

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**  
**Katedra i Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku**

Ewelina Wojtasińska

**„Wrodzona trombofilia jako czynnik ryzyka  
żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej”**

**„Inherited thrombophilia as a risk factor of venous  
thromboembolism”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. med. Mieczysław Komarnicki

Poznań 2014

*Panu prof. dr hab. med.  
Mieczysławowi Komarnickiemu  
pragnę złożyć serdeczne podziękowania  
za życzliwość i wsparcie podczas realizacji  
tematu niniejszej pracy*

*Pani dr n. med. Joannie Rupie-Matysek,*

*oraz*

*Panu dr n. med. Michałowi Michalakowi*

*dziękuję za nieocenioną pomoc*

*w redagowaniu niniejszej rozprawy*

*Koleżankom i Kolegom*

*z Laboratorium Diagnostyki Hematologicznej  
dziękuję za pomoc w realizacji części  
doświadczalnej oraz za życzliwość i wsparcie  
podczas redagowania niniejszej pracy*

*Mojej Rodzinie i Przyjaciółom  
za wyrozumiałość, wiarę  
i wsparcie składam serdeczne  
podziękowania*

## Wykaz stosowanych skrótów

<b>ACA</b>	przeciwciała antykardiolipinowe, <i>ang. anticardiolipin antibodies</i>
<b>ACCP</b>	Amerykańskie Kolegium Lekarzy Chorób Klatki Piersiowej, <i>ang. American College of Chest Physicians</i>
<b>APC</b>	aktywne białko C, <i>ang. activated protein C</i>
<b>APCr</b>	oporność na aktywne białko C, <i>ang. activated protein C resistance</i>
<b>AT</b>	antytrombina
<b>BMI</b>	wskaźnik masy ciała, <i>ang. body mass index</i>
<b>β<sub>2</sub> GPI</b>	β <sub>2</sub> glikoproteina I
<b>dRVVT</b>	test z zastosowaniem rozcieńczonego jadu żmii Russella, <i>ang. dilute Russell's viper venom test</i>
<b>EPCR</b>	śródbłonkowy receptor białka C, <i>ang. endothelial protein C receptor</i>
<b>FVL G1691A</b>	mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, <i>ang. factor V Leiden G1691 A mutation</i>
<b>FII G20210A</b>	polimorfizm G20210A genu protrombiny, <i>ang. factor II G20210A polymorphism</i>
<b>ISTH</b>	Międzynarodowe Towarzystwo Zakrzepicy i Hemostazy, <i>ang. International Society on Thrombosis and Hemostasis</i>
<b>LA</b>	antykoagulant toczniowy, <i>lac. lupus anticoagulant</i>
<b>PAI – 1</b>	inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, <i>ang. plasmin activator inhibitor type 1</i>
<b>PC</b>	białko C, <i>ang. protein C</i>
<b>PS</b>	białko S, <i>ang. protein S</i>
<b>SSC/ISTH</b>	Komitet Nauki i Standaryzacji ISTH, <i>ang. Scientific and Standardization Committee of ISTH</i>
<b>TAFI</b>	inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną, <i>ang. thrombin activable fibrinolysis inhibitor</i>
<b>TAT</b>	kompleks trombina-antytrombina
<b>TIA</b>	przejściowe niedokrwienie mózgu, <i>ang. transient ischemic attack</i>

<b>TFPI</b>	inhibitor drogi krzepnięcia zależnej od czynnika tkankowego, <i>ang. tissue factor pathway inhibitor</i>
<b>TF</b>	czynnik tkankowy, <i>ang. tissue factor</i>
<b>TM</b>	trombomodulina
<b>tPA</b>	tkankowy aktywator plazminogenu, <i>ang. tissue plasminogen activator</i>
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia, <i>ang. World Health Organisation</i>
<b>ŻChZZ</b>	żylna choroba zakrzepowo zatorowa
<b>ZP</b>	zatorowość płucna

## Spis treści

I	Wstęp.....	1
I.1	Patogeneza żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych.....	1
I.2	Wrodzona trombofilia .....	2
I.2.1	Klasyfikacja wrodzonej trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego.....	5
I.2.2	Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru antytrombiny.....	6
I.2.3	Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru białka C.....	9
I.2.4	Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru białka S.....	12
I.2.5	Oporność na aktywne białko C i jej związek z mutacją Leiden G1691A genu czynnika V.....	14
I.2.6	Kliniczne następstwa polimorfizmu G20210A genu protrombiny.....	15
I.2.7	Kliniczne następstwa podwyższonej aktywności czynnika VIII.....	15
I.3	Nabyte czynniki ryzyka ŻChZZ.....	16
I.3.1	Zespół antyfosfolipidowy.....	16
I.3.2	Inne nabyte czynniki ryzyka ŻChZZ.....	20
II	Cel pracy.....	24
III	Materiał i metody.....	25
III.1	Grupa badana.....	25
III.2	Materiał biologiczny.....	28
III.3	Metodyka oznaczenia laboratoryjnych czynników trombofilii.....	29
III.3.1	Metodyka oznaczenia czynników wrodzonej trombofilii.....	29
III.3.2	Metodyka oznaczenia czynników nabytej trombofilii.....	37
III.3.3	Metodyka oznaczeń podstawowych parametrów hemostazy.....	43
III.4	Analiza statystyczna .....	46
IV	Wyniki.....	47
V	Wnioski .....	66
VI	Omówienie wyników .....	67
VII	Spis tabel, rycin i wykresów.....	75
VII.1	Spis tabel .....	75
VII.2	Spis rycin.....	76
VII.3	Spis wykresów.....	77
VIII	Aneks.....	79
IX	Streszczenie.....	83
X	Summary.....	86
XI	Piśmiennictwo.....	89



# I WSTĘP

## I.1 *Patogeneza żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej*

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ) jest schorzeniem o znaczeniu społecznym. W populacji ogólnej występuje z częstością 1-3 przypadków /1000/rok (1-3). Jest to typowa choroba o etiologii wieloczynnikowej, na której patogenezę składają się zarówno czynniki środowiskowe jak i mechanizmy genetyczne. Klinicznie manifestuje się ona głównie w postaci zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych i zatorowości płucnej; rzadko może się również pojawiać w nietypowych lokalizacjach: naczyniach żylnych kończyn górnych, żyły środkowej siatkówki oka, naczyniach mózgowych i wątrobowych (1,2). Z danych literaturowych opublikowanych w 2007 roku wynika, że w 6 krajach Unii Europejskiej aż 370 000 zgonów rocznie jest następstwem zakrzepicy żył głębokich, będącej w 75% następstwem hospitalizacji (3). W oparciu o dane amerykańskie można przyjąć, iż w Polsce zatorowość płucna może być przyczyną 25 000-30 000 zgonów rocznie (4). Śmierć w ciągu 1 miesiąca od wystąpienia epizodu ŻChZZ obserwuje się około 10% pacjentów z rozpoznanym zatorom tętnicy płucnej (2). Poza bezpośrednim ryzykiem zgonu, ŻChZZ wiąże się także z odległym ryzykiem zespołu pozakrzepowego (5) i przewlekłego nadciśnienia płucnego (6), które znacznie obniżają jakość życia pacjentów.

Współczesne spojrzenie na etiologię zakrzepicy nadal opiera się na znanej od połowy XIX wieku słynnej triadzie Virchowa, według której do czynników ryzyka tej choroby należą:

1. Zmiany w szybkości przepływu krwi (zwolnienie przepływu krwi);
2. Zmiany w ścianie naczynia krwionośnego (uszkodzenie ściany przez siły ścinające przepływającej krwi lub mechaniczne: uraz, zabieg operacyjny, a także proces zapalny, miażdżyca);
3. Zmiany ilościowe i jakościowe w składzie przepływającej krwi – mające istotny wpływ na powstanie zakrzepu w naczyniach żylnych.

Znaczenie dla rozwoju ŻChZZ mogą mieć zarówno wrodzone defekty hemostazy, jak również nabyte czynniki sprzyjające chorobie, takie jak: unieruchomienie związane z opatrunkiem gipsowym czy hospitalizacją, a także zabieg operacyjny, ciąża, uraz, choroba nowotworowa, stosowanie doustnej antykoncepcji lub

hormonalnej terapii zastępczej czy przeciwciała antyfosfolipidowe. Do niezależnych czynników ryzyka ŻChZZ zalicza się: wiek powyżej 40 roku życia i płeć męską.

## *1.2 Wrodzona trombofilia*

Termin trombofilia oznacza genetycznie uwarunkowaną lub nabytą skłonność do występowania żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych; część ekspertów uważa, że ma ona również swój udział w etiologii zakrzepicy tętniczej. Uważana jest ona za stałą cechę danej osoby, u której zwiększone ryzyko wystąpienia zakrzepicy utrzymuje się przez całe życie (8). Rodzinna trombofilia została opisana po raz pierwszy w 1956 roku przez Jordan i Nandorff (7). W 1965 roku Egeberg opisał rodzinę, w której wysoka zapadalność na zakrzepicę żylną wiązała się z niedoborem antytrombiny (AT), uważanej w owym czasie za jedyny czynnik wrodzonej trombofilii (9). Dopiero lata 80-te i 90-te XX wieku przyniosły szereg przełomowych odkryć, takich jak:

- opisanie niedoboru białka C (PC) przez Griffin JH. i wsp. (10)
- opisanie klinicznych następstw niedoboru białka S (PS) przez Comp PC. i wsp. (14)
- odkrycie i opisanie zjawiska oporności osocza na działanie aktywnego białka C (*ang. activated protein c resistance, APCr*) przez Dahlbäck B. i wsp. (13)
- opisanie związku pomiędzy mutacją G1691A w genie czynnika V nazwanego czynnikiem V Leiden (FVL G1691A), a zjawiskiem APCr przez Bertina RM. i wsp. (11)
- opisanie polimorfizmu G20210A genu protrombiny (FII G20210A), przejawiającego się fenotypowo w postaci podwyższonego stężenia protrombiny w osoczu przez Poort SR. i wsp. (12).

Liczne doniesienia literaturowe związane z tymi odkryciami pozwoliły na określenie wrodzonych czynników ryzyka o największym znaczeniu w etiologii żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych. Przedstawiono je w tabeli nr 1:

Tabela nr 1. Czynniki wrodzonej trombofilii na podstawie Khan S. (15)

Wrodzone defekty o udokumentowanym związku z ŻChZZ	Rzadkie wrodzone defekty	Prawdopodobne czynniki wrodzonej trombofilii
<ul style="list-style-type: none"> <li>- mutacja Leiden G1691A</li> <li>- polimorfizm G20210A genu protrombiny</li> <li>- niedobór białka C</li> <li>- niedobór białka S</li> <li>- niedobór antytrombiny</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dysfibrynogenemia</li> <li>- hiperhomocysteinemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- podwyższony poziom czynnika VIII</li> <li>- podwyższony poziom czynnika IX</li> <li>- podwyższony poziom czynnika XI</li> <li>- niedobór plazminogenu</li> <li>- podwyższony poziom lipoptoteiny a</li> <li>- niedobór tPA</li> <li>- podwyższony poziom czynnika VII</li> <li>- obniżona aktywność czynnika XII</li> <li>- podwyższone stężenie trombomoduliny</li> <li>- obniżony poziom PAI</li> </ul>

*t-PA* - tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*); *PAI 1* - inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, (ang. *plasmin activator inhibitor type 1*)

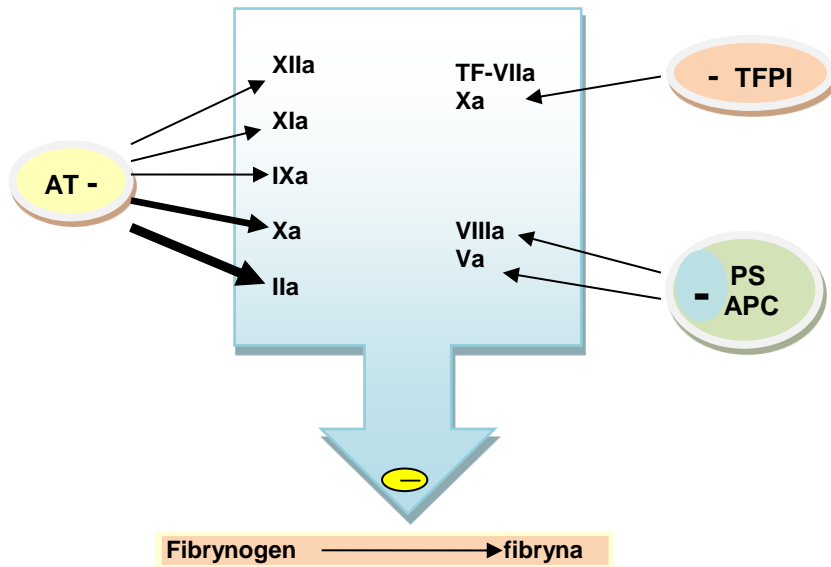
Rzadkie defekty genetyczne takie jak: dysfibrynogenemia, podwyższony poziom inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (ang. *thrombin activable fibrinolysis inhibitor, TAFI*), inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (ang. *plasmin activator inhibitor type 1, PAI-1*) czy niedobór tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator, tPA*), ze względu na niską częstość ich występowania, raportowane są przy okazji opisu przypadków klinicznych. Wysokie aktywności czynników IX, XI, oraz TAFI nie są niezależnymi czynnikami ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej; ich znaczenie kliniczne wzrasta w połączeniu ze wzrostem poziomu czynnika VIII (16). Hiperhomocysteinemia zaś jest czynnikiem ryzyka zarówno zakrzepicy żyłnej jak i tętniczej, związanym z ryzykiem jej wystąpienia przed 30 rokiem życia, jednak podobnie jak w przypadku podwyższonej aktywności czynnika VIII, problematycznym pozostaje ustalenie jej wartości granicznej. Austriaccy naukowcy wykazują, że hiperhomocysteinemia jest czynnikiem ryzyka nawrotu ŻChZZ, nie potwierdzają tego wyniki badań z ośrodka w Leiden (17).

Obecność wrodzonej trombofilii rozważa się u osoby po przebytym epizodzie zakrzepowo zatorowym, pojawiającym się bez uchwytnej przyczyny, udokumentowanym obiektywnymi metodami lub u osób z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku ŻChZZ. Wyniki wielu badań dowodzą, że u około 30-50% chorych z samoistną zakrzepicą żylną w wywiadzie, wykrywa się wrodzoną trombofiliją, związaną z niedoborem antytrombiny, białka C, białka S, opornością na

aktywne białko C (mutacją G1691A czynnika V), czy polimorfizmem G20210A genu protrombiny. 15% chorych z tej grupy przejawia współistnienie  $\geq 2$  wrodzonych czynników trombofilii, natomiast u około 15% przyczyną zakrzepicy jest zespół antyfosfolipidowy (*ang. antiphospholipid syndrome, APS*) z obecnością heterogennej grupy przeciwciał tzw. przeciwciał antyfosfolipidowych (*ang. antiphospholipid antibodies, APA*), przejawiających się w postaci antykoagulantu toczniowego i/lub przeciwciał antykardiolipinowych (*ang. anticardiolipin antibodies, ACA*) i/lub przeciwciał przeciwko  $\beta_2$  glikoproteinie I ( $\beta_2$  GPI) (18). Częstość występowania poszczególnych wrodzonych defektów hemostazy usposabiających do ŻChZZ różni się w zależności od rasy. Wśród osobników rasy kaukaskiej najczęściej wykrywanym czynnikiem wrodzonej trombofilii jest mutacja Leiden genu czynnika V (2-7%), natomiast obecność wariantu G20210A genu protrombiny stwierdza się u około 1-3% (8). Trombofilia jest dobrze udokumentowanym czynnikiem ryzyka wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ, natomiast jej znaczenie jako czynnika ryzyka nawrotu jest dużo mniejsze i dotyczy głównie podwyższonego stężenia czynnika VIII oraz obecności antykoagulantu toczniowego (20).

Mechanizm związany ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowym wiąże się ze zwiększeniem produkcji trombiny lub upośledzeniem jej inaktywacji, do którego dochodzi wskutek zachwiania równowagi układu hemostazy między mechanizmami prokoagulacyjnymi, antykoagulacyjnymi i fibrynolitycznymi. W warunkach uszkodzenia ciągłości naczynia, aktywacja krzepnięcia krwi prowadzi do generacji dużej ilości trombiny, aktywującej płytki krwi i przekształcającej fibrynogen w fibrynę. Efektywność działania tego układu jest modulowana przez szereg mechanizmów antykoagulacyjnych, zapobiegających niekontrolowanemu rozprzestrzenieniu tego procesu poza miejsce uszkodzenia naczynia krwionośnego. Jednym z nich jest TFPI, który bierze udział w modulacji inicjacji krzepnięcia. Inhibitor ten łącząc się nowopowstałym czynnikiem Xa, związanym z kompleksem TF-VIIa, inaktywuje i hamuje aktywację drogi zależnej od czynnika tkankowego (21-23). Innym czynnikiem jest antytrombina - inhibitor proteaz serynowych, mający szczególne powinowactwo do aktywnych czynników krzepnięcia niezwiązanych ze swymi białkowymi kofaktorami. Za regulację aktywności dwóch kofaktorów krzepnięcia: czynników VIIIa i Va odpowiedzialne jest aktywne białko C. Większość defektów genetycznych, których skutkiem jest trombofilia, ściśle wiąże się z działaniem tego właśnie układu (24,25).

Schemat działania mechanizmów antykoagulacyjnych układu hemostazy przedstawiono na rycinie nr 1:



Rycina nr 1. Mechanizm działania inhibitora drogi zależnej od czynnika tkankowego (TFPI), antytrombiny (AT), układu białka C: białka S (PS) w kompleksie z aktywnym białkiem C (APC) według Łopaciuk S. (26)

### I.2.1 Klasyfikacja trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego

Pierwszy epizod ŻChZZ wśród osób z wrodzoną trombofilią występuje najczęściej między 30 a 50 rokiem życia (8). Ryzyko jej wystąpienia różni się w zależności od rodzaju wrodzonej trombofilii (tabela nr 2).

Tabela nr 2. Klasyfikacja trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego (8)

<b>Łagodne - małego ryzyka</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- heterozygotyczne postacie mutacji Leiden G1691A genu czynnika V i polimorfizmu G20210A genu protrombiny</li> <li>- niedobór białka C</li> <li>- niedobór białka S</li> </ul>
<b>Ciężkie - dużego ryzyka</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- homozygotyczne postacie mutacji Leiden G1691A genu czynnika V i polimorfizmu G20210A genu protrombiny</li> <li>- współistnienie heterozygotycznych postaci tych dwóch mutacji</li> <li>- niedobór antytrombiny</li> <li>- zespół antyfosfolipidowy (trombofilia nabyta)</li> </ul>

### *I.2.2 Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru antytrombiny*

Wrodzony niedobór antytrombiny był pierwszym zidentyfikowanym czynnikiem wrodzonej trombofilii. W roku 1965 opisano rodzinę charakteryzującą się wyższą od przeciętnej zapadalnością na zakrzepicę żylną, do której dochodziło już w młodym wieku. U członków tej rodziny, którzy przeżyli epizod zakrzepicy żyłnej, stwierdzano obniżenie aktywności AT o ok. 50% w porównaniu z osobami, które nie miały zakrzepicy (9). Niedobór ten wiąże się z zaburzeniem równowagi układu hemostazy, polegającym na zmniejszeniu potencjału inaktywacji wszystkich aktywnych proteaz serynowych układu krzepnięcia (głównie trombiny i czynnika Xa (28)). AT jest najlepiej poznanym inhibitorem krzepnięcia; jest to jednołańcuchowa glikoproteina, (alfa 2 globulina) o masie cząsteczkowej 58 kD, zbudowaną z 432 aminokwasów, należąca do rodziny serpin, syntetyzowana przez komórki wątroby w postaci prekursora zbudowanego z 364 aminokwasów (w tym 32-aminokwasowy peptyd sygnałowy). Peptyd sygnałowy odgrywa kluczową rolę w translokacji białka do retikulum endoplazmatycznego, gdzie ma miejsce jego postranslacyjna modyfikacja (25,29). AT tworzy nieaktywny kompleks po połączeniu się z docelowym enzymem, dzięki budowie cząsteczki warunkującej jej właściwości antykoagulacyjne; sekwencja Lys 39-Arg 57, Lys 114-Glu 154 jest miejscem oddziaływania z heparyną, natomiast sekwencja Arg 393 - Ser 394 pozwala na interakcję z trombiną, polegającą na wiązaniu jej w nieaktywny proteolitycznie kompleks trombina-antytrombina (TAT) szybko usuwany z krążenia (30). Antytrombina sama w sobie jest inhibitorem wolnodziałającym, uzyskującym pełnię swej aktywności inhibitorowej po połączeniu się w stechiometryczny kompleks z siarczanem heparanu (glikozaminoglikanem obecnym w endotelium) lub heparyną egzogenną (31). Szybkość inaktywacji czynników krzepnięcia przez kompleks AT-heparyna wzrasta ponad 4000 krotnie (33). Wiąże się to ze zmianą konformacji cząsteczki AT i odsłonięciem miejsca wiążącego trombinę. Ponadto badania ujawniły ważne zadanie trzeciego regionu w cząsteczce antytrombiny (Phe 402-Pro 407), który jest zlokalizowany pomiędzy miejscem interakcji z trombiną a C-końcowym odcinkiem polipeptydu. Uważa się także, że czwarty region (znajdujący się blisko C-końcowej części polipeptydu), zwany kieszonką hydrofobową, jest odpowiedzialny za utrzymanie trzeciorzędowej struktury cząsteczki AT. Heparyna wiąże się z antytrombiną i potęguje jej aktywność za pośrednictwem reszty

glukozaminowej w obrębie specyficznego pentasacharydu. Zaburzenia funkcji AT mogą mieć charakter jakościowy lub ilościowy; przedstawiono je w tabeli nr 3 (32,33):

Tabela nr 3. Klasyfikacja niedoboru antytrombiny

Typ	Rodzaj defektu	Stężenie antygeny antytrombiny	Aktywność antytrombiny jako proteazy serynowej	Zdolność wiązania heparyny
I	defekt ilościowy	obniżone	obniżona	prawidłowa
II	defekt jakościowy			
II RS	(ang. <i>reactive site mutations</i> ) defekt regionu aktywnego	prawidłowe	obniżona	obniżona
II HBS	(ang. <i>heparin binding site mutations</i> ) defekt regionu wiążącego heparynę	prawidłowe	prawidłowa	obniżona
II PE	(ang. <i>pleiotropic effect</i> ) efekt plejotropowy	prawidłowe lub obniżone	obniżona	obniżona

Typ I jest definiowany jako zmniejszona synteza białka o prawidłowej strukturze, która wiąże się z obniżeniem stężenia i aktywności antytrombiny do około 50% wartości referencyjnych. Podłoże molekularne tego zaburzenia polega na małych delecjach/insercjach (do 22 par zasad) lub substytucji pojedynczej zasady. W typie II RS dochodzi do obniżenia jej aktywności, jako proteazy serynowej oraz spadku aktywności wiązania heparyny; natomiast typ II HBS wiąże się tylko ze zmianami strukturalnymi w obrębie miejsca wiążącego heparynę, skutkującym obniżeniem jej aktywności kofaktorowej dla heparyny do około 50% wartości referencyjnych. Efekt plejotropowy - typ IIPE, spowodowany jest zaburzeniami struktury cząsteczki antytrombiny w jej C-końcowej części, dotyczącymi aminokwasów w pozycjach 402-429; prowadzi to do zmiany konformacji cząsteczki AT, mogącej uwydatniać defekty zarówno miejsca wiązania heparyny jak i aktywności antytrombiny. Znany jest wariant AT „Budapeszt”, gdzie zamiana prolina na leucynę w pozycji 429 prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki, wpływającej zarówno na miejsce wiązania heparyny jak i trombiny (34). W badaniach grup naukowców z Utah i Oslo odkryto, że z powodu

zamiany aminokwasów w pozycjach 402 i 407, cząsteczki antytrombiny charakteryzują się krótszym czasem półtrwania we krwi (35). Niedobory antytrombiny typu I, IPE i IIRS są dziedziczone autosomalnie dominująco, natomiast typ IIHBS – autosomalnie recesywnie (32,38).

Defekty strukturalne bądź funkcjonalne, upośledzające czynność cząsteczki AT skutkują wystąpieniem stanu nadkrzepliwości, co wynika bezpośrednio z funkcji antytrombiny, jako inhibitora aktywnych czynników krzepnięcia, biorących udział w wytworzeniu stabilnego czopu hemostatycznego. Do tej pory odkryto 127 mutacji w obrębie genu kodującego antytrombinę; najczęściej w postaci heterozygotycznej. Gen kodujący antytrombinę znajduje się na długim ramieniu chromosomu 1 i składa się z 7 eksonów i 6 intronów. Mutacje w jego obrębie mogą powodować zaburzenia typu ilościowego lub jakościowego. Najcięższy przebieg kliniczny zakrzepicy koreluje z typem I niedoboru antytrombiny oraz z typem II wiążącym się z mutacją miejsca wiązania trombiny. Około 55% nosicieli tych defektów doświadczy zakrzepicy żyłnej (39). Homozygotyczny niedobór antytrombiny typu I nie został opisany u ludzi; wykazano, iż jest on cechą letalną, zarówno u ludzi jak i transgenicznych myszy, (40). W populacji ogólnej występuje rzadko i dotyczy 1:2000 – 1:5000 osób, a w populacji chorych na ŻChZZ stanowi około 1-2%. Homozygotyczny niedobór typu IIRS jest również cechą letalną, natomiast homozygotyczny niedobór typu IIHBS wiąże się z wystąpieniem zakrzepicy żyłnej i/lub tętniczej już w dzieciństwie; co ciekawe heterozygotyczny niedobór antytrombiny typu IIHBS wiąże się z wystąpieniem epizodu zakrzepowo-zatorowego tylko u kilku procent nosicieli. Częstość występowania różnych typów niedoboru antytrombiny w populacji ogólnej ocenia się na 1:2000 – 1:3000 (42). Wyniki dużego badania prospektywnego EPCOT (European Prospective Cohort on Thrombophilia), w którym oceniano zapadalność na pierwszy epizod ŻChZZ u bezobjawowych pacjentów z wykrytym niedoborem białka C, antytrombiny, białka S oraz mutacją Leiden genu czynnika V, wskazują, że w czasie 5,7-letniej obserwacji 4,5% pacjentów doświadczyła zakrzepicy żyłnej, przy czym najczęściej wykrywanym defektem w tej grupie był niedobór antytrombiny (42). Kliniczne niedobór antytrombiny objawia się we wczesnych latach drugiej dekady życia, najczęściej w postaci zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych, ale również w postaci: zakrzepicy zatok żylnych mózgu, żyły środkowej siatkówki, zakrzepicy naczyń żylnych jamy brzusznej, czy poronień u kobiet (33). Opisywany czynnik wrodzonej trombofilii jest również związany z podwyższonym ryzykiem zatoru tętnicy płucnej. Wyniki badań



włoskich naukowców na grupie pacjentów z zakrzepicą proksymalną wskazują, że ryzyko zatorowości płucnej u pacjentów z niedoborem antytrombiny jest 2,4 razy wyższe niż wśród osób, u których epizod zakrzepowy nie wiązał się z tym defektem (43).

