

Barbara Hudournik¹, Aljoša Oštir²

Odkrivanje trombofilije v družinah bolnikov z veno trombozo

Investigating Trombophilia in Families of Patients with Venous Thrombosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tromboflebitis, trombofilija – diagnostika – genetika, krvni koagulacijski testi.

Med prirojeno trombofilijo, stanje, ki povečuje nagnjenost k veno trombozi, uvrščamo pomanjkanje antitrombina III, beljakovin C in S ter neodzivnosti na aktivirano beljakovino C. Številna vprašanja o vplivu prirojene trombofilije na družinsko pojavljanje venske tromboze še niso odgovorjena. Znano je, da prisotnost prirojene trombofilije sama po sebi ne vodi nujno do venske tromboze, pogosto so za njen nastanek potrebni dodatni sprožilni dejavniki. V raziskavi smo ugotavljali prisotnost prirojene trombofilije in venske tromboze v družinah bolnikov, ki so že utrpeli veno trombozo in imajo prirojeno trombofilijo. Iskali smo morebitne razlike v bioloških lastnostih in vrednostih hemostatskih in hematoloških testov med osebami s prirojeno trombofilijo, ki so doživele veno trombozo in asimptomatskimi nosilci trombofilije. Proučevali smo tudi pogostost izpostavljenosti sprožilnim dejavnikom, ki so povezani z nastankom venske tromboze.

V raziskavo smo vključili 14 bolnikov s prebolelo veno trombozo (8 žensk, 6 moških, starih od 25 do 50, povprečno 41 let), pri katerih smo v obdobju po preboleli akutni veno trombozi ugotovili prirojeno trombofilijo. K raziskavi smo pritegnili 34 bližnjih bolnikovih sorodnikov (15 žensk, 19 moških, starih od 11 do 80 let, povprečno 44 let). Pri vseh preiskovancih smo merili aktivnost antitrombina III, beljakovin C in S ter neodzivnost na aktivirano beljakovino C. Merili smo tudi aktivirani parcialni tromboplastinski čas, trombinski čas, fibrinogen, protrombinski čas, lupusne antikoagulate, D-dimere ter osnovne hematološke parametre. Ovrednotili smo pogostost bolnikove izpostavljenosti dejavnikom tveganja za nastanek venske tromboze, med katere smo uvrstili imobilizacijo uda, mirovanje dlje kot tri dni, nedavno operacijo, oralno kontracepcijo, nosečnost in porod.

Pri 11 od 14 bolnikov z veno trombozo (79 %) smo ugotovili neodzivnost na aktivirano beljakovino C, pri 3 od 14 (21 %) pa pomanjkanje antitrombina III. Med pregledanimi sorodniki bolnikov z neodzivnostjo na aktivirano beljakovino C smo pri 12 od 23 (52 %) odkrili isto pomanjkanje. Tudi pri 3 od 11 (27 %) pregledanih sorodnikov bolnikov s pomanjkanjem antitrombina III smo ugotovili isto obliko prirojene trombofilije. Med sorodniki bolnikov z neodzivnostjo na aktivirano beljakovino C ni nihče utrpel venske tromboze, 1 sorodnik s pomanjkanjem antitrombina III je imel veno trombozo. Pri 2 sorodnikih, ki sta doživela veno trombozo nismo odkrili prirojene trombofilije. Med sorodniki so le 3 preboleli veno trombozo.

¹ Barbara Hudournik, štud. med., Klinični oddelek za žilne bolezni, SPS Interna klinika, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

² Aljoša Oštir, štud. med., Klinični oddelek za žilne bolezni, SPS Interna klinika, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana

³ Mentor: doc. dr. Polona Peternel, Klinični oddelek za žilne bolezni, SPS Interna klinika, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

⁴ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1997.

Med bolniki z vensko trombozo in asimptomatskimi nosilci prirojene trombofilije nismo odkrili razlik v bioloških lastnostih in ne v merjenih hemostatskih in hematoloških parametrih. Bolniki s prirojeno trombofilijo, ki so že doživeli vensko trombozo, so bili 3-krat pogosteje izpostavljeni sprožilnim dejavnikom kot asimptomatski nosilci prirojene trombofilije.

Na osnovi rezultatov naše raziskave zaključujemo, da je neodzivnost na aktivirano beljakovino C najpogostejša oblika prirojene trombofilije pri bolnikih z vensko trombozo. Odkrijemo jo tudi pri dobri polovici bližnjih sorodnikov. Prirojena trombofilija sama po sebi ni nujno povezana z razvojem venske tromboze, za njen nastanek so pomembni dodatni sprožilni dejavniki.

ABSTRACT

KEY WORDS: thrombophlebitis, thrombophilia – diagnosis – genetics, blood koagulation tests.

Inherited thrombophilia, state that predisposes individuals to venous thrombosis may be due to deficiency of antithrombin III, deficiency of protein C or protein S, or resistance to activated protein C. The impact of hereditary thrombophilia in familial venous thrombosis is not completely understood. It is known that hereditary thrombophilia by itself does not necessarily lead to development of venous thrombosis and that additional risk factors have to be present. In the present study hereditary thrombophilia was investigated in the families of patients with venous thrombosis and hereditary thrombophilia. Differences in biological factors and differences in levels of hemostatic and hematological parameters between subjects with hereditary thrombophilia and venous thrombosis and asymptomatic carriers were studied. Presence of the risk factor predisposing to venous thrombosis was also studied.

14 patients who had been diagnosed with venous thrombosis and inherited thrombophilia (8 females and 6 males, 25–50 years old, with a mean age of 41 years), and 34 close relatives of these patients (15 females and 19 males, 11–80 years old, with a mean age of 44 years), were included. In all subjects we measured the activity of antithrombin III, proteins C and S, and resistance to activated protein C, as well as activated partial thromboplastin time, thrombin time, prothrombin time, fibrinogen, lupus anticoagulants, D-dimers, and complete blood cell count. Factors predisposing to venous thrombosis such as immobilisation of a limb, bed rest longer than three days, recent surgery, oral contraception, pregnancy and delivery were also assessed.

In 11 patients (79%) we detected resistance to activated protein C, and in the remaining 3 patients (21%) deficiency of antithrombin III was observed. Among the relatives of patients with resistance to activated protein C we found the same deficiency in 12 out of 23 subjects (52%). Three out of 11 (27%) relatives of patients with deficiency of antithrombin III had the same deficiency. Among relatives with resistance to activated protein C no one suffered venous thrombosis, while among relatives with antithrombin III deficiency one had venous thrombosis. In two relatives with venous thrombosis no hereditary thrombophilia could be detected. Among the relatives only three subjects suffered venous thrombosis in the past.

There were no significant differences in hemostatic and hematologic parameters among patients with venous thrombosis and asymptomatic subjects with inherited thrombophilia. Subjects with inherited thrombophilia who had suffered venous thrombosis had been exposed to risk factors for thrombosis 3-times more often than subjects with inherited thrombophilia who had remained symptom-free.

Results of this study show that resistance to activated protein C is the most common form of inherited thrombophilia. This defect was found in about one half of close relatives of patients with venous thrombosis and resistance to activated protein C. It was concluded that inherited thrombophilia does not necessary lead to symptomatic venous thrombosis unless other risk factors are present.

UVOD

Trombofilija je prirojena ali pridobljena nagnjenost k trombozi, ki je posledica pomanjkanja posameznih beljakovin koagulacijskega ali fibrinolitičnega sistema. Prvi opis bolnika, pri katerem se je razvila venska tromboza (VT) zaradi prirojenega pomanjkanja antitrombina III (AT III), sega v leto 1965, ko je Egeberg opisal norveško družino s pomanjkanjem AT III (1). Klinično pomembne oblike prirojene trombofilije so: pomanjkanje AT III, beljakovine C, beljakovine S in neodzivnost faktorja V na aktivirano beljakovino C, ki jo označujemo tudi kot APC-R (activated protein C resistance). Skupna prevalenca pomanjkanja AT III, beljakovine C in S med bolniki z VT je 5–10%. Pri bolnikih z družinskimi pojavljanjem VT se povzpne na okoli 15% (2, 3). APC-R, ki ga je odkril Dahlback s sodelavci leta 1993, je med bolniki z VT 5–10-krat pogostejša kot vse do sedaj znane oblike trombofilije skupaj. Opisujejo jo pri okoli 20% zaporednih bolnikov z VT. Med dokazane vzroke spada tudi disfibrirogenemija in homocisteinemija. Te prirojene napake so zelo redke in lahko pojasnijo le posamezne primere bolnikov z VT. Druge prirojene nepravilnosti, ki jih odkrijemo z laboratorijskimi testi, vendar njihova neposredna vzročnost za nastanek VT še ni dorečena, so: pomanjkanje plazminogena, pomanjkanje heparinskega kofaktorja II, zvišanje koncentracije s histidinom bogatega glikoproteina in zmanjšana aktivnost tkivnega plazminogeneskega aktivatorja (t-PA) zaradi zvišane ravni zaviralca t-PA, ali znižane ravni aktivatorja t-PA. Prav pred kratkim je bil odkrit nov možen vzrok prirojene trombofilije. Gre za mutacijo gena za protrombin, pri kateri se gvanin na mestu 2010 zamenja z adeninom. Posledica je zvečana aktivnost protrombina, vendar še ni jasno ali so za to potrebni še dodatni dejavniki (4).

