeptidnog lanca, međusobno povezana disulfidnom vezom. Molekulska težina mu je 82.900 Da [33]. U cirkulaciji se plazmin nalazi u formi svog neaktivnog prekursora, proenzima plazminogena. Pretvaranje plazminogena u plazmin odvija se pod dejstvom brojnih aktivatora fibrinoliznog procesa.

Svoju proteoliznu aktivnost plazmin ispoljava razlaganjem argininskih i lizinskih veza, prvenstveno u molekulima fibrina i fibrinogena, pri čemu nastaju brojni fragmenti poznati kao fibrin/fibrinogen degradacioni produkti ili fragmenti X, Y, D i E. U fiziološkim uslovima, zahvaljujući dejstvu inhibitora, dejstvo plazmina je usmereno isključivo na fibrin u sastavu krvnog koaguluma, dok u izvesnim patološkim stanjima dolazi i do razgradnje fibrinogena. Pored toga, obzirom da je nespecifičan enzim, on izaziva i proteoliznu razgradnju V i VIII činioca kaogulacije, vonWillebrandovog faktora, činilaca sistema komplementa, adrenokortikotropnog hormona, glukagona i hormona rasta, a takođe izdvaja i peptid aktivacije iz molekule Glu-plazminogena [38].

Najznačajniji fiziološki inhibitor plazmina u cirkulaciji je  $\alpha_2$ -antiplazmin, dok su u trombu to inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) i trombinom aktivišući fibrinolizni inhibitor (TAFI) [39].

### **2.3.3. Tkivni aktivator plazminogena (t-PA)**

Tkivni aktivator plazminogena je jednolanačana serinska proteaza molekulske težine 68.000 Da. Njegova koncentracija u plazmi, merena kao t-PA antigen je niska, 5-10  $\mu\text{g/l}$  i menja se značajno pod uticajem različitih fizioloških i patoloških okolnosti. Vreme poluživota mu je veoma kratko i iznosi 2,5-5 minuta. Ovaj glikoprotein se nalazi u svim tkivima organizma osim jetre i placente. Detektovan je takođe i u telesnim tečnostima poput pljuvačke, suza, mleka i sperme [34]. Prevažodno se sintetiše u endotelnim ćelijama, pod kontrolom gena na hromozomu 8, ali se pored toga može sintetisati i u fibroblastima, makrofagnim ćelijama, leukocitima, glatko-mišićnim ćelijama i malignim ćelijama.

Brojni su stimulacijski faktori za oslobađanje t-PA iz endotelnih ćelija. To su pored hipoksije i fizičkog opterećenja i venska staza, acidoza, psihički stres, pušenje, kao i intravenska primena adrenalina, histamina ili vazopresina. Oslobodeni t-PA se vezuje sa svojim najznačajnijim inhibitorom, inhibitorom aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) i u plazmi se uglavnom i nalazi u formi ovog kompleksa, a svega oko 5% je u slobodnom obliku.

Kao što mu i samo ime kaže, osnovna uloga ovog enzima je u aktivaciji plazminogena, te na taj način u sprečavanju nastanka i širenja intravaskulne koagulacije. U nedostatku fibrina, t-PA veoma sporo aktivira Glu-plazminogen, dok se u slučaju fizioloških koncentracija fibrina, zajedno sa Glu-plazminogenom vezuje za fibrin i veoma brzo pretvara plazminogen u plazmin. Interesantna je činjenica da je jednolančani t-PA potpuno aktivan već kada se veže za fibrin i plazminogen, a pre formiranja dvolančane molekule, te je on praktično jedina poznata serinska proteaza sa gotovo maksimalnom aktivnošću u jednolančanoj formi.

Procesi koji regulišu pojavu aktivnog t-PA u krvi su: sekrecija t-PA iz endotelih ćelija u cirkulaciju, inhibicija t-PA pomoću PAI-1 u plazmi i eliminacija jetrom. Razlike u molarnom odnosu između t-PA antigene koncentracije i t-PA aktivnosti objašnjavaju se prisustvom PAI-1 koji sa t-PA formira inaktivan kompleks. U izvesnom stepenu i antiplazmin i C1-inhibitor doprinose ovome efektu. Moguće je i da kompleksi t-PA sa pomenutim inhibitorima imaju duže poluvreme života u cirkulaciji u poređenju sa slobodnim t-PA, dozvoljavajući tako njihovo akumuliranje. Sa druge strane, ćelije jetrenog parenhima prezentuju visokoafinitetne receptore za preuzimanje tPA/PAI-1 kompleksa i odgovorne su za njihovu razgradnju.

Svakako ne treba zaboraviti i činjenicu da u *in vivo* studijama nije pronađena nikakva korelacija između cirkulišućeg plazmatskog nivoa t-PA i njegovog lokalnog oslobađanja iz endotela, te se merenje koncentracije t-PA ili PAI-1 u plazmi ne može koristiti u svrhu procene lokalne fibrinolizne aktivnosti. Aktivnost t-PA na organskom nivou zavisna je pre od oslobađanja iz endotelih ćelija nego od cirkulišućeg t-PA ili inhibitora ovog činioca u krvi [40].

#### **2.3.4. Mokraćni aktivator plazminogena, urokinaza (u-PA)**

Mokraćni aktivator plazminogena, odnosno urokinaza (u-PA) je glikoprotein poreklom iz bubrežnog parenhima, koji se nalazi u urinu, a u vrlo niskoj koncentraciji i u plazmi. I brojne druge ćelije, poput fibroblasta, epitelih ćelija, pneumocita, makrofaga, ćelija decidue placentae, kao i ćelije nekih tumora mogu proizvoditi ovaj enzim [34]. Vreme poluživota u-PA je oko 10-15 minuta, a njegov prethodnik je tzv. prourokinaza koja je izgrađena iz jednog polipeptidnog lanca molekulske težine 54.000 Da i označena je kao scu-PA. Gen koji kontroliše sintezu prourokinaze nalazi se na hromozomu broj 10. scu-PA se konvertuje u enzimski aktivnu dvolančanu formu uPA pod uticajem plazmina ili kalikreina. Tačna uloga ovoga enzima u hemostazi i fibrinoliznom mehanizmu još uvek nije u potpunosti razjašnjena.

Za razliku od t-PA, prvenstveno zaduženog za sprečavanje intravaskularne tromboze, u-PA je uglavnom deo međućelijskih proteoliznih mehanizama u različitim tkivima. Ćelije ovih tkiva poseduju specifične receptore za pomenuti aktivator, budući da je u-PA uključen i u procese zapaljenja, tumorske invazije, reparacije tkiva, fertilizacije i embriogeneze [41].



### **2.3.5. Inhibitor plazmina, antiplazmin (PI)**

Najznačajniji fiziološki inhibitor fibrinolize je  $\alpha_2$ -antiplazmin, glikoprotein molekulske težine 70.000 Da. Sintetiše se u jetri, a vreme poluživota mu je oko 3 dana. Ulogu inhibitora plazmina on ostvaruje brзом inhibicijom slobodnog plazmina, ometanjem vezivanja plazminogena za fibrin i vezivanjem za  $\alpha$ -lance fibrina u toku koagulacije. Upravo je interakcija plazmin-antiplazmin centralna u fiziološkoj kontroli fibrinolize, sa ciljem da se obezbedi mogućnost za brzu i pravovremenu aktivaciju ovog sistema na mestima odlaganja fibrina, a bez stvaranja uslova za otpočinjanje sistemske fibrinolize.

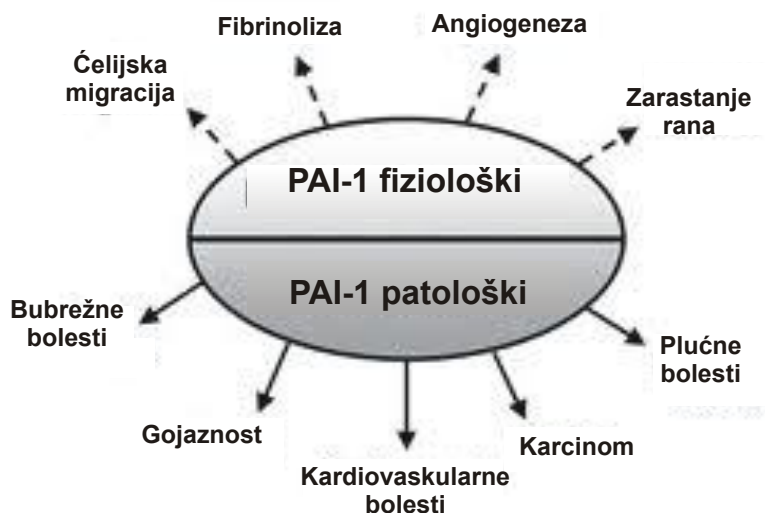
U odnosu 1:1,  $\alpha_2$ -antiplazmin formira kompleks sa plazminom u dva koraka. Prvi je formiranje reverzibilnog kompleksa sa plazminom vezanim za fibrin uz pomoć nekovalentnih veza. Drugi korak je ireverzibilno vezivanje serina iz plazmina sa određenim mestom  $\alpha_2$ -antiplazmina. U ovom procesu i sam antiplazmin biva delimično razgrađen plazminom. Vezivanje plazminogena za fibrin,  $\alpha_2$ -antiplazmin sprečava putem kompetitivne inhibicije za zajednička receptorska mesta. Inhibicijsku aktivnost ovaj enzim pokazuje i prema t-PA, u-PA, XIIa, XIa i Xa, kalikreinu i trombinu [42].

### **2.3.6. Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1)**

PAI-1 je glikoprotein molekulske težine 45.000 Da, sastavljen iz jednog polipeptidnog lanca sa reaktivnom peptidnom vezom na mestu Arg<sup>345</sup>-Met<sup>346</sup>. Sinteza mu je pod kontrolom gena na hromozomu 7, a primarno mesto sinteze vaskularni endotel. Pored toga, u manjoj meri ga mogu sintetisati i hepatociti, fibroblasti, glatke mišićne ćelije, kao i neke maligne ćelije [43]. Nalazi se u plazmi u antigenoj koncentraciji od oko 20 ng/ml, ali se u značajnoj količini nalazi i u  $\alpha_2$  granulama trombocita, odakle se oslobađa pri njihovoj aktivaciji. Osim aktivne inhibitorne forme, koja se spontano pretvara u latentnu formu, postoji i forma rascepljena na P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub> mestu, koja ne formira stabilne komplekse. Brojni su činioci koji mogu uzrokovati stvaranje i ekskreciju PAI-1, kao što su: trombin, interleukin-1 (IL-1), bakterijski endotoksini, faktor nekroze tumora (TNF), transformišući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), deksametazon i lipoproteini [33,34].

PAI-1 je značajna komponenta sistema plazminogen/plazmin, obzirom da je vodeći inhibitor t-PA i u-PA. Inhibitorno svojstvo ispoljava na taj način što prvo stvara reverzibilni kompleks sa aktivatorom plazminogena, da bi se nakon raskidanja jedne peptidne veze stvorila kovalentna veza i okončala inaktivacija. Poznato je da je PAI-1, uz trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI), glavni inhibitor plazmina u trombu. *In vitro* studije su pokazale da nivo PAI-1 vezanog za fibrin direktno utiče na rezistenciju tromba na fibrinolizu [44]. Osim toga, *in vivo* studijama je dokazano da su genetski modifikovane životinje bez PAI-1 gena znatno osetljivije na fibrinolizu veštački izazvane arterijske tromboze u odnosu na životinje koje imaju normalnu ekspresiju gena za PAI-1 [45]. U novije vreme, sve brojniji su dokazi da je povišen nivo PAI-1 praktično faktor rizika za razvoj koronarne srčane bolesti i infarkta miokarda, kao i ateroskleroze uopšte [46]. U subendotelnom matriksu, PAI-1 je zaštićen od inaktivacije i može funkcionisati tako što inhibira lokalnu proteolizu.

Osim uloge u regulaciji hemostaze, PAI-1 igra ulogu i u nekoliko drugih bioloških procesa zavisnih od aktivatora plazminogena ili plazminske aktivnosti. Studije sa miševima dokazale su funkcionalnu ulogu PAI-1 u zarastanju rana, metaboličkim poremećajima poput insulinske rezistencije i gojaznosti, tumorskoj angiogenezi, hroničnom stresu, astmi, reumatoidnom artritisu, fibrozi, remodeliranju kosti, glomerulonefritisu i sepsi (Slika 3). Ostaje da se razjasni da li ove uloge zavise od antiproteolizne aktivnosti PAI-1, njegovog vezivanja za vitronektin, glikoprotein koji olakšava i stabilizuje aktivaciju PAI-1 ili njegove interakcije sa celularnom migracijom [47,48].



Slika 3. Osnovne uloge PAI-1

### 2.3.7. Inhibitor aktivatora plazminogena-2 (PAI-2)

Ovaj glikoprotein prvo je otkriven u ekstraktu humane placentae. Kasnije je pronađen i u monocitima, leukocitima i makrofagima. Njegova plazmatska koncentracija raste tokom trudnoće, iznad 35  $\mu\text{mol/l}$  i naglo se smanjuje nakon porođaja, te se pretpostavlja da PAI-2 ostvaruje hemostaznu ulogu tokom trudnoće i porođaja. Ipak, u nekoliko slučajeva otkriven je i u plazmi muškaraca i žena koje nisu bile gravidne. Treba reći i da trudnice sa placentalnom insuficijencijom imaju nisku koncentraciju PAI-2, da su u preeklampsiji njegove koncentracije niže a koncentracije PAI-1 više nego kod žena sa nekomplikovanom trudnoćom [31].

PAI-2 se javlja u dva oblika, kao ćelijski PAI-2, čija je molekulska težina 46.000 Da, i kao glikozilirani oblik koji se izlučuje iz ćelija i čija je molekulska težina 70.000 Da.

### 2.3.8. Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor (TAFI)

Trombinom aktivirajući fibrinolizni inhibitor predstavlja direktnu sponu između koagulacionog i fibrinoliznog sistema [49]. Drugačije nazvan i prokarboksipeptidaza B ili karboksipeptidaza U, ovaj jednonačani glikoprotein, molekulske težine 60.000 Da, pripada familiji metalokarboksipeptidaza. Sintetiše se u jetri, a u krvotoku cirkuliše u formi

inaktivnog proenzima koji postaje aktiviran tokom procesa koagulacije. Najverovatniji fiziološki aktivatori TAFI su trombin (u kompleksu sa kofaktorom trombomodulinom), plazmin (u kompleksu sa polisaharidnim kofaktorima), kalikrein i tripsin [50,51].

Aktivna forma, TAFIa, može smanjiti fibrinoliznu aktivnost cepanjem C-terminalnih lizinskih rezidua od delom degradiranog fibrina, koji stimuliše konverziju plazminogena u plazmin indukovanu od strane t-PA. Posledica ovoga je smanjeno vezivanje plazminogena za površinu fibrina. Pored toga, TAFIa odlaže lizu ugruška posredovanu i drugim aktivatorima plazminogena [52]. Dakle, ovaj činilac nije klasičan inhibitor fibrinolize nego enzim koji može modulirati njenu aktivnost.

Pretpostavlja se da upravo TAFI igra ključnu ulogu u interakciji prokoagulantnih, antikoagulantnih i fibrinoliznih mehanizama [53] i da bi njegova inhibicija mogla znatno doprineti popravljaju snižene fibrinolizne aktivnosti i povećanju efikasnosti fibrinolitičke terapije u trombozama.

### **2.3.9. Ostali inhibitori fibrinolize**

Pored navedenih, vodećih inhibitora fibrinolize, i sledeći činioci mogu igrati određenu ulogu u suprimiranju fibrinoliznog potencijala:

$\alpha_2$ -makroglobulin - Ovu termostabilnu serinsku proteazu sintetišu ćelije jetre, endotelne ćelije, monociti i makrofagne ćelije. Osnovna uloga  $\alpha_2$ -makroglobulina je neposredna, brza i reverzibilna inhibicija plazmina. Inhibitorski efekat ispoljava i prema t-PA, kompleksu streptokinaza-plazminogen, trombinu, tripsinu, himotripsinu, kalikreinu i elastazi. Pored toga, razgrađuje fibrin, fibrinogen i faktor VIII koagulacije. Povišeni nivoi  $\alpha_2$ -makroglobulina sreću se u trudnoći, nefrotskom sindromu, nekim bolestima jetre i pluća i tokom korišćenja oralnih kontraceptiva. Pored toga, ovaj činilac je i protein akutne faze.

$\alpha_1$ -antitripsin - Povišeni nivoi ovog inhibitora fibrinolize se osim u slučaju snižene fibrinolizne aktivnosti mogu sresti i u zapaljenju, tumorima i tokom primene estrogenske terapije.

C1 esterazni inhibitor - Njegova osnovna uloga je inhibicija prve komponente komplekta, potom inhibicija kalikreina, faktora XIa i XIIa, ali i plazmina. Zapažena je udruženost deficita C1 inhibitora i hereditarnog angioedema bez krvarenja.

Antitrombin – On je na prvom mestu primarni inhibitor trombina, kao i nekih faktora koagulacije, ali pored toga sporo i ireverzibilno inhibiše i obično vrlo male količine plazmina [33,34].

XIII faktor koagulacije – Fosfolipidne membrane aktiviranih trombocita, monocita i endotela predstavljaju idealnu podlogu za aktivaciju koagulacionih faktora, a među njima i faktora XIII, koji u odvijanju fibrinoliznog procesa ima poseban značaj. Stvarajući unakrsne veze između fibrina i PAI-1, PAI-2,  $\alpha_2$ -antiplazmina, TAFI i apolipoproteina (a), aktivirani

faktor XIII znatno utiče na strukturu i stabilnost tromba u smislu jačanja njegove strukture i inhibiranja lize tromba [54].

Histidinski glikoprotein – To je glikoprotein molekulske težine 75.000 Da, koji poseduje jedno područje sa velikim brojem molekula histidina. Ova regija ima visok afinitet prema plazminogenu koga inhibira, obzirom da sprečava vezivanje plazminogena za fibrinogen. Čak oko 50% ukupnog cirkulišućeg plazminogena vezano je za histidinski glikoprotein u vidu reverzibilnog kompleksa. Na taj način je znatno smanjena količina plazminogena raspoloživog za vezivanje sa fibrinom u toku procesa koagulacije i nakon njega.

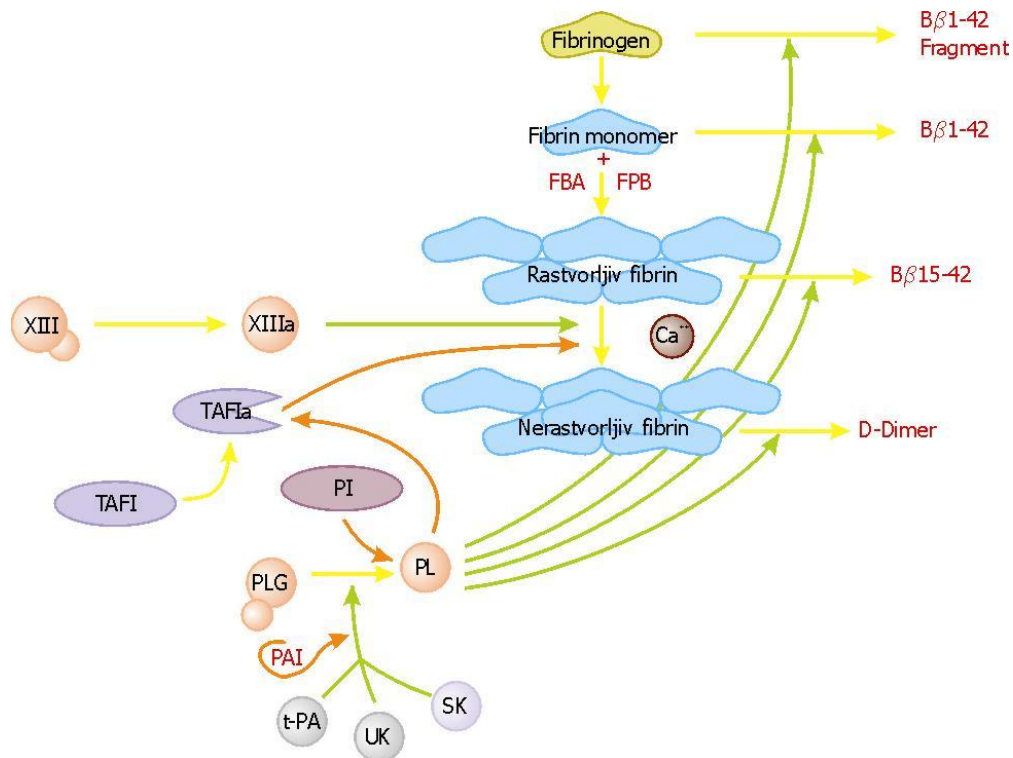
#### **2.3.10. Trombospondin**

Trombospondin je specifični regulator fibrinoliznog procesa. To je glikoprotein molekulske težine 450.000 Da koji se oslobađa tokom aktivacije trombocita iz njihovih  $\alpha$ -granula. U prisustvu fibrina on usporava aktivaciju plazminogena, a ukoliko fibrina nema, trombospondin višestruko ubrzava aktivaciju plazminogena od strane t-PA [55].

### **2.4. Mehanizam fibrinoliznog procesa**

Glavnu kariku fibrinoliznog mehanizma čini proteolizni enzim plazmin, koji se u plazmi nalazi u formi svog neaktivnog proenzima plazminogena. Za aktivaciju plazminogena i nastanak plazmina odgovorni su aktivatori plazminogena (kinaze). Do njihovog oslobađanja dolazi pri povredi krvnog suda, iz njegovih endotelnih ćelija, ali i u uslovima delovanja vazoaktivnih amina, hipertermije i fizičkog rada.

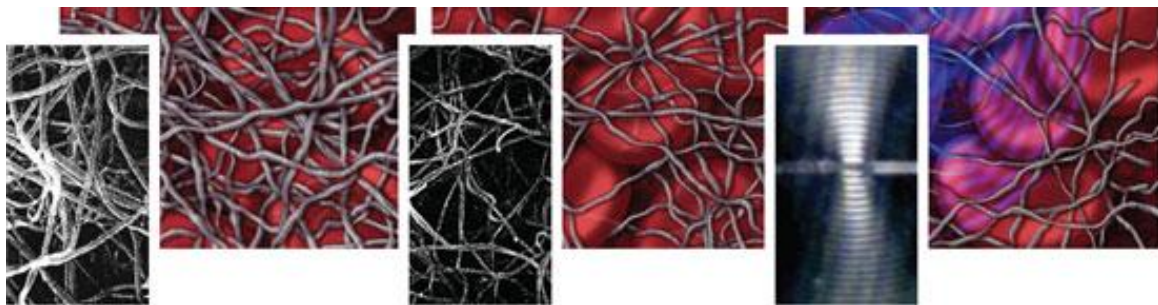
Osnovni aktivatori plazminogena su tkivni aktivator plazminogena (t-PA) i mokraćni aktivator plazminogena (u-PA). Osim njih, plazminogen aktiviraju i XII činilac koagulacije, trombin, kao i enzimi nekih bakterija [1]. Oslobađanjem t-PA ili pojavom aktivne urokinaze nastaju optimalni uslovi za aktivaciju procesa fibrinolize. Ipak, da bi se formirao plazmin neophodno je da se pojave fibrinska vlakna koja su supstrat za njegovo delovanje. U procesu koagulacije, za fibrin se veže izvesna količina plazminogena iz plazme i ista količina  $\alpha_2$ -antiplazmina. Obzirom da je za fibrin vezan i t-PA, nastaje kompleks aktivatora plazminogena, Glu-plazminogena i fibrina, što omogućava konverziju plazminogena u plazmin. Najveći deo plazmina vezanog za fibrin će biti inaktivisan dejstvom  $\alpha_2$ -antiplazmina, takođe vezanog za fibrin, čime će biti onemogućena prerana liza koaguluma. Da bi se započeta fibrinoliza nastavila potrebno je da se nove količine aktivatora vezuju za fibrin, što rezultuje daljom produkcijom plazmina koji sada postepeno počinje da razlaže fibrin. Na ogoljene regije, nastale razgradnjom fibrina, vezuju se novi molekuli plazminogena, koji dejstvom aktivatora bivaju transformisani u plazmin koji konačno uspeva da nadvlada inhibitorne činioce, te da omogući definitivnu razgradnju koaguluma (Slika 4).



Slika 4 . Fibrinolizni mehanizam

#### 2.4.1. Fiziološka regulacija fibrinoliznog procesa

Fiziološki odgovor na formiranje hemostaznog koaguluma ili tromba zahteva besprekorno koordinisanu interakciju brojnih aktivatora, proenzima, enzima, inhibitora i receptora fibrinoliznog mehanizma u cilju lokalne aktivacije fibrinolize (Slika 5).



Slika 5. Razgradnja fibrina pod uticajem fibrinoliznog mehanizma

Ovaj proces regulisan je koncentracijom plazminogena, aktivatora i inhibitora fibrinolize na mestu formiranja fibrina, kao i vezivanjem fibrinoliznih činilaca za fibrinske, ćelijske i komponente matriksa tromba. Plazminogen se vezuje za fibrin uporedo sa njegovom polimerizacijom i ugrađuje se u tromb vezivanjem regulisanim preko lizin-vezujućih mesta na "perecnim" domenima. Aktivacija vezanog plazminogena olakšana je vezivanjem t-PA za fibrin, kao i porastom aktivnosti kako tPA, tako i scuPA, u prisustvu fibrina [56]. Brzo delujući inhibitori, kao što su inhibitor plazmina i PAI-1 efikasni su u

inhibiranju slobodnog plazmina ili t-PA ali ne i enzima vezanih za fibrin, te dozvoljavaju lokalizovanu plazminsku proteolizu fibrina, istovremeno prevenirajući sistemsku aktivaciju fibrinolize.

Ukoliko posmatramo regulaciju fibrinoliznog mehanizma na nivou endotelnih ćelija, treba istaći da one poseduju vezujuća mesta za plazminogen, plazmin i aktivatore plazminogena. Sekretija t-PA od strane ovih ćelija može biti stimulisana fibrinom, vezivanjem trombina za tromb ili efektima same okluzije krvnog suda, te se na ovaj način povećava lokalna koncentracija aktivatora plazminogena. Pored toga, fibrin može inhibirati sekreciju PAI-1 od strane endotelnih ćelija, na taj način sprečavajući inaktivaciju sekretovanog t-PA [57]. Dakle, endotelne ćelije interreaguju sa fibrinoliznim sistemom kako bi na adekvatan način modulirale njegovu aktivnost u cilju održavanja netrombogenih svojstava endotela, uz očuvanje punog vaskularnog potencijala intaktnih krvnih sudova u smislu adekvatnog fibrinoliznog odgovora u slučaju pojave novostvorenih depozita fibrina.

Regulacija fibrinoliznog procesa odvija se i na nivou trombocita, pri čemu je od velikog značaja upravo sadržaj trombocitnih granula. Tako trombociti mogu vezivati i plazminogen i t-PA povećavajući na taj način stvaranje plazmina, ali mogu i ograničavati fibrinolizni proces putem sekrecije PAI-1 i inhibitora plazmina skladištenih u  $\alpha$ -granulama [58].

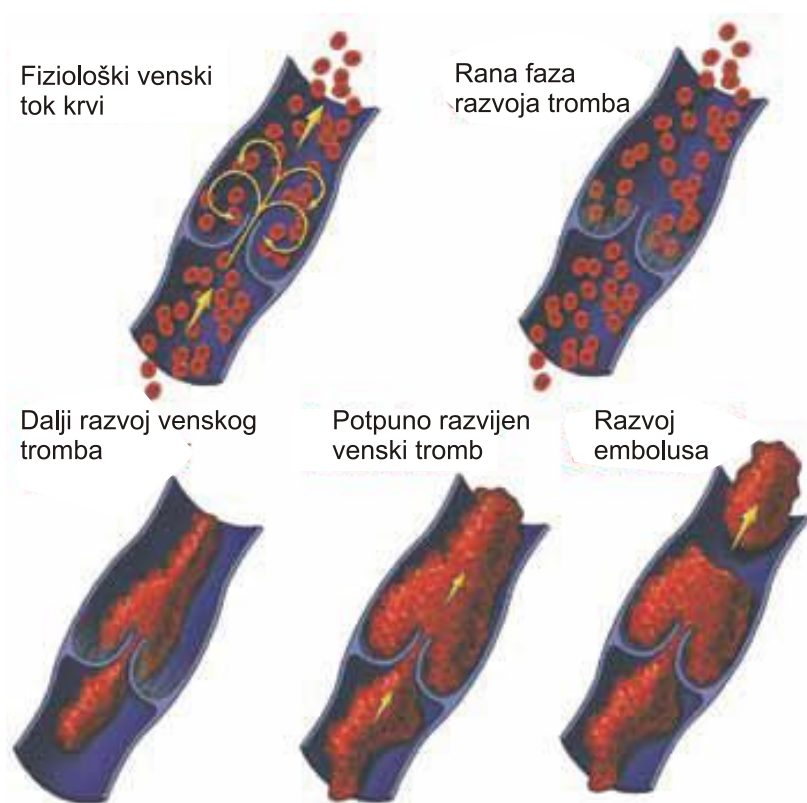
Inicijalno dejstvo plazmina na krvni ugrušak ubrzava fibrinolizu preko nekoliko mehanizama pozitivne povratne sprege. Tako plazmin pretvara Glu u Lys-plazminogen koji ispoljava znatno veći afinitet prema fibrinu, pretvara jednolančani t-PA u dvolančanu formu, što olakšava njegovo vezivanje za fibrin a pri cepanju plazmina eksponiraju se nova mesta za vezivanje plazminogena i t-PA [1]. Sa druge strane pak, postoje i osobine ugruška koje služe da smanje i uspore njegovo razlaganje, što je svakako povoljno u slučaju zaštite hemostatskog koaguluma ali nije toliko poželjno u slučaju tromba. Tako mala površina endotela koja pripada na njoj formiranom velikom ugrušku limitira količinu lokalnog t-PA, dok potpuno suprotno, u slučaju postojanja mikrovaskularnih ugrušaka, povećan odnos endotelne površine i volumena ugruška može rezultovati njegovom bržom i potpunijom lizom.

Uticaj na razlaganje stvorenog ugruška svakako imaju i fibrinolizni inhibitori. Tako PAI-1 vezan za fibrin inhibira i t-PA i u-PA, a u kompleksu sa t-PA takmiči se sa slobodnim t-PA za vezujuća mesta na molekuli fibrina. Pored toga, PAI-1 vezan za subendotelni matriks prevenira aktivaciju plazminogena na mestima oštećenja krvnog suda, održavajući hemostazni integritet i štiteći matriks od proteolizne degradacije. Istovremeno, FXIII koagulacije vezuje ukrštenim vezama inhibitor plazmina za  $\alpha$  lance fibrina. Na ove načine su inhibitori t-PA i plazmina specifično lokalizovani na ugrušku, sa ciljem smanjenja njegove fibrinolizne degradacije. Pored toga, sporo formiranje unakrsnih veza fibrinskih  $\alpha$  lanaca u cilju formiranja velikih polimera, uz pomoć faktora XIIIa, čini fibrin otpornijim na degradaciju u plazmi, doprinoseći otpornosti starijih ugruška na fibrinolizu. Konačno, TAFI kida novoeksponirana mesta za vezivanje plazmina te na taj način smanjuje vezivanje t-PA i plazminogena [59].

### 3. VENSKA TROMBOZA

#### 3.1. Osnovne karakteristike

Tromboza predstavlja proces formiranja krvnog ugruška koji nastaje kao posledica disbalansa prokoagulantnih, antikoagulantnih i fibrinoliznih faktora. Za razliku od arterijske tromboze *in situ* koja predstavlja kritičan momenat dugotrajnog i progresivnog aterosklerotskog procesa, razvoj venskog tromba je relativno iznenađan i pojavljuje se u sklopu akutnih i tranzitornih okolnosti. Međutim, situacija je po pitanju pojave simptoma često potpuno obrnuta. Tako se simptomi arterijske tromboze obično javljaju naglo, dok se u slučaju venske tromboze mogu razvijati sporo, te se vreme početka samog događaja ponekad ne može jasno definisati (Slika 6).



Slika 6. Razvoj venskog tromba i embolusa

U osnovi današnjeg shvatanja procesa venske tromboze je Virchow-ljev postulat o tri vodeća uzroka tromboze: promene u zidu krvnog suda, promene u protoku krvi i promene u sastavu krvi [60], pri čemu u slučaju venske tromboze dominantnu ulogu imaju poslednja dva uzročna mehanizma.

Venska tromboza najčešće se manifestuje kao tromboza dubokih vena nogu (DVT) ili kao plućni embolizam (PE), a znatno ređe može se pojaviti i u drugim venama, poput vena gornjih ekstremiteta, jetre, retine, cerebralnih sinusa, mezenterijuma. Incidenca venske tromboze je 108/100.000 osoba godišnje među Evropljanima, dok se u USA beleži oko 250.000 novih slučajeva godišnje među belcima i 78/100.000 osoba godišnje među

Afroamerikancima [61]. Tromboza dubokih vena može dovesti do razvoja hroničnih komplikacija u vidu posttrombotskog sindroma (PTS) koji se pojavljuje u oko 20% pacijenata, dok kao posledica plućne embolije može nastati hronična plućna hipertenzija. Stopa smrtnosti u sklopu venske tromboze, koja je u najvećoj meri posledica plućne embolije, iznosi od 1% u mlađoj populaciji pacijenata do 10% u starijoj populaciji, a najviša je kod osoba sa malignitetom u osnovi bolesti [62,63]. Aktuelni podaci pokazuju da je stopa smrtnosti u okviru prvih 30 dana nakon nastanka prve venske tromboze 6,4%, a jednogodišnji mortalitet 21,6% kada su u obzir uzeti svi pacijenti koji su doživeli vensku trombozu [64]. Ovako visoka stopa mortaliteta uglavnom je odraz visoke učestalosti venskih tromboznih incidenata kod bolesnika sa malignim bolestima. Međutim, čak i kada se isključe pacijenti sa karcinomom, značajan rizik od nastanka smrtnog ishoda ostaje i dalje prisutan i iznosi 3,6% nakon jednog meseca i 12,6% nakon jedne godine. Jednogodišnja stopa mortaliteta je jednaka za DVT i PE što ukazuje na presudan uticaj osnovne bolesti (poremećaja), dok je stopa mortaliteta u prvih mesec dana dvostruko viša u slučaju PE u poređenju sa DVT (10% vs 5%) ukazujući na efekat same tromboze.

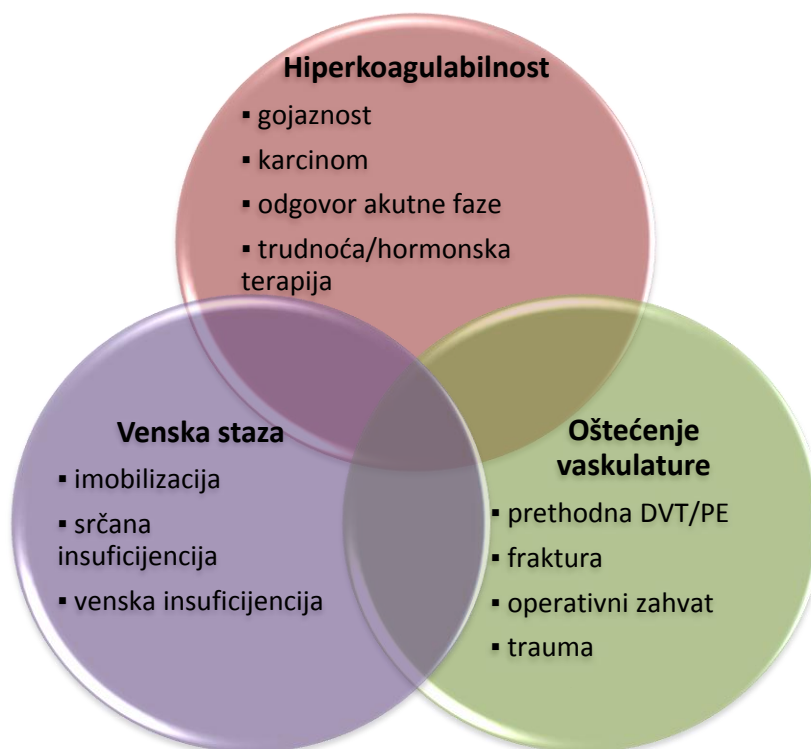
Zastupljenost venske tromboze u muškoj i ženskoj populaciji je približno jednaka, sa slabom prevagom u korist žena u mlađem životnom dobu, što je povezano sa rizicima koji sa sobom nose upotreba oralnih kontraceptiva, trudnoća i puerperijum. Treba istaći da je incidenca venske tromboze veoma zavisna od godina, te raste od 1/100.000 godišnje u dečijem uzrastu do čak 1/100 godišnje u najstarijem životnom dobu [65], kao i to da se radi o rekurentnoj bolesti gde jedna trećina pacijenata dobije recidiv unutar 10 godina. Rizik od nastanka recidiva najviši je u prvih 6 do 12 meseci od prethodnog događaja, viši je kod muškaraca, kao i nakon idiopatskih tromboza.

Prvo što moramo imati na umu uvek kada se suočavamo sa venskom trombozom je da je u osnovi njene prirode multikauzalnost, te da je za njen nastanak potrebno istovremeno prisustvo više faktora rizika. Rizik za nastanak bolesti koji dodaje svaki pojedinačni faktor može se jednostavno sumirati na efekat ostalih faktora ili pak umnožavati sa njima [66]. Upravo iz ovog razloga razmatranje pojedinačnih faktora rizika za nastanak venske tromboze je u izvesnoj meri nerealno, pa čak i nesvrshodno, obzirom da gotovo ni jedan od njih nije u stanju da dovede sam do razvoja bolesti i da će efekat svakog od pojedinačnih faktora zavisiti upravo od prisustva ili odsustva drugih faktora rizika. Iz didaktičkih razloga pak, faktore rizika za nastanak venske tromboze možemo pojedinačno definisati i klasifikovati.

### **3.2. Faktori rizika**

Venska tromboza je bolest u kojoj se nasledni i stečeni faktori rizika dinamično prepliću. Uporedo sa razvojem svesti o značaju primene različitih profilaktičkih tretmana, uticaj stečenih faktora rizika se smanjuje ali oni još uvek doprinose nastanku značajnog broja venskih tromboznih incidenata (Slika 7).





Slika 7. Najučestaliji faktori rizika za nastanak venske tromboze

### 3.2.1. Stečeni faktori rizika

#### 3.2.1.1. Životno doba

Ovo je najsnažniji faktor rizika za nastanak venske tromboze, sa izrazito strmim gradijentom porasta. Tako je dobro poznato da je incidenca čak 1000 puta viša kod najstarije populacije u poređenju sa najmlađom [61], ali još uvek nije razjašnjeno zašto je ova razlika tako drastična. Logično je da ovakvoj situaciji idu u prilog smanjena pokretljivost, smanjen mišićni tonus, porast incidence bolesti, koji mogu biti doprinosni faktori rizika, akumuliranje drugih faktora rizika, kao i starenje samih vena, a naročito njihovih valvula.

#### 3.2.1.2. Imobilizacija

Sve okolnosti koje dovode do staze venskog krvotoka u ekstremitetima, kao što je to slučaj u sklopu dugotrajno smanjene pokretljivosti ili nepokretnosti, povećavaju rizik od nastanka venske tromboze. Najčešće se ovo dešava u sklopu dugotrajnog ležanja u krevetu, gipsane imobilizacije, paralize i trudnoće. Imobilizacija vodi smanjenoj mišićnoj aktivnosti koja je od ključnog značaja u odvođenju venske krvi sa periferije radom mišićne pumpe [67].

#### 3.2.1.3. Trudnoća i puerperijum

Kao što je venska tromboza u mlađoj populaciji retka, tako je retka i u okviru trudnoće i puerperijuma. Međutim, svakako treba imati na umu da je polovina venskih tromboznih incidenata koji se javljaju kod žena u reproduktivnom periodu vezana za trudnoću, kao i to da je incidenca DVT i PE nešto ispod 1/1000 porođaja [68], od čega se dve trećine zadesa

javlja se pre a jedna trećina nakon porođaja. Tokom same trudnoće, rizik za pojavu venske tromboze najviši je tokom trećeg trimestra, a većina tromboza je lokalizovana u levoj nozi, što je najverovatnije uslovljeno značajnijim pritiskom gravidnog uterusa na levu zajedničku ilijačnu venu [69]. Incidenca venske tromboze u sklopu trudnoće i postpartalnog perioda je oko 10 puta viša u poređenju sa populacijom žena koje nisu trudne, a povišen rizik od nastanka venske tromboze u ovim situacijama odraz je kombinacije različitih protrombotskih okolnosti, koje su naročito nepovoljne u slučaju postojanja deficita antitrombina koji je prisutan u oko 1/5000 u opštoj populaciji ali u isto vreme kod čak 12% pacijentkinja koje dožive vensku trombozu povezanu sa trudnoćom [68]. Žene sa FV Leiden mutacijom ili mutacijom gena za protrombin G20210A imaju 30-50 puta veći rizik za nastanak venske tromboze povezane sa trudnoćom u odnosu na žene koje nisu trudne i nemaju ove genske mutacije.

#### *3.2.1.4. Hirurške intervencije i trauma*

Operativni zahvati sa sobom nose izuzetno visok rizik od nastanka tromboze ukoliko se ne primeni adekvatna profilaksa. Ortopedske i neurohirurške intervencije prednjače u tome. Operacije kolena i kuka dovode do nastanka tromboze kod čak 30-50% osoba koje nisu dobijale tromboprofilaksu [70]. Visok rizik prati i abdominalnu, ginekološku i urološku hirurgiju. Treba istaći i to da je rizik najviši kod opsežnih operativnih zahvata, što je svakako u vezi i sa veličinom operativne rane i sa trajanjem intervencije i posledičnom imobilizacijom, no u ortopedskoj hirurgiji, čak i kratkotrajne intervencije koje nisu agresivne, poput artroskopije, imaju uticaj na porast rizika od nastanka venske tromboze koji se ne sme zanemariti. Pored operacija, i traume su vezane sa visokim rizikom od nastanka tromboze, naročito povrede glave, kičme, frakture karlice, femura i tibije. Pored toga, čak i male povrede, poput ruptur mišića ili uganuća članka povećavaju pet puta rizik od nastanka venskog tromba [71].

#### *3.2.1.5. Malignitet*

Prisustvo maligniteta povećava rizik od nastanka venske tromboze za oko pet puta [72], ali je on različito visok u zavisnosti od tipa karcinoma. Malignitet ima uticaj na nastanak tromboze putem nekolicine patofizioloških mehanizama. Mnoge maligne ćelije imaju sposobnost produkcije tkivnog faktora, favorizujući na taj način prokoagulantno stanje. Apoptoza dovodi do formiranja mikroparticli koje mogu sadržavati tkivni faktor [73]. Pored ovoga, veliki tumori mogu dovesti direktnim, mehaničkim efektom do kompresije i venske opstrukcije. Hemoterapija, koja se veoma često koristi u ovakvim okolnostima može biti trombogena [74]. Konačno, tok ove bolesti u većini slučajeva dovodi do slabije pokretljivosti, koja je još jedan doprinosni faktor za nastanak tromboze u ovom slučaju.

#### *3.2.1.6. Antifosfolipidna antitela*

Osobe koje imaju prisutna antifosfolipidna antitela (bilo u slopu sistemskog eritemskog lupusa ili ne) imaju i povišen rizik od nastanka venske tromboze. Lupusni antikoagulansi

nalazi se kod nekoliko procenata pacijenata sa venskim trombozama i sam po sebi povećava rizik od nastanka ove bolesti za oko četiri puta [75].

#### *3.2.1.7. Duža putovanja*

Venska tromboza pogađa 1/4500 putnika koji lete avionom i 1/1200 putnika čiji let traje duže od 16 časova [76]. Nema sumnje da je dugotrajno sedenje vodeći faktor koji doprinosi razvoju tromboze u ovoj situaciji, ali u obzir treba uzeti i hipoksične uslove u kabini koji mogu dovesti do hiperkoagulabilnosti kod manjeg broja pojedinaca, naročito onih sa već prisutnim urođenim ili stečenim protrombotskim stanjima. Rizik od nastanka venske tromboze nije ograničen samo na avionski saobraćaj, prisutan je i u dugotrajnim putovanjima kolima, autobusom ili vozom ali je ipak nešto niži nego u sklopu putovanja avionom [77].

