



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Гордана М. Шошић**

**ФРЕКВЕНЦА МИКРОНУКЛЕУСА У ЛИМФОЦИТИМА**  
**ПЕРИФЕРНЕ КРВИ КОД ТРУДНИЦА СА**  
**ТРОМБОФИЛИЈОМ**

**докторска дисертација**

Ментор: Проф. др Мирјана Варјачић, редовни професор

Крагујевац, 2018.

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	7
1.1 МИКРОНУКЛЕУС – ЦИТОГЕНЕТИЧКИ БИОМАРКЕР.....	7
1.1.1 Утицај хромозомске нестабилности на хуману репродукцију и развоју. Микронуклеус тест .....	7
1.1.2 Историјски настанак и развој микронуклеус теста .....	8
1.1.3 Порекло и механизми настанка микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова и нуклеусних пупољака .....	10
1.1.4 Базална и индукована фреквенца микронуклеуса.....	12
1.1.4.1 Утицај демографских фактора (године живота и пол) на фреквенцу микронуклеуса .....	14
1.1.4.2 Утицај животних навика (исхрана, унос витамина и фолата, гојазности и физичка активности, пушења и конзумација алкохола) на фреквенцу микронуклеуса .....	15
1.1.4.3 Утицај генетичких фактора на фреквенцу микронуклеуса.....	16
1.1.5. Повишене вредности фреквенце микронуклеуса код одређених болести и стања .....	17
1.1.6 Повезаност фреквенце микронуклеуса с присутним инфертилитетом и компликацијама трудноће .....	18
1.1.7 Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима крви пупчане врпце .....	20
1.2 ХЕМОСТАЗА .....	20
1.3 ТРОМБОФИЛИЈА.....	26
1.3.1 Дефиниција тромбофилије .....	26
1.3.2 Историјски подаци .....	27
1.3.3 Патогенеза.....	28
1.3.4 Подела тромбофилије .....	28
1.4 УРОЂЕНА ТРОМБОФИЛИЈА .....	29
1.4.1 Урођена тромбофилија – антитромбин дефицијенција .....	29
1.4.1.1 Увод.....	29
1.4.1.2 Улога антитромбина у коагулацији.....	29
1.4.1.3 Ген за антитромбин .....	30
1.4.1.4 Урођена дефицијенција антитромбина .....	30
1.4.2 Урођена тромбофилија – протеин Ц дефицијенција .....	31

1.4.2.1 Увод.....	31
1.4.2.2 Улога протеина Ц у коагулацији.....	31
1.4.2.3 Ген за хумани протеин Ц и генска основа протеин Ц дефицијенције.....	32
1.4.2.4 Урођена тромбофилија услед протеин Ц дефицијенција.....	32
1.4.3 Урођена тромбофилија – протеин С дефицијенције .....	33
1.4.3.1 Увод.....	33
1.4.3.2 Улога протеина С у коагулацији.....	33
1.4.3.3 Ген за хумани протеин С .....	34
1.4.3.4 Урођена тромбофилија услед протеин С дефицијенције.....	34
1.4.4 Урођена тромбофилија услед FV Leiden мутације.....	35
1.4.4.1 Увод.....	35
1.4.4.2. Улога фактора V у хемостази.....	35
1.4.4.3 Ген за фактор V .....	36
1.4.4.4 Тромбофилија услед резистенција активираниог фактора V на активирани протеин С .....	36
1.4.5 Урођена тромбофилија услед повишеног нивоа протромбина.....	38
1.4.5.1 Увод.....	38
1.4.5.2 Грађа и улога протромбина у хемостази .....	38
1.4.5.3 Ген за протромбин .....	38
1.4.5.4 Тромбофилија услед мутације у FII гену .....	39
1.4.6 Урођена тромбофилија услед снижене активност метилентетрахидрофолат редуктазе ..	40
1.4.6.1 Увод.....	40
1.4.6.2 Метаболизам фолата и хомоцистеина .....	40
1.4.6.3 Ген за метилентетрахидрофолат редуктазу .....	41
1.4.6.4 Урођена хиперхомоцистинемија услед снижене активности метилентетрахидрофолат редуктазе.....	42
1.4.7 Урођена тромбофилија услед повишене експресије плазминоген активатор инхибитора тип 1 .....	43
1.4.7.1 Улога плазминогена у фибринолизи .....	43
1.4.7.2 Плазминоген активатор инхибитори.....	44
1.4.7.3 Ген за плазминоген активатор инхибитор тип 1.....	44
1.4.7.4 Повишена експресија плазминоген активатор инхибитора тип 1 .....	45

1.5	СТЕЧЕНА ТРОМБОФИЛИЈА.....	46
1.5.1	Стечена дефицијенција антитромбина.....	46
1.5.2	Стечена протеин Ц и протеин С дефицијенција.....	46
1.5.3	Стечена хиперхомоцистиенемија .....	46
1.5.4	Антифосфолипидни синдром .....	46
1.5.4.1	Дефиниција.....	46
1.5.4.2	Етиологија антифосфолипидног синдрома .....	47
1.5.4.3	Патогенеза антифосфолипидног синдрома .....	48
1.6	ТРОМБОФИЛИЈА У ТРУДНОЋИ.....	49
1.6.1	Увод .....	49
1.6.2	Патофизиолошке промене код трудноћа компликованих тромбофилијом.....	50
1.6.3	Оксидациони стрес код трудноћа компликованих тромбофилијом .....	53
1.6.4	Антикоагулантна терапија нискомолекуларним хепарином .....	53
<b>2.</b>	<b>ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>54</b>
2.1	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	54
2.2	ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	55
<b>3.</b>	<b>ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>56</b>
3.1	ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА.....	56
3.2	ОБРАДА И МЕТОДЕ АНАЛИЗЕ.....	56
3.2.1	Дијагностика тромбофилије .....	57
3.2.2	Процедура цитокинезис-блок микронуклеус теста .....	57
3.2.3	Одређивање хематолошких параметара и дијагностика антифосфолипидног синдрома .....	58
3.2.4	Реакција ланчаног умножавања ДНК (Polymerase Chain Reaction -PCR) .....	59
3.3	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА .....	60
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>61</b>
4.1	СОЦИО-ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИЦА.....	61
4.1.1	Демографска обележја и животне навике испитаница у студији .....	61
4.1.2	Претходне тромбозе и акушерска анамнеза код трудница у студији .....	63
4.2	ЗАСТУПЉЕНОСТ КРВНИХ ГРУПА АВО И RHD СИСТЕМА У ИСПИТИВАНОЈ ПОПУЛАЦИЈИ .....	64

4.3 ВРЕДНОСТИ БИОХЕМИЈСКИХ МАРКЕРА АНЕУПЛОИДИЈЕ У КРВИ ЗДРАВИХ ТРУДНИЦА И ТРУДНИЦА СА ТРОМБОФИЛИЈОМ.....	65
4.4 ПРИСУСТВО ФАКТОРА УРОЂЕНЕ И СТЕЧЕНЕ ТРОМБОФИЛИЈЕ КОД ТРУДНИЦА С ДИЈАГНОСТИКОВАНОМ ТРОМБОФИЛИЈОМ.....	66
4.5 ВРЕДНОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧКИХ БИОМАРКЕРА У ПРВОМ ТРИМЕСТРУ ГЕСТАЦИЈЕ.....	69
4.5.1 Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса здравих трудница и трудница са тромбофилијом ...	69
4.5.2 Базалне вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће у целој испитиваној популацији трудница.....	74
4.4.3 Базалне вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће у испитиваним кохортама .....	75
4.5.4 Дистрибуција цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће .....	78
4.5.5 Утицај присуства тромбоза, крвних група, животних навика, оптерећене акушерске и породичне анамнезе на цитогенетичке биомаркере на почетку трудноћа .....	81
4.5.6 Корелација фактора присутних пре актуелне трудноће с присуством тромбофилије .....	86
4.5.7 Корелација фактора присутних пре актуелне трудноће с присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП).....	87
4.5.8 Предиктори базалних фреквенци микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова и нуклеотидних пупољака на почетку трудноће .....	89
4.6 ВРЕДНОСТИ ЦИТОГЕНЕТИЧКИХ БИОМАРКЕРА У ПОРОЂАЈУ И У КРВИ НЕОНАТУСА.....	94
4.6.1 Вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у порођају у испитиваним кохортама .....	94
4.6.2 Дистрибуција цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у порођају .....	95
4.6.3 Вредности цитогенетички биомаркера у крви неонатуса.....	97
4.6.4 Дистрибуција цитогенетичких биомаркера код неонатуса .....	98
4.6.5 Корелација фактора присутних код мајки у трудноћи с присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) неонатуса.....	100
4.6.6 Корелација цитогенетичких биомаркера присутних код мајки у порођају с биомаркерима неонатуса .....	104
4.7 ЕФЕКАТ ТЕРАПИЈЕ НИСКОМОЛЕКУЛАРНИМ ХЕПАРИНОМ НА ХРОМОЗОМСКУ СТАБИЛНОСТ .....	106
4.7.1 Разлике у вредностима цитогенетичких биомаркера пре и после антикоагулантне терапије .....	106

4.8 ТРУДНОЋА И ПОРОЂАЈ.....	109
4.8.1 Исходи и компликације у трудноћи.....	109
4.8.2 Карактеристике порођаја код здравих трудница и трудница с тромбофилијом .....	111
4.9 ДИЈАГНОСТИЧКА ТАЧНОСТ ТЕСТА: СЕНЗИТИВНОСТ, СПЕЦИФИЧНОСТ И ROC КРИВА.....	113
4.9.1 Дијагностичка тачност ЦБМН теста у одређивању присуства тромбофилије .....	113
4.9.2 Дијагностичка тачност ЦБМН теста у одређивању појаве компликација у трудноћи ...	116
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>117</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>141</b>
<b>7. ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА.....</b>	<b>142</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>147</b>
<b>9. ПРИЛОГ.....</b>	<b>178</b>
<b>10. СПИСАК СЛИКА, СХЕМА, ГРАФИКОНА И ТАБЕЛА.....</b>	<b>180</b>
10.1 СЛИКЕ.....	180
10.2 СХЕМЕ .....	180
10.3 ГРАФИКОНИ .....	180
10.4 ТАБЕЛЕ.....	182

## 1. УВОД

### 1.1 Микронуклеус-цитогенетички биомаркер

#### 1.1.1 Утицај хромозомске нестабилности на хуману репродукцију и развоју.

##### Микронуклеус тест

Стабилност генетичког материјала је кључна за нормалан пренатални и постанални раст и развој (1). Интегритет генома је угрожен стално присутним оштећењем дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) из ендогених и егзогенох извора (2). Процењује се да се у свакој хуманој ћелији, као последица нормалног ћелијског метаболизма, дневно догоди  $2 \times 10^4$  ДНК оштећења (3). Нормално функционисање генома омогућава стално присутна ДНК репарација (2). Током феталног развоја, долази до брзе ћелијске пролиферације, активне експресије гена и високог нивоа ДНК метаболизма што може повећати подложност генотоксичном инсулту. До оштећења генетичког материјала може доћи путем различитих механизма који укључују поинт мутације, базне модификације, структурне хромозомске аберације (промене у структури хромозома) и нумеричке хромозомске аберације (промене у броју хромозома) и ова оштећења могу да се повежу с повишеним ризиком за настанак различитих болести (1).

За анализу спонтано насталих и индукованих хромозомских аберација у хуманим биомониторинг студијама *in vitro* и *in vivo* најчешће се користи микронуклеус тест (МН тест). Метода МН теста пружа податке о генотоксичном ефекту различитих мутагена из радне и животне средине и састоји се у праћењу присуства микронуклеуса (МН), који представљају цитоплазматске екстрануклеарне хроматинске масе, са изгледом малих једара, која се не инкорпорирају у једро једне од ћерки ћелија током ћелијске деобе (4, 5, 6). Микронуклеуси могу потицати од ацентричних хроматидних/хромозомских фрагмената или од целих хроматида/хромозома. Фреквенца МН се сматра квантитативним показатељем структурних и/или нумеричких аберација хромозома (7).

У хуманој популацији МН тест се може примењивати на различитим типовима ћелија: на фибробластима, на кератиноцитима (8), на ћелијама букалне слузнице (9) и најчешће на лимфоцитима периферне крви (10). У континуираној циркулацији кроз тело

лимфоцити трпе сталну физиолошку и нутритивну неравнотежу у ткивима. Фреквенца МН даје информацију о акумулираним генетичким оштећењима која су се десила током животног циклуса лимфоцита (време полуживота око 6 месеци) (1) и пружа интегрисану процену урођене и/или стечене хромозомске нестабилност (11, 12).

Досадашња знања су указала на повезаност хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви с репродуктивним капацитетом и компликацијама трудноћа, као што су рекурентни спонтани побачаји (13, 14) и преeklамсија (1). Повишене вредности МН у лимфоцитима периферне крви мајке могу се довести у везу са интраутериним застојем у расту и развоју фетуса (1). Подаци из литературе указују на везу између присутне хромозомске нестабилности у крви мајке са нестабилношћу генетичког материјала детета (15). Фреквенца МН у лимфоцитима крви пупчаника представља просечну суму геномске феталне нестабилност и *in utero* изложености анеугеним/кластрогеним агенсима (15). Спроведена истраживања указују на могући утицај геномске нестабилности неонатуса на будуће здравље и обољења током живота. Може се закључити да стабилност генома родитеља има значајан утицај на интраутерини раст и развој и да постоји могући утицај и на живот *ex utero*.

### **1.1.2 Историјски настанак и развој микронуклеус теста**

Микронуклеусе или *Howell-Jolly*-ева телашца први су идентификовали хематолози Вилијам Хенри Хаул (*William Henry Howell*) (1890) и Џастин Мери Џоли (*Justin Marie Jolly*) (1905) у еритроцитима периферне крви (16, 17). Ова телашца представљају резидуалну једарну ДНК која се под нормалним околностима губи из еритробласта током сазревања у коштаном сржи (18, 19). Средином 20. века утврђено је присуство МН у еритроцитима у коштаном сржи током различитих патолошких стања и појава ових телашца је доведена у везу с дефицијенцијом одређених витамина (фолати и витамин В12) (20). Недуго затим, присуство микронуклеуса описано је и у другим типовима ћелија, претежно у лимфоцитима периферне крви (21).

Еванс (*Evans*) и сарадници 1959. године приказују индуковани настанак МН под дејством гама-зрачења у ћелијама врха корена бубрежастог пасуља (лат. *Vicia faba*) (22).



Под називом „Mikrokern-Test“ 1970. године развијаја се тест за процену фреквенце МН у еритроцитима кошгана сржи и периферне крви кинеског хрчка (лат. *Cricetulus griseus*) након третирања тренимоном, алкилирајућим агенсом (23).

Средином 70-их година прошлог века, Шмид (*Schmid*) и Хедл (*Heddle*) са сарадницима дају основу МН теста (24), а 1976. године Кантримен (*Countryman*) и Хедл уводе методу МН теста на хуманим лимфоцитима периферн крви (25), коју Фенек (*Fenech*) и Морли (*Morley*) 1985. године модификују у цитокинезис блок МН (ЦБМН) (енгл. *cytokinesis-block micronucleus assay – CBMN*) тест (26, 27). Детаљан опис ЦБМН технике и њену примену у хуманим генотоксичним студијама даје Фенек 1993. године (28). Циљ ове методе је да се додавањем цитохалазина-Б у ћелијску културу блокира цитокинеза и омогући неометана кариокинеза, што доводи ћелије у бинуклеусно стање. Цитохалазин-Б је супстанца изолована из гљивице *Helminthosporium dematioidium* која инхибира цитокинезу блокирањем полимеризације актина у микрофиламентском прстену (25). Хомозомска општећења се детектују на основу присуства микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова (НПМ) и нуклеусних пупољака (НП) на ћелијама које су се само једном поделиле (12, 28, 29, 30), а резултати се изражавају као фреквенца цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на 1000 бинуклеусних (БН) ћелија. Фенек 2007. године (12) описује модификовану методу ЦБМН cytome (енгл. *cytokinesis-block micronucleus cytome – CBMN Cyt*) тест који нам пружа податке о генотоксичном ефекту различитих мутагена из радне и животне средине на основу присутних МН, НПМ и НП фреквенци, податке о цитотоксичном ефекту из пропорција некротичних и апоптоичних ћелија као и информације о цитостазном ефекту на основу пропорција и односа мононуклеусних, бинуклеусних и мултинуклеусних ћелија, као и из индекса нуклеусне деобе (енгл. *nuclear division index – NDI*) (12).

Одређивање порекла МН могуће је коришћењем додатних метода молекуларне генетике у оквиру ЦБМН теста. Молекуларне методе које се при томе користе могу бити методе са антикинетохорним антителима и флуоресцентна *in situ* хибридизација (енгл. *fluorescent in situ hybridization – FISH*) са ДНК пробама (11).

### 1.1.3 Порекло и механизми настанка микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова и нуклеусних пупољака

Под дејством кластрогених агенаса настају микронуклеуси пореклом од ацентричних хроматидних/хромозомских фрагмената који заостају у анафази ћелијске деобе, док под дејством анеугених агенаса настају микронуклеуси пореклом од целих хроматида/хромозома заосталих у анафази ћелијске деобе (7, Схема 1).

Ацентрични фрагменти могу настати путем различитих механизма: након обимних дволанчаних прекида ДНК који се не могу поправити у потпуности услед премашних репараторних капацитета ћелије; услед грешака у механизмима поправке као што су дисфункционална хомолога рекомбинација (енгл. *homologous recombination –HR*) или дефекти у ензимима нехомолог спајања крајева (енгл. *non-homologous end-joining –NHEJ*); услед грешака у ексцизионо-репараторним процесима оштећених или неадекватно инкорпорираних база у ДНК; услед непотпуног попуњавања гап-празнине настале на ДНК и од фрагментисаног материјала НПМ након телофазе (21, 27).

