

Katarina Plaustainer¹

Kazalci aktivirane koagulacije pri bolnikih z vensko trombozo in mutacijo v genu za protrombin in faktor V²

Indicators of Activated Coagulation in Patients with Venous Thrombosis and Mutation in the Genes for Prothrombin and Factor V²

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: venska tromboza – genetska, protrombin – genetika, faktor V – genetika, točkovna mutacija

Mutacija v genu za protrombin (G20120A) in mutacija v genu za faktor V (G1691A), ki se odraža kot neodzivnost na aktivirani protein C (nAPC), sta pomembna dejavnika tveganja za tromboembolijo, ker sta domnevno povezani z aktivirano koagulacijo. Pogostnost obeh mutacij kaže geografsko značilno razporeditev, pogostnost mutacije za protrombin pa med bolniki z vensko trombozo v Sloveniji še ni znana. Namen naloge je bil določiti pogostnost mutacije v genu za protrombin pri bolnikih z vensko trombozo ter preučiti možno povezavo med to mutacijo ter mutacijo v genu za faktor V s povišanimi koncentracijami kazalcev aktivirane koagulacije: peptidom, ki nastane ob aktivaciji protrombina v trombin (F1+2), kompleksom med trombinom in antitrombinom (TAT) ter razgradnimi produkti premreženega fibrina (D-dimeri). Postavili smo hipotezo, da je pogostnost mutacije v protrombinu podobna pogostnosti pri populacijah sosednjih držav. Mutaciji v protrombinu in faktorju V sta povezani s povišanimi koncentracijami kazalcev aktivirane koagulacije pri bolnikih z vensko trombozo. V retrospektivno raziskavo smo vključili 88 bolnikov, ki so preboleli vensko trombozo. Iz vzorcev krvi smo izolirali DNK in analizirali gen za protrombin. Mutacijo za faktor V smo določili z nAPC. Bolnikom smo izmerili koncentracije kazalcev aktivirane koagulacije (F1+2, TAT in D-dimere) z encimsko imunskimi preiskavami. Pogostnost mutacije za protrombin je bila 6,8 %, nAPC 23,3 % in obeh hkrati 3,5 %, kar je v skladu s pogostnostjo obeh mutacij pri bolnikih z vensko trombozo pri populacijah sosednjih držav. Razlike med koncentracijami kazalcev aktivirane koagulacije med bolniki z različnimi genotipi niso bile statistično značilne. Pri skupini bolnikov z mutacijo v genu za protrombin ali brez nje smo določili F1+2: 1,5 proti 1,0 nmol/L ($p = 0,21$), TAT: 6,3 proti 2,2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,16$) in D-dimeri: 45 proti 37 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,88$). Med skupinama z nAPC in brez nje F1+2: 1,2 proti 1,0 nmol/L ($p = 0,95$), TAT: 2,2 proti 2,2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,86$), D-dimeri: 26 proti 82 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,08$). Med skupinami z obema mutacijama ali brez mutacij F1+2: 1,4 proti 1,0 nmol/L ($p = 0,66$), TAT: 2,4 proti 2,2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,83$), D-dimeri: 21 proti 39 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,28$, vse vrednosti so mediane). Niti posamezni mutaciji niti kombinacija obeh mutacij nista bili povezani s povišanimi koncentracijami kazalcev aktivirane koagulacije v krvi.

¹ Katarina Plaustainer, štud. med., Klinični oddelek za žilne bolezni, SPS Interna Klinika, Klinični center, Riharjeva 24, 1000 Ljubljana.

² Delo je bilo pripravljeno leta 2001 v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom.

ABSTRACT

KEY WORDS: venous thrombosis – genetics, prothrombin – genetics, factor V – genetics, point mutation

Mutation in the prothrombin gene (G20210A) and in the factor V gene (G1691A), which is manifested as resistance to the activated protein C (nAPC), are important risk factors for thromboembolic disease because they are presumably connected with activated coagulation. The prevalence of both mutations shows a significant geographical distribution. The prevalence of prothrombin mutation among patients with deep vein thrombosis is not yet known in Slovenia. The aim of our research was to determine the prevalence of prothrombin gene mutation in patients with deep vein thrombosis and to study the possible connection between this mutation, mutation in factor V and higher concentrations of markers of activated coagulation: a peptide released from prothrombin during its activation to thrombin (F1+2), a complex between thrombin and antithrombin (TAT) and degradation products of cross-linked fibrin (D-dimers). Our research was based on the hypothesis that the prevalence of prothrombin mutation is similar to that in neighboring populations. Prothrombin mutation and mutation in factor V are connected to higher concentrations of markers of activated coagulation in patients with deep vein thrombosis. 88 patients with deep vein thrombosis were included in the retrospective study. DNA was isolated and DNA analysis was performed. Mutation in the factor V gene was determined as nAPC. The concentrations of markers of activated coagulation were measured using enzyme immunoassays. The prevalence of prothrombin gene mutation was 6.8%, that of nAPC was 23.3% and that of both was 3.5%, which is in concordance with the prevalence of both mutations in patients with deep vein thrombosis in neighboring populations. The differences in the concentrations of F1+2, TAT and D-dimers among patients with different genotypes were not statistically significant. F1+2 was measured in patients with or without prothrombin mutation: 1.5 vs. 1.0 nmol/L ($p = 0.21$), TAT: 6.3 vs. 2.2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.16$) and D-dimers: 45 vs. 37 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.88$). F1+2 in patients with and without nAPC was as follows: 1.2 vs. 1.0 nmol/L ($p = 0.95$), TAT: 2.2 vs. 2.2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.86$), D-dimers: 26 vs. 82 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.08$). In patients with both mutations or without any mutation it was: 1.4 vs. 1.0 nmol/L ($p = 0.66$), TAT: 2.4 vs. 2.2 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.83$), D-dimers: 21 vs. 39 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.28$, all values are medians). Neither of the two mutations nor the combination of both influenced the concentrations of markers of activated coagulation.

UVOD

Splošno

Venska tromboza je pogosta bolezen z ocenjenim pojavljanjem 1/1000 oseb letno. V slovenskem merilu to pomeni, da vsako leto zbolijo za vensko trombozo približno 2000 ljudi. Vzroke za nastanek venske tromboze delimo na prirojene (stalno prisotne) in pridobljene (prehodno prisotne). Med pridobljene štejemo antifosfolipidni sindrom, mieloproliferativne bolezni, malignome, operacijske posege in poškodbe, hormonsko nadomestno zdravljenje, oralno kontracepcijo, nosečnost, porod, puerperij, nepokretnost, starost ter prejšnje tromboze. Prirojene vzroki pa so lahko pomanjkanje antitrombina, pomanjkanje proteina C,

pomanjkanje proteina S, mutacija G1691A v genu za faktor V, ki se odraža kot neodzivnost na aktivirani protein C in mutacija G20210A – gena za protrombin (1).

