



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Слађана Д. Теофилов

**ПОВЕЗАНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА  
УКЉУЧЕНИХ У ПРОЦЕС КОАГУЛАЦИЈЕ  
СА ТРОМБОЗОМ ДУБОКИХ ВЕНА И  
ПЛУЋНОМ ЕМБОЛИЈОМ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Sladjana D. Teofilov

**ASSOCIATION OF COAGULATION-  
RELATED GENES POLYMORPHISM WITH  
DEEP VENOUS THROMBOSIS AND  
PULMONARY EMBOLISM**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2022

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Слађана Теофилов
Датум и место рођења: 18.02.1967. године Зубин Поток, Србија
Садашње запослење: Начелник Одељења за медицинску генетику, Клинички центар Црне Горе
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Повезаност полиморфизама гена укључених у процес коагулације са тромбозом дубоких вена и плућном емболијом
Број страница: 142
Број слика: 2, број табела: 35, број графикана: 3
Број библиографских података: 410
Установа и место где је рад израђен: 1. Центар за медицинску генетику и имунологију, Клинички центар Црне, Подгорица
Научна област (УДК): Медицина, Фармакологија
Ментори: 1. др сци. мед. Наташа Ђорђевић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу 2. др сци. мед. Оливера Миљановић, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета Црне Горе
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 22.07.2020.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-594/35, 09.09.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Данијела Тодоровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник Комисије. 2. Проф. др Владимир Здравковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан Комисије. 3. Проф. др Зоран Тодоровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, Клиничка фармакологија и токсикологија, члан Комисије.
1. Проф. др Данијела Тодоровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник Комисије. 2. Проф. др Владимир Здравковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан Комисије. 3. Проф. др Зоран Тодоровић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Фармакологија, Клиничка фармакологија и токсикологија, члан Комисије.
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Венска тромбоза (ВТЕ) је патолошка коагулација, у чијем настанку генетички фактори ризика имају значајну улогу. Главни циљ студије је да утврди да ли су полиморфизми једног нуклеотида (SNP) гена који кодирају факторе коагулације, и то: *FVHR26755A>G*, *FII19911A>G*, *FXIII-A102G>T*, *MTHFR677C>T*, *PAI14G/5G* и *FSAP1601G>A*, повезани са настанком, карактеристикама и рецидивом ВТЕ.

У студију су укључена 103 пацијента, који су на основу важећих дијагностичких алгоритама имали бар једну тромбозу и 106 контрола, који до тренутка када су прихватили учешће у студији нису имали тромбозу. Генотипизација је спроведена методом алел- специфичног PCR.

Међу SNPs *FV1691G>A* и *FVHR26775A>G* је уочен умерен LD, а међу SNPs *FII20210G>A* и *FII19911A>G* комплетан LD. Мултиваријантном анализом утицаја свих испитиваних SNPs на ризик од тромбозе, поред потврђеног вишеструког ризика за носиоце *FII20210G>A* и *FV1691G>A*, показан је скоро троструко повећан ризик код носиоца *FVHR26755A>G* ( $p=0,024$ ;  $OR=2,89$ ). У оквиру укупног утицаја свих испитиваних SNPs, присуство варијантног генотипа *FXIII-A102G>T* удружено је са скоро два и по пута мањим ризиком од развоја ВТЕ. У удруженом дејству генотипова свих SNPs и осталих испитиваних фактора ризика за ВТЕ, присуство бар једног варијантног *MTHFR677T* алела повезано је са скоро троструко већим ризиком од настанка ВТЕ. Варијантни генотипови на 4 и више гена, чешће су заступљени код ВТЕ пацијената ( $p=0,007$ ) као и код пацијената млађих од 50 година у односу на контроле исте старости ( $p=0,02$ ).

Присуство варијантних форми до сада недовољно испитаног хаплотипа *FVHR26775A>G* у заједничком утицају свих испитиваних SNPs, као и *MTHFR677C>T*, у заједничком утицају SNPs и испитиваних стечених фактора ризика, доприносе повећаном ризику од ВТЕ.

**Кључне речи:** ВТЕ, SNP, фактори коагулације

## ABSTRACT

Venous thrombosis (VTE) is a pathological coagulation, in whose etiopathogenesis genetic risk factors play a significant role.

The main objective of this study was to determine if single nucleotide polymorphisms (SNP) of genes encoding coagulation factors, namely: *FVHR26755A>G*, *FII19911A>G*, *FXIII-A102G>T*, *MTHFR677C>T*, *PAII4G/5G* and *FSAP1601G>A*, are associated with the onset, characteristics, and recurrence of VTE.

The study included 103 patients, who, based on valid diagnostic algorithms, had at least one confirmed thrombosis, and 106 healthy subjects, who had no thrombosis until the moment they accepted to participate in the study. Genotyping was carried out by allele-specific PCR method.

There was a moderate LD observed between *FV1691G>A* and *FVHR26775A>G* polymorphisms, while complete LD was observed between polymorphisms *FII20210G>A* and *FII19911A>G*. Multivariate analysis of the influence of all examined SNPs on the risk of thrombosis, in addition to the confirmed multiple risk for *FII 20210G>A* and *FV 1691G>A* carriers, showed an almost three-fold increased risk in *FVHR26755A>G* carriers ( $p=0.024$ ;  $OR=2.89$ ). Within the overall influence of all examined SNPs, the presence of the *FXIII-A102G>T* variant genotype was associated with an almost two and a half times lower risk of developing VTE. Within the combined effect of all analyzed SNPs and other examined risk factors for VTE, the presence of at least one variant *MTHFR 677T* allele was associated with an almost three-fold higher risk of VTE. Variant genotypes on 4 or more genes are more common in VTE patients ( $p=0.007$ ), as well as in patients younger than 50 years, as compared to healthy subjects of the same age ( $p=0.02$ ).

The presence of variant forms of the hitherto insufficiently investigated haplotype *FVHR26775A>G* in the joint influence of all investigated SNPs, as well as *MTHFR677C>T* in the joint influence of SNPs and the examined acquired risk factors. contribute to an increased risk of VTE.

**Key words:** VTE, SNP, coagulation factors

## ЗАХВАЛНИЦА

Својим менторима, Проф. др Наташи Ђорђевић и Проф. др Оливери Миљановић, исказујем велику захвалност за пружену несебичну помоћ, разумевање, савете и стрпљење при изради и писању ове дисертације.

Захваљујем Проф. др Звонку Магићу на подршци и саветима током израде ове тезе.

Захваљујем свим сарадницима, колегиницама и колегама Центра за медицинску генетику и имунологију, за подстицај, моралну и техничку подршку...посебно Мари, за пружену мотивацију у изради ове тезе, као и за пријатељство и искрено радовање сваком мом успеху од тренутка када смо почеле заједно да радимо.

Захваљујем мојој мајци, сестри и браћи и њиховим породицама и супруговој породици, јер су ме бодрили и подржавали да не посустанем у тешким тренуцима...Захваљујем оцу који одавно није међу нама а ипак ми је пружао подршку на посебан начин.

Захваљујем супругу Зорану, који је све ово разумео, веровао да ћу истрајати у овоме и давао ми посебну снагу, љубав и подршку свих година заједничког живота. Својој деци, јер су дали смисао свему овоме...

...и свима онима који су на било који начин допринели да истрајем у овоме.

*Ову тезу посвећујем својој породици, синовима Бранку и Борјану, унуку Андреју, снахи Ани и супругу Зорану, који су на посебан начин уткани у овај рад и мој живот. Они су моја инспирација и мотивација...све ово је због њих и за њих.*

## САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	Хемостаза .....	1
1.1.1	Ендотел.....	1
1.1.2	Тромбоцити.....	2
1.1.3	Протеински фактори коагулације .....	3
1.1.4	Примарна хемостаза .....	4
1.1.5	Секундарна хемостаза.....	4
1.1.6	Фибринолиза .....	6
1.2	Патолошка хемостаза.....	6
1.2.1	Венски тромбоемболизам.....	7
1.3	Епидемиологија ВТЕ .....	9
1.3.1	Учесталост и преваленција ДВТ И ПЕ.....	10
1.4	Фактори ризика за настанак ВТЕ .....	11
1.4.1	Тромбофилија .....	11
1.4.2	Стечени фактори ризика за развој ВТЕ.....	11
1.5	Генетички фактори ризика за настанак ВТЕ.....	17
1.5.1	Генске варијације.....	17
1.5.2	Фактор коагулације II (FII)–Протромбин .....	22
1.5.3	Полиморфизам <i>FII</i> 19911A>G.....	23
1.5.4	Фактор коагулације V (FV).....	25
1.5.5	Хаплотип R2 (HR2)- <i>FV</i> HR 26755A>G .....	27
1.5.6	Фактор коагулације XIII.....	27
1.5.7	Метилен тетраhydrofolат редуктаза-MTHFR .....	29
1.5.8	Инхибитор активатора плазминогена-PAI1 .....	30
1.5.9	Активирајућа протеаза фактора VII (FSAP), полиморфизам Marburg I .....	32
1.6	Превенција и лечење ВТЕ.....	33
2	ЦИЉЕВИ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА .....	35



2.1	Циљеви и хипотезе.....	35
2.2	Материјал и методе испитивања .....	36
2.2.1	Врста студије.....	36
2.2.2	Популација која се истражује.....	36
2.2.3	Варијабле које су се мериле у студији .....	37
2.2.4	Класификовање пацијената у односу на старост, локализацију прве ВТЕ и рецидиве .....	38
2.2.5	Фактори ризика: .....	38
2.2.6	Генотипизација и анализа SNPs .....	41
2.3	Статистичка обрада података .....	46
3	РЕЗУЛТАТИ .....	48
3.1	Опште карактеристике испитаника.....	48
3.1.1	Дистрибуција броја САБ и неуспелих IVF у оквиру ВТЕ и контролних испитаница .....	54
3.1.2	Медикаментозна терапија.....	55
3.2	Резултати анализе стечених фактора ризика и животних навика .....	56
3.3	Утврђивање повезаности коморбидитета, активности, ВМІ и не О-те крвне групе са животном доби настанка ВТЕ, рецидивима и локализацијом тромбозе.....	59
3.4	Анализа генетичких фактора ризика.....	62
3.4.1	Тестирање HWE на нивоу свих испитаника .....	63
3.4.2	Генетички модели дистрибуције генотипова и алела испитиваних SNPs и хаплотипска анализа .....	64
4	ДИСКУСИЈА.....	82
4.1	Основне карактеристике испитиваних група.....	82
4.1.1	Повезаност САБ, оралних контрацептива и антикогулантне терапије са ВТЕ .....	84
4.2	Стечени фактори ризика за настанак ВТЕ и животне навике .....	85
4.3	Повезаност коморбидитета, активности, ВМІ и не О-те са животном доби настанка ВТЕ, рецидивима и локализацијом ВТЕ .....	91
4.4	Генетички фактори ризика .....	93

4.4.1	Полиморфизми <i>FII</i> (20210 G>A и 19911A>G) и <i>FV</i> (1691G>A и HR2 6755A>G).....	93
4.4.2	Хаплотипска анализа .....	99
4.4.3	Полиморфизам <i>FXIII-A</i> 102G>T (Val34Leu).....	101
4.4.4	Полиморфизам <i>MTHFR</i> 677C>T.....	102
4.4.5	Полиморфизам <i>PAII</i> 4G/5G.....	104
4.4.6	Полиморфизам <i>FSAP</i> 1601G>A.....	106
4.5	Полиморфизми у оквиру пола испитиваних група; повезаност са различитим формама ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ, локализацијом ВТЕ и појавом рецидива.....	107
4.6	Повезаност присуства већег броја полиморфизама са појавом ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ, локализацијом ВТЕ и појавом рецидива .....	111
4.7	Закључци .....	113
5	ЛИТЕРАТУРА .....	115

# 1 УВОД

## 1.1 Хемостаза

Хемостаза је физиолошки процес, који строго контролисаним и усклађеним реакцијама одржава течно стање крви и њену неометану циркулацију унутар крвних судова, истовремено формирањем крвног угрушка на месту васкуларне повреде, зауставља прекомерно крварење (1-3). Осим ове улоге, систем хемостазе је директно укључен и у процесе ћелијске пролиферације и обнављање ткива након повреде, аутоимунске одговоре, запаљенске реакције, раст тумора, ширење метастаза и друго (4-8).

Најважније компоненте система хемостазе су: 1) ендотел крвних судова, 2) тромбоцити и 3) протеински (плазматски) фактори коагулације. Протеински фактори обухватају прокоагулантне факторе, антикоагулансе (инхибиторе коагулације) и факторе фибринолизе (2,5,9). Процес хемостазе остварује се прецизним реакцијама великог броја фактора кроз три фазе: 1) примарна хемостаза, 2) секундарна хемостаза и 3) терцијарна хемостаза (фибринолиза) (2,3).

### 1.1.1 Ендотел

Ендотел је динамичка баријера између крви и околних ткива, облаже све лимфне и крвне судове и на тај начин им обезбеђује структурну потпору и еластичност и спречава истицање крви из крвних судова (8). Регулисање хемостазе остварује контролисаном експресијом мембранских рецептора, који обезбеђују везивање антикоагулантних и прокоагулантних фактора на својој површини (8,10-12).

У нормалним физиолошким стањима организма ендотел је тромборезистентан и испољава антиагрегационо, антикоагулационо и профибринолизно деловање (8,11). У здравом крвном суду, са нормалним протоком крви, тромбоцити се не лепе на површину ендотела, нити међусобно, зато што ендотел инхибира адхезију тромбоцита ослобађањем азотног оксида (NO), ендотелног релаксирајућег фактора, ензима аденозин дифосфата (енгл. Adenosine diphosphate-ADP) и простагландина (8,11). Такође, на ендотелу се експримирају и различити антикоагуланси, као што су инхибитор пута ткивног фактора (енгл. Tissue factor pathway inhibitor-TFPI), тромбодулин (ТМ), протеоглигани слични хепарину и рецептор за протеин С (8). Активирани ендотелне ћелије експримирају и велики број молекула и рецептора који убрзавају адхезију тромбоцита на месту повреде (8,13). Повреда васкуларног ендотела основни је предуслов за активацију примарне хемостазе, јер долази до контакта протеинских компоненти хемостазног система и високореактивне површине

субендотела (8,11). Управо специфични спојевни протеина и ендотелних рецептора регулишу бројне ћелијске интеракције, преко којих ендотел остварује активно регулисање хемостазе (8,10-13). Прокоагулантно својство ендотела активира се ослобађањем фактора стимулације тромбоцита (енгл. Platelet Activating Factor-PAF) и ткивног фактора (енгл. Tissue Factor-TF) из оштећеног ткива (8,14). Важна улога ендотела је и у продукцији активатора и инхибитора фибринолизе и регулацији њихове активности (15).

Посебно важни ендотелни рецептори су ТМ и рецептори активирани протеазама (енгл. Protease-Activated Receptors-PARs) (8,14). ТМ је интегрални мембрански гликопротеин, чија је густина по једној ћелији 50-100 хиљада молекула (8,16). Представља главну одредницу ендотелне тромборезистенције и готово све хемостатске функције ендотела су посредоване ТМ (8,16). PARs (PAR1-PAR4) служе као магнети за протеазне факторе коагулације и покрећу серију ћелијских сигнала након активације (8). Посебно је значајан PAR1 који се доминантно активира тромбином (8,17).

### 1.1.2 Тромбоцити

Тромбоцити су најмање крвне ћелије, величине 2-5  $\mu\text{m}$ , немају једро, а код здравих особа су присутни у броју  $150-400 \times 10^9/\text{l}$  (18,19). Настају из мегакариоцита који се продукују у коштаном сржи (19). Као зрели тромбоцити циркулишу у крвотоку просечно 7-10 дана, након чега се селективно одстрањују посредством макрофага из слезине и јетре (18-21). Имају веома сложену грађу. Фосфолипиди, асиметрично распоређени, чине основну структуру плазматске мембране тромбоцита (20). Фосфолипиди су негативно наелектрисани, обезбеђују активацију тромбоцита и каталитичку површину за везивање фактора коагулације, док холестерол обезбеђује флуидност, стабилизује мембрану и помаже контролу трансмембранског транспорта (18,20). У мембрани су усидрени гликопротеини и протеоглици, који имају улогу рецептора и реагују на ћелијске и хуморалне надражаје, лиганде и агонисте, преносећи стимуланс кроз мембрану до органела унутрашње активације и на тај начин доприносе активацији, адхезији и агрегацији тромбоцита (18,21).

Тромбоцити учествују у заустављању крварења након повреде крвних судова. У условима хемостатске равнотеже немају тенденцију према адхезији, а активирају се на местима васкуларне повреде, након излагања адхезивним протеинима или растворљивим агонистима, кроз морфолошке трансформације и експримирањем бројних рецептора на мембрани (18,19). Да би се постигао потребан баланс хемостазе, активација тромбоцита се пажљиво контролише низом високо регулисаних интеракција између рецептора и лиганата (22). Активирање тромбоцита постиже се деловањем активатора, односно агониста, као што су колаген, тромбин, ADP, тромбоксан А2 (ТХА2), епинефрин, PAF, простагландини и други (18,19,22). Најважнији и најзаступљенији рецептори тромбоцита су интегрини, који чине велику породицу трансмембранских рецептора адхезије, помажући ћелијама да се вежу за остале активирание ћелије, као и за ванћелијски матрикс (23,24). Интегрини су нековалентно везани хетеродимери састављени од  $\alpha$  и  $\beta$  субјединице, у облику трансмембранског комплекса (23,24). Интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta3$  је највероватније најважнији од свих

рецептора, јер је на површини тромбоцита присутан са највећом густином и може се рећи да је по значају један од централних молекула хемостазе (18,23,24). Осим интегрина, значајна места везивања на тромбоцитима су рецептори удружени у функционалне димере, као што су: рецептор за Фон Вилебрандов фактор (енгл. vonWillebrand factor-vWf), GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V, GPVI, GPaIIb/IIIa; рецептор за фибриноген и PARs (PAR1 и PAR IV) (18,24-26).

### 1.1.3 Протеински фактори коагулације

Равнотежа између прокоагулантних, антикоагулантних и фактора фибринолизе пресудна је за одржавање физиолошке хемостазе и избегавање патолошких тромбоза или крварења (2,27). Прокоагулантни и антикоагулантни фактори имају важну улогу у регулацији стварања тромбина кроз серију ланчаних реакција у секундарној хемостази усмерених ка стварању фибрина (27). У том процесу, на различитим нивоима, укључен је велики број протеинских фактора и кофактора. Највећи број фактора су серинске протеазе, изузеци су: TF или фактор III (FIII), фактор VIII (FVIII) и фактор V (FV), који припадају гликопротеинима и фактор XIII (FXIII) који припада трансглутаминазама (28). Углавном се генеришу у јетри и у неактивном облику (у форми профактора) излучују у крвоток (28). Након почетне активације, кроз међусобне интеракције, претходно активирани фактор покреће активацију следећег. Често долази и до формирања ензимских комплекса који имају улогу катализатора и вишеструко убрзавају продукцију тромбина. Према номенклатури, сви фактори коагулације обележавају се римским бројевима, а њихов активни облик обележава се додавањем малог слова „а“ иза римског броја (27,28).

Антикоагуланси (инхибитори коагулације) имају регулаторну улогу прокоагулантних фактора и на тај начин локализују формирање тромба на месту повреде крвног суда (28). Најважнији природни антикоагуланси су: антитромбин (енгл. Antithrombin-AT), који представља главни инхибитор тромбина а инхибира и остале серинске протеазе, TFPI, протеин С и протеин S (28).

Фибринолизни систем своју улогу разградње тромба и спречавања згрушавања крви у здравим крвним судовима, остварује активирањем широког спектра кофактора, активатора, инхибитора и рецептора (2,28). Централна улога у овом процесу припада плазмину (29). Најважнији активатори фибринолизе су: ткивни активатор плазминогена (t-PA) и урокиназни активатор плазминогена (u-PA), а најзначајнији инхибитори фибринолизе су: инхибитор активатора плазминогена 1 (енгл. Plasminogen Activator Inhibitor-PAI1),  $\alpha 2$  антиплазмин (енгл.  $\alpha 2$ -antiplasmin) и инхибитор фибринолизе активирани тромбином (енгл. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor-TAFI) (29).

### 1.1.4 Примарна хемостаза

Примарна хемостаза започиње непосредно након оштећења ендотела, а подразумева стварање тромбоцитног чепа на месту повреде са циљем брзог заустављања крварења до стварања коначног угрушка (2,28). Одвија се веома брзо након повреде, кроз неколико усклађених интеракција адхезије, активације и агрегације тромбоцита, у које је укључен велики број рецептора и лиганда (2,28,30).

На месту оштећења ендотела долази до адхезије тромбоцита у облику једнослојног ћелијског покривача и контактне активације тромбоцита (18,24). Активацију тромбоцита стимулишу протромботички фактори који се ослобађају из оштећеног ендотела (27,31). Истовремено, активација тромбоцита подстиче активацију протеинских фактора неопходних за даљи ток коагулације. Агрегација тромбоцита започиње врло брзо након адхезије и активације, а представља слепљивање већег броја тромбоцита са циљем формирања тромбоцитног угрушка (28). Ова фаза посредована је интеракцијом фибриногена са гликопротеинским рецепторима на тромбоцитној површини (2,28). Агрегација тромбоцита подржана је енергијом ADP-а, адреналином, серотонином и ТХА<sub>2</sub> (2, 31). На процес агрегације утиче и тромбин настао спољашњим путем згрушавања, који из фибриногена генерише нетопљиви фибрин неопходан за стварање тромбоцитне мреже и тромбоцитног угрушка (8,28).

### 1.1.5 Секундарна хемостаза

За потпуно заустављање крварења неопходна је активација ензимских фактора коагулације на месту повреде крвног суда и стабилизација тромбоцитног угрушка фибрином. Тромбоцитни тромб настао у процесу примарне хемостазе је недовољно чврст за успостављавање дефинитивне хемостазе, зато се процес наставља серијом реакција серинских протеаза (2). У овој каскади се велики број неактивних ензимских прекурзора активира у функционалне, каталитички активне серинске протеазе, што резултира додатном активацијом тромбоцита и стварањем фибриноског угрушка (2,8,27,28).

Суштина каскадног модела заснована је на објашњењу да сваки фактор коагулације у физиолошким условима циркулише као неактивни фактор (проензим/зимоген) који се у контролисаним условима конвертује у ензимски активан облик (1,32-34). Основни принцип каскаде је да активација једног фактора доњег тока (нивоа) каскаде иницира активацију другог фактора коагулације на горњој лествици каскаде, при чему проензими доводе до активације ензима низводно (1,28,35). Према овом моделу, објашњење физиологије згрушавања крви темељи се на чињеници да протеински фактори коагулације контролишу и усмеравају процес згрушавања, а ћелије служе првенствено за обезбеђивање површине за реакцију (32,35).

Каскадни модел коагулације је представљен у облику добро познате "Y шеме" са прецизно разграниченим унутрашњим и спољашњим путем коагулације, који конвергирају и стапају се у заједнички пут у коме се активацијом фактора X (FX) и FV у активне форме (FXa и FVa) и њиховом интеракцијом формира протромбински активатор FXa/FVa, који катализује стварање тромбина из протромбина (34,35). Главна одлика регулације коагулације је да се иницијација коагулације покреће спољашњим путем а појачавање доприноси унутрашњи пут (36,37). За активацију унутрашњег пута коагулације пресудну улогу има фактор XII (FXII), а за активацију спољашњег пута TF и активирани фактор VII (FVIIa) (34-36). FXa настаје и у унутрашњем и спољашњем путу коагулације и покреће заједнички пут коагулације, а заједничким деловањем кофактора FVa и FXa протромбин се трансформише у тромбин (38). Резултат каскадне серије реакција је продукција великих количина тромбина (27,35). Настао тромбин покреће трансформацију растворљивог фибриногена у фибринске мономере, стварајући фибрин, а као крајњи резултат је формирање непропустљивог тромбоцитно-фибринског угрушка, који потпуно зауставља крварење из повређеног крвног суда (34,39,40). Овај процес траје веома кратко од активације и посебно је битан за велике крвне судове.

У складу са новим опажањима и сазнањима, крајем XX века Монро и Хофман су надоградили каскадни модел коагулације и представили нови модел, који наглашава ћелијску површину и важност ћелијских рецептора и липида у контролисању просторног и временског тока процеса коагулације (27,28,32,35,41). У овом моделу детаљније је размотрена улога ензимских фактора коагулације, а предуслов за почетак процеса коагулације је присуство тромбоцита, чија је улога да обезбеде негативно наелектрисану површину за стварање ензимских комплекса коагулације (35,36). Према ћелијском концепту хемостазе, процес коагулације се дели на три различита корака, који се међусобно преклапају: а) фаза иницијације, б) фаза амплификације в) и фаза пропагације (35).

а) **Фаза иницијације** започиње на ћелијама које експримирају TF (33, 41). С обзиром на то да је FVII једини протеин коагулације који у малом проценту циркулише у крви у активном облику, веома брзо долази до интеракције TF и FVIIa и формира се комплекс TF/FVIIa, који представља примарни физиолошки активатор система коагулације, што представља кључни догађај у покретању спољашњег пута коагулације и стварања тромбина (37,42).

б) **Фаза амплификације** представља унутрашњи пут коагулације и у њему иницијално створен тромбин активно учествује у сопственој продукцији убрзавањем активације тромбоцита и активацијом фактора V, VIII, фактора IX (FIX) и фактора (FXI) (36, 43). С обзиром на то да је потребна велика количина тромбина, суштина процеса амплификације је да се преко механизма позитивне повратне спреге повећава концентрација коагулационих ензима и кофактора. То доприноси континуираном појачавању стварања тромбина, јер иницијално створен тромбин амплификује сопствено стварање (28).

в) **Фаза пропагације** (ширења) наставља се на активираним тромбоцитима. Мобилизацијом великог броја тромбоцита на место повреде обезбеђује се потребна површина за формирање ензимских комплекса FIXa/FVIIIa и FXa/FVa, који доводе до експлозивног генерисања великих количина тромбина и активације FXIII (29,31). Фаза пропагације се завршава повезивањем растворљивих фибринских мономера у нерастворљиве полимере фибрина, што доводи до формирања стабилне фибринске мреже и угрушка (30,39,44). За ефикасност овог процеса неопходан је и антиромботски

механизам, како би се процес пропагације зауставио у право време. Ово се остварује преко ендотелног ТМ, TFPI, протеина С, протеина S и друго (16, 45).

### 1.1.6 Фибринолиза

Фибринолиза је природни механизам за одржавање хемостатске равнотеже који спречавањем прекомерног стварања и таложења фибрина у здравим крвним судовима обезбеђује неометану циркулацију (28,29). Такође, фибринолиза је физиолошки одговор на патолошку тромбозу, покреће се истовремено са процесом стварања угрушка, ограничава тромбозу на локално подручје повреде и започиње процес разградње угрушка и поправљање васкуларних оштећења (15,30,46,47). Неуравнотежено деловање фибринолитичких фактора може да помери хемостатску равнотежу у правцу прекомерног крварења или тромботичких догађаја (29). Главни ензим овог система је серинска протеаза плазмин, који се у циркулацији налази у форми неактивног проензима плазминогена (30,47,48). Активатори плазминогена ослобађају се из ендотелних ћелија приликом повреде крвног суда, а присутни су у већини органа и ткива, осим у јетри и плаценти (30,49-51). У регулисању фибринолизе важну улогу имају и њени инхибитори (47). Најзначајнији инхибитор фибринолизе је PAI1, чија је главна улога да блокира конверзију плазминогена у плазмин (30,47,51,52).

## 1.2 Патолошка хемостаза

Када се деси поремећај баланса између прокоагулантних, антикоагулантних и фибринолитичких фактора коагулације, унутар лумена крвног суда покреће се каскада згрушавања и долази до прекомерног крварења (хеморагије) и губитка крви, или до прекомерног згрушавања, односно патолошких тромбоза (1,2,28).

Тромбоза је патолошко формирање крвног угрушка (тромба) у крвотоку са последицом поремећаја природног протока крви и представља један од водећих узрока смртности и обољевања у већини развијених земаља (1,27,53). Овај поремећај чешћи је у венама него у артеријама, јер је крвна циркулација спорија у венама, а успорени проток крви изазива хипоксију, што погодује активацији коагулације (54). За разлику од артеријске тромбозе која најчешће настаје због ерозије или руптуре плака насталог као последица дуготрајног и прогресивног процеса атеросклерозе, развој венског тромба је углавном инициран поремећајем згрушавања крви и променама у протоку крви (9,54-56).

Крвни угрушак састоји се од фибрина, тромбина, еритроцита и тромбоцита. Тромб настао у дубоким венама је богат фибрином и црвеним крвним зрнцима, зато што настаје у условима спорог протока и ниског притиска (54,56). Насупрот овоме, артеријска тромбоза настаје у условима брзог протока и високог притиска, па је тромб богат тромбоцитима и



фибрином (56,57). Присуство тромба у површинским венама често је праћено флебитисом (запаљење венског зида) и упалом околног ткива (перифлебитис) (58,59). Код тромбозе дубоких вена (ТДВ) ови упални процеси су слабије изражени. Због ове чињенице опште је прихваћено да се све форме тромбозе дубоких вена означавају као ТДВ, а појам тромбофлебитис подразумева упални процес свих слојева венског зида као и околног поткожног ткива и тромбозе површинских вена (59).

Тромбофлебитис представља тромбозу површинских вена, настаје спонтано или након провоцирајућих фактора, а често је праћен варикозним венама (58). Карактерише га запаљење свих слојева венског зида и околног поткожног ткива, а бол повезан са тромбофлебитисом је веома јак (59). Најчешће се јавља на ногама, али може се јавити и на рукама и врату (58). Може бити последица тромбозе или може изазвати тромбозу (58). Иако се тромб може створити и у површинским и у дубоким венама, опаснији су тромбови настали у дубоким венама, зато што део одломљеног тромба или цео тромб може ући у систем циркулације и тако dospети до плућне артерије, чије зачепљење изазива плућну емболију (ПЕ), која веома често има фаталне последице (60). Тромб који се креће кроз крвоток назива се емболус, а на местима задржавања емболуса у крвној циркулацији формирају се исхемијска жаришта (1,60).

### 1.2.1 Венски тромбоемболизам

Венски тромбоемболизам (ВТЕ) је патолошка коагулација која је резултат сложених интеракција наследних фактора предиспозиције и стечених фактора ризика који провоцирају коагулацију (61-63). Узрок настанка ове мултифакторске болести је формирање тромба у венама, што нарушава венску циркулацију и доприноси прогресивној опструкцији и дисфункцији венског система (59,61). Када је циркулација крви успорена, долази до стазе и хипоксије, које удружене са упалним процесима делују тако што се активирани тромбоцити појачано везују на површиниу ендотела (2,9). На овај начин се активира систем коагулације који покреће серију реакција неконтролисане адхезије и агрегације тромбоцита, што доводи до повећаног стварања тромбина и фибрина, чији је крајњи продукт крвни угрушак-тромб (28,57). Створени тромб може да расте и да узрокује оклузију лумена крвног суда (63,64).

У основи процеса настанка тромбозе је Вирховљева тријада која повезује три водећа узрока настанка болести: оштећење или повреду зида (ендотела) крвног суда, нарушен проток крви (венска стаза) и хиперкоагулабилност (1,27,63). Вирховљева тријада о водећим узроцима настанка акутног ВТЕ, настала 1856. године, још увек је основни концепт који објашњава настанак и патолошку позадину ВТЕ. Обједињавањем наследних и стечених поремећаја и фактора ризика заједничким појмом тромбофилија, допринело је бољем разумевању механизма настанка болести и додатно објашњава овај концепт. Тромбофилија представља широк спектар предиспонирајућих тј. наследних и провоцирајућих тј. стечених фактора, који удруженим и динамичким интеракцијама доприносе повећаној склоности ка патолошкој тромбози (63,64).

С обзиром на то да ВТЕ представља велики здравствени проблем у развијеном свету, а са циљем подизања свести о тежини и последицама болести и могућностима превенције, интернационално друштво за тромбозу и хемостазу прогласило је 13. октобар Светским даном тромбозе (65).

#### 1.2.1.1 Клинички ентитети ВТЕ

Венски тромбоемболизам се састоји од два клиничка ентитета: ТДВ, односно флеботромбозе и ПЕ (1,61). Још увек се сматра да су ТДВ и ПЕ, као њена главна компликација, само различите клиничке манифестације исте болести, и зато су обједињене заједничким појмом ВТЕ (66,67). Овакав став заснован је на резултатима многих клиничких студија и аутопсија да највећи број пацијената са акутним ПЕ има исходиште у проксималној ТДВ доњих екстремитета (66-68). У новије време, истраживачи покушавају да кроз различите клиничке моделе истраживања поткрепе хипотезу да се ПЕ развија као независна тромбоза (69). Истраживања патолошких стања као што су хронична опструктивна упала плућа и астма показују блиску везу између локалне упале и активирања згрушавања крви, чиме се препознаје могућност независног настанка ПЕ од ТДВ (64,70).

#### 1.2.1.2 Клиничка слика ТДВ И ПЕ

Клиничка слика ВТЕ се манифестује акутним и хроничним симптомима болести, често са фаталним исходом или хроничним компликацијама у виду посттромботског синдрома (ПТС) и плућне хипертензије (27,71-73). ТДВ је стање код кога се угрушак крви формира у некој дубокој вени. Најчешће су то вене на ногама или у карлици, мада, може се јавити и у осталим венама (55,67). Уобичајени симптоми ТДВ су бол, отицање, еритем и проширене вене на делу тела захваћеном тромбозом (59,73). Осим тога што сама по себи представља озбиљну болест, ВТЕ може бити први симптом развоја неке малигне болести (74). Клиничке манифестације ПЕ су хетерогене и крећу се од асимптоматских до масивне емболије и изненадне смрти (60,75). Када се емболуси одвоје од венског зида путују кроз крвоток до десне срчане коморе, а затим улазе у плућни артеријски систем изазивајући неправилности у размени гасова и хемодинамички колапс (60). Типични симптоми укључују плеуралну бол у грудима, диспнеу, температуру, кашаљ, нагли губитак свести и искашљавање крви из дисајних путева (60).

Сваки настанак тромба може и не мора бити повезан са симптомима болести. Развој симптома зависи од степена тромбозе, адекватности колатералних крвних судова и степена придружености васкуларне оклузије и упале. Додатни фактор који утиче на развој симптома је опште здравствено стање, тако да емболус умерене величине углавном не изазива компликације код здраве особе, а код особа са нпр. узнапредовалим кардиоваскуларним болестима или канцером, изазива озбиљне компликације или има фаталан исход (76,77).

### 1.2.1.3 Подела и учесталост јављања тромбоза према топографији вена

Стопа јављања ТДВ према топографији вена варира. Најчешћа исходишта ТДВ јесу синуси валвула дубоких вена доњих екстремитета, нарочито синуси у солеалним (венски синуси мишића листа ноге) венама потколенице (9,55,78). Следе их, са опадајућом учесталошћу јављања, остале вене потколенице, затим бутне вене, поплитеална вена, феморална, илијачне вене и доња шупља вена (60). Поред тога, утврђено је да ТДВ чешће настаје у левој ноzi у односу на десну, а такође веома често се јавља билатерално (75,79). Пацијенти са билатералном ТДВ имају вишу учесталост рецидива, ПТС, ПЕ и морталитет (55,79). Према локализацији ТДВ се могу поделити и на проксималне и дисталне (60,80). Према овој подели, све тромбозе кранијално у односу на поплитеалну вену су проксималне, а тромбозе у потколеници су дисталне (60,80). Проксималне ТДВ имају већи ризик од тромбоемболије у поређењу са дисталним (60,79,80). Дисталне тромбозе су најчешће последица операција и имобилизације, а проксималне се углавном јављају као компликација тешких хроничних болести и код особа старије животне доби (80).

Најчешћи узрок ПЕ су емболуси настали у проксималним венама, а врло ретко из вене субклавије или вена руку (60,81). Када се акутни тромб не лизира у потпуности, преостали угрушак постаје фибротичан и може се уградити у зид плућне артерије (82). Ово доводи до прогресивне оклузије плућне васкулатуре која доводи до плућне хипертензије (82). Због велике површине плућног васкуларног корита последице емболизације најчешће постају видљиве када више од 60% плућног артеријског корита буде оклудирано (82). За појаву ПЕ већи ризик носе деснострани проксималне ТДВ (54). Знатно ређе, ТДВ се могу десити и у другим венама, као што су вене горњих екстремитета, церебралних синуса, мезентеријума, јетре, бубрега и слезине (83-85).

## 1.3 Епидемиологија ВТЕ

За праћење учесталости и преваленције ВТЕ највећи значај имају студије дугорочних трендова. Примећено је да последњих година преваленција ВТЕ расте, што се између осталог, објашњава дужим животним веком, а самим тим је повећана могућност деловања великог броја спољашњих фактора ризика који доприносе повећаној стопи оболевања (60, 86). На повећање преваленције оболелих од ВТЕ утицала је и смањена стопа смртности због великог броја дијагностичких и терапијских процедура и адекватне употребе преоперативне и постоперативне профилаксе (59,71).

### 1.3.1 Учесталост и преваленција ДВТ И ПЕ

Учесталост ВТЕ је 1-3 на 1.000 особа годишње у односу на укупну светску популацију (60,66,72,87,88). У европској популацији тај број се креће 1-2 на 1.000, односно 104 до 183 новооболелих на 100.000 становника у једној години (88). У САД-у укупна учесталост ВТЕ је већа, износи око 318-422 на 100.000 становника (89). Што се тиче земаља нашег региона, осим за Хрватску, нема објављених података о учесталости ВТЕ. Према резултатима студије, спроведене 2015. године у Хрватској, годишња учесталост ВТЕ је 1,185 на 1.000 људи, што је у опсегу учесталости осталих европских земаља (90) Афроамериканци имају највећу стопу оболевања и смртности од ВТЕ (90). У поређењу са белом популацијом учесталост ВТЕ код Афроамериканца је 30-60% већа, а у односу на азијско-пацифичку популацију чак за 70% (91). Једногодишња стопа смртности ВТЕ пацијената креће се 9-30%, а посматрано у оквиру једномесечног морталитета, 6% за ТДВ и 10% за ПЕ (72,86,92).

Кохортна студија спроведена на око 130.000 први пут дијагностикованих ВТЕ пацијената, праћених у периоду од 30 година након ВТЕ, показала је да пацијенти са ВТЕ имају дугорочно повећан ризик од смрти (93). Ризик је посебно повећан у првој години након тромботичног атака, али ризик је био присутан током свих 30 година праћења ВТЕ пацијената (93). Ова студија је показала да је смртност након ДВТ, после прве године, остала прилично константна за свих 30 година праћења, али се смртност од ПЕ постепено смањивала (93). Такође, ВТЕ пацијенти имају високу стопу рецидива, који на годишњем нивоу износи око 5 до 7%, а скоро једна трећина пацијената добије рецидив у прве 3 године након првог атака болести (94). Једном ко доживи тромботички напад, доживотно је у ризику од рецидива (94). Нека истраживања су показала да код пацијената са резидуалном тромбозом који нису наставили са терапијом, а остало је тромбозирано око 40% пречника вене, око 27% пацијената је имало рецидив након тромбосечне антикоагулантне терапије (95). Употреба антикоагулантне терапије за лечење почетне ВТЕ и спречавање рецидива може довести до крварења, што такође представља потенцијалну компликацију, при чему у случајевима великих крварења процењена стопа смртности износи око 11% (96). Зато је веома важно разумети корист и проценити ризик употребе антитромботске терапије у превенцији и лечењу ВТЕ (96).

Према истраживањима око 27-56% ВТЕ пацијената развије ПЕ, што их излаже великом ризику од смрти, а 20-50% развије ПТС у току прве године болести (72,73,92). ПТС представља потенцијално онеспособљавајуће стање, односно стање које умањује квалитет живота због смањене покретљивости, еритема, отицања ногу и бола (72,73,92). Најтежи облик ПЕ је акутна масивна ПЕ, која због масивне опструкције плућног корита, без обзира на лечење, носи стопу смртности већу од 20% (97). Већина клиничких студија открива двоструко више случајева ДВТ у односу на ПЕ, али приликом аутопсија више се дијагностикује ПЕ. Ово неслагање је вероватно због многих недијагностикованих ПЕ за живота и њихово откривање приликом аутопсије код пацијената чији је узрок смрти нека друга болест (92,93). Процењује се да само у САД од ВТЕ годишње умре више од 100.000 људи, а дијагностикује се око 600.000-900.000 ВТЕ пацијената (9,55,60). Процењена стопа годишње смртности у европској унији која се доводи и везу са ВТЕ је око 500.000 (98).

## 1.4 Фактори ризика за настанак ВТЕ

Фактори који повећавају ризик од развоја тромбозе могу се поделити на стечене и наследне. И једни и други су обједињени појмом тромбофилија.

### 1.4.1 Тромбофилија

Тромбофилија сама по себи није болест, већ склоност у виду појачаног дисбаланса механизма коагулације, који изазива повећану тенденцију патолошке интраваскуларне тромбозе, углавном као последица интеракције више наслеђених (предиспонирајућих) и/или стечених (провоцирајућих) фактора, који могу да предиспонирају настанак пролазног или трајног протромботичког стања (62,99,100). Тромбоза узрокована наследном тромбофилијом обично се дешава у млађем узрасту (пре 50-те године живота), често се понавља и компликује са ПЕ, настаје без јасних ризика или после безначајне провокације (61,101-103). Процењује се да поремећај наследних фактора коагулације представља узрок за око 25- 50% ВТЕ догађаја (61). Ипак, већина особа са наследном тромбофилијом никада не оболи од тромбозе, што потврђује чињеницу да је тромбоза мултифакторска болест и да је за настанак болести потребно истовремено присуство и интеракција већег броја фактора ризика (62,99,104). Неки од облика тромбофилија присутан је у приближно 50-70% пацијената са ВТЕ, при чему је у узрочној основи болести најчешће истовремено присутан већи број чинилаца са појединачним малим значајем (99).

Термин тромбофилија први пут су употребили Jordan i Nandorff 1956. године, а 1960. године, код породице у којој је било више случајева оболелих од тромбозе, откривена је снижена концентрација антитромбина у плазми, која је препозната као фактор ризика за настанак тромбозе (104). Израз тромбофилија води порекло из грчког језика, а значи и склоност (афинитет) и угрушак (62).

### 1.4.2 Стечени фактори ризика за развој ВТЕ

Најчешћи стечени фактори ризика који провоцирају хиперкоагулацију су: хируршке интервенције, имобилизација, хоспитализација, упални процеси, трудноћа и постпартални период, употреба оралних контрацептива, гојазност, дијабетес мелитус, хормонска терапија, малигнитет (посебно аденокарцином), анемија српастих ћелија и друге хемолитичке анемије, дуга путовања и друго (28,61,88,104,105). Стечене тромбофилије често су узроковане присуством антифосфолипидних антитела: антикардиолипинских антитела и анти  $\beta_2$  гликопротеин 1 антитела. Присуство ових антитела карактерише повећање прокоагулантног статуса и/или смањење природних антикоагуланаса што

доприноси настанку и венских и артеријских тромбоза (106). У стечене факторе ризика убрајају се и демографске карактеристике, животни стилови и навике.

#### 1.4.2.1 Хируршке интервенције

Висок ризик за ВТЕ представљају хируршке интервенције. Посебно су ризичне велике опште операције које укључују абдоминалне и торакалне операције, велики ортопедски захвати замене кука и колена, онколошке операције, инванзивни неурохируршки захвати велике трауме и оштећење кичмене мождине (107). Венски ендотел може бити оштећен хируршким поступцима или траумом, то изазива смањење нивоа антитромбина и подстиче се хиперкоагулација (108,109). Ризик је знатно повећан ако се приликом хируршких интервенција не примени одговарајућа профилакса (107-109). Посебно су ризичне ортопедске интервенције (прелом кука и елективна артропластика кука и колена), па више од 50% ових пацијената, без антитромботске профилаксе, има компликацију ВТЕ (110). Ови подаци указују да можда директна повреда проксималних вена у време хируршке интервенције доприноси покретању ВТЕ (108). Због продужене непокретности и дуготрајног лежања у јединицама интензивне неге, условљене операцијама и траумама, провоцира се венски застој што резултира локалном хипоксијом, повећањем TF, PAI1, vWF, фибриногена, а све то поспешује хиперкоагулацију и ВТЕ (27,109-111).

#### 1.4.2.2 Малигнитет

Малигнитет повећава ризик за настанак ВТЕ око 4-7 пута, а код ових пацијената подвргнутих операцији, тај ризик је троструко већи у односу на пацијенте без овог оптерећења (74,112). Процењује се да око 4-20% оболелих од малигнитета у некој фази основне болести доживи ВТЕ, што оболелима додатно нарушава квалитет живота и повећава стопу смртности (74,112,113). Врста и величина карцинома утиче на висину ризика за ВТЕ. Велики тумори могу вршити механички притисак и тако направити венске опструкције које су подлога за тромботичке догађаје. Основни патолошки механизам за настанак тромбозе је повећана експресија TF на малигним ћелијама, посебно у стањима узрадровале болести (74,112,113). Хемотерапија, која се у већини случајева примењује код пацијената са малигнитетом може имати тромбогени ефекат. Честе последице малигних болести су општа слабост и смањена покретљивост, што представља додатни ризик за настанак ВТЕ (113).

#### 1.4.2.3 Трудноћа и пуерперијум

Због појачане хиперкоагулације током трудноће, труднице имају 4-10 пута већу вероватноћу да развију ВТЕ, него када нису трудне (114-116). Венски застој је резултат хормонског статуса, јер повећање материце смањује венски тонус и омета проток крви у венама (116). Тромбови се најчешће формирају у левој ноzi, највероватније због притиска утеруса на заједничку илијачну вену (114,117,118). Ове компликације су често узрок матерналног и феталног морбидитета и морталитета. ПЕ је водећи узрок смртности

повезане са трудноћом (116,118). Трудноћа у комбинацији са наследним и/или стеченим тромбофилијама представља кумулативни ризик од тромбозе (116). Међутим, као што је ВТЕ редак у млађој популацији, исто тако је редак и у трудноћама и пуерперијуму, са учесталošћу око 0,6-1,7 случаја на 1.000 порођаја (116,118). Студије углавном извештавају да је најризичнији период у трудноћи за настанак ВТЕ време порођаја и постпартални период (80,116,117).

На повећање учесталости ВТЕ у трудноћи посебно неповољно утичу наследне тромбофилије (61,117,118). У систематском прегледу који је укључио 9 студија уочено је да присуство варијација на генима који кодирају про- и/или антикоагулантне факторе коагулације код трудница повећава ризик од ВТЕ више од 30 пута у односу на жене које нису трудне и немају генске варијације (117).

#### 1.4.2.4 Употреба оралних контрацептива

Од почетка употребе оралних контрацептива, појавила се тромботичка дијатеза као компликација, а већ од 1960. године документовано је да комбиновани хормонски контрацептиви повећавају ризик од ВТЕ и артеријских болести (119,120). Иако су контрацептиви генерално ефикасни у спречавању нежељене трудноће, имају и значајне негативне ефекте (119,120). Чак и данас, када су у употреби најновије генерације ових препарата, ризик од ВТЕ је присутан (80). Треба нагласити да је ризик највиши у току прве године коришћења и да употреба оралних контрацептива повећава ризик за ВТЕ само приликом њихове примене. Општа учесталост ВТЕ код младих жена је 1-3 на 10.000 годишње, а употреба треће и четврте генерације оралних контрацептива, тзв. комбиновани контрацептиви јер садрже и естроген и прогестерон, повећава овај ризик 2 до 6 пута (102,120,121). Коришћење контрацептива нарочито је ризично код жена које имају варијантне генотипове у генима који кодирају факторе коагулације (FV и FII) или имају дефицит природних инхибитора коагулације: антитромбин, протеин С и протеин S (61,115,118).

#### 1.4.2.5 Имобилизација и дуготрајно седење

Стања и околности због дуготрајно смањене покретљивости доводе до венске стазе у екстремитетима (122). Имобилизација доводи до смањене мишићне активности и рада мишићне пумпе која је од круцијалног значаја за одвођење периферне крви. Управо због физичке неактивности и смањене контракције скелетних мишића, код постоперативних пацијената, може настати венски застој (109). Ово се најчешће дешава приликом дуготрајног лежања у кревету због гипсане имобилизације након тешких траума, парализе и тешких болести (109). Такође и ризичне трудноће, које захтевају смањену покретљивост или лежање, представљају ризик за настанак тромбоза (109,123). Поред имобилизације и дуготрајно седење представља значајан фактор ризика за развој тромбозе, нарочито када су присутни и неки други фактори ризика. Овом ризику су посебно изложени путници у авионском саобраћају (80). Истраживања су показала да код путовања авионом постоји 2 до 4 пута повећани ризик од појаве венске тромбозе, а прикликом путовања на дугим раздаљинама тај ризик се креће 3-12% (27,60). Апсолутни ризик од асимптоматског ВТЕ

догађаја, који се односи на летове који су трајали дуже од 4 сата, је 1 случај на 4600 у оквиру 4 недеље након путовања.(123). Поред тога, подаци у студијама указују да је тромбоза повезана са дуготрајним путовањима чешћа код жена (123). Ризик од тромбоза присутан због дуготрајног седења у авионском саобраћају познат је и као „синдром економске класе“ или „путничка тромбоза“ (122). У извесној мери, ризик од ВТЕ присутан је и приликом дуготрајних путовања аутобусом, аутомобилом и возом (124). Посебно су ризична путовања у возилима са уским седиштима, када путовање траје дуже од 4 сата без паузе, а већ постоји и неки други стечени или наследни фактор ризика. У основи овог проблема су биолошки механизми, венски застој и едем, који се често компликују одређеним степеном хиперкоагулације (54). Због тога се дуготрајна путовања могу сматрати и окидачима за ВТЕ код већ постојећих фактора ризика. У циљу смањења нежељених ефеката изазваних дуготрајним седењем приликом путовања, код ризичних појединаца, може се предложити низ мера предострожности, као што су: ношење компресијских чарапа, повремено шетање и вежбање мишића ногу потколенице током лета, избегавање цигарета и алкохола, оптимална хидратација и употреба анти тромботске терапије (124,125).