Klinična opažanja, ki nas opozorijo na možnost trombofilije, so: idiopatska VT, ki nastopi brez vidnega sprožilnega dejavnika, VT pred 50. letom starosti, ponavljajoča se VT, VT na neobičajnih mestih, kot so vene zgornjega uda, osrednjega živčnega sistema, ledvic, črevesja, jeter ter vena porte, in pojavljanje tromboze pri več družinskih članih.

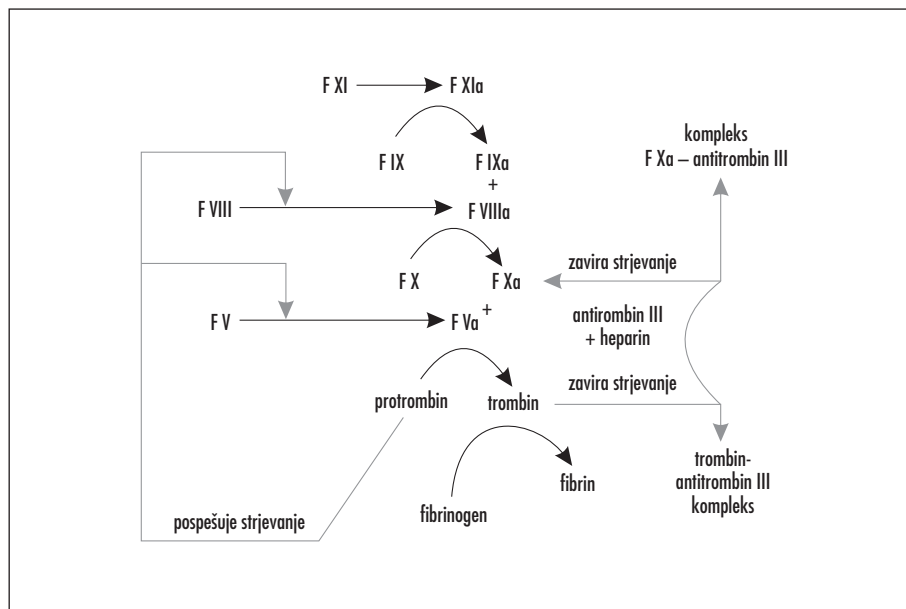
Družinsko pojavljanje VT so delno pojasnile nedavno odkrite genske napake, ki so odgovorne za prirojeno trombofilijo. Dedovanje je avtosomno dominantno, zato pričakujemo, da bo v družini imelo trombofilijo približno polovica ožjih sorodnikov (5). Pomanjkanje AT III, beljakovine C in S ter APC-R srečujemo tudi pri osebah, ki niso prebolele VT. Pomen trombofilije pri asimptomatskih bolnikih ni v celoti raziskan.

Doslej spoznane genske napake pojasni-jo vzrok za nastanek VT pri polovici bolnikov. Prirojena trombofilija se klinično najpogosteje izrazi kot VT in/ali pljučna embolija. Približno 50% vseh bolnikov s prirojeno trombofilijo utrpí VT brez očitnega sprožilnega dejavnika (6). Sem spadajo tudi bolniki s tako imenovano fulminantno trombofilijo, ki brez ustreznega zdravljenja neprestano doživljajo VT. Vendar pa v večini primerov velja, da nastopa VT občasno z daljšimi vmesnimi asimptomatskimi obdobji. Pogosto je potreben tudi dodatni sprožilni dejavnik. Ta je lahko mirovanje, daljše od treh dni, ortopedske in druge operacije, poškodbe, imobilizacija, pareza ali paraliza uda, uporaba oralne kontracepcije, nosečnost ali porod (7).

POMEN AT III, BELJAKOVIN C IN S ZA URAVNAVANJE AKTIVACIJE TROMBINA

Ključni dogodek pri strjevanju krvi je pretvorba fibrinogena v fibrin, ki zagotavlja nastanek krvnega strdka na mestu žilne poškodbe. Pri tem ima ključno vlogo trombin, ki nastaja po dveh poteh. Intrinzična pot se začne z aktivacijo faktorja XII. Za aktivacijo ekstrinzične poti je potreben tkivni faktor, ki se sprosti iz poškodovanega tkiva. Delovanje trombina mora ostati omejeno na področje poškodovane žilne stene, sicer povzroči nepotrebno nastajanje fibrina in s tem trombozo.

V fizioloških pogojih skrbita za to, da ostane delovanje trombina omejeno na mesto žilne poškodbe, dva različna sistema zaviralcev. Prvi vključuje AT III in heparinski kofaktor II. Oba zaviralca neposredno zavreta delovanje trombina tako, da se nanj vežeta. AT III zavira tudi aktivna faktorja X in XI in upočasnjuje nastanek trombina iz protrombina. Aktivnost obeh zaviralcev pospeši heparin in heparinu podobne snovi (8) (slika 1).

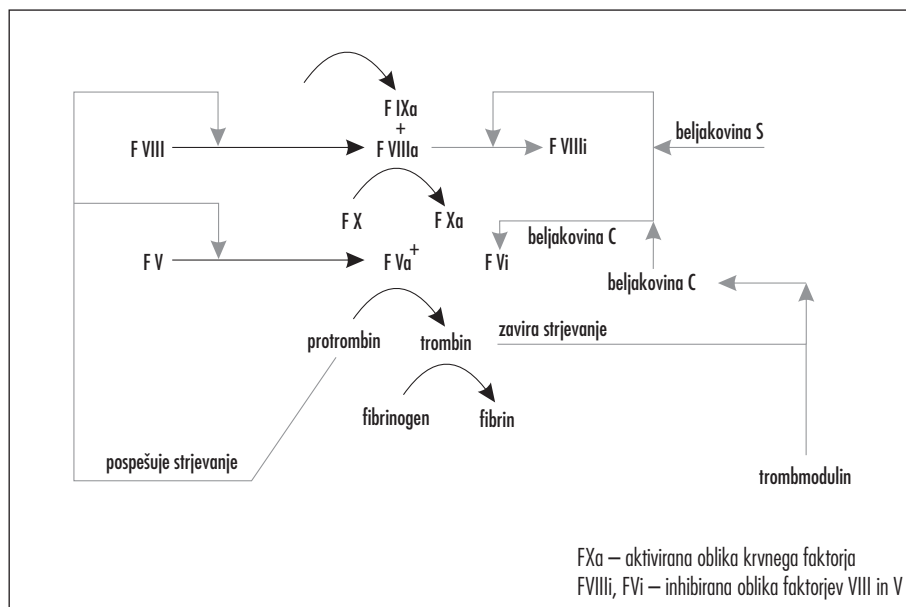


Slika 1. Regulacija aktivacije trombina z antitrombinom III (7).

Drugi zaviralni sistem, ki ga sestavljajo beljakovina C, beljakovina S in trombomodulin, deluje tako, da trombin sam v povratni zvezi uravnava svoje nastajanje. Nastali trombin se namreč veže na trombomodulin,

beljakovino v žilni steni. Ta kompleks aktivira beljakovina C. Aktivirana beljakovina C v prisotnosti beljakovine S deloma proteolizira faktorja VII in V, ju inaktivira in prepreči nastajanje trombina (8) (slika 2).

258



Slika 2. Regulacija aktivacije trombina z beljakovina C in S (7).

F Xa – aktivirana oblika krvnega faktorja
F VIIIi, F Vsi – inhibirana oblika faktorjev VIII in V

PRIROJENA TROMBOFILIJA

Pomanjkanje antitrombina III

AT III je najmočnejši naravni zaviralec strjevanja krvi. Nastaja v jetrih. S stabilno vezjo se veže na aktivne faktorje strjevanja II, IX, X, XI, XII in kalikrein. Z njimi tvori komplekse, ki preprečujejo encimsko aktivnost posameznih faktorjev strjevanja. Reakcija poteka relativno počasi, vezava heparina oziroma heparinu podobnih snovi na AT III pa jo pospeši za najmanj 1000-krat (9).

Pomanjkanje AT III je prvi opisal Egeberg leta 1965. Prirojeno pomanjkanje AT III je heterogena bolezen. Na podlagi laboratorijskih testov ločimo dve obliki. Pri pomanjkanju tipa 1 gre za zmanjšanje antigena in aktivnosti AT III, pri tipu 2 je antigen normalen, aktivnost pa je zmanjšana (7).