#### *3.2.1.8. Životne navike*

Redovna fizička aktivnost smanjuje rizik od nastanka venske tromboze [78], dok gojaznost povećava ovaj rizik za više od dva puta [79]. Iako prema podacima iz ranijih studija pušenje nije smatrano faktorom rizika za nastanak ovog oboljenja, rezultati novih istraživanja dokazuju da ono za 2-3 puta povećava rizik [80]. Tačan mehanizam nije još uvek objašnjen ali je moguće da veza leži u njegovim proinflamatornim efektima. Sa druge strane, umereno konzumiranje alkohola predstavlja činilac koji smanjuje rizik od nastanka venske tromboze [81], što se najviše dovodi u vezu sa njegovim uticajem na smanjenje nivoa fibrinogena. Kada je o životnim navikama reč, treba pomenuti i to da noviji radovi sugerišu da je umereno konzumiranje kafe povezano sa smanjenjem rizika od nastanka venske tromboze, a autori ovakve rezultate objašnjavaju uticajem ove životne navike na nivo von Willebrand-ovog faktora i FVIII koagulacije [82].

#### *3.2.1.9. Hormonska terapija*

Veza između upotrebe oralnih kontraceptiva i pojave venske tromboze potvrđena je vrlo brzo nakon pojave ove vrste lekova, a aktuelna je i danas, i u slučaju najnovijih generacija ovih preparata [83]. Treba istaći da upotreba oralnih kontraceptiva povećava rizik od nastanka venske tromboze samo tokom njihove primene, kao i to da je ovaj rizik najviši tokom prve godine upotrebe [84]. Takođe, ne sme se zaboraviti činjenica da je upotreba ovih lekova naročito rizična kod žena koje imaju deficit prirodnih inhibitora koagulacije antitrombina, protein C i proteina S [85], kao i trombofilne genske mutacije - FV Leiden i protrombin 20210A mutaciju [86].

Hormonska supstitucionalna terapija povećava rizik od nastanka venske tromboze za dva do četiri puta [87] ali je rizik pri transdermalnoj primeni estrogena značajno niži nego u slučaju peroralne primene [88].

### **3.2.2. Nasledni faktori rizika**

#### *3.2.2.1. Deficit prirodnih inhibitora koagulacije*

Deficiti proteina C, proteina S i antitrombina sreću se ukupno u manje od 1% opšte populacije i kod svega nekoliko procenata osoba koje dožive venski trombozni incident. Međutim, u pojedinim familijama sa naslednom trombofilijom sreću se češće i pokazuju veliku fenotipsku penetrantnost sa rekurentnim trombozama u mlađem životnom dobu [89].

#### *3.2.2.2. Faktor V Leiden*

Faktor V Leiden, otkriven 1994 godine, česta je genetska trombogeneza mutacija sa prevalencijom od oko 5% u populaciji belaca. U populaciji pacijenata sa venskom trombozom pak ovu mutaciju možemo naći kod oko 20% osoba i u oko 50% osoba sa naslednom trombofilijom [90]. Rizik od nastanka venske tromboze povećan je pet puta kod heterozigotnih nosilaca FV Leiden mutacije i čak pedeset-osamdeset puta kod homozigotnih nosilaca koji se sreću u otprilike 1/5000 osoba [91].

#### *3.2.2.3. Protrombin 20210A*

Protrombin 20210A mutacija dovodi do porasta nivoa FII koagulacije koji je udružen sa povišenim rizikom od nastanka venske tromboze [92]. Ova mutacija je relativno česta u opštoj, i to gotovo isključivo beloj populaciji, sa regionalnim razlikama u prevalenciji. Ona povećava rizik od nastanka venske tromboze za dva do tri puta i sreće se u oko 6% pacijenata sa ovim oboljenjem [93]. Kako su i FV Leiden i FII 20210A mutacija relativno česte u opštoj populaciji, to nije redak slučaj njihove udružene pojave, koja za čak dvadeset puta povećava rizik od nastanka venske tromboze [94].

#### *3.2.2.4. Novootkrivene genske mutacije*

Mutacija u genu za sintezu  $\gamma$ -lanca fibrinogena, na poziciji 10034 dvostruko povećava rizik od nastanka venske tromboze. Za još nekolicinu point mutacija u sva tri gena odgovorna za sintezu fibrinogena je potvrđeno da povećavaju rizik za nastanak ove bolesti ali u znatno manjoj meri od prethodne mutacije. Pored ovoga i mutacije u promoterskoj regiji proteina C na pozicijama 2404 i 2418, udružene sa njegovim umereno sniženim nivoima, povećavaju za 30-60% rizik od nastanka venske tromboze [95].

#### *3.2.2.5. Krvna grupa*

Osobe koje nemaju 0 krvnu grupu imaju dva do četiri puta viši rizik da dožive venski trombozni incident u poređenju sa nosiocima ove krvne grupe, što se dovodi u vezu sa povišenim antigenim nivoom FVIII koagulacije [96].

### **3.2.3. Ostali faktori rizika**

#### *3.2.3.1. Povišen nivo faktora koagulacije*

Faktori VIII, IX, XI, protrombin i fibrinogen dovedeni su u vezu sa povišenim rizikom od venske tromboze i to tako što proporcionalno njihovom porastu raste i rizik. Nivoi ovih faktora u okviru desetog percentila udruženi su sa dva do tri puta povišenim rizikom za nastanak pomenute bolesti [97], što važi i za snižen nivo TFPI [98]. Treba reći i to da nije u potpunosti razjašnjeno da li je poreklo povišenog nivoa pomenutih faktora koagulacije urođeno ili stečeno, izuzev u slučaju faktora VIII za koji je potvrđeno da je povezan sa ABO krvnom grupom [99].

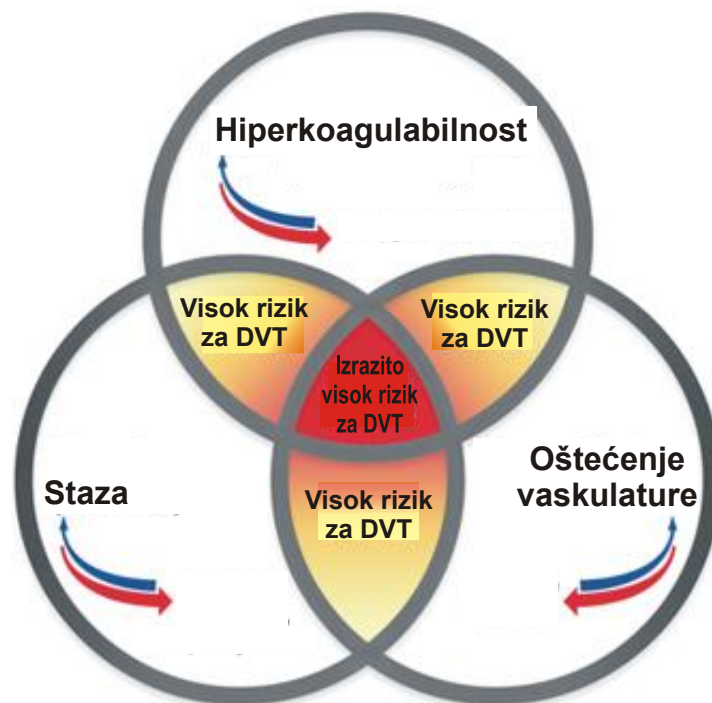
#### *3.2.3.2. Poremećaj fibrinoliznog mehanizma*

Poslednjih godina veoma su aktuelna ispitivanja uloge fibrinoliznog mehanizma u nastanku kako arterijskih, tako i venskih tromboza. Dokazano je da osobe sa smanjenim fibrinoliznim potencijalom, procenjenim na osnovu vremena lize koaguluma (CLT) imaju dvostruko viši rizik od nastanka venske tromboze ali još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno koji delovi fibrinoliznog sistema i na koji tačno način doprinose porastu ovoga rizika [100,101].

## **3.3. Kliničke manifestacije**

Simptomi i znaci tromboze dubokih vena posledica su opstrukcije jedne ili više vena, najčešće donjih ekstremiteta, krvnim ugruškom, odnosno trombom čija veličina i lokalizacija u najvećoj meri i definišu kliničku sliku.

Na samom početku važno je istaći da se ne sme zanemariti činjenica da je u značajnom procentu pacijenata koji dožive trombozu dubokih vena ona asimptomatska, ali sa sobom nosi rizik od nastanka komplikacija koji je jednak riziku u slučaju simptomatske venske tromboze, te da se ovo mora imati na umu u svim situacijama koje su prepoznate kao situacije povišenog rizika za nastanak ovog oboljenja, a suštinski se odnose na tri postulata koja obuhvata već pomenuta Virchow-ljeva trijada [102] (Slika 7).



Slika 7. Virchowljeva trijada i rizik za nastanak tromboze dubokih vena

Najučestaliji simptomi i znaci koji prate trombozu dubokih vena jesu: bol, otok, osećaj težine, osećaj "mravinjanja" i slaba plavičasto-crvena prebojenost kože, distalno od mesta okluzije trombom. Bol nije karakterističan i varira u širokom dijapazonu, od bolnosti do grčeva, od tupog do oštrog, od slabog do intenzivnog. Može biti prolaznog karaktera ili stalno prisutan, ali se obično pri stajanju i hodu pojačava, dok se pri elevaciji noge smanjuje. Veoma je interesantno da lokalizacija bola nije u vezi sa mestom nastanka tromba kao i to da njegov intenzitet ne zavisi od veličine i proširenosti tromboze. Unilateralni edem je čest pratilac tromboze dubokih vena a javlja se najčešće kao posledica lokalne opstrukcije venske drenaže i posledičnog porasta hidrostatskog pritiska u distalnom kapilarnom sistemu. Ukoliko postoji inflamatorna komponenta praćen je i bolom i crvenilom. Retke, ali teške, pa čak i životno ugrožavajuće forme tromboze dubokih vena manifestuju se kao Phlegmasia alba dolens, u sklopu koje dolazi do udruženog razvoja iliofemoralne tromboze i arterijskog spazma na ovom segmentu i Phlegmasia cerulea dolens koju karakteriše istovremena opstrukcija dubokih, površnih i kolateralnih vena. Od svih pacijenata sa simptomatskom trombozom dubokih vena noge samo 30-40% ima pozitivan Homans-ov znak, odnosno bol koji je provociran dorzofleksijom stopala, kao što i čak 50% osoba koje su klinički suspektne na postojanje ovog oboljenja ali kod koji ono kasnije bude isključeno, takođe imaju pozitivan pomenuti znak. Iako mu je prediktivna vrednost nesumnjivo mala, još uvek je široko rasprostranjeno njegovo korišćenje.

Kod određenog broja bolesnika koji dožive trombozu dubokih vena klinički tok bolesti može ići u pravcu razvoja posttrombotskog sindroma čiji su osnovni simptomi i znaci: bol, oticanje, svrab i peckanje, dok se u težim formama mogu pojaviti i venske ulceracije. Navedeni simptomi su tipično najintenzivniji krajem dana a nakon odmora se smanjuju.

Razlog za nastanak ove komplikacije treba tražiti u razvoju venske hipertenzije u sistemu dubokih vena, koja uz nefunkcionalnost perforantnih vena, vodi preusmeravanju toka krvi iz dubokog u površni venski sistem tokom mišićnih kontrakcija [103,104].

Još uvek je aktuelno stanovište da su tromboza dubokih vena i plućna embolija entiteti koji zajedno čine spektar iste bolesti, ali se u poslednje vreme pojavljuju i gledišta da plućna embolija može nastati i kao oboljenje in situ u plućnoj cirkulaciji. Njene kliničke manifestacije pak mogu varirati od u potpunosti asimptomatskih formi, koje se otkriju slučajno, do masivnog embolizma koji uzrokuje smrtni ishod, što zavisi od veličine krnog ugruška, dela plućnog vaskularnog korita koji je zahvaćen trombozom, ali i od prethodnog zdravstvenog stanja pacijenta, naročito u odnosu na kardiovaskularni sistem i funkciju pluća. Kod najvećeg broja pacijenata plućna embolija manifestovaće se pojavom bola ili opresije u grudima, dispneje, hemoptizija. Cirkulatorni kolaps, koji sugeriše postojanje masivne plućne embolije posledica je akutne insuficijencije desne komore i može biti prva linička manifestacija ovog oboljenja. Treba svakako istaći i to da se kod 1-2% pacijenata koji prežive plućnu tromboemboliju, u daljem toku bolesti razvija hrončna plućna hipertenzija čije su osnovne kliničke karakteristike progresivna, iscrpljujuća dispnea i netolerancija na fizički napor [105].

### **3.4. Dijagnostički pristup**

#### ***3.4.1. Dijagnostički pristup pri sumnji na postojanje tromboze dubokih vena***

Na osnovu dosadašnjih saznanja na polju tromboze dubokih vena, idealna strategija u dijagnostičkom pristupu pri sumnji na postojanje ovog oboljenja obuhvata kombinaciju procene kliničke verovatnoće, određivanje D-dimera i primenu ultrazvučnog imaging testiranja.

##### *3.4.1.1. Procena kliničke verovatnoće*

Procena kliničke verovatnoće postojanja tromboze dubokih vena svakako je nespecifična metoda, ali ukoliko je na pravilan način sprovedena, ukoliko uključuje sve validne znake, simptome i faktore rizika, tada joj se ne može osporiti značaj u kategorisanju pacijenata na one sa niskom, umerenom ili visokom verovatnoćom za postojanje ovog oboljenja. Treba napomenuti da gotovo sve aktuelne dijagnostičke strategije za trombozu dubokih vena uključuju procenu kliničke verovatnoće, obzirom da je neosporno dokazana njena bezbednost ali i korisnost. Takođe, potvrđeno je da je implementacija procene kliničke verovatnoće u vodiče za dijagnostiku venskog tromboembolizma udružena sa nižom stopom mortaliteta, te najviše iz tog razloga njihovu primenu treba podsticati [106].

Na slici 8. prikazan je Wells-ov skor, opšte prihvaćeni način na koji se boduju pojedini simptomi, znaci i faktori rizika, pri čemu skor niži od 1 podrazumeva nisku, skor 1 ili 2 umerenu, a skor viši od 2 visoku kliničku verovatnoću postojanja tromboze dubokih vena [107].

WELLS-ov SKOR za DVT	
• Aktivni karcinom (terapija aktuelna ili tokom prethodnih 6 meseci ili palijativni pristup)	1
• Paraliza, pareza ili gipsana imobilizacija donjih ekstremiteta u skorije vreme	1
• Trodnevna ili duža nepokretnost u skorije vreme ili major hirurgija uz opštu ili regionalnu anesteziju u prethodnih 12 nedelja	1
• Lokalizovana bolnost duž dubokog venskog sistema	1
• Otok cele noge	1
• Otok podkolenice > 3cm u poređenju sa asimptomatskom nogom (mereno 10cm ispod tuberozitasa tibie)	1
• Unilateralni edem ograničen na simptomatsku nogu	1
• Nevarikozne kolaterale površnih vena	1
• Prethodna epizoda DVT	1
• Alternativna dijagnoza najmanje verovatna koliko i DVT	-2
<p>≤ 0: NISKA verovatnoća</p> <p>1 ili 2: UMERENA verovatnoća</p> <p>≥ 3: VISOKA verovatnoća</p>	

Slika 8. Wells-ov skor za procenu verovatnoće postojanja tromboze dubokih vena

#### 3.4.1.2. Određivanje D-dimera

Pored procene kliničke verovatnoće postojanja tromboze dubokih vena i određivanje D-dimera ima svoje mesto u racionalnom dijagnostičkom pristupu koji se odnosi na ovo oboljenje. Treba istaći i to da upravo kombinacija ove dve metode značajno povećava senzitivnost kliničkih skorova.

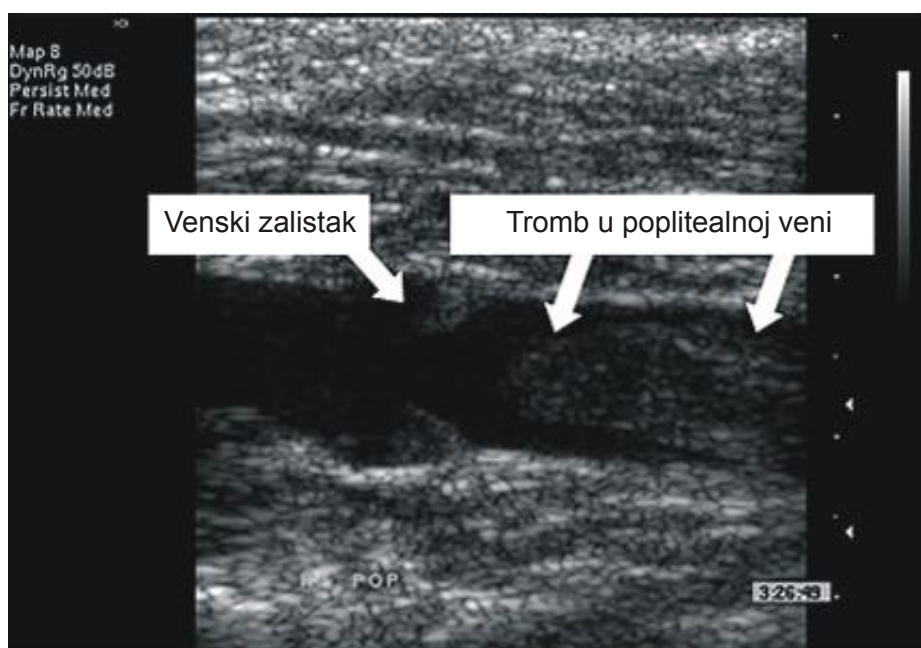
D-dimer, koji predstavlja degradacioni produkt fibrina, tipično je povišen u akutnoj venskoj trombozi. Iako mu je visoka senzitivnost velika prednost, najveći nedostatak ovoga testa je njegova veoma niska specifičnost, obzirom da se povišene vrednosti sreću i kod: skorihih operativnih zahvata, hemoragija, trauma, maligniteta, infekcija. Njegov nivo fiziološki se povećava tokom starenja i u sklopu trudnoće [108,109]. Dakle, određivanje D-dimera svakako treba uklopiti u dijagnostičku strategiju pri postojanju sumnje na trombozu dubokih vena, obzirom da se na osnovu fizioloških vrednosti ovoga parametra sa dosta velikom sigurnošću može isključiti postojanje pomenutog oboljenja. U slučaju povišenih vrednosti pak svakako se moraju primeniti dalji dijagnostički koraci.

#### 3.4.1.3. Imaging tehnike

Metoda izbora koju danas smatramo najznačajnijom stepenicom racionalnog dijagnostičkog pristupa u proveru klinički i laboratorijski postavljene sumnje na postojanje tromboze dubokih vena jeste venska kompresivna Doppler ultrasonografija, odnosno Duplex scan koji podrazumeva dopler u kombinaciji sa prikazom lumena krvnog suda u real time modu (Slika 9) [110]. Osnovna prednost pomenute dijagnostičke metode u slučaju sumnje



na postojanje tromboze dubokih vena je njena visoka specifičnost, dok joj je senzitivnost za proksimalni sistem dubokih vena oko 97%, a za distalni od 70 do 75% [111]. Upravo iz ovog razloga pojavile su se preporuke da se u slučaju negativnog nalaza, a visoke kliničke verovatnoće, analiza ponovi nakon nedelju dana, te da se serijskim testiranjem poveća senzitivnost dijagnostikovanja potkolenih tromboza dubokih vena sa tendencijom propagacije. Kako je krajnji zaključak studija koje su se bavile ovom problematikom taj da će se kod svega 1-2% pacijenata sa negativnim nalazom Duplex scana nakon serijskog testiranja potvrditi tromboza proksimalnih dubokih vena, ovaj pristup se nije pokazao opravdanim u smislu cost/effective odnosa [112]. Treba istaći i to da su rezultati tri aktuelne i kvalitetne studije potvrdili da je jedan Duplex scan celokupnog dubokog venskog sistema, na osnovu čijeg se negativnog rezultata isključuje postojanje tromboze u ovom sistemu dovoljno bezbedna strategija [113,114,115], kao i to da je senzitivnost ove metode u postavljanju dijagnoze potkolene tromboze dubokih vena ipak znatno veća od 70-75%, ukoliko analizu vrši iskusan dijagnostičar.



Poplitealna vena sa flotirajućim trombom (DVT)

*Slika 9. Duplex scan-om verifikovana tromboza vene poplitealis*

Kako su dosadašnja istraživanja pokazala, kompjuterizovana tomografska venografija (CTV) sa upotrebom intravenskog kontrasta mogla bi biti prihvatljiva dijagnostička imaging alternativa, ali još uvek se ne raspolaže sa dovoljnom količinom podataka koji se odnose na ovu metodu [116].

Iako u poređenju sa Duplex scanom, magnetna rezonanca (MR) ima približno istu tačnost, ova imaging analiza nije zadovoljavajuće standardizovana, neuporedivo je skuplja i dostupna je znatno manjem procentu opšte populacije [117]. Svoje mesto ova metoda

mogla bi u budućnosti pronaći u dijagnostici rekurentnih tromboza dubokih vena kod kojih je primena ultrazvučnih metoda nedovoljno pouzdana (Slika 10) [118].

Imaging tehnike	Prednosti	Nedostaci
Dupleks scan	Senzitivnost 97-100% specifičnost 98-99%, za proksimalnu DVT Neinvazivna, reproducibilna i široko dostupna Visoka senzitivnost u detektovanju distalnih tromboza	Teška za izvođenje kod ekstremno gojaznih pacijenata, teških edema, gipsanih ili drugih vrsta imobilizacija Smanjena mogućnost vizuelizacije poplitealne jame u slučaju distalne DVT
CT venografija	Neinvazivna Može dijagnostikovati karličnu DVT Istovremeno isključuje PE	Ograničeni podaci
Magnetna rezonanca	Visoka preciznost Bezbedna u trudnoći Neinvazivna	Skupa Nije široko dostupna
Kontrastna venografija	"Zlatni standard" Senzitivnost dostiže 100% Laka za interpretaciju	Invazivna Zahteva specijalizovanu opremu Retki ali teški neželjeni efekti

*Slika 10. Osnovne karakteristike različitih imaging tehnika u dijagnostici tromboze dubokih vena*

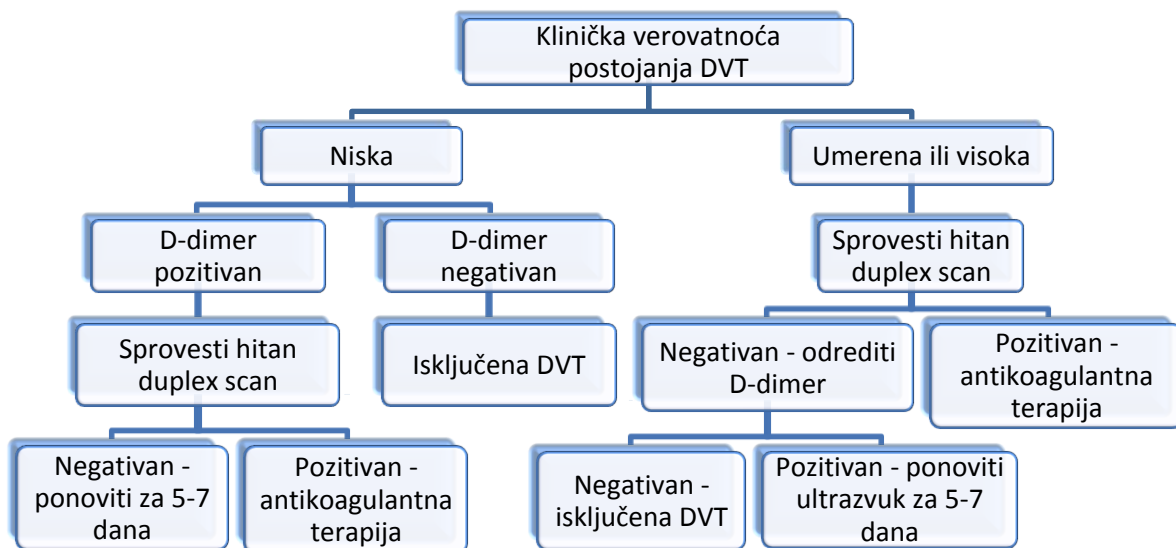
#### 3.4.1.4. Preporučeni dijagnostički algoritam

Ukoliko sumnjamo da kod pacijenta postoji tromboza dubokih vena najpre treba pristupiti proceni kliničke verovatnoće primenom Wells-ovog skora. Ukoliko je na ovaj način definitivno procenjeno da postojeći simptomi i znaci potiču od nekog drugog oboljenja dijagnostički pravac više neće biti usmeren na polje venske tromboze. Ukoliko je pak procenjeno da postoji umerena ili visoka klinička verovatnoća da se radi o ovom oboljenju treba izvršiti određivanje vrednosti D-dimera. Važno je da se testiranje D-dimera izvrši upravo u ovom koraku, a ne pre procene kliničke verovatnoće, kako bi se izbegao uticaj eventualnih povišenih vrednosti na rezonovanje lekara koji je ordinirao analizu i njegov dalji dijagnostički pravac. Ukoliko je vrednost kliničkog skora jednaka ili niža od 2 a vrednost D-dimera u fiziološkom rasponu, može se isključiti postojanje tromboze dubokih vena. U situaciji kada je pak vrednost D-dimera povišena, ili je ona fiziološka ali je skor kliničke verovatnoće postojanja tromboze dubokih vena viši od 2 tada se obavezno pristupa upotrebi neke od imaging tehnika. Svakako treba istaći i značaj kombinacije određivanja D-

dimera i procene kliničkog skora u donošenju terapijskih odluka u situacijama kada vizuelizacije dijagnostičke metode nisu dostupne [119].

Kada je imaging dijagnostika indikovana vrši se Duplex scan dubokog venskog sistema. U slučaju da je test pozitivan, odnosno da izostane kompletna venska kompresibilnost, dijagnoza tromboze dubokih vena se smatra potvrđenom. Ukoliko je test negativan, ponovljeno testiranje treba sprovesti kod osoba sa visokom kliničkom verovatnoćom procenjenom na osnovu skora i povišenim vrednostima D-dimera (Slika 11).

Postoji više različitih studija koje nude i drugačije dijagnostičke algoritme od kojih neke isključuju potrebu primene procene kliničke verovatnoće upotrebom skorova, dok druge favorizuju upotrebu imaging tehnika bez određivanja D-dimera u dijagnostičkoj proceduri. Međutim, izrazito studiozan ekspertski pregled postojećih dijagnostičkih modaliteta na ovom polju, objavljen od strane UK Health Technology Assessment group, u svom zaključku iznosi da je najprihvatljiviji dijagnostički pristup, uz svo poštovanje cost/benefit principa upravo kombinacija upotrebe adekvatnog kliničkog skora, D-dimera i Duplex scana [120].



Slika 11. Dijagnostički algoritam za DVT

### 3.4.2. Dijagnostički pristup pri sumnji na postojanje plućne tromboembolije

Pravovremena i tačna dijagnoza od ključnog je značaja u snižavanju morbiditeta i mortaliteta uslovljenih plućnom tromboembolijom sa jedne, ali i u smanjenju primene nepotrebnih, rizičnih terapijskih procedura sa druge strane. Tokom poslednje dve decenije predstavljene su brojne dijagnostičke metode i strategije na ovom polju, ali kao i u slučaju tromboze dubokih vena zaključeno je da idealan dijagnostički pristup pri sumnji na postojanje plućne tromboembolije podrazumeva primenu: procene kliničke verovatnoće, određivanja D-dimera i imaging testiranja.

Najpoznatiji klinički skorovi koji se nalaze aktuelno u upotrebi su Geneva skor [121], revidirani Geneva skor [122] i Wells-ov skor [123], od čega je poslednji najšire rasprostranjen (Slika 12). Ovi skorovi, sami za sebe, nedovoljno su pouzdani u smislu isključivanja tromboembolije pluća ali su veoma korisni u određivanju daljeg dijagnostičkog pravca. Tako u skladu sa Baye-vom teorijom, po kojoj je prediktivna vrednost određenog testa u funkciji ne samo njegove sopstvene senzitivnosti i specifičnosti, nego i prediktivne vrednosti prethodnih dijagnostičkih procedura, stratifikacija pacijenata u odnosu na Wells-ov skor neosporno ima mesto u dijagnostičkom algoritmu plućne tromboembolije (Slika 13) [124].

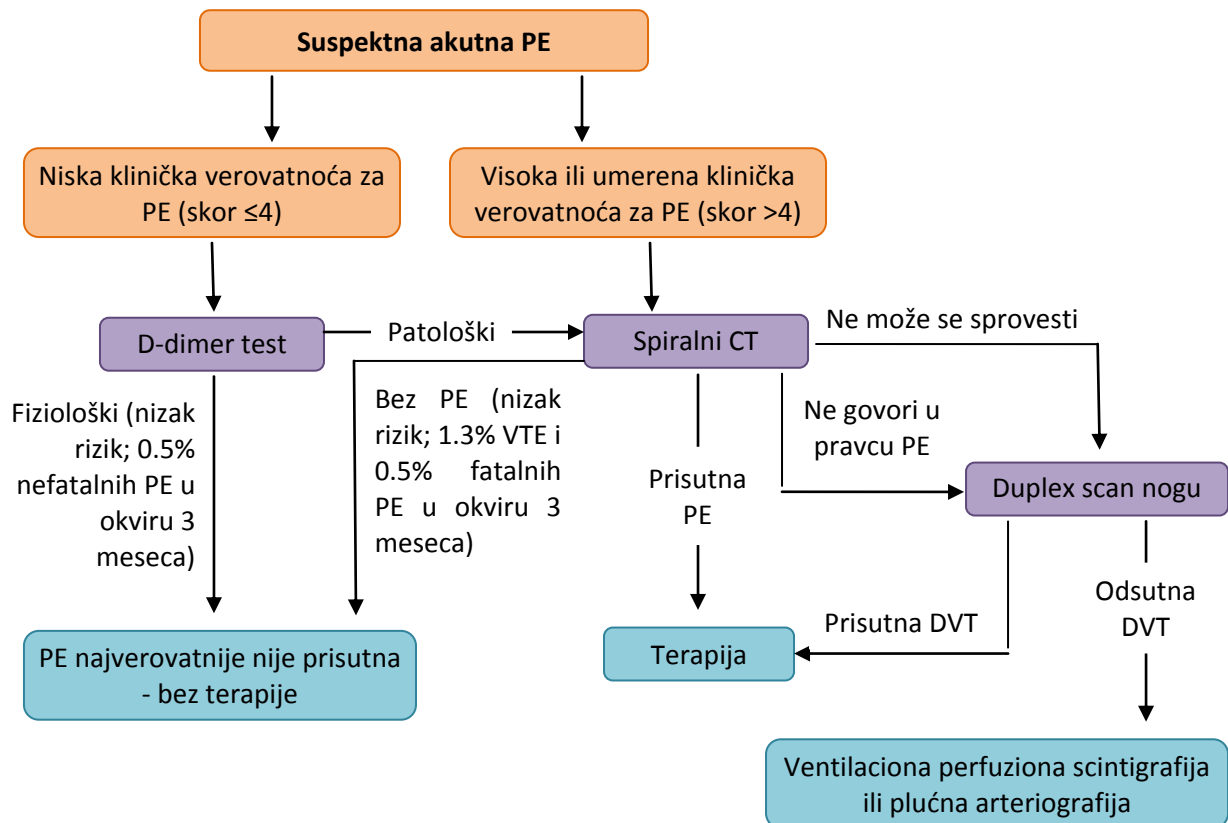
WELLS-ov SKOR za PE	
• <b>Klinički znaci i simptomi kompatibilni sa DVT</b>	<b>3</b>
• <b>Procena da je PE najverovatnija dijagnoza</b>	<b>3</b>
• <b>Hirurška intervencija ili nepokretnost u trajanju više od tri dana u prethodne 4 nedelje</b>	<b>1.5</b>
• <b>Prethodna DVT ili PE</b>	<b>1.5</b>
• <b>Srčana frekvenca &gt;100/min</b>	<b>1.5</b>
• <b>Hemoptizije</b>	<b>1</b>
• <b>Aktivni karcinom (terapija aktuelna ili tokom prethodnih 6 meseci ili palijativni pristup)</b>	<b>1</b>
<b>≤ 4: NISKA verovatnoća</b>	
<b>4.5-6: UMERENA verovatnoća</b>	
<b>&gt; 6: VISOKA verovatnoća</b>	

Slika 12. Wells-ov skor za procenu verovatnoće postojanja plućne embolije

Određivanje vrednosti D-dimera, brzog, jednostavnog i jeftinog testa, kao i u slučaju tromboze dubokih vena pokazuje visoku specifičnost ali nisku senzitivnost te se njegov rezultat koristi isključivo kao jedna od karika lanca integrativnog dijagnostičkog pristupa [125].

Vodeći imaging test, odnosno vodeća vizuelizaciona metoda koja se upotrebljava u dijagnostici plućne tromboembolije danas je komjuterizovana tomografska angiografija (CT angiografija). Ova metoda predstavljena je 1992. godine, a u samom početku primene bilo je naučnika koji su gajili dozu skepticizma prema njoj zasnovanu na nepouzdanosti u detektovanju embolusa u segmentnim i subsegmentnim arterijama. Međutim, sa uvođenjem višeslojnih CT detektora senzitivnost metode je značajno porasla i sada se i mali, subsegmentni embolusi na ovaj način mogu sa lakoćom detektovati [126]. CT angiografija ima nekoliko prednosti u odnosu na druge imaging tehnike, uključujući: brzinu postavljanja dijagnoze, mogućnost postavljanja alternativne dijagnoze u slučaju nepostojanja plućne tromboembolije i veoma mali procenat nedijagnostikovanih plućnih embolija (manje od 2%) [127].

Konačno, treba reći i da ventilaciona i perfuziona scintigrafija pluća predstavljaju imaging tehnike koje se mogu primeniti u cilju potvrđivanja, odnosno isključivanja postojanja plućne tromboembolije ali da je procenat pacijenata kod kojih je nakon njihove primene potrebno sprovesti dodatna ispitivanja visok, čak i u slučaju kombinovanja ovih metoda sa testiranjem kliničke verovatnoće i određivanjem D-dimera [128]. No, njihov značaj, obzirom na niže troškove i širu dostupnost, svakako još uvek nije prevaziđen, naročito u našoj sredini.



Slika 13. Dijagnostički algoritam za PTE

### 3.5. Prevencija venskog tromboembolizma

Značaj prevencije venskog tromboembolizma proističe iz činjenica da ova bolest predstavlja značajan zdravstveni problem, pogađajući značajan procenat opšte populacije, nosi sa sobom visok rizik od razvoja hroničnih komplikacija, zahteva česte lekarske kontrole, kao i angažovanje multidisciplinarnog tima stručnjaka. Kako su vodeći faktori rizika za nastanak venske tromboze hiperkoagulabilnost, venska staza i povreda zida krvnog suda, metode koje koristimo u prevenciji su: mehaničke, u svrhu smanjenja venske dilatacije i popravljjanja venskog toka krvi i/ili medikamentozne, koje se zasnivaju na primeni različitih lekova u cilju neutralizacije hiperkoagulabilnosti.

### 3.5.1. Mehaničke metode prevencije

Osnovna podela mehaničkih i fizikalnih metoda prevencije venskog tromboembolizma je na pasivne i aktivne, a zasniva se na samom mehanizmu delovanja (Slika 14).



Slika 14. Metode prevencije tromboze dubokih vena i plućne tromboembolije

#### 3.5.1.1. Elastična kompresivna bandaža

Ubrzavanjem krvnog toka u dubokom venskom sistemu nogu, elastična kompresivna bandaža smanjuje vensku stazu, kao i rizik od nastanka tromba, ograničavajući rastezanje zida venskog krvnog suda, što rezultuje smanjenjem broja endotelnih oštećenja. Pored toga, ona skraćuje vreme kontakta između krvi i endotela i poboljšava pražnjenje valvularnih kuspisa u kojima upravo i započinje formiranje venskog tromba kod većine imobilisanih pacijenata.

Dokazi sa kojima raspolažemo danas sugerišu da je kompresivna elastična bandaža, primenjena kao jedina vrsta prevencije tromboembolizma efikasna kod hirurških pacijenata sa umerenim rizikom za nastanak venske tromboze, ali još uvek nema dovoljno podataka o efikasnosti kod pacijenata sa visokim rizikom za razvoj ovog oboljenja, kao što je slučaj kod ortopedskih pacijenata ili pacijenata sa malignitetom. Takođe, nema podataka da primena samo ove metode trombopofilakse smanjuje rizik od nastanka plućne tromboembolije [129,130,131].

#### 3.5.1.2. Intermitentna pneumatska kompresija

Intermitentna pneumatska kompresija se smatra najefikasnijom metodom mehaničke trombopofilakse. Ona sprečava nastanak venske staze naizmeničnim pumpanjem vena donjih ekstremiteta koje obezbeđuje električni kompresor. Pored toga što poboljšava venski kapacitet i izbacivanje krvi iz venskog sistema, ova metoda povećava brzinu toka krvi i klirens dubokih vena. Još jedan veoma važan aspekt intermitentne pneumatske kompresije u prevenciji venskog tromboembolizma jeste stimulacija fibrinolize i prirodnih inhibitora koagulacije putem nekolicine različitih mehanizama, uključujući: porast koncentracije prostaciklina, t-PA i TFPI, kao i smanjenje nivoa PAI-1 i sniženje aktivacije trombocita [132,133].

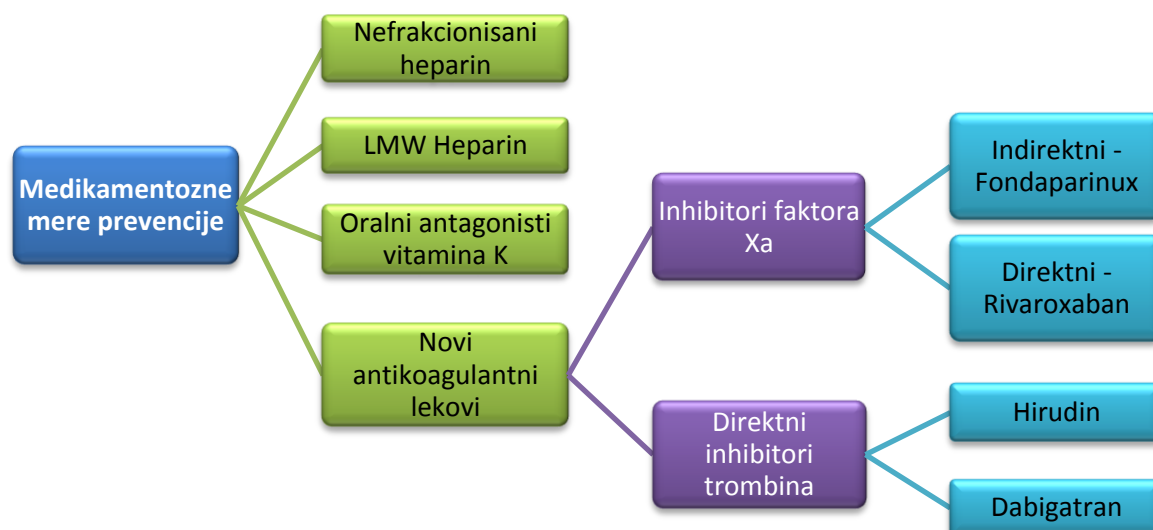
Ova mehanička metoda prevencije tromboembolijskih komplikacija dokazano smanjuje rizik od njihove pojave za čak 60% kod pacijenata podvrgnutih urološkim, neurohirurškim, ortopedskim i abdominalnim hirurškim procedurama [131].

### 3.5.1.3. Aktuelne preporuke

Prema poslednjem izdanju American College of Chest Physicians (ACCP) vodiča, mehanička trombopofilaksa kao jedina metoda profilakse venskog tromboembolizma preporučuju se kod pacijenata sa visokom rizikom za nastanak krvarećih komplikacija, a u kombinaciji sa nefrakcionisanim heparinom ili niskomolekularnim heparinom kod pacijenata sa visokim rizikom za nastanak tromboze [134].

### 3.5.2. Medikamentozna prevencija

U današnje vreme dostupno je šest različitih tipova medikamentozne trombopofilakse: nefrakcionisani heparin (UFH), niskomolekularni heparin (LMWH), fondaparinux, antagonisti vitamina K (VKA), antitrombocitni lekovi i novi oralni antikoagulantni lekovi (direktni inhibitori aktivisanog FX i direktni inhibitori trombina). Treba napomenuti da iako su pokazali visoku efikasnost u prevenciji arterijskih tromboza [135], brojne studije pružaju dokaze da nema koristi od primene antitrombocitnih lekova u prevenciji venskih tromboza [136] ili pak da su oni inferiorni u odnosu na druge profilaktičke pristupe [137]. Ne treba zaboraviti ni činjenicu da su antitrombocitni lekovi neosporno u vezi sa malim, ali ipak značajnim povišenjem rizika od krvarenja, te je aktuelno stanovište da se oni ne preporučuju u prevenciji venskog tromboembolizma [138].



Slika 15. Medikamentozna prevencija tromboze dubokih vena i plućne tromboembolije

#### 3.5.2.1. Stratifikacija rizika

Postizanje idealne trombopofilakse podrazumeva njeno prilagođavanje individualnom riziku od nastanka venskog tromboembolizma kao i individualnom riziku od razvoja

krvarećih komplikacija, za svakog pojedinca ponaosob. Postoji više razloga zašto se u svakodnevnoj kliničkoj praksi ne može dostići ovaj cilj a osnovni je taj što ne znamo koliki je tačno rizik od nastanka venske tromboze kod određene osobe, obzirom da njega determiniše kombinacija više različitih faktora rizika, među kojima i različite, nepoznate genetske karakteristike.

Iz ovog razloga prevencija venskog tromboembolizma sprovodi se u odnosu na stratifikaciju rizika vezanu za prepoznate vodeće faktore rizika, uz maksimalno poštovanje individualnih karakteristika pacijenta (Slika 15).

#### *3.5.2.2. Opšta hirurgija*

Vrsta hirurške procedure i njeno trajanje jasno su povezane sa rizikom od nastanka tromboze dubokih vena. Dodatni faktori rizika obuhvataju: malignitet, prethodne epizode venskih tromboza, gojaznost, venske varikozitete, upotrebu estrogena i stariju životnu dob [139]. Aktuelne preporuke sugerišu da pacijentima koji će biti podvrgnuti major hirurškim procedurama iz domena opšte hirurgije treba ordinirati tromboprofilaksu [138]. Lekovi koji su pokazali najveću efikasnost i bezbednost na ovom polju su UFH, koji je prvi stupio na scenu i LMWH. Niskomolekularni heparin je pokazao podjednaku efikasnost, uz poboljšanje bezbednosti u smislu smanjenja rizika od pojave krvarećih komplikacija. Dodatne prednosti su mu i to što se može primenjivati jednom dnevno i što sa sobom nosi manji rizik od nastanka heparinom indukovane trombocitopenije (HIT) u odnosu na nefrakcionisani heparin [140,141], te danas, u dozi prilagođenoj telesnoj masi, predstavlja lek izbora u prevenciji venskog tromboembolizma u ovoj grupi pacijenata. Svoje mesto u ovim indikacijama polako zauzima i selektivni FXa inhibitor, fondaparinux koji je do sada pokazao jednaku bezbednost kao i LMWH, uz nešto veću efikasnost kod pacijenata sa izrazito visokim rizikom za nastanak venskog tromboembolizma [142].

U Evropskim zemljama, tromboprofilaksa primenom LMWH započinje obično 10-12 sati pre planirane hirurške procedure, odnosno obično veće pre operativnog zahvata. U Severnoj Americi ona obično počinje 12-24<sup>h</sup> nakon operacije, kako bi se smanjio rizik od krvarenja i skratilo vreme hospitalizacije za elektivne hirurške procedure.