У основи настанка МН пореклом од целих хромозома јесу механизми који доводе до погрешне сегрегације или заостајања хромозома у анафази. Тако, хипометилација цитозина сателитске ДНК у центромерним и перичентромерним областима хромозома издужује ове репетитивне секвенце изазивајући смањење тензије у кинетохору. Смањена тензија доводи до неадекватне конекције између микротубула митотског вретена и кинетохора хромозома што за последицу има неадекватну сегрегацију и губитке хромозома. Остали механизми који могу бити укључени у настанак МН пореклом од целих хромозома јесу: дефекти у кинетохорима, дефекти у центромерама, дисфункционално деобно вретено као и дефекти у генима за контролне тачке анафазе (21, 27).

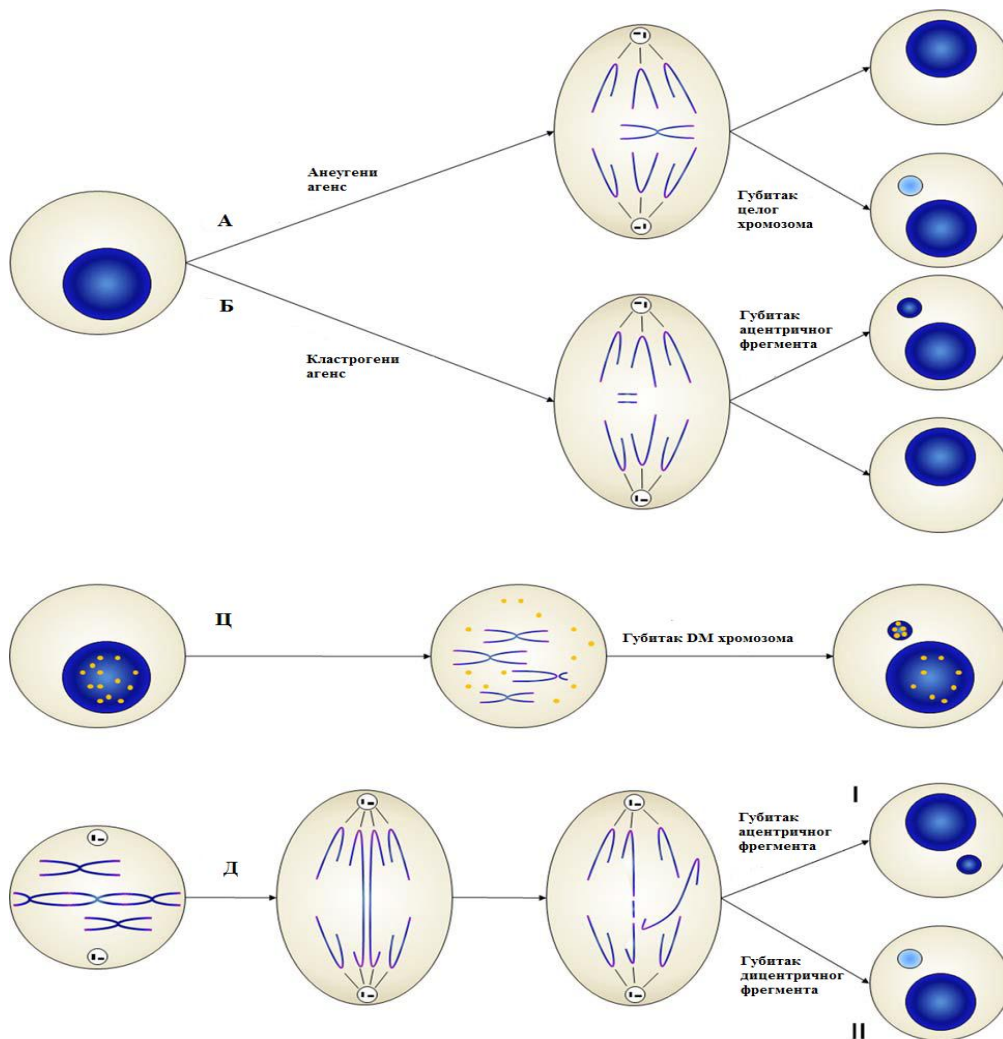
Нуклеоплазматски мостови потичу од дицентрика чије се центромере током анафазе митозе крећу ка различитим половима деобног вретена, при чему не долази до прекида насталог анафазног моста (12, Схема 1). Дицентрици настају након погрешне поправке ДНК прекида (као последица HR или NHEJ два хромозома или услед преобликовања дицентричног ринг хромозома у ланчани молекул), након фузије

теломерних крајева два хромозома или услед неправилног раздвајања сестринских хроматида у анафази (12).

Појава дицентрика је иницијални догађај који доводи до тз. ВFB циклуса (енгл. *breakage-fusion-bridge-BFB*), када долази до стварања мостова који се фузирају, пуцају и поново стварају мостове. ВFB циклуси представљају кључни фактор хромозомске нестабилности у ћелији јер се често дешава да се анафазни мост прекине неједнако, тако да једна ћерка ћелија добија вишак, док друга у истој количини има мањак генетичког материјала (21, 27).

Нуклеусни пупољци представљају нуклеарну аномалију повезану са хромозомском нестабилношћу (27) и последица су присутне амплификације гена, елиминације вишка хромозома из анеупloidне ћелије (21), ослобођених ДНК репарираних комплекса или заосталих делова након пуцања НПМ (27, Схема 1). Нуклеусни пупољци су исте морфологије као МН, али су ближе постављени и с једром повезани ужом или широм дршком од нуклеоплазматичног материјала (27).

Као последица ВFB циклуса настају прекинути хромозоми који уобичајно не садрже теломерне секвенце на својим крајевима и могу се спајати са својим репликама, тако да након поновљених ћелијских циклуса, долази до амплификације гена у близини тачке прекида или тачке фузије. Овако умножена ДНК секвенца може се елиминисати из хромозома путем рекомбинације хомологих региона и амплификоване секвенце при чему може доћи или до пуцања два ланца у делу репликационе петље или до изрезивања петље хомологог ДНА сегмента који укључује гене. Ови процеси резултирају настанком кружног молекула, без центромере и теломере, тзв. двоструки минутни (енгл. *double minutes - DMs*) хромозом (32). У *in vitro* експериментима Шимизу (*Shimizu*) и сарадници су 1998. године (33) показали да се амплификована ДНК може наћи на одређеним местима на периферији једра и да се може репликовати и/или елиминисати као НП у S фази ћелијског циклуса, транзиторно постати МН и искључити се из ћелије као *microcell*.



**Схема 1.** Механизми формирања микронуклеуса, нуклеусних пупољака и нуклеоплазматских мостова: МН (А;Б), НП (Ц) (жуте тачке указују на присуство ДМ - душлог минутног хромозом са високо амплификованим генским секвенцама), НПМ (Д) (приказана ситуација након пуцања НПМ). Преузето и модификовано из: Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 2010;705(1):60-7. (31).

#### 1.1.4 Базална и индукована фреквенца микронуклеуса

Базална (спонтана) фреквенца МН пружа информацију о акумулираним спонтано насталим хромозомским оштећењима током животног века циркулишућих лимфоцита (28). У студијама биолошке изложености спонтана МН фреквенца се односи на уочену инциденцу МН. Настанку спонтане МН фреквенце доприносе ендогени и егзогени чиниоци нормално присутни у животном и радном окружењу (7). Ниво базалне фреквенце

МН је одређен доприносом генетичком оштећењу ДНК које потиче од спољашњих фактора, од ендогених фактора (негенетских и генетских) као и од степена елиминације ДНК оштећења путем ДНК репарације које је детерминисано индивидуалним варијацијама у генима укљученим у репарацију (7, 34). Индукована фреквенца МН је резултат излагања могућим мутагеним и канцерогеним агенсима природног или вештачког порекла (35). Да би се утврдио генотоксични потенцијала агенаса и ради исправног тумачења резултата истраживања неопходно је утврдити базалну фреквенцу МН. Спонтану МН фреквенцу популације је потребно утврдити да би се одредиле нормалне граничне вредности фреквенце МН чиме се обезбеђује база података за случај да индивидуална фреквенца није позната пре излагања, а у случају да је индивидуална базална фреквенца позната, испитаник служи сам себи као контрола (36).

Међународни HUMN (енгл. *Human MicroNucleus*) пројекат установљен је 1997. године с циљевима: утврђивање базалних фреквенци МН у хуманим популацијама и њихове везе с методолошким, демографским, генетичким и факторима изложености; детерминисање варијабли које утичу на МН фреквенцу; утврђивање стандардних протокола за спровођење ЦБМН теста ради лакше компарације резултата међу различитим лабораторијама; процену повезаности фреквенце МН с болестима преко студија пресека и у проспективним студијама (37) чиме је побољшано разумевања и стандардизације ЦБМН теста. На основу прикупљених података у HUMN пројекту за око 7000 појединаца из преко 50 светских лабораторија дошло се до резултата да општа медијана базалне фреквенце МН износи 6,5МН/1000ВН (9) са интерквartilним опсегом између 3-12 МН/1000ВН. Резултати HUMN пројекта показали су да је једно од основних обележја хумане популације присуство интериндивидуалних разлика у базалној МН фреквенци (7). Запажено је да варијабилност у фреквенци МН зависи од фактора домаћина који обухватају демографске факторе (године, пол), животне навике (пушење, употреба алкохола, унос фолата и витамина, занимања), предиспозиције ка болестима (нпр. карциному)(21, 27).

#### 1.1.4.1 Утицај демографских фактора (године живота и пол) на фреквенцу микронуклеуса

Прва истраживања која су указивала на утицај година живота на фреквенцу МН спровели су Фенек и Морле 80-тих година прошлог века (38, 39). Од тада до данас већи број истраживања је потврдило феномен позитивне корелације фреквенци МН и НПМ с годинама живота (40, 41, 42). Претпоставља се да је узрок пораста хромозомске нестабилности с годинама живота кумулативни ефекат стечених мутација у генима одговорним за процес ДНК репарације, хромозомску сегрегацију и контролне тачке ћелијског циклуса, као и нумеричке и структурне аберације настале под утицајем ендогених и егзогених фактора (42, 43).

Базалне фреквенце код новорођенчади и деце су ниске (15, 44), док се од раног детињства до старијег доба код оба пола бележи константни пораст фреквенце МН. Подаци добијени из различитих светских лабораторија бележе скоковит пораст фреквенце МН преко 30. године живота (9), док Болоњези (*Bolognesi*) и сарадници (45) налазе најдраматичнији пораст у групи између 50-59. године, која након тога добија константан ниво.

Пол као демографски фактор који може да има утицај на фреквенцу МН анализирали су Бонаси (*Bonassi*) и сарадници (46) 1995. године при чему су показали да је у свим категоријама година стандардизована фреквенца МН виша код жена него код мушкараца. Ова разлика код новорођенчади (47) и у млађем животном добу је статистички незначајна, док се између 45-54. године код жена бележи 66% виши ниво фреквенце МН него код мушкараца (46). Нађено је да је код жена израженији ефекат година на фреквенцу МН која је у просеку била за 19% виша него код мушкараца (37). Једно од објашњења оваквих налаза јесте да се са старењем најчешће губе полни хромозоми (7, 48) и да постоји изражена тенденција хромозома X ка заостајању у анафази (49) при чему се у 80% случајева може наћи инактивирани хромозом X у саставу МН (50).

#### 1.1.4.2 Утицај животних навика (исхрана, унос витамина и фолата, гојазности и физичка активности, пушења и конзумација алкохола) на фреквенцу микронуклеуса

Количина и врста унете хране и суплемената исхраном утичу на концентрацију ћелијских микронутрицијената (42) (витамина и минерала) који су веома важни у одржавању стабилности хуманог генома *in vivo*, јер учествују као субстрати, кофактори ензима и интегрални делови протеина у синтези и репарацији ДНК (42), превенцији оксидативног ДНК оштећења и одржавању ДНК метилације (42, 51). Тако су антиоксиданти попут цинка, витамина Ц и витамина Е значајни у превенцији оксидативног оштећења ДНК; фолати превенирају инкорпорацију урацила у ДНК; метиони, холин, фолати, витамини Б12 одржавају метилацију ДНК; цинк и магнезијум су кофактори или компоненте ДНК репаративних ензима; ниацин и фолати учествују у одржавању дужина теломера (52, 53).

Прва запажања о вези између формирања МН и дефицијенције фолата описана су при проучавању анемије 1961. године (20). Фенек и сарадници (42) налазе везу између концентрације фолата, витамина Б12, рибофлавина, биотина, пантотената, бета-каротена, витамина Е, ретинола и калцијума у плазми са фреквенцом МН у хуманим лимфоцитима. Истраживачи (54, 55) закључују да избалансирана исхрана са свакодневном конзумација поврћа и воћа, рибе и меса, као и редовна физичка активност могу побољшати ендегену антиоксидативну заштиту и репарацију ДНК, што резултира смањењем хромозомских оштећења мерено МН тестом.

Гојазност, посебно абдоминална, главни је фактор ризика за развој инсулинске резистенције. Повишени ниво глукозе у крви доводи до повишеног нивоа слободних радикала, оксидативног стреса у различитим типовима ћелија што за последицу има оштећења ДНК, липида и протеина и појаву коморбидитета (дијабетес, различити карциноми, неуропатолошка обољења, артеросклеротична цереброваскуларна обољења)(56, 57). Скарпато (*Scarpato*) и сарадници (58) налазе код предгојазне и гојазне деце статистички значајно вишу фреквенцу МН у поређењу са децом нормалне тежине.

Студије које су анализирале ефекат пушења на фреквенцу МН дале су контрадикторне налазе. Тако Копјар (7) и Нефић (40) са сарадницима налазе корелацију између пушења и повишеног нивоа фреквенце МН, док Бонаси и сарадници (59) на основу података из HUMN пројекта долазе до закључка да пушачи имају нижу МН фреквенцу у односу на непушаче. Једна од претпоставки је да козумирање неколико цигарета дневно активира адаптивни одговор у смислу укључивања репаративних механизма ћелије, што за последицу има снижену МН фреквенцу (59). Фенек и сарадници (9) налазе радикалан пораст МН фреквенце само код пушача који пуше више од 30 цигарета дневно.

Студије (60, 61) које су испитивале утицај алкохола на геномску стабилност налазе да је фреквенца МН на епителним ћелијама букалне слузнице алкохоличара статистички значајно повишена у односу на антиалкохоличаре. Истраживањем се дошло до података да се токсичност алкохола не огледа само у директном дејству етанола, него и у индиректном дејству путем његових метаболичких продуката и реактивних кисеоничних врста (енгл. *reactive oxygen species – ROS*) који настају током његове биотрансформације узрокујући оксидативни стрес (62). У студији Бенаси-Евенс (*Benassi-Evans*) и сарадници (63) потврђују хипотезу да хронична изложеност алкохолу индукује формирање МН у одређеним хуманим ћелијским линијама. Применом FISH методе са центромерним ДНК пробама показан је анеугени ефекат алкохола (64).

#### **1.1.4.3 Утицај генетичких фактора на фреквенцу микронуклеуса**

Генски полиморфизам може имати утицај на индивидуалну подложност формирању МН. С повишеном фреквенцом МН повезани су полиморфизми одређених ДНК репаративних гена, гена за метаболизам фолата и гена укључених у ксенобиотски метаболизам (детоксификација карциногена, хемијских једињења, лекова и алкохола) (21, 65).

Тако се код запослених у зони зрачења који су носиоци појединачних нуклеотидних полиморфизама (енгл. *single nucleotide polymorphisms – SNP*) репаративних гена XRCC1, XRCC3, XPD (енгл. *xeroderma pigmentosum group D*) запажа пораст фреквенце МН у односу на контроле са истим генотиповима које нису изложене



зрачењу. Бројне студије су укључиле анализу полиморфизма гена значајних у детоксификацији, и то пре свега GST фамилију хуманих гена. Тако ген GSTM1 који кодира ензим глутатион S-трансферазу те класе учествује у II фази детоксификације електрофилних једињења (карциногена, неких хемотерапеутских лекова, егзогених токсина, продукта оксидационог стреса) путем коњугације са глутатионом (GSH) различитих класа (66, 67). Пораст фреквенце МН запажен је код носилаца GSTM1 нултог генотипа који су пушачи и који живе и раде у зонама загађеног ваздуха (68). Полиморфизам ALDH2 гена је повезан са настанком МН под дејством алкохола (21), док је инактивне генска варијанта ALDH2\*2, која је широко распрострањена у источној Азији, значајно повезана са порастом МН фреквенце код носилаца који конзумирају алкохол више од три пута недељно (69).

Значајна асоцијација је нађена између полиморфизама гена за фолат (RFC; G80A) и MTR (A2756G), као и код носилаца TT генотипа за MTHFR C677T генску варијанту код оболелих од коронарних артеријских обољења и повишених вредности МН фреквенце (65). Код носилаца BRCA1 и BRCA2 мутација нађена је предиспозиција за повишену сензитивност на оштећења ДНК, формирање МН и развој карцинома (70).

#### **1.1.5. Повишене вредности фреквенце микронуклеуса код одређених болести и стања**

Код многих обољења и стања запажен је пораст хромозомске нестабилности. Код особа са Дауновим синдромом, као и код њихових родитеља забележене су повишене МН фреквенце на ћелијама букалне слузнице у односу на контролну групу (71, 72). Објашњење овог феномена може бити повезано с мање ефикасном ДНК репарацијом и убрзаним опадањем ДНК репараторног капацитета с годинама живота код особа с Дауновим синдромом. Пораст фреквенце МН на сквамозним ћелијама и ћелијама букалне слузнице евидентирано је код оболелих од болести хромозомске нестабилности (латин. *Xeroderma pigmentosum* и латин. *Ataxia telangiectasia*) (73).

Хромозомска нестабилност се сматра једном од карактеристика премалигних и малигних стања. Код особа са дијагностикованим карциномима уочена је повишена фреквенца МН, док је анамнеза оптерећена оболевањем од карцинома у породици у

позитивној корелацији с порастом нивоа хромозмских оштећења и МН фреквенцом (78, 11, 74). Код оболелих од карцинома дојке, карцинома плућа, карцинома грлића материце и Нехочкиновог лимфома запажен је значајан пораст фреквенце МН на ћелијама букалне слузнице (40, 52, 75). Код преканцерозних цервикалних интраепителијалних неоплазија (енгл. *cervical intraepithelial neoplasia – CIN*) удружених са инфекцијом хуманим папилома вирусом примећен је пораст фреквенце МН на ћелијама сквамозног епитела (76) и у лимфоцитима периферне крви (12).