### *1.2.3 Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru białka C*

Wrodzona trombofilia związana z niedoborem białka C, jest uznanym czynnikiem ryzyka ŻChZZ. Białko to zostało wyizolowane i opisane, jako białko zależne od witaminy K przez Stenflo w 1976 roku (44); jest ono dwułańcuchową glikoproteiną syntetyzowaną w wątrobie. W osoczu występuje w postaci zymogenu proteazy serynowej i wykazuje niską aktywność; dopiero w obecności białka S, pod wpływem kompleksu trombina - trombomodulina dochodzi do jego aktywacji i ujawnienia biologicznej roli – wygaszania generacji trombiny. W 1977 r. wykazano, iż po aktywacji przez trombinę, białko C nabiera właściwości antykoagulacyjnych (45,46). Trombina, będąca kluczowym enzymem prokoagulacyjnymi w kaskadzie krzepnięcia, wytworzona w nadmiernych ilościach, zmienia swą konformację. Dzięki utracie aktywności prokoagulacyjnej i jednoczesnym nabyciu zdolności aktywowania białka C przekształca się z aktywatora krzepnięcia w inhibitor (45). Do zjawiska tego dochodzi pod wpływem białka receptorowego – trombomoduliny (TM) oraz przy współdziałaniu śródbłonkowego receptora dla białka C (*ang. endothelial cell protein C receptor, EPCR*) (46,47). Trombomodulina, obecna na powierzchni komórek endotelium, w krążeniu osiąga najwyższe stężenie w naczyniach kapilarnych, gdzie stosunek powierzchni naczynia do jego objętości jest najwyższy. Efektem interakcji trombina - trombomodulina jest zmiana konformacji cząsteczki trombiny, która sprawia, że utrzymuje ona jedynie nikłą aktywność proteolityczną w stosunku do niemal wszystkich białek, będących jej substratami i nabywa silne powinowactwo do białka C (46,47). Co więcej EPCR, wiążąc się z domeną G1a białka C, powoduje zmianę jego konformacji i odsłonięcie miejsca wiązania z kompleksem trombina-trombomodulina, co powoduje przekształcenie białka C w aktywną formę - APC i jego uwolnienie do osocza (47).

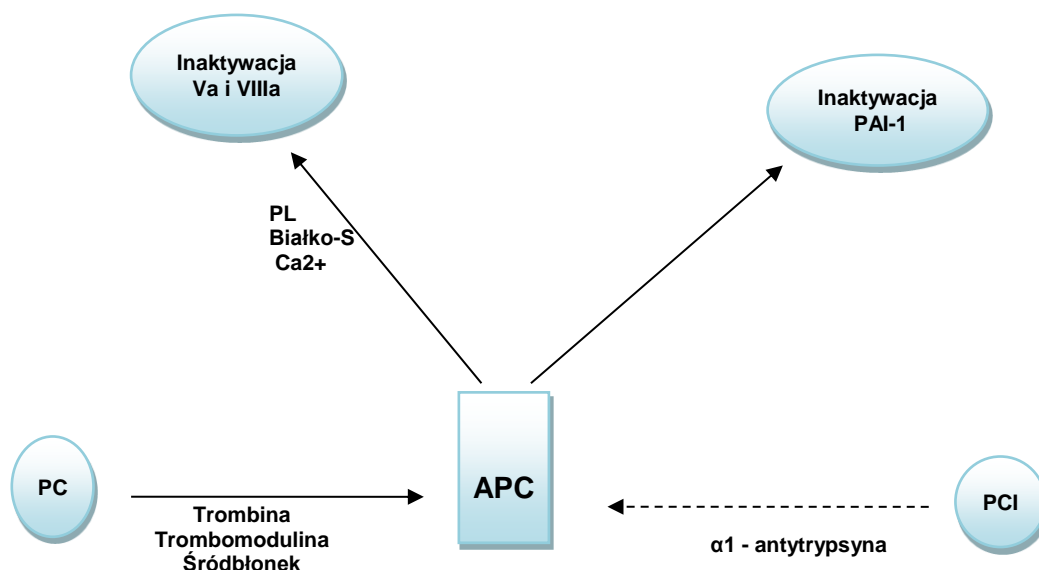
Aktywne białko C jest prawidłowym składnikiem krążącej krwi, będącym częścią mechanizmu antykoagulacyjnego zapobiegającego zakrzepicy (48,49). W osoczu osób zdrowych obserwuje się odwrotną zależność pomiędzy stężeniem aktywnego białka C i trombiny - jego stężenie wzrasta dość gwałtownie w odpowiedzi

na nadmierne wytwarzanie trombiny (49). APC charakteryzuje się dość długim okresem półtrwania w osoczu – około 20 minut i jego stopniowym unieczynnianiem przez inhibitor białka C (*ang. protein C inhibitor, PCI*) lub przez  $\alpha$ -1 antytrypsynę (8,25).

Funkcją kompleksu APC z kofaktorowym białkiem S jest inaktywacja aktywnych czynników krzepnięcia Va i VIIIa, poprzez ich częściową proteolizę. Proces ten zachodzi na powierzchni negatywnie naładowanych błon fosfolipidowych płytek krwi. Aktywne czynniki V i VIII są wysoce wrażliwe na działanie APC, jednakże związane w kompleks odpowiednio protrombinazy i tenazy są częściowo chronione przed proteolizą przez czynniki Xa i IXa. Cząsteczki czynników VIIIa i Va posiadają w swojej budowie kilka miejsc wrażliwych na działanie proteolityczne aktywnego białka C (51). Miejscami wrażliwymi na działanie aktywnego białka C w łańcuchu ciężkim czynnika Va są: R306, R506, R679, a w łańcuchu ciężkim cząsteczki czynnika VIIIa – R336 i R562 (51).

Aktywność kofaktorowa białka S względem APC w procesie wygaszania aktywności kompleksu tenazy, poprzez proteolizę aktywnego czynnika VIII, jest synergistycznie stymulowana przez zinaaktywowany czynnik V, co sugeruje, że czynnik ten posiada właściwości zarówno prokoagulacyjne jak i antykoagulacyjne. Ponadto, aktywne białko C nasila fibrylizę poprzez wiązanie się z PAI-1 w nieczynny kompleks. Schemat procesów związanych z działaniem aktywnego białka C przedstawiono na rycinie nr 2.

Działanie aktywnego białka C prowadzi do wygaszania generacji trombiny. Mamy tu do czynienia z tzw. paradoksem trombiny, pełniącej zarówno funkcję prokoagulacyjną: aktywacja układu krzepnięcia, przekształcanie fibrynogenu w fibrynę; jak i antykoagulacyjną: aktywacja układu białka C przy współdziałaniu trombomoduliny.



Rycina nr 2. Mechanizm działania układu białka C (PC - białko C, APC – aktywne białko C, PL – fosfolipidy, Va, VIIIa – aktywne czynniki krzepnięcia V i VIII, PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu, PCI – inhibitor białka C) (26)

Obniżenie aktywności białka C może być spowodowane zaburzeniami jego struktury jak i obniżeniem ilości syntetyzowanego białka. Klasyfikacja niedoboru białka C została przedstawiona w tabeli nr 4.

Tabela nr 4. Klasyfikacja niedoboru białka C (26)

Typ	Stężenie antygeny	Aktywność antykoagulacyjna	Aktywność Amidolityczna
I	↓	↓	↓
II a	N	↓	↓
II b	N	↓	N

↓ - obniżona, N – prawidłowa

Typ I występuje najczęściej i objawia się w postaci obniżenia aktywności białka C do około 50% wartości prawidłowych, zarówno w testach funkcjonalnych jak i immunologicznych. Istnieje bardzo duża zmienność fenotypowa manifestacji defektów genetycznych tego samego rodzaju w obrębie typu I niedoboru białka C. Te same zaburzenia genetyczne obserwuje się zarówno u objawowych pacjentów jak i bezobjawowych nosicieli wadliwego genu (53). Typ II charakteryzuje się prawidłowym stężeniem antygeny białka C i obniżoną aktywnością antykoagulacyjną. Dotychczas opisano wiele mutacji odpowiedzialnych za funkcjonalny defekt białka C (52).

Częstość występowania niedoboru białka C wynosi około 5% w populacji osób z rozpoznaną ŻChZZ (54). Klinicznymi objawami niedoboru białka C jest: zakrzepica żył głębokich i powierzchownych, plamica piorunująca noworodków (łac. neonatal purpura fulminans), martwica skóry spowodowana podaniem doustnych antykoagulantów z grupy pochodnych kumaryny. Podłożem plamicy piorunującej noworodków jest homozygotycznie uwarunkowany głęboki niedobór białka C, będący przyczyną masywnej zakrzepicy drobnych naczyń krwionośnych, powikłanej ciężką skazą krwotoczną, która powoduje śmierć wkrótce po urodzeniu (55). U około 50% nosicieli niedoboru białka C zakrzepica żylna ujawnia się przed 45 rokiem życia. U heterozygotycznych nosicieli mutacji genu białka C występuje ok 7-krotnie podwyższone ryzyko doświadczenia epizodu zakrzepowo-zatorowego w porównaniu z populacją bez tego defektu (57).

#### *1.2.4 Budowa, funkcja, kliniczne następstwa niedoboru białka S*

Kolejnym czynnikiem wrodzonej trombofilii o udowodnionym wpływie na ryzyko ŻChZZ jest niedobór białka S, które zostało po raz pierwszy opisane i nazwane w 1977 roku przez di Scipio i wsp. Następnie Walker i wsp. wykazali, że pełni ono funkcję kofaktora dla aktywnego białka C i bierze udział w inaktywacji czynników Va i VIIa (58). W 1984 roku Comp i Esmon opisali pierwszych pacjentów, u których stwierdzono niedobór białka S (14). Białko to jest jednołańcuchową glikoproteiną zależną od witaminy K, syntetyzowaną w wątrobie. Około 30-40% krążącego w osoczu białka S występuje w formie wolnej, posiadającej aktywność kofaktorową względem białka C, a pozostałe 60-70% tworzy kompleks z białkiem regulatorowym składowej dopełniacza C4 – białkiem wiążącym składową C4b (*ang. C4b binding protein – C4BP*) (59). Zatem proces zapalny, prowadzący do wzrostu stężenia C4BP ogranicza zarazem dostępność wolnego białka S i jest czynnikiem mającym prokoagulacyjny wpływ na hemostazę. Klasyfikacje niedoboru białka S przedstawiono w tabeli nr 5.

*Tabela nr 5. Klasyfikacja niedoboru białka S*

<b>Typ</b>	<b>Poziom antygeny całkowitego białka S</b>	<b>Poziom antygeny wolnego białka S</b>	<b>Aktywność białka S</b>
I	Obniżony	Obniżony	Obniżona
II	Prawidłowy	Prawidłowy	Obniżona
III	Prawidłowy	Obniżony	Obniżona

Gen kodujący białko S jest strukturalnie złożony, ponadto istnieje jego pseudogen o wysokiej homologii w stosunku do właściwego, co czyni diagnostykę molekularną niedoboru białka S dość skomplikowaną. Interesujące jest, że tylko u 50-60% pacjentów z niedoborem białka S wykryto mutacje (60). Opisano 33 warianty genetyczne, objawiające się fenotypowo, jako typ I niedoboru białka S: są to polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphisms, SNP*) insercje i delecje (60,61). Zidentyfikowano także cztery różne mutacje charakterystyczne dla typu II (35,61). W zależności od fenotypu około połowa osób, u których stwierdzono niedobór białka S rozwija zakrzepicę w wieku < 50 roku życia, a pozostali nie doświadczają zakrzepicy przez całe życie. Doniesienia niektórych autorów sugerują, że typ I i III niedoboru białka S, mogą być fenotypowym wariantem tego samego genotypu.

Białko S jest kofaktorem APC, uczestniczącym w proteolitycznej degradacji aktywnych czynników V i VIII. Poza wpływem na generację trombiny, białko S reguluje również wpływ APC na procesy związane z fibryrolizą, poprzez znoszenie działania PAI. Niezależnie od współdziałania z aktywnym białkiem C, białko S odgrywa rolę w bezpośredniej inaktywacji kompleksu protrombinazy, a także pełni funkcję kofaktora TFPI, wzmacniającego jego interakcję z czynnikiem Xa (62,63).

Częstość występowania wrodzonego niedoboru białka S w populacji ogólnej pozostaje nieznana, ponieważ występuje on niezwykle rzadko; dodatkowych trudności nastręcza metodologia oznaczenia. Dostępne są jednak dane z analizy 3788 szkockich dawców krwi, wśród których niedobór białka S stwierdzono u 0,03 – 0,13% (64). Niedobór białka S klinicznie manifestuje się w postaci zakrzepicy żył głębokich, powierzchownych i zatorowości płucnej; zanotowano również przypadki zakrzepicy żył mózgowia oraz martwicy skóry po podaniu doustnych antykoagulantów - pochodnych kumaryny. Homozygotyczny niedobór białka S objawia się już w okresie niemowlęcym w postaci masywnej zakrzepicy lub plamicy piorunującej (65,66), która nieleczona prowadzi do śmierci. Według danych literaturowych ryzyko wystąpienia epizodu ŻChZZ u osób z niedoborem białka S jest 8,5 - krotnie większe w porównaniu z osobami, które nie są nosicielami tego defektu (27,57). Podkreślić należy, że ponad 50% epizodów związanych z wrodzonym niedoborem białka S ma charakter samoistny, niepoprzedzony obecnością innego nabytego czynnika ryzyka ŻChZZ.

### *I.2.5 Oporność na aktywne białko C i jej związek z mutacją Leiden G1691A genu czynnika V*

W populacji kaukaskiej u około 20-60% pacjentów po przebytych epizodach żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej wykrywa się oporność na aktywne białko C-APCr (68,69). Termin ten jest definiowany, jako nieprawidłowo zmniejszona reakcja antykoagulacyjna składników osocza na działanie aktywnego białka C, na podstawie testu *in vitro* (13,26). Zjawisko to jako pierwszy w roku 1993 opisał Dahlback i wsp. (11). W roku 1994 Bertina i wsp. (11) wykazali, że za występowanie tego zjawiska odpowiedzialna jest punktowa mutacja w genie czynnika V, w pozycji 1691 eksonu 10 (mutacja Leiden), która powoduje zamianę pojedynczego aminokwasu – argininy na glicynę w pozycji 506 łańcucha aminokwasowego czynnika V, która jest jednym z miejsc proteolitycznego oddziaływania aktywnego białka C na aktywny czynnik V. Aktywny czynnik V Leiden jest dużo wolniej inaktywowany przez układ aktywnego białka C w porównaniu z czynnikiem Va niezmienionym przez mutację Leiden, co skutkuje zwiększonym efektem prokoagulacyjnym osocza (70). Co więcej czynnik Va jest kofaktorem inaktywacji czynnika VIIIa przez aktywne białko C. Mutacja Leiden dziedziczy się autosomalnie dominująco (70). Oporność na aktywne białko C może być również wynikiem mutacji H1299R. Łagodną postacią oporności na aktywne białko C powoduje mutacja Cambridge (R306T) (49) i Hong Kong (R306G) (24). Mutacja genu czynnika V Liverpool powoduje, że zmieniony czynnik V wykazuje słabą aktywność kofaktorową jako inaktywator czynnika VIIIa oraz jest wolniej inaktywowany przez aktywne białko C (73).

Zivelin i wsp. ocenia, że mutacja ta powstała około 21 tysięcy lat temu (84) po rozdzieleniu się ras, co wyjaśnia, dlaczego mutacja genu czynnika V występuje często u rasy kaukaskiej, natomiast w populacji Dalekiego Wschodu, Afryki i tubylczej ludności Australii i Ameryki jest prawie nieobecna (75). Częstość występowania czynnika V Leiden w populacji kaukaskiej wynosi 6%, natomiast w populacji afrykańskiej i azjatyckiej jest znacznie niższa (75). W populacji europejskiej mutacja ta występuje u około 40-50% osób z obciążonym rodzinnym wywiadem w kierunku żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych (11) i do nawet 15% w populacji ogólnej (Niemcy, Cypr, kraje Europy Środkowej) (72). Mutacja Leiden jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. Jej heterozygotyczna postać jest związana z 5-krotnie podwyższonym

ryzykiem wystąpienia zakrzepicy, podczas gdy w przypadku homozygot ryzyko to wzrasta nawet 50-krotnie.

### *1.2.6 Kliniczne następstwa obecności wariantu polimorficznego G20210A genu protrombiny*

Protrombina jest glikoproteina składającą się z pojedynczego łańcucha o masie 72 kDa. Gen kodujący budowę jej cząsteczki znajduje się na 11 chromosomie (78). W procesie krzepnięcia krwi jest ona proteolitycznie przekształcana w trombinę przez tzw. kompleks protrombinazy, powstający na powierzchni fosfolipidów błonowych płytek krwi, które pełnią rolę matrycy, na której aktywny czynnik X w obecności swego nieenzymatycznego kofaktora – czynnika Va tworzy kompleks. Poort i wsp. wykazali, że genetycznie uwarunkowany defekt cząsteczki protrombiny, objawiający się fenotypowo nieznacznie podwyższonym stężeniem protrombiny w osoczu, prowadzi do ciągłej zwiększonej gotowości prozakrzepowej. Opisywana zmiana pojedynczego nukleotydu guaniny - G na adeninę – A, w genie protrombiny w pozycji 20210, w końcu 3' nietranslacyjnego regionu DNA określana jest jako polimorfizm, ponieważ nie skutkuje zmianą struktury białka, a wpływa jedynie na jego zwiększoną ekspresję (12). Stężenie protrombiny w osoczu osób z polimorfizmem G20210A genu protrombiny jest o około 30% wyższe względem populacji bez tego polimorfizmu, czego skutkiem jest 3-4 krotny wzrost ryzyka wystąpienia ŻChZZ (79). Emmerich i wsp. wykazali, że współistnienie polimorfizmu G20210A i mutacji Leiden (podwójna heterozygota) zwiększa to ryzyko 20-krotnie (79). Około 2-4% zdrowej populacji południowej Europy jest nosicielami wariantu polimorficznego G20210A i około 4-8% populacji Europy północnej (80). Bykowska K. i wsp. w badaniach na grupie 323 pacjentów po przebytej zakrzepicy żyłnej oceniła jego częstość na 6,5% (56).

### *1.2.7 Kliniczne następstwa podwyższonej aktywności czynnika VIII*

Czynnik VIII jest glikoproteina wytwarzaną głównie w wątrobie. Po uczynnieniu przez trombinę aktywny czynnik VIII (VIIIa) jest kofaktorem aktywnego

czynnika IX (IXa) w reakcji aktywacji czynnika X (81). Gen kodujący czynnik VIII znajduje się na chromosomie X. W celu zapewnienia stabilności i ochrony przed proteolizą przez aktywne białko C, czynnik VIII występuje w krążeniu w kompleksie z czynnikiem von Willebranda (*ang. von Willebrand factor - vWF*) (81). Zatem jego stężenie jest zdeterminowane głównie stężeniem vWF, zależnego od grupy krwi w układzie AB0 (82). W badaniach populacyjnych przeprowadzonych na terenie Holandii stwierdzono, że iloraz szans doświadczenia pierwszego epizodu zakrzepowozatorowego u osoby, u której oznaczono stężenie czynnika VIII o wartości wyższej od 150% wynosi 4,8 w porównaniu z osobą, u której aktywność czynnika VIII znajduje się w granicach nieprzekraczających 100% (83). Pomimo tego, iż wcześniejsze badania sugerowały, że czynnik VIII, którego stężenie zależy głównie od stężenia czynnika von Willebranda, może być podwyższony w odpowiedzi na stan zapalny związany z zakrzepicą, niezależne badania prospektywne potwierdziły, że podwyższony poziom aktywności czynnika VIII może być czynnikiem przepowiadającym wystąpienie epizodu zakrzepowozatorowego, a nie tylko jego konsekwencją (84,85). Zauważono również wprost proporcjonalną zależność wzrostu aktywności czynnika VIII i jego antygeny, co świadczy o zwiększonej syntezie lub podwyższonej trwałości tego białka w osoczu, a nie jego aktywacji na powierzchni śródbłonna (86). Koster i wsp. stwierdzili wzrost aktywności czynnika VIII > 150 j/dl u 25% pacjentów, po przebytych pierwszym epizodzie ŻChZZ i u 11% zdrowych osób (83). W innych badaniach zaś wykazano zwiększoną > 175 j/dl aktywność czynnika VIII u 24% pacjentów z nawrotową ZZG, u 19% pacjentów po pierwszym epizodzie i tylko u 10% osób zdrowych (85).

### *I.3 Nabyte czynniki ryzyka ŻChZZ*

#### *I.3.1 Zespół antyfosfolipidowy*

Przeciwciała antyfosfolipidowe, są heterogenną grupą przeciwciał klasy IgG, IgM i IgA, skierowanych przeciwko ujemnie naładowanym kompleksom fosfolipidów z kofaktorami białkowymi, którymi mogą być m.in.:  $\beta_2$ GPI, protrombina, aneksyna V, białko C, białko S, wysokocząsteczkowy kininogen. (87). APA, mające właściwości przedłużania *in vitro* czasów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów zostały odkryte w roku 1952 w grupie pacjentów cierpiących na toczeń układowy rumieniowaty (88).



Wiele lat później wykazano, że opisana wyżej tendencja, nie przejawia się *in vivo*, jak można było oczekiwać - skłonnością do krwawień, lecz przeciwnie - wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowym i może występować nie tylko u pacjentów z chorobami układowymi, ale również u zdrowych osobników. Zespół antyfosfolipidowy jest schorzeniem o podłożu autoimmunologicznym, które można krótko scharakteryzować, jako obecność przeciwciał antyfosfolipidowych u pacjentów, cierpiących z powodu zakrzepicy (żylniej lub tętniczej) i/lub niepowodzeń ciąży (37,89). Może on występować na tle innych schorzeń o charakterze autoimmunologicznym, takich jak toczeń rumieniowaty układowy (wtórny APS) lub niezależnie od nich (pierwotny APS).

Objawy kliniczne APS:

- częste (obserwowane u > 20% chorych):
  - ŻChZZ,
  - małopłytkowość
  - poronienia,
  - udar niedokrwienny lub przejściowe niedokrwienie mózgu (*ang. transient ischemic attack, TIA*),
  - migrena,
  - sinica siateczkowata, *łac. livedo reticularis*,
- mniej powszechne, dotyczące 10-20% chorych:
  - rzucawka, stan przedrzucawkowy,
  - przedwczesny poród,
  - niewydolność zastawek serca,
  - anemia hemolityczna,
  - choroba wieńcowa,
- nietypowe, stwierdzane u <10% osób cierpiących na APS:
  - padaczka,
  - demencja,
  - zakrzepica żył lub tętnic siatkówki oka,
  - nadciśnienie płucne,
  - owrzodzenia kończyn dolnych,
  - nefropatia w przebiegu APS,
- rzadkie, występujące u <1% chorych:
  - krwotok nadnerczowy,

- zespół Budd-Chiari'ego (90).

Jedną z postaci klinicznych APS jest tzw. katastrofalny zespół antyfosfolipidowy (*ang. catastrophic antiphospholipid syndrome, CAPS*), w którym dochodzi do wytworzenia zakrzepów w naczyniach małego i dużego kalibru, prowadzące do niewydolności wielonarządowej, (co najmniej 3 narządów w ciągu 1 tygodnia). Śmiertelność w przebiegu tego schorzenia sięga 50% (91).

W oparciu o aktualne wytyczne wyliczyć można 3 grupy APA o udowodnionym znaczeniu klinicznym w etiologii APS; należą do nich:

- antykoagulant toczniowy (*łac. lupus anticoagulant, LA*),
- przeciwciała antykardiolipinowe,
- przeciwciała przeciwko  $\beta_2$  glikoproteinie I (anty  $\beta_2$ GPI), przy czym ACA oraz anty  $\beta_2$ GPI są wykrywane za pomocą testów immunoenzymatycznych z wykorzystaniem ich specyficzności antygenowej, gdzie łączą się z antygenami niezależnie od właściwości czynnościowych. Przeciwciała o typie LA wykrywane są, dzięki ich właściwościom przedłużenia czasu krzepnięcia osocza *in vitro*.

Na początku lat 90-tych dwie niezależne grupy naukowców udowodniły, że antygenem dla przeciwciał antyfosfolipidowych wykrywanych w testach na obecność ACA jest  $\beta_2$  glikoproteina I ( $\beta_2$ GPI) a nie kardiolipina, jak wcześniej sądzono (92,93). Białko, wiążąc się do ujemnie naładowanej powierzchni, odsłania swoje miejsca antygenowe. Powierzchnią taką mogą być ujemnie naładowane fosfolipidy, ale także płytka mikrotitracyjna, używana do testów ELISA; dlatego też niektóre APA łączą się bezpośrednio do  $\beta_2$ GPI bez obecności fosfolipidów. Istnieją przeciwciała o aktywności LA, które reagują z białkami innymi niż  $\beta_2$ GPI – np. z protrombiną (94). Ponadto wykazano również, że przeciwciała anty  $\beta_2$ GPI są bardziej swoiste, ale mniej czułe, jako marker zaburzeń krzepnięcia, zwianych z obecnością APS. Zdolność niektórych APA do przedłużenia czasów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów wynika z posiadania przez nie potencjału wytworzenia bivalentnych kompleksów pomiędzy przeciwciałem a  $\beta_2$ GPI (95) lub protrombiną (96). Kompleksy te mają zwiększone powinowactwo względem fosfolipidów i konkurują o tę samą powierzchnię katalityczną. Patomechanizm działania APA jest złożony i trudny do analizy. Istnieje wiele hipotez próbujących wyjaśnić prozakrzepowy mechanizm działania APA, między innymi zakładające zaburzenie funkcjonowania układu białka C, interferencję w układ fibrylizacji osoczowej, aktywację komórek śródbłonna naczyniowego ze zwiększonym wytwarzaniem mikrocząstek o działaniu prokoagulacyjnym, aktywację i płytek krwi oraz

składowych dopełniacza. Pewne hipotezy sugerują, że przyczyną zwiększonej tendencji zakrzepowej u pacjentek z niepowodzeniami ciąży jest przełamanie przeciwwakrzepowej tarczy aneksyny V przez przeciwciała antyfosfolipidowe. Aneksyna V, będąca białkiem łożyska o silnych właściwościach przeciwwakrzepowych, poprzez wiązanie fosfolipidów, częściowo redukuje powierzchnię, na której zachodzą procesy krzepnięcia (97). Dowodzą tego badania na hodowlach komórkowych, gdzie po inkubacji komórek śródbłonna z przeciwciałami przeciwko aneksynie V, dochodziło do szybszego wytworzenia się skrzepu (97). Badania *in vitro* przeprowadzone w obecności przeciwciał anti- $\beta_2$ GPI wykazały redukcję wiązania aneksyny V do nie-komórkowych powierzchni, opłaszczonych wcześniej fosfolipidami o ujemnym ładunku.

Kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego po raz pierwszy przedstawione w 1987 roku przez Harrisa (98), nie zmieniły się do dziś, co do zasady i nadal obejmują: współistnienie pewnych objawów klinicznych z nieprawidłowymi wynikami badań laboratoryjnych. Zostały one nieznacznie zmodyfikowane w roku 1999 (99), a następnie w 2006 na kongresie ISTH, gdzie podzielono je na kliniczne i laboratoryjne - aktualne do dziś (89). Do kryteriów klinicznych należą:

- zakrzepica w naczyniach tętniczych, żylnych lub w małych naczyniach krwionośnych narządów wewnętrznych (z wyjątkiem zakrzepicy żył powierzchownych) potwierdzona obiektywnymi metodami z zastosowaniem diagnostyki obrazowej lub badań histopatologicznych wykazujących brak cech stanu zapalnego w ścianie naczynia,
- niepowodzenia położnicze, definiowane, jako:
  - $\geq 1$  epizod obumarcia morfologicznie prawidłowego płodu po 10. tc. (prawidłowa morfologia potwierdzona badaniami USG lub bezpośrednią oceną płodu),
  - $\geq$  przedwczesny poród morfologicznie prawidłowego noworodka przed 34.tc. z powodu rzucaawki, stanu przedrzucaawkowego, niewydolności łożyska,
  - $\geq 3$  samoistne poronienia przed 10 tc. o niewyjaśnionej przyczynie, po wykluczeniu zmian anatomicznych, zaburzeń hormonalnych, chromosomalnych rodziców.

Kryteria laboratoryjne obejmują obecność w osoczu antykoagulantu toczniowego, stwierdzoną metodami zalecanymi przez SSC/ISTH (100,101); wykrycie w surowicy lub osoczu przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG lub IgM w średnim lub wysokim mianie ( $> 40$  GPL,  $> 40$  MPL, lub  $> 99$  percentyla względem

zdrowej populacji) lub obecność w surowicy lub osoczu przeciwciał przeciwko  $\beta_2$  glikoproteinie I w klasie IgG lub IgM (w mianie > 99 percentyla dla populacji zdrowej).

Rozpoznanie APS uzasadnia stwierdzenie obecności jednego spośród kryteriów laboratoryjnych (dwukrotnie w ciągu 12 tygodni) współistniejące, z co najmniej jednym kryterium klinicznym. Ryzyko zakrzepicy żyłnej, tętniczej oraz niepowodzeń ciąży w zależności od rodzaju wykrytych APA przedstawiono w tabeli nr 6.

*Tabela nr 6. Ryzyko doświadczenia epizodu zakrzepicy żyłnej lub tętniczej lub niepowodzeń ciąży w zależności od rodzaju APA (102).*

Rodzaj APA	Iloraz szans doświadczenia epizodu zakrzepicy żyłnej	Iloraz szans doświadczenia epizodu zakrzepicy tętniczej	Iloraz szans doświadczenia niepowodzeń ciąży
LA	3,84	2,25	1,94
ACA	2,33	3,16	2,01
anty $\beta_2$ GPI	2,10	2,40	1,96
> 1 rodzaj APA*	2,74	2,69	1,96

\*>1 rodzaj APA = LA+ACA lub LA+ anty-  $\beta_2$ GPI lub ACA+ anty- $\beta_2$ GPI lub ACA+ anty- $\beta_2$ GPI

(APA – przeciwciała antyfosfolipidowe, LA – antykoagulant toczniowy, ACA – przeciwciała antykardiolipinowe,  $\beta_2$ GPI -  $\beta_2$  glikoproteina I)

### 1.3.2 Inne czynniki ryzyka ŻChZZ

#### Wiek

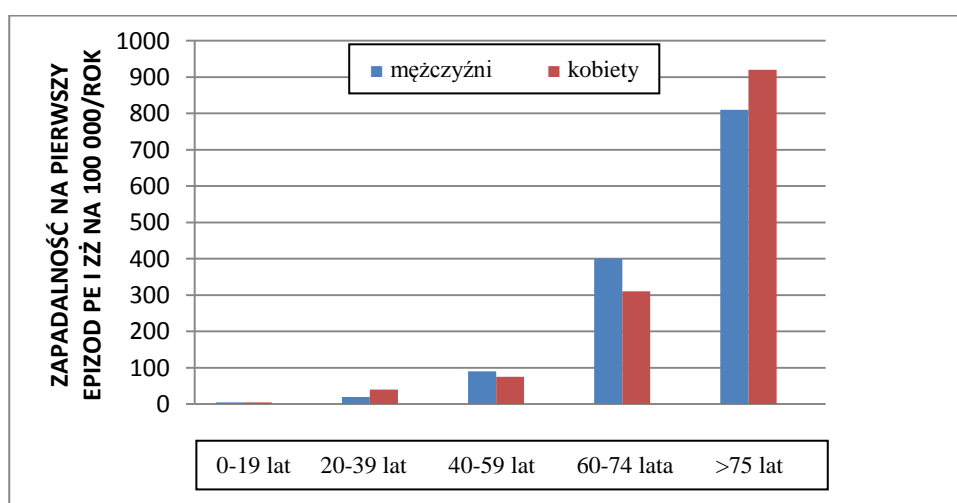
Zwiększenie odsetka powikłań zakrzepowo-zatorowych obserwuje się wraz ze wzrostem wieku badanej populacji: zapadalność jest tysiące razy wyższa wśród osób po 45 roku życia i wynosi 1/100/rok, podczas gdy w populacji dzieci pojawia się 1/ 100 000/ rok (2, 103). Wśród przyczyn wymienia się: zmniejszoną aktywność ruchową, współistnienie schorzeń nasilających tendencje prozakrzepowe, zmniejszone napięcie mięśniowe, i starzenie się układu żylnego - destrukcją zastawek, pełniących kluczową rolę w prawidłowym powrocie żylnym.

Zauważono również, że śmiertelność związana z wystąpieniem zatorowości płucnej jest dużo wyższa w grupie osób po 45 roku życia i wynosi 10%, podczas gdy

zator płucny, zakończony zejściem śmiertelnym występuje tylko u 1% pacjentów w młodszym wieku (2).

### *Płeć*

Wiele prac sugeruje, że ŻChZZ występuje częściej u osób płci męskiej (106), jednakże z dużych metaanaliz wynika, że jest ona spotykana z taką samą częstością zarówno w grupie mężczyzn jak i kobiet. Zauważyć można jednak, że w grupie kobiet częściej pojawia się w wieku rozrodczym, co można tłumaczyć przejściowymi czynnikami ryzyka, występującymi w tym okresie, związanymi ze stosowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, ciążą, porodem. Natomiast mężczyźni częściej niż kobiety chorują po 40 roku życia (2, 103).



Rycina nr 3. Zapadalność na pierwszy epizod zakrzepowo-zatorowy (zakrzepicy żyłnej (ZŻ) oraz zatorowości płucnej (PE) w zależności od wieku i płci (103) (wg. Oger E).

### *Ciąża, połóg, doustne środki antykoncepcyjne i hormonalna terapia zastępcza*

W krajach zachodnich zatorowość płucna jest trzecią po nadciśnieniu i sepsie przyczyną śmierci kobiet podczas ciąży i porodu, a zakrzepica żył głębokich należy do częściej występujących schorzeń związanych z tym stanem fizjologicznym (105). ŻChZZ jest chorobą, pojawiającą się w przebiegu 1-2/1000 ciąż; jej ryzyko wzrasta z wiekiem, sposobem porodu, współistnieniem innych czynników związanych ze stanem nadkrzepliwości (106). Ryzyko wystąpienia zakrzepicy u kobiety ciężarnej jest 5 - krotnie wyższe niż u kobiety w tym samym wieku, niebędącej w ciąży; w porożu ryzyko to wzrasta jeszcze około 12-krotnie i utrzymuje się do 3 miesięcy po porodzie (107). W ciąży poziom białka S znacznie się obniża, co w obecności dodatkowych czynników, takich jak zastój żylny związany z uciskiem płodu na żyłę główną dolną, zwiększone stężenie fibrynogenu, czynnika von Willebranda i czynnika VIII, może

stanowić podstawę, na bazie której dochodzi do wystąpienia epizodu zakrzepowo-zatorowego.

Innym problemem zdrowotnym dotyczącym kobiet w wieku rozrodczym jest częste występowanie zakrzepicy związanej ze stosowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, które weszły do użytku na szeroką skalę w roku 1959. Już w 1961 roku opisano pierwszy przypadek zatorowości płucnej u młodej kobiety, leczonej za ich pomocą z powodu endometriozy (108). Antykoncepcja hormonalna, ze względu na szerokie rozpowszechnienie należy do częstszych przyczyn zakrzepicy wśród młodych kobiet (109). Ryzyko zakrzepowe dla kobiety w wieku rozrodczym jest niższe niż 1/10000/rok a podczas zażywania doustnych środków antykoncepcyjnych wzrasta do 2-3/10000/rok (117). Wzrasta ono dość gwałtownie w czasie pierwszych czterech miesięcy od rozpoczęcia terapii i pozostaje niezmiennie przez cały okres jej trwania; obniża się do poziomu wyjściowego w ciągu 3 miesięcy od zaprzestania jej stosowania. Dane literaturowe wskazują, że pewne grupy kobiet są dużo bardziej narażone na wystąpienie epizodu zakrzepowo-zatorowego podczas stosowania doustnej antykoncepcji, należą do nich: kobiety otyłe, starsze (stosujące hormonalną terapię zastępczą oraz u kobiet z rodzinną trombofilią w wywiadzie, obejmującą niedobór białek antykoagulacyjnych: PC, PS, AT (57). Wykazano, że ryzyko zakrzepicy wzrasta 10 - krotnie u kobiet otyłych (111) i około 15-30 - krotnie u heterozygotycznych nosicielek mutacji Leiden i polimorfizmu genu protrombiny podczas stosowania doustnej antykoncepcji (110).

### *Duże zabiegi chirurgiczne i urazy wielonarządowe*

Urazy wielonarządowe, zwłaszcza związane z urazami głowy, uszkodzeniem rdzenia kręgowego, złamaniem miednicy czy kości udowej (112) oraz interwencje chirurgiczne są obciążone dużym ryzykiem wystąpienia epizodu zakrzepowo-zatorowego; w zależności od rodzaju zabiegu może ono sięgać nawet 50% pacjentów, u których nie zastosowano profilaktyki przeciwzakrzepowej. Najwyższe ryzyko (30-50%) wiąże się z operacjami neurochirurgicznymi i ortopedycznymi (113). Podobny stopień ryzyka wiąże się z operacjami brzucha, ginekologicznymi, urologicznymi (114). W pewnym uogólnieniu można stwierdzić, że im rozleglejszy zabieg tym wyższe ryzyko zakrzepowe stwarza. Badania naukowców na populacji z regionu Leiden, wykazały, że zabieg operacyjny około 6 – krotnie zwiększa ryzyko doświadczenia epizodu zakrzepowo-zatorowego (115).

## *Unieruchomienie*

Zastój żylny jest główną przyczyną zakrzepicy związanej z unieruchomieniem kończyn: paralizem, opatrunkiem gipsowym, długotrwałą podróżą (116). Wspólnym mianownikiem wszystkich tych stanów jest osłabienie pracy mięśni łydki, pełniących rolę pompy przeciskającej krew w górę. Unieruchomienie w pozycji siedzącej niesie ze sobą dużo wyższe ryzyko niż unieruchomienie w każdej innej pozycji ciała. Współcześnie odnotowuje się przypadki zakrzepicy spowodowanej spędzeniem 12 i więcej godzin przed ekranem komputera; ŻChZZ o takiej etiologii nazwano e-zakrzepicą (117).

## *Podróże samolotem*

Liczne prace dowodzą, że na wystąpienie epizodu zakrzepowozatorowego związanego z podróżą samolotem, poza unieruchomieniem, mają wpływ dodatkowe czynniki sprzyjające aktywacji układu krzepnięcia, takie jak: hypobaria i łagodna hypoksja. W 1986 roku opublikowano pracę, w której poddano analizie przypadki nagłej śmierci na londyńskim lotnisku Heathrow z podziałem na miejsce, w którym wystąpił incydent (hala odlotów vs hala przylotów). Dowiedziono w niej, że znaczna większość przypadków nagłej śmierci miała miejsce w hali przylotów; po dalszej analizie stwierdzono, że przyczyną zgonów była najczęściej zatorowość płucna. Jak obliczono ryzyko doświadczenia epizodu zatorowości płucnej było sześciokrotnie wyższe w hali przylotów w porównaniu z halą odlotów, co pośrednio dowodzi związku zakrzepicy z lotami samolotem (118).

## *Inne nabyte czynniki ryzyka ŻChZZ*

Do innych nabytych czynników ryzyka ŻChZZ należą: otyłość, choroba nowotworowa, zespół nerczycowy, nocna napadowa hemoglobinuria, choroby autoimmunologiczne (np. toczeń układowy), ostre infekcje, leki (np. thalidomide) (7).

## **II CEL PRACY**

Praca ma na celu:

1. Ocenę częstości występowania wrodzonej trombofilii w grupie pacjentów po przebytych epizodach żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej.
2. Analizę częstości wrodzonej trombofilii w zależności od wieku wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo - zatorowego w grupach wiekowych poniżej i powyżej 45 roku życia.
3. Zbadanie zależności pomiędzy rodzajem wrodzonej trombofilii a manifestacją kliniczną żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz wiekiem wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego.
4. Ocenę częstości występowania zespołu antyfosfolipidowego oraz jego wpływu na manifestację kliniczną ŻChZZ w badanej grupie chorych.
5. Analizę związku pomiędzy wrodzoną trombofilią złożoną lub współistnieniem wrodzonej trombofilii i zespołu antyfosfolipidowego a wiekiem wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego.



### III MATERIAŁ I METODY

#### III.1 GRUPA BADANA

Do retrospektywnej analizy zakwalifikowano 136 pacjentów po przebytych epizodzie żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej potwierdzonymi badaniami obrazowymi. Byli to pacjenci przyjęci do Oddziału Chorób Wewnętrznych i Hematologii Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. Józefa Strusia w Poznaniu, celem przeprowadzenia diagnostyki w kierunku trombofilii. Żylną chorobę zakrzepowo-zatorową diagnozowano na podstawie dostarczonych przez pacjenta wyników badań wykonanych w czasie trwania ostrego epizodu zakrzepowo-zatorowego: badanie dopplerowskie z kolorowym obrazowaniem przepływu lub wielorzędowa tomografia komputerowa z programem naczyniowym lub rezonans magnetyczny lub USG z testem uciskowym.

Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie analizy wyników badań uzyskanych w tej grupie pacjentów – sygnatura: 848/07.

##### Do analizy włączono chorych:

- z zakrzepicą żylną i/lub zatorowością płucną w wywiadzie,
- z zakrzepicą żylną i/lub zatorowością płucną u osoby z zakrzepicą i/lub zatorowością płucną w wywiadzie rodzinnym,
- z zakrzepicą żylną i/lub zatorowością płucną nawracającą,
- z zakrzepicą o nietypowej lokalizacji (żyły jamy brzusznej lub ośrodkowego układu nerwowego, żyły środkowej siatkówki oka, żyły powierzchowne),
- z martwicą skóry po zastosowaniu doustnych antykoagulantów,
- z zakrzepicą związaną z ciążą, stosowaniem doustnej antykoncepcji lub hormonalnej terapii zastępczej,
- co najmniej 3 miesiące po wystąpieniu ostrego epizodu zakrzepowo-zatorowego oraz ze stężeniem dimeru D < 500 ng/ml w dniu przyjęcia do oddziału,
- po zakończeniu leczenia pochodnymi kumaryny oraz heparyną i jej pochodnymi co najmniej 2 tygodnie przed dniem przeprowadzenia testów laboratoryjnych.

#### Kryteria wykluczające obejmują:

- ciążę,
- aktualnie stosowaną antykoncepcję hormonalną/hormonalną terapię zastępczą,
- zaburzenia funkcji wątroby (AlAT > 80 U/l, AspAT > 68 U/l w grupie kobiet i > 92 U/ml w grupie mężczyzn, stężenie bilirubiny > 2,0 mg/dl),
- zaburzenia funkcji nerek (stężenie kreatyniny > 2,0 mg/dl),
- tocień układowy rumieniowaty lub inne autoimmunologiczne choroby zapalne,
- chorobę nowotworową.

Ponieważ zaplanowano zbadanie częstości wrodzonej trombofilii w zależności od wieku wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego, pacjentów podzielono na dwie grupy wiekowe:

- osoby, u których ŻChZZ wystąpiła po raz pierwszy w wieku < 45 rż. – 61% (83/136),
- osoby z pierwszą manifestacją kliniczną ŻChZZ w wieku  $\geq$  45 rż – 39% (53/136).

W celu oceny wpływu wrodzonej trombofilii i APS na niepowodzenia położnicze, w grupie kobiet po epizodzie ŻChZZ wydzielono 40-osobową podgrupę kobiet w wieku rozrodczym (20-40 lat), spośród których 19 zgłaszało niepowodzenia ciąży w wywiadzie.

Pacjenci byli przyjmowani do oddziału zgodnie z ustalonym wcześniej terminem. Ogólne zalecenia dotyczące przygotowania do badań przekazywano im w dniu ustalania daty wykonania diagnostyki w kierunku trombofilii. Kobiety w wieku rozrodczym przyjmowano w 1-4 dniu cyklu miesięcznego oraz 2 miesiące po odstawieniu doustnych środków antykoncepcyjnych. W badanej grupie u części chorych istniały wskazania do przedłużonej antykoagulacji. Jeśli leczenie opierało się na stosowaniu doustnych antykoagulantów, informowano lekarza kierującego o konieczności zmiany wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej z doustnej antykoagulacji na heparynę drobnocząsteczkową na 2 tygodnie przed wyznaczoną datą przeprowadzenia badań. Celem tych działań była eliminacja fałszywie dodatnich wyników badań aktywności białka C, stężenia wolnego białka S, oporności na aktywne białko C oraz oznaczeń antykoagulantu toczniowego. Wartość INR > 2 wykluczała wykonanie tych oznaczeń. Aktywność antytrombiny oznaczano w trakcie leczenia doustnymi antykoagulantami, 2 tygodnie po odstawieniu heparyny lub po zakończeniu wtórnej profilaktyki przeciwzakrzepowej. Istotnym elementem badań była również

ocena stężenia D-dimeru, dzięki czemu nie włączano do grupy pacjentów, będących w trakcie ostrego epizodu zakrzepowego.

W materiale biologicznym, uzyskanym i opracowanym zgodnie metodyką opisaną na stronie 28, wykonano następujące oznaczenia:

- aktywność białka C,
- stężenie antygenu wolnego białka S,
- aktywność antytrombiny,
- obecność APCr,
- aktywność czynnika VIII,
- badanie obecności mutacji Leiden G1691A genu czynnika V,
- badanie obecności polimorfizmu G20210A genu protrombiny,
- czas częściowej tromboplastyny po aktywacji – aPTT,
- czas częściowej tromboplastyny po aktywacji z zastosowaniem odczynnika aPTT wrażliwego na obecność LA,
- badanie obecności antykoagulantu toczniowego,
- miano przeciwciał antykardiolipinowych (ACA) w klasie IgG i IgM,
- miano przeciwciał anty  $\beta_2$ -GPI w klasie IgG,
- czas protrombinowy,
- stężenie D dimeru.

Uzyskanie wyniku dodatniego było potwierdzane przez ponowne wykonanie oznaczenia z niezależnie pobranej próbki krwi, po wykluczeniu ostrego epizodu zakrzepowo-zatorowego. Średnie wartości oznaczeń tych parametrów przedstawiono w tabelach zamieszczonych w aneksie.

### **III.2 MATERIAŁ BIOLOGICZNY:**

Materiał do badań stanowiły: osocze ubogopłytkowe, osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczania antykoagulantu toczniowego, surowica oraz DNA, uzyskane w opisany poniżej sposób.

#### **Osocze ubogopłytkowe**

Krew pobierano z żyły łokciowej do probówki zawierającej buforowany roztwór cytrynianu dwusodowego o stężeniu 3,2 %, w stosunku 9:1 (9 części krwi na 1 część cytrynianu). Próbkę dostarczano do laboratorium w czasie krótszym niż 1 godzina od pobrania (w tym czasie materiał przechowywano w temperaturze 18-21°C), następnie próbkę odwirowywano (2000g, 10 min., 20°C), uzyskując osocze ubogopłytkowe.

#### **Osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczenia antykoagulantu toczniowego**

W celu wykluczenia fałszywie ujemnych wyników testów zależnych od fosfolipidów np. na obecność antykoagulantu toczniowego, uzyskaną próbkę osocza ubogopłytkowego ponownie wirowano (2500g, 10 min., 20°C - zgodnie z zaleceniami SSC/ISTH). W ten sposób pozbywano się resztkowej zawartości płytek krwi po pierwszym wirowaniu.

#### **Surowica**

Krew pobierano z żyły łokciowej do probówki zawierającej aktywator krzepnięcia w sposób zgodny z zaleceniami producenta, a następnie pozostawiano na 20 minut w temperaturze pokojowej celem wytworzenia się skrzepu. Po upływie tego czasu próbkę odwirowywano (2000g, 15 min., 4 °C) uzyskując surowicę.

#### **DNA**

DNA pozyskiwano z limfocytów krwi obwodowej pobranej na EDTA. Izolacji kwasu deoksyrybonukleinowego dokonywano przy użyciu zestawu QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit firmy Quiagen, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. DNA wykorzystywano do badań natychmiast lub zamrażano w temperaturze -70 °C i oznaczano w późniejszym terminie, po zebraniu serii próbek.

### **III.3 METODYKA OZNACZEŃ LABORATORYJNYCH CZYNNIKÓW TROMBOFILII:**

Oznaczenia laboratoryjne wykonano w Pracowni Hemostazy Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku U.M. w Poznaniu przy ul. Szamarzewskiego 82/84.

Zastosowano metody rekomendowane przez Brytyjski Komitet Standaryzacji w Hematologii (*ang. British Committee for Standards in Haematology, BCSH*) (120) oraz SSC/ISTH (89). Corocznie uzyskiwane certyfikaty zewnętrznej kontroli jakości badań układu hemostazy ECAT (*ang. External quality Control of diagnostic Assays and Tests*), nadawane zgodnie z normą ISO/ IEC 17043:2010, potwierdzają jakość oznaczeń wykonywanych w Pracowni Hemostazy.

#### **III.3.1 Metodyka oznaczenia czynników wrodzonej trombofilii**

##### **Metodyka oznaczenia aktywności białka C**

Oznaczenie aktywności białka C metodą chromogenną wykonywano przy użyciu zestawu Chrom Z Protein C firmy Helena BioSciences, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody: białko C zawarte w badanym osoczu jest aktywowane pod wpływem specyficznej frakcji jadu węża Agkistrodon contortrix, zawartej w stosowanym odczynniku. Przy współdziałaniu aktywnego białka C dochodzi do hydrolizy substratu chromogennego wprowadzanego do mieszaniny reakcyjnej w drugim etapie. Produktem tej reakcji jest paranitroanilina (pNA), nadająca próbce żółte zabarwienie. Natężenie barwy badanej, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 405 \text{ nm}$ , jest wprost proporcjonalne do aktywności białka C w badanym osoczu.
- b) Materiał do badań stanowiło osocze ubogopłytkowe.
- c) Metodyka oznaczenia: przed przystąpieniem do właściwego oznaczenia przygotowywano bufor do rozcieńczania próbek/osocza wzorcowego/kontrolnego: do 5 ml NaCl 0,9% dodawano 300  $\mu\text{l}$  wody dejonizowanej i mieszano. W kolejnym etapie dokonywano seryjnego rozcieńczenia osocza kalibracyjnego, o znanej aktywności białka C, w celu uzyskania krzywej wzorcowej. Do 4 probówek polipropylenowych dodawano kolejno: 300  $\mu\text{l}$ , 350  $\mu\text{l}$ , 375  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$  przygotowanego buforu, a następnie do 3 pierwszych dodawano kolejno 100  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$  osocza kalibracyjnego, a czwartą

próbówkę pozostawiono z pierwotną zawartością. W ten sposób uzyskiwano rozcieńczenia osocza wzorcowego, w których aktywność białka C wynosiła: 100%, 50%, 25%, 0%. W kolejnym etapie rozcieńczano osocze badane i kontrolne w przygotowanym buforze: do 400 µl buforu dodawano 100 µl osocza badanego lub kontrolnego. Przed rozpoczęciem oznaczenia ogrzewano odczynniki: aktywator białka C oraz substrat chromogeny (37°C, 10 min.). Oznaczenie aktywności białka C wykonywano w seriach, w próbkach polipropylenowych umieszczonych w bloku grzejnym (37° C). Jednocześnie oznaczano 10 próbek: 4 próbki odpowiadające seryjnym rozcieńczeniom krzywej wzorcowej, 2 próbki odpowiadające oznaczeniom w osoczu kontrolnym, oraz 4 próbki badanego osocza. W czasie t=0 przenoszono 50 µl rozcieńczonej próbki osocza do próbki polipropylenowej i inkubowano 2 minuty, następnie dodawano 100 µl aktywatora, a po upływie 5 minut 100 µl substratu chromogenego. Mieszaninę inkubowano 10 minut, a następnie zatrzymywano rozwój reakcji barwnej przez dodanie 100 µl kwasu octowego lodowatego. Z próbek polipropylenowych przenoszono po 200 µl otrzymanej mieszaniny reakcyjnej na mikropłytkę i odczytywano absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali 405 nm.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody, wyrażany jako procent aktywności oznaczany względem osocza referencyjnego: 70-140%.

### **Metodyka oznaczenia stężenia antygeny wolnego białka S**

Oznaczenie stężenia antygeny wolnego białka S w osoczu metodą ELISA wykonywano z wykorzystaniem zestawu firmy Helena BioSciences Europe, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody: wolne białko S zawarte w badanej próbce osocza wiąże się z przeciwciałem specyficznym dla ludzkiego wolnego białka S, opłaszczonym na płytce polistyrenowej. W kolejnym etapie koniugat peroksydazy chrzanowej z poliklonalnym przeciwciałem, skierowanym przeciwko ludzkiemu wolnemu białku S, wiąże się z ludzkim wolnym białkiem S. Dodanie roztworu substratu chromogenego - tetrametylobenzydyny (TMB) – rozpoczyna rozwój reakcji barwnej z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP), pochodzącej z koniugatu. HRP, który w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizuje reakcję utlenienia tetrametylobenzydyny do tetrametylobenzydynodiiminy o niebieskim zabarwieniu. Rozwój reakcji enzymatycznej jest zatrzymywany przez dodanie

kwasu, co powoduje zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm jest wprost proporcjonalne do stężenia wolnego białka S w badanej próbce osocza.

