

Pogostost neodzivnosti na aktivirani protein C pri bolnikih z vensko trombozo*

Incidence of activated protein C resistance among patients with deep vein thrombosis*

Tanja Cvelbar Marinko**, Karmen Goršič Tomažič***

Ključne besede
tromboflebitis
beljakovina C
parcialni tromboplastinski čas

Key words
trombophlebitis
protein C
partial thromboplastin time

Izvleček. Pri 100 zaporednih bolnikih, ki so se zaradi venske tromboze zdravili na Interni kliniki Trnovo v obdobju med januarjem 1992 in decembrom 1994, smo iskali novo obliko trombofilije – neodzivnost na aktivirani protein C. Med njimi je bilo 40 žensk in 60 moških, starih od 16 do 60 let ($x=39$). Zaradi primarne venske tromboze se je zdravilo 38 bolnikov (18% žensk, 82% moških). Sekundarno vensko trombozo je imelo 62 bolnikov, med njimi je bilo 53% žensk in 47% moških. Pri 32% bolnikov se je pojavljala venska tromboza v družini, 79% bolnikov se je zdravilo zaradi prve, ostali pa zaradi ponovne venske tromboze. Za določanje neodzivnosti na aktivirani protein C smo izračunavali razmerje med aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom ob dodatku aktiviranega proteina C in brez njega. Spodnjo mejo normalne vrednosti smo določili z meritvijo razmerja aktiviranega proteina C pri 100 zdravih osebah, ki so po spolu in starosti ustrezale bolnikom z vensko trombozo ($x \pm 2$ SD). Osebe, ki so imele razmerje aktiviranega proteina C pod 2,0, smo označili kot neodzivne na aktivirani protein C. Pri določanju neodzivnosti na aktivirani protein C smo zaradi jemanja kumarinov izključili 20 bolnikov, zaradi prisotnosti lupusnih antikoagulantov pa 9 bolnikov. Med 71 preostalimi bolniki smo odkrili neodzivnost na aktivirani protein C pri 10 (14%) bolnikih (6 žensk, 4 moški) za razliko od 3 (3%) moških med kontrolnimi osebami ($p < 0,05$). Odkrili smo tudi 1 bolnika s pomanjkanjem antitrombina III in 2 bolnika s pomanjkanjem proteina C. Nihče od njih ni imel sočasne neodzivnosti na aktivirani protein C. Nismo odkrili povezave med neodzivnostjo na aktivirani

Abstract. A group of 100 consecutive patients treated for deep vein thrombosis in the Trnovo Hospital of Internal Medicine from January 1992 to December 1994, was studied for the presence of a new type of thrombophilia – resistance to activated protein C. There were 40 women and 60 men, aged 16 to 60 years ($x=39$). Primary deep vein thrombosis was established in 38 patients (18% women, 82% men), and secondary deep vein thrombosis in 62 patients (53% women, 47% men). Thirty-two per cent of patients had a positive family history; 79 per cent were treated for the first episode of deep vein thrombosis and the remainder for recurrent episodes. Resistance to activated protein C was determined using a ratio between activated partial thromboplastin time with purified activated protein C and activated partial thromboplastin time without activated protein C. The lower normal limit was determined by measuring the activated protein C ratio in 100 sex and age matched healthy subjects (mean minus 2 SD). Subjects with an activated protein C ratio less than 2,0 were considered resistant to activated protein C. Twenty patients were excluded from the study because of anticoagulant treatment, and 9 because of the presence of lupus anticoagulants. Activated protein C resistance was established in 10 (14%) of the remaining 71 patients (6 women and 4 men). In the control group, the prevalence of activated protein C resistance was 3 per cent (3 men) ($p < 0,05$). One patient showed antithrombin III deficiency, and 2 patients protein C deficiency, but none of them had activated protein C resistance. There were no association between activated protein C

*Objavljeno je delo, ki je bilo nagrajeno s Prešernovo nalogo za študente v letu 1997.

**Tanja Cvelbar Marinko, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

***Karmen Goršič Tomažič, štud. med., Interna klinika Trnovo, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

protein C in primarno oz. sekundarno vensko trombozo, družinskim pojavljanjem venske tromboze ter prvo oz. ponovno vensko trombozo. Rezultati naše raziskave kažejo, da je neodzivnost na aktivirani protein C pogost, samostojen dejavnik tveganja za nastanek venske tromboze.

resistance and primary or secondary deep vein thrombosis, positive family history and first or recurrent episodes of the disease. The results of the study indicate that activated protein C resistance is a frequent independent risk factor for deep vein thrombosis.

Uvod

Že leta 1856 je 24-letni Rudolf Virchow predpostavil, da so za nastanek tromboze ključni trije dejavniki: poškodba žilne stene, zastoj krvi in nagnjenje k pospešenemu strjevanju krvi (1). Čas ni v ničemer omajal pomena znamenite Virchow triade. Izkazalo se je, da je poškodba žilne stene pomembna predvsem pri razvoju arterijske tromboze, v razvoju venske tromboze (VT) pa sta odločilnejša dejavnika zastoj krvi in motnje koagulacije. Slednje so v zadnjem času predmet živahnega raziskovanja. Z odkritjem okvar koagulacijskih faktorjev je uspelo pri določenem deležu bolnikov razjasniti izvor VT. To je privedlo do presenetljivega spoznanja, da je VT v nekaterih primerih genska bolezen. Pozornost raziskovalcev vzbujajo predvsem tisti bolniki, ki brez vidnega sprožilnega dejavnika utrpijo VT, kakor tudi tisti, pri katerih nastopa VT v družini. Odkrivanje nepravilnosti koagulacije pri bolnikih z VT ni pomembno samo s stališča diagnostične opredelitve, temveč vpliva tudi na odločanje o preprečevanju in zdravljenju boleznih (2).

Trombofilija

Trombofilija je stanje povečane nagnjenosti k VT, ki je lahko prirojeno ali pridobljeno (3). Pogostost prirojene trombofilije med zdravimi je 1/2500 do 1/5000 in je tako večja od hemofilije (4). Klinično najpomembnejše dedne oblike trombofilije so pomanjkanja antitrombina III (ATIII), proteina C (PC), proteina S (PS) in nedavno odkrita neodzivnost na aktivirani protein C (NAPC). Vzroki pridobljene trombofilije so različni: maligne bolezni, nefrotski sindrom, mieloproliferativni sindrom, paroksizmalna nočna hemoglobinurija, kemoterapija, hormonsko zdravljenje z estrogeni, prisotnost antifosfolipidnih protiteles ter zmanjšana fibrinolitična aktivnost krvi. Pomanjkanja ATIII, PC in PS skupaj predstavljajo le 3–16 % dednih tromboz (3). Pomanjkanje oz. nepravilnosti faktorjev, ki uravnavajo hemostazo samo po sebi, ni nujno povezano z nastankom VT, saj srečujemo nosilce teh prirojelih motenj tudi med navidezno zdravimi osebami (5).

Pomanjkanje antitrombina III

Pomanjkanje ATIII je odkril Egeberg leta 1965 in tako prvi potrdil povezavo med to motnjo koagulacije in VT (6). ATIII je najpomembnejši naravni zaviralec koagulacije. V plazmi zavira nastajanje trombina in drugih serinskih proteinaz, ki sodelujejo v intrinzični poti koagulacije (5). Nastaja v jetrih in endotelijskih celicah (7). Prirojeno pomanjkanje ATIII se deduje avtosomno dominantno in ga najdemo pri 5 % bolnikov z VT ob odsotnosti dejavnikov za nastanek VT (8).