У студијама (56, 77) се наводи да је фреквенца МН у значајној корелацији с појавом и тежином коронарне артеријске болести. Истраживања су показала да се повишена базална фреквенца МН може повезати с присуством неуродегенеративних болести, као што су Паркинсонова и Алцхајмерова болест (78, 79). Повишене базалне фреквенце МН у односу на здраве контроле забележене су код аутоимуних болести као што су: дијабетес (лат. *diabetes mellitus*) тип 1 (80), секундарно прогресивна мултипла склероза (81), генерализовани вилиги (82), код реуматоидног артритиса (83, 84), системске склерозе (85), Бахчетове болести (86).

### **1.1.6 Повезаност фреквенце микронуклеуса с присутним инфертилитетом и компликацијама трудноће**

Досадашња знања указују на везу између поремећаја репродуктивног капацитета и геномске стабилности (87, 88). Показано је да присуство МН у лимфоцитима периферне крви код мушкараца позитивно корелисано са оштећењем ДНК у сперми, док инфертилни парови показују више фреквенце МН у односу на фертилне парове (89, 90), као и парови с два и више спонтаних побачаја у односу на фертилне парове с нормалним трудноћама (91). Фернес (*Furness*) и сарадници (1) указују да МН може бити користан прогностички маркер успешности трудноће пружајући информацију о геномској нестабилности у оквиру родитељског и/или феталног ткива.

Повећано оштећење ДНК укључено је у многе патолошке процесе укључујући и компликације трудноће (92). Код прегестацијског дијабетеса тип 1 и тип 2, који су присутни код око 1% трудница, присуство хипогликемије и повишена продукција ROS

имају кључну улогу у патогенези компликација дијабетеса и ДНК оштећењу. Перинаталне компликације код присутног дијабетеса у трудноћи укључују малформације, макрозомију, хипоксију, хипогликемију, кардиомиопатију, хипербилирубинемију и хиперинсулинемију (93). Нађено је да је фреквенца МН код мајки са дијабетесом тип 1 и њихове новорођенчади значајно виша у односу на здраве контроле (80). Тољић и сарадници (94) налазе повезаност гестацијског дијабетеса (енгл. *gestational diabetes mellitus* – *GDM*) и трудноћом индуковане хипертензије (енгл. *pregnancy-induced hypertension* – *PIH*) с повишеним нивоом оксидационог стреса и оштећења ДНК мерено присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у лимфоцитима периферне крви трудница (94).

Присуство хромозомске нестабилности код пацијенткиња с рекурентним спонтаним побачајима (енгл. *recurrent pregnancy loss* – *RPL*) забележено је у већем броју истраживања (13, 14). Показано је да труднице с претећим спонтаним побачајима и жене с *RPL* имају статистички значајно вишу фреквенцу МН у односу на контролне групе (13, 95). Осим код жена са *RPL* забележена је значајно виша фреквенца МН и код њихових партнера, што указује да је оштећење ДНК код оба пола значајан фактор ризика за *RPL* (89, 96).

Болести у трудноћи везане за абнормалну плацентацију настају као последица утероплаценталне инсуфицијенције (енгл. *uteroplacental insufficiency* – *UPI*) која може ометати нормални фетални раст и развој услед смањене размене хранљивих и отпадних материја. Клинички фенотип повезан с *UPI* укључује преекламсију (енгл. *preeclampsia* - *PE*) и интраутерини застој у расту и развоју (енгл. *intrauterine growth restriction* – *IUGR*) (1). Фактори који могу допринети овим различитим клиничким фенотиповима било да се ради о *PE* или *IUGR* укључују: гојазност, инсулинску резистенцију, урођену или стечену тромбофилију, хиперхомоцистеинемију. Повишено ДНК оштећење је повезано с многим од ових фактора (1).

Фернес и сарадници (1) су у проспективној кохортној студији истраживали повезаност хромозомских оштећења мајке у 20. недељи гестације са исходом трудноће. Резултати су показали да је код жена које су развиле *PE* и *IUGR* била присутна значајно

повишена фреквенца МН пре настанка симптома болести. У овој студији претпоставка је да пораст фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви код РЕ и IUGR има везу с појавом геномске нестабилности у другим ткивима (ДНК оштећења на нивоу *natural killer* ћелија цитотрофобласта и оштећења ДНК у ћелијама трофобласта) и с присутним плаценталним оксидативним стресом (1).

### **1.1.7 Фреквенца микронуклеуса у лимфоцитима крви пупчане врпце**

Хумани фетуси су *in utero* константно изложени срединским агенсима и лековима који могу проћи кроз плаценту. Неки од ових агенаса могу изазвати оштећење генетичког материјала (15, 97, 98). Фреквенца МН у лимфоцитима крви пупчаника представља просечну суму геномске феталне нестабилност и *in utero* изложености анеугеним/кластрогеним агенсима.

МН фреквенца је на рођењу ниска и статистички је значајно различита у односу на фреквенцу код оба родитеља (15, 99). Забележена је статистички значајно виша медијана фреквенце МН код мајки у односу крви из пупчаника њихове новорђенчади (12), али је присутна и значајна корелација фреквенци МН мајки и новорођене деце (15, 97).

Утицај на пораст фреквенци МН у лимфоцитима крви из пупчаника након експозиције популације срединским мутагенима (током 2000-2001. године, након бомбардовања Србије 1999. године) показали су у студији Станковић и сарадници (98).

Забележена је значајно виша фреквенца МН у крви пупчаника код мајки које су пушиле током трудноће чиме се подржава хипотеза да одређени метаболити дувана могу проћи плаценталну баријеру и имати генотоксичан ефекат на фетус идукујући хромозомске губитке и ломове (100).

## **1.2 Хемостаза**

Хемостаза у најопштијем смислу представља процес заустављање крварења (101). У физиолошком смислу хемостаза је процес током кога се на месту оштећења крвног суда формира хемостазни чеп који спречава губитак крви (102) и обухвата велики број индивидуалних и међусобно чврсто повезаних механизма (101, 103).

У 5. веку пре нове ере грчки филозоф Платон запажа да крв ван температуре тела формира влакна и први употребљава термин фибрин. У 19. веку долази се до револуционарних открића у механизмима згрушавања крви, открићем тромбоцита и њихове значајне улоге у хемостази. Моравиц (*Morawitz*) је 1905. године дао први коагулациони модел који се састојао од четири фактора коагулације (протромбин, јони калцијума, фибриноген уз присуство ткивног фактора). Карактеристике осталих фактора коагулације одређене су средином 20. века. Шездесетих година прошлог века групе истраживача дали су модел коагулације, који Дејви (*Davie*) и Ратноф (*Ratnoff*) називају модел „водопада“ (104), а Мекфарлан (*Macfarlane*) модел „каскаде“ (105). Ревидирани ћелијски модел коагулације предложен је 2001. године (106).

Хемостазни систем означава механизме који у сваком тренутку имају две примарне функције: да зауставе крварење из оштећеног крвног суда и да обезбеде течно стање крви у крвном систему (107, 108). У физиолошким стањима хемостаза је у осетљивој равнотежи између фактора и чинилаца с прокоагулантним и антикоагулантним својствима (101, 107, 109). Хемостатски систем обухвата компоненте: васкуларног система (анатомске структуре, функционални статус крвних судова и факторе зида крвног суда), коагулационог система (тромбоците, коагулационе факторе плазме и коагулационе инхибиторе плазме) и фибринолитичког система (активаторе и инхибиторе фибринолизе) (101). Механизми хемостазе омогућавају брз и ефикасан одговор на крварење, али истовремено ограничавају прекомерни тромбогени одговор на месту васкуларне повреде, не дозвољавајући да тромбогени одговор траје дуже него што је физиолошки потребно (103). Поремећај било које компоненте хемостазног система може узроковати неравнотежу процеса хемостазе и довести до крварења или тромбоза (103, 107).

Зидови крвних судова су природна баријера која спречава излазак крви из крвних судова. Луминарна површина ендотелијума поседује мноштво молекула који регулишу активност тромбоцита и коагулационе каскаде чиме се одржава оптимални проток крви и спречава формирање тромба након повреде крвног суда (110). У физиолошким условима, ендотелне ћелије су тромборезистентне, негативним наелектрисањем одбијају тромбоците

и представљају физиолошку баријеру између тромбоцита и тромбогених супстанци субендотела, а такође не регулишу ни са факторима коагулације. Ендотелне ћелије ослобађају простацклин (PGI<sub>2</sub>) и азот моноксид (NO) чије вазодилаторно дејство повећава проток крви и смањује адхезију и агрегацију тромбоцита, аденозин који врши инхибицију агрегације тромбоцита, тромбомодулин који је важан за везивање тромбина и активацију протеина C и ткивни активатор плазминогена који врши активацију плазминогена (101, 108, 111, 112).

Након стимулације ендотелних ћелија (нпр. оксидативни стрес) или физичког оштећења зида крвних судова, систем хемостазе бива померен према активацији коагулационих процеса у коме долази до комплексне интеракције између тромбоцита, коагулационог система и зида крвног суда (101, 110), при чему долази до локалне вазоконстрикције малих артерија и вена, што отежава проток крви и појачава акумулацију тромбоцита. На месту повреде тромбоцити продукују вазоконстрикторне супстанце епинефрин и серотонин и долази до вазоконстрикције под контролом неуралног рефлекса глатких мишића артериола и венула (110).

Након повреде крвног суда долази до адхезије тромбоцита на колаген изложеног крвног суда посредовано A1 доменом *von Willebrandov* фактора (*vWF*). Путем медијатора из околног оштећеног ткива долази до активације ендотелних ћелија које стичу протромбичка својства, при чему се ослобађа тромбоцитни активирајући фактор (енгл. *platelet activated factor* – *PAF*), који стимулише активацију тромбоцита и експримира се ткивни фактор (енгл. *tissue factor* – *TF*)(108). Везивањем тромбоцитних гликопротеинских Ib-V-IX (GPIb-V-IX) рецептора за *vWF* који је везан за колаген субендотела на месту повреде, започиње активација тромбоцита (113). Активација доводи до експресије GPIIb/IIIa на мембрани тромбоцита, који везује *vWF*, фибронектин и ламинин, што изазива снажну адхезију тромбоцита (108).

Током активације тромбоцита негативно наелектрисани фосфолипиди прелазе са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране и за њих се везују фактори

коагулације Va i VIIa који су значајни у активацији протромбиназног комплекса и што повећава синтезу тромбина на месту повреде (113).

Агрегација тромбоцита се одвија само на претходно активираним тромбоцитима, где долази до конформационе промене рецептора GPIIb/IIIa. Везивање фибриногена и vWF за рецепторе GPIIb/IIIa доводи до међусобног везивања активираних тромбоцита и стварања тромбоцитног угрушка (108).

Процес адхезије, активације и агрегације тромбоцита одиграва се паралелно са активацијом система коагулације (112). Тако тромбин као снажан активатор тромбоцита, изазива настанак ензиматских комплекса на површини активираних тромбоцита који убрзавају процес коагулације и тако се стабилизује тромбоцитни угрушак (108). Фактори коагулације су присутни у крви у неактивној форми зимогена (профактори).

Систем коагулације описан моделом коагулационих каскада представља серију реакција где претходни активирани фактор коагулације активира следећи проензим у низу и конверује га у активирани ензим. Описана су два пута активације система коагулације, унутрашњи и спољашњи. У унутрашњем путу све компоненте су присутне у крви, док спољашњи пут захтева екстрени фактор (TF који потиче из екстраваскуларног ткива)(106). Оба пута се спајају у заједнички пут при чему и последњем кораку долази до стварања тромбина који доводи до превођења фибриногена у фибрин и настаје стабилизovan крви угрушак (Схема 2). Тромбин механизмима позитивне и негативне повратне спреге регулише и омогућава нормално одвијање хемостазе (115).

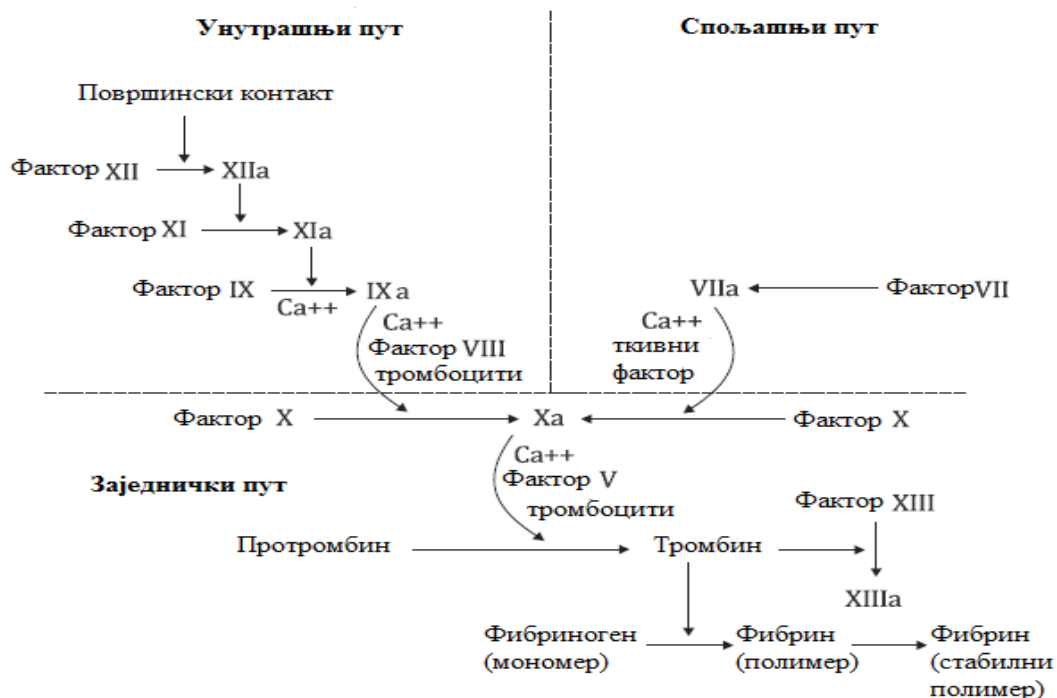


Схема 2. Модел коагулационе каскаде (114)

На основу ових процеса, традиционално хемостаза се може поделити на примарну хемостазу, секундарну хемостазу и фибринолизу (110). Први догађај у контроли крварења је формирања примарног тромба (тромбоцитног чепа) током неколико минута од настанка повреда, што се дешава у васкуларној и тромбоцитној фази хемостазе, а након 15-20 минута као резултат коагулационе каскаде настаје секундарни тромб (фибрински угрушак) (101, 110).

Ревидирани ћелијски модел коагулације истиче да специфични рецептори на ћелијским мембранама, преко локализације реакција фактора коагулације за специфичне ћелијске површине, имају доминантну улогу у процесу коагулације (106). Према ћелијски базираном моделу коагулација се састоји из иницијације, амплификације и пропације (110).



У току фазе иницијације процес коагулације започиње на ћелијама које након повреде излажу TF циркулишућој крви. Фактор FVII из плазме се везује за TF. Настали комплекс FVIIa-TF активира FX и FIX. Фактор FXa заједно са фактором V из плазме ствара комплекс протромбиназе који конвертује протромбин у тромбина. FIXa се везује за рецептор на мембрани тромбоцита (106).

Фаза амплификације се одвија на мембрани тромбоцита где мала количина насталог тромбина у инацијалној фази активира тромбоците и активира факторе V, VIII и XI (106). Из комплекса FVIII-vWF тромбин одваја и активира FVIII у FVIIIa, а такође активира FXI у FXIa (108). Комплекс TF-FVII-FX бива инактивисан деловањем инхибитора ткивног фактора (енгл. *tissue factor pathway inhibitor – TFPI*).

Током фазе пропације на површини тромбоцита настају теназни (FVIIIa/FIXa) и протромбиназни (FVa /FXa) комплекси који доводе до стварања великих количина тромбина (106). Тромбин цепа молекуле фибриноген, настају фибрински мономери чијом полимеризацијом настаје фибрин (108). Крајњи корак је активација FXIII и тромбином активаног инхибитора фибринолизе (енгл. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor – TAFI*) од стране тромбина. Настали FXIIIa омогућава стабилизацију крвног угрушка стварањем попречних веза између фибринских влакана, док активирани TAFI спречава превремену разградњу угрушка (108, 116).

Да би се процес коагулације одвијао само на месту повреде крвног суда, неопходна је ефикасна регулација која је посредована инхибиторима коагулација и системом за фибринолизу. Инхибитори коагулације активирају факторе коагулације у плазми или на мембрани неоштећених ендотелних ћелија. Најзначајнији инхибитори коагулације су антитромбин, протеин С и TFPI (108).

Фибринолиза обезбеђује течно стање крви, уклањајући фибринске депозите из циркулације. Систем фибринолизе се састоји од централног ензима фибринолизе плазмина, активатора плазминогена и инхибитора фибринолизе. Плазмин настаје од проензима плазминогена на који делује ткивни активатор плазминогена (енгл. *tissue plasminogen activator – t-PA*)(108).

## 1.3 Тромбофилија

### 1.3.1 Дефиниција тромбофилије

Према првој савременој дефиницији Британског савета за стандардизацију у хематологији (енгл. *The British Committee for Standards in Haematology*) из 1990. године термин тромбофилија треба да буде употребљен када су у питању урођени (херидитарни) и стечени (аквизитарни) поремећаји хемостазног система код којих постоји склоност најчешће ка венским тромбозама, а у неким случајевима и артеријским тромбозама (117, 118, 119, 120, 121). Тромбофилија није болест сама по себи (латин. *per se*). Стечена (латин. *acquisita*) тромбофилија може се повезати са одређеним стањима (нпр. трудноћа и пуерперијум), употребом лекова (нпр. орални контрацептиви), повредама, терапијским поступцима и хирушких интервенцијама, може бити повезана с малигнитетима као и са аутоимуним болестима, док је урођена (латин. *hereditaria*) тромбофилија условљена наследним факторима (122, 123, 124, 125).