S pomanjkanjem antitrombina, proteina C in proteina S, ki so bili opisani v preteklih 30 letih in katerih prevalenca je zelo nizka, lahko razložimo nastanek venske tromboze le pri zelo majhnem številu bolnikov. V devetdesetih letih pa sta bili opisani dve sorazmerno pogosti mutaciji: nAPC oziroma mutacija G1691A v koagulacijskem faktorju V in mutacija G20210A v genu za protrombin.

nAPC je bila opisana prvič v začetku 90 let (2, 3). Je najpogostejši prirojeni dejavnik tveganja za vensko trombozo in je prisotna pri 20–60 % bolnikov, med splošnim prebivalstvom pa se pojavlja pri 2–10 %. nAPC

kaže značilno geografsko razporeditev in je pogostejša na severu Evrope. Prisotnost nAPC pomeni 5–10-krat (heterozigoti) oziroma 80-krat (homozigoti) večje tveganje za razvoj venske tromboze (4). V skoraj vseh primerih je vzrok nAPC točkasta mutacija v genu za faktor V (G1691A), ki povzroči spremembo vezavnega mesta za aktiviran protein C, ki inaktivira faktor V. Posledica mutacije je bistveno počasnejša inaktivacija faktorja V (5), kar vodi v hitrejšo strjevanje krvi.

Mutacija G20210A v genu za protrombin, ki jo povezujemo s pojavljanjem venske tromboze, je bila odkrita leta 1996 (6). Tudi za to mutacijo je znano, da se geografsko zelo spreminja. Med prebivalci južne Evrope je pogostnost mutacije med zdravimi 6,5 %, med bolniki z vensko trombozo pa 17,2 % (7), medtem ko je pogostnost na severu Evrope 1,8 % med zdravimi (8) in 5 % med bolniki z vensko trombozo (9). Pri bolnikih z vensko trombozo v Sloveniji pogostnost te mutacije doslej še ni znana. Tveganje za nastanek venske tromboze je pri ljudeh, heterozigotih za to mutacijo, 3-krat večje kot pri osebah brez nje (7).

Za motnje, ki vodijo v povečano nagnjenost k trombozi (trombofilijo), je torej značilno, da je dinamično ravnovesje med nastankom in razgradnjo fibrina nagnjeno v smer nastajanja fibrina (aktivacija koagulacije), zato so bolniki izpostavljeni večjemu tveganju za trombozo. Stopnjo aktivacije koagulacije lahko merimo z določanjem nekaterih molekul, ki se sproščajo ob aktivaciji koagulacije. To so t. i. kazalci aktivirane koagulacije: protrombinski fragment 1+2 (F1+2), kompleks trombin-antitrombin (TAT) in specifični razgradni produkt premreženega fibrina D-dimer.

Molekularna genetika protrombina

Protrombin je krvna beljakovina, predhodnik trombina, ključnega encima v procesu strjevanja krvi. Nastaja v jetrih pod vplivom vitamina K kot enoverižni glikoprotein z molekulsko maso 72000.

Gen za protrombin se nahaja na kromosomu 11 na mestu 11p11-q12 v bližini centromere. Sestavljen je iz 14 eksonov in 13 vmesnih sekvenc (intronov) s 5' neprevedenim UT-področjem in 3' UT-področjem, ki verjetno

igrata pomembni vlogi pri uravnavanju ekspresije gena (10).

G20210A-mutacija je točkovna mutacija na 3' neprevedenem koncu gena, kjer pride do zamenjave gvanina za adenin. Tako so možni genotipi gena za protrombin GG, GA in AA. Mutacija posledično vodi v višje koncentracije protrombina v plazmi, čeprav je vzrok tega povečanja še neznan, možno pa bi bilo, da je posledica stabilnejše informacijske RNK (angl. mRNA) ali pospešenega prepisovanja gena. Višje koncentracije protrombina vodijo v povečano tvorbo trombina.

nAPC oziroma mutacija G1691A v genu za faktor V

Aktivni faktor V ni encim, temveč igra v koagulaciji krvi pomembno vlogo kot kofaktor pri aktivaciji faktorja X, ki pretvarja protrombin v trombin. Neaktivni faktor V aktivira v povratni zanki trombin, inaktivira pa ga aktivirani protein C (APC), ki tako deluje antikoagulantno. Vežava APC na faktor V poteka na točno določenem mestu, zato spremembe v aminokislinskem zaporedju na tem mestu otežijo vežavo. Motnje v vežavi APC in s tem inaktivaciji faktorja V imajo za posledico neuravnoteženo nastajanje trombina in posledično hiperkoagulabilnost (11).

Gen, ki kodira faktor V je na 1. kromosomu na mestu 1q21-q25 (12). Pri mutaciji G1691A pride do zamenjave gvanozina z adenozinom na mestu 1691 v eksonu 10 in s tem do zamenjave arginina z glutaminom na aminokislinskem mestu 506 faktorja V (faktor V R/Q506) (13). Možni genotipi so GG, AG in AA.

nAPC merimo s koagulacijskimi preiskavami, najbolj pogosto z aktiviranim delnim tromboplastinskim časom v prisotnosti in odsotnosti APC. Pri osebah z nAPC APC ne podaljša strjevanja plazme, saj je inaktivacija faktorja V upočasnjena.

Kazalci aktivirane koagulacije

Ob aktivaciji koagulacije se le majhen del (<1 %) protrombina spremeni v aktivirani trombin, tega pa hitro nevtralizira njegov inhibitor antitrombin. Zato z neposrednimi metodami merjenja trombina ne bi mogli izmeriti njegovega nastajanja (14). Za posredno merjenje

nastalega trombina in s tem aktiviranega strjevanja krvi uporabljamo t.i. kazalce aktivirane koagulacije. Dva odražata koncentracijo trombina v plazmi. To sta protrombinski delec 1+2 (F1+2) in trombin-antitrombin kompleks (TAT) (15). Tretji odraža količino nastalega in razgrajenega fibrinskega čepa (D-dimeri).

Protrombinski delec 1+2 (F1+2) se sprosti iz protrombina ob aktivaciji protrombina v trombin, in sicer na dva načina (14). Prva možnost je, da se iz protrombina sprosti F1+2, iz pretrombina 2 pa kasneje nastane trombin. Po drugi poti pa se protrombin spremeni v meizotrombin, ki vsebuje F1+2 in ki se kasneje spremeni v trombin, ob tem pa se sprosti F1+2. Ob povečanem tvorjenju trombina tako nastaja tudi več F1+2. Višje koncentracije pa pomenijo stanje povečanega strjevanja krvi – hiperkoagulabilnosti in jih ugotavljamo pri bolnikih s trombozo, pljučnimi embolizmi, diseminirano intravaskularno koagulacijo, malignimi boleznimi, trombofilijo, pri miokardnem infarktu, nosečnosti (15).