Pomanjkanje proteina C

Pomanjkanje PC so odkrili leta 1981 (9). PC je od vitamina K odvisna plazemska beljakovina, ki sodi v skupino serinskih proteinaz. Ključna je njegova vloga pri zaviranju koagulacije. Nastaja v jetrih, v Leidigovih celicah testisov in v epididimisu (10). Pomanjkanje PC ugotavljamo pri 5 % bolnikov z dedno trombofilijo (8). Vse opisane odrasle osebe s pomanjkanjem PC so heterozigoti. Homozigotnost je zelo redka (10). Pri tej skupini bolnikov se pokaže fiziološki pomen PC v vsej svoji dramatičnosti. Povezana je z razvojem sindroma purpure fulminans kmalu po rojstvu, ki se praviloma konča s smrtjo (11).

Pomanjkanje proteina S

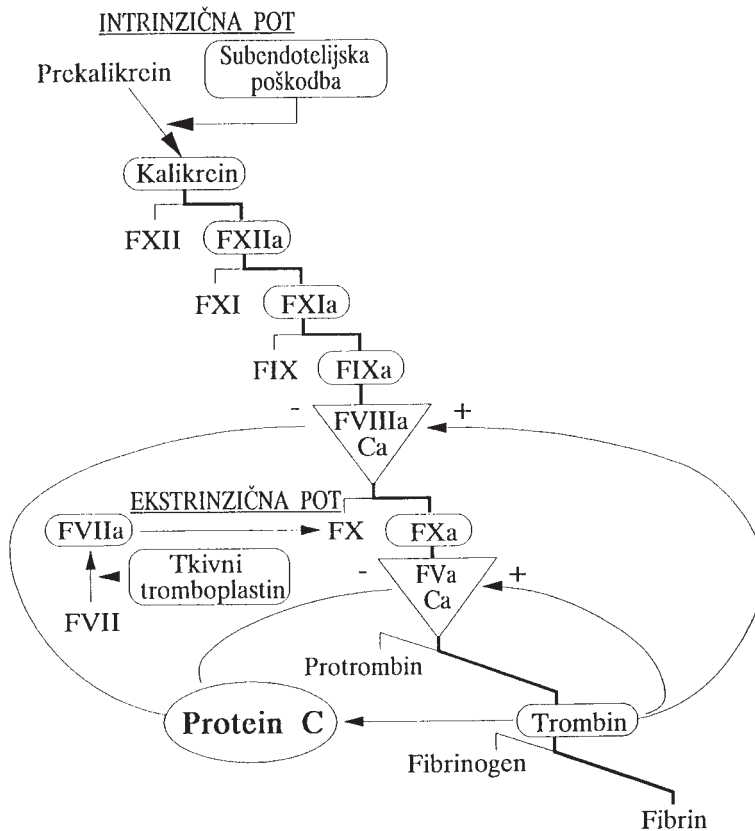
PS je od vitamina K odvisni kofaktor, ki omogoča delovanje aktiviranega PC (APC). Pomanjkanje PS so prvič opisali leta 1984 (5). Med bolniki z venko trombozo se pojavlja enako pogosto kot pomanjkanje PC (10).

Antifosfolipidna protitelesa

V skupino antifosfolipidnih protiteles uvrščamo lupusne antikoagulate (LA) in antikardiolipinska protitelesa. LA vplivajo na tiste koagulacijske teste, ki so odvisni od fosfolipidov, kot je na primer aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ). Antifosfolipidna protitelesa najdemo v številnih okoliščinah: pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, malignimi boleznimi, infekcijskimi boleznimi ter v povezavi z jemanjem številnih zdravil. Mehanizem, preko katerega sodelujejo pri nastanku VT, še ni dokončno pojasnjen (5).

Upravljanje koagulacije krvi preko povratne zanke proteina C

Z aktiviranjem niza koagulacijskih faktorjev, ki je natančno uravnano s kofaktorji in zaviralci, nastane osrednji encim koagulacijskega sistema – trombin. Ključni dogodek v koagulaciji krvi je pretvorba fibrinogena v fibrin pod vplivom trombina. Trombin nastane iz protrombina po dveh poteh. Intrinzična pot se začne z aktivacijo faktorja XII, za sprožitev ekstrinzične poti pa je potreben tkivni tromboplastin, ki se sprosti iz poškodovanega tkiva. Pomanjkanje zaviralcev koagulacije ima za posledico nenadzorovano nastajanje trombina in s tem tudi fibrina (12). Trombin ni le sestavni člen v verigi reakcij, ki vodijo do nastanka fibrinskega strdka, temveč je vpleten tudi v pozitivne in negativne povratne zanke, ki uravnavajo koagulacijo krvi. Preko pozitivne povratne zanke aktivira faktorja V in VIII in na ta način pospešuje koagulacijo krvi. V fizioloških pogojih pa to ni njegova edina naloga, saj pomembno vpliva tudi na zaviranje koagulacije (10). Z vezavo na trombomodulin, ki je receptor za trombin na površini endotelijskih celic, trombin aktivira PC (APC) in povzroči proteolizo faktorjev Va in VIIIa, ki sta vezana na površini trombocitov (13). Ta niz reakcij predstavlja negativno povratno zanko. Za delovanje APC sta nujno potrebna dva kofaktorja, PS in faktor V, ki delujeta vzajemno. Več kot polovica PS je v plazmi vezanega na C4b-vezavni protein, sestavni del komplementa. Ostali del, približno 40 %, v plazmi ni vezan in le-ta deluje kot kofaktor APC. Mehanizem, preko katerega PS sodeluje z APC, do sedaj še ni pojasnjen. Tako je koagulacijsko stanje odvisno od ravnotežja med aktivacijo in proteolizo faktorjev V in VIII, ki ga uravnava pozitivna in negativna povratna zanka preko APC (10) (slika 1).

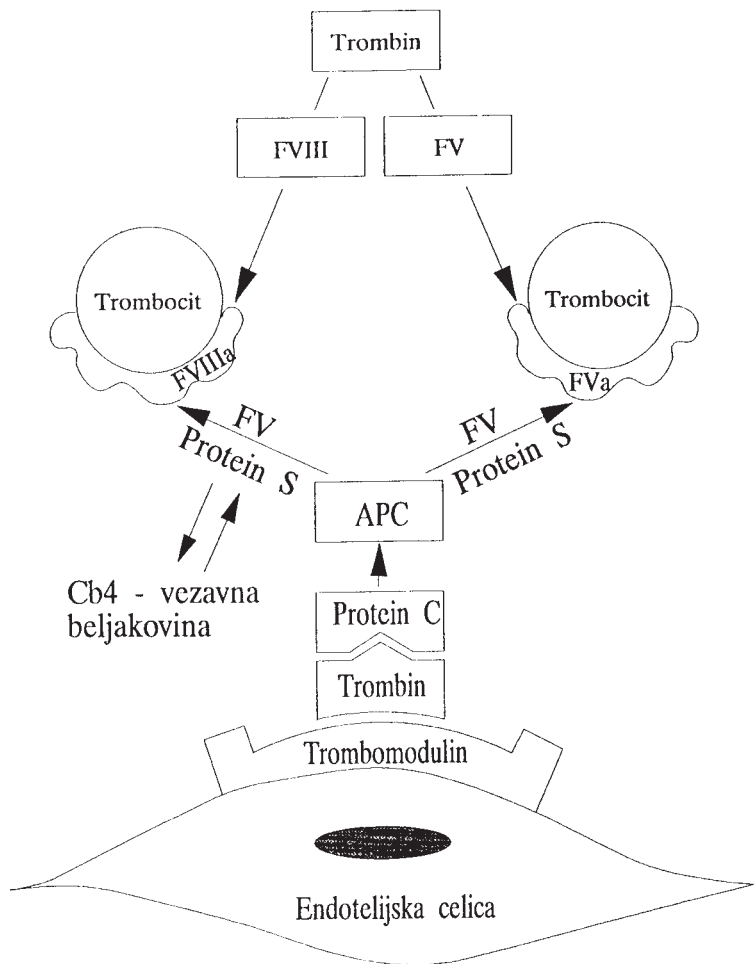


Slika 1. Pozitivna (+) in negativna (-) zanka trombina. Negativna povratna zanka poteka preko proteina C. (Modificirana shema po Matzsch T. Low molecular weight heparin. Animal experiments and clinical studies. Doctoral Dissertation, Malmö 1990.)