Тромбозе настају услед поремећаја на нивоу тока крви (стаза или турбуленција), на нивоу зида крвног суда (поремећај васкуларне и ендотелне функције) и на нивоу састава крви (поремећај равнотеже између коагулације и фибринолизе). Симптоматска тромбоза је мултифакторијална болест која се манифестује када се особа с предиспозицијом за тромбозе изложи клинички ризичном фактору за настанак болести (122).

Тромбофилија се клинички може јавити као један или више фенотипова, односно тромботичких манифестација као што су:

1. *purpura fulminans* (неонатална или адултна)
2. суперфицијални тромбофлебитис
3. дубока венска тромбоза
4. пулмонарни емболизам
5. венска тромбоза на „неуобичајним“ местима
6. некроза коже индукована варфарином

7. могућа артеријска тромбоза (шлог, акутни инфаркт миокарда)
8. понављајући спонтани побачаји
9. могуће компликације трудноће (инраутерусни застој у расту, тешка прееклампсија, абрупција плаценте)(122).

Предоминантна клиничка манифестација тромбофилије је венски тромбоемболизам (VTE)(122) који обухвата низ клиничких ентитета, од којих су најважнији дубока венска тромбоза, плућна венска тромбоемболија и церебрална венска тромбоза (126, 127, 128).

У земљама Запада термин тромбофилија се најчешће користи у контексту присуства дубоке венске тромбозе када се описују пацијенти с понављајућим компликацијама, оптерећеном породичном анамнезом везаном за обољевање од тромбоза, која се појављују први пут у млађем животном добу, с неуобичајним клиничким манифестацијама или одсуством препознајућег стимулуса (129).

### 1.3.2 Историјски подаци

Немачки патолог Рудолф Вирхов (*Rudolf Virchow*) 1856. године даје хипотезу о етиологији пулмонарног емболизма, што је била основа за разумевање три примарна услова за настанак венских и артеријских тромбоза (тзв. Вирхоовог тријаса): промена особина крвног суда, промена брзине циркулације крви, промене у саставу крви. Године 1937. употребљен је термин „есенцијална тромбофилија“ да би описали пет случајева рекурентних појава акутних оклузија у малим крвним судовима екстремитета, срца, бубрега и мозга, а 1956. године први пут се употребљава термин тромбофилија при описују породичне тенденције ка тромбоемболијским обољењима, иако у том моменту етиологија ове појаве није била јасна (130, 131, 132). Године 1965. тромбофилију као потенцијално наследно обољење описао је Егеберг (*Egeberg*), код норвешке породице с повишеном тенденцијом за VTE чији је узрок била урођена дефицијенција антитромбина (133). Од 80-тих година прошлог века, када су описане урођене дефицијенције протеина S и протеина C, па све до данас, откривени су различити урођени и стечени фактори који повећавају ризик за VTE (132).

### 1.3.3 Патогенеза

Спољашњи фактори ризика и генетска предиспозиција играју важну улогу у настанку тромбоза (134). Венска и артеријска тромбоза су примери комплексних болести, у којима различити биолошки фактори доприносе развоју болести (129). Заједничко у патогенези тромбоза је поремећај хемостазе. Критичан догађај за акутну фазу обе болести је настанак оклузивног тромба. Патогенеза венске и артеријске тромбозе је различита, па се могу сматрати различитим болестима. Артеријска тромбоза настаје у условима високог притиска и брзог протока, и тако формиран тромб је богат тромбоцитима, док венска тромбоза настаје у условима ниског притиска и спорог протока, па је тромб богат фибрином (135). Претпоставља се да је за појаву клиничке манифестације венског тромбоемболизам кључни моменат то да тромбозни потенцијал, који је у функцији година живота, генетичких и срединских фактора, као и њихових интеракција (адитивних или синергистичких), пређе одређени праг (129).

### 1.3.4 Подела тромбофилије

Поремећаји у хемостази који су у вези с настанком тромбофилије могу бити урођени дефекти, који настају због генских мутација, стечени дефекти, као што је антифосфолипидни синдром или комплексни, када исхрана или животне навике интерагују са генетском предиспозицијом за настанак тромбофилије (118). Генске варијанте (генски полиморфизми) могу утицати самостално или удружено са стеченим факторима ризика на настанак ВТЕ (130).

Генетски фактори ризика за настанак тромбофилије могу се поделити у групе које обухватају:

1. промене у генима за инхибиторе коагулације (SERPINC1, PROC, PROS1) услед којих настаје дефицијенције антикоагулантних протеина (антитромбин III, протеин C, протеин S)
2. промене у генима за факторе коагулације [NM\_000130.4: c.1601G>A (p.Arg534Gln) (фактор V Leiden) and NM\_000506.4: c.\*97G>A (фактор II G20210A)], (136, 137)

3. промене у генима фибринолитичког система [NM\_000602.4: с.-820\_-817G (4\_5) (плазминоген активатор инхибитор-1 (PAI-1) 5G/4G)] (138, 139)
4. остали генски полиморфизми који доприносе настанку тромбоза нпр. ([NM\_005957.4: с.665C>T (p.Ala222Val), (метилен тетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) C677T)] (130, 140).

## **1.4 Урођена тромбофилија**

### **1.4.1 Урођена тромбофилија – антиромбин дефицијенција**

#### **1.4.1.1 Увод**

Моравиц 1905. године предлаже идеју о улози антиромбина III (АТ) у инхибицији активности тромбина након коагулације крви (141). Урођена антиромбин дефицијенција се карактерише сниженим нивоом АТ активности и представља фактор ризика за рани развој венског тромбоемболизма (142, 143).

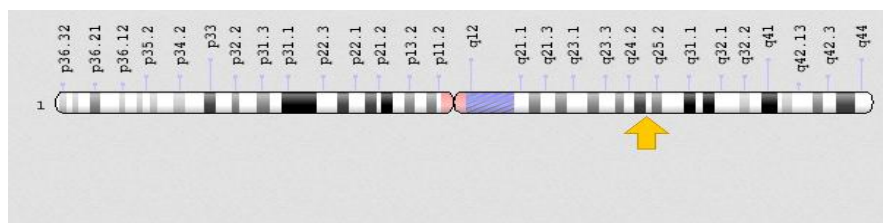
#### **1.4.1.2 Улога антиромбина у коагулацији**

Антиромбин III (АТ) је једноланчани гликопротеин ( $\alpha_2$  глобулин), који се синтетише у јетри и припада фамилији инхибитора серинских протеаза (серпина), са релативном молекулском масом од 58200 Da и полуживотом од 2,4 дана у крвној плазми и физиолошки је најважнији ендогени антикоагуланс (144, 145, 146, 147). Примарна улога АТ је инактивација тромбина (фактор II), а инактивише и друге активисане факторе коагулације (IXa, Xa, XIa и XIIa), као и t-РА, урокиназе, трипсин, плазмин и каликреин (142, 148).

У физиолошким условима АТ циркулише у форми са ниском инхибиторном активношћу (142, 149), док антикоагулантни ефекат АТ расте 1000 до 2000 пута у присуству хепарина и других хепарину сличних глукозамино глукана (150). Интеракција АТ са хепарин сулфатом лоцираним на ендотелу и субендотелу локализује активност АТ на зид крвног суда и одржава његову нормалну нетромбогену активност (141, 144).

### 1.4.1.3 Ген за антитромбин

Ген за антитромбин човека (енгл. *serpin family C member 1 - SERPINC1 gene*) (151) је секвенциран 1982. године. Дугачак је 13477 bp и садржи 8 егзона (152). Цитогенетска локација SERPINC1 гена је 1q25.1 (Графикон 1) (153, 154). Мутације у овом гену дају фенотип тромбофилије услед антитромбин III дефицијенције (155).



**Графикон 1.** Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелицом је приказана цитогенетска локација SERPINC1 гена, на дугу (q) краку хуманог хромозома 1 на позицији 25.1. (Преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINC1#location>)(154)

### 1.4.1.4 Урођена дефицијенција антитромбина

АТ дефицијенцију први пут је описао 1965. године Егеберг код једне норвешке породице (варијанта АТ-III Oslo) са већим бројем чланова оболелих од тромбоза и релативно ниским нивоом АТ у плазми (130, 156, 157).

Урођена АТ дефицијенција је редак аутозомно доминантни пормећај и оба пола су подједнако афицирана (158). Хомозиготност за АТ дефицијенцију је најчешће инкомпатибилна са животом и летална вероватно још *in utero*. Преваленца АТ дефицијенције у општој популацији износи од 1:2000 до 1:5000, док је код болесника с венским тромбоемболизмом 1:200 до 1:400 (130, 135, 159). До данас је описано око 330 различитих мутација у SERPINC1 гену (160, 161, 162). Већина ових мутација су поинт мутације, мале делеције или инсерције, док су ретко присутне велике делеције и губитак целог гена (163).

Урођена АТ дефицијенција се може класификовати на дефицијенцију тип I (с редукованом функционално активношћу и антигеним нивоом АТ у крви (квантитативна дефицијенција) код које су присутне „бесмислене“ (енгл. *nonsense*) и „ванфазне“ (енгл.

*frameshift*) мутације (130, 142, 160, 164)) и дефицијенцију тип II (с нормалним антигеним нивоом и ниском АТ активношћу услед синтезе дисфункционалног протеина (квалитативна дефицијенција)(164, 165, 172, 173)), које настају услед мутација с „погрешним значењем“ (енгл. *missense*) и обухвата: тип IIa (тип II RS) с мутацијама за тромбин-везујући регион, тип IIb (тип II HBS) са абнормалним хепарин везујућим АТ доменом и тип IIc (тип II PE) који обухвата плејотропну групу мутација које ометају функцију АТ реактивног домена (163, 164, 165, 172).

Клиничка слика и тежина тромботичких компликација зависи од типа дефицијенције и од типа и места мутације (163), тако да мутације које доводе до губитка функције (енгл. *null*) дају већи ризик од ВТЕ у односу на *missense* мутације (146), док тип II HBS дефицијенција представља значајно нижи ризик за развој тромбоза (163). Хетерозиготни носоци *Toyota* (R47C) мутације су асимптоматски, док је хомозиготна форма компатибилна са животом (157).

## **1.4.2 Урођена тромбофилија – протеин Ц дефицијенција**

### **1.4.2.1 Увод**

Протеин Ц је први пут изолован 1976. године из говеђе плазме (166, 167). Протеин Ц (PC) зависни антикоагулациони пут заузима једну од кључних улога у регулацији коагулације крви (168).

### **1.4.2.2 Улога протеина Ц у коагулацији**

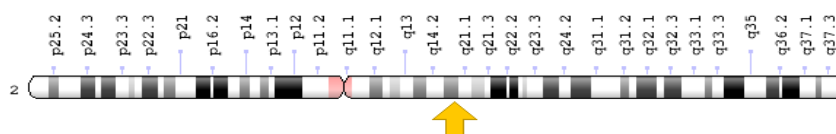
Протеин Ц је витамин К зависни гликопротеин, релативне молекулске масе 62 kDa, који у плазми циркулише као зимоген и представља прекурсор својој активисаној серин протеазној форми активисаном протеину Ц (енгл. *activated protein C – APC*). APC путем инактивације фактора Va и VIIIa врши антикоагулантну улогу, док се редуковањем активности t-PA остварује стимулација фибринолизе (169).

Хумани протеин Ц се синтетише углавном у јетри, али подаци показују да се синтетише и у ендотелним ћелијама вене пупчане врпце и Лејдиговим (енгл. *Lydig*) ћелијама мушког репродуктивног (170). Физиолошка активација протеина Ц се дешава на

површини ендотелних ћелија помоћу два мембранска рецептора: тромбомодулина (ТМ) и ендотелијалног РС рецептора (енгл. *endothelial protein C receptor – EPCR*)(167, 171, 172, 173, 174).

### 1.4.2.3 Ген за хумани протеин Ц и генска основа протеин Ц дефицијенције

Комплетна нуклеотидна секвенца и организација гена за хумани протеин Ц (енгл. *PROC gene*) одређена је 1986. године (175, 176). PROC ген је дугачак око 11,2 kb и састоји се од девет егзона и осам интрона (176), налази се на другом хуманом хромозому и положај PROC гена је 2q14.3, (Графикон 2)(177, 178).



**Графикон 2.** Идеограм другог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса PROC гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 2 на позицији 14.3 (преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PROC#resources> (178)

### 1.4.2.4 Урођена тромбофилија услед протеин Ц дефицијенција

Херeditарну РС дефицијенцију 1981. године први пут описују Грифин (*Griffin*) са сарадницима код мушких чланова породице, који су боловали од рекурентног тромбоемболизама и имали снижени ниво РС у плазми (179). Преваленца урођене РС дефицијенције у општој популацији износи 0,2-0,3%, код болесника са ВТЕ 3% (135), а код породица са урођеном тромбофилијом 6% (180).

Урођена РС дефицијенција настаје услед мутација у PROC гену које доводе до губитка функције протеина (168). Према подацима из 2009. године забележено је 275 различитих мутација у оквиру PROC гена (181). Највећи број присутних мутација су појединачне (енгл. *point*) нуклеотидне супституције у кодирајућем региону PROC гена



(182) које доводе до *missense* мутација (183). Клинички фенотип варира од тога на ком се месту јављају и које су врсте *missense* мутације (183).

Најчешће је присутна хетерозиготна РС дефицијенција која се доводи се у везу са седам пута повишеним ризиком за развој венских и артеријских тромбоза (184). Хомозиготна или дупла хетерозиготна форма РС дефицијенције је ретко присутна, и доводи до јаког пада нивоа РС у плазми и код новорођенчади до развоја тешких облика тромбоза и настанка *purpure fulminans* (173, 185). Постоје два основна типа РС дефицијенције: тип I (квантитативна дефицијенција), присутна код већине оболелих, са сниженом функционалном активношћу нормалног РС у крви, која настаје због редуковане синтезе или стабилности протеина (186), и са сниженом антигеним нивоом и тип II (квалитативна дефицијенција), са нормалном количином функционално измењеног протеина који показује снижену активност и нормални антигени нивоом (184).

### **1.4.3 Урођена тромбофилија – протеин С дефицијенције**

#### **1.4.3.1 Увод**

Протеин С (PS) је откривен 1977. године (187). Поред антикоагулантне улоге, PS има антиинфламаторну улогу и антиапоптоични ефекат (187). Под нормалним условима 40% PS је у плазми у слободној форми и поседује активност кофактора за APC (188, 189).

#### **1.4.3.2 Улога протеина С у коагулацији**

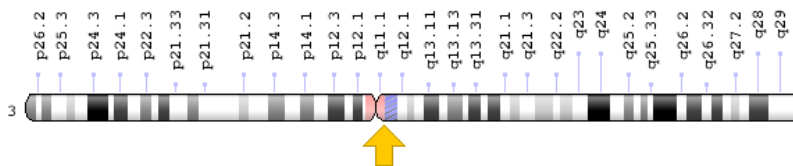
Протеин С је витамин К зависни гликопротеин плазме, молекулске тежине од 75 kDa и функционише као кофактор у РС регулаторном систему (190, 191). Протеин С се синтетише у јетри, ендотелним ћелијама, мегакариоцитима, Лејдиговим ћелијама тестиса (192), остеобластима и глатким мишићима крвних судова (193), а може се наћи и у  $\alpha$  гранулама тромбоцита (191).

Протеин С своју улогу у коагулационом путу остварује преко APC зависног механизма, где служи као кофактор APC-у у протеолитичкој разградњи Va и VIIa (194), повећава фибринолизу убрзавањем неутрализације PAI-1 активисаним РС и преко APC независног механизма учествује у директној инхибицији фактора Ха и активацији протромбина.

Протеин С је и кофактор који стимулише инхибицију TF од стране TFPI, повећава фибринолизу инхибицијом активације TAFI (193).

### 1.4.3.3 Ген за хумани протеин С

Године 1986. изолована је и секвенцирана комплементарна ДНК (енгл. *complementary DNA – cDNA*) за хумани PS (195). Положај PS гена (енгл. *PROS1 gene*) је мапиран 2008. године на генском локусу 3q11.2 трећег хуманог хромозома, (Графикон 3)(196). Хумана ДНК садржи 2 PS гена (190), од којих је један активан PROS1 ген, а други је блиско везан, неактиван PROS2 псеудоген. Активни PROS1 се састоји од 15 егзона и 14 интрона, док псеудоген не садржи егзон 1 (189, 197).



**Графикон 3.** Идеограм трећег хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса PROC гена на дугом краку (q) хуманог хромозма 3 на позицији 11.2 (прузето са сајта U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PROS1#location>)(196)

### 1.4.3.4 Урођена тромбофилија услед протеин С дефицијенције

Херидитарна PS дефицијенција настаје услед мутације у PROS1 гену (190). Наследна тромбофилија узрокована присуством дефицијенције PS први пут је описао Комп (*Comp*) 1984. године (198). Преваленца урођене PS дефицијенције износи 0,03-0,13% код белаца, 0,06%-1,12% код азијата (190, 199), код пацијената са тромбозама 2-5% (200) и код 2-12% пацијената са тромбофилијом (201).

У PROS1 гену је детектовано је више од 220 различитих мутација (202), које резултирају губитком функције протеина (203). Најбројније су *missens* и *nonsens* мутације,

а утврђено је присуство парцијалних делеција и дупликација различитих делова гена као и потпуних делеција PROS1 гена (196, 204).

Према номенклатури из 1991. године могу се разликовати три клиничка ентитета PS дефицијенције (194): тип I код кога су снижене вредности укупног PS антигена, снижене вредности слободног PS антигена и снижена активност PS, тип II код кога су нормалне вредности укупног и слободног PS антигена, док је PS активност смањена и тип III са нормалним вредностима укупног антигене, сниженим вредности слободног PS антигена и снижена PS активност (193).