Doslej je znanih že 39 različnih mutacij in devet popolnih ali delnih delecij gena za AT III. Pomanjkanje AT III se deduje avtosomno dominantno. Homozigotnost za pomanjkanje AT III je nezdružljiva z življenjem; vse osebe s pomanjkanjem AT III so heterozigoti. Klinično se pomanjkanje AT III kaže kot VT, ki se razvije v mladih letih, pogosto že med odraščanjem. Petinpetdeset odstotkov bolnikov doživi VT najmanj enkrat, idiopatska VT se pojavi v 36 %. Med sprožilnimi dejavniki za nastop VT sta najpogostejša nosečnost in porod (28 %), v 13 % pa se VT razvije po operaciji. Najpogosteje pride do VT spodnjih okončin, lahko pa tudi do tromboze črevesnih ven ali VT zgornjih udov. Zveza z arterijsko trombozo ni bila ugotovljena (9). Razširjenost pomanjkanja AT III v zdravi populaciji znaša 0,02 %, med zaporednimi bolniki s prvici prebolelo VT pa 1 % (7).

Pomanjkanje beljakovine C

Beljakovina C je od vitamina K odvisna plazemska beljakovina, ki nastaja v jetrih in je strukturno zelo podobna faktorjem strjevanja VII, IX, X in protrombinu. Za razliko od navedenih faktorjev strjevanja beljakovina C zavira strjevanje in pospešuje fibrinolizo. Deluje tako, da preko negativne povratne zanke zavre učinek aktiviranih faktorjev strjevanja V in VIII, pri čemer se nastajanje trombina pomembno upočasni.

Za svojo učinkovitost potrebuje beljakovina C kofaktor trombomodulin, beljakovina, ki je vezana na žilni endotelij (9).

Poleg protistrjevalnega ima beljakovina C tudi fibrinolitični učinek, saj zavira delovanje zaviralca t-PA (10). Zaviralni mehanizem je verjetno tvorba stabilnega kompleksa med aktivirano beljakovino C in zaviralcem t-PA. Hkrati beljakovina C tudi aktivira t-PA. Delovanje beljakovine C uravnava specifični zaviralec. Zaviranje pospešuje heparin v koncentracijah, ki močno presegajo terapevtske (9).

Pomanjkanje beljakovine C je prvi opisal Griffin leta 1981. Pomanjkanje beljakovine C je heterogena bolezen (11, 12). Delitev temelji na rezultatih imunoloških in funkcijskih testov. Pri tipu I gre za hkratno zmanjšanje antigena in aktivnosti beljakovine C, pri tipu II pa je prisotna normalna količina beljakovine C, vendar je molekulska struktura spremenjena, kar zmanjša aktivnost.

Leta 1995 je Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the SSC ISTH objavil podatke o 160 različnih mutacijah gena za beljakovino C (PROC gen). Posledica vsake od teh mutacij je ali tip I ali tip II pomanjkanja beljakovine C, pri čemer je bilo kar 60 % mutacij, ki so povzročile tip I pomanjkanja, točkovnih. Te privedejo do zamenjave aminokislina na določenem mestu, kar povzroči pospešeno razgradnjo beljakovine C (7).

Pomanjkanje beljakovine C se deduje avtosomno dominantno. Homozigotnost je povezana s težko klinično sliko, ki se pokaže kmalu po rojstvu kot purpura fulminans novorojenčkov. Pri heterozigotnih bolnikih se pomanjkanje beljakovine C največkrat kaže kot VT. Značilna, vendar zelo redka, je tudi s kumarini povzročena kožna nekroza. Ob pomanjkanju beljakovine C se lahko razvije tudi povrhnji tromboflebitis. Simptomi se pokažejo v mladosti, v poprečju pri 27 letih (13).

Posamezniki s pomanjkanjem beljakovine C imajo 8–10-krat večje tveganje za pojav VT. Do 40. leta približno polovica bolnikov s pomanjkanjem beljakovine C vsaj enkrat preboli VT.

V zdravi populaciji je razširjenost pomanjkanja beljakovine C 0,2–0,4 %, med bolniki, ki so enkrat preboleli VT, pa 3 % (7).

Pomanjkanje beljakovine S

Beljakovina S je od vitamina K odvisen glikoprotein, ki se sintetizira pretežno v jetrih, pa tudi v endotelijskih celicah, megakariocitih in Leydigovih celicah testisov (7). Beljakovina S je potrebna za vezavo aktivirane beljakovine C na trombocite, kar omogoča razgradnjo aktiviranega faktorja V. Deluje torej kot kofaktor za beljakovino C (14). Čeprav so do nedavnega domnevali, da je protistrjevalni učinek beljakovine S zgolj posledica vpliva na beljakovino C, so pred kratkim ugotovili, da lahko beljakovina S zavira delovanje kompleksov IXa-VIIIa in Xa-Va tudi brez prisotnosti beljakovine C (15-17).

Beljakovina S ni serinska proteinaza; je torej izjema med faktorji strjevanja, ki so odvisni od vitamina K. Določitev zaporedja aminokislin je pokazala, da ta beljakovina nima aktivnega centra (18).

V plazmi se beljakovina S nahaja v dveh oblikah: 35-40% je proste, 60-65% beljakovine S pa je vezane na t. i. C4b-vezavno beljakovino, ki spada med zaviralce komplementnega sistema (9).

Znana sta dva visoko homologna gena, ki kodirata beljakovino S. Aktivna oblika gena je PROS oz. PS α (19). PS β -gen je psevdogen, ki vsebuje številne aberacije.

Pomanjkanje beljakovine S so prvi opisali Comp, Esmon in Schwartz s sodelavci leta 1984. Delitev pomanjkanja beljakovine S še ni dokončno določena. Tip I predstavlja zmanjšanje antigena ter aktivnosti beljakovine S. Tip II, ki ga Comp (20) označuje kot tip IIb, pomeni prisotnost neučinkovite molekule beljakovine S. Pri tem je količina celotne in proste beljakovine S normalna, aktivnost pa je zmanjšana. Pri tipu III (oz. tip IIa po Compu) je količina celotne beljakovine S normalna; zmanjšana je količina proste beljakovine S ter njena aktivnost (7).

Klinično se pomanjkanje beljakovine S kaže kot VT. Tveganje za pojav VT pri pomanjkanju beljakovine S je težko oceniti, saj je razširjenost te dedne napake v splošni populaciji še neznan (21). Za sicer redke znane primere homozigotov pa velja, da je tveganje enako kot pri homozigotih za pomanjkanje beljakovine C. Pogostost VT je približno 2-krat večja pri moških s pomanjkanjem beljakovine S kot pri ženskah (9).

Deduje se avtosomno dominantno. Simptomi se pokažejo v mladosti, v poprečju pri 27 letih (13). Ob pomanjkanju beljakovine S je kot redkost opisana tudi arterijska tromboza (22).

Neodzivnost na aktivirano beljakovino C

Najpogostejša doslej znana oblika dedne trombofilije je neodzivnost faktorja V na aktivirano beljakovino C - APC-R. Sposobnost faktorja V za aktivacijo trombina s tem ni ohranjena. Tako se nagnjenost k strjevanju krvi, s tem pa tudi k nastanku VT, poveča.

Leta 1994 je bila odkrita točkovna mutacija gena za faktor V, katere posledica je zamenjava arginina z glicinom na mestu 506 v molekuli faktorja V. Na tem mestu beljakovina C cepi faktor V in ga s tem inaktivira. Sprememba v aminokislinskem zaporedju prepreči razcep in s tem zakasni inaktivacijo, kar opisujemo kot neodzivnost na aktivirano beljakovino C (7).

Zaenkrat je to edina znana mutacija, ki povzroča APC-R. Zaradi mutacije spremenjeni faktor V imenujemo tudi faktor V Leiden po nizozemskem mestu, v katerem si je raziskovalna skupina pridobila prvenstvo pri odkritju mutacije (23).

Razširjenost APC-R pri zdravih znaša 3-5% in je torej za red velikosti večja kot pri ostalih oblikah trombofilije. Zanimiva so poročila o različni zemljepisni razširjenosti APC-R. Na severu Evrope najdemo APC-R pri 6% zdrave populacije, na Japonskem in pri drugih vzhodnih ljudstvih ga praktično ni (24). APC-R je bil odkrit pri 20% bolnikov z VT in 40-60% bolnikov z dedno trombofilijo (25). V naši prejšnji raziskavi smo odkrili prisotnost APC-R pri 14% zaporednih bolnikov z VT in pri 3% zdravih (26).

Klinično se APC-R najpogosteje izrazi kot VT ali pljučna embolija, redko pa kot površinski tromboflebitis (27). Tveganje za pojav VT je pri heterozigotih 7-krat, pri homozigotih 100-krat večje (28). Penetranca kliničnih znakov se pri posameznikih močno razlikuje. Nekateri nikoli ne zbolijo, pri drugih pa si sledijo številne ponovitve VT. Tveganje je večje, če so hkrati prisotni drugi prirojeni ali pridobljeni sprožilni dejavniki za VT. Tveganje za pojav VT narašča s starostjo (29).

