

УЛОГА ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА У НАСТАНКУ ТРОМБОЗЕ

Иво ЕЛЕЗОВИЋ

Институт за хематологију, Клинички центар Србије, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Тромбоза је најчешћи узрок морбидитета и mortalитета у развијеном свету. Поремећај хемостазе је главни догађај у артеријској и венској тромбози. Код већине болесника с тромбозом нема јасно препознатљивих поремећаја хемостазе. Међутим, неки болесници имају урођено хиперкоагулабилно стање, које доприноси настанку тромбозе и других клиничких манифестација, као што су спонтани побачаји и компликације фетуса. У настанку тромбозе главну улогу имају спољни и генетски фактори. Пролазни или трајни фактори спољне средине могу имати важну улогу у настанку артеријских и венских тромбоза. Поремећај хемостазе који је генетски детерминисан има сталан утицај. Међутим, мутације гена које предиспонирају настанак тромбозе, као што су недостатак антитромбина, протеина С или протеина S, појављују се код релативно малог броја породица. Ако не постоји генска предиспозиција, тромбоза се јавља код старијих особа, најчешће у склопу спољних фактора ризика, као што су хируршке операције, гојазност или малигнитет. Насупрот томе, фамилијарне тромбозе удружене са генском мутацијом настају код младих болесника. Значај генског полиморфизма је сагледан открићем резистенције на активирани протеин С (APCR) која настаје због полиморфизма *G1691A* гена за фактор V (фактор V тип *Leiden*). То генско оштећење је указало на повећан ризик од венског тромбоемболизма без садејства са другим генетским или спољним факторима ризика. Откриће APCR је покренуло бројна истраживања других генских полиморфизама, као што су протромбин 20210, полиморфизми тромбомодулина, фактора коагулационог и фибринолизног система, гликопротеина тромбоцитне мембране и полиморфизам *S677T* метилентетрахидрофолат-редуктазе. Број потенцијалних генетских фактора ризика за настанак оклузивног тромба се значајно повећао. Већина тих генетских фактора повећава ризик венског тромбоемболизма, док за артеријске тромбозе још није јасно потврђено.

Кључне речи: тромбофилија; генски полиморфизам; мутација; артеријска тромбоза; венска тромбоза

УВОД

Тромбоза је најчешћи узрок морбидитета и mortalитета у развијеном свету. Инциденција је 1-3 на 1.000 особа годишње и разликује се према узрасту и полу. Код особа млађих од 25 година тромбозе су врло ретке, а после 40. године показују тенденцију значајног повећања. Акутни инфаркт миокарда (АИМ) је четири-пет пута чешћи код мушкараца до 55 година, а церебрални инфаркт је два пута чешћи код жена до 40 година. Венске тромбозе су два-три пута чешће код жена него код мушкараца, а та разлика је израженија у репродуктивном периоду. Код жена до 40 година ризик од венских тромбоза је пет пута већи него од артеријских тромбоза. Mortалитет код болесника са тромбозом млађих од 25 године је врло ређак (мање од 1 на 100.000 особа годишње), а после 40. године показује повећање. Смртност од венских тромбоза је значајно мања у односу на артеријске тромбозе. Код старих особа тромбозе представљају водећи узрок смрти [1].

Тромбоза је мултифакторска болест и у њеном настајању учествују три-четири фактора ризика код деце, а код особа старијих од 55 година два фактора или више њих. Фактори ризика за настанак тромбозе могу бити стечени или спољашњи, пролазни или трајни и урођени, који настају због генског полиморфизма или мутације појединих чинилаца [1, 2].

Заједничко у патогенези тромбоза је поремећај хемостазе. Код већине тромбоза поремећај хемостазе није препознат, међутим, ако се докаже поремећај хемостазе који доприноси настанку тромбозе, тада говоримо о тромбофилији [3]. Често је отежано испитивање фенотипа, односно мерење концентрације и активности појединих чинилаца. Међутим, раз-

војем генетике и усавршавањем генетских техника омогућено је лако препознавање генског полиморфизма и откривање нових алела. Досадашња испитивања су показала да генски полиморфизми могу утицати самостално или удружено са стеченим факторима ризика на настанак венског тромбоемболизма (VTE), међутим, када су у питању артеријске тромбозе, то није јасно доказано [4]. Велики број генских полиморфизама кодира протеине хемостазног система за које се претпоставља да могу утицати на повећање ризика од артеријских тромбоза. Међутим, мало је вероватно да они делују изоловано, већ као помажући фактори ризика у садејству са стеченим факторима [5, 6].

Оклузивни тромб је критичан догађај у артеријској и венској тромбози. Артеријска тромбоза настаје у условима високог притиска и брзог протока, па је тромб богат тромбоцитима, док венска тромбоза настаје у условима ниског притиска и спорог протока, па је тромб богат фибрином. Артеријска тромбоза и венска тромбоза су две различите болести.

ЗНАЧАЈ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА И МУТАЦИЈА ЗА НАСТАНАК АРТЕРИЈСКИХ ТРОМБОЗА

Лезија ендотела изазива адхезију, активацију, секретију и агрегацију тромбоцита, што доводи до стварања тромбоцитног тромба. Истовремено, експресија ткивног фактора на месту лезије доприноси активацији коагулације. Наша рана испитивања адхезије и агрегације тромбоцита у АИМ нису показала значајну разлику у односу на контролну групу [7,

8]. Међутим, резултати испитивања адхезије, агрегације тромбоцита и секреције Фон Вилебрандовог (*Von Willebrand*) фактора (*vWF*) из тромбоцита код болесника са јувенилним дијабетес мелитусом тип 1 су показала значајно повећану адхезивност тромбоцита, брзину агрегације на колаген и повећану спонтану секрецију *vWF* из тромбоцита болесника са јувенилним дијабетесом у односу на контролну групу [9].