Носиоци хетерозиготне PS мутације имају повећан ризик за настанак тромбоза, док хомозиготна или дупла хетерозиготна форма PS доводи до развоја тешких облика тромбоза и настанка *purpure fulminans* код новорођенчади и током прве године живота (205, 206).

#### **1.4.4 Урођена тромбофилија услед *FV Leiden* мутације**

##### **1.4.4.1 Увод**

Норвежанин Пол Оурен (*Paul Owren*) 1947. године открива до тада непознати фактор V (FV) код пацијената са повишеном тенденцијом за крварење (207). Фактор V учествује у прокоагулантним и антикоагулантним путевима и представља важан фактор у природном балансу између ове две појаве.

##### **1.4.4.2. Улога фактора V у хемостази**

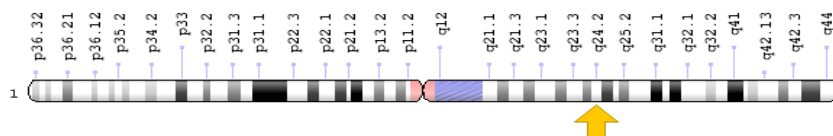
Биолошка судбина фактора V зависи од његове ограничене протеолизе (208). Прокоагулантна активност се одвија у активној форми FVa, кад има улогу кофактора FXa у протромбиназном комплексу, који као такав катализује конверзију протромбина у тромбин (209), што представља есенцијалан корак у хемостази. Аниткоагуланска улога се остварује у инактивној форми FV, где FV учествује као кофактор, заједно са PS и активираним PC у APC катализираној инактивацији фактора VIIIa (210).

Главни извор фактора V код човека је јетра где се након обрада про-пептида и посттранслационе модификације секретује у крв као протеин састављен од 2196 АК (207, 210, 211).

Фактор V не поседује коагулантну активност и слаб је субстрат за APC. Фактор V се може превести у активну форму ограниченом протеолизом помоћу тромбина или Ха (211, 212). Новонастали фактор Va се везује за фосфолипиде и долази у близак контакт са APC који заједно са PS доводе до деградације и инактивације фактора Va чиме се ограничава његова прокоагуланска активност (207, 211, 212) и долази до инхибиције коагулације (211, 213).

#### 1.4.4.3 Ген за фактор V

Структура гена за FV са 25 егзона и 24 интрона је одређена 1992. године (214). Прецизна локација гена за FV је мапирана на дугом краку првог хромозома (1q24.2) и приказана је на Графикону 4 (215).



**Графикон 4.** Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса фактор V гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 1 на позицији 24.2 (преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F5#location>)(215)

#### 1.4.4.4 Тромбофилија услед резистенција активираниог фактора V на активирани протеин C

Резистенцију FVa на APC, која се карактерише редукованима антикоагулантним одговором на APC, први пут је описана 1993. године код пацијента са мултипним тромботичким догађајима (216). Код неких пацијената потребна је виша концентрација APC да би се изазвало слично продужено време коагулације као код нормалне плазме (тз.

резистенције на APC) (210). Резистенција FVa на APC доводи до повећаног стварања FXa и тромбина и последично повећано стварање фибрина (193).

Бертина (*Bertina*) и сарадници са Универзитета у Лајдену 1994. године први пут наводе појединачну мутацију у гену FV тз. Фактор V Leiden мутацију, као најчешћи узрок настанка резистенција FVa на APC (217, 218).

Код генске варијанте FV Leiden присутан је SNP у 10. егзону FV гена на позиција 1691 где долази до нуклеотидне транзиције гуанина у аденин (G→A) која доводи до *missens* мутације и замене аргинина (Arg) глутамином (Gly) на 506. месту гликопротеина (207). Ова промена онемогућава протеолитичко исецање на Arg 506 месту и инактивисање FVa, односно долази до смањене осетљивост FV на инхибиторно дејство APC (219). Поред Фактор V Leiden мутације откривене су и нове *missens* мутације: Фактор Cambridge (FV Cambridge, Arg306→Thr)(208), Фактор Hong-Kong 2 (FV Hong-Kong, Arg306→Gly), FVR2 хаплотип (His1299 →Arg) и FV Liverpool (FV-Ile359→ Thr)(220, 221).

APC резистенција узрокована фактор V Leiden мутацијом је најчешћи и најјачи фактор ризика за настанак венске тромбозе. Око 95% пацијената са APC резистенцијом има и FV Leiden мутацију, док је остатак APC резистенција стечена или повезана са неком другом мутацијом у фактору V (193). Код хетерозиготних носилаца ове мутације ризик од тромбозе расте 7 пута, док се код хомозиготних носилаца тај ризик се повећава до 80% (210, 222). Показано је да носиоци FV His1299Arg мутације имају умерену APC резистенцију, док у комбинацији са FV Leiden, као двоструки хетерозиготи, ризик је повећан 3-4 пута у односу на носиоце само FV Leiden (223, 224).

Варијације у фреквенцији за фактор V Leiden мутацију су обимне. Тако се ова мутација јавља 2-15% у општој популацији, а до 60% код пацијената са тромбозам. Присутна је претежно код људи европског порекла, док је у азијским и афричким популацијама ретка. Може се закључити да се мутација јавила само једном у прошлости, и да је ефекат оснивача био присутан (207, 225). Широка распрострањеност FV Leiden варијанте међу популацијом европског порекла говори о њеној селективној еволутивној предности у моменту настанка (226, 227).

## **1.4.5 Урођена тромбофилија услед повишеног нивоа протромбина**

### **1.4.5.1 Увод**

Године 1963. први пут је изолован и описана су физичкохемијска својства протромбина (228). Протромбин је прекурсор тромбина, кључног фактора у регулацији хемостазе.

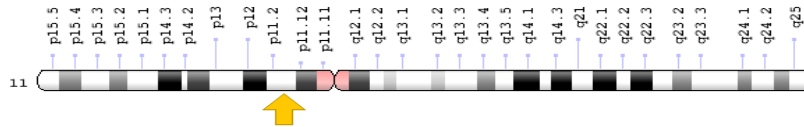
### **1.4.5.2 Грађа и улога протромбина у хемостази**

Молекулска маса протромбина износи 72 kDa (229) и у крвотоку циркулише као зимоген до своје протеолитичке активације у тромбин (230, 231). Хумани протромбин или фактор II (FII) је витамин К зависни гликопротеин који се примарно синтетише у јетри (232). Ниска експресија протромбина је присутна у мозгу, дијафрагми, желуцу, бубрезима, слезини, цревима, ткивима материце, постељице и надбубрежне жлезде (229).

Протромбин и фактор Ха се везују за фосфолипидне површине преко  $\gamma$  Gla домена уз присуство јона калцијума и фактора Va као кофактора, чинећи организовани комплекс (протромбиназни комплекс) у коме молекули FII и FXa долазе у близак контакт и што доводи до активације протромбина у тромбин. Формирање протромбиназног комплекса може се десити на површини активираних тромбоцита, ендотелних ћелија или леукоцита. Након формирања протромбиназног комплекса, долази до неколико ензиматских исецања протромбина на различитим местима при чему на крају настаје ензиматски активан  $\alpha$ -тромбин (115, 229, 233, 234, 235). У циркулацији осим  $\alpha$ -тромбина су присутне и деградоване  $\beta$  и  $\gamma$  форме, настале вероватно аутокаталитичким деловањем самог  $\alpha$ -тромбина, које здржавају део каталитичке активности и делимично учествују у активацији фактора XIII и протромбина (115).

### **1.4.5.3 Ген за протромбин**

Ген за FII је секвенциран 1987. године, дугачак је ~21 kb, садржи 1869 нуклеотида и састоји се од 14 егзона и 13 интрона (236). Позиција FII гена на хуманом хромозому 11 је у близини центромере (11p11-q12) и приказана је на Графикон 5 (237, 238).



**Графикон 5.** Идеограм једанестог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса F2 гена на кратком (p) краку хуманог хромозома 11 на позицији 11.2 (преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F2#location>) (237)

#### 1.4.5.4 Тромбофилија услед мутације у FII гену

За разлику од осталих хуманих гена, 3' крај гена за протромбин чине активни USE (енгл. *upstream element* – USE) елементи који везују две класе протеина: факторе који учествују у искрајању и факторе који чине полиаденилациону машинерију, мање ефикасно место искрајања и неактивни DSE (енгл. *downstream element* – DSE) елемент. Карактеристично за место исецања 3' крај гена за протромбин је присуство CG динуклеотида при чему је *in vitro* запажено да је исецање иза CG динуклеотида најмање ефикасно од свих могућих комбинација, тако да замена G нуклеотида било којим другим у протромбину доводи до повећане ефикасности исецања, што доводе до повећане експресије гена и настанка протеина који стиче активност која је већа од нормалне (енгл. *gain of function*), тј. долази до повећане експресије протромбина (115, 193).

Пурт (*Poort*) и сарадници 1996. године су први описали генетску варијанту у промоторском 3'UT региону гена за протромбин, код које је присутна транзиција G → A на нуклеотидној позицији 20210 (239, 240), која је повезана са благо повишеним нивоом протромбина у крвној плазми и сматра се независним фактором ризика за настанак венских и артеријских тромбоза (228, 229).

Механизам којим ова мутација утиче на ниво протромбина се повезује са ефикаснијом полиаденилацијом 3' краја информационе рибонуклеинске киселине (енгл. *messenger RNA* – mRNA), чиме се олакшава транспорт mRNA из једра у цитоплазму, одржава њена стабилност и повећава ниво синтезе протеина (115, 193). Ова мутација је

пример измене у месту исецања mRNA које претходи полиаденилацији и једина до сада позната таква мутација која повећава ниво обраде 3' краја јер се за измењену секвенцу са већим афинитетом везују фактори који учествују у кључним посттранскрипционим процесима (115).

Учесталост ове мутације у општој популацији је око 2,3% а међу болесницима са венским тромбозама око 6,2% (139). Код хетерозигота је ризик за настанак тромбоза од 2,8 до 4 пута већи (239) и повећава се током примене хормонске терапије. Показано је да FII G 20210 A варијанта може представљати значајан фактор за појаву спонтаних побачаја и смрти фетуса *in utero* (241, 242). Истовремено постојање FII G 19911 A мутације додатно повећава ризик за настанак тромбоза код носилаца FII G 20210 A мутације (115).

#### **1.4.6 Урођена тромбофилија услед снижене активност метилентетрахидрофолат редуктазе**

##### **1.4.6.1 Увод**

Хомоцистеин је аминотиолна аминокиселина која настаје из метионина и има значајну улогу у метаболизму фолата (193, 243). Хиперхомоцистиенемија (ННС) се карактерише повишеним нивоом хомоцистеина у плазми и представља кључни патофизиолошки фактор за различите клиничке поремећаје. Мутације у генима који кодирају ензиме укључене у метаболизам хомоцистеина доприносе настанку хиперхомоцистиенемије.

Есенцијалну улогу у синтези хомоцистеина и ДНК има фолат (витамин Б9). Биолошки активни облици фолата су тетраhydrofolати (FH<sub>4</sub>) који учествују у синтези пурина и приримидина и 5-метилентетрахидрофолат (N<sup>5</sup>-метил-FH<sub>4</sub>) који учествује у реметилацији хомоцистеина у метионин (243).

##### **1.4.6.2 Метаболизам фолата и хомоцистеина**

Након апсорпције у илеуму фолати се у интестиналним ћелијама преводе у N<sup>5</sup>-метил-FH<sub>4</sub>, који улази у порталну вену и даље у јетру, одакле се преноси крвотоком у облику лабавог комплекса с протеинима плазме. Конверзију 5,10-



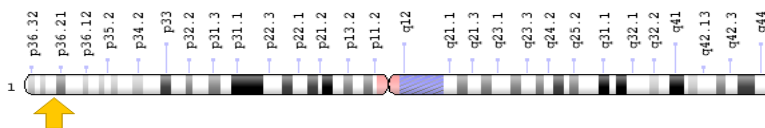
метилентетраhydrofolата ( $N^5,N^{10}$ -метил- $FH_4$ ) у  $N^5$ -метил- $FH_4$  катализује метилентетраhydrofolат редуктаза (MTHFR) уз присуство редукованог никотинамид-аденин динуклеотид фосфата (NADPH) (193, 244).  $N^5$ -метил- $FH_4$  је донор метил групе при реметилацији хомоцистеина у метионин (244).

Метионин је неопходан за синтезу S-аденозилметионина (SAM), који је главни давалац метил-групе у различитим процесима метилације у организму од којих је најважнија метилација ДНК, која представља један од епигенетичких механизма контроле генске експресије (193, 244). Преносом метил групе SAM се конвертује у S-аденозилхомоцистеин (SAH), који се хидролизира у хомоцистеин и аденозин (244).

Регенерација метионина из хомоцистеина је могућа у присуству фолата и витамина  $B_{12}$ . Када нема довољно метионина или је концентрација S-аденозилметионина ниска, хомоцистеин се усмерава у правцу реметилације. Код особа са дефицијенцијом витамина  $B_6$ ,  $B_{12}$ , фолата или услед смањене ензиматске активности MTHFR хомоцистеин се не може ефикасно реметилувати што доводи до накупљања хомоцистеина у циркулацији и настанку хиперхомоцистеинемije која је независни фактор ризика за тромбозу (244, 245).

### 1.4.6.3 Ген за метилентетраhydrofolат редуктазу

Године 1994. је године лоциран хумани MTHFR ген, који кодира MTHFR ензим, у региону 1p36.22 првог хуманог хромозома, што је приказано на Графикону 6 (245, 247), а 1998. године је одређена структура хуманог MTHFR гена који је дуг 2.2 kb и садржи 11 егзона (248).



**Графикон 6.** Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса MTHFR гена на кратком (p) краку хуманог хромозома 1 на позицији 36.22 (преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>) (247).

#### 1.4.6.4 Урођена хиперхомоцистиенемија услед снижене активности метилентетрахидрофолат редуктазе

Хомоцистинурија, наследна метаболичка болест, први пут је описана 1962. године. Настаје услед поремећаја метаболизма метионина и доводи до хиперхомоцистиенемије (245). Један од узрока хомоцистинурије може бити дефицијенција и снижена ензиматска активност МТНFR.

Код особа са хомоцистинуријом идентификовано је најмање 40 мутација у МТНFR гену (249). Најчешће присутну МТНFR С677Т генску варијату (250) идентификовали су 1995. године Фрошт (*Frosst*) и сарадници, код које је присутна супституција цитозина у тимин (С→Т) у 4. егзону на месту 677 транскрипта МТНFR гена, која последично води до замене аланина (Ala) валином (Val) на 222. месту у ензиму (244, 251). Хетерозиготна генска варијанта МТНFR С677Т утиче на синтезу термолабиног протеина са смањеном ензиматском активношћу на 30 % у односу на активност неизмењеног ензима, што за последицу има смањену количину доступног N<sup>5</sup>-метил-FH<sub>4</sub>, поремећену реметилацију хомоцистеина и последичну хиперхомоцистиенемију (219, 244, 252).

Други полиморфизам МТНFR, 1298А-С (супституцију аденина у цитозин (А→С) на 1298 месту у транскрипту гена за МТНFR) је идентификован 1998. године. Последица ове *missens* мутације је синтеза термолабилног ензима и смањена ензиматска активности МТНFR код СС хомозигота на 60% од активности неизмењеног ензима (253).

Присуство хиперхомоцистиенемије код хомозигитних носилаца С677Т мутације представља значајан фактор ризика за настанак васкуларних обољења, артеросклерозе и венске тромбозе (254), повезује се са настанком карцинома, шизофренијом, епилепсијом, депресијом, аутизмом и дефектом неуралне цеви (спина бифида и аненцефалија) (219, 255, 256). Забележено је да је повишени ниво хомоцистеина чешће присутан код жена са компликацијама трудноће (пreekламсија, абрупција плаценте, хабитуални побачаји, интраутерини застој у расту и развоју фетуса)(245, 257).

Код здравих људи МТНFR С677Т генска варијанта је присутна с релативно високом учесталошћу као хомозиготна (30-50%) и хетерозиготна форма (9-12%)(244, 258). Преваљенца С677Т је нижа у Африци у односу на Европу и Азију. Учесталост ове мутације је око 24%-40% код Европљана, 26%-37% у јапанској популацији, док је у афричкој популацији знатно мања, око 8% (193).

Сматра се да повећан унос фолне коселине у комбинацији с витаминима В групе може неутралисати метаболички утицај полиморфизма С677Т МТНFR гена (193, 219). Тако се са уносом најмање 0,5 mg фолне киселине редукује ниво хомоцистеина за 3–4  $\mu\text{mol/l}$  (252).

#### **1.4.7 Урођена тромбофилија услед повишене експресије плазминоген активатор инхибитора тип 1**

##### **1.4.7.1 Улога плазминогена у фибринолизи**

Фибринолиза настаје као резултат интеракције између више плазмоген активатора и инхибитора, који заједно чине ензимску каскаду, и на крају доводе до деградације фибрина помоћу плазмина (259).

Хумани плазминоген је једноланчани гликопротеин који се синтетише у јетри и у плазми је присутан примарно у неактивној форми зимогена (193, 260). Активацијом плазминогена настаје плазмин који доводи до фибринолизе крвног угрушка и обнављање нормалног тока крви (261).

Активација плазминогена у плазмин одвија се у присуству FXIa, FXIIa, каликреина, помоћу плазминоген активатора: tPAи урокиназног плазминоген активатора (uPA), PAI-1 и PAI-2 и инхибитора плазмина:  $\alpha$ 2- антитрипсин ( $\alpha$ 2-AP) и  $\alpha$ 2-макроглобулин ( $\alpha$ 2-MG) (193, 259, 260, 261). Систем плазминоген активатора има кључну улогу у различитим физиолошким и патолошким процесима: у коагулацији, фибринолизи, инфламацији, зарастању рана и малигнитету (259).