#### *3.5.2.3. Ortopedske hirurške procedure*

Kako povišen rizik od nastanka venske tromboze traje najmanje dva meseca nakon major ortopedskih hirurških zahvata, tromboprofilaksa se preporučuje za sve pacijente koji će biti podvrgnuti ovakvim procedurama [138] i treba je sprovoditi u trajanju od 30-42 dana nakon operativnog zahvata. Time se značajno smanjuje rizik od nastanka venskih tromboembolijskih komplikacija, a ne povećava istovremeno rizik od pojave major krvarenja [143,144].

Nakon elektivne implantacije proteze kuka preporučuje se primena LMWH u dozi prilagođenoj telesnoj masi [138]. Upotreba antagonista vitamina K se napušta za ovu indikaciju obzirom na odložen početak delovanja ovih lekova, varijabilan individualni odgovor pacijenata, potrebu za čestim laboratorijskim monitorisanjem i prilagođavanjem



doze, interakcije sa drugim lekovima i manju efikasnost u odnosu na LMWH. Ukoliko se ipak nađu kao lek izbora u prevenciji venskog tromboembolizma u pomenutoj indikaciji moraju biti upotrebljeni u dozi koja je dovoljna da se postigne ciljni international normalized ratio (INR) od 2,5 (odnosno raspod od 2,0-3,0). Prvu dozu VKA treba primeniti ili veće pre ili veće nakon operacije. Ciljni INR se na ovaj način postiže najranije trećeg postoperativnog dana [145].

Nakon elektivne implantacije proteze kolena rizik od nastanka venske tromboze još je viši nego u slučaju implantacije proteze kuka [137], što može biti i jedno od objašnjenja za smanjenu efikasnost trombopofilakse u sklopu ortopedskih procedura na kolenu u poređenju sa kukom [146]. Brojne studije potvrdile su da je profilaksa sa LMWH bezbedna i efikasna u slučaju ove indikacije, te da je superiorna u odnosu na primenu nefrakcionisanog heparina ili antagonista vitamina K [147]. Treba napomenuti i to da se u skladu sa ACCP preporukama iz 2012 godine, u prevenciji tromboembolizma u sklopu ortopedskih hiruških procedura, mogu primeniti i novi oralni antikoagulantni lekovi [138].

Što se artroskopije kolena tiče, treba istaći da terapijske artroskopske procedure nose sa sobom viši rizik od nastanka venske tromboze u poređenju sa dijagnostičkim artroskopskim procedurama, što je najverovatnije u vezi i sa dužinom trajanja procedure i njenom invazivnošću [148]. Do danas nije sprovedena ni jedna dovoljno snažna placebo-kontrolisana klinička studija o trombopofilaksi kod pacijenata koji su podvrgnuti artroskopiji, te se ne mogu još uvek doneti preporuke koje bi bile zasnovane na dokazima. Mogućnost sprovođenja trombopofilakse treba svakako uzeti u obzir kod pacijenata koji imaju visok rizik za nastanak venke tromboze uslovljen dodatnim faktorima rizika.

#### *3.5.2.4. Laparoskopske hirurške procedure*

Rizik od nastanka venske tromboze nakon laparoskopskih hirurških procedura višestruko je manji u odnosu na klasične operativne zahvate, što se može objasniti smanjenjem traume koja nastaje tokom operativnog zahvata, uz skraćenje trajanja hospitalizacije i imobilizacije [149,150]. Obzirom na veoma nisku stopu VTE kod pacijenata koji se podvrgavaju laparoskopskim intervencijama Evropsko udruženje endoskopskih hirurga (EAES) [151] i ACCP [138] ne preporučuju primenu trombopofilakse, osim u slučaju da pacijent ima dodatne faktore rizika za nastanak venske tromboze.

#### *3.5.2.5. Trauma*

Pacijenti koji dožive major traumu imaju viši rizik za razvoj tromboze dubokih vena od svih ostalih hospitalizovanih pacijenata. Bez primenjene trombopofilakse on prelazi 50%, a plućna tromboembolija je treći vodeći uzrok smrtnosti kod onih koji prežive prvi dan u ovoj grupi pacijenata [138]. Rutinska primena trombopofilakse kod pacijenata sa traumom danas predstavlja standardni terapijski pristup [152]. Najefikasniji i najjednostavniji način na koji se ona sprovodi je primena LMWH, sa kojom se počinje nakon uspostavljanja hemostaze, kod većine pacijenata sa umerenim i visokim rizikom za nastanak venske tromboze [138]. Iako se o dužini primene trombopofilakse kod ovih pacijenata još uvek

debatuje preporučuje se da ona traje do otpusta pacijenta iz bolnice, izuzev u slučaju preloma kuka [153].

U grupi pacijenata sa povredom kičme asimptomatska tromboza dubokih vena pojavljuje se u 60-100% [154], a plućna tromboembolija čini treći vodeći uzrok smrti [155], te se preporučuje primena rane trombopofilakse sa LMWH, čim se uspostavi adekvatna hemostaza. Takođe, preporučuje se kontinuirani nastavak primene LMWH ili prevođenje na oralni antikoagulantni lek (target INR 2,5; raspon 2,0-3,0) tokom celog perioda rehabilitacije [156] ili barem tokom faze hospitalne rehabilitacije [138].

#### *3.5.2.6. Trudnoća i puerperijum*

Žene tokom trudnoće i puerperijuma imaju petostruko viši rizik od nastanka venske tromboze u poređenju za ženama iste starosti, koje nisu trudne. Međutim, incidenca venskih tromboza u sklopu trudnoće i u postpartalnom periodu u opštoj populaciji iznosi svega 0,5-1/1000 porođaja [157] te se rutinska primena trombopofilakse vezano za trudnoću ne preporučuje, sa izuzetkom žena kod kojih drugi prisutni faktori rizika dodatno povećavaju rizik od nastanka venske tromboze [158]. Među ove faktore u prvom redu spadaju: prethodne venske tromboze, kao i nasledni deficit antitrombina, proteina C i proteina S, te u slučaju postojanja nekog od njih u obzir dolazi primena trombopofilakse uz dodatni oprez.

#### *3.5.2.7. Dugotrajna putovanja*

Rezultati skorašnjih studija potvrđuju postojanje dvostruko višeg rizika za nastanak venske tromboze kod pacijenata koji putuju duže od 4 sata [159], bilo da se radi o prevozu avionom, vozom ili kolima, što upućuje na to da razlog za povišenje rizika treba tražiti u produženoj imobilizaciji, a ne u hipobaričnoj hipoksiji za koju se ranije smatralo da je vodeći patofiziološki mehanizam u nastanku tromboze dubokih vena kod pacijenata koj su putovali avionom na duže relacije [160]. Rutinska primena trombopofilakse, bilo u smislu primene LMWH, bilo kompresivne elastične bandaže ili aspirina, ne preporučuje se vezano za ovu indikaciju [161], ali njenu primenu, uz individualni pristup, svakako treba razmotriti kod pacijenata koji su imali prethodnu epizodu venske tromboze.

#### *3.5.2.8. Hospitalizovani pacijenti*

Iako se hirurške procedure smatraju najvišim faktorom rizika tokom hospitalizacije, interesantan je podatak da se venski trombozni incidenti sa podjednakom učestalošću javljaju kod hirurških pacijenata (24%) i kod pacijenata hospitalizovanih iz drugih medicinskih indikacija (22%). Za sada raspoloživi dokazi sugerišu da trombopofilaksu tokom hospitalizacije treba primeniti kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom, akutnom respiratornom bolešću, akutnim infekcijama i kod onih kod kojih su prepoznati dodatni faktori rizika za nastanak venske tromboze [162,163,164].

Treba istaći i to da pacijenti koji su hospitalizovani zbog akutnog infarkta miokarda imaju visok rizik od nastanka venske tromboze [165]. Kako je primarni cilj kod ovih pacijenata prevencija rekurentnog infarkta, oni primaju kombinacije antitrombotičnih lekova

i visoke doze nefrakcionisanog ili niskomolekularnog heparina što u dovoljnoj meri snižava pomenuti rizik. Takođe, i pacijenti sa akutnim ishemijskim insultom imaju povišen rizik od nastanka venske tromboze. Međutim, obzirom na istovremeni visok rizik od razvoja hemoragijskih komplikacija, rutinska primena LMWH vezana za ovu indikaciju još uvek je predmet brojnih debata [138].

Pacijenti oboleli od karcinoma imaju 6 do 7 puta povišen rizik za nastanak venske tromboze, [166] koja je ujedno drugi vodeći uzrok smrti u ovoj grupi pacijenata [167]. Prema aktuelnim ACCP preporukama [138], kao i preporukama Američkog udruženja kliničkih onkologa (ASCO) [168] preporučuje se primena LMWH ili fondaparinusa kod svih hospitalizovanih pacijenata sa karcinomom. Rutinska primena trombopofilakse kod pacijenata sa karcinomom koji nisu hospitalizovani a primaju hemoterapiju se ne preporučuje, sa izuzetkom onih koji primaju kombinaciju talidomida (odnosno njegovog analoga lanalidomida) i deksametazona ili nekog drugog citostatika [168]. Nakon operacije karcinoma preporučuje se primena trombopofilakse sa LMWH u trajanju od najmanje 7 do 10 dana, a u odnosu na individualne karakteristike pacijenta trebalo bi razmotriti čak i produženu trombopofilaksu u trajanju od dodatne tri nedelje [169].

#### *3.5.2.9. Prethodne epizode venske tromboze*

Trombopofilaksu obavezno treba primeniti kod svih pacijenata koji su imali prethodnu epizodu venske tromboze a koji više ne primaju antikoagulantne lekove, kada se nađu u situacijama izloženosti stečenim faktorima rizika za nastanak ovog oboljenja, obzirom na veoma visok rizik od nastanka recidiva bolesti. Iz istog razloga treba izbegavati upotrebu oralnih kontraceptiva kod pacijentkinja koje su imale prethodnu trombozu [170].

#### *3.5.2.10. Trombofilija*

Aktuelno je stanovište da je trombopofilaksa opravdana kod asimptomatskih osoba sa trombofilijom u situacijama sa veoma povišenim rizikom od nastanka venske tromboze. Treba istaći i to da, uzimajući u obzir cost/benefit odnos i psihološko opterećenje koje sa sobom nosi saznanje o naslednoj bolesti nije opravdan skrining na trombofiliju kod svih pacijenata koji dožive prvu epizodu venske tromboze. Ovo testiranje treba uzeti u razmatranje ukoliko osoba doživi spontanu vensku trombozu u životnom dobu ispod 40 godina ili ako postoji istorija venskih tromboznih incidenata kod više od 20% prvostepenih rođaka [171].

### **3.6. Lečenje venskog tromboembolizma**

Lečenje tromboze dubokih vena zasniva se na četiri osnovna cilja, a to su:

1. Prevencija smrtnog ishoda usled nastanka plućne embolije,
2. Ublažavanje subjektivnih tegoba poput bola i oticanja,
3. Prevencija pojave recidiva oboljenja i

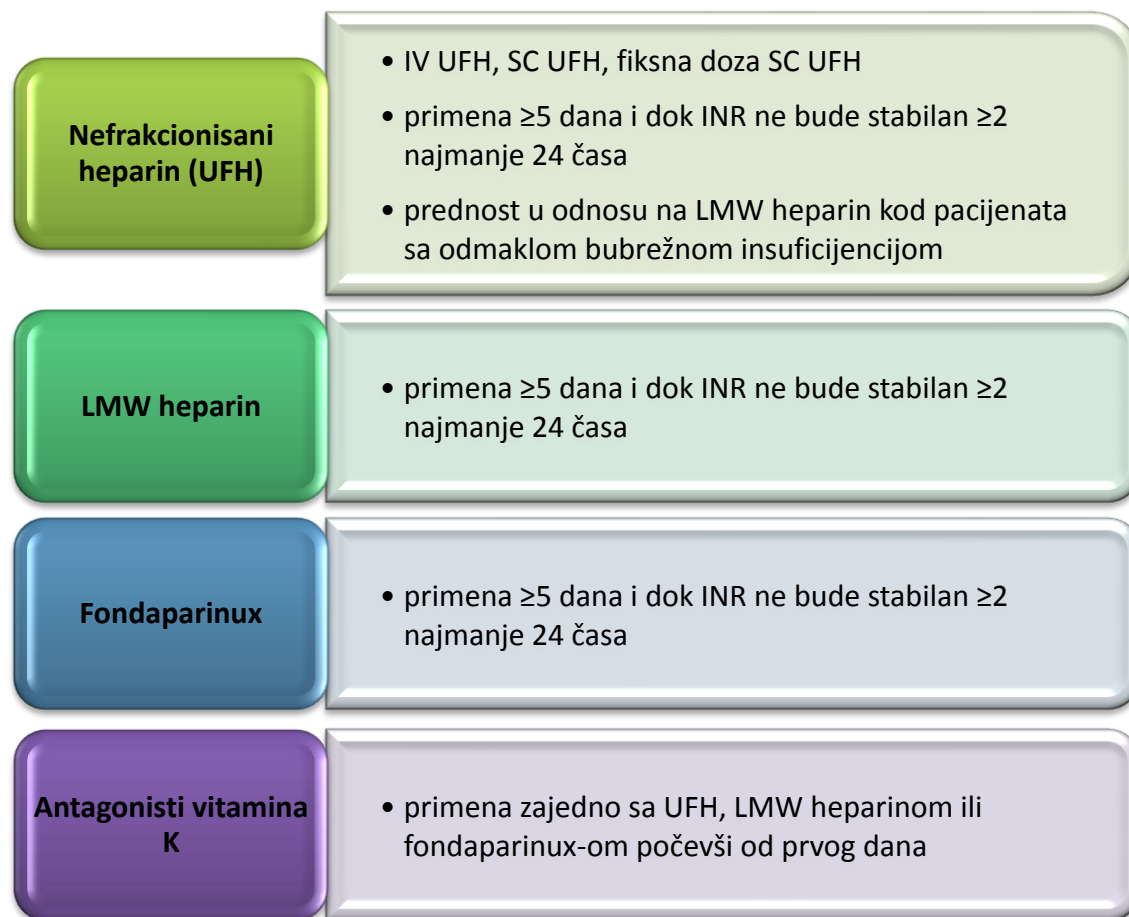
#### 4. Prevencija nastanka posttrombotskog sindroma.

Proksimalna venska tromboza je entitet koji podrazumeva pojavu venskog tromba u poplitealnoj ili venama proksimalnije od nje i veoma je ozbiljno oboljenje koje sa sobom nosi visok rizik od smrtnog ishoda. Ukoliko je neadekvatno lečena, u 20-50% slučajeva razvije se simptomatski recidiv oboljenja koji može za krajnji ishod imati i nastanak fatalne plućne tromboembolije. Simptomatska potkolena venska tromboza udružena je sa niskim rizikom (oko 1%) za nastanak plućne embolije a njena propagacija u poplitealnu ili još proksimalnije vene pojavljuje se kod čak 15-25% pacijenata koji nisu adekvatno lečeni [172].

Kod većine pacijenata sa trombozom dubokih vena četiri, gore pomenuta, terapijska cilja, postižu se primenom adekvatne antikoagulantne terapije, koja smanjuje incidencu propagacije tromboze i/ili nastanak recidiva tromboembolizma tokom prva tri meseca nakon postavljanja dijagnoze sa 25% na 4% [173]. Treba istaći i to da je nošenje adekvatno ordinirane elastične kompresivne bandaže, koja se postavlja čim to dozvole postojeći simptomi i kontinuirano nosi tokom najmanje dve godine pokazalo dobru efikasnost u smanjenju incidence posttrombotskog sindroma [174].

##### ***3.6.1. Inicijalni terapijski pristup u lečenju tromboze dubokih vena***

Aktuelne terapijske preporuke predlažu primenu antikogulantne terapije kao inicijalne terapije izbora za većinu pacijenata sa simptomatskom trombozom dubokih vena (Slika 16) [138]. Apsolutne kontraindikacije za njenu primenu obuhvataju: intrakranijalno krvarenje, druga teška, aktivna krvarenja, veoma skoru hiruršku intervenciju na mozgu, oku ili kičmenoj moždini i malignu hipertenziju. Relativne kontraindikacije za primenu antikoagulantne terapije uključuju: skore velike hirurške procedure, skori masivan tromboembolijski insult, aktivno gastrointestinalno krvarenje, neregulisanu tešku hipertenziju, teška oboljenja jetre i bubrega, kao i tešku trombocitopeniju (ukoliko je broj trombocita manji od 50.000/l).



Slika 16. ACCP (2012) preporuke za lečenje tromboze dubokih vena

Od 1960. do 1980. godine započinjanje antikoagulantnog lečenja u slučaju tromboze dubokih vena podrazumevalo je inicijalnu primenu kontinuiranog intravenskog heparina. No, devedesetnih godina LMWH primenjen u vidu subkutane injekcije jednom ili dva puta na dan potpuno je potisnuo heparin obzirom na to da su kliničke studije pokazale da je njegova primena podjednako efikasna ali i bezbedna u poređenju sa intravenskim heparinom. Konačno, početkom ovoga veka na scenu inicijalne terapije tromboze dubokih vena stupio je i sintetski pentasaharid, fondaparinux, koji je kroz kliničke studije pokazao jednaku efikasnost i bezbednost kao i LMWH [175,176]. Prednost LMWH i fondaparinusa u odnosu na dotadašnji terapijski pristup ogleda se u tome što ne zahtevaju antikoagulantni monitoring i mogu biti primenjeni u fiksnoj dozi, subkutanom aplikacijom, jednom ili dva puta dnevno, što omogućava da se inicijalna terapija tromboze dubokih vena sprovodi i van bolničkih uslova. Primena kontinuiranog intravenskog nefrakcionisanog heparina danas se preporučuje kod pacijenata sa teškom bubrežnom insuficijencijom [138]. U tom slučaju neophodno je dostići i pratiti njegov antikoagulantni efekat putem aktivisanog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT). Inicijalna terapija sa LMWH, fondaparinux-om ili UFH trebala bi da traje najmanje 5 dana.

Trombolitička terapija je veoma retko inicijalna terapija izbora u slučaju tromboze dubokih vena. Ograničene indikacije za njenu primenu podrazumevaju: masivnu akutnu proksimalnu vensku trombozu sa razvojem phlegmasia cerulea dolens sa pretećom venskom gangrenom ili masivnu proksimalnu vensku trombozu sa izraženim simptomima koji traju kraće od 14 dana, kod pacijenata dobrog funkcionalnog statusa, kod kojih je očekivano trajanje života duže od godinu dana uz nizak rizik od razvoja krvarećih komplikacija a sve sa ciljem smanjenja akutnih simptoma i sprečavanja nastanka posttrombotskog sindroma [138].

Plasiranje vena kava filtera rezervisano je za pacijente sa akutnom trombozom dubokih vena koji imaju jasne kontraindikacije za primenu antikoagulantne terapije i za veoma retke pacijente koji imaju recidive venskih tromboznih incidenata tokom adekvatne primene antikoagulantne terapije. Bez obzira na njegovo plasiranje, dugotrajnu antikoagulantnu terapiju treba početi primenjivati čim eventualno nestanu kontraindikacije za njenu inicijalnu primenu, kako bi se smanjila incidenca recidiva tromboze dubokih vena koju sa sobom nosi primena vena kava filtera kao jedinog terapijskog modaliteta [177].

### **3.6.2. Dugoročni terapijski pristup u lečenju tromboze dubokih vena**

Dugoročna primena antikoagulantne terapije kod pacijenata sa trombozom dubokih vena indikovana je u cilju smanjenja visoke frekvence (15-25%) simptomatske propagacije tromboznog procesa i prevencije recidiva venske tromboze. Terapija izbora za koju se danas smatra da na najbolji način ostvaruje pomenute ciljeve jeste peroralna primena antagonista vitamina K. Dugoročna primena UFH ili LMWH indikovana je pak samo za mali broj pacijenata kod kojih su antagonisti vitamina K kontraindikovani, kao što je slučaj kod trudnica na primer, ili kod kojih je dokazana veća efikasnost primene ovih lekova u odnosu na oralne antikoagulate lekove, kao što je slučaj kod pacijenata sa karcinomom [178,179].

Primenu oralnih antikoagulantnih lekova treba otpočeti istovremeno sa inicijalnom primenom LMWH, fondaparinuxa ili UFH već prvog terapijskog dana i primenjivati paralelno sa ovim lekovima najmanje 4-5 dana. Ukoliko je INR u terapijskom opsegu (odnosno iznad 2,0) tokom najmanje 24<sup>h</sup> obustavlja se dalja primena heparina ili fondaparinuxa [138]. Dozu antagonista vitamina K trebalo bi individualno prilagoditi tako da se obezbedi target INR od 2,5 (raspon 2,0-3,0) tokom celog trajanja lečenja. Dokazano je da target INR ispod 2,0 (1,5-1,9) ne smanjuje rizik od nastanka krvarećih komplikacija, ali značajno povećava rizik za nastanak recidiva venske tromboze te se ne preporučuje, izuzev ako pacijent izrazito ne zahteva znatno ređe kontrole [138]. INR od 3,1-4,0 ne treba postavljati kao target INR, jer je dokazano da nije povezan sa poboljšanjem efikasnosti terapije kod pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom i rekurentnim trombozama na primer, a istovremeno dokazano dovodi do češćih krvarećih komplikacija [180].

Terapija tromboze dubokih vena vođena na ovakav način treba da traje najmanje tri meseca kod pacijenata sa prvom epizodom tromboze proksimalnih vena koja je provocirana prepoznatim uzročnim faktorom [138]. U slučaju idiopatske tromboze terapija takođe treba

da traje tri meseca, nakon čega je neophodno izvršiti detaljnu evaluaciju dotadašnjeg terapijskog pristupa u odnosu na individualnu kombinaciju faktora rizika za nastanak venske tromboze, kao i risk/benefit odnos koji sa sobom nosi dugotrajna primena antikoagulantne terapije. Kod pacijenata koji imaju veoma mali rizik od nastanka krvarećih komplikacija i kod kojih je antikoagulantna terapija stabilno dozirana i protiče bez ikakvih komplikacija, preporučuje se dugotrajna primena ovog terapijskog modaliteta. To praktično znači da će se isti primenjivati dok god se eventualno ne proceni da je rizik od krvarenja nadmašio rizik od nastanka recidiva venske tromboze ili dok pacijent to izričito ne zahteva. Dakle, u ovom slučaju se periodično mora sprovoditi detaljna evaluacija dotadašnjeg terapijskog pristupa [181]. Takođe, dugotrajna primena antikoagulantnih lekova rezervisana je za gotovo sve pacijente sa recidivom idiopatske venske tromboze, svakako uz strogo poštovanje risk/benefit odnosa i u ovom slučaju. Konačno, treba istaći i to da se kod pacijenata sa prvom epizodom venske tromboze i dokazanim prisustvom antifosfolipidnih antitela ili dva ili više udružena trombofilna markera, a obzirom na veoma visok rizik od nastanka recidiva, preporučuje dugotrajna antikoagulantna terapija.

Dugotrajna primena LMWH, u trajanju od najmanje 3 do 6 meseci pokazala se podjednako efikasnom, a kod pacijenata sa karcinomom i efikasnijom u poređenju sa oralnom antikoagulantnom terapijom. Dokazano je i da sa sobom nosi manji rizik od nastanka krvarećih, naročito minor komplikacija [182]. Tako je kod pacijenata sa karcinomom ovo terapija izbora tokom prvih 3 do 6 meseci. Nakon toga bi ovi pacijenti trebalo da primaju ili LMWH ili oralne antikoagulantne lekove dok god je aktuelno osnovno oboljenje.

Novi antikoagulantni lekovi, među kojima direktni inhibitor trombina Dabigatran i direktni inhibitor FXa Rivaroxaban, polako ali sigurno zauzimaju svoj prostor pokrivajući sve veći broj indikacija za primenu oralne antikoagulantne terapije, među kojima je i njena primena u trombozi dubokih vena. Njihova osnovna prednost u odnosu na dosadašnje oralne antikoagulantne lekove je u tome što se primenjuju peroralno jednom ili dva puta na dan u fiksnoj dozi, ne zahtevaju monitoring i titiranje doze, stupaju sa znatno manjim brojem lekova u interakciju i imaju brz početak delovanja, poput LMWH, te dakle nose sa sobom mogućnost pojednostavljenja terapije tromboze dubokih vena uz značajno veći komfor za pacijenta [183].

### **3.6.3. Neželjeni efekti antikoagulantne terapije**

#### **3.6.3.1. Krvarenje**

Krvarenje predstavlja najčešći neželjeni efekat primenjene antikoagulantne terapije i na osnovu internacionalnog standarda može se podeliti na major i minor krvarenja. Major krvarenje se definiše kao ono koje je klinički uočljivo i praćeno je smanjenjem koncentracije hemoglobina od najmanje 2g/dl, ono koje dovodi do potrebe za primenom najmanje 2 doze koncentrovanih eritrocita ili ono koje je retroperitonealne ili intrakranijalne lokalizacije. Stopa major krvarenja tokom inicijalne terapije intravenskim heparinom, LMWH ili

fondaparinux-om je 1-2% [184], tokom prva tri meseca primene oralne antikoagulantne terapije ona iznosi 2%, a ukoliko se ovi lekovi nastave dugoročno primenjivati, stopa krvarenja je 1% godišnje [185].

#### *3.6.3.2. Heparinom indukovana trombocitopenija (HIT)*

I nefrakcionisani i niskomolekularni heparin mogu dovesti do razvoja trombocitopenije, koja se javlja u manje od 1% pacijenata lečenih ovim lekovima. Međutim, heparinom indukovana trombocitopenija (HIT) predstavlja ozbiljnu komplikaciju ove terapije udruženu sa propagacijom ili recidivom venskog tromboznog procesa ili pak razvojem arterijske tromboze. Ukoliko dođe do razvoja HIT-a, koji sa sobom nosi visok rizik od smrtnog ishoda i amputacije ekstremiteta, terapija heparinom se mora hitno obustaviti i započeti lečenje danaparoidom, lepirudinom ili argatrobanom. Primena antagonista vitamina K dolazi u obzir kada se normalizuje broj trombocita [175,176].

#### *3.6.3.3. Heparinom indukovana osteoporoza*

Kao rezultat dugotrajne primene UFH ili LMWH može doći do razvoja osteoporoze, koja se javlja obično tek nakon više od 6 meseci kontinuirane primene ovih lekova. Treba istaći i to da čak jedna trećina pacijenata lečenih dugotrajno heparinom ima asimptomatsko smanjenje gustine kosti. Sa druge strane, incidenca simptomatske osteoporoze u slučaju primene LMWH u dužini između 3 i 6 meseci veoma je niska i nije viša u poređenju sa onom koja prati primenu antagonista vitamina K [182].

#### *3.6.3.4. Hepatotoksičnost*

Primena UFH ili LMWH može dovesti do porasta jetrenih transaminaza, čiji klinički značaj nije objašnjen i koji obično nestaje nakon ukidanja pomenute terapije.

### **3.6.4. Terapijski pristup u lečenju plućne tromboembolije**

Danas se lekom izbora u inicijalnom terapijskom tretmanu plućne tromboembolije smatraju LMWH, fondaparinux i UFH, kao bezbedna i efikasna opcija u slučaju da je pacijent hemodinamski stabilan. LMWH i fondaparinux su jednostavniji za primenu, no zaključci skorašnjih studija sugerišu da UFH u fiksnoj dozi daje veoma slične rezultate [186,187]. Takođe, u grupi pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom UFH i dalje ostaje najbezbednija opcija. Dugotrajna antikoagulantna terapija sprovodi se peroralnim antagonistima vitamina K, poštujući iste principe primene kao i u slučaju tromboze dubokih vena. Dokazi pokazuju da je stopa recidiva venskog tromboembolizma nakon primene oralne antikoagulantne terapije u trajanju od 3 do 6 meseci nešto viša kod pacijenata koji su imali plućnu tromboemboliju nego kod pacijenata koji su imali trombozu dubokih vena [188]. No, i pored toga, rizik od nastanka fatalnih plućnih embolija nakon prekida antikoagulantnog lečenja ostaje nizak i nije viši u odnosu na rizik od nastanka fatalnih krvarenja uzrokovanih primenom prolongiranog antikoagulantnog lečenja [189]. Treba napomenuti i to da je randomiziranim studijama dokazano da je stopa recidiva tromboembolizma viša kod pacijenata koji su primali kraće vreme antikoagulantnu terapiju



(od 6 nedelja do 6 meseci) u poređenju sa pacijentima sa prolongiranom terapijom [190]. Međutim, u većini takvih studija pacijenti kod kojih je primenjena prolongirana antikoagulantna terapija nisu praćeni nakon njenog ukidanja a broj pacijenata koji su imali plućnu tromboemboliju u ovim studijama je generalno mali. Tako za sada ostaje nerazjašnjeno pitanje da li produžena primena antikoagulantne terapije smanjuje dugoročno stopu recidiva venskog tromboembolizma ili jednostavno odlaže naredni tromboembolijski događaj. Današnje preporuke ne predlažu duže lečenje pacijenata koji su doživeli plućnu tromboemboliju u odnosu na pacijente sa trombozom dubokih vena. U skladu sa ACCP preporukama, pacijenti sa prolaznim faktorima rizika treba da budu lećeni u trajanju od najmanje tri meseca a oni sa idiopatskim plućnim embolizmom u trajanju od najmanje šest meseci [191]. Odluku o dugotrajnoj primeni antikoagulantnih lekova kod pacijenata sa plućnom tromboembolijom treba doneti poštujući individualni pristup koji se u prvom redu odnosi na rizik od nastanka recidiva venske tromboze uz adekvatnu procenu rizika od nastanka krvarećih komplikacija, koji su različiti kod svakog pacijenta ponaosob.

#### **4. ULOGA FIBRINOLIZNOG MEHANIZMA U NASTANKU VENSKE TROMBOZE**

Dok je ispitivanje uloge koagulacionog mehanizma u nastanku venske tromboze decenijama u fokusu naučno-istraživačkog interesovanja, fibrinolizni mehanizam je svo to vreme imao nepravedno dodeljenu ulogu nemog posmatrača. Na osnovu činjenice da deficit plazminogena, kao centralne karike procesa fibrinolize, ne dovodi do povećanog rizika za nastanak venske tromboze, smatrano je da fibrinolizni mehanizam u celini nema nikakav patofiziološki značaj u nastanku ovog oboljenja. Međutim, rezultati studija koje su sprovedene tokom poslednje decenije dokazuju na osnovu testova koji procenjuju globalnu funkcionalnost ovog sistema, kao i na osnovu ispitivanja njegovih pojedinačnih činilaca, da ne treba olako eliminisati njegovu moguću ulogu u nastanku venske tromboze.

Postoji nekoliko različitih testova za globalnu procenu funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, pri čemu su najčešće korišćeni euglobulinsko vreme lize koaguluma (ECLT) i vreme lize koaguluma razblažene cele krvi (DWBCLT). Osnovno što se može zameriti ovim testovima je to što ne odražavaju zaista ukupni fibrinolizni potencijal krvi. Kako se za ECLT koristi samo euglobulinska frakcija plazme, a DWBCLT izvodi uz prisustvo citrata, to se na ovaj način ne uključuje ispitivanje interakcije koagulacionog i fibrinoliznog procesa posredovano TAFI-om i FXIII koagulacije. Dakle, pokušaji da se dokaže postojanje veze između neadekvatne funkcionalnosti fibrinoliznog sistema i tromboze u ranijim studijama bili su neuspešni u najvećoj meri zbog toga što su testovi za procenu funkcionalnosti fibrinoliznog sistema bili nespecifični, relativno nesenzitivni i nedovoljno standardizovani. U skorije vreme razvijen je novi test za procenu globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma - vreme lize koaguluma (CLT). U ovom testu fibrinski ugrušak se razlaže pod uticajem egzogeno dodatog t-PA a vreme lize koaguluma koje se njime meri uključuje uticaj

TAFI, plazminogena, inhibitora plazmina, PAI-1 i antitrombina [192]. Osnovni nedostatak ovoga eseja je taj što ispitivani uzorak ne sadrži ćelije krvi, koje takođe daju značajan doprinos ukupnoj fibrinoliznoj aktivnosti. Aktuelno je u toku razvoj novog fibrinoliznog eseja koji će obuhvatiti i ovaj aspekt [193], no u tom slučaju merenje mora biti sprovedeno odmah nakon uzorkovanja, što donekle otežava njegovu upotrebu u velikim studijama.

Treba takođe istaći i to da su danas na istraživačkoj sceni veoma aktuelne studije koje se bave upravo ispitivanjem i otkrivanjem patofizioloških mehanizama putem kojih pojedinačne komponente fibrinoliznog mehanizma dovode do izmene njegove funkcionalnosti koja rezultuje razvojem venskog tromba, bilo da su oni vezani za samu degradaciju fibrina, bilo za druge procese od značaja u nastanku tromboze. Osim toga, treba uvek imati na umu i činjenicu da sistemski nivoi fibrinoliznih komponenti ne odslikavaju uvek u potpunosti verodostojno lokalni fibrinolizni status, te da su od najvećeg patofiziološkog značaja studije koje se bave ispitivanjem regulacije fibrinolizne aktivnosti na organskom nivou.

#### **4.1. Uticaj pojedinačnih činilaca fibrinoliznog mehanizma na nastanak venske tromboze**

##### ***4.1.1. Plazminogen***

Najčešća klinička manifestacija homozigotnog, a ponekad i heterozigotnog nosilaštva genske mutacije koja uslovljava deficit plazminogena jeste linjuzni konjunktivitis koji podrazumeva pojavu ekstravaskularnih depozita fibrina u očima ali koji nikada nije doveden u vezu sa pojavom intravaskularnih depozita, odnosno povišenom učestalošću tromboznih incidenata. Jedna skorašnja studija koja je obuhvatila 50 pacijenata sa teškim deficitom plazminogena pokazala je da je čak 80% ovih pacijenata razvilo pomenutu formu konjunktivitisa ali ni jedan nije doživeo vensku trombozu. Takođe, populacione studije su potvrdile da je zastupljenost deficijencije plazminogena među pacijentima sa venskom trombozom veoma slična onoj kod zdravih ispitanika [194,195,196]. Sa druge strane, strukturalne abnormalnosti molekule plazminogena, bez obzira na njegovu koncentraciju u plazmi povezane su sa povišenim rizikom za nastanak venske tromboze. Tako je Aoki sa sar. [197] opisao pacijenta sa rekurentnim venskim trombozama koji je imao fiziološke antigene koncentracije plazminogena, ali samo 50% njegove funkcionalne aktivnosti, što je bio rezultat aminokiselinske zamene u blizini aktivnog histidinskog mesta. I kod nekolicine drugih pacijenata kasnije je zabeležena identična abnormalnost.

##### ***4.1.2. Tkivni aktivator plazminogena***

Iako rezultati ranijih studija nisu pokazivali postojanje veze između nivoa t-PA i rizika od nastanka prvog [198] ili ponovljenih venskih tromboznih incidenata [199], skorašnja istraživanja su dokazala da osobe se t-PA nivoima u najvišem kvartilu imaju 3,2 puta veći rizik od nastanka venske tromboze u poređenju sa osobama u prvom kvartilu [200,201].

Nekolicina ovih istraživanja ispitivala je i vezu između t-PA insercija/delecija (I/D) polimorfizma, koji je rezultat postojanja ili nedostatka Alu ponavljanja u osmom intronu gena za t-PA, i venske tromboze i prema njihovim rezultatima nema razlike u odnosu na genotip između osoba koje su doživele vensku trombozu i onih koje to nisu u Turskoj populaciji koja je ispitivana u ovom pravcu [200], dok su recimo Afro-Amerikanci sa DD genotipom imali 2,5 puta viši rizik od nastanka venske tromboze u odnosu na osobe iste etničke pripadnosti sa II genotipom [201].

Kako je koncentracija plazmatskog t-PA antigena odraz heterogene mešavine koju čine mala koncentracija aktivnog t-PA (svega nekoliko procenata) i znatno veća koncentracija kompleksa t-PA i raznih inhibitora (kao što su PAI-1, inhibitor plazmina ili C1 inhibitor) i kako je utvrđeno postojanje značajne korelacije između t-PA antigena i t-PA/PAI-1 kompleksa, to određivanje koncentracije ovih kompleksa ima daleko veći značaj u predviđanju trombotskih događaja u poređenju sa određivanjem koncentracija t-PA antigena. Treba istaći i to da plazmatska koncentracija t-PA antigena korelira sa aktivnošću PAI-1, ali ne i sa t-PA aktivnošću, te da porast koncentracije t-PA antigena iz tog razloga reflektuje sniženu a ne povišenu fibrinoliznu aktivnost

#### **4.1.3. Inhibitor aktivatora plazminogena**

Rezultati Physicians' Health Study [198] pokazuju da nema razlike u nivou PAI-1 antigena između ispitanika koji su doživeli vensku trombozu i onih koji nisu, što je potvrđeno i rezultatima case-control studije koja je izvedena iz LITE (Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology) kohorte, a obuhvatala je 308 pacijenata i 640 kontrola [202]. Pored toga, neke studije osporavaju i postojanje veze između nivoa ovog inhibitora fibrinolize i recidiva venske tromboze [199]. Za razliku od ovih rezultata, poslednjih godina sve je veći broj studija koje dokazuju postojanje višeg nivoa PAI-1 antigena ili aktivnosti kod osoba sa venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama [203]. Potvrđeno je i to da porast koncentracije PAI-1 u plazmi osoba sa venskom trombozom rezultuje brzim formiranjem inaktivnih kompleksa sa t-PA i skraćuje vreme poluživota t-PA na manje od jednog minuta. Kako je kod pacijenata sa trombozom dubokih vena često prisutan dugotrajan inflamatorni odgovor koji doprinosi porastu koncentracije PAI-1 u plazmi, informacije koje potiču iz retrospektivnih studija se moraju razmatrati sa dozom rezerve uzevši u obzir pitanje uzroka i posledice. Utoliko je značajnija činjenica da i rezultati prospektivnih studija dokazuju postojanje statistički značajne korelacije između PAI-1 nivoa u plazmi i rizika od nastanka tromboze dubokih vena.

Poznato je još nekoliko važnih činjenica u vezi sa inhibitorom aktivatora plazminogena, kao na primer to da je stabilnost slobodnog PAI-1 u plazmi izuzetno mala a njegovo određivanje u plazmi upravo iz ovog razloga, kao i zbog izraženih dnevnih varijacija, veoma teško. Treba istaći i to da trombociti sadrže značajnu količinu PAI-1 i da je obzirom na brzu konverziju aktivnog PAI-1 u latentnu formu u fiziološkim uslovima i vreme života trombocita u cirkulaciji od 5-10 dana, očekivano da je manje od 1% PAI-1 u trombocitima

aktivno. Međutim, dokazano je da je ovaj procenat oko deset puta veći. Razlog za to nije u potpunosti objašnjen još uvek, ali upravo u ovom otkriću može se tražiti objašnjenje za činjenicu da je tromb bogat trombocitima znatno otporniji na lizu sa t-PA [204].

Kada je o genu za sintezu inhibitora aktivatora plazminogena reč, treba istaći da je njegov najčešće proučavan polimorfizam 4G/5G I/D na poziciji -675 u promoterskoj regiji gena, kao i to da je ustanovljeno da je 4G alel u vezi sa povišenom transkripcijom gena i povišenim PAI-1 antigenim nivoima u poređenju sa 5G alelom. Tako je dakle, 4G/5G polimorfizam smatran tipičnim primerom "funkcionalnog" polimorfizma u čijem slučaju su upravo aleli pravi uzrok varijacija u PAI-1 koncentraciji, te postoje dokazi da osobe koje su homozigotni nosioci 4G alela imaju za 25% više plazmatske koncentracije PAI-1 u poređenju sa homozigotima za 5G alel. Studija sprovedena na Italijanskoj populaciji donosi rezultate da je prevalenca homozigotnih nosilaca 5G alela niža kod pacijenata sa venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama [205,206], a važno je istaći i rezultate metaanalize kojom je sagledavana veza između različitih genetskih činilaca i rizika za nastanak tromboze dubokih vena, koja je obuhvatila 173 case-control studije. Prema rezultatima ove metaanalize potvrđeno je postojanje statistički značajne veze između 4G/5G polimorfizma za PAI-1 i tromboze dubokih vena [207].

Iako se ne odnosi na pacijente sa venskom trombozom, interesantno je pomenuti rezultate jedne populacione kohortne studije sprovedene na 637 ispitanika koji su preživeli ishemijski cerebrovaskularni insult. Oni naime pokazuju da je povišen nivo aktivnosti PAI-1 u plazmi povezan sa povišenim rizikom od nastanka pomenutog oboljenja nezavisno od genotipa, te sugerišu da je genetska regulacija nivoa PAI-1 znatno kompleksnija nego što se pretpostavljalo i da se ne smeju zaboraviti alternativni mehanizmi koji dovode do porasta koncentracije ovog činioca, poput insulinske rezistencije i sistemske inflamacije, kao čestih komponenti trombotskog procesa [208]. Pruženi su čak i čvrsti dokazi da je 4G/4G genotip protektivan u slučaju ishemijskog cerebrovaskularnog insulta, a moguće objašnjenje treba tražiti u inhibiciji aktivacije enzima koji razgrađuju matriks u aterosklerotskom plaku od strane PAI-1, koji na taj način stabilizuje plak i prevenira njegovu rupturu koja vodi ishemijskoj infarkciji [209].

#### **4.1.4. Trombinom aktivišući fibrinolizni inhibitor**

Rezultati brojnih studija sugerišu da je povišen nivo TAFI-a povezan sa povišenim rizikom od nastanka venske tromboze. Tako je LETS studija (Leiden Thrombophilia Study), na uzorku od 474 pacijenata sa venskom trombozom i isto toliko kontrolnih ispitanika ustanovila dvostruko povišenje rizika za nastanak ovog oboljenja kod osoba koje su imale nivo TAFI-a iznad 90-og percentila [210], a rezultati još skorije case-control studije dokazuju čak četverostruko viši rizik [211]. Dalji dokazi o vezi između povišenog nivoa TAFI-a i recidiva venske tromboze proističu iz rezultata jedne prospektivne kohortne studije koja je obuhvatila 600 pacijenata sa prvom epizodom venske tromboze i ustanovila dvostruko

povišenje rizika od nastanka ovog oboljenja kod osoba koje imaju nivo TAFI-a iznad 75-og percentila [212].

Obzirom da je nivo TAFI-a delimično genetski determinisan i da je utvrđeno da 438 G/A polimorfizam u promoterskoj regiji gena za TAFI, kao i 505 G/A i 1040 C/T polimorfizmi u kodirajućoj regiji ovoga gena koreliraju sa plazmatskim nivoom TAFI antigena, mnoge studije bave se ispitivanjem veze pomenutih polimorfizama, antigenog nivoa TAFI u plazmi i rizika od nastanka tromboze. Do sada je utvrđeno da nosioci 505A alela imaju viši rizik od nastanka venske tromboze u poređenju sa osobama koje su nosioci 505G alela.

Na kraju, treba reći i to da postoje još uvek brojne nepoznanice i kontradiktornosti na polju uloge TAFI-a u nastanku venske tromboze. Tako na primer, dok je tromboza dubokih vena nogu nesumnjivo povezana sa povišenim nivoom TAFI-a u plazmi, u slučaju postojanja venske tromboze u splahnhičkoj regiji beleže se sniženi nivoui ovog činioca, što najverovatnije ukazuje na to da ne samo inhibitorna uloga u fibrinoliznom mehanizmu, nego i uticaj TAFI-a na inflamatorni odgovor igra značajnu ulogu u patogenezi ove retke tromboze [213,214].