Neodzivnost na aktiviran protein C

Še do nedavnega je bil vzrok za nastanek večine primarnih VT kakor tudi tistih, ki se pojavljajo družinsko, nepojasnen. Leta 1993 pa je Dahlback odkril novo obliko dedne trombofilije, ki jo je poimenoval neodzivnost na aktivirani protein C (NAPC) (14). To odkritje je odprlo novo poglavje v proučevanju prirojene trombofilije. Izkazalo se je, da ima odkritje izreden klinični pomen, saj je NAPC kar 5–10-krat pogostejša kot vse doslej znane dedne oblike trombofilije (15) (slika 2).

Odkritje NAPC je plod skrbne laboratorijske obdelave bolnika s ponavljajočimi se VT. V nasprotju s pričakovanim odgovorom se po dodatku APC aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ) bolnikove plazme ni podaljšal. APC v normalnih okoliščinah pov-



Slika 2. Mehanizem delovanja proteina C. (Modificirana shema po Bauer KA. Hypercoagulability – a new cofactor in the protein C anticoagulant pathway. N Engl J Med 1994; 24: 566–7.)

zroči inaktivacijo faktorjev Va in VIIIa, kar se kaže s podaljšanjem koagulacijskega časa. Dahlback je predpostavil, da gre za nepravilni odgovor plazme na dodani APC zaradi prisotnosti nekega, tedaj še neznanega faktorja. S preučevanjem štirih družin, v katerih se je VT pojavljala v več generacijah, je dokazal, da se NAPC deduje avtosomno dominantno ter da je povezana z nastankom VT. Predpostavil je, da APC za razgradnjo faktorjev Va in VIIIa potrebuje še kofaktor (14). Že leta 1994 je Dahlback iz normalne plazme izoliral beljakovino, ki je normalizirala odgovor bolnikove plazme na APC. Izkazalo se je, da gre za faktor V (16).

Dahlbackovo odkritje je izzvalo izredno zanimanje. Številni raziskovalci so začeli proučevati NAPC. Še istega leta je Bertina s sodelavci odkril, da je NAPC posledica točkaste mutacije v genu za faktor V, zamenjave arginina 506 z glutaminom (17). Po kraju odkritja so gen poimenovali faktor V Leiden. Mutacija je na mestu, kjer APC cepi aktivirani faktor V in ga s tem inaktivira. Ta ugotovitev pojasnjuje povezanost NAPC z nastankom VT, saj je mutirani faktor V neodziven na APC, hkrati pa ohrani svojo normalno vlogo v koagulaciji krvi (18).

Dahlbackovo odkritje pomeni velik zasuk v razumevanju vloge trombofilije pri nastanku VT. Začetne epidemiološke raziskave so pokazale, da je NAPC pogosta med bolniki z VT, odkrijemo pa jo tudi pri nekaterih zdravih osebah. Nedvomno je odkrivanje NAPC prva obveza v diagnostiki trombofilije.

Namen naloge

V nalogi smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

- Kako pogosta je neodzivnost na aktivirani protein C pri naših bolnikih z VT?
- Ali je neodzivnost na aktivirani protein C povezana z biološkimi lastnostmi, kot so spol, starost in telesna gradnja?
- Ali je neodzivnost na aktivirani protein C povezana z značilnostmi VT kot so prva ali ponovna VT, primarna ali sekundarna VT in družinska VT?

Preiskovanci in metode

Preiskovanci

Bolniki

V raziskavo smo vključili 100 zaporednih bolnikov, ki so se v obdobju od januarja 1992 do decembra 1994 zdravili na Interni kliniki Trnovo zaradi venske tromboze udov. Med njimi je bilo 60 moških, starih od 16 do 60 let ($x = 42$) in 40 žensk, starih od 16 do 58 let ($x = 36$). Pri vseh preiskovancih je bila VT potrjena vsaj z eno izmed diagnostičnih metod: ultrazvočno (UZ) preiskavo (CW Doppler ali dvojni ultrazvočni prikaz ven), impedančno pletizmografijo, izotopsko ali rentgensko venografijo.

Preiskovanci so bili seznanjeni s cilji in načinom izvedbe naloge. S podpisom pristopne izjave so potrdili svoje prostovoljno sodelovanje.

Kontrolna skupina

V primerjalno skupino smo vključili 100 naključno izbranih, zdravih prostovoljcev, ki so po spolu in starosti ustrezali bolnikom. Pogoj za vključitev v kontrolno skupino je bila odsotnost VT v anamnezi kakor tudi podatek, da preiskovanec ne jemlje antikoagulacijske zaščite. Nobena preiskovanka ni uporabljala oralnih kontraceptivov ali nadomestnega zdravljenja z estrogeni. Nihče od kontrolnih preiskovancev ni bil v sorodu z bolniki.

Anamneza in klinični pregled

Anamneza

Bolnike smo povprašali o družinskem pojavljanju venske tromboze – ločeno za bližnje (starši, bratje, sestre, otroci) in daljne (stari starši, tete, strici, sestrične, bratrance) sorodnike.

V anamnezi smo zbirali podatke o možnih sprožilnih dejavnikih za nastop VT. Mednje smo uvrstili ležanje od 7 do 60 dni, poškodbo zgornjih ali spodnjih udov, imobilizacijo uda ter večjo operacijo znotraj šestih tednov pred nastopom VT. Poleg tega smo upoštevali kot sprožilni dejavnik še kronično srčno popuščanje, malignom, predhodna obsevanja, kemoterapijo ter sistemski lupus eritematodes. Pri ženskah smo šteli za sprožilni dejavnik tudi nosečnost, poporodno obdobje, splav, uporabo oralne kontracepcije in nadomestno hormonsko zdravljenje. V primeru, da smo odkrili prisotnost dejavnikov tveganja, smo šteli VT za sekundarno, če teh dejavnikov ni bilo, smo jo šteli za primarno. Vse bolnike smo povprašali o jemanju kumarinov.

Klinični pregled

Preiskovancem smo izmerili obseg pasu in bokov, s čimer smo ocenili razporeditev telesnega maščevja, z indeksom telesne teže pa smo ocenili stanje prehranjenosti (BMI).

Odvzem krvi in priprava vzorcev

Odvzem krvi

Kri smo jemali zjutraj med sedmo in deveto uro spočitim in teščim preiskovancem. Pred odvzemom so sede počivali 15 minut. Kri smo odzemale iz komolčne vene brez preveze nadlakti.

Priprava vzorcev

Za teste hemostaze smo odvzeli vsakič po 18 ml krvi v ohlajeni epruveti s 3,8 % Na-citratom v razmerju 9 : 1. Za določitev t-PA smo odvzeli 4,5 ml krvi v epruveto z nakisanim Na-citratom (Stabilyte, Biopool, Švedska). Do centrifugiranja smo vse tri epruvete shranili v ledeno kopel.

