

Utjecaj oralne kontracepcije na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize

Oslaković, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:245820>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sandra Oslaković

**UTJECAJ ORALNE KONTRACPCIJE NA
ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND MEDICAL BIOCHEMISTRY

Sandra Oslaković

**EFFECT OF ORAL CONTRACEPTIVES ON FACTORS
OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sandra Oslaković

**UTJECAJ ORALNE KONTRACPCIJE NA
ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2014.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND MEDICAL BIOCHEMISTRY

Sandra Oslaković

**EFFECT OF ORAL CONTRACEPTIVES ON FACTORS
OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Renata Zadro, Ph.D., Full Professor

Zagreb, 2014.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Županijskoj bolnici Čakovec, Odjelu za transfuzijsku medicinu i Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoj jedinici za specijalnu i molekularnu hematologiju.

Zahvaljujem mojoj mentorici **prof. dr. sc. Renati Zadro**, koja mi je posvetila svoj trud i vrijeme pomažući mi vrijednim napomenama i brojnim stručnim savjetima u izradi i pisanju rada.

Na vjeri u mene i ovaj rad, posebno zahvaljujem **mag. Kseniji Šoštarčić** i **ing. Danielu Bakiću**, predstavnicima Siemens Healthcare Diagnostics GmbH Austrija, bez čijeg sponzorstva ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem djelatnicima Odjela za transfuzijsku medicinu, Županijske bolnice Čakovec, što su me podržavali tijekom izrade rada i poticali na njegov završetak.

Osobito sam zahvalna mom suprugu Dragi za strpljenje, nesebičnost, razumijevanje i ljubav bez čega ne bih mogla ustrajati.

Adamu - jer Ti si budućnost...

SAŽETAK

Oralni kontraceptivi imaju brojne učinke na organizam žene poput poželjnog smanjenja pojavnosti zloćudnih bolesti jajnika i endometrija, ali i nepoželjne učinke od kojih je najpoznatiji povišeni trombotički rizik. Činjenica je da su oralni kontraceptivi jedan od rizika za razvoj trombo-embolijskih bolesti, s relativnim rizikom od 1,15 do 8,5 ovisno o formulaciji pripravka i obliku trombo-embolijske bolesti. Razvoj laboratorijske dijagnostike, molekularnih ispitivanja i koagulacijskih pretraga, dao je novi zamah istraživanjima povezujući epidemiološke podatke o trombotičkim rizicima poput pušenja, debljine, dobi, tjelovježbe i drugih s biološkom osnovom. Istovremeno, razvoj sintetičnih estrogena i progesterona, njihovih doza i kombinacija, dodatan su poticaj studijama učinka pojedine formulacije na koagulacijski odgovor.

Cilj istraživanja bio je utvrđivanje utjecaja oralnih kontraceptiva na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize u lokalnoj populaciji, ovisno o: količini i hormonalnom sastavu korištenog pripravka, postojanju nasljednih trombofilija te razlici među ispitanicama u dobivenim vrijednostima aktivnosti čimbenika hemostaze u odnosu na dodatne čimbenike rizika za trombo-embolijske bolesti.

U istraživanje su uključeni rezultati 195 žena koje su uzimale 6 ciklusa oralnu kontracepciju. Određivani su čimbenici nasljedne trombofilije (FV Leiden, FIIG20210A i PAI-1 5G/4G) i koagulacijske pretrage (protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), fibrinogen, rezistencija na aktivirani protein C (aPCR), protein C i S, FVIII, antitrombin, plazminogen, inhibitor plazmina, inhibitor plazminogen aktivatora tip-1 (PAI-1) i d-dimeri) u 3 vremenske točke: početni - prije uzimanja oralne kontracepcije, nakon 3 i nakon 6 ciklusa.

Rezultati istraživanja pokazuju da su pod utjecajem oralnih kontraceptiva promijenjeni svi koagulacijski parametri osim aktivnosti FVIII. Analizom rezultata formulacija pripravaka, najveće razlike nađene su u kombinacijama s 20 μ g etilen estradiola (EE2) s gestodenom (GSD) u odnosu na kombinaciju s drospirenonom (DRSP) za koagulacijske pretrage protein C i S, plazminogen i (PAI-1). U istraživanju je potvrđena jednaka učestalost trombofilnih mutacija među ispitanicama kao u općoj populaciji. Polimorfizam PAI-1 5G/4G nije imao utjecaja na aktivnost PAI-1 kod mladih žena, niti je uzimanje oralnih kontraceptiva imalo učinka na aktivnost PAI-1.

Istraživanje je potvrdilo utjecaj oralne kontracepcije na koagulacijske pretrage, ali i nastojanje sustava hemostaze da postigne novu točke ravnoteže. Gestageni također utječu na koagulacijski odgovor žena. Patološke vrijednosti pretraga aktivnosti proteina S i određivanja koncentracije d-dimera mogu pomoći kliničarima u odluci o nastavku ili prekidu oralne kontracepcije kod žena s drugim visokim rizikom i/ili sumnjom na trombo-embolijski događaj.

Ključne riječi: oralni kontraceptivi, gestageni, čimbenici zgrušavanja i fibrinolize, nasljedna trombofilija, trombotički rizici

SUMMARY

Oral contraceptives have numerous effects on women's body like favorable decrease of prevalence risk for ovarian and endometrial cancer, but also undesirable increase of thrombotic events. The fact is that oral contraceptives are one of the reasons for increased risk for venous thromboembolism, with relative risk is 1.15-8.5, depending on the drug formulation and type of thromboembolic disease. The development of laboratory diagnostics, molecular tests and coagulation tests, gave a new momentum to the researches linking epidemiological data on thrombotic risks such as smoking, obesity, age, exercise, and others with a biological basis. Simultaneously, development of synthetic estrogens and progesterones are an additional stimulus for new studies of the effect of oral contraceptive formulations on the coagulation response.

The aim of the study was to determine the influence of oral contraceptives on factors of coagulation and fibrinolysis in the local population, depending on: the amount and composition of used drug, the presence of hereditary thrombophilia and the difference among study subjects in the obtained values of factors of coagulation and fibrinolysis in relation to the presence of additional risk factors for thromboembolic diseases.

The study included the data results of 195 women, who took six cycles of oral contraceptives. Tests for hereditary thrombophilia (FV Leiden, FII G20210A and PAI-1 5G/4G) were performed, as well as tests of hemostasis (PT, APTT, fibrinogen, APCR, protein C and S, FVIII, antithrombin, plasminogen, plasmin inhibitor, PAI-1 and d-dimer) measured at three time points: basic - before taking oral contraceptives after three and after six cycles of their use.

The results showed that oral contraceptives have changed all measured parameters except activity of FVIII. Analyzing the results by formulation of drug, the greatest differences were found in combination with 20µg EE2 GSD vs. DRSP for coagulation tests protein C and S, plasminogen and PAI-1. Data confirmed the same frequency of FV Leiden, FII G20210A i PAI-1 5G/4G among study subjects as in general population. Polymorphism of PAI-1 5G/4G had no influence on PAI-1 activity, nor the use of oral contraceptives.

This study confirmed impact of oral contraceptives on coagulation tests and tendency of hemostasis to reach new equilibrium. Gestagens also have impact on coagulation response. Pathological test results of protein S activity and d-dimers may help clinicians in the decision on continuation or discontinuation of oral contraceptives in women with other high-risk and / or suspected thromboembolic event.

Key Words: oral contraceptives, gestagens, coagulation and fibrinolytic factors, hereditary thrombophilia, thrombotic risks

SADRŽAJ:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Spolni hormoni u oralnim kontraceptivima | 3 |
| 1.1.1. Estrogeni | 3 |
| 1.1.2. Gestageni | 4 |
| 1.1.2.1. Derivati testosterona: 19-nortestosteron | 6 |
| 1.1.2.2. Derivati progesterona: 17-hidroksiprogesteron i 19-norprogesteron..... | 6 |
| 1.1.2.3. Derivati spironolaktona | 6 |
| 1.1.2.4. Klasifikacija oralnih kontraceptiva..... | 7 |
| 1.2. Tromboze i oralni kontraceptivi..... | 8 |
| 1.2.1. Ukupna estrogenost oralnog kontraceptiva | 9 |
| 1.2.2. Utjecaj oralnih kontraceptiva na sustav hemostaze | 9 |
| 1.2.3. Trombofilije i oralni kontraceptivi | 11 |
| 1.2.3.1. Manjak antitrombina..... | 12 |
| 1.2.3.2. Manjak proteina C | 13 |
| 1.2.3.3. Manjak proteina S..... | 13 |
| 1.2.3.4. FV Leiden (c. 1691G>A, p.Arg534Gln)..... | 14 |
| 1.2.3.5. FII G20210A (c. *97G>A)..... | 14 |
| 1.2.3.6. Polimorfizam PAI-1 4G/5G..... | 15 |
| 1.2.4. Ostali čimbenici rizika razvoja tromboze i oralni kontraceptivi | 15 |
| 1.3. Nekontracepcijski učinci oralne kontracepcije | 18 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 19 |
| 2.1. Cilj rada..... | 20 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 21 |
| 3.1. Materijali | 21 |
| 3.1.1. Uzorci krvi ispitanica..... | 21 |
| 3.1.1.1. Etički aspekt studije..... | 23 |
| 3.1.2. Upitni listići | 23 |
| 3.2. Metode | 24 |
| 3.2.1. Upitni listići | 24 |
| 3.2.2. Analiza uzoraka krvi na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize | 25 |
| 3.2.2.1. Protrombinsko vrijeme | 27 |
| 3.2.2.2. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme..... | 27 |
| 3.2.2.3. Fibrinogen..... | 27 |
| 3.2.2.4. FVIII..... | 27 |
| 3.2.2.5. Protein C | 28 |
| 3.2.2.6. Protein S..... | 28 |
| 3.2.2.7. Rezistencija na aktivirani protein C..... | 28 |
| 3.2.2.8. Antitrombin..... | 29 |
| 3.2.2.9. D-dimeri | 29 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2.10. <i>Plazminogen</i> | 29 |
| 3.2.2.11. <i>Inhibitor plazmina</i> | 30 |
| 3.2.2.12. <i>Inhibitor aktivatora plazminogena tip-1</i> | 30 |
| 3.2.3. Molekularno ispitivanje nasljedne trombofilije..... | 30 |
| 3.3.3. Statistička obrada podataka | 31 |
| 4. REZULTATI..... | 33 |
| 4.1. Ukupni utjecaj oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize..... | 33 |
| 4.2. Utjecaj formulacije oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize..... | 35 |
| 4.2.2. Utjecaj oralnih kontraceptiva na specifične pretrage zgrušavanja (AT, PC, PS, aPCR, FVIII) | 38 |
| 4.2.3. Utjecaj oralnih kontraceptiva na pretrage fibrinolitičkog puta (plazminogen, d-dimeri, inhibitor plazmina, PAI-1) | 43 |
| 4.2.4. Međugrupna analiza utjecaja formulacija oralnih kontraceptiva na koagulacijske pretrage | 47 |
| 4.3. Rezultati molekularne dijagnostike nasljednih trombofilnih čimbenika | 50 |
| 4.4. Analiza dodatnih čimbenika rizika na koagulacijske pretrage..... | 53 |
| 4.4.1. Ostali rezultati obrade podataka s upitnih listića..... | 60 |
| 5. RASPRAVA..... | 63 |
| 6. ZAKLJUČCI | 72 |
| 7. LITERATURA..... | 74 |
| 8. POPIS KRATICA | 82 |
| 9. PRILOZI..... | 83 |
| Prilog 1. Objavljeni znanstveni radovi vezani uz doktorski rad | 83 |
| Prilog 2. Upitni listić za ispitanice kod prvog vađenja uzorka krvi..... | 99 |
| Prilog 3. Upitni listić za ispitanice kod drugog i trećeg vađenja uzorka krvi..... | 100 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 101 |

1. UVOD

Kontracepcija ima veliko značenje u planiranju obitelji, planiranju populacije, izbjegavanju rizika od pobačaja, neželjene trudnoće i poroda, te očuvanju reproduktivnog zdravlja žene. Danas postoji dugogodišnje iskustvo uporabe oralnih kontraceptiva (OK). Sigurnost postizanja kontracepcijskog učinka, izražena Pearl indeksom (omjer trudnoća i mjeseci u kojima je žena mogla zanijeti) najviša je od svih drugih kontracepcijskih metoda (Tablica 1.), a važna je pristupačnost po cijeni lijeka, ali i nekontracepcijske koristi lijeka (1).

Oralna kontracepcija se počela upotrebljavati davne 1961. godine i od tada ne prestaje njen razvoj, kao i kontroverze koje je prate. Paradoksalno, razvoj oralne kontracepcije je posljedica studije utjecaja spolnih hormona na povećanje fertiliteta kod žena, kada je uočen anti-ovulacijski učinak visokih doza estrogena i progesterona. Dvojica znanstvenika, eksperimentalni biolog Gregory Pincus i stručnjak za liječenje neplodnosti, ginekolog John Rock, potpomognuti stipendijom Margaret Sanger, osnivačicom udruženja Planned Parenthood Federation of America, 1951. godine započinju ciljano istraživanje stvaranja oralne kontracepcije - Pilule.

1957. godine u Sjedinjenim Američkim Državama odobren je Envoid-10, proizvođača Searle, kombinacija 10 mg noretinodrela i 150 µg mestranola, s indikacijom za liječenje poremećaja menstrualnog ciklusa. Četiri godine kasnije, kao prva tableta za sprječavanje začeća odobren je Envoid (5 mg noretinodrela i 75 µg mestranola). Iste godine je i u Njemačkoj odobren Anvolar (proizvođač Schering) kombinacija 4 mg noretisterona i 50 µg etinil estradiola, a godinu poslije 1962. u Nizozemskoj Lyndiol (proizvođač Organon) kombinacija 2,5 mg linestrenola i 75 µg mestranola (2).

Od samog početka uzimanje tableta protiv začeća izazivalo je zabrinutost javnosti. S jedne strane isticalo se pitanje moralnosti osoba koje uzimaju oralnu kontracepciju, kao i strah od širenja promiskuliteta kojeg bi tablete potencijalno omogućavale, a s druge strane pojavili su se rezultati prvih studija koje su upućivali na kardiovaskularne rizike i potencijalnu kancerogenost. Danas je poznato da upotreba kombiniranih oralnih kontraceptiva značajno smanjuje pojavnost karcinoma jajnika i endometrija, a nešto manje i karcinoma debelog crijeva. Međutim, činjenica je da estrogen povećava rizik od trombo-embolijskih bolesti za 2-4 puta. Odjeci tih prvih studija prisutni su kroz medije i danas, te su jedan od uzroka brojnih studija provedenih o oralnoj kontracepciji, što ih čini jednim od najispitivanijih lijekova u kliničkoj praksi.

U proteklih 50 godina oralni kontraceptivi su prošli brojne razvojne faze - izmjenu odnosa količine spolnih hormona u tabletama, vrste sintetičnih derivata estrogena i progesterona, kao i načina uzimanja tableta, s ciljem poboljšanja pouzdanosti i sigurnosti njihove primjene. Prema procjeni Ujedinjenih naroda, oko 9% žena u reproduktivnoj dobi širom svijeta uzima oralne kontraceptive, što ih čini najuobičajenijom metodom kontracepcije danas u razvijenim zemljama i trećom metodom kontracepcije u zemljama u razvoju.

Tablica 1. Učinkovitost kontracepcijskih metoda

| Metoda kontracepcije | Pearl indeks |
|---|--------------|
| Bez metode | 90-100 |
| Metoda ritma | 20 |
| Kondom | 12 |
| Dijafragma | 18 |
| Spermicidi | 20 |
| Intrauterini uložak - IUD | 0,8 |
| Sterilizacija | 0,4 |
| Vazektomija | 0,2 |
| Oralna kontracepcija – samo progesteron | 0,5 |
| Oralna kontracepcija – estrogen+progesteron | 0,1 |

Niži Pearl indeks – veći kontracepcijski učinak metode.

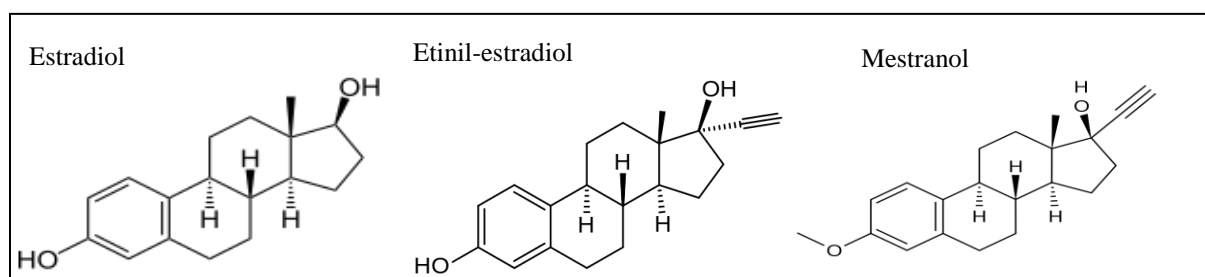
1.1. Spolni hormoni u oralnim kontraceptivima

Uloga spolnih hormona u oralnim kontraceptivima je primarno suprimirajuće djelovanje progesterona negativnom povratnom spregom na luteinizirajući hormon (LH), čime se onemogućuje nastanak ovulacije. Estrogen također ima anti-ovulatorni učinak jer inhibira sekreciju folikulostimulirajućeg hormona (FSH) te sprječava rast dominantnog folikula. Za postizanje ovog učinka potrebne su više doze estrogena kako bi inhibicija bila potpuna ili dodatak progesterona za smanjenje učinka LH. Stoga se estrogenska komponenta dodaje u formulu oralnih kontraceptiva uglavnom radi sprječavanja probojnog krvarenja tijekom uzimanja kontraceptiva i povećavanja koncentracije progesteronskih receptora (3).

U prirodnom obliku, spolni hormoni uzeti per os, slabo se resorbiraju u organizmu, imaju brzu metaboličku razgradnju i deaktivaciju u jetri i crijevima. Radi toga svi današnji oralni kontraceptivi imaju u svom sastavu sintetične spojeve, međutim i dalje su prisutne individualne razlike u apsorpciji hormona, pa čak i kod iste osobe u različitoj životnoj dobi, što posljedično može uzrokovati različite nuspojave i neželjene učinke.

1.1.1. Estrogeni

Sintetičan estrogen dolazi u obliku etinil-estradiola (EE2) ili 3-metil-eter-etinil-estradiola - mestranola koji se u organizmu prevodi u etinil-estradiol kako bi se vezao na estrogenske receptore, što znači da oba spoja imaju jednako biološko djelovanje (Slika 1.).



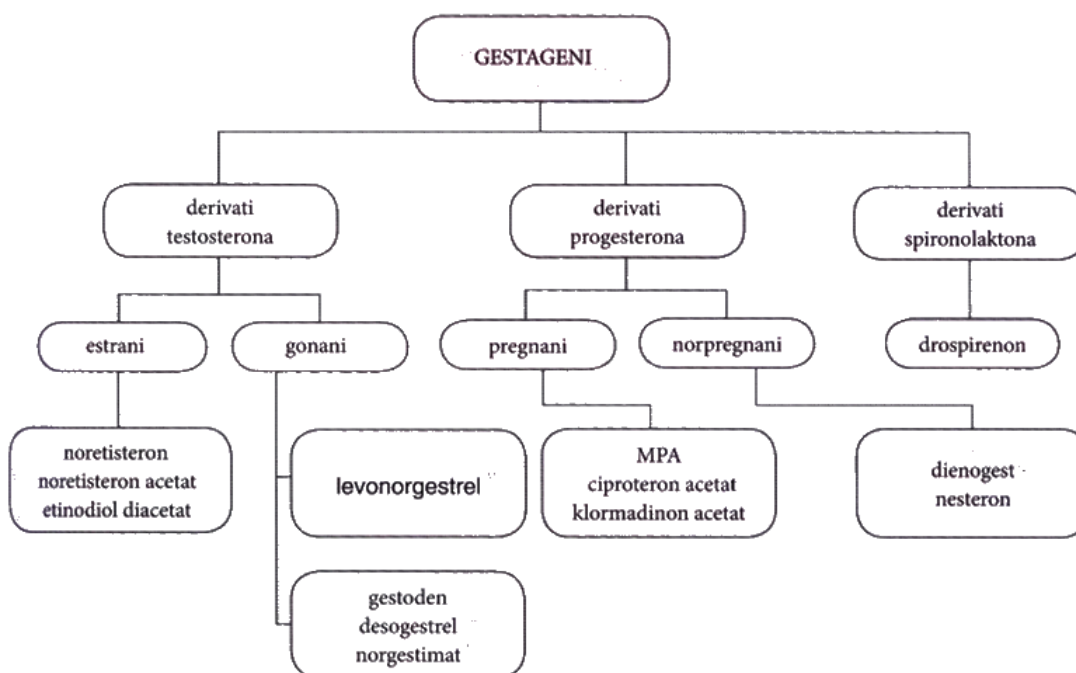
Slika 1. Kemijska formula estradiola i njegovih sintetičnih homologa. Preuzeto iz: en.wikipedia.org

Moderni kontraceptivi sadrže EE2, najčešće u niskim dozama (20-35 µg), koji se apsorbira u tankom crijevu, a metabolizira u jetri putem citokrom izoenzima P450 IIIA4 (4). Metaboliti se izlučuju putem žuči. Učinak enterohepatičke cirkulacije omogućuje dva vrha apsorpcije: prvi nakon dva sata od ingestije (30 min - 2 sata) i drugi nakon nekoliko sati prolaskom kroz jetru (2-6 sati). Vrijeme resorpcije i enterohepatičke cirkulacije je pokazalo velike razlike među etničkim grupama. EE2 je u plazmi vezan za albumin, a u organizmu djeluje vezanjem za estrogenske receptore (4).

Dva su tipa estrogenskih receptora – ER α , koji se nalaze na klasičnim ciljnim tkivima estrogena, i ER β , koji se nalaze na tkivima koja nisu smatrana klasičnim estrogenskim ciljem poput stanica krvnih žila, osteoblasta i astrocita (5). Vezanjem estrogena i njemu sličnih spojeva na ove receptore nastaje različit učinak na staničnu DNK, ovisno o tkivu u kojem se nalaze. Estrogen na sustav zgrušavanja i fibrinolize utječe povećanjem aktivnosti cirkulirajućih FII, FVII, FVIII, FIX, FX i plazminogena, smanjenjem aktivnosti antitrombina, te povećanjem adhezivnosti trombocita (6). Ostali važni učinci su: utjecaj na proizvodnju lipoproteina (povećanje HDL, a smanjenje LDL kolesterola), očuvanje koštane mase smanjenjem razgradnje i poticanjem stvaranja novog koštanog tkiva, proliferacija tkiva mliječnih žlijezda dojke, proliferacija tkiva endometrija, povećano zadržavanje vode i soli u organizmu i dr (7).

1.1.2. Gestageni

Gestageni su sintetični spojevi koji primarno imaju ulogu vezanja za progesteronske receptore. Sintetizirani su iz testosterona (derivati 19-nortestosterona), progesterona (derivati 17-hidroksiprogesterona i 19-norprogesterona) ili spironolaktona (1)(Slika 2.), te osim vezanja za progesteronski receptor imaju afinitet i za druge steroidne receptore: estrogenske, androgene, glukokortikoidne i/ili mineralokortikoidne receptore. Upravo o afinitetu pojedinog gestagena za steroidne receptore ovisi i njihov cjelokupni učinak na organizam (8-10)(Tablica 2.).



Slika 2. Klasifikacija gestagena. Preuzeto iz: Pavičić Baldani D, Vugrinec D. Farmakologija oralnih hormonskih kontraceptiva. u Šimunić V i sur. Dobrobit i rizici oralne hormonske kontracepcije. Fotosoft. Zagreb, 2008

Tablica 2. Biološka aktivnost gestagena (sastojaka modernih kontraceptiva) vezanjem na steroidne receptore

| Gestagen | PR | ER | Anti-ER | AR | Anti-AR | Anti-MKR | GKR | SHBG |
|--------------------------|----|----|---------|----|---------|----------|-----|------|
| Ciproteron acetat | + | - | + | - | ++ | - | + | - |
| Gestoden | + | - | + | + | - | + | + | - |
| Norgestimat | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Levonorgestrel | + | - | + | + | - | - | - | + |
| Noretisteron | + | + | + | + | - | - | - | + |
| Drospirenon | + | - | + | - | + | + | - | - |
| Desogestrel | + | - | + | ± | - | - | - | - |
| Dienogest | + | - | + | - | + | - | - | - |

PR – progesteronski receptor; ER – estrogenski receptor; AR – androgeni receptor; MKR – mineralokortikoidni receptor; GKR – glukokortikoidni receptor; SHBG – globulin za prijenos spolnih hormona; + učinak; ± slab učinak; - bez učinka

1.1.2.1. Derivati testosterona: 19-nortestosteron

Tridesetih godina 20. stoljeća uspjelo se etiliranjem testosterona proizvesti oralno aktivan i stabilan androgen etisteron, a dvadeset godina kasnije uklanjanjem ugljikovog atoma s položaja 19 stvoren je 19-noretisteron koji je zadržao svojstvo stabilnosti oralne primjene, ali više nije imao androgena već progesteronska svojstva - postao je gestagen. Strukturalno 19-noretisteron obuhvaća dvije grupe spojeva: estrane i gonane. Estrani (noretisteron i noretinodrel) imaju svojstvo vezanja za estrogenske i androgene receptore. Gonani nastaju iz potrebe za jačim gestagenima, a predstavnici su levonorgestrel, desogestrel, gestoden i norgestimat.

Levonorgestrel ima devet puta jača gestagenska svojstva od noretisterona, ali i tri puta jači androgeni učinak, dok su desogestrel, gestoden i norgestimat gestageni treće generacije sintetizirani s ciljem visoke gestagenske učinkovitosti bez androgenih svojstava (9, 10).

1.1.2.2. Derivati progesterona: 17-hidroksiprogesteron i 19-norprogesteron

Derivati 17-hidroksiprogesterona nastali su otkrićem da acetiliranjem 17-OH skupine progesterona, novonastali spojevi imaju gestagensko djelovanje i stabilni su pri oralnoj primjeni. Dodatnim acetiliranjem na položaju 6 nastao je, između ostalih, ciproteron acetat koji osim gestagenskog učinka ima jako antiandrogeno djelovanje te je pogodan za liječenje žena s hiperandrogenim poremećajima poput izraženih akni i/ili hirsutizma.

Čistim gestagenima, smatraju se derivati 19-norprogesterona koji su nastali uklanjanjem 19-C metilne skupine iz molekule progesterona. Ovi spojevi nemaju estrogensko, androgeno ili glukokortikoidno djelovanje, a predstavnici su dienogest i nesteron. U današnjim oralnim kontraceptivima koristi se dienogest koji ima i antiandrogeni učinak (9, 10).

1.1.2.3. Derivati spironolaktona

Spironolakton je diuretik, čiji sintetični analog drospirenon ima najviše farmakoloških sličnosti prirodnom progesteronu, a sastojak je zadnje generacije oralnih kontraceptiva. Antimineralokortikoidnim svojstvom suprotstavlja se aktivaciji renin-angiotenzin-aldosteron sustava pod utjecajem estrogena, smanjuje zadržavanje vode i natrija u organizmu, a zadržava kalij. Radi toga može dovesti do hiperkalemije kod žena s poremećajem funkcije bubrega,

jetre i /ili nadbubrežne žlijezde, ili pri egzogenom uzimanju kalija. Drospirenon također ima i antiandrogeno djelovanje, ali slabije od derivata 17-hidroksiprogesterona (9, 10).