#### 1.4.2.6 Демографске карактеристике и ризик од ВТЕ

Утицај неких демографских карактеристика, посебно старост, пол и етничка припадност, у великој мери су данас уважене као разлози који утичу на учесталост и преваленцију ВТЕ (61,105). Иако су пол и етничка припадност сталне и непроменљиве карактеристике сваке индивидуе, разумевање зашто се ВТЕ разликује у оквиру ових одредница је важно за ефикаснију дијагнозу, прогнозу и третман ВТЕ.

а) **Старост:** Старија животна доб повећава ризик за настанак ВТЕ, јер са старењем се сви остали ризико-фактори акумулирају, а то потврђује изразито стрм градијент настанка ВТЕ после 50 године живота (61,62,89,108). Значајна разлика и пораст јављања ВТЕ у односу на животну доб може се објаснити присуством коморбидитета у старијем животном добу, који доводе до чешћих хоспитализација и хируршких интервенција (108,126,127). Осим тога, са старењем долази до васкуларне дисфункције, ендотел крвних судова губи еластичност, расте вредност Д димера, повећава се садржај колагена и калцијума, а смањује се ниво простаглицина и NO (128). Такође, код старијих људи, због пораста плазматске концентрације фактора коагулације V, VII, VIII, X, фибриногена и других прокоагулантних протеина, повећава се степен активације система згрушавања крви (71,127). Ове чињенице условљавају да је ВТЕ предоминантно болест људи старије животне доби. Релативан ризик расте за око 2% на сваких 10 година живота (61). У старосној групи млађој од 18 година ВТЕ се јавља у просеку 1 на 100.000, а у популацији старосне доби изнад 80 година тај ризик је повећан више од 80 пута и износи око 8 на 1.000 (61,105). Приближно 60% свих ВТЕ јавља се код особа старијих од 70 година (61). Што се тиче деце, примећено је да се, у оквиру ове популације, ВТЕ најчешће јавља у неонаталном периоду и код адолесцената, а укупна учесталост у општој популацији је 0,07-0,49 на 10 хиљада деце (62,129). Код хоспитализоване деце, учесталост ВТЕ је од 4,9-21,9 на 10.000 (130). Компликације ВТЕ, као што су ПТС и рецидиви, нису у довољној мери истражени у дечјој популацији (130,131).



б) **Пол:** Према наводима из литературе, ВТЕ у оквиру полова је скоро равномерно заступљена, код мушкараца 130 на 100.000, а код жена 110 на 100.000. Међутим, у млађем животном добу који се поклапа са репродуктивним периодом, ризик је нешто више изражен код жена, а у старијем животном добу болест више погађа мушкарце (71,105,132). Ово се делимично може објаснити ризицима који са собом носе трудноћа и пуерперијум, и употребом оралних контрацептива код жена у овом животном добу (71,104,132). Са старењем се учесталост ВТЕ догађа чешће код мушкараца (71,94,133). Прилично је нејасно зашто је учесталост ВТЕ већа код старијих мушкараца него код жена исте животне доби. Једно од објашњења могло би бити засновано на постојању разлика у животним стилевима, нивоу ендогених полних хормона, као и разлика у телесној висини (71,132,134,135). Такође, ризик од понављања тромбозе је већи код мушкараца. У неким студијама наводи се да је ризик од рецидива, код мушкараца чак троструко већи у односу на жене (89,94).

в) **Етничка припадност:** иако многе студије уочавају разлике у учесталости ВТЕ међу етничким групама и расама, повезаност ВТЕ са овим одредницама још увек је контроверзна. Нека истраживања учесталости ВТЕ, заснована на расној и етничкој припадности испитаника, наводе да је ризик од ВТЕ највећи у црној популацији, затим белој, а најмањи ризик је присутан у жутој раси и код особа хиспано порекла (136). Према неким студијама, укупна учесталост ВТЕ у црној раси, у односу на белу, је виша чак за 30-60% (136,137). Такође, Афро- и Латиноамериканци оболевају од фаталне ПЕ у млађем животном добу у односу на белце (138). Студије у којима је испитивана расна припадност и ВТЕ у различитим регионима, показале су одређену разлику у оквиру исте расе, што сугерише да регионалне разлике имају одређену дозу оптерећења или заштите условљену факторима животне средине и животним стилевима (139-141). Такође, квалитет и различит приступ медицинској нези и терапији има одређену асоцијацију са ВТЕ (138,139). Наведене карактеристике делимично објашњавају контрадикторност да је у црној раси учесталост варијација најзначајнијих фактора коагулације, *FV G1691A* и *FII G20210A* присутна у малом проценту, а насупрот томе, повећан градијент ВТЕ (135,138,141). Друго могуће објашњење је да код припадника црне расе постоје неидентификоване генске варијанте одговорне за хиперкоагулацију, независно од *FV G1691A* и *FII G20210A* (86,138).

#### 1.4.2.7 Животни стилови и навике и ВТЕ

Животни стилови и навике имају значајан утицај на ризик од ВТЕ. Утицај физичке активности остварује благотворни ефекат на физиолошке и метаболичке процесе преко побољшања функције ендотела (142). Редовна физичка активност је добро описан заштитни механизам од ризика за артеријску тромбозу, али повезаност са ВТЕ је контроверзна (142,143). Сматра се да умерено вежбање и рекреација имају заштитни ефекат, односно смањују ризик од настанка ВТЕ, док напорне вежбе могу имати провоцирајући, односно негативан утицај на ВТЕ (142-144). Многа истраживања су показала и да умерено конзумирање алкохола и конзумирање кафе у већим количинама (више од три шољице дневно) представља чиниоце који смањују ризик од настанка венске тромбозе (135,141,145,146). Позитиван ефекат алкохола у умереним количинама на смањење ризика од ВТЕ доводи се у везу са његовим утицајем на смањење концентрације фактора (FVII, tPA, PAI1 и фибриногена), а конзумирање кафе остварује позитиван ефекат на ВТЕ

смањивањем нивоа vWF и FVIII (135,141,147,148). Кафа садржи активна једињења, међу којима су од посебног значаја полифеноли који имају противупална својства и на тај начин утичу на здравље ендотела. Такође, доказано је да полифеноли инхибирају активацију тромбоцита, а ендотел и тромбоцити су места синтезе vWF. На овај начин је улога полифенола препозната као главни механизам који објашњава повољан утицај конзумирања кафе на смањење ризика од ВТЕ (135,141,147). Заштитни ефекат од ВТЕ, посебно има свакодневно конзумирање умерених количина вина (149).

Док су штетни ефекти пушења на артеријске кардиоваскуларне болести добро познати, значај конзумирања цигарета за ВТЕ још увек није довољно јасан (150,151). Ипак, у новије време се конзумирање цигарета доводи у везу и са повећаним ризиком од ВТЕ (152). Начин штетног деловања још увек није у потпуности јасан, а једно од објашњења је у проинфламаторном ефекту цигарета на ендотел (152). Утицај цигарета на ВТЕ може бити и посредан, преко болести за које је пушење доказано као јасан ризик, као што су малигне болести, а које представљају значајан фактор ризика за ВТЕ (152-154). Конзумирање цигарета је значајан додатни стимуланс на употребу оралних контрацептива са исходом ВТЕ компликација (119,155).

#### 1.4.2.8 Гојазност

Последњих деценија уочено је да преваленција гојазности у значајном обиму расте широм света, као и то да гојазност представља фактор ризика за многе болести (86). Показано је да повећани индекс телесне масе (енгл. Body mass index-ВМИ), доприноси повећаном ризику од ВТЕ 2-3 пута, посебно у интеракцији са другим протромботичким факторима (86,134). Ризик је додатно повећан код пацијената са акутним стањима као што су трауме или операције (54). Поред тога, прекомерна тежина и гојазност у млађем животном добу, доприноси повећаном ризику од ВТЕ у каснијем животном добу (135).

## 1.5 Генетички фактори ризика за настанак ВТЕ

Генетички фактори ризика имају значајну улогу у мултифакторској основи и етиопатогенези ВТЕ, посебно у популацији млађој од 50 година (61,88,101-103).

Познато је да варијације на нивоу гена одговорних за синтезу и активност фактора коагулације, који учествују у хемостатском одговору, повећавају ризик за настанак венске тромбозе. Генетички фактори ризика који су препознати као најважнији у развоју тромбозе су: варијације на *FV*, *FII*, дефицијенције антитромбина, фибриногена, протеина С и протеина S и не нулта (не-О) крвна група (61,101). У последње време се као фактор ризика разматра и епигенетика, која проучава промену експресије гена без промене у секвенци ДНК (87,156,157). Такође, метилација је један од уобичајених процеса регулације експресије гена која утиче на ћелијску функцију, а препозната је и као епигенетски механизам утишавања транскрипције (156). Сматра се да метилација ДНК и одређена хистонска модификација (цитрулинација), индуковањем неутрофилне апоптозе, играју важну улогу у повећању брзине оклузивних догађаја у венском систему (87,156,157). Осим тога, на метилацију ДНК, посредно, преко регулације Нсу, утиче и ензим МТНFR (158).

Систем крвних група АБО је важна детерминанта нивоа vWF и FVIII (159,160). vWF присутан је у крви у два биолошка облика, један је са великом молекуларном масом (HМV-high molecular weight vWF) а други са ниском молекуларном масом (LHM- low molecular weight vWF). HМV vWF посредује у интеракцији између тромбоцита и оштећеног ендотела, а LHMvWF је молекул са улогом специфичног носача за прокоагулантни FVIII допремајући га на место васкуларне повреде (159,160). FVIII и vWF пролазе екстензивну пост-транслацијску модификацију помоћу гликозилтрансфераза кодираних АБО системом крвних група, тако да носиоци О-те крвне групе имају око 25-30% снижене вредности vWF у плазми, што директно утиче на ниво FVIII (160). Због директног функционалног ефекта АБО локуса на vWF, носиоцима О-те крвне групе обезбеђује се мањи ризик од ВТЕ у односу на носиоце не-О крвних група (160). У бројним студијама у којима је испитивана повезаност АБО крвних група са ВТЕ, нађено је да је ВТЕ значајно учесталији код носилаца не-О крвне групе (160,161).

### 1.5.1 Генске варијације

Убрзани развој технологија у истраживању ДНК је изазвао револуционарна открића у науци, посебно молекуларној биологији, доприносећи убрзаном напретку и трансформацији медицине (162). Једно од највећих достигнућа у биолошким истраживањима представља пројекат секвенцирања и мапирања људског генома (енгл. The Human Genome Project-HGP), који је започет крајем 1990. године а завршен априла 2003. године (162,163). Овај пројекат је подстакao унапређење математичких, софтверских и статистичких метода неопходних за обраду и складиштење свих података које је HGP генерисао (162). Секвенцирање представља утврђивање редоследа нуклеотида, односно

ДНК градивних блокова, у генетском коду и ове информације се сматрају основним сетом наслеђених упутстава за развој човека (162). Дешифровање секвенце људског генома проширило је разумевање на који начин генетичке информације одређују молекуларну структуру, функцију и развој људског организма (163). HGP је открио постојање око 20.500 функционалних гена, што је утицало на ревидирање концепта „један ген – један протеин“, који је до тог открића представљао централну догму у биологији (163). Ово откриће је наметнуло закључке да сложеност људског бића није заснована на количини гена већ на комбинацијама у кодирању различитих протеина (163). Један од неочекиваних резултата HGP је откриће варијација, односно полиморфизама ДНК, који представљају кључна места за лоцирање разлике у људском геному (162-166). Ово откриће наметнуло је питање какав је значај постојања овако великог броја варијација. Истраживања су кренула у правцу да ли варијације унутар ДНК секвенце изазивају болести, да ли су повезане са склоношћу за чешћу појаву неке болести у интеракцији са факторима спољашње средине, да ли могу да утичу на персонализовану терапију, и многа друга (62).

Сва одступања у секвенци ДНК, генски полиморфизми и генске мутације, обједињене су појмом варијације (164). Могу се испољити као измене на нивоу појединачних нуклеотида, које обухватају полиморфизме појединачних нуклеотида (енгл. single nucleotide polymorphisms, SNPs) или тачкасте мутације и као уметање и брисање нуклеотида (инсерцијско/делецијски полиморфизам-I/D), транспозиције, инверзије и понављање тандемских секвенци ДНК (164). Генске варијације за последицу могу имати: синтезу неизмењеног продукта (енгл. silent variant), замену једне аминокиселине (енгл. amino acid, a.a.) другом у протеинском ланцу (енгл. missense variant), која може али не мора довести до измена у функцији протеина, и синтезу превременог стоп кодона (енгл. nonsense variant) која доводи до синтезе мање активног протеина или до одсуства синтезе протеина (164-168). Мутације настају спонтано или под утицајем одређених мутагених фактора у кодирајућој или регулаторној секвенци гена, са учесталошћу мањом од 1%, и често представљају основни молекуларни узрок развоја одређене болести. За разлику од мутација, генски полиморфизми се јављају са учесталошћу већом од 1%, нормално су присутни и код здравих и код болесних, а укупни ефекат је често неутралан, понекад и повољан и не доводи директно до развоја одређене болести (164).

Најчешће испитивани генски полиморфизми су SNPs који представљају варијације у редоследу база у ДНК, односно постојање више од једног алела на истом генском локусу (164). Полиморфни локус је место на коме постоје најмање два алела са учесталошћу већом од 1% (169). Око 99% геномске секвенце је идентично код свих људи, а сва фенотипска разноликост настаје у оквиру мање од 1% геномске ДНК (164,167,169,170). Разлике у секвенци најчешће настају због присуства тандемских понављања и SNPs (167-169). Процењује се да у геному једне особе постоји око 10 милиона SNPs, односно да се јављају у просеку 1 на 300-1.000 нуклеотида (167-170). Ове варијације могу бити јединствене или се јављају код многих појединаца у оквиру популације. Већ је откривено око 85-100 милиона различитих SNPs широм света (156,170). Највећи број SNPs нема ефекта, односно не доприносе фенотипским варијацијама, и њихова учесталост у хуманој популацији је последица случајности (170). Међутим, неки SNPs могу се довести у везу са повећаном предиспозицијом за настанак мултифакторских болести (170). Посебан изазов за изучавање SNPs представљају полигенске болести, где је за развој одређеног фенотипа или болести, уз

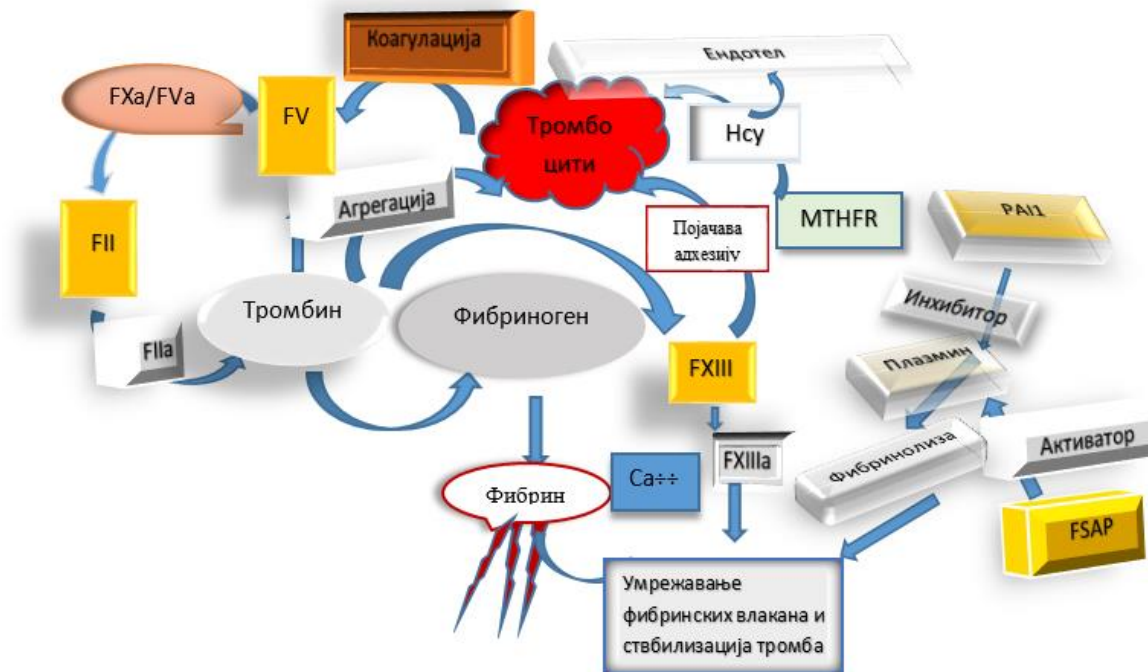
стечене факторе ризика, потребан истовремени утицај више гена. С обзиром на то, препознавање и идентификација таквих SNPs је од значаја за процену индивидулне генетичке склоности за ризик од настанка одређене болести, а самим тим и за превенцију и правовремену терапију (88,163).

SNPs настају заменом, брисањем или уметањем једног нуклеотида и могу бити локализовани у кодирајућем или некодирајућем региону ДНК (166-169). Приликом замене нуклеотида најчешће аденин (А) бива замењен гуанином (G) (A>G) или цитозин (C) тиминим (T) (C>T), (ређе су трансверзије A> C/T и G> C/T) (166). Брисањем се уклања један нуклеотид, а уметањем убацује један нуклеотид у секвенцу ДНК (167,168). За разлику од мутација, присуство SNPs у кодирајућим секвенцама гена, поред тога што могу имати директне ефекте на транскрипцију гена и транслацију протеина, не доводи обавезно до промене редоследа а.а. у молекулу протеина и његове функције (162,169). С обзиром на то да је само 1% ДНК организован у гене који кодирају протеине, SNPs локализовани у некодирајућим секвенцама ДНК и интергеним регионима су много чешћи, не утичу на синтезу протеина, али могу утицати на алтернативну обраду транскрипта (169-171). Ипак, новија истраживања су показала да је значајан део некодирајуће ДНК секвенце функционално укључен у генску регулацију (169-171). Недавна истраживања су открила значајну количину патогених варијација лоцираних у интронима, што упућује да истраживања интронске секвенце могу помоћи у идентификовању узрочних мутација за многе болести (170,171). SNPs унутар промоторског региона могу модификовати места везивања фактора транскрипције, утичући тако на експресију гена (172,173). Они су најчесталији, али су мање истражени, јер су већу пажњу истраживача заокупљала истраживања SNPs у кодирајућим секвенцама (173). Што се тиче номенклатуре SNPs, у најширој употреби је означавање позиције нуклеотида са позитивним (+) и негативним (-) предзнаком од стартног места транскрипције. Нуклеотиди узводно према 5' крају, означавају се негативним предзнаком, а нуклеотиди низводно од места почетка транскрипције, према 3' крају имају позитиван предзнак (174,175).

Последњих деценија истраживачи су интензивно проучавали различите гене кандидате и њихове полиморфизме са циљем да се разјасни појединачни значај и њихово удруживање са настанком ВТЕ (176,177). Захваљујући технологији нове генерације секвенцирања, (енгл. next generation sequencing-NGS) и биоинформатичке анализе, број новооткривених SNPs непрестано расте, а самим тим и откривање функционалних импликација SNPs на биолошки процес сложене болести (178,179). Објављено је много студија у којима су се истраживачи бавили испитивањем учесталости SNPs гена који кодирају факторе коагулације и фибринолизе и повезаности са ВТЕ (180-183). Велики допринос разумевању генетичке основе мултифакторских болести допринеле су геномске студије асоцијације које анализирају удруживање великог броја полиморфизама на великом узорку (енгл. Genome-wide association study-GWAS) (87,176). Управо су многе GWAS студије установиле повезаност између SNPs гена који кодирају факторе хемостатског система и болести повезане са тромбозом (87). Мета-анализа података, објављена 2015. године, из 4 кохортне и 8 студија типа случај-контрола, које су укупно укључиле преко 7,5 хиљада испитаника са дијагностикованим ВТЕ, преко 52,5 хиљаде контрола и преко 6,5 милиона анализираних SNPs, утврдила је 9 генских локуса значајно повезаних са настанком ВТЕ, укључујући гене који кодирају протромбин (FII) и фактор коагулације V (FV) (182). GWAS студија из 2019.

године, у којој је испитивана повезаност 13 милиона полиморфизама са ВТЕ, за 26.066 ВТЕ пацијената и 624.053 здравих испитаника, поред већ утврђених локуса из претходних студија, идентификовала је повезаност још 22 нова локуса са ВТЕ (180). Такође, резултати наведене студије су показали да постоји веће преклапање генетичких фактора ризика између венске и артеријске тромбозе него што се раније мислило. Без обзира на велики број новооткривених локуса са ризиком за ВТЕ, највеће познате генетичке ефекте на ВТЕ имају гени за: *FII*, *FV*, *FXI*, фибриноген и АБО (176). Важно је напоменути да се број SNPs повезаних са ВТЕ стално повећава, а доказано је да су за неке локусе сигнали вероватно посредовани експресијом суседног гена (176). Чињеница да су ген-ген интеракције (ефекат једне генске варијације је вероватно посредован неком другом генском варијацијом) и интеракције ген-средина присутни у мултифакторским болестима представља изазов у идентификацији SNPs и фактора спољашње средине који су удружени са настанком ових болести. Веома често појединачни ефекат једног SNPs на болест је мали, али се он значајно може појачати у присуству другог SNP, или више њих, или под утицајем провоцирајућих фактора средине (61,184). Управо зато испитивање истовременог утицаја већег броја SNPs има велики значај за предвиђање ризика за настанак ВТЕ, како би се на основу појединачног и заједничког ефекта SNPs на појаву ВТЕ, у геномски скор процене полигенског ризика од ВТЕ, укључили као генетички маркери они SNPs са највећим процењеним ризиком.

Без обзира на то што су објављени бројни радови о учесталости и повезаности многих генетичких фактора ризика са настанком ВТЕ, још увек је велики број контроверзних резултата о значају полиморфизама за испољавање ВТЕ, што сугерише да предиктивна вредност SNPs алтерација још увек није јасно дефинисана. Ово се посебно односи на значај SNPs: *PAII*, *FXIII-A*, *FSAP* и *MTHFR*. Такође, улога варијација *FII* 19911A>G и *FV* HR2 6755A>G, као фактора ризика у настанку тромбоза још увек није довољно јасна. Имајући ово у виду, наведени SNPs су укључени у наше истраживање, како би на неки начин дали мали допринос у процени истих о повезаности и предвиђању ризика за ВТЕ.



Слика 1. Шематски приказ улоге FV, FII, FXIII, MTHFR, PAI1 и FSAP у коагулацији

## 1.5.2 Фактор коагулације II (FII)–Протромбин

Протромбин је витамин К зависан гликопротеин, са молекулском масом око 72 kDa. Нормална физиолошка концентрација у крви је око 0.1-0,2 mg/ml, са полуживотом око 60 h (185). Синтетише се углавном у јетри и излучује у крвоток као неактивни проензим тј. зимоген, и у том облику остаје до тренутка активације (185).

Полипептидни ланац протромбина садржи 579 а.а, структурно распоређених у неколико домена: Gla регион који садржи 10 остатака  $\gamma$ -карбоксилне глутаминске киселине одговоран за везивање протромбина са прокоагулантном фосфолипидном површином, два домена у облику петљи стабилизваних са три дисулфидне везе за које се сматра да су укључени у интеракције протеин-протеин и домен серинске протеазе (186-188). Домен серинске протеазе је ензимски активан и састављен је од тешког и лаког ланца (186). Пре излучивања у плазму, протромбински протеин је подвргнут постранилацијским модификацијама, пролази кроз неколико реакција како би се генерисао активни ензим алфа ( $\alpha$ ) тромбин. Он је састављен од лаког A ланца, који садржи 36 а.а. и тешког B ланца који садржи 259 аа, међусобно повезаних дисулфидним везама (186,187). Сматра се да A-ланац тромбина има улогу алостерног ефектора у ензимским реакцијама и улогу структурног скелета за стабилизацију и обезбеђивање функционалности активног места домена B (187). Протеазни домен тромбина смештен је на B-ланцу (187,188). На тромбину су значајна и анјон везујућа места чија је улога у препознавању супстрата са којима тромбин остварује интеракцију (186,187).

### 1.5.2.1 Улога FII у коагулацији

Протромбин је прекурзор серинске протеазе тромбина, која заузима централно место у процесу коагулације (185). Помоћу протромбиназног комплекса FXa/FVa, уз присуство фосфолипида и Ca, протеолитички се претвара у активни протеазни тромбин (186,187). Главна улога тромбина је катализа процеса трансформације фибриногена у мономере фибрина, повећавање пропустљивости ендотела и стимулација агрегације тромбоцита, што му даје особину прокоагулантног фактора (185,189). Активирањем PARs, делује као сигнални молекул за посредовање низа реакција укључених у механизме позитивне и негативне спреге и на тај начин регулише ток коагулације (185,188-190). Управо, способност тромбина да активира PARs, чини га најзначајнијим ендогеним агонистом примарне хемостазе (185,189). Тромбин делује као активатор различитих про-упалних путева и на продукцију про-инфламаторних цитокина, а све то утиче на појачану коагулацију (185,189). Осим тога, тромбин је снажан митоген, и на тај начин је укључен у повећање метастатске способности неопластичних ћелија, подстичући раст и инвазивност туморских ћелијских линија, што представља ризик за патолошке тромбозе (190,191). Тромбин такође има улогу у регенерацији ткива, ембрионалном развоју и упалним процесима (185,189,190). Предоминантно место експримирања *FII* је у јетри, а експримирање овог гена у знатно мањој мери дешава се у мозгу, бубрезима, плаценти, дијафрагми и ткиву надбубрежне жлезде (188-190).



### 1.5.2.2 Структура гена *FII*

Ген за *FII* је локализован на кратком краку хромозома 11, 11p11.2, у близини центромере (190,192). Величина гена је око 21 кило база (кб), односно од места иницијације транскрипције до места полиаденилације садржи 20241 базних парова (енгл. base pair-bp) (190,192). Ген је структурно подељен на 14 егзона, дужине од 25 до 315 bp, и 13 интрона чија је дужина од 84 до 9447 bp (187,190). Интрони чине око 90% гена, а у њима је присутан велики број (41 копија) Алу понављајућих секвенци чија је дужина приближно 300 bp (190). *FII* човека је јединствен по томе што се састоји од приближно 50% понављајућих ДНК секвенци унутар интрона, а највећи број поновака смештен је на претпоследњем интрону и представља око 40% укупне величине *FII* (190). Промена само једног bp, G→A, у *FII* 3' некодирајућем региону (енгл. untranslated region-UTR), на позицији 20210, описана је 1996. године (193,194). Овај регион због своје неканонске архитектуре представља динамичку регију и потенцијално место за настанак функционалних генских варијација повезаних са мултифакторским болестима (190,192). С обзиром на то да је локус 20210 изван подручја кодирања протромбина, поменути SNP не утиче на структурну промену протромбинског молекула (194). Полиморфизми у *FII*, за које се претпоставља да су повезани са ризиком од ВТЕ а који нису довољно истражени су: 19911A>G, 20068C>T и 20211C>T (195-197).

### 1.5.2.3 Учесталост полиморфизма *FII* 20210 G>A

Преваленција *FII* 20210G/A у општој белој популацији је 1-6%, са значајним разликама у преваленцији у односу на етничку припадност и географску распрострањеност (102,194). У северној Европи преваленција је 1,7%, а на подручју Медитерана двоструко већа (194). Изразито је ретка заступљеност у Азији, Африци и домородачком становништву Јужне Америке, Аустралије и Океаније (102,194). Код пацијената са ВТЕ, варијантни хетерозиготни генотип *FII* 20210G>A присутан је код 6-18%, и повећава ризик за ВТЕ 3-4 пута (198,199). Варијантни хомозиготи су веома ретки, 1 на 10.000 становника, а носиоци имају 30 пута већи ризик од ВТЕ (198,199).

## 1.5.3 Полиморфизам *FII* 19911A>G

У последњем интрону гена за протромбин, интрону 13, идентификован је полиморфизам 19911A>G са функционалном улогом, који се, такође, повезује са повећањем концентрације протромбина у крвној плазми (200,201). Полиморфизам 19911A>G остварује ефекат на активност протромбина тако што присуство овог варијантног генотипа употпуњује уобичајени интронски G триплет, који утиче на процес полиаденилације и побољшава ефикасност обраде протромбинске информационе рибонуклеинске киселине (iRNK) (200). Међутим, од 2001. године када је овај полиморфизам почео да се разматра као фактор ризика за повећану склоност за тромбозе, до 2021. године пријављено је свега неколико студија случај-контрола (према нашим сазнањима само 6) у којима је испитивана повезаност *FII* 19911A>G са ризиком од ВТЕ (201). Резултати студија су неконзистентни, у три студије је утврђен умерен ризик за тромбозе док у осталим није утврђена повезаност,

па његова улога као независног фактора ризика за повећан ризик од тромбозе још увек није разјашњена (197,202,203-206).

## 1.5.4 Фактор коагулације V (FV)

Кофактор FV је кључни неензимски кофактор комплекса протромбиназе (203). Према структури је једноланчани гликопротеин, величине приближно 330 kD, са полуживотом од 12 до 36 сати и концентрацијом у плазми од 20 nmol/l (207,208). Приближно 80% FVa циркулише у плазми, а око 20% од укупног FVa депоновано је у  $\alpha$ -гранулама тромбоцита (207,208). Кодирани молекул FV састоји се од 2224 а.а. (207) Молекул зрелог FVa, који се излучује у плазму грађен је од 2196 а.а., јер се сигнални пептид од 28 а.а. отцепљује након овог премештања (207). FV у крви циркулише у две различите изоформе, FV1 и FV2, које имају различите моларне масе, а изоформа FV1 има већи прокоагулантни потенцијал за генерисање тромбина у односу на FV2 облик (209). FV је у литератури означен као лабилни фактор или проакцелерин а полиморфизам FV 1691G>A и као FV Лаиден, назван према граду Лаидену у коме је откривена ова генотипска варијанта (102,207). FVa састоји се од 6 домена: три домена А (A1, A2, A3), средишњег домена В и два домена С (C1 и C2) распоређених овим редоследом A1-A2-B-A3-C1-C2 (207-210). Троструки домен А и двоструки домен С показују приближно 40% структурне и функционалне сличности са одговарајућим регионима у FVIII (207,210). Домен В људског FVa, састоји се од 836 аа, представља око 50% укупне масе протеина FVa, и садржи необичне регионе тандемских поновака, два тандемска понављања од 17 а.а. и 21 тандемских понављања од 9 аа. (207,210). Овај домен не показује значајну сличност у секвенци ни са једним познатим протеином и није конзервиран међу врстама, док су функционално важни домени А1-А3 и C1-C2 високо очувани (208,210) Сматра се да је улога домена В у одржавању FV у облику профактора и антикоагулантној функцији стимулисањем инактивације FVIII преко APC (енгл. Activated protein C-APC) (209,211,212). Активација FV започиње протеолитичким уклањањем домена В (209,212).

### 1.5.4.1 Улога FV у коагулацији

Кофактор FV има двоструку улогу у одржавању хемостатске равнотеже (207,210). У нормалним, физиолошким условима, FV функционише као антикоагулантни кофактор за протеин С и TFPI и има веома низак афинитет за FXa (210,211). Прокоагулантну улогу остварује када се активира тромбином или FXa у високоактивни неензимски кофактор FVa градећи протромбиназни комплекс FXa/FVa, који представља главни активатор протромбина (207,210,211). FVa је хетеродимерни молекул, служи као есенцијални протеин у процесу коагулације и одговоран је за већину међупротеинских реакција и интеракција између протеина и мембране ендотела и тромбоцита (207,209,210). Када се на тромбоцитној мембрани FVa веже са FXa, каталитичка активност FXa се повећава за око 300.000 до милион пута у односу на његово самостално деловање, што обезбеђује продукцију велике количине тромбина (207). Основни допринос FVa у функцији протромбиназе је задржавање FXa на површини мембране (212). Такође, док циркулише у плазми као неактивирани проензим испољава антикоагулантно својство у садејству са активиранима протеинима С и S, појачавањем инактивације FVIIIa везаног у мембранском комплексу теназа FIXa/FVIIIa (207,212). Једноланчани FV нема способност везивања FXa, зато је активација FV у FVa од суштинског значаја за његову биолошку функцију (211-215). FV је у нормалним

физиолошким условима инактивиран помоћу APC. Управо је уравнотежено деловање FV регулисано протеолитичким деловањем природног антикоагуланса APC, тако што APC након пресецања FVa на три места инактивира FVa ограничавајући његову прокоагулантну активност (207,208,210). Овај механизам представља један од основних принципа физиолошке инхибиције процеса коагулације (207,208,210). Најважније место инактивације FVa је на позицији Arg506, а након пресецања и на позицији Arg306, постиже се потпуна блокада активности FVa (210,213). Почетно место цепања је на позицији 506 и то резултира 40 пута смањеним афинитетом FVa према FXa (210). Цепањем на позицији 306 и одвајањем домена A2 у потпуности се инактивира FVa. Деловање APC на FV доприноси инактивацији активираниог фактора VIII (FVIIIa) и на овај начин FV остварује своју антикоагулантну улогу у хемостази (207,208).

#### 1.5.4.2 Структура гена FV

Ген за FV је величине приближно 80 кб, састоји се од 25 егзона и 24 интрона, а смештен је на дугом краку хромозома 1, локус 1q24.2 (207,211,215,216). Познато је око 140 полиморфних варијација повезаних са квантитативним дефектом FV, а међу њима највећи број су „missense“ и „nonsense“ варијације (216,217). Најзначајнија варијација која се повезује са повећаним ризиком од ВТЕ је FV 1691G>A (102,211,218,219).

Откриће резистенције на APC, 1993.г, а затим 1994.г. откриће SNP FV 1691G>A који је одговоран за ову резистенцију, направило је прекретницу у истраживању наследних фактора коагулације (207). Установљено је да је за резистенцију на APC одговорна замена нуклеотида G→A на позицији 1691 у FV, што резултира заменом а.а. аргинина глутамином на позицији 506 у протеину FV (207). Управо, ова нуклеотидна измена, спречава да APC пресече FV на позицији 506, а последица тога је да се FVa инактивира 10-20 пута спорије у односу на неизмењену секвенцу, што последично доприноси повећаној активацији осталих фактора коагулације и повећање продукције тромбина, а самим тим и хиперкоагулабилног стања (102,207,215). Више од 95% резистенције на APC узроковано је FV 1691G>A варијацијом, а мање од 5% узроковано је стеченом резистенцијом (210,220).

#### 1.5.4.3 Учесталост полиморфизама FV 1691G/A

У општој популацији учесталост полиморфизма FV 1691 G>A креће се од 1-8% (102). Најзаступљенији је код беле популације (3-8%), ређе је заступљен код Африканаца и Азијата, а према истраживањима готово да није присутан у Југоисточној Азији, Јапану, Африци и код аутохтоних популација у Аустралији (102,221). Варијантни хомозиготи су веома ретки, отприлике једна особа на 5.000 има генотип FV 1691A>A, а носиоци оваквог генотипа имају значајно повећан ризик од тромбоза у односу на носиоце варијантног хетерозигота (102,221).

### 1.5.5 Хаплотип R2 (HR2)- FV HR 26755A>G

Хаплотип се састоји од групе полиморфизама у различитим егзонима у истом гену, односно скуп варијација ДНК на суседним локусима који теже да се наслеђују заједно (217,222). FV HR2 је сложени хаплотип, састоји се од >10 (13) функционално повезаних SNP у кодирајућем региону FV (216). Највећи број ових хаплотипова је смештен у егзону 13, а присутни су и у егзонима 8, 16 и 25 (216,217,222). Тачан механизам којим R2 хаплотип повећава ризик од ВТЕ још увек није јасан, и да ли уопште без истовременог присуства других полиморфизама у FV има утицаја на поремећај коагулације (102,216). Међутим, показано је да FV HR2 утиче на смањену концентрацију FV, што је праћено благом резистенцијом на APC (216,223-226). Такође, FV HR2 утиче на повећану продукцију изоформе FV1, која има израженију прокоагулантну активност (222). У *in vitro* условима FV1 генерише 7 пута више тромбина, чиме се делимично може објаснити повећан ризик од развоја ВТЕ код људи са варијантним генотипом FV HR26755A>G (102,217). Најчешће испитивана хаплотипна варијанта FV HR2 је 4070A>G смештена је у егзону 13, а вероватно најзначајнија 6755A>G смештена у егзону 25, домен C2, Ова варијанта доводи до замене а.а. Asp у Gly на позицији 2194, утиче на савијање протеина и повишен ниво гликолизације, који је нормално само делимично гликолизован (217,222,223). Неке *in vitro* студије су показале да замена а.а. Asp у Gly доприноси да се молекул FV задржава у ендоплазматском ретикулуму, а то је место где погрешно савијени протеини имају тенденцију да буду заробљени и деградирани, чиме се значајно слаби укупна функција протеина FV (217).

### 1.5.6 Фактор коагулације XIII

За разлику од осталих трансглутаминаза које су мономерне, функционални молекул FXIII је комплексан (227). У ћелијама и плазми циркулише у облику неактивног ензима који је састављен од по две каталитичке подјединице А и две некаталитичке подјединице Б, повезане нековалентном везом у хетеротетрамер FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (227-229). Молекулска тежина овог хетеротетрамера је 325 kDa (230). FXIII је једини молекул трансглутаминаза који се активира комбинацијом везивања Ca и протеолитичког цепања тромбина N-терминалног активацијског пептида, састављеног од 37 а.а. (229). Подјединице FXIII синтетишу се одвојено. Подјединицу А чине 732 а.а. са молекулском масом од 83 kDa, у плазми је присутна искључиво везана у комплексу са подјединицом Б, синтетише се у мегакариоцитима и моноцитима (макрофагима) и представља активни део FXIII (227-231). Структурно је подељена на 5 домена: каталитичко језгро, N-терминални активацијски пептид, β- сендвич, барел 1 и барел 2 (227,228,232-234). Активацијски пептид једне подјединице активира активацијско место друге, по принципу ланчане реакције. Ова структура стабилизована је помоћу неколико водоничних веза и мостова соли између активирајућег пептида и каталитичког језгра једне подјединице и активирајућег пептида друге субјединице (234). Приближно 50% укупне стабилношће активности фибрина у крви евидентирано је на тромбоцитима, у којима FXIII постоји као димерни молекул састављен само од две подјединице А (FXIII-A<sub>2</sub>) (233,234). Управо на тромбоцитима, FXIII-A<sub>2</sub>

присутан је у изразито високој концентрацији, и то 100-150 пута већој у односу на концентрацију у плазми, што у процесу коагулације доприноси појачаној адheziji тромбоцита (230,235,236). У циркулацији, фибриноген служи као носач неактивног облика FXIII. Просечна концентрација плазматског FXIII је 14 до 28  $\mu\text{g/ml}$  а полуживот је 9-14 дана (233,237).

#### 1.5.6.1 Улога FXIII у коагулацији

Иако FXIII делује на преко 140 супстрата у плазми, његова кључна улога је ковалентно умрежавање фибринских угрушака, што обезбеђује чврстоћу и стабилизацију фибриноског угрушка и заштиту од преурађене фибринолитичке разградње (227,228). Катализује настајање попречних ковалентних веза између глутаминских и лизинских остатака два суседна  $\gamma$  и  $\alpha$  -ланца фибрина међусобно (димери и полимери) и са осталим протеинима плазме, као што су  $\alpha$ 2-антиплазмин, фибронектин, колаген, vWf и TAFI (227-229). Управо овакво интрамолекуларно умрежавање фибринолитичких инхибитора са фибрином доприноси механичкој чврстоћи фибринских полимера и обезбеђује фибринолитичку отпорност угрушка (228,233,237). Ћелијски облици FXIII су присутни у више типова ћелија, као што су тромбоцити, моноцити, мегакариоцити и остеобласти, а доказано је да, осим у хемостази, имају улогу и у ангиогенези, зарастању рана, остваривање интеракције између ембриона и децидуе материце за успешан исход трудноће и друго (227,238).

#### 1.5.6.2 Структура гена *FXIII-A*

Ген за FXIII-A смештен је на р краку хромозома 6, 6 (p24-p25), састоји се од 160 кб и показује везу са главним комплексом хистокомпатибилности. Састоји се од 15 егзона и 14 интрона (228,233,235). Познато је више од 100 варијација у FXIII-A, које доприносе смањењу концентрације и функције FXIII или чак и потпуни недостатак FXIII-A који се повезује са тенденцијом спонтаног крварења (233). У оквиру алелне хетерогености FXIII-A, налази се и неколико уобичајених SNPs различитог функционалног и фармаколошког значаја (235,236). То су: Val34Leu, Tyr204Phe, Leu564Pro, Val650Ile и Glu651Gln на гену за FXIII-A, а на гену FXIII-B: pHis95Arg и c.1952+144C>G у интрону К (239). Најзаступљенији и најчешће испитиван је полиморфизам Val34Leu, који представља missense варијацију у кодону 34, егзон 2, у којој је G замењен T што у протеину доводи до замене валина леуцином, Val34Leu (235,239). Нема утицаја на концентрацију и ензимску активност FXIII-A у плазми, али значајно утиче на брзину активације FXIII тромбином и на структуру фибриноског угрушка у зависности од концентрације фибриногена у плазми, мењајући стопу стабилизације фибрина (235,236,240). Тако, код носилаца алела Leu34 отцепљивање активацијског пептида и активација FXIII тромбином дешава се 2,5 пута брже него код носилаца алела Val34 што доприноси бржем умрежавању фибрина и већој уградњи инхибитора плазмине у фибрин (230,235).

### 1.5.6.3 Учесталост полиморфизма *FXIII-A* 102G>T (Val34Leu)

Епидемиолошке студије су показале изразиту разлику дистрибуције полиморфизма Val34Leu у здравој популацији, према етничкој и географској припадности. У белој популацији је присутан око 20-45%, код Африканаца око 29%, Индијанаца око 52%, а код Азијата само 2,5% (241-243).

## 1.5.7 Метилен тетраhydrofolат редуктаза-MTHFR

Кључни ензим за метаболизам фолата и регулацију нивоа хомоцистеина (Hcy) је MTHFR (244-246). Катализује реакцију конверзије 5,10-метилентетраhydrofolат (5,10 МТНФ) у 5-метилентетраhydrofolат (5 МТНФ), примарни циркулишући облик фолата у крви који се користи у реметилацији Hcy у метионин (244,247). Углавном се експримира у јетри и бубрезима (158,246). Припада флавопротеинима, ензимима који су укључени у широк спектар биолошких процеса, а то су: метилација нуклеинских киселина и протеина, уклањање слободних радикала који доприносе оксидативном стресу и репарацији оштећене ДНК (247). Неопходни кофактори за метаболизам Hcy су витамини Б6 и Б12 и фолати (244). Активни протеин MTHFR је хомодимер са молекулском масом од 70-77 kDa, а садржи 656 а.а. (158,248).

### 1.5.7.1 Улога MTHFR ензима у коагулацији

Смањење активности MTHFR ензима доводи до поремећене метилације Hcy и повећања његове концентрације у крви (249). Изузетно висок ниво Hcy исцрпљује фолну киселину, која је организму неопходна за нормално функционисање, повезан је са низом медицинских стања и назива се хиперхомоцистеинија (158). Нормалне вредности Hcy у плазми здравих људи су 5-15  $\mu\text{mol/l}$ . Ниво Hcy између 16-30  $\mu\text{mol/l}$  класификован је као умерено повећан, 31-100  $\mu\text{mol/l}$  средње повећан, а вредност изнад 100  $\mu\text{mol/l}$  доприноси тешкој хиперхомоцистеинији (158,248,250). Тешки облици хиперхомоцистеиније су ретки, чешћи су облици са умерено повишеним нивоима Hcy а за њихов настанак су одговорни и генетски и стечени фактори ризика (158,244). Стечени фактори ризика се углавном односе на смањен унос фолата и витамина Б6 и Б12 (248,250).

### 1.5.7.2 Структура гена *MTHFR*

Ген *MTHFR* локализован је на хромозому 1, на позицији 1p36.3 и садржи 12 егзона и 11 интрона (158,249,250). Први егзон *MTHFR* је некодирајући, а осим кодирајућих региона идентификован је и UTR, који је допринео високој хетерогености транскрипта (158). Секвенцирањем гена установљено је око 34 ретких, штетних мутација, које изазивају хиперхомоцистеинију са хомоцистенуријом и 9 уобичајених полиморфизама у *MTHFR* са умереним ефектом на функцију ензима (244). Осим тога, на гену је описано и 8 nonsense варијација чија улога није довољно позната, а чак има претпоставки да неке хомозиготне

nonsense варијације представљају корисне алтерације, јер представљају природне делеције различитих делова крајева С протеина (244).

Секвенца *MTHFR* је високо очувана (249). Најчешћа SNP варијација је у егзону 4, доводи до замене нуклеотида цитозина тимином (С→Т), на позицији 677, што у протеину узрокује замену а.а. валина конзервираним аланином на позицији 222 (Ala222Val) и доводи се у везу са умереним повећањем серумског Нсу (249). Ензим са измењеном а.а. показује идентична каталитичка својства као WT ензим (Ala222Ala), али је термолабилан, што због убрзане деградације значајно умањује његову активност (158).

### 1.5.7.3 Учесталост полиморфизма *MTHFR* 677C>T

Полиморфизам 677 C>T је веома чест у белој популацији (30% до 50%) и код Азијата, а веома ретко заступљен у афричкој популацији (1-2%) (250,251). У Европи учесталост *MTHFR* 677C>T расте од севера према југу, тако је полиморфизам 677C>T у Норвешкој заступљен 28% а у Италији око 45% (251). Учесталост варијантних хомозигота за алел Т, 677 T>T, у здравој европској популацији је 5-15%, а у популацији хиспаноамериканаца око 20% (250,251). Овај полиморфизам је често испитиван код пацијената са тромбозом, резултати су веома опречни, од оних који су сугерисали да је значајан фактор ризика за тромбозе до оних који су утврдили сличну учесталост варијантних хетерозигота и хомозигота у популацији са ВТЕ и здравој популацији (242,245,251-254).

Осим 677 C>T, у егзону 4, значајна је варијација у егзону 7, на позицији 1298, А→С, што у ензиму резултира заменом глутаминске киселине аланином (244,249). Ова измена доводи до смањене ензимске активности *MTHFR* али не доводи до појачане осетљивости на температуре (248). Хиперхомоцистеинемија је присутна само код хомозигота, а смањена активност *MTHFR* је израженија и у случајевима истовременог присуства полиморфних варијанти *MTHFR* 677 C>T и *MTHFR* 1298, А>С (двоструки хетерозигот) (244).

## 1.5.8 Инхибитор активатора плазминогена-РАИ

Најважнији фактор инхибиције фибринолизе је једноланчани гликопротеин РАИ, из породице инхибитора серинских протеаза (енгл. serine protease inhibitor-SERPIN) (255,256). Грађен је од 379 а.а., а молекулска тежина је 48 kDa (257). Синтетише се у ендотелним ћелијама, хепатоцитима, мегакариоцитима, ћелијама глатких мишића, фибробластима, моноцитима, макрофагима, адипоцитима, ендометријуму, перитонеуму, мезотелним ћелијама и срчаним миоцитима (257). Након синтезе, РАИ се углавном складишти у тромбоцитима или на субендотелном матриксу, а може се излучити и у крвоток (255,257). Тромбоцити и ендотелне ћелије синтетишу нестабилан активни облик РАИ, који се у плазми веже за витронектин и тако постиже стабилност (257). Нормална концентрација РАИ ензима у плазми креће се од 6-80 ng/ml, а на 37C° спонтано губи функционалну активност након 1-2 сата (257).



### 1.5.8.1 Улога PAI1 у коагулацији

Због способности инхибиције оба активатора плазминогена, PAI1 представља главни инхибитор ендogene фибринолитичке активности (257,258). Ковалентним везивањем за активаторе плазминогена, блокира конверзију плазминогена у плазмин и на тај начин спречава константно стање фибринолизе (257). Појачана експресија PAI1 сузбија фибринолизу, што последично доводи до патолошког таложења фибрина и оштећења ткива са могућим последичним тромботичким догађајима (259,260). Такође, PAI1 директно ступа у интеракцију са ћелијама васкулатуре и учествује у регулацији ћелијске репликације, пролиферације, адхезије, апоптозе, ангиогенезе (257). Повећање концентрације PAI1 повезано је са многим болестима: мождани удар, инфаркт миокарда, ТДВ, атеросклероза, карцином и друго (255,257,261). Поред генетске детерминације, на концентрацију PAI1 протеина могу утицати и неки други фактори: хормони, цитокини, ендотоксини, ВМ1, плазматски липиди, инфламација (256). PAI1 се сматра реактантом акутне фазе, његова активност зависи од стимулације фактора упале, тако да су у условима атеросклерозе и метаболичким синдромима нивои овог ензима повишени (257). Концентрација PAI1 протеина у плазми прати циркадијалну активност. Његова концентрација достиже највиши ниво у раним јутарњим сатима (257). Од егзогенних фактора, пушење се доводи у везу са повишеном концентрацијом PAI1 протеина (262).