Trombin se po nastanku pojavlja v plazmi pretežno v svoji inaktivirani obliki, v kompleksu proteinaza/inhibitor, kar pomeni da je vezan na antitrombin v kompleksu trombin-antitrombin (TAT). TAT tako odraža funkcionalno stanje koagulacijskega sistema. Pri bolnikih s trombozo in pljučnim embolizmom je koncentracija TAT značilno povišana v akutnem stanju, zato ob kliničnem sumu na pljučno embolijo normalne vrednosti TAT le-to izključujejo. Tudi pri bolnikih z akutnim miokardnim infarktom, z diseminirano intravaskularno koagulacijo, pri malignomih in med trombolitičnim zdravljenjem najdemo višje koncentracije tega kompleksa (16).

Fibrin je po aktivaciji koagulacijskega sistema stabiliziran tako, da faktor XIII ustvari prečne vezi med dvema sosednjima molekulama fibrinogena. Ker se sočasno aktivira tudi fibrinolitični sistem z aktivacijo plazminogena v plazmin, se fibrinogen razgrajuje v razgradne produkte, med katerimi so najbolj specifični D-dimeri. Prisotnost D-dimerov vedno dokazuje aktivno fibrinolizo. Koncentracija v plazmi se zviša po formaciji čepa v žilnem sistemu, zato so D-dimeri zelo občutljivi in srednje specifični kazalci tromboembolijskih bolezni (17, 18).

NAMEN IN HIPOTEZA

Cilj raziskave je bil opredeliti prevalenco mutacije G20210A v genu za protrombin v slovenski populaciji bolnikov z vensko trombozo, saj teh podatkov za Slovenijo še ni. Prav tako smo želeli opredeliti pogostnost nAPC. Želeli smo preveriti hipotezo, da je pri bolnikih s prebolelo objektivno dokazano vensko trombozo in z mutacijo G20210A v genu za protrombin, nAPC ali z obema mutacijama koagulacija aktivirana tudi v kroničnem obdobju bolezni v primerjavi z bolniki brez teh genetskih sprememb.

METODE

Preiskovanci

V raziskavi smo zajeli 88 bolnikov z vensko trombozo. Vključitveni kriterij je bila ultrazvočno dokazana prva ali druga venska tromboza. Za izključitveni kriterij smo vzeli malignom, ki je zelo močan sprožitveni dejavnik za trombozo. Bolnikov, ki so preboleli več kot dve venski trombozi, nismo vključili v raziskavo, ker stalno prejemajo antikoagulacijsko zdravljenje, ki znižuje raven kazalcev aktivirane koagulacije. Bolniki niso bili v sorodu. Med preiskovanci je bilo 43 moških in 45 žensk, stari so bili med 20 in 89 (povprečno 54) let.

Iz anamnestičnih podatkov bolnikov o dejavnih tveganja za vensko trombozo smo povzeli, da je bilo 35 preiskovancev glede na anamnezo brez dejavnikov tveganja (operacija, nepokretnost, potovanje, nosečnost, porod, splav, nadomestno hormonsko zdravljenje, hormonska kontracepcija, intravenski kateter, kronična vnetna bolezen črevesja), ostali pa so jih imeli, in sicer 34 bolnikov enega, 16 bolnikov dva in 1 bolnik tri.

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo. Bolniki so sodelovali na podlagi pisnega privoljenja.

Način dela

Za določitev kazalcev aktivirane koagulacije, nAPC ter za izolacijo DNK smo preiskovancem odvzeli kri enkrat, povprečno 9 (od 6 do 15) mesecev po zadnji venski trombozi.

Gen za protrombin smo analizirali s pomočjo naprave za avtomatsko določanje mutacij in polimorfizmov (LightCycler™, Roche). Naprava deluje na principu zelo hitrega spreminjanja temperature v kombinaciji z mikrovolumskim fluorimetrom z visoko kvalitetno optiko za zaznavanje fluorescence in s tem pomnoževanja DNK (19).

Bistvo analize je verižna polimerazna reakcija (angl. *polymerase chain reaction* – PCR). To je postopek, pri katerem s pomočjo spreminjanja temperatur in z encimom polimerazo Taq pomnožimo želeni del DNK. Reakcija ima tri faze. V prvi poteka pri visoki temperaturi denaturacija vzorčne DNK, v drugi z nižanjem temperature dosežemo, da se na želena mesta vzorčne DNA pripnejo začetni oligonukleotidi. Ti v tretji fazi predstavljajo osnovo za podaljševanje z encimom Taq-polimerazo. Na ta način iz majhne osnovne količine DNK dobimo 2^n kopij želenega odseka (n je število ponovitev ciklov). Kot reakcijske epruvete smo uporabljali steklene kapilare, pri katerih je razmerje med površino in volumnom veliko, kar omogoča visoko efektivno prevajanje toplote in s tem hitro spreminjanje temperature. Naprava lahko tako izvede 30 reakcij PCR v 20 minutah.

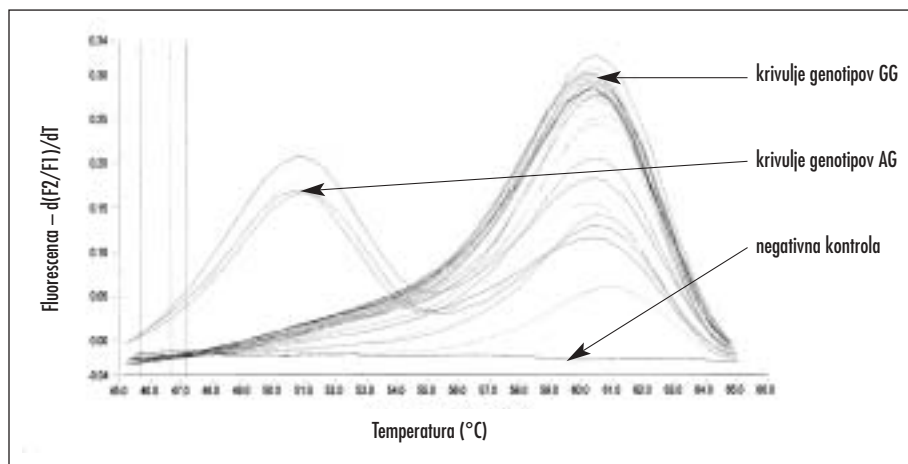
Fluorimeter je izvor svetlobe; ta se filtrira in fokusira na vrh kapilare. Fluorescirajoča svetloba iz vzorca se nato zbira skozi isto lečo, prehaja skozi dikroično zrcalo, se primerno filtrira in zbira na fotohibride, ki zbirajo podatke.

Za samo analizo gena je treba določiti tako imenovano krivuljo raztapljanja (angl. *melting curve*). Osnova te določitve je dejstvo, da se DNK raztopi pri neki značilni temperaturi (T_m), ki je določena kot temperatura, pri kateri je polovica dvojnovažne strukture DNK razdvojena. Temperatura raztapljanja DNK je odvisna predvsem od nukleotidne sestave. DNK z veliko baznimi pari GC se tako raztopi pri višji temperaturi kot DNK z veliko baznimi pari AT.