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed oznaczeniem doprowadzano wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (18-25° C), a następnie przygotowywano roztwór płuczący: do zlewki przenoszono 970 ml wody dejonizowanej i dodawano 30 ml stężonego buforu do płukania – mieszano. Osocze referencyjne rekonstruowano przez rozpuszczenie zawartości fiołki w 0,5 ml wody destylowanej, zmieszanie i odstawienie na 15 minut. Po upływie tego czasu wykonywano serię rozcieńczeń osocza referencyjnego w celu uzyskania krzywej wzorcowej: do sześciu probówek polipropylenowych dodawano kolejno 500 µl, 500 µl, 500 µl, 500 µl, 1000 µl, 2000 µl buforu do rozcieńczania próbek a następnie kolejno dodawano 30 µl, 20 µl, 15µl, 10 µl, 10 µl, 10 µl osocza kalibracyjnego. W kolejnym etapie przygotowywano rozcieńczenie próbek badanych i osoczy kontrolnych w stosunku 1:26 - do 500 µl buforu do rozcieńczania próbek dodawano 20 µl osocza badanego/kontrolnego i mieszano. Następnie nakładano po 100 µl rozcieńczonych próbek osocza badanego/kontrolnego/ wzorcowego do studzienek płytki. Do studzienki przeznaczonej na ślepą odczynnikową dodawano 100 µl buforu do rozcieńczania próbek. Tak przygotowaną płytkę ELISA inkubowano (temp. pokojowa, 40 min.). Po upływie czasu inkubacji zawartość studzienek wylewano i płukano 4-krotnie – za każdym razem napełniając studzienkę buforem płuczącym, wylewając go i osuszając płytkę przy pomocy bibuły, tak aby pozbyć się resztek buforu płuczącego. W kolejnym etapie dodawano do studzienek po 100 µl koniugatu i inkubowano (temp. pokojowa, 10 min.), po czym płukano płytkę, a następnie dodawano po 100 µl substratu chromogennego i ponownie inkubowano (temp. pokojowa, 10 min.). W tym czasie zachodziła reakcja barwna z wytworzeniem niebieskiej tetrametylobenzodiny. Po upływie 10 minut rozwój reakcji barwnej zatrzymywano przez dodanie kwasu siarkowego, co powodowało zmianę barwy z niebieskiej na żółtą. Odczytu absorbancji przy długości fali 450 nm dokonywano w czasie nie dłuższym niż 30 minut.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 50-150%

### **Metodyka oznaczenia oporności czynnika V na aktywne białko C (APCr)**

Oznaczenie oporności czynnika V na aktywne białko C (APCr) wykonywano z wykorzystaniem zestawu firmy Helena BioSciences Europe, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody: oporność na aktywne białko C wykrywana jest z wykorzystaniem zmodyfikowanego testu aPTT. Próbkę osocza pacjenta jest rozcieńczana w osoczu deficytowym, pozbawionym czynnika V. Dzięki temu wpływ niedoboru innych czynników krzepnięcia na długość aPTT jest znoszony, a wartość aPTT zależy tylko od aktywności czynnika V w badanym osoczu. Do oznaczenia stosowane są dwa rodzaje aPTT. Pierwszy z nich to standardowy odczynnik do oznaczania aPTT, natomiast drugi stanowi mieszaninę standardowego odczynnika do oznaczania aPTT z jadem węża Agkistrodon Controtrix Contortrix, który powoduje aktywację układu białka C i uzyskanie przez nie zdolności inaktywacji obecnego w badanej próbce aktywnego czynnika V. W dwóch niezależnych próbkach osocza badanego, rozcieńczonego osoczem substratowym pozbawionym czynnika V, dokonywane jest oznaczenie aPTT z użyciem obu odczynników. Współczynnik R (*ang. ratio*) jest obliczany poprzez podzielenie wartości czasu aPTT oznaczonego z zastosowaniem odczynnika aPTT z dodatkiem aktywatora białka C, przez standardowy aPTT.

$R > 2$  oznacza, że aktywny czynnik V jest prawidłowo inaktywowany przez aktywne białko C, co dowodzi jego prawidłowej budowy (braku mutacji czynnika V),

$R \leq 2$  świadczy o oporności czynnika V na inaktywację przez aktywne białko C – obecności mutacji genu czynnika V.

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: do dwóch naczynek pomiarowych umieszczonych w aparacie Fibrintimer II (Siemens, Niemcy) dodawano po 80  $\mu$ l osocza pozbawionego czynnika V (z zestawu) i po 20  $\mu$ l osocza badanego; do pierwszego z nich dodawano 100  $\mu$ l standardowego odczynnika do oznaczania aPTT, a do drugiego: 100  $\mu$ l odczynnika PCA.aPTT (z jadem węża), a następnie obydwie naczynka inkubowano w aparacie Fibrintimer przez 5 minut w temperaturze 37 °C. Po upływie tego czasu przenoszono naczynka do komory pomiarowej i dodawano 100  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub>, co uruchamiało pomiar czasu krzepnięcia obu próbek. Otrzymany wynik (w sekundach) zapisywano i dla tej samej próbki



badanej powtarzano procedurę ponownie, tak aby każde z oznaczeń z odpowiednim rodzajem aPTT wykonane było podwójnie.

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanego zestawu:  $R \geq 2$ .

### **Metodyka oznaczenia aktywności antytrombiny**

Oznaczenie aktywności antytrombiny w osoczu metodą chromogenną wykonywano przy użyciu zestawu Antithrombin Xa (Chromogenic) firmy Helena BioSciences Europe, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody: antytrombina zawarta w badanej próbce osocza inaktywuje czynnik Xa, dodawany w nadmiarze w pierwszym etapie reakcji. W drugim etapie substrat chromogeny wprowadzany do mieszaniny jest przekształcany przez reszkowy czynnik Xa do żółto zabarwionej paranitroaniliny. Natężenie barwy mieszaniny reakcyjnej jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia antytrombiny w badanej próbce osocza.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Metodyka oznaczenia: 30 minut przed przystąpieniem do wykonania oznaczenia wyjmowano odczynniki z lodówki tak, aby osiągnęły temperaturę pokojową, a następnie przygotowywano bufor do rozcieńczania próbek/ osocza wzorcowego/ kontrolnego. Krzywą wzorcową przygotowywano w 4 próbkach polipropylenowych. Do pierwszej z nich dodawano 990  $\mu$ l buforu do rozcieńczania próbek oraz 100  $\mu$ l osocza referencyjnego. Do kolejnych trzech probówek dodawano po 500  $\mu$ l buforu do rozcieńczania próbek, a następnie przez przeniesienie 500  $\mu$ l mieszaniny z pierwszej próbki seryjnie rozcieńczano osocze referencyjne dla uzyskania 4 punktów krzywej wzorcowej o aktywności antytrombiny 100%, 50%, 25%, 12,5%. Osocze badane oraz kontrolne rozcieńczano buforem w stosunku 1: 100 - do 990  $\mu$ l buforu dodawano 10  $\mu$ l osocza badanego lub kontrolnego. Przed rozpoczęciem oznaczania ogrzewano odczynniki: czynnik Xa i substrat (37° C, 10 min.). Oznaczenie aktywności antytrombiny wykonywano w seriach po 10, w próbkach polipropylenowych, umieszczonych w bloku grzejnym o temperaturze 37° C, według schematu: w czasie  $t=0$  przenoszono 60  $\mu$ l rozcieńczonej próbki osocza do próbki polipropylenowej i inkubowano 3 minuty, następnie dodawano 60  $\mu$ l czynnika Xa a po upływie 1 minuty - 60  $\mu$ l substratu chromogenego. Mieszaninę inkubowano 3 minuty a następnie zatrzymywano rozwój reakcji

barwnej przez dodanie 60 µl kwasu octowego lodowatego. Z probówek polipropylenowych przenoszono po 200 µl otrzymanej mieszaniny reakcyjnej na mikropłytkę i odczytywano absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali 405 nm.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody, wyrażany jako procent aktywności względem osocza referencyjnego: 78-122%.

### **Metodyka oznaczenia aktywności czynnika VIII**

Oznaczenie aktywności czynnika VIII metodą koagulometryczną wykonywano z wykorzystaniem osocza deficytowego pozbawionego czynnika VIII firmy Helena BioSciences Europe, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody jest oparta na modyfikacji oznaczenia aPTT, w której obserwuje się zdolność osocza badanego do korekcji aPTT w mieszaninie osocza badanego i substratowego pozbawionego czynnika VIII. Stopień korekcji aPTT uzyskany z oznaczenia próbki badanej jest porównywany z czasem uzyskanym dla rozcieńczonych próbek osocza wzorcowego o znanej aktywności czynnika VIII skalibrowanego względem standardu WHO.
- b) Materiał badany: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: w pierwszej kolejności sporządzano krzywą wzorcową przy użyciu osocza wzorcowego oraz buforu weronalowego: do kolejnych probówek dodawano 400 µl, 900 µl, 1900 µl, 3900 µl buforu weronalowego, a następnie do każdej z nich dodawano po 100 µl osocza referencyjnego i mieszano. W ten sposób uzyskano następującą aktywność czynnika VIII w kolejnych próbkach 100%, 50%, 25%, 12,5%. Następnie rozcieńczano osocze badane oraz kontrolne w stosunku 1:4 - do 400 µl buforu weronalowego dodawano 100 µl osocza badanego lub kontrolnego i mieszano. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki do oznaczania aktywności czynnika VIII inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie ogrzewano zestaw odczynników do oznaczania aPTT w aparacie Fibrintimer II (37° C, 15 min.). Po upływie tego czasu do naczynka pomiarowego z mieszadłem przenoszono 50 µl osocza deficytowego pozbawionego czynnika VIII, następnie dodawano 50 µl osocza badanego/ kontrolnego /wzorcowego rozcieńczonego (1:4) oraz 50 µl odczynnika aPTT SiL Minus, i inkubowano (37 °C, 3 min.). Po upływie tego czasu przenoszono naczynko do

komory pomiarowej i dodawano 50 µl CaCl<sub>2</sub>, co uruchamiało pomiar czasu do powstania stabilnego skrzepu fibrynowego, zatrzymującego ruch obrotowy mieszadełka. Wynik oznaczenia zapisywano. Dla każdego z oznaczanych osoczy procedurę wykonywano dwukrotnie. Do dalszych obliczeń wykorzystywano wartość średnią z obu oznaczeń.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 70-150% względem osocza referencyjnego kalibrowanego wg. WHO.

### **Metodyka oznaczenia obecności mutacji G1691A genu czynnika V oraz polimorfizmu G20210 A genu protrombiny**

Celem rozpoznania wariantów genetycznych G1691A genu czynnika V oraz G20210A genu protrombiny zastosowano metodę PCR RFLP multipleks według Ripoll L. i wsp. (71).

- a) Zasada metody: PCR jest metodą opartą na kopiowaniu i powielaniu wybranych fragmentów DNA. Składa się z kilku następujących po sobie cyklicznie etapów: denaturacji, hybrydyzacji starterów oraz syntezy komplementarnych nici. Technika PCR RFLP multipleks polega na amplifikowaniu wielu matryc podczas jednej reakcji PCR, dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu różnych zestawów starterów. Uzyskane produkty poddawane są trawieniu za pomocą enzymów restrykcyjnych, rozpoznających określone sekwencje nukleotydowe. Odpowiedni dobór enzymów pozwala wykryć zmianę nawet pojedynczego nukleotydu. Analizę długości fragmentów DNA po restrykcji umożliwia rozdział elektroforetyczny uzyskanych produktów reakcji.

- b) Materiał do badań: DNA

- c) Reakcja PCR:

-zastosowano następujące zestawy starterów:

- FVA: 5'–GCAGATCCCTGGACAGTC–3'

FVB: 5'–TGTTATCACACTGGTGCTAA–3' – w celu wykrycia mutacji Leiden G1691A genu czynnika V

- PTH1: 5'–CAATAAAAGTGACTCTCATC–3'  
 PTH2: 5'–AGGTGGTGGATTCTTAAGTC–3' – w celu wykrycia polimorfizmu G20210A genu czynnika protrombiny

Warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli nr 7.

Tabela 7. Warunki reakcji PCR zastosowanej w analizie obecności mutacji Leiden G1691A oraz polimorfizmu genu protrombiny

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	94°	2 minuty
Denaturacja	94°	10 sekund
Przylączenie starterów	54°	10 sekund
Elongacja	72°	15 sekund
Elongacja końcowa	72°	3 minuty

33 cykle

- d) Trawienie produktów reakcji PCR przeprowadzono z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *TaqI* (Promega), pozyskanego oryginalnie z bakterii *Thermus aquaticus*
- e) Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w 8% żelu poliakrylamidowym
- f) Wybarwianie żeli dokonano przez inkubację żeli w roztworze bromku etydyny
- g) Ocena produktów reakcji przeprowadzana była z zastosowaniem transiluminatora UV

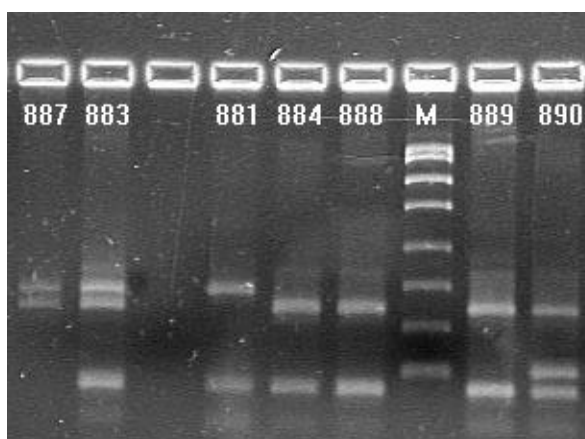
**Po PCR** FVL 175 pz (A) mut. > **po restrykcji:** 157 pz (G – typ dziki) + 18pz

**Po PCR** PTH 118 pz (A) mut. > **po restrykcji:** 98 pz (G – typ dziki) + 20pz

### Interpretacja żeli:

**FVL G1691A**      1 prążek na wysokości 175 pz homozygota, 2 allele zmutowane  
2 prążki 175 pz + 157 pz – heterozygota  
1 prążek 157 pz – homozygota, typ dziki

**F II G20210A**      1 prążek 118 pz – homozygota, 2 allele zmutowane  
2 prążki 118 i 98 pz – heterozygota  
1 prążek 98 pz – homozygota, typ dziki



Rycina nr 4: Przykładowy obraz żelu. M – marker wielkości DNA; 887, 883 – heterozygoty FVL G1691A; 881 – homozygota zmutowana FVL G1691A; 890 – heterozygota FII G20210A

### III.3.2 Metodyka oznaczeń czynników nabytej trombofilii

#### Metodyka oznaczenia czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji - aPTT

Do oznaczenia aPTT zastosowano dwa rodzaje odczynników, które różnią się między sobą stężeniem fosfolipidów. Takie rozwiązanie umożliwia wykazanie zależności przedłużenia aPTT od fosfolipidów i potwierdzenie obecności przeciwciał antyfosfolipidowych (antykoagulantu toczeniowego) w badanej próbce osocza.

Oznaczenie aPTT wykonywano przy użyciu zestawu aPTT SiL Minus (o standardowym stężeniu fosfolipidów) firmy Helena BioSciences Europe, Wielka Brytania.

- a) Zasada metody: aPTT jest miarą aktywacji protrombiny przez czynniki układu wewnątrzpochodnego po maksymalnej aktywacji czynnika XI i XII.

Przedłużenie czasu aPTT najczęściej związane jest z niedoborem czynników krzepnięcia drogi wewnątrzpochodnej (VIII, IX, XI, XII, prekalikreiny i wielkocząsteczkowego kininogenu). aPTT może się również przedłużać w przypadku niedoboru czynników drogi wspólnej: II, V, X, fibrynogenu lub w obecności antykoagulantu toczniowego.

- b) Materiał do badań osocze ubogopłytkowe przeznaczone do badania obecności antykoagulantu toczniowego.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki inkubowano (temperatura pokojowa, 15 min.), a następnie ogrzewano w aparacie Fibrintimer II (37 °C, 15 min.). Do naczynka pomiarowego z mieszadłem przenoszono 50 µl odczynnika aPTT SiL Minus, a następnie dodawano 50 µl osocza badanego i inkubowano (37 °C, 3 min.). Po upływie tego czasu przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano 50 µl CaCl<sub>2</sub>, co uruchamiało pomiar czasu do powstania stabilnego skrzepu. Oznaczenie aPTT dla każdej badanej próbki wykonywano podwójnie – wynik podawano, jako wartość średnią z obu oznaczeń.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 28,0” – 35,0”.

### **Metodyka oznaczenia aPTT (Actin FSL)**

Oznaczenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji – aPTT (Actin FSL) metodą koagulometryczną wykonywano z zastosowaniem odczynnika Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent (o zwiększonym stężeniu fosfolipidów) firmy Siemens, Niemcy.

- a) Zasada metody: pomiar aPTT przy użyciu odczynnika do oznaczania aPTT Actin FSL wzbogaconego w fosfolipidy i posiadającego zwiększoną wrażliwość na inhibitory toczniopodobne.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe przeznaczone do badania obecności antykoagulantu toczniowego.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki inkubowano (temperatura pokojowa, 15 min.), a następnie ogrzewano w aparacie Fibrintimer II (37 °C, 15 min.). Do naczynka pomiarowego z mieszadłem przenoszono 50 µl odczynnika aPTT Actin FSL, a następnie dodawano 50 µl osocza badanego i inkubowano (37 °C, 3 min.). Po upływie tego czasu przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano 50 µl CaCl<sub>2</sub>,

co uruchamiało pomiar czasu do powstania stabilnego skrzepu. Oznaczenie aPTT dla każdej badanej próbki wykonywano podwójnie – wynik podawano jako wartość średnią z obu oznaczeń

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 28,0''-36,0''.

### **Metodyka oznaczenia obecności antykoagulantu toczniowego**

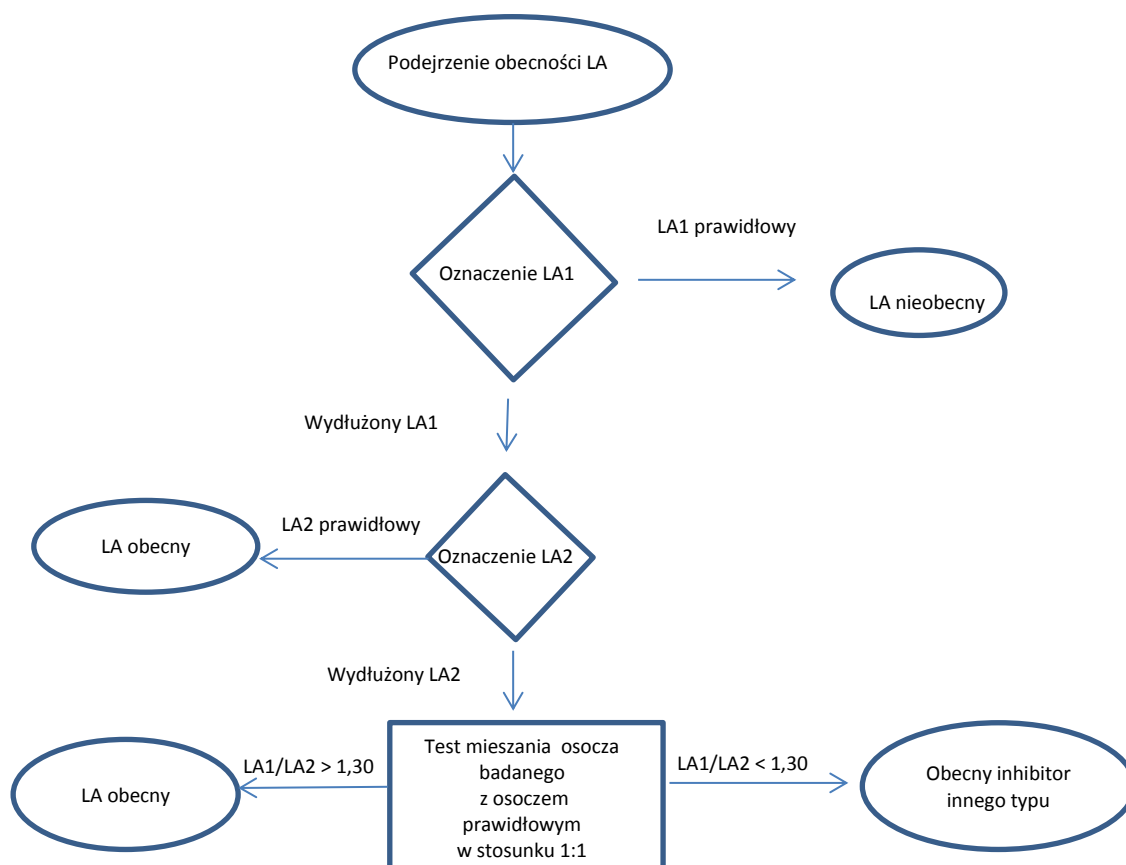
Oznaczenie obecności antykoagulantu toczniowego wykonywano metodą koagulometryczną opartą na badaniu czasu krzepnięcia próbki pod wpływem rozcieńzonego jadu żmii Russella zawartego w odczynnikach LA<sub>1</sub>, LA<sub>2</sub> firmy Siemens, Niemcy.

Zgodnie z zaleceniami SSC/ISTH diagnostykę obecności antykoagulantu toczniowego przeprowadzano 3-etapowo: w etapie 1 wykonywano test przesiewowy przy użyciu odczynnika, zawierającego standardowe stężenie fosfolipidów. Oznaczenie to miało na celu wykazanie przedłużenia minimum jednego z czasu krzepnięcia zależnych od fosfolipidów: aPTT lub dRVV (rozcieńczony jad żmii Russella, *ang. dilute Russells viper venom test*), w 2 etapie przeprowadzano test mieszania osocza badanego z prawidłowym (w stosunku 1:1). Wynik wskazywał czy zjawisko przedłużenia czasu krzepnięcia w teście przesiewowym miało charakter zależny od fosfolipidów: korekcja czasu krzepnięcia w mieszaninie dowodziła niedoboru czynnika krzepnięcia lub stosowania leków przeciwkrzepliwych, natomiast brak korekcji wskazywał na zależność zjawiska od fosfolipidów, w 3 etapie wykonywano test potwierdzający z zastosowaniem odczynnika, zawierającego wysokie stężenie fosfolipidów. Jeśli przedłużenie czasu krzepnięcia w teście przesiewowym miało charakter zależny od fosfolipidów – czas krzepnięcia osocza w teście potwierdzenia skracał się do wartości prawidłowych (nadmiar fosfolipidów wysycał obecne w osoczu pacjenta przeciwciała antyfosfolipidowe, co pozwalało na wytworzenia skrzepu w krótszym czasie).

a) Zasada metody: oparta jest na bezpośredniej aktywacji czynnika X przez rozcieńczony jad żmii Russella (dRVV) zawarty w odczynniku LA<sub>1</sub>. Czas krzepnięcia próbki zależny jest wówczas od stężenia czynników II, V, X, fibrynogenu, fosfolipidów. Jeśli czas krzepnięcia próbki badanej jest poza zakresem referencyjnym wykonywany jest test potwierdzający, mający na celu wykazanie zależności tego zjawiska od fosfolipidów. W oznaczeniu tym badane osocze jest aktywowane za pomocą odczynnika zawierającego dRVV, wzbogaconego w fosfolipidy (odczynnik LA<sub>2</sub>). Skrócenie czasu krzepnięcia

próbki pod wpływem LA<sub>2</sub> dowodziło zależności zjawiska od fosfolipidów i wskazywało na obecność przeciwciał antyfosfolipidowych o charakterze antykoagulantu toczniowego w badanej próbce osocza.

W celu wykluczenia niedoboru czynników krzepnięcia: II, V, X, fibrynogenu, które mogą wpływać na przedłużenie czasu krzepnięcia uzyskanego przy użyciu odczynnika LA<sub>1</sub>, wykonywano test mieszania osocza badanego z osoczem prawidłowym (1:1). Brak korekcji czasu krzepnięcia w mieszaninie dowodzi zależności przedłużenia czasu krzepnięcia testu przesiewowego od krążącego antykoagulantu.



Rycina nr 5. Schemat postępowania diagnostycznego w przypadku podejrzenia obecności antykoagulantu toczniowego

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczenia antykoagulantu toczniowego.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia doprowadzano odczynniki LA<sub>1</sub> i LA<sub>2</sub> do temperatury pokojowej, po czym rozpuszczano zawartość fiołki zgodnie z zaleceniami producenta. Po upływie 10 minut inkubowano odczynnik LA<sub>1</sub>, LA<sub>2</sub> w aparacie Fibrintimer II (37°C, 10 min.) i przystępowano do wykonania oznaczenia. Do naczynka pomiarowego dodawano 100 µl osocza badanego i inkubowano (37°C, 1 min.), następnie



przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano odczynnika LA<sub>1</sub> lub LA<sub>2</sub>, co uruchamiało pomiar czasu do wytworzenia skrzepu. Oznaczenie LA<sub>1</sub>, LA<sub>2</sub> dla każdego pacjenta wykonywano dwukrotnie. Wynik poszczególnych oznaczeń dla LA<sub>1</sub>, LA<sub>2</sub> podawano w sekundach, natomiast końcowy wynik oznaczenia przedstawiano w postaci ilorazu wyniku czasu krzepnięcia osocza badanego otrzymanego z oznaczeń za pomocą odczynników LA<sub>1</sub> i LA<sub>2</sub> (ang. LA Ratio):

$$\text{LA Ratio} = \frac{\text{czas krzepnięcia osocza badanego otrzymany przy użyciu odczynnika LA}_1}{\text{czas krzepnięcia osocza badanego otrzymany przy zastosowaniu odczynnika LA}_2}$$

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody:

LA1: 31-45 sekund,

LA2: 30-38 sekund,

LA ratio < 1,3.

### **Metodyka oznaczenia przeciwciał antykardiolipinowych – ACA w klasie IgG i IgM**

Oznaczanie miana przeciwciał antykardiolipinowych – ACA w klasie IgG i IgM metodą immunoenzymatyczną ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wykonywano z zastosowaniem testu firmy BioSystems, Hiszpania.

a) Zasada metody: przeciwciała antykardiolipinowe obecne w badanej próbce łączą się z antygenem opłaszczającym studzienki mikro płytki ELISA. W kolejnym etapie koniugat przeciwciał przeciwko ludzkiej immunoglobulinie klasy IgG lub IgM z peroksydazą chrzanową, przyłącza się do przeciwciał antykardiolipinowych klasy IgG lub IgM wcześniej zaadsorbowanych na płytce. Dodanie roztworu substratu chromogennego - tetrametylobenzydyny (TMB) – zapoczątkowuje rozwój reakcji barwnej z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP), pochodzącej z koniugatu. HRP w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizuje reakcję utlenienia tetrametylobenzydyny do tetrametylobenzydynodiiminy o niebieskim zabarwieniu. Rozwój reakcji enzymatycznej jest zatrzymywany przez dodanie kwasu solnego, co powoduje zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm jest wprost proporcjonalne do miana przeciwciał antykardiolipinowych odpowiednio w klasie IgG i IgM, w badanej próbce.

- b) Materiał badany: surowica.
- c) Wykonanie oznaczenia: po wyjęciu z lodówki wszystkie odczynniki pozostawiano w temperaturze pokojowej na 20 minut, a następnie sporządzano rozcieńczenia robocze próbek badanych (1:100): do 495  $\mu$ l buforu do rozcieńczania próbek dodawano 5  $\mu$ l surowicy badanej. Do studzienek mikropłytki dodawano po 100  $\mu$ l surowic wzorcowych IgG/IgM, kontroli dodatniej i ujemnej oraz rozcieńczonych próbek badanych. Mikropłytkę inkubowano (temp. pokojowa, 30 min., w wilgotnej komorze). Zawartość studzienek wylewano i przemywano je buforem płuczającym. W kolejnym etapie dodawano koniugat IgG do studzienek przeznaczonych do oznaczenia przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG oraz koniugat IgM do studzienek przeznaczonych do oznaczenia przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgM, po czym inkubowano płytkę (temp. pokojowa, 15 min., w wilgotnej komorze). Po upływie czasu inkubacji ponownie płukano płytkę, dodawano po 100  $\mu$ l substratu do każdej studzienki i inkubowano (temp. pokojowa 15 min., bez dostępu światła). W celu zatrzymania dalszego rozwoju reakcji barwnej do studzienek dodawano po 100  $\mu$ l kwasu solnego. Absorbancję próbek odczytywano z zastosowaniem spektrofotometru, przy długości fali  $\lambda = 450$  nm.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody:
- ACA w klasie IgG  $\leq 11,3$  GPL,
  - ACA w klasie IgM  $\leq 10,4$  MPL.