Примена генских проба омогућила је откривање бројних полиморфизама гена за гликопротеине (*GP*) на тромбоцитној мембрани, као што су *GPIb-IX-V*, који представља рецептор за *vWF*, затим *GPIIb-IIIa* (интегрин $\alpha IIb\beta_3$), рецептор за фибриноген, *vWF*, витронектин и ламинин, као и *GPIa-IIa* (интегрин $\alpha_2\beta_1$), рецептор за колаген [10]. Међутим, није у потпуности разјашњен допринос откривених полиморфизама гена за *GPIb-V-IX*, као што су *C3550T*, који кодира *Thr-145Met* и диморфизам *T/C* на нуклеотиду 5, у настанку артеријске тромбозе [11].

Описане су бројне варијације гена за *GPIIb-IIIa* у општој популацији. Тако полиморфизам *T1565C*, који кодира замену *Pro33Leu (PLA2)*, утиче на повећану агрегацију тромбоцита и удружен је са 2,8 пута већим ризиком од АИМ [12]. Међутим, каснија испитивања то нису потврдила ни за АИМ, нити за исхемијски шлог [13, 14]. Удруженост полиморфизма *Ile843Ser* с артеријском тромбозом у већини студија није потврђена, мада су недавна испитивања показала да је *Ser843* удружен са повећаним ризиком од АИМ код младих жена у присуству других фактора ризика (пушење, породична анамнеза, хиперхолестеролемија) [15].

Диморфизам гена за *GPIa-IIa C807T* утиче на густину интегрин $\alpha_2\beta_1$ и активност рецептора на тромбоцитима и у вези је са неравнотежом која настаје услед полиморфизма *G873A*, као и других варијација на истом гену [16]. Алел *G873A* повећава густину интегрин $\alpha_2\beta_1$ на тромбоцитима, што се доводи у везу са 1,6 пута већим ризиком од АИМ код младих мушкараца и повећаним ризиком од исхемијског шлога [17]. Међутим, то није потврђено у другим радовима [18].

Повећање концентрације *vWF* у плазми је удружено са већим ризиком од артеријске тромбозе [9, 19]. Особе са крвном групом *O* имају нижи ниво *vWF*, а самим тим и мањи ризик од артеријске и венске тромбозе [20]. За четири диморфизма гена за *vWF (1793G/C, 1234C/T, 1185A/G, 1051G/A)* која утичу на ниво *vWF* није доказано да су фактори ризика за настанак артеријске тромбозе [21].

Нема сигурних доказа да полиморфизми гена за фибриноген (*Bc-II, 455 G/A, Thr-312Ala*) утичу на настанак артеријске тромбозе. Међутим, метаанализа 22 студије је јасно показала да високе вредности фибриногена представљају два пута већи ризик за настанак кардиоваскуларних болести, да је независан фактор ризика за настанак артеријске тромбозе, да садејствује са другим факторима ризика (пушење, хипертензија) и да повећава ризик од рекурентних артеријских тромбоза за 8% [22]. Полиморфизам *G455A* се испољава повећањем фибриногена у плазми и доводи се у везу са ризиком од артеријске тром-

бозе, али резултати још нису усаглашени [4]. Полиморфизам *Thr-312Ala* повећава стабилност коагулума, али је без утицаја на повећање ризика од АИМ, мада су у другој студији доказани краће преживљавање после исхемијског шлога и повећан ризик од емболије плућа [23].

ЗНАЧАЈ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА У НАСТАНКУ ВЕНСКОГ ТРОМБОЕМБОЛИЗМА

У настанку ВТЕ врло важну улогу има коагулациони систем крви [4, 24]. Значајан помак у изучавању улоге тромбофилије у ВТЕ почиње открићем резистенције на активирани протеин *C (APCR)* [25, 26]. Овај поремећај настаје због замене гуанина 1691 са аденином (*G1691A*) у гену за фактор *V (FV)* [27]. Новонастали ген кодира синтезу *FV* тип *Leiden* у коме је аргинин 506 (*Arg506*) замењен глутамином (*Gln506*). Ова мутација не утиче на његову активацију под дејством тромбина, али онемогућава његову брзу протеолитну деактивацију под дејством *APC*, који не делује на *Arg506*, али ни и на *Gln506*. Због тога се протеолиза одвија спорим путем преко *Arg306*, која је у присуству протеина *S* убрзана 20 пута [28]. То објашњава зашто је *FV Leiden* и поред резистенције на *APC* релативно умерен фактор ризика за настанак тромбозе [29]. Међутим, 5% резистенције на *APC* није изазвано *FV Leiden* [29].

Фактор *V Leiden* се јавља код око 5% опште популације (2-15%), чешћи је код белаца у северној него јужној Европи и наслеђује се аутозомно доминантно [30]. Мутација је настала пре 20.000-30.000 година, односно после одвајања Африканаца и Монгола, што објашњава изузетну реткост овог фактора код код црне и жуте расе [4]. Доказан је код 20-50% болесника са првом венском тромбозом и код више од 50% чланова фамилије болесника са тромбофилијом. Хетерозиготи имају 4-8 пута већи ризик од ВТЕ, а хомозиготи 80 пута [30]. Хетерозиготи су у мањем, а хомозиготи у сличном ризику од настанка тромбозе, као и хетерозиготи са недостатком антитромбина (*AT*), протеина *C (PC)* или протеина *S (PS)* [24]. Време настанка прве тромбозе се не разликује између ове четири групе, али болесници са *FV Leiden* имају лакше симптоме са суперфицијалним тромбофлебитисом [31].

Тромбозе дубоких вена (ТДВ) су најчешће код болесника са *FV Leiden*, па чак и церебралне венске тромбозе [4]. Тромбоза ретко настаје пре петнаесте године, а затим се учесталост повећава за 2-4% годишње, тако да до педесете године 50-70% болесника оболи од тромбозе. Код половине болесника са *FV Leiden* тромбоза настаје спонтано, а код осталих је удружена са хируршком интервенцијом, имобилизацијом, повредом, трудноћом, порођајем или применом оралних контрацептива. Код 60% тромбоза у трудноћи доказан је *FV Leiden*. Орални контрацептиви повећавају ризик од тромбозе за 3,8 пута, а у комбинацији са *FV Leiden* 28,5 пута [24]. У трансплантацији кука, где постоји висок ризик за настанак тромбозе (26%), није доказано значајно повећање ВТЕ код болесника са *FV Leiden* (31%).