Naprava zazna različne signale iz vzorcev in tako omogoča razlikovanje med različnimi produkti PCR. Program izriše krivuljo za vsako vzorčno DNK, mi pa na podlagi pozitivne in negativne kontrole in podatka o izgledu krivulje za homo- oz. heterozigote določimo genotipe vzorčnih DNK.

Za zaznavo mutacije z napravo smo uporabili originalen kit (angl. *LightCycler – Prothrombin (G20210A) Mutation Detection Kit, Roche*). S krivuljo raztapljanja smo prepoznali mutacije.

Za faktor V Leiden nismo opravljali genske analize, pač pa smo na prisotnost mutacije sklepali iz rezultatov za nAPC. Uporabili smo koagulacijsko metodo, pri kateri merimo razmerje med aktiviranim delnim tromboplastinskim časom plazme z dodanim aktiviranim proteinom C in plazme brez aktiviranega proteina C. Uporabili smo spremenjeno metodo, pri kateri vzorce plazme predhodno razredčimo s plazmo brez faktorja V in tako zmanj-



Slika 1. Primeri krivulj raztapljanja gena za protrombin.

šamo vpliv pomanjkanja drugih koagulacijskih faktorjev na rezultat nAPC. Božič in sodelavci so ugotovili, da je ta spremenjena metoda stoodstotno občutljiva in specifična za prepoznavanje mutacije v genu za faktor V Leiden (20). Pri bolnikih z razmerjem med strjevanjem plazme z APC in brez APC, enakim ali manjšim od 1,9, smo menili, da imajo nAPC oziroma mutacijo v faktorju V, pri bolnikih z razmerjem, večjim kot 1,9, pa da nimajo nAPC oziroma mutacije v faktorju V (20).

Koncentracije kazalcev aktivirane koagulacije v plazmi smo določili z encimsko imunskimi preiskavami s tovarniško pripravljenimi reagenti.

F1+2 smo določali z Enzygnost® F1+2 micro (Dade/Behring), ki je encimsko imunska preiskava za *in vitro* določanje človeških F1+2. Osnovana je na principu »sendvič« tehnike. Med prvo inkubacijo se antigen F1+2 v vzorcu veže na protitelesa proti F1+2, ki so pritrjena na površini mikrotitrne plošče. Po dodatku vzorca ploščo speremo in dodamo protitelesa, konjugirana s peroksidazo, ki se v naslednji inkubacijski stopnji vežejo na prosta vezavna mesta na F1+2. Prebitek konjugiranih protiteles nato odstranimo s spiranjem in določimo samo encimsko aktivnost, ki je vezana na površino plošče. Encimsko reakcijo med vodikovim peroksidom in kromogenom prekinemo z dodajanjem razredčene kisline. Gostota barve, ki nastane, je sorazmerna koncentraciji F1+2 in jo določimo fotometrično. Koncentracijo F1+2 odčitamo iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s plazmo z znanimi koncentracijami F1+2. Referenčna vrednost je 0,4–1,1 nmol/L.

Tudi TAT in D-dimere smo določali po enakem principu imunske encimske preiskave (Enzygnost® TAT micro, Dade/Behring in Enzygnost® D-dimer micro, Dade/Behring). Referenčna vrednost za TAT je 1,0–4,4 µg/L, za D-dimere pa 4–78 ng/mL.

Statistične metode

Normalnost porazdelitve spremenljivk smo testirali s testom Kolmogorov-Smirnov. Ker se kazalci aktivirane koagulacije niso razporejali normalno, smo jih prikazali z mediano in razponom med spodnjim in zgornjim kvartilom, razlike in povezave z ostalimi spremenljivkami pa smo računali z neparametrijskimi testi.

Za testiranje razlik med dvema skupinama smo uporabili test Mann-Whitney U, pri računanju razlik med več skupinami z različnimi genotipi pa smo uporabili Kruskal-Wallisovo analizo variance. Povezanost med spremenljivkami smo ocenjevali s Spearmanovo formulo korelacije in izrazili s korelacijskim koeficientom R.

Pri iskanju razlik in povezav smo imeli $p < 0,05$ za statistično značilen. Rezultate smo analizirali s pomočjo statističnega programskega paketa Statistica (Stat Soft Inc. 1995, ZDA).

REZULTATI

Pogostnost mutacij

Protrombin

Od 88 analiziranih DNK smo odkrili mutacijo v genu za protrombin pri 6 preiskovancih. Vsi so bili heterozigoti z genotipom AG. Homozigotnosti AA nismo našli pri nobenem. Pri 82 bolnikih smo ugotovili normalen GG genotip. Pogostnost mutacije G20210A je bila 6,8%. V tej skupini so bili 4 moški in 2 ženski.

nAPC

Podatke o nAPC smo imeli za 86 bolnikov. 20 bolnikov je imelo nAPC, iz česar smo sklepali na mutacijo v faktorju V in izračunali pogostnost 23,3%. Od tega je bilo 9 moških in 11 žensk.

Protrombin in nAPC

Kombinacija mutacije v genu za protrombin in nAPC je bila prisotna pri 3 od 86 preiskovancev (pogostnost 3,5%), pri 2 moških in eni ženski. Iz tega podatka sledi, da so imeli 3 preiskovanci samo mutacijo v genu za protrombin in da je bilo 17 takih, ki so imeli samo nAPC.

Kazalci aktivirane koagulacije in povezava z mutacijami

Za analize teh povezav smo vzeli manjši vzorec bolnikov, ker pri vseh 88 niso bile opravljene vse laboratorijske preiskave. Določitve kazalcev aktivirane koagulacije so bile opravljene pri 78 bolnikih.

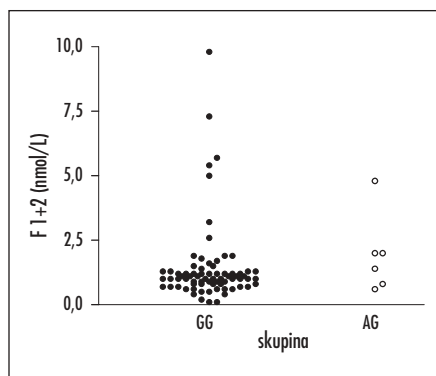
Mutacija v genu za protrombin

Koncentracije kazalcev aktivirane koagulacije se med genotipi niso statistično značilno razlikovale (tabela 1).

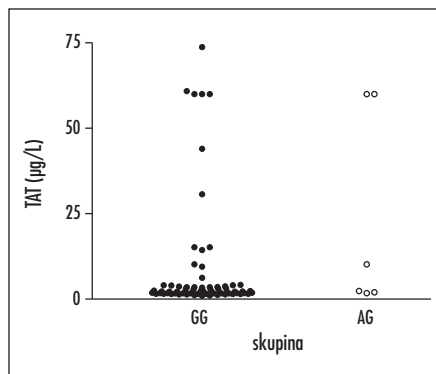
Tabela 1. Kazalci aktivirane koagulacije pri genotipih gena za protrombin. Prikazani so z medianami in razponom med 1. in 3. kvartilom.