### **Metodyka oznaczenia miana przeciwciał anty $\beta_2$ -GPI w klasie IgG**

Oznaczenie miana przeciwciał anty  $\beta_2$ -GPI w klasie IgG metodą immunoenzymatyczną ELISA wykonywano z zastosowaniem zestawu Quanta Lite<sup>®</sup>  $\beta_2$ -GPI IgG firmy Inova Diagnostics, USA.

- a) Zasada metody: przeciwciała anty  $\beta_2$ -GPI, pochodzące z próbki badanej łączą się z natywną, oczyszczoną  $\beta_2$ -GPI opłaszczającą płytkę. W kolejnym etapie reakcji koniugat (przeciwciała, skierowane przeciwko ludzkiej IgG, znakowane enzymem), łączy się z przeciwciałami anty  $\beta_2$ -GPI. Dodanie roztworu substratu chromogenego - tetrametylobenzydyny (TMB) – zapoczątkowuje rozwój reakcji barwnej z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP), pochodzącej z

koniugatu. HRP w obecności  $H_2O_2$  katalizuje reakcję utlenienia tetrametylobenzydyny do tetrametylobenzydynodiiminy o niebieskim zabarwieniu. Rozwój reakcji enzymatycznej jest zatrzymywany przez dodanie kwasu siarkowego, co powoduje zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm jest wprost proporcjonalne do miana przeciwciał anti- $\beta_2$ -GPI w klasie IgG.

b) Materiał do badań: surowica.

c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia doprowadzano wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej, a następnie rozcieńczano próbki surowicy badanej 1:101 w następujący sposób: do 500  $\mu$ l buforu do rozcieńczania próbek dodawano 5  $\mu$ l surowicy badanej. Do studzienek mikropłytki dodawano po 100  $\mu$ l surowic wzorcowych, kontrolnych oraz rozcieńczonych próbek badanych – płytkę zabezpieczano folią przed parowaniem i inkubowano (temp. pokojowa, 30 min.) Po upływie tego czasu płukano płytkę 3 – krotnie, a następnie do studzienek dodawano po 100  $\mu$ l koniugatu IgG, przykrywano płytkę i inkubowano (temp. pokojowa, 30 min.). Niezwiązany koniugat wymywano w trakcie 3 - krotnego płukania płytki, a następnie do studzienek dodawano po 100  $\mu$ l substratu chromogennego (TMB) i ponownie inkubowano (temp. pokojowa, 30 min., bez dostępu światła). W tym czasie zachodziła reakcja z substratem chromogennym z wytworzeniem niebieskiego kompleksu; rozwój reakcji zatrzymywano przez dodanie 100  $\mu$ l kwasu siarkowego do studzienek. Następnie z zastosowaniem spektrofotometru odczytywano absorbancję próbek przy długości fali  $\lambda = 450$  nm.

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody  $\leq 19,9$  GU.

### **III.3.3 Metodyka oznaczeń podstawowych parametrów hemostazy**

#### **Metodyka oznaczenia czasu protrombinowego**

Oznaczenie czasu protrombinowego metodą koagulologiczną wykonywano z zastosowaniem zestawu Hemosil<sup>TM</sup> RecombiPlasTin 2G firmy Instrumentation Laboratory, USA.

- a) Zasada metody: pomiar czasu krzepnięcia osocza ubogopłytkowego po aktywacji czynników zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia przez tromboplastynę, w obecności jonów wapnia i fosfolipidów. Czas krzepnięcia próbki mierzono przy zastosowaniu układu optycznego aparatu ACL 7000. Niezbędnych obliczeń dokonywano przy użyciu oprogramowania IL Coagulation.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: zgodnie z zaleceniami producenta zestawu.
- d) Zakres referencyjny czasu protrombinowego: 11,5"-17,4".
- e) Zakres referencyjny wskaźnika protrombinowego: 80-120% względem osocza wzorcowego.
- f) Zakres referencyjny INR: 0,8-1,2.

### **Metodyka oznaczenia stężenia D dimeru**

Oznaczenie stężenia D dimeru enzymatyczną metodą immunofluorescencyjną - ELFA (ang enzyme-linked immunofluorescent assay) wykonywano przy użyciu zestawu Vidas D-dimer Exclusion (DD2) w aparacie VIDAS firmy bioMerieux, USA.

- a) Zasada metody: oznaczenia D-dimeru przy użyciu zestawu VIDAS D-dimer Exclusion opiera się na w dwuetapowej kanapkowej metodzie immunoenzymatycznej, w której w końcowym etapie odczytywane jest natężenie fluorescencji, przeliczane na stężenie D-dimeru. Oznaczenie wykonywane jest automatycznie przy pomocy analizatora VIDAS, z zastosowaniem dwóch rodzajów mysich monoklonalnych przeciwciał, skierowanych przeciwko ludzkiemu D-dimerowi. Pierwsze z nich, zawarte w koniugacie znakowanym fosfatazą alkaliczną, łączy się z D-Dimerem, pochodzącym z badanej próbki w pierwszym etapie reakcji; drugie - opłaszczone wewnątrz pipetki, pełniące rolę pietora i fazy stałej, na której tworzy się „kanapka”, wiąże kompleks D-dimeru z koniugatem. Niezwiązany koniugat jest wmywany podczas płukania pipetki, po czym zaaspirowany przez nią substrat (fosforan 4-metyloumbeliferylu) jest hydrolizowany do produktu fluorescencyjnego (4-metyloumbeliferonu). Reakcję katalizuje fosfataza alkaliczna pochodząca ze związanego w fazę stałą koniugatu. Intensywność fluorescencji, odczytywanej przy długości fali  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , jest proporcjonalna do stężenia FDP w badanej próbce osocza.

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed przystąpieniem do oznaczenia do każdej próbki badanej przyporządkowywano po jednej pipetce i po jednym pasku testowym, które wyjmowano z lodówki i odstawiano na 30 minut w celu osiągnięcia temperatury pokojowej. W tym czasie uzupełniano w aparacie dane pacjenta oraz dane dotyczące stosowanych do oznaczenia materiałów kalibracyjnych i kontrolnych. Przed wprowadzeniem do studzienek materiałów kontrolnych i kalibracyjnych oraz próbek badanych mieszano je dokładnie, a następnie dodawano po 200  $\mu$ l każdego z nich do studzienek nr 1 pasków testowych. Paski testowe i pipetki umieszczano w aparacie i uruchamiano go. Wszystkie etapy oznaczenia wykonywane były automatycznie przez analizator VIDAS. Wynik oznaczenia obliczany był automatycznie. W przypadku otrzymania wyniku zakresu pomiarowego testu rozcieńczano osocze badane za pomocą buforu w stosunku 1:5.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody : <500 ng/ml.

### III.4 Analiza statystyczna

Analizowane dane pochodziły ze skali interwałowej bądź nominalnej. Dane ze skali interwałowej analizowano przy pomocy testu t-studenta. Założenie zgodności danych z rozkładem normalnym analizowano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji testowano przy pomocy testu F-Snedecora. W przypadku braku spełniania wymaganych założeń zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitney'a. Dane ze skali nominalnej analizowano testem niezależności chi-kwadrat a w przypadku występowania licznosci zerowych stosowano dokładny test Fishera. Dla istotnych czynników ryzyka  $\dot{Z}ChZZ$  wyznaczano iloraz szans wraz z 95% przedziałem ufności (szansa jest to stosunek prawdopodobieństwa wystąpienia określonego stanu klinicznego do prawdopodobieństwa jego niewystąpienia w danej grupie. Iloraz szans – (OR – odds ratio) iloraz szansy wystąpienia określonego stanu klinicznego w grupie eksponowanej na dany czynnik i szansy wystąpienia tego stanu w grupie nieeksponowanej).

Różnice w proporcjach między analizowanymi grupami porównywano przy pomocy testu wskaźnika struktury. Zależność pomiędzy analizowanymi danymi badano z zastosowaniem współczynnika korelacji rangowej Spearmana, a istotność statystyczną weryfikowano przy użyciu testu t-studenta. Wszystkie testy analizowane były na poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

Analizy statystycznej dokonano we współpracy z dr n. med. Michałem Michalakiem z Katedry i Zakładu Informatyki i Statystyki UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. Jerzy Moczko); zastosowano pakiet statystyczny Statistica 10 PL (StatSoft).

## IV WYNIKI

Podstawowe dane kliniczne i demograficzne badanej grupy chorych przedstawiono w tabeli nr 8.

Tabela nr 8. Podstawowe dane kliniczne i demograficzne badanej grupy pacjentów.

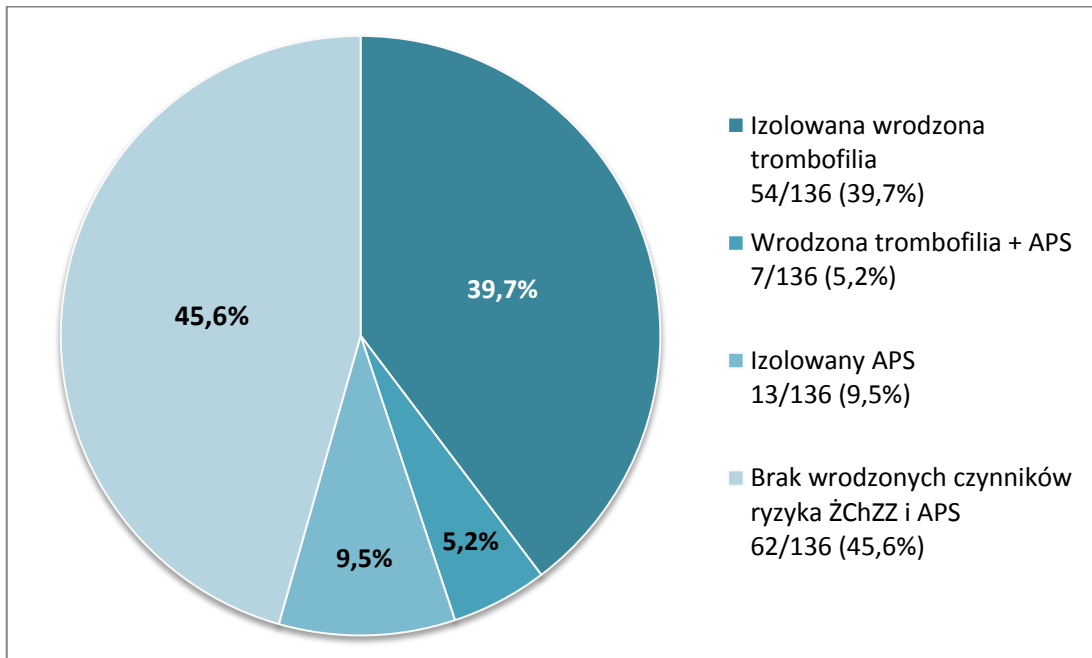
Dane kliniczne	
Liczba chorych	136
Płeć (K/M)	74/62
Wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego – Mediana (Min ; Max)	38 (18 ; 64) lat K 36 (18 ; 64) lat M 42 (18 ; 64) lat
Liczba epizodów zakrzepowo-zatorowych - mediana (zakres)	2,0 (1,0 - 4,0)

Rozpoznanie	n (%)
1. Zakrzepica żył głębokich	73 (54)
2. Zatorowość płucna	37 (27)
3. Zakrzepica o nietypowej lokalizacji	26 (19)
- zakrzepica zatok żylnych mózgu	5 (4)
- zakrzepica naczyń jamy brzusznej	8 (6)
- zakrzepica żył kończyn górnych	4 (3)
- zakrzepica żyły środkowej siatkówki	6 (4)
- zakrzepica żył powierzchownych	3 (2)
4. Niepowodzenia ciąży w grupie kobiet w wieku rozrodczym (n=40)	19 (48)
5. Nawrotowość	131(96)

## Częstość występowania czynników ryzyka żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych w badanej grupie pacjentów

W badanej grupie chorych wrodzoną trombofilię zdiagnozowano u 61/136 (45%) pacjentów. U 39,7% chorych (54/136) wrodzona trombofilia była jedynym rozpoznanym czynnikiem ryzyka ŻChZZ (izolowana wrodzona trombofilia), a w 5,2% (7/136) współistniała z obecnością APS. U 45,6% (62/136) osób stwierdzono występowanie ŻChZZ pomimo braku zarówno APS jak i wrodzonych czynników jej ryzyka. Izolowaną obecność APS wykryto u 13/136 pacjentów (9,5%).



Wykres nr 1. Częstość występowania czynników ryzyka ŻChZZ w badanej grupie pacjentów



Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy manifestacji klinicznej ŻChZZ w zależności od rodzaju czynnika ryzyka ŻChZZ.

Tabela nr 9. Analiza wpływu ocenianych grup czynników ryzyka ŻChZZ na jej manifestację kliniczną

Manifestacja kliniczna	Czynnik ryzyka ŻChZZ				wartość p
	Wrodzona trombofilia	APS	Wrodzona trombofilia +APS	Brak czynnika	
<b>Zatorowość płucna</b>	12/41 22,6%	5/13 38,5%	1/7 14,3%	19/62 30,7%	0,5057
<b>Zakrzepica żył głębokich</b>	35/51 68,6%	7/13 63,6%	4/6 66,7%	27/53 50,9%	0,2243
<b>Nietypowa lokalizacja</b>	9/54 16,6%	4/13 30,7%	2/7 28,6%	11/62 17,7%	0,3030
<b>Niepowodzenia ciąży w grupie kobiet</b>	9/17 52,3%	0/0 0,0%	1/2 50,0%	9/21 42,9%	0,9426
<b>Nawrotowość</b>	50/54 95,0%	13/13 100,0%	7/7 100,0%	61/62 1,6%	0,5040

### Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w zależności od rodzaju czynnika ryzyka ŻChZZ w badanej grupie chorych

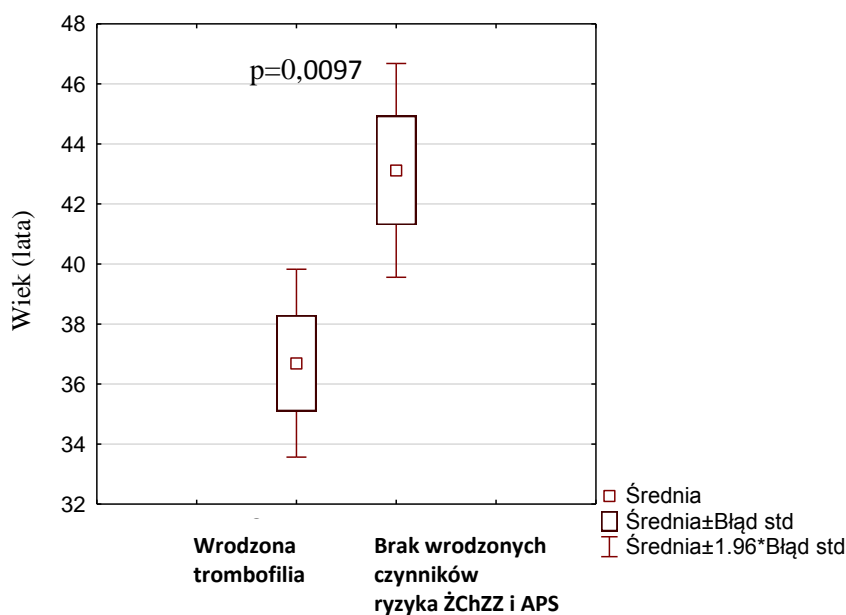
Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo - zatorowego w badanych grupach pacjentów przedstawiono w tabeli nr10.

Tabela nr 10: Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ w ocenianych grupach chorych

Czynnik ryzyka ŻChZZ	n	Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ (lata) ± SD
Wrodzona trombofilia	54	36,7 ± 12,3
APS	13	44,1 ± 13,6
Wrodzona trombofilia + APS	7	29,6 ± 14,7
Brak czynnika	62	43,1 ± 11,8

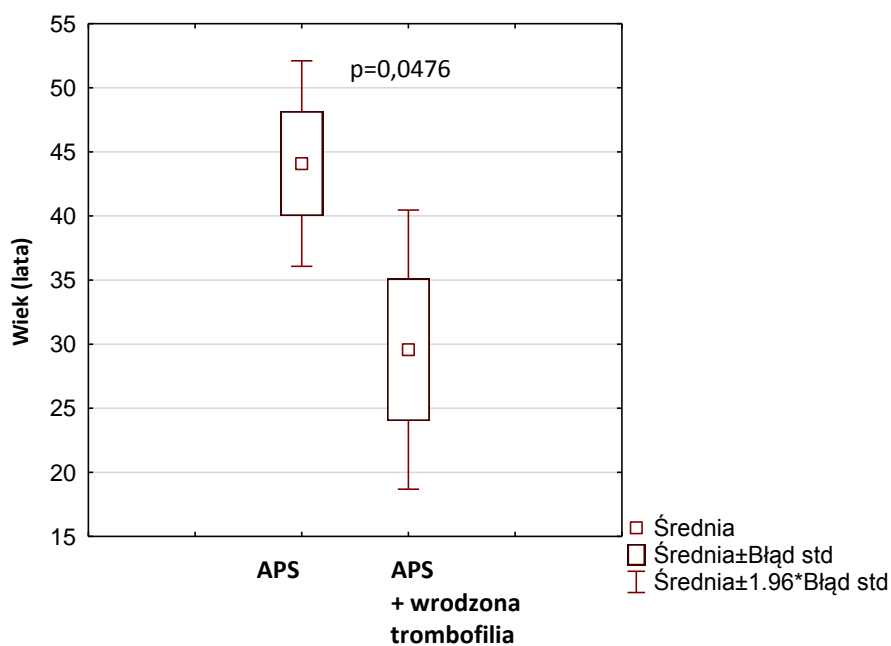
ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, APS – zespół antyfosfolipidowy

Średni wiek wystąpienia zakrzepicy wśród pacjentów z izolowaną wrodzoną trombofilią (54/136) był istotnie statystycznie niższy w porównaniu ze średnim wiekiem wystąpienia epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie pacjentów, u których nie stwierdzono wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ i APS (62/136), (36,7±12,3 lat vs 43,1±11,8 lat; p=0,0097).



Wykres nr 2. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie pacjentów z wrodzoną trombofilią i brakiem wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ i APS (ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa)

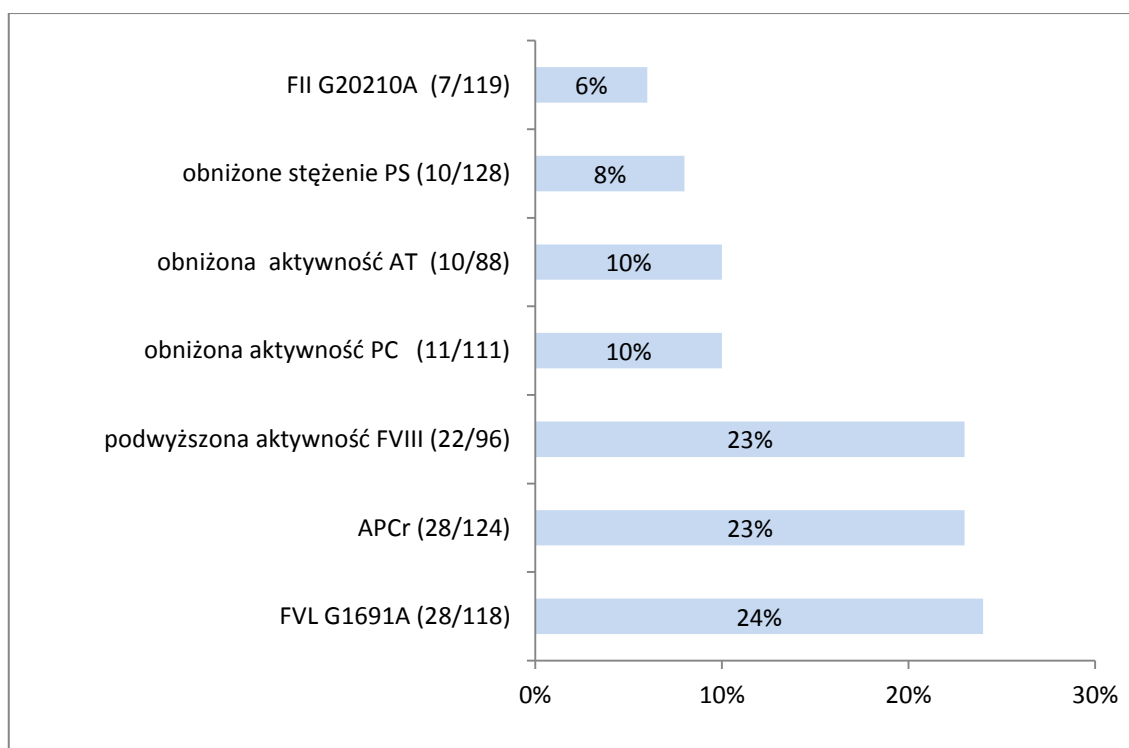
Istotną statystycznie różnicę średniego wieku wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ stwierdzono pomiędzy grupą pacjentów, u których APS współistniał z wrodzoną trombofilią a grupą osób, u których jedynym wykrytym czynnikiem ryzyka ŻChZZ była obecność APS (13/20), ( $29,6 \pm 14,7$  lat vs  $44,1 \pm 13,6$  lat;  $p=0,0476$ ).



Wykres nr 3. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie chorych z APS oraz w grupie pacjentów ze współistnieniem wrodzonej trombofilii z APS (APS – zespół antyfosfolipidowy)

## Częstość występowania wrodzonej trombofilii w badanej grupie pacjentów

Najczęściej wykrywanym wrodzonym czynnikiem ryzyka ŻChZZ w badanej grupie chorych była mutacja Leiden G1691A genu czynnika V; z podobną częstością wykrywano oporność na aktywne białko C oraz podwyższone stężenie czynnika VIII. Niedobory naturalnych białek antykoagulacyjnych jak i polimorfizm G20210A genu protrombiny występowały znacznie rzadziej. Częstość występowania czynników ryzyka ŻChZZ w analizowanej grupie pacjentów przedstawiono na wykresie poniżej:

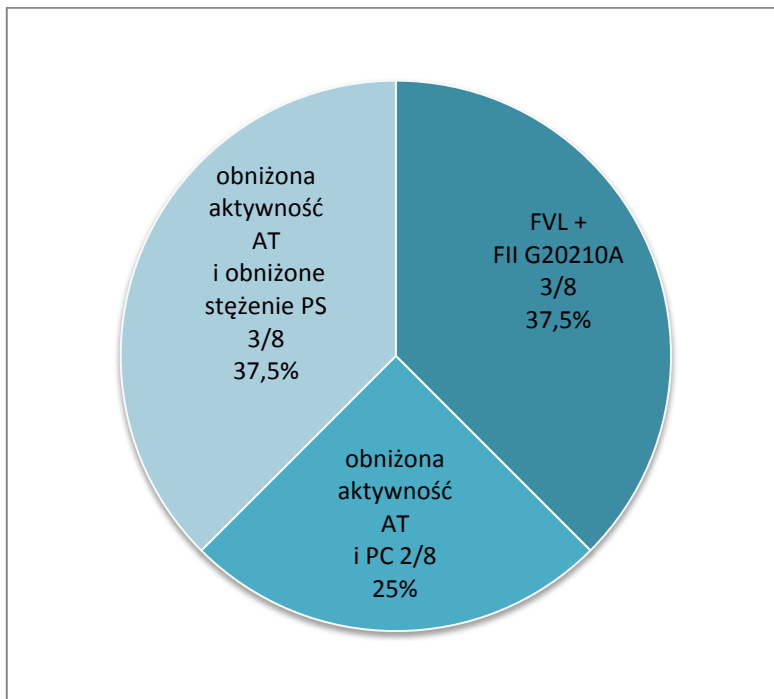


Wykres nr 4. Rozkład procentowy ocenianych grup chorych z dodatnim wynikiem badania w kierunku wrodzonej trombofilii w populacji badanej (FII G20210A – polimorfizm genu protrombiny, FVL G1691A – mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, PS- białko S, PC- białko C, AT – antytrombina, FVIII – czynnik VIII)

## Częstość występowania złożonej wrodzonej trombofilii w grupie pacjentów z wrodzoną trombofilią

Rozpoznanie wrodzonej trombofilii złożonej potwierdzono u 13,1% (8/61) pacjentów. Defekty złożone związane z obniżeniem aktywności białek antykoagulacyjnych: antytrombiny, białka C, białka S - wykryto u 8,2% (5/61),

natomiast złożone wrodzone defekty genetyczne (FVL G1691A i FII G20210A) u 4,9% (3/61) pacjentów.



Wykres nr 5. Rozkład procentowy poszczególnych grup chorych, u których wykryto złożoną wrodzoną trombofilię (AT – antytrombina, PC – białko C, PS- białko S, FVL G1691A - mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, FII G20210A genu protrombiny – polimorfizm G20210A genu protrombiny)

Nie wykazano współistnienia wrodzonej trombofilii na tle niedoboru białek antykoagulacyjnych i mutacji G1691A genu czynnika V oraz polimorfizmu G20210A genu protrombiny.

### **Częstość występowania wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ w zależności od płci**

Zauważono, że w badanej grupie pacjentów wrodzona trombofilia wykrywana była z podobną częstością zarówno w grupie mężczyzn 27/62 (44%) jak i wśród kobiet 34/74 (46%),  $p = 0,7794$ ). Nie odnotowano również istotnych różnic w częstości występowania ocenianych czynników wrodzonej trombofilii w zależności od płci (tabela 11).

Tabela nr 11. Częstość występowania czynników wrodzonej trombofilii w zależności od płci

Czynnik wrodzonej trombofilii	n	Kobiety	Mężczyźni	P
Obniżona aktywność AT	11/88	7/46 (15%)	3/42 (7%)	0,2332
Obniżona aktywność PC	11/111	6/63 (10%)	5/48 (10%)	0,8760
Obniżone stężenie PS	10/125	6/68 (9%)	4/57 (7%)	0,7108
FVL G1691A	28/118	12/62 (19%)	16/56 (29%)	0,2542
FII G20210A	7/119	2/62 (3%)	5/57 (9%)	0,1988
APCr	28/124	16/68 (24%)	12/56 (21%)	0,7807
Podwyższona F VIII	22/96	9/51 (18%)	13/45 (29%)	0,1909

*AT – antytrombina, PC –białko C, PS- białko S, APCr – oporność na aktywne białko C, FVIII – czynnik VIII, FVL G1691A - mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, FII G20210A – polimorfizm G20210A genu protrombiny*

### **Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie pacjentów z wrodzoną trombofilią**

Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego był istotnie statystycznie niższy w grupie pacjentów z polimorfizmem G20210A genu protrombiny, w grupie pacjentów, u których wykryto oporność na aktywne białko C oraz wśród pacjentów ze złożoną wrodzoną trombofilią w porównaniu z osobami, bez wrodzonej trombofilii. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 12.