Улога *FV Leiden* у артеријској тромбози није јасна и бројне студије нису доказале његову улогу [32]. Међутим, нека истраживања су показала да делује синергистички са другим факторима ризика. Код жена од 23 до 44 године *FV Leiden* не повећава ризик од АИМ, али ако је удружен са пушењем, ризик се повећава 30 пута у односу на непушаче. Код гојазних особа повећава ризик са четири на 19 пута, а код особа са хиперхолестеролемијом, хипертензијом или дијабетесом повећава ризик са пет на 22 пута [33]. Код болесника са резистенцијом на *АРС* код којих није доказан полиморфизам *G1691A* доказани су полиморфизми у којима је *Arg306* замењен треонином (*Thr306* – тип Кембриј) или глицином (*Gly306* – тип Хонгконг). Према досадашњим подацима, они су благи фактори ризика за настанак тромбозе [34].

ПОЛИМОРФИЗАМ ПРОТРОМБИНА

Генска мутација протромбина у којој је гуанин 20210 замењен аденином доводи до синтезе протромбина *G20210A (FII20210)*, који има повећану протромбинску активност за око 30% и удружен је са ризиком од ВТЕ, укључујући и тромбозе церебралних вена [35]. Јавља се код 2,3% здравих људи (0,7-4%) и 6,2% болесника са тромбозом, чешће у јужној него у северној Европи и релативно је чест у односу на недостатак *АТ*, *РС* или *PS* [30]. Ризик од ВТЕ је код хетерозигота повећан за око три пута (1,7-2,8), што га чини благим фактором ризика и не повећава ризик рекурентних тромбоза [4, 30].

Улога протромбина *G20210A* као фактора ризика за настанак артеријске тромбозе није дефинитивно доказана, али у садејству са другим факторима ризика, као што је пушење код младих или хормонска терапија у менопаузи, значајно доприноси настанку АИМ [36]. Недавно је доказана нова мутација протромбина *A1991G* која доводи до благог повећања протромбина, али не повећава ризик за настанак ВТЕ.

ФАКТОРИ КОАГУЛАЦИЈЕ

Главни покретач коагулације је ткивни фактор (*TF*). Описано је шест полиморфизама гена за *TF*, али није доказано да повећава ризик од тромбозе [37]. Повећана концентрација *FVII*, *FVIII* или *FIX* представља факторе ризика за настанак тромбозе, међутим, нису откривени полиморфизми гена који би могли да се доведу у везу са тромбозом. Повећање концентрације *FVIII* веће од 150% јавља се код 11% опште популације и код 25% болесника са тромбозом. Релативан ризик за венске и артеријске тромбозе је пет (2-11) [38-40, 19]. Међутим, *FVIII* је реактант акутне фазе и снижен је у крвној групи 0 [4, 20]. Недостатак *FXII* је код 10% болесника удружен са тромбозом [24]. Полиморфизам гена за *FXIII (Val34Leu, Pro564Leu, Val650Ile, Glu651Gln, Arg37-Gly38)* код хомозигота има парадоксално заштитни анти тромбозни ефекат од артеријских и венских тромбоза, што није доказано у свим студијама [41].

ПРИРОДНИ АНТИКОАГУЛАНСИ

Активирана коагулација и стварање фибриног коагулума је под контролом инхибитора ткивног пута коагулације (*TFPI*), антитромбина и протеина *C* са кофактором протеином *S*. Полиморфизам гена за *TFPI (Val-264Met)*, који утиче на његово снижење у циркулацији, као и за остале (*Pro151Leu, Val-264Met, T384C* на ексону 4 и *C-33T* на интрону 7) не представља фактор ризика за настанак тромбозе [42]. Постоје подаци да је полиморфизам *Pro151Leu* фактор ризика за ВТЕ, али то касније није потврђено [43].

Генетски поремећаји *АТ*, *РС* и *PS* су врло ретки у општој популацији, али значајно повећавају ризик за ВТЕ. Међутим, њихова улога у настанку артеријских тромбоза није разјашњена, осим код деце код које недостатак природног антикоагуланта може допринети настанку исхемијског шлога, мада и ту постоје неслагања [44, 45].

Бројне мутације доводе до недостатка *АТ*, али њихова идентификација није клинички неопходна. Преваленција недостатка *АТ* тип *I* у општој популацији је 0,02%, а код болесника са ВТЕ 2-4%. Релативан ризик од настанка тромбозе је 8-12. Недостатак *АТ* се наслеђује аутозомно доминантно и представља тежи поремећај у односу на недостатак *РС* или *PS* јер код већине тромбоза настаје у 25. години. Релативан ризик за ВТЕ је већи код квантитативног (тип *I*) него код квалитативног поремећаја *АТ* (тип *II*), који захвата место везивање за хепарин (мањи ризик) или реактивно место (већи ризик), а исти је као код плеоморфног типа који се одликује квантитативним недостатком и смањеним афинитетом за хепарин [30].

Урођени недостатак протеина *C* јавља се код 0,2-0,3% опште популације и код 3% болесника са ВТЕ. Разликују се квантитативни (тип *I*) и квалитативни недостатак *РС* (тип *II*). Релативан ризик за настанак тромбозе је 7-10. Наслеђује се аутозомно доминантно, као и недостатак *PS* [30].

Преваленција за урођени недостатак протеина *C* у општој популацији није позната, али се претпоставља да је 1-2%, а међу болесницима са ВТЕ око 3% [30]. Синтезише се у јетри, ендотелу и мегакариоцитима у присуству витамина *K*. Учествује као кофактор у активацији *РС*. Везује се за комплемент *C4bp* и тако везан не учествује у коагулацији. Разликује се квантитативни (тип *I*), квалитативни (тип *II*) недостатак *PS* и тип *III* са нормалним укупним али смањеним слободним *PS*. Релативан ризик за ВТЕ је 8-10 [24].