## **4.2. Ukupni fibrinolizni potencijal i rizik od nastanka venske tromboze**

Još pre oko dve decenije ustanovljeno je postojanje veze između suprimirane fibrinolizne aktivnosti i venske tromboze [215]. Od tada, pa sve do danas, u centru interesovanja naučnika koji se bave ovom problematikom je pokušaj da se osmisli globalni test za procenu funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, koji na najbolji način odslikava kompleksnu interakciju njegovih brojnih pojedinačnih činilaca [216,217]. Među brojnim manje ili više uspešnim testovima koji su korišteni u ovu svrhu izdvojila su se dva. Početkom ovog veka predstavljen je OFP (overall fibrinolysis potential) ili ukupni fibrinolizni potencijal koji se izračunava kao razlika između ukupnog hemostaznog (OHP) i ukupnog koagulacionog (OCP) potencijala očitanih sa krive agregacije fibrina koja nastaje analizom uzoraka citratne plazme kojoj se dodaju male količine trombina i t-PA [218]. Nekoliko godina kasnije, javnosti je predstavljen još jedan test, CLT (clot lysis time) koji ima brojne prednosti u odnosu na prethodne metode procene globalne funkcije fibrinoliznog mehanizma ali se za sada koristi isključivo u naučno-istraživačke svrhe. Rezultati LETS studije, u kojoj je globalna funkcija fibrinoliznog mehanizma procenjivana pomoću CLT, potvrđuju postojanje dvostruko povišenog rizika za nastanak venske tromboze kod osoba koje imaju CLT iznad 90-og percentila u odnosu na osobe čije je CLT ispod ove cut off granice. I MEGA (Multiple Environmental and Genetic Assesement) studija, velika populaciona case-control studija pruža dokaze da postoji veza između izmerenog CLT i rizika za nastanak tromboze dubokih vena nogu, ali i plućne tromboembolije [219]. Koristeći kvartile za CLT u odnosu na vrednosti koje su ustanovljene u kontrolnoj grupi ispitanika, utvrđeno je da osobe u najvišem kvartilu imaju dvostruko viši rizik od nastanka venske tromboze u poređenju sa osobama u najnižem kvratilu.

Rezultati MEGA studije pokazali su još jedno interesantno otkriće, a to je da je kod osoba koje imaju kombinaciju suprimiranog fibrinoliznog potencijala i faktora rizika koji se

odnose na hiperkoagulabilnost, poput FV Leiden mutacije ili imobilizacije, stvarni rizik od nastanka venske tromboze značajno viši od onog koji se može pretpostaviti na osnovu prostog sabiranja ovih faktora rizika. Najizraženiji porast rizika za nastanak venske tromboze zabeležen je u grupi žena sa sniženim fibrinoliznim potencijalom koje su koristile oralna kontraceptivna sredstva. Tako su one koje su imale CLT iznad 75-og percentila, uz istovremeno uzimanje oralnih kontraceptiva imale čak 22 puta viši rizik za nastanak ovog oboljenja, dok su hipofibrinoliza ili uzimanje pomenutih lekova pojedinačno doveli do dvostrukog povišenja rizika [220].

Ne sme se zanemariti činjenica da je osnovna mana korišćenja case-control studija u ispitivanju veze između rizika za nastanak venske tromboze i različitih parametara koji se dobijaju analizom krvi ta da se krv od pacijenata uzima tek nakon što se već desio trombotski događaj. Logična je stoga bojazan da dokazana smanjena fibrinolizna aktivnost u ovoj bolesti može biti zapravo posledica njenog razvoja a ne uzročni mehanizam u njenom nastanku. U tom slučaju, za očekivati je da ako se CLT produžava kao posledica trombotskog događaja, dođe do njegovog skraćivanja nakon određenog vremena nakon tog događaja. No, pomenute studije koje su ispitivale vezu između CLT i rizika od nastanka venske tromboze, ustanovile su da nema povezanosti između CLT i broja dana između trombotskog incidenta i uzorkovanja krvi za analize, te dakle opravdavaju korišćenje rezultata case-control studija u donošenju zaključaka na ovom polju nauke.

Na kraju treba istaći da iako je u više studija ustanovljeno neosporno postojanje veze između sniženog fibrinoliznog potencijala, kao i povišenog plazmatskog nivoa TAFI i nastanka venske tromboze, još uvek je mali broj dokaza o uzročnoj ulozi nivoa plazminogena, inhibitora plazmina, t-PA i PAI-1 u nastanku ovog oboljenja. Upravo zbog toga, nedovoljno je jasno da li dokazana veza hipofibrinolize i venske tromboze zaista odslikava kombinovane efekte pojedinačnih fibrinoliznih proteina na rizik, samostalne efekte TAFI-a na rizik ili je pak odraz delovanja mehanizama koji nisu u neposrednoj vezi sa lizom fibrinskog ugruška.

## 5. Radna hipoteza i cilj istraživanja

Činjenica da je venska tromboza veoma značajan uzrok obolevanja i umiranja u većini zemalja danas, da sve češće pogađa mlađu populaciju, uslovljava visok procenat invalidnosti, zahteva česte lekarske kontrole i angažovanje multidisciplinarnog tima stručnjaka, što je sve povezano i sa značajnim materijalnim troškovima, govori u prilog zauzimanja aktivnog stava u ranom pronalaženju laboratorijskih znakova rizikofaktora za njen nastanak. Epidemiološke studije, koje su nam za sada na raspolaganju, a koje se bave ispitivanjem etiopatogeneze ove kompleksne, multikauzalne bolesti, sugerišu postojanje veze između smanjene fibrinolizne aktivnosti i razvoja tromboze, ali tačna patogenetska uloga i prediktivna vrednost fibrinoliznih alteracija do danas nisu u potpunosti rasvetljene.

Pretpostavke na kojima se zasniva istraživanje su:

- Učestalost suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma značajno je veća kod bolesnika sa venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama, te suprimirana funkcionalnost fibrinolize povećava rizik od nastanka venske tromboze
- Bolesnici oboleli od venske tromboze značajno se razlikuju u odnosu na koncentraciju inhibitora aktivatora plazminogena-1, ali i ostalih pojedinačnih činilaca fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa zdravim osobama
- Učestalost 4G/5G PAI-1 genskog polimorfizma značajno je viša kod bolesnika sa venskom trombozom u poređenju sa njegovom učestalošću kod osoba koje nisu doživele venski trombozni incident

Ispitivanje globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, kao i ispitivanje pojedinačnih komponenti fibrinoliznog mehanizma kod bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i njihovo poređenje sa funkcionalnošću fibrinoliznog mehanizma i njegovim komponentama kod zdravih osoba koje nisu imale vensku trombozu, imalo je sledeće ciljeve:

- Utvrditi eventualno postojanje razlike u učestalosti suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih osoba, kao i uticaj hipofibrinolize na rizik od nastanka venske tromboze
- Utvrditi da li postoji značajna razlika u koncentraciji inhibitora aktivatora plazminogena-1, kao i drugih činilaca fibrinoliznog mehanizma između bolesnika obolelih od venske tromboze i zdravih osoba

- Utvrditi da li postoji razlika u zastupljenosti 4G/5G PAI-1 polimorfizma između bolesnika sa venskom trombozom i osoba koje nikada nisu doživele venski trombozni incident



## 6. Materijal i metode ispitivanja

### 6.1. Odabir i grupisanje ispitanika

Tokom dvogodišnje studije, sprovedene u Centru za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine, u periodu od početka 2012. do početka 2014. godine, u istraživanje je uključeno ukupno 200 ispitanika, među kojima je bilo 100 bolesnika koji su doživeli trombozu dubokih vena (bilo izolovanu ili u kombinaciji sa plućnom tromboembolijom) i 100 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu grupu.

Prilikom posete lekaru, u Odeljenju za trombozu, hemostazu i hematološku dijagnostiku, ispitanicima je uzimana detaljna anamneza, sa akcentom na ličnu anamnezu u pogledu faktora rizika za nastanak tromboze dubokih vena i porodičnu anamnezu, koja se prvenstveno odnosila na venske trombozne incidente.

Nakon uzimanja anamnestičkih podataka ispitanici su podvrgnuti detaljnom kliničkom pregledu uz merenje telesne visine i telesne mase, kao i arterijskog krvnog pritiska.

Nakon adekvatne pripreme u vidu dvanaestočasovnog gladovanja, svim ispitanicima je izvršeno uzimanje uzoraka kubitalne venske krvi. Krv je uzimana između 7 i 9 časova pre podne, našte, nakon petnaestominutnog odmora, u sedećem položaju, sa posebnom pažnjom da se ne izazove duža venostaza. Uzorkovanje krvi je vršeno u tri epruvete. Dva uzorka uzimana su u plastične epruvete, sa 0,11 M tri-Na-citratom kao antikoagulansom u finalnoj koncentraciji 1:10. Iz jednog je odvajana plazma u centrifugi sa hlađenjem, u trajanju od petnaest minuta, na 3000 g, dok je drugi, uzorak pune krvi, korišten za genetske analize. Treći uzorak krvi, iz koga je izdvajan serum, uziman je u epruvete bez antikoagulansa. Najveći broj analiza izvođen je istog dana kada su i uzimani uzorci krvi, a za određivanje plazminogena, t-PA, PAI-1 i TAFI plazma je čuvana na -80°C. Uzorci pune krvi za genetske analize čuvani su na -20°C. U sklopu ove studije, u rad Centra za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine kao nove analize uvedene su određivanje TAFI i određivanje PAI-1.

Pored toga, svim ispitanicima uzet je i prvi jutarnji uzorak urina.

Na osnovu dobijenih laboratorijskih nalaza, koji su uključivali: kompletan pregled urina, sedimentaciju eritrocita, kompletnu krvnu sliku, CRP, glikemiju, pokazatelje jetrene i bubrežne funkcije (ukupni i direktni bilirubin, aspartat amino transferazu, alanin amino transferazu, alkalnu fosfatazu, gama glutamil transpeptidazu, ureu, kreatinin, mokraćnu kiselinu), ukupne proteine, elektrolitski status (K, Cl, P, Na, Ca, Fe), hemostazni mehanizam (vreme krvarenja, broj trombocita, aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme, protrombinsko vreme, trombinsko vreme, fibrinogen, euglobulinsko vreme lize koaguluma, D-dimer, plazminogen, t-PA, PAI-1, TAFI) i lipidske parametre (ukupni holesterol, ukupni trigliceridi, HDL holesterol, non-HDL holesterol, LDL holesterol, LDL/HDL holesterol, ukupni/HDL holesterol, Lp(a) lipoprotein) iz ispitivanja su isključene osobe koje nisu zadovoljavale kriterijume za uključivanje u studiju, koji će kasnije biti navedeni.

### **6.1.1. Bolesnici**

U grupi od 100 bolesnika ispitano je 48 (48%) muškaraca i 52 (52%) žene. Prosečna starost bolesnika bila je 52 godine. Najmlađi ispitanik je imao 19, a najstariji 88 godina.

Osnovni kriterijum za uključivanje bolesnika u studiju je bio da su doživeli trombozu dubokih vena, pri čemu je dijagnoza morala biti verifikovana putem anamneze, kliničkog pregleda i dopunske imaging dijagnostike (Duplex scan). Važno je istaći i to da je od kliničkog događaja venske tromboze do uzimanja bioloških uzoraka od bolesnika prošlo u svakom pojedinačnom slučaju više od tri meseca (obzirom na neophodnost primene antitrombozne terapije u ovom periodu) te je tako eliminisan mogući uticaj odgovora akutne faze na vrednosti ispitivanih parametara, kao i to da su bolesnici uključivani u studiju najranije tri meseca nakon obustavljanja oralne antikoagulantne terapije kako bi se izbegao svaki mogući uticaj ovih lekova na funkcionalnost hemostaznog mehanizma. U studiju su uključivani isključivo ispitanici stariji od 18 godina.

Kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja su bili: postojanje prethodno dokazanog poremećaja hemostaznog mehanizma; uzimanje lekova za koje se zna da mogu imati uticaja na hemostazni mehanizam, kao što su: kortikosteroidi i anabolici (sa izuzetkom antitrombocitnih lekova); akutna bolest u momentu uzorkovanja krvi ili 6 nedelja pre toga; malignitet; trudnoća; teže duševne bolesti; bolesti jetre i bubrega; autoimune bolesti; odbijanje ispitanika da potpiše pristanak informisanog ispitanika.

### **6.1.2. Kontrolna grupa**

Kontrolnu grupu zdravih ispitanika činilo je 100 osoba, od čega 51 (51%) muškarac i 49 (49%) žena. Prosečna starost iznosila je 50 godina. Najmlađi ispitanik je imao 19, a najstariji 87 godina. Kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja i u ovom slučaju bili su isti kao i za grupu bolesnika.

### **6.1.3. Klasifikovanje ispitanika**

Klasifikovanje ispitanika vršeno je na sledeći način:

- kako u okviru grupe bolesnika tako i u kontrolnoj grupi ispitanike smo najpre klasifikovali prema polu,
- ispitanike smo i u okviru grupe bolesnika i u okviru kontrolne grupe klasifikovali u odnosu na vrednosti arterijskog krvnog pritiska na ispitanike bez hipertenzije i ispitanike sa hipertenzijom
- u odnosu na pušačke navike bolesnike i kontrole smo klasifikovali u pušače i nepušače (ukoliko nisu pušili najmanje 10 poslednjih godina ili nikada nisu pušili),
- u odnosu na porodičnu anamnezu u pravcu venskog tromboembolizma bolesnike i kontrole smo klasifikovali na one sa pozitivnom i negativnom porodičnom anamnezom,

- u odnosu na vrednosti BMI ispitanike smo, kako u okviru grupe bolesnika, tako i u okviru kontrolne grupe klasifikovali kao: normalno uhranjene (BMI 18,6-24,9), prekomerno uhranjene (BMI 25,0-29,9) i gojazne (BMI  $\geq$ 30),
- u okviru grupe bolesnika ispitanike smo klasifikovali na one sa distalnom venskom trombozom (bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena nogu distalnije od v. poplitealis), one sa proksimalnom venskom trombozom (bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena nogu na nivou v. poplitealis ili proksimalnije), kao i one sa trombozom dubokih vena atipične lokalizacije (bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena ruku, cerebralnih venskih sinusa ili v. centralis retinae),
- u okviru grupe bolesnika takođe, ispitanike smo klasifikovali na one sa provociranim (provoked) i primarnim (unprovoked) venskim trombozama. Pod provociranom venskom trombozom smatrali smo onu trombozu za koju bolesnik daje podatak da joj je prethodio najmanje jedan od sledećih prihvaćenih faktora rizika za nastanak tromboze dubokih vena: hirurška intervencija, gipsana imobilizacija, povreda, hospitalizacija, nepokretnost, trudnoća, u periodu od tri meseca pre nastanka tromboznog incidenta, dugotrajna putovanja u periodu od dva meseca pre nastanka tromboze, kao i upotreba oralnih kontraceptivnih sredstava. Primarnom venskom trombozom smatrali smo onu trombozu za koju nije prepoznat ni jedan od nabrojanih faktora rizika,
- u odnosu na fibrinolizni potencijal ispitanici su klasifikovani u kategoriju sa očuvanim ili suprimiranim fibrinoliznim potencijalom. Ispitivanje funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma vršili smo korišćenjem kako metoda za utvrđivanje ukupne aktivnosti fibrinoliznog sistema, tako i metoda za određivanje pojedinačnih komponenti fibrinoliznog sistema. Na osnovu svih dobijenih rezultata donosili smo procenu o očuvanosti fibrinoliznog potencijala kod ispitanika i svrstavali ih u dve pomenute kategorije, pri čemu su ispitanici okarakterisani kao oni sa suprimiranim fibrinoliznim potencijalom obavezno imali euglobulinsko vreme lize koaguluma duže od 240 minuta, a ispitanici sa očuvanim fibrinoliznim potencijalom od 120 do 240 minuta,
- ispitanike smo i u okviru grupe bolesnika, i u okviru kontrolne grupe klasifikovali, u odnosu na rezultate sprovedenih genetskih analiza u pravcu postojanja 4G/5G polimorfizma gena za PAI-1, na ispitanike koji nisu nosioci mutacije (5G/5G genotip), ispitanike koji su heterozigotni nosioci mutacije (4G/5G genotip) i ispitanike koji su homozigotni nosioci mutacije (4G/4G genotip).
- u odnosu na serumske koncentracije Lp(a) lipoproteina ispitanici su u okviru obe grupe klasifikovani u kategoriju onih sa hiperLp(a)lipoproteinemijom (vrednost Lp(a)lipoproteina iznad 0,30 g/l) i onih bez hiperLp(a)lipoproteinemije (vrednost Lp(a)lipoproteina do 0,30 g/l),

- koristeći opšte prihvaćene parametre za dijagnostikovanje tipa hiperlipoproteinemije (serumski nivoi ukupnog holesterola i triglicerida, HDL-holesterol, mokraćna kiselina, frižiderski test), a na osnovu modifikovane i dopunjene Fredricksonove klasifikacije [221] ispitanici kod kojih je verifikovano postojanje hiperlipoproteinemije klasifikovani su u podgrupe na osnovu tipa hiperlipoproteinemije.

## 6.2. Metode ispitivanja

### 6.2.1. Analize hemostaznog mehanizma

Analize parametara hemostaznog mehanizma izvršene su u laboratoriji Odeljenja za trombozu, hemostazu i hematološku dijagnostiku, Centra za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine.

Vreme krvarenja je određivano metodom po Ivy-ju koja podrazumeva merenje srednjeg vremena za koje krv spontano prestaje da ističe iz malih, subkutanih krvnih sudova, koji su povređeni pravljenjem dva uboda na podlaktici ruke, standardnom lancetom, pri arterijskom pritisku od 5,2 kPa [222]. Rezultat je izražen u sekundama. Broj trombocita je određivan pomoću automatizovanog hematološkog brojača CELL-DYN SAPPHIRE, proizvođača ABBOTT (Wiesbaden, Germany).

Testovi za procenu globalne očuvanosti funkcionalnosti koagulacionog mehanizma: aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT), protrombinsko vreme (PT) i trombinsko vreme (TT) izvedeni su delom (do januara 2013. godine) uz pomoć automatizovanog koagulometra ACL-TOP 500 CTS, proizvođača Instrumentation Laboratory, Lexington, USA, a delom (nakon januara 2013. godine) uz pomoć automatizovanog koagulometra SIEMENS BCSxp, proizvođača Dade Behring (Marburg, Germany). Za aPTT je korišten reagens Dade Actin FS, proizvođača Dade Behring, Marburg, Nemačka. Protrombinsko vreme je određivano pomoću reagensa Thromborel S, a trombinsko vreme reagensom BC Thrombin, istoga proizvođača. Rezultati aPTT-a, PT-a i TT-a izražavani su u R (ratio), koji se dobija kada se dobijeni rezultat za određivani uzorak plazme izražen u sekundama podeli sa komercijalnom kontrol plazmom laboratorije u kojoj je izvedena analiza, takođe izraženom u sekundama. Nivo D-dimera određivan je automatizovanim latex imunoesejom, pomoću reagensa D-dimer Latex Reagent, proizvođača Instrumentation Laboratory, Lexington, USA.

Euglobulinsko vreme lize koaguluma je određivano prema Macfarlane-u i Pilling-u [223]. Princip metode je u tome da se najpre razblaživanjem plazme destilovanom vodom, a potom zakiseljavanjem rastvorom sirćetne kiseline izazove taloženje euglobulinske frakcije plazme, a zatim se dobijeni talog resuspenduje u boratnom puferu, koaguliše dodatkom 0,025 M rastvora  $\text{CaCl}_2$  i registruje vreme lize koaguluma koji se inkubira u vodenom kupatilu na 37°C. Vreme lize koaguluma je izražavano u minutima. Koncentracija fibrinogena u plazmi određivana je modifikacijom metode po Clauss-u, korišćenjem reagensa

Multifibren U, proizvođača Dade Behring, Marburg, Nemačka i izražavana u g/l [224]. Koncentracija plazminogena određivana je testom sa hromogenim supstratom, uz pomoć reagensa Berichrom Plasminogen, proizvođača Siemens, Marburg, Nemačka. Vrednosti plazminogena izražene su u procentima koji se odnose na plazmatsku aktivnost plazminogena. Nivo tkivnog aktivatora plazminogena u plazmi određivan je ELISA tehnikom, pomoću Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit for tPA reagensa, proizvođača USCNK Life Science Inc, Wuhan, China. Vrednosti su izražavane u ng/ml.

#### *6.2.1.1. Određivanje nivoa TAFI*

Nivo TAFI-a određivan je ELISA tehnikom, Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit for TAFI reagensom firme USCNK Life Science Inc, Wuhan, China.

Pincip testa: Uzorak ispitivane plazme dodajemo u čašice držača koje su obložene sa mišjim monoklonskim anti-humanim TAFI antitelima, specifičnim za jednu antigenu determinantu TAFI-a. TAFI iz uzorka plazme se vezuje za ova antitela, tokom dvočasovne inkubacije. Uzorci plazme se prethodno razblažuju u odnosu 1:5 sa diluiranim fosfatnim puferom, kako bi pomenuta mišja antitela bila u višku tokom reakcije antigen – antitelo, odnosno kako bi se celokupan TAFI iz uzorka plazme vezao za njih. Nakon ovoga sledi ispiranje, a potom se dodaje reagens koji u sebi sadrži druga mišja monoklonska anti-humani TAFI-antitela, specifična za drugu antigenu determinantu TAFI i vezana za enzim peroksidazu. Tako se formira “sendvič” u kome je TAFI preko dve različite antigene determinante vezan za dve vrste mišjih monoklonskih antitela. Na ovaj način je obezbeđena visoka senzitivnost testa. Ovo vezivanje se odvija tokom inkubacije koja traje sat vremena. Potom sledi novo ispiranje, a zatim se dodaje reagens koji sadrži orto–fenil–enediamin kao supstrat za pomenutu peroksidazu, a u prisustvu vodonik peroksida. Tada se razvija boja. Reakcija se stopira sa jakim kiselinom, a intenzitet stvorene boje direktno je proporcionalan koncentraciji TAFI u uzorku plazme.

Materijal neophodan za analizu: aluminijumska ploča sa 96 čašica obloženih mišjim monoklonskim anti-humanim TAFI antitelima, standard, Assay Diluent A, detekcioni reagens A, Assay Diluent B, detekcioni reagens B, TMB substrat, koncentrisani rastvor za ispiranje.

#### Metodologija rada:

##### *Priprema reagenasa:*

- svi reagensi i uzorci moraju pre analize da se temperiraju 30 minuta na sobnoj temperaturi (18-25°C), ne preporučuje se rastvaranje reagenasa na 37°C;
- standard se rekonstituiše sa 1 ml standard diluenta. Ovaj rastvor pre upotrebe treba da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi. Na taj način je dobijena koncentracija od 100 ng/ml u standardu. Potom se u 7 čašica koje sadrže po 0,5 ml standard diluenta naprave dvostruko razblažene serije i na taj način dobije 7 tačaka razblaženog standarda (odnosno 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 ng/ml) a

poslednja čašica je blank, odnosno ima koncentraciju 0 ng/ml. Standard je potrebno pripremiti unutar 15 minuta pre otpočinjanja analize;

- detekcioni reagens A i B se pre upotrebe centrifugiraju, a potom se sa Assay Diluent-om A i B razblaže do radne koncentracije (1:100);
- 20 ml koncentrisanog rastvora za ispiranje se razblaži sa 580 ml destilovane vode kako bi se dobilo 600 ml rastvora za ispiranje;
- TMB substrat - potrebna doza rastvora se uzima sa sterilnim nastavkom, a ostatak rastvora se ne vraća u bočicu.

#### *Priprema i čuvanje uzoraka:*

- za određivanje TAFI krv je uzorkovana u epruvete sa 0,11 M tri-Na-citratom, u odnosu 1:10. Nakon toga krv je centrifugirana u centrifugi sa hlađenjem na 3000 g u trajanju od 15 minuta;
- tako obrađeni uzorci plazme su do momenta analize čuvani na  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
- neposredno pre izvođenja analize uzorci su odmrzavani na sobnoj temperaturi.

#### Procedura:

1. Odrede se čašice za razblaženja standarda, blank i uzorke, pri čemu je potrebno 7 čašica za standard i 1 za blank. Doda se po 100  $\mu\text{l}$  svakog od razblaženja standarda, blanka i uzoraka u odgovarajuće čašice. Ploča se prekrije sa pokrovom. Sledi inkubacija na  $37^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 2 sata.
2. Ukloni se tečnost iz čašica, bez ispiranja.
3. Doda se po 100  $\mu\text{l}$  radnog rastvora detekcionog reagensa A u svaku čašicu. Nakon pokrivanja sledi inkubacija na  $37^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 1 sata.
4. Nakon ispiranja rastvora, svaka čašica se ispere sa 350  $\mu\text{l}$  rastvora za ispiranje i ostavi da stoji 1-2 minuta. Otresanjem na absorbujući papir u potpunosti se odstrani sav eventualni višak tečnosti. Na ovaj način se detaljno ispiranje ponovi ukupno tri puta. Nakon trećeg ispiranja odstrani se i pufer za ispiranje aspiracijom ili otresanjem.
5. Doda se po 100  $\mu\text{l}$  radnog rastvora detekcionog reagensa B u svaku čašicu. Nakon pokrivanja, sledi inkubacija na  $37^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 30 minuta.
6. Izvrši se ispiranje, na identičan način kako je opisano u koraku 4, ukupno 5 puta.
7. Doda se 90  $\mu\text{l}$  rastvora TMB substrata u svaku čašicu. Nakon pokrivanja novim pokrovom, sledi inkubacija na  $37^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 5-10 minuta. Neophodno je u ovom momentu dobro zaštititi ploču od svetlosti. Nakon dodavanja substrata uzorci u čašicama će promeniti boju u plavo.

8. Doda se 50  $\mu$ l stop rastvora u svaku čašicu. Nakon ovoga uzorci će postati žuti. Izvrši se mešanje tapkanjem ploče sa strane, što je naročito važno ukoliko promena boje ne deluje ravnomerno.

9. izvrši se očitavanje na automatskom čitaču na 450 nm.

#### *6.2.1.2. Određivanje nivoa PAI*

Nivo PAI aktivnosti u plazmi određivan je metodom hromogenog substrata, uz korišćenje reagensa Berichrom PAI, proizvođača Siemens, Marburg, Nemačka.

Pincip testa: PAI u ispitivanom uzorku deaktivira prisutnu urokinazu. Preostala aktivnost urokinaze određuje se na osnovu konverzije plazminogena u plazmin. Nastali plazmin meri se pomoću hromogenog substrata na 405 nm.  $\alpha$ 2 antiplazmin se deaktivira oksidacijom sa hloramonom.

Materijal neophodan za analizu: PAI standard S1, PAI standard S2, PAI kontrolna plazma, urokinaza reagens, plazminogen reagens, oksidans, substrat plazmina, diluent substrata.

#### Metodologija rada:

##### *Priprema reagenasa:*

- potrebno je da se svi reagensi (izuzev standarda i kontrola) pre analize temperiraju na temperaturi od 37°C;
- liofilizirani reagensi se rekonstituišu sa naznačenom količinom destilovane vode;
- doda se substrat plazmina substrat diluentu
- pre upotrebe se reagens nežno promućka

##### *Priprema i čuvanje uzoraka:*

- za određivanje PAI krv je uzorkovana u epruvete sa 0,11 M tri-Na-citratom, u odnosu 1:10. Nakon toga krv je centrifugirana u centrifugi sa hlađenjem na 3000 g u trajanju od 15 minuta;
- tako obrađeni uzorci plazme su do momenta analize čuvani na -80°C;
- neposredno pre izvođenja analize uzorci su odmrzavani u vodenom kupatilu na 37°C unutar 10 minuta, a nakon toga je analiza izvođena unutar dva sata od odmrzavanja uzoraka.

#### Procedura:

Nivo aktivnosti PAI određivan je na automatizovanom koagulometru SIEMENS BCSxp, Dade Behring (Marburg, Nemačka), koji na osnovu S1 i S2 standarda automatski pravi referentnu krivu sa koje na osnovu absorbance očitava aktivnost PAI izraženu u urokinaza-inhibirajućim jedinicama po mililitru (U/ml). Obzirom da je analiza PAI, u sklopu izrade ove doktorske disertacije uvedena u rad Laboratorije

za hemostazu i trombozu Centra za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine, na osnovu vrednosti koje su dobijene u grupi od 100 kontrolnih uzoraka zdravih osoba, a koje su podrazumevale srednju vrednost od 4,56 U/ml i standardnu devijaciju 1,92, referentni opseg PAI za našu populaciju definisan je kao onaj između 2,63 i 6,48 U/ml.

### **6.2.2. Analize krvnih lipida i Lp(a) lipoproteina**

Za analize krvnih lipida i Lp(a) lipoproteina korišteni su serumi. Oni su izdvajani iz pune krvi nakon koagulacije i dvočasovnog perioda inkubacije uzorka na sobnoj temperaturi. Parametri lipidskog statusa ispitivani su u svežim uzorcima seruma, dok su za određivanje Lp(a) lipoproteina serumi zamrzavani na  $-20\text{ C}^{\circ}$ , u periodu kraćem od mesec dana.

#### **6.2.2.1. Lipidski status**

Koncentracija holesterola u serumu, kao i koncentracija serumskih triglicerida određivane su standardizovanim enzimskim postupkom uz korišćenje reagenasa firme "bioMérieux". Određivanje holesterola u HDL frakciji vršeno je direktnom enzimskom metodom za kvantitativno određivanje HDL holesterola u humanom serumu pomoću reagenasa firme "Randox". Vrednosti LDL holesterola (Friedewald i saradnici) i non-HDL holesterola (ukupni holesterol-HDL holesterol), kao i indeks ateroskleroze (LDL holesterol / HDL holesterol) i aterogeni odnosi (ukupni holesterol / HDL holesterol i non-HDL holesterol / HDL holesterol) dobijeni su računskim putem. Vršeno je i procenjivanje izgleda seruma posle njegovog stajanja 18-24 časa na temperaturi od  $+4\text{ C}^{\circ}$ .

#### **6.2.2.2. Lp(a) lipoprotein**

Koncentracija Lp(a) lipoproteina u serumu određivana je imunoturbidimetrijskom metodom Latex aglutinacije, korišćenjem latex čestica sa monoklonskim antitelima visoko specifičnim za Lp(a) lipoprotein, automatski, na aparatu Olympus AU400. Latex reagens sadrži mikročestice jednake veličine, obložene sa monoklonskim antitelima visoko specifičnim za Lp(a) lipoprotein. Nakon mešanja uzorka seruma sa Latex reagensom dolazi do aglutinacije, čiji je stepen direktno proporcionalan koncentraciji Lp(a) lipoproteina u uzorku, a određuje se kinetičkim testom merenja povećane absorpcije na 570 nm, uzrokovane prisustvom agregata. Rezultati su iskazani u g/l.

### **6.2.3. Genetska analiza**

Ispitivanje prisustva PAI-1 genske mutacije sprovedeno je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Beogradu.

Za izolaciju DNK ispitanika za analizu PAI-1 4G/5G genskog polimorfizma korišteni su limfociti periferne krvi. Krv ispitanika uzimana je sa 3,2% Na-citratom kao antikoagulansom. Genomska DNK izolovana je upotrebom QIAampDNA blood mini kit-a (QIAGEN, Nemačka), prema standardnom protokolu proizvođača. Detekcija genske varijante PAI-1 4G/5G vršena je metodom PCR-RFLP. Reakcija lančanog umnožavanja DNK za analizu prisustva PAI-1



4G/5G genske varijante odvijala se u smeši finalne zapremine 25  $\mu$ l, sledećeg sastava: 1xpufer A (Kapa system, Boston, USA), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP; 10 pmol svakog od odgovarajućih graničnika, 1 U Taq polimeraze i 200 ng DNK. PCR reakcija se odvijala po preskripciji proizvođača: inicijalna denaturacija DNK u trajanju od 5 minuta na 94°C, 33 ciklusa u trajanju od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 61°C i 30 sekundi na 72°C, te potom finalna sinteza DNK u trajanju od 10 minuta na 72°C. Elektroforezom genomske DNK na 2% agaroznom gelu u TBE puferu proveravan je kvalitet dobijene DNK. U bunariće načinjene na polimerizovanom agaroznom gelu, kome je dodat etidijum-bromid (fluorescentna boja), dodato je po 5  $\mu$ l izolovane DNK i 2 $\mu$ l boje (6xloading buffer: 0.25% brom-fenol plavo, 0.25% ksilen-cijanol i 20% fikol), a elektroforeza DNK je izvršena u trajanju od 30 minuta u TBE puferu, pri naponu od 80V i jačini struje 25-40mA. Kako negativno naelektrisana DNK migrira ka anodi, kvalitetno dobijeni uzorci ostaju na dnu bunarića u gelu, bez formiranja trake. Metodom PCR (Polymerase Chain Reaction) postignuta je selektivna amplifikacija dela DNK koji je planiran za analizu. Na ovaj način postiže se visoka specifičnost i prinos uzoraka, jer se DNK umnožava 10<sup>6</sup> do 10<sup>9</sup> puta. Nakon proveravanja na agaroznom gelu produkti PCR reakcije digestirani su Bsel I restrikcionim enzimom (Biolabs, New England). Produkti digestije analizirani su vertikalnom elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu. Na osnovu veličine restrikcionih fragmenata razdvajani su normalni (77 i 21 bp) i mutirani (98 bp) aleli. Vizuelizacija DNK vršena je bojenjem gelova solima srebra [225].

### 6.3. Obrada podataka

#### 6.3.1. Statistička analiza

Za statističu obradu podataka korišten je softver SPSS, verzija 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

U svrhu prikaza osnovnih karakteristika ispitanika korištene su metode deskriptivne statistike. Pre odabira statističkih metoda koje će biti korištene u analizi podataka izvršeno je testiranje verovatnoće i distribucije za svaku pojedinačnu varijablu, upotrebom One-Sample Binomial testa, One-Sample  $\chi^2$  testa i Kolmogorov-Smirnov testa. Za ispitivanje statističke značajnosti razlika za kontinuirane varijable koje imaju normalnu distribuciju korišten je Mann-Whitney U test. Za ispitivanje razlika u učestalosti pojedinih parametara između različitih grupa ispitanika korišten je Pearson-ov  $\chi^2$  test. Za utvrđivanje povezanosti su korišteni Pearson-ov koeficijent linearne korelacije i Spearman-ov koeficijent korelacije ranga. P-vrednost manja od 0.05 je smatrana statistički značajnom, u svakom od pomenutih testova.

Za poređenje pacijenata sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika, korištena je i nekondicionalna logistička regresija, pomoću koje su dobijeni OR sa 95% CI kao mera relativnog rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma i koncentraciju pojedinačnih komponenti fibrinoliznog mehanizma. Analiza je prilagođena za sve potencijalne "confounder"-e (godine, pol, BMI, pušenje,

hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a) lipoproteinemiju, diabetes, CRP, fibrinogen, hipertenziju) koji se dovode u vezu sa funkcionalnošću fibrinoliznog mehanizma, a u isto vreme mogu imati uticaj na rizik od nastanka venske tromboze. Kako bi izbegli to da dobijeni rezultati budu posledica biasa, pomenutu analizu smo prilagodili takođe i za upotrebu statina, hormonskih lekova (oralni kontraceptivi ili postmenopauzalna hormonska terapija) i fizičke aktivnosti, kao potencijalnih izvora "confounding"-a. Ovi lekovi dodati su modelu kao dihotomna varijabla, pri čemu su svi muškarci klasifikovani tako da nisu izloženi njihovom uticaju. 95% CI je izračunat prema metodi po Woolf-u [226].

Pacijenti sa provociranom i idiopatskom venskom trombozom, kao i pacijenti sa trombozom dubokih vena i oni sa plućnom tromboembolijom kombinovani su u većini analiza, ali su i posebno analizirani.

### **6.3.2. "Confounding"**

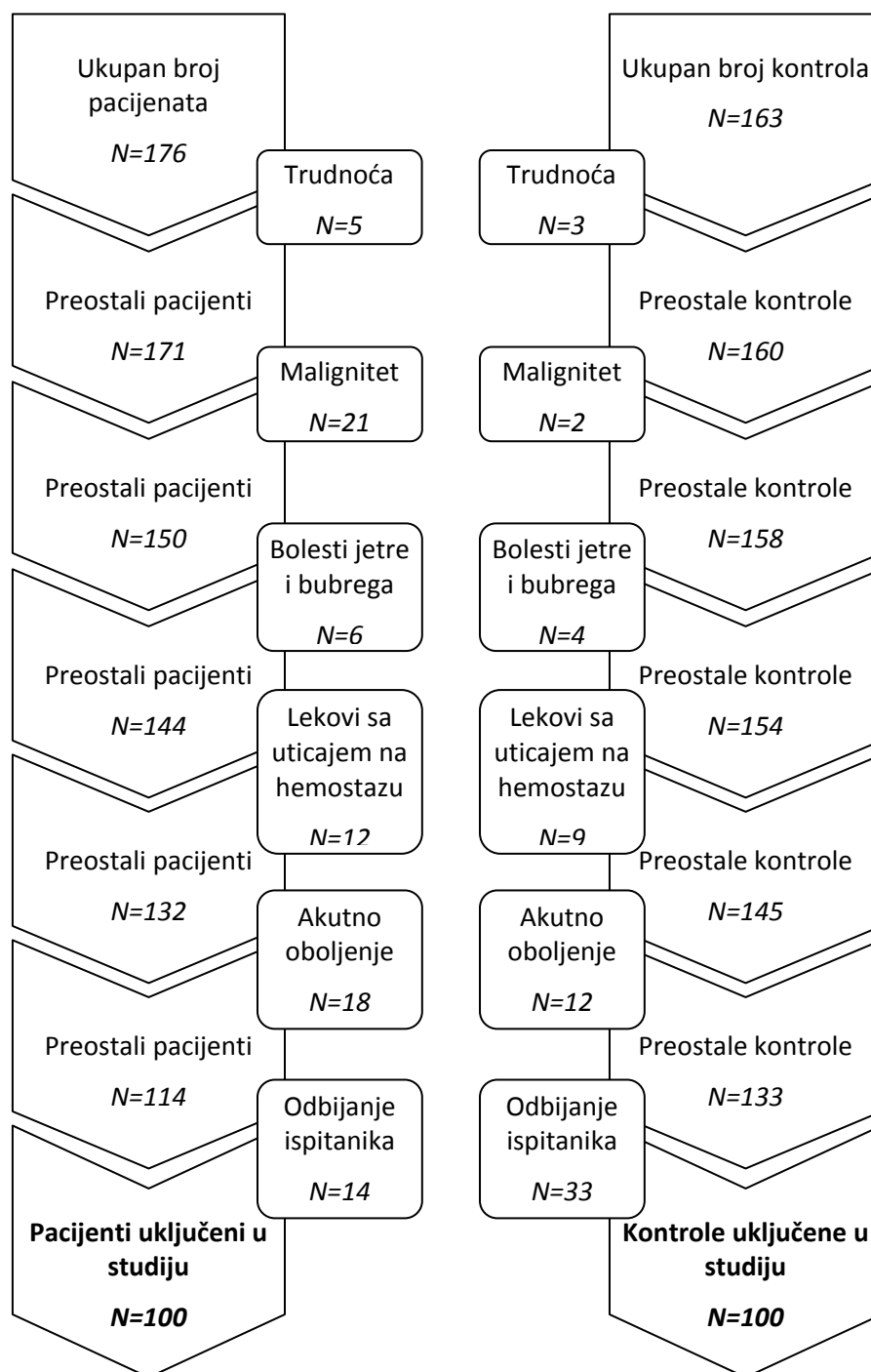
Kako se u današnje vreme podrazumeva da je jedno od ključnih pitanja vezanih za kvalitetan dizajn bilo koje studije upravo eliminisanje potencijalnog uticaja "confounder"-a, to se pri dizajniranju ove studije o tome posebno vodilo računa. "Confounding" podrazumeva situaciju u kojoj je efekat varijable čiji uticaj na neki parametar ispituujemo pomešan sa uticajem neke druge varijable na isti parametar, što može usloviti nastanak biasa, odnosno grube greške u interpretaciji dobijenih rezultata. Drugačije rečeno, "confounder" istovremeno mora biti u dokazanoj vezi sa bolešću (bilo kao neposredni uzročni činilac, bilo kao indirektni činilac, ali ne kao efekat bolesti), kao i sa činiocem čiju uzročnu vezu sa tom bolešću ispituujemo.

Upravo iz ovih razloga nekondicionalna logistička regresija koja je korištena kao analiza za procenu relativnog rizika za nastanak venske tromboze kod pacijenata sa suprimiranim fibrinoliznim potencijalom prilagođena je osim za godine i pol, i za: BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a) lipoproteinemiju, diabetes, CRP, fibrinogen, hipertenziju, statine i hormonsku terapiju (oralni kontraceptivi ili estrogena supstituciona terapija), obzirom da je svaki od ovih pojedinačnih činilaca doveden na osnovu rezultata reprezentativnih studija u vezu sa funkcionalnošću fibrinoliznog mehanizma, a u isto vreme je za svaki od njih dokazano da mogu uticati na rizik od nastanka venske tromboze [227-246].

## 7. Rezultati ispitivanja

### 7.1. Selekcija i opšte karakteristike ispitanika

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 339 ispitanika. Nakon primenjivanja prethodno navedenih kriterijuma za isključivanje iz studije, u ispitivanje je uključeno ukupno 200 ispitanika podeljenih u dve grupe - grupu bolesnika i kontrolnu grupu (Slika 1).



Slika 1. Selekcija ispitanika u bolesničkoj i kontrolnoj grupi

Osnovne karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje predstavljene su u Tabeli 1. Grupa bolesnika obuhvatila je 100 ispitanika, među kojima je bilo 48 muškaraca i 52 žene, prosečne starosti 52 godine. Najmlađi ispitanik u ovoj grupi imao je 19, a najstariji 88 godina. Kontrolnu grupu činilo je takođe 100 ispitanika. Među njima bio je 51 muškarac i 49 žena, prosečne starosti 50 godina, pri čemu je najmlađi ispitanik imao 19, a najstariji 87 godina. Bolesnici koji su doživeli venski trombozni incident imali su u proseku nešto viši body mass index (BMI) u odnosu na zdrave kontrole (27 vs. 26).

Posmatrajući klasične faktore rizika za nastanak venske tromboze koji uključuju: hiruršku intervenciju, gipsanu imobilizaciju, povredu ili nepokretnost, u periodu od tri meseca pre nastanka tromboznog incidenta, kao i duža putovanja u periodu od dva meseca pre nastanka tromboze, ustanovili smo da su oni češće prisutni kod bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (44% vs. 15%).

Analizom zastupljenosti klasičnih faktora rizika za nastanak arterijske tromboze uočava se da su bolesnici koji su doživeli vensku trombozu gojazniji u poređenju sa zdravim kontrolama (22% vs. 16%) i češće spadaju u pušače (31% vs. 24 %). Takođe, kod bolesnika sa venskom trombozom češće se beleže hipertenzija (41% vs. 29%), hiperlipoproteinemija (69% vs. 54%) i hiperLp(a)lipoproteinemija (20% vs. 12%) nego kod zdravih kontrola.

*Tabela 1. Kliničke karakteristike ispitanika*

	<b>Bolesnici (n=100)</b>	<b>Kontrole (n=100)</b>
<b>Opšte karakteristike</b>		
Muškarci	48 (48)	51 (51)
Starost, g	52 (19-88)	50 (19-87)
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27 (17-39)	26 (18-37)
<b>Klasični faktori rizika za nastanak venske tromboze</b>		
Prisutni†	44 (44)	15 (15)
Odsutni†	56 (56)	85 (85)
<b>Klasični faktori rizika za nastanak arterijske tromboze</b>		
Gojaznost	22 (22)	16 (16)
Pušenje	31 (31)	24 (24)
Hipertenzija	41 (41)	29 (29)
Hiperlipoproteinemija	69 (69)	54 (54)
Hiper Lp(a) lipoproteinemija	20 (20)	12 (12)

†Klasični faktori rizika uključuju hirurške intervencije, malignitet, nepokretnost, traumu, gipsanu imobilizaciju, upotrebu hormonskih preparata i duža putovanja

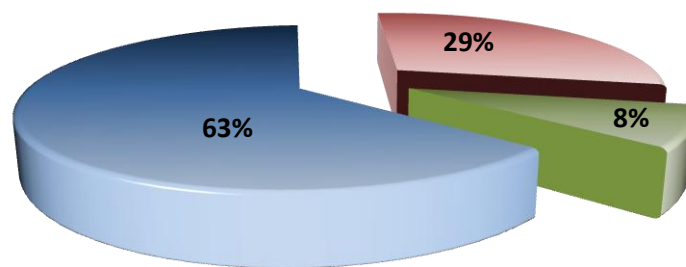
U odnosu na lokalizaciju venskog tromboznog procesa beleži se proksimalna venska tromboza (ona koja je lokalizovana u v. poplitealis i/ili venama proksimalno od nje) kod 63% bolesnika, dok je izolovana distalna venska tromboza bila prisutna kod dvostruko manje

bolesnika (29%). Kod bolesnika sa proksimalnom venskom trombozom uočava se gotovo podjednaka zastupljenost levostrane i desnostrane lokalizacije procesa (49% vs. 51%), dok je kod bolesnika sa izolovanom distalnom trombozom dubokih vena nogu češće prisutna levostrana lokalizacija (59% vs. 41%). Prisustvo atipično lokalizovane venske tromboze zabeleženo je kod 8 (8%) bolesnika, od čega je kod 7 bolesnika ona zahvatila duboke vene ruku a kod 1 bolesnika v. centralis retinae. Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 2 i na Grafikonu 1.