### 1.5.8.2 Структура гена PAI1

Ген за PAI1 локализован је на хромозому 7 (7q21.3-q22.1) и садржи 8 интрона и 9 егзона (263,264). Унутар гена описано је неколико полиморфизама од којих је до сада најчешће испитиван I/D полиморфизам једне базе G у промоторском региону PAI1 гена, који може проузроковати промене у брзини транскрипције што директно утиче на концентрацију PAI1 у плазми (258,263). Прекомерна експресија PAI1 доводи до поремећаја активности фибринолитичког система, чиме се повећава ризик од тромботичких догађаја. Резултати испитивања учесталости и повезаности овог полиморфизма са ВТЕ су веома хетерогени, што даје на значају новим истраживањима (224,242). Осим повезаности са тромбозом, неке студије су показале да су 4G/4G и 4G/5G алелске варијанте фактори ризика за спонтане побачаје, инсулинску резистенцију, дијабетес тип 2, астму, лошу прогнозу карцинома дојке (255-259,265). Такође, са старењем се повећава концентрација PAI1 (256-258).

### 1.5.8.3 Учесталост полиморфизма PAI1 4G/5G

Као и за остале генетичке факторе коагулације и учесталост 4G/4G и 4G/5G варијација PAI1 варира зависно од етничке и географске припадности. Према објављеним подацима, у здравој популацији, 4G алел је најучесталији у азијској популацији (59%), затим у белој популацији (51%), а нешто ређе је заступљен у афричкој популацији (25%) (266). Без обзира што је повећана концентрација PAI1 условљена, потенцијално штетном, делецијском варијацијом 4G, чињеница да је висока учесталост варијације 4G присутна и у здравој популацији, упућује на корисност истраживања I/D полиморфизма PAI1 са ризиком од ВТЕ, како самостално тако и у комбинацији са другим генетичким факторима коагулације.

### 1.5.9 Активирајућа протеаза фактора VII (FSAP), полиморфизам Marburg I

Ензим FSAP, познат и као протеин који веже хијалуронску киселину, је плазматски гликопротеин који има две значајне улоге у процесу хемостазе; активирање FVII и активирање активатора плазминогена (267,268). У плазми је присутан као једноланчани проензим величине 70 kDa, у концентрацији од 12 µg/ml (267,269). Углавном се експримира у јетри, а у крвоток излучује у неактивном про-FSAP облику (268-270).

#### 1.5.9.1 Улога FSAP у коагулацији

Важна улога ензима FSAP је способност да активира FVII у активни облик FVIIa и тако омогућава започињање плазматске коагулације крви (267,269,271). Међутим, неке студије наводе да је активација FVII посредована ензимом FSAP занемарљива, само око 4%, а да FSAP може вршити прокоагулантну улогу инхибицијом активације TFPI (267,268,272). Друга важна улога FSAP-а је активирање активатора плазминогена (t-PA и u-PA), што представља окидач за покретање реверзног процеса коагулације, односно фибринолизе (273). Идентификовани су и многи други супстрати на којима је доказана интеракција FSAP-а, а то су: фактори раста који се ослобађају са тромбоцита, епидермални фактор раста, PARs, хистони, кининоген високе молекулске тежине и други (268,269,272). Присутан је и у процесима васкуларног ремоделирања, инфламацији, фибрози јетре, карциному, формирању неointиме и артериогенези (268,273).

*In vitro*, активација FSAP је посредована његовим везивањем за позитивно наелектрисане полиамине и за негативно наелектрисане полианјоне, као што су хепарин, RNK и полифосфати, што изазива његову аутоактивацију (267,269). У *in vivo* условима FSAP се може активирати у условима васкуларне повреде, током процеса ремоделирања ткива и постапоптотичним (мртвим) ћелијама јер се у овим ситуацијама ослобађају нуклеинске киселине (НК), хистони и нуклеозоми (271,272). Хистони ослобођени из апоптотичних или некротичних ћелија покрећу активацију FSAP у серуму, након чега активирани FSAP врши протеолизу хистона, штитећи ћелије од цитотоксичности узроковане хистонском активацијом (273). Базирано на овим сазнањима, у великом броју студија истраживана је повезаност SNPs у гену за FSAP са различитим болестима (268,270,271). У неким студијама је показано да је код пацијената са тромбозом, у односу на здраве испитанике, повећана активност FSAP (268,274,275). Осим тога, активност овог ензима је већа код жена у односу на мушкарце, а посебно је појачана током трудноће и употребе оралних контрацептива (268).

#### 1.5.9.2 Структура гена FSAP

Ген *FSAP* је детерминисан 1997. године, његов локус је на хромозому 10q25-q26 (271). Ген сачињава 35 кб смештених у 13 егзона и 12 интрона (271). Промена само једног bp, G→A, на позицији 1601 у егзону 13 *FSAP* гена, доводи до замене у протеину а.а. глицина

глутамином, на позицији 534 (Gly534Glu). у домену активног места протеазе у близини Ц терминалног дела лаког ланца, и има 5 пута нижу протеолитичку активност у односу на неизмењени генотип (269,270,271).

Овај SNP познат је и под називом Марбург 1 (енгл. Marburg I) (271,274). *FSAP* G1601A селективно нарушава фибринолитички капацитет ензима, носиоци варијантног хетерозигота имају знатно смањену способност активирања проурокиназе, а способност активирања FVII остаје скоро непромењена (271). Доказана је повезаност ниске ензимске активности *FSAP* условљене присуством варијантног хетерозигота *FSAP* 1601G>A са повећаним ризиком од каротидне стенозе и можданог удара (267,269,273). Насупрот томе, резултати повезаности овог полиморфизма са тромбозом су хетерогени (268,272,275-277).

### 1.5.9.3 Учесталост полиморфизма *FSAP* 1601G >A

Према подацима спроведених студија, учесталост *FSAP* 1601G>A код ВТЕ пацијената се креће од 5-12%, с тим што је значајно већа код пацијената са непровоцираном тромбозом (око 12%), у односу на пацијенте са провоцираном тромбозом (око 5%). У општој белој популацији преваленција *FSAP* 1601G >A креће се од 2-9% (269,270,273,275-277).

## 1.6 Превенција и лечење ВТЕ

ВТЕ са око 10 милиона нових случајева годишње, великом преваленцијом, смртношћу и посттромботским компликацијама, представља велики здравствени проблем у целом свету и главни фактор у глобалном оптерћењу болестима (60,71,85-88). Због тога су предузете иницијативе и развијене стратегије за превенцију и лечење ВТЕ. Чињеница да су стечени фактори ризика често временски ограничени у свом деловању, пружа могућност превенције ризика од ВТЕ кроз индивидуалну антикоагулансну профилаксу и кориговање животних навика (62,87,88,96). Утврђивањем узрочне основе која повезује гене и болести, намеће потребу прилагођавања стратегије лечења и према генетичким факторима ризика. Ово је утицало на развијање персонализоване медицине. Зато је неопходно идентификовати оне генетске факторе који би могли послужити као биомаркери предвиђања ризика од тромбозе (87,278). Међутим, поред ризика од тромбозе, важно је предвидети и ризик од крварења који може настати лечењем тромбозе.

Важеће методе које се користе у превенцији су: механичке (смањују венску дилатацију и поправљају венску стазу) и медикаментозне (антикоагуланси и антиагрегациони лекови) (59,96,101,280). Механичке методе су погодне код пацијената са ризиком од крварења. За превенцију је управо веома важно постизање идеалне тромбопрофилактике што подразумева стратификовање ризика и њено персонализовано прилагођавање ризику од ВТЕ. Такође, бројне смернице су креиране за употребу одговарајуће превентиве са циљем спречавања ВТЕ код хируршких и хоспиализованих пацијената (59,279).

Основни циљ у лечењу ВТЕ је локализовање и спречавање ширења тромба, убрзавање фибринолизе, спречавање понављања тромботског атака, настанак фаталне ПЕ, плућне хипертензије и посттромботских компликација (59,71). Стога је након постављања дијагнозе примена антикоагулантних лекова главно средство за лечење ВТЕ. Код пацијената са великим хируршким захватима и у интензивној нези примена антиромботске фармаколошке профилаксе значајно доприноси смањењу морталитета (71,280). Лечење се спроводи кроз три фазе: првих 10 дана након дијагнозе, 3-6 месеци од почетне терапије и након 6 месеци продужена фаза терапије до постизања одговарајућег терапијског ефекта. Прва 3 месеца антикоагулантне терапије обично су индикована након акутне ВТЕ, а после тога одлука да ли ће се терапија дугорочно наставити доноси се на основу процене вероватноће појаве рецидива и ризика од крварења (59,281).

Имајући у виду значајну повезаност тромбофилија, па самим тим и тромбоза, са компликацијама и неповољним исходима трудноћа, клиничари све више препоручују антиромботску терапију женама које су у ризику, како би се смањио број изгубљених трудноћа и компликација насталих због ВТЕ (279). На основу стратификације ризика, фармаколошка превенција код трудница са ризиком од ВТЕ, углавном се заснива на употреби хепарина мале молекуларне тежине, прилагођено телесној тежини пацијенткиње (62,88,279). Додатни ризик за тромбозу представља употреба комбинованих оралних контрацептива (61), па светска здравствена организација не препоручује употребу комбинованих оралних контрацептива особама са утврђеним присуством ризичних генотипова (101).

## 2 ЦИЉЕВИ И МЕТОДОЛОГИЈА ИСТРАЖИВАЊА

### 2.1 Циљеви и хипотезе

Главни циљ:

1. Утврђивање да ли полиморфизми гена који кодирају факторе коагулације, и то: *FVHR2* 6755 A>G (rs6027), *FII* 19911 A>G (rs3136516), *FXIII-A* 102 G>T (rs 5985), *MTHFR* 677 C>T (rs1801133), *PAII* 4G/5G (rs1799762) и *FSAP* 1601 G>A (rs7080536), утичу на ризик од настанка ВТЕ.

Остали циљеви:

2. Утврђивање повезаности коморбидитета, активности, ВМI и и не О-те крвне групе и појаве ВТЕ, животне доби испољавања болести ВТЕ, појаве рецидива и локализације ВТЕ.
3. Упоредивање учесталости испитиваних полиморфизама у односу на пол испитиваних група.
4. Упоредивање учесталости испитиваних полиморфизама код пацијената са различитим формама ВТЕ.
5. Утврђивање утицаја испитиваних полиморфизама на животну доб испољавања ВТЕ, локализацију ВТЕ и појаву рецидива.
6. Утврђивање повезаности истовременог присуства већег броја полиморфизама са појавом ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ и појавом рецидива.

Хипотезе:

1. Генски полиморфизми *FVHR2* 6755 A>G (rs6027), *FII* 19911 A>G (rs3136516), *FXIII-A* 102 G>T (rs5985), *MTHFR* 677 C>T (rs1801133), *PAII* 4G/5G (rs1799762) и *FSAP* 1601 G>A (rs7080536) значајно утичу на ризик од настанка ВТЕ.
2. Коморбидитети, активност, ВМI, и не О-те крвне групе утичу на појаву ВТЕ, животну доб испољавања болести ВТЕ, локализацију ВТЕ и појаву рецидива.
3. Постоје разлике у учесталости испитиваних полиморфизама у односу на пол испитиваних група.
4. Постоје значајне разлике у учесталости испитиваних полиморфизама код пацијената са различитим формама ВТЕ.
5. Испитивани полиморфизми значајно утичу на животну доб испољавања ВТЕ, локализацију ВТЕ и појаву рецидива.
6. Постоји повезаност истовременог присуства већег броја полиморфизама са појавом ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ, локализацијом ВТЕ и појавом рецидива.

## 2.2 Материјал и методе испитивања

### 2.2.1 Врста студије

Клиничка опсервациона, ретроспективно-проспективна, случај-контрола студија, одобрена је од Етичког комитета Клиничког центра Црне Горе (бр.03/01-5005/1, одобрено: 22.04.2016. године и бр. 03/01-13055/1, одобрено: 24.06.2020. године), а спроведена је у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (Good Clinical Practice, GCP) и Хелсиншке декларације.

### 2.2.2 Популација која се истражује

У ово истраживање укључено је 209 испитаника. У прву студијску групу укључено је 103 пацијента оба пола, који су на основу важећих дијагностичких алгоритама имали бар једну потврђену епизоду ТДВ и/или ПЕ. У другу, контролну групу, укључено је 106 здравих испитаника оба пола, који до тренутка када су прихватили учешће у студији нису имали тромбоемболијске епизоде болести. Истраживање је спроведено у Центру за медицинску генетику и имунологију (ЦМГИ), Клиничког центра Црне Горе, у периоду од јануара 2017. године до краја 2020. године.

#### 2.2.2.1 Узорковање

Испитаници студијске групе регрутовани су проспективно и ретроспективно из групе пацијената након једног или више тромботичких догађаја, који су упућени у ЦМГИ на генетичку консултацију ради процене ризика и дијагностике наследне тромбофилије. У студију су укључени пацијенти са медицински верификованом, најмање једном ВТЕ, и код којих је након генетичке консултације постављена индикација за дијагностичко испитивање фактора коагулације *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A*. Проспективно укљученим испитаницима је приликом генетичког саветовања, пре генетичке дијагностике, понуђено учешће у студији и писана информација о истраживању. Испитаници који су прихватили учешће потписали су информисани пристанак и увршћени су у истраживање. Пацијенти који су укључени у студију ретроспективно, већ су у склопу дијагностичког генетичког испитивања полиморфизама за *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* имали потписан информисани пристанак да се резултати њиховог тестирања и узорци ДНК могу чувати и користити за додатна испитивања или истраживања која одобри Етички комитет институције.

Критеријуми за укључивање у студијску групу били су: позитивна анамнеза на ВТЕ, хемостазне анализе, „imaging“ дијагностика која потврђује ВТЕ (колор доплер), специјалистички извештај васкуларног хирурга са постављеном дијагнозом ВТЕ.

За прикупљање података о социодемографским карактеристикама и стеченим факторима ризика користили су се анамнестички подаци из медицинске документације пацијената и упитник који је за проспективно укључене испитанике, приликом генетичке консултације, попуњавао клинички генетичар. За ретроспективно укључене испитанике упитник је попуњен након телефонског разговора истраживача и пацијента. Упитник је садржао питања о породичној анамнези, са посебним освртом на ВТЕ, коморбидитетима, терапији, употреби оралних контрацептива и антиромботске терапије, АБО крвној групи, конзумирању кафе, цигарета и алкохола, занимању и физичкој активности.

Учесници контролне групе изабрани су по принципу згодног узорка, из здраве популације (популације без ВТЕ) која гравитира ка домовима здравља и КЦЦГ у Подгорици, на бази добровољног пристанка. Узимање података о социодемографском статусу и стеченим факторима ризика, као и узорковање периферне крви и генетичко анализирање узорака, спроведено је на исти начин као и код испитаника у студијској групи.

Критеријуми за неукључивање у студијску групу били су непотпуност медицинске документације у вези ВТЕ, трудноћа и присуство малигнитета. У контролну групу нису укључене труднице и особе у крвном сродству са другим испитаницима у студији.

За све учеснике у студији, ДНК за генотипизацију SNPs изолована је из лимфоцита периферне крви добијене венопункцијом кубиталних вена. Крв је узоркована у вакутајнер епрувете, запремине 4,5ml (Vacutainer tubes, Becton dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), које су као антикоагуланс садржале 3,8% (0,129M) натријум цитрат, а однос крви и антикоагуланса је 10:1. Након узорковања садржај епрувете је пажљиво промешан окретањем епрувете за 180° 3 до 4 пута. Узорци крви су прописно обележени и чувани на температури од 4-8°C до тренутка изолације ДНК, а изолована ДНК до генотипизације је чувана замрзнута на -20°C.

### 2.2.3 Варијабле које су се мериле у студији

Као независне варијабле испитивани су: присуство генских полиморфизама *FVHR2* 6755A>G, *FII* 19911A>G, *MTHFR* 677C>T, *PAII* 4G/5G, *FSAP* 1601G>A и *FXIII-A* 102A>T, АБО крвна група, коморбидитети, породични ризик и други стечени фактори ризика за настанак ВТЕ, тј: физичка активност у односу на слободно време и занимање, конзумирање цигарета, кафе и алкохола. Као коваријабле анализирани су полиморфизми *FV* 1691G>A и *FII* 20210G>A.

Као зависне варијабле праћени су појава ВТЕ, животна доб испољавања ВТЕ, локализација ВТЕ и појава рецидива, као и појава различитих форми ВТЕ и то ДВТ, ДВТ/ПЕ и ПЕ.

## 2.2.4 Класификовање пацијената у односу на старост, локализацију прве ВТЕ и рецидиве

Према старости јављања прве ВТЕ, сви пацијенти су прво класификовани према периоду јављања прве ВТЕ на 1) пре 50-те и 2) после 50-те године, а затим и на периоде: 1) до 20-те године, 2) 20-30 година, 3) 30-40 година, 4) 40-50 година, 5) 50-60 година и 6) 60-70 година.

Пацијенти су класификовани у односу на то да ли су имали рецидив или не, и да ли су имали вишеструке рецидиве. Временски период када су се јавили рецидиви је класификован на: 1) у првој години након првог напада тромбозе, 2) 2-5 година након тромбозе и 3) после 5 година од прве ВТЕ.

Испитаници са ВТЕ у односу на локализацију прве тромбозе класификовани су на оне код којих је била дијагностикована: 1) дистална венска тромбоза (пацијенти који су доживели ТДВ у потколеници, односно дистално од поплитеалне вене), 2) проксимална венска тромбоза (ТДВ у венама натколенице, поплитеална, феморална и илијачна вена), 3) тромбоза вене атипичне ВТЕ локализације (дубоке вене руку, церебралних венских синуса и вене порте) и 4) ПЕ. Локализација ВТЕ је класификована и према томе да ли је прва тромбоза настала у левој ноzi, десној ноzi, обострано или у осталим венама, као и према топографији вена.

## 2.2.5 Фактори ризика:

Сви испитаници су у односу на породичну анамнезу, која се односила на присуство ВТЕ и других кардиоваскуларних болести у породици, класификовани на оне са и без породичног ризика (подаци су добијени на основу лекарских извештаја и на основу података које су давали испитаници).

У односу на стечене факторе ризика, испитиване групе анализиране су на следећи начин:

### 1) Према коморбидитетима

- Коморбидитети који су испитивани као фактори ризика су: гојазност изражена преко индекса телесне масе ( $\text{kg/m}^2$ ) (engl. Body Mass Indeks-ВМI), хипертензија (ХТА), коронарна болест, трауме и операције (непосредно пре појаве ВТЕ), дијабетес и остало (антифосфолипидни синдром, хронична венска инсуфицијенција и дуготрајно мировање због неке болести или приликом путовања).
- Гојазност је третирана засебно од осталих коморбидитета, а у односу на вредности ВМI, сви испитаници су према важећем критеријуму класификовани на: 1) није гојазан ( $\text{ВМI} < 29,9$ ) и 2) гојазан ( $\text{ВМI} \geq 30$ ). Поред ове класификације вредност ВМI је класификована на: 1) низак ( $\text{ВМI} < 18,6$ ), 2) нормално ухрањени ( $\text{ВМI} 18,6-24,9$ ), 3) прекомерно ухрањен ( $\text{ВМI} 25,0-29,9$ ) и 4) гојазан ( $\text{ВМI} \geq 30$ ) (282).



## 2) Према животним навикама

– Испитиване су следеће животне навике: активност у односу на слободно време, активност која се односила на занимање (активност у току радног времена), конзумирање цигарета, кафе и алкохола.

- Активност везана за слободно време (стил живљења) је класификована на: 1) неактивни (испитаници који нису имали никакав облик тренинга нити свакодневне шетње). 2) умерено активни (осим шетње, вежбање 1-2 пута недељно по сат времена) и 3) активни (испитаници који су, осим шетње, вежбали 3 и више пута недељно по сат времена).
- Физичка активност везана за занимање (посао који испитаници обављају) класификована је као: 1) седентарни (сви послови који захтевају вишесатно седење током радног времена), 2) умерена активност (сви послови који подразумевају лакши степен активности током радног времена) и 3) активни (сви тежи физички послови).
- У односу на конзумирање цигарета испитаници су сврстани на: 1) непушаче (никада нису конзумирали цигарете), пушаче (у тренутку учешћа у студију пуше свакодневно више од две цигарете) и бивше пушаче. За праћење дозног ефекта броја цигарета на ВТЕ, односно конзумирање броја цигарета на дневном нивоу, пушачи су сврстани на: 2-10 цигарета дневно, 11-20 цигарета дневно, 21-30 цигарета дневно и на више од 31 цигарете дневно (150,151).
- У односу на дневно конзумирање кафе испитаници су прво класификовани на оне који не пију кафу и на оне који пију кафу. Због могућег дозног ефекта конзументи кафе су у односу на дневну количину разврстани на: не пију кафу, пију до две шољице дневно, и пију три и више шољица дневно (141,147).
- У односу на конзумирање алкохола испитаници су сврстани: не пију алкохол (уопште не пију или пију јако ретко, у веома малој количини) и пију алкохол (они који су свакодневно конзумирали алкохол у било којој количини). Затим су испитаници који пију алкохол сврстани на оне који пију у просеку једну до две чашице дневно, и 3 и више чашица дневно (145,148,149).

## 3) Према медикаментозној терапији

- У односу на антикоагулантну терапију (орални антикоагуланси и антиагрегациони лекови), пацијенти су разврстани на оне који пре појаве тромбозе: 1) нису користили ову терапију и 2) јесу користили ову терапију.
- У односу на употребу оралних контрацептива (ОК), све пацијенткиње су сврстане на оне које пре појаве тромбозе: 1) нису користиле оралне контрацептиве и 2) јесу користиле оралне контрацептиве.

## 4) Према осталим факторима ризика

- У односу на то да ли су имале спонтане побачаје (спонтани абортуси-САБ), све испитанице су сврстане на оне које: 1) нису имале САБ, 2) јесу имале САБ, и 3) са неуспелом вантелесном оплодњом (енгл. In vitro fertilization-IVF).

- Према крвној групи испитаници су сврстани на оне са: 1) 0 крвном групом и 2) не-0 крвном групом (А, Б и АБ).

## 2.2.6 Генотипизација и анализа SNPs

### 2.2.6.1 Изолација ДНК из лимфоцита периферне крви

Геномска ДНК изолована је комерцијалним тестом за изолацију ДНК из узорака периферне крви (QIA ampDNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), према упутству и стандардном протоколу произвођача. Овај кит за изолацију ДНК садржи мини спин колонице са силикатном гел мембраном, протеиназу К која сече пептидне везе на карбоксилном крају ароматских и ненаелектрисаних а.а., пуфер (AL) за лизирање ћелија и ослобађање ДНК, растворе за испирање AW1 и AW2 који служе да се исперу и уклоне нечистоће са ДНК и пуфер за растварање и прикупљање ДНК везане на мембрани колонице (AE). Употреба колоница за изолацију ДНК смањује ризик од замене узорака, јер се поступак од почетка до краја одвија на истој колоници. Процедура је брза и једноставна, обезбеђује оптималну количину изоловане ДНК за анализу. Приликом третирања наведеним растворима, ДНК се везује за мембрану а остале компоненте се испирају и уклањају. На овакав начин изолована ДНК је високе концентрације и чистоће, са минималном количином инхибитора и контаминирајућих супстанци. Просечна концентрација ДНК изоловане овом методом обично је износила 6 µg ДНК на 200 µl (након растварања са AE пуфером), односно 30 ng/µl. За инкубацију узорака коришћен је термоблок (Thermomixer comfort, Eppendorf), за хомогенизацију вортекс (Vortex V2H, Восо, Germany) а за центрифугирање узорака центрифуга (Centrifuge 5417C, Eppendorf).

#### 2.2.6.1.1 Поступак изолације ДНК

У обележене микротубе волумена 1,5ml, за сваки узорак, додавано је по 20µl ензима протеиназе К, а затим по 200µl узорка периферне крви и 200µl пуфера за лизирање ћелија (AL) и ослобађање ДНК и све то хомогенизовано на вортексу 10 до 15 секунди при брзини 1500 обртаја. Како би се обезбедило лизирање ћелија и ослобађање ДНК од протеина, припремљена смеша је инкубирана 10 минута на 56°C, у апарату термоблоку (Thermomixer comfort, Eppendorf). Након инкубације, у микротубе је додато 200µl 96% етил алкохола (етанол), а затим је смеша хомогенизована на вортексу. Овако припремљен узорак је помоћу пипетмана пренет на обележену мини спин колоницу, која има одговарајућу тубу, и центрифугиран на 6000 x g (8000 rpm) 1 минут. Након овог корака, колоница је премештена на нову тубу, филтрат и претходна туба су одложени у посуду за одлагање отпада, а на колоницу је додато 500µl AW1 пуфера и понављен поступак центрифугирања на 6000 x g (8000 rpm). Након центрифугирања филтрат са претходном тубом је уклоњен а колоница је пренета на нову тубу и у њу је додато 500µl вошера AW2 а узорак центрифугиран 3 минута на 20000 x g (14000 rpm). Поступци са вошерима AW1 и AW2 служе да се исперу и уклоне нечистоће са ДНК везане за мембрану колонице како би се добила ДНК одговарајућег квалитета и чистоће. На крају је колоница пренета на чисту, обележену епендорфицу са поклопцем, и на њу је додато 200µl пуфера AE. Како би се повећао принос ДНК, епендорфица са садржајем ДНК на колоници, стајала је 5 минута на собној температури. На овај начин је AE пуфер растворио ДНК везану на мембрани колонице. Центрифугирањем на 6000 x g (8000 rpm) 1 минут, растворена ДНК је заједно са AE пуфером прошла кроз

мембрану колонице. На овај начин је ДНК прикупљена у микротуби у којој је на температури  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-30^{\circ}\text{C}$  чувана до генотипизације.

#### 2.2.6.1.1.1 АЛЕЛ СПЕЦИФИЧАН PCR (AS-PCR)

Ланчана реакција полимеразе (engl. Polymerase Chain Reaction-PCR) представља *in vitro* oponaшање природног процеса ДНК репликације у живим организмима и обезбеђује генерисање велике количине одређеног сегмента ДНК из мале количине почетног узорка, за кратко време (283). У основи за извођење PCR реакције потребна је изолована ДНК, одговарајући реагенси и термостабилна полимераза (енгл. Taq polymerase) која врши елонгацију циљаних секвенци ДНК (283). Изолована ДНК представља дволанчану матрицу која садржи фрагмент од интереса и служи као калуп по коме се врши умножавање жељене секвенце ДНК. Да би се добила ДНК матрица неопходно је развијање двоструког ланца ДНК, при чему се добијају два једнострука ланца, од којих је сваки матрица за наредни корак реакције (284).

Методу алел-специфичан PCR (AS-PCR), покренуо је Newton са сарадницима само 6 година након изума PCR (285). Метода је једноставна, брза и поуздана, а један од разлога за широку употребу ове методе јесте то што не захтева скупу лабораторијску опрему. AS-PCR се користи за брзу и поуздану детекцију познатих варијација у геномској ДНК заснованој на малим изменама ДНК, као што су замене само једног нуклеотида и инсерције или делеције само једне базе. Методом AS-PCR амплификација жељене секвенце изводи се истовремено у две паралелне реакције, при чему је у првој реакцији прајмер комплементаран секвенци дивљег типа, а у другој, варијантној секвенци. Овако дизајнирани прајмери омогућавају да се након електрофорезе на гелу утврди који је алел присутан у ДНК испитиваном узорку. Ако оба алела носе секвенцу дивљег (неизмењеног) типа или оба садрже измењену секвенцу, на агарозном гелу видеће се само једна трака, али на различитој удаљености од почетног места, а ако један алел носи секвенцу дивљег типа а други алел измењену (варијантну) секвенцу на гелу се уочавају две траке, односно хетерозиготни полиморфизам.

У овом истраживању амплификација жељених секвенци спроведена је методом AS-PCR, а за све испитиване полиморфизме коришћени су комерцијални тестови Attomol® Quicktype, од произвођача Attomol GmbH Molecular Diagnostics, Bronkow, Deutschland, процедура је извођена према упутству произвођача.

Сетови тестова Attomol® Quicktype за AS-PCR садрже лиофилизоване прајмере у тубама од 1,5ml (за 40 реакција, 2x20 реакција и за 20 реакција, 2x10 реакција), одговарајућу количину PCR пуфера за прављење премикса (за 20 реакција 450 $\mu\text{l}$  а за 10 реакција 225  $\mu\text{l}$  пуфера) и 0,5ml стерилне дејонизоване воде, која се користи за негативну контролу.

Табела 1. Испитивани полиморфизми AS-PCR методом

Полиморфизам/ Замена нуклеотида	Замена аминокиселине	rs	Хромозом/ Локус	Алел	Величина фрагмента
<b>FV 1691G&gt;A</b>	Arg506Glu	rs 6025	1q24.2	<b>G</b>	150 bp
				<b>A</b>	180 bp
<b>FV HR2 6755A&gt;G</b>	Arg506Glu	rs 6027	1q24.2	<b>A</b>	233bp
				<b>G</b>	272bp
<b>FII 20210G&gt;A</b>	3' UTR	rs 1799963	11p11.2	<b>G</b>	140 bp
				<b>A</b>	180 bp
<b>FII 19911A&gt;G</b>	интрон	rs 3136516	11p11.2	<b>A</b>	148bp
				<b>G</b>	184bp
<b>FXIII 102G&gt;T</b>	Val34Leu	rs 5985	6p25.1	<b>G</b>	165bp
				<b>T</b>	205bp
<b>PAII 4G/5G</b>	675delG	rs1799762	7q21.3-q22.1	<b>GGGGG</b>	217bp
				<b>GGGG</b>	255bp
<b>MTHFR 677C&gt;T</b>	Ala222Val	rs1801133	1p36.3	<b>C</b>	308 bp
				<b>T</b>	347 bp
<b>FSAP 1601G&gt;A</b>	Gly534Glu	rs 7080536	10q25-q26	<b>G</b>	198bp
				<b>A</b>	237bp

За извођење AS-PCR коришћен је PCR апарат (Thermocycler, Eppendorf), који кроз наизменичне промене температуре, дефинисано временским трајањем, обезбеђује потребне услове за реакцију (Табела 2). За припремање миксева за амплификацију коришћено је: PCR стерилна комора (DNA/RNA UV-Cleaner, UVC/T-AR, LKB), сет микропипета са подесивим волуменом (запремине од 0,5 µl до 500 µl), одговарајући стерилни наставци са заштитним филтерима, микротубе са поклопцем запремине 1,5 ml и 0,2 ml и одговарајући сталкови за микротубе, стерилне рукавице и адекватне пластичне посуде за одлагање отпада.

Табела 2. Услови за амплификацију циљаних ДНК секвенци за све испитиване полиморфизме методом AS-PCR

Фаза PCR	Температура	Време трајања	Број циклуса
Иницијација активације	95°C	1 min	1
Денатурација	94°C	1 min	
Везивање прајмера	63°C	1 min	5
Синтеза новог ланца	72°C	1 min	
Денатурација	94°C	30s	
Везивање прајмера	63°C	30s	30
Синтеза новог ланца	72°C	30s	
Завршна синтеза	72°C	2 min	
Хлађење	4°C	Није ограничено	

#### 2.2.6.1.2 АГАРОЗНА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА

Агарозна гел електрофореза је стандардна техника која се користи за раздвајање, идентификацију и пречишћавање НК (285). Погодна је за раздвајање алела базираних на величини фрагмената. Агарозним гелом, зависно од концентрације, могу се анализирати и раздвајати ДНК фрагменти величине од 100 до 25.000bp. За проверу квалитета геномске ДНК користе се гелови мање концентрације (0,8-1%), док се за детекцију и анализу мањих фрагмената ДНК користе гелови веће концентрације (2-3%). Мањи молекули путују брже кроз гел и мигрирају даље од већих фрагмената, који се спорије крећу. Већа концентрација агарозе у гелу повећава густину гела и омогућава раздвајање краћих фрагмената. Уколико је изолована ДНК доброг квалитета, то јест није фрагментисана, пуштањем на 1% гелу на дну бунарића запажа се јака трака, јер геномска ДНК има сувише велику молекуларну масу да би прошла кроз поре у гелу. Ако је изолована ДНК фрагментисана, запажа се низ трака различитих дужина, тј. размаз (енг. smear).

У овом истраживању коришћена је хоризонтална електрофореза (Amersham, Biosciences), димензије калупа: 80x106mm, чешљеви по 11 бунарића распоређени у два реда (укупно 22 бунарића у једном гелу). У једном реду су у 9 бунарића стављани амплификати, у остала два бунарића стављане су позитивна и негативна контрола.

##### 2.2.6.1.2.1 СУПСТАНЦЕ И РАСТВОРИ НЕОПХОДНИ ЗА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ

Сви раствори су припремани према стандардним протоколима.

За прављење гелова, осим агарозе, потребне су и следеће хемикалије за растворе и пуфере. За TBE (Tris/Borate/EDTA): 0,89M TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane- C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>), 0,89M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (борна киселина), 20mM EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid) етилен диамин тетра сирћетна киселина.

Боја за бојење ДНК узорка, прављена је од: 0,25% ВРВ (Bromophenol blue-бром фенол плаво), 0,25% ХС (Xylene Cyanol) и 20% Ficoll 400 (Фикол). За 20ml боје неопходно је 0,05g ВРВ, 0,05g ХС и 4g Ficoll 400. Боја служи да повећа густину узорка и спусти ДНК амплификат на дно бунарића и омогући праћење тока електрофорезе и путовање узорка кроз гел.

За визуелизацију и генотипизацију ДНК узорака коришћен је етидијум-бромид (EtBr, хемијска формула  $C_{21}H_{20}BrN_3$ ), интеркалирајући агенс, који се умеће између ланаца двоструког хеликса ДНК, и често се користи за флуоресцентно обележавање НК у гел електрофорези. Када се изложи UV светлу, флуоресцира у наранцасто-црвеном опсегу на таласној дужини од 260 до 360 nm, а везивањем за ДНК постаје скоро 20 пута јаче видљив (286). Међутим, негативна страна је што је ова боја високо мутагена и канцерогена.

**Поступак припреме гела:** У ерленмајер запремине 250 ml додато је 40 ml 0,5xTBE пуфера и 1g агарозе, раствор на магнетној мешалици загрејан до кључања (стварање мехурића). Након тога, ерленмајер је склоњен са мешалице док се мехурићи нису изгубили, а затим је поступак поновљен још једном. Отопљена агароза је охлађена на око 60°C, додато 1,8μl (у концентрацији 0,5 μg/mL) EtBr, промешано на магнетној мешалици, садржај усут у припремљени калуп са постављеним чешљевима у два реда (по 11 бунарића) и остављен да се охлади и полимеризује на собној температури. Из охлађеног гела извађени су чешљеви који су формирали бунариће, гел је постављен у кадицу, кадица стављена у апаратуру за електрофорезу и сипано 0,5xTBE пуфера мало изнад нивоа бунарића. У 9 бунарића у једном реду су пипетом стављани амплификати добијени AS-PCR-ом (помешано 8μl ДНК амплификата и 2μl боје), а у преостала два бунарића, позитивна и негативна контрола. Електрофореза је текла 60 минута, при јачини струје 40mA и напону 80 V (4-7 V/cm<sup>2</sup>).

Добијене траке су посматране на UV трансилуминатору (LKB, UV transilluminator). Генотипизација алела ДНК узорака одређена је упоређивањем трака узорака са тракама узорка позитивне контроле директно са гела. У циљу архивирања резултата, гел на трансилуминатору је сниман мобилним телефоном а слике архивирани у рачунару.

## 2.3 Статистичка обрада података

### 2.3.1.1 Снага студије и величина узорка

*FV G1691A* се сматра статистички најзначајнијим наследним фактором ризика за тромбоемболијске болести, због чега је величина потребног узорка за ову студију израчуната на основу учесталости хетерозиготног генотипа за ову варијацију (у ВТЕ-у је 15% до 40%, а у општој популацији 3% до 8%) (287). На основу формуле за израчунавање величине узорка код  $\chi^2$  теста, добијена је величина узорка од минимално 88 испитаника по групи, за ниво статистичке значајности од 0,05.

#### 2.3.1.1.1 СТАТИСТИЧКЕ МЕТОДЕ

За статистичку анализу података коришћен је програмски софтвер IBM SPSS 21. Прикупљени подаци представљени су коришћењем описне статистике, континуалне варијабле у облику средњих вредности и стандардних девијација, а варијабле категоријског типа кроз процентуалну заступљеност. За статистичко тестирање нормалности расподеле коришћен је Kolmogorov-Smirnov тест. У случају потврђивања нормалности, за поређење студијских група коришћен је независни Т тест, у супротном коришћен је Mann Whitney-ev U тест. За сваки испитивани полиморфизам, добијене учесталости генотипова и алела између испитиваних група, упоређиване су се  $\chi^2$  тестом, или Фишеровим егзактним тестом у случајевима када је број података мањи од 5.

Као мерило повезаности фактора ризика (независне варијабле) и исхода (могућа повезаност испитиваних полиморфизама с настанком ВТЕ), одређиван је однос вероватноће (OR-Odds Ratio) са 95% интервалом поверења (CI-Confidence Interval). За испитивање утицаја сваког појединачног полиморфизма на настанак ВТЕ тј. ТДВ и/или ПТЕ, коришћен је униваријантни регресијски модел, а мултиваријантни модел за истовремено присуство већег броја полиморфизама и/или стечених фактора. Резултати логистичке регресије представљени су помоћу OR са 95% интервалом поверења. Интеракција између генотипова и осталих предикторских варијабли испитана је помоћу логистичке регресије и анализе коваријансе. Дефинисана статистичка значајност је  $p < 0,05$ , а резултати су представљени табеларно и графички.

Генотип је класификован на основу присуства алела као: дивљи хомозигот (енгл. wild type-WT), варијантни хетерозигот (један алел WT, а други измењен тј. варијантни: енгл. variant type - VT) и варијантни хомозигот (оба алела измењена). За све SNPs урађена је анализа учесталости генотипова на основу три генетичка модела: адитивни модел (AM), доминантни модел (DM) и рецесивни модел (PM). У адитивном моделу су генотипови посматрани као: "AA", "Aa" и "aa", при чему је "A" чешћи алел, дивљи облик (WT), а "a" варијантни алел. Овакав начин кодирања имплицира да сваки генотип даје посебан допринос фенотипу. Због чињенице да је у студијама заснованим на случају и контроли, фенотип или случај или контрола, као алтернатива AM коришћен је DM и PM. У одређеним ситуацијама се претпоставља да су "Aa" и "aa", односно варијантни хетерозигот и



варијантни хомозигот на истом нивоу ризика, у том случају коришћење ДМ и РМ је боља опција јер могу да повећају прецизност резултата. У ДМ су упоређивани генотипови: дивљи хомозигот (AA) наспрам варијантни хетерозигот (Aa) и варијантни хомозигот (aa), а у РМ су упоређивани: варијантни хомозигот (aa) наспрам дивљег хомозигота (AA) и варијантног хетерозигота (Aa). За *FV* и *FII* испитивана су по два SNPs а за остале факторе и ензиме по један SNPs. Осим тога за SNPs у *FV* и *FII*, испитивано је постојање хаплотипског блока и неравнотеже везаности алела (енгл. linkage disequilibrium, LD), у циљу утврђивања постојања разлике у дистрибуцији хаплотипова између анализираних група.

Због чињенице да присуство већег броја варијантних алела и генотипова делује адитивно на ризик од венске тромбозе, осим анализе дистрибуције и учесталости појединачних SNPs и здружених генотипова према ДМ и РМ, испитана је и дистрибуција учесталости истовременог присуства већег броја варијантних хетерозигота и хомозигота у оквиру ВТЕ пацијената и здравих испитаника. За ВТЕ пацијенте повезаност вишеструког броја SNPs је испитивана у односу на старост настанка ВТЕ, рецидиве и вишеструке рецидиве.

За тестирање дистрибуције учесталости генотипова и алела, односно проверу правилне селекције и генетичке структуре контролне групе, као и за проверу квалитета резултата генотипизације на нивоу обе испитиване групе и у односу на све испитанике студије, коришћена је Харди-Вајнбергова равнотежа (енгл. Hardy-Weinbergov equilibrium-HWE). Одступање од HWE (разлика између добијених и очекиваних генотипова) тестирано је  $\chi^2$  тестом у оквиру статистичког софтвера SPSS.

За анализу хаплотипа коришћен је софтвер за популациону генетику Arlequin, верзија 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Неравнотежа у везаности алела (енгл. linkage disequilibrium, LD) испитана је употребом биоинформатичког софтвера Haploview, верзија 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) и анализом параметара  $D'$  и  $r^2$ .

### 3 РЕЗУЛТАТИ

#### 3.1 Опште карактеристике испитаника

У истраживање је укључено укупно 209 испитаника сврстаних у две групе: ВТЕ пацијенти и здрава контролна група. Основне карактеристике испитаника приказане су у Табели 3, а дистрибуција ВТЕ пацијената према старосним категоријама Графиконом 1.

Табела 3. Основне клиничке карактеристике ВТЕ пацијената и контролних испитаника

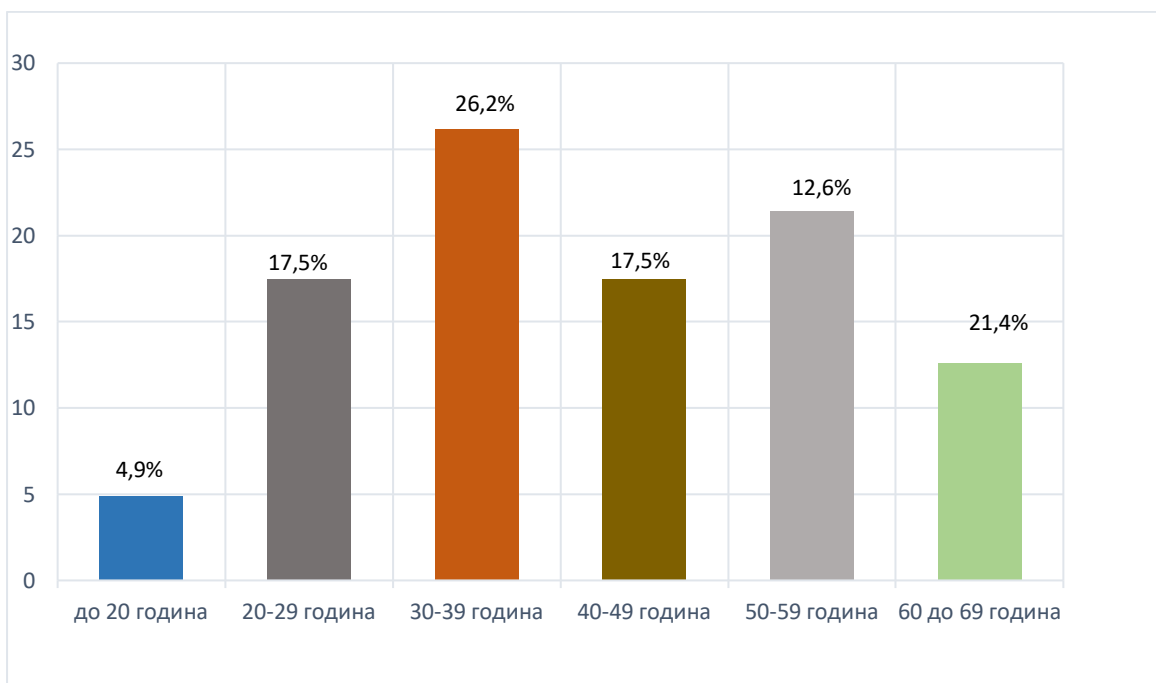
Основне карактеристике	ВТЕ пацијенти	Контролни испитаници	Укупно
n (%)	103 (49,3%)	106 (50,7%)	209 (100%)
<b>Пол</b>			
мушки	49 (47,6%)	53 (50,0%)	102 (48,8%)
женски	54 (52,4%)	53 (50,0%)	107 (51,2%)
<b>Старост</b>			
Просечна±SD	41,6±14,0	43,6±9,4	42,6±11,9
медијана	40,0	42,5	42,0
минимум	10,0	20,0	10,0
максимум	67,0	77,0	77,0
<b>Старост прве ВТЕ</b>			
пре 50-те године	68 (66,0%)		
после 50-те године	35 (34,0%)		
<b>Породични ризик</b>			
Да	42 (40,8%)	15 (14,2%)	57 (27,3%)
Не	61 (59,2%)	91 (85,8%)	152 (72,7%)
<b>Крвна група</b>			
А	61 (59,2%)	52 (49,1%)	113 (54,1%)
Б	6 (5,8%)	8 (7,5%)	14 (6,7%)
АБ	8 (7,8%)	8 (7,5%)	16 (7,7%)
О	28 (27,2%)	38 (35,8%)	66 (31,6%)
<b>О и не О-те к. групе</b>			
О	28 (27,2%)	38 (35,8%)	66 (31,6%)
А, Б, АБ	75 (72,8%)	68 (64,2%)	143 (68,4%)

\*Не О-та крвна група обухвата све испитанике са А, Б и АБ крвном групом

Поређење ВТЕ пацијената са контролном групом је показало да међу њима није било статистичке разлике ни у старости ( $t=1,219$ ;  $p=0,224$ ), ни према полу ( $\chi^2=0,123$ ;  $p=0,726$ ).

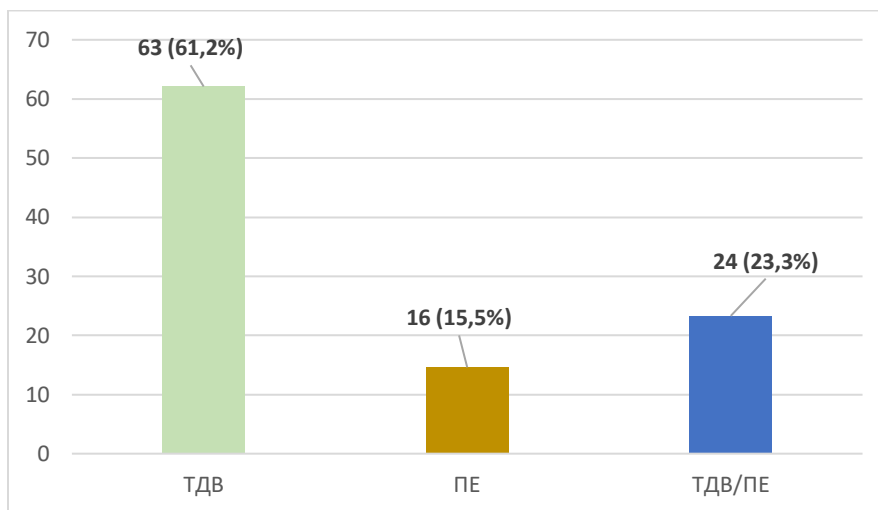
Просечна старост ВТЕ пацијената у тренутку када су укључени у студију износила је  $45,62 \pm 13,83$  година. Највећи број ВТЕ пацијената био је старости између 30-39 година.

Породични ризик је био чешће присутан код ВТЕ пацијената, са статистички значајном разликом ( $\chi^2=18,671$ ;  $p<0,001$ ). Иако је уочено да је 0-та крвна група у већем проценту присутна код ВТЕ пацијената у односу на здраве испитанике, није утврђена статистички значајна разлика у дистрибуцији крвних група ( $\chi^2=1,815$ ;  $p=0,178$ ).



Графикон 1. Заступљеност ВТЕ према старосним категоријама

На основу различитих форми ВТЕ, структура пацијената је приказана на Графикону 2. Уочено је да су међу ВТЕ пацијентима у највећем проценту били заступљени пацијенти са дијагнозом ТДВ.



Графикон 2. Структура ВТЕ пацијената према дијагнози

Резултати дистрибуције локализације прве ВТЕ представљени су у Табели 4. Уочено је да се највећи број тромботичких напада догодио у проксималним венама доњих екстремитета. Такође, значајно више првих тромбоза догодило се у левој ноzi.

Табела 4. Локализација прве ВТЕ

	n (%)	Укупно
<b>ПЕ</b>	16 (15,54)	28 (27,18%)
<b>Атипична</b>	12 (11,65)	
<b>Дистално</b>	36 (34,95)	75 (72,81%)
<b>Проксимално</b>	39 (37,86)	
<b>Доњи екстремитети</b>		
<b>Лева нога</b>	46 (44,66)	46 (44,66%)
натколеница	33	
потколеница	13	
<b>Десна нога</b>	27 (26,21)	27 (26,21%)
натколеница	8	
потколеница	19	
<b>Обострано потколеница</b>	2 (1,95)	2 (1,95%)

У односу на топографију вена доњих екстремитета, утврђено је да се у односу на леву и десну ногу, значајно већи број првих ВТЕ догађаја десио у венама леве натколенице, док су у венама потколенице тромбозе биле равномерно заступљене у обе ноге. У односу на вене, најчешће је била захваћена поплитеална вена. Подаци о локализацији ВТЕ према венској топографији представљени су у Табели 5.

Табела 5. Дистрибуција ВТЕ према венској топографији доњих екстремитета

Вена	n	Укупно
<b>Лева натколеница</b>		
Феморална	3	
Поплитеална	8	
Илијачна	2	33
Феморо-поплитеална	7	
Феморо-илео-поплитеална	6	
Феморо-илијачна	7	
<b>Десна натколеница</b>		
Феморална	1	
Поплитеална	6	
Илијачна	/	8
Феморо-поплитеална	1	
Феморо-илео-поплитеална	/	
Феморо-илијачна	/	
<b>Натколеница обострано (поплитеална)</b>	/	/
<b>Лева потколеница</b>	13	13
<b>Десна потколеница</b>	19	19
<b>Потколеница обострано</b>	2	2

Повезаност проксималне и дисталне локализације прве тромбозе са настанком ПЕ након ТДВ (искључени пацијенти који су имали само ПЕ), представљени су у Табели 6. Утврђено је да се ТДВ/ПЕ статистички значајно чешће дешавала након ТДВ у проксималним венама.