Тромбомодулин (*TM*) је функционални рецептор за тромбин. Тромбин везивањем за *TM* губи прокоагулантну функцију и активира *РС* [4]. Описан је полиморфизам гена за *TM* код болесника са венском тромбозом, међутим, било је тешко одредити његов значај у настанку тромбозе јер нема једноставних тестова који би доказали да полиморфизам мења функцију [46]. Полиморфизам *Ala-455Val* је удружен са 6,1 пут већим ризиком од коронарне болести код црнаца, а нема значајног утицаја код белаца [47]. Полиморфизам гена за *TM G127A* који кодира замену *Ala25Thr* удружен је са 6,5 пута већим ризиком од АИМ код особа млађих од 50 година у присуству других фактора ризика (пушење, метаболички фак-

тори) [48]. Међутим, две студије нису потврдиле улогу *Ala25Thr* у настанку коронарне болести и исхемијског шлога [49]. Полиморфизам *TM G33A* утиче на ниво солубилног *TM* и повећава 1,8 пута ризик од коронарне болести код Кинеза и 2,4 пута од каротидне атеросклерозе код особа млађих од 60 година [50].

ЧИНИОЦИ ФИБРИНОЛИЗНОГ СИСТЕМА

Фибринолизни систем има важну улогу у реканализацији тромбозираних крвних судова. Ткивни активатор плазминогена (*t-PA*) подстиче стварање плазмине и веровало се да недостатак *t-PA* може бити фактор ризика за настанак тромбозе [4]. Међутим, недавно је показано да повећање *t-PA* парадоксално повећава ризик од коронарне тромбозе [51]. Описани су бројни полиморфизми гена за *t-PA*, од чега три имају утицај на ослобађање *t-PA*, а остале варијације су без утицаја [52].

Повећање концентрације инхибитора активатора плазминогена тип 1 (*PAI-1*) се доводи у везу с артеријском тромбозом. Полиморфизам *4G/5G* утиче на ниво *PAI-1* а *4G* значајно повећава *PAI-1* у плазми. Резултати испитивања полиморфизма *4G/5G* као фактора ризика за настанак артеријске тромбозе су у супротности. Метаанализа је показала да је алел *4G* удружен са 1,2 пута већим ризиком од АИМ [53].

ОСТАЛИ ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗМИ КОЈИ ДОПРИНОСЕ НАСТАНКУ ТРОМБОЗЕ

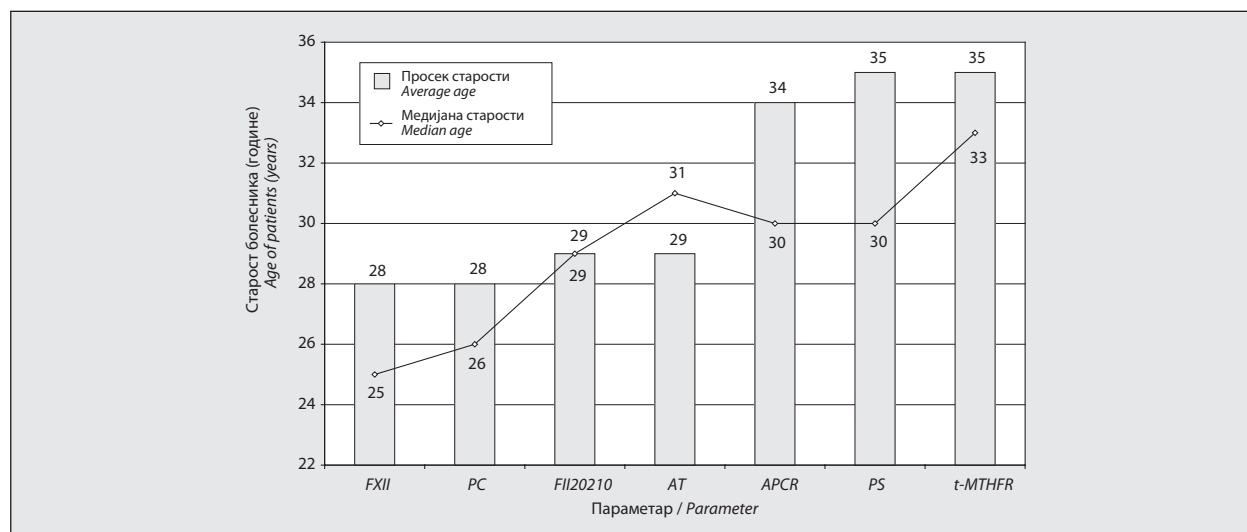
Хиперхомоцистеинемија представља фактор ризика за настанак артеријске и венске тромбозе и јавља се код 50% болесника млађих од 30 година. Ензим метилентетрахидрофолат-редуктаза (*MTHFR*) је неопходан у синтези деривата фолата за ремети-

лацију хомоцистеина у метионин. Његов недостатак доводи до хомоцистинурије, која је врло ретка, и описано је око 50 случајева. Испољава се неуролошким и васкуларним симптомима и тромбозом. Полиморфизам *C677T* гена за *MTHFR* доводи до синтезе термолабилне *MTHFR (t-MTHFR)*, у којој је валин 222 замењен аланином, што доводи до смањења активности, а у условима смањеног уноса фолата настаје хиперхомоцистеинемија [54]. Преваленција хетерозигота за *t-MTHFR* је 35-50%, а хомозигота 12%. Дијета сиромашна витамином *B* и ренална дисфункција такође могу довести до хиперхомоцистеинемије. Надокнада фолата представља добар терапијски избор [4].