### 1.4.7.2 Плазминоген активатор инхибитори

Најзначајнији инхибитори фибринолизе су инхибитори активатора плазминогена: тип 1 (PAI-1) тзв. PAI ендотелних ћелија, тип 2 (PAI-2) тзв. плацентални тип PAI и тип 3 (PAI-3) који је идентичан инхибитору протеина С (259) и инхибитору плазмина ( $\alpha$ 2 антиплазмин)(119, 259).

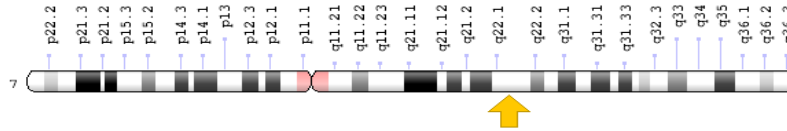
Плазминоген активатор инхибитор 1 припада фамилији серин протеазних инхибитора (SERPINE 1), има кључну улогу у контроли формирања плазмина и регулацији фибринолизе, инхибира интраваскуларну фибринолизу и ћелијску повезану протеолизу (енгл. *cell-associated proteolysis*) (193, 259).

Године 1986. откривена је линеарна структура PAI-1, молекулске масе око 47.2 kDa (262), кога производи васкуларни ендотел, мегакариоцити, глатке мишићне ћелије, фибробласти, моноцити/макрофази, адипоцити, ендометријум, перитонеум, ћелије јетре, мезотелијалне ћелије и ћелије срчаног мишића. Најчешће се депонује у тромбоцитима или субендотелијалном матриксу (259). У тромбоцитима су присутне велике количине PAI-1 у латентној форми. Након активације и агрегације тромбоцита PAI-1 се ослобађа и везује за фибрин, чиме се објашњава релативна резистенција на лизу угрушака богатих тромбоцитима (261).

Веома повишена експресија PAI-1 значајно инхибира фибринолизу и доводи до патолошког таложења фибрина, тромбоза и оштећења ткива (193, 259). Концентрација PAI-1 у плазми зависи од расе, пола, има циркадијални ритам и делом је генетски детерминисана (259).

### 1.4.7.3 Ген за плазминоген активатор инхибитор тип 1

Положај PAI-1 гена (енгл. *SERPINE1 gene*) на седмом хуманом хромозому на локусу 7q22.1-q22.3 приказан је на Графикону 7 (263). Генетска структура SERPINE1 гена, који је дуг око 12.2 kbp и садржи 9 егзона и 8 интрона, је одређена 1987. године (264).



**Графикон 7.** Идеограм седмог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса SERPINE1 гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 7 на позицији 22.1 (преузето са U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINE1#location>) (265)

#### 1.4.7.4 Повишена експресија плазминоген активатор инхибитора тип 1

Досон (*Dawson*) и сардници су 1993. године идентификовали инсерционо/делециони SNP једног гуанозина (G) у промотору PAI-1 гена на позицији -675 bp (675 базних парова узводно од места почетка транскрипције) означен као 4G/5G генска варијанта (266). Алелска варијанта са 5 гуанозина (5G) садржи преклапајућа везујућа места за активатор и репресор транскрипције, док 4G варијанта везује само активатор транскрипције, тако да 5G варијанта доводи до нормалне експресије, док 4G варијанта доводи до повећања нивоа PAI-1 у крви (119). Хомозиготни генотип са делецијом (4G/4G) повезан је са вишом PAI-1 концентрацијом и редукованом фибринолитичком активношћу у односу на инсерциони генотип (5G/5G) (267).

У здравој српској популацији је утврђено високо присуство мутираног 4G алела (0,58), а такође и у хрватској (0,58), македонској (0,55) и грчкој популацији (0,52)(119).

Подаци из литературе указују на значајну асоцијацију 4G/5G полиморфизма са артеријским обољењима, инфарктом миокарда, венским тромбоемболизмом, хеморагијским шоком, полицистичним оваријалним синдромом и астмом (268). Хомозиготна PAI-1 4G/4G варијанта представља потенцијални фактор ризика за компликације трудноћа (269), као што су превремени порођај, интраутерини застој у расту, спонтани побачаји, мртворођеност (267, 270, 271) и настанак преекламсије (268, 272, 273).

## **1.5 Стечена тромбофилија**

### **1.5.1 Стечена дефицијенција антитромбина**

Стечени дефицијенција АТ се јавља код тешких оболења јетре (хепатитис, алкохолизам, оштећења услед злоупотребе дрога), бубрега и црева, током употреба контрацептива који садрже естроген или прогестаген (274), као и током лечења нефракционисаним хепарином (193).

### **1.5.2 Стечена протеин Ц и протеин С дефицијенција**

Стечена дефицијенција протеина Ц може се развити код стања повезаних са дисеминована интраваскуларна коагулација (енгл. *disemminated intravascular coagulation – DIC*), као што је тешка сепса, код терапије варфарином код хетерозигота за РС дефицијенцију и услед формирања аутоантитела и коришћења валпроичне киселине (275).

Стечени недостатак PS је најчешће последица болести јетре или последица недостатка витамина К (193).

### **1.5.3 Стечена хиперхомоцистеинемија**

Најчешћи узроци стечене хиперхомоцистеинемије су: дефицијенција фолата, витамина В6 и В12 у исхрани, примена лекова који делују на метаболизам фолата (антиепилептички лекови и метотрексат), пушење, мегалобластна анемија, псоријаза, хронична бубрежна инсуфицијенција, хемодијализа, хипотиреоидизам и неки малигни тумори (193, 276). Такође, с годинама долази до пораста нивоа укупног хомоцистеина у плазми независно од присуства мутација у МТНFR гену (193).

### **1.5.4 Антифосфолипидни синдром**

#### **1.5.4.1 Дефиниција**

Антифосфолипидни синдром (APSy) је неинфективна аутоимунска болест с клиничким манифестацијама артеријске и венске тромбозе и/или компликацијама у трудноћи код пацијената с перзистентно позитивним антифосфолипидним антителима (АРА). АРА обухватају: антикардиолипинска антитела (aCL), анти- $\beta_2$ -гликопротеинских

антитела (а $\beta$ 2GPI) и/или лупус антикоагуланс (LA)(277, 278). АРА реагују с фосфолипид везујућим плазма протеинима ( $\beta$ <sub>2</sub>-гликопротеин, протеин С, протеин S, протромбин, анексин V, анексин II, липопротеине мале густине), с комплексима протеин/фосфолипид и анјонским фосфолипидима (278). Најчешћи антигени циљни LA и аCL је молекул је  $\beta$ <sub>2</sub>-гликопротеин 1 ( $\beta$ 2GPI)(277, 279).

Антифосфолипидни синдром је први пут описао 1983. године британски реуматолог проф. др Грејам Хјуз (*Graham Hughes*) у прегледном раду у коме бележи присуство антитела, које је назвао лупус антикоагуланс, код пацијената који су боловали од системског еритремског лупуса, а које је довео у везу с настанком тромбоза, спонтаних побачаја и церебралним обољењима (280).

Антифосфолипидни синдром је најчешћи узрок стечене тромбофилије (277). У здравој популацији преваланца аCL износи између 1% - 5,6%, док је за LA између 1% - 3,6% (279). Најчешћа места за појаву тромбоза код APSy су дубоке вене доњих екстремитета и церебрална циркулација (277). Компликације које се могу јавити код трудница са APSy-ом су понављајући спонтани побачаји, олигохидроамнион, превремени порођај, интраутерини застој у расту, фетални дистрес, фетална или неонатална тромбоза, преекламсија/екламсија, HELLP (енгл. *H-hemolysis of erythrocytes, EL-elevated liver enzymes, LP-low platelet coun*) синдром, артеријска тромбоза и плацентална инсуфицијенција (278, 279).

#### **1.5.4.2 Етиологија антифосфолипидног синдрома**

Етиологија APSy је непозната. Описано је породично наслеђивање APSy и о овој болести се говори као о стеченом стању које захтева генетску предиспозицију. Хадсон (*Hudson*) и сарадници су 1997. године дали први извештај о могућем постојању генске асоцијације између HLA-DRB1\*14 алела, смешеног на кратком краку хромозома 6 (6p21.3) и подложност за APSy (281, 282). У хуманим породичним студијама најчешће су евидентиране везе између APSy-а и HLA гена: DR4 и DRw53, DR7, DQw3, DQw7, A30, Cw3, B60 (283).

### 1.5.4.3 Патогенеза антифосфолипидног синдрома

Примарни антигени циљ АРА је  $\beta$ 2GPI који заједно с протромбином чини 90% антигених циљева код пацијената са APSy (283). Остали потенцијално значајни антигени циљеви су tPA фосфатидил серин, плазмин, анексин2, APC, тромбин, антитромбин III и анексин V (283).

$\beta$ 2GP-I се везује за различите молекуле на ћелијској површини и представља природни антикоагуланс који инхибира унутрашњи коагулациони пут, протромбиназну активност тромбоцита и ADP зависну агрегацију тромбоцита (284). Везивањем АРА за  $\beta$ 2GP-I на површини ендотелних ћелија, моноцита, тромбоцита блокира се његова антикоагуланта улога и врши се активација ових ћелија, чиме се идукује појачана синтеза ткивног фактора и тромбоксана A2 и доводи до експресије прокоагулантне активности (277, 284).

Лупус антикоагуланс (LA) чији је ефекат посредован преко  $\beta$ 2GPI или  $\alpha$ 2GPI антитела престављају најјачи фактор ризика за настанак тромбоза у односу на антикардиолипинска и антипротромбинска антитела (277).

IgG  $\alpha$ 2GPI антитела за домен 1 су најјаче повезана с претходним тромбозама и компликацијама трудноће у односу на антигене других регија протеина. Присуство системског еритремског лупуса и других фактора ризика за настанак тромбоза, као што су урођена тромбофилија, канцер, имобилизација, пушење, трудноћа, коришћење оралних контрацептива или претходне тромбозе, додатно повећавају ризик од тромбоза (277).

Везивање АРА за плацентале трофобласте резултира у инхибицији ћелијске пролиферације и диференцијације, док је на животињским моделима показано да изазива неутрофилну активацију посредовану ткивним фактором и комплементом, оштећење трофобласта и губитак фетуса (277, 283). Инфламација је централни патогени фактор и есенцијални посредник између плаценталног оштећења и APSy-a (283).



## 1.6 Тромбофилија у трудноћи

### 1.6.1 Увод

Трудноћа представља стање повишеног ризика за настанак тромбоза и тромбоемболизма (285). Прве *postmortem* описе инфаркта и плућне емболије жена умрлих током трудноће и након порођаја дао је Ангус МекДоналд (*Angus MacDonald*) 1878. године (286). Све три компоненте Вирхоове тријаде су присутне у трудноћи, венска стаза достиже врхунац крајем трећег триместра, присутна је хиперкоагулабилност и оштећење крвних судова приликом порођаја (285).

Присутна хиперкоагулабилност у трудноћи је изазвана повећањем концентрације фактора коагулације, смањењем количине природних антикоагуланаса и смањењем фибринолитичке активности крви (287) и најизраженија је у моменту рађања постељице, када долази до ослобађања тромбопластичних супстанци које стимулишу стварање крвног угрушка (287). Физиолошке промене и активације система коагулације током трудноће доводе до повећаног стварања тромбина (285), нарочито у постнаталном периоду (288). Вредност тромбоцита током трудноће се смањују услед деструкције и хемодилуције (287). Као резултат хормонских промена (288) долази до пораста фактора VII, VIII, X, XII, *Von Willebrandovog* фактора, фибриногена и повећаног стварања фибрина (285, 288, 289). Такође расту протромбин F1 и 2 и тромбин-антитромбин (ТАТ) комплекси (290). Фактор VII расте од ране трудноће све до 29–34 НГ где достиже горње референтне вредности ван трудноће и ту се задржава до раног постпарталног периода. Фактор VIII код 50% жена између 13–20 НГ достиже више нивое у односу на ван трудноће, константно расте до краја трудноће и достиже ниво три пута виши у односу на ван трудноће и на том нивоу се задржава два дана постпартално. Фактор IX такође константно расте током трудноће, али мање изражено него фактор VIII. На порођају око 50% жена има вредности фактора IX више него референтне вредности ван трудноће, које настављају да расту прва два постпартална дана (289). Концентрације фактора II, X и XI су непромењене током трудноће, а такође је и фактор V стабилан током трудноће и порођаја, али долази до његовог пораста другог постпарталног дана (289). Фактор XII је стабилан током целе

трудноће, али је нешто више концентрације у односу на референце ван трудноће (289). Концентрација фибриногена расте најдраматичније после 28 НГ и достиже двоструке вредности у односу на референтне ван трудноће и на том нивоу остаје прва два дана након порођаја (289). Вредност антиромбина је током трудноће стабилна, на нешто нижем нивоу у односу на референце ван трудноће (289), инхибитор ткивног фактора минимално расте (288), вредност РС се не мења и лагано расте после порођаја, док активност PS опада, достижући најнижи ниво на порођају (289).

Фибринолитичка активност је за време трудноће смањена као последица пада вредности tPA, који остаје повишен до сат времена након порођаја. Ово смањење има за последице повишене вредности PAI-1, чије се вредности утростручују и PAI-2 чији је ниво да 25 пута виши и постпартално остаје повишен неколико дана (285, 287). Посељница производи PAI-1 и представља примарни извор PAI-2.

Од самог почетка трудноће као последица дејства прогестерона на зидове крвног суда, долази до развоја венске стазе, док с напредовањем трудноће механички фактори постају све израженији (287).

Ове физиолошке промене у хемостазном систему имају важну заштитну улогу у перипарталном периоду, али могу и да предиспонирају мајку и фетус компликацијама током трудноће: преекламсији, плаценталној абрупцији, интутерусном застоју у расту и развићу плода, превременом порођају, раном и касном губитку трудноће и интутерусној смрти плода. Ризик за мајку почиње од зачетка и најновији подаци указују да траје све до 12 недеља постпартално, док ризик за фетус укључује присуство компликација током трудноће. Ризик за компликације у трудноћи је повишен код мајки са урођеном или стеченом тромбофилијом (291).

### **1.6.2 Патопфизиолошке промене код трудноћа компликованих тромбофилијом**

Хемостатски систем игра значајну улогу у процесу имплантације и плацентације. Контакт између феталне и матерналне циркулације и равнотежа између коагулације и фибринолизе у постелици на нивоу хемохорионске мембране је кључан за развој успешне трудноће, док протромботске и тромботске промене могу оштетити овај процес (288).

У нормалној трудноћи плацента обезбеђује неколико важних функција које су неопходне за нормалан раст фетуса: транспортну функцију, која омогућава размену хранљивих и отпадних материја између мајчине и феталне циркулације, ендокрину функцију, при чему трофобласне ћелије производе естриол, прогестерон и хумани плацентални лактоген и имунолошку функцију која је значајна у препознавању феталног ткива од стране имунског система мајке (288).

Успешност трудноће зависи и од ефикасности менахизама који превенирају коагулацију мајчине крви у интервилозном простору и крви у феталном крвотоку. Анексин V је снажан антикоагуланс експримиран на површини трофобласта који има кључну улогу у превенцији тромбоза интервилозног простор и одржавању нормалне плаценталне циркулације и налази се у директном контакту с коагулационим протеинима мајчине крви, које инхибира везујући се за фосфолипиде (290).

Током нормалне плацентације цитотрофобласт феталног порекла емигрира из хорионских вила вршећи инвазију матерналних спиралних артерија и трансформише их тако да постају максимално проширене и омогућавају максималан проток крви кроз постељицу (288, 290, 292). Током процеса васкуларне инвазије цитотрофобласт мења епителни фенотип у ендотелни фенотип, у процесу познатом као „псеудоваскуларизација“ (292), при чему замењује матернални ендотелни слој, а такође се убацује између ћелија глатких мишића и делимично их замењује (290, 293). Инвазија трофобласта почиње у касном првом триместру, а завршава се у 18–20 НГ. Ремоделирање и трансформација спиралних артерија је потребна да би се обезбедила адекватно снабдевање фетуса хранљивим материјама и кисеоником (294). Код патолошке плацентације, у патолошкој трудноћи, цитотрофобласт не прелази у ендотелни фенотип, нема инвазије спиралних артерија од стране трофобласта и оне остају сужене (4). Због отпора крвних судова проток крви кроз плаценту је отежан (292). Настала смањена перфузије плаценте, услед абнормалног развоја постељице и неадекватне фето-матерналне циркулације, удружена је са ендотелном дисфункцијом, вазоконстрикцијом, васкулопатијом, плацентном исхемијом и повећаном коагулабилношћу (288). Плацентална васкулопатија је термин патолошких

плацентних промена који подразумева: суперфицијалну инвазију трофобласта у простору спиралних артерија и појаву тромботичких процеса у спиралним артеријама и/или интервилозним просторима. Плацентална васкулопатија је клинички удружена с преекламсијом, интратерусним застојем у расту и развоју, абрупцијом плаценте, губицима трудноћа и мртворођеношћу (290). Присуство тромбофилије може бити додатни фактор ризика за настанак ових компликација, али и за развој венског тромбоемболизма у трудноћи и постпартално (290).

Систематски преглед литературе и мета-анализе студија случај-контрола показале су да постоји јака повезаност између неповољног исхода трудноће и тромбофилије у трудноћи (291, 295). Робертсон (*Robertson*) и сардници су 2005. године потврдили налазе предходних студија да су урођена и стечена тромбофилија узрочно повезана с венским тромбоемболизмом и негативним исходом трудноће (296).

Током трудноће компликоване тромбофилијом расте ризик за венски тромбоемболизам, али такође може бити и увећан ризик за ране (поновљени губици трудноћа) и касне компликације трудноће (преекламсија, интратерусни застој у расту плода, плацентну абрупцију, превремени порођај и интратерусну смрт плода)(290, 292). Претпоставка је да су плацентна васкуларна тромбоза и абнормална плацентација делимично одговорне за ове компликације у трудноћи (292).