Табела 6. Повезаност локализације прве тромбозе са ТДВ/ПЕ

Дијагноза	Локализација ВТЕ (n/%)			P
	Дистално	Проксимално	Атипично	
ТДВ	32 (88,8)	22 (56,41)	10 (83,3)	<b>0,012*</b>
ТДВ/ПЕ	4 (11,12)	18 (43,59)	2 (16,7)	

\*Фишеров тест тачне вероватноће

Поређење учесталости рецидива и вишеструких рецидива у односу на дијагнозу ВТЕ пацијената и у односу на временски период када се рецидив догодио, приказани су у Табелама 7, 8 и 9. Према ВТЕ дијагнози (Табела 7), рецидиви су се статистички чешће јављали код пацијената са дијагнозом ТДВ/ПЕ у односу на пацијенте са ТДВ ( $\chi^2=5,95$ ;  $p=0,01$ ).

Табела 7. Учесталост рецидива и вишеструких рецидива и време појаве рецидива

	n/%	Укупно n/%
<b>ВТЕ Пацијенти</b>	103 (100)	103 (100)
Рецидиви	40 (38,8)	40 (38,8)
Без рецидива	63 (61,2)	63 (61,2)
<b>Рецидиви/ ВТЕ</b>		
Само један	31(30,1)	40 (38,8)
Вишеструки	9(8,7)	
<b>Рецидиви/дијагноза</b>		
ТДВ	19 (29,7)	40 (38,8)
ТДВ/ПЕ*	21 (53,8)	
<b>Вишеструки рецидиви/дијагноза</b>		
ТДВ	5 (7,8)	9 (8,7)
ТДВ/ПЕ*	4 (10,3)	
<b>Време појаве рецидива</b>		
У првој години	24 (23,3)	40 (38,8)
2-5 година	9 (8,7)	
Након 5 година	7 (6,8)	

\*ТДВ/ПЕ (укључени и пацијенти са дијагнозом ПЕ)

Највећи број рецидива догодио се у првој години након првог тромботичког атака и то код пацијената са дијагнозом ТДВ/ПЕ. (Табела 8).

Табела 8. Време појаве рецидива у односу на дијагнозу

Рецидиви	ТДВ n (%)	ТДВ/ПЕ* n (%)	Укупно n (%)	$\chi^2$	p
Нема рецидив	44(70,3)	19(47,1)	63(61,2)		
У првој години	9 (14,1)	15 (38,5)	24 (23,3)		
2-5 година	8 (12,5)	1 (2,6)	9 (8,7)	<b>13,69</b>	<b>0,004</b>
Након 5 година	2 (3,1)	5 (12,8)	7 (6,8)		

\*У групу ТДВ/ПЕ увршћени су и пацијенти само са ПЕ дијагнозом

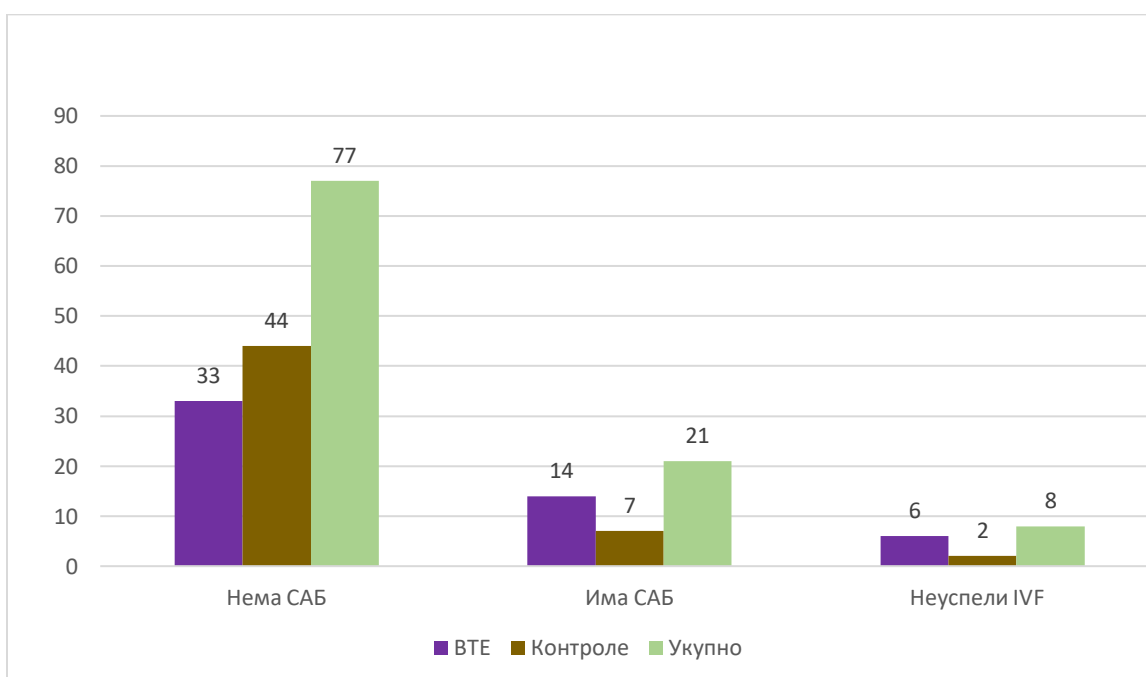
Подаци о повезаности рецидива са локализацијом ВТЕ представљени су у Табели 9. Испитивањем повезаности рецидива са локализацијом ВТЕ, утврђено је да постоји статистички значајна повезаност појаве рецидива и места где се догодио први тромботички атак. Највећи број рецидива повезан је са тромбозама насталим у проксималним венама.

Табела 9. Повезаност рецидива са локализацијом ВТЕ

Рецидиви	ПЕ (n/%)	Дистално(n/%)	Проксимално(n/%)	Остале вене(n/%)	Укупно(n/%)	р
Нема	13 (81,3)	25 (69,4)	15 (41,0)	9 (75,0)	63 (61,2)	<b>0,01</b>
Има	3 (18,8)	11 (30,6)	23 (59,0)	3 (25,0)	40 (38,8)	

### 3.1.1 Дистрибуција броја САБ и неуспелих IVF у оквиру ВТЕ и контролних испитаница

На Графикону 3. представљени су резултати заступљености САБ и неуспелих IVF. Утврђена разлика није статистички значајна ( $\chi^2$  тест=5,90;  $p=0,050$ ). Међутим, уочено је да су се код испитаница женског пола са ВТЕ, чешће дешавали спонтани губици трудноћа, као и неуспели IVF у односу на испитанице контролне групе. Односно, један или више САБ догађаја се догодио код 25,92% ВТЕ пацијенткиња, а само код 13,20% контролних испитаница.



Графикон 3. Дистрибуција САБ и неуспелих IVF у оквиру ВТЕ и контрола



### 3.1.2 Медикаментозна терапија

Резултати поређења употребе антикоагулантне терапије пре јављања прве тромбозе и у време појаве рецидива код ВТЕ пацијената, а за контролне испитанике у тренутку учешћа у студији, као и употреба оралних контрацептива за припаднице женског пола, приказани су у Табели 10. Резултати су показали да у тренутку настанка тромбозе, није било статистички значајне разлике у употреби антикоагулантне терапије између ВТЕ пацијената и здравих испитаника. Није утврђена статистички значајна разлика ни у употреби оралних контрацептива између пацијенткиња са ВТЕ и здравих испитаница.

Табела 10. Употреба терапије и оралних контрацептива

	ВТЕ	Контроле	Укупно	$\chi^2$	p
<b>Терапија*</b>	n (%)	n (%)	n (%)		
Не	84 (81,6)	93 (87,7)	177 (84,7)	1,81	0,407
Да	13 (12,6)	10 (9,4)	23 (11,0)		
<b>Терапија/рецидив**</b>					
Нема рецидив	63 (61,2)				
Нису били на терапији	18 (17,5)				
Користили терапију	20 (19,4)				
Нема податак	2 (1,9)				
<b>Орални контрацептиви</b>					
Не	37 (68,51)	42 (79,24)	79 (73,83)	0,24	0,886
Да	6 (11,11)	5 (9,43)	11 (10,28)		
<b>Нема података</b>	11 (20,37)	6 (11,32)	17 (15,88)		

Терапија\* (За ВТЕ односи се на коришћење антиромботске терапије у време прве тромбозе, а за контроле пре и у тренутку укључења у студију)

Терапија/рецидив\*\*-Само за ВТЕ, односи се на употребу терапије у време појаве рецидива

### 3.2 Резултати анализе стечених фактора ризика и животних навика

Подаци и резултати анализе о присуству коморбидитета (осим ВМИ који је анализиран засебно) код испитаника приказани су у Табели 11. Поређење ВТЕ пацијената са контролном групом показало је да су ВТЕ пацијенти имали значајно чешће коморбидитете у односу на контролну групу, са статистички значајном разликом ( $\chi^2=47,325$ ). Сваки од испитиваних коморбидитета је значајно чешће заступљен код ВТЕ пацијената, а утврђено је и то, да је код нешто више од половине ВТЕ пацијената био присутан бар један од испитиваних коморбидитета. Код обе испитиване групе најчешће присутан коморбидитет била је ХТА, а поред тога, у групи ВТЕ су у значајном броју биле присутне трауме и операције.

Табела 11. Учесталост коморбидитетета

Коморбидитети	ВТЕ n/%	Контроле n/%	Укупно n/%	p
Нема	51 (49,5)	100 (94,3)	151 (72,2)	<b>&lt;0,001</b>
Има	52 (50,5)	6 (5,7)	58 (27,8)	
ХТА	23 (22,3)	5 (4,7)	28 (13,4)	<b>&lt;0,001</b>
Дијабетес	6 (5,8)	0 (0,0)	6 (2,9)	<b>0,013</b>
Трауме и операције	13 (12,6)	1 (0,9)	14 (6,7)	<b>&lt;0,001</b>
Коронарна болест	3 (2,9)	0 (0,0)	3 (1,4)	0,118
Остало	7 (6,8)	0 (0,0)	7 (3,3)	<b>0,006</b>

Резултати анализе поређења ВМІ ВТЕ пацијената са контролном групом, приказани су у Табели 12. Средња вредност и стандардна девијација ВМІ свих испитаника укључених у истраживање износила је  $26,2 \pm 3,9$ . Најнижа вредност ВМІ износила је 17,9, а највиша 38,3. Уочено је да су ВТЕ пацијенти најчешће били изнад нормале ВМІ и гојазни, док су контролни испитаници најчешће имали нормалне ВМІ вредности.

Табела 12. Индекс телесне масе (ВМІ) ВТЕ пацијената и контрола

ВМІ	ВТЕ (n/%)	Контроле (n/%)	Укупно (n/%)	$\chi^2/t/U$	p
Није гојазан	77 (74,8%)	97 (91,5%)	174 (83,3%)	$\chi^2 = 10,515$	<b>&lt;0,001</b>
Јесте гојазан	26 (25,2%)	9 (8,5%)	35 (16,7%)		
Просечна $\pm$ SD	27,0 $\pm$ 4,3	25,4 $\pm$ 3,3	26,2 $\pm$ 3,9	t=3,073	<b>0,002</b>
медијана	26,6	25,2	26,0		
минимум	17,9	18,7	17,9		
максимум	38,3	36,0	38,3		
<b>ВМІ категорије</b>					
Низак	2 (1,9%)	0 (0,0%)	2 (1,0%)	U=4184,0	<b>0,002</b>
Нормалан	30 (29,1%)	51 (48,1%)	81 (38,3%)		
Изнад нормале	45 (43,7%)	46 (43,4%)	91 (43,5%)		
Гојазаност	26 (25,2%)	9 (8,5%)	35 (16,7%)		

Резултати анализе података који се односе на конзумирање цигарета, кафе и алкохола, представљени су у Табели 13. Поређењем ВТЕ пацијената са контролном групом показано је да није било статистичке разлике ни у односу на навику пушења ( $U=5220,0$ ;  $p=0,748$ ) ни према броју цигарета у току дана ( $U=5446,0$ ;  $p=0,972$ ). Највећи број испитаника, у оквиру обе групе, припадао је категорији непушача, а пушачи су најчешће конзумирали 11-20 цигарета дневно.

У односу на конзумирање кафе, највећи број учесника студије конзумирао је кафу. Иако је већи проценат конзумента кафе међу ВТЕ пацијентима, није утврђена статистички значајна разлика између ВТЕ пацијената и контролних испитаника у односу на то да ли конзумирају кафу или не, као ни у односу на количину кафе разврстано на: не пију кафу, пију 1-2 шољице и  $\geq 3$  шољице дневно. ( $\chi^2=0,763$ ,  $p=0,382$ ;  $\chi^2=5,28$ ,  $p=0,071$  редом).

У односу на навику конзумирања алкохола, није утврђена статистичка разлика између ВТЕ пацијената и контролних испитаника ( $U=3026,5$ ;  $p=0,076$ ). Испитаници укључени у истраживање најчешће нису конзумирали алкохол. Такође, не постоји статистички значајна разлика ни у степену конзумирања алкохола између ВТЕ пацијената и контрола ( $\chi^2=5,578$ ;  $p=0,06$ ), мада су испитаници контролне групе чешће конзумирали 1-2 чашице дневно, а ВТЕ пацијенти, или нису пили или су пили  $\geq 3$  чашице дневно.

Табела 13. Животне навике (конзумирање цигарета, кафе и алкохола)

	ВТЕ	Контроле	Укупно
	(n/%)	(n/%)	(n/%)
<b>Пушење</b>			
Не	66 (64,1)	65 (61,3)	131 (62,7)
Да	31 (30,1)	32 (30,2)	62 (29,7)
Бивши пушачи	6 (5,8)	9 (8,5)	15 (7,2)
<b>Број цигарета/дан</b>			
2 до 10	2 (1,9)	11 (10,4)	13 (6,2)
11 до 20	24 (23,3)	21 (19,8)	45 (21,5)
21 до 30	10 (9,7)	7 (6,6)	17 (8,1)
више од 31	1 (1,0)	2 (1,9)	3 (1,4)
<b>Кафа</b>			
Не	21 (20,4)	27 (25,5)	48 (23,0)
Да	82 (79,6)	79 (74,5)	161 (77,0)
<b>Шољица/дан</b>			
Не пију	21 (20,4)	27 (25,5)	48 (23,0)
1 до 2 шољице	56 (54,4)	41 (38,7)	97 (46,4)
≥ 3 шољице	26 (25,2)	38 (35,8)	64 (30,6)
<b>Алкохол</b>			
Не	87 (84,5)	79 (74,5)	166 (79,4)
Да	16 (15,5)	27 (25,5)	43 (20,6)

Поређење активности током слободног времена и у току радног времена, између ВТЕ пацијената и здравих испитаника, приказано је у Табели 14. Није утврђена статистички значајна разлика у степену активности у слободно време између ВТЕ пацијената и контролних испитаника. Насупрот томе, поређење степена физичке активности везано за посао који испитаници обављају у току радног времена, показало је да постоји статистички значајна разлика између ВТЕ пацијената и контролних испитаника. Уочено је да је међу пацијентима у односу на здраве испитанике, било значајно више испитаника који су се бавили седентарним пословима, као и то да се већи број ВТЕ испитаника бавио тежим физичким пословима, а међу здравим испитаницима, највећи број учесника студије се бавио занимањима која су захтевала умерену активност.

Табела 14. Поређење активности ВТЕ пацијената и контролних испитаника

	ВТЕ	Контроле	Укупно	U	p
	(n/%)	(n/%)	(n/%)		
<b>Активност/слободно време</b>					
Активни	20 (19,4)	19 (17,9)	39 (18,7)		
Умерено активни	62 (60,2)	71 (67,0)	133 (63,6)	5291,0	0,653
Нису активни	21 (20,4)	16 (15,1)	37 (17,7)		
<b>Активност/радно време</b>					
Активни (тежи физички рад)	12 (11,7)	7 (6,6)	19 (9,1)		
Умерено активни	48 (46,6)	75 (70,8)	123 (58,9)	4698,0	<b>0,046</b>
седентарни	43 (41,7)	24 (22,6)	67 (32,1)		

### 3.3 Утврђивање повезаности коморбидитета, активности, ВМІ и не О-те крвне групе са животном доби настанка ВТЕ, рецидивима и локализацијом тромбозе

Резултати испитивања повезаности коморбидитета, активности, ВМІ и присуства О-те и не О-те крвне групе, на животну доб настанка ВТЕ (дефинисано на период пре и период после 50-те године старости), приказани су у Табели 15. Није утврђена статистички значајна разлика у дистрибуцији испитиваних фактора ризика у односу на животну доб настанка тромбозе.

Табела 15. Повезаност коморбидитета, активности, ВМІ и крвних група са старошћу настанка ВТЕ

	Пре 50	После 50	Укупно	$\chi^2$	p
	n/%	n/%	n/%		
<b>Коморбидитети</b>					
Има	33 (47,83)	19 (55,88)	52 (50,5)	0,591	0,744
Нема	36 (52,17)	15 (44,12)	51 (49,5)		
<b>Активност-посао</b>					
Седентарни	28 (41,2)	15 (42,9)	43 (41,75)	0,491	0,782
Умерена активност	33 (48,5)	15 (42,9)	48 (46,60)		
Активни	7 (10,3)	5 (14,3)	12 (11,65)		
<b>Активност-слободно време</b>					
Нису активни	13 (19,1)	8 (22,9)	21 (20,39)	0,300	0,861
Умерена активност	41 (60,3)	21 (60,0)	62 (60,19)		
Активни	14 (20,6)	6 (17,1)	20 (19,42)		
<b>ВМІ</b>					
Низак	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (0,97)	4,803	0,187
Нормалан	27 (39,8)	7 (20,0)	34 (33,00)		
Изнад нормале	23 (33,8)	16 (45,7)	39 (37,87)		
Гојазан	17 (25,0)	12 (34,3)	29 (28,16)		
<b>Крвне групе</b>					
Не О-те	51 (75,0)	24 (68,6)	75 (72,82)	0,482	0,487
О-та	17 (25,0)	11 (31,4)	28 (27,18)		

Није утврђена статистички значајна разлика у присуству коморбидитета, ВМІ, степену активности у слободно време и присуству О-те и не О-те крвне у односу на појаву рецидива код ВТЕ пацијената (Табела 16). Утврђено је да је на појаву рецидива утицала активност која се односила на занимање којим су се бавили испитаници студије: пацијенти који су имали рецидиве чешће су се бавили занимањима седентарног карактера у односу на пацијенте без рецидива.

Табела 16. Повезаност коморбидитета, активности, ВМІ и крвних група са настанком рецидива

	Има (n/%)	Нема (n/%)	$\chi^2$	p
<b>Коморбидитети</b>				
Има	19 (47,50)	33 (52,40)	0.233	0,63
Нема	21 (52,5)	30 (47,6)		
<b>Хипертензија</b>				
Има	10 (25,0)	13 (20,63)	0.151	0,70
Нема	30 (75,0)	47 (79,37)		
<b>Активност-посао</b>				
Седентарни	23 (53,5)	20 (46,5)	6,743	<b>0,034</b>
Умерена активност	14 (29,2)	34 (70,8)		
Активни	3 (25,0)	9 (75,0)		
<b>Активност-слободно време</b>				
Активни	7 (35,0)	13 (65,0)	0,642	0,725
Умерена активност	26 (41,9)	36 (58,1)		
Нису активни	7 (33,3)	14 (66,7)		
<b>ВМІ</b>				
Низак	0 (0,0)	1 (100)	4,930	0,177
Нормалан	9 (26,5)	25 (73,5)		
Изнад нормале	16 (41,0)	23 (59,0)		
Гојазан	15 (51,7)	14 (48,3)		
<b>Крвне групе</b>				
Не О-те	31 (41,3)	44 (58,7)	0,725	0,395
О-та	9 (32,19)	19 (67,9)		

Резултати испитивања повезаности коморбидитета, активности, ВМІ и крвних група са локализацијом ВТЕ представљени су у Табели 17. Испитивањем повезаности наведених категорија са локализацијом настанка ВТЕ, није утврђена статистичка значајност испитиваних фактора ризика. Међутим, уочено је да су коморбидитети и ХТА у високом проценту присутна код пацијената са ПЕ, а пацијенти са коморбидитетима, седентарним занимањем и они који су били активни у слободно време, у високом проценту су имали тромбозе у проксималним венама.

Табела 17. Повезаност коморбидитета, активности, ВМІ и крвних група са локализацијом ВТЕ

Фактори ризика	ПЕ (n/%)	Дистално (n/%)	Проксимално (n/%)	Остале вене (n/%)	$\chi^2$	p
<b>Коморбидитети (укупно)</b>						
Има	12 (75,0)	14 (38,89)	21 (53,85)	5 (41,67)	6,33	0,09
Нема	4 (25,0)	22 (61,11)	18 (46,15)	7 (58,33)		
<b>ХТА</b>						
Има	7 (43,75)	7 (19,45)	6 (15,38)	3 (25,0)	5,54	0,13
Нема	9 (56,25)	29 (80,55)	33 (84,62)	9 (75,0)		
<b>Активност-посао</b>						
Седентарни	5 (11,6)	14 (32,6)	21 (48,8)	3 (7,0)	6,040	0,419
Умерена активност	10 (20,8)	17 (35,4)	13 (27,1)	8 (16,7)		
Активни	2 (16,7)	4 (33,3)	4 (33,3)	2 (16,7)		
<b>Акт. слободно време</b>						
Активни	1 (5,0)	7 (35,0)	10 (50,0)	2 (10,0)	11,332	0,079
Умерена активност	8 (12,9)	24 (38,7)	22 (35,5)	8 (12,9)		
Нису активни	8 (38,1)	4 (19,0)	6 (28,6)	3 (14,3)		
<b>ВМІ</b>						
Низак	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10,417	0,318
Нормалан	7 (20,6)	10 (29,4)	14 (41,2)	3 (8,8)		
Изнад нормале	8 (20,5)	10 (25,6)	13 (33,3)	8 (20,5)		
Гојазан	2 (6,9)	14 (48,3)	11 (37,9)	2 (6,9)		
<b>Крвне групе</b>						
Не О-те	16 (21,3)	22 (29,3)	29 (38,7)	8 (10,7)	6,721	0,081
О-та	1 (3,6)	13 (46,4)	9 (32,1)	5 (17,9)		

### 3.4 Анализа генетичких фактора ризика

На Слици 2. приказани су примери амплификата свих испитиваних SNP-s, добијених AS-PCR-ом, на гел-хоризонталној електрофорези, на основу којих је извршена генотипизација. У колони обележеној словом М, представљен је ДНК маркер, дужине 50 бр. Дужина рестрикционих фрагмената, за све испитиване полиморфизме, већ је приказана у Табели 2.



Слика 2. Примери амплификата испитиваних полиморфизама.



### 3.4.1 Тестирање HWE на нивоу свих испитаника

Подаци тестирања дистрибуције учесталости генотипова и алела испитиваних SNPs, у односу на укупан број испитаника студије, приказани су у Табели 18. У односу на све испитанике студије, није било одступања од HWE ни алела ни генотипова.

Табела 18. Резултати HWE у односу на све учеснике студије

SNP	Генотип	Генотип		Алел A <sup>a</sup> Учесталост	Алел a <sup>aa</sup> Учесталост	χ <sup>2</sup>	p
		Добијено	Очекивано				
<b>FV 1691G&gt;A</b>	GG	178	179	0,9258	0,0742	0,329*	0,848
	GA	31	29				
	AA	0	1				
<b>FV HR2 6775A&gt;G</b>	AA	182	183	0,9354	0,0646	0,341*	0,843
	AG	27	25				
	GG	0	1				
<b>FII G20210G&gt;A</b>	GG	185	185	0,9426	0,0574	0,262*	0,877
	GA	24	23				
	AA	0	1				
<b>FII 19911A&gt;G</b>	AA	52	58	0,5287	0,4713	3,288	0,193
	AG	117	104				
	GG	40	47				
<b>FXIII-A 102G&gt;T</b>	GG	121	118	0,7512	0,2488	1,23	0,54
	GT	72	78				
	TT	16	13				
<b>MTHFR 677C&gt;T</b>	CC	62	66	0,5622	0,4378	1,264	0,532
	CT	111	103				
	TT	36	40				
<b>PAI1 4G/5G</b>	5G/5G	37	38	0,4282	0,5718	0,08	0,96
	4G/5G	105	103				
	4G/4G	67	68				
<b>FSAP 1601G&gt;A</b>	GG	192	192	0,9593	0,0407	0,267*	0,875
	GA	17	16				
	AA	0	1				

,\*Фишеров тест; A<sup>a</sup>-дивљи тип алела; a<sup>aa</sup>-варијантни алел; <sup>aaa</sup>За PAI1 4G/5G df=2, за остале SNPs df=1

### 3.4.2 Генетички модели дистрибуције генотипова и алела испитиваних SNPs и хаплотипска анализа

У циљу утврђивања у којој мери SNPs испитиваних гена могу бити повезани са настанком ВТЕ, испитивана је дистрибуција учесталости генотипова и алела у групи ВТЕ пацијената и контролних испитаника. Резултати су приказани у Табели 19. У односу на анализу дистрибуције генотипова, потврђена је значајна статистичка разлика између ВТЕ пацијената и контролних испитаника у учесталости генотипова полиморфизама *FV* 1691 и *FII* 20210. За остале испитиване гене није било статистички значајне разлике у заступљености генотипова. Такође, код *FV* 1691, *FII* 20210, *FV* HR2 6775 и *FSAP* 1601 није било варијантних хомозигота. На нивоу учесталости варијантних алела, статистички значајна разлика у дистрибуцији између ВТЕ пацијената и контрола уочена је код *FV* 1691G>А и *FII* 20210G>А, али и за *FXIII*-А 102G>Т: док је за полиморфизме *FV* 1691 и *FII* 20210, варијантни алел А значајно чешће заступљен код ВТЕ пацијената, за *FXIII*-А 102 варијантни алел Т је чешће заступљен код контролних испитаника.

Табела 19. Учесталост генотипова и алела код ВТЕ пацијената и контролних испитаника

Ген/SNP	Генотип/Алел	ВТЕ (n/%)	Контроле (n/%)	Укупно n/%	$\chi^2$	p
<b>FV 1691G&gt;A</b>	G/G	74 (71,8)	104 (98,1)	178 (85,2)	28,53	<b>&lt;0,001</b>
	G/A	29 (28,2)	2 (1,9)	31 (14,8)		
	алел G	177 (85,9)	210 (99,06)	387 (92,58)	26,25	<b>&lt;0,001</b>
	алел A	29 (14,1)	2 (0,94)	31(7,42)		
<b>FV HR2 6775A&gt;G</b>	A/A	86 (83,5)	96 (90,6)	182 (87,1)	2,32	0,128
	A/G	17 (16,5)	10 (9,4)	27 (12,9)		
	алел A	189 (91,7)	202 (95,3)	391(93,5)	2,16	0,141
	алел G	17 (8,3)	10 (4,7)	27 (6,5)		
<b>FII 20210G&gt;A</b>	G/G	81 (78,6)	104 (98,1)	185 (88,5)	19,49	<b>&lt;0,001</b>
	G/A	22 (21,4)	2 (1,9)	24 (11,5)		
	алел G	184 (89,3)	210 (99,1)	394 (94,3)	18,30	<b>&lt;0,001</b>
	алел A	22 (10,7)	2 (0,9)	24 (5,7)		
<b>FII 19911A&gt;G</b>	A/A	30 (29,1)	22 (20,8)	52 (24,9)	3,51	0,173
	A/G	51 (49,5)	66 (62,3)	117 (56)		
	G/G	22 (21,4)	18 (17)	40 (19,4)		
	алел G	111 (53,9)	110 (51,9)	221 (52,9)	0,17	0,682
	алел A	95 (46,1)	102 (48,1)	197 (47,1)		
<b>FXIII-A 102G&gt;T</b>	G/G	66 (64,1)	55 (51,9)	121 (57,9)	4,10	0,129
	G/T	32 (31,1)	40 (37,7)	72 (34,4)		
	T/T	5 (4,9)	11 (10,4)	16 (7,7)		
	алел G	164 (79,6)	150 (70,7)	314 (75,1)	4,38	<b>0,036</b>
	алел T	42 (20,4)	62 (29,3)	104 (24,9)		
<b>MTHFR 677C&gt;T</b>	C/C	28 (27,2)	34 (32,1)	62 (29,7)	0,66	0,720
	C/T	56 (54,4)	55 (51,9)	111 (53,3)		
	T/T	19 (18,4)	17 (16,0)	36 (17,2)		
	алел C	112 (54,4)	123 (58,0)	235 (56,2)	0,56	0,452
	алел T	94 (45,6)	89 (42,0)	183 (43,8)		
<b>PAI1 4G/5G</b>	5G/5G	17 (16,5)	20 (18,9)	37 (17,7)	0,22	0,894
	4G/5G	52 (50,5)	53 (50,0)	105 (50,2)		
	4G/4G	34 (33,0)	33 (31,1)	67 (32,1)		
	алел 5G	86 (41,7)	93 (43,9)	179 (42,8)	0,19	0,661
	алел 4G	120 (58,3)	119 (56,1)	239 (57,2)		
<b>FSAP 1601G&gt;A</b>	G/G	94 (91,3)	98 (92,5)	192 (91,9)	0,10	0,753
	G/A	9 (8,7)	8 (7,5)	17 (8,1)		
	алел G	197 (95,6)	204 (96,2)	401 (95,9)	0,09	0,758
	алел A	9 (4,4)	8 (3,8)	17 (4,1)		

Анализа дистрибуције генотипова на основу ДМ и РМ није показала значајну разлику у дистрибуцији генотипова у односу на АМ. Резултати су представљени у Табели 20. На основу ДМ, поређењем учесталости генотипова, установили смо да су од осам испитиваних SNPs који се доводе у везу са повећаним ризиком за тромбозе, само су *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* присутни са већом учесталашћу у групи ВТЕ пацијената у односу на здраве испитанике. Због одсуства варијантних хомозигота за оба ова полиморфизма и за *FSAP 1601G>A* рецесивни модел није могао бити примењен.

Табела 20. Учесталост генотипова на основу доминантног и рецесивног модела

Ген/SNP	Генотип/ алели	ВТЕ n/%	Контроле n/%	Укупно n/%	$\chi^2$	p
<i>FV 1691G&gt;A</i>						
Рецесиван модел*	GG+GA AA	103 (100,0)	106 (100,0)	209 (100,0)		
Доминантан модел**	GG GA+AA	74 (71,8) 29 (28,2)	104 (98,1) 2 (1,9)	178 (85,2) 31 (14,8)	28,53	<0,001
<i>FV HR2 6775A&gt;G</i>						
Рецесиван модел*	AA+AG GG	103 (100,0)	106 (100,0)	209 (100,0)		
Доминантан модел**	AA AG+GG	86 (83,5) 17 (16,5)	96 (90,6) 10 (9,4)	182 (87,1) 27 (12,9)	2,32	0,128
<i>FII 20210G&gt;A</i>						
Рецесиван модел*	GG+GA AA	103 (100,0)	106 (100,0)	209 (100,0)		
Доминантан модел**	GG GA+AA	81 (78,6) 22 (21,4)	104 (98,1) 2 (1,9)	185 (88,5) 24 (11,5)	19,49	<0,001
<i>FII 19911A&gt;G</i>						
Рецесиван модел*	AA+AG GG	81 (78,6) 22 (21,4)	88 (83,0) 18 (17,0)	169 (80,9) 40 (19,1)	0,65	0,421
Доминантан модел**	AA AG+GG	30 (29,1) 73 (70,9)	22 (20,8) 84 (79,2)	52 (24,9) 157 (75,1)	1,96	0,162
<i>FXIII-A 102G&gt;T</i>						
Рецесиван модел*	GG+GT TT	98 (95,1) 5 (4,9)	95 (89,6) 11 (10,4)	193 (92,3) 16 (7,7)	2,25	0,133
Доминантан модел**	GG GT+TT	66 (64,1) 37 (35,9)	55 (51,9) 51 (48,1)	121 (57,9) 88 (42,1)	3,18	0,074
<i>MTHFR 677C&gt;T</i>						
Рецесиван модел*	CC+CT TT	84 (81,6) 19 (18,4)	89 (84,0) 17 (16,0)	173 (82,8) 36 (17,2)	0,21	0,645
Доминантан модел**	CC CT+TT	28 (27,2) 75 (72,8)	34 (32,1) 72 (67,9)	62 (29,7) 147 (70,3)	0,60	0,439
<i>PAI1 4G/5G</i>						
Рецесиван модел*	5G/5G+4G/G 4G4G	69 (67,0) 34 (33,0)	73 (68,9) 33 (31,1)	142 (67,9) 67 (32,1)	0,08	0,771
Доминантан модел**	5G/5G 4G/5G+4G/G	17 (16,5) 86 (83,5)	20 (18,9) 86 (81,1)	37 (17,7) 172 (82,3)	0,20	0,655
<i>FSAP 1601G&gt;A</i>						
Рецесиван модел*	GG+GA AA	103 (100,0)	106 (100,0)	209 (100,0)		
Доминантан модел**	GG GA+AA	94 (91,3) 9 (8,7)	98 (92,5) 8 (7,5)	192 (91,9) 17 (8,1)	0,10	0,753

Рецесиван модел\* Варијантни хомозиготи наспрам WT+варијантни хетерозиготи;  
Доминантан модел\*\* WT наспрам варијантни хетерозиготи+ варијантни хомозиготи

3.4.2.1 Хаплотипска анализа за испитиване полиморфизме у *FII* и *FV*

Учесталост испитиваних *FII* полиморфизама, хаплотипова и диплотипова, у укупној популацији и у односу на ВТЕ приказана је у табелама 21 и 22.

Анализа је показала да у испитиваној популацији међу G20210A и A19911G полиморфизмима постоји комплетан LD уз 3 могућа хаплотипа: A-A, G-A и G-G ( $D'=1,0$ ;  $r^2=0,054$ ).

Табела 21. Учесталост SNP, хаплотипова и диплотипова гена *FII* у укупној популацији

	Добијена учесталост	95% CI*
<b>SNP</b>		
G20210A	0,057 (24/418)	(0,039-0,085)
A19911G	0,471 (197/418)	(0,424-0,519)
<b>Хаплотип G20210A-A19911G</b>		
A-A	0,057 (24/418)	(0,039- 0,085)
G-A	0,471 (197/418)	(0,424-0,519)
G-G	0,471 (197/418)	(0,424-0,520)
<b>Диплотип G20210A-A19911G</b>		
G-A/G-A	0,196 (41/209)	(0,148-0,256)
G-A/G-G	0,498 (104/209)	(0,431-0,565)
G-G/G-G	0,191 (40/209)	(0,144-0,254)
G-A/A-A	0,053 (11/209)	(0,029-0,093)
G-G/A-A	0,062 (13/209)	(0,036-0,105)

\*95% (CI) Прорачун интервала поверења према модификованој Wald методи

Табела 22. Учесталост SNP, хаплотипова и диплотипова гена *FII* код ВТЕ и контрола

	ВТЕ		Контроле		$\chi^2$	p
	Добијена учесталост	95% CI*	Добијена учесталост	95% CI*		
<b>SNP</b>						
G20210A	0,107(22/206)	(0,071-0,157)	0,009(2/212)	(0,001-0,036)	14,67	<0,001
A19911G	0,461(95/206)	(0,394-0,529)	0,311(66/212)	(0,253-0,377)	1,19	0,27
<b>Хаплотип G20210A-A19911G</b>						
A-A	0,107(22/206)	(0,071-0,157)	0,009(2/212)	(0,001-0,036)	16,81	<0,001
G-A	0,432(89/206)	(0,366-0,500)	0,509(108/212)	(0,443-0,576)		
G-G	0,461(95/206)	(0,394-0,529)	0,481(102/212)	(0,415-0,548)		
<b>Диплотип G20210A-A19911G</b>						
G-A/G-A	0,194(20/103)	(0,129-0,282)	0,198(21/106)	(0,133-0,285)	10,92	0,027
G-A/G-G	0,378(39/103)	(0,291-0,475)	0,613(65/106)	(0,518-0,700)		
G-G/G-G	0,213(22/103)	(0,145-0,303)	0,169(18/106)	(0,110,0,254)		
G-A/A-A	0,097(10/103)	(0,052-0,172)	0,009(1/106)	(0,000-0,058)		
G-G/A-A	0,116(12/103)	(0,059-0,182)	0,009(1/106)	(0,000-0,058)		

\*95% Прорачун интервала поверења према модификованој Wald методи

Учесталост испитиваних *FV* полиморфизама, хаплотипова и диплотипова у укупној популацији и у односу на ВТЕ приказана је у Табелама 23 и 24.

У испитиваној популацији међу G1691A и A6775G полиморфизмима постоји умерен LD ( $D'=0,597$ ;  $r^2=0,002$ ) и могућа је појава сва 4 хаплотипа.

Табела 23. Учесталост SNP, хаплотипова и диплотипова гена *FV* у укупној популацији

	Учесталост	95% интервал поверења*
<b>SNP</b>		
G1691A	0,074(31/418)	(0,053-0,104)
A6775G	0,065(27/418)	(0,045-0,093)
<b>Хаплотип G1691A-A6775G</b>		
A-A	0,071(28/418)	(0,047-0,096)
G-A	0,868(363/418)	(0,832-0,898)
G-G	0,057(24/418)	(0,039-0,085)
A-G	0,007(3/418)	(0,002-0,022)
<b>Диплотип G1691A-A6775G</b>		
G-A/G-A	0,737(154/209)	(0,673-0,792)
G-A/G-G	0,115(24/209)	(0,078-0,166)
G-A/A-A	0,134(28/209)	(0,094-0,188)
G-A/A-G	0,014(3/209)	(0,003-0,044)

\*95% Прорачун интервала поверења према модификованој Wald методи

Табела 24. Учесталост SNP, хаплотипова и диплотипова гена *FV* код ВТЕ и контрола

	ВТЕ		Контроле		$\chi^2$	p
	Добијена учесталост	95% CI*	Добијена учесталост	95% CI*		
<b>SNP</b>						
G1691A	0,141(29/206)	(0,100-0,196)	0,009(2/212)	(0,001-0,036)	20,9	<0,001
A6775G	0,083(17/206)	(0,052-0,129)	0,047(10/212)	(0,025-0,086)	1,39	0,24
<b>Хаплотип G1691A-A6775G</b>						
A-A	0,126(26/206)	(0,087-0,179)	0,009(2/212)	(0,001-0,036)	24,03	<0,001
G-A	0,791(163/206)	(0,730-0,841)	0,943(200/212)	(0,902-0,968)		
G-G	0,068(14/206)	(0,040-0,112)	0,047(10/212)	(0,025-0,086)		
A-G	0,015(3/206)	(0,003-0,044)	0,0(0/212)	(0,000-0,022)		
<b>Диплотип G1691A-A6775G</b>						
G-A/G-A	0,583(60/103)	(0,486-0,673)	0,887(94/106)	(0,810-0,935)	27,57	<0,001
G-A/G-G	0,136(14/103)	(0,082-0,217)	0,094(10/106)	(0,051-0,167)		
G-A/A-A	0,252(26/103)	(0,178-0,345)	0,019(2/106)	(0,001-0,071)		
G-A/A-G	0,029(3/103)	(0,007-0,087)	0,0(0/106)	(0,000-0,043)		

\*95% 95% Прорачун интервала поверења према модификованој Wald методи

## 3.4.2.2 Дистрибуција учесталости генотипова међу мушкарцима и женама

Дистрибуција генотипова у односу на пол ВТЕ испитаника и контрола приказана је у Табели 25. Поређењем дистрибуције генотипова између мушкараца и жена у оквиру ВТЕ пацијената, није утврђена статистичка разлика ни за један од испитиваних полиморфизама. У оквиру контрола, варијантни хетерозигот *FV HR2 6775A/G* је статистички чешће заступљен код мушкараца, а остали полиморфизми су равномерно заступљени између мушкараца и жена здравих испитаника.

Табела 25. Дистрибуција генотипова анализираних SNPs у односу на пол ВТЕ испитаника и контрола

Ген/Генотип	ВТЕ (n/%)				Контроле (n/%)			
	Мушкарци	Жене	$\chi^2$	p	Мушкарци	Жене	$\chi^2$	p
<b><i>FV 1691G&gt;A</i></b>								
G/G	35 (71,4)	39 (72,2)	0,01	0,93	52 (98,1)	52 (98,1)	*	1,00
G/A	14 (28,6)	15 (27,8)			1 (1,9)	1 (1,9)		
<b><i>FV HR2 6775A&gt;G</i></b>								
A/A	40 (81,6)	46 (85,2)	0,23	0,63	44 (83,0)	52 (98,1)	*	<b>0,02</b>
A/G	9 (18,4)	8 (14,8)			9 (17,0)	1 (1,9)		
<b><i>FII 20210G&gt;A</i></b>								
G/G	37 (75,5)	44 (81,5)	0,54	0,46	53 (100,0)	51 (96,2)	*	0,47
G/A	12 (24,5)	10 (18,5)			0 (0,0)	2 (3,8)		
<b><i>FII 19911A&gt;G</i></b>								
A/A	18 (36,7)	12 (22,2)	0,41	0,13	9 (17,0)	13 (24,2)	1,49	0,47
A/G	24 (49,0)	27 (50,0)			36 (67,9)	30 (56,6)		
G/G	7 (14,3)	15 (27,8)			8 (15,1)	10 (18,9)		
<b><i>FXIII-A 102G&gt;T</i></b>								
G/G	28 (57,1)	38 (70,4)	*	0,21	27 (50,9)	28 (52,8)	0,12	0,95
G/T	17 (34,7)	15 (27,8)			20 (37,7)	20 (37,7)		
T/T	4 (8,2)	1 (1,9)			6 (11,3)	5 (9,4)		
<b><i>MTHFR 677C&gt;T</i></b>								
C/C	11 (22,4)	17 (31,5)	1,17	0,56	15 (28,3)	19 (35,8)	0,69	0,71
C/T	29 (59,2)	27 (50,0)			29 (54,7)	26 (49,1)		
T/T	9 (18,4)	10 (18,5)			9 (17,0)	8 (15,1)		
<b><i>PAI1 4G/5G</i></b>								
5G/5G	11 (22,4)	6 (11,1)	2,40	0,30	10 (18,9)	10 (18,9)	0,05	0,98
4G/5G	23 (46,9)	29 (53,7)			26 (49,1)	27 (50,9)		
4G/4G	15 (30,6)	19 (35,2)			17 (32,1)	16 (30,2)		
<b><i>FSAP 1601G&gt;A</i></b>								
G/G	47 (95,9)	47 (87,0)	*	0,16	49 (92,5)	49 (92,5)	*	1,00
G/A	2 (4,1)	7 (13,0)			4 (7,5)	4 (7,5)		

\*Фишеров тест тачне вероватноће



Анализа заступљености генотипова мушкараца, између ВТЕ и контрола, и генотипова жена, између ВТЕ и контрола, приказана је у Табели 26. Поређењем дистрибуције генотипова између ВТЕ и контрола за мушки пол, утврђено је да су *FV 1691G/A* и *FII 20210G/A* статистички значајно чешће присутни код мушкараца ВТЕ групе, а истим поређењем за женски пол, утврђено је да је поред *FV 1691G/A* и *FII 20210G/A*, такође и *FV HR2 6775A/G*, статистички чешће заступљен код жена ВТЕ групе у односу на контроле.

Табела 26. Заступљеност генотипова међу мушкарацима (ВТЕ/контроле) и женама (ВТЕ/контрола)

Ген/Генотип	Мушкарци (n/%)				Жене (n/%)			
	ВТЕ	Контроле	$\chi^2$	p	ВТЕ	Контроле	$\chi^2$	p
<b><i>FV 1691G&gt;A</i></b>								
G/G	35 (71,4)	52 (98,1)	*	<0,001	39 (72,2)	52 (98,1)	*	<0,001
G/A	14 (28,6)	1 (1,9)			15 (27,8)	1 (1,9)		
<b><i>FV HR2 6775A&gt;G</i></b>								
A/A	40 (81,6)	44 (83,0)	0,01	0,94	46 (85,2)	52 (98,1)	*	0,039
A/G	9 (18,4)	9 (17,0)			8 (14,8)	1 (1,9)		
<b><i>FII 20210G&gt;A</i></b>								
G/G	37 (75,5)	53 (100,0)	*	<0,001	44 (81,5)	51 (96,2)	*	0,034
G/A	12 (24,5)	0 (0,0)			10 (18,5)	2 (3,8)		
<b><i>FII 19911A&gt;G</i></b>								
A/A	18 (36,7)	9 (17,0)			12 (22,2)	13 (24,2)		
A/G	24 (49,0)	36 (67,9)	5,32	0,07	27 (50,0)	30 (56,6)	1,19	0,55
G/G	7 (14,3)	8 (15,1)			15 (27,8)	10 (18,9)		
<b><i>FXIII-A 102G&gt;T</i></b>								
G/G	28 (57,1)	27 (50,9)			38 (70,4)	28 (52,8)		
G/T	17 (34,7)	20 (37,7)	*	0,94	15 (27,8)	20 (37,7)	*	0,21
T/T	4 (8,2)	6 (11,3)			1 (1,9)	5 (9,4)		
<b><i>MTHFR 677C&gt;T</i></b>								
C/C	11 (22,4)	15 (28,3)			17 (31,5)	19 (35,8)		
C/T	29 (59,2)	29 (54,7)	0,46	0,79	27 (50,0)	26 (49,1)	0,34	0,84
T/T	9 (18,4)	9 (17,0)			10 (18,5)	8 (15,1)		
<b><i>PAI1 4G/5G</i></b>								
5G/5G	11 (22,4)	10 (18,9)			6 (11,1)	10 (18,9)		
4G/5G	23 (46,9)	26 (49,1)	0,20	0,90	29 (53,7)	27 (50,9)	1,32	0,52
4G/4G	15 (30,6)	17 (32,1)			19 (35,2)	16 (30,2)		
<b><i>FSAP 1601G&gt;A</i></b>								
G/G	47 (95,9)	49 (92,5)	*	0,75	47 (87,0)	49 (92,5)	*	0,54
G/A	2 (4,1)	4 (7,5)			7 (13,0)	4 (7,5)		

\*Фишеров тест тачне вероватноће

### 3.4.2.3 Дистрибуција учесталости генотипова у односу на ВТЕ дијагнозу (ТДВ и ПЕ и ТДВ/ПЕ)

Анализа дистрибуције генотипова ВТЕ пацијената у односу на дијагнозу приказана је у Табели 27. Генотипови испитиваних SNPs, код пацијената са различитим формама ВТЕ, су равномерно заступљени, осим за *FV 1691G>A*. Постоји статистички значајна разлика у дистрибуцији варијантног генотипа за *FV 1691G>A* у односу на дијагнозу ВТЕ испитаника. Хетерозиготни генотип за *FV 1691G>A* је значајно чешће присутан код ТДВ пацијената у односу на пацијенте са дијагнозом ТДВ/ПЕ и/или ПЕ.

Табела 27. Дистрибуција генотипова у односу на дијагнозу ВТЕ пацијената

Ген/Генотип	ТДВ n/%	ТДВ/ПЕ и ПЕ n/%	$\chi^2$	p
<b><i>FV 1691G&gt;A</i></b>				
G/G	41 (64,1)	33 (84,6)	5,061	<b>0,024</b>
G/A	23 (35,9)	6 (15,4)		
<b><i>FV HR2 6775A&gt;G</i></b>				
A/A	55 (85,9)	31 (79,5)	0,732	0,392
A/G	9 (14,1)	8 (20,5)		
<b><i>FII 20210G&gt;A</i></b>				
G/G	52 (81,3)	29 (74,4)	0,685	0,408
G/A	12 (18,8)	10 (25,6)		
<b><i>FII 19911A&gt;G</i></b>				
A/A	21 (32,8)	11 (28,2)	0,368	0,832
A/G	29 (45,3)	20 (51,3)		
G/G	14 (21,9)	8 (20,5)		
<b><i>FXIII-A 102G&gt;T</i></b>				
G/G	41 (64,1)	25 (64,1)	*	0,676
G/T	19 (29,7)	13 (33,3)		
T/T	4 (6,3)	1 (2,6)		
<b><i>MTHFR 677C&gt;T</i></b>				
C/C	21 (32,8)	7 (17,9)	2,708	0,258
C/T	32 (50,0)	24 (61,5)		
T/T	11 (17,2)	8 (20,5)		
<b><i>PAI1 4G/5G</i></b>				
5G/5G	11 (17,2)	6 (15,4)	1,267	0,531
4G/5G	29 (45,3)	22 (56,4)		
4G/4G	24 (37,5)	11 (28,2)		
<b><i>FSAP 1601G&gt;A</i></b>				
G/G	60 (93,8)	34 (87,2)	*	0,432
G/A	4 (6,3)	5 (12,8)		

\*Фишеров тест тачне вероватноће

### 3.4.2.4 Утврђивање утицаја испитиваних полиморфизама на, животну доб испољавања ВТЕ, локализацију ВТЕ и појаву рецидива.

Резултати анализе дистрибуције генотипова у односу на животну доб настанка прве тромбозе приказани су у Табели 28. Поређењем пацијената који су развили тромбозу пре и после 50-те године показано је да међу њима нема значајне статистичке разлике у дистрибуцији генотипова.