1.1.2.4. Klasifikacija oralnih kontraceptiva

Klasifikacija gestagena u oralnoj kontracepciji nastala je prema vremenu izlaska na tržište, a ne prema strukturi ili osnovnoj farmakologiji. Četiri su generacije oralnih kontraceptiva (1):

- Prva generacija: oralni kontraceptivi koji sadrže 50 µg i više EE2
- Druga generacija: oralni kontraceptivi koji sadrže do 35 µg EE2, a kao gestagensku komponentu - levonorgestrel, noretindron i njegove derivate
- Treća generacija: oralni kontraceptivi koji sadrže do 30 µg EE2, a kao gestagensku komponentu desogestrel, norgestimat ili gestoden
- Četvrta generacija: oralni kontraceptivi koji sadrže do 30 µg EE2 i drospirenon kao gestagensku komponentu.

Posebno se klasificiraju derivati 17-hidroksiprogesterona, poput ciproteron acetata koji iako su na tržište izašli paralelno s drugom generacijom, nisu primarno uvršteni u oralne kontraceptive.

1.2. Tromboze i oralni kontraceptivi

Temelje za razumijevanje nastanka tromboze, dao je još prije 150 godina Rudolf Virchow, uočivši da je nastanak ugruška posljedica najmanje jednog člana trijasa: staze krvotoka, ozljede krvne žile i hiperkoagulabilnosti krvi. Prema mjestu nastanka u krvožilnom sustavu razlikujemo arterijske (arterijska okluzivna bolest s aterosklerozom, infarkt miokarda) i venske tromboze (duboke venske tromboze, plućne embolije, posttrombotički sindrom). Specifičnost tromboza kod žena koje uzimaju oralnu kontracepciju je u tome što su one uglavnom zdrave bez komorbiditeta u smislu zastoja u cirkulaciji i/ili ozljede krvne žile. Stoga je većina istraživanja usmjerena na prokoagulacijski učinak oralnih kontraceptiva. Vrlo brzo je pokazano da oralni kontraceptivi utječu na promjene kod velikog broja čimbenika sustava zgrušavanja i fibrinolize, ali i da su te promjene umjerene i upitne kliničke značajnosti.

Tablica 3. Relativni rizik (RR) razvoja tromboze prema generaciji oralnih kontraceptiva

| Komplikacija | Vrsta kontraceptiva | RR |
|--|---------------------|-----------|
| Venske trombo-embolije | 1. generacija | 8,5 |
| | 2. generacija | 2,8 |
| | 3. generacija | 2,5 – 3,1 |
| | 4. generacija | 2,7 |
| Infarkt miokarda i moždani udar | 1. generacija | 3,2 |
| | 2. generacija | 2,5 |
| | 3. generacija | 1,15 |

Odmah na početku ere uzimanja oralnih kontraceptiva, studije su povezale učinak doze estrogena u formulaciji oralnog kontraceptiva i rizik za razvoj venske tromboze, koji je za prvu generaciju kontraceptiva bio 6-8 puta veći, ovisno o studiji, nego kod žena koje nisu uzimale kontracepciju. Smanjenjem količine estrogena u oralnim kontraceptivima, smanjen je i rizik za nastanak tromboze (Tablica 3.). Današnje formulacije oralnih kontraceptiva nazivaju se nisko-estrogenskim pripravcima, a sadrže 35 µg i manje EE2. Daljnje snižavanje estrogenske komponente nije pokazalo smanjenje preostalog rizika za tromboze, a povećalo je pojavnost nuspojava poput probojnog krvarenja (3, 11). S druge strane, smatralo se da sami

gestageni ne utječu ili vrlo malo utječu na trombogeni rizik, te je njihov razvoj prvenstveno bio u smislu povećanja biološke učinkovitosti i smanjenja metaboličkih nuspojava. Međutim, studije koje su uspoređivale drugu i treću generaciju kontraceptiva, a sadržavale su jednaku količinu EE2 pokazale su da vrsta gestagena mijenja trombotički rizik (12, 13).

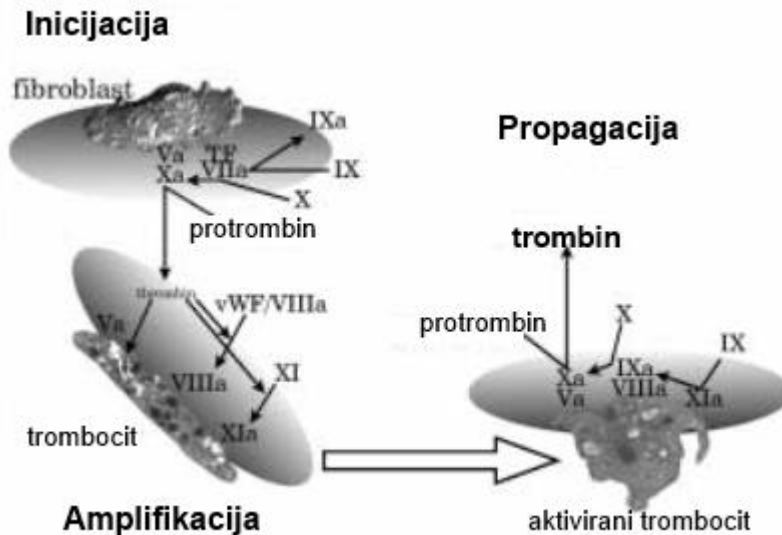
1.2.1. Ukupna estrogenost oralnog kontraceptiva

Otkriće da gestageni utječu na trombotički rizik formulacije oralnog kontraceptiva rezultiralo je izračunavanjem ukupne estrogenosti oralnog kontraceptiva. Estrogenost pripravka se povećava količinom EE2, a smanjuje anti-estrogenskim učinkom gestagena. Za mjerenje ukupne estrogenosti formulacije oralnog pripravka predložen je protein SHBG (engl. sex hormone binding globulin - globulin za vezanje spolnih hormona).

SHBG je protein koji se proizvodi u jetri, a funkcija mu je vezanje i prijenos dihidrotosterona, testosterona i estrogena (estradiola) do ciljnih tkiva. Koncentracija SHBG u krvi raste unosom estrogena, a smanjuje se unosom progesterona. Dodatno je uočena proporcionalna povezanost koncentracije SHBG i rizika od venskih tromboza uzrokovanih unosom spolnih hormona (3).

1.2.2. Utjecaj oralnih kontraceptiva na sustav hemostaze

Brojna su istraživanja izvršena s ciljem utvrđivanja učinka oralnih kontraceptiva na sustav hemostaze. Međutim, rezultati su često bili djelomični – zbog nedostatnih testova kojima bi se mjerili ovi učinci, ali i zbog nedorečenosti same teorije o sustavu zgrušavanja i fibrinolize. Dobiveni rezultati su bili najčešće unutar referentnih intervala te im se nije davao veći klinički značaj. Prvi proboj na tom polju nastao je razvojem molekularne dijagnostike i otkrićem genetičkih trombofilnih faktora poput FV Leiden i FII G20210A. Usporedo s razvojem novih dijagnostičkih mogućnosti 2001. godine Dougald Monroe i Maureane Hoffman su predstavili staničnu teoriju sustava hemostaze (Slika 3.).



Slika 3. Stanični model hemostaze. Preuzeto iz: Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:958-965.

Prema staničnoj teoriji, sustav hemostaze se odvija u tri preklapajuće faze: inicijaciji, amplifikaciji i propagaciji (14). Cilj ovog procesa je stvaranje stabilnog ugruška koji je istovremeno lokaliziran samo na mjestu ozljede krvne žile. Za pravilno odvijanje hemostaze potrebne su dvije vrste stanica – endotelne stanice krvožilnog sustava koje na sebi nose tkivni faktor (TF) i trombociti.

U fazi inicijacije ozljedom endotela krvne žile nastaje kompleks TF:FVIIa koji aktivira male količine FIX i FX. Istovremeno na kolagen s mjesta ozljede adheriraju trombociti, djelomično aktiviraju i otpuštaju FVa iz svojih α -granula. FXa također može i sam dodatno aktivirati FV. Nastaje protrombinski kompleks FXa:FVa, koji je zaštićen od antikoagulacijskog djelovanja antitrombina i inhibitora puta tkivnog faktora (TFPI) samo uz površinu stanica endotela. Ulaskom u cirkulaciju protrombinski kompleks će biti inaktiviran. Na ovaj način stvara se mala količina trombina. Međutim nastali FIXa može ući u cirkulaciju do drugih trombocita jer nije podložan inaktivaciji s TFPI, a antitrombin na njega ima znatno slabiji učinak.

U fazi amplifikacije, nastali trombin ima funkciju daljnje aktivacije trombocita, aktivaciju FV, FVIII i FXI na površini trombocita.

Faza propagacije se odvija na površini trombocita. FIXa iz faze inicijacije se veže s FVIIIa; FXIa na površini trombocita dodatno oslobađa FIXa; kompleks FIXa:FVIIIa aktivira FXa na

površini trombocita koji se odmah veže s FVa i započinje obilna proizvodnja trombina koji cijepa fibrinogen u fibrin i stvara ugrušak.

Istovremeno s prokoagulacijskim procesima odvija se i fibrinoliza gdje se pod utjecajem tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) plazminogen aktivira u plazmin i razgrađuje fibrinsku mrežicu ugruška. Glavni regulatori fibrinolize su inhibitor aktivatora plazminogena tip-1 (PAI-1) i inhibitor trombinom aktivirane fibrinolize (TAFI).

Tablica 4. Učinak oralnih kontraceptiva 2. i 3. generacije na sustav hemostaze

| | 2. generacija | 3. generacija |
|--|---------------|---------------|
| Koagulacijski čimbenici | | |
| Protrombin | ↑ | ↑ |
| Fibrinogen | ↑ | ↑ |
| FV | ↓ | ↓ |
| FVII | ↑ | ↑ |
| FVIII | ↕ | ↑ |
| FX | ↑ | ↑ |
| Antikoagulacijski čimbenici | | |
| Antitrombin | ↕ | ↓ |
| Protein C | ↑ | ↑ |
| Protein S | ↓ | ↓ |
| aPCR | ↕ | ↓ |
| Čimbenici fibrinolitičkog sustava | | |
| PAI-1 | ↓ | ↓ |
| Plazminogen | ↑ | ↑ |
| TAFI: Ag | ↑ | ↑ |

Novije studije o utjecaju oralnih kontraceptiva, potvrdile su prisutnost promjena u sustavu hemostaze u svim njenim dijelovima: prokoagulacijskom, antikoagulacijskom, fibrinolitičkom i antifibrinolitičkom (Tablica 4.). Međutim, zapažene promjene nisu bile jednakoznačne za sve oralne kontraceptive niti za istu formulaciju oralnog kontraceptiva u različitim populacijama.

1.2.3. Trombofilije i oralni kontraceptivi

Nasljedne trombofilije su predispozicije za razvoj tromboza. Do sredine 1990-tih i razvoja molekularne dijagnostike jedini poznati nasljedni oblici trombofilija bili su manjak antitrombina, proteina C (PC) i proteina S (PS) čija je prevalencija u općoj populaciji oko 1%. Razvojem molekularne dijagnostike otkrivene su mutacija FV G1691A (FV Leiden), mutacija FII G20210A, polimorfizam PAI-1 4G/5G, mutacija enzima metilentetrahidrofolat reduktaze MTHFR C677T, FXIII Val34Leu i dr. Istraživanja su ukazala i na povezanost tromboza i

povišene aktivnosti FVIII. Ubrzo su prve studije povezanosti novootkrivenih oblika trombofilije i oralnih kontraceptiva ukazale na dramatično povećanje rizika za obolijevanje od trombo-embolijskih bolesti kod pojedinih oblika trombofilija (15-18) (Tablica 5.).

Tablica 5. Relativni rizik (RR) za razvoj tromboze kod trombofilija sa i bez uzimanja oralne kontracepcije (OK)

| Trombofilija | RR sa OK | RR bez OK |
|------------------------------|-----------------|------------------|
| Bez trombofilije | 3,1 | 1 |
| FV Leiden | 15,62 | 3,78 |
| FII G20210A | 6,09 | 1,34 |
| FV Leiden+FII G20210A | 7,85 | 4,03 |
| Manjak proteina S | 4,88 | 5,31 |
| Manjak proteina C | 6,33 | 2,45 |
| Manjak antitrombina | 12,6 | 3,18 |
| Povišen FVIII | 8,80 | 4,56 |

1.2.3.1. Manjak antitrombina

Antitrombin (AT) u sustavu hemostaze je primarni antikoagulacijski čimbenik s višestrukim učincima: inhibicija trombina (FIIa), FXa i FIXa, ali i inhibirajući utjecaj na FXIIa, FXIa i kompleks TF:FVIIa. U spoju s heparinom, svoje antikoagulacijsko djelovanje višestruko pojačava.

Manjak antitrombina u pravilu je nasljedan, iako su moguća stanja (bolesti) koja dovode do smanjenja razine antitrombina u organizmu radi njegove ubrzane potrošnje (sepsa, diseminirana intravaskularna koagulopatija, masivna krvarenja). Prirođeni manjak antitrombina, najčešće se nasljeđuje autosomno dominantno, ali ima i varijanti koje se nasljeđuju kao recesivno svojstvo. Manjak antitrombina se fenotipski može izraziti, smanjenom aktivnosti antitrombina i koncentracijom antigena u plazmi (Tip I), ili smanjenom aktivnosti antitrombina, a normalnom koncentracijom antigena (Tip II).

Dokazane su mnoge mutacije (>100), a najvažnije su one koje zahvaćaju reaktivno mjesto za serinske proteaze, vezno mjesto za heparin ili zbog preranog STOP kodona nastali proteini imaju smanjene kvantitativne i kvalitativne značajke.

Prevalencija manka antitrombina u općoj populaciji iznosi od 0,02-1,1% ovisno o etničkoj pripadnosti. Kod osoba oboljelih od trombo-embolijskih bolesti prevalencija je oko 4%. Homozigotni oblik tipa I nije spojiv sa životom.

1.2.3.2. Manjak proteina C

Uloga proteina C u sustavu hemostaze je antikoagulacijska - inaktivacija FVa i FVIIIa uz protein S kao koenzim na membrani aktiviranih trombocita. Pod utjecajem trombina, trombomodulin aktivira protein C. Manjak proteina C pomiče težište sustava hemostaze prema prokoagulacijskom stanju.

Manjak proteina C opisan je 1981. godine, a može biti posljedica smanjenog stvaranja - kvantitativan (Tip I) ili nastanak nefunkcionalne molekule proteina C - kvalitativan (Tip II) radi čega ne može doći do odgovarajućih veza s trombomodulinom, FVa, FVIIIa, fosfolipidima i dr. (19).

Prevalencija manjka proteina C u općoj populacije je oko 0,2%, a homozigotna mutacija uzrokuje purpuru fulminans, oboljenje karakterizirano stvaranjem brojnih ugrušaka u organizmu.

1.2.3.3. Manjak proteina S

Protein S u sustavu hemostaze djeluje kao koenzim proteina C, njegov manjak je prepoznat i opisan 1984. godine, nedugo nakon otkrića manjka proteina C. U krvotoku su prisutna dva oblika proteina S – slobodni i vezan na proteinski nosač Cb4 (engl. C4b-binding protein). Samo slobodan oblik proteina S može se vezati s aktiviranim proteinom C na površini trombocita. Manjak proteina S pomiče radi toga težište hemostaze u prokoagulacijsko stanje (20).

Manjak proteina S može biti trojak: tip I – nedovoljna koncentracija proteina S u slobodnom i vezanom obliku, tip II – poremećaj u građi molekule proteina S koja nema punu funkcionalnost i tip III – nedostatna koncentracija samo slobodnog oblika proteina S, dok je koncentracija ukupnog proteina S unutar referentnog intervala.

Prevalencija manjka proteina S u općoj populaciji zbog problema u dijagnostici nije poznata, ali studija na škotskim darivateljima krvi pokazala je prevalenciju od 0,03-0,13%, dok je prevalencija kod oboljelih od dubokih venskih tromboza 1-13%, ovisno o etničkim razlikama, ali i odabiru testova u studijama (21).

1.2.3.4. FV Leiden (c. 1691G>A, p.Arg506Gln)

FV je važan čimbenik koagulacije jer aktiviran FV u spoju s aktiviranim FX ima glavnu ulogu u pretvorbi protrombina u trombin. Proizvodi se u jetri, a inaktivira djelovanjem proteina C na dvije glavne pozicije – nakon arginina na poziciji 306 koje je sporije i nakon arginina na poziciji 506 u peptidnom lancu koje je višestruko brže. Uzrok pojave rezistencije FVa na antikoagulacijsko djelovanje proteina C u koagulacijskoj kaskadi je u točkastoj mutaciji na genu za FV. Mutaciju predstavlja zamjena gvanina adeninom na položaju 1691 nukleotidnog niza, što ima za posljedicu zamjenu kodnog tripleta za arginin (CGA) kodnim tripletom za glutamin (CAA) na položaju 506 peptidnog lanca. Ovako kodiran peptid FV ima jednaku funkcionalnost u prokoagulacijskom djelovanju, ali smanjenu osjetljivost prema proteinu C, što je posljedično pomaknulo težište sustava hemostaze prema prokoagulacijskom stanju.

Mutacija se nasljeđuje autosomno dominantno, a prevalencija FV Leiden u općoj populaciji je različita, 2-15% u bijeloj rasi (češća je na sjeveru nego jugu Europe) (22).

Poznate su i druge inačice mutacija na genu FV s učinkom smanjene osjetljivosti na djelovanje proteina C (FV Cambridge, FV Hong Kong, FV Liverpool), ali su one puno rjeđe.

1.2.3.5. FII G20210A (c. *97G>A)

Protrombin (FII) je glavni čimbenik u stvaranju ugruška. Stvara se u jetri, a pod djelovanjem kompleksa FXa/FVa aktivira se u FIIa, odnosno trombin. Uloga trombina je vrlo složena, te se može podijeliti na:

- prokoagulacijsko djelovanje – pretvara fibrinogen u fibrin, aktivira FXIII – stabilizacija fibrinske mrežice, aktivira FV i FVIII čime se pojačava pretvorba protrombina u trombin; vezanjem na receptor aktiviranih proteaza (PAR) i cijepanjem GpVa od GpIb-IX-V kompleksa potiče aktivaciju trombocita, pojačava njihovu adheziju i agregaciju
- antikoagulacijsko djelovanje – u spoju s trombomodulinom pojačava djelovanje proteina C, aktivira TAFI
- antifibrinolitičko djelovanje – aktivacijom TAFI smanjuje aktivaciju plazminogena
- pro-upalno djelovanje – vezanjem s PAR potiče aktivaciju trombocita, pojačava staničnu signalizaciju
- protu-upalno djelovanje – TAFI inaktivira sustav komplementa na razini C5a

1996. godine otkrivena je točkasta mutacija u genu koji kodira FII, kod koje je na položaju 20210 gvanin zamijenjen adeninom. Posljedica mutacije je i do 30% povećano stvaranje protrombina što je dovodi do pomicanja težišta hemostaze prema prokoagulacijskom stanju. Prevalencija ove mutacije u općoj populaciji među bijelcima je oko 2-4%, a homozigoti za ovu mutaciju su vrlo rijetki (23).

1.2.3.6. Polimorfizam PAI-1 5G/4G

Inhibitor aktivatora plazminogena tip-1 (PAI-1) je glavni regulator fibrinolize. Regulirajući aktivaciju plazminogena u plazmin, kontrolira razgradnju fibrina u ugrušku. Radi toga njegova povećana proizvodnja može poremetiti odstranjenje fibrina, te dovesti do njegovog taloženja i nastanka trombo-embolijskih događaja. Njegovu proizvodnju kodira gen PAI-1 na kromosomu 7q22. Na promotorskoj regiji gena nađen je polimorfizam uslijed delecije točkaste mutacije na položaju -675b, gdje jedan alel sadržava 4 gvanina (4G) u nizu, a drugi 5 gvanina (5G) u nizu. Oba tipa imaju vezno mjesto za aktivatora transkripcije, ali samo polimorfizam 5G ima i dodatno vezno mjesto za represora-blokatora transkripcije, što rezultira nižim brojem transkripcija odnosno manjom količinom sintetiziranog PAI-1.

PAI-1 proizvodi se u različitim organima i tkivima – jetri, slezeni, masnim stanicama i endotelnim stanicama, a sinteza je dodatno regulirana različitim spojevima poput glukoze, inzulina i lipida (24).

Studije koje su istraživale utjecaj ovog polimorfizma na arterijsku ili vensku trombozu donijele su kontroverzne rezultate. Čini se da sam polimorfizam nema klinički značaj, ali uz prisutnost bolesti koje potiču proizvodnju PAI-1 ili drugih trombofilija pojačava rizik obolijevanja od trombo-embolijske bolesti (25).

1.2.4. Ostali čimbenici rizika razvoja tromboze i oralni kontraceptivi

Osim izravnih učinaka oralnih kontraceptiva na sustav hemostaze, rizik za trombo-embolijske bolesti mijenjaju određene navike, fiziološka stanja i bolesti poput visokog tlaka, pušenja, konzumacije alkohola, povećane tjelesne mase, starosne dobi, fizičke aktivnosti, ali i etničke pripadnosti.

Pušenje pogoduje razvoju arterijske i/ili venske tromboze putem oštećenja stijenke krvne žile, pojačavanjem upalnog stanja i povećanjem aktivnosti fibrinogena. Sinergistički djeluje s oralnim kontraceptivima u povećanju rizika od tromboza (26). Relativni rizik pušenja za razvoj venske tromboze je 1,2-1,4, a arterijske tromboze 2,5-3,5, ovisno o studiji, rizik se povećava do 15 puta kod uzimanja oralnih kontraceptiva za arterijske tromboze (27).

Mehanizam učinka debljine na povećani rizik za trombozu nije točno poznat. Teorije se najviše slažu o kombiniranom učinku smanjene pokretljivosti pretilih osoba i mase na stjenku venskog sustava s posljedičnim usporavanjem protoka i razvojem venske staze (28, 29). Međutim, studije ukazuju na povezanost debljine i koncentracije FVIII, kao i utjecaj masnog tkiva na povećanu proizvodnju tkivnog faktora. U masnom tkivu se događa i pretvorba androgena u estrogen, što dodatno povisuje razinu estrogena u organizmu, a time je povećano stvaranje ostalih koagulacijskih čimbenika (poglavlje 1.1.1.) (27). Jedan od načina izražavanja tjelesne mase osoba je indeks tjelesne mase - BMI (engl. body mass index) koji se izračunava kao omjer tjelesne mase u kilogramima i kvadrata visine izražene u metrima, odnosno $BMI = \text{kg/m}^2$. Relativni rizik za razvoj venske i /ili arterijske tromboze za pretilo osobe ($BMI > 26$) je oko 2,0, a ako uzimaju oralne kontraceptive relativni rizik se poveća do 11,6 puta u odnosu na osobe normalne tjelesne mase ($BMI < 25$) bez oralne kontracepcije (29).

Starenjem organizma eksponencijalno raste rizik obolijevanja od trombo-embolijskih bolesti, a rizik osobito raste nakon 45 godine. Mogući mehanizam je kumulativno djelovanje promjena na stjenkama arterija, smanjene pokretljivosti osobe s posljedičnom venskom stazom, te promjene u sustavu hemostaze vezane uz starenje organizma: povećanje aktivnosti FV, FVII, FVIII, FIX i fibrinogena, ali i von Willebrandova čimbenika (vWF) kao ključnog proteina u adheziji trombocita na krvnu žilu (30).

Alkohol ima antikoagulacijski učinak kod kardiovaskularnih bolesti (31) i venskih tromboza. Učinak je najizraženiji pri umjerenoj konzumaciji (količina alkohola oko dvije čaše vina) kada smanjuje aktivnost fibrinogena, FVII i vWF (32).

Tjelesna aktivnost ima dvojak učinak na sustav hemostaze. Neredovito intenzivno vježbanje ima prokoagulacijski učinak, dok redovito vježbanje ima antikoagulacijski i fibrinolitički učinak (Tablica 6.). Učinak oralnih kontraceptiva poništava fibrinolitički učinak vježbanja, te su žene izloženije prokoagulacijskom učinku vježbanja (32).

Tablica 6. Učinak vježbanja na sustav hemostaze

| | Redovito vježbanje | Povremeno intenzivno vježbanje |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Fibrinogen | ↓ | ↑ |
| FVII | ↓ | ↔ |
| tPA | ↑ | ↓ |
| PAI-1 | ↓ | ↓ |
| Aktivacija trombocita | ↓ | ↑ |
| Stvaranje trombina | Nije poznato | ↑ |

Etnička pripadnost na više razina mijenja rizik od trombo-embolijskih bolesti, te utječe na rizik od tromboza kod uzimanja oralnih kontraceptiva.

Prevalencija nasljednih trombofilija je različita – npr. za FV Leiden od 15 % na sjeveru Europe do 2% na jugu Europe.

Studije su potvrdile različite razine čimbenika hemostaze među etnički različitim skupinama – najviše se razlikuju u aktivnostima fibrinogena, FVII, FVIII i plazminogena (33).

U literaturi je dobro opisan utjecaj polimorfizma P450 CYP2C9 i VKORC1 u terapiji oralnim antikoagulacijskim lijekom varfarinom, te njihovu različitu raspodjelu među etničkim skupinama (34).

Faktori specifični za regiju poput stupnja izloženosti operativnim zahvatima s većim rizikom od tromboza, debljina, prevalencija pušača, primjena hormonalne terapije čine dio ukupnog etničkog rizika za trombo-embolijsku bolest (35).

1.3. Nekontracepcijski učinci oralne kontracepcije

Nekontracepcijski učinci oralne kontracepcije, bilo pozitivni ili negativni, posljedica su utjecaja primarno na reprodukcijski sustav žene, ali i na druge organske sustave poput mozga, bubrega, kože i dr. Radi toga je procijenjeno da oko 20% žena uzima oralne kontraceptive kao lijek za druga stanja i bolesti od kojih su najznačajnija smanjenja rizika za vanmaternične trudnoće 90%, disfunkcionalna krvarenja 70%, predmenstrualni sindrom 60%, menometroragije 50%, funkcionalne ciste jajnika 50-70%, akne 70-90%, hirzutizam 50%, dobroćudne promjene u dojci 40%, osteoporoza 25% (36).

Također vrlo važan učinak je i smanjenje rizika za razvoj zloćudnih bolesti – a studije su dokazale smanjenje rizika za 40-80% zloćudnih tumora jajnika, endometrija i debelog crijeva.

Stupanj zaštitnog djelovanja oralnih kontraceptiva proporcionalan je duljini uzimanja.

Međutim, osim dodatne koristi uzimanja oralnih kontraceptiva, postoje uz, opće poznati protrombotički rizik, i drugi neželjeni učinci - povećani rizik od bolesti žučnog mjehura, hepatocelularnog karcinoma (iako postoje kontradiktorne studije zbog malog broja ispitanica jer unatoč povećanju broja žena koje uzimaju oralnu kontracepciju nema porasta hepatocelularnog karcinoma u apsolutnim brojevima - podaci za SAD) i raka grlića maternice - ali novije studije više ističu utjecaj Humanog papiloma virusa i vrijeme stupanja u spolne odnose kao čimbenik rizika (18, 37, 38).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U Hrvatskoj je do 2008. godine oralnu kontracepciju koristilo oko 80.000 žena (8,5%), ali je nakon širenja panike izazvane trombo-embolijskim incidentom taj broj drastično pao te danas se procjenjuje da svega 56.000 ili 5% žena generativne dobi (između 15 i 49 godina) uzima oralnu kontracepciju.