Genotip	F1+2 (nmol/L)	TAT (μ g/L)	D-dimeri (μ g/L)
GG	1,0	2,2	37
N = 72	0,8–1,3	1,7–3,8	24–65
AG	1,5	6,3	45
N = 6	0,8–4,8	2,0–60,0	21–53
p	0,21	0,16	0,88

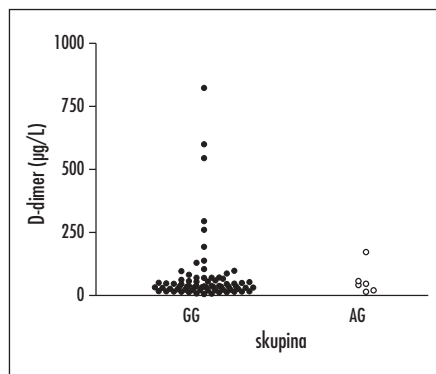
Kazalci aktivirane koagulacije pri posameznih bolnikih z mutacijo v genu za protrombin ali brez nje so prikazani v slikah 2–4.



Slika 2. Koncentracije F1+2 (nmol/L) pri genotipu GG in AG za protrombin.



Slika 3. Koncentracije TAT (μ g/L) pri genotipu GG in AG za protrombin.



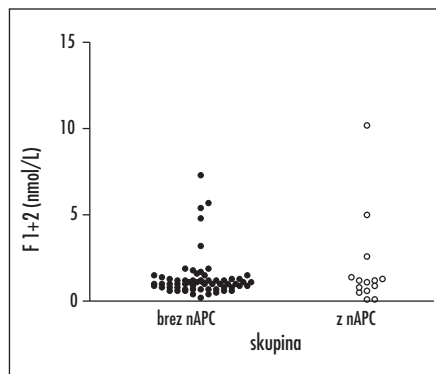
Slika 4. Koncentracije D-dimerov (μ g/L) pri genotipu GG in AG za protrombin.

nAPC

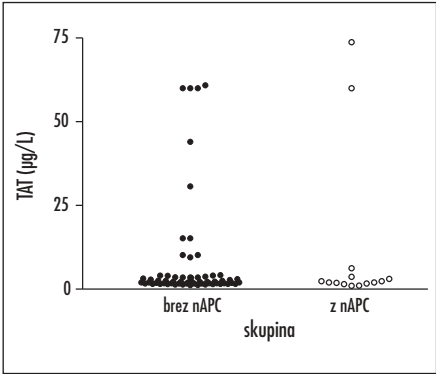
Podatke o nAPC smo imeli za 76 bolnikov. Tudi v tem primeru se koncentracije kazalcev aktivirane koagulacije med bolniki z nAPC ali brez nAPC niso pomembno razlikovale (tabela 2). Še najbližje značilni razliki so bile vrednosti za D-dimere, ki so bile nekoliko nižje v skupini z nAPC ($p = 0,08$).

Tabela 2. Kazalci aktivirane koagulacije pri bolnikih z nAPC in brez nAPC, prikazani z medianami in razponom med 1. in 3. kvartilom.

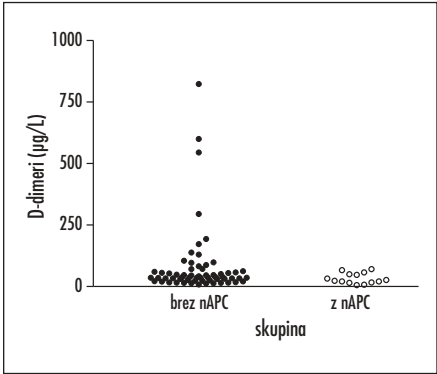
Genotip	F1+2 (nmol/L)	TAT (μ g/L)	D-dimeri (μ g/L)
brez nAPC	1,0	2,2	82
N = 62	0,8–1,3	1,7–3,8	25–63
z nAPC	1,2	2,2	26
N = 14	0,6–1,4	1,7–3,7	17–50
p	0,95	0,86	0,08



Slika 5. Koncentracije F1+2 (nmol/L) pri bolnikih z nAPC in brez nAPC.



Slika 6. Koncentracije TAT (µg/L) pri bolnikih z nAPC in brez nAPC.



Slika 7. Koncentracije D-dimerov (µg/L) pri bolnikih z nAPC in brez nAPC.

Kazalci aktivirane koagulacije pri posameznih bolnikih z nAPC ali brez nAPC so prikazani v slikah 5–7.

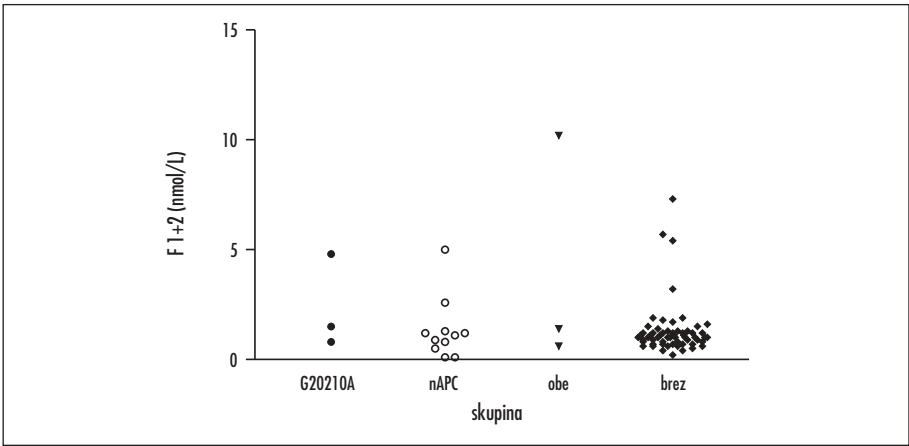
Mutacija v genu za protrombin in nAPC

Razlike med nivoji kazalcev aktivirane koagulacije med različnimi skupinami z eno samo mutacijo ali z obema mutacijama niso bile statistično značilne (tabela 3). Pomembnost razlik smo izračunali s Kruskal-Wallisovo analizo variance.

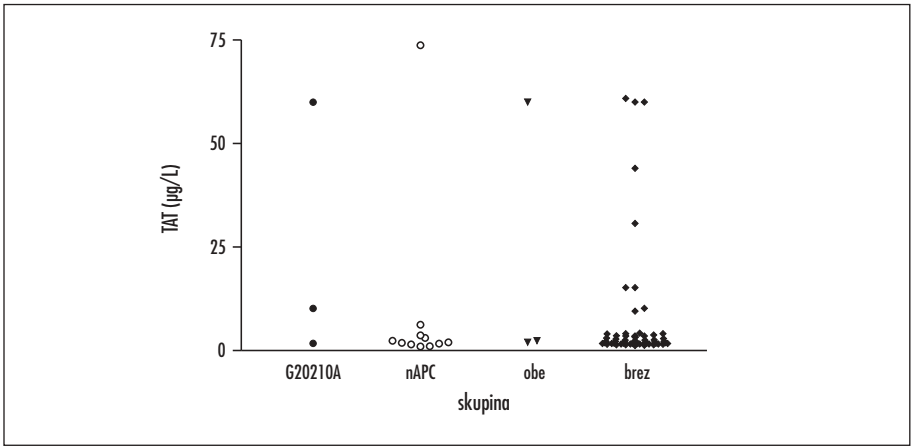
Kazalci aktivirane koagulacije za posamezne bolnike iz različnih skupin mutacij so prikazani na slikah 8–10.