Хиперхомоцистеинемија се јавља код 30% ТДВ и 37% артеријских тромбоза. Метаанализа 27 студија, која је обухватила 2.500 болесника с коронарним, 900 болесника са цереброваскуларним и 700 с обољењем периферних артерија, показала је да је релативан ризик за коронарну тромбозу 1,7, за цереброваскуларна обољења 2, за тромбозу периферних артерија 6,8, за прву ТДВ 2,5 и за рекурентне ТДВ 3,1. Хиперхомоцистеинемија представља исти ризик као хиперхолестеролемија или пушење, а мањи од хипертензије [24].

КЛИНИЧКЕ ОДЛИКЕ БОЛЕСНИКА СА ТРОМБОФИЛИЈОМ

У току наших досадашњих испитивања урођена тромбофилија је доказана код 101 болесника са тромбозом, код 15 жена са понављаним спонтаним побачајима и код 25 чланова породица болесника са доказаном тромбофилијом. Од укупно 141 особе са доказаном тромбофилијом 77 су биле жене (55%) а 64 мушкарци (45%). Резистенције на *APC*, недостатак *FXII* и лупус антикоагуланс (*LA*) мерени су стандардним

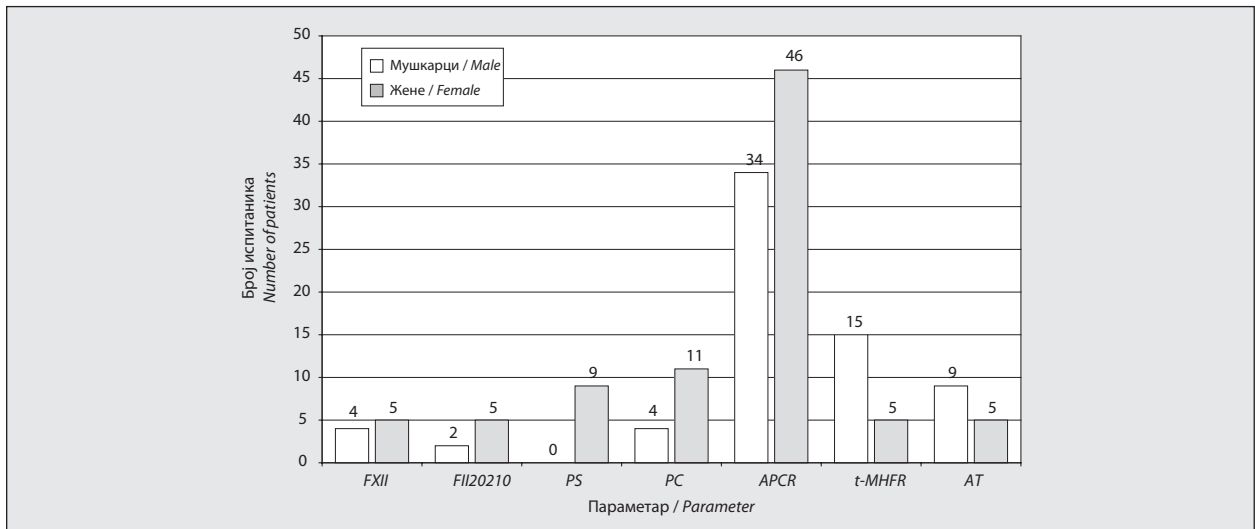


ГРАФИКОН 1. Просечна старост и медијана старости при настанку прве тромбозе код болесника с урођеном тромбофилијом.

FXII – недостатак фактора *XII*; *PC* – недостатак протеина *C*; *FII20210* – протромбин 20210; *AT* – недостатак антиромбина; *APCR* – резистенција на активирани протеин *C*; *PS* – недостатак протеина *S*; *t-MTHFR* – термолабилна метилентетрахидрофолат-редуктаза

GRAPH 1. Average and median ages of patients with thrombophilia when they first develop thromboses.

FXII – factor *XII* deficiency; *PC* – protein *C* deficiency; *FII20210* – prothrombin 20210; *AT* – antithrombin deficiency; *APCR* – activated protein *C* resistance; *PS* – protein *S* deficiency; *t-MTHFR* – methylentetrahydrofolate reductase



ГРАФИКОН 2. Заступљеност болесника са тромбофилијом по полу.

FXII – недостатак фактора XII; FII20210 – протромбин 20210; PS – недостатак протеина S; PC – недостатак протеина C; APCR – резистенција на активирани протеин C; t-MTHFR – теролабилна метилентетрахидрофолат-редуктаза; AT – недостатак антиромбина

FIGURE 2. Number of patients distributed by thrombophilia and sex.

FXII – factor XII deficiency; FII20210 – prothrombin 20210; PS – protein S deficiency; PC – protein C deficiency; APCR – activated protein C resistance; t-MTHFR – methyltetrahydrofolate reductase; AT – antithrombin deficiency

коагулационим методима, антикардиолипинска антитела и $\beta 2$ -гликопротеин I мерени су ELISA тестом, AT, PC и PS методом са хромогеним супстратом, а FV Leiden, протромбин 20210 и t-MTHFR помоћу PCR метода.

Просечна старост болесника при настанку тромбозе у појединим групама са урођеном тромбофилијом (Графикон 1) била је између 28 и 35 година, а медијана старости од 25 до 33 године, и ту није било значајне разлике, што су уочили и други аутори [31]. Тромбоза је пре тридесете године била чешћа код болесника са недостатком AT, PC и FXII, а после тридесете код недостатка PS, резистенције на APC и t-MTHFR. Недостатак PC, PS, FXII, мутација протромбина 20210 и резистенција на APC били су чешћи код жена, а t-MTHFR и недостатак AT код мушкараца (Графикон 2).