Табела 28. Дистрибуција генотипова у односу на животну доб настанка прве тромбозе код ВТЕ пацијената

Ген/Генотип	Животна доб ВТЕ пацијената			$\chi^2$	p
	пре 50 (n/%)	после 50 (n/%)	Укупно (n/%)		
<i>FV 1691G&gt;A</i>					
G/G	45 (66,2)	29 (82,9)	74 (71,8)	3,178	0,075
G/A	23 (33,8)	6 (17,1)	29 (28,2)		
<i>FV HR2 6775A&gt;G</i>					
A/A	57 (83,8)	29 (82,9)	86 (83,5)	0,016	0,899
A/G	11 (16,2)	6 (17,1)	17 (16,5)		
<i>FII 20210G&gt;A</i>					
G/G	55 (80,9)	27 (77,1)	82 (79,6)	0,199	0,655
G/A	13 (19,1)	8 (22,9)	21 (20,4)		
<i>FII 19911A&gt;G</i>					
A/A	21 (30,9)	9 (25,7)	30 (29,1)	3,203	0,202
A/G	36 (52,9)	15 (42,9)	51 (49,5)		
G/G	11 (16,2)	11 (31,4)	22 (21,4)		
<i>FXIII-A 102G&gt;T</i>					
G/G	39 (57,4)	27 (77,1)	66 (64,1)	*	0,254
G/T	25 (36,8)	7 (20,0)	32 (31,1)		
T/T	4 (5,9)	1 (2,9)	5 (4,9)		
<i>MTHFR 677C&gt;T</i>					
C/C	18 (26,5)	10 (28,6)	28 (27,2)	*	0,586
C/T	35 (51,5)	21 (60,0)	56 (54,4)		
T/T	15 (22,1)	4 (11,4)	19 (18,4)		
<i>PAI1 4G/5G</i>					
5G/5G	11 (16,2)	6 (17,1)	17 (16,5)	1,053	0,591
4G/5G	36 (52,9)	15 (42,9)	51 (49,5)		
4G/4G	21 (30,9)	14 (40,0)	35 (34,0)		
<i>FSAP 1601G&gt;A</i>					
G/G	64 (94,1)	30 (85,7)	94 (91,3)	*	0,267
G/A	4 (5,9)	5 (14,3)	9 (8,7)		

\* Фишеров тест тачне вероватноће

У односу на локализацију тромботског инцидента, утврђена је статистичка значајност за дистрибуцију генотипа *FSAP* 1601G>A. Пацијенти који су имали ПЕ, значајно чешће су били носиоци варијантног алела *FSAP* 1601A, у односу на ВТЕ пацијенте са тромбозом на другим локализацијама. За остале испитиване SNPs код ВТЕ пацијената, није утврђена статистичка значајност у дистрибуцији генотипова у односу на локализацију болести. Резултати дистрибуције генотипова испитиваних SNPs у односу на локализацију ВТЕ догађаја, приказани су у Табели 29.

Табела 29. Дистрибуција генотипова у односу на локализацију ВТЕ

Ген/Генотип	РЕ n/%	Дистално n/%	Проксимално n/%	Остале вене n/%	Укупно n (%)	$\chi^2$	p
<i>FV</i> 1691G>A							
G/G	15 (88,2)	23 (65,7)	28 (73,7)	8 (61,5)	74 (71,8)	3,654	0,301
G/A	2 (11,8)	12 (34,3)	10 (26,3)	5 (38,5)	29 (28,2)		
<i>FV</i> HR2 6775A>G							
A/A	13 (76,5)	28 (80,0)	35 (92,1)	10 (76,9)	86 (83,5)	3,371	0,338
A/G	4 (23,5)	7 (20,0)	3 (7,9)	3 (23,1)	17 (16,5)		
<i>FII</i> 20210G>A							
G/G	16 (94,1)	29 (82,9)	27 (71,1)	10 (76,9)	82 (79,6)	4,204	0,240
G/A	1 (5,9)	6 (17,1)	11 (28,9)	3 (23,1)	21 (20,4)		
<i>FII</i> 19911A>G							
WT (A/A)	4 (23,5)	11 (31,4)	12 (31,6)	3 (23,1)	30 (29,1)	2,812	0,832
A/G	7 (41,2)	18 (51,4)	19 (50,0)	7 (53,8)	51 (49,5)		
G/G	6 (35,3)	6 (17,1)	7 (18,4)	3 (23,1)	22 (21,4)		
<i>FXIII</i> A 102G>T							
G/G	11 (64,7)	25 (71,4)	21 (55,3)	9 (69,2)	66 (64,1)	7,349	0,290
G/T	5 (29,4)	9 (25,7)	16 (42,1)	2 (15,4)	32 (31,1)		
T/T	1 (5,9)	1 (2,9)	1 (2,6)	2 (15,4)	5 (4,9)		
<i>MTHFR</i> 677C>T							
C/C	3 (17,6)	10 (28,6)	14 (36,8)	1 (7,7)	28 (27,2)	12,400	<b>0,054</b>
C/T	13 (76,5)	17 (48,6)	15 (39,5)	11 (84,6)	56 (54,4)		
T/T	1 (5,9)	8 (22,9)	9 (23,7)	1 (7,7)	19 (18,4)		
<i>PAI1</i> 4G/5G							
5G/5G	2 (11,8)	5 (14,3)	8 (21,1)	2 (15,4)	17 (16,5)	6,091	0,413
4G/5G	11 (64,7)	16 (45,7)	15 (39,5)	9 (69,2)	51 (49,5)		
4G/4G	4 (23,5)	14 (40,0)	15 (39,5)	2 (15,4)	35 (34,0)		
<i>FSAP</i> 1601G>A							
G/G	12 (70,6)	33 (94,3)	36 (94,7)	13 (100,0)	94 (91,3)	11,333	<b>0,010</b>
G/A	5 (29,4)	2 (5,7)	2 (5,3)	0 (0,0)	9 (8,7)		

Дистрибуција генотипова у односу на рецидиве приказана је у Табели 30. Поређењем дистрибуције генотипова испитиваних гена, осим за *FSAP* 1601G>A, није утврђена статистички значајна разлика међу пацијентима који су имали рецидиве у односу на оне који нису имали рецидиве ВТЕ болести. Наиме, нико од пацијената са варијантним генотипом *FSAP* 1601G>A није имао рецидив. Осим тога, уочено је да је више од половине ВТЕ пацијената са рецидивом (57,5%), имало најмање једну од ове три ризичне варијанте; *FV*1691 G>A, *FII* 20210 G>A и *FV* HR2 6775A>G, а у односу на укупан број рецидива са овим варијантама, само код два пацијента су истовремено била присутна по два ризична генотипа (код једног *FII* 20210 G>A и *FV* 1691 G>A, код другог *FII* 20210 G>A и *FV* HR2 6775A>G).

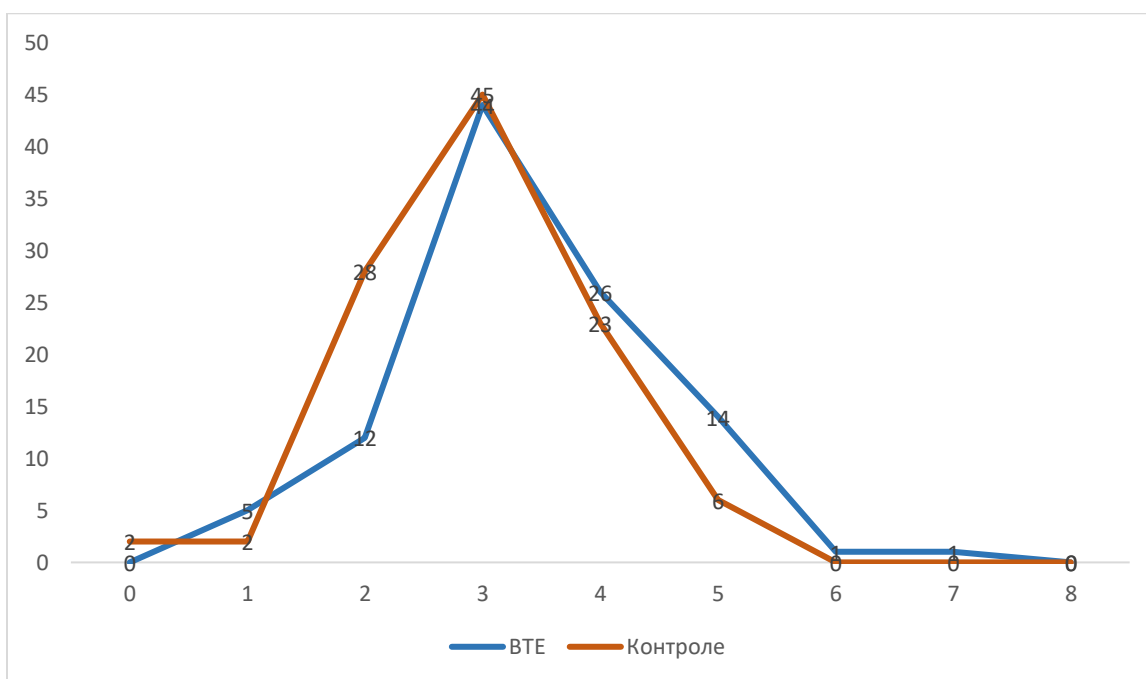
Табела 30. Дистрибуција генотипова у односу на рецидиве

Ген/Генотип	Рецидиви		$\chi^2$	p
	Не (n/%)	Да (n/%)		
<i>FV</i> 1691G>A				
G/G	42 (56,8)	32 (43,2)	2,15	0,14
G/A	21 (72,4)	8 (27,6)		
<i>FV</i> HR2 6775A>G				
A/A	51 (59,3)	35 (40,7)	0,76	0,38
A/G	12 (70,6)	5 (29,4)		
<i>FII</i> 20210G>A				
G/G	51 (63,0)	30 (37,0)	0,52	0,47
G/A	12 (54,5)	10 (45,5)		
<i>FII</i> 19911A>G				
A/A	16 (53,3)	14 (46,7)	3,30	0,19
A/G	30 (58,8)	21 (41,2)		
G/G	17 (77,3)	5 (22,7)		
<i>FXIII</i> A 102G>T				
G/G	40 (60,6)	26 (39,4)		0,98*
G/T	20 (62,5)	12 (37,5)		
T/T	3 (60,0)	2 (40,0)		
<i>MTHFR</i> 677C>T				
C/C	19 (67,9)	9 (32,1)	0,73	0,69
C/T	33 (58,9)	23 (41,1)		
T/T	11 (32,0)	8 (42,1)		
<i>PAI1</i> 4G/5G				
5G/5G	10 (58,8)	7 (41,2)	0,90	0,64
4G/5G	30 (57,7)	22 (42,3)		
4G/4G	23 (67,6)	11 (32,4)		
<i>FSAP</i> 1601G>A				
G/G	54 (57,4)	40 (100,0)		0,01*
G/A	9 (100,0)	0 (0,0)		

\* Фишеров тест тачне вероватноће

### 3.4.2.5 Дистрибуција присуства већег броја измењених SNPs код ВТЕ пацијената и здравих испитаника, у оквиру животне доби и у односу на појаву рецидива

Резултати дистрибуције учесталости вишеструког броја варијантних хетерозигота и хомозигота за испитиване SNPs у оквиру ВТЕ пацијената и здравих испитаника приказани су Графиконом 4. На x оси је представљен број испитиваних полиморфизама (опсег 0-8), а на y оси број пацијената у односу на број полиморфизама. Утврђена је статистички значајна разлика у броју измењених SNPs између ВТЕ пацијената и контролних испитаника ( $U=4334,0$ ;  $p=0,007$ ). Уочено је да је највећи број испитаника имао по 3 хетерозиготне и/или хомозиготне варијације, а ВТЕ пацијенти су чешће имали 4 и више полиморфизма истовремено, у односу на контроле. Код ВТЕ пацијената није било испитаника да нису имали ни један измењени генотип, док је у контролној групи, са WT генотипом, за све испитиване гене, присутно само два испитаника.



Графикон 4 Дистрибуција већег броја измењених SNPs у оквиру испитиваних група.

У Табели 31, приказано је поређење дистрибуције броја полиморфизама у оквиру старосних група испитаника. Утврђено је да су варијантни хетерозиготи и/или хомозиготи на 4 и више гена чешће заступљени код ВТЕ пацијената млађих од 50 година у односу на контролне испитанике исте старосне доби. Насупрот томе, није било статистички значајне разлике у дистрибуцији броја SNPs ( $< 4$  и  $\geq 4$ ) између ВТЕ испитаника и контрола у оквиру старосне доби изнад 50 година.

Табела 31. Поређење дистрибуције броја SNPs у оквиру старосних група ВТЕ и контрола

Број SNPs	ВТЕ (n/%)	Контроле (n/%)	$\chi^2$	p
<b>Млађи од 50 г.</b>	69 (66,70)	87 (73,56)		
< 4	39 (56,52)	65 (74,71)	5,730	<b>0,02</b>
$\geq 4$	30 (43,48)	22 (25,29)		
<b>Старији од 50 г.</b>	34 (33,30)	19 (26,44)		
< 4	22 (64,70)	12 (63,1)	0,013	0,90
$\geq 4$	12 (35,30)	7 (36,8)		
<b>Укупно</b>	103 (100,0)	106 (100,0)		
< 4	61 (59,2)	77 (72,64)	4,20	<b>0,04</b>
$\geq 4$	42 (40,78)	29 (27,36)		

Резултати анализе дистрибуције вишеструких SNPs у односу на старост настанка ВТЕ, рецидиве и вишеструке рецидиве приказани су у Табели 32. Уочено је да је у оквиру свих ових категорија, просечан број SNP износио 3, са опсегом 1-7. У односу на старост ВТЕ испитаника када су доживели тромбозу (дефинисана на период настанка ВТЕ пре 50-те и после 50-те године), испитивање дистрибуције присуства већег броја SNPs између ове две подгрупе ВТЕ пацијената, није показало статистички значајну разлику. Код пацијената који су добили тромбозу пре 50-те године, опсег укупног броја полиморфизама износио је 1-7, а код пацијената који су добили тромбозу после 50 година, 1-5.

Табела 32. Дистрибуција вишеструког броја SNPs у односу на старост прве ВТЕ, рецидиве и вишеструке рецидиве

	опсег SNPs	Број измењених SNPs		p
		медијана	U*	
<b>Старост прве ВТЕ</b>				
пре 50-те године	(1-7)	3	990,0	0,143
после 50-те године	(1-5)	3		
<b>Рецидиви</b>				
са рецидивима	(1-5)	3	1168,5	0,632
без рецидива	(1-7)	3		
<b>Вишеструки рецидиви</b>				
Да	(1-4)	3	443,5	0,801
Не	(1-7)	3		

U\*Mann–Whitney U test

Поређењем заступљености већег броја измењених генотипова у односу на то да ли су ВТЕ пацијенти имали рецидив болести или не, као и у односу на то да ли су имали само један рецидив или већи број рецидива, такође, није показало статистички значајну разлику.

#### 3.4.2.6 Регресиона анализа

Резултати униваријантне логистичке регресије за процену ризика за настанак ВТЕ у односу на најзначајније стечене факторе ризика и генотипове, приказани су у Табели 33. Посматрано на нивоу појединачног утицаја на ризик од ВТЕ, као стечени фактори ризика за настанак ВТЕ показали су се породични ризик, присуство коморбидитета и ВМI. У односу на генетичке факторе ризика, потврђена је повезаност присуства генотипова *FV* 1691G>А и *FII* 20210G>А са вишеструко повећаним ризиком од развоја ВТЕ болести. За остале испитиване полиморфизме и стечене факторе ризика, није уочено постојање повећаног ризика ни протективне улоге за настанак ВТЕ.



Табела 33. Униваријантна логистичка регресија са ВТЕ као зависном варијаблом

Независне варијабле	Контроле наспрам ВТЕ			
	B*	p	OR**	95% CI***
Пол (Ж наспрам М)	0.098	0.726	1.1	0.64-1.90
Старост	-0.014	0.221	0.99	0.96-1.01
Породични ризик	1.43	<b>&lt;0,001</b>	<b>4.18</b>	2.13-8.19
Коморбидитети	2.716	<b>&lt;0,001</b>	<b>15.12</b>	6.09-37.57
Навика пушења	-0.082	0.591	0.92	0.68-1.24
Конзумирање кафе	0.349	0.296	1.42	0.74-2.73
Количина кафе	-0,104	0,584	0,90	0,62-1,31
Конзумирање алкохола	-0.620	0.078	0.54	0.27-1.07
Активност слободно време	-0.105	0.649	0.9	0.57-1.41
Занимање активност	-0.397	0.092	0.67	0.42-1.07
BMI	0.113	<b>0.003</b>	<b>1.12</b>	1.04-1.21
BMI Категорије	0.615	<b>0.002</b>	<b>1.85</b>	1.25-2.73
О-та наспрам не О-та	0.403	0.179	1.5	0.83-2.7
<b>FV 1691G&gt;A</b>				
G/G	реф.кат.			
G/A	3.014	<b>&lt;0,001</b>	<b>20.38</b>	4.72-88.06
<b>FII 20210G&gt;A</b>				
G/G	реф.кат.			
G/A	2.648	<b>&lt;0,001</b>	<b>14.12</b>	3.23-61.82
<b>FII 19911A&gt;G</b>				
A/A	реф.кат.			
A/G	-0,568	0,092	0,57	0,29-1,01
G/G	-0,109	0,796	0,90	0,39-2,06
<b>FVHR2 6775A&gt;G</b>				
A/A	реф.кат.			
A/G	0,641	0,132	1,90	0,82-4,37
<b>FXIII-A102G&gt;T</b>				
G/G	реф.кат.			
G/T	-0,405	0,176	0,67	0,37-1,20
T/T	-0,971	0,088	0,38	0,12-1,16
<b>MTHFR 677C&gt;T</b>				
C/C	реф.кат.			
C/T	0,212	0,467	1,24	0,66-2,31
T/T	0,305	0,447	1,36	0,60-3,10
<b>PAI1 4G/5G</b>				
5G/5G	реф.кат.			
4G/5G	0,143	0,708	1,15	0,55-2,45
4G/4G	0,192	0,639	1,21	0,54-2,71
<b>FSAP 1601G&gt;A</b>				
G/G	реф.кат.			
G/A	0,159	0,753	1,17	0,43-3,17

\*B-регресиони коефицијент; \*\*OR (engl.Odds ratio)-однос шанси; \*\*\*CI (95% интервал поверења)

Резултати мултиваријантне регресионе анализе заједничког утицаја генотипова свих испитиваних SNPs, према адитивном и доминантном генетичком моделу, и ризика од ВТЕ, приказани су у Табели 34. Резултати су показали да варијантни генотипови: *FV1691G>A*, *FII 20210G>A* и *FV HR26775A>G*, на основу оба наведена генетичка модела, носе повећан ризик за настанак тромбозе. Насупрот томе, уочено је да варијантни генотип *FXIII-A 102G>T* остварује протективно деловање на настанак ВТЕ. За остале анализираних гене није

показано постојање ни повећаног ни смањеног ризика за настанак ВТЕ у присуству варијантних генотипова.

Табела 34. Мултиваријантна логистичка регресија утицаја генотипова (адитивни и ДМ) на појаву ВТЕ

SNP/Генотип АМ	ВТЕ наспрам контрола		
	B	p	OR(95%CI)
<i>FV 1691G&gt;A</i>			
G/A	3.288	<b>&lt;0,000</b>	26,80 (5,851-122,75)
<i>FII 20210G&gt;A</i>			
G/A	3.231	<b>&lt;0,000</b>	25,31 (5,171-123,911)
<i>FII 19911A&gt;G</i>			
A/A		0,254	
A/G	-0,417	0,339	0,66 (0,280-1,543)
G/G	0,268	0,610	1,31 (0,467-3,659)
<i>FV HR26775A&gt;G</i>			
A/G	0,988	<b>0,039</b>	2,71 (1,054-6,984)
<i>FXIII- A 102G&gt;T</i>			
G/G		0,043	
G/T	-0,843	<b>0,027</b>	0,43 (0,204-0,910)
T/T	-1,077	0,110	0,34 (0,091-1,275)
<i>MTHFR 677C&gt;T</i>			
C/C		0,220	
C/T	0,623	0,114	1,86 (0,860-4,04)
T/T	0,058	0,913	1,06 (0,372-3,021)
<i>PAI 1 4G/5G</i>			
5G/5G		0,808	
4G/5G	0,258	0,584	1,29 (0,514-3,261)
4G/4G	0,067	0,896	1,07 (0,392-2,920)
<i>FSAP 1601G&gt;A</i>			
G/A	0,276	0,642	1,32 (0,411-4,228)
<b>SNP/Генотип ДМ</b>			
<i>FV1691G&gt;A</i>	3,224	<b>&lt;0,000</b>	25,13(5,590-112,987)
<i>FII 20210G&gt;A</i>	3,001	<b>&lt;0,000</b>	20,11 (4,253-95,117)
<i>FII 19911A&gt;G</i>	-0,027	0,514	0,76 (0,340-1,715)
<i>FV HR26775A&gt;G</i>	1,062	<b>0,024</b>	2,89 (1,149-7,284)
<i>FXIII- A 102G&gt;T</i>	-0,778	<b>0,025</b>	0,46 (0,233-0,907)
<i>MTHFR 677C&gt;T</i>	0,545	0,146	1,72 (0,828-3,597)
<i>PAI 1 4G/5G</i>	0,245	0,581	1,28 (0,536-3,044)
<i>FSAP 1601G&gt;A</i>	0,325	0,574	1,38 (0,447-4,288)

У Табели 35. приказани су резултати мултиваријантне логистичке регресионе анализе заједничког утицаја значајних стечених предиктора и генотипова свих анализираних полиморфизама, према доминантном генетичком моделу, на ризик од ВТЕ. Приликом укључивања свих наведених фактора у регресиону анализу, потврђен је вишеструки ризик за ВТЕ у присуству породичног ризика, коморбидитета и гојазности. Од генетичких фактора ризика, са вишеструко повећаним ризиком од ВТЕ, потврђени су варијантни генотипови за: *FV1691G>A* и *FII 20210G>A*. Такође, показано је и да *MTHFR 677C>T*, у присуству свих наведених фактора, има повећан ризик од ВТЕ, а значај ризика *FV HR26775A>G* за ВТЕ је на граници дефинисане статистичке значајности.

Табела 35. Мултиваријантна анализа заједничког утицаја генотипова (ДМ) и осталих предиктора на ризик од ВТЕ

Предиктори	Контроле наспрам ВТЕ		
	B	p	OR(95%CI)
Пол	0.15	0.76	1.17 (0.43-3.20)
Породични ризик*	1.46	<b>0.005</b>	4.32 (1.56-11.91)
Коморбидитети *	3.29	<b>&lt;0,000</b>	26.87 (8.46-85.33)
ВМI (није и јесте гојазан)	1.82	<b>0.007</b>	6.12 (1.63-22.99)
Кафа **	-0.98	0.07	0.37 (0.13-1.08)
Алкохол **	-0.7	0.27	0.50 (0.14-1.71)
Пушење **	-0.42	0,66	0,66 (0,10-4,19)
Активност **	0.21	0.73	1.23 (0.39-3.89)
<i>FV1691G&gt;A</i> ¶	3.76	<b>&lt;0,000</b>	43.09 (7.70-241.04)
<i>FII 20210G&gt;A</i> ¶	3.54	<b>&lt;0,000</b>	34.58 (6.02-198.55)
<i>FII 19911A&gt;G</i> ¶	-0.46	0.39	0.63 (0.22-1.79)
<i>FV HR26775A&gt;G</i> ¶	1.24	<b>0.05</b>	3.45 (0.98-12.20)
<i>FXIII- A 102G&gt;T</i> ¶	-0.43	0.34	0,65 (0.27-1.58)
<i>MTHFR 677C&gt;T</i> ¶	1.03	<b>0.04</b>	2.81 (1.03-7.61)
<i>PAI 1 4G/5G</i> ¶	0.28	0.64	1.32 (0.42-4.16)
<i>FSAP 1601G&gt;A</i> ¶	0.21	0.81	1.22 (0.27-5.54)

\*-Односи се на (нема/има); \*\*-односи се на (не/да); ¶-односи се на доминантан генетички модел

## 4 ДИСКУСИЈА

### 4.1 Основне карактеристике испитиваних група

Тромбоза је сложена болест са значајном улогом у инциденцији и преваленцији обољевања и смртности на годишњем нивоу у целом свету, а због озбиљне тежине клиничке слике у великом проценту случајева, често је са последицом значајног нарушавања квалитета живота и представља озбиљан медицинско-социјални проблем.

Због чињенице да присуство истих ризико-фактора за настанак тромбозе код неких особа изазива болест а код неких не, истраживање етиологије ВТЕ још увек привлачи пажњу истраживача. Иако се ВТЕ може јавити у било ком узрасту, епидемиолошке студије су показале да се, у односу на општу популацију, тромбозе значајно чешће јављају код особа старије животне доби (61,64,75,288,289). Са годинама долази до пораста обољевања вена које су изазване појачаном акумулацијом патолошких процеса зависних од старости и повећане преваленције провоцирајућих фактора ризика за ВТЕ, што заједно утиче на васкуларну старост вена и осетљивост на упалне и тромботичке процесе (288,289). У склопу патолошких процеса, значајан допринос васкуларној старости доприносе протромбогене промене ендотела и морфолошке промене венског зида у којима се формирају удубљења погодна за акумулирање активираних тромбоцита и фактора коагулације (289,290). Међутим, посматрано у склопу мултифакторске каузалности, посебно генетичке предиспозиције, тромбозе се често дешавају пре 50-те године старости (61,88,101-103). Стога је, осим анализирања фактора ризика у односу на укупне групе испитаника, анализа спроведена и у односу на старосне групе пацијената: млађи и старији од 50 година. У нашој истраживачкој групи, број ВТЕ пацијената млађих од 50 година је скоро двоструко већи у односу на пацијенте старије од 50 година, а у односу на животне декаде, највећи број пацијената био је старосне доби 30-39 година, што даје на значају испитивању присуства генетичких протромбогених фактора.

Чињеница да чланови породице осим генетичких, често деле и заједничке факторе ризика спољашње средине, породична анамнеза пацијента представља значајну информацију у процени ризика од ВТЕ (291). Осим тога, породична историја може бити потенцијално корисна информација за клиничку процену ризика од ВТЕ, чак и код сродника другог и трећег степена (101,292,293). У нашој студији је приближно 40% ВТЕ пацијената изјавило да имају чланове породице са ВТЕ или кардиоваскуларним болестима, што је статистички значајно чешће у односу на контроле, а анализа је показала да особе са породичним оптерећењем имају око 4 пута повећан ризик за настанак тромбозе у односу на особе без овог оптерећења. Резултати наше студије су потврдили да породични ризик има значајну улогу у настанку ВТЕ, што је у складу са подацима из литературе у којима се наводи да породична историја носи повећан ризик за ВТЕ (1101,292,293).

Антигени АБО крвних група, осим високе експресије на површини еритроцита, значајно су експримирани и на површини тромбоцита и васкуларном ендотелу и корелирају са повећаним нивоима FVIII и vWf у плазми (294). Осим тога, констатовано је да је код носилаца не О-те крвне групе повећан ниво липида у крви који, такође, представљају проинфламаторне биомаркере за кардиоваскуларне болести (294). Иако је велики број студија у којима се наводи да носиоци не О-те крвне групе корелирају са повећаним ризиком од ВТЕ (61,87,159,160,295), у нашем истраживању није утврђена повезаност не О-те крвне групе са ВТЕ. Један од могућих разлога за овакав резултат је релативно мали број испитаника, као и то да заступљеност АБО фенотипова делимично зависи од етничког порекла и географске припадности и на тај начин, приликом истраживања, може утицати на исходе резултата о утицају на болести. С обзиром на то да је највећи број испитаника наше студије имао А крвну групу, што јесте у складу са заступљеношћу ове крвне групе у општој популацији у нашим географским подручју (296,297), а уочено је да је у оквиру групе ВТЕ пацијената процентуално било присутно више испитаника са не О-ом крвном групом у односу на О-ту крвну групу, завређује пажњу додатног истраживања на већем узорку испитаника.

Због сложености и различите манифестације ВТЕ болести, пацијенти су анализирани у односу на најзначајније карактеристике ВТЕ. У односу на примарну дијагнозу, највећи број наших испитаника имао је ТДВ, што корелира са званичним подацима о заступљености дијагноза у оквиру ВТЕ пацијената, као и у односу на укупну учесталост ТДВ и ПЕ у општој популацији (61,63,68,71,72,224). Као значајне компликације ВТЕ болести анализирани су рецидиви. Ризик од тромботичких рецидива делимично је одређен факторима присутних ризика у време првог тромботичног напада, односно већи ризик за рецидиве је присутан код непровоцираних тромбоза него код провоцираних (298). Према подацима студија, стопа рецидива у првој години креће се у просеку 7-10%, у прва 24 месеца 3,3-7,4%, око 25% пацијената са непровоцираном ВТЕ развије рецидив у року од 5 година након постављања дијагнозе, а укупан ризик од поновљене ВТЕ приближава се 40% у току 10 година праћења (54,88,298-302). У поређењу са расположивим резултатима, стопа рецидива наше студије у првој години је значајно виша, са посебно високом учесталошћу код пацијената са дијагнозом ТДВ/ПЕ. С обзиром на то да пацијенте нисмо стратификовали у односу на провоциране и непровоциране тромбозе, као и то да око 50% пацијената са понављаном тромбозом може имати заосталу венску тромбозу, која може дати лажну дијагнозу поновљене тромбозе, можемо рећи да наши резултати, посматрано на укупан период праћења рецидива, износе око 40%, и корелирају са подацима студија оваког типа (54,298-302). Осим тога, резултати нашег истраживања су показали да су се рецидиви догодили код око 54% пацијената са ПЕ и ТДВ/ПЕ насупрот око 30% ТДВ пацијената, што је у складу са подацима из литературе да већи ризик за рецидиве имају управо пацијенти са ПЕ и ТДВ/ПЕ (303,304). Посматрано у односу на локализацију настанка ВТЕ дефинисану на проксималне, дисталне и вене атипичне локализације, највећи број пацијената наше ВТЕ групе имао је тромбозу у проксималним венама леве ноге, а у односу на дисталне вене, у десној потколеници. Од укупног броја ВТЕ пацијената десностраних проксималних тромбоза присутне су код око 8% пацијената, насупрот томе, левостраних проксималних тромбоза су заступљене код око 32% пацијената, а само два пацијента су имала билатералну тромбозу (око 2%). Како су резултати објављених студија са широким опсегом утврђене учесталости проксималних и дисталних тромбоза, од веома ниске учесталости дисталних до тога да се

њихова учесталост креће 20-50%, као и да левостране тромбозе имају превагу над десностраним, наши резултати су у опсегу претходно добијених резултата (60,66-68,305-307). У односу на вену у којој се догодила прва тромбоза, највећи број ВТЕ епизода догодио се у поплитеалној вени, затим у осталим бутним венама, што је такође у складу са подацима о заступљености тромбоза у односу на венску топографију (60,78). Резултати наше студије су показали да је око 70% пацијената, који су након ТДВ добили ПЕ, имали прву тромбозу у некој од проксималних вена што је у складу са студијама у којима се сугерише да проксималне тромбозе у односу на дисталне, имају озбиљније компликације и носе већи ризик за настанак ПЕ (54,75,79,82,306). Објашњење за овакав исход је у томе да постоје само по једна илијачна, феморална и поплитеална вена у свакој ноzi, па настао угрушак може блокирати цео венски слив у делу ноге где је формиран. Насупрот томе, у листовима ногу вене су упарене на предње и задње, па у већини случајева здрава вена компензује функцију тромбозираних вена (306-308). Повезаност повећаног ризика левостране и десностраних проксималних тромбоза од ПЕ није довољно проучавана. У новије време, неке студије наводе да повећан ризик од ПЕ имају пацијенти са десностраним ТДВ, а да билатералне ТДВ имају значајно већи терет пратећих болести, већу учесталост ПЕ и лошији исход у првој години (79,307). Међутим, закључци наведених студија сугеришу да тема није довољно проучена и да резултате треба додатно тестирати на великој популацији ВТЕ пацијената.

#### 4.1.1 Повезаност САБ, оралних контрацептива и антикогулантне терапије са ВТЕ

Због чињенице да тромбофилије доприносе повећаној хиперкоагулацији у трудноћи, а комбиновани хормонски контрацептиви повећавају ризик од ВТЕ и артеријских болести, што све може имати неповољни утицај на исход трудноће (115,116,119-121,155,309), за испитанике студије женског пола анализирани су подаци о САБ и употреби ОК. У литератури су презентована бројна истраживања у којима је испитивана повезаност наследних тромбофилија са настанком САБ, у многим је утврђена повезаност, а посебно се истиче улога *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* у патогенези САБ (309-312). У мета-анализи спроведеној од стране Eslami и сар., којом су обухваћене 62 студије, са 10.410 пацијенткиња са поновљеним САБ и 9.406 контрола, утврђена је значајна повезаност *FV 1691G>A* са исходом САБ насталим као последица тромбозе (310). У нашој студији, 14 пацијенткиња ВТЕ групе имало је 1 или више неповољних исхода трудноћа, а у контролној групи само 7 испитаница. Након анализе учесталости *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A*, установљено је да је *FII 20210G>A* био присутан код 2 пацијенткиње, *FV 1691G/A* код 6, а истовремено присуство варијације *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* код једне ВТЕ пацијенткиње са САБ-ом. Насупрот томе, ни код једне контролне испитанице са САБ-ом није утврђена потенцијално ризична хетерозиготна варијација *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A*. У нашој студији повезаност САБ и ВТЕ је тачно на граници дефинисане статистичке значајности, а висока дистрибуција хетерозигота *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* код ВТЕ пацијенткиња је у складу са резултатима студија које наводе значај генетичке компоненте у узрочној основи САБ-а, као и то да жене са ризичним генотипом *FV 1691G>A* најчешће доживе први тромботички атак у млађем животном добу, које се често поклапа са трудноћом (102,312).

Према епидемиолошким подацима, употреба ОК доприноси повећаном ризику од ВТЕ. Ризик је чак око 13 пута повишен у прва три месеца употребе, остаје висок и током прве године употребе, а након тога се постепено смањује и остаје повишен 2-6 пута у односу на жене које не користе овај облик контрацептивне заштите (118,119). Ризик од ВТЕ је условљен дејством ОК на повећану продукцију тромбина и отпорност на АРС (119). Такође, утврђено је да је ризик од ВТЕ позитивно повезан са дозом естрогена, као и то да употреба ОК носи већи ризик за ДВТ него за ПЕ (119,120). У нашем истраживању, највећи број испитаница нису користиле ОК, а међу ВТЕ пацијенткињама и контролама, скоро једнак број жена користиле су ОК. Статистичка повезаност употребе ОК са ВТЕ није утврђена, а као могући разлог је управо величина узорка и мали број испитаница које су користиле ОК. Орална антиромботска терапија је веома ефикасна за превенцију и регулисање ВТЕ, а када се оралним антикоагулансима добро управља, ризик од рецидива је прилично низак, око 2 случаја на 100 пацијената годишње (313). Најчешћи разлози који доводе до појаве рецидива и приликом примене антиромботске терапије су: карцином као основна болест, хроничне кардиоваскуларне и респираторне болести и субтерапијске дозе антиромботског лека (313,314). Имајући у виду то да здраве особе, у одређеним ситуацијама, користе антиромботску терапију у циљу примарне превенције ВТЕ (313,314), а до тренутка прве тромбозе пацијенти са ВТЕ укључени у нашу студију су могли бити третирани као здрави, анализирани су и подаци о употреби антиромботске терапије пре и након појаве ВТЕ. Са друге стране, за ВТЕ пацијенте са рецидивом, анализирана је употреба антиромботске терапије пре појаве рецидива, тј. у циљу секундарне превенције ВТЕ. Нисмо утврдили значајну разлику између ВТЕ пацијената и контрола у односу на употребу антикоагулантне терапије и појаве прве тромбозе. У односу на рецидиве, око 50% ВТЕ пацијената са рецидивом нису били на антиромботској терапији у тренутку добијања рецидива, што можда може делимично да објасни високу стопу рецидива у нашој студији. Међутим, како је у нашем истраживању испитивање повезаности употребе антикоагулантне терапије засновано само на томе да ли су испитаници користили оралну антикоагулантну терапију или нису, без података о примењиваној дози и дужини трајања, као и релативно мали број пацијената наше студије за истраживање повезаности употребе антикоагулантне терапије са ВТЕ и рецидивима, наши резултати су ограниченог значаја.

## 4.2 Стечени фактори ризика за настанак ВТЕ и животне навике

Анализирајући присуство коморбидитета, утврђено је да је њихова заступљеност очекивано статистички значајно већа у групи ВТЕ пацијената у односу на здраве испитанике, што корелира са чињеницом да су коморбидитети одавно препознати као значајни фактори ризика у мултифакторској основи тромбозе, са посебним значајем код особа старије животне доби (60,61,86,88). У нашем истраживању потврђено је да присуство коморбидитета може бити значајан предиктивни фактор за тромбозе са укупно повећаним ризиком око 15 пута у односу на здраве испитанике. Због чињенице да је ХТА најчешће присутан коморбидитет и код пацијената и здравих испитаника, а дијабетес се сматра чак најзначајнијим, посебан акценат је стављен на ова два коморбидитета. ХТА, утичући на тромбоците и ендотел, може пореметити равнотежу између протромботичких и

фибринолитичких фактора у васкуларном систему и индуковати протромботичко стање доприносећи ВТЕ компликацијама (315). Досадашње студије усмерене на испитивање повезаности ХТА и ВТЕ, показале су опречне резултате (316-318). Поред великог броја студија које нису пронашле узрочну везу између ХТА и ВТЕ, прво је потврђена повезаност ХТА само са ризиком од ПЕ, а након тога велики број студија је пронашао повезаност ХТА и ВТЕ, са учесталošћу ХТА од 13-33% код ВТЕ пацијената (317-320). Мета-анализа спроведена 2016. године, од стране Huang и сар., којом је обухваћено 16 релевантних студија са преко 120.000 испитаника, са циљем разјашњења повезаности између ХТА и ТДВ након ортопедске операције, показала је да ХТА може подстаћи тромбозу након ортопедске операције (321). Поред тога, ова мета-анализа сугерише да ХТА може бити независни предиктор за ВТЕ у општој популацији (321). С обзиром на то да је око 22% ВТЕ пацијената у нашој студији имало ХТА а да су операције, такође, имале значајног удела у етиологији ВТЕ пацијената наше студије, као и повезаност ХТА и великих хируршких захвата, можемо рећи да су наши резултати у корелацији са студијама у којима је ХТА значајно повезана са настанком ВТЕ. Без обзира на велики број студија у којима је утврђена повезаност ХТА и ВТЕ, контроверзе су још увек присутне јер у већини закључака се сугерише да пацијенти са ХТА имају тенденцију развоја ВТЕ када имају и друге факторе ризика (316-321). Због тога, реални утицај ХТА на тромбозе може се пратити код испитаника који нису имали друге факторе ризика осим ХТА, а развили су тромбозу. Због синергистичког ефекта, присуство других коморбидитета и фактора ризика може делимично утицати на величину утицаја ХТА на ВТЕ исход.

Дијабетес утиче на повећану продукцију тромбина и концентрацију прокоагулантних циркулишућих микрочестица што је значајан стимуланс за хиперкоагулацију (317,322,323). У великој мета-анализи, којом је укључено 9 студија случај-контрола и 6 кохортних студија са око 45.000 испитаника са тромбозом и око 84.000 контрола, утврђено је да је учесталост ВТЕ била већа међу пацијентима са дијабетесом, са повећаним ризиком од 1,3-3,5 пута за настанак тромбозе у односу на оне без дијабетеса (317). У нашој студији, са овим коморбидитетом присутно је око 6% пацијената, што је у поређењу са студијама спроведених од стране Piazza и сар. (на 2.488 ВТЕ пацијената, 19,1% је имало дијабетес) и студије коју је спровео Peng и сар., у којој је утврђено да су пацијенти са дијабетесом тип 1, имали 5.33 пута чешће тромбозу у односу на испитанике без дијабетеса, значајно мања заступљеност (322,323). Низак удео ВТЕ пацијената са дијабетесом у нашој студији, можемо тумачити малим бројем испитаника, а како у контролној групи нисмо имали ни једног испитаника са дијабетесом, утврђена статистичка значајност је ограниченог значаја. Осим тога, у студији Peng и сар., утврђено је да се дијабетес тип 1 најчешће јавља у старосној доби 30-40 година (323). У нашој студији, скоро сви пацијенти са дијабетесом, добили су тромбозу у старосном периоду између 50-60 година. Међутим, како се наши подаци односе укупно на дијабетес тип 1 и 2 (по три пацијента су имала дијабетес тип 1 и тип 2), као и због малог удела овог коморбидитета у нашој ВТЕ групи, није могуће правити адекватно поређење са релевантним студијама.

Гојазност је повезана са неактивношћу, хроничним упалним стањима, повишеним интра-абдоминалним притиском и повећаним нивоима плазматских фактора коагулације, што све заједно доприноси повећаном ризику од ВТЕ (146,324). Студије које су имале за предмет истраживања повезаност гојазности са ризиком од ВТЕ имају неконзистентне резултате. У



неким се наводи да са повећањем вредности ВМІ расте укупан ризик од ВТЕ, као и да гојазност доприноси настанку дисталних тромбоза, прве тромбозе и рецидива (322,325-327), у другима се наводи да је фактор ризика за ВТЕ само абдоминална гојазност (328,329). У мета-анализи, у којој је анализирано око 20.000 пацијената са тромбозом и око 70.000 контрола, утврђено је да пацијенти са  $\text{ВМІ} \geq 30 \text{ kg/m}^2$  имају 2-4 пута повећан ризик за тромбозе (317). Поред тога, гојазност производи синергистички ефекат са већ постојећим коморбидитетима и генетичким факторима предиспозиције у односу на ВТЕ (325-328). Вредност  $\text{ВМІ} \geq 30 \text{ kg/m}^2$  доприноси до 6 пута већем ризику од тромбозе у односу на нормалан ВМІ, посебно код особа старијих од 50 година (75,146). Ово се може објаснити чињеницом да прекомерна телесна тежина, поред повећања интраабдоминалног притиска, врши значајан притисак на феморалне вене, чиме се подстичу упални процеси, повећава пречник феморалне вене и успорава венски ток (325,326). На овај начин гојазност провоцира протромботички статус и нарушава фибринолитичку активност (325,326). Такође, код старијих особа гојазност може повећати ризик од тромбозе јер је масно ткиво важан извор фактора који регулишу формирање тромба, као што су инфламаторни цитокини и РАИ1 (324,330). Резултати нашег истраживања су потврдили да је ВМІ изнад нормале значајно повезан са настанком тромбозе, са скоро двоструко повећаним ризиком за ВТЕ у односу на особе са нормалним ВМІ.

Позитиван утицај умерене физичке активности на кардиоваскуларне болести је одавно препознат (61,142,331). Редовна физичка активност у слободно време повезује се и са смањеним ризиком од ВТЕ, но та веза још увек није јасна (143,327,332). Зато, истраживачи још увек трагају за доказима о односу између интензитета активности и ризика или заштите од ВТЕ (143,333,334). Без обзира на повољне ефекте на здравље, осим корелације физичке неактивности са повећаним ризиком од ВТЕ, неке студије извештавају о утицају напорног вежбања на повећан ризик од ВТЕ, посебно када је у питању напорно вежбање код мушкараца, као и на ризик од акутног инфаркта миокарда и možданог удара (144,327,335). Насупрот томе, неке студије су установиле значајну повезаност између физичке активности и нижег ризика од ВТЕ код жена, док истовремено није утврђена повезаност физичке активности и смањеног ризика од ВТЕ код мушкараца (143,336). Осим тога, установљено је да напорна физичка активност има негативан утицај на ризик од ВТЕ код гојазних особа (337). Ово се објашњава тиме да дуг и екстремни напор повећава реактивност тромбоцита, ниво FVIII и vWf, па самим тим и хиперкоагулабилност са истовремено појачаном фибринолизом (335). Такође, вежбе са дужим трајањем и интензитетом носе и ризик од повреда, што може допринети ризику од ВТЕ због имобилизације и мировања или због хируршких интервенција (335). Пошто се фибринолитички параметри брзо враћају на почетну вредност а параметри прокоагуланата остају повишени дуже време, могу да направе дисбаланс у коагулацији (334). Најновија мета-анализа из 2019. године, у којој је обједињено 14 проспективних кохортних студија са циљем да се процени повезаност између редовне физичке активности и ВТЕ, је установила да је редовна физичка активност умереног интензитета била значајно повезана са мањим ризиком од ВТЕ у поређењу са неактивним начином живота (142).

У нашем истраживању није утврђена статистичка разлика у степену активности између пацијената и контролних испитаника у слободно време, а истраживање активности није стратификовано у односу на пол испитаника. Ипак, уочено је да су ВТЕ пацијенти чешће

били неактивни и активни у односу на контроле, а контролни испитаници су чешће упражњавали умерену активност у слободно време у односу на ВТЕ пацијенте. Овакав резултат могао би указивати на повезаност по принципу доза-одговор у облику слова У (U-shaped), при чему мање количине изазивају један утицај а веће други утицај, односно у испитивању повезаности физичке активности у слободно време, већа и мања активност имају супротан ефекат на исход ВТЕ, о чему је извештавано у многим студијама (334,336). Због наведених чињеница, значајно би било спровести истраживање на већем узорку испитаника стратификованих према полу.

Након препознавања дуготрајног седења приликом путовања авионом и ризика од ВТЕ, истраживања су кренула у правцу испитивања повезаности седентарних занимања са ВТЕ, међутим, резултати истраживања су прилично контроверзни. Прва студија случај-контрола која је истраживала потенцијалну улогу седентарног посла са ризиком од ВТЕ, спроведена од стране West и сар., којом је укључено 97 ВТЕ пацијената и 106 контрола са артеријским тромбозама, изнела је закључке о повезаности продуженог седења на послу са ризиком од венске тромбозе, односно ВТЕ случајеви су значајно чешће били изложени продуженој непокретности на послу у поређењу са контролама (338). У студију West и сар., конципираној по узору на велику студију случај-контрола којом је испитивана путничка тромбоза, укључени су узастопни пацијенти након ВТЕ догађаја, а контролна група је изабрана из исте медицинске установе, од пацијената без ВТЕ, примљених у јединицу за коронарну негу (338,339). Седентарни посао дефинисан је у складу са максималним бројем сати седења у току 24 сата и максималним временом у току дана проведеним седећи у било којој прилици без устајања на: седење 8 сати дневно са најмање 3 сата без устајања, седење 10 сати, са најмање 2 сата без устајања и седење 12 сати дневно са најмање 1 сат без устајања. Осим седења на послу, узета је у обзир и укупна непокретност у току дана (долазак на посао, рад у кућним условима) (338). Студијом спроведеној од стране Nealy и сар. на око 200 ВТЕ пацијената и исто толико контрола, по одабиру испитаника и дизајну веома слична претходној, потврђени су резултати претходне студије и изнесени слични закључци, да је седентарни посао повезан са 2,8 пута већим ризиком од тромбозе у односу на контролну групу (340). Насупрот резултатима претходно наведених студија, велика кохортна студија спроведена у Данској од стране Johannesen и сар., а објављена 2020. године, у коју је укључено око 600.000 учесника, није пронашла повезаност седентарног начина рада са повећаним ризиком од ВТЕ у општој популацији (341). Приликом укључивања испитаника у наведену студију (Johannesen и сар.), сви испитаници су били здрави, седентарно занимање на основу процене броја сати проведених у седећем положају, дефинисано је седењем на  $\geq 6.5$  сати/дан и  $\leq 3.5$  сати/дан. Приликом 10-годишњег периода праћења, регистровано је 911 ВТЕ исхода, а студијом је показано да нема везе између дефинисаног седентарног рада од  $\geq 6.5$  сат/дан са ризиком од ВТЕ, као ни разлике у ризику од ВТЕ међу групама дефинисаних у односу на сат/дан на  $\geq 6.5$  и  $\leq 3.5$  сати седења на послу (341).

У наведеној студији, сугерисано је на могућност да нека занимања, као што су возачи, или рад на рачунару, могу имати повећан ризик од ВТЕ, што је у складу са резултатима студија West и сар. и Nealy и сар. (338,340,341). У нашем истраживању контролни испитаници су се значајно чешће бавили занимањима која су захтевала умерен физички напор, а ВТЕ пацијенти седентарним и тежим физичким пословима. Међутим, утврђена повезаност

седентарног посла са ризиком од ВТЕ, није потврђена униваријантном регресионом анализом, на шта је могао утицати мали број испитаника обухваћених нашом студијом.

Неконзистентни резултати истраживања најчешће настају због различитог дизајна студија, што је веома изражено у наведеним студијама о утицају седентарног рада на ВТЕ. Према броју испитаника, наша студија је слична истраживањима West и сар. и Nealy и сар. (338,340), међутим, контролна група наше студије су здрави испитаници, а у претходним студијама су контроле пацијенти са коронарним болестима. С друге стране, студијом Johannesen и сар. (341), ВТЕ је праћена као исход код испитаника који су приликом укључивања у студију били здрави. Претпоставка да редовна физичка активност у слободно време, смањивањем ВМI и хипертензије, на неки начин ублажава штетне ефекте седентарног посла на ризик од ВТЕ, упућује да приликом дизајнирања студија за испитивање утицаја активности у радно време на ризик од ВТЕ треба узети у обзир и ове моменте. Зато, укључивање већег броја испитаника са прецизно дефинисаним бројем радних сати у седећем положају, број и дужина пауза током радног времена, време одсуствовања са посла и укључивање степена активности после радног времена, допринело би добијању прецизнијих резултата. Суштински, резултати већине студија повезаности физичке активности са ВТЕ, било као стил живљења или у радно време, показују корист од неке физичке активности. Међутим, због неуједначене дефиниције и квантификације нивоа активности које се примењују у различитим студијама, долази до потешкоћа у упоређивању резултата и извођењу закључака.