Tabela 3. Kazalci aktivirane koagulacije pri različnih kombinacijah mutacije G20210A in nAPC; mediane in razpon med 1. in 3. kvartilom.

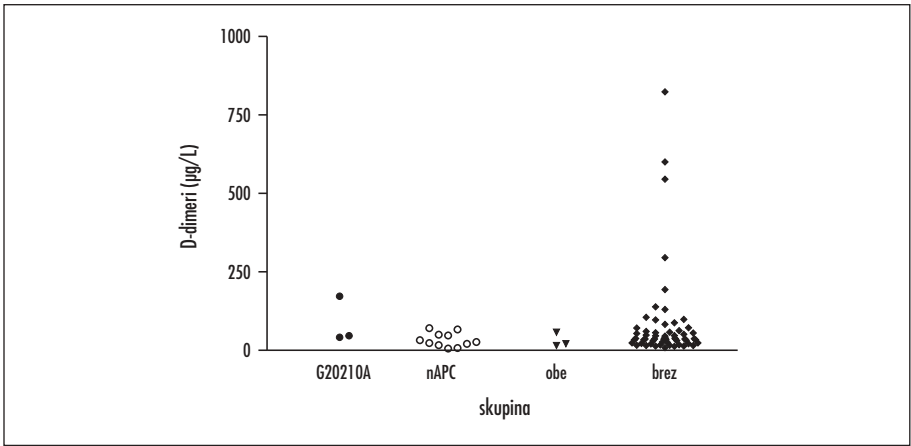
Genotip	F1+2 (nmol/L)	TAT (µg/L)	D-dimeri (µg/L)
brez mutacije	1,0	2,2	39
N = 59	0,8–1,3	1,7–3,6	24–72
samo G20210A	1,5	10,2	87
N = 3	–	–	–
samo nAPC	1,1	2,0	27
N = 11	0,5–1,3	1,5–3,7	17–50
G20210A in nAPC	1,4	2,4	21
N = 3	–	–	–
p	0,66	0,83	0,28



Slika 8. Koncentracije F1+2 (nmol/L) pri različnih genotipih.



Slika 9. Koncentracije TAT (µg/L) pri različnih genotipih.



Slika 10. Koncentracije D-dimerov (µg/L) pri različnih genotipih.

Ugotovili smo, da so bili bolniki z eno ali drugo mutacijo povprečno pomembno mlajši kot tisti brez mutacije (58 proti 42 let, $p < 0,001$). Spearmanova neparametrška formula korelacije med kazalci aktivirane koagulacije in starostjo je pokazala pomembno povezavo med starostjo in vsemi tremi kazalci aktivirane koagulacije (tabela 4).

Da bi zmanjšali vpliv starosti na kazalce aktivirane koagulacije, smo izključili bolnike, starejše od 60 let, in tako dobili skupini bolnikov, ki se nista razlikovali v starosti (41 proti 38 let, $p = 0,56$). Kljub temu nismo dobili pomembnih razlik v kazalcih aktivirane koagulacije med bolniki z mutacijama in brez njih ($F1+2\ p = 0,24$; $TAT\ p = 0,33$; $D\text{-dimeri}\ p = 0,73$).

Tabela 4. Povezava med kazalci aktivirane koagulacije in starostjo (starostni razpon 20–89 let).

	R	p
F1+2	0,27	0,015
TAT	0,36	0,001
D-DIMERI	0,46	<0,001

RAZPRAVLJANJE

Rezultati pričujoče raziskave so pokazali, da je bila pogostnost mutacije G20210A v genu za protrombin med bolniki s prebolelo trombozo skoraj 7 %. S tem je bilo ugotovljeno, da

je pogostnost te mutacije podobna pogostnosti pri dveh populacijah, ki sta geografsko najbližji Sloveniji (Avstrijci in Italijani). V raziskavi smo ugotovili tudi 23 % pogostnost nAPC, ki je bila nekoliko višja od pogostnosti, ki smo jo ugotovili v predhodni raziskavi [16 %, (21)] in višja od pogostnosti pri omenjenih sosednjih populacijah (22, 23). Mutaciji v genu za protrombin in mutacija G1691A v genu za faktor V oziroma nAPC, nista bili povezani s pomembno povišanimi koncentracijami kazalcev aktivirane koagulacije (F1+2, TAT in D-dimeri), zato nismo mogli potrditi postavke o aktivirani koagulaciji pri bolnikih s temi genetskimi spremembami v kroničnem obdobju bolezni.

Za nastanek venske tromboze pogosto ne zadošča le ena mutacija, pač pa se ji mora po stopničastem modelu tveganja, ki ga je predlagal Rosendaal, pridružiti še en ali več dejavnikov tveganja (imobilizacija, oralna kontracepcija, malignom, itd.), da dosežemo prag, pri katerem nastane venska tromboza (24). Zato so osebe z eno samo mutacijo pogosto asimptomatske. Po omenjenem modelu se v primeru dveh mutacij ali sočasnega pojavljanja ene mutacije in pridobljenega dejavnika (na primer operacije) tveganje poveča, ker smo že od začetka na višji in venski trombozi bližji stopnički. Potrdilo temu modelu so rezultati raziskave Peternelove in sodelavcev o družinah bolnikov z vensko trombozo in prirojeno trombofilijo. Ugotovili so, da med sorodniki prvega kolena z nAPC nihče ni utrpel venske tromboze, bolniki z nAPC in vensko trombozo pa so bili trikrat pogostejše izpostavljeni dejavnikom tveganja kot njihovi asimptomatski sorodniki (25). Zato je pri bolnikih z vensko trombozo pomembna genetska analiza, saj lahko na podlagi le-te bolnike v primeru, kadar so zavestno izpostavljeni kateremu od dejavnikov tveganja (operacija, nosečnost itd.), zaščitimo z antikoagulacijskimi zdravili in preprečimo nastanek venske tromboze.

Pogostnost mutacije v genu za protrombin je bila pri naši skupini bolnikov s prebolelo vensko trombozo 6,8 %. Če upoštevamo rezultate nekaterih drugih raziskav, npr. raziskave v Avstriji, kjer je bila pogostnost mutacije med bolniki 4,5 % (22) in italijanskih raziskav (pogostnosti 5 % in 4,3 %) (23, 26), lahko

rečemo, da je naš rezultat v skladu z geografsko razporeditvijo pogostnosti te mutacije. Španska raziskava je namreč pokazala 17,2 % pogostnost med bolniki z vensko trombozo (7), tajska raziskava pa je pokazala, da med bolniki ni bilo niti enega nosilca mutacije v genu za protrombin (27).