Код 141 испитаника доказане су укупно 154 урођене тромбофилије (недостатак AT код 14, PC код 15, PS код девет, FXII код девет, APCR код 80, FII20210 код седам, t-MTHFR код 20 испитаника), што значи да су код 13 болесника (9%) доказане две урођене тромбофилије (APCR удужен са недостатком PC код једног, са PS код пет, са t-MTHFR код пет и са недостатком FXII код једног, удруженост FII20210 и t-MTHFR код једног испитаника). Такође, код 11 болесника с једном урођеном тромбофилијом (шест са t-MTHFR, три са APCR, једног са недостатком FXII и једног са FII20210) и код два болесника са две урођене тромбофилије (удруженост FII20210 са t-MTHFR и APCR са недостатком PS) доказана су антифосфолипидна антитела (лупус антикоагуланс, односно антикардиолипинска антитела), која представљају важан фактор ризика за настанак тромбозе [55]. Код шест болесника (4,2%) с урођеном тромбофилијом и тромбозом дијагностикован је малигнитет (есенцијална тромбоцитенија, Хочкинов и не-Хочкинов

лимфом, хронична лимфоцитна леукемија, сарком и миом утеруса).

При постављању дијагнозе тромбофилије, код 43% болесника је дијагностикована једна тромбоза, код 33% две тромбозе, а код 24 три тромбозе или више њих. Просечан број тромбоза по болеснику био је 1,7 код мутације протромбина 20210, 1,9 код t-MTHFR, недостатка AT и APCR, 2,2 код недостатка PS, 2,3 код недостатка FXII и 2,6 код недостатка PC. Рецидивантна тромбоза је настала код 55% болесника с једном и код 64% болесника са две или више тромбофилија и та разлика није значајна.

Код 101 болесника с урођеном тромбофилијом било је укупно 200 тромбоза, и то 90% венских и 10% артеријских. Најчешће артеријске тромбозе су биле АИМ, исхемијски шлог и транзиторни исхемијски атак (ТИА) по шест и две тромбозе поплитеалне артерије. Венске тромбозе су биле заступљене са 79 илијакофеморалних тромбоза, 31 плућном емболијом, 24 потколених тромбоза, девет аксилобрахијалних, осам мезентеријских, седам тромбоза сафене магне, шест доње шупље вене, пет линеалних тромбоза, четири портне тромбозе, две у десном срцу, две сагиталног синуса и три тромбозе AV фистуле. Код 72 испитаника тромбоза је била удружена са трудноћом код 15 и порођајем код 11 болесница, повредом код девет, операцијом код осам, пушењем код седам, имобилизацијом код шест, инфекцијом код пет, малигнитетом код шест, контрацептивима код два болесника, побачајем код једне болеснице, хемодијализом код једног и обуставом антикоагулантне терапије код такође једног болесника.

Петнаест од 77 жена (19%) са доказаном урођеном тромбофилијом укупно су имале 42 спонтане побачаја (просек 2,8). Жене с једном тромбофилијом имале су у просеку два и по спонтане побачаја, а жене са две тромбофилије пет спонтаних побачаја. Код осам

трудница са тромбофилијом (једна са *APCR+PS+AFA*, две са *APCR*, две са недостатком *PC* и три са недостатком *PS*), које су претходно имале 18 спонтаних побачаја, применом антикоагулантне профилаксе са хепарином мале молекулске масе у току трудноће и постпартално од четири недеље до шест недеља, остварено је девет успешних трудноћа (код једне са дефицитом *PC* два порођаја) [56].

Од 25 чланова породице болесника са тромбофилијом код којих је доказана тромбофилија у току петогодишњег периода надгледања, тромбоза је спонтано настала само код једне особе (недостатак *AT*). Код три болесника је примењена примарна антикоагулантна профилакса у току припреме за операцију или после тешке повреде, и оне су протекле без тромбозе.

ДИСКУСИЈА

Значај откривања тромбофилије је не само у сагледавању патофизиолошког механизма тромбоза, већ и у примени примарне и секундарне антиромбозне профилаксе. Примарна антикоагулантна профилакса код болесника са тромбофилијом се препоручује код стања високог ризика од ВТЕ, као што је припрема за хируршку или акушерску интервенцију, у току тешке повреде или имобилизације.

Удруженост урођене тромбофилије са спољним или стеченим факторима ризика значајно доприноси настанку тромбозе, што указује на неопходност престанка пушења, обуставу примене оралних контрацептива, избегавање дуготрајног мировања (седење више од три сата или лежање више од три дана) и на неопходност свакодневне умерене физичке активности (ходање најмање један сат). Код болесника са *t-MTHFR* неопходан је адекватан унос фолата у исхрани или његова надокнада.

Доказивање тромбофилије код болесника са тромбозом је важно ради процене трајања секундарне антикоагулантне терапије и интензитета лечења ради превенције поновног настанка тромбозе. Хомозиготи за *FV Leiden* и *t-MTHFR*, као и болесници са недостатком *AT*, *PC* и *PS* имају повећану склоност ка поновном јављању тромбозе (релативан ризик је 2,5), што захтева примену антикоагулантне терапије после прве венске тромбозе до годину дана или неограничено дуго [57]. Хетерозиготи за *FV Leiden* или са протромбином 20210 имају мањи ризик ка настанку тромбозе (релативан ризик је 1,4), што захтева антикоагулантно лечење до шест месеци [57]. Код болесника са две тромбозе или више њих, антикоагулантна терапија траје неограничено [24, 58].

Мада постоје опречни подаци о утицају тромбофилије на губитак трудноће, изванредан број студија је, укључујући и наше резултате, показао да примена хепарина мале молекулске масе може допринети успешном исходу трудноће [59]. Има података који показују да тромбофилија два пута повећава ризик од губитка трудноће, интраутеринске ретардације плода, тешке прееклампсије и настанка *HELLP* синдрома (*Hemolysis, Elevated Liver Enzims Low Platelet* – хемолиза, повишени ензими јетре и тромбоцитопе-

нија) [57, 60]. Механизам ових поремећаја се доводи у везу са микроваскуларном тромбозом плацентних крвних судова и инсуфицијенцијом плаценте [57].