Штетни ефекти пушења на ризик од карцинома и кардиоваскуларних болести су већ добро познати (321). Активно пушење индукује акутне атеротромботичке инциденте, благо повећава ризик од ВТЕ на директан начин, а због штетног утицаја цигарета на многе болести, негативан ефекат се остварује и посредним путем, доприносићи развоју других болести и коморбидитета повезаних са ризиком од ВТЕ (150-152,154,332). Такође, уочено је да пушење повећава ниво фибриногена који доприноси повећаном ризику од тромбозе (155), а доводи се у везу и са ризиком од ВТЕ компликација приликом оперативних захвата (150). Штетност цигарета зависи и од количине и дужине времена конзумирања цигарета, као и од изложености дуванском диму у окружењу (332,342). Претходне студије које су испитивале повезаност пушења и ВТЕ показале су контроверзне резултате, што је вероватно делом условљено разликама у дизајну (317). У студији спроведеној од стране Romp и сар., установљен је благо повећан ризик од ВТЕ и међу актуелним и бившим пушачима (155). У студији Gallucci и сар. је утврђено да је пушење доприносило повећаној смртност од кардиоваскуларних болести само код жена, а могуће објашњење за овакав исход је у генима одговорним за активацију тромбина (152). Такође, у студији спроведеној од стране Yuan и сар., је утврђена позитивна корелација пушења са ризиком од ВТЕ само код жена (333). Неке студије наводе да особе које су класификоване као тешки пушачи (конзумирање >20 цигарета/дан) имају резидуални ризик од кардиоваскуларних болести и након 5-20 година од престанка пушења (343). У неким студијама није утврђена повезаност између конзумирања цигарета и ризика од ВТЕ, док је пушење било повезано са тромбозама код особа које су имале дијагнозу канцера (153). Неке студије су показале повећан ризик од ВТЕ и међу актуелним и бившим пушачима, док у неким ризик је присутан само међу актуелним пушачима који конзумирају веће количине цигарета свакодневно (332). У оквиру наше групе пацијената нисмо пронашли повезаност ни повећан ризик ни у односу навике

ни количине конзумирања цигарета са ВТЕ, на шта је могуће утицао дизајн и недовољан број пацијената студије за истраживање оваквог типа. Релативно, али не и значајно, непушача и бивших конзумената цигарета, као и оних који су конзумирали мањи број цигарета дневно, процентуално је више заступљено код контрола.

Због широке употребе кафе, испитивање њених ефеката, осим за повезаност са болестима, значајно је и на нивоу популације. Чешће је повезана са повољним ефектима на здравље, него са негативним утицајем (344,345). Кафа је напитака са око 1.000 биоактивних супстанци, са кључним активним једињењима кофеином, дитерпенима и хлорогеном киселином који имају антиоксидантну и антиканцерогену улогу (333). Повољан ефекат кафе остварује и преко високог садржаја полифенола, посебно флавоноида и фенолних киселина, који имају заштитни ефекат на упалне процесе, побољшавају здравље ендотела и инхибирају активацију тромбоцита (346). С обзиром на то да су и ендотел и тромбоцити значајни извори vWf који је функционално повезан са FVIII, приликом повреде ендотела и активације тромбоцита долази до повишених нивоа ових компоненти и хемостатског дисбаланса. Стога се у студијама којима је испитивана повезаност конзумирања кафе са настанком тромбозе као могући заштитни механизам за инверзну повезаност кафе са тромбозама наводе нижи нивои FVIII и vWf, повољан ефекат на ендотел и смањена активација тромбоцита код конзумената кафе (141,147).

Иако је одавно утврђена заштитна улога кафе за артеријске тромбозе и кардиоваскуларне болести, резултати истраживања о штетности и/или корисности за ВТЕ су још увек контрадикторни (333,346). Неке студије нису утврдиле повезаност конзумирања кафе са ВТЕ, на супрот томе, у неким студијама је утврђено да количина кафе од  $\geq 5$  шољица/дан смањује ризик од ВТЕ (141,333,346). Такође, 2017. године, у великој студији обрађени су подаци из преко 200 мета-анализа, а управо један од резултата и изведених закључака је да је конзумирање кафе, посебно у количини од 3-4 шољице дневно, повезан са нижим ризиком од настанка кардиоваскуларних болести, можданих удара и коронарне болести, као и смртности од истих (345).

У односу на све учеснике наше студије, кафу је конзумирало више од 3/4 испитаника, без статистички значајне разлике између ВТЕ пацијената и контролних испитаника. Ипак, уочено је да су ВТЕ пацијенти најчешће пили 1-2 шољице у току дана, а здрави испитаници су чешће пили  $\geq 3$  шољице у току дана или нису конзумирали кафу. Овакво запажање иде у прилог инверзне повезаности конзумирања кафе са ВТЕ, а могуће је да због недовољног броја пацијената ова веза није статистички доказана. С обзиром на то да су релевантне студије, које су се бавиле истраживањима утицаја конзумирања кафе на тромбозе, углавном укључивале знатно већи број испитаника, као и то да су навике у односу на количину кафе углавном дељене у пет категорија: они који не пију кафу, пију једну до две шољице дневно, три до четири шољица дневно, пет до шест шољица дневно и више од шест шољица дневно ограничава адекватно поређење резултата наше студије. Осим тога, још увек није стандардизована величина шољице за кафу, количина зрна и начин припреме, а биоактивне супстанце кафе могу варирати и у односу на врсту кафе, што може утицати на резултате и закључке (339).

Велики број студија је показао да је лагани до умерени унос алкохола повезан са повећањем доброг холестерола (HDL-C) и нижим нивоима: фибриногена, вискозитета плазме, FVII,

vWf и нижим бројем и активношћу тромбоцита, што утиче на повољнији коагулациони и фибринолитички статус (145,148,347). Насупрот томе, прекомерни унос алкохола преко повећања концентрације PAI-1 и tPA доприноси смањењу фибринолитичке активности а повећане коагулације (148,347). Резултати студија које су се бавиле испитивањем повезаности конзумирања алкохола са кардиоваскуларним болестима наглашавају да је ниска до умерена конзумација алкохола, која подразумева количину 1-2 чашице дневно, повезана са смањеним ризиком од артеријске тромбозе, док су статистички подаци у односу на ВТЕ неконзистентни (145,148). У Тромсо студији из 2011 године, у којој је испитиван утицај алкохола и вина на ризик од ВТЕ, којом је обухваћено око 27.000 испитника, праћених око 12 година, са ВТЕ као примарним исходом, није утврђено да је укупна конзумација алкохола била повезана са ризиком од ВТЕ инцидената (149). Међутим, утврђено је да су испитаници који су се прекомерно опијали имали око 53% повећан ризик од ВТЕ у поређењу са онима који нису пили, док је конзумација вина била повезана са око 22% смањеним ризиком од ВТЕ (149). У студији спроведеној од стране Lindqvist и сар. је утврђено да жене које нису пушачи, упражњавају физичку активност и конзумирају алкохол у умереној количини имају смањен ризик од ВТЕ, као и то да вероватно постоји инверзна веза између уноса алкохола и ризика од ВТЕ (332). У данској студији, која је обухватила око 57.000 испитаника, утврђена је "У" веза између количине уноса алкохола и ВТЕ, као и то да су најниже стопе ВТЕ инцидената утврђене код испитаника са просечним уносом алкохола од 4-14 стандардних чашица недељно (348). Најновија мета-анализа, сумирајући резултате свих прихватљивих проспективних и кохортних студија базираним на испитивању зависно-дозног ефекта уноса алкохола и ризика од ВТЕ, која је укључила око 400.000 контрола и преко 10.000 пацијената са ВТЕ, слично као и у Тромсо студији (149), није утврдила повезаност алкохола са укупним ризиком од ВТЕ (148). Међутим, када је анализа примењена само на женску популацију, резултати су указивали на потенцијалну заштитну улогу алкохола у умереним количинама у односу на ВТЕ, што сугерише да истраживање о потврди протективне улоге алкохола у односу на ВТЕ треба усмерити према женској популацији. Како је умереност кључни фактор, конзумирање алкохола не може бити препорука у циљу превенције од ВТЕ. Према нашим резултатима, није утврђена статистички значајна разлика између ВТЕ пацијената и контрола у односу на то да ли испитаници конзумирају алкохол или не, као ни у количини уноса алкохола. Ипак, уочено је да су конзументи алкохола у умереној количини, са конзумирањем 2-3 чашице дневно (што је у опсегу количине 4-14 чашица недељно која је у Тромсо студији (149) повезана са нижом стопом ВТЕ инцидената), чешће процентуално заступљени у контролној групи у односу на ВТЕ пацијенате, што упућује на корисност додатног истраживања на ову тему.

#### 4.3 Повезаност коморбидитета, активности, ВМІ и не О-те са животном доби настанка ВТЕ, рецидивима и локализацијом ВТЕ

Након испитивања учесталости и повезаности коморбидитета, активности, ВМІ и не О-те крвне са настанком тромбозе, исте категорије ризика анализирани су и у односу на животну доб настанка ВТЕ, рецидиве и локализацију ВТЕ. У нашем истраживању, осим повезаности

седентарног занимања са појавом рецидива, за остале факторе ризика није утврђена статистичка повезаност са наведеним категоријама. Нема много расположивих студија којима је испитивана повезаност наведених фактора ризика са животном доби настанка ВТЕ, рецидивима и локализацијом ВТЕ. У највећем броју студија испитивана је повезаност ВМІ и коморбидитета са настанком рецидива, но подаци су још увек контрадикторни (146,313,314,322,325-329). Познато је да се са старосћу повећава број коморбидитета. У нашем истраживању, укупан број коморбидитета у односу на старост настанка тромбозе, процентуално је чешће заступљен у групи пацијената старије животне доби, али разлика није статистички значајна. С обзиром на то да је ХТА најчешће заступљен коморбидитет у нашој групи ВТЕ пацијената, уочено је да је у високом проценту заступљена код пацијената са ПЕ, што је у складу са студијама у којима се сугерише да ХТА може бити независни предиктор за ВТЕ у општој популацији (317,321).

Расположиви подаци о повезаности физичке активности са ризиком од поновљених тромбоза, углавном се односе на уопштену физичку активност. Нису пронађене студије о повезаности седентарног занимања са ризиком од ВТЕ рецидива. У студији спроведеној од стране Evensen и сар. испитивана је повезаност између уобичајене физичке активности пре појаве ВТЕ и ризика од морталитета и рецидива, а главни закључци студије су да је физичка активност повезана са нижим ризиком од смртности а да није било повезаности између физичке активности и ризика од ВТЕ рецидива (98). У студији спроведеној од стране Flinterman и сар. је показано да су мушкарци и жене са већом телесном висином, а водили су неактиван начин живота пре појаве тромбозе, имали повећан ризик од прве венске тромбозе и рецидива, који је већи у комбинацији са седентарним начином живота (350). Објашњење за овакав резултат је то што телесна висина, утичући на динамику венског притиска, доприноси да виши људи са смањеном физичком активношћу могу чешће имати венске застоје у ногама (350). Резултати наше студије су показали да су пацијенти са седентарним занимањима најчешће имали ВТЕ рецидиве, док је међу активним и умерено активним пацијентима тај број значајно мањи. Треба нагласити и то да је скоро половина пацијената са седентарним занимањем, као и половина свих пацијената који су изјавили да су активни у слободно време, имало проксималне тромбозе, а пацијенти који нису активни у слободно време, имали су у високом проценту ПЕ. Не О-та крвна група је била чешће заступљена код пацијената са проксималном тромбозом, а О-та крвна група код пацијената са дисталном тромбозом. Због наведених запажања и чињенице да тема није довољно истражена, упућује на значај додатног истраживања, посебно утицаја седентарног рада на ВТЕ рецидиве.

Осим тога, све је више доказа да усвајање здравог начина живота, што подразумева и повећање редовне физичке активности, доприноси смањењу ризика од ВТЕ, па тако и од рецидива болести (351).

## 4.4 Генетички фактори ризика

На основу досадашњих истраживања, процењено је да генетичка компонента има удела у настанку тромбозе 40-60% (101,102). С обзиром на познату чињеницу да присуство варијантних алела у хетерозиготном и хомозиготном статусу може да повећава склоност ка некој болести, у нашој студији испитиван је утицај и повезаност варијантних генотипова са ВТЕ. Због додатног повећања ризика за настанак тромботичких догађаја приликом истовременог присуства више од једног SNP у истом гену, за најзначајније познате генетичке факторе ризика за тромбозе *FII* и *FV*, осим за рутински испитиване SNPs, анализиран је још по један недовољно испитан полиморфизам. Због претпоставке да се због функционалне повезаности, алели у истом гену могу налазити у LD-у, за испитиване полиморфизме ова два гена спроведена је хаплотипска анализа.

С обзиром на то да молекуларне методе пружају могућност откривања потенцијално ризичних варијантних алела и генотипова за развој ВТЕ, анализа наследних тромбофилија данас се широко примењује код пацијената са непровоцираном тромбозом или компликацијама узрокованим поремећајем хемостазе.

### 4.4.1 Полиморфизми *FII* (20210 G>A и 19911A>G) и *FV* (1691G>A и HR2 6755A>G)

Варијанте *FII* G20210 G>A и *FV* 1691G>A су, због утицаја на појачано формирање тромбина, дефинитивно препознате и сврстане у најзначајније генетичке факторе ризика за настанак тромбозе. Међутим, њихова учесталост значајно варира у односу на етничку, расну и географску припадност, како у општој популацији тако и код оболелих од ВТЕ, због чега су још увек широко испитивани у студијама генетичких асоцијација.

#### 4.4.1.1 *FII* (20210 G>A и 19911A>G)

Активација протромбина је једна од кључних тачака у физиолошкој и патофизиолошкој коагулацији (194). Помоћу FXa и FVa, протромбин се активира у тромбин, односно FIIa, а активирани тромбин доводи до цепања фибриногена на фибринске мономере који након полимеризације формирају фибрински угрушак (194,197). Генотипска варијанта *FII* 20210G>A директно утиче на различите процесе који се односе на метаболизам протромбинске iRNK (информационе рибонуклеинске киселине), доводећи до повећане експресије гена изазива појачану транскрипцију, повећану обраду 3' краја и појачану синтезу iRNK (197,199,352). На тај начин доприноси повећаној синтези и акумулацији протромбина у плазми, што за последицу има вишеструко повећан ризик од ВТЕ (195,197,199). Утврђено је да повишен ниво протромбина за 15% од нормалног нивоа двоструко повећава ризик од ВТЕ. Присуство полиморфизма *FII* 20210G>A узрокује за једну трећину већу синтезу протромбина од нормалног нивоа (133%), па самим тим вишеструко доприноси повећаном ризику од тромбозе (194).

Већина студија које су испитивале повезаност *FII* 20210G>A са тромбозом најчешће наводе учесталост ове варијанте 6-18% код ВТЕ (194,198,224,253,353,354). Међутим, резултати студија спроведених на Балкану о учесталости *FII* 20210G>A и повезаности са повећаним ризиком од тромбозе су опречни. У студији спроведеној у Босни и Херцеговини, од стране Јусић-Карић и сар., на приближно једнаком узорку као и наша студија, хетерозиготна варијанта *FII* 20210G>A код пацијената са ВТЕ је била заступљена мање од 3%, што је у опсегу учесталости ове варијације у здравој популацији (253,355). Веома слични резултати су утврђени у Хрватској: у студији Alfirević и сар., око 6% ВТЕ пацијената имало је варијанту *FII* 20210G>A, што такође није било значајно чешће у односу на здраву контролу (356). Насупрот овим резултатима, у студији Kovac и сар., спроведеној у Србији, утврђена је повезаност и повећан ризик од тромбозе у присуству *FII* 20210G>A, посебно код пацијената са изолованом ПЕ (357). У великој мета-анализи, спроведеној од стране Simone и сар., обрађени су подаци великог броја студија са око 9.000 ВТЕ пацијената и око 18.000 контрола, а утврђено је да је варијанта *FII* 20210G>A повезана са око 3 пута повећаним ризиком од тромбозе (253).

Клиничка експресија *FII* 20210G>A је променљива, стога многе особе које су хетерозиготне, па чак и особе са варијантним хомозиготом *FII* 20210A>A, никада не развију тромбозу (198). Ово може указивати на значајну улогу и неоткривених, коегзистирајућих генетичких фактора ризика, који синергистичким деловањем утичу на укупан ризик од тромбозе, а да је стварни ризик *FII* 20210G>A за тромбозе прецењен (199). Осим тога, и стечени фактори ризика дају допринос укупном тромботичком ризику. Узимајући чак и ове могућности у обзир, у етиологији тромбозе *FII* 20210G>A заузима значајно место. Поред тога што углавном узрокује ВТЕ пре 50-године старости, присуство *FII* 20210G>A често изазива тромбозу и рецидиве много раније, пре 30-те године (198). Генерално, присуство варијанте *FII* 20210G>A носи повећан ризик за понављане тромбоза 3-4 пута (198). Трудноћа представља најчешћи додатни провоцирајући фактор за тромбозе код носилаца *FII* 20210G/A, а присуство ове варијанте, код трудница доприноси повећаном ризику од ВТЕ 3-15 пута (198). Поред трудноће, употреба ОК код жена носилаца ове варијанте доприноси повећању ризика од тромбозе 16-59 пута, што код особа са ризиком од наследне тромбофилије даје на значају генетичком тестирању (198). Гојазност такође представља



значајан провоцирајући фактор у настанку тромбозе за носиоце *FII* 20210G>A, који се код особа са  $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$  седмоструко повећава (198).

Резултати наше студије су показали учесталост *FII* 20210G>A у групи ВТЕ пацијената (преко 20%), и здравој контроли (око 2%), што је у корелацији са подацима многих студија које су се бавиле овом темом, а односе се на европску популацију (194,253,353,355,358). Такође, међу испитаницима наше студије није детектован ни један случај хомозиготне A/A варијанте, што је у складу са подацима да је ова варијанта веома ретко заступљена (198,199). Поредиши учесталост варијантног генотипа *FII* 20210G>A, као и дивљег алела G и варијантног A, између ВТЕ пацијената и контрола, утврђена је значајна статистичка разлика, са око 14 пута повећаним ризиком од тромбозе за генотип G/A у односу на дивљи хомозиготни генотип G/G. Ризик је потврђен и након укључивања у мултиваријантну регресиону анализу свих 8 испитиваних SNPs, као и приликом укључивања стечених фактора ризика.

Други испитивани полиморфизам *FII* 19911A>G смештен у последњем интрону протромбинског гена, преко ефекта појачивача интронског спајања побољшава ефикасност обраде протромбинске iRNK, па самим тим повећава концентрацију протромбина у плазми и појачано утиче на хиперкоагулацију (204,359). Није доступан велики број студија у којима је истраживана улога полиморфизма *FII* 19911A>G и његова повезаност са ВТЕ, а добијени резултати су неконзистентни (197,202-206). Због малог броја студија случај-контрола, још увек нема синтетизованих података у мета-анализи. Група истраживача Seelie и сар. је 2001. године, трагајући за узроцима високог нивоа протромбина у плазми, спровела истраживање на групи носилаца *FII* 20210G>A варијанте и установила да је у присуству другог полиморфизма у истом гену, *FII* 19911A>G, додатно повећан ниво протромбина (360). Уочено је да варијанта *FII* 19911A>G модулира ризик од тромбозе за присуство варијанте *FII* 20210G>A, но због малог узорка закључци нису могли бити поуздани (360). Ово опажање је покренуло истраживања у смеру испитивања повезаности варијанте *FII* 19911A>G са повећаним ризиком од тромбозе. Група истраживача (Pérez-Ceballos и сар.) је већ 2002. године спровела прву студију на 213 испитаника, који су имали утврђене варијантне генотипове *FII* 20210G>A и *FII* 20210A>A (203 наспрам 10), од чега је 152 имало ТДВ, 26 артеријску тромбозу а 35 су били здрава контрола, са циљем да потврди везу *FII* 19911 полиморфизама са повећаним ризиком од тромбозе (205). Добијени резултати наведене студије нису показали да варијантни хетерозиготи и хомозиготи *FII* 19911 имају значајну улогу и повећан ризик за настанак венске и артеријске тромбозе, али уочено је да варијанта *FII* 19911A>G благо доприноси додатном повећању ризика за носиоце варијанте *FII* 20210G>A (205). Такође, у студији спроведеној у Србији од стране Agadjanski и сар., није утврђен утицај варијанте *FII* 19911A>G на повећан ризик од тромбозе, а заступљеност варијантних генотипова је била скоро једнака у обе испитиване групе (197).

Студија спроведена од стране Martinelli и сар. 2006. године, у којој је упоређено око 800 здравих контрола са око 800 ВТЕ пацијената (од којих је око 200 имало варијанту *FV* 1691G>A, 167 варијанту *FII* 20210G>A, а остали пацијенти нису имали протромбогене ризичне варијанте) показала је да је *FII* 19911A>G, независно од *FV* 1691G>A и *FII* 20210G>A, доприносио 1,5 пута повећаном ризику од ВТЕ, а 2 пута у асоцијацији са *FV* 1691G>A (204). У истој студији, супротно резултатима студије Seelie и сар (360), није примећен ефекат *FII* 19911A>G на додатно повећање ризика од тромбозе на носиоце

варијанте *FII 20210G>A* (204,360). Неколико година касније Martinelli је са другом групом истраживача спровео истраживање повезаности *FII 19911A>G* са ризиком од тромбоза у церебралним венским синусима, на око 100 пацијената са тромбозом и преко 800 контрола (203). Насупрот претходним резултатима, у овом истраживању није показан утицај варијанте *FII 19911A>G* на повишен ризик од тромбозе у венским синусима, чак ни у асоцијацији са *FII 20210G>A* и *FV 1691G>A* (203). Резултати студије спроведене од стране Chinthammitr и сар., којом је обухваћено око 4.300 пацијената и 4.800 контрола, показали су да *FII 19911A>G* има умерену али и независну улогу у настанку ВТЕ, са повећаним ризиком од 1,3 пута за варијантне хетерозиготе А/Г и 2,1 пута за варијантне хомозиготе Г/Г у односу на носиоце дивљег генотипа А/А (206). У најновијој кохортној студији спроведеној 2021. године, од стране Limperger и сар., на узорку од око 1.000 ВТЕ пацијената и преко 900 контрола, изнесени су слични закључци као у студији Chinthammitr и сар (206): да обе генотипске варијанте (А/Г и Г/Г) за *FII 19911* имају значаја у настанку прве тромбозе (202). Осим тога, у наведеној студији, први пут је показано да *FII 19911A>G* и *FII 19911 G>G* може бити фактор ризика за поновљене тромбозе код мушкараца (202).

Супротно од студија у којима је утврђена повезаност *FII 19911A>G* са ризиком од ВТЕ (202,204,206), у нашем истраживању, није утврђена статистички значајна разлика ни повећан ризик од тромбозе за варијантне генотипове *FII 19911A>G* и *FII 19911G>G*. Чак је утврђено да је потенцијално ризичан варијантни хетерозигот *FII 19911A>G* чешће заступљен у контролној групи испитаника, док су нормални А/А генотипови и потенцијално ризични варијантни хомозиготи били чешће заступљени код ВТЕ пацијената. Према нашим сазнањима у ранијим студијама није било извештаја о негативној корелацији *FII 19911A>G* са ВТЕ, као ни то да овај полиморфизам може доводити до смањеног ризика од тромбозе.

Сумирајући закључке свих наведених студија, можемо рећи да су резултати о повезаности *FII 19911A>G* са тромбозом опречни, а наши резултати су у складу са студијама које нису утврдиле повезаност овог полиморфизма са ризиком од тромбозе, а то су студије: Aradjanski и сар, Pérez-Ceballos и сар и Martinelli и сар., у својој другој студији (197,203,205). Значајно опажање је и то да је повезаност *FII 19911A>G* са тромбозом утврђена у студијама које су укључивале велики број испитаника, да је ризик благо повећан, као и то да су истраживачке групе биле хетерогене (202,204,206). Наведене чињенице дају на значају додатним истраживањима, а наредни корак у нашем истраживачком раду могао би бити укључивање значајно већег броја пацијената за испитивање значаја *FII 19911A>G* у настанку тромбозе.

#### 4.4.1.2 *FV(1691G>A* и *HR2 6755A>G)*

На основу хаплотипске анализе процењено је да је полиморфизам *FV 1691G>A* настао пре око 21.000-34.000 година, када је дошло до раздвајања беле популације од Африканаца и Азијата (102,209). Због кратког животног века у прошлости утицај једнонуклеотидне измене *G>A* у *FV 1691* на тромбозу није могао бити велики. Релативно висока учесталост варијантног хетерозигота у белој популацији углавном се тумачи баланским полиморфизмом који доноси и одређени степен предности у преживљавању особама које су носиоци ове варијанте (102,215,361). Неки аутори сматрају да хетерозиготни генотип који повећава

протромботичку активност истовремено смањује смртност узроковану обилним крварењима приликом тешких повреда (102). Осим тога, у неким истраживањима се наводи да су жене са варијантом *FV 1691G>A* губиле значајно мању количину крви током порођаја и постпартално од жена које нису имале ову генску варијацију (362,363). Резултати неких студија су показали да код тешких случајева хемофилије, носиоци *FV 1691G>A* имају значајно мање озбиљна крварења (102,215). Зато, релативно висока учесталост потенцијално штетне варијанте *1691G>A* може парадоксално бити резултат еволутивне селективне предности, која кроз смањење ризика од крварења даје већу могућност преживљавања (102,215,219,217,361,362). Без обзира на наведену предност, варијанта *FV 1691G>A* доприноси хиперкоагулацији и повећаном ризику од ВТЕ.

Према резултатима студија, код пацијената са ВТЕ, полиморфизам *FV 1691 G>A* је присутан у 15-40% (око 20% особа у односу на укупну ВТЕ, око 50% ВТЕ са наследном тромбофилијом), и сматра се да је одговоран за 20-25% ВТЕ догађаја, са посебним доприносом стопи рецидива (102,224,362). У Републици Србији и земљама у окружењу, учесталост *FV 1691G>A* код ВТЕ пацијената креће се од 15-33% (364-366). Велика епидемиолошка студија спроведена у САД показала је да је учесталост полиморфизма *FV 1691G>A* у општој белој популацији 5,27%, латиноамеричкој 2,21%, код Афроамериканаца 1,23%, Индијанаца 1,25% и само 0,45% у азијској популацији (102,366). У студији у којој су приказани резултати великог броја европских земаља, такође се наводи преваленција у општој популацији од 0,6-8,3% (102,353). Просечна преваленција *FV 1691G>A* у здравој европској популацији креће се око 5%, при чему је већа у северним земљама у односу на земље јужне и источне Европе. У централној Европи је преваленција око 3%, а за популације словенског порекла испод 3%, док је највећа регистрована преваленција у Румунији, више од 8% (253,353,366).

Приликом активације *FV*, ступањем у интеракцију са протромбином, *FХa* и другим протеинима згрушавања, покреће експлозивну продукцију тромбина, кључног хемостатског ензима који активира тромбоците и катализује таложeње фибрина, са крајњим циљем претварања растворљивог фибриногена у фибрински угрушак (102,209,213,215,253).

Управо генотипска варијанта *FV 1691G>A* узрокујући замену а.а. аргинина глутамином на позицији 506 у протеину *FV* (207), ствара отпорност према деловању *APC*, спречавајући пресецање *FV* на позицији 506 и доприноси 10-20 пута спорију инактивацију *FVa* (209,354). На тај начин се *FVa* дуже него што је потребно задржава у циркулацији, појачавајући активност протромбиназног комплекса и прекомерно стварање тромбина, и помера хемостатску равнотежу према повећаној коагулацији (209,354). Према резултатима истраживања, процењени релативан ризик за појаву тромбозе код носилаца варијанте *FV 1691G>A* је 2 до 7 пута (а код варијантних хомозигота ризик за тромбозе је 15 до 20 пута) већи у односу на особе које имају неизмењени (дивљи) облик алела (61,101,102). Према неким истраживањима, ризик од ВТЕ код носилаца варијантног хомозигота је повећан чак више од 50 пута у односу на особе са *WT* генотипом (102,221,354). Као и код носилаца варијантних генотипова за *FII 20210*, и за генотипове *FV 1691G>A* и *FV 1691A>A*, клиничка експресија варира па се дешава да неки носиоци оваквих генотипова никада не развију тромбозу (101,102). Објашњење за ово лежи у чињеници да постоје модулаторни механизми који надокнађују измењену функцију ензима, као и то да у мултифакторским болестима није увек довољан само један фактор ризика за настанак болести (101,102,215).

У нашем истраживању утврђене учесталости *FV* 1691G>A, и у контролној групи и у групи ВТЕ пацијената, у потпуности корелирају са објављеним подацима, посебно са земљама у региону (353,364-366). Потврђена је изразито јака корелација *FV* 1691G>A са ВТЕ, са око 20 пута повећаним ризиком од ВТЕ, у поређењу са генотипом G/G. Ризик од ВТЕ у присуству ове варијанте је остао висок и приликом униваријантне и мултиваријантне анализе свих SNPs, као и приликом укључивања у мултиваријантну регресиону анализу осталих најзначајнијих стечених фактора ризика.

Поред полиморфизама на позицији 1691 у гену *FV*, за процес коагулације значајна је и хаплотипска варијанта *FV* HR2 6755A>G, која делујући на смањену укупну продукцију *FV* (215,367), а повећану продукцију прокоагулантне изоформе *FV*1, доприноси смањеној резистенцији на APC и утиче на повећану продукцију тромбина (102,214,215). Ова једнонуклеотидна промена доприноси измени а.а. која се налази на трећем месту од краја *FV* молекула, непосредно поред цистеинског остатка који учествује у формирању дисулфидног моста у С2 домену одговорном за мембранско везивање *FV* (217,223). Због тога се дешава губитак два моста између аспаргинских и лизинских остатака на позицијама 2101 и 2013 у протеину *FV*, што за резултат има мање стабилан домен С2 (214,217). Доказана функционална улога *FV* HR26755A>G је појачана гликолизација и савијање протеина, који су као такви мање активни (223,367) Без обзира на наведено, још увек се полемиче о ефектима овог хаплотипа на функцију и физиолошке особине *FV*, односно колики је његов допринос хиперкоагулацији са и без присуства варијанте *FV* 1691G>A, поготову што су резултати студија о учесталости овог хаплотипа неконзистентни (214,217,222,223,367,368).

За разлику од *FV* 1691G>A, чија је учесталост и повезаност са ВТЕ установљена у многобројним студијама, учесталост и повезаност *FV* HR26755A>G са тромбозом још увек није довољно испитана. Заступљеност *FV* HR26755A>G у оквиру различитих популација је врло варијабилна. Веома је редак у азијској популацији (2,7%), одсутан међу Африканцима, а међу припадницима беле популације достиже учесталост чак до 8,2% (216,224). Висока учесталост у белој популацији је од великог значаја, посебно имајући у виду да алел *FV* HR2 6755G може бити присутан у транс позицији са *FV* 1691G>A, повећавајући његов протромботички ефекат, који је описан у појави псеудохომозиготне резистенције на APC (216,219,223,369). Псеудохомозиготна резистенција на APC се јавља као последица комбинације два дефекта, односно варијантна полиморфизма, у гену за *FV*, а карактерише је стање када присутан генотип *FV* 1691G>A, услед неактивности нормалног G алела даје фенотип отпорности на APC као да је варијантни хомозигот *FV* 1691A>A (369). У оваквим ситуацијама када нормални алели, због неке друге SNP измене, постану неактивни, називају се нултим “null” алелима. На основу преваленције тешког недостатка *FV* (1/1.000.000), процењена учесталост нултих алела *FV* у општој популацији је 0,1%, па се очекује да ће приближно 1 од 1.000 носилаца варијанте *FV* 1691G>A имати псеудохомозиготну резистенцију на APC (207,369)

Нема много расположивих студија у којима је испитивана улога и значај овог хаплотипа за настанак тромбозе. У мета-анализи спроведеној 2002. године, од стране Castaman и сар., којом је обухваћено 8 расположивих студија, са око 2.700 ВТЕ пацијената и око 7.700 контрола, изнесени су веома хетерогени закључци (368). Закључци иду од тога да се сматра

као функционална одредница са умерено смањеном резистенцијом на АРС, до тога да се не може третирати као независни фактор ризика за тромбозу, али може бити значајан када је истовремено присутан са *FV 1691G>A* (368). Међутим, студије укључене у наведену мета-анализу биле су веома хетерогене у дизајну, што је отежавало и синтезу и анализу података. Након наведене мета-анализе, готово да није било студија које су испитивале повезаност *FV HR26775A>G* са тромбозом.

На основу расположивих података, учесталост *FV HR26775A>G* креће се у распону од 7,8-18,5% у случајевима са ВТЕ, код контролних испитаника од 5,6-12,1% (216,225,365,367,369). Веома висока учесталост у општој популацији, чак око 50%, пријављена је у индијанским племенима из Костарике (370). У нашем истраживању, учесталост *FV HR26775A>G* у групи ВТЕ пацијената и контролној групи је у складу са објављеним подацима.

Иако није доказана статистички значајна разлика у дистрибуцији *FV HR26775A>G* између ВТЕ пацијената и контрола, запажање да од 17 ВТЕ пацијената са *FV HR26775A>G*, 13 је имало само варијанту *FV HR2 6775A/G*, без истовременог присуства високоризичних генотипова *FV 1691G>A* и/или *FII 20210G>A*, (два су имала истовремено присуство *FV HR2 6775A>G* и *FV 1691G>A*, један пацијент је поред *FV HR26775A/G* имао *FII 20210 G>A*, код једног пацијента присутни су истовремено *FV 1691G>A*, *FII 20210G>A* и *FV HR2 6775A>G*), може ићи у прилог независне улоге овог хаплотипа у настанку тромбозе, што упућује на значај додатног истраживања овог хаплотипа. Осим тога, мултиваријантном анализом утицаја свих SNPs на ризик од тромбозе, показано је да је *FV HR26775A>G* доприносио скоро три пута повећаном ризику од ВТЕ, а приликом укључивања у мултиваријантну анализу и ненаследних предиктора, ризик *FV HR26775A>G* за тромбозе је био на граници дефинисане статистичке значајности. Имајући у виду уочена запажања, као и да због малог броја студија и контроверзних резултата, повезаност *FV HR26775A>G* са тромбозом још увек није у потпуности разјашњена, неопходне су нове студије у циљу прецизније процене о функционалној важности и протромботичкој улози овог хаплотипа у настанку ВТЕ.

#### 4.4.2 Хаплотипска анализа

Већина студија повезаности полиморфизама са болестима, у фокус истраживања ставља анализу генотипова и алела како би откриле могућу асоцијацију са болестима. Такав приступ може утицати на то да су многи од објављених података повезаности једног полиморфизма са ризиком од болести прецењени, јер су добијени без знања о присуству додатних SNP-s који су функционално повезани са варијантом која се истражује, односно хаплотипом у коме се варијанта налази (217). Последњих година, истраживања су показала да хаплотипска анализа може идентификовати варијанте које се не откривају стандардном анализом заснованом на полиморфизму једног нуклеотида (371). Анализа хаплотипова заснива се на LD-у, који описује однос зависности између два алела на два различита локуса. Узимање у обзир LD између два полиморфизма доприноси прецизнијој процени њиховог правог утицаја на ризик од болести. Уколико су SNPs смештени унутар једног LD

блока, постоји велика вероватноћа да ће се наслеђивати заједно (372). Управо, претпоставка да се неки SNP налази у LD са неким другим, функционално важним алелима, а да њихова везана сегрегација у гамете може условити испољавање одређеног клиничког стања, хаплотипском и диплотипском анализом нуди се нови приступ у испитивању асоцијације генских варијанти са мултифакторским болестима (373,374).

Прегледом литературе нисмо пронашли много доступних студија хаплотипске и диплотипске анализе за SNPs у *FII* и *FV* генима који се испитују у нашем истраживању, што ограничава поређење и коментарисање наших резултата.

У две студије у којима су испитивани узроци високог нивоа протромбина у плазми, утврђено је да су носиоци варијантног хомозигота *FII* 19911G>G имали 8 U/dl виши ниво протромбина у односу на варијантни хетерозигот *FII* 19911A>G, што је код носилаца варијанте *FII* 20210G>A доприносило додатном повећању ризика од тромбозе (205,375). Овакав налаз је упућивао на могући међусобни утицај алела испитиваних полиморфизама. Након тога, у студији спроведеној од стране von Ahsen и Oellerich се наводи да су алели 19911A и 20210A у равнотежи и да је највећа експресија iRNK и активност протромбина управо узрокована хаплотипом 20210A-9911A (200). Хаплотип 20210G-19911G је показао нижу експресију протромбина од хаплотипа 20210G-19911A (200). Насупрот овоме, у истраживању спроведеном од стране Seelie и сар., се наводи да је алел 19911G имао повишену експресију и активност FII и након искључивања пацијената са алелом 20210A, што је у супротности са наводима претходне студије (200,375). У нашем истраживању је утврђено да је хаплотип 20210A-19911A статистички значајно чешће заступљен код ВТЕ пацијената у односу на контроле, што корелира са наводима студије von Ahsen и Oellerich (200). Осим тога, са статистички значајном разликом заступљени су диплотипови G-A/A-A и G-G/A-A код ВТЕ пацијената, док је диплотип G-A/G-G чешће заступљен у контролној групи.

Важна карактеристика *FV* је постојање снажног рекомбинантног места у интрону 6, што доприноси да веза SNPs смештених у првих 6 егзона и следећих 6, буде прилично слаба (217). Зато се оба региона од поменуте тачке, сматрају засебним хаплотипским блоковима. Полиморфизам *FV* 1691G>A је смештен у егзону 10, а полиморфизам *FV* HR26775A>G у егзону 25 (207,211,217,367).

Приликом испитивања повезаности молекуларних механизма утицаја 4 полиморфизма у *FV* HR2 хаплотипу, који доводе до замене а.а. у *FV*: Met385Thr, His1299Arg, Met1736Val и Asp2194Gly, на функцију и количину *FV*, утврђено је да *FV* који носи све 4 наведене хетерозиготне варијанте у односу на *FV* са дивљим алелима за наведене полиморфизме, имао значајно нижу експресију и синтезу протеина *FV* (367). Ова 4 полиморфизма су за већину алела HR2 у неравнотежи везе, осим за ретке алелне варијанте узроковане рекомбинацијом гена (367). При том је утврђено да *FV* HR26775A>G (Asp2194Gly), у односу на остала 3 поменута полиморфизма, има доминантну улогу на смањену синтезу и поремећени транспорт *FV* из ендоплазматичног ретикулума до голџијевог апарата (367,376). Првобитно се сматрало да је за овакав ефекат одговоран *FV* HR24070A>G који у *FV* доводи до измене а.а. His1299Arg (217).

У нашем истраживању, међу *FV 1691 G>A* и *FV 6775 A>G* полиморфизмима постоји умерен LD и појава сва 4 хаплотипа, при чему се као ризични за тромбозе уочавају хаплотип 1691A-6775 A и хаплотип 1691A-6775G. Ризични диплотипови за тромбозе показали су се G-A/A-A и G-A/A-G. Хаплотип A-G и диплотип G-A/A-G присутни су само код ВТЕ пацијената, што може упућивати на повезаност варијантног алела *FV 6775 G* са повећаним ризиком од тромбозе.

Чињеница да варијантни алел *FV 6775G* додатно повећава ризик од тромбозе код већ утврђених полиморфизама *FV 1691G>A*, даје на значају хаплотипској анализи у случајевима када је код пацијената већ утврђен варијантни генотип *FV 1691G>A* или *FV 1691 A>A*.

#### 4.4.3 Полиморфизам *FXIII-A 102G>T (Val34Leu)*

Фактор коагулације FXIII је укључен у завршни део заједничког пута коагулације, помоћу тромбина претвара се у активну форму FXIIIa, који умрежавајући фибринска влакна и уграђивањем антифибринолитичких протеина у крвне угрушке, стабилизује их и чини отпорним на деградацију (227,230). Истовремено, смањењем адхезије тромбоцита на фибрин, FXIII делимично испољава антикоагулантно својство (227,377). Структура угрушка код полиморфизма *FXIII-A 102G>T (Val34Leu)* је са тањим влакнима и ситнијим порама, а бочна агрегација фибринских влакана је смањена (231,237). Код варијантних хомозигота *FXIII-A 102T>T (Leu34Leu)*, који су у плазми имали и повишену концентрацију фибриногена, доказано је да су фибринска влакна гушћа, порознија и подложнија фибринолизи, а код нижих концентрација фибриногена, фибринска влакна су тања, гушћа и мање порозна. Код носилаца дивљег типа, *FXIII-A 102G>G (Val34Val)*, нису запажене структурне промене угрушка без обзира на концентрацију фибриногена (231). Због чињенице да *FXIII-A 102G>T* не резултира променом (смањењем) концентрације FXIII у плазми, механизам који стоји у основи заштитног ефекта овог полиморфизма, у односу на тромбозе, није у потпуности јасан. Једно од могућих објашњења могло би бити то што је варијантни хетерозигот *FXIII-A 102G>T*, повезан са око 2,5 пута бржом активацијом FXIII и умрежавањем фибрина, а супротно очекивањима да повећава, смањује отпорност на фибринолизу, што обезбеђује бржу разградњу угрушка (239,378,379). У студији Kohler и сар., у којој је испитивана улога FXIII у васкуларним болестима, наводи се да варијантни генотип G/T може смањити ефикасност умрежавања и олакшану деградацију фибрина (378). На основу досадашњих истраживања евидентно је да Val34Leu и Leu34Leu због брзе активације и исцрпљивања функционалног FXIII-A доприносе смањеној стабилизацији угрушака, што може пружити заштитни ефекат од ВТЕ, посебно у условима са повишеним вредностима фибриногена (229,237,241).

Супротно очекивањима да присуство варијантних генотипова доприноси повећању ризика од тромбозе, резултати многих студија случај-контрола у којима је испитивана учесталост овог полиморфизма показали су статистички значајно већу учесталост *FXIII-A 102G>T* код здравих испитаника у односу на ВТЕ пацијенте (237,380). Управо овакви налази, утицали су на усмеравање закључака да присуство полиморфизма *FXIII-A 102G>T (Val34Leu)*

остварује заштитну улогу у односу на ВТЕ, коронарне артеријске и друге кардиоваскуларне болести (381). Мета-анализа из 2006. године, спроведена од стране Wells и сар., којом је обухваћено 12 студија са преко 3.000 ВТЕ пацијената и око 5.000 контрола са циљем да процени повезаност *FXIII*-А 102G>Т варијанте са тромбозом изнела је закључке о заштитној улози ове варијанте од ВТЕ (382). Ефекат протективне улоге није био велики, али је уочен и код варијантних хетерозигота, G/Т (*Val34Leu*) и хомозигота Т/Т (*Leu34Leu*) (380,382). Заштитни ефекат *Val34Leu* од ВТЕ потврдили су и Gohil и сар. у мета-анализи која је обухватила око 120.000 пацијената и око 180.000 контролних испитаника (383). Насупрот овоме, резултати неких студија нису потврдили заштитну улогу овог полиморфизма за тромбозе, односно није утврђена значајна разлика у учесталости *Val34Leu* између пацијената са тромбозом и контролних испитаника (242,384,385).

Иако су оба варијантна генотипа *FXIII*-А 102 била ређе заступљена у ВТЕ групи, резултатима наше студије није показана статистички значајна разлика у њиховој дистрибуцији између ВТЕ пацијената и контрола. Ипак, утврђено је да је варијантни Т алел статистички значајно чешће присутан у контролној групи у односу на ВТЕ пацијенте. Овакав резултат иде у прилог заштитној улози у односу на тромбозе, што је и потврђено мултиваријантном регресионом анализом свих SNPs укључених у студију. На основу AM, је показано да варијантни генотип *FXIII*-А 102 G>Т остварује протективни значај у односу на ВТЕ, док за варијантни хомозигот *FXIII*-А 102 Т>Т то није потврђено. Доминантним моделом је, такође, потврђено постојање смањеног ризика у односу на тромбозе. Добијени резултати су у складу са закључцима претходно наведених мета-анализа и студија случај-контрола (380-383). Откривање варијанти са заштитним дејством у сложенем систему коагулације је од значаја јер могу пружити увид у биохемијске путеве који делују протективно у односу на ВТЕ.

#### 4.4.4 Полиморфизам *MTHFR* 677C>Т

*MTHFR* је кључни ензим за метаболизам фолата и регулацију нивоа Нсу, учествује у процесу метилације, а важна улога је и у донирању метил групе за регулисање епигенетске модификације (158,246). Хомоцистеин је најважнија одредница процеса метилације, настаје сложеним биохемијским процесом, искључиво као међупродукт у биосинтези есенцијалне а.а. метионина која спада у тиоаминске а.а. јер садржи сумпор (158,248). Смањење активности *MTHFR* ензима доводи до поремећене метилације Нсу, па самим тим и поремећаја његове концентрације у крви (158,248). Иако се Нсу формира у свим ткивима, његова детоксикација се дешава углавном у јетри, бубрезима, танком цреву, панкреасу и сочиву (246). Изузетно висок ниво Нсу исцрпљује фолну киселину која је организму неопходна за нормално функционисање, повезан је са низом медицинских стања и назива се хиперхомоцистеинемија (158,246). Хиперхомоцистеинемија може довести до неравнотеже између васкуларног релаксирајућег фактора и фактора васкуларне контракције, што повећава тенденцију ТДВ (242). Смањењем синтезе NO нарушава функцију и флексибилност ендотела и токсично делује на васкуларни ендотел, а оштећени лумен крвних судова делује као подлога за тромботичке догађаје (241,249). Поред тога, утиче на промену функције тромбоцита и стање коагулације крви, и на овај начин доприноси патогенези ВТЕ (248,249). Повећањем проинфламаторних цитокина и



смањењем антиинфламаторних цитокина, Нсу индукује инфламаторне одговоре који доводе до апоптозе ћелија (246).

Стања и болести које су повезане са SNPs у *MTHFR* гену и хиперхомоцистеинемом су: тромбоза, атеросклероза, хронична бубрежна инсуфицијенција, срчане болести, дијабетес отпоран на инсулин, синдром полицистичних јајника, анненцефалија, спина бифида, Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, мултипла склероза, шизофренија, депресија и друго (245,247,248). Без обзира на то што многе студије износе резултате о повезаности са овим болестима, још увек се не зна да ли је Нсу узрочник болести или само биолошки маркер, односно, да ли висок ниво Нсу доприноси настанку болести или је управо повишен Нсу резултат саме болести, а претпоставља се и то да су пацијенти са варијантним генотипом у већем ризику од бржег напредовања болести (248,386). На овакав закључак утицали су резултати студија у којима је утврђена повезаност *MTHFR* варијанти и болести али нису потврђени јасни докази о узрочно-последичној вези, као и то да варијантни полиморфизми *MTHFR* на локацији 677 не морају увек бити у корелацији са повишеним нивоом Нсу (387,388).

Замена једног нуклеотида С >Т на локусу 677, *MTHFR* гена, доводи у ензиму до замене а.а. аланина валином (Ala222Val) на позицији 222 у протеину (249,254). Ензим са измењеном а.а. показује идентична каталитичка својства као ензим дивљег типа (Ala222Ala), али је термолабилан, што због убрзане деградације значајно умањује његову активност (248,388). У поређењу са дивљим генотипом (С/С) који остварује нормалну ензимску ктивност, хетерозиготна (С/Т) и хомозиготна (Т/Т) варијанта смањују ензимску активност за око 34% и 50-65% (248,386,388,389). Због ове чињенице, сматра се да су особе које имају варијантни С/Т и Т/Т генотип склоније развоју хиперхомоцистеинемие и тромботичких поремећаја, с тим што се сугерише да већи ризик носи хомозиготна варијанта *MTHFR* 677Т>Т (158,354). Зато је протеклих година *MTHFR* 677 интензивно испитиван у асоцијацији са ризиком од ВТЕ, али су резултати студија још увек контроверзни.

У неким студијама случај-контрола и мета-анализама, утврђена је повезаност само хомозиготне Т/Т варијанте са ризиком од тромбозе (158,354,390,391), док је у мета-анализи спроведеној од стране Zhang и сар, којом су обухваћене 24 студије са око 2.400 ВТЕ пацијената и преко 4.000 контрола, у кинеској популацији утврђена значајна повезаност обе генотипске варијанте *MTHFR* 677 (С/Т и Т/Т) са повећаним ризиком од тромбозе (389). Насупрот томе, у студијама спроведеним у Србији, Македонији, Хрватској и Босни и Херцеговини није утврђена значајна разлика у заступљености варијантних генотипова *MTHFR* 677С>Т између ВТЕ пацијената и контрола (355,356,366,392). Такође, у великој мета-анализи спроведеној од стране Simone и сар., у коју је укључено око 11.000 ВТЕ пацијената и преко 21.000 контрола, није утврђен ефекат варијантних генотипова *MTHFR* 677 (С/Т и Т/Т) на ВТЕ (253). Међутим, у наведеној студији, стратификованом анализом према полу, код мушкараца са варијантним генотиповима за *MTHFR* 677С>Т, утврђен је значајно повећан ризик од развоја ВТЕ (253). У последње две године објављене су две велике мета-анализе у којима су систематизовани подаци највећег броја релевантних студија о учесталости и повезаности *MTHFR* 677С>Т са ризиком од ВТЕ (245,250). Мета-анализа у коју су укључене 32 студије са преко 8.000 ВТЕ пацијената и 10.000 контрола утврдила је повезаност *MTHFR* 677С>Т са тромбозом у азијској популацији, док у студијама

које су се односиле на белу популацију није утврђена повезаност (250). Друга мета-анализа, спроведена од стране Zeng и сар, у којој је анализирано укупно 97 студија са 30.650 учесника, утврдила је на основу свих генетичких модела повезаност варијантних генотипова *MTHFR* 677C>T са ризиком од тромбозе у оквиру беле и западноазијске популације, док у оквиру афричке и источноазијске популације повећан ризик није утврђен (245).

На контрадикторност резултата о учесталости и утицају варијантних *MTHFR* 677 генотипова на тромбозе, осим могућег присуства неоткривених SNPs, који независно или у садејству са варијантама *MTHFR* 677C>T, могу додатно утицати на ризик од тромбозе, могли су утицати и неки други чиниоци од којих зависи повишен ниво Нсу (251). Исхрана је један од важних чинилаца, односно одговарајући унос фолата смањује ризик од високог нивоа Нсу код носилаца С/Т и Т/Т генотипа, што може делимично објаснити то што су ови генотипови у високом проценту присутни у здравој белој популацији (250,251). Чињеница да је значај варијантних генотипова *MTHFR* 677C>T у настанку тромбозе прилично дуго истраживан а резултати још увек нису конзистентни, може се делимично објаснити и разликама насталим због етничке хетерогености испитиваних популација, као и због неусклађености дизајна студија.