Oralna kontracepcija koristi se preko 50 godina, njenu primjenu i razvoj prate brojne studije - javno zdravstvene, epidemiološke, ginekološke, onkološke, farmakološke, laboratorijske s posebnim osvrtom na koagulacijsku problematiku. Time su oralni kontraceptivi postali jedan od najistraživanijih farmaceutskih pripravaka današnjice. Činjenica je da su oralni kontraceptivi jedan od rizika za razvoj trombo-embolijskih bolesti te da se relativni rizik kreće od 1,15 do 8,5 ovisno o generaciji kontraceptiva i obliku trombo-embolijske bolesti.

Utjecaj oralne kontracepcije na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize obrađen je u mnogim studijama s različitih aspekata poput procjenjivanja rizika od trombo-embolijskog događaja, opravdanosti rutinskog pretraživanja na nasljednu trombofiliju, zatim povezanosti oralne kontracepcije s dodatnim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima poput pušenja, debljine, fizičke aktivnosti, povišenog krvnog tlaka, povišenih masnoća u krvi, šećerne bolesti i dr. Veliki broj radova je ukazao i na različit utjecaj oralne kontracepcije na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize s obzirom na sastav kontraceptiva i količinu estrogena i/ili progesterona u njima.

1991. godine Leck i sur. (33), objavili su rezultate multicentrične studije utjecaja oralne kontracepcije na hemostazu s obzirom na zemljopisnu lokaciju i etničku pripadnost. Zaključak studije je da isti pripravci oralnih kontraceptiva imaju različiti utjecaj na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize u različitim populacijama, a time i različiti rizik za trombo-embolijske komplikacije.

Razvoj laboratorijskih pretraga, njihova pristupačnost, smanjenje cijene pretraga, novi načini i područja primjene oralnih kontraceptiva, nove farmaceutske formulacije, kao i novi farmaceutski spojevi steroidnih hormona razlog su novim i daljnjim istraživanjima kako u velikim globalnim studijama, tako i u studijama koje ukazuju na lokalne razlike u primjeni oralnih kontraceptiva.

2.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je utvrđivanje utjecaja hormonalnih pripravaka za oralnu kontracepciju na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize u lokalnoj populaciji.

Specifični zadaci bili su slijedeći:

- određivanje aktivnosti čimbenika zgrušavanja i fibrinolize ovisno o količini i hormonalnom sastavu korištene oralne kontracepcije
- određivanje aktivnosti čimbenika zgrušavanja i fibrinolize u odnosu na postojanje nasljednih mutacija
- utvrđivanje postojanja razlike među ispitanicama u dobivenim vrijednostima aktivnosti čimbenika zgrušavanja i fibrinolize u odnosu na prisutnost dodatnih čimbenika rizika za trombo-embolijske bolesti - poput pušenja, debljine, dobi i sl.

Tema je obranjena 29.06.2009. pred Povjerenstvom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, a potvrđena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 10.06.2010.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci krvi ispitanica

U istraživanje je bilo uključeno 227 žena upućenih iz ordinacija opće ginekologije, a koje su pristale uzimati najmanje šest ciklusa odabranog oralnog kontraceptiva, na dobrovoljno testiranje u Djelatnost za transfuzijsku medicinu Županijske bolnice Čakovec, u razdoblju od lipnja 2009. godine do veljače 2011. godine.

Kriteriji uključivanja bili su: ispitanica prvi puta koristi oralnu kontracepciju ili ispitanica nije koristila oralnu kontracepciju najmanje tri mjeseca prije uključivanja u studiju. Ovaj podatak je važan jer je ovo razdoblje potrebno da se izgubi utjecaj kontraceptiva na rezultate pretraga čime se osigurava da sve ispitanice u početnom testiranju zadovolje status nultog uzorka – odnosno da početni rezultati pretraga odgovaraju njihovom osnovnom fiziološkom stanju bez utjecaja oralne kontracepcije, te da se odvoje kao skupine ispitanice koje su već uzimale kontracepciju od ispitanica koje ih uzimaju prvi puta (39).

Kriterij isključivanja: prisutnost kontraindikacije za korištenje oralne kontracepcije.

Tijekom istraživanja 32 ispitanice su bile isključene iz istraživanja:

- 21 ispitanica zbog preranog prekida uzimanja oralnih kontraceptiva
- 4 ispitanice nisu počele s uzimanjem oralnih kontraceptiva nakon vađenja početnog (nultog) uzorka krvi
- 6 ispitanica nije poštovalo protokol (nije se na javilo u vrijeme određeno za vađenje slijedećeg uzorka krvi)
- 1 ispitanica je nakon vađenja prvog uzorka krvi saznala za trudnoću.

Stopa isključivanja iz studije time iznosi 14% što je u skladu s podacima sličnih studija.

Ukupno 195 ispitanica je bilo uključeno tijekom cijele studije. Osnovne značajke ispitanica prikazane su u Tablici 7.

Uzorci krvi ispitanica vađeni su u tri vremenske točke:

- početni uzorak krvi – prije početka uzimanja oralnih kontraceptiva - Uzorak 1
- uzorak nakon tri ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva (tijekom pauze ili placebo tableta) - Uzorak 2

- o uzorak nakon šest ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva (tijekom pauze ili placebo tableta) - Uzorak 3

Svi uzorci krvi vađeni su ispitanicama natašte, ujutro između 8.00 i 10.00 sati, u Vacutest® epruvetu s 3,2%-tnim Na-citratom.

Ispitanicama su u prvoj vremenskoj točki izvađena dva uzorka krvi – jedan za koagulacijske pretrage i drugi za molekularno ispitivanje, dok je u drugoj i trećoj vremenskoj točki vađen uzorak krvi samo za koagulacijske pretrage.

Svi uzorci krvi za koagulacijske pretrage su, nakon vađenja, dva puta centrifugirani na 2500G tijekom 10 minuta, a zatim je, unutar jednog sata od uzorkovanja, po 1 ml plazme siromašne trombocitima raspodijeljen u plastične epruvete (Eppendorf microtubes) i pohranjen na -25°C do analiziranja u seriji. Vrijeme između vađenja krvi i provođenja analize iznosilo je najviše 4 tjedna.

Tablica 7. Značajke ispitanica na početku studije

| Značajka | N (%) |
|--|--------------------------|
| Dob (godine, $\bar{x} \pm SD$, raspon) | 23,51±6,16 (15-43) |
| <18 | 20 (10,3%) |
| 18-25 | 120 (61,5%) |
| 26-30 | 27 (13,8%) |
| >30 | 28 (14,4%) |
| BMI (kg/m², $\bar{x} \pm SD$, raspon) | 21,83±3,03 (16,85-36,33) |
| <18,50 | 14 (7,2%) |
| 18,50-24,99 | 159 (81,5%) |
| 25,00-29,99 | 17 (8,7%) |
| ≥30 | 5 (2,6%) |
| Pušenje: | |
| DA | 58 (29,7%) |
| NE | 137 (70,3%) |
| Uzimanje OK: | |
| Prvi puta | 114 (58,5%) |
| Više puta | 81 (41,5%) |
| Ranije trudnoće: | |
| DA | 58 (29,7%) |
| Pobačaj | 21 (36,2%) |
| NE | 137 (70,3%) |

BMI-indeks tjelesne mase; N-broj uzoraka; \bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

3.1.1.1. Etički aspekt studije

Sve ispitanice dale su pismeni pristanak za sudjelovanje u studiji.

Dodatni pismeni pristanak najmanje jednog roditelja (skrbnika), bio je obavezan za sudjelovanje maloljetnih ispitanica u studiji.

Protokol za izvođenje studije odobren je od etičkih povjerenstava Županijske bolnice Čakovec i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Upitni listići

U studiji su korištene dvije vrste upitnih listića: pri prvom vađenju uzorka krvi - opširan upitnik o ispitanici i eventualnim stanjima i bolestima koje bi mogli dodatno utjecati na rezultate; pri drugom i trećem vađenju uzorka krvi - upitnik kojim se prate promjene podataka, vrsta i nuspojave oralne kontracepcije (Prilog 2 i Prilog 3).

3.2. Metode

Nakon općeg ginekološkog pregleda, te odluke ispitanice o korištenju oralne kontracepcije, ginekolog je, prije upućivanja na dobrovoljno sudjelovanje u studiji, predložio ispitanici nekoliko različitih oralnih kontraceptiva, a ispitanica bi sama učinila odabir.

Podaci potrebni za provedbu istraživanja prikupljeni su na slijedeće načine:

- putem upitnih listića
- analizom uzoraka krvi na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize
- analizom uzoraka krvi molekularnim ispitivanjima prisutnosti nasljednih trombofilnih mutacija

3.2.1. Upitni listići

Upitnim listićima prikupljeni su anamnestički podaci ispitanica (Prilog 2 i Prilog 3).

Prvi upitni listić koristio se kod početnog vađenja uzorka krvi prije uporabe oralnih kontraceptiva, a sadržavao je podatke o:

- crtičnom kodu ispitanice,
- dobi, težini i visini koja se preračunava u BMI,
- broju trudnoća, poroda i pobačaja,
- lijekovima i pripravcima koje ispitanica uzima,
- konzumiranju alkohola (preračunata količina na tjednoj osnovi),
- pušenju (broj cigareta tjedno),
- rekreaciji (sati/tjedan),
- postojanju težih oboljenja kod ispitanice (hipertenzija, povišene masnoće, tromboze, bolesti vena, srčane bolesti, jetrene bolesti, bubrežne bolesti, šećerna bolest, maligne bolesti i/ili operativni zahvati u zadnjih godinu dana),
- ranijem korištenju oralne kontracepcije, i ako da – kada.

Drugi upitni listić koristio se nakon tri (šest) ciklusa oralnih kontraceptiva, a sadržavao je:

- crtični kod ispitanice,
- podatke o dobi, težini i visini koja se preračunava u BMI,
- podatak o vrsti korištene kontracepcije,

- napomenu o promjenama u odnosu na prethodno vađenje krvi - nuspojavama, promjenama stila života, lijekovima i slično.

3.2.2. Analiza uzoraka krvi na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize

Svi prikupljeni uzorci krvi ispitanica testirani su na Djelatnosti za transfuzijsku medicinu, Županijske bolnice Čakovec, na automatiziranom koagulometru Behring Coagulation System (BCS) proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics, Njemačka. Svi uporabljeni reagensi također su od istog proizvođača.

Odabrane su pretrage koje se rutinski izvode u laboratorijima, te je time povećana pouzdanost i reproducibilnost rezultata, a ujedno se dobiva informacija nužna kliničarima o utjecaju oralnih kontraceptiva na rutinske pretrage hemostaze.

U sve tri vremenske točke studije, uzorci krvi analizirani su slijedećim načinom, pretragama i reagensima – Tablica 8.:

Tablica 8. Pretrage sustava hemostaze korištene u studiji

| Naziv pretrage | Uzorak | Reagens | Metoda | Referentni interval |
|---|------------------|--------------------------|--|---------------------|
| Opće koagulacijske pretrage: | | | | |
| Protrombinsko vrijeme | Svježa plazma | Thromborel® S | koagulometrijska | 10,0-15,0 s |
| Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme | Svježa plazma | Actin FS | koagulometrijska | 23,0-31,9 s |
| Fibrinogen | Svježa plazma | Multifibren U | koagulometrijska | 2,1-4,0 g/L |
| Specifične pretrage zgrušavanja: | | | | |
| FVIII | Otopljena plazma | FVIII Chromogenic Assay | fotometrijska s kromogenim supstratima | 50-150 % |
| Protein S | Otopljena plazma | Protein S Ac | koagulometrijska | 59-118 % |
| Protein C | Otopljena plazma | Berichrom Protein C | fotometrijska s kromogenim supstratima | 70-140 % |
| Rezistencija na aktivirani protein C | Otopljena plazma | ProC AcR | koagulometrijska | omjer >1,8 |
| Antitrombin | Otopljena plazma | Berichrom AT III | fotometrijska s kromogenim supstratima | 75-125 % |
| Specifične pretrage fibrinolize: | | | | |
| D-dimeri | Svježa plazma | D-dimer Innovance | imunoturbidimetrijska | <550 µg/L FEU |
| Plazminogen | Otopljena plazma | Plasminogen | fotometrijska s kromogenim supstratima | 75-150 % |
| Inhibitor plazmina | Otopljena plazma | Berichrom α2-antiplasmin | fotometrijska s kromogenim supstratima | 80-120 % |
| Inhibitor aktivatora plazminogena tip-1 | Otopljena plazma | Berichrom PAI | fotometrijska s kromogenim supstratima | 2,0-7,0 U/mL |

3.2.2.1. Protrombinsko vrijeme

Protrombinsko vrijeme (PV) određeno je metodom po Quick-u pomoću reagensa Thromborel® S. Zgrušavanje uzorka plazme postiže se inkubacijom s odgovarajućom količinom tromboplastina i kalcija. Određivanjem PV-a dobiva se informacija o vanjskom putu zgrušavanja, koji obuhvaća FII, FV, FVII, FX i fibrinogen. Za mjernu jedinicu u provedbi studije odabrana je sekunda, a ne omjer ili INR kako bi se što preciznije uočile razlike u mjernim točkama ili prema grupi oralnih kontraceptiva. Referentni interval iznosi 10,0-15,0 sekundi.

3.2.2.2. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) određivano je metodom aktivacije zgrušavanja pomoću reagensa Actin FS uz dodatak otopine CaCl₂, 0,025 mol/L. Produžena vrijednost APTV-a upućuje na poremećaje u unutrašnjem putu zgrušavanja, ali za uredan nalaz potrebna je zadovoljavajuća funkcija i drugih koagulacijskih čimbenika: FI, FII, FV, FVIII, FIX, FX, FXI i FXII. Referentni interval iznosi 23,0-31,9 sekundi.

3.2.2.3. Fibrinogen

Aktivnost fibrinogena je određena metodom po Clauss-u. Dodatkom suviška trombina uzorku plazme nastaje ugrušak. Stvaranje ugruška ovisi isključivo o aktivnosti fibrinogena u mjenom uzorku plazme. Pretraga je izvedena pomoću reagensa Multifibren U. Fibrinogen je protein upalne faze i aktivnost je povišena nakon operacija, trauma, infarkta miokarda, tijekom trudnoće, infekcija, zloćudnih oboljenja. Snižena aktivnost fibrinogena prisutna je kod nasljedne ili stečene hipofibrinogenemije (ili afibrinogenemije): stanje diseminirane intravaskularne koagulopatije, fibrinolize, bolesti jetre, krvarenja, ubrzane razgradnje kod zloćudnih bolesti. Referentni interval iznosi 2,1-4,0 g/L.

3.2.2.4. FVIII

Aktivnost FVIII određena je kromogenom metodom pomoću FVIII Chromogenic Assay. Aktivacijom FVIII u FVIIIa ubrzava se aktivacija FX u FXa u prisutnosti FIXa, fosfolipida i kalcija. Aktivnost FXa određuje se hidrolizom specifične boje (p-nitroanilid), a količina

oslobođene boje proporcionalna je aktiviranom FX, odnosno aktivnosti FVIII. Snižena aktivnost upućuje na hemofiliju A, recesivno nasljedni nedostatak FVIII vezan uz X kromosom s kliničkom slikom krvarenja. Međutim, povišena aktivnost FVIII povezuje se uz trombo-embolijska oboljenja. Referentni interval iznosi 50-150%.

3.2.2.5. Protein C

Aktivnost proteina C mjeri se aktivacijom pomoću zmijskog otrova. Pretvorba u aktivirani PC mjeri se promjenom boje kromogenog supstrata (nitro anilinska boja) iz reagensa Berichrom Protein C, pod djelovanjem nastalog PCa. Protein C proizvodi se u jetri i ovisan je o prisutnosti vitamina K. Zajedno s kofaktorom proteinom S ima antikoagulacijsko djelovanje i regulator je aktivnosti FV i FVIII. Manjak PC povezan je s ozbiljnim trombo-embolijskim bolestima. Referentni interval iznosi 70-140%.

3.2.2.6. Protein S

Aktivnost proteina S mjeri se ubrzanjem aktivacije zgrušavanja cijepanjem FVa od strane PCa nastale pod utjecajem zmijskog otrova iz reagensa Protein S Ac. PS je kofaktor PCa, te je ubrzanje zgrušavanja proporcionalno količini PS u uzorku plazme. Dodavanjem plazme bez PS osigurava se da u uzorku ima dovoljno drugih čimbenika zgrušavanja potrebnih za nastanak ugruška (FV, fibrinogen, FX). Manjak PS može biti nasljedan, ali i stečen kod jetrenih bolesti, oralne kontracepcije, trudnoće, estrogenske terapije, povišene razine komplementa C4b kao proteina akutne faze. Posljedica snižene aktivnosti PS je razvoj trombo-embolijskih bolesti. Referentni interval iznosi 59-118%.

3.2.2.7. Rezistencija na aktivirani protein C

Rezistencija na aktivirani protein C (aPCR) je pretraga pretraživanja na FV Leiden. Izvodi se metodom aktivacije PC u plazmi, a nakon toga i FX pomoću zmijskih otrova. FXa je vrlo osjetljiv na učinak PCa na FV, te se vrijeme zgrušavanja produžava 2-3 puta u odnosu na plazmu bez aktivatora. Kod prisutnosti FV Leiden - vrijeme zgrušavanja je produženo do 1,8 puta. Pretraga je izvedena pomoću reagensa ProC[®]AcR. Radi izbjegavanja utjecaja poremećaja ostalih čimbenika koagulacijskog puta rezultat pretrage se izražava omjerom

vremena zgrušavanja aktivirane plazme i vremena zgrušavanja plazme bez aktivatora. Referentni interval aPCR>1,8.

3.2.2.8. Antitrombin

Antitrombin (AT) je inhibitor trombina (FIIa), te djeluje antikoagulacijski. Aktivnost antitrombina mjeri se aktivacijom pomoću heparina i njegovim učinkom na supstrat trombin. Ostati trombin cijepa kromogeni supstrat, a količina razvijene boje obrnuto je proporcionalna aktivnosti antitrombina. Pretraga je izvedena pomoću reagensa Berichrom Antithrombin III(A). Smanjena aktivnost AT predstavlja povećani rizik za trombo-embolijske bolesti, a osim nasljednog oblika, manjak može biti prisutan kod velikih operativnih zahvata, diseminirane intravaskularne koagulopatije, sepse, nekroze tkiva, uzimanja oralnih kontraceptiva i dr. Referentni interval iznosi 75-125%.

3.2.2.9. D-dimeri

D-dimeri su raspadni produkti fibrinske mrežice nastali u procesu fibrinolize. Koncentracija d-dimera određuje se imunoturbidimetrijskom metodom - čestice polistirena obložene monoklonalnim protutijelom 8D3 agregiraju u spoju s d-dimerima koji imaju stereosimetričnu strukturu te mogu vezati protutijela na dva mjesta. U izvođenju pretrage koristio se Innovance D-dimer. Vrijednosti d-dimera su povišene kod stanja povećane koagulacijske aktivnosti: trombo-embolijske bolesti, diseminirane intravaskularne koagulopatije, akutne aortalne disekcije, infarkta miokarda, zloćudnih oboljenja, postoperativno, posttraumatski, tijekom trudnoće ili komplikacija u trudnoći i porodu. Referentni interval iznosi < 550 µg/L FEU (engl. Fibrinogen Equivalent Unit).

3.2.2.10. Plasminogen

Plasminogen je neaktivni oblik plazmina koji proteolitički cijepa fibrin u procesu fibrinolize. Aktivacija plasminogena u plasmin nastaje djelovanjem aktivatora - urokinaze (uPA) ili tkivnog aktivatora plasminogena (tPA), odnosno egzogene streptokinaze. Aktivnost plasminogena određuje se mjerenjem kompleksa plasminogen-streptokinaza koji djeluje na kromogeni supstrat promjenom boje iz reagensa Berichrom Plasminogen. Povećana aktivnost plasminogena je opisana kod zloćudnih oboljenja i šećerne bolesti. Snižena aktivnost

plazminogena je povezana s diseminiranom intravaskularnom koagulopatijom, jetrenim bolestima i u trombolizi. Referentni interval iznosi 75-150%.

3.2.2.11. Inhibitor plazmina

Inhibitor plazmina (stariji naziv α 2-antiplazmin) je glavni regulator fibrinolitičkog puta, stvarajući s plazminom ireverzibilan neaktivan spoj. Mjerenjem učinka ostatnog plazmina na kromogeni supstrat iz reagensa Berichrom Antiplasmin u uzorku plazme, dobiva se podatak o količini inaktiviranog inhibitora plazmina. Aktivnost inhibitora plazmina je smanjena u stanjima hiperfibrinolize koje mogu dovesti do diseminirane intravaskularne koagulopatije ili u bolestima jetre kada je smanjena proizvodnja. Referentni interval iznosi 80-120%.

3.2.2.12. Inhibitor aktivatora plazminogena tip-1

Inhibitor aktivatora plazminogena tip-1 (PAI-1) regulira učinak uPA i tPA na plazminogen. Time se sprječava prerana razgradnja nastalog ugruška. Aktivnost PAI-1 određuje se mjerenjem učinka plazmina na kromogeni supstrat iz reagensa Berichrom PAI. Plazmin nastaje djelovanjem ostatne urokinaze na plazminogen, nakon stvaranja kompleksa s PAI-1 iz uzorka plazme. Povećana aktivnost PAI-1 nađena je kod akutnih trombo-embolijskih bolesti, sepse, zloćudnih oboljenja, operativnih zahvata i trudnoće. Visoka aktivnost PAI-1 povezuje se s povećanim rizikom za infarkt miokarda, reinfarkt i postoperativnu duboku vensku trombozu. Referentni interval iznosi 2,0-7,0 U/mL.

3.2.3. Molekularno ispitivanje nasljedne trombofilije

Molekularnim ispitivanjem testirali smo ispitanice na prisutnost FV Leiden, FII G20210A i polimorfizam PAI-1 4G/5G. Zamrznuti uzorci krvi ispitanica su transportirani na ispitivanje u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Izdvajanje genomske DNK provedeno je prema standardnom postupku izoliranja (40).

Za dokazivanje FV Leiden i FII G20210A korištene su specifične ishodbice za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (engl. polymerase chain reaction - PCR) prema autorima Zöller i sur. (41) i Poort i sur. (23), a zatim je izvedeno cijepanje umnoženih odsječaka DNK

restriksijskim endonukleazama - odsječke od 287bp pomoću MnlI za FV Leiden i odsječke od 345bp pomoću Hind III za FII G20210A.

Polimorfizam PAI-1 4G/5G ispitivan je metodom „real-time“ PCR, analizom krivulje taljenja prema Nauck i sur. (42) na uređaju LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

3.3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvedena je upotrebom programskog alata MedCalc ver. 12.2.1.0. Prag statističke značajnosti postavljen je na $p < 0,05$ u svim korištenim analizama. Skupovi rezultata koji su pokazali normalnu razdiobu iskazani su srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom te su primjenjeni parametrijski testovi, a ostali medijanom i rasponom uz primjenu neparametrijskih testova. Upotrebljeni su slijedeći testovi:

- u obradi kategoričkih podataka - apsolutna i relativnom učestalost, a ukupne numeričke vrijednosti poput dobi i BMI izražene su srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom i rasponom
- za utvrđivanje statističke značajnosti promjene rezultata koagulacijskih pretraga u vremenskim točkama neovisno o vrsti korištenog oralnog kontraceptiva, izveden je parametrijski test ponovljenog mjerenja varijance - RM ANOVA test, p vrijednosti prikazane za usporedbu među točkama mjerenja su izračunate koristeći Bonferonijevu korekciju
- za utvrđivanje statističke značajnosti promjene rezultata koagulacijskih pretraga u vremenskim točkama ovisno o vrsti korištenog oralnog kontraceptiva zbog manjeg broja ispitanica po skupini bez obzira na normalnost razdiobe, odabran je neparametrijski test - Friedman ANOVA test, p vrijednosti prikazane za usporedbu među točkama mjerenja su izračunate koristeći Wilcoxon test, a rezultati pretraga prikazani su medijanom i rasponom.
- za usporedbu svih međugrupnih rezultata koagulacijskih pretraga prema vrstama korištenih oralnih kontraceptiva nakon šest ciklusa - neparametrijski test - Kruskal-Wallis test
- za usporedbu dva međugrupna rezultata koagulacijskih pretraga prema vrstama korištenih oralnih kontraceptiva nakon šest ciklusa - neparametrijski test - Mann-Whitney test

- za utvrđivanje učinka prisutnosti/odsustva FV Leiden i FII G20210A (dvije nezavisne grupe) na koagulacijske pretrage, u prvoj i trećoj vremenskoj točki, korišten je neparametrijski Mann-Whitney test, a za polimorfizam PAI-1 4G/5G (tri nezavisne grupe) u pojedinoj vremenskoj točki - Kruskal-Wallis test, odnosno za pojedinu grupu polimorfizma u sve tri vremenske točke - RM ANOVA test, *p* vrijednosti prikazane za usporedbu među točkama mjerenja su izračunate koristeći Bonferonijevu korekciju
- za utvrđivanje učinka pušenje/nepušenje, kao i ranijeg uzimanja/neuzimanja oralnih kontraceptiva na koagulacijske pretrage, u prvoj i trećoj vremenskoj točki, ako je razdioba bila normalna parametrijski t-test, u suprotnom Mann-Whitney test, dok je za utvrđivanje učinka pripadnosti definiranim dobnim skupinama korišten Kruskal-Wallis test
- za analizu statističke značajnosti promjene BMI na početku i kraju ispitivanja, te za međusobnu usporedbu rezultata koagulacijskih pretraga, u prvoj i trećoj vremenskoj točki, u pojedinu BMI skupinu korišten je t-test usporedbe srednjih vrijednosti, a za utvrđivanje učinka BMI prema definiranim skupinama u odnosu na prvu i treću vremensku točku - neparametrijski Kruskal-Wallis test

4. REZULTATI

U skladu s postavljenim ciljem provedene studije, rezultati se prikazuju na slijedeći način:

- ukupni utjecaj uzimanja oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize
- utjecaj pojedine formulacije oralnog kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize
- utjecaj uzimanja oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize kod ispitanica s nasljednom trombofilijom
- utvrđivanje postojanja razlike među ispitanicama u aktivnostima čimbenika zgrušavanja i fibrinolize u odnosu na prisutnost dodatnih čimbenika rizika - pušenja, dobi, debljine, učestalosti korištenja oralne kontracepcije i pozitivnoj obiteljskoj anamnezi za trombo-embolijske bolesti

4.1. Ukupni utjecaj oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize

Rezultati mjerenih koagulacijskih parametara u tri vremenske točke prikazani su u Tablici 9. Usporedba dobivenih rezultata pokazuje statistički značajnu promjenu za sve mjerene parametre, osim aktivnosti FVIII.