У трудноћи и пуерперијуму ВТЕ је водећи узрок морбидитета и морталитета и ризик је пет пута већи него код жена сличног старосног доба које нису трудне. Код трудница са тромбофилијом је повећан ризик од ВТЕ за 3,4-15,2 пута. Код жена са претходном тромбозом је 3,5 пута већи ризик од настанка тромбозе у трудноћи у односу на период без трудноће, међутим, не препоручује се рутинска антикоагулантна терапија [59].

Често се поставља питање кога и када треба подвргнути испитивањима којима се открива тромбофилија? На тромбофилију треба посумњати ако тромбоза настане код особа млађих од 45 година, код рекурентних тромбоза, идиопатских тромбоза или тромбоза после безначајне провокације, код удружене артеријске и венске тромбозе или тромбозе на необичном месту, код тромбозе у трудноћи, пуерперијуму, у току хормонске терапије, код рецидивних побачаја, неонатусне пурпуре фулминанс, некрозе коже у току лечења кумарина, код чланова породице болесника са доказаном тромбофилијом. Испитивање треба урадити пре настанка или што касније од јављања акутне тромбозе, без антикоагулантне терапије, ван трудноће, искључити запаљењска стања и болести јетре.

ЗАКЉУЧАК

Досадашња испитивања су показала да се генски полиморфизам може наћи код 60-70% болесника са ВТЕ. Још није са сигурношћу доказан директан утицај генског полиморфизма на настанак артеријске тромбозе осим код млађих особа с удруженим стеченим факторима ризика. Неопходна су даља испитивања урођених и стечених тромбофилија, као и кластера ризика за настанак тромбозе ради боље процене индивидуалног ризика.

ЛИТЕРАТУРА

- Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):1-6.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.
- Makris M, Rosendaal FR, Preston FE. Familial thrombophilia: genetic risk factors and management. *J Inter Med* 1997; 242(Suppl 740):9-15.
- Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95:1517-32.
- Winkelmann BR, Hager J. Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence. *Pharmacogenomics* 2000; 1:73-94.
- Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 2001; 115:491-506.
- Elezović I, Prostran M. Испитивање тромбocитне агрегације и фибринолитичког система крви у болесника са коронарном бољешћу. *Медицински подмладак* 1972; (3-4):34-8.
- Elezović I. Тромбocитна агрегација у болесника са акутним инфарктом миокарда. *Медицински подмладак* 1975; 1:7-11.
- Elezović I. Испитивање активности тромбocитног von Willebrandо-

- vog faktora u bolesnika sa juvenilnim dijabetesom [magistarska teza]. Beograd: Medicinski fakultet; 1981.
10. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531-9.
 11. Li CQ, Garner SE, Smethurst PA, Wardell MR, Ouwehand WH. Threonine-145/methionine-145 variants of baculovirus produced recombinant ligand binding domain of GPIIb/IIIa express HPA-2 epitopes and show equal binding of von Willebrand factor. *Blood* 2000; 95:205-11.
 12. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves G. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PIA²): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 1999; 105:664-6.
 13. Aleksić N, Juneja H, Folsom AR, et al. Platelet PI (A2) allele and incidence of coronary heart disease: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2000; 12:1901-5.
 14. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa P1^A and GP IIb variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1998; 18:1124-31.
 15. Reiner AP, Schwartz SM, Prasanna NK, et al. Platelet glycoprotein IIb polymorphism, traditional risk factors and non-fatal myocardial infarction in young women. *Br J Haematol* 2001; 112:632-6.
 16. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nigent DJ. Hereditary variation in platelet integrins $\alpha_2\beta_1$ density is associated with two silent polymorphisms in the α_2 coding sequence. *Blood* 1997; 89:1939-43.
 17. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C₈₇₃T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999; 93:2449-53.
 18. Croft SA, Hampton KK, Sorrell JA, et al. The PG1a C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol* 1999; 106:771-6.
 19. Tracy TA, Arnold AM, Ettinger W, Fried I, Meilahn E, Savage P. The relationship of fibrinogen and factor VII and VIII to incident cardiovascular disease and death in the elderly: results from the cardiovascular health study. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19:1776-83.
 20. Meade TW, Cooper JA, Stirling Y, Howarth DJ, Ruddock V, Miller GJ. Factor VIII, ABO blood group, and the incidence of ischaemic heart disease. *Br J Haematol* 1994; 88:601-7.
 21. Bitondo RD, Cameron CL, Daly ME et al. The -1185 A/G and -1051 G/A dimorphisms in the von Willebrand factor gene promoter and risk of myocardial infarction. *Br J Haematol* 2001; 115:701-6.
 22. Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. An update. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19:1368-77.
 23. Carter AM, Catto AJ, Grant PJ. Association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with post stroke mortality in subjects with atrial fibrillation. *Circulation* 1999; 99:2423-6.
 24. Elezović I. Urodene i stečene trombofilije. *Bilt Za Transf* 1999; 45:16-25.
 25. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342:1503-6.
 26. Lane DA, Villegas A, Preston R. Predicting the risk of thrombosis with haemostasis gene polymorphisms: fact and fancies. *Haematol J* 2002; 3(Suppl 2):179-82.
 27. Dahlback B. New Molecular Insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C causing by Arg⁵⁰⁶ to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74:139-48.
 28. Rosing J, Tans G. Coagulation factor V: An old star shines again. *Thromb Haemost* 1997; 78:427-33.
 29. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor V R⁵⁰⁶Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78:438-88.
 30. Walker ID, Greaves M, Preston FE. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114:512-28.
 31. Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, et al. APC resistance carries a lower risk of thrombosis in comparison to the other inherited thrombophilic defects. *Thromb Haemost* 1997; 1(Suppl):373-9.
 32. Reiner AP, Koppel H, Brodmann M, et al. Factor II G20210A and FV G1691A gene mutation and peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost* 2000; 83:20-2.
 33. Rosendaal ER, Siskovic DS, Schwartz SM, et al. Factor V Leiden (resistant to activated protein C) increase risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 89:2817-21.
 34. Norstrom E, Thorelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood* 2002; (100):524-30.
 35. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-703.
 36. Psaty BM, Smith NI, Lemaitre RN, et al. Hormone replacement therapy, prothrombotic mutation and risk of incident nonfatal myocardial infarction in postmenstrual women. *J Am Med Assoc* 2001; 285:906-13.
 37. Arnaud E, Barbalat V, Nicaud V, et al. Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20:892-8.
 38. Iacovello L, Castelnuovo A, de Knijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *New Engl J Med* 1998; 338:79-85.
 39. Rosendaal ER. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83:1-2.
 40. Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. *Br J Haematol* 2001; 115:507-13.
 41. Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, et al. Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2000; 85:67-71.
 42. Moatti D, Seknadji P, Galand C, et al. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene in patients with acute coronary syndromes and in healthy subjects: impact of the V264M substitution on plasma levels of TFI. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19:862-9.
 43. Moatti D, Meirhaeghe A, Ollivier V, Bauters C, Amouyel P, de Prost D. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor gene and risk of restenosis after coronary angioplasty. *Blood Coagul and Fibrinol* 2001; 12:317-23.
 44. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, et al. Lipoprotein (a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylentetrahydrofolate reductase gene are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94:3678-82.
 45. Reiner AP, Siskovic DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factor and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2000; 86:584-95.
 46. Le Flem L, Mennen I, Aubry ML, et al. Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis and varicose veins. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21:445-51.
 47. Wu KK, Aleksić N, Ahn C, Folsom AR, Juneja H, ARIC. Thrombomodulin Ala-455Val polymorphisms and risk of coronary heart disease. *Circulation* 2001; 103:1386-9.
 48. Doggen CJM, Kunz G, Rosendaal FR, et al. A mutation in thrombomodulin gene, 127G to A coding Ala-25Thr and risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost* 1998; 80:743-8.
 49. Warner D, Catto A, Kunz G, Ireland H, Grant PJ, Lane DA. The thrombomodulin gene mutation G(127)→A (Ala-25Thr) and cerebrovascular disease. *Cerebrovascular disease* 2000; 10:359-63.
 50. Li YH, Chen CH, Yeh PS, et al. Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; 154:713-9.
 51. Thomson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate P, van de Loo JC. Hemostatic factor and the risk of myocardial infarction or sudden death inpatients with angina pectoris. *New Engl J Med* 1995; 332:635-41.
 52. Ladenvall P, Wall U, Jern S, Jern C. Identification of eight novel single-nucleotide polymorphisms at human tissue-type plasminogen activator (t-PA) locus: association with vascular t-PA release in vivo. *Thromb Haemost* 2000; 84:150-5.
 53. Iacovello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphisms of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:1029-30.
 54. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylentetrahydrofolate reductase. *Thromb Haemost* 1997; 78:523-6.
 55. Elezović I, Miljić P, Antunović P, Suvajdžić N, Sretenović M, Čolović M. The management of antiphospholipid syndrome. *Vojnosanit Pregl* 1998; 55(Suppl 2):41-6.
 56. Elezović I, Miljić P, Đorđević V, et al. Thrombosis and other clinical