Pogostnost nAPC smo izračunali pri manjšem številu bolnikov in dobili rezultat 23,3 %. V raziskavi med bolniki z vensko trombozo v Sloveniji so ugotovili 16 % pogostnost mutacije v genu za faktor V (21). Raziskava Kosterja in sodelavcev iz leta 1993 (28) je pokazala podobno pogostnost med bolniki in sicer 20 %. V prej omenjeni avstrijski (22) raziskavi je bila ta pogostnost izračunana na 12 %, v italijanski (23) pa le na 3 %.

Pogostnost prisotnosti obeh mutacij pri istem bolniku je bila 3,5 %. V podobni raziskavi je Margaglione s sodelavci ugotovil pogostnost sočasne mutacije v genu za protrombin in mutacije v genu za faktor V pri 4,1 % preiskovancev (29).

Razlike v pogostnostih mutacije v protrombinu in faktorju V oziroma nAPC pogosto ne moremo pripisati samo značilni geografski razporeditvi mutacij, temveč tudi izboru bolnikov. Tako je, na primer, več avtorjev ugotovilo, da je pogostnost obeh mutacij bistveno višja pri mladih ženskah, ki so prebolele vensko trombozo med nosečnostjo in v puerperiju kot pri zaporednih, neizbranih bolnikih z vensko trombozo (30–32). Na pogostnost pa pogosto vpliva tudi število opazovanih oseb. Vpliv števila je pomemben predvsem pri raziskavah, v katerih je vključeno sto ali manj oseb.

Pri bolnikih z vensko trombozo lahko aktivnost trombotičnega procesa in učinkovitost antikoagulacijskega zdravljenja merimo s kazalci aktivirane koagulacije (33). Kazalci so ob akutni trombozi povišani pri večini bolnikov in se po uvedbi antikoagulacijskega zdravljenja hitro znižajo. Predpostavili smo, da bodo pri bolnikih s prebolelo vensko trombozo in mutacijo v genu za protrombin in faktor V kazalci višji kot pri bolnikih brez teh mutacij tudi v kroničnem obdobju bolezni. Vendar pa niti pri bolnikih z mutacijo v genu za protrombin niti pri bolnikih z nAPC nismo ugotovili višjih koncentracij kazalcev aktivirane koagulacije glede na bolnike brez te mutacije (tabeli 1 in 2). Glede mutacije

v genu za protrombin se naši rezultati skladajo z majhno raziskavo, ki je pokazala, da srednje vrednosti F1+2 v plazmi bolnikov heterozigotov, nosilcev mutacije G20210A v genu za protrombin, niso bile pomembno povečane. Pač pa so ugotovili pomembno višje koncentracije pri bolnikih homozigotih, nosilcih A20210A-mutacije v istem genu (34). O koncentracijah TAT in D-dimerov v povezavi z mutacijo G20210A v genu za protrombin pa ni podatkov.

Naši rezultati, ki so pokazali, da kazalci aktivirane koagulacije niso bili povečani pri bolnikih z mutacijo v genu za faktor V, nasprotujejo rezultatom raziskave Simionija in sodelavcev. Ti so ugotovili, da imajo bolniki z vensko trombozo in z mutacijo v genu za faktor V povišane vrednosti F1+2 in TAT (35). Raziskava Mercurijeve in sodelavcev pa je obravnavala tako bolnike z vensko trombozo kot tudi zdrave preiskovance, ki so imeli mutacijo v genu za faktor V. V obeh skupinah so bile koncentracije F1+2 višje kot pri preiskovancih brez mutacije (36). V naši raziskavi povišanih koncentracij kazalcev aktivirane koagulacije nismo ugotovili niti pri nosilcih obeh mutacij (tabela 3), kar je v nasprotju z rezultati Bauerja s sodelavci, ki je pomembno zvišane koncentracije F1+2 izmeril celo pri asimptomatskih nosilcih obeh mutacij (8).

Iz naših rezultatov o ravni kazalcev aktivirane koagulacije pri različnih genotipih bolnikov z vensko trombozo smo sklepali, da koagulacija v kroničnem obdobju ni aktivirana, in s tem zavrnilo delovno hipotezo. Na rezultate je imelo nedvomno vpliv sorazmerno majhno število preiskovancev. Vzrok za to, da nismo ugotovili razlik med skupinama z mutacijo in brez nje, lahko iščemo tudi v metodoloških problemih merjenja koncentracij kazalcev aktivirane koagulacije. Nekateri avtorji namreč navajajo, da je ob odvzemu krvi za meritve kazalcev aktivirane koagulacije krvi treba dodati poleg natrijevega citrata še dodatno antikoagulantno sredstvo (na primer heparin), da *in vitro* popolnoma zavremo koagulacijo (37, 38). V nasprotnem primeru lahko v vzorcih dodatno nastajajo kazalci aktivirane koagulacije, kar vodi do lažno visokih koncentracij kazalcev. Pomemben je tudi sam način odvzema krvi, ki mora biti odvzeta zelo previdno. Poročali pa so tudi, da se ob

pravilnih postopkih s krvjo koncentracije TAT v plazmi, shranjeni na -80°C , v treh mesecih znižajo (39).

Poudariti moramo tudi to, da so bili naši bolniki v kroničnem obdobju bolezní, vsaj šest mesecev po preboleli venski trombozi. Če bi merili kazalce aktivirane koagulacije v akutni fazi bolezní, bi morda izračunali razlike med tistimi z mutacijama in tistimi brez njiju. Zato bi bilo zanimivo raziskati te povezave pri bolnikih v akutnem obdobju venske tromboze. Verjetno pa bi bila v tem primeru težava v tem, da ti bolniki prejemajo antikoagulantno zdravljenje, ki bi nedvomno znižalo koncentracije kazalcev aktivirane koagulacije.

ZAKLJUČKI

V Sloveniji je pogostnost mutacije G20210A v genu za protrombin med bolniki z vensko trombozo 6,8 %, pogostnost nAPC pa 23,3 %.

Povezave med ravniyo kazalcev aktivirane koagulacije in različnimi genotipi nismo mogli dokazati. Zaključili smo, da pri bolnikih, ki so preboleli vensko trombozo in imajo mutacijo v genu za protrombin ali faktor V, koagulacija ni aktivirana bolj kot pri bolnikih brez teh genetskih sprememb, s čimer smo zavrgli delovno hipotezo o domnevni razliki med skupinama.

ZAHVALA

Za dober veter v jadrih mojega raziskovanja sta skrbela mentorja: prof. dr. Mojca Stegnar in prof. dr. Borut Peterlin, ki se jima iskreno zahvaljujem.