Plazmo za določanje testov hemostaze smo pripravili s 30 minutnim centrifugiranjem citratne krvi pri 2000 g in temperaturi 4 °C. Plazmo smo razdelili, jo zamrzili v tekočem dušiku in do analiz shranili pri –70 °C.

Laboratorijske preiskave

Preiskave koagulacijskega sistema

Presejalne koagulacijske preiskave

Vse preiskave smo opravili na mehanooptičnem koagulacijskem aparatu Fibrintimer (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija).

Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ) citratne plazme smo merili s prilagojeno metodo po Proctorju in Rapaportu (26). Intrinzično pot koagulacije smo aktivirali s Patrombinom (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija), ki vsebuje čisti lipidni izvleček človeške posteljice in kaolin. Začetek strjevanja smo sprožili z dodatkom 0,025 M kalcijevega klorida in izmerili čas do nastanka strdka.

Tromboplastinski čas citratne plazme smo merili z metodo po Quicku (27). Rezultat smo umerili z mednarodnim standardom in ga izrazili kot International Normalised Ratio (INR). Fibrinogen smo določali po prirejeni Claussovi metodi (28) z reagenti Multifibren (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija).

Neodzivnost na aktiviran protein C (NAPC)

Neodzivnost na aktivirani protein C (NAPC) smo določali z meritvijo APTČ, najprej ob dodatku aktiviranega proteina C (APC) in nato brez njega (14). Intrinzično pot koagulacije smo aktivirali z dodatkom koloida silike in sintetičnih fosfolipidov (Chromogenix, Molndal, Švedska). Začetek strjevanja smo sprožili z dodatkom 0,025 M kalcijevega klorida najprej v prisotnosti in nato v odsotnosti APC. Merili smo čas do nastanka strdka. Rezultat smo izražali v obliki razmerja med obema časoma in ga poimenovali APC-razmerje (APCr).

$$\text{APCr} = \frac{\text{APTČ z dodatkom APC (s)}}{\text{APTČ brez dodatka APC (s)}}$$

Aktivnost antitrombina III smo določali s kinetično spektrofotometrično metodo (29) po navodilih proizvajalca z reagenti Berichrom Antithrombin III (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija).

Aktivnost proteina C smo določali s spektrofotometrično metodo (30) z reagenti Berichrom – Protein C (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija). Preiskavo smo opravili na aparatu Chromotimer (Behring, Marburg/Lahn, Nemčija).

Statistične metode

Za spremenljivke, ki so se razporejale normalno, smo kot srednjo vrednost uporabili aritmetično sredino, kot merilo variabilnosti pa standardni odklon. Za ostale spremenljivke, ki se niso razporejale normalno, smo kot srednjo vrednost uporabili mediano, kot merilo variabilnosti pa razpon. Za testiranje razlik med skupinami smo uporabili pri normalni porazdelitvi rezultatov Studentov t-test za neodvisne vzorce, pri nenormalni porazdelitvi pa Mann-Whitneyjev test U. Pri atributivnih spremenljivkah smo za testiranje razlik uporabili χ^2 -test. Za primerjavo razlik med skupinami smo uporabili test analize variance (ANOVA) (31).

Pri preizkušanju domnev smo vrednost $p < 0,05$ imeli za statistično značilno.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket Statistika (Stat Soft, ZDA).

Rezultati

Klinični rezultati

Tabele 1–5 prikazujejo klinične značilnosti venske tromboze (VT) pri 100 bolnikih.

Ob nastopu prve VT so bili bolniki stari od 16 do 60 ($x = 39$) let. Moški so bili v poprečju za 6 let starejši od žensk ($p < 0,05$), (tabela 1).

Tabela 1. Starost bolnikov ($x \pm SD$) ob nastopu prve venske tromboze. N – število bolnikov, $*p < 0,05$ pri primerjavi starosti med ženskami in moškimi.

Bolniki	N	leta ($x \pm SD$)
Ženske	40	36 (± 10)*
Moški	60	42 (± 11)*
Skupaj	100	39 (± 11)

Tabela 2 prikazuje anamnestične značilnosti bolnikov.

Tabela 2. Število (N) in odstotki (%) prve in ponovne venske tromboze, primarne in sekundarne venske tromboze in družinsko pogojene venske tromboze pri 40 ženskah in 60 moških. N – število bolnikov, $*p = 0,0006$ pri primerjavi pogostosti primarne venske tromboze pri ženskah in moških

Venska tromboza	Ženske (N, %)	Moški (N, %)	Skupaj (N, %)
	40 (40%)	60 (60%)	100 (100%)
Prva	32 (80%)	47 (78,3%)	79 (79%)
Ponovna	8 (20%)	12 (21,7%)	21 (21%)
Primarna	7 (17,5%)*	31 (31,7%)*	38 (38%)
Sekundarna	33 (82,5%)	29 (48,3%)	62 (62%)
Družinsko pojavljanje	14 (43,8%)	18 (56,2%)	32 (32%)

Tabela 3. Sprožilni dejavniki za pojav sekundarne venske tromboze pri bolnikih obeh spolov. N – število bolnikov.

Sprožilni dejavnik	Skupaj (N, %)	Ženske (N, %)	Moški (N, %)
Poškodba	23 (37%)	7 (21,2%)	16 (55,2%)
Operacija	22 (35,5%)	6 (18,2%)	16 (55,2%)
Imobilizacija	16 (25,8%)	5 (15,2%)	11 (37,9%)
Ležanje	15 (24%)	3 (9,1%)	12 (41,4%)
Malignom	3 (4,8%)	1 (3%)	2 (6,9%)

Tabela 4 prikazuje s spolom pogojene sprožilne dejavnike za nastop VT pri ženskah.

Tabela 4. *Sprožilni dejavniki za nastop sekundarne venske tromboze pri bolnicah. N – število bolnic.*

Sprožilni dejavnik	Bolnice (N, %)
Oralna kontracepcija	14 (42,4 %)
Zdravljenje z estrogeni	4 (12,1 %)
Poporodno obdobje	4 (12 %)
Nosečnost	3 (9,1 %)
Splav	1 (3 %)

Tabela 5. *Lokalizacija venske tromboze po posameznih žilnih odsekih. N – število bolnikov, *p < 0,05 pri primerjavi prizadetosti levega ali desnega spodnjega uda.*

Venska tromboza	Ženske N (%)	Moški N (%)	Skupaj N (%)
Levi spodnji ud	26 (65 %)	40 (66,7 %)	66 (66 %)*
Desni spodnji ud	14 (35 %)	19 (31,7 %)	33 (33 %)*
Proksimalna venska tromboza spodnjega uda	34 (40,5 %)	50 (59,5 %)	84 (84 %)
Distalna venska tromboza spodnjega uda	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (3 %)
Proksimalna in distalna venska tromboza spodnjih udov	0 (0 %)	6 (100 %)	6 (6 %)
Venska tromboza zgornjega uda	5 (71,4 %)	2 (28,6 %)	7 (7 %)

Laboratorijski rezultati

Neodzivnost na aktivirani protein C

Pri vrednotenju NAPC smo upoštevali rezultate 71 bolnikov z VT. Vzrok izključitve pri 20 bolnikih je bilo jemanje kumarinov, pri 9 bolnikih pa prisotnost lupusnih antikoagulantov. Obe stanji že sami po sebi spremenita koagulacijske čase, predvsem APTČ in tromboplastinski čas, kar bi utegnilo vplivati na rezultate APCr. V obdobju, ko smo delali laboratorijske analize, iz tehničnih razlogov nismo uspeli uporabiti prilagojene metode merjenja APCr, ki bi omogočila meritev NAPC tudi ob uporabi kumarinov.