Snižene vrijednosti rezultata za PV, APTV, aPCR, PS, AT s povišenim aktivnostima fibrinogena i inhibitora plazmina ukazuju na prokoagulacijske promjene pod utjecajem oralnih kontraceptiva. Antikoagulacijski i fibrinolitički odgovor očituje se u povećanoj aktivnosti PC, povišenim vrijednostima d-dimera i sniženjem aktivnosti PAI-1.

Statistički značajna promjena je prisutna između Uzorka 1 i Uzorka 2, kao i između Uzorka 1 i Uzorka 3 pokazujući dugotrajni učinak oralnih kontraceptiva na sustav hemostaze. Međutim, usporedbom mjerenih vrijednosti Uzorka 2 i Uzorka 3 statistička značajnost promjene se gubi kod pretraga: PV, fibrinogen, aPCR, PC, AT, plazminogen i inhibitora plazmina, a granična je kod PS i d-dimera.

Iako su promjene vrijednosti rezultata testiranja pokazivale statistički značajne razlike, ukupni rezultati su bili unutar referentnog intervala.

Kod nijedne ispitanice nije nađen nasljedni oblik manjka proteina C, proteina S i/ili antitrombina.

Tablica 9. Vrijednosti mjerenih koagulacijskih parametara u tri mjerene točke uzimanja oralnih kontraceptiva ($\bar{x}\pm SD$). Broj ispitanica N=195.

| Pretraga | Uzorak 1 | Uzorak 2 | Uzorak 3 | <i>p</i> vrijednost | | |
|-------------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Početni prije OK | Poslije 3. ciklusa OK | Poslije 6. ciklusa OK | Uzorak 1 vs. Uzorak 2 | Uzorak 1 vs. Uzorak 3 | Uzorak 2 vs. Uzorak 3 |
| PV (s) | 12,43±0,05 | 11,75±0,05 | 11,76±0,06 | <0,001 | <0,001 | 1,00 |
| APTV (s) | 28,66±0,16 | 26,93±0,16 | 27,60±0,19 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fibrinogen (g/L) | 2,8±0,03 | 3,02±0,04 | 3,03±0,05 | <0,001 | <0,001 | 1,000 |
| aPCR (omjer) | 4,24±0,08 | 3,64±0,06 | 3,57±0,07 | <0,001 | <0,001 | 1,000 |
| PC (%) | 103,33±1,25 | 116,90±1,36 | 116,90±1,42 | <0,001 | <0,001 | 1,000 |
| PS (%) | 90,23±1,06 | 71,39±1,12 | 74,66±1,31 | <0,001 | <0,001 | 0,045 |
| FVIII (%) | 97,22±2,5 | 100,6±2,31 | 100,85±2,57 | 0,330 | 0,350 | 1,000 |
| AT (%) | 102,41±0,62 | 99,98±0,72 | 98,27±0,77 | 0,007 | <0,001 | 0,052 |
| Plazminogen (%) | 94,2±0,74 | 122,82±1,19 | 125,12±1,28 | <0,001 | <0,001 | 0,053 |
| Inhibitor plazmina (%) | 103,12±0,68 | 108,24±0,68 | 108,58±0,64 | <0,001 | <0,001 | 1,000 |
| PAI-1 (U/mL) | 4,23±0,08 | 3,86±0,09 | 3,6±0,07 | 0,002 | <0,001 | 0,014 |
| D-dimeri (µg/L FEU) | 232,03±10,7 | 416,11±24,13 | 382,56±21,49 | <0,001 | <0,001 | 0,045 |

OK-oralna kontracepcija; \bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

4.2. Utjecaj formulacije oralnih kontraceptiva na aktivnost čimbenika zgrušavanja i fibrinolize

Ispitanice u studiji koristile su sedam farmaceutskih formulacija oralnih kontraceptiva, koji su se razlikovali u količini etinilestradiola, dok su količine gestagena bile jednake za istu vrstu gestagena:

- 35µg etinilestradiola + norgestimat (35EE2/NGM)
- 35µg etinilestradiola + ciproteron acetat (35EE2/CPA)
- 35µg etinilestradiola + noretisteron (35EE2/NET)
- 30µg etinilestradiola + levonorgestrel (30EE2/LNG)
- 30µg etinilestradiola + drospirenon (30EE2/DRSP)
- 20µg etinilestradiola + gestoden (20EE2/GSD)
- 20µg etinilestradiola + drospirenon (20EE2/DRSP)

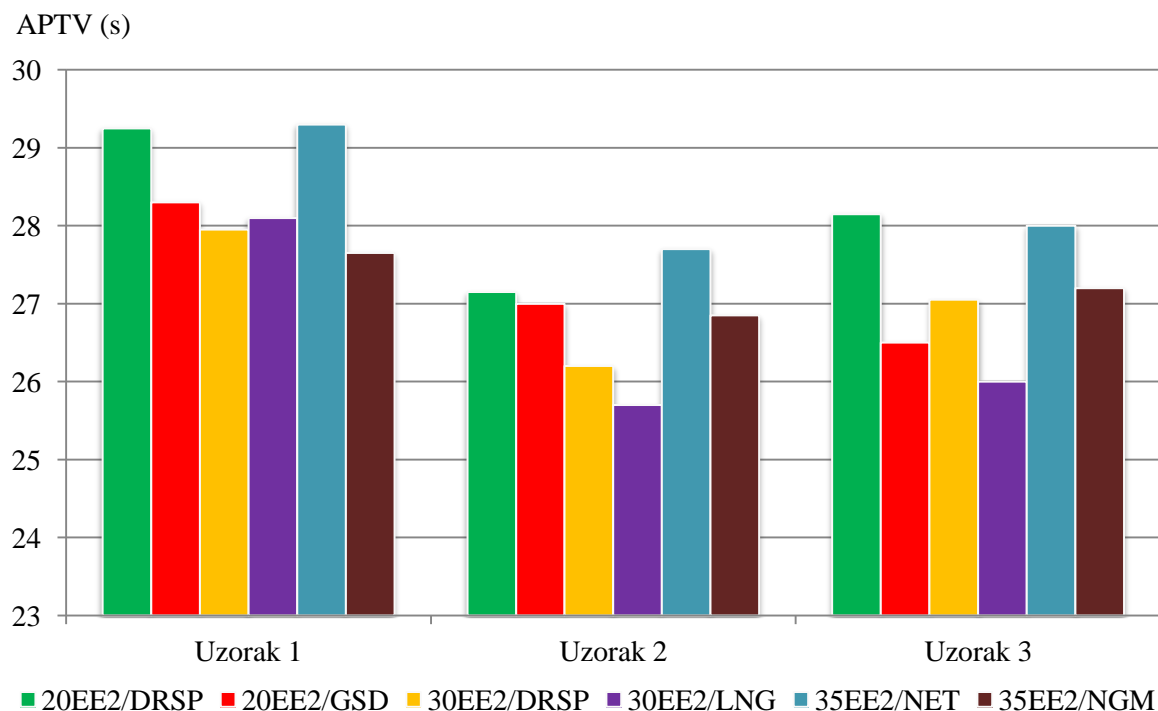
Rezultati su analizirani međugrupno i unutargrupno. Zbog malog broja ispitanica koje su koristile formulaciju 35EE2/CPA, njihovi rezultati su prikazani, ali nisu tumačeni.

4.2.1. Utjecaj oralnih kontraceptiva na opće koagulacijske pretrage (PV, APTV, fibrinogen)

Od općih koagulacijskih pretraga u studiji su korišteni PV, APTV i fibrinogen, a rezultati utjecaja pojedine formulacije oralnih kontraceptiva prikazani su u Tablici 10.

Rezultati PV-a pokazali su sniženje vrijednosti za sve formulacije oralnih kontraceptiva nakon trećeg i šestog ciklusa u odnosu na osnovnu vrijednost. Najveća promjena bila je u grupi 30EE2/LNG nakon trećeg ciklusa (Uzorak 2) i iznosila je 9% kod usporedbe medijana, dok se samo u grupama 35EE2/NET i 20EE2/DRSP vrijednosti medijana snižavale i nakon šestog ciklusa oralnih kontraceptiva (Uzorak 3).

Vrijednosti APTV-a su također bile snižene za sve grupe oralnih formulacija nakon tri ciklusa oralnih kontraceptiva, međutim samo grupe 20EE2/GSD, 35EE2/NET i 30EE2/LNG su zadržale statističku značajnost promjene i nakon šestog ciklusa, dok kod ostalih formulacija vrijednosti APTV-a pokazuju povratak prema osnovnim vrijednostima (Slika 4.).



Slika 4. Rezultati APTV pretrage za formulacije oralnih kontraceptiva u tri mjerene točke. Vrijednosti su iskazane medijanom.

Fibrinogen pokazuje međugrupno manju osjetljivost prema oralnim kontraceptivima nego prethodne dvije pretrage. Statistički značajne promjene u smislu povećanja koncentracije fibrinogena prisutne su samo u grupama 35EE2/NET i 20EE2/GSD nakon tri ciklusa oralnih kontraceptiva, ali je samo 20EE2/GSD zadržala značajnost promjene i nakon šest ciklusa (Tablica 10).

Tablica 10. Rezultati općih koagulacijskih pretraga (medijan, raspon) u tri mjerene točke.

| Pretraga: | Uzorak: | Formulacija OK | | | | | | |
|------------------|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 35EE2/NGM N=52 | 35EE2/NET N=30 | 35EE2/CPA N=9 | 30EE2/LNG N=17 | 30EE2/DRSP N=24 | 20EE2/GSD N=35 | 20EE2/DRSP N=28 |
| PV (s) | Uzorak 1 | 12,30 (10,80-14,10) | 12,50 (11,50-13,60) | 12,50 (11,00-13,10) | 12,40 (11,40-14,40) | 12,15 (10,70-13,40) | 12,70 (11,20-14,10) | 12,65 (11,10-14,40) |
| | Uzorak 2 | 11,60 (10,40-14,00) | 11,75 (10,80-13,70) | 11,90 (10,50-12,70) | 11,30 (10,40-13,40) | 11,50 (10,50-13,00) | 11,90 (10,60-13,60) | 11,90 (10,30-13,80) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,074 | <0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 11,60 (10,20-14,80) | 11,50 (10,50-14,00) | 11,60 (10,50-12,80) | 11,50 (10,90-14,90) | 11,75 (10,60-13,80) | 12,00 (10,70-13,60) | 11,70 (10,50-14,30) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,004* | 0,006* | 0,008* | <0,001* | <0,001* |
| | | | | | | | | |
| APTV (s) | Uzorak 1 | 27,65 (25,30-33,70) | 29,30 (26,00-34,50) | 29,00 (24,90-33,10) | 28,10 (25,00-34,30) | 27,95 (24,50-32,80) | 28,30 (23,80-35,60) | 29,25 (24,90-32,60) |
| | Uzorak 2 | 26,85 (23,50-34,20) | 27,70 (24,00-32,80) | 27,40 (22,70-32,10) | 25,70 (21,00-30,80) | 26,20 (22,80-32,50) | 27,00 (22,50-32,50) | 27,15 (23,30-30,60) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,301 | <0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 27,20 (23,50-34,20) | 28,00 (24,10-32,50) | 28,00 (24,50-31,30) | 26,00 (23,20-36,00) | 27,05 (23,10-33,20) | 26,50 (20,50-36,80) | 28,15 (23,20-33,10) |
| | <i>p</i> | 0,101 | 0,004* | 0,078 | 0,035* | 0,081 | <0,001* | 0,140 |
| | | | | | | | | |
| Fibrinogen (g/L) | Uzorak 1 | 2,90 (2,00-4,10) | 2,45 (1,60-3,70) | 2,50 (2,10-3,80) | 2,90 (2,00-4,00) | 2,70 (2,00-3,60) | 2,70 (2,20-4,50) | 2,90 (2,10-3,60) |
| | Uzorak 2 | 3,05 (2,20-4,10) | 2,80 (1,30-4,30) | 2,90 (2,20-3,30) | 3,30 (2,10-4,30) | 3,00 (1,80-4,10) | 3,20 (2,30-4,90) | 3,00 (2,00-4,10) |
| | <i>p</i> | 0,064 | 0,012* | 0,426 | 0,117 | 0,080 | <0,001* | 0,073 |
| | Uzorak 3 | 2,85 (1,90-5,70) | 2,70 (0,90-4,10) | 2,70 (2,30-3,60) | 3,20 (2,30-4,30) | 2,90 (2,20-4,60) | 3,30 (1,90-5,90) | 2,95 (2,10-4,40) |
| | <i>p</i> | 0,124 | 0,160 | 0,496 | 0,207 | 0,109 | <0,001* | 0,166 |
| | | | | | | | | |

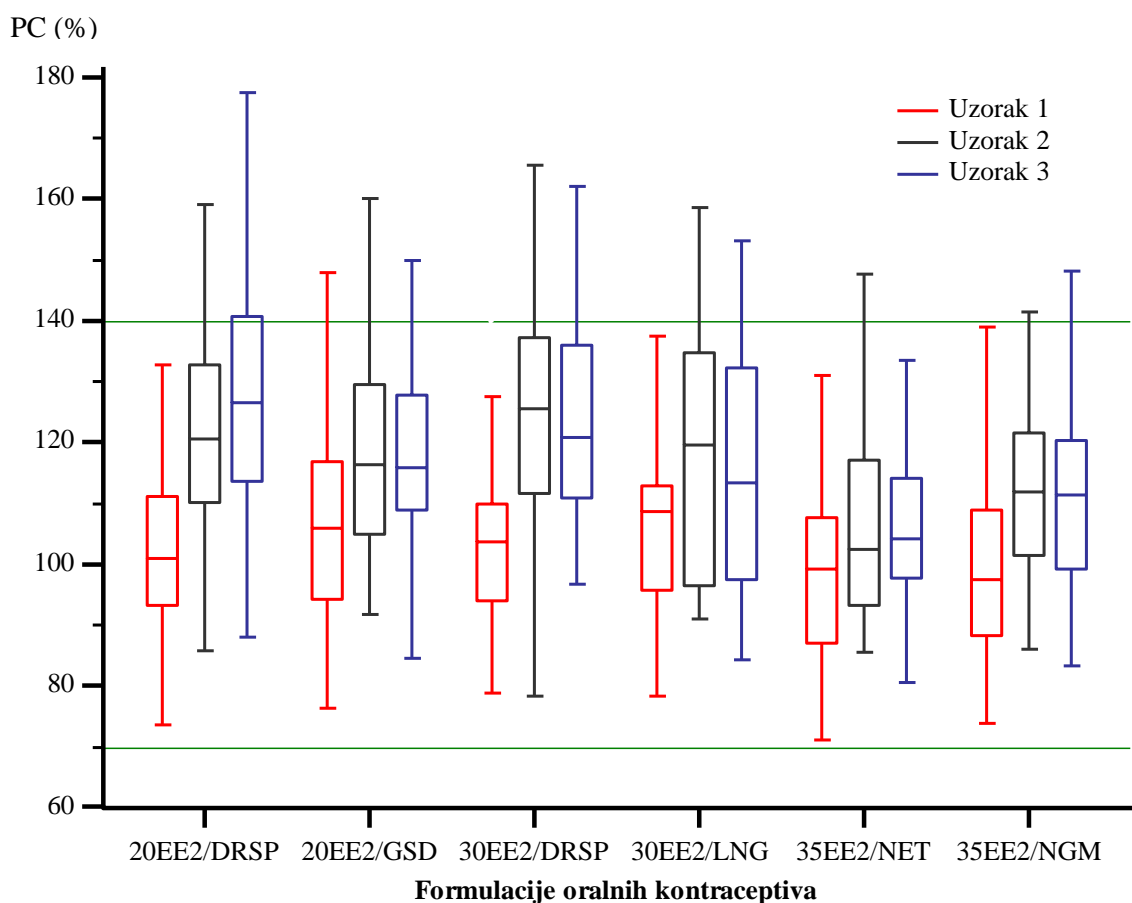
OK-oralna kontracepcija; N-broj ispitanica; * $p < 0,05$ u odnosu na početni uzorak (Uzorak 1)

4.2.2. Utjecaj oralnih kontraceptiva na specifične pretrage zgrušavanja (AT, PC, PS, aPCR, FVIII)

Pretrage puta zgrušavanja mjerene u studiji su aktivnost antitrombina, proteina C, proteina S, FVIII, te rezistencija na aktivirani protein C izražena omjerom. Rezultati su prikazani u Tablici 11.

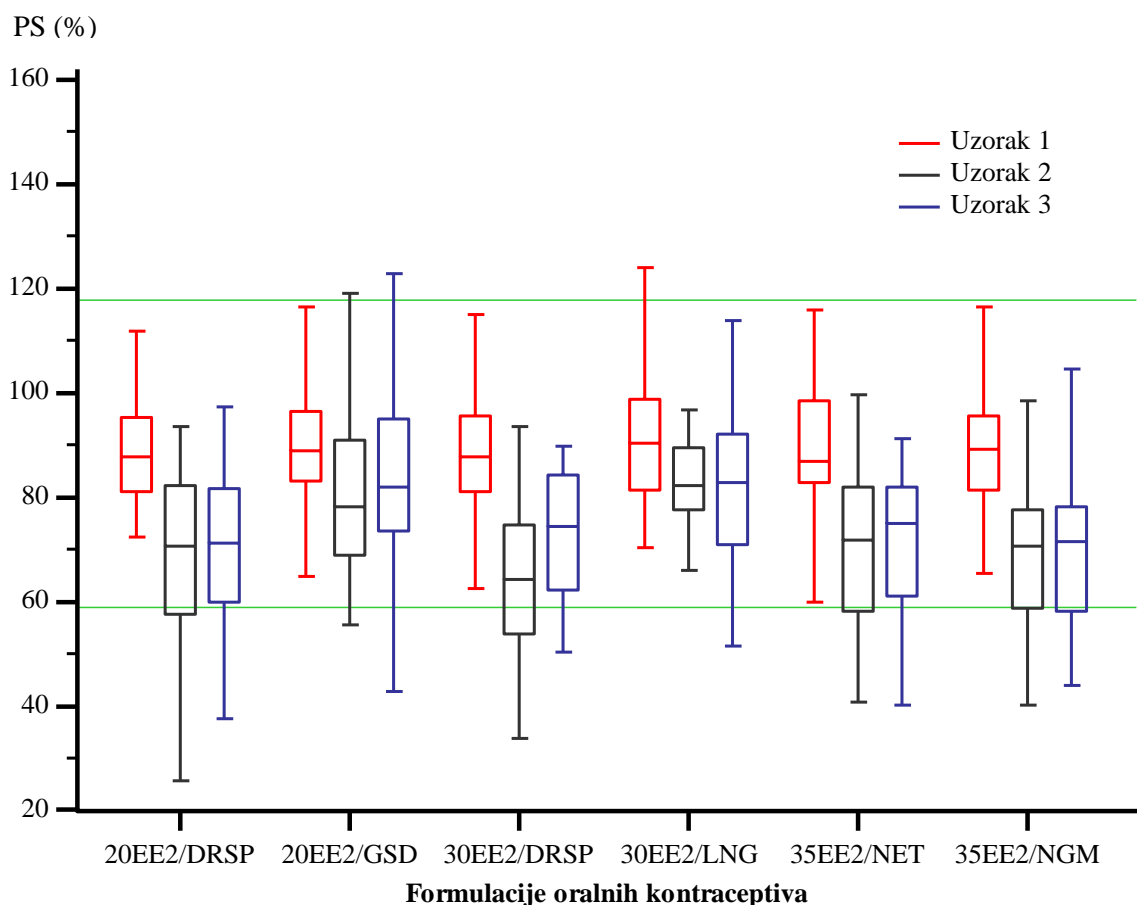
Antitrombin je pokazao značajan pad aktivnosti kod samo dvije formulacije oralnih kontraceptiva 20EE2/GSD u oba uzorka, dok je kod 35EE2/NGM pad aktivnosti dostigao značajnost tek u Uzorku 3, odnosno nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva.

Povećanje aktivnosti proteina C bilo je prisutno kod svih formulacija oralnih kontraceptiva, a najdominantnija promjena je bila u grupama s drospirenonom i iznosila je od 17-25% usporedbom medijana (Slika 5.).



Slika 5. Aktivnost PC u mjerenim točkama prema formulaciji oralnih kontraceptiva. Rezultati su iskazani medijanom.

Očekivano, statistički značajne promjene aktivnosti bile su prisutne i kod proteina S, ali one su bile smanjene u odnosu na osnovni uzorak. Smanjenje aktivnosti proteina S kod dijela ispitanica dostigao je patološke vrijednosti.



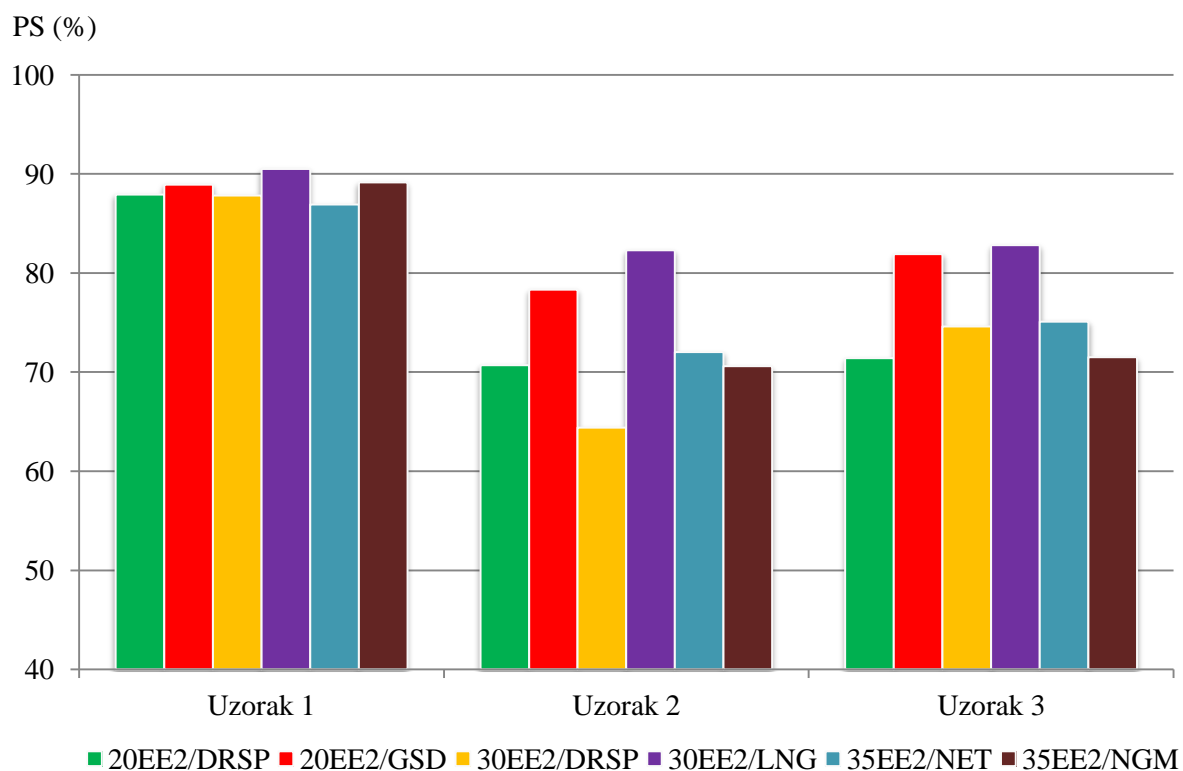
Slika 6. Aktivnost PS u mjerenim točkama prema formulaciji oralnih kontraceptiva. Rezultati su iskazani medijanom.

Najveće sniženje aktivnosti proteina S usporedbom medijana za 21-27% bilo je u formulacijama s drospirenonom i norgestimatom. Posebnost rezultata pokazala je i grupa 30EE2/LNG kod koje je pad aktivnosti proteina S dostigao statističku značajnost tek u Uzorku 3, odnosno nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva (Slika 6. i Slika 7.).

Rezultati rezistencije na aktivirani protein C pokazuju smanjenje za sve grupe oralnih kontraceptiva nakon tri ciklusa oralnih kontraceptiva, osim grupe 30EE2/LNG koja je dostigla značajnost promjene nakon šestog ciklusa i imala najmanju promjenu u odnosu na osnovni

uzorak. Većina grupa oralnih kontraceptiva pokazale su daljnje smanjenje vrijednosti omjera aPCR nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva, osim 35EE2/NET i 20EE2/GSD.

Aktivnost FVIII nije se značajno mijenjala niti u jednoj grupi oralnih kontraceptiva u mjerenim točkama.



Slika 7. Aktivnost PS za formulacije oralnih kontraceptiva u tri mjerene točke. Vrijednosti su iskazane medijanom.

Tablica 11. Rezultati specifičnih pretraga zgrušavanja (medijan, raspon) u tri mjerene točke.

| Pretraga: | Uzorak: | Formulacija OK | | | | | | |
|-----------------|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 35EE2/NGM N=52 | 35EE2/NET N=30 | 35EE2/CPA N=9 | 30EE2/LNG N=17 | 30EE2/DRSP N=24 | 20EE2/GSD N=35 | 20EE2/DRSP N=28 |
| Antitrombin (%) | Uzorak 1 | 100,60 (81,50-120,20) | 96,80 (89,70-117,10) | 103,30 (86,00-111,60) | 101,80 (83,90-117,30) | 102,85 (84,00-122,10) | 106,00 (84,40-117,00) | 102,95 (82,40-127,44) |
| | Uzorak 2 | 99,50 (70,00-115,20) | 100,45 (77,30-116,00) | 102,20 (92,20-116,10) | 94,30 (76,20-123,60) | 102,60 (79,90-121,50) | 101,10 (86,60-120,60) | 103,10 (82,10-122,30) |
| | <i>p</i> | 0,094 | 0,688 | 0,569 | 0,080 | 0,587 | 0,019* | 0,495 |
| | Uzorak 3 | 95,20 (74,00-112,40) | 96,65 (68,60-121,90) | 92,60 (81,90-115,90) | 100,40 (80,50-124,80) | 97,65 (79,10-114,50) | 98,80 (74,80--128,55) | 102,85 (85,50-117,20) |
| <i>p</i> | 0,001* | 0,154 | 0,086 | 0,329 | 0,175 | 0,028* | 0,964 | |
| Protein C (%) | Uzorak 1 | 97,60 (73,80-139,10) | 99,30 (71,10-161,50) | 105,70 (86,80-134,90) | 108,80 (78,30-137,50) | 103,65 (78,80-171,00) | 106,00 (76,50-153,53) | 101,10 (73,60-132,70) |
| | Uzorak 2 | 112,00 (86,10-136,86) | 102,60 (85,60-147,80) | 113,80 (78,20-167,90) | 119,60 (91,10-158,58) | 125,55 (78,50-165,47) | 116,30 (91,90-160,13) | 120,50 (85,90-177,34) |
| | <i>p</i> | <0,001* | 0,002* | 0,203 | 0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 111,40 (83,30-177,90) | 104,10 (80,70-148,80) | 112,90 (89,00-179,42) | 113,50 (84,30-113,50) | 120,90 (68,20-162,10) | 116,00 (84,70-149,90) | 126,50 (88,00-177,60) |
| <i>p</i> | <0,001* | 0,002* | 0,276 | 0,006* | <0,001* | <0,001* | <0,001* | |
| Protein S (%) | Uzorak 1 | 89,15 (65,50-141,75) | 86,90 (59,90-131,10) | 86,10 (62,00-97,30) | 90,50 (70,30-134,53) | 87,80 (62,50-119,20) | 88,90 (64,80-136,64) | 87,90 (72,60-126,20) |
| | Uzorak 2 | 70,60 (40,30-98,60) | 72,00 (41,00-99,60) | 73,40 (53,60-86,40) | 82,30 (66,20-96,70) | 64,40 (33,90-118,70) | 78,30 (55,70-119,10) | 70,70 (25,90-93,50) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,039* | 0,064 | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 71,50 (44,10-104,60) | 75,10 (40,40-145,10) | 67,00 (52,50-75,20) | 82,80 (51,60-125,20) | 74,60 (50,50-119,90) | 81,90 (43,00-148,60) | 71,40 (37,70-97,40) |
| <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,020* | 0,035* | 0,003* | 0,038* | <0,001* | |

OK-oralna kontracepcija; N-broj ispitanica; * $p < 0,05$ u odnosu na početni uzorak (Uzorak 1)

Tablica 11. Rezultati specifičnih pretraga zgrušavanja (medijan, raspon) u tri mjerene točke - nastavak.