ARTERIJSKA TROMBOZA

Bolniki s prirojeno trombofilijo redko zbolijo za arterijsko trombozo. Običajno se pojavi po 50. letu starosti pri bolnikih, ki imajo tudi druge dejavnike tveganja za nastanek arterijske tromboze (30). Simioni s sodelavci je ugotovil, da je pogostost VT pri bolnikih s pomanjkanjem beljakovin C, S in AT III 24-krat višja kot pogostost arterijske tromboze (31).

PRIDOBLENE OBLIKE TROMBOFILIJE

Venska tromboza spremlja številne hematološke bolezni, paroksizmalno nočno hemoglobinurijo, mieloproliferativne bolezni in antifosfolipidni sindrom. Že več kot stoletje je znana tudi povezava med strjevanjem krvi in rakom. Posebno rak trebušne slinavke, jajčnikov, pljuč in mucinozni tumorji prebavit lahko izzovejo VT, pa tudi redkejšje oblike, kot so migrantni povrhnji tromboflebitis, nebakterijski trombotični endokarditis ter VT na neobičajnih mestih (mezenterij, spodnja votla vena, ledvične vene, jetrna vena) (32).

OBRAVNAVA BOLNIKOV S SUMOM NA PRIROJENO TROMBOFILIJO

Bolnikom z VT, pri katerih obstaja klinični sum za prirojeno trombofilijo, opravimo laboratorijske preiskave za pomanjkanje AT III, beljakovin C, S in APC-R. Pomembno je, da preiskav ne delamo v obdobju nenadnega izbruha bolezni. Če je možno, jih opravimo tedaj, ko bolnik ne dobiva več zdravil proti strjevanju. Vedno ko pri bolniku potrdimo trombofilijo, preiskavo ponovimo. Če tudi ponovna preiskava potrdi prirojeno trombofilijo, razširimo testiranje na ožje sorodnike (5).

Zdravljenje VT se pri bolnikih s trombofilijo ne razlikuje od zdravljenja ostalih bolnikov z VT, razen v tem, da tudi bolnikom ob nastopu prve VT, ki jo opredelimo za sekundarno, predpišemo zdravila proti strjevanju krvi za 6 mesecev (33).

Preprečevanje VT pri osebah s prirojeno trombofilijo, še posebej pri ženskah v rodnem

obdobju, je podvrženo strožjim principom kot pri ostali populaciji. Tako predpisujemo farmakološko zaščito tudi ženskam po porodu, pa tudi osebam, ki bi jim sicer predpisali le fizikalne ukrepe, na primer po manjših operacijah. Nedorečena je zaščita pred VT pri asimptomatskih nosilkah prirojene trombofilije med nosečnostjo. Še posebej to velja za nosilke pomanjkanja AT III. Do uporabe oralne kontracepcije in nadomestnega hormonskega zdravljenja v menopavzi smo pri asimptomatskih nosilkah trombofilije zadržani, dokler ne bodo znani rezultati ustreznih raziskav (29).

Glede na dejstvo, da kaže pojavljanje VT kakor tudi prirojene trombofilije zemljepisno odvisnost, je treba upoštevati priporočila, da se opravijo raziskave za različne populacije ločeno.

NAMEN NALOGE

Številna vprašanja o vplivu prirojene trombofilije na družinsko pojavljanje VT so še neodgovorjena. Prirojena trombofilija se deduje avtosomno dominantno, zato smo predpostavili, da bomo odkrili isto napako pri polovici ožjih sorodnikov. Ker tveganje za pojav VT narašča s starostjo, smo predpostavili, da bodo bolniki z VT starejši kot njihovi sorodniki. Predpostavili smo tudi, da bodo bolniki z VT v večji meri izpostavljeni sprožilnim dejavnikom za nastanek VT. Dejavniki, ki vplivajo na nastanek VT pri nosilcih prirojene trombofilije, niso v celoti prepoznani.

Z nalogo smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Kakšna je pogostost prirojene trombofilije in VT pri sorodnikih?
2. Ali se bolniki z VT po svojih bioloških lastnostih in vrednostih hematoloških in hemostatskih testov ločijo od sorodnikov brez VT?
3. Ali se bolniki z VT ločijo od sorodnikov brez VT po izpostavljenosti sprožilnim dejavnikom za nastanek VT?

PREISKOVANCI IN METODE

Preiskovanci

Raziskava je potekala od 11. 4. 1997 do vključno 8. 9. 1997 na Kliničnem oddelku za žilne bolezni Kliničnega centra v Ljubljani. Preisko-

vance smo izbrali med zaporednimi bolniki z VT in predhodno ugotovljeno trombofilijo. Kriterij za vključitev bolnikov je bila predhodno odkrita in ponovno potrjena prirojena trombofilija, prebolela VT s pljučno embolijo ali brez nje in starost pod 50 let.

Izključili smo vse bolnike s pridobljeno trombofilijo.

Izbrane bolnike smo povabili k raziskavi z osebnim ali telefonskim razgovorom oziroma s pisnim vabilom. Prosili smo jih, da k sodelovanju pritegnejo starše, sorojence in otroke, starejše od 10 let. Na vabilo se je odzvalo 14 od 32 bolnikov. Vzrok za nesodelovanje je bilo v šestih primerih odklonilno stališče. Trije bolniki so se v tem času preselili neznano kam, trije so bili begunci, ki so se vrnili v domovino, eni bolnici pa za sodelovanje ni uspelo pridobiti družine. Pet bolnikov, ki nimajo telefona, se ni odzvalo na pisna vabila.

Bolniki

V raziskavo smo vključili 14 bolnikov, 8 žensk in 6 moških, starih od 25 do 50, povprečno 41 let. VT so preboleli od 6 mesecev do 5 let, povprečno 2 leti pred vključitvijo v raziskavo. Diagnoza VT je bila v vseh primerih objektivno potrjena z eno izmed naslednjih metod: ultrazvočna preiskava, impedančna pletizmografija ali rentgenska venografija.

Ocenili smo, da je bila tromboza pri šestih bolnikih primarna. Osem jih je prebolelo sekundarno trombozo. Opredelitev sekundarne VT in sprožilnih dejavnikov, ki so privedli do VT, prikazuje tabela 1.

Šest bolnikov je v času raziskave jemalo varfarin kot zaščito proti strjevanju krvi; zdravil nismo odtegovali. Drugih zdravil, ki bi lahko vplivala na rezultate meritev, ni jemal nihče.

Tabela 1. Sprožilni dejavniki sekundarne venske tromboze (VT).

Sprožilni dejavnik	Število bolnikov s sekundarno VT (N = 8)	
	ženske (N = 7)	moški (N = 1)
imobilizacija uda	1	0
mirovanje več kot 3 dni	1	0
operacija	0	1
oralna kontracepcija	1	0
nosečnost	2	0
porod	2	0

Ena bolnica je bila v času raziskave noseča v prvem tromesečju. Dve bolnici imata dva in dve enega otroka. Dve bolnici sta v preteklosti spontano splavili, ena od njiju dvakrat.

Sorodniki

K raziskavi so bolniki pritegnili od 1 do 6, skupaj 34 družinskih članov, 15 žensk in 19 moških, starih od 11 do 80, povprečno 44 let. Od tega je bilo 15 staršev, 7 sorojencev in 12 otrok. Trije izmed njih so v preteklosti preboleli VT, eden pred 6 leti v starosti 58 let, drugi pred 18 leti pri 60. letih. Tretji je VT prebolel dvakrat, 3 in 4 leta pred raziskavo, prvič v starosti 27 let. Pri nobenem nismo pri pojavu prve VT zasledili sprožilnega dejavnika. En sorodnik je v času raziskave jemal varfarin zaradi atrijske fibrilacije, eden pa zaradi prebolele VT. Ena sorodnica je v času raziskave uporabljala oralno kontracepcijo. Rodilo je 10 sorodnic. Ena je rodila enkrat in kasneje trikrat splavila. Pet jih je rodilo dvakrat, tri od njih so enkrat spontano splavile. Tri so rodile trikrat in ena štirikrat.

Triindvajset sorodnikov od skupno 57 (40%) se raziskave iz različnih razlogov ni udeležilo. Trije otroci so bili premladi (4 leta, 2 leti in pol, 6 mesecev), 18 se jih ni želelo udeležiti, ena sorodnica je psihiatrična bolnica in ni želela dati krvi, en sorodnik pa je zaradi ostarelosti in oddaljenosti zavrnil sodelovanje. Tako v raziskavi niso sodelovali 3 starši, 14 sorojencev in 6 otrok.

V raziskavo smo zaradi naključnega odkritja APC-R vključili eno družino; nihče v družini ni prebolel VT.