Zahvala gre tudi ing. Marinki Tehovnik iz laboratorija Kliničnega oddelka za žilne bolezni za opravljene meritve neodzivnosti na aktivirani protein C in kazalcev aktivirane koagulacije.

Hvala tudi osebj u laboratorija Službe medicinske genetike za vse nasvete in pomoč.

Zahvaljujem se tudi mag. Tjaši Vižintin, brez katere bi bilo delo bolj sivo, in mag. Miranu Šebeštjenu, za nenadomestljivo pomoč pri premagovanju računalniških programov.

Nenazadnje hvala mojim domačim za vso vspodbudo in Gregatu za plamen v srcu.

LITERATURA

1. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2000; 84: 396–400.
2. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004–8.
3. Salobir-Pajnič B, Peternel P, Stegnar M. Nova oblika prirojene trombofilije – neodzivnost na aktivirani protein C zaradi mutacije gena za faktor V. *Zdrav Vestn* 1996; 65: 631–5.
4. Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Brit J Haematol* 1996; 95: 579–86.
5. Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aiach M, et al. Resistance to activated protein C: role in venous and arterial thrombosis. *Biomed Pharmacoter* 1996; 50: 254–60.
6. 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.
7. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Rio E, Oliver A, Mateo J, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366–69.
8. Bauer KA, Humphries S, Smillie B, Li L, Cooper JA, Barzegar S, Rosenberg RD, Miller GJ. Prothrombin activation is increased among asymptomatic carriers of the prothrombin G20210A and factor V Arg506Gln mutations. *Thromb Haemost* 2000; 84: 396–400.
9. Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706–8.
10. Degen Frieznar AJ. Prothrombin. In: High KA, Roberts HR, eds. *Molecular basis of thrombosis and hemostasis*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1995. p. 75–95.
11. Müller-Berghaus G. Hemostasis: regulation and dysregulation. In: Lother T, ed. *Clinical laboratory diagnostics, use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt: TH-Book VerlagGessellschaft; 1998. p. 548–66.
12. Wang H, Riddell DC, Guinto ER, MacGillivray RT, Hamerton JL. Localization of the gene encoding human factor V to chromosome 1q21-25. *Genomics* 1988; 2: 324–8.
13. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64–7.
14. Haerberli A. Prothrombin fragment F1+2. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, eds. *Laboratory techniques in thrombosis – a manual*. Dordrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 217–22.
15. Wagner C, Dati F. Activation markers: thrombin-antithrombin complex (TAT), prothrombin fragment 1+2 (F+2). In: Lother T, ed. *Clinical laboratory diagnostics, use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt: TH-Book VerlagGessellschaft 1998. p. 618–20.
16. Harenberg J. Thrombin-antithrombin (TAT) complexes. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, ed. *Laboratory techniques in thrombosis – a manual*. Dordrecht-Boston-London: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 209–16.
17. Dempfle CE. Use of D-dimer assays in diagnosis of venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 631–41.
18. Prisco D, Antonucci E, Marcucci R, Pepe G. D-dimer in the year 2000: Current data and new perspectives. *Ann Ital Med Int* 2000; 15: 267–72.
19. von Ahsen N, Schütz E, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methyltetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 1999; 45: 694–96.
20. Božič M, Teran N, Kunej T, Peterlin B, Stegnar M. Ali izboljšava preiskave na neodzivnost aktiviranega proteina C zmanjšuje potrebo po analizi DNA? *Farm Vestn* 2000; 51: 427–28.
21. Stegnar M, Peternel P, Uhrin P, Cvelbar-Marinko T, Goršič-Tomažič K, Binder BR. Fibrinolysis in patients with the 1691 G → A mutation in factor V gene and history of deep vein thrombosis. *Fibrinolysis & Proteolysis* 1997; 11: 201–7.
22. Renner W, Koppel H, Hoffmann C, Schallmoser K, Stanger O, Toplak H, et al. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000; 99: 35–9.
23. Tosoeto A, Missiaglia E, Frezzato M, Rodeghiero F. The VITA project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in the general population. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1395–8.
24. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167–73.
25. Peternel P, Stegnar M, Oštir A, Hudournik B. Odkrivanje trombofilije v družinah bolnikov s trombozo. Pripravljen za objavo.
26. Galli M, Finazzi G, Duca F, Norbis F, Moia M. The G1691 → A mutation of factor V, but not the G20210 → A mutation of factor II or the C677 → T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase, is associated with venous thrombosis in patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol* 2000; 108: 865–70.

27. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Aryuchai K, Busabaratana M, Sura T, Atichartakarn V, Sritara P. Prevalence of the G1691A mutation of the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the thai population. *Am J Hematol* 2000; 65: 119–22.
28. Koster T, Rosendaal FR, De Ronde H, Briet E, Vanderbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to a poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503–6.
29. Margaglione M, D'Andrea G, Colaizzo D, Cappucci G, del Popolo A, Brancaccio V, et al. Coexistence of factor V Leiden and factor II A20210 mutations and recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1583–7.
30. Meglič L, Stegnar M, Milanez T, Božič M, Peterlin B, Peternel P, Novak-Antolič Ž. Factor V Leiden, prothrombin 20210 G → A, methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T and plasminogen activator inhibitor 4G/5G polymorphism in women with pregnancy related venous thromboembolism. Poslano v objavo.
31. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, Di Minno G. Genetic susceptibility to pregnancy related venous thromboembolism: Roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1324–8.
32. Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, et al. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000; 342: 374–80.
33. The DVTENOX Study group. Markers of hemostatic system activation in acute deep venous thrombosis – evolution during the first days of heparin treatment. *Thromb Haemost* 1993; 70: 909–14.
34. Kyrle PA, Manhalter C, Beguin S, Stumpf A, Hirschl M, Weltermann A, et al. Clinical studies and thrombin generation in patients heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1287–91.
35. Simioni P, Scarano L, Gavasso S, Sardella C, Girolami B, Scudeller A, Girolami A. Prothrombin fragment 1+2 and thrombin-antithrombin complex levels in patients with inherited APC resistance due to factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 1996; 92: 435–41.
36. Mercuri F, Giacomello R, Puglisi F, Colaone R, Fabbro D, Menegon MG, et al. Factor V Leiden increases F1+2 levels both in normal and deep vein thrombosis subjects. *Haematologica* 2000; 85: 386–89.
37. Tripodi A, Chantarangkul V, Bottasso B, Mannucci PM. Poor comparability of prothrombin fragment F1+2 values measured by two commercial ELISA methods: influence of different anticoagulants and standards. *Thromb Haemost* 1994; 71: 605–8.
38. Bauer KA, Barzegar S, Rosenberg RD. Influence of anticoagulants used for blood collection on plasma prothrombin fragment F1+2 measurements. *Thromb Res* 1991; 63: 617–28.
39. Iversen LH, Thorlacius-Ussing O. Short-time stability of markers of coagulation and fibrinolysis in frozen plasma. *Thromb Res* 1996; 81: 253–61.

Prispelo 24. 3. 2003