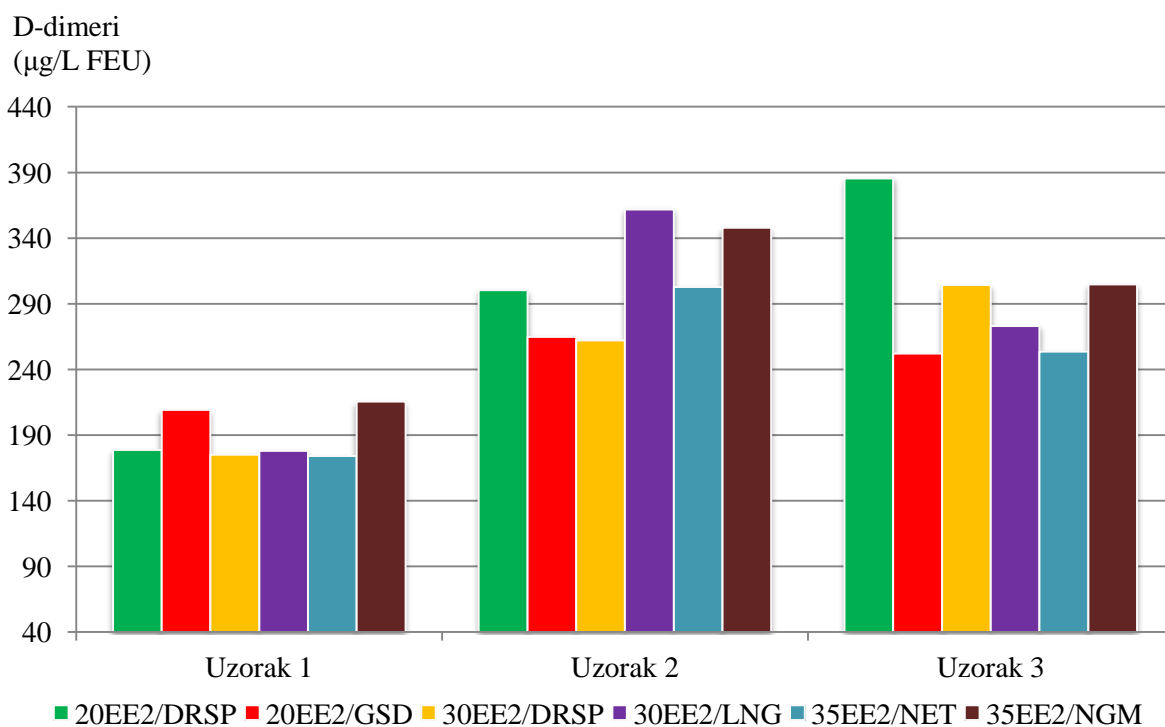
| Pretraga: | Uzorak: | Formulacija OK | | | | | | |
|--------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 35EE2/NGM N=52 | 35EE2/NET N=30 | 35EE2/CPA N=9 | 30EE2/LNG N=17 | 30EE2/DRSP N=24 | 20EE2/GSD N=35 | 20EE2/DRSP N=28 |
| aPCR (omjer) | Uzorak 1 | 4,10 (1,30-6,30) | 4,10 (1,20-6,50) | 4,30 (2,90-5,78) | 3,80 (1,20-5,90) | 4,50 (2,70-6,40) | 4,30 (1,30-6,20) | 4,50 (2,70-6,60) |
| | Uzorak 2 | 3,50 (1,20-6,10) | 3,20 (1,10-5,60) | 3,40 (2,40-4,20) | 3,80 (1,00-4,70) | 3,65 (2,20-4,90) | 3,70 (1,20-5,70) | 3,70 (2,10-5,70) |
| | <i>p</i> | <0,001* | 0,005* | 0,074 | 0,130 | 0,001* | <0,001* | 0,018* |
| | Uzorak 3 | 3,25 (1,10-6,10) | 3,40 (1,10-11,00) | 3,40 (2,40-5,40) | 3,40 (1,20-4,40) | 3,45 (2,60-4,90) | 3,80 (1,10-6,50) | 3,40 (2,20-5,70) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,301 | <0,001* | 0,001* | 0,002 | <0,001* |
| | FVIII (%) | Uzorak 1 | 101,95 (52,50-244,40) | 94,35 (52,80-166,90) | 74,70 (52,10-154,10) | 81,50 (52,60-143,80) | 88,05 (57,00-181,00) | 86,20 (54,10-231,00) |
| | Uzorak 2 | 106,95 (40,30-258,70) | 97,65 (57,80-156,36) | 106,10 (51,30-165,50) | 80,40 (54,70-126,00) | 98,55 (49,20-187,38) | 88,00 (54,30-154,30) | 99,55 (59,00-197,50) |
| | <i>p</i> | 0,665 | 0,195 | 0,496 | 0,487 | 0,290 | 0,406 | 0,123 |
| | Uzorak 3 | 105,50 (31,80-278,50) | 106,45 (42,10-168,40) | 100,20 (48,90-130,80) | 82,10 (44,60-126,50) | 96,65 (43,50-162,26) | 94,60 (52,10-180,10) | 97,70 (53,20-247,60) |
| | <i>p</i> | 0,480 | 0,627 | 1,000 | 0,782 | 0,719 | 0,533 | 0,192 |

OK-oralna kontracepcija; N-broj ispitanica; * $p < 0,05$ u odnosu na početni uzorak (Uzorak 1)

4.2.3. Utjecaj oralnih kontraceptiva na pretrage fibrinolitičkog puta (plazminogen, d-dimeri, inhibitor plazmina, PAI-1)

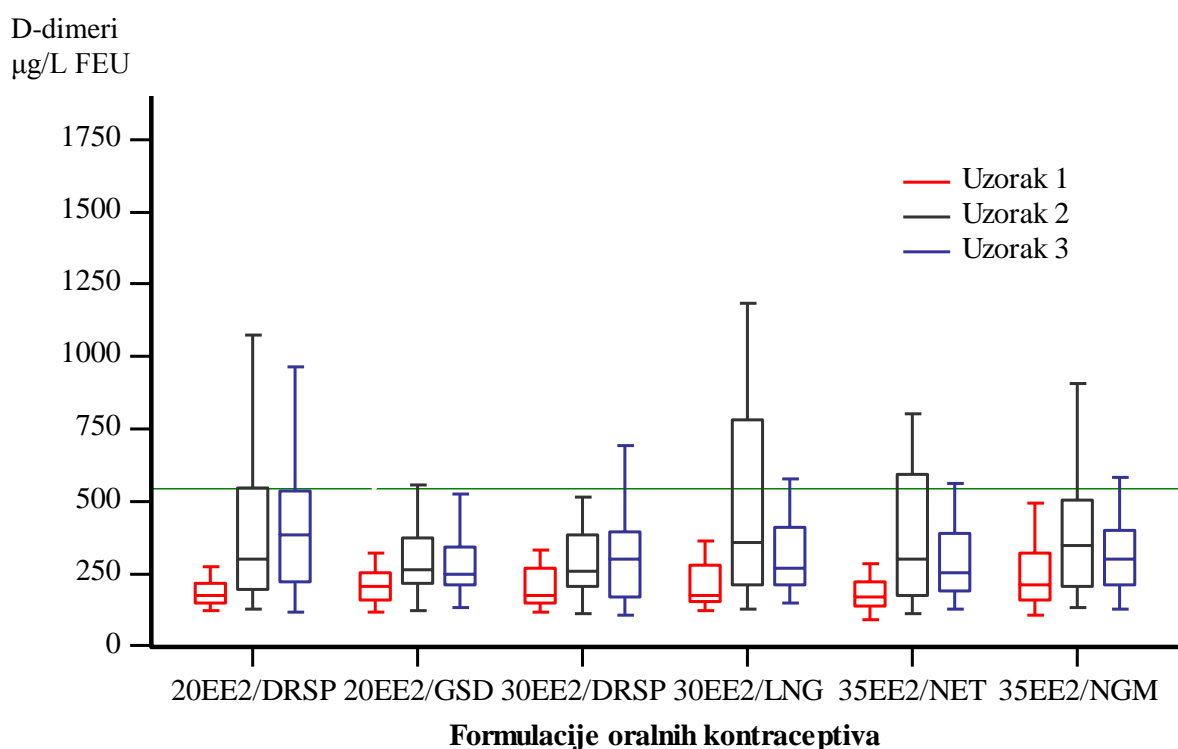
Najčešće rutinske pretrage fibrinolitičkog puta su aktivnost plazminogena, koncentracija d-dimera, aktivnost inhibitora plazmina i inhibitora aktivatora plazminogena tip-1. Utjecaj pojedine formulacije oralnih kontraceptiva na rezultate pretraga prikazan je u Tablici 12.

Povišenje aktivnosti plazminogena bilo je statistički značajno u svim grupama oralnih kontraceptiva nakon tri ciklusa uzimanja, a povišene vrijednosti su zadržale značajnost i nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva. Sve promjene, mjerene usporedbom medijana, su bile veće od 25% u odnosu na osnovnu vrijednost, ali najizraženija je bila u grupi 20EE2/DRSP gdje je povećanje aktivnosti iznosilo 43% nakon trećeg ciklusa i šestog ciklusa oralnih kontraceptiva.



Slika 8. Koncentracija d-dimera za formulacije oralnih kontraceptiva u tri mjerene točke. Vrijednosti su iskazane medijanom.

Koncentracije d-dimera (Slika 8. i Slika 9.) pokazale su najviše postotke otklona od osnovnih vrijednosti među svim mjerenim pretragama. Sve grupe oralnih kontraceptiva pokazale su statistički značajno povišenje vrijednosti u obje mjerene točke, a rezultati su često bili izvan referentnog intervala. Usporedbom medijana promjene su iznosile od 27% za grupu 20EE2/GSD nakon trećeg ciklusa do 116% za grupu 20EE2/DRSP nakon šestog ciklusa. Samo se kod grupa oralnih kontraceptiva koje sadrže DRSP, nakon šestog ciklusa, održala ista vrijednost d-dimera ili se dodatno povećala, dok je kod ostalih grupa zabilježeno smanjenje razlike u odnosu na osnovnu vrijednost.



Slika 9. Koncentracija d-dimera u mjerenim točkama prema formulaciji oralnih kontraceptiva. Rezultati su iskazani medijanom.

Većina grupa oralnih kontraceptiva, osim u grupa 20EE2/GSD i 30EE2/LNG, uzrokovala je statistički značajne promjene u povećanoj aktivnosti inhibitora plazmina. Međutim, te promjene su diskretne, a najveći otklon u odnosu na osnovni uzorak bio je 10% nakon šest ciklusa kontraceptiva u grupama 35EE2/NET i 20EE2/DRSP.

Kod aktivnosti PAI-1 rezultati se potpuno razlikuju među grupama oralnih kontraceptiva. Sve grupe pokazuju tendenciju snižavanja vrijednosti, međutim promjena je dostigla statističku značajnost nakon trećeg ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva za 30EE2/LNG,

koja je tu značajnost izgubila nakon šestog ciklusa, zatim za 20EE2/DRSP u obje mjerene vremenske točke i za 35EE2/NET nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva.

Tablica 12. Rezultati specifičnih pretraga fibrinolize (medijan, raspon) u tri mjerene točke

| Pretra- ga: | Uzorak: | Formulacija OK | | | | | | |
|---------------------------|----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 35EE2/NGM N=52 | 35EE2/NET N=30 | 35EE2/CPA N=9 | 30EE2/LNG N=17 | 30EE2/DRSP N=24 | 20EE2/GSD N=35 | 20EE2/DRSP N=28 |
| Plazminogen (%) | Uzorak 1 | 94,15 (75,80-110,10) | 90,55 (75,10-108,40) | 98,00 (87,30-101,70) | 94,50 (76,20-112,70) | 95,10 (81,60-127,10) | 94,70 (71,80-137,30) | 92,50 (76,50-117,40) |
| | Uzorak 2 | 125,40 (93,40-155,15) | 122,65 (83,40-159,20) | 122,90 (79,80-165,30) | 124,90 (93,20-154,30) | 126,65 (101,10-158,57) | 118,10 (85,70-156,16) | 132,55 (93,60-156,10) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,020* | <0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 126,25 (84,10-166,20) | 128,15 (93,20-171,30) | 123,40 (96,30-154,30) | 124,90 (99,80-150,30) | 119,40 (86,30-153,20) | 118,50 (84,40-147,80) | 132,55 (94,10-174,50) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* | <0,001* |
| | | | | | | | | |
| D-dimeri (µg/L FEU) | Uzorak 1 | 215,50 (108,70-669,00) | 174,20 (92,00-1564,00) | 214,60 (119,00-334,90) | 178,10 (126,90-363,70) | 175,10 (121,45-700,70) | 209,20 (119,68-549,40) | 178,85 (126,50-792,40) |
| | Uzorak 2 | 347,85 (133,74-1826,40) | 302,95 (117,00-2313,20) | 282,00 (137,50-834,40) | 361,80 (132,18-1183,60) | 262,10 (117,01-1629,70) | 264,80 (124,17-1449,10) | 300,35 (130,00-1602,50) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,066 | 0,004* | 0,012* | 0,002* | 0,002* |
| | Uzorak 3 | 304,85 (132,40-1831,40) | 253,70 (128,40-2145,90) | 261,20 (144,68-662,40) | 273,20 (149,30-1034,80) | 304,25 (111,63-1611,20) | 252,10 (134,70-1294,80) | 385,55 (121,30-1190,20) |
| | <i>p</i> | <0,001* | <0,001* | 0,113 | 0,007* | 0,011* | 0,002* | <0,001* |
| | | | | | | | | |
| Inhibitor plazmina (%) | Uzorak 1 | 103,10 (82,40-119,10) | 98,80 (84,70-124,00) | 101,10 (92,90-107,50) | 102,70 (91,20-119,60) | 100,60 (87,60-124,40) | 107,90 (87,00-128,15) | 100,65 (88,90-119,70) |
| | Uzorak 2 | 107,90 (90,10-132,10) | 109,30 (85,90-135,10) | 112,50 (81,30-120,00) | 106,00 (94,50-129,21) | 108,40 (93,70-126,01) | 104,90 (87,10-131,13) | 109,20 (94,10-123,90) |
| | <i>p</i> | <0,001* | 0,004* | <0,001* | 0,244 | 0,007* | 0,978 | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 106,60 (87,60-120,07) | 109,80 (90,10-129,76) | 104,90 (92,30-124,60) | 109,80 (88,20-119,40) | 108,50 (92,00-123,07) | 107,00 (90,10-146,60) | 113,10 (95,30-121,47) |
| | <i>p</i> | 0,037* | 0,001* | 0,034 | 0,185 | 0,010* | 0,160 | <0,001* |
| | | | | | | | | |
| PAI-1 (U/mL) | Uzorak 1 | 4,20 (1,76-6,30) | 4,20 (2,00-6,00) | 3,50 (2,60-5,90) | 4,20 (2,80-5,80) | 4,10 (2,00-6,00) | 4,50 (2,80-8,79) | 4,15 (2,10-8,60) |
| | Uzorak 2 | 3,85 (1,70-7,20) | 3,70 (1,50-6,60) | 3,50 (1,70-5,80) | 3,50 (1,70-4,80) | 2,90 (6,40-3,50) | 4,60 (1,50-8,40) | 3,60 (2,00-5,80) |
| | <i>p</i> | 0,319 | 0,113 | 0,728 | 0,043* | 0,887 | 0,450 | <0,001* |
| | Uzorak 3 | 3,25 (2,10-5,30) | 3,25 (1,60-5,10) | 3,10 (2,40-4,60) | 3,60 (1,90-4,70) | 3,45 (2,10-5,40) | 4,10 (2,40-6,80) | 3,50 (1,80-6,30) |
| | <i>p</i> | 0,070 | 0,005* | 0,131 | 0,095 | 0,166 | 0,074 | 0,031* |
| | | | | | | | | |

OK-oralna kontracepcija; N-broj ispitanica; * $p < 0,05$ u odnosu na početni uzorak (Uzorak 1)

4.2.4. Međugrupna analiza utjecaja formulacija oralnih kontraceptiva na koagulacijske pretrage

Ukupna međugrupna analiza rezultata učinjena je s rezultatima na kraju studije - nakon šest ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva. Rezultati su prikazani u Tablici 13.

Statistička značajnost bila je prisutna kod:

- aktivnosti antitrombina za 20EE2/DRSP u odnosu na 35EE2/NGM i 35EE2/NET
- aktivnosti proteina C za 35EE2/NGM u odnosu na 30EE2/DRSP i 20EE2/DRSP, za 35EE2/NET u odnosu na 20EE2/GSD, 20EE2/DRSP i 30EE2/DRSP, i za 30EE2/LNG u odnosu na 20EE2/DRSP
- aktivnosti proteina S za 20EE2/GSD u odnosu na 35EE2/NGM, 35EE2/NET i 30EE2/DRSP, i za 30EE2/LNG u odnosu na 35EE2/NGM i 20EE2/DRSP
- aktivnosti plazminogena za 20EE2/GSD u odnosu na 35EE2/NGM, 35EE2/NET i 20EE2/DRSP, te dodatna razlika za 20EE2/DRSP u odnosu na 30EE2/LNG i 30EE2/DRSP
- aktivnosti PAI-1 za 20EE2/GSD u odnosu na 35EE2/NET, 35EE2/NGM i 20EE2/DRSP.

Kako bi se ustanovila razlika među formulacijama oralnih kontraceptiva, učinjena je usporedba s obzirom na vrstu gestagena kod oralnih kontraceptiva s istom količinom EE2 nakon šest ciklusa uzimanja (Tablica 14.):

- U grupama oralnih kontraceptiva s 35 µg EE2 - NGM u odnosu na NET, statistički značajna različitost bila je prisutna samo kod inhibitora plazmina.
- Usporedbom grupa s 30 µg EE2, LGN u odnosu na DRSP - nije bilo statističke značajnosti u razlici među izvedenim koagulacijskim pretragama.
- Grupe s 20 µg EE2, GSD i DRSP su se statistički značajno razlikovale u četiri mjerena parametra: PC ($p = 0,0434$), PS ($p = 0,0097$), plazminogen ($p = 0,0009$) i PAI-1 ($p = 0,0427$).

Dodatno učinjena usporedba rezultata o utjecaju količine EE2 za grupe koje sadrže DRSP pokazala je značajnost razlike rezultata u aktivnosti plazminogena od $p=0,0193$ (Tablica 14.) pri čemu je grupa 20EE2/DRSP imala višu aktivnost plazminogena od grupe 30EE2/DRSP (usporedba srednjih vrijednosti 134,74% u odnosu 120,72%).

Tablica 13. Međugrupna analiza utjecaja formulacije OK na mjerene koagulacijske pretrage na kraju studije

| Pretraga: | Sve grupe OK | <i>p</i> vrijednost | | | | |
|---------------------------|--------------|--|--|---|---|--|
| | | 35EE2/NGM | 35EE2/NET | 30EE2/LNG | 20EE2/DRSP | 20EE2/GSD |
| PV | 0,759 | | | | | |
| APTV | 0,381 | | | | | |
| Fibrinogen | 0,112 | | | | | |
| AT | 0,030* | | | | 0,004* vs. 35EE2/NGM 0,031* vs. 35EE2/NET | |
| PC | 0,002* | 0,011* vs. 30EE2/DRSP 0,002* vs. 20EE2/DRSP | 0,005* vs. 20EE2/GSD 0,001* vs. 20EE2/DRSP 0,003* vs. 30EE2/DRSP | 0,042* vs. 20EE2/DRSP | | |
| PS | 0,001* | | | 0,005* vs. 35EE2/NGM 0,049* vs. 20EE2/DRSP | | <0,001* vs. 35EE2/NGM 0,020* vs. 35EE2/NET 0,029* vs. 30EE2/DRSP |
| aPCR | 0,219 | | | | | |
| FVIII | 0,385 | | | | | |
| Plazminogen | 0,033* | | | | 0,027* vs. 30EE2/LNG 0,019* vs. 30EE2/DRSP | 0,001* vs. 20EE2/DRSP 0,049* vs. 35EE2/NGM 0,046* vs. 35EE2/NET |
| D-dimeri | 0,462 | | | | | |
| Inhibitor plazmina | 0,063 | | | | | |
| PAI-1 | 0,042* | | | | | 0,004 vs. 35EE2/NET 0,002* vs. 35EE2/NGM 0,043* vs. 20EE2/DRSP |

OK-oralna kontracepcija; * $p < 0,05$

Tablica 14. Analiza značajnosti međugrupne različitosti formulacija oralnih kontraceptiva u koagulacijskim pretragama mjerenim nakon šestog ciklusa

| Pretraga: | Sve grupe OK | 35EE2/NGM vs. 35EE2/NET | 30EE2/LNG vs. 30EE2/DRSP | 20EE2/GSD vs. 20EE2/DRSP | 20EE2/DRSP vs. 30EE2/DRSP |
|---------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | <i>p</i> vrijednost | | | | |
| PV | 0,759 | 0,729 | 0,801 | 0,293 | 0,707 |
| APTV | 0,381 | 0,324 | 0,926 | 0,061 | 0,199 |
| Fibrinogen | 0,112 | 0,193 | 0,606 | 0,113 | 0,971 |
| Antitrombin | 0,030* | 0,927 | 0,412 | 0,347 | 0,052 |
| Protein C | 0,002* | 0,192 | 0,173 | 0,043* | 0,452 |
| Protein S | 0,001* | 0,270 | 0,076 | 0,010* | 0,627 |
| aPCR omjer | 0,219 | 0,340 | 0,731 | 0,068 | 0,563 |
| FVIII | 0,385 | 0,392 | 0,278 | 0,481 | 0,942 |
| Plazminogen | 0,033* | 0,806 | 0,741 | 0,001* | 0,019* |
| D-dimeri | 0,462 | 0,292 | 0,874 | 0,060 | 0,219 |
| Inhibitor plazmina | 0,063 | 0,024* | 0,874 | 0,068 | 0,215 |
| PAI-1 | 0,042* | 0,765 | 1,000 | 0,043* | 0,912 |

* $p < 0,05$

4.3. Rezultati molekularne dijagnostike nasljednih trombofilnih čimbenika

Molekularnim testiranjem utvrdila se njihova učestalost u populaciji ispitanica, te time i njihov utjecaj na ranije navedene rezultate ispitivanja aktivnosti čimbenika zgrušavanja i fibrinolize (Tablica 15.).

Učestalost FV Leiden iznosi 2,6%, a FII G20210A 2,1%, uz dokazani jedan dvostruki heterozigot.

Kod ispitivanja učestalosti polimorfizma PAI-1 4G/5G, najveću frekvenciju je imao heterozigotni oblik 51,8%.

Tablica 15. Učestalost FV Leiden, FII G20210A i polimorfizma PAI-1 4G/5G kod ispitanica

| Polimorfizam | N (%) |
|--------------------|-------------|
| FV Leiden | |
| GG | 190 (97,4%) |
| GA | 5 (2,6%) |
| FII G20210A | |
| GG | 191 (97,9%) |
| GA | 4 (2,1%) |
| PAI-1 4G/5G | |
| 5G/5G | 43 (22,1%) |
| 4G/5G | 101 (51,8%) |
| 4G/4G | 51 (26,2%) |

N-broj ispitanica

Kod žena s utvrđenim mutacijama dokazana je statistički značajna razlika u usporedbi s ispitanicama bez mutacije za slijedeće rezultate (Tablica 16.):

- za FV Leiden - PS (Uzorak 1 - usporedba medijana 71,1% vs. 88,90%; Uzorak 3 - usporedba medijana 51,6% vs. 74,3%) i aPCR u osnovnom uzorku i nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva što je očekivano s obzirom da aPCR služi kao probirna pretraga za FV Leiden
- za FII G20210A - fibrinogen i plazminogen u osnovnom uzorku, ali se značajnost izgubila nakon 6 ciklusa oralnih kontraceptiva, te aPCR u trećem uzorku
- za PAI-1 4G/5G - FVIII u osnovnom uzorku međusobno za sve genotipove, ali se značajnost izgubila nakon 6 ciklusa oralne kontracepcije, AT u trećem uzorku

međusobno za sve genotipove, te PS u trećem uzorku samo između genotipova 4G/4G i 5G/5G

S obzirom da je ukupni učinak oralne kontracepcije na razinu PAI-1 pokazao statistički značajne promjene, učinjena je detaljnija analiza polimorfizma PAI-1 4G/5G i aktivnosti PAI-1 u plazmi ispitanica. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku, u odnosu na osnovni uzorak, isključivo kod ispitanica s 4G/5G genotipom u obje mjerne točke (Tablica 17.). Nije nađena statistički značajna razlika među ispitanicama u pojedinoj mjernoj točki (p vrijednost u mjernim točkama bio je za Uzorak 1- 0,38, Uzorak 2 - 0,0599 i Uzorak 3 - 0,2524).