Anamneza in klinični pregled

Pri vseh bolnikih smo preverili medicinsko dokumentacijo o preboleli VT, kjer smo dobili podatke o lokalizaciji, ponovitvah, zapletih in o tem, kako je bila VT objektivno potrjena. Anamneza je vsebovala podrobno analizo sprožilnih dejavnikov, ki so jim bolniki bili ali so jim še izpostavljeni. Povprašali smo jih o preteklih boleznih, operacijah, poškodbah in razvadah. Pri ženskah nas je v okviru ginekološke anamneze zanimala uporaba oralne kontracepcije, nosečnost, porodi in morebitni spontani splavi. Ista vprašanja smo postavili njihovim sorodnikom. Pri kli-

ničnem pregledu smo izmerili parametre, potrebne za izračun indeksa telesne teže (višina, teža, obseg pasu in bokov).

Preiskovanci so bili seznanjeni s cilji in načinom izvedbe naloge. Pri delu smo se držali načel Helsinško-tokijske deklaracije in Kodeksa etike zdravstvenih delavcev Slovenije.

Raziskavo je odobrila Republiška komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije (št. 37/05/97).

Laboratorijske metode dela

Odvzem krvi in priprava vzorcev

Preiskovanci so prihajali na pregled tešči med sedmo in deveto uro zjutraj. Po 15 minutah počitka smo jim iz komolčne vene odvzeli 35 ml venske krvi v dve 5 ml epruveti, ki sta vsebovali etilen-diamino-tetra-acetat (EDTA), dve 10 ml epruveti za teste strjevanja in eno 5 ml epruveto z nakisanim Na-citratom. Vse epruvete, razen epruvet z EDTA, smo pred uporabo ohladili v ledeni kopeli, kjer smo jih hranili tudi po odvzemu krvi do nadaljnje obdelave vzorca.

Vzorke za teste strjevanja smo nato centrifugirali 30 minut pri 3000 obratih pri temperaturi +4°C. Del plazme smo nato filtrirali. Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku in jih do končnih analiz shranili pri temperaturi -70°C.

Laboratorijski testi

Protrombinski čas (Thromborel S, Behring).

Test po Quicku je hiter pregledni test za ekstrinzični del strjevalnega sistema. Občutljiv je za okvare faktorjev II, V, VII, X. Za test smo uporabili citrirano plazmo. Po dodatku reagenta smo merili čas do nastanka strdka.

Normalna vrednost: 0,70–1,20, relativno na aktivnost normalne zmesne plazme.

Rekalcifikacijski čas s kaolinom je osnovni orientacijski test za oceno hemostaze. Plazmi, iz katere smo odstranili Ca-ione z Na-citratom, smo dodali najprej kaolin, ki aktivira faktor XII, nato pa Ca-ione, ki so potrebni za strjevanje, ter merili čas do nastanka strdka (fibrina).

Normalna vrednost: 40–85 sekund.

Aktivirani delni tromboplastinski čas. Za določanje aktiviranega delnega tromboplastinskega časa (APTČ) smo uporabljali reagent Pathromtin (Behring). Z njim smo aktivirali intrinzično pot strjevanja. Začetek strjevanja smo sprožili z dodatkom 0,025 M Ca-klorida in izmerili čas do nastanka strdka. Normalna vrednost: 26–36 sekund.

Trombinski čas smo merili po dodatku trombina Test-Thrombin (Behring) citrirani plazmi. Merili smo čas do nastanka fibrina. Ta test je občutljiv za antitrombine in zmanjšano količino fibrinogena v plazmi.

Normalna vrednost: 14–21 sekund.

Fibrinogen smo določali po prirejeni Clausovi metodi (34) z reagenti Multifibren U (Behring). Razredčeno citrirano plazmo smo strjevali z dodatkom sorazmerne količine trombina in izmerili čas do nastanka strdka.

Normalna vrednost: 1,9–3,8 g/l.

D-dimere smo določali z metodo ELISA na mikrotitrskih ploščicah z dvojnimi protitelesi, po navodilih proizvajalca (TintElize®, t-PA, Biopol, Umea, Švedska).

Normalna vrednost: < 250 ng/ml.

Neodzivnost na aktivirano beljakovino C.

Test je osnovan na aktiviranem delnem tromboplastinskem času (APTČ) (Coatest® APC™ resistance V/V-S, Chromogenix). Podaljšanje osnovnega APTČ po dodatku aktivirane beljakovine C (APC) je pri posameznikih z APC-R manj izrazito kot pri zdravih osebah. Uporabili smo prilagojeni test, pri katerem vzorec plazme pred uporabo razredčimo s plazmo brez faktorja V. S tem zagotovimo zadostno količino faktorjev strjevanja odvisnih od vitamina K, kar omogoča, da testiramo tudi plazmo bolnikov, ki jemljejo kumarine. Strjevanje smo sprožili enkrat v prisotnosti APC in enkrat brez njega ter merili čas do nastanka strdka s fibrintimerjem.

Rezultat smo izrazili kot razmerje:

$$R = \frac{\text{APTČ z dodatkom APC (sek)}}{\text{APTČ brez dodatka APC (sek)}}$$

Normalna vrednost: 2,0–4,7.

Lupusne antikoagulate (LA) smo najprej določali s presejalnim preizkusom (LA-Screen, Gradipore). Če je bil preizkus

pozitiven, smo izvedli še potrditveni preizkus (LA-Confirm test, Gradipore). Oba se izvajata kot enostavna enostopenjska testa strjevanja. Za test smo uporabili citrirano plazmo. Pred zamrznitvijo smo vzorce plazme filtrirali skozi 0,2 μ m filter, s čimer smo odstranili trombocite.

Test smo izvajali v aparatu za strjevanje. Po dodatku reagentov smo merili čas do nastanka strdka. Rezultat smo prikazali kot razmerje med presejalnim in potrditvenim testom. Normalne vrednosti: 0,8–1,2.

Aktivnost antitrombina III (Berichrom antitrombin III, Behring). Antitrombin III v plazmi ob prisotnosti heparina inaktivira α -trombin. Preostalo aktivnost trombina smo izmerili kinetično s kromogenim substratom kot porast absorpcije pri 405 nm. Meritev smo opravili z aparatom Chromotimer (Behring).

Normalna vrednost: 0,75–1,25 relativno na normalno zmesno plazmo.

Aktivnost plazminogena (Berichrom plazminogen, Behring). Plazmin je naravni fibrinolitični encim, ki nastane iz neaktivnega plazminogena pod vplivom aktivatorjev plazminogena. V vzorcu plazme tvori kompleks s streptokinazo. Aktivnost tega kompleksa na kromogeni substrat smo izmerili kinetično kot porast absorpcije pri 405 nm.

Meritev smo izvajali z aparatom Chromotimer (Behring). Uporabljali smo citrirano plazmo.

Normalna vrednost: 0,75–1,50, relativno na normalno zmesno plazmo.

Aktivnost beljakovine C (Berichrom protein C, Behring). Beljakovino C v vzorcu plazme smo aktivirali s specifičnim aktivatorjem iz kačjega strupa. Test smo izvajali z aparatom Chromotimer (Behring). Aktivnost beljakovine C na kromogeni substrat smo izmerili kinetično kot porast absorpcije pri 405 nm.

Normalna vrednost: 0,70–1,40, relativno na normalno zmesno plazmo.

Čas evglobulinske lize. Plazmo smo močno razredčili z vodo in nakisali. Tako smo oborili evglobulinsko frakcijo, ki vsebuje komponente fibrinolitičnega sistema. Zaviralci fibrinolize so ostali v raztopini. Evglobuline smo raztopili in strdili, nato pa merili čas lize strdka.

Normalna vrednost: 80–380 minut.

Aktivnost beljakovine S smo izmerili na osnovi podaljšanja protrombinskega časa v prisotnosti govejega tromboplastina, Ca-ionov in aktivirane beljakovine C. Test je avtomatiziran (instrument ACL).

Normalna vrednost: 0,60–1,40 relativno na normalno zmesno plazmo.

Hematološki testi. Za določitev hematoloških parametrov smo uporabili hematološki aparat (Cobas minos ste-x, Roche). Določili smo število levkocitov, eritrocitov, trombocitov ter vrednosti hemoglobina (g/dl) in hematokrita (%).

Statistične metode

Za spremenljivke, ki so se razporejale normalno, smo izračunali aritmetično sredino, kot merilo pa standardni odklon. Za spremenljivke z asimetrično porazdelitvijo smo kot srednjo vrednost uporabili mediano, kot mero spremenljivosti pa razpon. Za testiranje razlik med skupinami smo pri normalni razporeditvi uporabili Studentov t-test za neodvisne vzorce, pri asimetrični pa Mann-Whitneyjev U-test. Pri preizkušanju domnev smo vrednost $p < 0,05$ imeli za statistično značilno. Pri atributivnih spremenljivkah smo za testiranje razlik uporabili χ^2 -test.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket Statistica (Stat Soft).