U odnosu na vrstu venske tromboze uočava se da je kod 56% bolesnika u pitanju bila spontana ("unprovoked") venska tromboza, dok je kod 44% njih bila provocirana ("provoked") jednim od faktora rizika za nastanak venske tromboze, što je prikazano na Grafikonu 2. Među provociranim venskim trombozama hirurške intervencije prepoznate su kao uzročni faktor kod 11% bolesnika, gipsana imobilizacija kod 27% bolesnika, trauma kod 25% bolesnika, trudnoća kod 23% bolesnika a hormonska terapija (koja je podrazumevala bilo primenu oralnih kontraceptivnih preparata, bilo supstitucionu postmenopauznu hormonsku terapiju) kod 14% bolesnika.

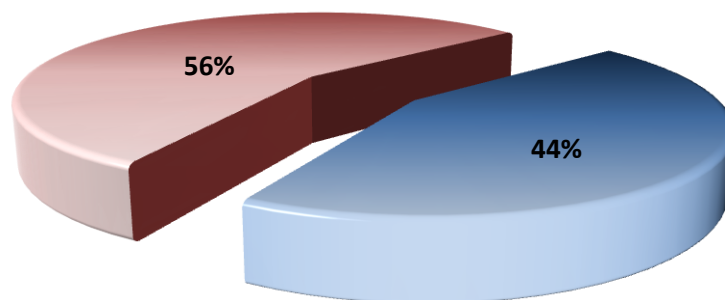
*Tabela 2. Karakteristike grupe bolesnika u odnosu na vrstu i lokalizaciju venske tromboze*

Lokalizacija venske tromboze			
Proksimalne duboke vene nogu	63 (63)	Desnostrana	32 (51)
		Levostrana	31 (49)
Distalne duboke vene nogu (izolovano)	29 (29)	Desnostrana	12 (41)
		Levostrana	17 (59)
Atipična	8 (8)	Duboke vene ruku	7 (88)
		V. centralis retinae	1 (12)
Prisustvo faktora rizika za nastanak venske tromboze			
Provocirana venska tromboza	44 (44)	Hirurške intervencije	5 (11)
		Gipsana imobilizacija	12 (27)
		Trauma	11 (25)
		Trudnoća	10 (23)
		Hormonska terapija	6 (14)
Spontana venska tromboza	56 (56)		



■ Proksimalne duboke vene nogu ■ Distalne duboke vene nogu ■ Atipična lokalizacija

*Grafikon 1. Prikaz bolesnika u odnosu na lokalizaciju trombotskog procesa*



■ Provocirana venska tromboza ■ Spontana venska tromboza

*Grafikon 2. Prikaz bolesnika u odnosu na vrstu trombotskog procesa*

## **7.2. Rezultati ispitivanja zastupljenosti faktora rizika za nastanak tromboze u okviru različitih bolesničkih podgrupa**

Analizom zastupljenosti različitih faktora rizika za nastanak tromboze uočavamo da nema statistički značajne razlike u procentualnoj zastupljenosti gojaznih između bolesnika sa distalnom, proksimalnom i trombozom vena retke lokalizacije (17% vs. 22% vs. 37%;  $p=0.471$ ), kao ni između bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena (20% vs. 23%;  $p=0.741$ ).

U grupi bolesnika koji su doživeli trombozu dubokih vena 6 bolesnika (14%) je koristilo oralne kontraceptivne preparate ili postmenopauznu hormonsku supstytucionu terapiju. Nisu zabeležene razlike u učestalosti korišćenja ovih hormonskih preparata između tri bolesničke podgrupe u odnosu na lokalizaciju tromboznog procesa (distalna DVT 7% vs. proksimalna DVT 6% vs. DVT retke lokalizacije 0%;  $p=0.566$ ).

Ne uočava se postojanje značajne razlike u zastupljenosti pušača između bolesnika sa distalnom, proksimalnom ili trombozom vena retke lokalizacije (35% vs. 32% vs. 12%;  $p=0.482$ ), kao ni između bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena (25% vs. 36%;  $p=0.250$ ).

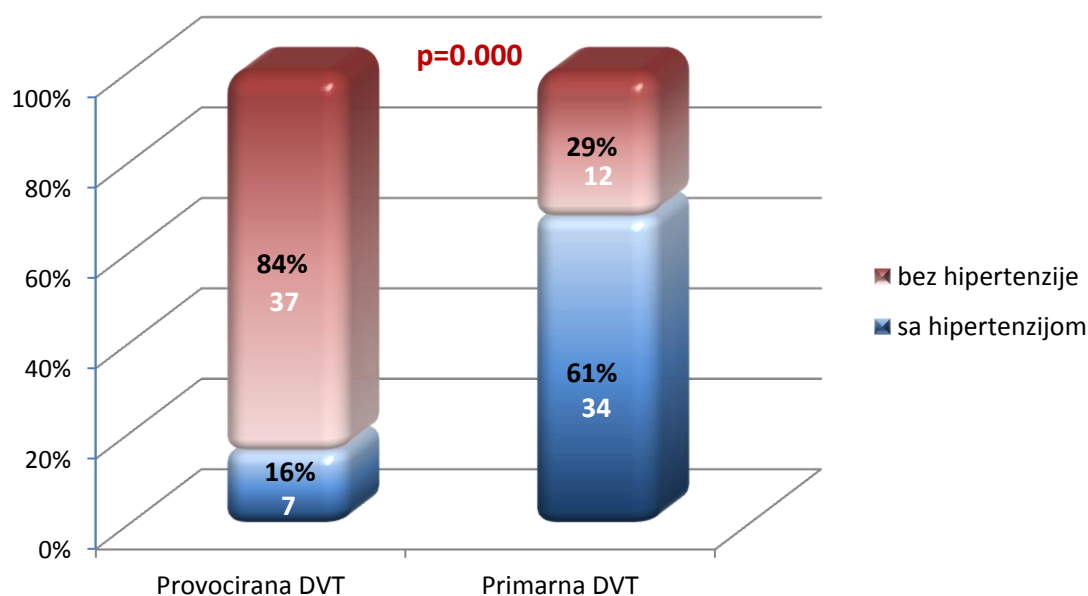
Poređenjem bolesnika sa različitim lokalizacijama venskog tromboznog procesa u odnosu na učestalost hipertenzije ne dobija se statistički značajna razlika (distalna DVT 45% vs. proksimalna DVT 43% vs. DVT retke lokalizacije 12%;  $p=0.229$ ). Međutim, prilikom poređenja bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena u odnosu na zastupljenost ovoga faktora rizika za nastanak tromboze jasno uočavamo da je značajno viši procenat osoba sa hipertenzijom prisutan u grupi bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena u odnosu na grupu bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena (61% vs. 16%;  $p=0.000$ ), što je i prikazano na Grafikonu 3.

Učestalost hiperlipoproteinemije nije pokazala značajne razlike prilikom poređenja bolesnika sa različitim lokalizacijama venskog tromboznog procesa (distalna DVT 79%, proksimalna DVT 67%, DVT retke lokalizacije 50%;  $p=0.229$ ), kao ni prilikom poređenja bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena (61% vs. 75%;  $p=0.143$ ).

Slični rezultati dobijeni su i u slučaju poređenja zastupljenosti hiperLp(a) lipoproteinemije između različitih bolesničkih podgrupa. Tako je ova dislipidemija bila prisutna kod 28% bolesnika sa distalnom DVT, 16% bolesnika sa proksimalnom DVT i 25% bolesnika sa DVT retke lokalizacije ( $p=0.399$ ). Ne beleži se ni postojanje razlike u učestalosti hiperLp(a) lipoproteinemije između bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena (23% vs. 18%;  $p=0.546$ ). Svi rezultati koji se odnose na ispitivanje zastupljenosti pomenutih faktora rizika između različitih bolesničkih podgrupa prikazani su u okviru tabele 3.

Tabela 3. Poređenje zastupljenosti različitih faktora rizika za nastanak tromboze u odnosu na lokalizaciju i vrstu venskog tromboznog procesa

		Bolesnici				
		distalna DVT	proksimalna DVT	retke lokalizacije DVT	provocirana DVT	primarna DVT
Gojazni	Broj (%)	5 (17)	14 (22)	3 (37)	9 (20)	13 (23)
	<i>p</i>		0.471		0.741	
Hormoni	Broj (%)	2 (7)	4 (6)	0 (0)	6 (14)	0 (0)
	<i>p</i>		0.566		0.004	
Pušači	Broj (%)	10 (35)	20 (32)	1 (12)	11 (25)	20 (36)
	<i>p</i>		0.482		0.250	
Hipertenzija	Broj (%)	13 (45)	27 (43)	1 (12)	7 (16)	34 (61)
	<i>p</i>		0.229		0.000	
HLP	Broj (%)	23 (79)	42 (67)	4 (50)	27 (61)	42 (75)
	<i>p</i>		0.229		0.143	
hiperLp(a)LP	Broj (%)	8 (28)	10 (16)	2 (25)	10 (23)	10 (18)
	<i>p</i>		0.399		0.546	



Grafikon 3. Prikaz poređenja učestalosti hipertenzije između bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena

U tabeli 4 prikazani su rezultati poređenja zastupljenosti različitih faktora rizika za nastanak tromboze između bolesnika kojima je dijagnostikovana izolovana tromboza dubokih vena i bolesnika kojima je dijagnostikovana tromboembolija pluća. Iz njih možemo uočiti da nema razlike u zastupljenosti gojaznosti između bolesnika sa trombozom dubokih



vena bez plućne tromboembolije i bolesnika sa plućnom tromboembolijom (22% vs. 33%;  $p=0.630$ ), kao ni upotrebe hormona (6% vs. 0%;  $p=0.657$ ), pušenja (32% vs. 0%;  $p=0.238$ ), hipertenzije (42% vs. 0%;  $p=0.143$ ), hiperlipoproteinemije (69% vs. 67%;  $p=0.929$ ) ili hiper Lp(a) lipoproteinemije (20% vs. 33%;  $p=0.558$ ).

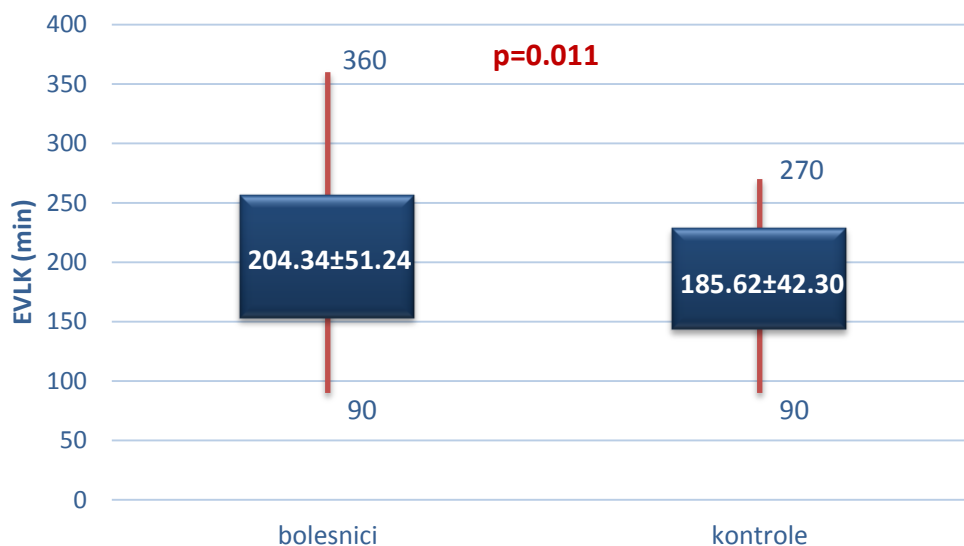
*Tabela 4. Poređenje zastupljenosti različitih faktora rizika za nastanak tromboze između bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika sa tromboembolijom pluća*

		Bolesnici	
		bez PTE	sa PTE
Gojazni	<b>Broj (%)</b>	21 (22)	1 (33)
	<b>p</b>	0.630	
Hormoni	<b>Broj (%)</b>	6 (6)	0 (0)
	<b>p</b>	0.657	
Pušači	<b>Broj (%)</b>	31 (32)	0 (0)
	<b>p</b>	0.238	
Hipertenzija	<b>Broj (%)</b>	41 (42)	0 (0)
	<b>p</b>	0.143	
HLP	<b>Broj (%)</b>	67 (69)	2 (67)
	<b>p</b>	0.929	
Lp(a)	<b>Broj (%)</b>	19 (20)	1 (33)
	<b>p</b>	0.558	

### 7.3. Rezultati ispitivanja fibrinoliznog mehanizma

#### 7.3.1. Ukupni fibrinolizni potencijal

Rezultati ispitivanja fibrinoliznog mehanizma koji se odnose na ispitivanje njegove globalne funkcionalnosti ukazuju na to da bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena imaju značajno duže vreme lize koaguluma, odnosno suprimiranu funkcionalnost u poređenju sa zdravim kontrolama ( $204.34 \pm 51.24$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.011$ ), što je grafički predstavljeno na Grafikonu 4.



*Grafikon 4. Poređenje globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika i kontrola*

Tabela 5. prikazuje razlike u globalnoj funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između pojedinih podgrupa ispitanika sa venskom trombozom i zdravih ispitanika. Tako se iz nje može videti da, kada se odvojeno posmatraju bolesnici sa izolovanom distalnom venskom trombozom i bolesnici sa proksimalnom trombozom uočava se da grupa bolesnika sa izolovanom distalnom venskom trombozom ima značajno duže euglobulinsko vreme lize koaguluma u odnosu na kontrolnu grupu ( $218.32 \pm 41.12$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.001$ ), dok nema značajne razlike u suprimiranosti fibrinoliznog potencijala, odnosno dužini euglobulinskog vremena lize koaguluma pri poređenju bolesnika sa proksimalnom venskom trombozom i zdravih ispitanika ( $194.70 \pm 54.04$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.440$ ). Treba istaći i to da i bolesnici sa atipičnom lokalizacijom venske tromboze imaju značajno duže vreme lize koaguluma u odnosu na kontrole ( $229.38 \pm 46.18$  vs.  $194.70 \pm 54.04$ ;  $p=0.015$ ).

Pri ispitivanju značajnosti razlika u funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma u odnosu na vrednosti euglobulinskog vremena lize koaguluma između bolesnika koji su imali provociranu vensku trombozu i kontrolnih ispitanika i bolesnika koji su imali vensku trombozu bez prepoznatog faktora rizika i kontrolnih ispitanika uočavamo značajno više vrednosti ovoga parametra kod bolesnika koji su imali provociranu vensku trombozu u poređenju sa kontrolama ( $208.18 \pm 48.53$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.018$ ) i odsustvo značajne razlike u ovom parametru između bolesnika sa primarnom trombozom i zdravih ispitanika ( $201.32 \pm 53.51$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.071$ ).

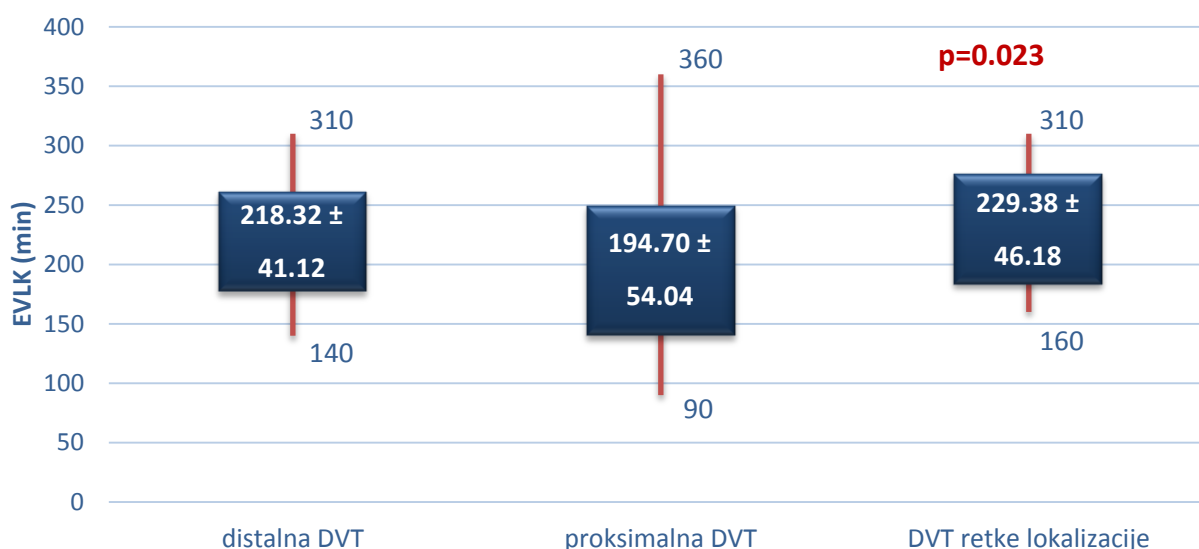
*Tabela 5. Poređenje globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih podgrupa bolesnika i zdravih ispitanika*

	Euglobulinsko vreme lize koaguluma (min)		
	SV±SD	Raspon	p
Bolesnici	204.34±51.24	90-360	0.011
Kontrole	185.62±42.30	90-270	
Bolesnici-distalna DVT	218.32±41.12	140-310	0.001
Kontrole	185.62±42.30	90-270	
Bolesnici-proksimalna DVT	194.70±54.04	90-360	0.440
Kontrole	185.62±42.30	90-270	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	229.38±46.18	160-310	0.015
Kontrole	185.62±42.30	90-270	
Bolesnici-provocirana DVT	208.18±48.53	130-320	0.018
Kontrole	185.62±42.30	90-270	
Bolesnici-primarna DVT	201.32±53.51	90-360	0.071
Kontrole	185.62±42.30	90-270	

Poredeći pak različite bolesničke podgrupe u odnosu na globalnu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma, međusobno, primećujemo da postoji značajna razlika u dužini euglobulinskog vremena lize koaguluma između podgrupa klasifikovanih u odnosu na lokalizaciju venskog tromboznog procesa (distalna DVT 218.32±41.12 vs. proksimalna DVT 194.70±54.04 vs. DVT retke lokalizacije 229.38±46.18; p=0.023). Tako, najduže euglobulinsko vreme lize koaguluma imaju bolesnici sa trombozom dubokih vena retke lokalizacije, a najkraće bolesnici sa trombozom proksimalnih dubokih vena nogu. Ne beleži se značajna razlika u odnosu na globalnu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma ukoliko se porede bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena i bolesnici sa primarnom trombozom dubokih vena (208.18±48.53 vs. 201.32±53.51; p=0.661), kao ni ukoliko se porede bolesnici sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnici sa tromboembolijom pluća (205.20±51.30 vs. 176.67±49.33; p=0.392). Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 6, kao i na Grafikonu 5.

Tabela 6. Poređenje globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih podgrupa bolesnika

	Euglobulinsko vreme lize koaguluma (min)		
	SV±SD	Raspon	p
Bolesnici-distalna DVT	218.32±41.12	140-310	0.023
Bolesnici-proksimalna DVT	194.70±54.04	90-360	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	229.38±46.18	160-310	
Bolesnici-provocirana DVT	208.18±48.53	130-320	0.661
Bolesnici-primarna DVT	201.32±53.51	90-360	
Bolesnici-izolovana DVT	205.20±51.30	90-360	0.392
Bolesnici-PTE	176.67±49.33	120-210	



Grafikon 5. Poređenje globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa različitim lokalizacijama DVT

Rezultati poređenja učestalosti prisustva suprimiranog fibrinoliznog potencijala između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih ispitanika, kao i između pojedinih bolesničkih podgrupa i kontrolnih ispitanika prikazani su na Tabeli 7, iz koje se može videti da bolesnici koji su doživeli vensku trombozu imaju značajno višu učestalost suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa zdravim osobama (25% vs. 11%;  $p=0.010$ ).

Posmatrajući bolesničke podgrupe u odnosu na lokalizaciju venskog trombotskog procesa uočavamo da 35% bolesnika sa trombozom distalnih vena nogu ima suprimiran fibrinolizni potencijal, u poređenju sa 11% zdravih ispitanika, što predstavlja statistički značajnu razliku u učestalosti ( $p=0.003$ ). Za razliku od toga, ne beleži se statistički značajna razlika u učestalosti suprimiranosti fibrinoliznog potencijala pri poređenju bolesnika sa trombozom proksimalnih vena nogu i zdravih ispitanika (19% vs. 11%;  $p=0.151$ ), kao ni pri

poređenju bolesnika sa trombozom dubokih vena retke lokalizacije i zdravih kontrola (38% vs. 11%;  $p=0.032$ ). Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 7.

Poređenje bolesnika sa provociranom i primarnom venskom trombozom sa kontrolnim ispitanicima, u odnosu na učestalost suprimiranosti fibrinoliznog potencijala, takođe prikazano u Tabeli 7, pokazuje nam da postoji statistički značajno veća učestalost suprimiranosti fibrinolizne aktivnosti i među bolesnicima sa provociranom venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama (25% vs. 11%;  $p=0.031$ ) i među bolesnicima sa primarnom venskom trombozom u poređenju sa zdravim ispitanicima (25% vs. 11%;  $p=0.022$ ).

*Tabela 7. Poređenje učestalosti suprimiranosti fibrinoliznog mehanizma između različitih podgrupa bolesnika i kontrola*

Učestalost suprimiranosti fibrinoliznog potencijala		
	Broj (%)	p
Bolesnici	25 (25)	0.010
Kontrole	11 (11)	
Bolesnici-distalna DVT	10 (35)	0.003
Kontrole	11 (11)	
Bolesnici-proksimalna DVT	12 (19)	0.151
Kontrole	11 (11)	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	3 (38)	0.032
Kontrole	11 (11)	
Bolesnici-provocirana DVT	11 (25)	0.031
Kontrole	11 (11)	
Bolesnici-primarna DVT	14 (25)	0.022
Kontrole	11 (11)	

U Tabeli 8. prikazano je poređenje učestalosti suprimiranosti fibrinoliznog potencijala između različitih bolesničkih podgrupa, međusobno, iz koga uočavamo da nema statistički značajne razlike u učestalosti smanjene fibrinolizne aktivnosti između bolesnika sa trombozom distalnih vena nogu, proksimalnih vena nogu i trombozom dubokih vena retke lokalizacije (35% vs. 19% vs. 38%;  $p=0.197$ ). Takođe, ne beleži se ni postojanje značajne razlike u suprimiranosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena (25% vs. 25%;  $p=0.594$ ), kao ni između bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika sa plućnom tromboembolijom (26 % vs. 0%;  $p=0.310$ ).

*Tabela 8. Poređenje učestalosti suprimiranosti fibrinoliznog mehanizma između različitih bolesničkih podgrupa*

Učestalost suprimiranosti fibrinoliznog potencijala		
	n (%)	p
Bolesnici-distalna DVT	10 (35)	
Bolesnici-proksimalna DVT	12 (19)	0.197
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	3 (38)	
Bolesnici-provocirana DVT	11 (25)	
Bolesnici-primarna DVT	14 (25)	0.594
Bolesnici-izolovana DVT	25 (26)	
Bolesnici-PTE	0 (0)	0.310

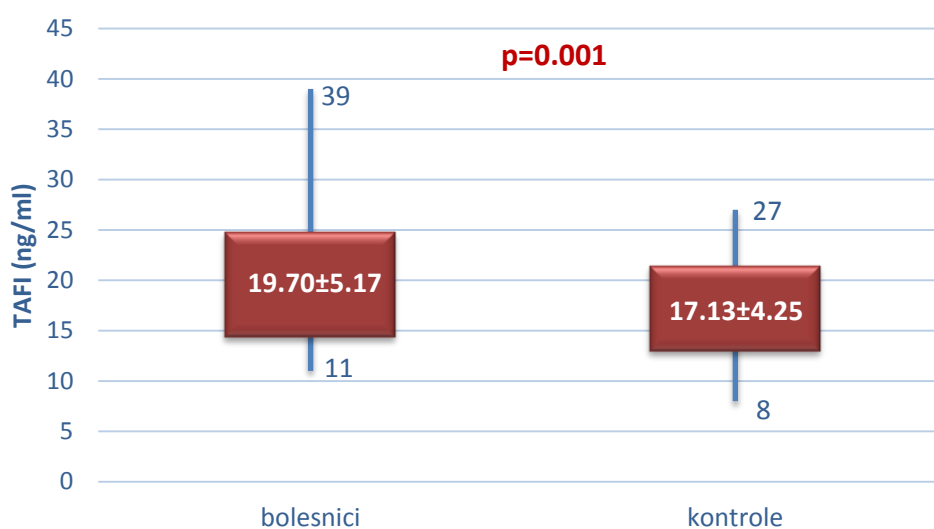
### **7.3.2. Komponente fibrinoliznog mehanizma**

Uporedo sa ispitivanjem globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma izvršili smo i ispitivanje njegovih pojedinačnih komponenti.

Poređenjem koncentracije plazminogena između bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i zdravih ispitanika uočavamo da nema značajne razlike u ovom parametru između dve pomenute grupe ( $123.90 \% \pm 27.37$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.126$ ). Statistički značajna razlika nije dobijena ni prilikom poređenja koncentracije t-PA između bolesnika i kontrola ( $18.65 \text{ ng/ml} \pm 9.86$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.110$ ), kao ni prilikom poređenja koncentracije PAI-1 između ove dve grupe ispitanika ( $5.23 \text{ ng/ml} \pm 2.76$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.329$ ). Za razliku od toga, prilikom poređenja koncentracije TAFI uočavamo da bolesnici koji su doživeli venski trombozni incident imaju značajno više koncentracije ovoga inhibitora fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa osobama koje nikada nisu imale vensku trombozu ( $19.70 \text{ ng/ml} \pm 5.17$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ). Ovi rezultati predstavljeni su zbirno u Tabeli 9, dok Grafikon 6 prikazuje poređenje koncentracije TAFI između dve pomenute grupe ispitanika.

Tabela 9. Poređenje pojedinačnih komponenti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika i kontrola

	<b>Bolesnici n=100</b>	<b>Kontrole n=100</b>
<b>Plazminogen (%)</b>		
SV±SD	123.90±27.37	117.09±24.49
Raspon	62-199	58-160
p	0.126	
<b>t-PA (ng/ml)</b>		
SV±SD	18.65±9.86	16.78±8.08
Raspon	2-56	8-44
p	0.110	
<b>PAI-1 (ng/ml)</b>		
SV±SD	5.23±2.76	5.42±2.73
Raspon	1-13	1-13
p	0.329	
<b>TAFI (ng/ml)</b>		
SV±SD	19.70±5.17	17.13±4.25
Raspon	11-39	8-27
p	0.001	



Grafikon 6. Poređenje koncentracije TAFI između grupe bolesnika i kontrolne grupe

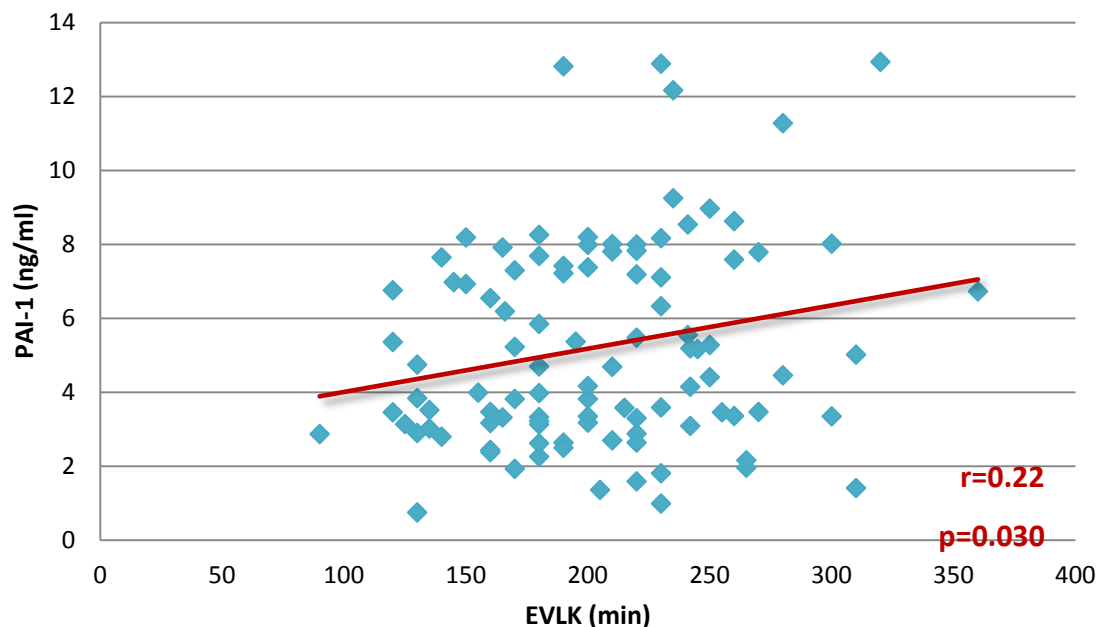
U Tabeli broj 10 prikazani su rezultati ispitivanja povezanosti pojedinačnih parametara fibrinoliznog mehanizma i njegove globalne funkcionalnosti, kako kod svih ispitanika, tako i u grupi bolesnika i kontrolnoj grupi ispitanika, pojedinačno. Iz tabele se vidi da nije

ustanovljeno postojanje statistički značajne veze između plazminogena i euglobulinskog vremena lize koaguluma kao mere globalnog fibrinoliznog potencijala ukoliko posmatramo sve ispitanike ( $r=0.17$ ;  $p=0.018$ ). O značajnosti veze između t-PA i TAFI sa euglobulinskim vremenom lize koaguluma ne možemo se izjasniti, obzirom da p ni u jednom slučaju nije dostiglo nivo statističke značajnosti potreban za validnu interpretaciju rezultata. Što se povezanosti PAI-1 i euglobulinskog vremena lize koaguluma tiče, u ovom slučaju ne beleži se značajna povezanost posmatrajući sve ispitanike ( $r=0.18$ ;  $p=0.012$ ), ali se uočava postojanje slabe povezanosti između ova dva parametra u grupi bolesnika ( $r=0.22$ ;  $p=0.030$ ), što je grafički i predstavljeno na Grafikonu 7.

*Tabela 10. Analiza povezanosti pojedinačnih fibrinoliznih parametara i globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma*

	<b>Bolesnici n=100</b>	<b>Kontrole n=100</b>	<b>Svi ispitanici n=200</b>
<b>EVLK - Plazminogen</b>			
r	0.17	0.12	0.17
p	0.093	0.254	0.018
<b>EVLK - tPA</b>			
r	-0.10	-0.03	-0.05
p	0.324	0.794	0.500
<b>EVLK - PAI-1</b>			
r	0.22	0.15	0.18
p	0.030	0.130	0.012
<b>EVLK - TAFI</b>			
r	-0.13	0.06	0.01
p	0.202	0.532	0.961



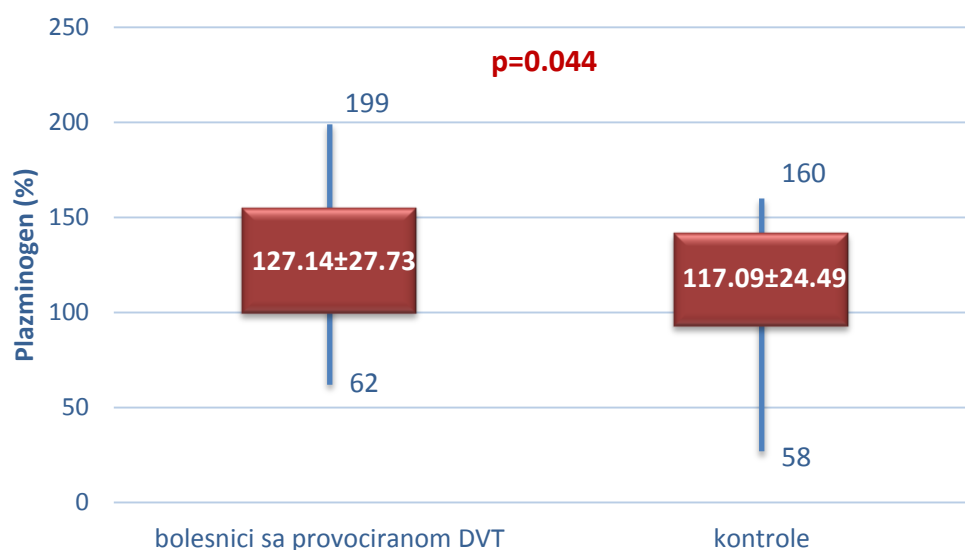


Grafikon 7. Analiza povezanosti EVLK i PAI-1 u grupi bolesnika

Poređenje nivoa plazminogena između različitih bolesničkih podgrupa i ispitanika u kontrolnoj grupi, kao i između pojedinih bolesničkih podgrupa međusobno, predstavljeno na Tabeli 11, pokazuje da nema značajne razlike u koncentraciji ovoga parametra ukoliko poredimo bolesnike sa distalnom trombozom dubokih vena i zdrave kontrole ( $129.86 \% \pm 29.68$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.056$ ), bolesnike sa proksimalnom trombozom dubokih vena i zdrave kontrole ( $121.32 \% \pm 24.73$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.428$ ), bolesnike sa retkom lokalizacijom tromboze dubokih vena i zdrave kontrole ( $122.63 \% \pm 37.99$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.515$ ), kao i bolesnike sa primarnom trombozom dubokih vena i zdrave kontrole ( $121.36 \% \pm 27.06$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.551$ ). Za razliku od ovih rezultata, interesantno je da poređenjem bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i kontrolnih ispitanika uočavamo da bolesnici iz ove podgrupe imaju značajno više vrednosti plazminogena u poređenju sa zdravim osobama ( $127.14 \% \pm 27.73$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.044$ ), što je i prikazano na Grafikonu 8. Posmatrajući rezultate međusobnog poređenja bolesnika sa distalnom, proksimalnom i trombozom dubokih vena retke lokalizacije možemo reći da između ovih bolesničkih podgrupa nema značajne razlike u odnosu na nivo plazminogena ( $129.86 \% \pm 29.68$  vs.  $121.32 \% \pm 24.73$  vs.  $122.63 \% \pm 37.99$ ;  $p=0.412$ ), što važi i za međusobno poređenje bolesnika sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena ( $127.14 \% \pm 27.73$  vs.  $121.36 \% \pm 27.06$ ;  $p=0.154$ ), kao i za poređenje bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika sa plućnom tromboembolijom ( $123.34 \pm 27.32$  vs.  $142.00 \pm 27.18$ ;  $p=0.230$ ).

Tabela 11. Poređenje nivoa plazminogena između različitih bolesničkih podgrupa međusobno, kao i u odnosu na kontrole

	Plazminogen (%)		
	SV±SD	Raspon	p
Bolesnici-distalna DVT	129.86±29.68	78-199	0.056
Kontrole	117.09±24.49	58-160	
Bolesnici-proksimalna DVT	121.32±24.73	76-180	0.428
Kontrole	117.09±24.49	58-160	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	122.63±37.99	62-182	0.515
Kontrole	117.09±24.49	58-160	
Bolesnici-provocirana DVT	127.14±27.73	62-199	0.044
Kontrole	117.09±24.49	58-160	
Bolesnici-primarna DVT	121.36±27.06	76-182	0.551
Kontrole	117.09±24.49	58-160	
Bolesnici-distalna DVT	129.86±29.68	78-199	0.412
Bolesnici-proksimalna DVT	121.32±24.73	76-180	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	122.63±37.99	62-182	0.154
Bolesnici-provocirana DVT	127.14±27.73	62-199	
Bolesnici-primarna DVT	121.36±27.06	76-182	0.230
Bolesnici-izolovana DVT	123.34±27.32	62-199	
Bolesnici-PTE	142.00±27.18	112-165	

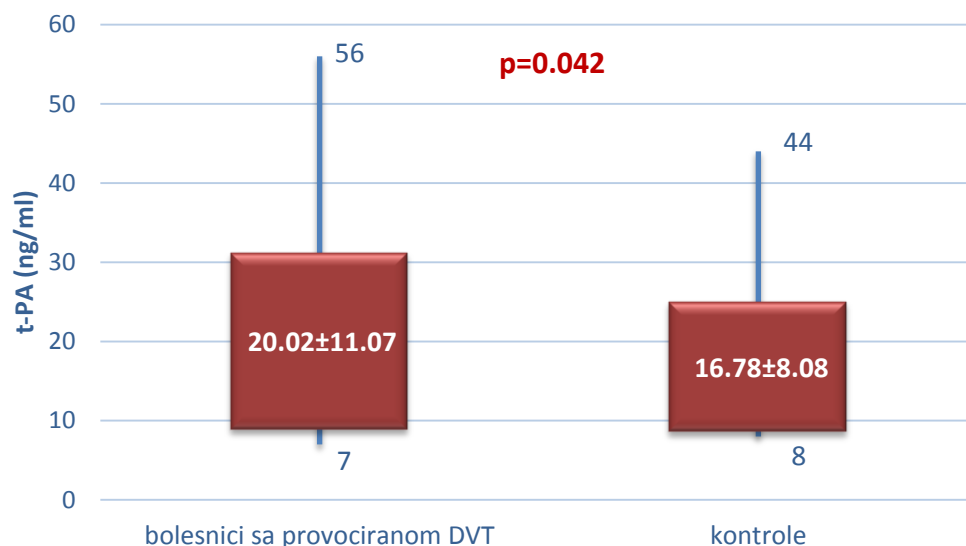


Grafikon 8. Poređenje nivoa plazminogena između bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i zdravih ispitanika

Tabela 12 prikazuje poređenje koncentracije t-PA između različitih bolesničkih podgrupa i ispitanika u kontrolnoj grupi, kao i između pojedinih bolesničkih podgrupa međusobno. Iz ove tabele jasno se uočava da nema značajne razlike prilikom poređenja koncentracije t-PA između bolesnika sa distalnom trombozom dubokih vena i zdravih ispitanika ( $18.57 \text{ ng/ml} \pm 8.41$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.266$ ), bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena i zdravih ispitanika ( $18.30 \text{ ng/ml} \pm 9.78$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.172$ ), kao i bolesnika sa trombozom dubokih vena retke lokalizacije ( $21.73 \text{ ng/ml} \pm 15.33$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.507$ ) i zdravih ispitanika. Kao i u slučaju nivoa plazminogena, bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena imaju značajno više koncentracije t-PA u poređenju sa kontrolnom grupom ( $20.02 \text{ ng/ml} \pm 11.07$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.042$ ), dok se ne beleži postojanje statistički značajne razlike prilikom poređenja bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena i zdravih kontrola ( $17.58 \text{ ng/ml} \pm 8.75$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.492$ ). Grafikon 9. upravo i prikazuje poređenje koncentracija t-PA između bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i zdravih ispitanika. Kada posmatramo međusobno poređenje bolesnika sa distalnom, proksimalnom i trombozom dubokih vena atipične lokalizacije možemo reći da se ne uočavaju značajne razlike u odnosu na koncentraciju t-PA ( $18.57 \text{ ng/ml} \pm 8.41$  vs.  $18.30 \text{ ng/ml} \pm 9.78$  vs.  $21.73 \text{ ng/ml}$ ;  $p=0.943$ ), što je slučaj i kada međusobno poredimo bolesnike sa provociranom i primarnom trombozom dubokih vena ( $20.02 \text{ ng/ml} \pm 11.07$  vs.  $17.58 \text{ ng/ml} \pm 8.75$ ;  $p=0.367$ ), kao i bolesnike sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnike sa tromboembolijom pluća ( $18.70 \pm 9.95$  vs.  $17.10 \pm 7.62$ ;  $p=0.985$ ).

*Tabela 12. Poređenje koncentracije t-PA između različitih bolesničkih podgrupa međusobno, kao i u odnosu na kontrole*

	SV±SD	t-PA (ng/ml)	
		Raspon	p
Bolesnici-distalna DVT	18.57±8.41	8-44	0.266
Kontrole	16.78±8.08	8-44	
Bolesnici-proksimalna DVT	18.30±9.78	2-56	0.172
Kontrole	16.78±8.08	8-44	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	21.73±15.33	6-53	0.507
Kontrole	16.78±8.08	8-44	
Bolesnici-provocirana DVT	20.02±11.07	7-56	0.042
Kontrole	16.78±8.08	8-44	
Bolesnici-primarna DVT	17.58±8.75	2-40	0.492
Kontrole	16.78±8.08	8-44	
Bolesnici-distalna DVT	18.57±8.41	8-44	0.943
Bolesnici-proksimalna DVT	18.30±9.78	2-56	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	21.73±15.33	6-53	
Bolesnici-provocirana DVT	20.02±11.07	7-56	0.367
Bolesnici-primarna DVT	17.58±8.75	2-40	
Bolesnici-izolovana DVT	18.70±9.95	2-56	
Bolesnici-PTE	17.10±7.62	12-26	0.985



Grafikon 9. Poređenje koncentracije t-PA između bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i zdravih ispitanika

Prikaz rezultata poređenja koncentracije PAI-1 između različitih bolesničkih podgrupa međusobno, kao i u odnosu na kontrole dat je u Tabeli 13, iz koje se uočava da se ne beleži postojanje značajne razlike u koncentraciji ovoga činioca pri poređenju bolesnika sa distalnom trombozom dubokih vena i zdravih kontrola ( $5.44 \text{ ng/ml} \pm 2.65$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.890$ ), bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena i zdravih kontrola ( $5.04 \text{ ng/ml} \pm 2.85$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.099$ ), kao i bolesnika sa retkom lokalizacijom tromboze dubokih vena i zdravih ispitanika ( $5.96 \text{ ng/ml} \pm 2.63$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.482$ ). Ni između bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i kontrola ( $5.52 \text{ ng/ml} \pm 2.95$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.830$ ), kao ni između bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena i kontrola ( $5.00 \text{ ng/ml} \pm 2.61$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.196$ ), ne beleži se postojanje značajne razlike u koncentraciji PAI-1. Poređenje koncentracije PAI-1 između bolesnika sa distalnom trombozom dubokih vena, bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena i bolesnika sa retkim lokalizacijama tromboze dubokih vena pokazuje da nema značajne razlike u odnosu na ovaj parametar fibrinoliznog mehanizma ( $5.44 \text{ ng/ml} \pm 2.65$  vs.  $5.04 \text{ ng/ml} \pm 2.85$  vs.  $5.96 \text{ ng/ml} \pm 2.63$ ;  $p=0.279$ ), kao što razlika ne postoji ni kada se porede u odnosu na koncentraciju PAI-1 bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena i bolesnici sa primarnom trombozom dubokih vena ( $5.52 \text{ ng/ml} \pm 2.95$  vs.  $5.00 \pm 2.61$ ;  $p= 0.314$ ), ili bolesnici sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnici sa plućnom tromboembolijom ( $5.19 \pm 2.78$  vs.  $6.55 \pm 1.76$ ;  $p=0.263$ ).