Tablica 16. Značajnost prisutnosti/odsutnosti FV Leiden, FII G20210A i polimorfizma PAI-1 4G/5G na koagulacijske pretrage u prvoj i trećoj mjerenoj točki (Uzorak 1 i Uzorak 3)

| | F V Leiden | FII G20210A | PAI-1 4G/5G |
|-----------------------------|----------------|-------------|-------------|
| Pretraga: | p vrijednost | | |
| PV-Uzorak 1 | 0,822 | 0,228 | 0,376 |
| PV-Uzorak 3 | 0,641 | 0,175 | 0,368 |
| APTV-Uzorak 1 | 0,140 | 0,861 | 0,260 |
| APTV- Uzorak 3 | 0,399 | 0,677 | 0,157 |
| Fibrinogen-Uzorak 1 | 0,661 | 0,041* | 0,239 |
| Fibrinogen-Uzorak 3 | 0,327 | 0,158 | 0,290 |
| Antitrombin-Uzorak 1 | 0,550 | 0,125 | 0,590 |
| Antitrombin-Uzorak 3 | 0,286 | 0,968 | 0,023* |
| PC-Uzorak 1 | 0,952 | 0,059 | 0,682 |
| PC-Uzorak 3 | 0,222 | 0,479 | 0,358 |
| PS-Uzorak 1 | 0,001* | 0,305 | 0,223 |
| PS-Uzorak 3 | 0,016* | 0,057 | 0,034* |
| aPCR-Uzorak 1 | 0,001* | 0,164 | 0,589 |
| aPCR-Uzorak 3 | 0,022* | 0,036* | 0,866 |
| FVIII-Uzorak 1 | 0,534 | 0,922 | 0,015* |
| FVIII-Uzorak 3 | 0,952 | 0,573 | 0,417 |
| Plazminogen-Uzorak 1 | 0,082 | 0,023* | 0,989 |
| Plazminogen-Uzorak 3 | 0,751 | 0,799 | 0,654 |
| D-dimeri-Uzorak 1 | 0,382 | 0,754 | 0,036 |
| D-dimeri-Uzorak 3 | 0,327 | 0,558 | 0,828 |
| A2A-Uzorak 1 | 0,709 | 0,400 | 0,543 |
| A2A-Uzorak 3 | 0,607 | 0,196 | 0,366 |
| PAI-1-Uzorak 1 | 0,6880 | 0,257 | 0,385 |
| PAI-1-Uzorak3 | 0,8978 | 0,234 | 0,252 |

* $p < 0,05$

Tablica 17. Usporedba polimorfizma PAI-1 4G/5G i aktivnosti PAI-1 u mjerenim vremenskim točkama ($\bar{x}\pm SD$)

| | | PAI-1 (U/mL) | | | <i>p</i> vrijednost | |
|----------------------------|-----|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Genotip: | N | Uzorak 1 Bez OK | Uzorak 2 Nakon 3 ciklusa OK | Uzorak 3 Nakon 6 ciklusa OK | Uzorak 1 vs. Uzorak 2 | Uzorak 1 vs. Uzorak 3 |
| 4G/4G | 51 | 4,24±0,17 | 4,145±0,18 | 3,8±0,13 | 1,000 | 0,115 |
| 4G/5G | 101 | 4,29±0,11 | 3,86±0,12 | 3,51±0,1 | 0,005* | <0,001* |
| 5G/5G | 43 | 4,08±0,2 | 3,54±0,16 | 3,55±0,13 | 0,090 | 0,060 |
| <i>p</i> vrijednost | | 0,380 | 0,060 | 0,252 | | |

N-broj ispitanica; \bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija; * $p < 0,05$

4.4. Analiza dodatnih čimbenika rizika na koagulacijske pretrage

U poglavlju 3.1.1. prikazane su glavne značajke ispitanica. Značajke povezane s povećanim rizikom za trombo-embolijske bolesti na sustav zgrušavanja i fibrinolize poput dobi, tjelesne mase, pušenja i ranijeg uzimanja oralnih kontraceptiva, analizirane su na početku i kraju ispitivanja (Uzorak 1 i Uzorak 3).

Usporedbom rezultata ispitanica pušačica i nepušačica, statistički značajna razlika $p=0,0095$ nađena je samo u rezultatu za APTV u Uzorku 1, dok se uzimanjem oralnih kontraceptiva različitost rezultata gubi (Tablica 18.). Ispitanice koje su pušile imale su kraći APTV (usporedba medijana: 27,75 s u odnosu na 28,6 s kod nepušačica).

Ispitanice koje su prvi puta uzimale oralnu kontracepciju u odnosu na ispitanice koje su ranije već koristile oralnu kontracepciju pokazale su značajnost razlike rezultata u nekoliko pretraga:

- prije početka uzimanja oralnih kontraceptiva (Uzorak 1) statistički značajna razlika prisutna je kod antitrombina, proteina C i plazminogena, ali se značajnost izgubila nakon šest ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva (Uzorak 3). Kod sve tri navedene pretrage nađena je povišena aktivnost u grupi ispitanica koje su ranije uzimale OK. Srednje vrijednosti iznose za: antitrombin 103,88% u odnosu 101,37%, protein C 107,74% u odnosu 100,19%, plazminogen 96,04% u odnosu 92,89%
- nakon uzimanja kontraceptiva statistički značajna razlika nađena je u vrijednostima APTV-a i aktivnosti proteina S. Ispitanice koje su ranije uzimale OK imale su kraće vrijeme APTV-a ($\bar{x}=26,97$ s u odnosu na $\bar{x}=28,05$ s), ali i višu aktivnost proteina S (usporedba medijana 76,80% u odnosu na 72,55%)

Za odgovarajuću analizu utjecaja dobi na rezultate pretraga, ispitanice su podijeljene u četiri grupe: do 18 godina, od 18 do 25 godina, od 26 do 30 godina i starije od 30 godina. Iako je najviše ispitanica bilo u grupi od 18-25 godina (120 ispitanica), i u ostalim grupama je broj ispitanica bio dovoljan za robustnu statističku usporedbu rezultata (20 i više ispitanica).

Tablica 18. Značajnost razlike rezultata koagulacijskih pretraga u odnosu na rizik pušenja, dobi i ranijeg korištenja oralnih kontraceptiva

| Pretraga: | Pušenje | Dob | OK ranije |
|------------------------------------|--------------|--------|-----------|
| | p vrijednost | | |
| PV-Uzorak 1 | 0,799 | 0,027* | 0,267 |
| PV-Uzorak 3 | 0,246 | 0,444 | 0,964 |
| APTV-Uzorak 1 | 0,010* | 0,198 | 0,671 |
| APTV- Uzorak 3 | 0,318 | 0,196 | 0,005* |
| Fibrinogen-Uzorak 1 | 0,364 | 0,579 | 0,845 |
| Fibrinogen-Uzorak 3 | 0,389 | 0,910 | 0,489 |
| Antitrombin-Uzorak 1 | 0,601 | 0,565 | 0,046* |
| Antitrombin-Uzorak 3 | 0,781 | 0,573 | 0,109 |
| PC-Uzorak 1 | 0,282 | 0,035* | 0,003* |
| PC-Uzorak 3 | 0,107 | 0,180 | 0,059 |
| PS-Uzorak 1 | 0,811 | 0,614 | 0,533 |
| PS-Uzorak 3 | 0,684 | 0,008* | 0,022* |
| aPCR-Uzorak 1 | 0,053 | 0,544 | 0,937 |
| aPCR-Uzorak 3 | 0,353 | 0,498 | 0,101 |
| FVIII-Uzorak 1 | 0,359 | 0,203 | 0,514 |
| FVIII-Uzorak 3 | 0,807 | 0,011* | 0,977 |
| Plazminogen-Uzorak 1 | 0,136 | 0,157 | 0,036* |
| Plazminogen-Uzorak 3 | 0,315 | 0,691 | 0,143 |
| D-dimeri-Uzorak 1 | 0,404 | 0,294 | 0,441 |
| D-dimeri-Uzorak 3 | 0,080 | 0,886 | 0,426 |
| Inhibitor plazmina-Uzorak 1 | 0,979 | 0,380 | 0,800 |
| Inhibitor plazmina-Uzorak 3 | 0,260 | 0,980 | 0,918 |
| PAI-1-Uzorak 1 | 0,501 | 0,782 | 0,867 |
| PAI-1-Uzorak 3 | 0,652 | 0,230 | 0,069 |

* $p < 0,05$

Međugrupna usporedba rezultata testova pokazuje različitost kod uzoraka prije i nakon 6 ciklusa uzimanja OK:

- Prije uzimanja OK pokazala se statistički značajna razlika kod PV-a i aktivnosti proteina C. PV je bio različit za grupu ispitanica starijih od 30 godina ($\bar{x}=12,1$ s) u odnosu na grupe 18-25 godina ($\bar{x}=12,5$ s) i 26-30 godina ($\bar{x}=12,48$ s), dok je aktivnost proteina C bila različita za grupu mlađu od 18 godina ($\bar{x}=96,11\%$) u odnosu na grupe 26-30 godina ($\bar{x}=106,78\%$) i starije od 30 godina ($\bar{x}=107,01\%$). Ova različitost se gubi nakon šest ciklusa uzimanja OK.
- U Uzorku 3, statistička značajnost javlja se u pretragama aktivnosti proteina S i FVIII. Aktivnost proteina S je bila statistički različita za ispitanice mlađe od 18 godina

($\bar{x}=69,92\%$) i od 18 do 25 godina ($\bar{x}=72,69\%$) u odnosu na grupu od 26 do 30 godina ($\bar{x}=81,94\%$) i grupu stariju od 30 godina ($\bar{x}=79,46\%$). Aktivnost FVIII bila je statistički različita za ispitanice u dobi 26-30 godina ($\bar{x}=83,71\%$) u odnosu na grupe ispitanica u dobi 18-25 godina 8 ($\bar{x}=104,31\%$) i starije od 30 godina ($\bar{x}=105,99\%$).

Indeks tjelesne mase kao čimbenik rizika nije tijekom studije bio nepromjenjiva varijabla te je i analiza rezultata zahtjevala provjeru značajnosti promjene BMI. Usporedbom srednjih vrijednosti na početku i kraju studije pokazano je da nema statistički značajne promjene BMI kod ispitanica (Tablica 19.). Ispitanice su prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije razvrstane u četiri grupe BMI:

- manje od 18,50
- od 18,50 do 24,99
- od 25,00 do 29,99
- više od 30,00

Najveći broj ispitanica bio je normalne tjelesne mase 18,50-24,99 od 159 do 155 na kraju studije, te su ostale grupe imale mali broj ispitanica čime je ograničeno tumačenje statističke značajnosti promjena, osobito u grupi s BMI >30.

Tablica 19. BMI ispitanica na početku i kraju studije

| | BMI-Uzorak 1 | BMI-Uzorak 3 | <i>p</i> vrijednost |
|-----------------------------|------------------|------------------|---------------------|
| $\bar{x}\pm SD$ | 21,83 \pm 3,03 | 21,96 \pm 3,02 | 0,6715 |
| Broj ispitanica (N): | | | |
| <18,50 | 14 | 12 | |
| 18,50-24,99 | 159 | 155 | |
| 25,00-29,99 | 17 | 20 | |
| ≥ 30 | 5 | 5 | |

\bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija;

Učinjena je međugrupna i unutargrupna analiza rezultata pretraga u odnosu na BMI grupu ispitanica prije i nakon uzimanja šest ciklusa oralnih kontraceptiva (Tablica 20.). Međugrupnom analizom rezultata težište je stavljeno na mogući učinak BMI među samim

ispitanicama, dok je unutargrupnom analizom rezultata vidljiviji učinak OK na pojedinu grupu BMI kod ispitanica.

Međugrupna analiza u prvoj mjernoj točki - Uzorku 1 pokazala je postojanje statistički značajne razlike za slijedeće rezultate:

- PV - nađena je statistički značajna razlika između ispitanica u grupama BMI <18,5 i 18,50-24,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI 25,00-29,99 i BMI >30. Ispitanice s višim BMI imale su kraća protrombinska vremena.
- Fibrinogen - nađena je statistički značajna razlika između ispitanica u grupama BMI <18,5 i 18,50-24,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI 25,00-29,99 i BMI >30. Ispitanice s višim BMI imale su višu aktivnost fibrinogena.
- Protein C - nađena je statistički značajna razlika između ispitanica u grupama BMI <18,5 i 18,50-24,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI 25,00-29,99 i BMI >30. Ispitanice s višim BMI imale su višu aktivnost proteina C.
- FVIII - nađena je statistički značajna razlika kod ispitanica s BMI 25,00-29,99 u odnosu na grupe s BMI 18,50-24,99 i BMI >30. U ovoj grupi ispitanica s blago povećanom tjelesnom masom bila je i najviša aktivnost FVIII.
- Plazminogen - nađena je statistički značajna razlika između ispitanica u grupama BMI <18,5 i 18,50-24,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI 25,00-29,99 i BMI >30. Ispitanice s višim BMI imale su višu aktivnost plazminogena.
- PAI-1 - nađena je statistički značajna razlika između ispitanica u grupama BMI <18,5 i 18,50-24,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI 25,00-29,99 i BMI >30. Ispitanice s višim BMI imale su višu aktivnost PAI-1.

Međugrupna analiza ispitanica nakon šest ciklusa uzimanja OK - u Uzorku 3, pokazala je da je statistička značajnost promjene ostala samo djelomično kod pretrage fibrinogena (grupa ispitanica s BMI >30 u odnosu na grupe ispitanica s BMI manjim od 25,00) i PAI-1 (grupa ispitanica s BMI 25,00-29,99 u odnosu na grupe ispitanica s BMI manjim od 25,00).

Niti jedna grupa ispitanica nije postigla statističku značajnost promjene rezultata samo u Uzorku 3.

Unutargrupna analiza rezultata pokazala je statistički značajne promjene kod BMI grupa ispitanica za slijedeće vrijednosti testova (Tablica 20.):

- BMI <18,50: sniženje aktivnosti proteina S, smanjenje aPCR omjera, povećanje aktivnosti plazminogena, smanjenje aktivnosti PAI-1

- BMI 18,50-24,99: ovo je grupa s najvećim brojem ispitanica - 81% od ukupnog broja na početku studije do 79% na njenom završetku. Time je ova grupa ispitanica najveći nosilac uočenih statistički značajnih promjena u provedenim pretragama hemostaze koji su na općoj razini prikazani u Tablici 9.: statistički značajne promjene su prisutne u svim pretragama osim kod aktivnosti FVIII
- BMI 25,00-29,99: skraćenje protrombinskog vremena, snižena aktivnost proteina S, povećana aktivnost plazminogena, povišena koncentracija d-dimera i snižena aktivnost PAI-1
- BMI >30,00: svega pet ispitanica činilo je ovu grupu čime je statistička obrada rezultata bila vrlo robustna i treba je tumačiti vrlo oprezno - ali je pokazala pojačanu aktivnost fibrinolitičkog dijela hemostaze - porastom aktivnosti plazminogena i koncentracije d-dimera

Tablica 20. Značajnost razlike rezultata koagulacijskih pretraga na početku i kraju studije u odnosu na BMI grupu ispitanica.

| Pretraga: | BMI grupa | | | | <i>p</i> vrijednost |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| | <18,50 (1.) | 18,50-24,99 (2.) | 25,00-29,99 (3.) | ≥30 (4.) | |
| PV - Uzorak 1 (s) | 12,60 (11,50-14,40) | 12,50 (10,70-14,40) | 11,90 (11,20-13,20) | 11,80 (11,50-11,90) | 0,004* (1. vs 3. i 4.; 2. vs 3. i 4.) |
| PV - Uzorak 3 (s) | 12,00 (10,80-13,30) | 11,60 (10,20-14,90) | 11,45 (10,70-12,30) | 11,60 (11,10-12,20) | 0,089 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,068 | <0,001* | <0,001* | 0,644 | |
| APTV - Uzorak 1 (s) | 28,60 (25,80-32,30) | 28,30 (23,80-35,60) | 27,60 (24,80-30,50) | 27,50 (27,20-34,30) | 0,316 |
| APTV - Uzorak 3 (s) | 27,35 (23,80-31,90) | 27,50 (23,00-36,80) | 26,40 (20,50-31,80) | 25,60 (24,90-28,80) | 0,266 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,154 | 0,001* | 0,268 | 0,081 | |
| Fibrinogen - Uzorak 1 (g/L) | 2,60 (2,00-3,20) | 2,70 (1,60-4,50) | 3,20 (2,30-3,60) | 3,30 (3,00-3,70) | 0,003 *(1. vs 3. i 4.; 2. vs 3. i 4.) |
| Fibrinogen - Uzorak 3 (g/L) | 2,85 (1,90-3,50) | 2,90 (0,90-5,90) | 3,30 (1,90-4,50) | 3,70 (2,80-4,40) | 0,028* (4. vs 1. i 2.) |
| <i>p</i> vrijednost | 0,185 | 0,002* | 0,250 | 0,255 | |
| Antitrombin - Uzorak 1 (%) | 101,50 (83,90-112,20) | 102,70 (81,50-127,44) | 103,90 (82,40-122,10) | 101,80 (94,80-111,70) | 0,722 |
| Antitrombin - Uzorak 3 (%) | 104,25 (81,40-122,00) | 97,80 (68,60-124,80) | 98,70 (84,20-113,80) | 103,60 (94,50-116,90) | 0,489 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,943 | <0,001* | 0,106 | 0,840 | |
| PC - Uzorak 1 (%) | 92,65 (75,40-138,30) | 100,40 (71,10-171,00) | 110,50 (85,10-153,53) | 118,10 (108,90-134,90) | 0,005* (1. vs 3. i 4.; 2. vs 3. i 4.) |
| PC - Uzorak 3 (%) | 106,30 (86,60-135,00) | 113,80 (38,20-177,90) | 126,50 (84,30-177,60) | 111,60 (105,30-179,42) | 0,161 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,140 | <0,001* | 0,107 | 0,766 | |
| PS - Uzorak 1 (%) | 85,40 (67,50-113,70) | 88,60 (59,90-141,75) | 90,00 (62,50-136,64) | 88,40 (82,00-97,30) | 0,896 |
| PS - Uzorak 3 (%) | 79,70 (44,90-87,60) | 73,60 (37,70-148,60) | 79,55 (51,10-105,00) | 77,90 (59,70-114,00) | 0,267 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,006* | <0,001* | 0,012* | 0,874 | |
| aPCR - Uzorak 1 (omjer) | 4,20 (3,10-6,40) | 4,30 (1,20-6,60) | 3,90 (2,70-5,70) | 4,00 (3,30-4,70) | 0,689 |
| aPCR - Uzorak 3 (omjer) | 3,60 (2,20-4,80) | 3,40 (1,10-11,00) | 3,45 (2,70-6,50) | 3,40 (2,40-4,80) | 0,935 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,043* | <0,001* | 0,533 | 0,250 | |

* $p < 0,05$; \bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

Tablica 20. Značajnost razlike rezultata koagulacijskih pretraga na početku i kraju studije u odnosu na BMI grupu ispitanica - nastavak.

| Pretraga: | BMI grupa | | | | <i>p</i> vrijednost |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| | <18,50 (1.) | 18,50-24,99 (2.) | 25,00-29,99 (3.) | ≥30 (4.) | |
| | medijan, raspon | | | | |
| FVIII-Uzorak 1 (%) | 80,15 (53,90-153,23) | 88,80 (52,10-244,40) | 123,90 (63,30-148,25) | 71,80 (60,50-112,30) | 0,046* (3. vs 2. i 4.) |
| FVIII-Uzorak 3 (%) | 96,65 (42,10-119,90) | 100,00 (31,80-278,50) | 83,30 (52,10-180,10) | 76,30 (58,60-94,50) | 0,248 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,465 | 0,101 | 0,416 | 0,977 | |
| Plazminogen-Uzorak 1 (%) | 88,50 (77,70-108,30) | 93,40 (71,80-125,60) | 100,40 (86,10-137,30) | 88,40 (82,00-97,30) | 0,006* (1. vs 3. i 4.; 2. vs 3. i 4.) |
| Plazminogen-Uzorak 3 (%) | 127,10 (86,30-151,60) | 126,50 (84,10-174,50) | 124,20 (96,60-171,30) | 126 (121,80-133,70) | 0,867 |
| <i>p</i> vrijednost | <0,001* | <0,001* | <0,001* | 0,001* | |
| D-dimeri-Uzorak 1 (µg/L FEU) | 231,75 (133,58-700,70) | 186,10 (92,00-1564,00) | 196,90 (108,70-294,80) | 169,80 (123,50-316,40) | 0,497 |
| D-dimeri-Uzorak 3 (µg/L FEU) | 279,80 (135,32-1173,90) | 295,60 (111,63-2145,90) | 305,40 (134,70-1611,20) | 203,40 (162,00-402,40) | 0,699 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,297 | <0,001* | 0,011* | 0,037* | |
| Inhibitor plazmina-Uzorak 1 (%) | 94,65 (87,50-110,70) | 102,50 (82,40-128,15) | 108,00 (87,60-124,37) | 98,80 (94,70-112,70) | 0,096 |
| Inhibitor plazmina -Uzorak 3 (%) | 104,10 (88,20-120,00) | 108,50 (87,60-128,90) | 110,70 (95,20-129,76) | 108,80 (103,10-146,60) | 0,255 |
| <i>p</i> vrijednost | 0,071 | <0,001* | 0,129 | 0,167 | |
| PAI-1-Uzorak 1 (U/mL) | 3,65 (2,80-5,00) | 4,20 (1,76-8,60) | 5,20 (2,00-8,79) | 4,80 (4,20-7,20) | 0,005* (1. vs 3. i 4.; 2. vs 3. i 4.) |
| PAI-1-Uzorak 3 (U/mL) | 2,75 (2,00-4,70) | 3,40 (1,60-6,80) | 4,50 (1,90-6,30) | 3,80 (3,00-5,20) | 0,015* (3. vs 1. i 2.) |
| <i>p</i> vrijednost | 0,037* | <0,001* | 0,048* | 0,083 | |

* $p < 0,05$; \bar{x} -srednja vrijednost; SD-standardna devijacija

Kao česta nuspojava uzimanja OK navodi se povećanje tjelesne mase. Iako usporedba promjene BMI prije i poslije studije nije pokazala statističku značajnost promjene (Tablica 19.), učinjena je dodatna analiza u odnosu na formulaciju OK koje su uzimale ispitanice (Tablica 21).

Rezultati pokazuju da nijedna formulacija OK tijekom šest ciklusa uzimanja nije statistički značajno utjecala na promjenu BMI kod ispitanica.

Tablica 21. Utjecaj formulacije OK na BMI ispitanica (BMI1 prije početka uzimanja OK, BMI2 nakon 6 ciklusa OK) (medijan, raspon)

| Formulacije OK | N | BMI1 | BMI2 | <i>p</i> vrijednost |
|-------------------|----|------------------------|------------------------|---------------------|
| 20EE2/DRSP | 28 | 21,44 (18,70-25,56) | 21,17 (18,38-25,60) | 0,697 |
| 20EE2/GSD | 35 | 21,20 (16,89-36,30) | 21,10 (18,36-31,02) | 0,876 |
| 30EE2/DRSP | 24 | 21,17 (17,16-28,72) | 21,56 (17,63-28,70) | 0,314 |
| 30EE2/LNG | 17 | 22,32 (17,71-32,66) | 22,30 (18,04-32,66) | 0,847 |
| 35EE2/CPA | 9 | 21,29 (19,81-33,43) | 20,76 (19,81-36,73) | 0,313 |
| 35EE2/NET | 30 | 20,73 (16,90-27,55) | 21,74 (16,90-26,81) | 0,074 |
| 35EE2/NGM | 52 | 20,47 (16,85-27,24) | 20,95 (16,85-27,40) | 0,107 |

OK-oralna kontracepcija; N-broj ispitanica;

4.4.1. Ostali rezultati obrade podataka s upitnih listića

Anamnestičkim uzimanjem podataka dobiveni su slijedeći podaci o profilu ispitanica:

- Podaci o trudnoćama: 140 (71,8%) ispitanica nije imalo djece, 21 (10,8%) ispitanica imala je jedno dijete, 31 (15,9%) ispitanica imala je dvoje djece, 3 (1,5%) ispitanice imale su troje djece, 21 (10,8%) ispitanica imala je namjerni prekid trudnoće - 18 ispitanica imale su jedan namjerni pobačaj, a 3 ispitanice imale su 2 namjerna pobačaja
- Uzimanje alkohola: 56 (29,2%) ispitanica je prigodno konzumiralo alkohol u maloj količini
- Tjelovježba: 49 (25,1%) ispitanica redovito je vježbalo do 6 sati tjedno
- Tromboembolijske bolesti u obitelji: 75 (38,5%) ispitanica imalo je pozitivnu obiteljsku anamnezu na tromboembolijske bolesti (Tablica 22.)
- Nuspojave uzimanja OK: 48 (24,6%) ispitanica prijavilo je nuspojave tijekom prva tri ciklusa uzimanja OK, a kod 16 ispitanica nuspojave su bile prisutne i nakon šestog

ciklusa. Najčešće nuspojave bile su redom: probojna krvarenja (16 ispitanica), mučnina (12 ispitanica), glavobolja (12 ispitanica), osjećaj napetosti u dojčkama i trbuhu (11 ispitanica)

Tablica 22. Učestalost trombo-embolijskih događaja u obiteljskoj anamnezi ispitanica

| Trombo-embolijski događaj | N | % |
|---------------------------|----|-------|
| CVI | 36 | 48,0% |
| DVT | 5 | 6,7% |
| DVT+CVI | 1 | 1,3% |
| DVT+PE | 1 | 1,3% |
| DVT+PE+CVI | 1 | 1,3% |
| IM | 21 | 28,0% |
| IM+CVI | 2 | 2,7% |
| IM+DVT | 3 | 4,0% |
| NAGLA SMRT | 1 | 1,3% |
| NAGLA SMRT+IM | 1 | 1,3% |
| PE | 2 | 2,7% |
| PE+CVI | 1 | 1,3% |

N-broj ispitanica; CVI-cerebrovaskularni inzult; DVT-duboka venska tromboza; PE-plućna embolija; IM-infarkt miokarda

Od navedenih anamnestičkih podataka utjecaj na koagulacijske pretrage može imati samo pozitivna obiteljska anamneza na trombo-embolijske bolesti. U Tablici 23. prikazani su rezultati koagulacijskih pretraga u odnosu na obiteljsku anamnezu.

Statistički značajna razlika nađena je za slijedeće koagulacijske parametre:

- Smanjena aktivnost fibrinogena na završetku studije (Uzorak 3) u grupi ispitanica s pozitivnom obiteljskom anamnezom upućuje na druge uzroke ovakvog rezultata jer smanjena aktivnost fibrinogena ne povećava rizik za razvoj VTE.
- Smanjena aktivnost proteina C u grupi TE-DA prije uzimanja OK (Uzorak 1), međutim nakon šest ciklusa OK značajnost se izgubila.
- Smanjeni omjer aPCR i aktivnost proteina S na kraju studije (Uzorak 3) kod ispitanica s pozitivnom obiteljskom anamnezom u odnosu na ostale ispitanice upućuje na izraženije promjene rezultata za ove pretrage i time veći prokoagulacijski učinak OK.