REZULTATI

Laboratorijski rezultati

S ponovno preiskavo smo potrdili isto obliko trombofilije pri vseh bolnikih. Pri 11 bolnikih smo odkrili APC-R, pri 3 pomanjkanje AT III. Trije bolniki z APC-R so imeli ob ponovnem testiranju beljakovino C pod spodnjo mejo normale. To spremembo smo pripisali antikoagulacijskemu zdravljenju s kumarini.

V 11 od pregledanih 14 družin smo odkrili trombofilijo pri vsaj enem družinskem članu. V vseh 11 družinah je imel vsaj en sorodnik enako obliko trombofilije kot bolnik. Le en sorodnik je imel poleg te še dodatno okvaro. En sorodnik, ki je prebolel VT, je imel enako okvaro kot bolnik, 2 pa nista imela prepoznavne oblike trombofilije (tabela 2).

Tabela 2: Število pregledanih sorodnikov ter pogostost prirojene trombofilije v posameznih družinah in rezultati meritev neodzivnosti na aktivirano beljakovino C (APC-R), aktivnosti beljakovine C (PC) in antitrombina III (AT III) pri posameznih bolnikih oziroma sorodnikih. R – razmerje laboratorijskih meritev aktiviranega delnega tromboplastinskega časa z in brez dodatka aktivirane beljakovine C, rel. – laboratorijske vrednosti relativno na normalno zmesno plazmo, * – isti preiskovanec, pri katerem smo odkrili odstopanja pri dveh različnih testih, ** – preiskovanec iz skupine sorodnikov, ki je prebolel venske tromboze.

Zap. št. družine	Število bolnikov (N = 14)			Število sorod. (N = 34)			Št. sorod. z ugotovljeno napako / št. pregledanih sorod. (%)
	APC-R (R)	PC (rel.)	AT III (rel.)	APC-R (R)	PC (rel.)	AT III (rel.)	
1	1 (1,53)	0	0	2 (1,38, 1,40)	0	0	2/3
2	1 (1,59)	0	0	0	0	0	0/2
3	1 (1,53)	0	0	0	0	0	0/3
4	1 (1,37)	0	0	1 (1,50)	0	0	1/2
5	1 (1,30)	0	0	2 (1,48, 1,50)	0	0	2/3
6	1 (1,55)	0	0	1 (1,65)	0	0	1/2
7	1 (1,67)	0	0	2 (1,79, 1,69)	0	0	2/2
8	1 (1,61)	0	0	1 (1,54)	0	0	1/1
9	1 (1,46)	0	0	1 (1,57)	0	0	1/1
10	1 (1,48)	0	0	1* (1,39)	1* (0,64)	0	1/2
11	1 (1,56)	0	0	1 (1,41)	0	0	1/2
12	0	0	1 (0,68)	0	0	2** (0,67, 0,73)	2/6
13	0	0	1 (0,53)	0	0	0	0/1
14	0	0	1 (0,60)	0	0	1 (0,57)	1/4
skupaj	11	0	3	12	1	3	15/34 (44%)

V tabeli 2 navajamo pogostost posameznih oblik prirojene trombofilije ter rezultate meritev APC-R, aktivnosti beljakovine C in antitrombina III pri bolnikih z VT in njihovih sorodnikih. Navedeno je število sorodnikov s prirojeno trombofilijo in število vseh pregledanih sorodnikov.

Pri 7 od 11 bolnikov z APC-R je bila predhodno ugotovljena mutacija gena za faktor V Leiden. Pri ostalih preiskava ni bila opravljena.

Osemindvajsetim od 48 (58%) preiskovancev smo določili aktivnost beljakovine S. Pri 3 bolnikih, ki so dobivali kumarine, in pri nosečnici so bile vrednosti beljakovine S pod

265

Tabela 3. Rezultati hematoloških testov in testov hemostaze pri bolnikih z vensko trombozo (VT) in zdravih preiskovanih ($X \pm SD$ ali mediana z razponom). nz – statistično neznačilne razlike med vzorci

	VT (N = 17)	brez VT (N = 35)	p
Levkociti ($10^3/\text{mm}^3$)	6,86 ± 2,69	6,2 ± 1,6	nz
Eritrociti ($10^6/\text{mm}^3$)	4,75 ± 0,53	4,69 ± 0,42	nz
Hemoglobin (g/dl)	14,9 ± 1,4	14,8 ± 1,3	nz
Hematokrit (%)	41,5 ± 4,0	41,4 ± 3,8	nz
Trombociti ($10^3/\text{mm}^3$)	254 ± 67	244 ± 49	nz
Protrombinski čas (rel.)	1,05 (0,18–1,22)	1,05 (0,29–1,22)	nz
Protrombinski čas (INR)	0,96 (0,85–3,79)	0,96 (0,85–2,45)	nz
Rekalifikacijski čas s kaolinom (sek)	65,8 (50,6–180,0)	69,1 (35,5–98,9)	nz
Aktivirani parcialni tromboplast. čas (sek)	34,3 (29,2–180,0)	35,2 (27,5–47,2)	nz
Trombinski čas (sek)	14,4 (12,0–104,5)	14,7 (11,0–18,8)	nz
Fibrinogen (g/l)	3,18 ± 0,89	2,94 ± 1,11	nz
D-dimeri (ng/ml)	124 (58–446)	103 (66–738)	nz
Plazminogen (rel.)	1,16 ± 0,27	1,03 ± 0,18	0,06
Liza evoglobulinov (min)	300 ± 79	247 ± 88	0,06

Tabela 4. *Prisotnost lupusnih antikoagulantov pri bolnikih z venso trombozo in sorodnikih.*

APC-R – neodzivnost na aktivirano beljakovino C

AT III – pomanjkanje antitrombina III

PC – pomanjkanje beljakovine C

	Bolniki (N = 15)	Sorodniki (N = 37)
brez prirojene trombofilije	0	4
APC-R	4	2
AT III	0	1
PC	0	1

spodnjo mejo normale, pri vseh ostalih so bili rezultati meritev beljakovine S v referenčnem območju.

Tabela 3 prikazuje vrednosti hematoloških testov in testov hemostaze pri preiskovancih, ki so preboleli VT, in tistih, ki niso zboleli. Prikazane so srednje vrednosti ter standardni odklon oziroma mediana in razpon ter verjetnost, da je razlika statistično značilna.

Tabela 4 prikazuje število bolnikov z VT in njihovih sorodnikov, pri katerih smo odkrili lupusne antikoagulate.

Pri bolnikih s testi, ki smo jih izvedli pred vključitvijo v raziskavo, nismo odkrili lupusnih antikoagulantov. Pri ponovnem testiranju smo pri 3 bolnikih in 7 sorodnikih odkrili mejno povečane vrednosti LA. En bolnik in njegov brat sta imela nekoliko višje vrednosti LA, ki pa so bile še vedno občutno nižje od tistih pri antifosfolipidnem sindromu.

Klinični rezultati

VT smo pri petih bolnikih z APC-R opredelili kot primarno, pri šestih pa kot sekundarno. Trije bolniki so doživeli ponovno VT, 2 pa pljučno embolijo, ki hemodinamsko ni bila pomembna.

VT smo pri bolnicah s pomanjkanjem AT III opredelili enkrat kot primarno, dvakrat kot sekundarno. Dve bolnici sta doživeli ponovno VT, vse 3 tudi hemodinamsko pomembno pljučno embolijo.

Med sorodniki je imel en bolnik s pomanjkanjem AT III primarno VT, ki se je ponovila. Pri 2 sorodnikih, pri katerih nismo odkrili trombofilije, smo VT enkrat opredelili kot primarno, drugič kot sekundarno. VT se je pri

Tabela 5. *Primerjava bioloških lastnosti med preiskovanci z venso trombozo (VT) in preiskovanci brez venske tromboze. BMI – indeks telesne teže; nz – statistično neznačilna razlika med vzorci*

	VT (N = 17)	Zdravi (N = 35)	p
Starost	48 ± 14	42 ± 20	nz
Tel. teža (kg)	76,8 ± 15,1	68,6 ± 14,1	nz
Tel. višina (cm)	172 ± 7	170,5 ± 9,9	nz
BMI	25,5 ± 3,5	23,4 ± 3,4	nz
Obseg pasu (cm)	90,9 ± 11,9	80,5 ± 11,0	<0,01
Obseg bokov (cm)	101,5 ± 6,6	96,9 ± 8,4	nz
Razmerje: pas/boki	0,90 ± 0,1	0,83 ± 0,1	0,03

Tabela 6. *Pogostost izpostavljenosti sprožilnim dejavnikom pri preiskovancih s prirojeno trombofilijo z venso trombozo (VT) in brez.*

Sprožilni dejavnik	Št. sprožilnih dejavnikov pri bolnikih s trombofilijo in VT	Št. sprožilnih dejavnikov pri sorodnikih s trombofilijo brez VT
oralna kontracepcija	5	0
porod	11	3
nosečnost	2	2
imobilizacija	3	2
poškodba	2	2
mirovanje	2	0
operacija	6	3
skupaj	31	12

enem bolniku ponovila, drugi je doživel pljučno embolijo.