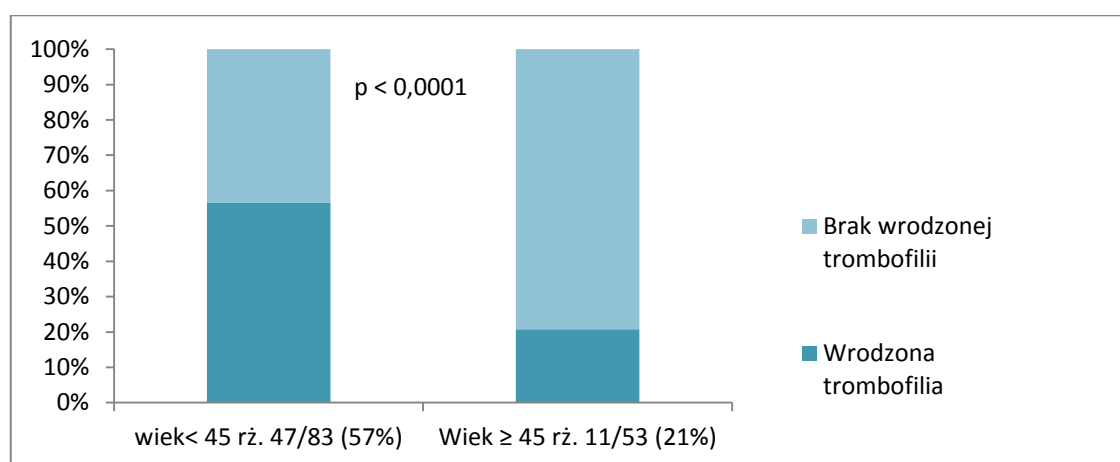
Tabela nr 12. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w badanej grupie pacjentów w zależności od rodzaju wrodzonego czynnika ryzyka ŻChZZ

Oznaczany czynnik		Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ X ± SD Min ; Max	wartość p
<b>Aktywność AT</b>	Prawidłowa	38,7 ± 12,3 18,0 ; 64,0	0,5848
	Obniżona	36,5 ± 12,5 19,0 ; 57,0	
<b>Aktywność PC</b>	Prawidłowa	39,0 ± 12,3 18,0 ; 64,0	0,1606
	Obniżona	33,5 ± 12,2 20,0 ; 53,0	
<b>Stężenie wolnego PS</b>	Prawidłowe	37,5 ± 12,2 18,0 ; 64,0	0,9426
	Obniżone	38,9 ± 13,3 19,0 ; 60,0	
<b>Mutacja FVL G1691A</b>	Genotyp GG	39,1 ± 12,6 18,0 ; 64,0	0,2921
	Genotyp GA/AA	36,0 ± 10,8 20,0 ; 55,0	
<b>Polimorfizm FII G20210A</b>	Genotyp GG	39,1 ± 12,3 18,0 ; 64,0	0,0243
	Genotyp GA/AA	27,5 ± 5,4 21,0 ; 34,0	
<b>Współczynnik APCr</b>	Prawidłowy	39,7 ± 12,4 18,0 ; 64,0	0,0299
	Obniżony	33,6 ± 11,0 18,0 ; 52,0	
<b>Aktywność FVIII</b>	Prawidłowa	37,7 ± 12,6 18,0 ; 64,0	0,6392
	Podwyższony	38,9 ± 11,7 20,0 ; 58,0	
<b>Złożona wrodzona trombofilia</b>	NIE	36,9 ± 12,1 19,0 ; 60,0	0,0348
	TAK	27,4 ± 8,5 19,0 ; 42,0	

AT – antytrombina, PC – białko C, PS- białko S, APCr – oporność na aktywne białko C, F VIII – czynnik VIII, FVL G1691A - mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, FII G20210A - polimorfizm G20210A genu protrombin, GA/AA – genotyp nieprawidłowy, GG - genotyp prawidłowy

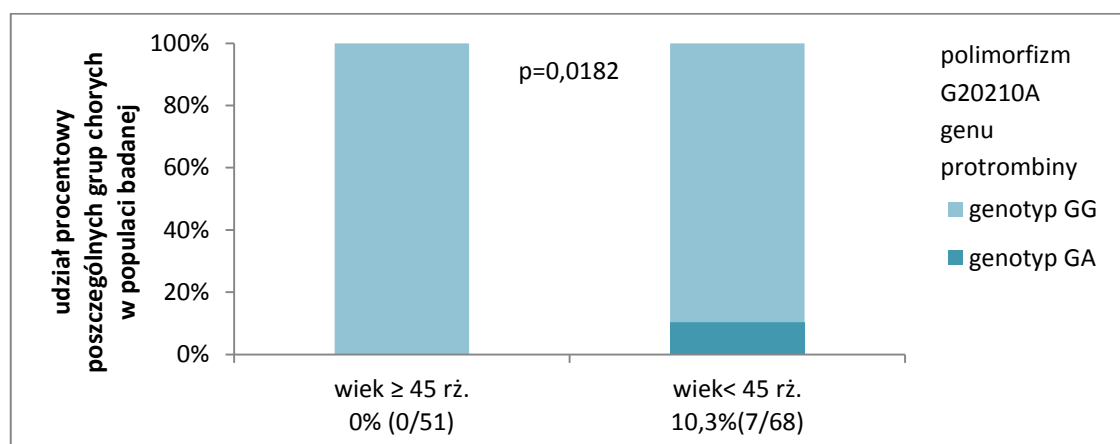
## Częstość występowania wrodzonej trombofilii w grupach wiekowych $\geq 45$ roku życia i $< 45$ roku życia

Gdy badano częstość występowania wrodzonej trombofilii w wyodrębnionych grupach wiekowych, stwierdzono, że istotnie statystycznie częściej była ona wykrywana w grupie pacjentów, w której do pierwszej zakrzepicy doszło w wieku  $< 45$  rż. w porównaniu z osobami, u których epizod wystąpił w wieku  $\geq 45$  rż. - odpowiednio u 57% (47/83) i 21% (11/53) osób;  $p < 0,0001$ .



Wykres nr 6. Częstość występowania wrodzonej trombofilii w grupach pacjentów z pierwszą zakrzepicą w wieku  $< 45$  roku życia i  $\geq 45$  roku życia

Spośród ocenianych czynników wrodzonej trombofilii wykazano, że polimorfizm G20210A genu protrombiny występował istotnie statystycznie częściej w grupie wiekowej, w której pierwszy epizod zakrzepowy wystąpił przed 45 rokiem życia.



Wykres nr 7. Częstość występowania polimorfizmu G20210A genu protrombiny w grupach wiekowych  $< 45$  rż. i  $\geq 45$  rż. w badanej populacji (GG-genotyp prawidłowy, GA-genotyp nieprawidłowy)



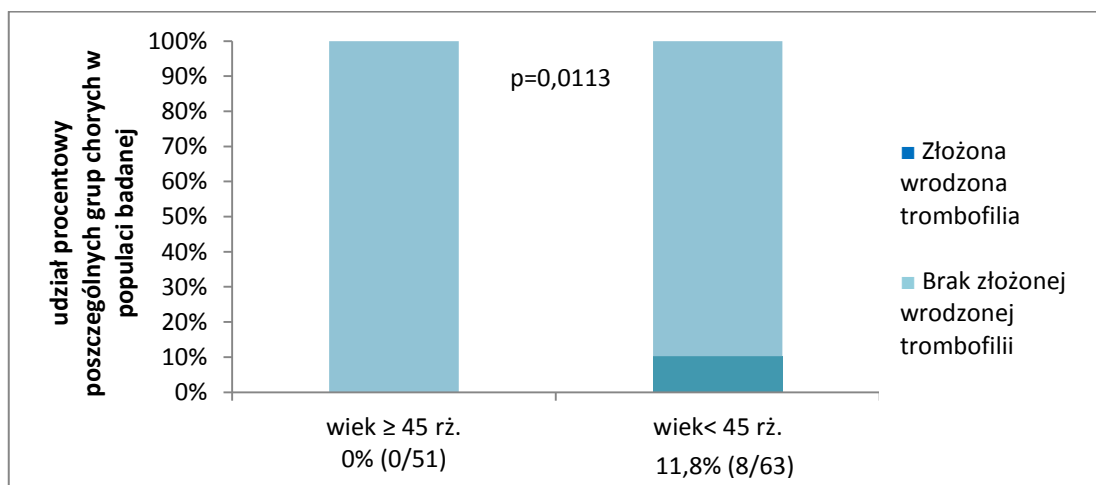
W przypadku obniżenia aktywności białka C i antytrombiny, obniżenia stężenia wolnego białka S, oporności na aktywne białko C, podwyższonej aktywności czynnika VIII oraz mutacji Leiden różnice te nie były znamienne:

Tabela nr 13. Częstość występowania wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ w grupach chorych z pierwszym epizodem ŻChZZ w wieku < 45 rż. i ≥45 rż.

Czynnik wrodzonej trombofilii	Wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego		wartość p
	≥ 45 rż	< 45 rż	
Obniżona aktywność AT	3/35 (9%)	7/53 (16%)	0,5024
Obniżona aktywność PC	5/67 (8%)	6/44 (14%)	0,2870
Obniżone stężenie PS	3/51 (6%)	7/74 (9%)	0,4557
FVL G1691A	7/42 (17%)	21/74 (28%)	0,1566
APCr	4/49 (18%)	19/75 (25%)	0,3644
Podwyższona aktywność FVIII	8/40 (20%)	14/52 (27%)	0,3412

AT – antytrombina, PC – białko C, PS – białko S, APCr – oporność na aktywne białko C, F VIII – czynnik VIII, FVL G1691A – mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, FII G20210A – polimorfizm G20210A genu protrombiny

Zaobserwowano również, że wśród pacjentów, u których pierwszy epizod ŻChZZ wystąpił przed 45 rż., wrodzoną złożoną trombofiliją, wykryto u (11,8%) (8/68), podczas gdy wśród chorych z pierwszą zakrzepicą po 45 rż. nie spotykano współistnienia wrodzonych defektów usposabiających do ŻChZZ (0/51),  $p=0,0113$ .



Wykres nr 8. Częstość występowania wrodzonej złożonej trombofilii w grupach wiekowych < 45rż. i ≥ 45 roku życia. w badanej populacji pacjentów

## **Analiza wpływu ocenianych wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ na jej manifestację kliniczną**

### **Analiza wpływu obniżonego stężenia wolnego białka S na manifestację kliniczną ŻChZZ**

Nie wykazano wpływu obniżonego stężenia wolnego białka S na manifestację kliniczną ŻChZZ.

*Tabela nr 14. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżonym i prawidłowym stężeniem wolnego białka S*

<b>Manifestacja kliniczna ŻChZZ</b>	<b>Stężenie wolnego białka S</b>		<b>wartość p</b>
	<b>Prawidłowe</b>	<b>Obniżone</b>	
<b>Zatorowość płucna</b>	36/89 28,8%	1/10 10%	0,1997
<b>Zakrzepica żył głębokich</b>	48/112 43%	1/10 10%	0,0619
<b>Nietypowa lokalizacja</b>	23/125 18%	0/10 0%	0,1364
<b>Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet</b>	17/36 47%	2/4 50%	0,9159
<b>Nawrotowość</b>	121/125 97%	10/10 100%	0,5658

*ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa*

## Analiza wpływu obniżonej aktywności białka C na manifestację kliniczną

Nie wykazano wpływu obniżonej aktywności białka C na manifestację kliniczną ŻChZZ w badanej grupie chorych.

Tabela nr 15. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżoną i prawidłową aktywnością białka C

Manifestacja kliniczna ŻChZZ	Aktywność białka C		wartość p
	Prawidłowa	Obniżona	
Zatorowość płucna	35/124 28,2%	2/11 18,2%	0,4741
Zakrzepica żył głębokich	63/110 57%	9/11 82%	0,1138
Nietypowa lokalizacja	22/124 18%	1/11 9%	0,4645
Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet	18/38 47%	1/2 50%	0,9421
Nawrotowość	120/124 97%	11/11 100%	0,5454

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

## Analiza wpływu obniżonej aktywności antytrombiny na manifestację kliniczną ŻChZZ

W grupie kobiet po przebytych epizodach ŻChZZ i z obniżoną aktywnością antytrombiny stwierdzono większą częstość występowania niepowodzeń ciąży (5/5) w porównaniu z kobietami, u których aktywność antytrombiny pozostawała w zakresie wartości referencyjnych (14/35,  $p = 0,0177$ ). Wykazano również, że iloraz szans wystąpienia niepowodzeń ciąży jest 5,9-krotnie wyższy wśród kobiet z obniżoną aktywnością AT w porównaniu z tymi, u których pozostawała ona w granicach wartości referencyjnych (95% CI 1,07-32,56).

Tabela nr 16. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżoną i prawidłową aktywnością AT

Manifestacja kliniczna ŻChZZ	Aktywność antytrombiny		wartość p
	Prawidłowa	Obniżona	
Zatorowość płucna	34/125 27,%	3/10 30%	0,8485
Zakrzepica żył głębokich	64/111 58%	7/10 70%	0,1680
Nietypowa lokalizacja	23/125 18%	0/10 0%	0,1364
Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet	14/35 40%	5/5 100%	<b>0,0177</b>
Nawrotowość	121/125 97%	10/10 100%	0,5658

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

W grupie chorych, u których wykryto obniżoną aktywność antytrombiny wykazano wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ilością epizodów zakrzepowo-zatorowych a stopniem niedoboru antytrombiny ( $r_s=0,25$ ,  $p=0,0201$ ). Zależności takiej nie wykazano w przypadku niedoboru PC ( $r_s=0,0569$ ,  $p=0,5563$ ), PS ( $r_s=0,0192$ ,  $p=0,2269$ ), APCr ( $r_s=-0,0114$ ,  $p=0,9000$ ), czynnika VIII ( $r_s=-0,0912$ ,  $p=0,3767$ ).

## **Analiza wpływu oporności na aktywne białko C na manifestację kliniczną ŻChZZ**

Nie wykazano wpływu obniżonej oporności na aktywne białko C na manifestację kliniczną ŻChZZ.

*Tabela nr 17. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżonym i prawidłowym APCr*

<b>Manifestacja kliniczna ŻChZZ</b>	<b>Współczynnik APCr</b>		<b>wartość p</b>
	<b>Prawidłowy</b>	<b>Obniżona</b>	
<b>Zatorowość płucna</b>	31/108 28,7%	6/27 22,2%	0,4995
<b>Zakrzepica żył głębokich</b>	58/95 61%	14/26 54%	0,5071
<b>Nietypowa lokalizacja</b>	19/108 18%	4/27 15%	0,7313
<b>Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet</b>	15/31 48%	4/9 44%	0,8348
<b>Nawrotowość</b>	107/108 99%	24/27 89%	0,2052

*APCr – oporność na aktywne białko C*

## Analiza wpływu mutacji Leiden G1691A na manifestację kliniczną ŻChZZ

Nie wykazano wpływu mutacji Leiden G1691A na manifestację kliniczną ŻChZZ.

Tabela nr 18. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z mutacją Leiden G1691A genu czynnika V i bez mutacji Leiden G1691A genu czynnika V

Manifestacja kliniczna ŻChZZ	Mutacja Leiden G1691A		wartość p
	Nieobecna	Obecna	
Zatorowość płucna	33/111 30%	4/20 17%	0,1932
Zakrzepica żył głębokich	56/98 57%	16//23 70%	0,2747
Nietypowa lokalizacja	20/111 18%	3/24 13%	0,5144
Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet	16/16 50%	3/8 38%	0,5266
Nawrotowy charakter	109/111 98%	22/24 91%	0,0871

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

## **Analiza wpływu polimorfizmu G20210A genu protrombiny na manifestację kliniczną ŻChZZ**

Nie wykazano wpływu polimorfizmu G20210A genu protrombiny na manifestację kliniczną ŻChZZ.

*Tabela nr 19. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z polimorfizmem FII G20210A genu protrombiny i bez polimorfizmu G20210A genu protrombiny*

<b>Manifestacja kliniczna ŻChZZ</b>	<b>Polimorfizm G20210A genu protrombiny</b>		<b>wartość p</b>
	<b>Nieobecny</b>	<b>Obecny</b>	
<b>Zatorowość płucna</b>	34/128 26%	3/7 43%	0,3466
<b>Zakrzepica żył głębokich</b>	67/114 59%	5/7 71%	0,5078
<b>Nietypowa lokalizacja</b>	22/128 18,0%	1/7 14%	0,8424
<b>Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet</b>	19/19 50%	0/2 0%	0,1676
<b>Nawrotowość</b>	124/128 67%	7/7 100%	0,6349

*ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa*

## Analiza wpływu podwyższonej aktywności czynnika VIII na manifestację kliniczną ŻChZZ

Wśród pacjentów z aktywnością czynnika VIII pozostająca w zakresie referencyjnym wykazano częstsze występowanie zakrzepicy żył głębokich w porównaniu z osobami, u których aktywność czynnika VIII była podwyższona.

Tabela nr 20. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z podwyższonym i prawidłowym poziomem aktywności czynnika VIII

Manifestacja kliniczna ŻChZZ	Aktywność czynnika VIII		wartość p
	NIE	TAK	
Zatorowość płucna	18/74 24%	7/22 32%	0,4819
Zakrzepica żył głębokich	41/68 60%	6/21 29%	0,0109
Nietypowa lokalizacja	15/74 20,3%	4/22 18,2%	0,8291
Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet	10/24 42%	2/4 50%	0,7552
Nawrotowość	73/74 99%	20/22 91%	0,0669

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa



## Analiza wpływu APS na manifestację kliniczną ŻChZZ

APS stwierdzono u 15% (20/136) pacjentów. Głównym rodzajem APA, w grupie badanej były przeciwciała o aktywności LA, które wykryto u 85% (17/20) osób z APS. Przedłużony aPTT i aPTT z Actinem wykryto odpowiednio u 70% (14/20) i 80% (16/20) chorych z zespołem przeciwciał antyfosfolipidowych. Obecność przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG i IgM oznaczono u (2/20) 10% osób, a występowanie przeciwciał anty  $\beta_2$  GPI w 5% (1/20) przypadków APS.

Tabela nr 21. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów, u których wykryto APS i w grupie pacjentów bez APS

Manifestacja kliniczna ŻChZZ	APS	Brak APS	wartość p
Zatorowość płucna	31/115 27%	6/20 30%	0,7782
Zakrzepica żył głębokich	61/104 58,7%	11/17 64,7%	0,6375
Nietypowa lokalizacja	17/115 14,8%	6/14 30%	0,0948
Niepowodzenia położnicze w grupie kobiet	18/38 47,4%	1/2 50%	0,9421
Nawrotowość	111/115 96,5%	20/20 100%	0,3972

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

Zauważono, że spośród wszystkich oznaczeń wykonanych w celu wykrycia i potwierdzenia obecności APS, z ilością nawrotów ŻChZZ korelował współczynnik  $LA_1/LA_2$  ( $r_s=0,2494$ ,  $p=0,0276$ ). W przypadku pozostałych ocenianych parametrów nie wykazano takiej zależności: aPTT ( $r_s=-0,0674$ ,  $p=0,4472$ ), aPTT z Actinem ( $r_s=-0,0581$ ,  $p=0,5161$ ), przeciwciała ACA IgG ( $r_s=0,0792$ ,  $p=0,3934$ ), przeciwciała ACA IgM ( $r_s=0,1445$ ,  $p=0,8640$ ), przeciwciała anty  $\beta_2$ GPI ( $r_s=0,0016$ ,  $p=0,9924$ ).

## V WNIOSKI

1. Obecność wrodzonej trombofilii stwierdzono u 45% chorych po przebytych epizodzie żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, przy czym najczęściej obserwowano obecność mutacji Leiden G1691A genu czynnika V.
2. Wrodzoną trombofilie wykrywano z większą częstością wśród pacjentów, u których pierwszy epizod zakrzepowo-zatorowy wystąpił przed 45 rokiem życia.
3. Obniżona aktywność antytrombiny była jedynym spośród wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ, który istotnie statystycznie wpływał na zwiększenie ryzyka nawrotu ŻChZZ, a także na wzrost ryzyka niepowodzeń ciąży u kobiet.
4. Obecność antykoagulantu toczniowego była związana z ryzykiem nawrotu ŻChZZ.
5. Trombofilia złożona, związana ze współistnieniem wrodzonych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz współistnieniem wrodzonych czynników ryzyka żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i zespołu antyfosfolipidowego, wiąże się z wystąpieniem pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w młodszym wieku.

## VI OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wieloczynnikowa etiologia ŻChZZ przejawia się dużą częstością współistnienia wrodzonych i/lub nabytych czynników ryzyka związanych z jej wystąpieniem. W opisywanym badaniu analizowano obecność tych czynników w grupie 136 pacjentów po przebytych epizodach zakrzepowo - zatorowym.

### *Wrodzona trombofilia*

Badania własne przeprowadzone w grupie osobników rasy kaukaskiej, podobnie jak dane oparte na analizach dużych populacji pacjentów nie wykazały różnicy w częstości występowania wrodzonej trombofilii w zależności od płci. Wrodzone czynniki ryzyka ŻChZZ w opisywanej grupie chorych stwierdzono u 61/136 (45%) pacjentów, co pokrywa się z danymi literaturowymi, w których wśród osobników tej rasy częstość ich występowania oceniano na 40 - 60% w zależności od grupy etnicznej (121,122). W ostatnio opublikowanych wynikach badań MAISTHRO, wykazano je u 50,1% spośród 1500 kolejnych pacjentów, u których doszło do zakrzepicy żyłnej (123), zaś Martinelli i wsp. u 55% spośród 723 krewnych osób w wywiadem ŻChZZ. W pracy tej rozpoznano następujące defekty: obniżona aktywność PC – 9%, obniżona aktywność AT – 12%, obniżone stężenie PS – 6%, mutacja Leiden genu czynnika V – 28% (124). Wyniki te odpowiadają wynikom badań własnych, w których wykrywano je kolejno u 10%, 8%, 10%, 23% pacjentów. Współistnienie wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ oceniono na 5,9% (8/136), a w badaniach Martinelli i wsp. było to tylko 1% (6/723) (124). Salomon i wsp. (125) stwierdzili obecność trombofilii u 49% (80/162) chorych po przebytych epizodach ŻChZZ, niedobory naturalnych białek antykoagulacyjnych (AT, PS, PC) badacze ci wykryli kolejno u 6%, 10%, 6%, natomiast defekty wykrywane metodami biologii molekularnej u 22% i 10% odpowiednio dla mutacji Leiden G1691A i polimorfizmu G20210A genu protrombiny, co również odpowiada wynikom własnym. Podobną częstość występowania wrodzonych czynników trombofilii raportuje grupa polskich naukowców - Lewandowski K. i wsp. (126). Wśród 147 chorych po przebytych epizodach zakrzepowo-zatorowym niedobory naturalnych białek antykoagulacyjnych (AT, PC, PS) oraz oporność czynnika V na aktywne białko C wymienieni polscy badacze stwierdzili odpowiednio u 4%, 4% i 8,8%, 19%, zaś mutację Leiden u 16,3% pacjentów. Częstość występowania wrodzonej trombofilii w opisanym populacji

pacjentów oceniono podobnie jak w badaniach własnych – na 52%. Wyniki badań tego samego zespołu naukowców na grupie około 250 pacjentów, wskazują podobną jak w badaniach własnych częstość występowania poszczególnych zaburzeń hemostazy AT – 6,5%, PC – 7%, PS – 6%, APCr – 13,4%, mutacji Leiden – 19,2% i polimorfizmu protrombiny – 8,6. Jednoczesne obniżenie aktywności naturalnych białek antykoagulacyjnych wykryli u 2 pacjentów, natomiast obecność mutacji Leiden i polimorfizmu FII G20210A u 5,3% osób z heterozygotyczną postacią FVL G1691A (126). Lewandowski i wsp. zbadali także częstość występowania polimorfizmu A4070G genu czynnika V (opisywanego, jako 1 z 13 polimorfizmów tzw. haplotypu HR2), która wyniosła – 14,7% (127). W badaniach własnych w osoczu pochodzącym od 3 osób wykryto oporność na aktywne białko C, pomimo braku mutacji Leiden genu czynnika V. Być może zjawisko to można wytłumaczyć występowaniem u nich jednego z polimorfizmów haplotypu HR2 genu czynnika V, które nie były oceniane w analizowanej grupie.

W kolejnej części pracy starano się dokonać analizy, mającej na celu zbadanie czy wiek pierwszej manifestacji klinicznej ŻChZZ różni się w grupie chorych ze współistnieniem wrodzonych czynników prozakrzepowych w porównaniu z osobami z izolowanym defektem hemostazy. W analizie Ehrenforth S. i wsp. wśród 352 pacjentów po pierwszym epizodzie ŻChZZ przeżytym w wieku poniżej 45 roku życia i u 89 bezobjawowych nosicieli mutacji Leiden, oceniano częstość współwystępowania mutacji Leiden G1691A z polimorfizmem G20210A genu protrombiny. Obecność polimorfizmu G20210A genu protrombiny Ehrenforth S. i wsp. wykazali u 11,4% pacjentów po przeżytym epizodzie zakrzepowo-zatorowym, będących nosicielami mutacji Leiden (128), podobną częstość współistnienia tych dwóch mutacji stwierdzono w badaniach własnych. W pracy Ehrenforth S. i wsp. zauważono również, że wśród pacjentów z zakrzepicą w wywiadzie częstość ta była 3 - krotnie wyższa niż u bezobjawowych nosicieli mutacji Leiden ( $p=0,02$ ) (128). Warto również nadmienić, że ci sami naukowcy dowodzą większej częstości występowania zakrzepicy o nietypowej lokalizacji u pacjentów ze współistnieniem FVL G1691A i FII G20210A (128), co jednak nie zostało potwierdzone w materiale własnym, z powodu niskiej liczebności grupy, w której współistniały te dwie mutacje (3 osoby). Martinelli i wsp. wykazali, że złożona wrodzona trombofilia związana z mutacją Leiden G1691A i polimorfizmem G20210A genu protrombiny jest czynnikiem związanym z wczesnym wystąpieniem epizodu ŻChZZ ( $17 \pm 2$  lata) w porównaniu do wieku pierwszej manifestacji klinicznej

zakrzepicy wśród osób z pojedynczym defektem (124). Co więcej inne doniesienia literaturowe wskazują, że defekty złożone, polegające na współistnieniu mutacji Leiden genu czynnika V z niedoborem PC, PS i AT oraz z FII G20210A (128,129,130) są przyczyną nie tylko wczesnej manifestacji klinicznej, ale także zwiększają ryzyko nawrotu zakrzepicy żyłnej. Pomimo tego, że dla współistnienia poszczególnych czynników wrodzonej trombofilii nie udało się znaleźć znamiennej różnicy wieku wystąpienia pierwszego epizodu w porównaniu z pojedynczym defektem, to podczas analizy porównawczej wykazano istotną statystycznie różnicę średniego wieku wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ pacjentów z izolowanym defektem hemostazy (n=53) z wiekiem pierwszej manifestacji klinicznej zakrzepicy w grupie pacjentów ze złożoną wrodzoną trombofilią (n=8), ( $36,9 \pm 12,1$  lat vs  $27,4 \pm 8,5$  lat;  $p=0,0348$ ). Obserwacja ta prowadzi do wniosku, że fenotyp wybitnie prozakrzepowy, związany z współistnieniem wrodzonych czynników trombofilii przejawia się znacznie niższym wiekiem wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ.