Tablica 23. Učinak pozitivne obiteljske anamneze na koagulacijske pretrage ispitanica na početku i završetku studije. Ispitanice su razvrstane u skupine TE-DA s anamnestičkim podacima o trombo-embolijama u obitelji i TE-NE za ispitanice bez oboljelih u obitelji. Rezultati testova su izraženi kao srednja vrijednost \pm st.devijacija ($\bar{x}\pm SD$)

| Vrsta pretrage: | TE-NE N=120 | TE-DA N=75 | <i>p</i> vrijednost |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| PV-Uzorak 1 | 12,40 \pm 0,74 | 12,49 \pm 0,62 | 0,362 |
| PV-Uzorak 3 | 11,78 \pm 0,84 | 11,73 \pm 0,83 | 0,715 |
| APTV-Uzorak 1 | 28,68 \pm 2,38 | 28,62 \pm 2,12 | 0,851 |
| APTV- Uzorak 3 | 27,33 \pm 2,61 | 28,04 \pm 2,64 | 0,068 |
| Fibrinogen-Uzorak 1 | 2,85 \pm 0,50 | 2,72 \pm 0,43 | 0,066 |
| Fibrinogen-Uzorak 3 | 3,12 \pm 0,75 | 2,90 \pm 0,56 | 0,030* |
| Antitrombin-Uzorak 1 | 102,70 \pm 9,01 | 101,94 \pm 8,13 | 0,552 |
| Antitrombin-Uzorak 3 | 99,12 \pm 10,85 | 96,92 \pm 10,41 | 0,1634 |
| PC-Uzorak 1 | 105,88 \pm 18,23 | 99,25 \pm 15,57 | 0,010* |
| PC-Uzorak 3 | 117,99 \pm 18,41 | 115,14 \pm 21,95 | 0,329 |
| PS-Uzorak 1 | 90,85 \pm 13,13 | 89,23 \pm 17,24 | 0,459 |
| PS-Uzorak 3 | 77,19 \pm 18,13 | 70,61 \pm 17,87 | 0,014* |
| aPCR-Uzorak 1 | 4,31 \pm 1,01 | 4,12 \pm 1,13 | 0,224 |
| aPCR-Uzorak 3 | 3,72 \pm 1,10 | 3,34 \pm 0,86 | 0,012* |
| FVIII-Uzorak 1 | 96,32 \pm 35,07 | 98,65 \pm 34,70 | 0,651 |
| FVIII-Uzorak 3 | 98,37 \pm 38,04 | 104,81 \pm 31,91 | 0,223 |
| Plazminogen-Uzorak 1 | 94,35 \pm 9,81 | 93,67 \pm 11,18 | 0,656 |
| Plazminogen-Uzorak 3 | 124,36 \pm 16,78 | 126,33 \pm 19,46 | 0,454 |
| D-dimeri-Uzorak 1 | 247,50 \pm 175,63 | 207,89 \pm 88,96 | 0,072 |
| D-dimeri-Uzorak 3 | 404,11 \pm 327,27 | 348,08 \pm 248,84 | 0,206 |
| Inhibitor plazmina-Uzorak 1 | 103,89 \pm 9,98 | 101,88 \pm 8,52 | 0,150 |
| Inhibitor plazmina-Uzorak 3 | 108,53 \pm 9,04 | 108,67 \pm 8,84 | 0,916 |
| PAI-1-Uzorak 1 | 4,36 \pm 1,15 | 4,03 \pm 1,17 | 0,054 |
| PAI-1-Uzorak 3 | 3,68 \pm 0,99 | 3,46 \pm 0,91 | 0,121 |

* $p < 0,05$; N-broj ispitanica;

5. RASPRAVA

Brojne studije su proučavale učinak oralnih kontraceptiva na različite dijelove hemostaze, a najčešće se radilo o studijama usporedbe dvije formulacije oralnih kontraceptiva.

Ovo prospektivno istraživanje imalo je za cilj utvrditi ukupni učinak najčešće korištenih formulacija oralnih kontraceptiva u vremenu trajanja istraživanja na vrijednosti koagulacijskih pretraga u lokalnoj populaciji žena u Hrvatskoj.

Rezultati, zabilježeni nakon tri i šest ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva, ukazuju na prisutnost statistički značajnih promjena u svim dijelovima hemostaze: prokoagulacijskom, antikoagulacijskom, profibrinolitičkom i antifibrinolitičkom dijelu. Ukupni učinci promjene, neovisni o vrsti formulacije oralnog kontraceptiva, bili su umjereni i ukazivali su na težnju sustava hemostaze da postigne novu točku ravnoteže (43, 44). Tijekom trajanja studije nijedna ispitanica nije oboljela od trombo-embolijskih bolesti.

Usporedbom sa sličnim istraživanjima (45-48) rezultati se podudaraju za vrijednosti proteina S, proteina C, plazminogena, inhibitora plazmina, fibrinogena i d-dimera, ali se razlikuju rezultati za pretrage PV, APTV, aPCR, PAI-1 i FVIII.

Rezultati aPCR odgovaraju podacima iz studija za žene koje nemaju FV Leiden (49-51). Iako je u istraživanju upotrijebljena rutinska metoda za aPCR koja se osniva na modifikaciji APTV-a radi čega se smatra manje osjetljivom (52), rezultati su pokazali statističku značajnost promjene. Jedan od čimbenika koji utječe na rezultate aPCR pretrage je aktivnost FVIII (50, 53), koja se nije statistički značajno mijenjala tijekom ovog istraživanja što upućuje da drugi čimbenici unutrašnjeg puta zgrušavanja imaju veći utjecaj. Ovaj nalaz dodatno potvrđuju statistički značajne promjene samog APTV-a koji je pokazao kraće vrijeme zgrušavanja. U studiji RATIO (54), opisani su rezultati povišene aktivnosti FIX, FXI i FXII kod mladih žena na oralnoj kontracepciji radi čega je povećan rizik od arterijskih tromboza.

Povišena aktivnost FVIII iznad 150% smatra se jednim od čimbenika rizika koji pridonose nastanku trombo-embolijske bolesti (55). Međutim, dobiveni su oprečni rezultati u istraživanjima vezanim za uzimanje oralne kontracepcije. Neke studije pokazale su povišenje aktivnosti FVIII (56, 57), ali rezultat ovog istraživanja podudara se sa studijama Luxembourg i sur. (48), te Winkler i sur. (58) koji opisuju izostanak promjena u aktivnosti FVIII pod hormonalnim utjecajem. Jedan od mogućih razloga različitim rezultatima istraživanja je visok učinak nasljednih osobina gena za FVIII koji određuje i do 40% aktivnosti FVIII u odgovoru na stanje organizma (59, 60).

Inhibitor plazmina uz α -2 makroglobulin je glavni regulator razgradnje plazmina. Povišena aktivnost inhibitora plazmina u istraživanju može se objasniti hemostatskim odgovorom na povećanje aktivnosti plazminogena, ali i na povećanje aktivnosti proteina C čiji je također inhibitor (61).

Povišena aktivnost PAI-1 se smatra čimbenikom rizika za infarkt miokarda, a njegova aktivnost se povezuje s polimorfizmom gena PAI-1 4G/5G. Rezultati istraživanja pokazuju sniženje aktivnosti PAI-1 u obje vremenske točke kod uzimanja oralnih kontraceptiva u odnosu na osnovne vrijednosti kod ispitanica što se na prvi pogled podudara s rezultatima iz literature (62, 63). Međutim, detaljnija analiza aktivnosti PAI-1 u odnosu na genotip ispitanica prikazana u poglavlju 4.3 pokazala je da je sniženje aktivnosti PAI-1 prisutno samo u grupi ispitanica heterozigota s genotipom PAI-1 4G/5G već nakon trećeg ciklusa oralnih kontraceptiva ($p=0,0045$), a zadržalo je statističku značajnost i nakon šestog ciklusa ($p<0,0001$). Ovi rezultati potvrđuju nepodudarnost nađenu u literaturi (43, 44, 58, 64), te ukazuju na veći utjecaj okoliša ili dodatnih polimorfizama vezanih uz gen PAI-1 (65, 66). Sniženje aktivnosti PAI-1 također može biti posljedica estrogenskog učinka na funkciju jetre u smislu proizvodnje i odstranjenja iz cirkulacije (67). Snižanjem količine estrogena u formulacijama oralnih kontraceptiva može se očekivati izostanak ovog učinka.

Studije učinka oralnih kontraceptiva na hemostazu ukazale su na različitost koagulacijskog i fibrinolitičkog odgovora kod žena različite rasne i etničke pripadnosti.

U talijanskoj studiji, Lippi i sur. (68) istraživali su 137 žena koje su uzimale kontraceptive treće generacije. Njihovi rezultati se podudaraju s rezultatima ove studije za pretrage aPCR, aktivnost antitrombina, proteina C i S.

U njemačkoj studiji, Wiegratz i sur. (43) su u istraživanju 91 ispitanice analizirali rezultate koagulacijskih pretraga nakon šestomjesečnog uzimanja četiri niskoestrogenske formulacije oralnih kontraceptiva. Studija je pokazala značajno sniženje aktivnosti PAI-1 i izostanak promjene kod aPCR (osim za 20 μ g EE2+ 2 mg dienogest) što je u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, rezultati za koncentraciju d-dimera, aktivnosti fibrinogena, plazminogena, proteina C i S se podudaraju, dok se vrijednosti aktivnosti FVII, antitrombin i fragmente protrombina 1+2 razlikuju prema formulacijama oralnih kontraceptiva.

U Bugarskoj je provedeno istraživanje učinka gestodena na hemostazu kod 70 žena tijekom godinu dana (69). Prikazani rezultati podudarali su se s rezultatima ove studije za koncentraciju d-dimea, aktivnosti fibrinogena, plazminogena, proteina C i S, ali nije nađena statistički značajna promjena rezultata PV-a i APTV-a dok su za inhibitor plazmina i

aktivnost antitrombina rezultati ovisili o formulaciji oralnog kontraceptiva, odnosno o količini estrogena. Poznato je da količine estrogena manje od 35 µg u formulaciji oralnih kontraceptiva imaju minimalne, ali statistički značajne promjene u sustavu hemostaze. Kliničko značenje ovih promjena nije u potpunosti utvrđeno (45, 47).

U ovoj studiji potvrdile su se promjene u pretragama hemostaze za sve ispitivane nisko-estrogenske formulacije oralnih kontraceptiva. Većina rezultata (PV, APTV, protein C i S, aPCR, plazminogen, d-dimeri i inhibitor plazmina) bila je statistički značajno promijenjena već nakon tri ciklusa uzimanja kontracepcije. Ove vrijednosti su ostale promijenjene u odnosu na osnovne vrijednosti i nakon šest ciklusa, s tendencijom vraćanja osnovnim vrijednostima. Međutim, kod dijela ispitanica, koncentracija d-dimera i aktivnost proteina S pokazale su patološke rezultate nakon 3 ciklusa i ostale su takve i nakon šestog ciklusa kontracepcije.

Rezultati dobiveni određivanjem koncentracije d-dimera pokazale su da 42 ispitanice (21%) imaju vrijednosti više od referentnog intervala, a među njima 10 ispitanica je imalo vrijednosti više od 1100 µg/L FEU. Kod ovih ispitanica nije dijagnosticirano stanje koje bi moglo utjecati na rezultat. Polovica ispitanica s povišenom koncentracijom d-dimera bile su u grupi 35EE2/NGM ili 20EE2/DRSP. Dodatna međugrupna analiza prikazana u tablici 14. potvrdila je rezultate sličnih studija (47, 70), tj. da među grupama nema statistički značajne razlike u koncentraciji d-dimera, te stoga povišene vrijednosti nisu posljedica količine estrogena ili tipa gestagena.

Devetnaest ispitanica (9,7%) imalo je aktivnost proteina S manju od 50% (referentni interval za aktivnost proteina S kod žena koje uzimaju oralnu kontracepciju je 52-118%), a ispitanice su također pripadale većinom (14 ispitanica) grupi 35EE2/NGM (7 ispitanica) ili 20EE2/DRSP (7 ispitanica). Međutim, kod analize međugrupnih rezultata aktivnosti proteina S, nađena je značajnost između 30EE2/LNG u odnosu na grupe 35EE2/NGM i 20EE2/DRSP, što potvrđuje da formulacije oralnih kontraceptiva koje sadrže drospirenon imaju sličan učinak na aktivnost proteina S kao kontraceptivi treće generacije poput norgestimata, u odnosu na kontraceptive druge generacije čiji je predstavnik u studiji formulacija 30EE2/LNG grupa (47, 71).

Analizom rezultata među formulacijama oralnih kontraceptiva istakle su se razlike u aktivnosti proteina S, proteina C, antitrombina i PAI-1.

Smanjena aktivnost proteina S ima učinak na povećanje rezistencije na aktivirani protein C i smatra se jednim od važnih čimbenika u mehanizmu nastanka trombo-embolijskih bolesti

(3). Usporedba rezultata pokazala je dobru korelaciju između aktivnosti proteina S i aPCR u obje mjerne vremenske točke ($p < 0,05$).

Aktivnost proteina C pokazala je značajnost razlike između, na primjer, grupa 35EE2/NET i formulacija koje sadrže drospirenon, što se može objasniti biološkim značajkama pojedinih gestagena i njihovim odnosom na estrogensku komponentu (51). Noretisteron ima estrogenski i androgeni učinak, te je pokazao najmanje povećanje aktivnosti proteina C u usporedbi s drospirenonom koji ima antiestrogenski i antiandrogeni učinak (9).

Ranije studije su pokazale smanjenu aktivnost antitrombina pri uzimanju kontraceptiva treće generacije (50, 68, 70), što se podudara s rezultatima ovog istraživanja - značajno je niža aktivnost antitrombina u grupi 20EE2/GSD u obje mjerene vremenske točke i 35EE2/NGM nakon šest ciklusa u odnosu na osnovne vrijednosti, ali su ove snižene vrijednosti još uvijek bile unutar referentnog intervala. U studiji koju su proveli Winkler i sur. (58) nađena je snižena aktivnost antitrombina i za grupu 30EE2/LNG što ovo istraživanje ne može potvrditi.

Različitost rezultata za PAI-1 u studijama je već ranije raspravljen. Analiza PAI-1 za pojedinu formulaciju kontraceptiva pokazuje statistički značajnu promjenu za 20EE2/DRSP grupu u obje mjerene točke, 30EE2/LNG grupu samo nakon tri ciklusa i 35EE2/NET nakon šest ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva.

Usporedbom rezultata grupa s istom količinom estrogena ili istim gestagenom dobiveni su rezultati učinka pojedinog gestagena ili važnosti količine estrogena među niskodoznim kontraceptivima.

Grupe s 30 μg EE2 sadržavale su kao gestagen levonorgestrel ili drospirenon, a nisu pokazale statistički značajne razlike u utjecaju na učinjene pretrage hemostaze. U grupama s 35 μg EE2 kojima je gestagenska komponenta norgestimat ili noretisteron, statistički značajna razlika je bila samo u aktivnosti inhibitora plazmina, ali su rezultati bili unutar referentnog intervala. U grupama s najmanjom količinom estrogena - 20 μg EE2 i gestagenskim komponentama gestodenom ili drospirenonom, nađeno je najviše statistički značajnih razlika rezultata - aktivnost proteina C i S, PAI-1 i plazminogena.

Gestoden i drospirenon se razlikuju u svojim biološkim značajkama, androgenim i glukokortikoidnim aktivnostima te visokim afinitetom gestodena za SHBG, što je rezultiralo manjim promjenama u rezultatima koagulacijskih pretraga u odnosu na drospirenon. Afinitet vezanja za SHBG korelira s aktivnošću čimbenika koji sudjeluju u antikoagulacijskom učinku proteina C: povećanje razine SHBG je povezano sa povećanom rezistencijom na aktivirani protein C. Gestageni koji se vežu za SHBG poput gestodena time smanjuju potencijalni učinak estrogenske komponente oralnog kontraceptiva, dok gestageni koji se ne vežu za

SHBG poput drospirenona ne mijenjaju potencijal učinka estrogenske komponente u oralnom kontraceptivu. Važno je istaknuti da je utjecaj gestagena na vrijednosti SHBG u plazmi samo jedan od mehanizama na koji oni djeluju, dok se njihov učinak na steroidne receptore, a time na promjene u hemostatskom sustavu, još uvijek istražuje (3, 72, 73).

Usporedbom grupa koje sadržavaju drospirenon i EE2 u količini 20 µg i 30 µg dobiveni su podaci o učinku smanjivanja estrogenske komponente na koagulacijske pretrage. Drospirenon je relativno novi gestagen na tržištu - derivat je spironolaktone te posjeduje antimineralokortikoidna i antiandrogena svojstva. Antimineralokortikoidno svojstvo očituje se u sprječavanju transaktivacije mineralokortikoidnih receptora čime je smanjen aldosteronski učinak te je povećano izlučivanje natrija i vode iz organizma, a time i blago smanjenje tjelesne mase i krvnog tlaka (74). Antiandrogeno svojstvo proširuje indikaciju uporabe pripravaka s drospirenonom za liječenje žena s aknama, hirsutizmom ili sindromom policističnih jajnika. Ne veže se na SHBG te ne mijenja učinak količine EE2 u formulaciji (75), stoga ukupni trombotički rizik za drospirenon ovisi o količini estrogena. U ovoj studiji, statistički značajna razlika u testovima bila je prisutna samo kod aktivnosti plazminogena. Formulacija 20EE2/DRSP imala je veću aktivnost plazminogena, što sugerira jači fibrinolitički odgovor na nastale hemostatske promjene. Studije koje uspoređuju ove dvije formulacije su malobrojne, u istraživanju Kluff i sur. (44) nađena je razlika samo u aktivnosti proteina S.

Studija rizika za nastanak venske tromboze u ovisnosti o količini estrogena i vrsti progesterona pokazala je korelaciju povišenog rizika za pripravke s većom količinom EE2 - autori su relativni rizik za 30µg EE2 označili s 1, tako je za 20 µg EE2 iznosio 0,8 (95% CI 0,5-1,2), a za 50µg EE2 1,9 (95% CI 1,1-3,4). Analiza tipa progesterona pokazala je relativni rizik: levonorgestrel 3,6, noretisteron 3,9, gestoden 5,6, norgestim 5,9, drospirenon 6,3, ciproteron acetat 6,8 (76).

U ovom radu pokazano je da su sve formulacije oralnih kontraceptiva statistički značajno mijenjale rezultate većine pretraga, ali formulacija 20µg EE2+GSD je imala ukupno najmanji utjecaj na provedene pretrage zgrušavanja i fibrinolize.

Molekularnim ispitivanjem najučestalijih nasljednih trombofilnih faktora - FV Leiden, FII G20210A te polimorfizma PAI-1 5G/4G potvrđeni su jednaki rezultati među ispitanicama kao i u općoj populaciji u Republici Hrvatskoj (77).

Iako rezultati pokazuju statistički značajne razlike u nekim koagulacijskim pretragama između ispitanica sa ili bez mutacije, njihov broj je premali te tumačenje treba ograničiti. Za

ispitanice s FV Leiden očekivana je razlika u aPCR-u koji služi kao pretraga probira za ovu mutaciju, ali uočljiva je i velika razlika u smanjenju aktivnosti proteina S. Utjecaj FV Leiden na nižu aktivnost proteina S opisana je u literaturi, a poznato je da je prije otkrića FV Leiden više osoba proglašavano da imaju manjak proteina S. Međutim još nije jasno radi li se o utjecaju reagensa na rezultat ili je u podlozi još nerazjašnjen koagulacijski mehanizam (78, 79).

Kod ispitanica s FII G20210A nije moguće komentirati rezultate za aPCR koji su pokazali statističku značajnost razlike rezultata u odnosu na ispitanice bez mutacije, jer od 4 ispitanice s FII G20210A, jedna ispitanica je ujedno imala i FV Leiden čime je značajno snižen medijan vrijednosti za aPCR.

Heterogenost rezultata za polimorfizam PAI-1 5G/4G je raspravljen ranije u tekstu.

Pušenje samostalno pridonosi povećanju rizika za nastanak arterijske i venske tromboze (26, 32, 76). Većina studija ističe promjene u povišenju aktivnosti fibrinogena, sniženju aktivnosti antitrombina, te povišenoj aktivnosti PAI-1 kao glavne učinke pušenja na hemostazu. Ove promjene su bile izraženije kod žena koje su uzimale oralnu kontracepciju ili hormonsko nadomjesno liječenje. U ovom radu nije nađena statistički značajna razlika među ispitanicama u navedenim pretragama. Jedina razlika je nađena, u osnovnom uzorku za vrijednost APTV-a čija je srednja vrijednost kod pušačica bila niža nego kod nepušačica (usporedba medijana 27,75s vs. 28,6s). Međutim, uzimanjem oralne kontracepcije kroz šest ciklusa razlika se izgubila ukazujući na veći utjecaj oralne kontracepcije nego pušenja u hemostatskim promjenama (usporedba medijana 27,7s vs 27,3s). U studiji Fruzzetti-ja uzimanje EE2 u dozi 30-35 µg uzrokuje veće promjene u aktivnosti fibrinogena nego u dozi od 20 µg EE2 (80). Zbog malog broja ispitanica-pušačica u svakoj skupini formulacije oralnih kontraceptiva, ova tvrdnja nije potvrđena. Nedavnim radom Pretorius i sur. (81), analiziran je izgled fibrinske mrežice pod elektronskim mikroskopom, te objašnjen učinak pušenja i estrogena na fibrinsku mrežicu. Autori uvode pojam „fenomen ljepljivog fibrina“ koji smatraju odgovornim za protrombotički učinak ovih čimbenika rizika, a ne samu promjenu koncentracije i /ili aktivnosti koagulacijskih čimbenika.

Hemostatske promjene uslijed starenja dobro su opisane, a obuhvaćaju povišenje aktivnosti prokoagulacijskih čimbenika poput fibrinogena, FV, FVII, FVIII, FIX i von Willebrandova faktora, sniženje fibrinolitičke aktivnosti povećanom aktivnošću PAI-1 kao glavnog regulatora aktivacije plazminogena, te povećanje agregabilnosti trombocita (30, 82).

Kod žena hemostatske promjene ovise i o njihovom hormonalnom statusu, a tako i u slučaju uzimanja sintetičkih hormona kao oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije. Danas žene ranije počinju uzimati oralne kontraceptive i uzimaju ih kroz duže vremensko razdoblje što je dovelo do sniženja granice za povećani rizik od trombo-embolijskih bolesti s 45 godina na 33 godine. Kod žena s trombofilijom pojavnost trombo-embolijskih bolesti javlja se nakon manjeg broja ciklusa uzimanja oralnih kontraceptiva, a nije usko vezana uz samu dob (83-85). U ovoj studiji, ispitanice su bile do 40 godina starosti te su i njihovi rezultati pokazali izostanak razlike među ispitanicama (iako statistički značajne - klinički irelevantna razlika u PV i PC koja se izgubila nakon uzimanja oralne kontracepcije). Stoga je izgledno da uzimanje oralne kontracepcije ima veći učinak na sustav hemostaze od starosti ispitanica. Posebno je značajan i rezultat aktivnosti proteina S nakon šest ciklusa koji pokazuje značajno sniženje aktivnosti kod ispitanica do 25 godina do patoloških vrijednosti. Moguće objašnjenje ovih rezultata je u tome što 83 od 140 ispitanica u dobi do 25 godina pripada grupama s norgestimatom ili drospirenonom koji su pokazali i najveći učinak u smislu smanjenja aktivnosti proteina S u odnosu na bazični uzorak.

Među ispitanicama koje su prvi puta uzimale oralnu kontracepciju i višestrukih korisnica ustanovljene su razlike u rezultatima pretraga. U osnovnom uzorku prisutna je razlika u aktivnosti antitrombina, proteina C i plazminogena, ali unutar referentnog intervala i bez kliničke značajnosti. Ove razlike se gube na kraju studije. Međutim nakon šest ciklusa oralnih kontraceptiva prisutna je razlika u APTV -u i nižoj aktivnosti proteina S, što je mogući utjecaj formulacija oralnih kontraceptiva s norgestimatom ili drospirenonom koje su uzimale češće mlađe ispitanice.

Uzimanje oralne kontracepcije po prvi puta ima viši rizik za razvoj tromboembolijskih bolesti (86, 87). U meta-analizi usporedbe oralnih kontraceptiva druge i treće generacije, Kemmeren i sur. (88), navode da je relativni rizik 2,6-4,2 puta veći nego kod žena koje su uzimale oralnu kontracepciju u više navrata. Nedostaju studije koje bi pronašle biološku podlogu, tim više što su ispitanice koje prvi puta uzimaju kontracepciju u prosjeku značajno mlađe od višekratnih korisnica, što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja ($\bar{x} \pm SD$ slijedom: 20,93±4,87 vs. 27,14±5,99 godina; $p < 0,001$).

Debljina je široko prihvaćeni rizik za razvoj venskih tromboza, osobito dubokih venskih tromboza nogu, dok je incidencija plućne embolije znatno manja (89, 90). Biološka potvrda očituje se u povišenim aktivnostima čimbenika zgrušavanja FVII, FVIII, FXII i fibrinogena, a

pridonosi joj venska staza donjih udova i manjak tjelovježbe (91, 92). U ovoj studiji, u provedenim analizama prisutna je statistički značajna razlika u osnovnom uzorku među ispitanicama - više vrijednosti BMI povezane su s skraćenjem PV-a, povišenom aktivnosti fibrinogena, proteina C, FVIII, plazminogena i PAI-1. Vrijednosti BMI \geq 30 povezuju se s smanjenom sposobnosti fibrinolize zbog otpuštanja PAI-1 iz visceralne masti (32, 93). Nakon šest ciklusa oralne kontracepcije, značajnost se zadržala u samo dvije pretrage - povišena aktivnost fibrinogena za BMI \geq 30 u odnosu na ispitanice s BMI <25, te povišena aktivnost PAI-1 kod ispitanica s BMI>25, u odnosu na ostale ispitanice. Rad Pomp i sur. (29) na temelju podataka iz MEGA studije (engl. Multiple Environmental and Genetic Assessment of risk factors for venous thrombosis study), potvrdio je sinergistički učinak povećane tjelesne mase i uzimanja oralne kontracepcije drastičnim povećanjem rizika 24 puta za pretile žene u odnosu na žene normalne tjelesne mase bez oralne kontracepcije, odnosno povećani rizik 23,78 kod uzimanja oralne kontracepcije nasuprot 3,04 puta kod žena s BMI \geq 30 u dobi od 18-39 godina.

Učinak oralne kontracepcije na promjenu tjelesne mase u smislu povećanja nije dokazan u ovoj studiji ($p=0,6715$) što je u skladu sa sličnim radovima (94) i Cochrane preporuci za kliničare kao dokaz snage B.

Prateći razvoj formulacija oralnih kontraceptiva i laboratorijske dijagnostike, među kliničarima se stalno javlja dvojba treba li žene koje uzimaju kontracepciju pratiti dijagnostičkim pretragama ili je dovoljno uzimanje anamnestičkih podataka. Postoji niz preporuka za kliničare, ali studije su malobrojne. Zbog sve veće dostupnosti i pada cijene pretraga, provedene „cost-effective“ studije ubrzo nisu primjenjive. Apsolutno treba razlikovati molekularno testiranje nasljedne trombofilije i praćenje koagulacijskog statusa ispitanice na oralnoj kontracepciji. U TREATS studiji (18) dokazano je da molekularno testiranje ispitanica prije uzimanja oralne kontracepcije nije preporučljivo, osim u slučajevima poznate obiteljske anamneze o postojanju nasljedne trombofilije. I rezultati u ovom radu pokazuju da od 5 ispitanica s FV Leiden - 3 ispitanice imale su negativnu obiteljsku anamnezu na trombo-embolijske bolesti. Ispitanica s FV Leiden i FII G20210A također nije navela trombo-embolijske bolesti u obitelji. Dodatan problem je testiranje na mutacije koje nisu dokazano povezane s pojavom venskih tromboza, ali uz postojanje FV Leiden i FII G20210A povećavaju rizik za trombo-embolijski događaj uzimanjem oralnih kontraceptiva, poput MTHFR C677T, PAI-1 5G/4G, FXIII Val3Leu i drugih. Ovakvim pristupom se

neopravdano ženama uskraćuje oralna kontracepcija kao metoda protiv začeća, ali i čine neopravdani troškovi zdravstvenom sustavu.

U preporukama kliničarima nerijetko se navodi da je obiteljska anamneza dovoljna za smanjenje rizika od trombo-embolijskih bolesti. U ovom radu 38% ispitanica ima sigurno pozitivnu obiteljsku anamnezu - čime bi one trebale biti uskraćene za oralnu kontracepciju, dok je ukupno svega 8 ispitanica (4%) sa nasljednom trombofilijom. U radu Aznar i sur. (95), čak 84% žena koje su uzimale oralnu kontracepciju imalo je pozitivnu obiteljsku anamnezu, dok je među ženama koje su oboljele od duboke venske tromboze za vrijeme uzimanje oralne kontracepcije 42% imalo negativnu obiteljsku anamnezu.