Tabela 5 prikazuje biološke lastnosti preiskovancev z VT in brez. Iz tabele je razvidno, da med skupinama ni razlik, razen v obsegu pasu in razmerju pas/boki.

Tabela 6 prikazuje pogostost izpostavljenosti sprožilnim dejavnikom pri bolnikih s prirojeno trombofilijo in VT ter pri sorodnikih s prirojeno trombofilijo, ki niso preboleli VT. Prikazano je število ogrožajočih okoliščin, ki pri bolnikih niso nujno pripeljale do VT.

Med preiskovanci s prirojeno trombofilijo in prebolelo VT jih je bilo 10 od 15 izpostavljeno več kot enemu sprožalnemu dejavniku za nastanek VT. V skupini 17 preiskovancev s trombofilijo brez prebolele VT sta bila takšna le 2. Razlika je bila statistično značilna ($p = 0,005$).

Potek bolezni pri 3 bolnicah s pomanjkanjem AT-III.

Prva bolnica je utrpela proksimalno VT, ki se je zapletla s pljučno embolijo, pri 15 letih. Kasneje se je VT še 2-krat ponovila, prvič ob jemanju oralne kontracepcije, drugič ob koncu nosečnosti. Med nosečnostjo je utrpela tudi hemodinamsko pomembno pljučno embolijo. Šele po porodu je bilo ugotovljeno pomanjkanje AT III. Odtlej dobiva trajno zaščito proti strjevanju krvi. Letos je bil pri bolnici brez zapletov narejen splav in sočasna sterilizacija.

Pri drugi, 21-letni bolnici je obsežna VT, ki je zajela spodnjo votlo veno in obe iliakalni veni, prvič nastopila po porodu. Otrok je nekaj dni po rojstvu umrl, domnevno zaradi tromboze ledvičnih žil. V tem času je bilo pri bolnici potrjeno pomanjkanje AT III. Odtlej dobiva zaščito proti strjevanju krvi. Druga nosečnost je potekla brez zapletov, po porodu pa je kljub zaščiti utrpela hemodinamsko pomembno pljučno embolijo.

Tretja, 23-letna bolnica je po rojstvu drugega otroka prebolela poplitealno VT in ob tem hemodinamsko pomembno pljučno embolijo. Tudi pri njej je bil vzrok trombofilije ugotovljen po porodu.

RAZPRAVA

K razumevanju nastanka družinske VT so pripomogla nedavna odkritja genskih napak, ki

so vzrok za prirojeno trombofilijo. Dostopnost novejših laboratorijskih preiskav, s katerimi potrđimo obstoj napake, pomeni bistven napredek pri proučevanju družinskega pojavljanja VT.

V našo raziskavo smo vključili 14 bolnikov z VT in predhodno ugotovljeno prirojeno trombofilijo ter 34 od 58 (59%) njihovih ožjih sorodnikov. Med sorodniki, ki v raziskavi niso sodelovali, je bilo največ sorojencev. Izkušnje s podobnimi raziskavami kažejo, da je odziv staršev in otrok mnogo boljši kot odziv sorojencev. Ne smemo prezreti dejstva, da bi morebitno odkritje genske napake predstavljalo nekaterim preiskovancem breme, ki so se mu z nesodelovanjem raje izognili.

Najpogostejša oblika prirojene trombofilije v naši skupini bolnikov z VT je bila APC-R, ki smo jo ugotovili pri 11 od 14 bolnikov (78%). Ugotovitev, da so vsi naši bolniki utrpeli VT spodnjega uda, da nihče ni imel VT na neobičajnem mestu, da je bila njihova povprečna starost ob prvi VT 39 let in da se je bolezen le v dveh primerih zapletla s pljučno embolijo, je povsem v skladu s pričakovanjem o klinični manifestaciji te oblike prirojene trombofilije (5, 35, 36). Pri 6 od 11 (55%) bolnikov je bil ob prvem pojavu VT prisoten sprožilni dejavnik. Tudi drugi raziskovalci navajajo, da je dobra polovica VT pri bolnikih z APC-R sekundarne narave. Kot najpogostejši sprožilni dejavnik so opisani: oralna kontracepcija, nosečnost, poškodba in operacija (37). Ocenjujejo, da vsaka tretja ženska z APC-R utрпи VT med nosečnostjo ali po porodu (38). V Leidenski raziskavi (39) so ugotovili, da uporaba oralne kontracepcije pri nosilkah APC-R povečuje tveganje za nastop VT za 35-krat. Domnevajo, da tako APC-R kot tudi oralni kontraceptivi zmanjšujejo zaviralno delovanje beljakovin C in S. Med bolniki z APC-R so trije doživeli ponovno VT. Zaenkrat ni znano, ali je prisotnost APC-R povezana s povečanim tveganjem za ponovno VT (40). Presenetljiva je ugotovitev, da je ena od bolnic utrpela tudi periferno arterijsko trombozo. V literaturi nismo zasledili podatka o povezavi med prisotnostjo APC-R in arterijsko trombozo.

APC-R smo odkrili pri 12 (52%) od 23 sorodnikov bolnikov z APC-R. Med njimi ni nihče prebolel VT. Ugotovili smo, da so bili

bolniki s prebolelo VT trikrat pogosteje izpostavljeni dejavnikom tveganja. Med bolniki s prirojeno trombofilijo, ki so preboleli VT, je bilo v primerjavi s tistimi osebami s trombofilijo, ki VT niso doživele, več takih, ki so bili sprožilnim dejavnikom izpostavljeni več kot enkrat ($p = 0,005$).

Pomanjkanje AT III je sicer redkejši vzrok trombofilije kot APC-R, vendar je spričo tega, da povzroči hujšo klinično sliko, zelo pomembno (41, 42). Pomanjkanje AT III smo odkrili pri 3 od 14 bolnikov; vse so bile ženske. Za pomanjkanje AT III je značilno, da 50% bolnikov doživi VT že pred 25. letom starosti in da je VT v 30–50% sekundarna. Najpogostejša sprožilna dejavnika za klinične manifestacije pomanjkanja AT III sta nosečnost in porod. Tudi oralna kontracepcija povečuje tveganje za VT. Pri polovici bolnikov s pomanjkanjem AT III se VT ponovi (43–45). Tudi pri naših bolnicah so se opisane klinične manifestacije izrazile v polni meri.

V družinah bolnikov s pomanjkanjem AT III smo pregledali 11 (79%) od 14 še živih sorodnikov. Trije so imeli zmanjšano vrednost AT III, kar daleč presega razširjenost pojavljanja te napake v zdravi populaciji (46). Med njimi je bil preiskovanec, ki je v starosti 59 let prebolel prvo VT, ki se je enkrat ponovila. Sprožilnega dejavnika za VT nismo ugotovili.

Naša opažanja, da so klinične manifestacije VT ob pomanjkanju APC-R bistveno milejše od tistih, ki jih doživljajo bolniki s pomanjkanjem AT III, so skladne s podatki iz literature. Pomanjkanje AT III je med vsemi doslej znanimi prirojenimi oblikami trombofilije povezano z najtežjo klinično sliko (41–43). Posebej so ogrožene ženske v zvezi z nosečnostjo, porodom in uporabo oralne kontracepcije.

Primerjava bioloških značilnosti med skupino bolnikov z VT in preiskovanci, ki VT niso utrpeli, ni pokazala razlik. Tudi primerjava hematoloških in hemostatskih testov med skupinama ni odkrila razlik. Edino izjemo je predstavljalo podaljšanje časa evglobulinske lize pri bolnikih z VT. Pri bolnikih je bil čas podaljšanja evglobulinske lize daljši kot pri osebah, ki VT niso utrpeli ($p = 0,06$). Čas evglobulinske lize omogoča oceno glo-

balne fibrinolitične aktivnosti krvi, ni pa specifičen za posamezne komponente fibrinolitičnega sistema. Zaenkrat zmanjšanje fibrinolitične aktivnosti krvi ni opredeljeno kot dejavnik tveganja za nastanek VT.