Spodnjo mejo normalnega območja APCr smo izračunali iz vrednosti APCr 100 kontrolnih preiskovancev. Vsako izmerjeno APCr smo najprej logaritmirali. Po logaritmični pretvorbi so vse vrednosti ležale nad ali pod srednjo vrednostjo v okviru 3SD. Spodnjo mejo normalnega območja za APCr smo izračunali tako, da smo določili srednjo vrednost APCr in ji odšteli 2SD.

Vse preiskovance, ki so imeli APCr manjše od 2,0, smo označili kot nosilce NAPC.

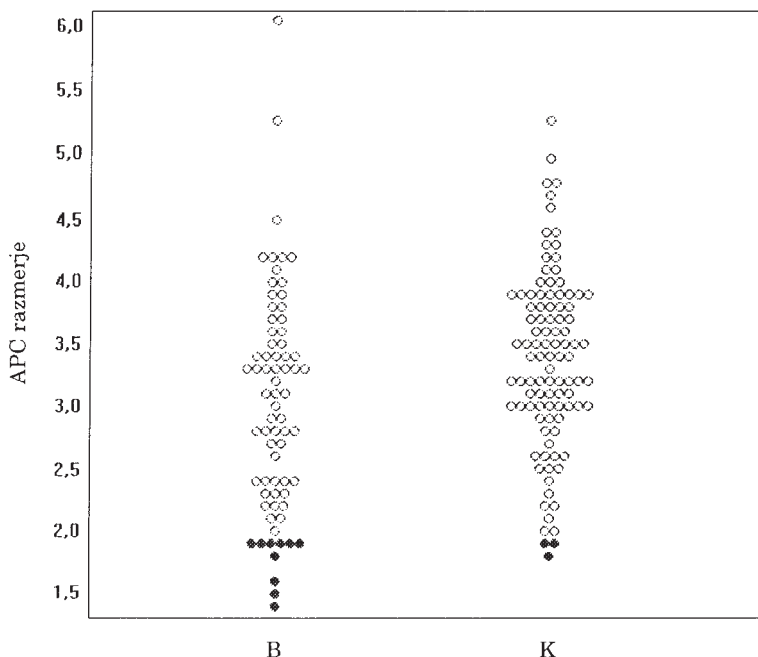
Pri vseh bolnikih smo izmerili tudi ATIII in PC. Vrednosti so bile v okviru referenčnih z izjemo treh bolnikov. Odkrili smo enega bolnika s pomanjkanjem ATIII (0,53 %) in dva bolnika s pomanjkanem PCA (0,37 %, 0,535), vendar nihče od njih ni imel sočasne NAPC.

Tabela 6. Anamnestične značilnosti pri vključenih bolnikih. N – število bolnikov, *p = 0,005 pri primerjavi primarne in sekundarne venske tromboze pri vključenih moških in ženskah.

Venska tromboza	Ženske N (%)	Moški N (%)	Skupaj N (%)
Prva	27 (42,9%)	36 (57,1%)	63 (89%)
Ponovna	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (11%)
Primarna	5 (18,5%)*	22 (81,5%)*	27 (38%)
Sekundarna	23 (52,3%)	21 (47,7%)	44 (62%)
Družinsko pojavljanje	10 (43,5%)	13 (56,2%)	23 (32%)

Pri 10 (14 %) bolnikih z VT smo ugotovili prisotnost NAPC za razliko od le 3 preiskovancev iz kontrolne skupine (p < 0,05), (tabela 8).

Slika 3 prikazuje APCr pri 71 bolnikih z VT in pri 100 kontrolnih preiskovancih.



Slika 3. Neodzivnost na aktivirani protein C (NAPC), podana v razmerju med časom strjevanja z aktiviranim proteinom C (APC) in brez njega. APC-razmerje (APCr) < 2,0 pomeni, da je neodzivnost na aktivirani protein C (počrnjeni krogi) prisotna. B – bolniki, K – kontrole.

Tabela 7. Pogostost neodzivnosti na aktivirani protein C (NAPC) pri bolnikih z vensko trombozo in pri kontrolnih osebah. N – število oseb, NAPC + – bolniki z NAPC, NAPC – – bolniki brez NAPC, * $p < 0,05$ pri primerjavi pogostosti NAPC med bolniki z VT in kontrolnimi preiskovanci.

Skupina	N	NAPC + (%)	NAPC – (%)
Bolniki	71	10 (14 %)*	61 (86 %)
Kontrole	100	3 (3 %)*	97 (97 %)

Povezava neodzivnosti na aktiviran protein C s kliničnimi lastnostmi bolnikov z vensko trombozo

Tabela 8. Pogostost neodzivnosti na aktiviran protein C pri bolnikih z vensko trombozo ločeno po spolu. N – število bolnikov, NAPC + – bolniki z neodzivnostjo na aktiviran protein C, NAPC – – bolniki brez neodzivnosti na aktiviran protein C.

Bolniki	N	NAPC + (%)	NAPC – (%)
Ženske	28	6 (21 %)	22 (79 %)
Moški	43	4 (9 %)	39 (91 %)

NS

Tabela 9. Anamnestične značilnosti bolnikov s prisotno neodzivnostjo na aktiviran protein C. N – število bolnikov, NAPC + – bolniki z neodzivnostjo na aktiviran protein C, NAPC – – bolniki brez neodzivnosti na aktiviran protein C.

Venska tromboza	NAPC + N (%)	NAPC – N (%)	Skupaj N (%)
Prva	2 (20 %)	55 (90,2 %)	57 (80,5 %)
Ponovna	2 (20 %)	6 (9,8 %)	8 (11,3 %)
Primarna	4 (40 %)	23 (37,7 %)	27 (38,0 %)
Sekundarna	6 (60 %)	38 (62,3 %)	44 (62,0 %)
Družinsko pojavljanje	3 (30 %)	20 (32,8 %)	23 (32,4 %)

Večino bolnikov z NAPC smo odkrili v mlajših starostnih skupinah (do 40 let). Pri starejših je bil delež bolnikov z NAPC skromnejši (tabela 10).

Tabela 10. Neodzivnost na aktivirani protein C pri bolnikih z vensko trombozo po starostnih skupinah. N – število bolnikov, NAPC + – bolniki z neodzivnostjo na aktiviran protein C, NAPC – – bolniki brez neodzivnosti na aktiviran protein C.

Starostna skupina (leta)	N	NAPC + (%)	NAPC – (%)
< 30	11	3 (27 %)	8 (73 %)
30–39	17	3 (18 %)	14 (82 %)
40–49	23	2 (9 %)	21 (91 %)
> 49	20	2 (10 %)	18 (90 %)
skupaj	71	10 (14 %)	61 (86 %)

NS

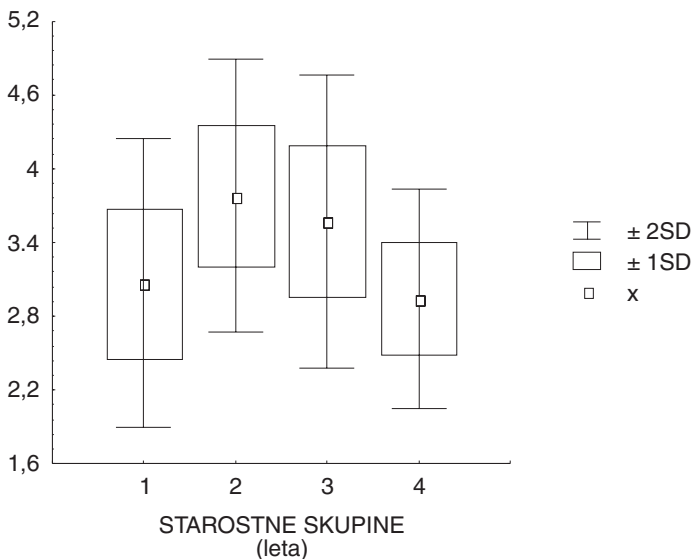
Povezavo prisotnosti NACP z indeksom telesne teže prikazuje tabela 11. Med 10 bolniki z NACP je bil indeks telesne hranjenosti le pri treh nad referenčno vrednostjo, kar kaže, da povečan BMI ni povezan z nastopom NACP.