Wyniki badań własnych wskazują także na istotną zależność niepowodzeń ciąży od obniżenia aktywności AT. Cięża, będąca stanem nadkrzepliwości wraz z nakładającą się na nią wrodzoną trombofilią, która dodatkowo nasila tendencje prozakrzepowe, zwiększa nie tylko ryzyko doświadczenia ŻChZZ w czasie ciąży, ale także prawdopodobieństwo jej utraty lub wystąpienia komplikacji położniczych takich, jak stan przedrzucawkowy czy niewydolność łożyska (131,132). W badaniach histopatologicznych łożysk kobiet, u których doszło do ich przedwczesnego odklejenia, Kinzler WL i wsp. stwierdziła martwicę i liczne zawały, które mogły być skutkiem nieprawidłowości w krążeniu łożyskowym, prowadzącym do zmniejszenia przepływu krwi przez jego naczynia (133). W materiale własnym wykazano, że iloraz szans (OR) wystąpienia niepowodzeń ciąży w grupie pacjentek, u których wykryto obniżoną aktywność antytrombiny wynosi 5,9 (95% CI 1,07-32,56) w porównaniu do kobiet z prawidłową aktywnością antytrombiny. Preston i wsp. w ogólnoeuropejskiej wielośrodkowej analizie wykazali, że kobiety, u których wykryto wrodzoną trombofilię, zwłaszcza związaną z niedoborem antytrombiny lub defektami złożonymi, wykazywały zwiększone ryzyko późnej utraty ciąży w porównaniu z pacjentkami, u których jej nie wykryto (134). Z kolei w badaniu, w którym oceniano 188 ciąż u 60 kobiet, podzielonych na 2 grupy: kobiety, ze stwierdzoną wrodzoną trombofilią i kobiety, u których nie stwierdzono wrodzonej trombofilii, okazało się, że kobiety z wrodzonym defektem utraciły 22% ciąż, podczas gdy w grupie kontrolnej - 11% (135).

Wymienione prace potwierdzają wyniki badań własnych o roli wrodzonej trombofilii, jako czynnika ryzyka niepowodzeń ciąży. Istnieje wiele doniesień, w których podejmowane są próby szczegółowego wyjaśnienia patomechanizmu tego zjawiska: badania Vincent T i wsp. wskazują, że osocze, pochodzące od kobiet, doświadczających nawracających niepowodzeń położniczych, często wykazuje zwiększoną gotowość prozakrzepową (136). Zarówno w grupie kobiet, u których doszło do poronienia w pierwszym jak i w trzecim trymestrze wykrywano istotnie wyższe stężenia kompleksów TAT w porównaniu z kobietami bez komplikacji położniczych. Wykazano u nich także przewlekłą stymulację endotelium związaną z aktywacją hemostazy (137). Wiążąc te dane z faktem, że do naturalnych inhibitorów krzepnięcia należy właśnie antytrombina, której niedobór może być przyczyną niekontrolowanego wzrostu tendencji prozakrzepowych i związanych z nimi komplikacji położniczych, warto podkreślić, że aktualne wytyczne Polskiej Grupy ds. Hemostazy, zalecają wprowadzenie profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet w ciąży i porożu, u których w wywiadzie stwierdzono niedobór antytrombiny.

W badaniach własnych zauważono także, że spośród wrodzonych czynników trombofilii tylko obniżona aktywność antytrombiny była związana z ilością nawrotów ŻChZZ. Ze względu na rzadkie występowanie wrodzonej trombofilii w populacji ogólnej, znaleziono niewiele publikacji opisujących tę zależność. Badania retrospektywne wskazywały, że częstość nawrotów ŻChZZ wśród pacjentów z niedoborami białek antykoagulacyjnych wynosi 36-63% (138). W badaniu, w którym analizowano ryzyko nawrotu (ang. recurrence risk - RR) w grupie 64 pacjentów z niedoborami AT, PC, PS, de Stefano i wsp. wykazali, że było ono najwyższe wśród pacjentów z niedoborem antytrombiny – RR = 1,9 (95% CI 1,0-3,9) w porównaniu do osób bez stwierdzonej trombofilii (141) Tendencji tej nie potwierdzono jednak w późniejszych badaniach prospektywnych z tego okresu (142,143). Jednakże najświeższe wyniki analizy prospektywnej 823 pacjentów po pierwszym przebytych epizodzie ŻChZZ obserwowanych przez 8,7 lat wskazują, że w grupie osób, u których aktywność antytrombiny była niższa niż 70% RR wynosiło 3,5 (95% CI 2,1 - 5,6), a w grupie, w której aktywność AT osiągała wartości graniczne (70-80%): RR = 2,4 (95% CI 1,5 - 3,8) w porównaniu z osobami, u których poziom AT pozostawał w granicach wartości referencyjnych (144).

*Wrodzona trombofilia w grupach pacjentów, u których epizod wystąpił w wieku przed i po 45 roku życia*

W badaniu własnym starano się również zbadać częstość wrodzonej trombofilii w zależności od wieku, w którym wystąpił pierwszy epizod w grupach wiekowych: 18 - 44 lata oraz powyżej 45 roku życia. Zauważono, że wrodzona trombofilia istotnie statystycznie częściej występowała w grupie osób z pierwszą manifestacją zakrzepicy przed 45 rokiem życia w porównaniu z osobami doświadczającymi jej po 45 roku życia (57% vs 21%,  $p= 0,0001$ ) Nie wykazano znamienności tej różnicy w przypadku obniżenia aktywności/stężenia poszczególnych naturalnych białek antykoagulacyjnych oraz mutacji Leiden. W pracy Paschoa AF. i wsp., badających częstość występowania niedoboru PC, PS i AT, w grupie 84 pacjentów po przebytych epizodach ŻChZZ, podzielonych na kategorie wiekowe przed 50 rż i po 50 rż., również nie stwierdzono różnicy częstości występowania niedoboru tych czynników w wyznaczonych grupach wiekowych (145). Natomiast wyniki pracy Pottier i wsp., opisujące grupę 66 pacjentów po epizodzie niesprovokowanej zakrzepicy, wskazują większą jej częstość wśród pacjentów w wieku poniżej 40 rż. w porównaniu ze starszymi (64% vs 32%,  $p = 0,03$ ) (146). Podobne obserwacje są wynikiem badania populacyjnego EMET (Spanish Multicentric Study on Thrombophilia), które objęło 2132 pacjentów po epizodzie ŻChZZ, w którym Mateo i wsp. opisali większą częstość występowania niedoborów białek antykoagulacyjnych wśród pacjentów poniżej 45 roku życia (147). Dane te potwierdza również publikacja z 2012 roku, opisująca wyniki badania obserwacyjnego RIETE (148). W ostatnich latach poddaje się w wątpliwość celowość wykonywania oznaczeń w kierunku trombofilii u wszystkich pacjentów po przebytych epizodach zakrzepowo-zatorowym, niezależnie od wieku jego wystąpienia (161) jednakże dotychczas nie opracowano międzynarodowych standardów, pozwalających na ujednoczenie wskazań do diagnostyki w kierunku wrodzonej trombofilii. Wyniki badań własnych, odnoszące się do większej częstości występowania wrodzonej trombofilii wśród osób, u których zakrzepica wystąpiła przed 45 rokiem życia wydają się być ważnym wnioskiem, który może znaleźć zastosowanie przy podejmowaniu przez lekarza klinicystę decyzji o przeprowadzeniu szczegółowej diagnostyki w kierunku obecności wrodzonych defektów hemostazy sprzyjających jej wystąpieniu w grupie młodych pacjentów. W materiale własnym wykazano także, że polimorfizm G20210A genu protrombiny był istotnie statystycznie częściej wykrywany w grupie pacjentów, u których zakrzepica wystąpiła przed 45 rż. De Stefano i wsp. przedstawili podobne

obserwacje w odniesieniu do większej częstości występowania mutacji Leiden i polimorfizmu genu protrombiny, a także niedoboru naturalnie występujących białek antykoagulacyjnych wśród młodych pacjentów z zakrzepicą samoistną w porównaniu z osobami starszymi niż 45 lat i tymi, u których epizod był poprzedzony obecnością nabytych czynników ryzyka ŻChZZ (168). Podobną tendencję zauważyli Vossen CY. i wsp., którzy w badaniu EPCOT (European Prospective Cohort Study) zauważyli, że pierwszy epizod zakrzepicy żyłnej u pacjentów, będących nosicielami mutacji Leiden lub polimorfizmu genu protrombiny pojawia się około 20 lat wcześniej niż u osób nie wykazujących obecności tych czynników ryzyka ŻChZZ (149). Podsumowując można stwierdzić, że obecność wrodzonej trombofilii w badanej grupie pacjentów częściej wykrywano w grupie wiekowej, w której pierwszy epizod wystąpił przed 45 rokiem życia w porównaniu osobami, u których wystąpiła ona po raz pierwszy w starszym wieku.

#### *Współistnienie wrodzonej trombofilii i APS*

Poza opisanymi wyżej wrodzonymi czynnikami ryzyka ŻChZZ w badaniach własnych u 20/136 (15%) wykryto APS, a jego współistnienie z wrodzonymi czynnikami ryzyka u 7/20 pacjentów z APS. Podobną częstość współistnienia tych dwóch ważnych grup czynników sprzyjających wystąpieniu zakrzepicy wykryto w badaniu Shostak i wsp. (157), w którym w grupie 97 pacjentów po przebytej zakrzepicy żyłnej badano częstość APS i jego współistnienie z uznanymi wrodzonymi czynnikami trombofilii (FVL G1691A, FII G20210A, oraz niedoborem AT, PC, PS). Pierwotny APS Shostak i wsp. wykryli u 18,5% wśród których dominującą manifestacją kliniczną była zatorowość płucna. Zauważono także, że nawrotowy charakter zatorowości płucnej był częściej obserwowany w grupie, w której APS współistniał z wrodzonym defektem hemostazy niż w grupie z izolowanym APS (157). W badaniach własnych również stwierdzono korelację liczby nawrotów ŻChZZ ze współczynnikiem LA<sub>1</sub>/LA<sub>2</sub>. Do podobnych wniosków doszli Khamashata i wsp., którzy wykazali wysokie ryzyko nawrotu zakrzepicy u pacjentów, u których stwierdzono przetrwałą obecność przeciwciał antyfosfolipidowych. W swoich badaniach opisali, że 69% spośród pacjentów z APS miało w sumie 186 nawrotów w ciągu 1 roku od wystąpienia epizodu. Najwyższa częstość nawrotów została zanotowana w ciągu pierwszych 6 miesięcy od zakończenia terapii przeciwkrzepliwnej. Badacze ci doszli również do wniosku, że przedłużenie i intensyfikacja



terapii lekami przeciwkrzepliwymi w tej grupie pacjentów jest konieczna (156), co w obliczu przedstawionych danych wydaje się być uzasadnione.

W dalszym etapie analizy w badaniach własnych oceniano czy współistnienie trombofilii wrodzonej i APS ma wpływ na wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego. W badaniu Brouwer JLP i wsp. (158), w którym przez 12 lat obserwowano 144 pacjentów chorych na toczeń układowy rumieniowaty; potwierdzono wysokie ryzyko wystąpienia zarówno zakrzepicy żyłnej jak i tętniczej, co związane było głównie z obecnością LA oraz ACA. W tym samym badaniu oceniano również wpływ na ryzyko zakrzepowe czynników wrodzonej trombofilii (AT, PC, PS, APCr, FVL G1691A, FII G20210A) izolowanych lub w kombinacji z LA i ACA. Wykazano, że tylko FVL G1691A i FII G20210A w kombinacji z LA lub ACA zwiększały ryzyko wystąpienia ŻChZZ 20 - 30 - krotnie w porównaniu z populacją ogólną (158). W badaniach własnych również wykazano, że współistnienie APS z wrodzoną trombofilią skutkuje wcześniejszym wystąpieniem epizodu zakrzepowo - zatorowego w porównaniu z wpływem izolowanej obecności APA (29,6 vs 44,1 lat,  $p=0,0476$ ). Niska liczebność grupy ze skojarzoną obecnością APS i wrodzonej trombofilii (7 osób), powoduje, że trudno jest jednoznacznie określić czy zależność ta jest istotna klinicznie, zwłaszcza, że prace innych autorów nie potwierdzają związku pomiędzy APS i wrodzoną trombofilią w pierwotnym APS (159,160). Należy także wspomnieć, że przytaczane wyniki badań Brouwer i wsp. opisują pacjentów z obecnością APA wtórną do choroby o tak złożonej etiologii, jaką jest toczeń układowy, natomiast w badaniach własnych opisywana jest grupa osób z pierwotnym APS. Można zatem jedynie wnioskować, że wrodzona trombofilia może w obecności dodatkowego silnego nabytego czynnika ryzyka ŻChZZ, jakim są APA, potęgować efekt prozakrzepowy i skutkować wystąpieniem epizodu zakrzepowo – zatorowego w młodszym wieku.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych analiz należy podkreślić rolę wrodzonych czynników trombofilii w patogenezie ŻChZZ, zwłaszcza w grupie pacjentów, u których występuje więcej niż jeden defekt genetyczny. Publikacje opisujące efekt współistnienia wrodzonych czynników nabytej trombofilii na wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego należą do rzadkości, a na podstawie opisanego w badaniach własnych efektu klinicznego, będącego skutkiem współistnienia wrodzonych zaburzeń hemostazy, można wysnuć wniosek, że występowanie dwóch defektów wrodzonych może prowadzić do zakrzepicy żyłnej w znacznie młodszym wieku. Ponadto na podkreślenie zasługuje fakt, że wykrycie

jednego rodzaju wrodzonej trombofilii nie oznacza braku innych defektów, co potwierdza zasadność wykonywania tak szerokiego panelu diagnostycznego, mającego na celu wykrycie wszystkich najważniejszych czynników wrodzonych sprzyjających zakrzepicy. Podobne wnioski można wyciągnąć analizując wyniki badań dotyczące nabytego czynnika ryzyka zakrzepicy żyłnej jakim jest APS. Znajomość oddziaływania i umiejętność wykrycia tak wielu czynników ryzyka ŻChZZ daje szansę na praktyczne wykorzystanie uzyskanych informacji w odniesieniu do określonych grup chorych i wdrożenie odpowiedniej profilaktyki przeciwzakrzepowej w uzasadnionych sytuacjach klinicznych. Przykładem praktycznego zastosowania tych danych mogą być wytyczne Polskiej Grupy ds. Hemostazy, która rekomenduje włączenie terapii przeciwkrzepliwej u kobiet w ciąży i porożu, u których stwierdzono trombofilie dużego ryzyka w wywiadzie. Wyniki przedstawionej powyżej analizy wskazują także, iż częstość występowania wrodzonej trombofilii jest zdecydowanie wyższa wśród osób, u których pierwszy epizod zakrzepowo-zatorowy wystąpił przed 45 rokiem życia, co sugeruje ograniczenie szerokiej diagnostyki w kierunku wrodzonych defektów hemostazy tylko do osób, u których zakrzepica żylna wystąpiła w wieku poniżej 45 roku życia.

## VII SPIS TABEL, RYCIN I WYKRESÓW

### VII.1 Spis tabel

- Tabela nr 1. Czynniki wrodzonej trombofilii na podstawie Khan S
- Tabela nr 2. Klasyfikacja trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego
- Tabela nr 3. Klasyfikacja niedoboru antytrombiny
- Tabela nr 4. Klasyfikacja niedoboru białka C
- Tabela nr 5. Klasyfikacja niedoboru białka S
- Tabela nr 6. Ryzyko doświadczenia epizodu zakrzepicy żylniej lub tętniczej lub niepowodzeń ciąży w zależności od rodzaju APA
- Tabela nr 7. Warunki reakcji PCR zastosowanej w analizie obecności mutacji Leiden G1691A oraz polimorfizmu genu protrombiny
- Tabela nr 8. Podstawowe dane kliniczne i demograficzne badanej grupy pacjentów
- Tabela nr 9. Analiza wpływu ocenianych grup czynników ryzyka ŻChZZ na jej manifestację kliniczną
- Tabela nr 10: Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ w ocenianych grupach chorych
- Tabela nr 11. Częstość występowania czynników wrodzonej trombofilii w zależności od płci
- Tabela nr 12. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w badanej grupie pacjentów w zależności od rodzaju wrodzonego czynnika ryzyka ŻChZZ
- Tabela nr 13. Częstość występowania wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ w grupach chorych z pierwszym epizodem ŻChZZ w wieku  $< 45$  rż. i  $\geq 45$  rż.
- Tabela nr 14. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżonym i prawidłowym stężeniem wolnego białka S
- Tabela nr 15. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżoną i prawidłową aktywnością białka C
- Tabela nr 16. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżoną i prawidłową aktywnością AT

- Tabela nr 17. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupach chorych z obniżonym i prawidłowym APCr
- Tabela nr 18. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z mutacją Leiden G1691A genu czynnika V i bez mutacji Leiden G1691A genu czynnika V
- Tabela nr 19. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z polimorfizmem FII G20210A
- Tabela nr 20. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów z podwyższonym i prawidłowym poziomem aktywności czynnika VIII
- Tabela nr 21. Manifestacja kliniczna ŻChZZ w grupie pacjentów, u których wykryto APS i w grupie pacjentów bez APS
- Tabela nr 22. Średni czas protrombinowy, INR i średnie stężenie D-dimeru w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 23. Średnia aktywność antytrombiny w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 24. Średnia aktywność białka C w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 25. Średnie stężenie wolnego białka S w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 26. Średnia wartość współczynnika APCr w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 27. Średnia aktywność czynnika VIII w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 28. Średnie stężenie ACA w klasie IgG w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 29. Średnie stężenie ACA w klasie IgM w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 30. Średnie stężenie przeciwciał anty  $\beta_2$  GPI w klasie IgG w badanej populacji pacjentów
- Tabela nr 31. Średnia wartość współczynnika LA<sub>1</sub>/LA<sub>2</sub> w badanej grupie pacjentów
- Tabela nr 32. Średnia wartość aPTT w badanej grupie pacjentów
- Tabela nr 33. Średnia wartość aPTT z Actinem w badanej grupie pacjentów

## VII.2 Spis rycin

- Rycina nr 1 Mechanizm działania inhibitora drogi zależnej od czynnika tkankowego (TFPI), antytrombiny (AT), układu białka C (białko S (PS) w kompleksie z aktywnym białkiem C (APC)) według Łopaciuk S
- Rycina nr 2. Mechanizm działania układu białka C (PC - białko C, APC – aktywne białko C, PL – fosfolipidy, Va, VIIIa – aktywne czynniki krzepnięcia V i

VIII, PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu, PCI – inhibitor białka C)

- Rycina nr 3. Zapadalność na pierwszy epizod zakrzepowo-zatorowy (zakrzepicy żył głębokich oraz zatorowości płucnej) w zależności od wieku i płci (wg. Oger E)
- Rycina nr 4. Przykładowy obraz żelu. M – marker wielkości DNA; 887, 883 – heterozygoty FVL G1691A; 881 – homozygota zmutowana FVL G1691A; 890 – heterozygota PTH G20210A
- Rycina nr 5. Schemat postępowania diagnostycznego w przypadku podejrzenia obecności antykoagulantu toczniowego

### VII.3. Spis wykresów

- Wykres nr 1. Częstość występowania czynników ryzyka ŻChZZ w badanej grupie pacjentów
- Wykres nr 2. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie pacjentów z wrodzoną trombofilią i brakiem wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ i APS (ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa)
- Wykres nr 3. Średni wiek wystąpienia pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w grupie chorych z APS oraz w grupie pacjentów ze współistnieniem wrodzonej trombofilii z APS (APS – zespół antyfosfolipidowy)
- Wykres nr 4. Rozkład procentowy ocenianych grup chorych z dodatnim wynikiem badania w kierunku wrodzonej trombofilii w populacji badanej (FII G20210A – polimorfizm genu protrombiny, FVL G1691A – mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, PS- białko S, PC- białko C, AT – antytrombina, FVIII – czynnik VIII)
- Wykres nr 5. Rozkład procentowy poszczególnych grup chorych, u których wykryto złożoną wrodzoną trombofilię (AT – antytrombina, PC – białko C, PS- białko S, FVL G1691A - mutacja Leiden G1691A genu czynnika V, FII G20210A genu protrombiny – polimorfizm G20210A genu protrombiny)
- Wykres nr 6. Częstość występowania wrodzonej trombofilii w grupach pacjentów z pierwszą zakrzepicą w wieku < 45 roku życia i ≥ 45 roku życia

Wykres nr 7. Częstość występowania polimorfizmu G20210A genu protrombiny w grupach wiekowych  $< 45$  rż. i  $\geq 45$  rż. w badanej populacji (GG-genotyp prawidłowy, GA-genotyp nieprawidłowy)

Wykres nr 8. Częstość występowania wrodzonej złożonej trombofilii w grupach wiekowych  $< 45$  rż. i  $\geq 45$  roku życia w badanej populacji pacjentów

## VIII ANEKS

### Średnie wartości oznaczeń czynników ryzyka ŻChZZ wykonywanych podczas realizacji tematu niniejszej pracy

Tabela nr 22. Średni czas protrombinowy, INR i średnie stężenie D-dimeru w badanej populacji pacjentów

Test przesiewowy	Wynik testu $x \pm SD$
Czas protrombinowy (sekundy)	14,3 $\pm$ 3,0
INR	1,0 $\pm$ 0,19
Stężenie D-dimeru (ng/ml)	337 $\pm$ 135

Tabela nr 23. Średnia aktywność antytrombiny w badanej populacji pacjentów

Klasyfikacja	Aktywność antytrombiny (%) $x \pm SD$
obniżona	54,1 $\pm$ 12,3
w zakresie referencyjnym	114,3 $\pm$ 23,8

Tabela nr 24. Średnia aktywność białka C w badanej populacji pacjentów

Klasyfikacja	Aktywność białka C (%) $x \pm SD$
obniżona	49,2 $\pm$ 17,8
w zakresie referencyjnym	104,5 $\pm$ 22,4

Tabela nr 25. Średnie stężenie wolnego białka S w badanej populacji pacjentów

<b>Klasyfikacja</b>	<b>Aktywność białka S (%)</b> <b>x ± SD</b>
<b>obniżone</b>	42,5 ± 5,4
<b>w zakresie referencyjnym</b>	88,3 ± 34,2

Tabela nr 26. Średnia wartość współczynnika APCr w badanej populacji pacjentów

<b>Klasyfikacja</b>	<b>współczynnik APCr</b> <b>x ± SD</b>
<b>obniżony</b>	1,68 ± 0,23
<b>w zakresie referencyjnym</b>	2,9 ± 0,80

*APCr – oporność na aktywne białko C*

Tabela nr 27. Średnia aktywność czynnika VIII w badanej populacji pacjentów

<b>Klasyfikacja</b>	<b>Aktywność czynnika VIII</b> <b>x ± SD</b>
<b>podwyższona</b>	184,0 ± 28,5
<b>w zakresie referencyjnym</b>	97,5 ± 23,2



Tabela nr 28. Średnie stężenie ACA w klasie IgG w badanej populacji pacjentów

Klasyfikacja	Stężenie ACA w klasie IgG (GPL) x ± SD
podwyższone	21,3 ± 9,2
w zakresie referencyjnym	5,4 ± 4,5

ACA – przeciwciała antykardiolipinowe, GPL – jednostki stężenia przeciwciał w klasie G

Tabela nr 29. Średnie stężenie ACA w klasie IgM w badanej populacji pacjentów

Klasyfikacja	Stężenie ACA w klasie IgM (MPL) x ± SD
podwyższone	15,3 ± 1,3
w zakresie referencyjnym	3,8 ± 2,4

ACA – przeciwciała antykardiolipinowe, MPL – jednostki stężenia przeciwciał w klasie M

Tabela nr 30. Średnie stężenie przeciwciał anty  $\beta_2$  GPI w klasie IgG w badanej populacji pacjentów

Klasyfikacja	Stężenie przeciwciał anty- $\beta_2$ GPI w klasie IgG (GU) x ± SD
Podwyższone	28,3 ± 7,4
w zakresie referencyjnym	7,2 ± 2,2

$\beta_2$  GPI -  $\beta_2$  glikoproteina I, GU – jednostki stężenia przeciwciał w klasie G

Tabela nr 31. Średnia wartość współczynnika LA<sub>1</sub>/LA<sub>2</sub> w badanej grupie pacjentów

Klasyfikacja	Współczynnik LA <sub>1</sub> /LA <sub>2</sub> x ± SD
<b>Podwyższony</b>	1,56 ± 0,22
<b>w zakresie referencyjnym</b>	1,09 ± 0,18

*LA – antykoagulant toczniowy*

Tabela nr 32. Średnia wartość aPTT w badanej grupie pacjentów

Klasyfikacja	aPTT (s) x ± SD
<b>Przedłużony</b>	43,5 ± 7,5
<b>w zakresie referencyjnym</b>	32,3 ± 3,4

*aPTT – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji*

Tabela nr 33 Średnia wartość aPTT z Actinem w badanej grupie pacjentów

Klasyfikacja	aPTT z Actinem (s) x ± SD
<b>Przedłużony</b>	45,8 ± 7,8
<b>w zakresie referencyjnym</b>	31,3 ± 3,6

*aPTT z Actinem – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji uzyskany z zastosowaniem odczynnika wrażliwego na antykoagulant toczniowy*

## **IX STRESZCZENIE**

### ***Wstęp***

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ) w populacji ogólnej występuje z częstością 1-3 przypadków /1000/rok. Głównymi czynnikami ryzyka zakrzepicy żylny są: wiek > 45 rż., zabieg operacyjny, uraz, unieruchomienie, hospitalizacja, ciąża, połów, stosowanie leków hormonalnych, otyłość oraz wrodzone i nabyte zaburzenia prowadzące do nadkrzepliwości. Trombofilia wrodzona (mutacja Leiden G1691A genu czynnika V (FVL G1691A), oporność na aktywne białko C, polimorfizm G20210A genu protrombiny, obniżenie aktywności/lub stężenia naturalnych białek antykoagulacyjnych: białka C (PC), wolnego białka S (PS), antytrombiny (AT)) oraz nabyta (zespół antyfosfolipidowy - APS) są uznanymi czynnikami ryzyka ŻChZZ. Wiele prac sugeruje, że wrodzona trombofilia ma znaczenie w rozwoju powikłań zakrzepowych szczególnie w grupie młodszych pacjentów.

### ***Cel pracy***

Celem niniejszej pracy było przedstawienie częstości występowania wrodzonej trombofilii i APS w badanej grupie chorych, w szczególności ich wpływu na wiek pierwszej manifestacji klinicznej ŻChZZ. Ponadto oceniano także wpływ współistnienia 2 i więcej czynników wrodzonych lub wrodzonych i APS na wiek wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ oraz badano częstość występowania wrodzonej trombofilii w grupach wiekowych < i  $\geq$  45 rż.

### ***Material i metody***

Badaniami objęto grupę 136 chorych (54% stanowiły kobiety), mediana wieku wystąpienia pierwszego epizodu ŻChZZ wynosiła 38 lat. Wykonano następujące oznaczenia: aktywność białka C, stężenie antygeny wolnego PS, aktywność AT, badanie obecności APCr, aktywność czynnika VIII, badanie obecności wariantu G1691A genu czynnika V (mutacji Leiden) i G20210A genu protrombiny; obecność APS wykrywano zgodnie z zaleceniami SSC/ISTH.