Поредећи дистрибуцију учесталости алела С и Т, као и генотипских варијанти *MTHFR* 677, између ВТЕ и контролне групе, у нашој студији није уочена статистичка значајност ни повећан ризик од ВТЕ између испитиваних група. Овај резултат је у сагласности са студијама из региона, као и са резултатима великог броја других студија које нису утврдиле повезаност варијантних *MTHFR* 677 генотипова са ризиком од тромбозе (250,253,355,356,366,392). Међутим, након истовременог укључивања стечених и генетичких фактора ризика према ДМ, у мултиваријантну регресиону анализу, показано је да варијантни генотипови *MTHFR* 677 вишеструко повећавају ризик од ВТЕ. Објашњење за овакав ефекат *MTHFR* 677C>T и *MTHFR* 677T>T лежи у могућем успостављању интеракција са генотиповима у другим генима, као и то да због високе полиморфности *MTHFR* и LD, могуће је формирање диплотипова са другим локусима у *MTHFR* који нису испитивани нашом студијом. Узимајући у обзир то да вредност Нсу поред, главне условљености експресијом варијантних генотипова *MTHFR* 677C>T, може бити делимично супримирана другим факторима, као што су: физичка активност, конзумирање кафе, цигарета, алкохола и др, (251,389), а како су сви наведени фактори обухваћени мултиваријантном анализом, постоји могућност да су допринели статистичкој значајности варијантних полиморфизама *MTHFR* 677 у односу на ризик од тромбозе.

#### 4.4.5 Полиморфизам PAII 4G/5G

Функционална неравнотежа између коагулације и фибринолизе може бити узрокована високом концентрацијом PAII у плазми, тако што висока концентрација овог ензима појачано инхибира најважније фибринолитичке активаторе tPA и uPA (257,258). Стога, прекомерна концентрација PAII, условљавајући стање ниске фибринолизе, може подстаћи тромботичке догађаје. За његову појачану експресију одговоран је I/D полиморфизам једног гуанина (4G/5G) (257).

У промоторском региону, на позицији -675 bp узводно од почетног места транскрипције описана је I/D једног G која је означена као 4G/5G генска варијанта (256,259,264). Алелска варијанта 4G везује само активатор транскрипције, што повећава концентрацију PAI1 у плазми, а то доприноси смањењу функције фибринолизе (263). Особе које су хомозиготи за алел 4G, имају виши ниво транскрипције гена и до 6 пута већу концентрацију PAI1 у плазми од носилаца дивљег генотипа, 5G/5G (263). Претпоставља се да инсерција додатног G (5G) интерферира са додатним местом за везивање инхибитора фибринолизе (256). Тако, алелска варијанта 5G садржи додатни везни положај за репресорске протеине, односно преклапајућа везујућа места за активатор и инхибитор транскрипције, што резултира експресијом нормалног нивоа PAI1, чиме се постиже његова оптимална концентрација у крви и функционална активност (256). Због одсуства везујућег места за репресорске протеине, хомозиготи за алел 4G производе до 6 пута више iRNK, што за последицу има приближно 25% повећање концентрације PAI1 у плазми у односу на хомозиготе за алел 5G (256,263). Многе студије су истраживале повезаност 4G/5G полиморфизма и венске тромбозе, међутим досадашњи резултати су још увек веома хетерогени, а као главни разлози се наводе разлике у генетичкој структури популације или то да овај полиморфизам делује у синергији са неким другим факторима (257,258,354,356). Висока заступљеност делецијског 4G алела у општој популацији утицала је чак на различите истраживачке приступе у тумачењу биолошке вредности ове генске варијације у односу на болести. Управо због високе заступљености варијантних генотипова у здравој популацији, у студији Hoekstra и сар., размишљања су кренула и у правцу да 4G/4G генотип смањује ризик од исхемијског можданог удара и да остварује протективну улогу у настанку стабилне коронарне болести (393,394). Сматра се да повећана експресија PAI1, која је условљена 4G/5G и 4G/4G генотиповима смањењем фибринолизне активности, доприноси смањењу ризика од можданог удара тиме што локално повећање PAI1 може стабилизovati плакове и на тај начин смањити ризик од цереброваскуларних болести (393,395).

У студијама асоцијације PAI1 4G/5G са венским тромбозама није било извештаја о његовој протективној улози, а истраживања су углавном усмерена на значај и откривање његове повезаности са ризиком од тромбозе. У најновијој великој мета-анализи спроведеној од стране Zhang и сар., у коју је укључено 27 студија случај-контрола из земаља различитих географских региона, које су испитивале повезаност PAI1 4G/5G са ризиком од ВТЕ, установљена је повезаност овог полиморфизма са тромбозама, посебно у азијској популацији (258). Међутим, студије обухваћене овом мета-анализом су веома хетерогене у дизајну и структури пацијената; неке су испитивале само ТДВ, неке само ПЕ, неке само тромбозе порталних вена, церебралне венске тромбозе, док је само 10 студија испитивало укупно ВТЕ, а чак и резултати неких студија су прилично хетерогени. Такође, у иранској студији спроведеној од стране Hosseini и сар. пронађена је повезаност наведених варијанти са повећаним ризиком од тромбозе (396). Насупрот овим резултатима, у многим студијама није утврђена повезаност PAI1 4G/5G и PAI1 4G/4G варијанти са повећаним ризиком од тромбозе (354,356,397). Закључци о значају PAI1 4G/5G још увек нису јасно дефинисани у односу на ризик за ВТЕ, али се сугерише да полиморфизам делује као појачивач многих других генетичких фактора, посебно на FII 20210G>A (354).

У нашој студији нису уочене значајне разлике у заступљености генотипова PAI1 675delG у оквиру ВТЕ пацијената и контролних испитаника ни према једном генетичком моделу

испитивања. Резултати нашег истраживања су у складу са објављеним учесталостима овог полиморфизма великог броја студија укључених у мета-анализу (Zhang и сар.) које су се односиле на ВТЕ, посебно са студијама из Европских земаља, као и са земљама из региона: Србија, Македонија, Хрватска, Грчка и Италија (258,263,356,397).

#### 4.4.6 Полиморфизам *FSAP 1601G>A*

Улога *FSAP* у регулацији коагулације и фибринолизе заснована је на *in vitro* студијама, у којима је показано да су две најзначајније улоге овог ензима активирање *FVII* у активни облик *FVIIa*, чиме започиње плазматску коагулацију крви и активирање активатора плазминогена (*u-PA*), покретача фибринолизе (267,268). Осим тога ензим *FSAP* је укључен у екстрацелуларну протеолизу (267,268). Генотипска варијанта *FSAP 1601G>A* има до 5 пута нижу протеолитичку активност у односу на неизмењени *G/G* генотип (269,270,398,399).

Од тренутка када су 2002. године Roemisch и сар. установили да 5-10% здравих људи имају смањен потенцијал да активирају *u-PA*, а анализом ДНК утврђено да је за то одговоран *SNP* у гену за *FSAP*, почело је истраживање о повезаности *FSAP 1601G>A* са болестима (400). Након тога је група научника Willeit и сар. (401) потврдила да је полиморфизам *FSAP 1601G>A* један од фактора ризика за каротидну стенозу, а веома брзо група истраживача Норре и сар., је спровела студију случај-контрола на групи од 213 ВТЕ пацијената и исто толико контрола, са циљем да процени значај варијантног полиморфизма *FSAP 1601G>A* у настанку ВТЕ (399). Закључак наведене студије је да је *FSAP 1601G>A* нарушавајући протеолитичку активност значајно смањео фибринолитички капацитет плазме, чиме се представља као независан фактор ризика за примарну венску тромбозу (399). У истој студији није показан утицај хетерозиготне варијанте *FSAP 1601G>A* на тромботичке рецидиве (399). У студији спроведеној од стране Ahmad-Nejad и сар. утврђена је повезаност *FSAP 1601G>A* и са ризиком од примарне и поновљене тромбозе (274). Насупрот резултатима претходних студија, у студијама спроведеним од стране van Minkelen и сар., и Sidelmann и сар., није потврђена значајна повезаност *FSAP 1601G>A* са ризиком од тромбозе (275,398). Мета-анализа из 2020. године, којом је обухваћено око 2.400 ВТЕ пацијената и 2.850 контрола из 7 пажљиво одабраних студија случај-контрола, утврдила је да *FSAP 1601G>A* може повећати до 3,5 пута ризик од ВТЕ, у односу на носиоце дивљег *G/G* генотипа, док повезаност са ризиком од тромботичких рецидива није испитивана овом студијом (402).

С обзиром на то да је према доступним подацима, учесталост *FSAP 1601G>A* код пацијената са непровоцираном тромбозом чешћа у односу на пацијенте са провоцираном тромбозом (398,399,403), а како непровоциране тромбозе чешће дају рецидиве, очекивано би било да *FSAP 1601G>A* буде повезан и са рецидивима. Међутим, резултати студија у којима је истраживана повезаност *FSAP 1601G>A* са рецидивима ВТЕ су веома варијабилни (274,275,399).

У нашем истраживању дистрибуција генотипова *FSAP* 1601G>A, као и учесталост алела G и A, готово је равномерно заступљена у оквиру ВТЕ пацијената и контролних испитаника. Варијантни хомозиготи нису утврђени ни код једног испитаника наше студије. Резултати нису показали да носиоци *FSAP* 1601 G>A имају повећан ризик од ВТЕ, што је у складу са студијама које нису пронашле повезаност *FSAP* 1601G>A са повећаним ризиком од тромбозе и кардиоваскуларних болести (271,398). Узимајући у обзир све наведено, указује да су још увек присутне контроверзе о повезаности *FSAP* 1601 G>A са ризиком од тромбозе, стога је значајно наставити истраживања.

#### 4.5 Полиморфизми у оквиру пола испитиваних група; повезаност са различитим формама ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ, локализацијом ВТЕ и појавом рецидива

Због широког спектра клиничких манифестација ВТЕ, претпоставља се да варијантни генотипови могу имати различиту улогу у односу на локализацију ТДВ и њену главну компликацију ПЕ, на животну доб настанка тромбозе и рецидиве.

Према нашим сазнањима, истраживања разлике учесталости генотипова потенцијално протромботичких гена у оквиру пацијената са историјом ВТЕ догађаја, у односу на различите форме ВТЕ болести, животну доб настанка тромбозе, локализацију где се догодио први тромботички атак, рецидиве, као и међу половима, се углавном односе на најчешће испитиване SNPs: *FV* 1691G>A, *FII* G20210G>A, *MTHFR* 677C>T, *FXIII-A* 102G>T и *PAII* 4G/5G. Скоро да нема података о учесталости *FV* HR2 6775A>G, *FII* 19911A>G и *FSAP* 1601G>A у оквиру наведених одредница, што ограничава адекватно поређење наших резултата. Такође, мало је расположивих података о учесталости наведених потенцијално протромботичких генотипова у односу на пол у општој популацији (404). Подаци о разликама учесталости ризичних генетичких варијанти у оквиру ових одредница, када се једном потврде на већим популацијама, могу помоћи у осмишљавању бољих стратегија за превенцију тромбозе.

Претпоставка да због физиолошких разлика међу половима, које се посебно односе на трудноћу, употребу оралних контрацептива и хормонску супституциону терапију, варијантни генотипови могу различито утицати на предиспозицију за болести код жена и мушкараца, утицала је да се приликом испитивања дистрибуције варијантних генотипова у односу на болест, испитује и у односу на пол испитаника (219). Већина претходних студија није пронашла значајне разлике у дистрибуцији протромботичких варијанти међу мушкарцима и женама са историјом венских или артеријских тромботичких поремећаја (258,354). Једно од значајних запажања је да је учесталост *FV* 1691 G>A, код оболелих од ПЕ, већа код мушкараца него код жена (242,253).

У мета-анализи спроведеној од стране Simone и сар., на основу доминантног модела наслеђивања, међу половима није утврђена разлика и ризик од ВТЕ у присуству

полиморфних варијанти *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A*, док је на основу рецесивног модела, *MTHFR 677C>T*, значајно чешће заступљен код мушкараца (253). У иранској студији, спроведеној од стране Farajzadeh и сар. у популацији са ВТЕ, утврђена је значајно већа учесталост генотипова *FII 20210 G>A* и *PAII 4G/5G* у оквиру припадница женског пола, док је дистрибуција генотипова *FV 1691* била равномерно заступљена међу мушкарацима и женама (405). У истој студији није било разлике у дистрибуцији ни за једну од испитиваних варијанти у општој популацији (405).

У италијанској студији, спроведеној од стране Cerneга и сар., утврђено је да је у оквиру ВТЕ пацијената дистрибуција генотипа *FV 1691 G>A* учесталија код мушкараца са ПЕ, док није утврђена разлика у заступљености генотипова *FV 1691 G>A*, *FII 20210 G>A*, *PAII 4G/5G* и *FXIII A102G>T* међу половима у општој популацији и у односу на укупну групу ВТЕ (242). У студији Roach и сар., нису утврђене разлике у учесталости *FV 1691G>A* и *FII 20210 G>A* према полу контролних испитаника, а утврђени ризик од ВТЕ који се може приписати популацији за ове SNPs је приближно једнак за мушкарце и жене (406). Насупрот овоме, истраживање у јорданској здравој популацији је показало да су варијантни генотипови за: *MTHFR 677*, *FV 1691* и *PAII 4G/4G* чешће заступљени код жена (404). У истој студији је утврђена већа учесталост варијантних генотипова *FII 20210 G>A* и *FII 20210 A>A* у здравој популацији мушкараца (404).

У нашем истраживању није уочена статистички значајна разлика у дистрибуцији испитиваних SNPs у односу на пол ВТЕ пацијената и контролних испитаника, осим за *FVHR2 6775A>G*, који је у оквиру контрола значајно чешће заступљен код мушкараца. Међутим, посматрајући процентуалне резултате студије уочено је да је у групи ВТЕ пацијената, код мушкараца у односу на жене, *FII 20210G>A* заступљенији, што је супротно студијама Simone и сар. и Farajzadeh и сар. (253,405), У нашој контролној групи наведени варијантни генотип је био заступљен само код жена. Такође, код припадника мушког пола ВТЕ групе, чешће су заступљени *FVHR2 6775A>G* и обе варијанте за *FXIII A102*. Варијантни генотипови за *PAII (4G/5G и 4G/4G)* су у већем проценту присутни код ВТЕ пацијенткиња, што је у складу са резултатима иранске студије Farajzadeh и сар. (405). У оквиру контролне групе сви генотипови за *PAII* су били равномерно заступљени код мушкараца и жена. Код припадница женског пола ВТЕ групе присутнији је и ризични генотип *FSAP 1601G>A*, а у литератури нема доступних података о учесталости овог полиморфизма у оквиру полова ВТЕ пацијената и опште популације. Варијанта *FII 19911 A>G* је равномерно заступљена у оквиру полова ВТЕ, а у оквиру контролних испитаника хетерозиготни генотип је заступљенији код мушкараца, док варијантни G/G генотип код жена. Нема расположивих података о учесталости овог полиморфизма у односу на пол ни у здравој популацији ни у оквиру ВТЕ пацијената. За *MTHFR 677C>T*, такође, није било статистички значајне разлике у дистрибуцији варијантних генотипова, али је генотип C/T заступљенији код мушкараца у оквиру обе испитиване групе, што је у складу са резултатима мета-анализе Simone и сарадника (253).

Осим истраживања поређења разлике учесталости протромботичких генских варијанти пацијената са историјом ВТЕ догађаја у односу на контроле, истраживачи су усмерили истраживања и према томе да ли генетички фактори ризика имају различите ефекте у оквиру различитих форми ВТЕ: ТДВ и ПЕ (224,242,354,365).

Запажање да носиоци *FV 1691G>A*, најзначајније генетичке варијанте за настанак ВТЕ, имају већи ризик за ТДВ у односу на тешку компликацију ПЕ, названа је „парадокс *FV* Лаиден“ (61). Једно од објашњења за ову појаву је у томе да *FV 1691G>A* појачаном активацијом тромбина индукује активност *FXIII*, чиме се ојачава структура угрушка и утиче на стабилност тромба, локализацију и број захваћених вена (61,407). Супротно овоме, у великој проспективној студији, спроведеној у Шведској, од стране Zöller и сар., за носиоце хомозиготне варијанте *FV 1691A>A* утврђен је повећан ризик од ПЕ, што сугерише да је „парадокс *FV* Лаиден“ повезан само са присуством хетерозигота *FV 1691G>A* (408). Студије углавном извештавају о већој учесталости *FV 1691G>A* у оквиру ТДВ и или ТДВ/ПЕ дијагнозе у односу на изоловану ПЕ (102,354,364). Насупрот овоме, у студији Bezgin и сар. је показано да су *FV 1691G>A* и *FII 20210 G>A* чешће били присутни код ПЕ пацијената у односу на остале форме ВТЕ (224). Студијом спроведеном од стране Serneга и сар., није показана статистички значајна разлика у дистрибуцији варијантних генотипова *FII 20210 G>A*, *FV 1691 G>A*, *MTHFR 677 C>T*, *PAII 4G/5G* и *FXIII- A102G>T* између пацијената са ТДВ и ПЕ (242,354). Осим тога, у наведеној студији, је утврђено да су мушкарци са варијантним хетерозиготом *FV 1691 G>A* имали скоро 6 пута већи ризик за ПЕ у односу на жене, што је у супротности са осталим наведеним студијама (242).

У нашем истраживању, у односу на форме ВТЕ болести, *FV 1691G>A* је био значајно чешће заступљен код пацијената са дијагнозом ТДВ, у односу на пацијенте са ТДВ/ПЕ и ПЕ, што је у складу са феноменом „парадокс *FV* Лаиден“ и резултатима претходно наведених студија (61,354,364). У доступној литератури се наводи да носиоци *FII 20210 G>A* варијанте, имају значајно већу стопу ПЕ у односу на носиоце варијанте *FV 1691G>A* (32% наспрам 19%) (198). Слични резултати су и у нашем истраживању, 25% пацијената са дијагнозом ДВТ/ПЕ и ПЕ имало је *FII 20210G>A*, а код 15,4% пацијената присутан је *FV 1691G>A*. За остале полиморфизме, осим за *PAII 4G/4G*, варијантни генотипови су заступљенији код пацијената који су имали ТДВ/ПЕ и ПЕ, али без статистички значајне разлике. Остали испитивани полиморфизми су прилично равномерно дистрибуирани у оквиру различитих форми ВТЕ. Иако, без утврђене статистичке значајности, *FV HR2 6775A>G* и *FSAP 1601G>A* су процентуално скоро двоструко више присутни код пацијената са дијагнозом ПЕ и ТДВ/ПЕ. Због уочене веће процентуалне заступљености *FV HR2 6775A>G* и *FSAP 1601G>A* код пацијената са ПЕ и ТДВ/ПЕ у односу на пацијенте са ТДВ, испитивање повезаности ових SNPs требало би спровести на већем узорку пацијената, истраживање усмерити одвојено на ПЕ и ТДВ, са циљем прецизнијег дефинисања улоге и повезаности испитиваних варијантних генотипова у односу на наведене дијагнозе.

Још увек је мало података о повезаности варијантних генотипова са локализацијом првог тромботичког напада и рецидивима, као и у односу на старост настанка тромбозе. Студија спроведена од стране Simone и сар. у којој је, између осталог, испитивана корелација *FV 1691G>A*, *FII 20210G>A* и *MTHFR 677 C>T* у односу на старост прве тромбозе и рецидиве, није утврдила статистички значајну повезаност *FII 20210G>A* и *MTHFR 677 C>T* ни са старошћу настанка прве тромбозе ни са рецидивима, док је за *FV 1691G>A* утврђена корелација и са старошћу и са рецидивима (253). Осим тога, у истој студији наведени полиморфизам је значајно повезан и са тромбозама насталим у церебралним венским синусима (253). О значају варијантног генотипа *FV 1691G>A* за настанак рецидива извештавале су и многе друге студије (102,224,365). У студији спроведеној од стране Kupeli

и сар. није утврђена разлика у дистрибуцији варијантних генотипова *FV 1691*, *PAII 4G/5G*, *FII 20210* и *MTHFR 677* у односу на дисталне и проксималне тромбозе, али је утврђена повезаност генотипа *MTHFR 677T>T* са билатералним тромбозама (354). Слични резултати за *MTHFR 677* добијени су у студији *Notoleanu* и сар., утврђена је повезаност *T/T* генотипа са повећаним ризиком од понављаних тромбоза, док *C/T* генотип није повећавао ризик за рекурентне тромбозе (158). У истој студији није утврђена разлика у дистрибуцији генотипова у односу на пол пацијената и контрола (158). У студији *Cernera* и сар., варијанте *FV 1691G>A* и *FII 20210G>A* су чешће заступљене код пацијената са тромбозом у порталној вени и церебралним венским синусима (242).

Резултати нашег истраживања нису показали значајну повезаност испитиваних SNPs у односу на животну доб настанка тромбозе, а у односу на рецидиве, само је за *FSAP 1601G>A* утврђена статистичка значајност. Наиме, наведени полиморфизам је био заступљен само код ВТЕ пацијената без тромботичког рецидива, што би могло указивати на заштитни ефекат овог полиморфизма од настанка рецидива. Ниједна студија није изнела овакав закључак, а с обзиром на то да су резултати студија о повезаности са ризиком од тромбозе још увек контрадикторни, значајно би било наставити истраживања на ову тему. Треба нагласити и то да је у укупној групи наших пацијената, део испитаника добио тромбозу непосредно пре укључивања у студију, а како се рецидиви могу јавити и много година касније, за потврђивање овог резултата требало би укључити пацијенте који су прву тромбозу добили знатно раније, или дизајнирати студију праћења ВТЕ пацијената са *FSAP 1601G>A* у односу на појаву рецидива. Резултати наше студије су у складу са резултатима студије *Норре* и сар. у којој није утврђена повезаност *FSAP 1601G>A* са рецидивима (399). Супротно овоме, у студији спроведеној од стране *Ahmad-Nejad* и сар., утврђена је повезаност овог полиморфизма са повећаним ризиком од поновњених тромбоза (274). Такође, у нашем истраживању, уочено је да су варијанте *FV 1691G>A* и *MTHFR 677 T>T* скоро двоструко више присутне код пацијената млађих од 50 година, што је у складу са резултатима студије *Simone* и сарадника (253). С обзиром на то да није утврђена статистичка значајност, било би значајно проширити истраживање на већој групи пацијената у циљу могућег доказивања уоченог запажања.

Поређењем учесталости варијантних генотипова у односу на локализацију тромбозе, утврђено је значајно чешће присуство *FSAP 1601G>A* код пацијената са ПЕ у односу на проксималне, дисталне и вене атипичне локализације, док је статистичка значајност *MTHFR 677* на граничној вредности. Варијантни хомозигот *MTHFR 677T>T* најчешће је присутан у проксималним и дисталним тромбозама, а *C/T* генотип код пацијената који су имали прву тромбозу у венама атипичне локализације. У студији *Notoleanu* и сар. није пронађена повезаност *C/T* и *T/T* генотипа са венама атипичне локализације (252). У студији спроведеној од стране *Arsov* и сар., утврђена је висока учесталост варијанте *FV 1691G>A* у проксималним венама, са повећаним ризиком за тромбозе већим од 10 пута, а резултатима студија спроведених од стране *Cernera* и сар. и *Simone* и сар., је утврђено да је овај полиморфизам значајно заступљен у порталној вени и церебралним венским синусима, односно венама атипичне локализације за настанак ВТЕ (242,253). Наши резултати нису показали значајну разлику у заступљености *FV 1691G>A* у оквиру локализације тромбозе. У литератури нисмо пронашли студије које су се бавиле испитивањем повезаности *FSAP 1601G>A* са локализацијом тромбозе, али у великој мета-анализи која је прва таква студија



са фокусом на повезаност *FSAP* 1601G>A и ВТЕ, потврђена је корелација у односу на ВТЕ (402). Чињеница да резултати наше студије указују на могућу позитивну корелацију полиморфима *FSAP* 1601G>A и *MTHFR* 677T>T са локализацијом прве тромбозе, као и уочена хетерогеност доступних података на ову тему, упућује да истраживање треба проширити на већи број пацијената како бисмо потврдили добијене резултате.

#### 4.6 Повезаност присуства већег броја полиморфизама са појавом ВТЕ, животном доби испољавања ВТЕ, локализацијом ВТЕ и појавом рецидива

Доступност велике количине података о SNPs утицала је на то да се у последње време осим испитивања повезаности појединачних SNPs све чешће истражује потенцијална клиничка корисност присуства већег броја варијантних генотипова са неком болешћу (409). Врло често се дешавало да када испитивање повезаности само једног SNP са тромбозом има мали статистички значај, или уопште нема значај, а након укључивања у анализу тог SNP са другим полиморфизмима, који су, такође, имали мали значај или су без значаја, добијана је значајна повезаност са повећаним ризиком од тромбозе. Истовремено присуство већег броја ризичних генотипова због генских интеракција остварује адитивни ефекат и као да утиче по принципу доза-одговор; што је већи број ризичних генотипова, већи је и ризик од ВТЕ (242). Овакав приступ утицао је на креирање генетичких модела предвиђања ризика (engl. genetic risk score-GRS) од настанка и/или понављања ВТЕ болести. Због чињенице да је ризик од рецидива повећан након престанка узимања антикоагулантне терапије, GRS модели су заузели посебно место у предвиђању ризика од понављања тромбозе, како би пацијенти са повећаним ризиком били на дуготрајној антикоагулантној терапији (94,96). Осим SNPs, за које се сматра да су одговорни за непровоциране тромбозе, на ризик од рецидива значајно утиче и старост (старији од 50 година) као и број и локализација тромбозираних вена: проксималне тромбозе у односу на дисталне, су одговорне за већи број рецидива (94,401,410). Осим тога, детектовање великог броја генских варијанти са slabим ефектом на коагулацију омугућава креирање прецизнијих GRS модела за израчунавање ризика за настанак болести, па самим тим и предузимање ефикаснијих мера у превенцији болести и њених компликација (101).

У студији која је базирана на предвиђању ризика од поновљених тромбоза, а праћено је 1.465 пацијената у периоду од 10 година након прве ВТЕ, од 22 SNPs укључених у истраживање, од којих су неки са прокоагулантним, неки са фибринолизним деловањем, за 12 SNPs је утврђена повезаност са понављаним тромбозама, и укључени су у израчунавање GRS (293). Од испитиваних SNPs у овој студији, за које је утврђена повезаност са ризиком од поновљених тромбоза, три SNPs су испитивана и у нашој студији, а то су: *FV* 1691 G/A, *FII* 20210 и *PAII* 4G/5G. Осим тога варијанте *FV* 1691 G>A и *FII* 20210 G>A су уврштене у многе GRS моделе предвиђања ризика како од прве ВТЕ, тако и од рецидива (300).

У нашој студији, испитивањем повезаности истовременог присуства већег броја варијантних генотипова, утврђено је да су ВТЕ пацијенти значајно чешће имали 4 или више

варијантна генотипа у односу на контроле, што је у складу са претпоставком да присуство већег броја SNPs својим малим појединачним деловањем остварује адитивни ефекат на болест.

Поредивши присуство укупног броја варијантних генотипова у односу на старост ВТЕ испитаника, није било значајне разлике. Међутим, у оквиру старосне доби испитаника млађих од 50 година, присуство већег броја SNPs код ВТЕ пацијената је скоро дупло чешће у односу на контроле. Ово је у складу са наводима да присуство варијантних генотипова често доприноси настанку непровоцираних тромбоза пре 50-те године старости (101,102). Насупрот овоме, упоредивши испитанике животне доби изнад 50 година, није утврђена значајна разлика у присуству броја варијантних генотипова између ВТЕ пацијената и контрола, што упућује да су на појаву тромбозе код пацијената изнад 50 година старости највероватније утицали неки други фактори ризика. Такође, иако смо у истраживању имали процентуално високу заступљеност рецидива, нисмо утврдили повезаност истовременог присуства већег броја варијантних генотипова (SNPs) са настанком рецидива, што одступа од резултата студија које су утврдиле повезаност истовременог присуства већег броја варијантних генотипова са понављаним тромбозама (102,293,300). Ово неслагање може бити последица броја испитаника студије, што претпоставља да би било значајно стратификовати пацијенете на оне са провоцираном и оне са непровоцираном тромбозом, затим према полу, проширити број пацијената и прилагодити студију праћења рецидива на дужи временски период.

## 4.7 Закључци

На основу резултата спроведене студије може се закључити следеће:

1. Носиоци бар једног варијантног *FII* 20210А алела су у вишеструко већем ризику од развоја ВТЕ.
2. Присуство бар једног варијантног *FV* 1691А алела повезано је са вишеструко већим ризиком од ВТЕ. У групи ВТЕ пацијената, генотип *FV* 1691G>А је чешће заступљен код оних са ТДВ у поређењу са пацијентима са ПЕ.
3. Присуство бар једног варијантног *FVHR2* 6775G алела, посматрано у склопу заједничког утицаја свих испитиваних SNPs, носи скоро троструко већи ризик од појаве ВТЕ. Међу здравим испитаницима, генотип *FV* HR2 6775А>G заступљенији је код мушкараца него код жена.
4. Међу полиморфизмима *FV* 1691G>А и *FVHR2* 6775А>G постоји умерен LD. Хаплотипови повезани са повећаним ризиком од тромбозе су А-А и А-G, а ризични диплотипови G-А/А-А и G-А/А-G. Хаплотип А-G и диплотип G-А/А-G присутни су само код ВТЕ пацијената.
5. Међу полиморфизмима *FII* 20210G>А и *FII* 19911А>G постоји комплетан LD. Хаплотип А-А и диплотипови G-А/А-А и G-G/А-А су значајно чешће заступљени код ВТЕ пацијената у односу на здраве испитанике. Диплотип G-А/G-G је чешће заступљен код здравих испитаника него код ВТЕ пацијената.
6. У удруженом дејству полиморфизама и осталих испитиваних фактора ризика, присуство бар једног варијантног *MTHFR* 677Т алела повезано је са скоро троструко већим ризиком од настанка ВТЕ.
7. Варијантни *FXIII*-А 102Т алел чешће је заступљен код здравих испитаника него код ВТЕ пацијената, што указује на његову протективну улогу. У оквиру укупног утицаја свих испитиваних SNPs, присуство бар једног варијантног *FXIII*-А 102Т алела удружено је са скоро два и по пута мањим ризиком од развоја ВТЕ.
8. У поређењу са ВТЕ пацијентима са тромбозом на другим локализацијама, они који су имали ПЕ значајно чешће су били носиоци варијантног *FSAP* 1601А алела. Ниједан пацијент са рецидивима није имао генотип *FSAP* 1601G/А.
9. Није утврђена разлика у заступљености полиморфизма *PAII* 4G/5G и *FII* 19911А>G између ВТЕ пацијената и здравих испитаника.

10. Варијантни хетерозиготи и/или хомозиготи на 4 и више гена чешће су заступљени код ВТЕ пацијената у односу на здраве испитанике, као и код пацијената млађих од 50 година у односу на здраве испитанике исте старосне доби.
11. Након ТДВ, ПЕ и рецидиви чешће су се јављали код пацијената са тромбозама у проксималним венама.
12. Занимања седентарног типа су повезана са тромбозама и појавом рецидива.
13. Дијагноза ВТЕ или неке кардиоваскуларне болести у породици, присуство коморбидитета (поготово ХТА, дијабетеса и траума и операција) и већи ВМІ повезани су са вишеструко већим ризиком од појаве ВТЕ.

## 5 ЛИТЕРАТУРА

1. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-336.
2. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic pathology.* 2011;39(1):273-280.
3. Sfredel MD, Burada E, Cătălin B, et al. Blood Coagulation Following an Acute Ischemic Stroke. *Curr Health Sci J.* 2018;44(2):118-121.
4. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep.* 2018;7(4):350-358.
5. Jain S, Harris J, Ware J. Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2362-2367.
6. Suzuki-Inoue K. Platelets and cancer-associated thrombosis: focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2019;2019(1):175-181.
7. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
8. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:130.
9. Budnik I, Brill A. Immune Factors in Deep Vein Thrombosis Initiation. *Trends Immunol.* 2018;39(8):610-623.
10. Sadhukhan R, Leung JWC, Garg S, et al. Fractionated radiation suppresses Kruppel-like factor 2 pathway to a greater extent than by single exposure to the same total dose. *Sci Rep.* 2020;10(1):7734.
11. Lee MD, Wilson C, Saunter CD, Kennedy C, Girkin JM, McCarron JG. Spatially structured cell populations process multiple sensory signals in parallel in intact vascular endothelium. *Sci Signal.* 2018;11(561): eaar4411
12. McCarron JG, Wilson C, Heathcote HR, Zhang X, Buckley C, Lee MD. Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium. *Curr Opin Pharmacol.* 2019;45:23–32.
13. Hamilos M, Petousis S, Parthenakis F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8(5):568-580.
14. Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):231-241.
15. van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):93-106.

16. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(12):H1585-H1597.
17. Heuberger, D.M., Schuepbach, R.A. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis J* 17, 4 (2019). <https://doi.org/10.1186/s1297-019-0194-8>
18. Montague SJ, Lim YJ, Lee WM, Gardiner EE. Imaging Platelet Processes and Function- Current and Emerging Approaches for Imaging in vitro and in vivo. *Front Immunol.*2020;11:78.
19. Palacios-Acedo AL, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front Immunol.*2019;10:1805.
20. Lhermusier T, Chap H, Payrastra B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost.* 2011;9(10):1883-1891
21. Gardiner EE. Proteolytic processing of platelet receptors. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(2):240-250.
22. Becker RC, Sexton T, Smyth SS. Translational Implications of Platelets as Vascular First Responders. *Circ Res.* 2018;122(3):506-522.
23. Huang J, Li X, Shi X, et al. Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):26.
24. Hosseini E, Mohtashami M, Ghasemzadeh M. Down-regulation of platelet adhesion receptors is a controlling mechanism of thrombosis, while also affecting post-transfusion efficacy of stored platelets. *Thromb J.* 2019;17:20.
25. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Forty Years Since the Structural Elucidation of Platelet-Activating Factor (PAF): Historical, Current, and Future Research Perspectives. *Molecules.* 2019;24(23):4414.
26. Amelirad A, Shamsasenjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D. Signaling Pathways of Receptors Involved in Platelet Activation and Shedding of These Receptors in Stored Platelets. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(1):38–47.
27. Phillippe HM. Overview of venous thromboembolism. *Am J Manag Care.* 2017;23(20 Suppl):S376-S382.
28. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515–523.
29. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015;29(1):17-24.
30. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia.* 2014;20 Suppl 4:15–22.

31. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(8):516-521.
32. O'Donnell JS, O'Sullivan JM, Preston RJS. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. *Br J Haematol*. 2019;186(1):24-36.
33. Boulton F. A hundred years of cascading - started by Paul Morawitz (1879-1936), a pioneer of haemostasis and of transfusion. *Transfus Med*. 2006;16(1):1-10.
34. Key NS, Geng JG, Bach RR. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2007;118:165-173.
35. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(1):3-10.
36. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):41-48.
37. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1687-1693.
38. Lechtenberg BC, Murray-Rust TA, Johnson DJ, et al. Crystal structure of the prothrombinase complex from the venom of *Pseudonaja textilis*. *Blood*. 2013;122(16):2777-2783.
39. Kattula S, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(3):e13-e21.
40. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem*. 2017;82:405-456.
41. Ho KM, Pavey W. Applying the cell-based coagulation model in the management of critical bleeding. *Anaesth Intensive Care*. 2017;45(2):166-176.
42. Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:515-525.
43. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B. The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(2):94-109.
44. Chan KYT, Yong ASM, Wang X, et al. The adhesion of clots in wounds contributes to hemostasis and can be enhanced by coagulation factor XIII. *Sci Rep*. 2020;10(1):20116.
45. Ikezoe T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care*. 2015 Jan 7;3(1):1.
46. Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):441-447.
47. Franchini M, Zaffanello M, Mannucci PM. Bleeding Disorders in Primary Fibrinolysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7027.
48. Abdul S, Leebeek FW, Rijken DC, Uitte de Willige S. Natural heterogeneity of  $\alpha 2$ -antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood*. 2016;127(5):538-545

49. Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(5):785-801.
50. Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de Laat B. Assessing Plasmin Generation in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2758.
51. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol.* 2018;8:24
52. Vousden KA, Lundqvist T, Popovic B, et al. Discovery and characterisation of an antibody that selectively modulates the inhibitory activity of plasminogen activator inhibitor-1. *Sci Rep.* 2019;9(1):1605.
53. Schofield Z, Baksamawi HA, Campos J, Alexiadis A, Nash GB, Brill A, Vigolo D. The role of valve stiffness in the insurgence of deep vein thrombosis. *Commun Mater.* 2020;1(1):65.
54. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 2011;9(2):120-138.
55. Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.* 2009;23(5):225–229.
56. Lippi G, Favaloro EJ. Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the SameCoin?. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(3):239-248.
57. Lichota A, Szewczyk EM, Gwozdziński K. Factors Affecting the Formation and Treatment of Thrombosis by Natural and Synthetic Compounds. *Int J Mol Sci.* 2020.27;21(21):7975.
58. Czysz A, Higbee SL. Superficial Thrombophlebitis. [Updated 2021 Jan 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556017/>
59. Atanasijević I, i sar. Venska oboljenja. *NČ UM Halo* 194. 2019; 25(1): 61-77
60. Turetz M, Sideris AT, Friedman OA, Tripathi N, Horowitz JM. Epidemiology, Pathophysiology, and Natural History of Pulmonary Embolism. *Semin Intervent Radiol.* 2018;35(2):92-98.
61. Crous-Bou M, Harrington LB, Kabrhel C. Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *SeminThrombHemost.* 2016; 42(8):808-820.
62. Colucci G, Tsakiris DA. Thrombophilia screening revisited: an issue of personalized medicine. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;49(4):618-629.
63. Stone J, Hangge P, Albadawi H, et al. Deep vein thrombosis: pathogenesis, diagnosis, and medical management. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7(Suppl 3):S276-S284.
64. Chanchal S, Mishra A, Singh MK, Ashraf MZ. Understanding Inflammatory Responses in the Manifestation of Prothrombotic Phenotypes. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:73.
65. ISTH (<https://www.isth.org/>)



66. Perrier A. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a single disease entity with different risk factors? *Chest*. 2000;118(5):1234-6.
67. Yamaki T, Nozaki M, Sakurai H, Takeuchi M, Soejima K, Kono T. Presence of lower limb deep vein thrombosis and prognosis in patients with symptomatic pulmonary embolism: preliminary report. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;37(2):225-31.
68. Vyas V, Goyal A. Acute Pulmonary Embolism. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021- Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560551/>
69. Marongiu F, Mameli A, Grandone E, Barcellona D. Pulmonary Thrombosis: A Clinical Pathological Entity Distinct from Pulmonary Embolism? *Semin Thromb Hemost*. 2019 ;45(8):778-783.
70. Castellana G, Intiglietta P, Dragonieri S, et al. Incidence of deep venous thrombosis in patients with both Pulmonary Embolism and COPD. *Acta Biomed*. 2021;92(3):e2021210.
71. Nicholson M, Chan N, Bhagirath V, Ginsberg J. Prevention of Venous Thromboembolism in 2020 and Beyond. *J Clin Med*. 2020;9(8):2467.
72. Nicklas JM, Gordon AE, Henke PK. Resolution of Deep Venous Thrombosis: Proposed Immune Paradigms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2080.
73. Kahn SR. The post-thrombotic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):413-418.
74. Abdol Razak NB, Jones G, Bhandari M, Berndt MC, Metharom P. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview of Mechanisms, Risk Factors, and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2018;10(10):380.
75. Tak T, Karturi S, Sharma U, Eckstein L, Poterucha JT, Sandoval Y. Acute Pulmonary Embolism: Contemporary Approach to Diagnosis, Risk-Stratification, and Management. *Int J Angiol*. 2019;28(2):100-111.
76. Wattanakit K, Lutsey PL, Bell EJ, et al. Association between cardiovascular disease risk factors and occurrence of venous thromboembolism. A time-dependent analysis. *Thromb Haemost*. 2012;108(3):508-515.
77. Fernandes CJ, Morinaga LTK, Alves JL Jr, Castro MA, Calderaro D, Jardim CVP, Souza R. Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. *Eur Respir Rev*. 2019;28(151):180119.
78. Brooks EG, Trotman W, Wadsworth MP, et al. Valves of the deep venous system: an overlooked risk factor. *Blood*. 2009;114(6):1276-1279.
79. Bikdeli B, Sharif-Kashani B, Bikdeli B, et al. Impact of Thrombus Sidedness on Presentation and Outcomes of Patients with Proximal Lower Extremity Deep Vein Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(4):341-347.
80. Kesieme E, Kesieme C, Jebbin N, Irekpita E, Dongo A. Deep vein thrombosis: a clinical review. *J Blood Med*. 2011;2:59-69.

81. Sadeghi R, Safi M. Systemic thrombolysis in the upper extremity deep vein thrombosis. *ARYA Atheroscler*. 2011;7(1):40-46.
82. Jamieson S, Pretorius GV. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Semin Intervent Radiol*. 2018;35(2):136-142.
83. Ploton G, Pistorius MA, Raimbeau A, et al. A STROBE cohort study of 755 deep and superficial upper-extremity vein thrombosis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(6):e18996.
84. Feinberg J, Nielsen EE, Jakobsen JC. Thrombolysis for acute upper extremity deep vein thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;12(12):CD012175.
85. Akhondi H, Ganjali S, Nagalli S. Splanchnic Venous Thrombosis. [Updated 2020 Jul 6]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553170/>
86. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol*. 2007;44(2):62-69.
87. Benincasa G, Costa D, Infante T, Lucchese R, Donatelli F, Napoli C. Interplay between genetics and epigenetics in modulating the risk of venous thromboembolism: A new challenge for personalized therapy. *Thromb Res*. 2019;177:145-153.
88. Heit JA, Spencer FA, White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41(1):3-14.
89. Deitelzweig SB, Johnson BH, Lin J, Schulman KL. Prevalence of clinical venous thromboembolism in the USA: current trends and future projections. *Am J Hematol*. 2011;86(2):217-220.
90. Pulanić D, Gverić-Krečak V, Nemet-Lojan Z, et al. Venous thromboembolism in Croatia - Croatian Cooperative Group for Hematologic Diseases (CROHEM) study. *Croat Med J*. 2015;56(6):550-7.
91. Hernandez W, Gamazon ER, Smithberger E, et al. Novel genetic predictors of venous thromboembolism risk in African Americans. *Blood*. 2016;127(15):1923-1929.
92. Setacci C, Benevento D, de Donato G, et al. Acute Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: is the Thromboaspiration Device an Appropriate Choice?. *Transl Med UniSa*. 2020;21:38-46.
93. Søgaard KK, Schmidt M, Pedersen L, Horváth-Puhó E, Sørensen HT. 30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Circulation*. 2014;130(10):829-836.
94. Fahrni J, Husmann M, Gretener SB, Keo HH. Assessing the risk of recurrent venous thromboembolism-a practical approach. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:451-459.
95. Siragusa S, Malato A, Anastasio R, et al. Residual vein thrombosis to establish duration of anticoagulation after a first episode of deep vein thrombosis: the Duration of Anticoagulation based on Compression UltraSonography (DACUS) study. *Blood*. 2008;112(3):511-515.

96. Li D, Liu Y, Song Y, Wen A. Antithrombotic therapy for secondary prevention of unprovoked venous thromboembolism: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Med.* 2022;54(1):253-261.
97. Bělohávek J, Dytrych V, Linhart A. Pulmonary embolism, part I: Epidemiology, risk factors and risk stratification, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and nonthrombotic pulmonary embolism. *Exp Clin Cardiol.* 2013;18(2):129-138.
98. Evensen LH, Isaksen T, Braekkan SK, Hansen JB. Physical activity and risk of recurrence and mortality after incident venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2019;17(6):901-911.
99. Salvagno GL, Pavan C, Lippi G. Rare thrombophilic conditions. *Ann Transl Med.* 2018;6(17):342.
100. Anderson FA Jr, Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation.* 2003;107(23 Suppl 1):I9-16.
101. Zöllner B, Svensson PJ, Dahlbäck B, Lind-Hallden C, Hallden C, Elf J. Genetic risk factors for venous thromboembolism. *Expert Rev Hematol.* 2020;13(9):971-981.
102. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011;13(1):1-16.
103. Ashraf N, Visweshwar N, Jaglal M, Sokol L, Laber D. Evolving paradigm in thrombophilia screening. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2019;30(5):249-252.
104. Reitsma PH, Rosendaal FR. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul;5 Suppl 1:264-9.
105. Rosendaal FR. Causes of venous thrombosis. *Thromb J.* 2016; 14(Suppl 1):24.
106. Lim W. Prevention of thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):707-713.
107. O'Donnell M, Weitz JI. Thromboprophylaxis in surgical patients. *Can J Surg.* 2003;46(2):129-135.
108. Toker S, Hak DJ, Morgan SJ. Deep vein thrombosis prophylaxis in trauma patients. *Thrombosis.* 2011;2011:505373.
109. Edeer AD, Comez S, Damar HT, Savci A. Prevalence and risk factors of venous thromboembolism in postoperative patients: A retrospective study. *Pak J Med Sci.* 2018;34(6):1539-1544.
110. Kahn SR, Shivakumar S. What's new in VTE risk and prevention in orthopedic surgery. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(3):366-376.
111. Miri M, Goharani R, Sistanizad M. Deep Vein Thrombosis among Intensive Care Unit Patients; an Epidemiologic Study. *Emerg (Tehran).* 2017;5(1):e13.
112. Ünlü B, Versteeg HH. Cancer-associated thrombosis: The search for the holy grail continues. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(4):622-629.
113. Riondino S, Ferroni P, Zanzotto FM, Roselli M, Guadagni F. Predicting VTE in Cancer Patients: Candidate Biomarkers and Risk Assessment Models. *Cancers (Basel).* 2019;11(1):95.

114. Devis P, Knuttinen MG. Deep venous thrombosis in pregnancy: incidence, pathogenesis and endovascular management. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2017;7(Suppl 3):S309-S319.
115. Dado CD, Levinson AT, Bourjeily G. Pregnancy and Pulmonary Embolism. *Clin Chest Med.* 2018;39(3):525-537.
116. Alsheef MA, Alabbad AM, Albassam RA, et al. Pregnancy and Venous Thromboembolism: Risk Factors, Trends, Management, and Mortality. *Biomed Res Int.* 2020;2020:4071892.
117. Croles FN, Nasserinejad K, Duvekot JJ, Kruip MJ, Meijer K, Leebeek FW. Pregnancy, thrombophilia, and the risk of a first venous thrombosis: systematic review and bayesian meta-analysis. *BMJ.* 2017;359:j4452.
118. McLean K, Cushman M. Venous thromboembolism and stroke in pregnancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):243-250.
119. Dulicek P, Ivanova E, Kostal M, Sadilek P, Beranek M, Zak P, Hirmerova J. Analysis of Risk Factors of Stroke and Venous Thromboembolism in Females With Oral Contraceptives Use. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(5):797-802.
120. van Hylckama Vlieg A, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP, Doggen CJ, Rosendaal FR. The venous thrombotic risk of oral contraceptives, effects of oestrogen dose and progestogen type: results of the MEGA case-control study. *BMJ.* 2009;339:b2921.
121. Stegeman BH, de Bastos M, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Helmerhorst FM, Stijnen T, Dekkers OM. Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis. *BMJ.* 2013;347:f5298.
122. Kuipers S, Cannegieter SC, Middeldorp S, Robyn L, Büller HR, Rosendaal FR. The absolute risk of venous thrombosis after air travel: a cohort study of 8,755 employees of international organisations. *PLoS Med.* 2007;4(9):e290.
123. Izadi M, Alemzadeh-Ansari MJ, Kazemisaleh D, Moshkani-Farahani M, Shafiee A. Do pregnant women have a higher risk for venous thromboembolism following air travel?. *Adv Biomed Res.* 2015;4:60.
124. Lippi G, Favaloro EJ. Car Travel-Related Thrombosis: Fact or Fiction?. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(4):327-333.
125. Bartholomew JR, Evans NS. Travel-related venous thromboembolism. *Vasc Med.* 2019;24(1):93-95.
126. Xu X, Wang B, Ren C, et al. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. *Aging Dis.* 2017;8(5):590-610.
127. Mari D, Ogliairi G, Castaldi D, Vitale G, Bollini EM, Lio D. Hemostasis and ageing. *Immun Ageing.* 2008;5:12.
128. Brenner B, Arya R, Beyer-Westendorf J, et al. Evaluation of unmet clinical needs in prophylaxis and treatment of venous thromboembolism in at-risk patient groups: pregnancy, elderly and obese patients. *Thromb J.* 2019;17:24.