Tabela 11. Indeks telesne teže (BMI) in neodzivnost na aktiviran protein C pri bolnikih z vensko trombozo. N – število bolnikov, NACP + – bolniki z neodzivnostjo na aktiviran protein C, NACP – – bolniki brez neodzivnosti na aktiviran protein C, BMI > 30 – bolniki s prekomerno telesno težo, BMI < 30 – bolniki z normalno telesno težo, *p < 0,05 pri primerjavi indeksa telesne teže pri bolnikih z neodzivnostjo na aktiviran protein C in brez nje.

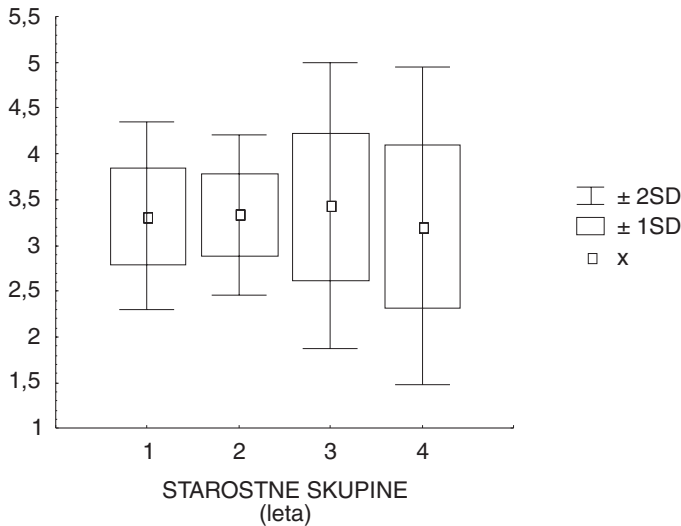
BMI	N	NACP + (%)	NACP – (%)
> 30	44	3 (6,8%)*	41 (93,2%)
< 30	27	7 (25,9%)*	20 (74,1%)
Skupaj	71	10 (14%)	61 (86%)

Aktiviran protein C-razmerje

Za vrednotenje APCr smo upoštevali vseh 100 kontrolnih oseb. Pri ženskah smo ugotovili vpliv starosti na APCr. S starostjo je APCr naraščal in v menopavzi upadal. Nihanje APCr je bilo značilno (p < 0,05), (slika 4). Pri moških nismo ugotovili vpliva starosti na APCr (slika 5).



Slika 4. Aktiviran protein C-razmerje pri kontrolni skupini žensk po starostnih skupinah. V skupini 1 je starost do 30 let, v skupini 2 30–39 let, v skupini 3 40–49 let in v skupini 4 več kot 50 let, p < 0,05 pri primerjavah med skupinami 1, 2, 3, 4.



Slika 5. Aktiviran protein C-razmerje pri kontrolni skupini moških po starostnih skupinah. V skupini 1 je starost do 30 let, v skupini 2 30–39 let, v skupini 3 40–49 let in v skupini 4 več kot 50 let.

Razprava

Odkrivanje bolnikov z NAPC je v sedanjem času prvenstvena zadolžitev strokovnjakov, ki se ukvarjajo s trombofilijo. Ker sta minili od odkritja NAPC šele slabi dve leti, na mnoga vprašanja o kliničnem pomenu te dedne motnje še ni odgovora.

Med našimi bolniki z VT smo odkrili NAPC pri 10 osebah (14%), za razliko od prisotnosti NAPC pri samo 3 kontrolnih preiskovancih (3%) ($p < 0,05$). Med bolniki z VT je tako kar približno 5-krat več oseb z NAPC kot pa v kontrolni skupini.

Podatki o pogostosti NAPC med bolniki z VT v literaturi niso enotni, saj niha pogostost NAPC med posameznimi raziskavami od 12 do 64% (32, 33). Tolikšen razpon pojasnjujejo različni kriteriji pri vključevanju bolnikov v raziskave. O zelo visokem deležu NAPC (52–64%) pri bolnikih z VT poročajo raziskovalci, ki so proučevali samo bolnike s primarno VT (33). V nekatere raziskave so vključili le bolnike, napotene v specializirane ustanove za proučevanje trombotičnih bolezni (34), kar lahko pomeni drugačnost izbora. Razlika v izboru bolnikov obstaja tudi glede lokalizacije VT. V nekatere raziskave so poleg bolnikov z VT udov vključili tudi bolnike z VT nenavadnih lokalizacij, kar pa že samo po sebi opozarja na možnost trombofilije (35). Ob takšnih vključitvenih kriterijih smemo že vnaprej predvidevati večji delež bolnikov z NAPC, kot bi ga dobili, če bi vključili samo bolnike z VT udov. Ti rezultati z našimi niso primerljivi, ker smo se z vključitvijo zaporednih bolnikov z VT udov želeli izogniti pristranskosti.

Druge razlaga za manjšo pogostost NAPC med našimi bolniki z VT pa je možen vpliv geografske specifičnosti. Epidemiološke raziskave kažejo, da je v Evropi pojavnost VT

v splošni populaciji 1/1000 (10), medtem ko je med vzhodnimi narodi zelo nizka (36). Ker je NACP genska motnja, smemo predpostaviti, da se po geografskih področjih različno razporeja. V Sloveniji je do sedaj NACP proučevala le Salobir-Pajničeva, ki je med 30 mladimi ženskami s prebolelo VT, ugotovila NACP pri 12 % bolnic (37). Rezultati te raziskave so skorajda skladni z našimi. V literaturi smo zasledili le nekaj raziskav, ki so glede na vključitvene pogoje primerljive z našimi. Presenetljivo je, da so v večini raziskav na severu Evrope ugotovili večjo prisotnost NACP kot pa v srednjem in južnem delu Evrope. Na Nizozemskem so v veliki Leidenski raziskavi (LETS-Leiden Thrombophilia Study), v katero so vključili 301 zaporednega bolnika z VT, NACP odkrili pri 21 % bolnikov z VT. To je do sedaj nedvomno najpomembnejša raziskava o pogostosti NACP med bolniki z VT (38). Švedi so v raziskavi, ki je zajela 104 preiskovance, odkrili NACP pri 33 % bolnikov z VT (35), Nemci pa so v svoji obsežni raziskavi med 984 bolniki z VT ugotovili 23 % pogostost NACP (39).

Številčno nekoliko skromnejši so podatki o pogostosti NACP v drugih predelih Evrope. Tako opisujejo na Portugalskem med preiskovanimi 66 bolniki z VT 15 % (40), v Franciji 14 % (41), v Italiji 12 % (32), v Avstriji pa 17,5 % (42) pogostost NACP. S temi rezultati je 14 % pogostost NACP pri bolnikih v naši raziskavi skorajda skladna. Podatkov o razporejanju NACP v preostalih evropskih deželah nismo zasledili. Za dokončno potrditev geografskih razlik v pogostosti NACP so seveda potrebne še dodatne raziskave.