Tabela 13. Poređenje koncentracije PAI-1 između različitih bolesničkih podgrupa međusobno, kao i u odnosu na kontrole

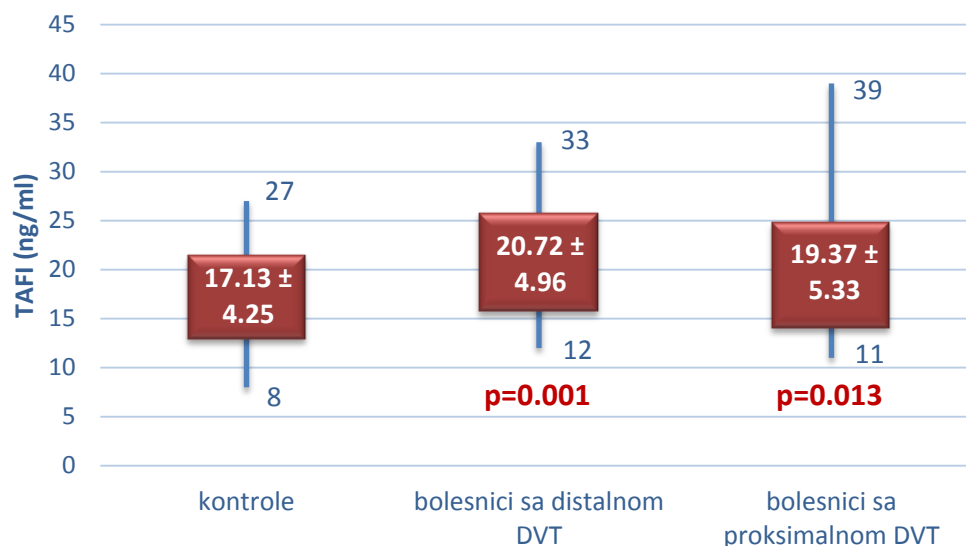
	PAI-1 (ng/ml)		
	SV±SD	Raspon	p
Bolesnici-distalna DVT	5.44±2.65	1-11	0.890
Kontrole	5.42±2.73	1-13	
Bolesnici-proksimalna DVT	5.04±2.85	1-13	0.099
Kontrole	5.42±2.73	1-13	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	5.96±2.63	1-9	0.482
Kontrole	5.42±2.73	1-13	
Bolesnici-provocirana DVT	5.52±2.95	1-13	0.830
Kontrole	5.42±2.73	1-13	
Bolesnici-primarna DVT	5.00±2.61	1-13	0.196
Kontrole	5.42±2.73	1-13	
Bolesnici-distalna DVT	5.44±2.65	1-11	0.279
Bolesnici-proksimalna DVT	5.04±2.85	1-13	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	5.96±2.63	1-9	
Bolesnici-provocirana DVT	5.52±2.95	1-13	
Bolesnici-primarna DVT	5.00±2.61	1-13	
Bolesnici-izolovana DVT	5.19±2.78	1-13	0.314
Bolesnici-PTE	6.55±1.76	5-8	

Rezultati poređenja koncentracije TAFI između različitih bolesničkih podgrupa i kontrolne grupe ispitanika ukazuju na postojanje značajne razlike u koncentraciji ovoga činioca. Nepostojanje razlike beleži se samo u slučaju poređenja bolesnika sa retkim lokalizacijama tromboze dubokih vena i zdravih ispitanika (18.62 ng/ml ± 4.64 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.376), dok bolesnici sa distalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa kontrolama (20.72 ng/ml ± 4.96 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.001), kao i bolesnici sa proksimalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa kontrolama (19.37 ng/ml ± 5.33 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.013) imaju značajno više koncentracije TAFI, što je i prikazano na Grafikonu 10. Koncentracija ovog veoma važnog inhibitora fibrinoliznog procesa značajno je veća i kod bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena u poređenju s zdravim osobama (19.93 ng/ml ± 3.97 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.000), kao i kod bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim ispitanicima (19.53 ng/ml ± 5.97 vs. 17.13 ng/ml ± 4.25; p=0.023). Ove rezultate prikazuje Grafikon 11. Međusobnim poređenjem bolesnika sa distalnom trombozom dubokih vena, bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena i bolesnika sa trombozom dubokih vena retke lokalizacije, uočavamo da nema statistički značajne razlike u koncentraciji TAFI (20.72 ng/ml ± 4.96 vs. 19.37 ng/ml ± 5.33 vs. 18.62 ng/ml ± 4.64; p=0.320), kao što se značajna razlika u ovom

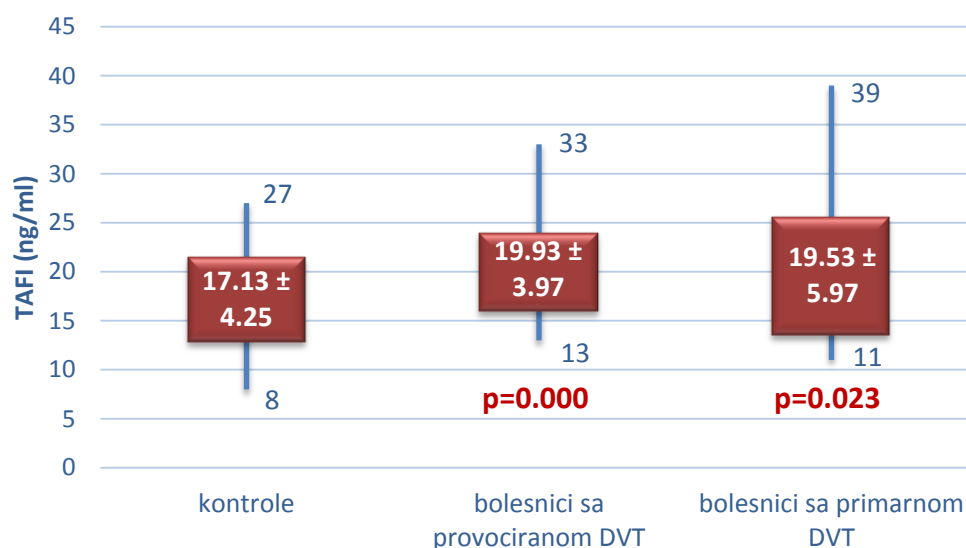
parametru ne beleži ni prilikom poređenja bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena ( $19.93 \text{ ng/ml} \pm 3.97$  vs.  $19.53 \text{ ng/ml} \pm 5.97$ ;  $p=0.341$ ), kao ni prilikom poređenja bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika sa tromboembolijom pluća ( $19.73 \pm 5.24$  vs.  $18.85 \pm 1.90$ ;  $p=0.939$ ). Svi navedeni rezultati prikazani su u tabeli 14.

*Tabela 14. Poređenje koncentracije TAFI između različitih bolesničkih podgrupa međusobno, kao i u odnosu na kontrole*

	TAFI (ng/ml)		
	SV±SD	Raspon	p
Bolesnici-distalna DVT	20.72±4.96	12-33	0.001
Kontrole	17.13±4.25	8-27	
Bolesnici-proksimalna DVT	19.37±5.33	11-39	0.013
Kontrole	17.13±4.25	8-27	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	18.62±4.64	12-24	0.376
Kontrole	17.13±4.25	8-27	
Bolesnici-provocirana DVT	19.93±3.97	13-33	0.000
Kontrole	17.13±4.25	8-27	
Bolesnici-primarna DVT	19.53±5.97	11-39	0.023
Kontrole	17.13±4.25	8-27	
Bolesnici-distalna DVT	20.72±4.96	12-33	0.320
Bolesnici-proksimalna DVT	19.37±5.33	11-39	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	18.62±4.64	12-24	
Bolesnici-provocirana DVT	19.93±3.97	13-33	0.341
Bolesnici-primarna DVT	19.53±5.97	11-39	
Bolesnici-izolovana DVT	19.73±5.24	11-39	0.939
Bolesnici-PTE	18.85±1.90	17-20	



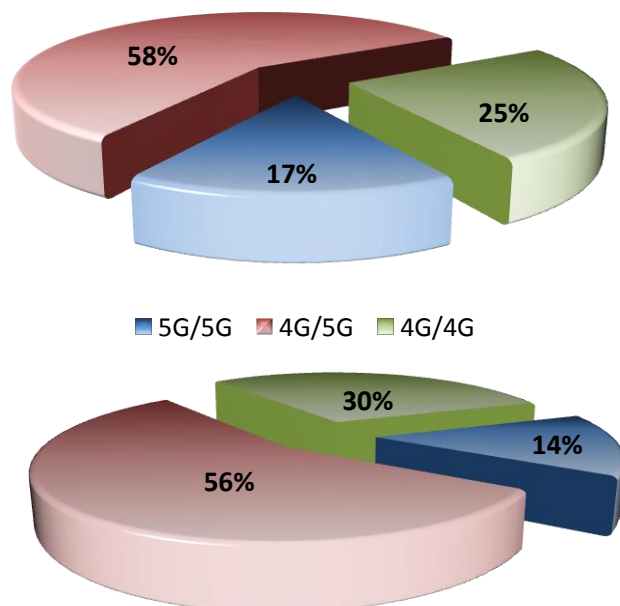
Grafikon 10. Poređenje koncentracije TAFI između bolesnika sa različitim lokalizacijama venskog trombotskog procesa i zdravih kontrola



Grafikon 11. Poređenje koncentracije TAFI između bolesnika sa provociranom, kao i primarnom trombozom dubokih vena u odnosu na zdrave kontrole

### 7.3.3. Rezultati genetskih analiza

Bolesnička i kontrolna grupa ispitanika bile su veoma slične u odnosu na zastupljenost pojedinih PAI-1 genotipskih podgrupa što se jasno može videti na Grafikonu 12. Tako smo u okviru grupe bolesnika imali 25% homozigotnih i 58% heterozigotnih nosilaca mutacije gena za PAI-1, dok 17% bolesnika nije imalo pomenutu gensku mutaciju. U okviru kontrolne grupe pak, bilo je 30% homozigotnih i 56% heterozigotnih nosilaca mutacije a 14% ispitanika nije imalo mutaciju.



*Grafikon 12. Prikaz distribucije PAI-1 genotipskih podgrupa u grupi bolesnika i kontrolnoj grupi ispitanika*

Tabela 15 prikazuje poređenje bolesnika sa distalnom, proksimalnom i trombozom dubokih vena retke lokalizacije, poređenje bolesnika sa spontanom i provociranom trombozom dubokih vena, kao i poređenje bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika koji su imali tromboemboliju pluća u odnosu na učestalost zastupljenosti različitih genotipskih varijanti gena za PAI-1. Iz nje uočavamo da nema značajne razlike u zastupljenosti 4G/4G genotipa između bolesnika sa različitim lokalizacijama venskog trombotskog procesa (distalna DVT 29% vs. proksimalna DVT 21% vs. DVT retke lokalizacije 12%;  $p=0.501$ ) kao i to da nema razlike u zastupljenosti ovoga genotipa kod provocirane i spontane tromboze dubokih vena (27% vs. 23%;  $p=0.642$ ), niti kod izolovane tromboze dubokih vena u poređenju sa plućnom tromboembolijom (25% vs. 33%;  $p=0.735$ ). Ni u odnosu na zastupljenost 4G/5G genotipa bolesnici sa različitim lokalizacijama venske tromboze nisu pokazali značajnije razlike (distalna DVT 55% vs. proksimalna DVT 56% vs. DVT retke lokalizacije 87%;  $p=0.211$ ), kao što ih nisu pokazali ni bolesnici sa provociranom venskom trombozom u poređenju sa bolesnicima sa spontanom trombozom dubokih vena (61% vs. 55%;  $p=0.546$ ) ili bolesnici sa izolovanom trombozom dubokih vena u poređenju sa bolesnicima sa plućnom tromboembolijom (58% vs. 67%;  $p=0.757$ ). Zastupljenost 5G/5G genotipa takođe nije pokazala značajne razlike pri poređenju bolesnika sa distalnom, proksimalnom i trombozom dubokih vena retke lokalizacije (24% vs. 16% vs. 0%;  $p=0.254$ ), kao ni pri poređenju bolesnika sa primarnom i provociranom trombozom dubokih vena (18% vs. 16%;  $p=0.797$ ) i pri poređenju bolesnika sa izolovanom trombozom dubokih vena i bolesnika sa tromboembolijom pluća (18% vs. 0%;  $p=0.426$ ).



Tabela 15. Poređenje zastupljenosti tri PAI-1 genotipa između različitih bolesničkih podgrupa međusobno

Učestalost PAI-1 4G/4G genotipa		
	Broj (%)	p
Bolesnici-distalna DVT	18 (29)	0.501
Bolesnici-proksimalna DVT	6 (21)	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	1 (12)	
Bolesnici-provocirana DVT	10 (23)	0.642
Bolesnici-primarna DVT	15 (27)	
Bolesnici-izolovana DVT	24 (25)	0.735
Bolesnici-PTE	1 (33)	
Učestalost PAI-1 4G/5G genotipa		
	Broj (%)	p
Bolesnici-distalna DVT	16 (55)	0.211
Bolesnici-proksimalna DVT	35 (56)	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	7 (87)	
Bolesnici-provocirana DVT	27 (61)	0.546
Bolesnici-primarna DVT	31 (55)	
Bolesnici-izolovana DVT	56 (58)	0.757
Bolesnici-PTE	2 (67)	
Učestalost PAI-1 5G/5G genotipa		
	Broj (%)	p
Bolesnici-distalna DVT	7 (24)	0.254
Bolesnici-proksimalna DVT	10 (16)	
Bolesnici-retke lokalizacije DVT	0 (0)	
Bolesnici-provocirana DVT	7 (16)	0.797
Bolesnici-primarna DVT	10 (18)	
Bolesnici-izolovana DVT	17 (18)	0.426
Bolesnici-PTE	0 (0)	

Nakon ovoga, pristupili smo proceni rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na postojanje poremećaja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, u odnosu na patološke koncentracije pojedinih komponenti fibrinoliznog mehanizma, kao i u odnosu na postojanje 4G/4G mutacije u genu za PAI-1, što je prikazano u Tabeli 16.

Kako nekondicionalna logistička regresija, koja je korištena u svrhu procene relativnog rizika, uključuje prilagođavanje analiza za moguće "confonder"-e, odnosno činioce koji mogu uticati na krajnji rezultat i dati sliku lažno višeg ili nižeg rizika, to smo mi u našu analizu uključili prilagođavanje za: godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a)

lipoproteinemiju, diabetes, CRP, fibrinogen, hipertenziju, upotrebu statina, oralnih kontraceptivnih lekova, kao i hormonske supstitucione terapije.

U odnosu na uticaj suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma na rizik za nastanak tromboze dubokih vena OR prilagođen za pol i godine iznosio je 2.70 (CI 1.22-5.98), prilagođen i za BMI i pušenje iznosio je 2.49 (CI 1.12-5.56), prilagođen dodatno za hiperlipoproteinemiju i hiperLp(a) lipoproteinemiju iznosio je 2.47 (CI 1.10-5.55), prilagođen i za diabetes iznosio je 2.72 (CI 1.19-6.20), prilagođen dodatno za CRP i fibrinogen bio je 2.67 (CI 1.16-6.14), prilagođen pored toga i za hipertenziju bio je 2.85 (CI 1.22-6.61). Konačno, nakon prilagođavanja i za upotrebu statina i hormonskih preparata možemo reći da naši rezultati pokazuju da suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma trostruko povećava rizik za nastanak tromboze dubokih vena (OR 3.02; CI 1.26-7.22).

Povišen nivo PAI-1 nema uticaja na rizik od nastanka tromboze dubokih vena, na šta ukazuje OR od 0.86 sa CI 0.59-1.25 nakon prilagođavanja za sve pomenute "confounder"-e. Takođe, ni povišen nivo t-PA antigena ne utiče na rizik od nastanka tromboze dubokih vena (OR 1.53; CI 0.79-2.94).

Prilikom ispitivanja uticaja pojedinih komponenti fibrinoliznog mehanizma na rizik od nastanka venskih tromboznih incidenata zapažamo da za razliku od PAI-1 i t-PA antigena, povišene koncentracije TAFI više od dvostruko povećavaju ovaj rizik. Tako je OR u ovom slučaju prilagođen za pol i godine života iznosio 2.18 (CI 1.19-3.99), nakon dodatnog prilagođavanja za BMI i pušenje OR je bio 2.16 (1.17-3.98), nakon daljeg prilagođavanja za hiperlipoproteinemiju i hiperLp(a) lipoproteinemiju OR je iznosio 2.21 (1.19-4.11). Prilagođavanje koje je pored pomenutih faktora uključilo i diabetes dalo je OR od 2.37 (CI 1.26-4.46), a ono koje je dodatno obuhvatilo i CRP i fibrinogen dalo je OR od 2.30 (1.22-4.35). Kada je u "confounder"-e uključena i hipertenzija dobijen je OR 2.24 (CI 1.18-4.25), a na kraju, uz sve potencijalne "confounding" faktore, uključujući i upotrebu statina i hormonskih preparata dobijen je OR 2.25 (CI 1.16-4.35).

Rezultati ispitivanja uticaja 4G/4G genotipa gena za sintezu PAI-1 na rizik od nastanka tromboze dubokih vena pokazuju da pomenuti genotip nema značajnijeg uticaja na ovaj rizik u poređenju sa 4G/5G ili 5G/5G genotipom, što potvrđuje OR koji nakon prilagođavanja za sve pomenute činioce iznosi 0.57 (0.27-1.20).

Tabela 16. Procena rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na globalnu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma, njegove pojedinačne komponente i postojanje 4G/4G genotipa za PAI-1

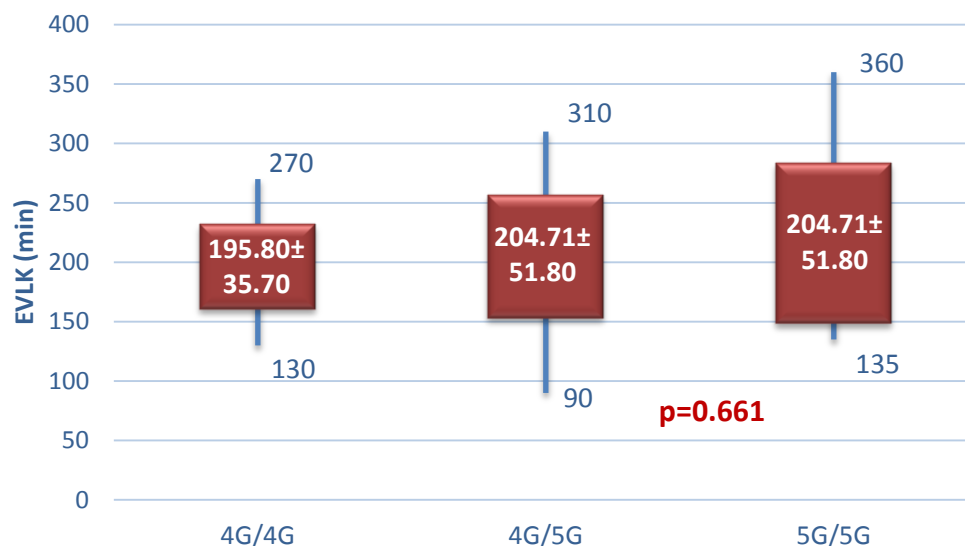
	Pacijenti n (%)	Kontrole n (%)	Odds ratio* (95% CI)	Odds ratio† (95% CI)	Odds ratio‡ (95% CI)	Odds ratio§ (95% CI)	Odds ratio¶ (95% CI)	Odds ratio   (95% CI)	Odds ratio** (95% CI)
<b>Venska tromboza</b>									
Očuvana funkcionalnost FM	75 (75)	89 (89)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
Suprimirana funkcionalnost FM	25 (25)	11 (11)	2.70 (1.22-5.98)	2.49 (1.12-5.56)	2.47 (1.10-5.55)	2.72 (1.19-6.20)	2.67 (1.16-6.14)	2.85 (1.22-6.61)	3.02 (1.26-7.22)
Fiziološki nivo PAI-1	62 (62)	67(67)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
Povišen nivo PAI-1	38 (38)	33 (33)	0.88 (0.66-1.16)	0.83 (0.61-1.13)	0.83 (0.60-1.15)	0.83 (0.59-1.17)	0.84 (0.59-1.19)	0.85 (0.60-1.21)	0.86 (0.59-1.25)
Fiziološki nivo t-PA	34 (34)	39(39)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
Povišen nivo t-PA	66 (66)	61 (61)	1.30 (0.72-2.33)	1.40 (0.77-2.53)	1.48 (0.81-2.72)	1.42 (0.77-2.64)	1.43 (0.77-2.67)	1.40 (0.75-2.62)	1.53 (0.79-2.94)
Fiziološki nivo TAFI	58 (58)	75(75)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
Povišen nivo TAFI	42 (42)	25 (25)	2.18 (1.19-3.99)	2.16 (1.17-3.98)	2.21 (1.19-4.11)	2.37 (1.26-4.46)	2.30 (1.22-4.35)	2.24 (1.18-4.25)	2.25 (1.16-4.35)
PAI-1 5G/5G i 4G/5G	75 (75)	70(70)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)	1.0 (Reference)
PAI-1 4G/4G	25 (25)	30 (30)	0.75 (0.40-1.41)	0.74 (0.39-1.40)	0.77 (0.40-1.47)	0.70 (0.36-1.38)	0.62 (0.31-1.25)	0.61 (0.30-1.22)	0.57 (0.27-1.20)

\*Prilagođeno za godine i pol †Prilagođeno za godine, pol, BMI i pušenje ‡Prilagođeno za godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju i hiperLp(a)lipoproteinemiju §Prilagođeno za godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a)lipoproteinemiju i diabetes ¶Prilagođeno za godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a)lipoproteinemiju, diabetes, CRP i fibrinogen ||Prilagođeno za godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a)lipoproteinemiju, diabetes, CRP, fibrinogen i hipertenziju \*\*Prilagođeno za godine, pol, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a)lipoproteinemiju, diabetes, CRP, fibrinogen, hipertenziju, upotrebu statina i hormonskih preparata

Tabela 17. prikazuje poređenje euglobulinskog vremena lize koaguluma, kao mere globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih genotipskih podgrupa u okviru grupe bolesnika, kontrolne grupe i svih ispitanika. Iz nje se jasno vidi da nema značajne razlike u globalnoj funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između nosilaca 4G/4G, 4G/5G i 5G/5G genotipa u okviru grupe bolesnika ( $195.80 \pm 35.70$  min. vs  $204.71 \pm 51.80$  min. vs  $215.65 \pm 67.26$  min;  $p=0.661$ ), što je i prikazano na grafikonu 13, u okviru kontrolne grupe ispitanika ( $193.10 \pm 42.56$  min. vs  $184.36 \pm 41.72$  min. vs  $174.64 \pm 44.22$  min;  $p=0.321$ ), kao ni pri poređenju ove tri genotipske podgrupe kod svih ispitanika zajedno ( $194.33 \pm 39.26$  min. vs  $194.71 \pm 58.01$  min. vs  $197.13 \pm 60.75$  min;  $p=0.936$ ).

*Tabela 17. Poređenje euglobulinskog vremena lize koaguluma između različitih genotipskih podgrupa u okviru grupe bolesnika, kontrolne grupe i svih ispitanika*

	Euglobulinsko vreme lize koaguluma (min)		
	SV $\pm$ SD	Raspon	p
<b>Bolesnici</b>			
4G/4G	195.80 $\pm$ 35.70	130-270	0.661
4G/5G	204.71 $\pm$ 51.80	90-310	
5G/5G	215.65 $\pm$ 67.26	135-360	
<b>Kontrole</b>			
4G/4G	193.10 $\pm$ 42.56	120-270	0.321
4G/5G	184.36 $\pm$ 41.72	90-270	
5G/5G	174.64 $\pm$ 44.22	120-265	
<b>Ukupno</b>			
4G/4G	194.33 $\pm$ 39.26	120-270	0.936
4G/5G	194.71 $\pm$ 48.01	90-310	
5G/5G	197.13 $\pm$ 60.75	120-360	



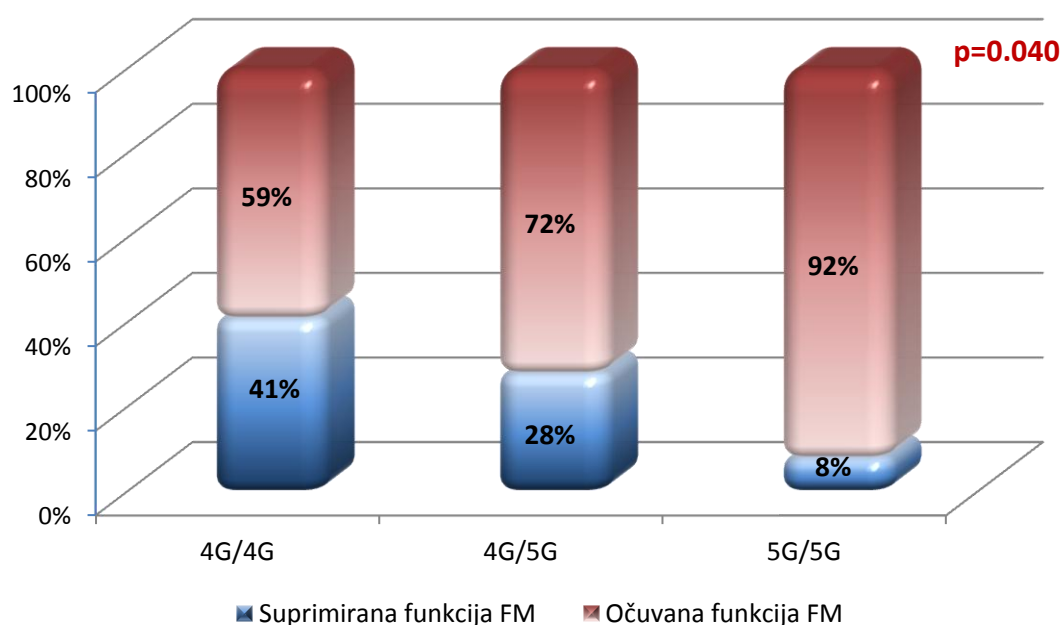
Grafikon 13. Prikaz poređenja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesničkih podgrupa u odnosu na PAI-1 genotip

U Tabeli 18. prikazano je poređenje učestalosti suprimiranosti funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih genotipskih podgrupa u okviru grupe bolesnika, kontrolne grupe ispitanika i svih ispitanika zajedno.

Uočavamo da je zastupljenost suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma češća u podgrupi bolesnika sa 4G/4G PAI-1 genotipom u poređenju sa bolesnicima sa 4G/5G genotipom i 5G/5G genotipom (41% vs 28% vs 8%;  $p=0.040$ ), što je i predstavljeno na grafikonu 14, dok nema značajne razlike u zastupljenosti ovog poremećaja fibrinoliznog mehanizma prilikom poređenja različitih PAI-1 genotipskih varijanti u okviru kontrolne grupe ispitanika (10% vs 11% vs 14%;  $p=0.910$ ) ili kada se posmatraju svi ispitanici zajedno (9% vs 19% vs 29%;  $p=0.059$ ).

Tabela 18. Poređenje učestalosti suprimiranosti funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih genotipskih podgrupa u okviru grupe bolesnika, kontrolne grupe i svih ispitanika

	Suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma	
	Broj (%)	p
<b>Bolesnici</b>		
4G/4G	7 (41)	0.040
4G/5G	16 (28)	
5G/5G	2 (8)	
<b>Kontrole</b>		
4G/4G	3 (10)	0.910
4G/5G	6 (11)	
5G/5G	2 (14)	
<b>Ukupno</b>		
4G/4G	5 (9)	0.059
4G/5G	22 (19)	
5G/5G	9 (29)	



Grafikon 14. Prikaz učestalosti suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između različitih genotipskih podgrupa u okviru grupe bolesnika

## 8. Diskusija

Fibrinolizni mehanizam se na pozornici na kojoj se odigrava istraživanje uloge pojedinih komponenti kompleksnog hemostaznog mehanizma u nastanku tromboze, dugo nalazio u potpunoj senci. Ne retko je njegova uloga, čak i od strane stručne javnosti, doživljavana kao sporedna, svedena na sekundarni fenomen koji se ispoljava samo kao odgovor na aktiviranu koagulaciju, te mu shodno tome nije pridavan gotovo nikakav značaj u brojnim studijama koje su ispitivale ulogu hemostaze u nastanku trombotske bolesti.

Poslednjih godina međutim, interesovanje za ulogu fibrinolize u patofiziološkom mehanizmu odgovornom za nastanak, kako arterijskih, tako i venskih tromboza značajno raste, te danas predstavlja veoma aktuelnu istraživačku temu u kojoj su još uvek ostale mnoge neistražene oblasti. Za porast interesovanja na ovom polju, svakako je delimično odgovorno i otkriće novog regulatora fibrinoliznog procesa - trombinom aktivišućeg fibrinoliznog inhibitora [247].

Kako tromboza predstavlja vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u većini razvijenih zemalja danas, to su značajni istraživački naponi usmereni upravo ka što preciznijem rasvetljavanju etiopatogeneze ove bolesti i posledično efikasnijoj prevenciji njenih komplikacija. Decenijama unazad značajno veći procenat naučnika bavio se istraživanjem u oblasti arterijske tromboze i njenih najznačajnijih komplikacija, infarkta miokarda i ishemijskog cerebrovaskularnog inzulta, ali se poslednjih godina fokus interesovanja usmerava značajnije i na teren venske tromboze.

Epidemiološke studije prepoznale su brojne uzročne faktore za nastanak venske tromboze, među kojima se kao najznačajniji izdvajaju: karcinom, upotreba hormona, trudnoća, hirurške intervencije, imobilizacija, trauma, deficit prirodnih inhibitora koagulacije, kao i mutacije u genu za sintezu protrombina G20210A i faktor V Leiden mutacija [66], no i pored toga ključno pitanje bilo je zbog čega kod određene osobe ovi faktori dovode do nastanka venskog tromboembolizma, dok kod većine drugih to nije slučaj. Vremenom, postalo je jasno da je venska tromboza multikauzalno oboljenje i da kombinacija više različitih naslednih i stečenih faktora rizika kod jedne individue dovodi do razvoja ove bolesti, kao i to da rizik za njen nastanak višestruko prevazilazi prosti zbir prepoznatih pojedinačnih uzročnih faktora [248].

Posmatrajući vensku trombozu kao izuzetno komplikovanu ali veoma interesantnu i inspirativnu slagalicu sastavljenu od mnoštva delova, našom studijom, želeli smo da ispitamo da li se i na koji način uloga fibrinoliznog mehanizma uklapa u ovu slagalicu i da na taj način damo mali doprinos rasvetljavanju etiopatogeneze venske tromboze, imajući pri tome na umu činjenicu da su studije koje se bave ovom problematikom još uvek retke, kao i to da su njihovi rezultati nekonzistentni.

Studijom je obuhvaćeno 200 ispitanika, među kojima je bilo 100 bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i 100 klinički i laboratorijski zdravih dobrovoljaca koji nikada nisu

imali trombozu. Prilikom kreiranja studije sa posebnom pažnjom se pristupilo sagledavanju svih mogućnosti za potencijalno uvođenje biasa u studiju, te njihovom eliminisanju. Dobro je poznato da postoji bezbroj pravaca iz kojih se u epidemiološku studiju može provući greška, ali da su tri ključna: selekcija ispitanika, sakupljanje informacija i "confounding". Kako bi selekcija ispitanika bila pravilna, u našoj studiji kontrolna grupa je odabrana randomizacijom iz populacije iz koje potiče i grupa bolesnika, nezavisno od ispitivanih faktora rizika, vodeći se osnovnim epidemiološkim postulatima pravilno kreirane case-control studije da je svaki ispitanik u grupi bolesnika odgovarao ispitaniku iz kontrolne grupe, pre nego što je doživeo vensku trombozu, kao i da je svaki ispitanik iz kontrolne grupe mogao da postane ispitanik iz grupe bolesnika ukoliko doživi vensku trombozu. Greške koje bi bile posledica sakupljanja informacija eliminisane su na taj način što je informacije, prema strogo formulisanom upitniku i kriterijumima prikupljala samo jedna osoba za sve ispitanike. Konačno, poseban trud uložen je u izbegavanje uticaja "confoundinga", kao trećeg najčešćeg, a ujedno i najjačeg uzroka "biasa", na rezultate studije. Sa tim ciljem, nakon detaljnog pretraživanja literature, izdvojili smo sve potencijalne "confounder"-e, koji su detaljno opisani u poglavlju Materijal i metode i sprovedene statističke analize prilagodili za njihov uticaj. Kako pomenuti uzroci grešaka u epidemiološkim studijama, a pre svega "confounding" mogu biti toliko jaki da čak u potpunosti preokrenu u suprotan smer efekat ispitivanih parametara [249], smatramo da smo dizajnirajući studiju na ovaj način značajno doprineli njenom kvalitetu i validnosti njenih rezultata.

U skladu sa aktuelnim istraživačkim dilemama iz oblasti venskog tromboembolizma, nametnula su se pitanja: Da li je izolovana distalna venska tromboza poseban entitet u poređenju sa proksimalnom venskom trombozom? Koji to sve još uzročni činoci mogu biti svrstani u grupu onih koji dovode do nastanka provocirane venke tromboze, a ne javljaju se kod pacijenata koji dožive primarnu trombozu vena? Da li je plućna tromboembolija neizostavno komplikacija koja proističe iz prethodno razvijenog trombotskog procesa u sistemu dubokih vena ili se može javiti kao potpuno nezavisan entitet? U skladu sa njima izvršili smo klasifikovanje bolesnika na one sa distalnom i proksimalnom trombozom dubokih vena, one sa primarnom i provociranom trombozom dubokih vena i one sa izolovanom trombozom dubokih vena i sa kombinacijom tromboze dubokih vena i plućne tromboembolije, te smo ove podgrupe poredili u odnosu na ispitivane parametre. Nakon analize rezultata, obzirom na izuzetno mali broj ispitanika u okviru podgrupe bolesnika koji su imali kombinaciju plućne tromboembolije i tromboze dubokih vena odlučili smo da ne diskutujemo detaljnije dobijene rezultate u ovoj podgrupi, obzirom na njihovu limitiranost uslovljenu brojem ispitanika.

Analizirajući prisustvo klasičnih faktora rizika za nastanak venske tromboze ustanovili smo da je njihova zastupljenost, očekivano bila značajno češća u grupi bolesnika u poređenju sa kontrolnim grupom, što je još jedna potvrda poznate činjenice da imobilizacija, trauma, dugotrajna putovanja, kao i upotreba hormonskih preparata predstavljaju deo uzročnog kruga venske tromboze [66].



Nakon ovoga pristupili smo analizi poređenja zastupljenosti klasičnih faktora rizika za nastanak arterijske tromboze između bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i zdravih ispitanika. Naši rezultati pokazuju upravo da su gojaznost, pušenje, hipertenzija, hiperlipoproteinemija i hiperLp(a) lipoproteinemija češće zastupljeni među bolesnicima obolelim od venske tromboze u odnosu na zdrave osobe. Iako je do relativno skoro smatrano da arterijska i venska tromboza imaju potpuno različite patofiziološke mehanizme nastanka, te da ne dele zajedničke faktore rizika, poslednje godine pružaju sve više dokaza da je situacija upravo suprotna [230,232,234]. Prema rezultatima Vayo-a i saradnika hiperlipidemija predstavlja faktor rizika za nastanak venske tromboze [232] a potvrda ovog otkrića stiže i nakon objavljivanja rezultata studije Ray-a i saradnika prema kojima statini, ali ne i drugi hipolipemici značajno smanjuju rizik od nastanka venske tromboze, što autori tumače stabilizacijom endotela [250]. Ageno i saradnici su metaanalizom koja je obuhvatila dvadeset i jednu "case-control" i kohortnu studiju na ukupno 63552 pacijenata ustanovili da gojaznost povećava rizik od nastanka venske tromboze 2.3 puta, hipertenzija 1.5 puta, dok dijabetes povećava ovaj rizik za 42%, pušenje za 18 % a hiperholesterolemija za 16% [251]. I Prandoni je sa svojim saradnicima objavio nekolicinu studija koje potvrđuju da postoji veza između ateroskleroze i venske tromboze [240], ali još uvek ostaje aktuelno pitanje da li aterosklerotski proces indukuje vensku trombozu ili ova dva stanja dele zajedničke faktore rizika.

U našem uzorku ispitanika 63% njih je imalo proksimalnu vensku trombozu, dok je izolovana distalna venska tromboza bila prisutna kod 29% bolesnika. U odnosu na aktuelne epidemiološke podatke, učestalost izolovane distalne tromboze dubokih vena kreće se između 31-56%, prema rezultatima različitih studija, što zavisi pre svega od primenjene dijagnostičke metode i varijabilnog kliničkog ispoljavanja. Iz tabele 19 u kojoj je predstavljena zastupljenost proksimalne i izolovane distalne tromboze dubokih vena prema rezultatima različitih autora [115,252,253,254,255,256], možemo videti da se naši rezultati kreću u istome rangu.

*Tabela 19. Lokalizacija tromboze dubokih vena donjih ekstremiteta prema rezultatima različitih studija*

<b>Autor</b>	<b>Vrsta studije</b>	<b>Dijagnostička metoda</b>	<b>Proksimalna DVT</b>	<b>Izolovana distalna DVT</b>
Schulman	prospektivna	venografija	56.1%	43.9%
Mattos	retrospektivna	duplex scan	66.7%	33.3%
Kazmers	retrospektivna	duplex scan	74.2%	25.8%
Stevens	prospektivna	duplex scan	68.1%	31.2%
Bernardi	prospektivna	duplex scan	76.6%	23.4%
Oger	prospektivna	duplex scan	63.0%	37.0%

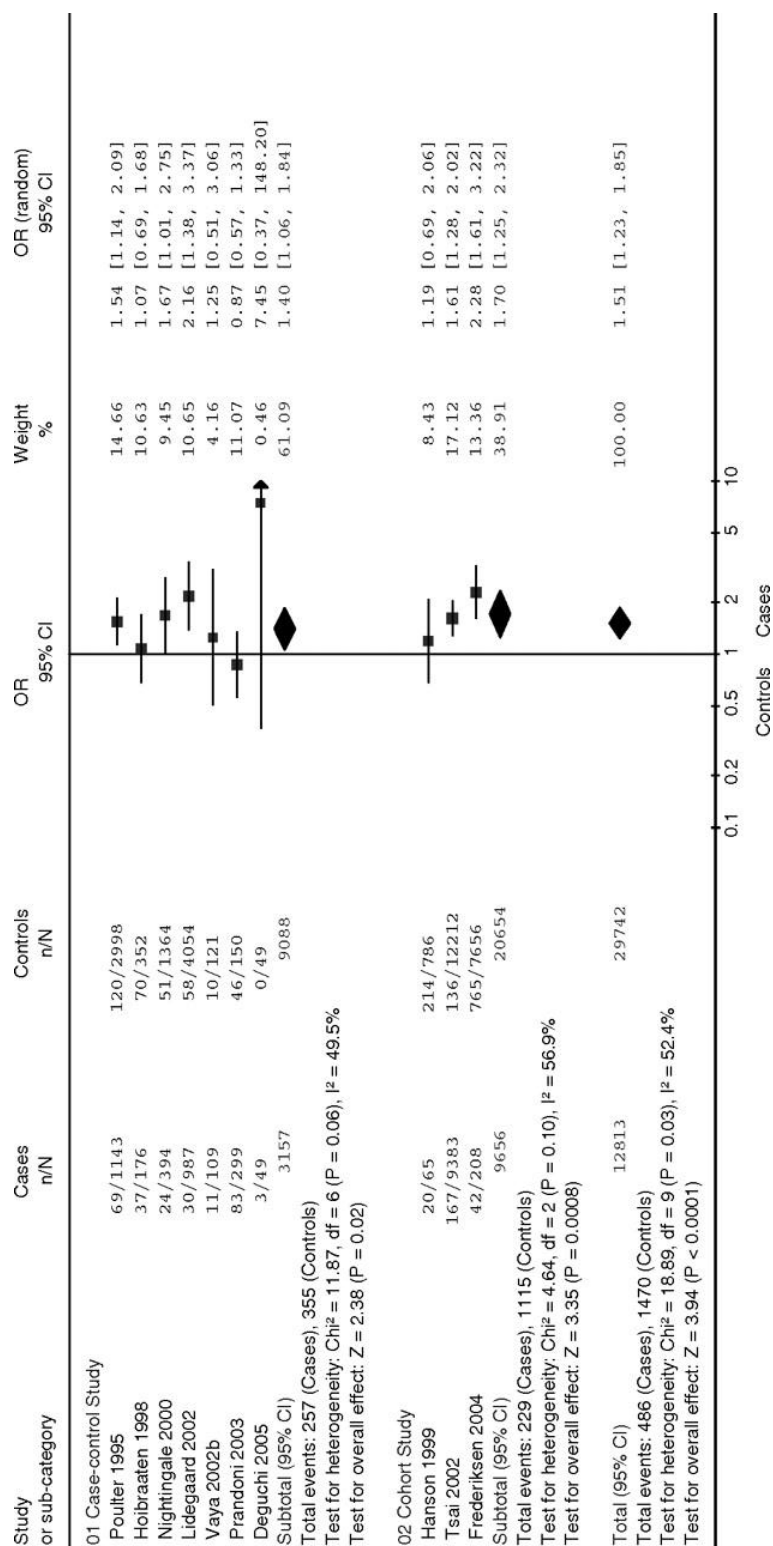
Slično Ouriel-u i saradnicima prema čijim rezultatima je odnos levostrane lokalizacije venskog tromboznog procesa u odnosu na desnostranu kod bolesnika sa distalnom trombozom dubokih vena 1.3:1 [257], u našoj studiji ovaj odnos iznosio je 1.4:1 u korist levostrane lokalizacije, ali nismo uočili postojanje razlike kada je u pitanju proksimalna tromboza dubokih vena, za razliku od pomenutog autora.

U odnosu na vrstu venske tromboze u našoj studiji bilo je 56% bolesnika sa spontanom ("unprovoked") venskom trombozom i 44% bolesnika sa provociranom ("provoked") venskom trombozom. Među provociranim venskim trombozama kao uzročni faktori bili su prisutni: hirurške intervencije, gipsana imobilizacija, trauma, trudnoća i hormonska terapija. Klasifikovanje bolesnika sa venskom trombozom na one sa provociranom i spontanom, koje smo i mi u okviru naše studije koristili ima pre svega veliki klinički značaj, obzirom da postoje čvrsti dokazi da je rizik od razvoja recidiva venskog tromboembolizma nakon 3-6 meseci primene antikoagulantne terapije oko 50% niži među pacijentima sa provociranom u odnosu na one sa spontanom trombozom dubokih vena [258]. Takođe, iako je inicijalni terapijski pristup identičan i u slučaju provocirane i primarne venske tromboze, nakon izvesnog vremena kliničar se nalazi pred neizbežnom odlukom da li će pacijentu ukinuti antikoagulantnu terapiju ili se odlučiti za njenu dugotrajnu primenu, a odgovor na ovu dilemu u najvećoj meri leži u činjenici da li je nastanak tromboze bio uslovljen nekim od priznatih faktora rizika za njen nastanak, odnosno da li je ona bila provocirana ili ne [259]. No, da bi odluka bila još komplikovanija služi sledeće pitanje koje se logično nameće: "Kako ikada možemo biti sigurni da pacijent zaista ima spontanu vensku trombozu", odnosno "Ima li logike u razmišljanju da su sve tromboze dubokih vena izazvane nekim, možda neprepoznatim, tranzitornim faktorom rizika?" Ovu veoma značajnu dilemu delimično su razjasnili Rogers i saradnici [260], koji su dizajnirali studiju sa specijalnim ciljem da identifikuju tranzitorne provocirajuće faktore rizika za trombozu dubokih vena, koristeći metodologiju "case-crossover" koja do tada nije često korišćena u identifikovanju faktora rizika za venske tromboze [261]. Autori ove studije su, na osnovi dobijenih rezultata, uz do tada prepoznate faktore rizika za nastanak venske tromboze, među kojima su i svi koje smo u našoj studiji imali u grupi bolesnika sa provociranom trombozom, kao veoma značajne uvrstili i akutne infekcije i primenu stimulatora eritropoeze i transfuzija krvi.