### ***Wyniki***

U 61/136 (45%) pacjentów wykryto co najmniej jeden rodzaj wrodzonej trombofilii. Częstość występowania poszczególnych czynników wrodzonej trombofilii była następująca: obniżenie aktywności PC – 10%, obniżenie aktywności AT – 10%, obniżenie stężenia wolnego PS – 8%, APCr – 23%, mutacja Leiden G1691A – 23%, polimorfizm G20210A genu protrombiny – 6%. Zwiększoną aktywność czynnika VIII

stwierdzono u 23% pacjentów. Wrodzoną trombofilię złożoną wykryto u 13,1% (8/61) populacji badanej; defekty złożone związane z obniżeniem aktywności AT i PC, oraz obniżeniem stężenia wolnego PS - wykazano 8,2% (5/61) osób, natomiast złożone wrodzone defekty genetyczne (FVL G1691A i FII G20210A) u 4,9% (3/61). Obniżona aktywność antytrombiny okazała się być czynnikiem związanym z 5,9-krotnie wyższym ryzykiem niepowodzeń ciąży (95% CI 1,07-32,56) w porównaniu z kobietami, u których aktywność antytrombiny pozostawała w granicach wartości referencyjnych.

Średni wiek wystąpienia zakrzepicy wśród pacjentów z izolowaną wrodzoną trombofilią (53/136) był istotnie statystycznie niższy w porównaniu z osobami, u których nie wykryto APS ani wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ (44/136), ( $36,7 \pm 12,3$  lat vs  $43,1 \pm 11,8$  lat;  $p=0,0097$ ). Częstość występowania wrodzonej trombofilii była wyższa w grupie pacjentów, u których pierwszy epizod wystąpił przed 45 rż w porównaniu z grupą osób starszych: 57% (47/83) vs 21% (11/53);  $p<0,0001$ . Kiedy porównywano grupę pacjentów z izolowanym defektem hemostazy (53/136) z grupą osób ze złożoną wrodzoną trombofilią (8/136) zauważono, że średni wiek wystąpienia epizodu ŻChZZ był niższy w grupie chorych ze złożoną wrodzoną trombofilią w porównaniu z pacjentami, u których wykryto izolowany wrodzony defekt hemostazy ( $27,4 \pm 8,5$  lat vs  $36,9 \pm 12,1$  lat;  $p=0,0348$ ). Co więcej u wszystkich pacjentów, u których wykryto wrodzoną złożoną trombofilię, pierwszy epizod ŻChZZ wystąpił przed 45 rż. ( $p=0,0113$ ). Zespół antyfosfolipidowy stwierdzono u 15% pacjentów (20/136). Wśród pacjentów, u których APS współistniał z wrodzoną trombofilią pierwszy epizod ŻChZZ wystąpił o 14,5 lat wcześniej w porównaniu z grupą, w której jedynym czynnikiem ryzyka ŻChZZ był APS ( $29,6 \pm 14,7$  lat vs  $44,1 \pm 13,6$  lat;  $p=0,0476$ ). Liczba epizodów zakrzepowo-zatorowych była wprost proporcjonalna do współczynnika  $LA_1/LA_2$ .

## **Wnioski**

1. Obecność wrodzonej trombofilii stwierdzono u 45% chorych po przebytych epizodzie żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, przy czym najczęściej obserwowano obecność mutacji Leiden G1691A genu czynnika V.
2. Wrodzoną trombofilię wykrywano z większą częstością wśród pacjentów, u których pierwszy epizod zakrzepowo-zatorowy wystąpił przed 45 rokiem życia.

3. Obniżona aktywność antytrombiny była jedynym spośród wrodzonych czynników ryzyka ŻChZZ, który istotnie statystycznie wpływał na zwiększenie ryzyka nawrotu ŻChZZ, a także na wzrost ryzyka niepowodzeń ciąży u kobiet.
4. Obecność antykoagulantu toczniowego była związana z ryzykiem nawrotu ŻChZZ.
5. Trombofilia złożona, związana ze współistnieniem wrodzonych czynników ryzyka żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz współistnieniem zespołu antyfosfolipidowego z wrodzoną trombofilia, wiąże się z wystąpieniem pierwszego epizodu zakrzepowo-zatorowego w młodszym wieku.

## **X SUMMARY**

### ***Background***

Venous thromboembolism (VTE) occurs at an annual incidence of about 1-3 per 1000 in general population. The major risk factors for venous thrombosis include: age over 45 years, surgery, trauma, immobility, hospitalization, pregnancy, puerperium and hormone use, obesity and inherited or acquired disorders leading to hypercoagulation. Among the well-established risk factors for venous thromboembolism is inherited thrombophilia, including: factor V Leiden G1691A mutation, the activated protein C resistance (APCr), prothrombin G20210A polymorphism, deficiencies of natural anticoagulants: protein C (PC), protein S (PS), antithrombin (AT); and antiphospholipid syndrome (APS). It has been proposed that hereditary thrombophilia may substantially contribute to the development of VTE in young patients.

### ***Objectives***

The aim of this study was to analyse the prevalence of inherited thrombophilia and antiphospholipid syndrome in the study group with special regard to the age of first VTE manifestation, and also to evaluate the relationship between coexistence of 2 or more inherited or inherited risk factor with APS and their influence on the age of first manifestation of VTE. Furthermore, the prevalence of inherited thrombophilia among patients with first VTE manifestation at the age of less than 45 and over 45 was estimated.

### ***Material and methods***

The study group consisted of 136 patients (54% female) with a median age 38 years at the time of their first VTE. Screening for thrombophilia included testing for the factor V Leiden G1691A mutation, the prothrombin G20210A polymorphism, the APCr, the free PS antigen, activities of AT, PC, factor VIII, and the presence of antiphospholipid antibodies (APA). APA was determined according to the international criteria of the SSC/ISTH.

## **Results**

At least one thrombophilic disorder was identified in 61/136 (45%) of the patients. Of there, 10% had PC deficiency, 8% free PS deficiency and 10% AT deficiency, 23% had FVL G1691A mutation and/or APCr, 6% had FII G20210A polymorphism, and 23% elevated factor VIII activity. AT deficiency was a risk factor for pregnancy failure when compared to women with normal antithrombin activity (OR 5.9; 95% CI 1.07-32.56). Coinheritance of more than one thrombophilic defect was found in 13,1% (8/61) of the patients (inhibitors deficiency: AT, PC, PS – 8,2% (5/61); while complex genetic defects (FVL G1691A and FII G20210A) coexistence was found in 4,9% (3/61).

The mean age of VTE manifestation was lower in patients with inherited thrombotic defects (58/136) when compared to those who had neither APS nor inherited risk factors for VTE (44/136) ( $36.7 \pm 12.3$  years vs  $43.1 \pm 11.8$  years,  $p=0.0097$ ). The rate of detecting hereditary thrombophilia was dependent on age. The differences were highly significant when comparing patients younger than 45 years with those older than 45 years: 57% (47/83) vs 21% (11/53);  $p<0.0001$ . When compared to patients with one thrombophilic defect (53/136), VTE occurred prematurely in the patients suffering from combined thrombophilia (8/136):  $36.9 \pm 12.1$  years vs  $27.4 \pm 8.5$  years;  $p=0.0348$ . Moreover, in all those patients VTE occurred earlier than 45 years ( $p=0.0113$ ). APS was diagnosed in 15% of the patients (20/136). The first VTE occurred 14,5 years earlier among patients with coexistence of APS and factor V Leiden G1691A mutation compared to those with APS alone ( $29.6 \pm 14.7$  years vs  $44.1 \pm 13.6$  years,  $p=0.0476$ ). Number of venous thromboembolic episodes was proportional to LA/LA2 ratio ( $r=0,25$ ,  $p=0,0276$ ).

## **Conclusions**

1. Inherited thrombophilia was present in 45% of patients after venous thromboembolic episode
2. The rate of detecting hereditary thrombophilia was higher among patients with first VTE manifestation below 45 year.
3. Antithrombin deficiency was the were risk factor for VTE recurrence and pregnancy failure in women.
4. Lupus anticoagulant was the risk factor for VTE recurrence.

5. The coexistence of inherited or inherited and risk factor and APS decreases the age of first manifestation of VTE.



## XI PIŚMIENNICTWO

1. Nordström M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellström T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med*. 1992;232:155-160.
2. Cushman M, Tsai AW, White RH et al. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med*. 2004;117:19-25.
3. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007;98:756-764.
4. Nizankowski R. Komentarz do “Wytyczne profilaktyki i leczenia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej”. *Med Prakt* 2002;5:100-101.
5. Prandoni P, Vilalta S, Bagatella P, et al. The clinical course of deep-vein thrombosis. Prospective long-term follow-up of 528 symptomatic patients. *Haematologica* 1997;82:423-428.
6. Pengo V, Lensing AW, Prins MH, et al. Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study Group. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2004;350:2267-2264.
7. Jordan FLJ, Nandorff A. The familial tendency in thromboembolic disease. *Acta Med Scand*. 1956;13:516-530.
8. Undass A. Stany nadkrzepliwości W: (red. P. Gajewski) *Interna Szczeklika 2013*: s1768-1771. Kraków: Medycyna Praktyczna.
9. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-530.
10. Griffin JH, Evatt BL, Zimmermann TS, Kleisz AJ, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1362-1363.
11. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
12. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-3703.

13. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-1008.
14. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984;68:1221-1228.
15. Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J* 2006 12;4:15.
16. Makris M. Thrombophilia: grading the risk. *Blood*. 2009;113:5038-9.
17. Pernod G, Biron-Andreani C, Morange PE, Boehlen F et al. Recommendations on testing for thrombophilia in venous thromboembolic disease: A French consensus guideline, *Journal Des Maladies Vasculaires*. 2009; 34,156-203.
18. Rand JH. The antiphospholipid syndrome. Pathogenic mechanisms, diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:510-519.
19. Celinska-Lowenhoff M, Iwaniec T, Padjas A, Musial J, Undass A. Altered fibrin clot structure/function in patients with antiphospholipid syndrome: association with thrombotic manifestation. *Thromb Haemost*. 2014;20:112.
20. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, et al. Predictive value of D dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation*. 2003;108:313-318.
21. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005;115:3355-3362.
22. Monroe BM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:41-48.
23. Gomez K, McVey JH, Tuddenham E. Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. *Haematologica*. 2005;90:1570-1576.
24. Chan WP, Lee CK, Kwong Yl et al. A novel mutation of Arg 306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998;91:1135-1139.
25. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:102-115.
26. Łopaciuk S. Wrodzona trombofilia W: S. Łopaciuk (red.), *Zakrzepy i zatory* 2002: s65-88; PZWL, Warszawa.
27. Weitz JI, Middeldorp S, Geerts W, Heit JA. Thrombophilia and new anticoagulant drugs. *Hematology* 2004;2:424-38.

28. Khor B, Van Cott EM. Laboratory test for antithrombin deficiency. *Am J Hematol* 2010;85:947.
29. Fitches AC, Appleby R, Lane DA, et al. Impaired cotranslational processing as a mechanism for type I antithrombin deficiency. *Blood* 1998;92:4671.
30. Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis. *Blood* 1999;94:3388.
31. Abidgaard U. Antithrombin: early prophecies and present challenges. *Thromb Haemost.* 2007;98:97-104.
32. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, et al. Antithrombin mutation database: 2<sup>nd</sup> (1997) update. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211.
33. Van Boven HH , Lane DA. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol.* 1997;34:188-204.
34. Sas G, Blaskó G, Banhegyi D, et al. Abnormal antithrombin III (antithrombin III “Budapest”) as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1974;32:105.
35. Bock SC, Silberman JA, Wikoff W, et al. Identification of a threonine for alanine substitution at residue 404 of antithrombin III Oslo suggests integrity of the 404-407 region is important for maintaining normal plasma inhibitor levels. *Thromb Haemost* 1989;62:494.
36. Eikelboom JW, Quinlan DJ, Douketis JD. Extended-duration prophylaxis against venous thromboembolism after total hip or knee replacement: a meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2001;358:9-15.
37. Musiał J. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Thromb Res* 2012;129: 345-7.
38. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996: 76:651.
39. Cosgriff TM, Bishop DT, Hershgold EJ, et al. Familial antithrombin III deficiency: its natural history, genetics, diagnosis and treatment. *Medicine* 1983;62:209.
40. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest.* 2000;106:873-878.
41. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam SI et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994;87:106-12.

42. Vossen CY, Walker ID, Svensson P, et al. Recurrence rate after first venous thrombosis in patients with familial thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1992-1997.
43. Rossi E, Za T, Ciminello A, Leone G et al. The risk of symptomatic pulmonary embolism due to proximal deep venous thrombosis differs in patients with different types of Inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2008;99:1030-1034.
44. Stenflo J. A new vitamin K dependent protein: purification from bovine plasma preliminary characterization. *J Biol Chem.* 1974;249:6347-6350.
45. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry.* 1977;16:5824-5831.
46. Kisiel W, Ericsson LH, Davie EW. Proteolytic activation of protein C from bovine plasma. *Biochemistry.* 1976;15:4893-4900.
47. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1981;78:2249-2252.
48. Mannucci P.M. Venous Thrombosis: the history of knowledge. *Path Haemost Thromb.* 2002;62:209-212.
49. Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett,* 2005;579:3310-16.
50. Merli GJ. Deep-vein thrombosis in malignancy: how long should patients be treated and with what? *Catheter Cardiovasc Interv.* 2009;1:27-34.
51. Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Throm Haemost* 2007;98:530-542.
52. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;73:876.
53. Reitsma PH, Poort SR, Allart CF, et al. The spectrum of genetic defects in a panel of 40 Dutch families with symptomatic protein C deficiency type I: heterogeneity and founder effects. *Blood* 1991;78:890.
54. Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, et al. The frequency of heterozygous type I protein C and Protein S deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1988;59:18-22.

55. Fernandez Burriel M. Severe clinical presentation of protein C deficiency in a type I/II compound heterozygote newborn. *Thromb Haemost.* 2005;94:216-8.
56. Bykowska K, Vertun-Baranowska B, Windyga J, Łopaciuk S. Prevalence of G20210A prothrombin gene mutation in Poland. *Pol Arch Med Wewn* 2000;104:729-33.
57. Shah SH, Becker RC. The Genetics of Thrombosis W: (red. AT. Askari, AM. Lincoff) *Antithrombotic Drug Therapy in Cardiovascular Disease* 2010: s63-116 Nowy Jork, Springer Science & Business Media.
58. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein: a possible function for bovine protein S. *J Biol Chem.* 1980;255:5521-5524.
59. Dahlback B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:2512-2516.
60. Inherited thrombophilia: memorandum from a joint WHO & International Society of Thrombosis and Haemostasis meeting. *Bull World Health Organ* 1997;75:177-189.
61. Hepner M, Karlaftis V. Protein S. *Methods Mol Biol.* 2013;992:373-81
62. Monroe BM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:41-48.
63. Gomez K, McVey JH, Tuddenham E. Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. *Haematologica.* 2005;90:1570-1576.
64. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD et al. A study in protein S levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol.* 2001;113:636-641.
65. Dahlback B. The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb Haemost* 2007;98:90-96.
66. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1222-31.
67. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest,* 2003,124, 26-32.
68. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994;330:517-522.
69. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;342:1503-1506.

70. Voorberg J, Roelse J, Koopman R. et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994;343:1535-1536.
71. Ripoll L, Paulin D, Thomas S, Drouet LO. Multiplex PCR-mediated site-directed mutagenesis for one-step determination of factor V Leiden and G20210A transition of the prothrombin gene. *Thromb Haemost.* 1997;78:960-1.
72. Norstrom E, Thorelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood* 2002;100:524-530.
73. Steen M, Norstrom EA, Tholander AL. Functional characterization of V-Ile359The: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004;103:3381-3387.
74. Zivelin H, Mor-Cohen R, Kovalsky V, et al. Prothrombin 20210G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. *Blood* 2006;107:4666-4668.
75. Rees DC, Cox M, Clegg JB et al. World Distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-1134.
76. Lindqvist PG, Svensson PJ, Dalback B et al. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced inpartum blood loss-a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 1998;54:7969-73.
77. Corral J, Iniesta JA, Gonzalez-Conejero R et al. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001;97:2979-2982.
78. Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:596-606.
79. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210 A on the risk of venous thromboembolism: pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls: Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:809-816.
80. Mäkelburg ABU, Veeger NJGM, Middeldorp S, Hamulyák K, Prins MH, Büller HR, Lijfering WM. Different risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in carriers with factor V Leiden compared with non-carriers, but not in other thrombophilic defects. Results from a large retrospective family cohort study. *Haematologica* 2010;95:1030–1033.

81. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:108-117.
82. Franchini M, Capra F, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. *Thromb J.* 2007;5:14.
83. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandembroucke JP et al. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995;345:152-155.
84. Souto JC, Alamsy L, Borrel M, Blanco-Vaca F, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: The GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Am Hum Genet* 2000;67:1452-1459.
85. Kraaijenhagen RA, Anker PS, Koopman MM, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A i wsp.: High plasma concentration of factor VIII c is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000;83:5-9.
86. O'Donnell J, Tuddenham EGD, Manning R, Kembell-Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to acute phase reaction. *Thromb Haemost* 1997;77:825-828.
87. Wisløff F, Jacobsen EM, Liestøl S. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2003;108:263-271.
88. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhage disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952;31:621-2.
89. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
90. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamshata M. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010;376:1498-1509.
91. Espinosa G, Santos E, Cervera R. Adrenal involvement in the antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic characteristics of 86 patients *Medicine* 2003;82:106.

92. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-7.
93. Obermoser G, Bitterlich W, Kunz F, Sepp NT. Clinical Significance of anticardiolipin antibodies and anti- $\beta$ 2-Glycoprotein I antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:148-53.
94. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only. But to complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66:629-32.
95. Arnout J, Wittevrongel C, Vanrusselt M, Hoyalaerts M, Vermeylen J. beta-2-glycoprotein I dependent lupus anticoagulants from stable bivalent antibody beta-2-glycoprotein I complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost* 1998;79:79-86.
96. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, et al. complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with thrombin binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol* 2001;113:621-9.
97. Zawilska K. Zaburzenia hemostazy w zespole antyfosfolipidowym. *Twój Magazyn Medyczny, Reumatologia* 2005;10:25-30.
98. Harris EN. Of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987;26:324-6.
99. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lock shin MD, Branch DW, Piette J-C, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
100. Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulant/ Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;74:1597-603.
101. Pengo V, Tripodi A. i wsp. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009;7:1737-1740.
102. Swadźba J, Iwaniec T, Szczeklik A. Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune diseases. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1883-1889.



103. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community –based study in western France. *Thromb Haemost.* 2000;83:657-660.
104. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckberd SR, Tracy RP, Aleksic N et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Am J Med* 2002;113:636-642.
105. Ralli E, Zezza L, Lillo R, Conti E, Comito C, Caserta D, Moscarini M. Venous thromboembolism in pregnancy: current state of the art. *Minerva Med.* 2013;104:563-78.
106. Heit JA, Kobbervik CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ III. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30 year population-based study. *Ann Intern Med* 2005;10:697-706.
107. Cervera R, Piette JC, Font J et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019.
108. Jordan WM. Pulmonary embolism. *Lancet* 1961;2:1146-1147.
109. Gourbil M, Grandvuillemin A, Beyens MN, Massy N, Gras V, D'Amico A, Miremont-Salamé G, Petitpain N. Thromboembolic events in women exposed to hormonal contraception or cyproterone acetate in 2012: a cross-sectional observational study in 30 French public hospitals. French Network of Regional Pharmacovigilance Centres. *Drug Saf.* 2014;37:269-82.
110. Blanco-Molina Á. Oral contraception in women with mild thrombophilia: what have we learned recently? *Thromb Res.* 2012;130:16-18.
111. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and their interaction with coagulation factors and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003; 89:493-498.
112. Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, et al. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. *N Engl J Med* 1994; 331: 1601-1606.
113. Sun Y, Chen D, Xu Z, Shi D, Dai J, Qin J, Qin J, Jing Q. Deep venous thrombosis after knee arthroscopy: a systemic review and meta-analysis. *Arthroscopy.* 2014;30:406-412.
114. Benyo M, Harsfalvi J, Pfliegler G, Molnar Z, Muranyi M, Jozsa T, Flasko T. Present practice of thrombosis prophylaxis or radical prostatectomy in European country: a Hungarian multicenter study. *Urol Int.* 2014;92:289-93.

- 115.Koster T. Deep vein thrombosis. A population-based case control study: Leiden Thrombophilia study; Thesis, Leiden, Rijksuniversiteit Leiden. 1995.
- 116.Ansari MT, Mahmood MT, Karlberg JP. The association between seated immobility and local lower-limb venous coagulability in healthy adult volunteers: a simulation of prolonged travel immobility. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17:335-341.
- 117.Naess IA, Christiansen S.C., Romundstad P et al. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population based study. *J Thromb Haemost* 2007;4:692-9.
- 118.Lapostolle F, Surget V, Borron SW i wsp. Severe pulmonary embolism associated with air travel. *N Engl J Med* 2001;345:779-783.
- 119.Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9<sup>th</sup> ed: American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:1-801.
- 120.Walker ID, Greaves M, Preston FE. British Committee for Standards in Haematology. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol*. 2001;114:512-528.
- 121.Lindhoff-Last E, Luxembourg B. Evidence-based indications for thrombophilia screening. *VASA* 2008;37:19-30.
- 122.Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br J Haematol*. 2008;143:321-335.
- 123.Weingarz L, Schowonberg J, Schindewolf, Hecking K et al. Prevalence of thrombophilia according to age of the first manifestation of venous thromboembolism: results from the MAISTHRO registry. *Br J Haemat* 2013;163:655-665.
- 124.Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998;92:2353-2358.
- 125.Salomon O, Steiberg DM, Zivelin A, Gitel S et al. Combined prothrombotic factor in patients with idiopathic venous thromboembolism: Prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.1999;19:511-18.
- 126.Lewandowski K, Turowiecka Z, Rożek M, Markiewicz WT, Zawilska K. Częstość mutacji Leiden, genu czynnika V, u chorych na żylną chorobę zakrzepowo-zatorową: analiza 147 kolejnych przypadków. *Acta Haematol Pol* 1997;28:31-37.

127. Lewandowski K, Kwaśnikowski P, Rożek M, Turowiecka Z, Markiewicz WT, Zawilska K. Wrodzona trombofilia w regionie wielkopolskim. *Acta Haematol Pol* 2001;32:295-303.
128. Ehrenforth S, von Depka, Prondsinski M, Aygoren-Pursun E, Nowak-Göttl U. Study of the prothrombin gene 20210 GA variant in FV:Q506 carriers in relationship to the presence or absence of juvenile venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:276-280.
129. Eichinger S, Pabinger I, Stümpflen A, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 1997;77:624-628.
130. Nowak-Göttl U, Junker R, Hartmeier M, et al. Increased lipoprotein (a) is an important risk factor for venous thrombosis in childhood. *Circulation.* 1999;100:743-748.
131. D'Uva M, Di Micco P, Strina I, De Placido G. Recurrent Pregnancy Loss and Thrombophilia. *Clin Med Res.* 2010;2:18–22.
132. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, et al. Thromboprophylaxis in pregnancy reduces fetal losses in women with heritable thrombophilia: a prospective EPCOT study. *Thromb Haemost* 1999;3:227.
133. Kiznler ML, Prasad V, Ananth C. The effect of maternal thrombophilia on placental abruption: histologic correlates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:243-428.
134. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348:913–16.
135. Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P, et al. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin, protein C and protein S deficient women. *Thromb Haemost* 1996;75:387–88.
136. Vincent T, Rai R, Regan L, Cohen H. Increased thrombin generation in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 1998;352:116.
137. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2002;55:163-180.
138. Van den Belt AG, Sanson BJ, Simioni P, Prandoni P, Buller HR, Girolami A, Prins MH. Recurrence of venous thromboembolism in patients with familial thrombophilia. *Arch Intern Med.* 1997;157:2227–2232.

139. Jimenez D, Diaz G, Marin E, Vidal R, Sueiro A, Yusen RD. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with unprovoked symptomatic deep vein thrombosis and asymptomatic pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 2006;95:562–566.
140. Spencer FA, Gore JM, Lessard D, Douketis JD, Emery C, Goldberg RJ. Patient outcomes after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the Worcester Venous Thromboembolism Study. *Arch Intern Med.* 2008;168:425–430.
141. De Stefano V, Simioni P, Rossi E, Tormene D, Za T, Pagnan A, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica.* 2006;91:695–698.
142. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors and recurrent venous thrombosis events. *JAMA* 2005;293:2352-2361.
143. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet.* 2003;362:523-526.
144. Di Minno MN, Dentali F, Lupoli R, Ageno W. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: a prospective cohort study. *Circulation* 2014;28:497-503.
145. Paschoa AF, Guillaumon AT. Impact of screening on thrombophilia for patients with venous thrombosis. *International Angiology* 2006;25:52-59.
146. Pottier P, Cormier G, Truchaud F, Planchon. Efficiency of systematic thrombophilia screening in idiopathic venous thrombosis: a prospective study in internal medicine. *Clin Appl Thromb Haemost.* 2005;11:243-251.
147. Mateo J, Oliver A, Borrell M et al. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism – results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET - study). *Thromb Haemost* 1997;77:444-451.
148. Monreal M, del Campo R, Papadakis E. Thrombophilia and venous thromboembolism: RIETE Experience. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2012;25:285-294.
149. Vossen CY, Conrad J, Fontcuberta J, Makris M, van der Meer S et al. Risk of a first venous thrombotic event in carriers of familiar thrombophilic defect. *The*

- European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* 2005; 3:459-64.
150. Healy B, Levin E, Perrin K, Weatherall M, Beasley R. Prolonged work- and computer-related seated immobility and risk of venous thromboembolism. *J R Soc Med*. 2010;103:447–454.
151. Blanco-Molina A, Trujillo-Santos J, Criado J, Lopez L, et al. Venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost*. 2007;97:186-90.
152. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors and recurrent venous thrombosis events. *JAMA* 2005;293:2352-2361.
153. Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H. Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors. *Arch Intern Med*. 2000;160:769-74.
154. Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR et al. Deficiencies of coagulation – inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1999;92:2353.
155. Couturaud F, Kearon C. Predictors of thrombosis in relatives of patients with venous thromboembolism. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16:453-8.
156. Khamashata MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA et al. The management of thrombosis in the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med*. 1995; 332, 15,993-7.
157. Shostak NA, Kirienko AI, Leont'ev SG, Avdonin PV, et al. Antiphospholipid syndrome in the structure of hematogenic thrombophilia in young and middle-aged patients with venous thrombosis. *Ter Arkh*. 2005;77:47-51.
158. Brouwer JLP, Bijl M, Veeger NJGM, Kluin-Nelemans HC et al. The contribution of inherited and acquired thrombophilic defects, alone or combined with antiphospholipid antibodies, to venous and arterial thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2004;104:143-8.
159. Dizon TD, Hutchinson C, Silver R, Branch DW, et al. The factor V Leiden mutation which predisposes to thrombosis is not common in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1995;74:1029-31.

160. Berman H, Ugarte-Gil MF, Espinosa G, Tàssies D, et al. Can inherited thrombophilia modulate the clinical phenotype of patients with antiphospholipid syndrome? *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31:926-32.
161. Baglin T, Gray E, Greaves M, Hunt BJ, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Brit J Haemat* 2010;149:209-220.