Етиопатогенеза компликација у трудноћи код присуства тромбофилије није јасно и у потпуности дефинисана (288, 297). Једна од хипотеза која покушава да објасни патофизиолошки механизам полази од чињенице да присуство тромбофилије доводи до прекомерне активације хемостазног система, што за последицу има таложења фибрина или стварање ситних тромбова у спиралним артеријама или интервилозном простору плаценте (290, 293) који ремете утероплацентну перфузију (298). Међутим, постоје докази да негативни исходи трудноћа не могу бити искључиво последица присутне тромбофилије, већ да су и други патогени механизми укључени у компликацију постојећег хиперкоагуабилног стања (294, 297).

### 1.6.3 Оксидациони стрес код трудноћа компликованих тромбофилијом

Резултати већег броја студија су показали да оксидациони стрес игра важну улогу у развоју компликација током трудноћа код пацијенткиња са тромбофилијом (288). Код трудница с тромбофилијом је запажено значајно повећана активност ензима за заштиту од оксидационих оштећења у ткиву плаценте, што говори о томе да је у протромботским условима плацента изложена оксидационом стресу. Главна ROS у плацентном ткиву трудница с тромбофилијом је водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), што се закључује на основу значајно повишене активности ензима који користе водоник пероксид као супстрат (каталазе и глутатион пероксидазе), док неповишене вредност плацентне активности ензима супероксид дисмутаза ( $CuZnSOD$  и  $MnSOD$ ) код трудница с тромбофилијом у односу на здраве труднице указује да  $H_2O_2$  не потиче из плацентног ткива. Пристов и сарадници (298) налазе да су активности каталаза и супероксид дисмутаза код фетуса, као и аскорбил радикала који представља маркер оксидационог стреса у амнионској течности, биле сличне код здравих и трудница с тромбофилијом, на основу чега закључују да водоник пероксид који изазива оксидациони стрес у плаценти може бити дистрибуиран из мајчине крви или ендотелијума. Продукција  $H_2O_2$  је иницирана протромботским стањем у мајчиној циркулацији везаним за тромбофилију (298). Оксидативни стрес, узрокован протромботским условима, активира каскаду догађаја који узрокују вазоконстрикцију, леукоцитну адхезију, оксидацију мембране и даљу коагулацију, а истовремено сваки од ових догађаја узрокује даљу генерацију ROS (288). Ове ланчене реакције могу довести до повишеног нивоа водоник пероксида у плаценти с тромбофилијом и оштећења ткива плаценте, застоја у расту плода и спонтаних побачаја (298).

### 1.6.4 Антикоагулантна терапија нискомолекуларним хепарином

Нискомолекуларни хепарин (енгл. *low-molecular-weight heparin – LMWH*) настаје контролисаном хидролизом стандардног хепарина и има молекулску масу између 4000-6000 далтона (299). Показано је да је примена LMWH безбедна током трудноће. Нискомолекуларни хепарин не пролази кроз плаценту и због тога нема ефекат на плод (300,

301). Анималне и хумане ретроспективне студије нису показале фетотоксичност нити тератогеност LMWH (302).

Клиничка истраживања су показала да примена LMWH тромбопрофилактике код жена са оптерећеном акушерском анамнезом, посебно оних са рекурентним спонтаним побачајима и мртворођеношћу, значајно смањује појаву компликација у трудноћи (303) и повећава стопу живорођености (291, 304). Тако је показано чешће присуство патолошких ултразвучних параметара (недостатак N–дијастоле у умбиликалном протоку, олигоамнион, застој у расту плода) код трудница са урођеном тромбофилијом које нису примале LMWH у односу на групу која су биле на антикоагулантној терапији (305).

Америчко удружење обстетричара и гинеколога дало је препоруке за примену LMWH у трудноћи (306). Код жена са APSу саветује се коришћење LMWH заједно са ацетил салицилном киселином (аспирин) (302). Почетак примена LMWH код трудница с тромбофилијом сматра се идеалном до 6 НГ (у периоду пре инвазије трофобласта), али има терапијског ефекта и до 18 НГ (завршетак друге фазе трофобласне инвазије)(288). Еноксапарин (Сlexane), далтепарин (Fragmin), надропарин (Fraxiparin) су облици LMWH који се широко користе у тромбопрофилактици (302).

Механизам деловања LMWH је комплексан и састоји се од инхибиције томбина, индиректне инхибиције фактора Ха преко дејства на антитромбин, блокирања активације комплемента иницирањем aPL-IgG на децидуалном ткиву, директног ефекта на тромбoplast редукацијом апоптозе, побољшања ендометријалне ангиогенезе и модулације имуског система (288).

## **2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА**

### **2.1 Циљеви истраживања**

Као значајна метода у процени здравственог стања организма издваја се испитивање хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви. Како код трудница нема довољно података из добро дизајнираних и контролисаних студија и како

се подаци добијени на лабораторијским животињама не могу у потпуности применити код људи, на основу процене хромозомске нестабилности код трудница и пупчаника неонатуса основи циљеви ове студије били су да се утврди:

1. Ниво базалног оштећења наследног материјала у лимфоцитима периферне крви код трудница са тромбофилијом и код здравих трудница,
2. Постојање корелација између генетичке нестабилности и анамнезе претходних трудноћа, обољења и животних навика,
3. Ефекат тромбопрофилактичке терапије на степен хромозомске нестабилности код трудница с дијагностикованом тромбофилијом,
4. Предиктивна вредност МН теста на лимфоцитима периферне крви у односу на исход трудноће.

## **2.2 Хипотезе истраживања**

1. Постоји статистички значајна разлика у фреквенци цитогенетских биомаркера (МН, НПМ, НП) у лимфоцитима периферне крви између трудница с тромбофилијом и здравих трудница пре примене тромбопрофилактичке терапије.

2. У лимфоцитима периферне крви трудница с тромбофилијом без антикоагулантне терапије постоји статистички значајно виша фреквенца цитогенетских биомаркера.

3. Не постоји статистички значајна разлика у фреквенци цитогенетских биомаркера у лимфоцитима периферне крви након примене тромбопрофилактичке терапије између трудница с тромбофилијом и здравих трудница.

4. Тромбопрофилактикса утиче на значајно смањење МН фреквенце у лимфоцитима периферне крви.

5. Фреквенца МН у крви мајке у порођају је у корелацији с фреквенцом МН код неонатуса.

б. Фреквенце цитогенетских биомаркера у крви неонатуса су на ниском нивоу и значајно ниже у односу на мајку.

### **3. ИСПИТИВАНА ПОПУЛАЦИЈА, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

#### **3.1 Испитивана популација**

Студија је реализована по типу клиничке опсервационе проспективне кохортне студије и спроведена је на пацијенткињама-трудницама на Одељењу патологије трудноће, Клинике за гинекологију и акушерство, Клиничког центра Крагујевац, током 2015. и 2016. године.

Током испитивања пацијенткиње-труднице подељене су у две групе – кохорте. Прву кохорту су чиниле 37 трудница с присутном тромбофилијом, другу кохорту 37 здравих труднице без тромбофилије.

Студију је одобрио Етички комитет Клиничког центра Крагујевца (број одлуке 01-12294) и реализована је у оквиру Јуниор пројекта Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (евиденциони број ЈР 02/15).

#### **3.2 Обрада и методе анализе**

Након потписивања писане сагласности и информисања о значају студије све труднице с тромбофилијом и здраве труднице су попуниле стандардизовани упитник, који је укључивао демографска питања, питања у вези са животним навикама, питања из репродуктивне и медицинске историје. Искључујући критеријуми у студији су били постојање инфективне или гинеколошке етиологије за настанак губитака и компликације претходних трудноћа.

Сви подаци о личној и породичној анамнези везани за појаву тромбоза и компликација трудноћа, као и подаци о исходу актуелне трудноће, сакупљани су из историја болести пацијенткиња.



### 3.2.1 Дијагностика тромбофилије

Дијагностички и терапијски приступ тромбофилији је спроведен независно од ове студије, према важећим болничким протоколима и актуелним водичима добре клиничке праксе у вези с тематиком овог истраживања.

### 3.2.2 Процедура цитокинезис-блок микронуклеус теста

Ради утврђивања нивоа генетичких оштећења у лимфоцитима периферне крви код трудница с тромбофилијом и здравих трудница коришћен је ЦБМН тест, метода коју су 1985. године су модификовали Фенек и Морли (307).

У стерилном хепаринизованом шприцу из надлактичне вене венепункцијом је свакој трудници узето по 2 ml крви, на почетку трудноће до 9. недеље гестације и у порођају, као и крв из пупчаника након порођаја и клемовања пупчаника. У кохорти трудница с тромбофилијом крв је узимана на почетку трудноће пре почетка примене антикоагулантне терапије.

Пуна хепаринизирана крв 20-25 капи (0,5 ml) је укапавана у стерилне бочица са 5 ml комплетног медијума за култивацију лимфоцита периферне крви РВMax Carotyping (*Invitrogen*, Калифорнија, САД). Сваки узорак крви је засејан у дупликату и инкубиран 72h на 37°C. У циљу заустављања цитокинезе, након 44h од почетка култивације културама се додавао цитохалазин Б (*Sigma*, Aldrich, САД) у финалној концентрацији од 4µg/ml. Инкубација ћелијских култура је затим настављена још додатних 28h.

Препарација култура је вршена према стандардној процедури. По завршетку инкубације и иницијалне центрифуге у трајању од 12 минута на 1200 обртаја, ћелијске суспензије су испиране у физиолошком раствору и поново центрифугиране. Ћелијске суспензије су затим третиране два пута хладним (4°C) хипотоним, 0,56% раствором КСI и центрифугиране у трајању од 12 мин. на 1200 обртаја, а затим фиксирне три пута свежим Карнојевим фиксативом (глицерална сирћетна киселина и метанол у односу 1:3). Након последњег центрифугирања, супернатан је пажљиво одливан и ресуспендован у малој количини фиксатива и добијени материјал је развлачен на чиста и хладна предметна

стакла, а затим су препаратри сушени иницијално под лампом и на ваздуху у трајању од три дана. Осушене плочице су бојене 2% раствором гимза боје (*BioGnost*, Загреб, Хрватска) у трајању од 12 минута.

За утврђивање фреквенце микронуклеуса (МН), нуклеусних пупољака (НП) и нуклеоплазматских мостова (НПМ) анализирано је 1000 бинуклеарних (БН) ћелија по особи светлосним микроскопом (*Leica*) при увећању од 400х. Одређивање присуства микронуклеуса у ћелијској цитоплазми вршене су према дефинисаним критеријумима који су дати у оквиру HUMN пројекта: да су микронуклеуси овалног или округлог облика, величине 1/3 до 1/6 дијаметра главног једра, да нису везани за главно једро али могу да га додирују, односно да имају сопствену нуклеарну мембрану, да нису рефрактилни, па се приликом изоштравања могу разликовати од артефакта као што су честице боје, најчешће су сличног или некада јачег интензитета бојења у односу на главно једро. НПМ у БН ћелијама представљају непрекидну нуклеоплазматску везу између два једра, дебљине до 1/4 пречника једра и бојења сличног као једро. НПМ се анализирају у ћелијама код којих постоји јасна граница између једара која се не преклапају или додирују. НП имају исту морфологију као и МН, нису одвојени од главног једра већ су увек тањом или дебљом дршком повезани с њим и према обојености су слични главном једру (308, 309).

### **3.2.3 Одређивање хематолошких параметара и дијагностика антифосфолипидног синдрома**

Узоркована је крв венепункцијом према стандардој процедури ујутру на празан стомак, а анализу концентрације протеина Ц, протеина С, хомоцистеина и APCRV је учињена у лабораторији Клинике за хематологију на апарату ACL ELITE PRO, користећи оригиналне реагенсе *Hemosil* (САД).

Анализа узорковане крви и одређивање INR, РТ, АРТТ, фибриногена, D-dimer, АТ III и LAC и LAC sct су одређивани на апарату ACL TOP CTS 300, *Instrumentation laboratory*, оригиналним реагенсима *Hemosil* (САД).

Лабораторијска дијагностика аСL и аβ2GP-I заснована на ELISA техници је обављена коришћењем теста *Euroimmun Microplate ELISA (Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany)*.

### 3.2.4 Реакција ланчаног умножавања ДНК (Polymerase Chain Reaction -PCR)

За изолацију ДНК су коришћени лимфоцити периферне крви и ћелије букалне слузнице. Узорци периферне крви (са 3,8% Na-цитратом као антикоагулансом) су узимани стандардном процедуром, а брисеви букалне слузнице помоћу стерилних штапића. Геномска ДНК је изолована помоћу DNA-Sorb-A kita i DNA-Sorb-B kita (*SACACE Biotechnologies, Italy*), према стандардном протоколу произвођача. Коришћени су различити раствори у китовима (Lysis, Sorbent, Washing и ДНК-eluent) ради добијања ДНК жељене чистоће и концентрације спремне за корићење у даљем молекуларно-генетичком испитивању. Детекција генских варијанти за V Leiden G1691A, faktor II G20210A, MTHFR C677T i PAI-1 5G/4G извршена је методом real-time PCR на апарату SaCycler-96 Real Time PCR Syust (модел SaCycler-96 RUO, *Sacace Biotechnologies, Italy*).

У реакцији ланчаног умножавања ДНК коришћени су следећи комерцијални китови: Duplica<sup>RealTime</sup>Factor II G20210A Genotyping Kit, Duplica<sup>RealTime</sup>Factor V G1691A Genotyping Kit, Duplica<sup>RealTime</sup>MTHFR C677T Genotyping Kit and Duplica<sup>RealTime</sup>PAI-1 Genotyping Kit (*Euroclone Diagnostica, Italy*). Сваки од њих је дизајниран да идентификује поменуте генске варијанте користећи две присутне реакционе смеше, *amplification mix* (Hot Start Taq DNA полимераза, нуклеотиди, MgCl<sub>2</sub> и пуфер) и *oligo mix* (са прејмерима и флуоресцентним пробама), према стандардном протоколу произвођача.

На основу специфичног препознавања и амплификације циљних секвенци помоћу PCR раздвајани су нормални и мутирани алели. Уопштено, пробе дизајниране да детектују нормални (“*wild type*”) и мутирани алел (“*mutated allele*”) су појединачно обележене на 5’ крају са флуоресцентним бојама: FAM (6-carboxyfluorescein) и HEX (hexachloro-fluorescein). Интерпретација резултата је заснована на присуству само FAM сигнала (хомозигот *wild type*), само HEX сигнала (хомозигот за мутирани алел) или су присутна оба сигнала (хетерозигот).

### 3.3 Статистичка анализа података

Од добијених података формирана је рачунарска база која је статистички обрађена уз помоћ програмског пакета PASWStatistics верзија 18 (SPSS, Чикаго, САД). На почетку истраживања извршена је обрада резултата методама класичне дескриптивне статистике. Категоријске (номиналне и ординалне) променљиве описане су расподелом учесталости њихових категорија, док су непрекидне (мерне) променљиве описане мерама централне тенденције, минималном и максималном вредношћу, аритметичком средином, стандардном девијацијом и медијаном. Избор статистичких тестова је био условљен карактером прикупљених података и типом њихове расподеле. Нормалност расподеле података испитиван је Колмогоров-Смирновим (*Koglmorov Smirnov*) тестом. Код анализе вредности нумеричких обележја између посматраних група испитаница у случају нормалне расподеле података коришћен је t- тест независних узорака, односно Ман Витнијев (*Mann Whitney*) тест у случају расподеле података различите од нормале. За поређење атрибутивних обележја посматрања између група испитаница коришћен је Пирсонов hi-квадрат (*Pirson  $\chi^2$* ) тест. Одступање од Харди – Вајнбергове (*Hardy-Weinberg-HWE*) равнотеже за сваку групу генотипова је анализирано коришћењем HWE калкулатора (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>), са вредношћу за  $\chi^2 < 3,84$ ,  $\chi^2$ -тест за један степен слободе (df-1). Преваленца сваке генске варијанте је поређена са публикованим подацима за здраву српску популацију (119, 310) коришћењем  $\chi^2$ -тест са 95% интервалом поверења (95%CI). Корелисаност обележја посматрања са присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) испитивана је Спирмановом (*Sperman*) корелацијом ранга ( $\rho$ ). Ефекти различитих променљивих на фреквенцу анализирани цитогенетичких биомаркера су одређивани применом мултипле линеарне регресионе анализе. За поређење резултата поновљених мерења коришћен је Вилкоксон (*Wilcoxon*) тест ранга. Подаци су се сматрали статистички значајним уколико је вероватноћа радне хипотезе била мања од 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Социо-демографске карактеристике испитаница

#### 4.1.1 Демографска обележја и животне навике испитаница у студији

Клиничком опсервационом проспективном кохортном студијом која је трајала две године, до 1. фебруара 2017. године, обухваћена је популација од 74 трудница, просечне старости  $29,93 \pm 4,51$  (21–39) година. У овом истраживању су идентификоване две кохорте које су обухватале 37 трудница с дијагностикованом тромбофилијом и 37 здравих трудница које су праћене током актуелних трудноћа.

Анализа фреквенце цитогенетичких маркера (МН, НП и НПМ) у БН ћелијама извршена је на узорцима крви трудница која је узимана у два наврата: у првом триместру гестације и у порођају код истих трудница и из пупчаника њихових неонатуса.

Основне социо-демографске карактеристике испитиване групе дате су у Табели 1. Присуство претходних обољевања од тромбоза и акушерска анамнеза дати су у Табели 2. Труднице у две кохорте биле су усклађене према социоепидемиолошким карактеристикама (Табела 1, Табела 2) као што су: старост, старосне категорије, телесна маса, претходно обољевање од тромбоза (*Mann Whitney U* тест,  $\chi^2$ -тест, *t*-тест;  $p > 0,05$ ). Међугрупном анализом утврђено је непостојање статистички значајних разлика између две испитиване кохорте на почетку трудноће у пушачким навикама и конзумацији алкохола ( $\chi^2$  тест;  $p > 0,05$ , Табела 1). Већина жена у обе групе нису пушиле цигарете у трудноћи (81,1%). Такође, већина трудница није конзумирала алкохол (90,54%), док је шест (8,1%) то чинило повремено, а једна трудница (1,35%) је користила алкохол седмично (Табела 1).