129. Mahajerin A, Croteau SE. Epidemiology and Risk Assessment of Pediatric Venous Thromboembolism. *Front Pediatr.* 2017;5:68.
130. Park ES, Choi HS, Lee KS, Kim SW, Lee JM. Venous Thromboembolism in Children and Young Adults in Korea: Analysis of the Korean Health Insurance Review and Assessment Service Database. *J Korean Med Sci.* 2019;34(49):e316.
131. Mello TT, Carneiro JDA, Mello GA, Bizzacchi JMA. Venous thromboembolism in childhood: where is Brazil after 20 years?. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2020;42(1):62-69.
132. Sex difference in risk of second but not of first venous thrombosis: paradox explained. Roach RE, Lijfering WM, Rosendaal FR, Cannegieter SC, le Cessie S *Circulation.* 2014; 129(1):51-6.
133. Barco S, Klok FA, Mahé I, et al. Impact of sex, age, and risk factors for venous thromboembolism on the initial presentation of first isolated symptomatic acute deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 2019;173:166-171.
134. Severinsen MT, Johnsen SP, Tjønneland A, Overvad K, Dethlefsen C, Kristensen SR. Body height and sex-related differences in incidence of venous thromboembolism: a Danish follow-up study. *Eur J Intern Med.* 2010 ;21(4):268-72.
135. Glise Sandblad K, Jern S, Åberg M, Robertson J, Torén K, Lindgren M, Adiels M, Hansson PO, Rosengren A. Obesity in adolescent men increases the risk of venous thromboembolism in adult life. *J Intern Med.* 2020;287(6):734-745.
136. White RH, Keenan CR. Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2009;123 Suppl 4:S11-7.
137. Venous thrombosis in blacks. Buckner TW, Key NS *Circulation.* 2012 Feb 14; 125(6):837-9.
138. Tang Y, Sampson B, Pack S, Shah K, Yon Um S, Wang D, Wang T, Prinz M. Ethnic differences in out-of-hospital fatal pulmonary embolism. *Circulation.* 2011;123(20):2219-25.
139. Zakai N, Lutsey P, Folsom A, Cushman M. Black-white differences in venous thrombosis risk: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Blood ASH Annual Meeting Abstracts.* 2010; 116:478.
140. Zakai NA, McClure LA, Judd SE, et al. Racial and regional differences in venous thromboembolism in the United States in 3 cohorts. *Circulation.* 2014;129(14):1502-1509.
141. Roach RE, Siegerink B, le Cessie S, Rosendaal FR, Cannegieter SC, Lijfering WM. Coffee consumption is associated with a reduced risk of venous thrombosis that is mediated through hemostatic factor levels. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2519-25.
142. Kunutsor SK, Mäkikallio TH, Seidu S, et al. Physical activity and risk of venous thromboembolism: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol.* 2020;35(5):431-442.
143. Johansson M, Johansson L, Wennberg P, Lind M. Physical activity and risk of first-time venous thromboembolism. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(11):1181-1187.
144. Kean J, Pearton A, Fell JW, et al. Deep vein thrombosis in a well-trained masters cyclist, is popliteal vein entrapment syndrome to blame?. *J Thromb Thrombolysis.* 2019;47(2):301-304.

145. Harrington LB, Hagan KA, Mukamal KJ, et al. Alcohol consumption and the risk of incident pulmonary embolism in US women and men. *J Thromb Haemost.* 2018;16(9):1753-1762.
146. Hotoleanu C. Association between obesity and venous thromboembolism. *Med Pharm Rep.* 2020;93(2):162-168.
147. Enga KF, Braekkan SK, Hansen-Krone IJ, Wilsgaard T, Hansen JB. Coffee consumption and the risk of venous thromboembolism: the Tromsø study. *J Thromb Haemost.* 2011;9(7):1334-9.
148. Chen M, Ji M, Chen T, Hong X, Jia Y. Alcohol Consumption and Risk for Venous Thromboembolism: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Front Nutr.* 2020; 2;7:32.
149. Hansen-Krone IJ, Brækkan SK, Enga KF, Wilsgaard T, Hansen JB. Alcohol consumption, types of alcoholic beverages and risk of venous thromboembolism - the Tromsø Study. *Thromb Haemost.* 2011;106(2):272-278.
150. Al-Nasser B. Influence of Tobacco Smoking on Perioperative Risk of Venous Thromboembolism. *Turk J Anaesthesiol Reanim.* 2020;48(1):11-16.
151. Rostron BL, Chang CM, Pechacek TF. Estimation of cigarette smoking-attributable morbidity in the United States. *JAMA Intern Med.* 2014;174(12):1922-8.
152. Gallucci G, Tartarone A, Lerose R, Lalinga AV, Capobianco AM. Cardiovascular risk of smoking and benefits of smoking cessation. *J Thorac Dis.* 2020;12(7):3866-3876.
153. Paulsen B, Gran OV, Severinsen MT, et al. Association of smoking and cancer with the risk of venous thromboembolism: the Scandinavian Thrombosis and Cancer cohort. *Sci Rep.* 2021;11(1):18752.
154. Jacob L, Freyn M, Kalder M, Dinas K, Kostev K. Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK: a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget.* 2018;9(25):17420-17429.
155. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol.* 2008;83(2):97-102.
156. Kim H, Wang X, Jin P. Developing DNA methylation-based diagnostic biomarkers. *J Genet Genomics.* 2018;45(2):87-97.
157. Trerotola M, Relli V, Simeone P, Alberti S. Epigenetic inheritance and the missing heritability. *Hum Genomics.* 2015;28;9(1):17
158. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1):242.
159. Wang Z, Dou M, Du X, et al. Influences of ABO blood group, age and gender on plasma coagulation factor VIII, fibrinogen, von Willebrand factor and ADAMTS13 levels in a Chinese population. *PeerJ.* 2017;5:e3156.
160. Zhou S, Welsby I. Is ABO blood group truly a risk factor for thrombosis and adverse outcomes?. *World J Cardiol.* 2014;6(9):985-992.

161. Sun X, Feng J, Wu W, Peng M, Shi J. ABO blood types associated with the risk of venous thromboembolism in Han Chinese people: A hospital-based study of 200,000 patients. *Sci Rep*. 2017 6;7:42925.
162. Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med*. 2013;5(9):79.
163. Moraes F, Góes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ*. 2016;44(3):215-223.
164. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015;8:37.
165. Rajagopalan RM, Fujimura JH. Variations on a Chip: Technologies of Difference in Human Genetics Research. *J Hist Biol*. 2018;51(4):841-873.
166. Neininger K, Marschall T, Helms V. SNP and indel frequencies at transcription start sites and at canonical and alternative translation initiation sites in the human genome. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214816.
167. Robert F, Pelletier J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Front Genet*. 2018;9:507.
168. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
169. Teama, S. (2018). DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In (Ed.), *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>
170. van Arensbergen J, Pagie L, FitzPatrick VD, et al. High-throughput identification of human SNPs affecting regulatory element activity. *Nat Genet*. 2019;51(7):1160-1169.
171. Rigau M, Juan D, Valencia A, Rico D. Intronic CNVs and gene expression variation in human populations. *PLoS Genet*. 2019;15(1):e1007902.
172. Wu J, Tang B, Tang Y. Allele-specific genome targeting in the development of precision medicine. *Theranostics*. 2020;10(7):3118-3137.
173. Marques H, Freitas J, Medeiros R, Longatto-Filho A. Methodology for single nucleotide polymorphism selection in promoter regions for clinical use. An example of its applicability. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2016;7(3):126-136.
174. Matić, Gordana: *Osnovi molekularne biologije*, Zavet, Beograd, 1997.
175. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/RefSNP\\_about/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/RefSNP_about/)
176. Lindström S, Wang L, Smith EN, et al. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism. *Blood*. 2019;134(19):1645-1657

177. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*. 2019;16(1):4-10.
178. Alekseyev YO, Fazeli R, Yang S, et al. A Next-Generation Sequencing Primer-How Does It Work and What Can It Do?. *Acad Pathol*. 2018;5:2374289518766521
179. Vestergaard LK, Oliveira DNP, Høgdall CK, Høgdall EV. Next Generation Sequencing Technology in the Clinic and Its Challenges. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1751.
180. Hinds DA, Buil A, Ziemek D, et al. Genome-wide association analysis of self-reported events in 6135 individuals and 252 827 controls identifies 8 loci associated with thrombosis. *Hum Mol Genet*. 2016;25(9):1867-1874.
181. Klarin D, Busenkell E, Judy R, et al. Genome-wide association analysis of venous thromboembolism identifies new risk loci and genetic overlap with arterial vascular disease. *Nat Genet*. 2019;51(11):1574-1579.
182. Germain M, Chasman DI, de Haan H, et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet*. 2015;96(4):532–542.
183. Curk T, Rot G, Zupan B. SNPsyn: detection and exploration of SNP-SNP interactions. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Web Server issue):W444-W449.
184. Dato S, Soerensen M, De Rango F, et al. The genetic component of human longevity: New insights from the analysis of pathway-based SNP-SNP interactions. *Aging Cell*. 2018;17(3):e12755.
185. Pozzi N, Di Cera E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):653-655.
186. Chinnaraj M, Chen Z, Pelc LA, et al. Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation. *Sci Rep*. 2018;8(1):2945.
187. Carter IS, Vanden Hoek AL, Pryzdial EL, Macgillivray RT. Thrombin a-chain: activation remnant or allosteric effector?. *Thrombosis*. 2010;2010:416167.
188. Acquasaliente L, Pelc LA, Di Cera E. Probing prothrombin structure by limited proteolysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):6125.
189. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(11):1257-1271.
190. Sun WY, Degen SJ. Gene targeting in hemostasis. Prothrombin. *Front Biosci*. 2001;6:D222-D238.
191. Reddel CJ, Tan CW, Chen VM. Thrombin Generation and Cancer: Contributors and Consequences. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):100
192. Chinnaraj M, Planer W, Pozzi N. Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:281.



193. Pourgholi L, Goodarzynejad H, Ziaee S, Zare E, Jalali A, Boroumand M. Prothrombin Gene G20210A Variant in Angiographically Documented Patients with Coronary Artery Stenosis. *J Tehran Heart Cent.* 2019;14(4):150-155.
194. Jadaon MM. Epidemiology of prothrombin G20210A mutation in the Mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011; 3(1): e2011054.
195. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2582-6.
196. Djordjevic V, Pruner I, Tomic B, Nestorovic A, Gvozdenov M, Kovac M, Radojkovic D. The 3'end prothrombin gene variants in patients with different thrombotic events. *Lab Med.* 2014 Fall;45(4):309-14.
197. Aradjanski M, Djordjevic V, Pruner I, et al. The 3' end prothrombin gene variants in serbian patients with idiopathic thrombophilia. *Balkan J Med Genet.* 2015;17(2):43-48.
198. Kujovich JL. Prothrombin Thrombophilia. 2006 [Updated 2021]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1148/>
199. Bosler D, Mattson J, Crisan D. Phenotypic Heterogeneity in Patients with Homozygous Prothrombin 20210AA Genotype : A Paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2006;8(4):420-5.
200. von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood.* 2004;103(2):586-93.
201. Morange PE, Trégouët DA. Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11 Suppl 1:111-21.
202. Limperger V, Kenet G, Kiesau B, et al. Role of prothrombin 19911 A>G polymorphism, blood group and male gender in patients with venous thromboembolism: Results of a German cohort study. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;51(2):494-501.
203. Martinelli I, Bucciarelli P, De Stefano V, Passamonti SM, Menegatti M, Tormene D, Tosetto A, Mannucci PM. Effect of prothrombin 19911 A>G polymorphism on the risk of cerebral sinus-venous thrombosis. *Eur J Neurol.* 2010;17(12):1482-5.
204. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2582-6.
205. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, González-Conejero R, Vicente V. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol.* 2002;118(2):610-4.
206. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost.* 2006 ;4(12):2587-92.

207. Asselta R, Tenchini ML, Duga S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost.* 2006;4(1):26-34.
208. Camire RM, Bos MH. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. *J Thromb Haemost.* 2009;7(12):1951-1961.
209. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor $\alpha$ , and protein S. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1241-1250.
210. Schreuder M, Reitsma PH, Bos MHA. Blood coagulation factor Va's key interactive residues and regions for prothrombinase assembly and prothrombin binding. *J Thromb Haemost.* 2019;17(8):1229-1239.
211. Dahlbäck B, Guo LJ, Livaja-Koshiar R, Tran S. Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPI $\alpha$ ) cofactors. *Res Pract Thromb Haemost.* 2017;2(1):114-124.
212. Bos MH, Camire RM. A bipartite autoinhibitory region within the B-domain suppresses function in factor V. *J Biol Chem.* 2012;287(31):26342-51.
213. Bernal S, Pelaez I, Alias L, et al. High Mutational Heterogeneity, and New Mutations in the Human Coagulation Factor V Gene. Future Perspectives for Factor V Deficiency Using Recombinant and Advanced Therapies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9705.
214. Hoekema L, Castoldi E, Tans G, Girelli D, Gemmati D, Bernardi F, Rosing J. Functional properties of factor V and factor Va encoded by the R2-gene. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):75-81.
215. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003 1;101(1):20-30.
216. Paraboschi EM, Menegatti M, Rimoldi V, et al. Profiling the mutational landscape of coagulation factor V deficiency. *Haematologica.* 2020;105(4):e180-e185.
217. Vos HL. Inherited defects of coagulation Factor V: the thrombotic side. *J Thromb Haemost.* 2006;4(1):35-40.
218. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-7.
219. Gemmati D, Longo G, Franchini E, Araujo Silva J, Gallo I, Lunghi B, Moratelli S, Maestri I, Serino ML, Tisato V. Cis-Segregation of c.1171C>T Stop Codon (p.R391\*) in SERPINC1 Gene and c.1691G>A Transition (p.R506Q) in F5 Gene and Selected GWAS Multilocus Approach in Inherited Thrombophilia. *Genes (Basel).* 2021;12(6):934.
220. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden and hemophilia. *Thromb Res.* 2010;125(2):119-23.
221. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;15;85(6):1504-8
222. Oztürk A, Balli S, Akar N. Determination of factor V Leiden mutation and R2 polymorphism in cis position. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;19(6):685-688.

223. Pecheniuk NM, Morris CP, Walsh TP, Marsh NA. The factor V HR2 haplotype: prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphisms. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12(3):201-6.
224. Bezgin T, Kaymaz C, Akbal Ö, Yılmaz F, Tokgöz HC, Özdemir N. Thrombophilic Gene Mutations in Relation to Different Manifestations of Venous Thromboembolism: A Single Tertiary Center Study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(1):100-106.
225. Ašić A, Salazar R, Storm N, Doğan S, Höppner W, Marjanović D, Primorac D. Prevalence of rare F5 variants in general population from Bosnia and Herzegovina. *Mol Biol Rep*. 2021;48(6):5181-5186.
226. Otrrock ZK, Taher AT, Shamseddeen WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. *Ann Hematol*. 2008;87(12):1013-6.
227. Shi DY, Wang SJ. Advances of Coagulation Factor XIII. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(2):219-223.
228. Muszbek L, Berezky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*. 2011; 91(3):931–972.
229. Protopopova AD, Ramirez A, Klinov DV, Litvinov RI, Weisel JW. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy. *J Thromb Haemost*. 2019;17(5):737-748
230. Byrnes JR, Wolberg AS. Newly-Recognized Roles of Factor XIII in Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(4):445-454.
231. Vasilyeva A, Yurina L, Shchegolikhin A, Indeykina M, Bugrova A, Kononikhin A, Nikolaev E, Rosenfeld M. The Structure of Blood Coagulation Factor XIII Is Adapted to Oxidation. *Biomolecules*. 2020;10(6):914.
232. Dodt J, Pasternack R, Seitz R, Volkens P. Free factor XIII activation peptide (fAP-FXIII) is a regulator of factor XIII activity via factor XIII-B. *Br J Haematol*. 2016;172(3):452-60.
233. Korte W. Catridecacog: a breakthrough in the treatment of congenital factor XIII A-subunit deficiency?. *J Blood Med*. 2014;5:107-113.
234. Kreutz RP, Bitar A, Owens J, et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism and recurrent myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;38(3):380-387.
235. Ansani L, Marchesini J, Pestelli G, et al. F13A1 Gene Variant (V34L) and Residual Circulating FXIIIA Levels Predict Short- and Long-Term Mortality in Acute Myocardial Infarction after Coronary Angioplasty. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2766.
236. Kattula S, Byrnes JR, Martin SM, et al. Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice. *Blood Adv*. 2018;2(1):25-35.

237. Fadoo Z, Merchant Q, Rehman KA. New developments in the management of congenital Factor XIII deficiency [published correction appears in *J Blood Med.* 2013;4:87]. *J Blood Med.* 2013;4:65-73.
238. Li B, Billur R, Maurer MC, et al. Proline 36 of the Factor XIII Activation Peptide Plays a Crucial Role in Substrate Recognition and Zymogen Activation. *Thromb Haemost.* 2018;118(12):2037-2045
239. Székely EG, Czuriga-Kovács KR, Bereczky Z, Katona É, Mezei ZA, Nagy A, Tóth NK, Berényi E, Muszbek L, Csiba L, Bagoly Z. Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):7662.
240. Cushman M, Cornell A, Folsom AR, et al. Associations of the beta-fibrinogen Hae III and factor XIII Val34Leu gene variants with venous thrombosis. *Thromb Res.* 2007;121(3):339-345.
241. Ząbczyk M, Natowska J, Undas A. Factor XIII and Fibrin Clot Properties in Acute Venous Thromboembolism. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1607.
242. Cernera G, Di Minno A, Amato F, Elce A, Liguori R, Bruzzese D, Di Lullo AM, Castaldo G, Zarrilli F, Comegna M. Molecular Analysis of Prothrombotic Gene Variants in Venous Thrombosis: A Potential Role for Sex and Thrombotic Localization. *J Clin Med.* 2020;9(4):1008.
243. Attié-Castro FA, Zago MA, Lavinha J, Elion J, Rodriguez-Delfin L, Guerreiro JF, Franco RF. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost.* 2000;84(4):601-3.
244. Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular Biology of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/>
245. Zeng J, Zeng Q. Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2):120-134.
246. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017;57(5):142-149.
247. Shahzad K, Hai A, Ahmed A, Kizilbash N, Alruwaili J. A Structured-based Model for the Decreased Activity of Ala222Val and Glu429Ala Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutants. *Bioinformatics.* 2013;9(18):929-936.
248. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, et al. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):1733.
249. Yadav U, Kumar P, Gupta S, Rai V. Distribution of MTHFR C677T Gene Polymorphism in Healthy North Indian Population and an Updated Meta-analysis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB.* 2017;32(4):399-410.
250. Gao M, Feng N, Zhang M, Ti X, Zuo X. Meta-analysis of the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and venous thromboembolism in the Caucasian and Asian. *Biosci Rep.* 2020;40(7):BSR20200860.

251. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 2015;14:6.
252. Hotoleanu C, Trifa A, Popp R, Fodor D. The importance of homozygous polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in romanian patients with idiopathic venous thromboembolism. *Balkan Med J.* 2013;30(2):197-203.
253. Simone B et al. "Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls." *European journal of epidemiology* 2013; 28(9): 621-47.
254. Lupi-Herrera E, Soto-López ME, Lugo-Dimas AJ, et al. Polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR Gene: Homocysteine Levels and Prothrombotic Biomarkers in Coronary and Pulmonary Thromboembolic Disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019;25:1076029618780344.
255. Ghosh AK, Murphy SB, Kishore R, Vaughan DE. Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(5):e63825.
256. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(5):e72-91.
257. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:858293
258. Zhang Q, Jin Y, Li X, Peng X, Peng N, Song J, Xu M. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism - a meta-analysis and systematic review. *Vasa.* 2020;49(2):141-146.
259. Kubala MH, DeClerck YA. The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38(3):483-492.
260. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost.* 2008;100(6):1029-36.
261. Parpugga TK, Tatarunas V, Skipskis V, Kupstyte N, Zaliaduonyte-Peksiene D, Lesauskaite V. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Dis Markers.* 2015;2015:260101.
262. Bhandary YP, Shetty SK, Marudamuthu AS, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in cigarette smoke exposure and influenza A virus infection-induced lung injury. *PLoS One.* 2015;10(5):e0123187.
263. Joksic I, Mikovic Z, Filimonovic D, et al. Combined presence of coagulation factor XIII V34L and plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G gene polymorphisms significantly contribute to recurrent pregnancy loss in Serbian population. *J Med Biochem.* 2020;39(2):199-207.
264. Khalaf, F.A., Ibrahim, H., Bedair, H.M. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism as a risk factor for vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Egypt J Med Hum Genet* 20, 18 (2019).

265. Divella R, Daniele A, Abbate I, et al. Circulating Levels of PAI-1 and SERPINE1 4G/4G Polymorphism Are Predictive of Poor Prognosis in HCC Patients Undergoing TACE. *Transl Oncol.* 2015;8(4):273-278.
266. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(4):365-72.
267. Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, Broze G, Etscheid M. Factor VII-activating protease promotes the proteolysis and inhibition of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(2):427-33.
268. Olsson M, Stanne TM, Pedersen A, et al. Genome-wide analysis of genetic determinants of circulating factor VII-activating protease (FSAP) activity. *J Thromb Haemost.* 2018;16(10):2024-2034.
269. Yamamichi S, Nishitani M, Nishimura N, Matsushita Y, Hasumi K. Polyamine-promoted autoactivation of plasma hyaluronan-binding protein. *J Thromb Haemost.* 2010;8(3):559-566.
270. Nielsen NV, Roedel E, Manna D, Etscheid M, Morth JP, Kanse SM. Characterization of the enzymatic activity of the serine protease domain of Factor VII activating protease (FSAP). *Sci Rep.* 2019;9(1):18990.
271. Parahuleva MS, Schieffer B, Klassen M, Worsch M, Parviz B, Hölschermann H. Expression of the Marburg I Single Nucleotide Polymorphism (MI-SNP) and the Marburg II Single Nucleotide Polymorphism (MII-SNP) of the Factor VII-Activating Protease (FSAP) Gene and Risk of Coronary Artery Disease (CAD): A Pilot Study in a Single Population. *Med Sci Monit.* 2018;24:4271-4278.
272. Zeerleder S. Factor VII-Activating Protease: Hemostatic Protein or Immune Regulator? *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(2):151-158.
273. Marsman G, von Richthofen H, Bulder I, Lupu F, Hazelzet J, Luken BM, Zeerleder S. DNA and factor VII-activating protease protect against the cytotoxicity of histones. *Blood Adv.* 2017;1(26):2491-2502
274. Ahmad-Nejad P, Dempfle CE, Weiss C, Bugert P, Borggreffe M, Neumaier M. The G534E-polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is a risk factor for venous thrombosis and recurrent events. *Thromb Res.* 2012;130(3):441-4.
275. Sidelmann JJ, Vitzthum F, Funding E, Münster AM, Gram J, Jespersen J. Factor VII-activating protease in patients with acute deep venous thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122(6):848-53.
276. Hoppe B, Tolou F, Radtke H, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood* 2005; 105:1549–1551.
277. Kumar N, Sundaram A, Rani N, Ahluwalia J, Das R, Varma N, Suri V, Malhotra P. Marburg I Polymorphism (G511E) in Adults with Deep Vein Thrombosis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2020;36(1):183-186.
278. Anghel L, Sascău R, Radu R, Stătescu C. From Classical Laboratory Parameters to Novel Biomarkers for the Diagnosis of Venous Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1920.

279. Badireddy M, Mudipalli VR. Deep Venous Thrombosis Prophylaxis. [Updated 2021 Apr 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534865/>
280. Lilly CM, Liu X, Badawi O, Franey CS, Zuckerman IH. Thrombosis prophylaxis and mortality risk among critically ill adults. *Chest*. 2014;146(1):51-57.
281. Huang W, Goldberg RJ, Cohen AT, Anderson FA, Kiefe CI, Gore JM, Spencer FA. Declining Long-term Risk of Adverse Events after First-time Community-presenting Venous Thromboembolism: The Population-based Worcester VTE Study (1999 to 2009). *Thromb Res*. 2015;135(6):1100-6.
282. Yang G, De Staercke C, Hooper WC. The effects of obesity on venous thromboembolism: A review. *Open J Prev Med*. 2012;2(4):499-509.
283. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012;(63):e3998.
284. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
285. Darawi, M.N., Ai-Vyrn, C., Ramasamy, K. et al. Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Med Genet* 14, 27 (2013).
286. Cunha EN, de Souza MFB, Lanza DCF, Lima JPMS. A low-cost smart system for electrophoresis-based nucleic acids detection at the visible spectrum. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240536.
287. Saeed A, Sumreen, Kashif MA. To determine the frequency of Factor V Leiden in cases of Deep Vein Thrombosis and Healthy controls. *Pak J Med Sci*. 2015;31(5):1219-22.
288. Engbers MJ, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2105-12.
289. Molnár AÁ, Nádasy GL, Dörnyei G, et al. The aging venous system: from varicosities to vascular cognitive impairment. *Geroscience*. 2021;43(6):2761-2784.
290. Lichota A, Szewczyk EM, Gwozdziński K. Factors Affecting the Formation and Treatment of Thrombosis by Natural and Synthetic Compounds. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7975.
291. Zöller B, Pirouzifard M, Svensson PJ, Holmquist B, Stenman E, Elston RC, Song YE, Sundquist J, Sundquist K. Familial Segregation of Venous Thromboembolism in Sweden: A Nationwide Family Study of Heritability and Complex Segregation Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(24):e020323.
292. Zöller B, Ohlsson H, Sundquist J, Sundquist K. Familial risk of venous thromboembolism in first-, second- and third-degree relatives: a nationwide family study in Sweden. *Thromb Haemost*. 2013;109(3):458-63.
293. Ahmad A, Sundquist K, Palmér K, Svensson PJ, Sundquist J, Memon AA. Risk prediction of recurrent venous thromboembolism: a multiple genetic risk model. *J Thromb Thrombolysis*. 2019;47(2):216-226.

294. Lympiraki E, Stalika E, Tzavelas G, Tormpantoni E, Samara D, Vagdatli E, Tsamesidis I. The Clinical Utility of ABO and RHD Systems as Potential Indicators of Health Status, a Preliminary Study in Greek Population. *Clin Pract.* 2022;12(3):406-418.
295. Dentali, F.; Sironi, A.; Ageno, W.; Turato, S.; Bonfanti, C.; Frattini, F. Crestani, S.; Franchini, M. Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: Results from a meta-analysis of the literature. *Semin. Thromb. Hemost.* **2012**, 38, 535–548
296. Vojvodic S: Distribution of the ABO, Rh, MNSS, Kell and Duffy blood group antigens in the population of Vojvodina (in Czechian). *Med Pregl* 2003;56:173-177.
297. Volken T, Crawford RJ, Amar S, Mosimann E, Tschaggelar A, Taleghani BM. Blood Group Distribution in Switzerland - a Historical Comparison. *Transfus Med Hemother.* 2017;44(4):210-216
298. Khan F, et al. MARVELOUS Collaborators. Long term risk of symptomatic recurrent venous thromboembolism after discontinuation of anticoagulant treatment for first unprovoked venous thromboembolism event: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2019;366:14363.
299. Arshad N, Bjøri E, Hindberg K, Isaksen T, Hansen JB, Braekkan SK. Recurrence and mortality after first venous thromboembolism in a large population-based cohort. *J Thromb Haemost.* 2017;15(2):295-303.
300. Hodeib H, et al. Recurrent Unprovoked Venous Thromboembolism. *Genes (Basel).* 2021;12(6):874.
301. Palareti G. Recurrent venous thromboembolism: what is the risk and how to prevent it. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:391734.
302. Huang W, Goldberg RJ, Cohen AT, Anderson FA, Kiefe CI, Gore JM, Spencer FA. Declining long-term risk of adverse events after first-time community-presenting venous thromboembolism: the Population-based Worcester VTE Study (1999–2009). *Thromb Res* 2015; 135: 1100–16.
303. Áinle, Fionnuala Ní, and Barry Kevane. “Which patients are at high risk of recurrent venous thromboembolism (deep vein thrombosis and pulmonary embolism)?.” *Blood advances* vol. 4,21 (2020): 5595-5606.
304. Nielsen JD. The incidence of pulmonary embolism during deep vein thrombosis. *Phlebology.* 2013 ;28 Suppl 1:29-33.
305. Ouriel K, Green RM, Greenberg RK, Clair DG. The anatomy of deep venous thrombosis of the lower extremity. *J Vasc Surg.* 2000;31(5):895-900.
306. Robert-Ebadi, Helia, and Marc Righini. “Should we diagnose and treat distal deep vein thrombosis?.” *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* vol. 2017,1 (2017): 231-236.
307. Gong S, Lee EJ, Kim JS, Kim H, Noh M, Park H, Park BW, Yang S, Park SJ. Association between Laterality and Location of Deep Vein Thrombosis of Lower Extremity and Pulmonary Embolism. *Vasc Specialist Int.* 2021; 25;37:12.



308. Heller T, Becher M, Kröger JC, Beller E, Heller S, Höft R, Weber MA, Meinel FG. Isolated calf deep venous thrombosis: frequency on venous ultrasound and clinical characteristics. *BMC Emerg Med.* 2021;30;21(1):126.
309. Sottilotta G, Oriana V, Latella C, Luise F, Piromalli A, Ramirez F, et al. Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res.* 2006;117:681–4.
310. Eslami, M.M., khalili, M., Soufizomorrod, M. et al. Factor V Leiden 1691G > A mutation and the risk of recurrent pregnancy loss (RPL): systematic review and meta-analysis. *Thrombosis J* 18, 11 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12959-020-00224-z>
311. Padda J, Khalid K, Mohan A, Pokhriyal S, Batra N, Hitawala G, Cooper AC, Jean-Charles G. Factor V Leiden G1691A and Prothrombin Gene G20210A Mutations on Pregnancy Outcome. *Cureus.* 2021 Aug 15;13(8):e17185
312. Nikolaeva MG, Momot AP, Zainulina MS, Yasafova NN, Taranenko IA. Pregnancy complications in G20210A mutation carriers associated with high prothrombin activity. *Thromb J.* 2021; 5;19(1):41.
313. Douketis JD, Foster GA, Crowther MA, Prins MH, Ginsberg JS. Clinical Risk Factors and Timing of Recurrent Venous Thromboembolism During the Initial 3 Months of Anticoagulant Therapy. *Arch Intern Med.* 2000;160(22):3431–3436.
314. Schulman S. How I treat recurrent venous thromboembolism in patients receiving anticoagulant therapy. *Blood.* 2017;129(25):3285-3293.
315. Nadar S, Lip GY. The prothrombotic state in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *Curr Pharm Des.* 2003;9(21):1715-32.
316. Nazarzadeh M et al. BLOOD PRESSURE AND RISK OF VENOUS THROMBOEMBOLISM, *Journal of Hypertension*: 2019 - Volume 37 - Issue - p e9
317. Mi Y, Yan S, Lu Y, Liang Y, Li C. Venous thromboembolism has the same risk factors as atherosclerosis: A PRISMA-compliant systemic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(32):e4495.
318. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, et al. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Arch Intern Med* 2002; 162:1182–1189.
319. MacDonald CJ, Madika AL, Lajous M, Canonico M, Fournier A, Boutron-Ruault MC. Association between cardiovascular risk-factors and venous thromboembolism in a large longitudinal study of French women. *Thromb J.* 2021;19(1):58.
320. Alanazi OA, El-Fetoh NMA, Mohammed NA, et al. Deep Venous Thrombosis among hypertensive patients in King Abdulaziz University (KAU) Hospital, Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia. *Electron Physician.* 2017;9(10):5472-5477.
321. Huang L, Li J, Jiang Y. Association between hypertension and deep vein thrombosis after orthopedic surgery: a meta-analysis. *Eur J Med Res.* 2016;21:13.
322. Piazza G, Goldhaber SZ, Kroll A, Goldberg RJ, Emery C, Spencer FA. Venous thromboembolism in patients with diabetes mellitus. *Am J Med.* 2012;125(7):709-716.

323. Peng YH, Lin YS, Chen CH, et al. Type 1 diabetes is associated with an increased risk of venous thromboembolism: A retrospective population-based cohort study. *PLoS One*. 2020;15(1):e0226997.
324. Blokhin IO, Lentz SR. Mechanisms of thrombosis in obesity. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(5):437-444.
325. Yang G, De Staercke C, Hooper WC. The effects of obesity on venous thromboembolism: A review. *Open J Prev Med*. 2012;2(4):499-509.
326. El-Menyar A, Asim M, Al-Thani H. Obesity Paradox in Patients With Deep Venous Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018 ;24(6):986-992.
327. Kim J, Kraft P, Hagan KA, Harrington LB, Lindstroem S, Kabrhel C. Interaction of a genetic risk score with physical activity, physical inactivity, and body mass index in relation to venous thromboembolism risk. *Genet Epidemiol*. 2018;42(4):354-365.
328. Borch KH, Braekkan SK, Mathiesen EB, Njolstad I, Wilsgaard T, Stormer J, et al. Abdominal obesity is essential for the risk of venous thromboembolism in the metabolic syndrome: The Tromso study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7:739–745.
329. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, Heckbert SR, Jacobs DR, Jr, Rosamond WD, et al. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7:746–751.
330. Molnár AÁ, Nádasy GL, Dörnyei G, et al. The aging venous system: from varicosities to vascular cognitive impairment. *Geroscience*. 2021;43(6):2761-2784.
331. Olsen LN, Fischer M, Evans PA, Gliemann L, Hellsten Y. Does Exercise Influence the Susceptibility to Arterial Thrombosis? An Integrative Perspective. *Front Physiol*. 2021;12:636027.
332. Lindqvist PG, Epstein E, Olsson H. The relationship between lifestyle factors and venous thromboembolism among women: a report from the MISS study. *Br J Haematol*. 2009;144(2):234-40.
333. Yuan S, Bruzelius M, Håkansson N, Åkesson A, Larsson SC. Lifestyle factors and venous thromboembolism in two cohort studies. *Thromb Res*. 2021;202:119-124.
334. Danin-Mankowitz H, Ugarph-Morawski A, Braunschweig F, Wändell P. The risk of venous thromboembolism and physical activity level, especially high level: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;52(2):508-516.
335. Borch KH, Hansen-Krone I, Braekkan SK, et al. Physical activity and risk of venous thromboembolism. The Tromso study. *Haematologica*. 2010;95(12):2088-2094.
336. Armstrong ME, Green J, Reeves GK, Beral V, Cairns BJ; Million Women Study Collaborators. Frequent physical activity may not reduce vascular disease risk as much as moderate activity: large prospective study of women in the United Kingdom. *Circulation*. 2015;131(8):721-9.
337. Solli H, Olsen M, Larsen FB, Pedersen L, Schmidt M. Physical Activity as an Effect Modifier of the Association Between Obesity and Venous Thromboembolism: A Danish Population-Based Cohort Study. *Clin Epidemiol*. 2020;12:1361-1370.

338. West J, Perrin K, Aldington S, Weatherall M, Beasley R. A case-control study of seated immobility at work as a risk factor for venous thromboembolism. *J R Soc Med.* 2008;101(5):237-43.
339. Ferrari E, Chevallier T, Chapelier A, Baudouy M. Travel as a risk factor for venous thromboembolic disease: a case-control study. *Chest.* 1999;115:440-4
340. 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(11):447-54.
341. Johannesen CDL, Flachs EM, Ebbelhøj NE, Marott JL, Jensen GB, Nordestgaard BG, Schnohr P, Bonde JPE. Sedentary work and risk of venous thromboembolism. *Scand J Work Environ Health.* 2020;46(1):69-76.
342. Cheng YJ, Liu ZH, Yao FJ, Zeng WT, Zheng DD, Dong YG, Wu SH. Current and former smoking and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2013;10(9):e1001515.
343. Duncan MS, Freiberg MS, Greevy RA Jr, Kundu S, Vasani RS, Tindle HA. Association of Smoking Cessation With Subsequent Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA.* 2019 20;322(7):642-650.
344. Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(4):363-73.
345. Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ.* 2017 ;359:j5024.
346. Lippi G, Mattiuzzi C, Franchini M. Venous thromboembolism and coffee: critical review and meta-analysis. *Ann Transl Med.* 2015;3(11):152.
347. Lee KW, Lip GY. Effects of lifestyle on hemostasis, fibrinolysis, and platelet reactivity: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2003 Oct 27;163(19):2368-92.
348. Gaborit FS, Overvad K, Nørgaard M, Kristensen SR, Tjønneland A, Severinsen MT. Alcohol intake and risk of venous thromboembolism. A Danish follow-up study. *Thromb Haemost.* 2013;110(1):39-45
349. Vučković BA, Cannegieter SC, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Lijfering WM. Recurrent venous thrombosis related to overweight and obesity: results from the MEGA follow-up study. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1430-1435.
350. Flinterman LE, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Body height, mobility, and risk of first and recurrent venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2015;13(4):548-54.
351. Folsom AR, Cushman M. Exploring Opportunities for Primary Prevention of Unprovoked Venous Thromboembolism: Ready for Prime Time?. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(23):e019395.
352. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet.* 2001;28(4):389-92.

353. Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Krętowski, A.J. & Posmyk, R. Frequency of thrombophilia associated genes variants: population-based study. *BMC Med Genet* 21, 198 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01136-5>
354. Kupeli E, Verdi H, Simsek A, Atac FB, Eyuboglu FO. Genetic mutations in Turkish population with pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011;17(6):E87-94.
355. Jusić-Karić A, Terzić R, Jerkić Z, Avdić A, Pođanin M. Frequency and association of 1691 (G>A) FVL, 20210 (G>A) PT and 677 (C>T) MTHFR with deep vein thrombosis in the population of Bosnia and Herzegovina. *Balkan J Med Genet*. 2016;19(1):43-50.
356. Alfirevic Z, Simundic AM, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, et al. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochemia Medica*. 2010;20:229–35.
357. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Antonijevic N, Djordjevic V, Mikovic D, Mandic V, Rakicevic L, Radojkovic D. Type and location of venous thromboembolism in carriers of Factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation versus patients with no mutation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010;16(1):66-70.
358. Hadhri S, Rejab MB, Guedria H, Ifa L, Chatti N, Skouri H. Factor V Leiden, prothrombin 20210G>A, MTHFR 677C>T and 1298A>C, and homocysteinemia in Tunisian blood donors. *J Clin Lab Anal*. 2012;26(3):167-173.
359. Rocanin-Arjo A, Cohen W, Carcaillon L, et al. CardioGenics Consortium. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies ORM1 as a novel gene controlling thrombin generation potential. *Blood*. 2014;123(5):777-85.
360. Ceelie, H., Bertina, R.M., Van Hylckama Vlieg, A., Rosendaal, F.R. & Vos, H.L. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;85(6), 1066–70.
361. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008 ;112(1):19-27.
362. Lindqvist, Pelle G., et al. "Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss—a possible evolutionary selection mechanism." *Thrombosis and haemostasis* 59.01 (1998): 69-73.
363. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden in women: a thrombotic risk factor or an evolutionary advantage? *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(3):275-9.
364. Arsov T, Miladinova D, Spiroski M. Factor V Leiden is associated with higher risk of deep venous thrombosis of large blood vessels. *Croat Med J*. 2006;47(3):433-439.
365. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, et al. Prevalence of factor V leiden, factor V cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol*. 2004;112:227–9.

366. Clark JS, 3333 G, Salkic NN, Ciechanowicz A. Allele frequency distribution of 1691G >A F5 (which confers Factor V Leiden) across Europe, including Slavic populations. *J Appl Genet.* 2013;54(4):441-446.
367. Yamazaki T, Nicolaes GA, Sørensen KW, Dahlbäck B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. *Blood.* 2002;100(7):2515-21.
368. Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. *Haematologica.* 2003;88(10):1182-9.
369. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, Tormene D, Rosing J, Bernardi F. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood.* 2005;106(7):2363-5.
370. Ašić A, Salazar R, Storm N, Doğan S, Höppner W, Marjanović D, Primorac D. Prevalence of rare F5 variants in general population from Bosnia and Herzegovina. *Mol Biol Rep.* 2021;48(6):5181-5186.
371. Al Bkhetan, Z., Zobel, J., Kowalczyk, A. et al. Exploring effective approaches for haplotype block phasing. *BMC Bioinformatics* 20, 540 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3095-8>
372. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R,
373. MacDonald, C.J., Madika, A.L., Lajous, M. *et al.* Association between cardiovascular risk-factors and venous thromboembolism in a large longitudinal study of French women. *Thrombosis J* **19**, 58 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12959-021-00310-w>
374. Ouyang C, Smith DD, Krontiris TG. Evolutionary signatures of common human cis-regulatory haplotypes. *PLoS One.* 2008;3(10):e3362.
375. Ceelie H, Bertina RM, van Hylekama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):1066-70.
376. Chang YS, Lan YC, Chen YJ, Huang JS, Yang CN, Huang CF, Yeh KY. A Novel Phenotype of the Factor 5 Gene Mutation (Homozygote Met1736Val and Heterozygote Asp68His) Is Associated With Moderate Factor V Deficiency. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:870269.
377. Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(3):450-460.
378. Kohler HP. Role of blood coagulation factor XIII in vascular diseases. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(3-4):31-4.
379. Francis CW. Factor XIII polymorphisms and venous thromboembolism. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(11):1391-3.
380. Memtsas VP, Arachchillage DRJ, Gorog DA. Role, Laboratory Assessment and Clinical Relevance of Fibrin, Factor XIII and Endogenous Fibrinolysis in Arterial and Venous Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1472.
381. Jung JH, Song GG, Kim JH, Seo YH, Choi SJ. Association of factor XIII Val34Leu polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis. *Cardiol J.* 2017;24(1):74-84.

382. Wells PS, Anderson JL, Scarvelis DK, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2006;164(2):101-109.
383. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):360-70.
384. Diz-Kucukkaya R, Hancer VS, Inanc M, Nalcaci M, Pekcelen Y. Factor XIII Val34Leu polymorphism does not contribute to the prevention of thrombotic complications in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2004;13(1):32-5.
385. Corral J, González-Conejero R, Iniesta JA, Rivera J, Martínez C, Vicente V. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica.* 2000;85(3):293-7.
386. Munshi R, Panchal F, Kulkarni V, Chaurasia A. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in healthy volunteers and its correlation with homocysteine levels in patients with thrombosis. *Indian J Pharmacol.* 2019;51(4):248-254.
387. Pramukarso DT, Faradz SM, Sari S, Hadisaputro S. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and carotid intima medial thickness progression in post ischaemic stroke patient. *Ann Transl Med.* 2015;3(21):324.
388. Castiglia P, Sanna V, Azara A, De Miglio MR, Murgia L, Pira G, Sanges F, Fancellu A, Carru C, Bisail M, Muroli MR. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer: a Sardinian preliminary case-control study. *Int J Med Sci.* 2019;16(8):1089-1095.
389. Tinelli C, Di Pino A, Ficulle E, Marcelli S, Feligioni M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr.* 2019;6:49.
390. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):292-9.
391. Zhang P, Gao X, Zhang Y, Hu Y, Ma H, Wang W, Wang H, Zhang J, Xu H, Lu Z. Association between MTHFR C677T polymorphism and venous thromboembolism risk in the Chinese population: a meta-analysis of 24 case-controlled studies. *Angiology.* 2015;66(5):422-32.
392. Spiroski I, Kedev S, Antov S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genetic polymorphisms with occlusive artery disease and deep venous thrombosis in Macedonians. *Croat Med J.* 2008;49(1):39-49.
393. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke.* 2003;34(12):2822-8.
394. Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Skrzypek M. Lack of Associations Between PAI-1 and FXIII Polymorphisms and Arterial Ischemic Stroke in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019;25:1076029619869500.

395. Morrow GB, Whyte CS, Mutch NJ. A Serpin With a Finger in Many PAIs: PAI-1's Central Function in Thromboinflammation and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:653655.
396. Hosseini S, Kalantar E, Hosseini MS, Tabibian S, Shamsizadeh M, Dorgalaleh A. Genetic risk factors in patients with deep venous thrombosis, a retrospective case control study on Iranian population. *Thromb J.* 2015;13:35.
397. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Trajkov D, Petlichkovski A, Dzhekova-Stojkova S, Kostovska S, Spiroski M. Investigation of SERPINE1 genetic polymorphism in Macedonian patients with occlusive artery disease and deep vein thrombosis. *Kardiol Pol.* 2009;67(10):1088-94.
398. van Minkelen R, de Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. The Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is not associated with venous thrombosis. *Blood.* 2005;105(12):4898;
399. Hoppe B, Tolou F, Radtke H, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood* 2005; 105:1549–1551.
400. Willeit J, Kiechl S, Weimer T, Mair A, Santer P, Wiedermann CJ, Roemisch J. Marburg I polymorphism of factor VII--activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation.* 2003 Feb 11;107(5):667-70. doi: 10.1161/01.cir.0000055189.18831.b1. PMID: 12578864.
401. Roemisch J, Feussner A, Nerlich C, et al. The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP). *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 433–441.
402. Da L, Jiahui Z, Xiaoqiang L. Association between FSAP 1601G>A polymorphism and venous thromboembolism risk: A meta-analysis. *Phlebology.* 2020 ;35(5):345-353.
403. Kumar N, Sundaram A, Rani N, Ahluwalia J, Das R, Varma N, Suri V, Malhotra P. Marburg I Polymorphism (G511E) in Adults with Deep Vein Thrombosis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2020;36(1):183-186.
404. Al-Zoubi N, Alrabadi N, Kheirallah K, Alqudah A. Prevalence and Multiplicity of Thrombophilia Genetic Polymorphisms of *FV*, *MTHFR*, *FII*, and *PAI-I*: A Cross-Sectional Study on a Healthy Jordanian Population. *Int J Gen Med.* 2021;14:5323-5332.
405. Farajzadeh M, Bargahi N, Poursadegh Zonouzi A, Farajzadeh D, Pouladi N. Polymorphisms in thrombophilic genes are associated with deep venous thromboembolism in an Iranian population. *Meta Gene.* 2014;2:505-513.
406. Roach RE, Cannegieter SC, Lijfering WM. Differential risks in men and women for first and recurrent venous thrombosis: the role of genes and environment. *J Thromb Haemost.* 2014;12(10):1593-600.
407. Shaya SA, Westrick RJ, Gross PL. Thrombus stability explains the factor V Leiden paradox: a mouse model. *Blood Adv.* 2019;3(21):3375-3378.
408. Zöller B, Melander O, Svensson PJ, Engström G. Factor V Leiden paradox in a middle-aged Swedish population: A prospective study. *Vasc Med.* 2018 ;23(1):52-59.

409. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ, Le Cessie S, Reitsma PH, Arellano AR, Tong CH, Devlin JJ, Bare LA, Rosendaal FR, Vossen CY. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood*. 2012 Jul 19;120(3):656-63.
410. Galanaud JP, Sevestre MA, Genty C, Kahn SR, Pernod G, Rolland C, Diard A, Dupas S, Jurus C, Diamand JM, Quere I, Bosson JL; OPTIMEV-SFMV investigators. Incidence and predictors of venous thromboembolism recurrence after a first isolated distal deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2014;12(4):436-43.



## Биографија

Слађана Д. Теофилов (рођена Божовић) рођена је 18.02.1967. године у Зубином Поточу, Република Србија. У родном месту је завршила основну школу, а затим Гимназију, 1981-1985. године, (природни смер), у Косовској Митровици. Студије је уписала 1985/1986 на ПМФ (Природно математички факултет), Биологија, на Универзитету у Приштини, а завршила 1990. године.

Слађана је од 1993-1999 г. радила у Клиничко болничком центру у Приштини, а 1993. године обављала део приправничког стажа у Институту за болести деце, у Новом Саду. Специјализацију из медицинске генетике. завршила на Медицинском факултету у Новом Саду, Институт за болести деце, у периоду 1996-1999 године, а специјалистички испит положила новембра 1999. године. Од јануара 2000. године, запослена је у Центру за медицинску генетику и имунологију, Клинички центар Црне Горе у Подгорици, а од октобра 2002. године (и даље) је начелник Одељења за генетику. У јуну 2008. године, у оквиру пројекта Progetto Tiorcas, Campo Baso, Италија, завршила курс молекуларне генетике у Италији. Одлуком Медицинског факултета, Универзитета у Београду, од 2010. године, Слађана је Ментор из области Медицинске генетике. Била је члан тима у научно-истраживачком пројекту: Конгениталне аномалије у Црној Гори; молекуларни механизми настанка геномских поремећаја, клиничке и епидемиолошке карактеристике (2012-2015). Слађана има 6 публикација у научним часописима а као аутор и/или коаутор са више од 20 радова (постер презентације) учешће на европској конференцији (ESHG).

Стручно звање: специјалиста медицинске генетике.

Са породицом живи у Подгорици.

## Библиографија

1. **Sladana Teofilov**, Zvonko Magić, Tatjana Ostojić, Milena Bulatović, Olivera Miljanović, *Association of FII Prothrombin, FV Leiden and MTHFR gene polymorphisms in the Montenegrin patients with venous thromboembolisms- Povezanost polimorfizama za FII Protrombin, FV Leiden i MTHFR gen sa venskim tromboembolizmom kod crnogorskin pacijenata*, Vojnosanitetski pregled (2019); Online First September, 2019. **UDC:DOI:** <https://doi.org/10.2298/VSP190402086T>
2. Miljanović O, **Teofilov S**, Anđelić M, Magić Z, Cikota-Aleksić B. Maternal MTHFR 677C>T, 1298A>C gene polymorphisms and risk of offspring aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2022 Aug;42(9):1190-1200. doi: 10.1002/pd.6214. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35856339.
3. Miljanović O, Ilić V, **Teofilov S**, *et al* Polymorphisms of ACE and thrombophilic genes: risk for recurrent pregnancy loss *Journal of Clinical Pathology* Published Online First: 08 September 2022. doi: 10.1136/jcp-2021-208057.

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„Повезаност полиморфизама гена укључених у процес коагулације са тромбозом дубоких вена и плућном емболијом“**

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 2022. године,

Слађана Теофилов  
потпис аутора



**Образац 2**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Повезаност полиморфизама гена укључених у процес коагулације са тромбозом  
дубоких вена и плућном емболијом“**

истоветне.

У Крагујевцу, 2022. године.

Слађана Теофилов  
потпис аутора 

## Образац 3

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Слађана Теофилов,

- да дозвољавам
- не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**„Повезаност полиморфизама гена укључених у процес коагулације са тромбозом дубоких вена и плућном емболијом“**

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

- да дозвољавам
- не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 2022. године,

Слађана Теофилов  
потпис аутора



---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>