Očitno je, da prisotnost trombofilije sama po sebi še ne pomeni, da bo oseba utrpela VT, nedvomno pa poveča tveganje za njen nastop. Dejstvo, da bolezen nastopa občasno, kaže na to, da je za razvoj VT pogosto potreben še dodatni sprožilni dejavnik. Med našimi bolniki se je izkazalo, da je bil le-ta 3-krat pogosteje prisoten pri bolnikih, ki so razvili VT. Glede na ugotovitev, da utrpijo osebe s prirojeno trombofilijo, predvsem pa osebe s pomanjkanjem AT III, pogoste in hude zaplete tudi ob okoliščinah, ki jim ne pripisujemo velike verjetnosti za nastop VT, nas sili k uvajanju preventivnih ukrepov tudi v teh primerih. To še posebej velja za ženske v rodnem obdobju. Za farmakološke preventivne ukrepe pred nastankom VT se odločamo v poporodnem obdobju, ko je ogroženost zaradi VT tudi največja. Nerešeno je vprašanje, ali smejo ženske s prirojeno trombofilijo uporabljati oralno kontracepcijo. Zagotovo lahko trdimo, da jo odsvetujemo bolnicam s pomanjkanjem AT III, predvsem zaradi možnosti resnih zapletov, ki se pojavljajo ob tej obliki prirojene trombofilije. Uporaba kontracepcijskih tablet, ki vsebujejo tretjo generacijo progestagenov, je relativno tveganje za pojav VT zmanjšala na 2,2–3,8-krat v primerjavi z 8,7-krat večjim tveganjem pri uporabi progestagenov druge generacije (47). V primeru, da je pri uporabnici oralne kontracepcije iz nekega drugega razloga indicirana antikoagulacijska zaščita, pa se hkratna uporaba obeh zdravil zaenkrat zdi varna (29).

ZAKLJUČKI

Na osnovi izvedene raziskave lahko odgovorimo na vprašanja, ki smo jih zastavili v uvodu.

1. Prirojeno trombofilijo smo odkrili pri 15 od 34 sorodnikov. Med sorodniki z APC-R nihče ni prebolel VT, med sorodniki s pomanjkanjem AT III je ena oseba utrpela VT. Pri 2 sorodnikih, ki sta doživela VT, nismo odkrili trombofilije.

2. Po bioloških lastnostih in merjenih hemostatskih in hematoloških parametrih se bolniki z VT niso razlikovali od oseb, ki VT niso preboleli.
3. Bolniki s prirojeno trombofilijo in VT so bili 3-krat pogostejše izpostavljeni dejavnikom tveganja za nastop VT kot njihovi sorodniki s prirojeno trombofilijo, ki niso utrpeli VT. Delež bolnikov z VT, ki so bili izpostavljeni več kot 1 dejavniku tveganja, je bil značilno višji od deleža preiskovancev s trombofilijo, ki VT niso preboli ($p = 0,05$).

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Poloni Peternel se zahvaljujeva za strokovno pomoč in vodenje pri nastajanju naloge.

Višji medicinski sestri Brigiti Valenčič in drugim sestram hvala za pomoč pri delu s preiskovanci.

Vsem v laboratoriju iskrena hvala za opravljene laboratorijske teste in potrpežljivost.

Dr. Mojci Stegnar hvala za koristne napotke.

Dr. Alešu Blincu hvala za pomoč pri prevajanju v angleščino.

Dr. Alenki Mavri hvala za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Vsem preiskovancem iskrena hvala za sodelovanje.

Biserki Hrnčič se iskreno zahvaljujeva za potrpežljivo odpravljanje slovničnih napak.

Jelki hvala, ker je bila vedno na voljo.

Najinim staršem najlepša hvala za vzpodbudo in pomoč.

Tebi, Jaka, hvala za potrpežljivost. Saj več.

LITERATURA

1. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-30.
2. Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlback B. Thrombembolic disease - critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992; 68: 7-13.
3. Taberner MD, Tomas JF, Alberca I, Orfao A, Borrasca AL, Vicente V. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am J Hematol* 1991; 36: 249-54.
4. 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 increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
5. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Bulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited Thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76: 824-34.
6. Winter JH, Fench A, Ridlery W: Familial antithrombin III deficiency. *QJM* 1982; 51: 373.
7. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Bulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited Thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
8. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. *Overview of hemostasis*. In: Collman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW eds. *Haemostasis and Thrombosis - basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott Company; 1994. p. 3-18.
9. Comp PC. *Hereditary disorders predisposing to thrombosis*. In: Coller BS ed. *Progress in Haemostasis and Thrombosis*, New York: Grune & Stratton, 1986. p. 71-102.
10. Zolton RP, Seegers WH: Autoprothrombin II-A: Thrombin removal and mechanism of induction of fibrinolysis. *Thromb Res* 1973; 3: 23.
11. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, Saito H, Sala N, Witt I, Cooper D. Protein C deficiency: A database of mutations 1995 update. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876-89.
12. Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1995; 74: 81-9.
13. Broeckmans AW, Bertina RM, Reinalda-Poot J. Hereditary protein S deficiency and venous thrombembolism - a study of three Dutch families [Abstract]. *Thromb Haemost* 1985; 53: 273.
14. Walker FJ: Regulation of activated protein C by a new protein - a possible function for protein S [Abstract]. *J Biol Chem* 1980; 255: 5521.
15. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268: 2872-7.
16. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2728-32.
17. Koopelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BM. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: Evidence for specific binding of protein S to Factor VIII. *Blood* 1995; 86: 1062-71.

18. Dahlback B, Lundwall a, Stenflob: Amino acid sequence of bovine protein S [Abstract]. *Thromb Haemost* 1985; 54: 56.
19. Watkins PC, Eddy R, Fukushima Y, Byers MG, Cohen EH, Dackowski WR, Wydro RM, Shows TB. The gene for protein S maps near the centromere of human chromosome 3. *Blood* 1988; 71: 238–41.
20. Comp PC. Laboratory evaluation of protein S status. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16: 177–81.
21. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannuci PM. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thromb Hemost* 1993; 70: 1067–71.
22. Coller BS, Horowitz D, Comp PC. Association of plasma protein S deficiency with extensive arterial, as well as venous thrombosis [Abstract]. *Blood* 1985; 66 (Suppl): 348.
23. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C. Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503–6.
24. Rees DC, Coxs M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133–4.
25. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989–93.
26. Cvelbar-Marinko T, Goršič-Tomažič K. *Pogostost neodzivnosti na aktivirani protein C pri bolnikih z venko trombozo*. Prešernova naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1995.
27. Dahlback B, Zoller B, Hillarp A. Inherited resistance to activated protein C caused by presence of the FV: Q506 allele as a basis of venous thrombosis. *Haemostasis* 1996; 26 (4): 301–314.
28. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance) [Abstract]. *Blood* 1995; 85: 1504.
29. Hirsh J, Prins H, Samama M. *Approach to the thrombophilic patient for hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. In: Colman RW, Hirsh J, Marder WJ, Salzman EW eds. Hemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice. Philadelphia: Lippincot Company; 1994. p. 1543–61.
30. Coller BS, Owen J, Jesty et al. Deficiency of plasma protein S, protein C or antithrombin III and arterial thrombosis [Abstract]. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 456.
31. Simioni P, Zanardi S, Saracino A et al. Occurrence of arterial thrombosis in a cohort of patients with hereditary deficiency of clotting inhibitors [Abstract]. *J Med* 1992; 23: 61.
32. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer. Trousseau's sindrom revisited [Abstract]. *Blood* 1983; 62: 14.
33. Hyers TM, Hull RD, Weg JG. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. *Chest* 1995; 108: 335S–51S.
34. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogenes. *Acta Haematol* 1957; 17: 237–46.
35. Martinelli I, Faioni EM, Monzani ML, Manucci PM. Inherited resistance Tto activated protein C (APC): clinical and laboratory features [Abstract]. *Blood* 1994; 84: 84.
36. Rosenthall L, Herba MJ, Leclerc JR. *Diagnosis of pulmonary embolism*. In: Leclerc JR ed. Venous thromboembolic disorders. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 229–66.
37. Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94: 2521–4.
38. De Stefano V, Mastrangelo S, Paciaroni K, Erland H, Lein DA, Scirpa P, Bizzi B, Leone G. Thrombotic risk during pregnancy and puerperium in women with APC-resistance. Effective subcutaneous heparin in prophylaxis in a pregnant patient. *Thromb Haemost* 1995; 74: 793–4.
39. Helmerhorst FM, Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives and thrombotic disease: Risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997; 78: 327–33.
40. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor V R506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 483–88.
41. Briet E, Engesser L, Brommer EJP, Broekmans AW, Bertina RM. Thrombophilia: Its causes and a rough estimate of its prevalence [Abstract]. *Thromb Haemost* 1987; 58: 39.
42. Taberner MD, Tomas JF, Alberca I, Orfao A, Lopez Borrasca A, Vincente V. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am J Hematol* 1991; 36: 249–54.
43. Finazzi G, Barbui T. Different incidence of venous thrombosis in patients with inherited deficiencies of antithrombin III, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1994; 71: 15–8.
44. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin III deficient person. Report of the large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116: 754–61.
45. Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Haematol* 1981; 10: 369–90.
46. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Carrel RW, Islam SIA, McCall F, Mitchell R, Davidson JF. Prevalence of antithrombin III deficiency subtypes in 4000 healthy blood donors [Abstract]. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 893.
47. Felix JM, van der Meer, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR. The Leiden thrombophilia study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 631–5.