Ispitivanje zastupljenosti faktora rizika za nastanak tromboze u okviru različitih bolesničkih podgrupa uključilo je poređenje gojaznosti, upotrebe hormona, pušenja, hipertenzije, hiperlipoproteinemije i hiperLp(a) lipoproteinemije između bolesnika sa različitim lokalizacijama venke tromboze kao i između bolesnika sa provociranom i spontanom trombozom dubokih vena. Kao što je već pomenuto ovi faktori rizika, koji su izuzev hormonske terapije, do skora smatrani tipičnim faktorima rizika za nastanak isključivo arterijske tromboze, dokazano povećavaju rizik od nastanka i venskih tromboznih incidenata, ali gotovo da i nema studija koje se bave ispitivanjem eventualnog postojanja razlike u zastupljenosti ovih faktora rizika kod različitih tipova venskih tromboza. Naši rezultati pokazuju da se grupe bolesnika sa trombozom vena različite lokalizacije ne razlikuju

u odnosu na zastupljenost pomenutih faktora, kao i to da se grupe bolesnika sa provociranom i spontanom trombozom dubokih vena takođe ne razlikuju u odnosu na njihovu zastupljenost, izuzimajući hipertenziju. Tako je dobijena veoma interesantna statistički izrazito značajna razlika u zastupljenosti hipertenzije između bolesnika sa primarnom i provociranom trombozom dubokih vena u korist prvih (61% : 16%;  $p=0.000$ ). Do sada je ukupno 10 studija ispitivalo uticaj hipertenzije na venski tromboembolizam, među kojima 7 case-control studija (232, 240, 262, 263, 264, 265, 266) i 3 kohortne studije (80, 267, 268) čiji su rezultati i predstavljeni u Tabeli 20. Ove studije obuhvatile su ukupno 12813 pacijenata sa venskim trombozama i 29742 kontrole. Pacijenti sa hipertenzijom imali su viši rizik za nastanak venske tromboze (OR 1.51; CI 1.23-1.85) uz statističku heterogenost u različitim studijama ( $I^2=52.4\%$ ;  $P=0.03$ ). Međutim, do sada nisu objavljeni rezultati poređenja učestalosti hipertenzije kod različitih vrsta venskih tromboza. Iz rezultata naše studije, prema kojima je hipertenzija češća kod pacijenata sa spontanom venskom trombozom nameće se razmišljanje da ona zaista predstavlja jedan od uzročnih faktora rizika za nastanak pomenutog oboljenja, obzirom da je kod ispitanika u ovoj grupi, kako bi oni uopšte u nju i bili klasifikovani, eliminisano prisustvo ostalih, poznatih faktora rizika za nastanak venskog tromboembolizma.

Tabela 20. Pregled studija koje su ispitivale uticaj hipertenzije na nastanak DVT



Rezultati ispitivanja fibrinoliznog mehanizma koji se odnose na ispitivanje njegove globalne funkcionalnosti pokazali su da bolesnici koji su doživeli trombozu dubokih vena imaju značajno duže vreme lize koaguluma, odnosno suprimiranu funkcionalnost u poređenju sa zdravim ispitanicima ( $204.34 \pm 51.24$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p = 0.011$ ), kao i da je u

skladu sa ovim rezultatima i učestalost suprimirane funkcionalnosti fibrinoliznog sistema značajno viša među bolesnicima koji su doživeli vensku trombozu u poređenju sa zdravim ispitanicima (25% vs. 11%;  $p=0.010$ ). Prvi pregledni članak koji se bavio vezom između smanjene fibrinolizne aktivnosti i venske tromboze objavljen je pre 23 godine [215] a autori su doneli zaključak da su dokazi koji govore u prilog postojanja ove veze neubedljivi. Ipak, oni su istakli i činjenicu da iako se ne čini da smanjena fibrinolizna aktivnost može biti korištena kao prediktor ukupnog venskog tromboembolizma, izgledno je da postoji veza između suprimirane fibrinolize i postoperativne tromboze vena. U poslednje dve decenije objavljen je mali broj studija koje su se bavile ovom istraživačkom oblašću, a među značajnijima su svakako prospektivna, kohortna studija Crowther-a i saradnika koja nije pokazala da euglobulinsko vreme lize koaguluma ima prediktivnu vrednost u odnosu na recidiv venske tromboze [199], ali i studije čiji su rezultati drugačiji. Tako prema rezultatima LETS studije (Leiden Thrombophilia Study), "case-control" studije koja je kreirana sa ciljem ispitivanja faktora rizika za nastanak venske tromboze i koja je uključila ukupno 474 pacijenta sa prvom epizodom ove bolesti, redukovani fibrinolizni potencijal dvostruko povećava rizik za venski tromboembolizam kod pacijenata čije su vrednosti vremena lize koaguluma iznad 90-og percentila vrednosti nađenih u kontrolnoj grupi u poređenju sa pacijentima čije je vreme lize koaguluma ispod ove cut-off granice (OR 1.9; 95% CI 1.3–2.9) [100]. Pored LETS studije i MEGA studija (Multiple Environmental and Genetic Assessment of risk factors for venous thrombosis), velika, populaciona case-control studija koja je obuhvatila gotovo 2500 pacijenata sa venskom trombozom i 3000 kontrola potvrdila je nedvosmisleno postojanje veze između hipofibrinolize i venske tromboze [101]. Mogući razlog za nekonzistentnost rezultata i zaključaka pomenutih studija najverovatnije leži između ostalog i u raznovrsnosti eseja koji su primenjivani u svrhu procene globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma. U našoj studiji, kao što je već istaknuto koristili smo euglobulinsko vreme lize koaguluma čiji je osnovni nedostatak to što obuhvata samo euglobulinsku frakciju plazme ali kao prednost nosi široku dostupnost, dobru reproducibilnost i zadovoljavajući cost/benefit odnos. I savremeniji eseji imaju nedostataka koji se odnose na potcenjivanje uloge ćelija koje takođe doprinose punom fibrinoliznom potencijalu, te je aktuelan dalji razvoj fibrinoliznih testova koji koriste uzorke pune krvi [193].

Kada smo uporedili funkcionalnost fibrinoliznog sistema između pojedinih bolesničkih podgrupa i kontrolne grupe uočili smo da pri poređenju bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena i zdravih kontrola nije bilo značajnije razlike u dužini euglobulinskog vremena lize koaguluma ( $194.70 \pm 54.04$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.440$ ), ali da je ona bila evidentna prilikom poređenja bolesnika sa izolovanom distalnom venskom trombozom i zdravih ispitanika ( $218.32 \pm 41.12$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.001$ ), što potvrđuje i poređenje učestalosti prisustva suprimirane funkcionalnosti fibrinolize (35% vs. 11%,  $p=0.003$ ).

Međusobno poređenje funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa različitim lokalizacijama tromboze dubokih vena pokazalo je da postoje značajne razlike u euglobulinskom vremenu fibrinolize (distalna DVT  $218.32 \pm 41.12$  vs. proksimalna DVT  $194.70 \pm 54.04$  vs. DVT retke lokalizacije  $229.38 \pm 46.18$ ;  $p=0.023$ ) i potvrdilo da je na našem uzorku ispitanika ono značajno duže kod bolesnika sa izolovanom distalnom trombozom dubokih vena u odnosu na bolesnike sa proksimalnom lokalizacijom trombotskog procesa. Uočavamo i da se najviše vrednosti euglobulinskog vremena dobijaju u podgrupi ispitanika sa trombozom retke lokalizacije.

Konačno, ispitivanjem značajnosti razlika u funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma u odnosu na vrednosti euglobulinskog vremena lize koaguluma između bolesnika koji su imali provociranu vensku trombozu i kontrolnih ispitanika i bolesnika koji su imali vensku trombozu bez prepoznatog faktora rizika i kontrolnih ispitanika uočili smo da bolesnici koji su imali provociranu vensku trombozu imaju značajno više vrednosti ovoga parametra u poređenju sa kontrolama ( $208.18 \pm 48.53$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.018$ ), kao i da nema značajne razlike u ovom parametru između bolesnika sa primarnom trombozom i zdravih ispitanika ( $201.32 \pm 53.51$  vs.  $185.62 \pm 42.30$ ;  $p=0.071$ ), dok smo poređenjem bolesnika sa provociranom i primarnom venskom trombozom sa kontrolnim ispitanicima, u odnosu na učestalost suprimiranosti fibrinoliznog potencijala, uočili da postoji statistički značajno veća učestalost suprimiranosti fibrinolizne aktivnosti i među bolesnicima sa provociranom venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama (25% vs. 11%;  $p=0.031$ ) i među bolesnicima sa primarnom venskom trombozom u poređenju sa zdravim ispitanicima (25% vs. 11%;  $p=0.022$ ). Međusobnim poređenjem funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa provociranom trombozom dubokih vena i bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena nismo dobili postojanje značajnih razlika.

Izolovana distalna venska tromboza je jedno od pitanja iz oblasti venskog tromboembolizma oko koga se aktuelno vode brojne debate, počevši od toga šta tačno predstavlja ovaj entitet, preko toga koliki je stvarni rizik od nastanka embolijskih i posttrombotskih komplikacija koje sa sobom nosi, do pitanja koji je idealan terapijski pristup i kako pristupiti proceni rizika od recidiva venske tromboembolijske bolesti u slučaju njenog postojanja. Veoma je značajno istaći činjenicu da je sve veći broj dokaza poslednjih godina da je "profil rizika" za izolovanu distalnu vensku trombozu drugačiji od onoga za proksimalnu trombozu dubokih vena i plućnu tromboemboliju. Studija izvedena iz RIETE registra, na više od 11000 pacijenata sa potvrđenom trombozom dubokih vena [269] donela je dokaze da je izolovana distalna venska tromboza ređe zastupljena kod pacijenata starijih od 75 godina, kod žena tokom trudnoće i puerperijuma, kao i u drugim "hroničnim stanjima" poput prethodnog venskog tromboembolizma ili karcinoma. Za razliku od toga češće je udružena sa tranzitornim faktorima rizika za nastanak venske tromboze poput hospitalizacije, skorih hirurških procedura ili traume, skorašnjih dugih putovanja i venskih varikoziteta. Pored toga, ova studija, kao i studija Kovač i saradnika [270] pruža dokaze da prisustvo naslednih trombofilnih mutacija nema efekta na prevalencu izolovane distalne tromboze dubokih

vena. Rezultati pomenutih studija sugerišu da je ravnoteža između faktora koji favorizuju propagaciju krvnog ugruška i onih koji im se suprotstavljaju u slučaju izolovane distalne tromboze dubokih vena drugačija nego u slučaju proksimalne venske tromboze. Prema rezultatima naše studije evidentna je razlika u funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma između bolesnika sa proksimalnom i distalnom trombozom dubokih vena, odnosno njena funkcionalnost je značajno više suprimirana kod bolesnika sa izolovanom distalnom trombozom. Objašnjene za ovakve rezultate moglo bi se tražiti upravo u navedenom "profilu rizika" za izolovanu distalnu trombozu dubokih vena koji obuhvata faktore rizika koji mogu biti, i to najčešće putem traume, dovedeni u vezu sa oslobađanjem inhibitora fibrinoliznog mehanizma iz oštećenog venskog endotela, te posledičnim smanjenjem aktivacije plazminogena, pri čemu treba istaći da postoje studije koje potvrđuju nesumnjiv porast nivoa PAI-1 u traumati, kao i postojanje značajne korelacije između ovog inhibitora fibrinolize i D-dimera kao posrednog pokazatelja nivoa stimulacije trombinske aktivnosti [271].

Nakon analize rezultata dobijenih ispitivanjem globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma pristupili smo analizi rezultata dobijenih ispitivanjem pojedinačnih komponenti fibrinoliznog mehanizma. Tako uočavamo da nema značajne razlike u koncentraciji plazminogena između bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i zdravih ispitanika ( $123.90 \% \pm 27.37$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p=0.126$ ), što je u skladu sa većinom postojećih literaturnih podataka. Naime, izuzev nekolicine prikaza slučaja, do pre nekoliko godina nisu pruženi dokazi za postojanje veze između deficita plazminogena i venske tromboze, a velika, populaciona, case-control studija Okamoto-a i saradnika pokazala je da je prevalenca deficita plazminogena slična kod pacijenata sa venkom trombozom i njima odgovarajućih zdravih kontrola [196]. Kada smo nakon klasifikacije bolesnika analizirali dobijene rezultate u odnosu na poređenje nivoa plazminogena između različitih bolesničkih podgrupa i zdravih kontrola uočili smo da nema značajnih razlika pri poređenju bolesnika sa izolovanom distalnom trombozom dubokih vena, bolesnika sa proksimalnom trombozom dubokih vena, bolesnika sa atipičnom lokalizacijom venske tromboze, kao ni između bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena prilikom poređenja sa kontrolnom grupom ispitanika. Međutim, prema našim rezultatima bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena imali su značajno više koncentracije plazminogena u poređenju sa zdravim osobama ( $127.14 \% \pm 27.73$  vs.  $117.09 \% \pm 24.49$ ;  $p= 0.044$ ). Iako do skora nije nikada ustanovljeno postojanje veze između plazmatskog nivoa plazminogena i rizika od venskog tromboembolizma, obzirom da istraživanja nisu odmakla dalje od studija na osobama sa deficitom plazminogena, koje nisu pružile nikakve dokaze o uzročnoj ulozi plazminogena u riziku za vensku trombozu, 2010-e godine objavljena je studija Meltzer i saradnika [272] koja otvara potpuno nove perspektive u pogledu veze plazminogen-venska tromboza. Naime, rezultati ove velike studije pokazuju neočekivanu pozitivnu korelaciju između nivoa plazminogena i rizika za nastanak tromboze dubokih vena. Uloga plazminogena u trombotskom procesu oduvek je bila veoma nejasna. Pojedini autori su u populacionim studijama došli do zaključka da je povišen nivo plazminogena povezan sa povećanim rizikom

od nastanka arterijske tromboze [273,274], što su objasnili inflamatornim procesom [275], obzirom da je pomenuta veza nestala nakon prilagođavanja za markere inflamacije [276]. U studiji Meltzer, prilagođavanje za fibrinogen i FVIII koagulacije, kao proteine akutne faze, ublažilo je ali ne i potpuno poništilo vezu između plazminogena i venske tromboze, sugerišući da plazminogen jeste marker inflamacije, ali da je moguće da na rizik za nastanak venske tromboze utiče putem alternativnih patofizioloških mehanizama. Stoga, ne treba smetnuti sa uma da plazmin ima brojne druge supstrate pored fibrina, kao što su PAR-1, ekstracelularni matriks, TFPI i FV koagulacije a da su svi ovi činioci potencijalno značajni u trombotskom riziku, kao i da plazmin može indukovati endotelno oštećenje za koje je dobro poznato da u velikoj meri ima uticaj na nastanak tromboze [277,278,279, 280,281].

Prilikom poređenja koncentracije t-PA između svih bolesnika i kontrola nije dobijena statistički značajna razlika ( $18.65 \text{ ng/ml} \pm 9.86$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.110$ ), što je u skladu sa većinom literaturnih navoda. Tako je, iz kohorte Physicians' Health Study, grupisana prospektivna case-control studija koja je uključila 55 pacijenata i kontrola i pratila ih 5 godina [198] zaključila da cirkulišući nivo t-PA nije prediktor venskih tromboza. Takođe, i rezultati još jedne prospektivne kohorte koja je uključila 303 osobe koje su doživele vensku trombozu pružaju dokaze da nivo t-PA nema prediktivni značaj za pojavu recidiva venske trombotske bolesti [199]. Međutim, prema rezultatima naše studije, identično kao i u slučaju plazminogena, nakon klasifikovanja bolesnika i analize rezultata u odnosu na poređenje t-PA između različitih bolesničkih podgrupa i zdravih osoba uočili smo da bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena imaju značajno više koncentracije t-PA u poređenju sa zdravim ispitanicima ( $20.02 \text{ ng/ml} \pm 11.07$  vs.  $16.78 \text{ ng/ml} \pm 8.08$ ;  $p=0.042$ ). I Colucci i saradnici, diskutujući ulogu t-PA u arterijskoj trombozi navode da se čini da je povišen nivo t-PA, najverovatnije kao rezultat difuznog inflamatornog oštećenja zida krvnog suda, bolji prediktor ishemijskih vaskularnih događaja, nego povišen nivo PAI-1, obzirom da prediktivna snaga t-PA ostaje ili nepromenjena ili redukovana ali i dalje signifikantna nakon korekcije za "confounding" varijable i to naročito one indikativne za insulinsku rezistenciju, dok se ovo u slučaju PAI-1 potpuno gubi. Biološka relevantnost cirkulišućeg nivoa t-PA nije do danas u potpunosti razjašnjena. Logično je očekivati da povišen nivo t-PA, kao glavnog aktivatora plazminogena, bude udružen sa smanjenjem rizika za nastanak trombotske bolesti zbog povišene fibrinolizne aktivnosti. Međutim, povišeni nivoi t-PA antigena ne podrazumevaju povišenu fibrinoliznu aktivnost obzirom da je većina t-PA antigena u plazmi neaktivna, u formi kompleksa sa PAI-1, te bi najefikasnije ispitivanje uloge t-PA u fibrinoliznom procesu bilo monitorisanje oslobađanja t-PA nakon stimulacije. Pored toga, kada se razmatraju rezultati koji se odnose na pojedinačne činioce fibrinoliznog mehanizma i njihovu eventualnu ulogu u patofiziološkom mehanizmu odgovornom za nastanak venske tromboze uvek treba imati na umu da ni jedna *in vivo* studija nije ustanovila postojanje korelacije između cirkulišućeg nivoa t-PA i lokalnog oslobađanja ovoga aktivatora fibrinolize iz endotelnih ćelija, pa sa rezervom treba prihvatati tumačenje rezultata plazmatskog nivoa t-PA i ne poistovećivati ga sa lokalnom fibrinoliznom aktivnošću ovoga činioca. Kako je



lokalna aktivnost t-PA, ali i ostalih najznačajnijih karika fibrinoliznog lanca pre svega zavisna od njegovog oslobađanja iz endotela, to tek studije na organskom nivou mogu pružiti konačni sud o njihovoj stvarnoj ulozi u etiopatogenezi venske tromboze.

Prema rezultatima naše studije, bolesnici sa venskom trombozom se ne razlikuju od zdravih ispitanika u odnosu na koncentraciju PAI-1 ( $5.23 \text{ ng/ml} \pm 2.76$  vs.  $5.42 \text{ ng/ml} \pm 2.73$ ;  $p=0.329$ ). Iste rezultate dobijamo i prilikom poređenja pojedinih bolesničkih podgrupa i zdravih ispitanika u odnosu na nivo ovog inhibitora fibrinolize. I drugi autori smatraju da nivo cirkulišućeg PAI-1 ne utiče na rizik od nastanka venske tromboze. Prema rezultatima pomenute Physicians' Health Study [198], nije ustanovljeno postojanje razlike u nivou PAI-1 na početku studije između ispitanika koji su u njenom daljem toku doživeli vensku trombozu i onih koji nisu oboleli od nje. Ovi rezultati potvrđeni su i grupisanom case-control studijom izvedenom iz LITE kohorte [202] koja je obuhvatila 308 pacijenata i 640 kontrola, kao što ni rezultati kohortne studije Crowther-a i saradnika [199] nisu ustanovili postojanje povezanosti između PAI-1 aktivnosti ili njegovog antigenog nivoa i recidiva venskog tromboembolizma. Sa druge strane pak, postoji i nekolicina studija koje su ustanovile postojanje viših nivoa PAI-1 antigena ili aktivnosti kod pacijenata sa recidivima venskih tromboza u poređenju sa zdravim kontrolama [202,203,282]. Kada se sagledaju rezultati svih studija koje se bave ispitivanjem značaja povišenog nivoa PAI-1 na rizik od nastanka venske tromboze evidentno je da je značajnija veza ustanovljena prema rezultatima retrospektivnih nego prospektivnih studija. Pacijenti sa trombozom dubokih vena često imaju prolongiran inflamatorni odgovor, što svakako doprinosi povišenim nivoima PAI-1 u plazmi. Retrospektivne studije stoga daju ograničene informacije i teške su za evaluaciju obzirom na pitanje uzroka i posledice. Jedan od mogućih razloga zbog koga rezultati naše studije ne ukazuju na viši nivo PAI-1 kod bolesnika sa trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim kontrolama je i taj što su bolesnici uključivani u studiju često i nekoliko godina nakon nastanka venske tromboze, te je eventualni uticaj čak i prolongiranog inflamatornog odgovora u potpunosti eliminisan.

Za razliku od do sada iznetih rezultata ispitivanja parametara fibrinolize, analizom poređenja koncentracije TAFI uočili smo da bolesnici koji su doživeli venski trombozni incident imaju značajno više koncentracije ovoga inhibitora fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa osobama koje nikada nisu imale vensku trombozu ( $19.70 \text{ ng/ml} \pm 5.17$  vs.  $17.13 \text{ ng/ml} \pm 4.25$ ;  $p=0.001$ ). Ovakvi rezultati dobijeni su i pri poređenju koncentracija TAFI između različitih bolesničkih podgrupa klasifikovanih u odnosu na vrstu i lokalizaciju venskog trombotskog procesa i zdravih ispitanika. I drugi autori smatraju da je nivo TAFI direktno povezan sa venskom trombozom. Tako se prema rezultatima LETS studije beleži gotovo dvostruko povišenje rizika za nastanak prve epizode tromboze dubokih vena kod osoba sa nivoom TAFI iznad 90-og percentila u poređenju sa osobama ispod ove granice (OR 1.7; 95%CI 1.1–2.7) [210]. Takođe, i rezultati case-control studije Verdu-a i saradnika [283] izvedene na 60 pacijenata i 62 kontrole, pokazali su četverostruko povećanje rizika od nastanka tromboze dubokih vena kod ispitanika sa nivoima TAFI iznad 90-og percentila, kao i

što su rezultati velike, prospektivne kohorte [212] koja je uključila 600 pacijenata koji su imali vensku trombozu, pokazali da već nivoi TAFI iznad 75-og percentila zdravih kontrola dvostruko povećavaju rizik od nastanka recidiva ove bolesti. Neke od već dokazanih činjenica koje pružaju moguće objašnjenje za vezu između povišenih koncentracija TAFI i venske tromboze jesu to da nivo TAFI-a raste sa starenjem, naročito kod žena, kao i to da je njegov nivo povišen kod žena koje koriste oralne kontraceptivne preparate [284]. No, veza između TAFI-a i venske tromboze znatno je komplikovanija, a u prilog tome govore dokazi studija izvedenih poslednjih godina na osnovu kojih postaje jasno da su nivoi TAFI-a delimično genetski determinisani, te da su pojedini singl-nukleotidni polimorfizmi u promoterskoj regiji gena za TAFI u direktnoj vezi sa antigenim nivoom TAFI-a u plazmi [285], a neki od njih i u direktnoj vezi sa povišenim rizikom za nastanak venske tromboze [286]. Konačno, ne treba zaboraviti ni mogućnost da TAFI doprinosi ovome porastu ne samo putem inhibitorne fibrinolizne uloge nego i putem uticaja na inflamatorni odgovor, za šta su se pojavili i prvi dokazi [59].

Kako je jedan od ciljeva naše studije bio i ispitivanje uticaja 4G/4G mutacije u genu za PAI na funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma i rizik od nastanka venske tromboze pristupili smo analizi rezultata dobijenih sprovedenim genetskim analizama. Uočavamo da su grupa bolesnika i kontrolna grupa ispitanika veoma slične u odnosu na zastupljenost pojedinih PAI-1 genotipskih podgrupa, obzirom da je u okviru grupe bolesnika bilo 25% homozigotnih i 58% heterozigotnih nosilaca mutacije gena za PAI-1, a 17% bolesnika nije imalo pomenutu gensku mutaciju, dok je u okviru kontrolne grupe bilo 30% homozigotnih i 56% heterozigotnih nosilaca mutacije, a 14% ispitanika nije imalo mutaciju. Poznato je da učestalost mutacije u genu za PAI-1 zavisi od etničke pripadnosti, a na osnovu naših rezultata koji se odnose na kontrolnu grupu ispitanika, možemo reći da su oni u skladu sa rezultatima jedine dosadašnje studije sprovedene u Srpskoj populaciji, Đorđević i saradnika, u koju je bilo uključeno 210 zdravih ispitanika i koji su pokazali da 19% ispitanika nije imalo mutaciju u ovome genu, odnosno bili su 5G/5G nosioci, 46% njih je imalo 4G/5G genotip, odnosno bili su heterozigotni nosioci mutacije, a 35% ispitanika su bili homozigotni nosioci mutacije ovoga gena, odnosno nosioci 4G/4G genotipa [287]. Pored toga, naši rezultati u skladu su i sa rezultatima koji su dobijeni u studijama izvedenim u okolnim populacijama [288,289,290]. Sa druge strane, pojedine studije koje su obuhvatile populacije Italije i Španije pokazale su nešto nižu učestalost 4G alela [291,292]. Međutim, sve studije, uključujući i našu, su bez obzira na postojanje određenih razlika u procentualnoj zastupljenosti pokazale izrazito visoku učestalost mutiranog 4G alela u opštoj populaciji, te se neminovno nameće pitanje koja je stvarna biološka vrednost ove genske varijante, odnosno može li ona protektivnim uticajem smanjiti rizik za nastanak određenih bolesti. U prilog ovakvog razmišljanja govore i rezultati studija koje dokazuju da PAI-1 4G/4G genotip smanjuje rizik od nastanka ishemijskog moždanog udara [293]. Autori pretpostavljaju da mehanizam kojim se ovo odigrava podrazumeva da tokom inflamatornih procesa u moždanom tkivu prisustvo 4G alela može dovesti do povećanja nivoa PAI-1, koji pak ima

neposredan uticaj na proteolizu i stabilizaciju plaka. Ono što je važno zapaziti je da prema rezultatima naše studije ne postoje značajne razlike u zastupljenosti 4G/5G polimorfizma kod bolesnika sa trombozom dubokih vena u odnosu na zdrave osobe iz čega se nameće zaključak da ova genska mutacija nema uticaj na povišenje rizika od nastanka venske tromboze, što će u kasnijem toku diskusije biti detaljno obrazloženo. Zastupljenost pojedinih PAI-1 genotipova nije se razlikovala u podgrupama bolesnika klasifikovanih u odnosu na vrstu ili lokalizaciju trombotskog procesa iz čega se nameće zaključak da odgovor za eventualne razlike u patofiziološkom mehanizmu odgovornom za nastanak određenih tipova tromboze ne treba tražiti na terenu ove genske mutacije.

Sama srž naše studije bila je da što realnije sagledamo ulogu fibrinoliznog mehanizma u venskoj trombozi, odnosno da utvrdimo da li i koliki realno veći rizik za nastanak ove bolesti imaju osobe koje imaju poremećaj fibrinoliznog mehanizma. Iz tog razloga i sa tim ciljem smo pristupili proceni rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na postojanje poremećaja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, u odnosu na patološke koncentracije pojedinih komponenti fibrinoliznog mehanizma, kao i u odnosu na postojanje 4G/4G mutacije u genu za PAI-1.

Prema rezultatima naše studije, globalno suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma povećava rizik za nastanak venske tromboze za tri puta (OR 3.02; CI 1.26-7.22), čak i nakon prilagođavanja za sve, pažljivim odabirom uključene, "confounding" faktore, odnosno pol, godine, BMI, pušenje, hiperlipoproteinemiju, hiperLp(a) lipoproteinemiju, CRP, fibrinogen, hipertenziju, upotrebu statina i hormonskih preparata. Pored toga što su naši rezultati u skladu sa rezultatima veoma kvalitetne studije Lisman-a i saradnika izvedene na velikom broju ispitanika [100], logično su povezani i sa rezultatima publikacije prema kojima se asimptomatska venska tromboza može detektovati kod približno 1% opšte populacije [294]. Na osnovu činjenice da se mali, asimptomatski trombi pojavljuju sa ovako velikom učestalošću možemo pretpostaviti da upravo uticaj neadekvatnog funkcionisanja fibrinoliznog sistema u smislu smanjenog potencijala da ukloni ove male asimptomatske trombe rezultuje povećanim rizikom od nastanka tromboze dubokih vena kod osoba koje imaju suprimiranu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma. No, kako istraživačke godine protiču sve jasnije je da hipofibrinoliza predstavlja faktor rizika za nastanak venske tromboze, čemu mali doprinos daje i naša studija, ali i dalje aktuelna ostaje dilema da li je ona determinisana genetskim ili stečenim činiocima ili pak njihovom kombinacijom.

Na našem uzorku ispitanika ni povišen nivo t-PA antigena, kao ni povišen nivo PAI-1 nije imao uticaja na rizik od nastanka tromboze dubokih vena. Za razliku od toga, povišene koncentracije TAFI više od dvostruko su povećale ovaj rizik. Tako je OR nakon kompletnog prilagođavanja iznosio 2.25 (CI 1.16-4.35). Naši rezultati najsličniji su rezultatima Eichinger-a i saradnika [212] koji su ustanovili dvostruko povećanje rizika od nastanka recidiva venskih tromboza kod osoba sa povišenim nivoima TAFI. Otkriće ovog relativno novog inhibitora fibrinolize, osim što je ponudilo prvu pravu sponu između koagulacije i fibrinolize, iznedrilo

je i interesantno pitanje da li inhibicija TAFI može stimulisati endogenu fibrinolizu, nudeći na taj način dugotrajnu zaštitu od neželjenih trombotskih događaja. Kao logičan sled događaja usledilo je istraživanje i dizajniranje inhibitora vodećih inhibitora fibrinolize - PAI-1 i TAFI-1 poslednjih godina [295,296,297], koja otvaraju potpuno nove perspektive u prevenciji i lečenju tromboembolizma.

Konačno, rezultati ispitivanja uticaja 4G/4G genotipa na rizik od nastanka tromboze dubokih vena pokazuju da on nema značajnijeg uticaja na ovaj rizik u poređenju sa 4G/5G ili 5G/5G genotipom, što potvrđuje OR koji nakon prilagođavanja za sve pomenute činioce iznosi 0.57 (0.27-1.20). Od studija koje su se bavile ispitivanjem 4G/5G PAI-1 polimorfizma na rizik od nastanka venske tromboze treba spomenuti studiju Grubića i saradnika [298]. Ova studija obuhvatila je 83 pacijenta sa trombozom dubokih vena i 50 zdravih dobrovoljaca, a prema njenim rezultatima nije ustanovljeno postojanje veze između pomenutog genskog polimorfizma i rizika od nastanka venske tromboze. Pored toga, svakako je neophodno osvrnuti se i na rezultate najveće objavljene studije iz ove oblasti, odnosno studije Ridkera i saradnika [299], koja je ispitala PAI-1 polimorfizam u okviru Physicians Health Study na 14916 muškaraca koji su praćeni 8.6 godina u proseku. Tokom ovog perioda 121 osoba je doživela vensku trombozu, a autori nisu ustanovili nikakvo postojanje veze između ovih događaja i PAI-1 genotipa, niti eventualne razlike u frekvenci alela između bolesnika sa venskom trombozom i mečovanih kontrola. I Stegnar i saradnici [300] su izveli case-control studiju na 158 pacijenata koji nisu bili u srodstvu i 145 kontrolnih osoba. Njihovi rezultati pokazali su da su pacijenti imali značajno više nivoa PAI-1 antigena i aktivnosti u poređenju sa kontrolama, kao i viši BMI, nivoa lipida, glukoze i insulina, ali takođe nisu ustanovili postojanje veze između PAI-1 4G polimorfizma i venske tromboze. Hooper i saradnici [301] su pak ispitali ulogu PAI-1 4G/5G polimorfizma na rizik od nastanka venske tromboze u populaciji Afro Amerikanaca i ustanovili da ni na ovom uzorku nema direktne veze između 4G alela i rizika za vensku trombozu, ali ono što je interesantno je da su 4G alel detektovali kod oko 25% Afro Amerikanaca, odnosno ređe nego što je to prijavljivano za populaciju belaca. Veza između PAI-1 4G/5G polimorfizma u Turskoj populaciji istraživa je u case-control studiji Akara-a i saradnika [302], koja je obuhvatila 136 pacijenata i 113 zdravih kontrola. Autori nisu pronašli vezu između PAI-1 genotipa i venske tromboze. Ipak, 4G alel je povećavao rizik od nastanka ove bolesti u prisustvu postojanja heterozigotnog nosilaštva Faktor V Leiden mutacije sa OR od 5.5 (95% CI 1.7–6.3). Slične rezultate objavili su i Seguí i saradnici [303]. U studiji fokusiranoj na nasledni deficit proteina S, koju su izveli Zöller i saradnici [304] ispitivan je i 4G/5G polimorfizam kod 143 osobe sa deficitom ovog prirodnog inhibitora koagulacije, 206 nedeficitarnih rođaka iz 21 različite familije, kao i 140 zdravih kontrola koje nisu bile ni u kakvoj rodbinskoj vezi. Među 206 rođaka bez deficita proteina S, nije ustanovljeno postojanje veze između 4G genotipa i venskog tromboembolizma. Međutim, u grupi od 143 osobe sa deficitom proteina S, ustanovljeno je da 4G homozigotno nosilaštvo značajno povećava rizik za nastanak plućne tromboembolije, ali ne i tromboze dubokih vena. Autori su zaključili da 4G alel doprinosi težini venske tromboembolijske bolesti kod pacijenata sa deficitom proteina S. Dakle, u

najvećem broju slučajeva rezultati objavljenih studija u skladu su sa našim rezultatima, a jedan od narednih koraka u našem daljem istraživačkom radu na ovom polju svakako bi moglo da bude ispitivanje rizika za nastanak tromboze dubokih vena u odnosu na kombinaciju različitih priznatih i potencijalnih trombofilnih mutacija.

Na kraju, sumirajući naše rezultate možemo reći da bolesnici sa izolovanom distalnom trombozom dubokih vena, kao i bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena imaju značajno suprimiran fibrinolizni potencijal u poređenju sa zdravim ispitanicima, ali ne i bolesnici sa proksimalnom trombozom dubokih vena i bolesnici sa primarnom trombozom dubokih vena. Nivo t-PA antigena, ali i plazminogena značajno je viši kod bolesnika sa provociranom venskom trombozom u poređenju sa zdravim osobama, dok nema razlike u koncentraciji PAI-1 među njima. Kod bolesnika sa primarnom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim osobama nema značajne razlike u odnosu na bilo koji pojedinačni činilac fibrinoliznog mehanizma. Nivo TAFI značajno je viši kod bolesnika sa provociranom, ali i primarnom, kao i kod bolesnika sa izolovanom distalnom, ali i proksimalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim osobama. Nema razlika u zastupljenosti 4G/5G polimorfizma između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih ispitanika. Konačno, ispitivanjem uticaja fibrinoliznog mehanizma na rizik za nastanak tromboze dubokih vena ustanovili smo da suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma trostruko povećava rizik od nastanka tromboze dubokih vena, da povišen nivo TAFI vodi dvostrukom povećanju ovoga rizika, ali da 4G/5G PAI-1 polimorfizam samostalno nema uticaja na rizik za venski tromboembolizam.

Na kraju jednog ovakvog naučnog istraživanja nesumnjivo se i samim istraživačima, ali i čitaocima nameće isto pitanje. Koji je stvarni, upotrebn i značaj ovih otkrića? Da li smo na bilo koji način olakšali svakodnevne dileme sa kojima se susreću lekari koji se bave lečenjem i prevencijom venske tromboembolijske bolesti?

Osnovni "problem" za lekara koji se susreće sa venskim trombozama, bez obzira na to koliko iskustva i znanja u ovoj oblasti ima nije inicijalna terapija ove bolesti, nego optimalna dužina lečenja, kao i njena prevencija. Terapijske odrednice su danas globalno usklađene i aktuelni vodiči dobre kliničke prakse najčešće ne ostavljaju mesta za bojazan da li smo doneli ispravnu terapijsku odluku. Međutim, pravilna i pravovremena prevencija venskog tromboembolizma pravi je izazov koji proističe upravo iz multikauzalnosti same bolesti i činjenice da je verovatno svaki čovek na našoj planeti čiji rizik za nastanak venske tromboze procenjujemo jedinstven u pogledu toga rizika u odnosu na kombinaciju riziko faktora koje ima. Tako realnim sagledavanjem svih do danas prepoznatih i priznatih faktora rizika za nastanak venske tromboze svakodnevno donosimo odluke da li da pacijentu uključimo primarnu prevenciju venske tromboze svesni rizika od nastanka hemoragijskih komplikacija ili HIT-a koji takva odluka sa sobom nosi, odnosno da li da pacijentu koji je već doživeo jedan venski trombotski incident ukinemo oralnu antikoagulantnu terapiju primenjivanu u sekundarnoj prevenciji svesni rizika od nastanka recidiva venske tromboze ili je nastavimo dugotrajno, ponovo svesni rizika od nastanka ozbiljnih hemoragijskih komplikacija. Važuci

tako sve argumente za i protiv ne retko se nalazimo u situaciji da je vaga u idealnoj revnoteži, te je i najmanji teg koji možemo dodati i na taj način biti sigurni da donosimo ispravnu terapijsku odluku od izuzetnog značaja. Rezultati naše studije omogućuju lekarima koji se bave ovom problematikom da upotrebom dostupnog i jeftinog testiranja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma u svojim rukama imaju još jedan argument koji će pomoći u terapijskim odlukama na polju prevencije venskog tromboembolizma, te imaju veliki praktični značaj. Pored toga, u svetlu cost/benefit odnosa na osnovu naših rezultata možemo reći da genetske analize u pravcu eventualnog postojanja 4G/5G PAI-1 genske mutacije ne treba uvrštavati u spektar rutinskih analiza koje koristimo u svrhu procene rizika za nastanak venske tromboze.

Kao zanimljiva tema za dalja istraživanja na osnovu rezultata ove studije nametnulo su se detaljnije ispitivanje globalne uloge fibrinoliznog mehanizma, kao i uloge njegovih pojedinačnih komponenti u nastanku provocirane venske tromboze, kao i izolovane distalne tromboze dubokih vena, na većem uzorku ispitanika. Pored toga, interesantno bi bilo proširiti procenu rizika za nastanak venske tromboze u odnosu na 4G/5G PAI-1 polimorfizam u kombinaciji sa različitim drugim poznatim trombofilnim mutacijama, jer bi tek na taj način u potpunosti bilo kompletirano sagledavanje uloge ovoga polimorfizma u nastanku venske tromboze.

## 9. Zaključci

Rezultati ispitivanja globalne funkcionalnosti fibrinoliznog mehanizma, ali i njegovih pojedinačnih komponenti kod bolesnika sa venskom trombozom i njihovo poređenje sa rezultatima ispitivanja fibrinolizne aktivnosti zdravih osoba pokazali su da hipofibrinoliza ima važan značaj u venskoj tromboembolijskoj bolesti. Rezultatima sprovedenog ispitivanja delimično je potvrđena radna hipoteza. Na osnovu dobijenih rezultata možemo izvesti sledeće zaključke:

1. Bolesnici sa izolovanom distalnom trombozom dubokih vena, ali ne i bolesnici sa proksimalnom trombozom dubokih vena, imaju suprimiranu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa zdravim osobama.

2. Bolesnici sa provociranom trombozom dubokih vena, ali ne i bolesnici sa primarnom trombozom dubokih vena, imaju suprimiranu funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma u poređenju sa zdravim osobama.

3. Nivo t-PA antigena značajno je viši kod bolesnika sa provociranom venskom trombozom nego kod zdravih osoba.

4. Nivo plazminogena značajno je viši kod bolesnika sa provociranom venskom trombozom nego kod zdravih osoba.

5. Nema razlike u nivou PAI-1 između bolesnika koji su doživeli vensku trombozu i zdravih osoba koje nikada nisu imale venski trombozni incident

6. Nivo TAFI značajno je viši kod bolesnika sa provociranom, ali i primarnom, kao i kod bolesnika sa izolovanom distalnom, ali i proksimalnom trombozom dubokih vena u poređenju sa zdravim osobama.

7. Ne postoji razlika u zastupljenosti 4G/5G PAI-1 polimorfizma između bolesnika sa venskom trombozom i zdravih ispitanika.

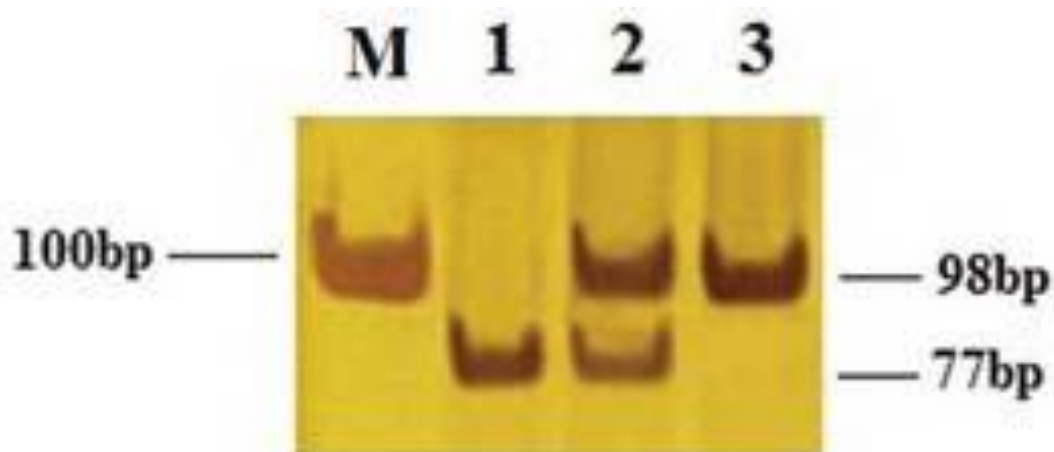
8. Suprimirana funkcionalnost fibrinoliznog mehanizma trostruko povećava rizik od nastanka tromboze dubokih vena.

9. Povišen nivo TAFI-a dvostruko povećava rizik od nastanka tromboze dubokih vena.

10. 4G/5G PAI-1 polimorfizam nema uticaja na rizik za nastanak venskog tromboembolizma.

**Dodatak 1**

Fotografija gela na kome je urađena elektroforeza fragmenata dobijenih umnoženih gena



Fotografija 1: PAI-1

M – Marker dužine (100bp)

1 – PAI-1 5G/5G genotip

2 – PAI-1 4G/5G genotip

3 – PAI-1 4G/4G genotip



## LITERATURA

1. Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ. Overview of hemostasis. In Colman RW, Clowes AW, Goldhaber SZ, Marder VJ, George JN. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. 5<sup>th</sup> edition, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia 2006.
2. Lind SE, Marks PW, Ewenstein BM. Hemostatic system. In Handin RI, Lux SE, Stossel TP. Blood principles and practice of hematology. 2<sup>nd</sup> edition, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia 2003.
3. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 1964; 202:498–499.
4. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145:1310-12.
5. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:41-8.
6. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7:459-64.
7. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 958-65.
8. Kjalke M, Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Ezban M, Roberts HR. Active site-inactivated factors VIIa, Xa, and IXa inhibit individual steps in a cell-based model of tissue factor-initiated coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 80:578-84.
9. Le D, Borgs P, Toneff T, Witte M, Rapaport S. Hemostatic factors in rabbit limb lymph: relationship to mechanisms regulating extravascular coagulation. *Am J Physiol* 1998; 274:H769-76.
10. Miller GJ, Howarth DJ, Attfield JC, Cooke CJ, Nanjee MN, Olszewski WL, et al. Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph. *Thromb Haemost* 2000; 83:427-32.
11. Jesty J, Beltrami E, Willems G. Mathematical analysis of a proteolytic positive-feedback loop: Dependence of lag time and enzyme yields on the initial conditions and kinetic parameters. *Biochemistry* 1993; 32:6266-74.
12. Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Philips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1823-8.
13. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J Biol Chem* 2001; 276:4692-8.
14. Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, Lopez JA, Walsh PN, et al. Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* 2003; 278:48112-9.
15. Oliver JA, Monroe DM, Church FC, Roberts HR, Hoffman M. Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. *Blood* 2002; 100:539-46.
16. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots; with an altered fiber structure: a possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood* 2003; 101:3008-13.
17. Dahlback B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004; 79:117-24.
18. Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circ Res* 2001; 89:117-24.
19. Alberio L, Dale GL. Flow cytometric analysis of platelet activation by different collagen types present in the vessel wall. *Br J Haematol* 1998; 102:1212-8.