V raziskavi smo želeli proučiti tudi morebitne vplive na APCr, ki je določitelj NACP.

O vplivu starosti in spola na APCr so v literaturi številna poročila (35, 38, 43, 44). Koster s sodelavci je sicer našel odvisnost APCr od starosti in spola pri zdravih osebah, vendar razlika ni bila značilna (38). Svensson s sodelavci (35) in Henkens s sodelavci (43) nista odkrila odvisnosti APCr od starosti. Tudi mi nismo odkrili povezave med APCr in spolom. Presenetljiv rezultat naše raziskave pa je ugotovitev, da obstaja nihanje v APCr med starostnimi skupinami kontrolnih preiskovank ($p = 0,02$). APCr pri zdravih preiskovankah s starostjo narašča, v obdobju menopavze pa začne upadati. Ker starostne skupine bolnic številčno niso bile uravnotežene, menopavzalna skupina žensk je bila namreč zelo majhna, bi bilo treba rezultat preveriti na večjem številu žensk v menopavzi. Nakazuje se tudi razlika v APCr zdravih žensk pred 50. letom in po njem ($p = 0,06$). Tako imajo ženske v rodni dobi v povprečju višje APCr kot pa ženske po menopavzi. Med zdravimi moškimi nismo dobili povezave med APCr in starostjo, kar dopušča domnevo o morebitnem vplivu ženskih spolnih hormonov na APCr.

V literaturi srečujemo veliko razprav o vplivu uporabe oralne kontracepcije za tveganje za nastanek VT. Znano je, da je tveganje odvisno od odmerka estrogena (45). Estrogeni v oralnih kontraceptivih povišajo koncentracijo fibrinogena ter koagulacijskih faktorjev II, VII, VIII, IX, X, XI, XII, znižajo pa ATIII in PS (46, 47, 48, 49, 50). Te spremembe vodijo k povečani koagulabilnosti krvi. Henkens s sodelavci je v svoji raziskavi prvi prikazal vpliv oralne kontracepcije na APCr. Pri ženskah, ki so uporabljale oralne kontraceptive, je našel značilno manjše APCr kot pri skupini žensk brez kontracepcijske zaščite. Razliko je pripisal estrogenom (43). Vandenbroucke s sodelavci je preučeval 155 zaporednih premenopavznih žensk, ki so prebolele VT. Ugotovil je, da imajo ženske, ki uporabljajo

oralno kontracepcijo, 3,8-krat večje tveganje za nastanek VT kot pa ženske brez zaščite. Pri ženskah, ki jemljejo oralne kontraceptive ter imajo hkrati ugotovljeno mutacijo faktorja V, odgovorno za NACP, pa je tveganje kar 35-krat večje (51). Razpravljajo tudi o možnosti vpliva nadomestnega zdravljenja z estrogeni v menopavzi na nastanek VT, vendar raziskave, ki bi vključila zadostno število preiskovank, doslej še niso opravili (45). Med našimi kontrolnimi preiskovankami ob odvzemu krvi nobena ni jemala estrogenov. Tako bi morda nihanje APCr pri zdravih ženskah lahko pripisali fiziološkim spremembam spolnih hormonov.

Glede na naše rezultate, ki kažejo, da imajo mlade ženske že fiziološko manjše APCr, se strinjamo s priporočilom, da bi bilo smiselno pred uvedbo oralne kontracepcije narediti test za odkrivanje NACP (43). Temu v prid govori tudi dejstvo, da smo kar pri 42 % deležu naših bolnic našli kot sprožilni dejavnik za nastanek VT oralno kontracepcijo. Če pri tem upoštevamo, da je oralna kontracepcija med mladimi ženskami v sedanjem času zelo pogosta, bi s presejalnim testom na preprost in cenen način morda zmanjšali število bolnic z VT.

Rezultati o pogostosti NACP pri naših zdravih preiskovancih so povsem primerljivi z ugotovitvami drugih avtorjev, ki pri zdravi kontrolni skupini navajajo 2–5 % pogostost NACP (34, 38, 52). Tudi meja, s pomočjo katere smo določili NACP ($APCr < 2,0$) je primerljiva z ostalimi avtorji (35, 38, 53).

Jemanje kumarinov vpliva na meritve koagulacijskih časov, zato se večina avtorjev izogiba meritvam NACP pri bolnikih, ki jemljejo antikoagulacijsko zaščito. V literaturi sicer zasledimo tudi posamezna poročila, ki zanikajo vpliv kumarinov na APC-razmerje (54), vendar pa smo se pridružili mnenju, da bolnik, ki jemlje kumarine, ni primeren za testiranje NACP. APCr naših bolnikov z antikoagulacijsko zaščito oziroma brez nje se je razlikoval ($p < 0,001$), kar podpira priporočilo, da bolnikov med jemanjem kumarinov ne testiramo.

V naši raziskavi smo proučili tudi morebitno povezanost testov hemostaze s prisotnostjo ali odsotnostjo NACP. Povezanosti NACP s testi hemostaze nismo našli. V literaturi nismo zasledili podatkov o medsebojni povezanosti NACP in testov hemostaze.

Ob koncu želimo podati še nekaj kliničnih ugotovitev. Ob nastopu prve VT so bili naši bolniki v povprečju 6 let starejši od bolnic ($p < 0,05$), kar ponovno izpostavlja večjo ogroženost mladih žensk pred nastopom VT. Pri ženskah smo pogosteje odkrili sekundarno VT kot pri moških ($p < 0,0006$), kar pripisujemo prisotnosti več dejavnikov tveganja za nastanek VT pri ženskah. Skladno s poročili drugih raziskav (55) smo našli sprožilni dejavnik za nastanek VT pri dobri polovici bolnikov.

Zaradi anatomskih značilnosti je VT levega spodnjega uda pogostejša kot VT desnega spodnjega uda (55), kar smo potrdili tudi pri naših bolnikih, ki so imeli dvakrat pogostejšo VT levega kot pa desnega spodnjega uda.

Mnogi avtorji si zastavljajo vprašanje, kakšen je klinični pomen odkritja NACP. Prevladuje mnenje, da ugotovljena NACP pri bolniku z VT sama po sebi še ni vzrok za doživljenjsko antikoagulacijsko zaščito (10, 18, 34). Smiselno pa je priporočilo, da osebo z NACP ob izpostavljenosti dodatnim sprožilnim dejavnikom za nastanek VT ustrezno zaščitimo (34). Vedno bolj se namreč uveljavlja mnenje, da je za nastanek VT potrebnih več hkrati delujočih

dejavnikov (1). Zastavlja se tudi vprašanje, ali bi bilo smiselno ob stiku z možnimi sprožilnimi dejavniki za nastanek VT, kot so oralna kontracepcija in nadomestno zdravljenje z estrogeni v menopavzi, nepomičnost idr., uvesti presejalni test za odkrivanje NACP (10). V primeru prisotnosti te motnje bi veljalo oralno kontracepcijo in nadomestno hormonsko zdravljenje odsvetovati, nepomičnega bolnika pa ustrezno zaščititi.

Zaključki

Na osnovi pričujočega dela lahko odgovorimo na vprašanja, ki smo si jih zastavili v uvodu. Med 71 preiskovanimi bolniki z VT smo NACP odkrili pri 10 bolnikih (14 %), kar je skladno z rezultati raziskovalcev v sosednjih deželah.