- cal manifestations of hereditary thrombophilia. Abstract. Haematologica 2005; 90(Suppl 2):131.
57. Weitz IJ, Middeldorp S, Geerts W, Heit AJ. Thrombophilia and New Anticoagulant Drugs. Hematology 2004;424-38.
58. Elezović I. Antikoagulantni lekovi. In: Kažić T, Ostojić M, editors. Klinička kardiovaskularna farmakologija. IV izdanje. Beograd: Integra; 2004; 339-64.
59. Pabinger I, Vormittag R. Thrombophilia and complication of pregnancy. Hematology – The European hematology association education program 2005; 1(1):231-4.
60. Dunjić R, Elezović I, Rakić S, Miković Z, Lončar-Stevanović H. Protein S u trudnoći. Srp Arh Celok Lek 2002; 130(1-2):36-7.

ROLE OF GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF THROMBOSES

Ivo ELEZOVIĆ

Institute of Haematology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

ABSTRACT

The development of thromboses is one of the most common causes of morbidity and mortality in the Western world. The perturbation of haemostasis is the central event in the pathogenesis of all thromboses. Most patients with thromboses have no recognisable associated haemostatic disorders. However, some patients do manifest hereditary hypercoagulable states, which contribute to the development of thromboses as well as other clinical manifestations, such as miscarriages and foetal complications. The major determinants of thrombosis include both environmental influences and genetic factors. Transient or long-lasting environmental influences may play important roles in arterial and venous thromboses. Haemostatic perturbation may also be genetically determined and exert a life-long influence. Specific mutations of genes predisposed to thrombosis, such as deficiency of antithrombin, protein C, or protein S, are found in relatively small number of families. In the absence of genetic deficiencies, thrombosis occurs in the older population, largely within the context of marked environmental influences (such as surgery, obesity, and malignancy). In contrast, familial thrombosis, associated with gene mutation, is associated with a younger age. The general importance of gene polymorphism was established after the recognition of activated protein C resistance (APCR) due to gene

polymorphism G1691A in factor V (Factor V Leiden). This single gene defect increases the risk of venous thrombosis, without interaction with other genetic or environmental risk factors. The development of APCR led to many other investigations of gene polymorphism, such as prothrombin 20210, thrombomodulin, factors in the coagulation and fibrinolytic system, glycoproteins of platelet membranes, as well as polymorphism C677T of methylene tetrahydrofolate reductase. The number of potential genetic risk factors for occlusive thrombotic disease has increased significantly. Most of these gene polymorphisms increase the risk of venous thrombosis but there is no strong evidence of their influence as far as arterial thrombosis is concerned.

Key words: thrombophilia; gene polymorphism; mutation; arterial thrombosis; venous thrombosis

Ivo ELEZOVIĆ
 Institut za hematologiju
 Klinički centar Srbije
 Dr Koste Todorovića 2, 11000 Beograd
 Tel.: 011 363 5563
 Faks: 011 306 5112
 E-mail: ivoelez@eunet.yu