20. Hunter J. A Treatise on the Blood Inflammation and Gunshot Wounds. Nicol London 1794; 87.
21. Morawitz P. Über einige postmortale Blutveränderungen. Beitr. Chem. Physiol. Path 1906; 8:1.
22. Dastre A. Fibrinolyse dans le sang. Archive de Physiologie Normale et Pathologique 1893; 5:661.
23. Nolf P. Contribution a l'étude de la coagulation de sang. V. La fibrinolyse. Arch. Int. Physiol 1908;6:306
24. MacFarlane RG, Biggs R. Observations on fibrinolysis; spontaneous activity associated with surgical operations, trauma, &c. Lancet 1946; 14; 2:862-4.
25. Opie EL, Barker BI. Leucoprotease and antileucoprotease of mammals and birds. J Exp Med 1907; 9:207.
26. Schmitz A. Über die Freilegung von aktiven Trypsin and Blutplasma. Yweite Mitteilung zur Kenntnis des Plasma-Trypsinsystems. Hoppe-Seyl Z Physiol Chem 1937; 250:37.
27. Tillett WS, Garner RL. The fibrinolytic activity of haemolytic streptococci. J Exp Med 1933; 58:485.
28. Milstone JH. A factor in normal human blood which participate in streptococcal fibrinolysis. J Immunol 1941; 42:109.
29. Christensen LR, MacLeod CM. A proteolytic enzyme of serum: characterisation, activation and reaction with inhibitors. J Gen Physiol 1945; 559.
30. Albrechtsen OK. Fibrinolytic activity in the organism. Acta Physiol Scand 1959; 47:165.
31. Nordenhem A. The Fibrinolytic Enzyme System: New Markers of Potential Interest in Cardiovascular Disease. PhD thesis. Karolinska Institute. Stocholm 2006.
32. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br J Haematol 2005; 129:307-21.
33. Lučić A. Mehanizam fibrinoliznog procesa u gojaznih osoba. Doktorska disertacija. Novi Sad 1976.
34. Baklaja R, Pešić MČ, Czarhecki J. Haemostasis and Haemorrhagic Disorders. Thymus Medizinischer Fachbuchverlag Bad Harzburg 2000.
35. Lóopez-Lira F, Rosales-León L, Monroy-Martinez V, Ruis Ordaz BH. The role of  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) in the activation of plasminogen. Bioch Bioph Acta 2006; 1764:815-23.
36. Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. Ann NY Acad Sci 2001; 902:226-36.
37. Rijker DC, Sakharov DV. Basic Principles in Thrombolysis: Regulatory Role of Plasminogen. Thromb Research 2001; 103(1):S41-9.
38. Vodnik T, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Parametri hemostaze kao pokazatelji hiperkoagulabilnosti u trudnoći. Jugoslov Med Biohem 2003; 22:119-26.
39. Bouma BN, Meijers JC. New insights into factors affecting clot stability: A role for thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI; plasma procarboxypeptidase B, plasma procarboxypeptidase U, procarboxypeptidase R). Semin Hematol 2004; 41:13-19.
40. Hrafnkelsdottir T, Gudnason T, Wall U, Jern C, Jern S. Regulation of local availability of active tissue-type plasminogen activator in vivo in man. J Thromb Haemost 2004; 2:1960-8.
41. Robbie LA, Dummer S, Booth NA, Adey GD, Bennett B. Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leukocytes in patients with severe sepsis. Br J Haematol 2000; 109:342-8.
42. Holmes WE, Nelles L, Lijnen HR, Collen D. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). J Biol Chem 1987; 262:1659-1664.
43. Agirbasli M. Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. Int J Clin Pract 2005; 59:102-6.
44. Stringer HA, Pannekoek H. The significance of fibrin binding by plasminogen inhibitor 1 for the mechanism of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis. J Biol Chem 1995; 270:11205-8.
45. Yanhong Zhu, Carmeliet P, Fay WP. Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance. Circulation 1999; 99:350-5.

46. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1995; 74:71-6.
47. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005; 3:35-45.
48. Gils A, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor-1. *Curr Med Chem* 2004; 11:2323-34.
49. Meltzer ME. The role of the fibrinolytic system in arterial and venous thrombosis. PhD thesis. Universiteit Utrecht 2010.
50. Knecht W, Willemse J, Stenhamre H, Andersson M, Berntsson P, Furebring C, et al. Limited mutagenesis increases the stability of human carboxypeptidase u (TAFIa) and demonstrates the importance of CPU stability over proCPU concentration in down-regulating fibrinolysis. *The FEBS Journal [Febs J]* 2006; 273:778-92.
51. Marx PF. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2335-48.
52. Bajzar L, Jain N, Wang P, Walker JB. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med* 2004; 32:320-4.
53. Guimarães AH, Rijken DC. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) affects fibrinolysis in a plasminogen activator concentration-dependent manner. Study of seven plasminogen activator in an internal clot lysis model. *Thromb Haemost* 2004; 91:473-9.
54. Francis CW, Marder VJ. Rapid formation of large molecular weight alpha-polymers in cross-linked fibrin induced by high factor XIII concentrations. Role of platelet factor XIII. *J Clin Invest* 1987; 80: 1459-65.
55. Berghaus GM. Hemostasis: Regulation and dysregulation. Proceedings of the ESTM residential course jointly organized with the European School of Hematology (ESH). Frankfurt (Germany) 1997; 1-40.
56. Lijnen HR, Van Hoef B, De Cock F, Collen D. The mechanism of plasminogen activation and fibrin dissolution by single-chain urokinase-type plasminogen activator in a plasma milieu in vitro. *Blood* 1989; 73:1846.
57. Fukao H, Ueshima S, Tanaka N, Okada K, Matsuo O. Suppression of plasminogen activator inhibitor 1 release by fibrin from human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res Suppl* 1990; 10:11.
58. Braaten JV, Handt S, Jerome WG, Kirkpatrick J, Lewis JC, Hantgan RR. Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor 1: light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model platelet-fibrin thrombus. *Blood* 1993; 81:1290.
59. Martini CH, Branolts A, de Brujine EL, vanHylckama Vlieg A, Leebeek FW, Lisman T, et al. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *BJH* 2006; 134:92-4.
60. Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem; Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. Staatsdruckerei, Frankfurt, 1856.
61. Heit JA. Predicting the Risk of Venous Thromboembolism Recurrence. *Am J Haematol* 2012; 87:S63-S67.
62. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in western France. *Thromb Haemost* 2000; 83:657-60.
63. Cushman M, Tsai AW, White RH, Heckbert SR, Rosamond WD, Enright P, et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med* 2004; 117:19-25.
64. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 5:692-9-
65. Rosendaal FR. Causes of Venous Thrombosis. In van Beek EJR, Büller HR, Oudkerk M. *Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Wiley-Blackwell 2009.
66. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.

67. Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, et al. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Arch Intern Med* 2002; 162:1245-8.
68. McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, et al. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997; 78:1183-8.
69. Pomp ER, Lenselink AM, Rosendaal FR, Doggen CJ. Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. *J Thromb Haemost* 2008; 6:632-7.
70. Hull RD, Raskob GE. Prophylaxis of venous thromboembolic disease following hip and knee surgery. *J Bone Joint Surg* 1986; 68:146-50.
71. van Stralen KJ, Rosendaal FR, Doggen CJ. Minor injuries as a risk factor for venous thrombosis. *Arch Intern Med* 2008; 168:21-6.
72. Bloom JW, Doggen CJ, Ossanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 293:715-20.
73. Tesselaar MET, Romijn PHTM, Van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Ossanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007; 5:520-7.
74. Weijl NI, Rutten MF, Zwinderman AH, Keizer HJ, Nooy MA, Rosendaal FR, et al. Thromboembolic events during chemotherapy for germ cell cancer: a cohort study and review of the literature. *J Clin Oncol* 2000; 18:2169-78.
75. de Groot PG, Lutters B, Derksen RH, Lisman T, Meijers JC, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1993-7.
76. Kuipers S, Cannegieter S, Middeldorp S, Robyn L, Büller HR, Rosendaal FR. The absolute risk of venous thrombosis after air travel: a cohort study of 8755 employees of interbational organizations. *PLoS Med* 2007; 4:e290.
77. Cannegieter SC, Doggen CJ, van Houwelingen HC, Rosendaal FR. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study). *PloS Med* 2006; 3:e307.
78. van Stralen KJ, le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJM. Regular sports activities decrease the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 517-20.
79. Pomp ER, le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJ. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol* 2007; 139:289-96.
80. Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svardsudd K, Wilhelmsen L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men: "The Study of Men Born in 1913". *Arch Intern Med* 1999; 159:1886-90.
81. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ. Alcohol consumption is associated with a decreased risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2008; 99:59-63.
82. Roach RE, Siegerink B, Le Cessie S, Rosendaal FR, Cannegieter SC, Lijfering WM. Coffee consumption is associated with a reduced risk of venous thrombosis that is mediated through hemostatic factor levels. *J Thromb Haemost* 2012; 10:2519-25.
83. Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Büller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995; 346:1593-6.
84. Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Higher risk of venous thrombosis during early use of oral contraceptives in women with inherited clotting defects. *Arch Intern Med* 2000; 160:49-52.
85. Martinelli I, Manucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998; 92:2353-8.

86. Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:700-3.
87. Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS. Oestrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* 2004; 292:1573-80.
88. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GD, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336:1227-31.
89. Vossen CY, Conard J, Fountcuberta J, Makris M, van der Meer FJ, Pabinger I, et al. Risk of first venous thrombotic event in carriers of familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* 2005; 3:459-64.
90. 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; 85:1504-8.
91. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133-4.
92. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-703.
93. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, van Pampus EC, Koopman MM, Hamulyak K, et al. Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 2004; 164:1932-7.
94. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, de Stefano V, Cumming T, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism - pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group of Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86:809-16.
95. Smith NL, Nindorff LA, Heckbert SR, Lamaitre RN, Marcianti KD, Rice K. Association of genetic variations with nonfatal venous thrombosis in postmenopausal women. *JAMA* 2007; 297:489-98.
96. Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Koster T, Blann AD, Vos HL, et al. High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. *Br J Haematol* 2001; 115:156-8.
97. van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J Thromb Haemost* 2003; 1:2677-8.
98. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95:2855-9.
99. Kamphuisen PW, Lensen R, Houwing-Duistermaat JJ, Eikenboom JC, Harvey M, Bertina RM, et al. Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. *Br J Haematol* 2000; 109:519-22.
100. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential as a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005; 105:1102-5.
101. Meltzer ME, Lisman T, Doggen CJ, de Groot PG, Rosendaal FR. Synergistic effects of hypofibrinolysis and genetic and acquired risk factors on the risk of a first venous thrombosis. *PLoS Med* 2008; 5:e97.
102. Söhne M, Vink R, Büller H. Clinical Presentation of Deep Vein Thrombosis. In van Beek EJR, Büller HR, Oudkerk M. *Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Wiley-Blackwell 2009.
103. Hirsh J, Hull RD. Natural history and clinical features of venous thrombosis. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Hemostasis and Thrombosis*. Lippincott, Philadelphia 1987.
104. Kahn SR, Ginsberg JS. Relationship between deep vein thrombosis and the post thrombotic syndrome. *Arch Intern Med* 2004; 164:17-26.

105. Stein PD, Beemath A, Matta F, et al. Clinical characteristics of patients with acute pulmonary embolism: data from PIOPED II. *Am J Med* 2007; 120:871-9.
106. Le Gal G, Rodger MA. Clinical prediction rules for diagnosis of venous thromboembolism. In van Beek EJR, Büller HR, Oudkerk M. *Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Wiley-Blackwell 2009.
107. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Forgie MA, Kearon C, Dreyer JF, et al. Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 2003; 349:1227-35.
108. Bombeli T, Raddatz MP, Fehr J. Evaluation of an optimal dose of low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis in pregnant women at risk of thrombosis using coagulation activation markers. *Haemostasis* 2001; 31:90-8.
109. Bosson JL, Labarere J, Sevestre MA, Belmin J, Beyssier L, Elias A, et al. Deep vein thrombosis in elderly patients hospitalized in subacute care facilities. A multicenter cross-sectional study of risk factors, prophylaxis and prevalence. *Arch Intern Med* 2003; 163:2613-8.
110. Cogo A, Lensing AWA, Koopman MMW, Piovella F, Siragusa S, Wells PS, et al. Compression ultrasonography for diagnostic management of patients with clinically suspected deep vein thrombosis; prospective cohort study. *Br Med J* 1998; 316:17-20.
111. Kearon C, Julian JA, Newman TE, Ginsberg JS. Noninvasive diagnosis of deep vein thrombosis. *Ann Intern Med* 1998; 128:663-77.
112. Perone N, Bouna,eaux H, Perrier A. Comparison of four strategies for diagnosing deep vein thrombosis: a cost effectiveness analysis. *Am J Med* 2000; 110:33-40.
113. Elias A, Mallard L, Elias M, Alquier C, Guidolin F, Gauthier B, et al. A single complete ultrasound investigation of the venous network for the diagnostic management of patients with a clinically suspected first episode of deep vein thrombosis of the lower limbs. *Thromb Haemost* 2003; 89:221-7.
114. Schellong SM, Schwarz T, Halbritter K, Beyer J, Siegert G, Oettler W, et al. Complete compression ultrasonography of the leg veins as a single test for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2003; 89:228-34.
115. Stevens SM, Elliot CG, Chan KJ, Egger MJ, Ahmed KM. Withholding anticoagulation after a negative result on duplex ultrasonography for suspected symptomatic deep vein thrombosis. *Ann Intern Med* 2004; 140:985-91.
116. Thomas SM, Goodacre SW, Sampson FC, vanBeek EJ. Diagnostic value of CT for deep vein thrombosis: results of a systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol* 2008; 63:299-304.
117. Sampson FC, Goodacre SW, Thomas SM, vanBeek EJ. The accuracy of MRI in diagnosis of suspected deep vein thrombosis: systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol* 2007; 17:175-81.
118. Sirol M, Fuster V, Badimon JJ, Fallon JT, Moreno PR, Toussaint JF, et al. Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contact agent. *Circulation* 2005; 112:1594-600.
119. de Bastos MM, Bastos MR, Pessoa PC, Bogutchi T, Carneiro-Proietti AB, Rezende SM. Managing suspected venous thromboembolism in a mixed primary and secondary care setting using standard clinical assessment and D-dimer in a noninvasive diagnostic strategy. *Blood Coagul Fibrinol* 2008; 19:48-54.
120. Goodacre S, Sampson F, Stevenson M, Wailoo A, Sutton A, Thomas S, et al. Measurement of the clinical and cost-effectiveness of non-invasive diagnostic testing strategies for deep vein thrombosis. *Health Technol Assess* 2006; 10:151.
121. Wicki J, Perneger TV, Junod AF, Bounameaux H, Perrier A. Assessing clinical probability of pulmonary embolism in the emergency ward: a simple score. *Arch Intern Med* 2001; 161:92-7
122. Le Gal G, Righini M, Roy PM, et al. Prediction of pulmonary embolism in the emergency department: the Revised Geneva score. *Ann Intern Med* 2006; 144:165-71.

123. Wells PS, Anderson DR, Rodger M, et al. Derivation of a simple clinical model to categorize patients probability of pulmonary embolism: increasing the models utility with the SimpliRED D-dimer. *Thromb Haemost* 2000; 83:416-20.
124. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. *Clinical Epidemiology: a Basic Science for Clinical Medicine*, 2nd edn. Little, Brown, Boston, 1991.
125. Stein PD, Hull RD, Patel KC, Olson RE, Ghali WA, Brant R, et al. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Ann Intern Med* 2004; 140:589-602.
126. Perrier A, Roy PM, Sanchez O, LeGal G, Meyer G, Gourdier AL, et al. Multidetector-row computed tomography in suspected pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2005; 352:1760-8.
127. Van Strijen MJ, de Monye W, Schiereck J, Kieft GJ, Prins MH, Huisman MV, et al. Single-detector helical computed tomography as the primary diagnostic test in suspected pulmonary embolism: a multicenter clinical management study of 510 patients. *Ann Intern Med* 2003; 138:307-14.
128. Leclercq MG, Lutusan JG, van Marwijk Kooy M, Kuipers BF, Oostdijk AHJ, van der Leur JJCM et al. Ruling out clinically suspected pulmonary embolism by assessment of clinical probability and D-dimer levels: a management study. *Thromb Haemost* 2003; 89(1):97-103.
129. Wells PS, Lensing AW, Hirsh J. Graduated compression stockings in the prevention of postoperative venous thromboembolism. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 1994; 154:67-72.
130. Amaragiri SV, Lees TA. Elastic compression stockings for prevention of deep vein thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD001484.
131. Roderick P, Ferris G, Wilson K, Halls H, Jackson D. Towards evidence-based guidelines for the prevention of venous thromboembolism: systematic reviews of mechanical methods, oral anticoagulation, dextran and regional anaesthesia as thromboprophylaxis. *Health Technol Assess* 2005; 9:iii-iv.
132. Guyton DP, Khayat A, Husni EA, Schreiber H. Elevated levels of 6-keto-prostaglandin-F1a from a lower extremity during external pneumatic compression. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 166:338-42.
133. Comerota AJ, Chouhan V, Harada RN, Sun L, Hosking J, Veermansunemi R, et al. The fibrinolytic effects of intermittent pneumatic compression: mechanism of enhanced fibrinolysis. *Ann Surg* 1997; 226:306-13.
134. Turpie AG, Bauer KA, Caprini JA, Comp PC, Gent M, Muntz JE. Fondaparinux combined with intermittent pneumatic compression vs intermittent pneumatic compression alone for prevention of venous thromboembolism after abdominal surgery: a randomized, double-blind comparison. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1854-61.
135. Patrono C, Collier B, Dalen JE, Fitzgerald GA, Fuster V, Gent M, et al. Platelet-active drugs: the relationship among dose, effectiveness and side-effects. *Chest* 2001; 119:39S-63S.
136. Pulmonary Embolism Prevention (PEP) Trial Collaborative Group. Prevention of pulmonary embolism and deep vein thrombosis with low dose aspirin: Pulmonary Embolism Prevention (PEP) Trial. *Lancet* 2000; 355:1295-302.
137. Geerts WH, Heit JA, Clagett GP, Pineo GF, Colwell CW, Anderson FA Jr, et al. Prevention of venous thromboembolism. *Chest* 2001; 119:132S-175S.
138. Geerts WH, Pineo GF, Heit JA, Bergqvist D, Lassen MR, Colwell CW, et al. Prevention of venous thromboembolism: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126:338S-400S.
139. Ageno W. Applying risk assessment models in general surgery: overview of our clinical experience. *Blood Coagul Fibrinol* 1999; 10:S71-S78.
140. Mismetti P, Laporte S, Darmon JY, Buchmüller A, Decousus H. Meta-analysis of low molecular weight heparin in the prevention of venous thromboembolism in general surgery. *Br J Surg* 2001; 88:913-30.

141. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, et al. Heparin- induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995; 332:1330-5.
142. Agnelli G, Bergqvist D, Cohen AT, Gallus AS, Gent M, PEGASUS investigators. Randomized clinical trial of postoperative fondaparinux versus perioperative deltaparin for prevention of venous thromboembolism in high-risk abdominal surgery. *Br J Surg* 2005; 92:1212-20.
143. Eikenboom JW, Quinlan DJ, Douketis JD. Extended-duration prophylaxis against venous thromboembolism after total hip replacement: a meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2001; 358:9-15.
144. Lijfering WM, van der Meer J. Pharmacological Prevention of Venous Thromboembolism. In van Beek EJR, Büller HR, Oudkerk M. *Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Wiley-Blackwell 2009.
145. Caprini JA, Arcelus JI, Motykie G, Kudrna JC, Mokhtee D, Reyna JJ. The influence of oral anticoagulation therapy on deep vein thrombosis rates four weeks after total hip replacement. *J Vasc Surg* 1999; 30:813-20.
146. Agnelli G. Prevention of venous thromboembolism in orthopedic surgery. In Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (eds), *Hemostasis and Thrombosis*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2006:1369-81.
147. Brookenthal KR, Freedman KB, Lotke PA, Fitzgerald RH, Lonner JH. A meta-analysis of thromboembolic prophylaxis in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2001; 16:293-300.
148. Demers C, Marcoux S, Ginsberg JS, Laroche F, Cloutier R, Poulin J. Incidence of venographically proved deep vein thrombosis after knee arthroscopy. *Arch Intern Med* 1998; 158:47-50.
149. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thromb Haemost* 2003; 90:446-55.
150. Filtenborg Tvedskov T, Rasmussen MS, Wille-Jørgensen P. Survey of the use of thromboprophylaxis in laparoscopic surgery in Denmark. *Br J Surg* 2001; 88:1413-6.
151. Neudecker J, Sauerland S, Neugebauer E, Bergamaschi R, Bonjer HJ, Cuschieri A, et al. The European Association for Endoscopic Surgery clinical practice guideline on the pneumoperitoneum for laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 2002; 16:1121-43.
152. Rodgers FB, Cipolle MD, Velmahos G, Rozycki G, Luchette FA. Practice management guidelines for the prevention of venous thromboembolism in trauma patients: the EAST practice management guidelines work group. *J Trauma* 2002; 53:142-64.
153. Eriksson BI, Lassen MR, PENTasaccharide in Hip-FRACTure Surgery Plus Investigators. Duration of prophylaxis against venous thromboembolism with fondaparinux after hip fracture surgery: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med* 2003; 163:1337-42.
154. Spinal Cord Injury Thromboprophylaxis Investigators. Prevention of venous thromboembolism in the acute treatment phase after spinal cord injury: a randomized, multicenter trial comparing low-dose heparin plus intermittent pneumatic compression with enoxaparin. *J Trauma* 2003; 54:1116-24.
155. DeVivo MJ, Krause JS, Lammertse DP. Recent trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1999; 80:1411-9.
156. Hadley MN. Deep vein thrombosis and thromboembolism in patients with cervical spinal cord injuries. *Neurosurgery* 2002; 50:S73-S80.
157. Heit JA, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ III. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med* 2005; 143:697-706.
158. Mitić G. Nasledna trombofilija i trombozne komplikacije u trudnoći. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu 2007.



159. Cannegieter SC, Doggen CJ, van Houwelingen HC, Rosendaal FR. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study). *PLoS Med* 2006; 3:1258-65.
160. Kuipers S, Schreijer AJ, Cannegieter SC, Büller HR, Rosendaal FR, Middeldorp S. Travel and venous thrombosis: a systematic review. *J Intern Med* 2007; 262:615-34.
161. Chee YL, Watson HG. Air travel and thrombosis. *Br J Haematol* 2005; 130:671-80.
162. Samama MM, Cohen AT, Darmon JY, Desjardins L, Eldor A, Janbon C. A comparison of enoxaparin with placebo for the prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients: Prophylaxis in Medical patients with Enoxaparin Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341:793-800.
163. Leizorovicz A, Cohen AT, Turpie AG, Olsson CG, Vaitkus PT, Goldhaber SZ; PREVENT Medical Thromboprophylaxis Study Group. Randomized, placebo-controlled trial of deltaparin for prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients. *Circulation* 2004; 110:874-9.
164. Cohen AT, Davidson BL, Gallus AS, Lassen MR, Prins MH, Tomkowski W, et al; ARTEMIS Investigators. Efficacy and safety of fondaparinux for the prevention of venous thromboembolism in older acute medical patients: randomised placebo controlled trial. *BMJ* 2006; 332:325-9.
165. Collins R, MacMahon S, Flather M, Baigent C, Remvig L, Mortensen S, et al. Clinical effects of anticoagulant therapy in suspected acute myocardial infarction: systematic overview of randomised trials. *BMJ* 1996; 313:652-9.
166. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 293:715-22.
167. Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 2005; 6:401-10.
168. Lyman GH, Khorana AA, Falanga A, Clarke-Pearson D, Flowers C, Jahanzeb M, et al, American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline: recommendations for venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5490-505.
169. Rasmussen MS. Preventing thromboembolic complications in cancer patients after surgery: a role for prolonged thromboprophylaxis. *Cancer Treat Rev* 2002; 28:141-4.
170. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 2005; 293: 2352-61.
171. Lijfering WM, Coppens M, Veeger NJ, Middeldorp S, Hamulyák K, Prins MH, et al. Thrombophilic risk factors for first venous thrombosis, recurrence and its implications. *J Thromb Haemost* 2007; 5:O-T-007.
172. Raskob G. Initial and Long-Term Treatment of Deep Vein Thrombosis. In van Beek EJR, Büller HR, Oudkerk M. *Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Wiley-Blackwell 2009.
173. van Dongen CJJ, van der Belt AGG, Prins MH, et al. Fixed dose subcutaneous low-molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 4:CD001100.
174. Brandjes D, Büller H, Heijboer H, et al. Randomized trial of the effect of compression stockings in patients with symptomatic proximal-vein thrombosis. *Lancet* 1997; 349:759-62.
175. Büller H, Davidson B, Decousus H, et al. Fondaparinux or enoxaparin for the initial treatment of symptomatic deep vein thrombosis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2004; 140:867-73.
176. Matisse Investigators. Subcutaneous fondaparinux versus intravenous unfractionated heparin in the initial treatment of pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2003; 349:1695-702.
177. Decousus H, Leizorovicz A, Parent F, Page Y, Tardy B, Girard F, et al. A clinical trial of vena cava filters in the prevention of pulmonary embolism in patients with proximal deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:409-16.

178. Lee A, Levine M, Baker R, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:146-53.
179. Hull R, Pineo G, Brant R, et al. Long-term low-molecular weight heparin versus usual care in proximal vein thrombosis patients with cancer. *Am J Med* 2006; 119:1062-72.
180. Hull R, Hirsh J, Jay R, Carter C, Gent M, Turpie AGG, et al. Different intensities of oral anticoagulant therapy in the treatment of proximal vein thrombosis. *N Engl J* 1982; 307:1676-81.
181. 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-vein thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 345:165-9.
182. Hull RD, Pineo GF, Brant RF, Mah AF, Burke N, Dear R, et al. Self-managed long-term low-molecular weight heparin therapy: the balance of benefits and harms. *Am J Med* 2007; 120:72-82.
183. Weitz J, Hirsh J, Samama M. New antithrombotic drugs: American College of Chest Physicians Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest* 2008; 133:234S:256S.
184. Quinlan D, McQuillan A, Eikenboom J. Low-molecular-weight heparin compared with intravenous unfractionated heparin for treatment of pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 2004; 140:175-83.
185. Linkins L, Choi P, Douketis J. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139:893-900.
186. Büller HR, Davidson BL, Decousus H, Gallus A, Gent M, Piovella F, et al. Subcutaneous fondaparinux versus intravenous unfractionated heparin in the initial treatment of pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2003; 349:1695-702.
187. Simonneau G, Sors H, Charbonnier B, Page Y, Laaban JP, Azarian R, et al. A comparison of low molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. The THESEE Study Group. *Tinzaparine ou Heparine Standard: Evaluations dans l'Embolie Pulmonaire*. *N Engl J Med* 1997; 337:663-9.
188. Eichinger S, Weltermann A, Minar E, Stain M, Schonauer V, Schneider B, et al. Symptomatic pulmonary embolism and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2004; 164:92-6.
189. Douketis JD, Gu CS, Schulman S, Ghirarduzzi A, Pengo V, Prandoni P. The risk for fatal pulmonary embolism after discontinuing anticoagulant therapy for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 2007; 147:766-74.
190. Büller HR, Cohen AT, Davidson B, Decousus H, Gallus AS, Gent M, et al. Extended prophylaxis of venous thromboembolism with idraparinux. *N Engl J Med* 2007; 357:1105-12.
191. Büller HR, Agnelli G, Hull RD, Hyers TM, Prins MH, Raskob GE. Antithrombotic therapy for venous thromboembolism disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126:401S-428S.
192. Lisman T, Leebeek FWG, Mosnier LO, Bouma BN, Meijers JCM, Janssen HL, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* 2001; 121:131-9.
193. Leebeek FWG, Kock EL, Guimaraes AH, Murad SD, Janssen HL, Rijker DC. Evidence for an Enhanced Fibrinolytic Capacity in Liver Cirrhosis Measured with a New Global Fibrinolysis Test in Whole Blood. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108:1627.
194. Brandt JT. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:1376-81.
195. Tefs K, Gueorguieva M, Klammt J, Allen CM, Aktas D, Anlar FY, et al. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients. *Blood* 2006; 108:3021-6.
196. Okamoto A, Sakata T, Mannami T, Baba S, Katayama Y, Matsuo H, et al. Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic

- diseases of plasminogen deficiency in the Japanese: the Suita Study. *J Thromb Haemost* 2003; 1:2397-403.
197. Aoki NB, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M, et al. Abnormal plasminogen: a hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1978; 61:1186.
  198. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Shen C, Newcomer LM. Baseline fibrinolytic state and the risk of future venous thrombosis. A prospective study of endogenous tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor. *Circulation* 1992; 85:1822-7.
  199. Crowther MA, Roberts J, Roberts R, Johnston M, Stevens P, Skingley P. Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. *Thromb Haemost* 2001; 85:390-4.
  200. Oguzulgen IK, Ekim N, Erkekol FO, Altinok B, Akar N. Is tissue-plasminogen activator genepolymorphism a risk factor for venous thromboembolism in every population? *J Thromb Thrombolysis* 2005; 19:61-3.
  201. Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, et al. The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000; 99:223-30.
  202. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80:956-60.
  203. Swiatkiewicz A, Jurkowski P, Kotschy M, Ciecierski M, Jawien A. Level of antitrombin III, protein C, protein S and other selected parameters of coagulation and fibrinolysis in the blood of the patients with recurrent deep venous thrombosis. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR263-CR268.
  204. Nordenhem A. The Fibrinolytic Enzyme System: New Markers of Potential Interest in Cardiovascular Disease. PhD Thesis. Karolinska Institute. Stockholm 2006.
  205. Asselbergs FW, Williams SM, Hebert PR, Coffey CS, Hillege HL, Navis G. The gender-specific role of polymorphisms from the fibrinolytic, renin-angiotensin, and bradykinin systems in determining plasma t-PA and PAI-1 levels. *Thromb Haemost* 2006; 96:471-7.
  206. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367:651-8.
  207. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism: A meta-analysis involving ~120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009; 102:360-70.
  208. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G Genotype of PAI-1 Gene Is Associated With Reduced Risk of Stroke in Elderly. *Stroke* 2003; 34:2822-8.
  209. Roest M, Banga JD. Genetic Make-Up for Increased PAI-1 Expression Protects Against Stroke. *Stroke* 2003; 34:2828-9.
  210. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95:2855-9.
  211. Verdu J, Marco P, Benlloch S, Sanchez J, Lucas J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD). *Thromb Haemost* 2006; 95:585-6.
  212. Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004; 103:3773-6.
  213. Martini CH, Brandts A, de Bruijne EL, van Hylckama VA, Leebeek FW, Lisman T, et al. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *BJH* 2006; 134:92-4.
  214. Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem* 2003; 278:51059-67.

215. Prins MH, Hirsh J. A critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 1991; 151:1721-31.
216. Jones AJ, Meunier AM. A precise and rapid microtitre plate clot lysis assay: methodology, kinetic modeling and measurement of catalytic constants for plasminogen activation during fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1990; 64:455-63
217. Smith AA, Jacobson LJ, Miller BI, Hathaway WE, Manco-Johnson MJ. A new euglobulin clot lysis assay for global fibrinolysis. *Thromb Res* 2003; 112:329-37.
218. He S, Antović A, Blombäck M. A Simple and Rapid Laboratory Method for determination of Haemostasis Potential in Plasma II. Modifications for Use in Routine Laboratories and Research Work. *Thromb Res* 2001; 103:355-61.
219. Meltzer ME, Lisman T, Doggen CJM, de Groot PhG, Rosendaal FR. Synergistic Effects of Hypofibrinolysis and Genetic and Acquired Risk Factors on the Risk of a First Venous Thrombosis. *PLoS Medicine* 2008; 5:e97.
220. Meltzer ME, Doggen CJM, de Groot PG, Rosendaal F, Lisman T. The impact of the fibrinolytic system on the risk of venous and arterial thrombosis. *Seminars in Thromb and Haemost* 2009; 35:468-77.
221. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins. *N Engl J Med* 1967; 276:148-57.
222. Mielke CH, Kaneshiro MM, Maher IA, Winer JM, Rapaport SI. The Standardized Normal Ivy Bleeding Time and Its Prolongation by Aspirin. *Blood* 1969; 34:204-15.
223. Macfarlane RG, Pilling J. Observations on fibrinolysis. Plasminogen, plasmin, and antiplasmin content of human blood. *Lancet* 1946; 2:562.
224. Mackie J, Lawrie AS, Kitchen S, Gaffney PJ, Howarth D, Lowe GD. A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Claus and PT-derived fibrinogen. *Thromb Haemost* 2002; 87:997-1005.
225. Radojković D, Kušić J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem* 2000; 46:883-4.
226. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19:251-3.
227. Vague P, Juhan-Vague I, Aillaud MF, Badier C, Viard R, Alessi MC, et al. Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level, and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism* 1986; 35:250-3.
228. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003; 89:493-8.
229. Simpson AJ, Gray RS, Moore NR, Booth NA. The effects of chronic smoking on the fibrinolytic potential of plasma and platelets. *BJH* 1997; 97:208-13.
230. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJM. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *AJH* 2008; 83:97-102.
231. Mussoni L, Mannucci L, Sirtori M, Camera M, Maderna P, Sironi L. Hypertriglyceridemia and regulation of fibrinolytic activity. *Atheroscl Thromb and Vasc Biol* 1992; 12:19-27.
232. Vaýo A, Mira Y, Ferrando F, Conteras M, Estelles A, España F. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors *BJH* 2002; 118:255-9.
233. Anglés-Cano E, Diaz A, Loyau S. Inhibition of Fibrinolysis by Lipoprotein(a). *Ann NY Ac Sci* 2001; 936:261-75.
234. Marcucci R, Liotta AA, Cellai AP, Rogolino A, Gori AM, Giusti B. Increased plasma levels of lipoprotein(a) and the risk of idiopathic and recurrent venous thromboembolism. *Am J Med* 2003; 115:601-5.
235. Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE. Attenuated Fibrinolysis and Accelerated Atherogenesis in Type II Diabetic Patients. *Diabetes* 1993; 42:1-7.

236. Petrauskiene V, Falk M, Waernbaum I, Norberg M, Eriksson JW. The risk of venous thromboembolism is markedly elevated in patients with diabetes. *Diabetologia* 2005; 48:1017-21.
237. Boudjeltia KZ, Piagnerelli M, Brohée D, Guillaume M, Cauchie P, Vincent JL, et al. Relationship between CRP and hypofibrinolysis: Is this a possible mechanism to explain the association between CRP and outcome in critically ill patients? *Thrombosis Journal* 2004; 2:7.
238. Luxembourg B, Schmitt J, Humpich M, Glowatzki M, Dressler D, Seifried E, et al. Cardiovascular risk factors in idiopathic compared to risk-associated venous thromboembolism: A focus on fibrinogen, factor VIII, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). *Thromb Haemost* 2009; 102:668-75.
239. Poli KA, Tofler GH, Larson MG, Evans JC, Sutherland PA, Lipinska I, et al. Association of Blood Pressure with Fibrinolytic Potential in the Framingham Offspring Population. *Circulation* 2000; 101:264-9.
240. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AWA. An association between Atherosclerosis and Venous Thrombosis. *N Engl J Med* 2003; 348:1435-41.
241. Krysiak R, Okopień B, Herman ZS. Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Coagulation and Fibrinolysis Processes. *Drugs* 2003; 63:1821-54.
242. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, et al. A Randomized Trial of Rosuvastatin in the prevention of Venous Thromboembolism. *N Engl J Med* 2009; 360:1851-61.
243. Mejjers JCM, Middeldorp S, Tekelenburg W, van den Ende AE, Tans G, Prins MH, et al. Increased Fibrinolytic Activity during Use of Oral Contraceptives Is Counteracted by an Enhanced Factor XI - independent down Regulation of Fibrinolysis A Randomized Cross-over Study of Two Low-dose Oral Contraceptives. *Thromb Haemost* 2000; 84:9-14.
244. Manzoli L, De Vito C, Marzuillo C, Boccia A, Villari P. Oral Contraceptives and Venous Thromboembolism. *Drug Safety* 2012; 35:191-205.
245. Lee KW, Lip GYH. Effects of Lifestyle on Hemostasis, Fibrinolysis, and Platelet Reactivity. *Arch Intern Med* 2003; 163:2368-92.
246. Van Stralen KJ, Le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJM. Regular sports activities decrease the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5:2186-92.
247. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterisation of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270:14477-84.
248. Vandenbroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KW, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, et al. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344:1527-35.
249. Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology*, 2nd ed. Measures of disease frequency. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
250. Ray JG, Mamdani M, Tsuyuki RT, Anderson DR, Yeo EL, Laupacis A. Use of statins and the subsequent development of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2001; 161:1405-10.
251. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular Risk Factors and Venous Thromboembolism A Meta-Analysis. *Circulation* 2008; 117:93-102.
252. Schulman S, Rhedin AS, Lindmarker P, Carlsson A, Larfars G, Nicol P, et al. A comparison of six weeks with six months of oral anticoagulant therapy after a first episode of venous thromboembolism. *N Engl J Med* 1995; 332:1661-5.
253. Mattos MA, Melendres G, Sumner DS, Hood DB, Barkmeier LD, Hodgson KJ, et al. Prevalence and distribution of calf vein thrombosis in patients with symptomatic deep vein thrombosis: a color-flow duplex study. *J Vasc Surg* 1996; 24:738-44.
254. Kazmers A, Groehn H, Meeker C. Acute calf vein thrombosis: outcomes and implications. *Am Surg* 1999; 65:1124-7.
255. Bernardi E, Camporese G, Buller HR, Siragusa S, Imberti D, Berchio A, et al. Serial 2-point ultrasonography plus D-dimer vs whole-leg color-coded Doppler ultrasonography for

- diagnosing suspected symptomatic deep vein thrombosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300:1653-9.
256. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in western France. *Thromb Haemost* 2000; 83:657-60.
257. Ouriel K, Green RM, Greenberg RK, Clair DG. The anatomy of deep vein thrombosis of the lower extremity. *J Vasc Surg* 2000; 31:895-900.
258. White RH, Murin S, Wun T, Danielsen B. Recurrent venous thromboembolism after surgery: provoked versus unprovoked thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2010; 8:987-97.
259. Rodger MA, Kahn SR, Wells PS, Anderson DA, Chagnon I, Le Gal G, et al. Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy. *CMAJ* 2008; 179:417-26.
260. Rogers MAM, Levine DA, Blumberg N, Flanders SA, Chopra V, Langa KM. Triggers of hospitalization for venous thromboembolism. *Circulation* 2012; 125:2092-9.
261. Maclure M, Mittleman MA. Should we use a case-crossover design? *Annu Rev Public Health* 2000; 21:193-221.
262. Deguchi H, Pecheniuk NM, Elias DJ, Averell PM, Griffin JH. High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation* 2005; 112:893-9.
263. Poulter NR, Meirik O, Chang CL, Farley TMM, Marmot MG. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 1995; 346:1575-82.
264. McColl MD, Sattar N, Ellison J, Tait RC, Walker ID, Packard CJ, et al. Lipoprotein(a), cholesterol and triglycerides in women with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11:225-9.
265. Nightingale AL, Lawrenson RA, Simpson EL, Williams TJ, MacRae KD, Farmer RD. The effects of age, body mass index, smoking and general health on the risk of venous thromboembolism in users of combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2000; 5:265-74.
266. Lidegaard B, Edstrom B, Kreiner S. Oral contraceptives and venous thromboembolism: a five-year national case-control study. *Contraception* 2002; 65:187-96.
267. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Palak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Arch Intern Med* 2002; 162:1182-9.
268. Frederiksen J, Juul K, Grande P, Jensen GB, Schroeder TV, Tybjaerg-Hansen A, et al. Methylentetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular-disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood* 2004; 104:3046-51.
269. Galanaud JP, Quenet S, Rivron-Guillot K, Quere I, Sanchez Munoz-Torrero JF, Tolosa C, et al. Comparison of the clinical history of symptomatic isolated distal deep vein thrombosis vs. proximal deep vein thrombosis in 11 086 patients. *J Thromb Haemost* 2009; 7:2028-34.
270. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Antonijevic N, Djordjevic V, Mikovic D, et al. Type and location of venous thromboembolism in carriers of Factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation versus patients with no mutation. *Clin Appl Thromb Haemost* 2010; 16:66-70.
271. Chen JP, Rowe DW, Enderson BL. Contrasting Post-Traumatic Serial Changes for D-Dimer and PAI-1 in Critically Injured Patients. *Thromb Res* 1999; 175-85.
272. Meltzer ME, Lisman T, deGroot PG, Meijers JCM, leCessie S, Doggen CJM, et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-a. *Blood* 2010; 116:113-21.
273. Folsom AR, Aleksic N, Park E, Salomaa V, Juneja H, Wu KK. Prospective study of fibrinolytic factors and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:611-617.

274. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Hawerkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation* 1996; 94:2057-2063.
275. Jenkins GR, Seiffert D, Parmer RJ, Miles LA. Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood* 1997; 89:2394-2403.
276. Meltzer ME, Doggen CJM, deGroot PG, Rosendaal FR, Lisman T. Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 2010; 116:529-36.
277. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86:324-333.
278. Lee CD, Mann KG. Activation/inactivation of human factor V by plasmin. *Blood* 1989; 73:185-190.
279. Stalboerger PG, Panetta CJ, Simari RD, Caplice NM. Plasmin proteolysis of endothelial cell and vessel wall associated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86:923-928.
280. Okajima K, Abe H, Binder BR. Endothelial cell injury induced by plasmin in vitro. *J Lab Clin Med* 1995; 126:377-84.
281. Okajima K, Abe H, Binder BR. Endothelial cell injury induced by plasmin in vitro. *J Lab Clin Med* 1995; 126:377-84.
282. Bombeli T, Jutzi M, De CE, Seifert B, Fehr J. In patients with deep-vein thrombosis elevated levels of factor VIII correlate only with von Willebrand factor but not other endothelial cell-derived coagulation and fibrinolysis proteins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13:577-581.
283. Verdu J, Marco P, Benlloch S, Sanchez J, Lucas J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD). *Thromb Haemost* 2006; 95:585-586.
284. de Brujine EL. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Venous and Arterial Thrombosis. PhD Thesis. Erasmus Universiteit Rotterdam 2011.
285. Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, et al. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood* 2001; 97:2053-2058.
286. Franco RF, Fagundes MG, Meijers JC, Reitsma PH, Lourenco D, Morelli V, et al. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the tafi gene: relationship with plasma tafi levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica* 2001; 86:510-517.
287. Đorđević V, Gvozdenov M, Pruner I, Tomić B, Kovač M, Antonijević N i sar. Učestalost PAI-1 4G/5G genske varijante u Srpskoj populaciji. *Med Glas* 2013; 49:28-41.
288. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, et al. 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; 20:229-35.
289. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Trajkov D, Petlichkovski A, Dzhekova-Stojkova S, et al. Investigation of SERPINE1 genetic polymorphism in Macedonian patients with occlusive artery disease and deep vein thrombosis. *Kardiol Pol* 2009; 67:1088-94.
290. Nossikoff A, Vikentieva E, Savov A. 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI-1 gene in patients with myocardial infarction in Bulgaria - a pilot case-control study. *Balk J Med Gen* 2006; 9(3&4).
291. Tàssies D, Espinosa G, Muñoz-Rodríguez FJ, Freire C, Cerrera R, Monteagudo J, et al. The 4G/5G polymorphism of the type 1 plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2349-58.
292. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, et al. The PAI-1 Gene Locus 4G/5G Polymorphism Is Associated With a Family History of Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:152-6.

293. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke* 2003; 34:2822-8.
294. Schwarz T, Siegert G, Oettler W, Halbritter K, Beyer J, Frommhold R, et al. Venous thrombosis after long-haul flights. *Arch Intern Med* 2000; 163:2759-64.
295. Liang A, Wu F, Tran K, Jones SW, Deng G, Ye B, et al. Characterization of a small molecule PAI-1 inhibitor, ZK4044. *Thromb Res* 2005; 115:341-50.
296. Van De Craen B, Scroyen I, Abdelnabi R, Brouwers E, Lijnen HR, Declerck PJ, et al. Characterization of a panel of monoclonal antibodies toward mouse PAI-1 that exert a significant profibrinolytic effect in vivo. *Thromb Res* 2011; 128:68-76.
297. Miyzaki H, Ogiku T, Sai H, Ohmizu H, Murakami J, Ohtani A. Design, synthesis, and evaluation of orally active inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18:6419-22.
298. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1996; 84:431-443.
299. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997; 95:59-62.
300. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnič B, Stare J, et al. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998; 79:975-979.
301. Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, et al. The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000; 99:223-230.
302. Akar N, Yilmaz E, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Cin S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res* 2000; 97:227-230.
303. Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C, et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol* 2000; 111:122-128.
304. Zöllner B, García de Frutos P, Dahlbäck B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1998; 79:802-807.