U zaključku, ovim istraživanjem je pokazano da pod utjecajem oralnih kontraceptiva patološki rezultati pretraga aktivnosti proteina S i koncentracije d-dimera mogu poslužiti kao pomoć kliničarima za testiranje žena na oralnoj kontracepciji u slučaju sumnje na trombo-embolijski događaj.

6. ZAKLJUČCI

1. Oralni kontraceptivi utječu na odabrane pretrage zgrušavanja i fibrinolize u istraživanju, osim na aktivnost FVIII. Učinak je dugotrajan i vidljiv i nakon šest ciklusa kontracepcije. Zahvaćeni su svi dijelovi sustava hemostaze, ali je uočljiva težnja organizma da postigne novu točku hemostatske ravnoteže.
2. Međusobnom usporedbom formulacija oralnih kontraceptiva ustanovljene su razlike u aktivnostima antitrombina, proteina C, proteina S, plazminogena i PAI-1 - odnosno postojanje razlika u antikoagulacijskom i fibrinolitičkom odgovoru.
3. Kod formulacija s istom količinom EE2 - za količine 30 i 35 µg nema većih razlika u rezultatima testiranja (NGM vs. NET u aktivnosti inhibitora plazmina, dok između LGN i DRSP nije bilo razlike). Međutim, formulacije s 20µg EE2 razlikuju se u utjecaju na aktivnost proteina C, proteina S, plazminogena i PAI-1 pri čemu GSD ima manje izražen ukupni učinak na hemostazu u odnosu na DRSP.
4. Polimorfizam PAI-1 5G/4G nema utjecaja na aktivnost PAI-1 kod mladih zdravih žena, a uzimanje oralnih kontraceptiva ne povećava aktivnost PAI-1.
5. Učestalost trombofilnih mutacija u istraživanju jednak je učestalosti u općoj populaciji te upućivanje žena na analizu trombofilnih mutacija prije uzimanja oralnih kontraceptiva nije opravdano.
6. Oralni kontraceptivi ne utječu na povećanje tjelesne mase ispitanica, ali tjelesna masa ispitanica utječe na rezultate koagulacijskih pretraga s prokoagulacijskim učinkom za žene s BMI >25,00. Statistički značajno su promijenjeni rezultati: skraćen PV, povišena aktivnost fibrinogena, proteina C, FVIII, plazminogena i PAI-1. Uzimanje oralnih kontraceptiva ispitanica s BMI>25, utječe na promjene aktivnosti fibrinogena i PAI-1.
7. Podatak o pozitivnoj obiteljskoj anamnezi o trombo-embolijskim bolestima, nije dovoljan za uskraćivanje oralne kontracepcije ženama.

8. Kod žena koje uzimaju oralnu kontracepciju i s visokim rizikom i/ili sumnjom na tromboembolijski događaj - određivanje aktivnosti proteina S i koncentracije d-dimera može pomoći odluci o nastavku ili prekidu oralne kontracepcije.

7. LITERATURA

1. Šimunić V. Dobrobit i rizici oralne hormonske kontracepcije. Zagreb: Fotosoft; 2008.
2. Dhont M. History of oral contraception. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010;15 Suppl 2:S12-8.
3. Tchaikovski SN, Rosing J. Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism. *Thromb Res* 2010;126:5-11.
4. Goldzieher JW, Stanczyk FZ. Oral contraceptives and individual variability of circulating levels of ethinyl estradiol and progestins. *Contraception* 2008;78:4-9.
5. The European Consensus Development Conference 2002: Sex Steroids and Cardiovascular Diseases. On the route to combined evidence from OC and HRT/ERT. *Maturitas* 2003;44:69-82.
6. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:201-10.
7. Haider Z, D'Souza R. Non-contraceptive benefits and risks of contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2009;23:249-62.
8. Burkman R, Bell C, Serfaty D. The evolution of combined oral contraception: improving the risk-to-benefit ratio. *Contraception* 2011;84:19-34.
9. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, et al. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 2003;46 Suppl 1:S7-S16.
10. Stanczyk FZ. All progestins are not created equal. *Steroids* 2003;68:879-90.
11. Martinelli I, Battaglioli T, Mannucci PM. Pharmacogenetic aspects of the use of oral contraceptives and the risk of thrombosis. *Pharmacogenetics* 2003;13:589-94.
12. Barsoum MK, Heit JA, Ashrani AA, Leibson CL, Petterson TM, Bailey KR. Is progestin an independent risk factor for incident venous thromboembolism? A population-based case-control study. *Thromb Res* 2010;126:373-8.
13. Schindler AE. Differential effects of progestins on hemostasis. *Maturitas* 2003;46 Suppl 1:S31-7.
14. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65.
15. Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin III-, protein C- and protein S-deficiency taking oral contraceptive medication. The GTH Study Group on Natural Inhibitors. *Thromb Haemost* 1994;71:548-52.

16. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995;346:1593-6.
17. Blickstein D, Blickstein I. Oral contraception and thrombophilia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:370-6.
18. Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess* 2006;10:1-110.
19. Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia* 2008;14:1214-21.
20. Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 2008;15:529-36.
21. ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 2008;14:1222-8.
22. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med* 2011;13:1-16.
23. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
24. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res* 2008;122:736-42.
25. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, et al. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9:299-307.
26. Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol* 2008;83:97-102.
27. Lijfering WM, Flinterman LE, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Relationship between venous and arterial thrombosis: a review of the literature from a causal perspective. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:885-96.
28. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med* 2002;162:1182-9.

29. Pomp ER, le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJ. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol* 2007;139:289-96.
30. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 2011;9:120-38.
31. Booyse FM, Parks DA. Moderate wine and alcohol consumption: beneficial effects on cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2001;86:517-28.
32. Lee KW, Lip GY. Effects of lifestyle on hemostasis, fibrinolysis, and platelet reactivity: a systematic review. *Arch Intern Med* 2003;163:2368-92.
33. Leck I, Thomson JM, Bocaz JA, Barja P, Bonnar J, Daly L, et al. A multicentre study of coagulation and haemostatic variables during oral contraception: variations with geographical location and ethnicity. Task Force on Oral Contraceptives--WHO Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. *Int J Epidemiol* 1991;20:913-20.
34. Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1257-70.
35. Zakai NA, McClure LA. Racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2011;9:1877-82.
36. Dayal M, Barnhart KT. Noncontraceptive benefits and therapeutic uses of the oral contraceptive pill. *Semin Reprod Med* 2001;19:295-303.
37. Moodley M, Moodley J, Chetty R, Herrington CS. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:103-10.
38. Maheshwari S, Sarraj A, Kramer J, El-Serag HB. Oral contraception and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007;47:506-13.
39. Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007;5:855-8.
40. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
41. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994;94:2521-4.

42. Nauck M, Wieland H, Marz W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAII gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Clin Chem* 1999;45:1141-7.
43. Wiegratz I, Lee JH, Kutschera E, Winkler UH, Kuhl H. Effect of four oral contraceptives on hemostatic parameters. *Contraception* 2004;70:97-106.
44. Kluft C, Endrikat J, Mulder SM, Gerlinger C, Heithecker R. A prospective study on the effects on hemostasis of two oral contraceptives containing drospirenone in combination with either 30 or 20 microg ethinyl estradiol and a reference containing desogestrel and 30 microg ethinyl estradiol. *Contraception* 2006;73:336-43.
45. Jespersen J, Endrikat J, Dusterberg B, Schmidt W, Gerlinger C, Wessel J, et al. A 1-year study to compare the hemostatic effects of oral contraceptive containing 20 microg of ethinylestradiol and 100 microg of levonorgestrel with 30 microg of ethinylestradiol and 100 microg of levonorgestrel. *Contraception* 2005;72:98-104.
46. Archer DF, Mammen EF, Grubb GS. The effects of a low-dose monophasic preparation of levonorgestrel and ethinyl estradiol on coagulation and other hemostatic factors. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:63-6.
47. Oral Contraceptive and Hemostasis Study Group. The effects of seven monophasic oral contraceptive regimens on hemostatic variables: conclusions from a large randomized multicenter study. *Contraception* 2003;67:173-85.
48. Luxembourg B, Schmitt J, Humpich M, Glowatzki M, Seifried E, Lindhoff-Last E. Intrinsic clotting factors in dependency of age, sex, body mass index, and oral contraceptives: definition and risk of elevated clotting factor levels. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20:524-34.
49. Curvers J, Thomassen MC, Nicolaes GA, Van Oerle R, Hamulyak K, Hemker HC, et al. Acquired APC resistance and oral contraceptives: differences between two functional tests. *Br J Haematol* 1999;105:88-94.
50. Tans G, Curvers J, Middeldorp S, Thomassen MC, Meijers JC, Prins MH, et al. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel- and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. *Thromb Haemost* 2000;84:15-21.
51. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Tans G, Bouma BN, Curvers J, et al. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor VLeiden mutation: a randomized trial. *Blood* 2004;103:927-33.

52. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Guillonneau S, Kirzin JM, Aiach M, Ochat N, et al. Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives. *J Thromb Haemost* 2004;2:1594-600.
53. Henkens CM, Bom VJ, van der Meer J. Lowered APC-sensitivity ratio related to increased factor VIII-clotting activity. *Thromb Haemost* 1995;74:1198-9.
54. Winckers K, Siegerink B, Duckers C, Maurissen LF, Tans G, Castoldi E, et al. Increased tissue factor pathway inhibitor activity is associated with myocardial infarction in young women: results from the RATIO study. *J Thromb Haemost* 2011;9:2243-50.
55. van der Meer FJ, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR. The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1997;78:631-5.
56. Wiegratz I, Stahlberg S, Manthey T, Sanger N, Mittmann K, Lange E, et al. Effects of conventional or extended-cycle regimen of an oral contraceptive containing 30 mcg ethinylestradiol and 2 mg dienogest on various hemostasis parameters. *Contraception* 2008;78:384-91.
57. Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA, et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol* 1997;97:775-84.
58. Winkler UH, Rohm P, Hoschen K. An open-label, comparative study of the effects of a dose-reduced oral contraceptive containing 0.02 mg ethinylestradiol/2 mg chlormadinone acetate on hemostatic parameters and lipid and carbohydrate metabolism variables. *Contraception* 2010;81:391-400.
59. Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martinez-Sanchez E, Vallve C, et al. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2005;93:468-74.
60. Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Saut N, Pellegrina L, Alessi MC, et al. Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. *Br J Haematol* 2005;128:91-9.
61. Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Biol Chem* 1991;266:17606-12.

62. Norris LA, Bonnar J. The effect of oestrogen dose and progestogen type on haemostatic changes in women taking low dose oral contraceptives. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:261-7.
63. Kluft C, Lansink M. Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1997;78:315-26.
64. Machado RB, de Melo NR, Maia H, Jr., Cruz AM. Effect of a continuous regimen of contraceptive combination of ethinylestradiol and drospirenone on lipid, carbohydrate and coagulation profiles. *Contraception* 2010;81:102-6.
65. Cesari M, Sartori MT, Patrassi GM, Vettore S, Rossi GP. Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 : A study of normotensive twins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:316-20.
66. de Lange M, Snieder H, Ariens RA, Spector TD, Grant PJ. The genetics of haemostasis: a twin study. *Lancet* 2001;357:101-5.
67. Hoetzer GL, Stauffer BL, Greiner JJ, Casas Y, Smith DT, DeSouza CA. Influence of oral contraceptive use on endothelial t-PA release in healthy premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E90-5.
68. Lippi G, Manzato F, Brocco G, Franchini M, Guidi G. Prothrombotic effects and clinical implications of third-generation oral contraceptives use. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:69-72.
69. Uchikova E, Pehlivanov B. Effect of two low-dose gestodene containing monophasic oral contraceptives on hemostasis in Bulgarian women. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:1839-44.
70. Klipping C, Marr J. Effects of two combined oral contraceptives containing ethinyl estradiol 20 microg combined with either drospirenone or desogestrel on lipids, hemostatic parameters and carbohydrate metabolism. *Contraception* 2005;71:409-16.
71. van Vliet HA, Bertina RM, Dahm AE, Rosendaal FR, Rosing J, Sandset PM, et al. Different effects of oral contraceptives containing different progestogens on protein S and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 2008;6:346-51.
72. Africander D, Verhoog N, Hapgood JP. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids* 2011;76:636-52.
73. Fleischer K, van Vliet HA, Rosendaal FR, Rosing J, Tchaikovski S, Helmerhorst FM. Effects of the contraceptive patch, the vaginal ring and an oral contraceptive on APC resistance and SHBG: a cross-over study. *Thromb Res* 2009;123:429-35.

74. Oelkers W. Drospirenone, a progestogen with antiminerlocorticoid properties: a short review. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217:255-61.
75. Sitruk-Ware R, Nath A. The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 2010;82:410-7.
76. 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.
77. Coen D, Zadro R, Honovic L, Banfic L, Stavljenic Rukavina A. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. *Croat Med J* 2001;42:488-92.
78. Tripodi A, Asti D, Chantarangkul V, Biguzzi E, Mannucci PM. Interference of factor V Leiden on protein S activity: evaluation of a new prothrombin time-based assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:543-6.
79. Maurissen LF, Thomassen MC, Nicolaes GA, Dahlback B, Tans G, Rosing J, et al. Re-evaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated protein C-catalyzed factor Va-inactivation. *Blood* 2008;111:3034-41.
80. Fruzzetti F. Hemostatic effects of smoking and oral contraceptive use. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S369-74.
81. Pretorius E, Oberholzer HM, van der Spuy WJ, Meiring JH. Smoking and coagulation: the sticky fibrin phenomenon. *Ultrastruct Pathol* 2010;34:236-9.
82. Wilkerson WR, Sane DC. Aging and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:555-68.
83. Girolami A, Spiezia L, Girolami B, Zocca N, Luzzatto G. Effect of age on oral contraceptive-induced venous thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:259-63.
84. Rathbun S. Venous thromboembolism in women. *Vasc Med* 2008;13:255-66.
85. Tanis BC, Rosendaal FR. Venous and arterial thrombosis during oral contraceptive use: risks and risk factors. *Semin Vasc Med* 2003;3:69-84.
86. Suissa S, Blais L, Spitzer WO, Cusson J, Lewis M, Heinemann L. First-time use of newer oral contraceptives and the risk of venous thromboembolism. *Contraception* 1997;56:141-6.
87. Gronich N, Lavi I, Rennert G. Higher risk of venous thrombosis associated with drospirenone-containing oral contraceptives: a population-based cohort study. *CMAJ* 2011;183:E1319-25.

88. Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ* 2001;323:131-4.
89. Stein PD, Beemath A, Olson RE. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *Am J Med* 2005;118:978-80.
90. Zakharova MY, Meyer RM, Brandy KR, Datta YH, Joseph MS, Schreiner PJ, et al. Risk factors for heart attack, stroke, and venous thrombosis associated with hormonal contraceptive use. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011;17:323-31.
91. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med* 2002;113:636-42.
92. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003;89:493-8.
93. Rissanen P, Vahtera E, Krusius T, Uusitupa M, Rissanen A. Weight change and blood coagulability and fibrinolysis in healthy obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:212-8.
94. Salisbury-Afshar E. The effects of combination contraceptives on weight. *Am Fam Physician* 2012;86:1009.
95. Aznar J, Mira Y, Vaya A, Ferrando F, Villa P. Is family history sufficient to identify women with risk of venous thromboembolism before commencing the contraceptive pill? *Clin Appl Thromb Hemost* 2002;8:139-41.

8. POPIS KRATICA

OK - oralna kontracepcija

LH - luteinizirajući hormon

FSH - folikulostimulirajući hormon

EE2 - etinil-estradiol

SHBG - globulin za vezanje spolnih hormona (engl. sex hormone binding globuline)

TF - tkivni faktor

TFPI - inhibitor puta tkivnog faktora

tPA - tkivni aktivator plazminogena

PAI-1 - inhibitor aktivatora plazminogena tip-1

TAFI - inhibitor trombinom aktivirane fibrinolize

PC - protein C

PS - protein S

AT - antitrombin

BMI - indeks tjelesne mase (engl. body mass index)

vWF - von Willebrandov čimbenik

PV - protrombinsko vrijeme

APTV - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

aPCR - rezistancija na aktivirani protein C

NGM - norgestimat

CPA - ciproteron acetat

NET - noretisteron

LNG - levonorgestrel

DRSP - drospirenon

GSD - gestoden

9. PRILOZI

Prilog 1. Objavljeni znanstveni radovi vezani uz doktorski rad

Ovaj dodatak sadrži dva znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

Oslakovic S, Zadro R. Comparison of the impact of four generations of progestins on hemostatic variables. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2014;20(4):448-55.

Zadro R, **Oslakovic S.** Routine tests of haemostasis and low-oestrogen oral contraceptives: what to expect? *Clin Lab.* 2014;60(5):827-32.

Prilog 2. Upitni listić za ispitanice kod prvog vađenja uzorka krvi

**UPITNI LISTIĆ I:
(multi uzorak)**

| | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----------------|----------------------------------|---------------------------|---------|---------|
| Bar-code oznaka: | | | | | | |
| Datum rođenja: | | Menarha (dob): | | Ciklus (trajanje/ciklus): | | |
| Trudnoće: | | Porodi: | | Pobačaji: | | |
| Težina: | | Visina: | | BMI: | | |
| Pušenje: | DA | NE | Ako da – koliko cigareta tjedno: | | | |
| Alkohol: | DA | NE | Ako da – koliko tjedno: | | | |
| Lijekovi: | | | | | | |
| Sport i rekreacija (sati/tjedan): | | | | | | |
| Bolesti: | Sećerna bolest | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Povišene masnoće u krvi | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Bolesti vena | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Tromboze | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Povišen tlak | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Srčane bolesti | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Jetrene bolesti | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Bubrežne bolesti | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Maligne bolesti | | | DA | NE | NE ZNAM |
| | Operativni zahvat unutar 1 godine | | | DA | NE | NE ZNAM |
| Ostalo - | | | DA | NE | NE ZNAM | |
| Ranije korištena oralna kontracepcija: | | | | DA | NE | |
| Ako da – kada: | | | | | | |
| U obitelji tromboembolijske bolesti? | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Datum: _____

Prilog 3. Upitni listić za ispitanice kod drugog i trećeg vađenja uzorka krvi

UPITNI LISTIĆ II:
(uzorak nakon 3 i 6 ciklusa oralne kontracepcije)

| | | | | | |
|---------------------------------|--|---------|--|------|--|
| Bar-code oznaka: | | | | | |
| Težina: | | Visina: | | BMI: | |
| Korištena oralna kontracepcija: | | | | | |
| | | | | | |
| Broj ciklusa: | | | | | |
| | | | | | |
| Nuspojave: | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Datum: _____

10. ŽIVOTOPIS

Sandra Oslaković rođena je 21. kolovoza 1970. godine u Osijeku, gdje je završila svoje osnovno i srednješkolno obrazovanje.

1995. godine diplomirala je na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

1997. godine odradila je pripravnički staž u KB Osijek i položila državni ispit.

Od siječnja 1998. do studenog 1999. godine radi kao zamjenski liječnik u ambulantama opće prakse u Međimurskoj županiji.

Od studenog 1999. zapošljava se u Županijskoj bolnici Čakovec gdje specijalizira transfuzijsku medicinu 2003. godine. Iste godine imenovana je predsjednicom Povjerenstva za transfuzijsko liječenje u bolnici.

2007. godine imenovana je rukovoditeljicom Djelatnosti za transfuzijsku medicinu ŽB Čakovec, a od rujna 2013. pomoćnicom ravnatelja za kvalitetu.

Doktorski studij na upisala je 15. siječnja 2008. godine i položila je sve ispite.

Obranu i prihvaćanje teme za doktorski rad održala je 29. lipnja 2009.

Tijekom svog stručnog rada dr. Oslaković je težište stavila na kvalitetu rada u laboratorijskoj praksi i implementaciji kliničke transfuzije u ŽB Čakovec, ali i transfuzijskoj službi Republike Hrvatske aktivnim sudjelovanjem na domaćim i stranim simpozijima i kongresima, izlažući rezultate praćenja kvalitete transfuzijskog liječenja pacijenta i primjenu EU standarda.

Članica je Hrvatskog društva za hematologiju i transfuzijsku medicinu (HDHTM) i International Society of Blood Transfusion (ISBT).

Udana je i majka jednog djeteta.

Objavljeni radovi:

Vurušić B, **Oslaković S**, Ostrički B, Ivanković Z, Kovačić M, Škvorc-Marcus I. Evaluation of D-Dimer test in patients on chronic hemodialysis. *Cardiolog Croat.* 2013;8(7-8):254-57.

Oslakovic S, Zadro R. Comparison of the impact of four generations of progestins on hemostatic variables. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2014;20(4):448-55.

Zadro R, **Oslakovic S**. Routine tests of haemostasis and low-oestrogen oral contraceptives: what to expect? Clin Lab. 2014;60(5):827-32.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorska disertacija

UTJECAJ ORALNIH KONTRACEPTIVA NA ČIMBENIKE ZGRUŠAVANJA I FIBRINOLIZE

Sandra Oslaković

SAŽETAK

Oralni kontraceptivi imaju brojne učinke na organizam žene poput poželjnog smanjenja pojavnosti zloćudnih bolesti jajnika i endometrija, ali i nepoželjne učinke od kojih je najpoznatiji povišeni trombotički rizik. Činjenica je da su oralni kontraceptivi jedan od rizika za razvoj trombo-embolijskih bolesti, s relativnim rizikom od 1,15 do 8,5 ovisno o formulaciji pripravka i obliku trombo-embolijske bolesti. Razvoj laboratorijske dijagnostike, molekularnih ispitivanja i koagulacijskih pretraga, dao je novi zamah istraživanjima povezujući epidemiološke podatke o trombotičkim rizicima poput pušenja, debljine, dobi, tjelovježbe i drugih s biološkom osnovom. Istovremeno, razvoj sintetičnih estrogena i progesterona, njihovih doza i kombinacija, dodatan su poticaj studijama učinka pojedine formulacije na koagulacijski odgovor.

Cilj istraživanja bio je utvrđivanje utjecaja oralnih kontraceptiva na čimbenike zgrušavanja i fibrinolize u lokalnoj populaciji, ovisno o: količini i hormonalnom sastavu korištenog pripravka, postojanju nasljednih trombofilija te razlici među ispitanicama u dobivenim vrijednostima aktivnosti čimbenika hemostaze u odnosu na dodatne čimbenike rizika za trombo-embolijske bolesti.

U istraživanje su uključeni rezultati 195 žena koje su uzimale 6 ciklusa oralnu kontracepciju. Određivani su čimbenici nasljedne trombofilije (FV Leiden, FIIG20210A i PAI-1 5G/4G) i parametri hemostaze (PV, APTV, fibrinogen, aPCR, protein C i S, FVIII, antitrombin, plazminogen, inhibitor plazmina, PAI-1 i d-dimeri) mjereni u 3 vremenske točke: osnovni - prije uzimanja oralne kontracepcije, nakon 3 i nakon 6 ciklusa.

Rezultati istraživanja pokazuju da su pod utjecajem oralnih kontraceptiva promijenjeni svi koagulacijski parametri osim aktivnosti FVIII. Analizom rezultata formulacija pripravaka, najveće razlike nađene su u kombinacijama s 20 μ g EE2 GSD vs DRSP za koagulacijske pretrage protein C i S, plazminogen i PAI-1. U istraživanju je potvrđena jednaka učestalost trombofilnih mutacija među ispitanicama kao u općoj populaciji. Polimorfizam PAI-1 5G/4G nije imao utjecaja na aktivnost PAI-1 kod mladih žena, niti je uzimanje oralnih kontraceptiva imalo učinka na aktivnost PAI-1.

Istraživanje je potvrdilo utjecaj oralne kontracepcije na koagulacijske pretrage, ali i nastojanje sustava hemostaze za stjecanjem nove točke ravnoteže. Gestageni također utječu na koagulacijski odgovor žena. Patološke vrijednosti pretraga aktivnosti proteina S i određivanja koncentracije d-dimera mogu pomoći kliničarima u odluci o nastavku ili prekidu oralne kontracepcije kod žena s drugim visokim rizikom i/ili sumnjom na trombo-embolijski događaj.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 92 stranice, 7 slika, 23 tablice i 91 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: oralni kontraceptivi, gestageni, čimbenici zgrušavanja i fibrinolize, nasljedna trombofilija, trombotički rizici
Mentor: Prof. dr. sc. Renata Zadro, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Mirna Sučić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
Izv. prof. dr. sc. Roberta Petlevski, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
Izv. prof. dr. sc. Hrvoje Vrčić, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 6. studenog 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

EFFECT OF ORAL CONTRACEPTIVES ON FACTORS OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS

Sandra Oslaković

SUMMARY

Oral contraceptives have numerous effects on women's body like favorable decrease of prevalence risk for ovarian and endometrial cancer, but also undesirable increase of thrombotic events. The fact is that oral contraceptives are one of the reasons for increased risk for venous thromboembolism, with relative risk is 1.15-8.5, depending on the drug formulation and type of thromboembolic disease. The development of laboratory diagnostics, molecular tests and coagulation tests, gave a new momentum to the researches linking epidemiological data on thrombotic risks such as smoking, obesity, age, exercise, and others with a biological basis. Simultaneously, development of synthetic estrogen and progesterones are an additional stimulus for new studies of the effect of oral contraceptive formulations on the coagulation response.

The aim of the study was to determine the influence of oral contraceptives on factors of coagulation and fibrinolysis in the local population, depending on: the amount and composition of used drug, the presence of hereditary thrombophilia and the difference among study subjects in the obtained values of factors of coagulation and fibrinolysis in relation to the presence of additional risk factors for thromboembolic diseases.

The study included the data results of 195 women, who took six cycles of oral contraceptives. Tests for hereditary thrombophilia (FV Leiden, FIIG20210A and PAI-1 5G/4G) were performed, as well as tests of hemostasis (PT, APTT, fibrinogen, APCR, protein C and S, FVIII, antithrombin, plasminogen, plasmin inhibitor, PAI-1 and d-dimer) measured at three time points: basic - before taking oral contraceptives after three and after six cycles of their use.

The results showed that oral contraceptives have changed all measured parameters except activity of FVIII. Analyzing the results by formulation of drug, the greatest differences were found in combination with 20µg EE2 GSD vs. DRSP for coagulation tests protein C and S, plasminogen and PAI-1. Data confirmed the same frequency of FV Leiden, FII G2021A i PAI-1 5G/4G among study subjects as in general population. Polymorphism of PAI-1 5G/4G had no influence on PAI-1 activity, nor the use of oral contraceptives.

This study confirmed impact of oral contraceptives on coagulation tests and tendency of hemostasis to reach new equilibrium. Gestagens also have impact on coagulation response. Pathological test results of protein S activity and d-dimers may help clinicians in the decision on continuation or discontinuation of oral contraceptives in women with other high-risk and / or suspected thromboembolic event.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 92 pages, 7 pictures, 23 tables i 91 references. Original is in Croatian language.
Key words: oral contraceptives, gestagens, coagulation and fibrinolytic factors, hereditary thrombophilia, thrombotic risks
Menthor: Renata Zadro, PhD, Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Reviewers:: Mirna Sučić, PhD, Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Roberta Petlevski, PhD, Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Hrvoje Vršćić, PhD, Associate Professor, School of Medicine, University of Zagreb

The thesis accepted: November 6, 2014.