Med našimi bolniki nismo odkrili povezave med prisotnostjo NACP in spolom, starostjo ter BMI.

Nismo odkrili povezave med pojavljanjem NACP in prvo oz. ponovno VT, primarno oz. sekundarno VT ter družinsko VT.

Zahvala

Najini mentorici doc. dr. Poloni Peternel iskrena hvala za strokovno pomoč in vodenje pri nastajanju naloge.

Ing. Marinki Tehovnik in ostalim v laboratoriju se zahvaljujema za natančno opravljene laboratorijske analize.

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

Dr. Barbari Salobir-Pajnič in dr. Alenki Mavri se posebej zahvaljujema za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Vsem preiskovancem se želiva zahvaliti za njihovo sodelovanje.

Gospodu Lojzetu Pajku hvala, ker je odpravljaj najine slovnične napake.

Ing. Jožetu Fišerju se zahvaljujema za skrbno izdelane slike.

Alenki in vsem domačim hvala za pomoč pri izdelavi naloge.

Vama, Peter in Gregor, pa hvala za vzpodbudo.

Literatura

1. Schafer A. Hypercoagulable states: molecular genetics to clinical practice. *Lancet* 1994; 344: 1739–42.
2. Hirsh J, Salzman EW, Marder VJ, Colman RW. Overview of the Thrombotic Process and Its Therapy. In: Colman RW, Hirsh J, Marder WJ, Salzman EW, eds. *Haemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincot, 1994: 1151–59.
3. 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. *Haemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincot, 1994: 1543–61.
4. Bertina RM. Prevalence of hereditary thrombophilia and the identification of genetic risk factors. *Fibrinolysis* 1988; 2: 7–13.
5. Walker ID. Thrombophilia: how far should a clotter be investigated? *Postgrad Med J* 1994; 70: 411–7.
6. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 515–30.

7. Rodger LB. Hypercoagulability and Thrombosis. *Common Bleeding and Clotting Disorders 1994*; 78: 635–65.
8. Bauer KA, Weitz JI. Laboratory markers of coagulation and fibrinolysis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder WJ, Salzman EW, eds. *Haemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincot, 1994: 1197–210.
9. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest 1981*; 68: 1370–3.
10. Dahlback B. New molecular insights into the genetics to thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg⁵⁰⁶ to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost 1995*; 74: 139–48.
11. Seligson U, Berger A, Abend M, et al. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med 1984*; 310: 559–62.
12. Stegnar M, Peternel P. Prirojena trombofilija. *Zdrav Vestn 1990*; 59: 23–13.
13. Bauer KA. Hypercoagulability – a new cofactor in the protein C anticoagulant pathway. *N Engl J Med 1994*; 24: 566–7.
14. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A 1993*; 90: 1004–8.
15. Dahlback B. Factor V gene mutation causing inherited resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. *J Int Med 1995*; 237: 221–7.
16. Dahlback B, Hilderbrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A 1994*; 91: 1396–400.
17. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature 1994*; 359: 64–7.
18. Majerus PW. Bad blood by mutation. *Nature 1994*; 369: 14–15
19. Buckell M. The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity. *J Clin Pathol 1959*; 11: 403–5.
20. Ranbz M, Norrman B, Wallen P. A sensitive assay for tissue plasminogen activator. *Thromb Res 1982*; 27: 743–9.
21. Ranby B, Bergsdorf N, Nilsson T, Mellring G, Winblad B, Bucht G. Age dependence of tissue plasminogen activator concentration in plasma, as studied by improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem 1986*; 32: 2160–5.
22. Chmielewska J, Ranby M, Wiman B. Evidence of rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res 1983*; 31: 427–36.
23. Declerk PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruihof EKO, Jugan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody based enzyme linked immunosorbent assay. *Blood 1988*; 19: 9–12.
24. Friberger P, Knoss M. Plasminogen determination in human plasma. In: Scully, Kakkar VV, eds. *Chromogenic Peptide Substrates*. Edinburg: Churhill, 1979: 128–39.
25. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, REynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anticardiolipin antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardisation and quantitation of results. *Clin Exp Immunol 1985*; 62: 738–45.
26. Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. *Am J Clin Pathol 1961*; 63: 212–9.
27. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in haemophilia and jaundice. *Am J Med Sci 1935*; 190: 501–11.
28. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol 1957*; 17: 237–46.
29. Abildgaard U, Lier M, Odegard OR. Antithrombin (heparin cofactor) assay with new chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). *Thromb Res 1977*; 11: 549–53.
30. Sturk A, Morrien-Salomons WM, Husman MV, Born JJ, Buller HR, Ten Cate JW. Analytical and clinical evaluation of commercial protein C assays. *Clin Chim Acta 1987*; 165: 263–70.
31. Adamič Š. *Temelji biostatistike*. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, 1989: 27–128.

32. Bura A, Ascani A, Nenci GG, Berettini M. The clinical relevance of inherited resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1122.
33. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989–93.
34. 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.
35. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517–21.
36. Liu HW, Kwong YL, Bourke C, et al. High Incidence of Thrombophilia Detected in Chinese Patients with Venous Thrombosis. *Thromb Haemost* 1994; 71: 416–9.
37. Salobir-Pajnič B, Stegnar M, Peternel P, Obersnel-Kveder D, Grobovšek-Opara S. Fibrinolysis after myocardial infarction and venous thromboembolism in women in the reproductive period. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1139.
38. 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.
39. Vogel G, Wintersten EM, Letrari S, Fischer C. Poor anticoagulant response to activated protein C in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1372.
40. Ferrer-Antunes C, Palmeiro A, Frazao L, et al. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1370
41. Gouault-Heilmann M, Leroy-Matheron C, Pignon JM., Mendonca C, Levent M. Inherited resistance to activated protein C: clinical manifestations and biological data. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1122.
42. Halbmayer WM, Haushofer A, Schon R. The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 51–7.
43. Henkens CMA, Bom VJJ, Seinen AJ et al. Sensitivity to activated protein C; influence of oral contraceptives and sex. *Thromb Haemost* 1995; 73: 402–4.
44. de Ronde H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost* 1994; 72: 880–6.
45. Salzman EW, Hirsh J. The Epidemiology, Pathogenesis and Natural History of Venous Thrombosis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder WJ, Salzman EW, eds. *Haemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincot, 1994: 1275–96.
46. Beller FK, Ebert C. Effects of oral contraceptives on blood coagulation. A Review. *Obstet Gynecol Surv* 1985; 40: 425–36.
47. Bonnat J. Coagulation effects of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1042–8.
48. Daume E. Influence of modern low-dose oral contraceptives on hemostasis. *Adv Contracept* 1990; 6: Suppl: 51–68.
49. Boerger LM, Morris PC, Thurnau GR, Esmon CT, Comp PC. Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood* 1987; 69: 692–4.
50. Malm J, Laurell M, Dahlback B. Changes in the plasma levels of vitamin K-dependent proteins C and S of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br J Haematol* 1988; 68: 437–43.
51. Vandenbroucke JP, Koste T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344: 1453–7.
52. Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 449–53.
53. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg⁵⁰⁶ of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535–8.
54. ABS 841 Johnson M, Brill-Edwards P, Ginsberg JS. Change in the activated protein C resistance ratio with and without warfarin therapy. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1120.
55. Hull J, Hull RD. Natural history and clinical features of venous thrombosis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder WJ, Salzman EW, eds. *Haemostasis and Thrombosis – basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincot, 1987: 1208–19.