Демографска обележја и животне навике	Труднице	Значајност
---------------------------------------	----------	------------

		Тромбофилија	Здраве	
<b>Старост</b>		30,38±4,710	29,49±4,324	<sup>c</sup> p=0,365
(X±SD)(Med;min-max)		(30; 22-38)	(30; 21-39)	
<b>Старосне категорије</b>	<b>20-29</b>	26,33±2,765	26,11±2,685	<sup>a</sup> p=0,817
		(27; 22-29)	(27; 21-29)	
(X±SD)(Med; min-max)	<b>30-39</b>	34,21±2,299	33,06±2,388	
		(34; 30-38)	(33; 30-39)	
<b>Пушачке навике пре трудноће n (%)</b>	<b>Пушач</b>	14 (37,8%)	14 (37,8%)	<sup>b</sup> p=1,000
	<b>Непушач</b>	23 (62,2%)	23 (62,2%)	
<b>Пушачке навике у трудноћи n (%)</b>	<b>Пушач</b>	9 (24,3%)	5 (13,5%)	<sup>b</sup> p=0,373
	<b>Непушач</b>	28 (75,7%)	32 (86,5%)	
<b>Конзумација алкохола n (%)</b>	<b>Не</b>	32 (86,5%)	35 (94,6%)	<sup>b</sup> p=0,427
	<b>Да</b>	5 (13,5%)	2 (5,4%)	
<b>ВМИ kg/m<sup>2</sup></b>		22,98±2,43	23,32±4,42	<sup>a</sup> p=0,646
(X±SD)(Med; min-max)		(23,2; 17,0-27,4)	(23,2; 17,2-34,3)	
<b>Категорије према ВМИ kg/m<sup>2</sup> n (%)</b>	<b>&lt;24,99</b>	29 (78,4%)	26 (70,3%)	<sup>b</sup> p=0,595
	<b>≥24,99</b>	8 (21,6%)	11 (29,7%)	

Табела 1. Демографска обележја и животне навике трудница у студији

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; <sup>b</sup>χ<sup>2</sup> 2-тест; <sup>c</sup> t-тест; индекс телесне масе (*body mass index – BMI*), X – средња вредност, SD – стандардна девијација, Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности

#### 4.1.2 Претходне тромбозе и акушерска анамнеза код трудница у студији

У испитиваној популацији утврђена је статистички значајна разлика у односу на присуство претходних спонтаних побачаја (присуство, број, рекурентност) и интраутерусне феталне смрти (број) између трудница с тромбофилијом и здравих трудница (*Mann Whitney U* тест,  $\chi^2$ -тест;  $p < 0,05$ , Табела 2).

**Табела 2.** Претходне тромбозе и акушерска анамнеза код трудница у студији

Претходне тромбозе и акушерска анамнеза		Труднице		Значајност
		тромбофилија	здраве	
Тромбозе n (%)	Да	2 (5,4%)	0 (0,0%)	<sup>b</sup> $p=0,473$
	Не	35 (94,6%)	37 (100,0%)	
Присуство претходних спонтаних побачаја n (%)	Да	30 (81,1%)	6 (16,2%)	<sup>b</sup> $p=0,000^*$
	Не	7 (18,9%)	31 (83,8%)	
Број претходних спонтаних побачаја (X±SD)(Med;min-max)		1,14±0,787 (1; 0-3)	0,19± 0,462 (0; 0-2)	<sup>a</sup> $p=0,000^*$
Поновљени спонтани побачаји n (%)	0/1	28 (75,5%)	36 (97,3%)	<sup>b</sup> $p=0,017^*$
	2>	9 (24,3%)	1 (2,7%)	
Претходни FMU категорије n (%)	Да	4(10,8%)	0 (0,0%)	<sup>b</sup> $p=0,123$
	Не	33(89,2%)	37 (100,0%)	
Број претходних FMU (X±SD) (Med;min-max)		0,11±0,315 (0; 0-1)	0,0 (0; 0)	<sup>a</sup> $p=0,041^*$

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; <sup>b</sup> $\chi^2$  2-тест; интраутерусна смрт плода (*fetus mortus in utero* – FMU), X – средња вредност, SD – стандардна девијација, Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности

Већина трудница с тромбофилијом имала је претходне спонтане побачаје (81,1%), док већина здравих трудница није имала претходне спонтане побачаје (83,8%). Поновљени спонтани побачаји (2>) били су чешће заступљени код трудница с тромбофилијом у односу на здраве труднице (24,3% vs. 2,7%).

#### 4.2 Заступљеност крвних група АВО и RhD система у испитиваној популацији

Код трудница с тромбофилијом запажена је статистички значајно различита заступљеност крвних група АВО система ( $\chi^2$ -тест,  $p < 0,05$ ), с доминантно присутном А крвном групом (54,1%) у кохорти с тромбофилијом и О крвном групом (51,4%) код здравих трудница, (Табела 3). Процентуално већа заступљеност RhD+ крвне групе забележен је код здравих трудница у односу на кохорту с тромбофилијом (91,1% vs. 81,1%), док је за RhD- крвну групу био обрнут однос (8,1% vs. 18,2%), али присутне разлике нису биле статистички значајне ( $\chi^2$ -тест,  $p > 0,05$ , Табела 3).

**Табела 3.** Присуство крвних група АВО и RhD система у испитиваној популацији

Крвне групе	Труднице		Значајност	
	тромбофилија	здраве		
АВО систем n (%)	0	7 (18,9%)	19 (51,4%)	<sup>b</sup> p=0,021*
	A	20 (54,1%)	11 (29,7%)	
	B	8 (21,6%)	4 (10,8%)	
	AB	2 (5,4%)	3 (8,1%)	
RhD n (%)	RhD+	30 (81,1%)	34 (91,9%)	<sup>b</sup> p=0,308
	RhD-	7 (18,9%)	3 (8,1%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>b</sup> $\chi^2$  2-тест



У испитиваној популацији количник шансе за присуство спонтаних побачаја у претходним трудноћама код носилаца „non-O“ (A, B и AB) крвних група износи OR=1,482 [95% CI (0,566-3,880)], односно 1,5 пута је већи изглед да се код трудница са „non-O“ крвном групом деси спонтани побачај у односу на труднице са O крвном групом. Код носилаца „non-O“ крвних група релативан ризик за настанак спонтаних побачаја је RR = 1,147 [95% CI (0,820-1,605)] и виши је у односу на релативан ризик за настанак спонтаних побачаја код O крвне групе RR = 0,774 [95% CI (0,820-1,605)]. Количник шанси за настанак FMU у претходним трудноћама код носилаца „non-O“ крвних група износи OR = 1,667 [95% CI (0,165-16,881)], са релативним ризиком од RR = 1,167 [95% CI (0,645-2,109)].

#### **4.3 Вредности биохемијских маркера анеуплоидије у крви здравих трудница и трудница са тромбофилијом**

У испитиваној популацији трудница, спроведен је комбиновани пренатални скрининг тест првог триместра на присуство анеуплоидија плода – Дабл тест (енгл. *Double test*) код 62 жене које су биле млађе од 35 година. Између група здравих трудница (n=33) и трудница с тромбофилијом (n=29) поређене су вредности плазма протеина А повезаног с трудноћом (енгл. *pregnancy-associated plasma protein A – PAPP-A*), слободне бета субјединице хуманог хорионског гонадотопина (енгл. *free  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin – fbHCG*) и вредности нухалне тренслуценције (енгл. *nuchal translucency – NT*). У групи трудница с тромбофилијом вредности PAPP-A (mLU/L) биле су статистички значајно више (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ , Табела 4), док су вредности за fbHCG (IU/L) биле ниже, а феталне NT (mm) вредности више, али ова разлика није била од статистичког значаја (*Mann Whitney U* тест;  $p > 0,05$ , Табела 4).

**Табела 4.** Биохемијски маркери анеуплодије у испитиваним кохортама

Биохемијски маркери	Труднице		Значајност
	Тромбофилија	Здраве	
<b>fHCG</b> (X±SD)	60,25±60,93	111,64±314,98	<sup>b</sup> p=0,603
<b>PAPP-A</b> (X±SD)	5718,71±6041,87	3258,74±3026,25	<sup>b</sup> p=0,028*
<b>NT</b> (X±SD)	1,40±0,29	1,31±0,27	<sup>b</sup> p=0,171

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест;

#### 4.4 Присуство фактора урођене и стечене тромбофилије код трудница с дијагностикованом тромбофилијом

Од фактора урођене тромбофилије у кохорти трудница с тромбофилијом утврђено је најчешће присуство појединачног нуклеотидног полиморфизма 5G/4G за PAI-1 ген код 81,1% (30/37) носилаца (43,2% хетерозигота и 37,8% хомозигота). Друга по учесталости је била MTHFR C677T генска варијанта код 48,6% (18/37) носилаца (40,5% хетерозигота и 8,1% хомозигота). Најучесталија је била протеин S дефицијенција (18,9%, 7/37 трудница), док ниједна трудница није имала антитромбин III дефицијенцију (Табела 5 и Табела 6).

За анализу генотипских фреквенци и израчунавање алелских фреквенци коришћена је Харди-Вајнбергова формула:  $p^2 (AA) + 2pq (2Aa) + q^2 (aa) = (p + q)^2 = 100\%$ , где је AA учесталост немутираних хомозигота (*Wild type*), Aa учесталост хетерозигота, aa учесталост мутираних хомозигота, A – учесталост немутираног алела, а – учесталост мутираног алела (Табела 6).

**Табела 5.** Присуство протеинске дефицијенције, појединачних генских варијанти и антифосфолипидних антитела код трудница с дијагностикованом тромбофилијом

Дефицијенције протеина	Снижен n (%)	Нормалан n (%)
PS	7 (18,9%)	30 (81,8%)
PC	1 (2,7%)	36 (97,3%)
AT III	0 (0,0%)	37 (100,0%)
Генске варијанте	Присутне n (%)	Одсутне n (%)
FP G20210A	2 (5,4%)	35 (94,6%)
FV LEIDEN	2 (5,4%)	35 (94,6%)
MTHFR C677T	18 (48,6%)	19 (51,4%)
PAI 5G/4G	30 (81,1%)	7 (18,9%)
Поремећаји	Присутна n (%)	Одсутна n (%)
APCRV	1 (2,7%)	36 (97,3%)
Хиперхомоцистинемија	1 (2,7%)	36 (97,3%)
Антитела	Позитивна n (%)	Негативна n (%)
LAC	1 (2,7%)	36 (97,3%)
ACA (IgM)	1 (2,7%)	36 (97,3%)
anti- $\beta$ 2GPI	0(0,0)	37 (100,0%)

У групи с тромбофилијом уочено је најчешће присуство 4G алела PAI-1 гена (59,46%, 44/74 алела) и T алела MTHFR гена (28,38%, 21/74 алела). Фреквенце мутираних алела за ФакторV Leiden и Фактор II G20210A су биле ниске и износиле су 2,70% (2/74 алела) за обе варијанте (Табела 6).

**Табела 6.** Измерени генотипови и алелске фреквенце за четири генске варијанте (Фактор V Leiden, Фактор II G20210A, MTHFR C667T и PAI-1 5G/4G) код трудница с дијагностикованом тромбофилијом

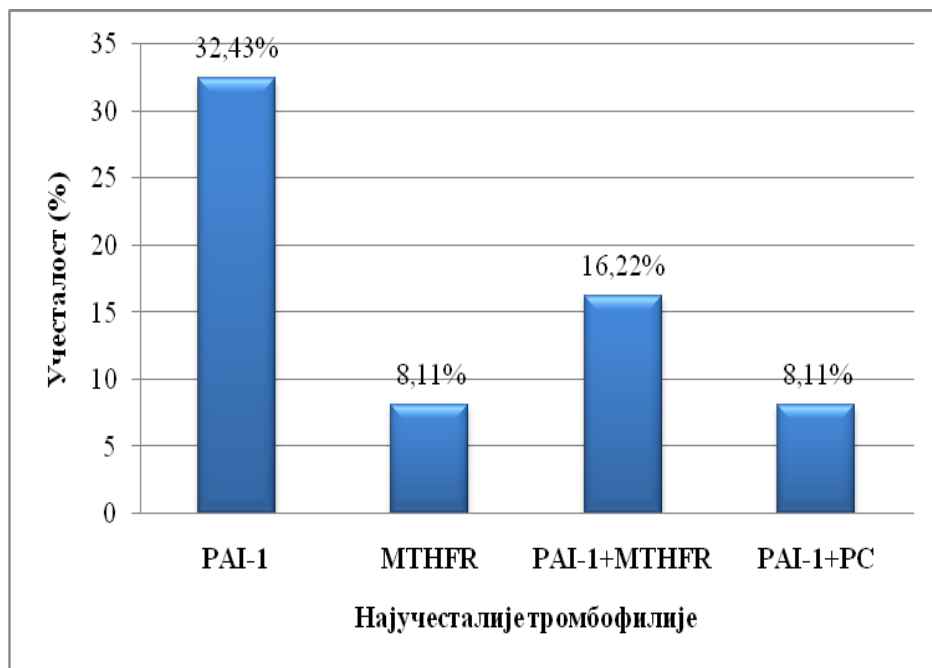
Гени	Генотипови			Алелска фреквенца		Одступање од HWE	
	Wild type n (%)	Хетерозигот n (%)	Хомозигот n (%)	Wild type	Мутирани	X <sup>2</sup>	Значајност
<b>Фактор V</b>	G/G	G/A	A/A	G	A	0,08	<sup>b</sup> p=0,8658
	94,6	5,4	0,0	0,97	0,03		
<b>Фактор II</b>	G/G	G/A	A/A	G	A	0,08	<sup>b</sup> p=0,8658
	94,6	5,4	0,0	0,97	0,03		
<b>MTHFR</b>	C/C	C/T	T/T	C	T	0,00	<sup>b</sup> p=0,9869
	51,4	40,5	8,1	0,72	0,28		
<b>PAI-1</b>	5G/5G	5G/4G	4G/4G	5G	4G	1,06	<sup>b</sup> p=0,5309
	18,9	43,2	37,8	0,41	0,59		

<sup>b</sup>χ<sup>2</sup>-тест; X<sup>2</sup> дистрибуција за један степен слободе (df-1); \* статистички значајна разлика; p < 0,05; HWE – Харди-Вајнберговог еквилибријум; Wild type – немутирани алел;

Анализом генотипских фреквенци показанао је да нема статистички значајног одступања посматране групе од Харди-Вајнберговог еквилибријума у односу на очекиване вредности (χ<sup>2</sup>-тест; χ<sup>2</sup><3,84; p>0,05, Табела 6). Учесталости алела и генотипова код трудница с дијагностикованом тромбофилијом у испитиваној популацији су биле у генетичкој равнотежи.

У 43,24% анализираних случајева уочено је присуство само једне врсте тромбофилије (16/37). Код осталих носилаца биле су присутне комбинације различитих

тромбофилија. Доминантно присутна појединачна тромбофилија била је генска варијаната PAI-1 4G/5G 32,43% (12/37), док је доминантно присутна комбинација генских варијанти била PAI-1 4G/5G + MTHFR C677T од 16,22% (6/37), (Графикон 8).



**Графикон 8.** Најучесталији појединачни и комбиновани тромбофилни поремећаји хемостазног система код трудница с дијагностикованом тромбофилијом

#### 4.5 Вредности цитогенетичких биомаркера у првом триместру гестације

##### 4.5.1 Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса здравих трудница и трудница са тромбофилијом

Резултати вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће, у порођају и у крви неонатуса за сваку појединачну трудницу дате су у Табели 7 и Табели 8. Укупан број испитиваних узорака је износио 218. Број испитиваних узорака код трудница с тромбофилијом износио је 107 (37 на почетку трудноће, 35 у порођају и 35

крви неонатуса, Табела 8), а код здравих трудница укупно је било 111 узорака (37 на почетку трудноће, 37 у порођају и 37 узорака крви неонатуса, Табела 7).

**Табела 7.** Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса здравих трудница

<b>Здраве труднице</b>									
Ред. број	Цитогенетички биомаркери у првом триместру			Цитогенетички биомаркери у порођају			Цитогенетички биомаркери у крви неонатуса		
	МН	НПМ	НП	МН	НПМ	НП	МН	НПМ	НП
1.	3	2	1	3	1	0	2	1	0
2.	4	0	2	3	1	0	1	0	0
3.	2	0	1	4	1	0	3	0	0
4.	5	1	2	5	1	1	3	1	2
5.	3	2	0	6	1	1	4	1	1
6.	4	1	0	3	3	0	3	1	1
7.	4	2	0	3	1	0	3	0	0
8.	2	0	1	4	0	1	2	0	2
9.	3	2	0	4	1	0	4	0	0
10.	3	1	1	6	0	1	1	0	0
11.	5	0	0	9	1	3	4	0	0
12.	2	0	1	3	0	1	1	1	2
13.	1	1	2	3	1	0	0	0	0
14.	5	1	2	10	2	4	6	2	1
15.	4	1	0	1	0	1	0	0	0
16.	5	0	0	5	0	1	2	0	0

17.	3	2	0	2	0	1	1	0	0
18.	4	0	0	4	3	0	2	1	1
19.	2	1	0	2	0	1	2	1	1
20.	4	2	0	7	2	3	4	1	2
21.	3	0	0	4	0	0	3	0	0
22.	3	0	1	4	1	0	3	0	0
23.	6	1	1	5	1	2	3	0	0
24.	4	1	1	3	2	0	1	1	0
25.	3	1	1	2	0	1	2	0	1
26.	2	1	2	2	2	0	2	0	1
27.	4	0	1	5	0	1	3	1	0
28.	4	1	0	3	2	0	2	1	0
29.	5	0	0	6	3	4	3	1	1
30.	2	0	0	2	0	0	1	0	0
31.	1	0	1	3	1	0	2	1	0
32.	2	0	1	3	1	1	1	0	0
33.	2	2	1	2	1	1	1	0	1
34.	3	1	0	3	1	0	2	1	0
35.	3	1	2	3	1	0	1	1	0
36.	2	0	0	2	0	0	1	0	0
37.	4	1	0	5	0	0	2	0	0
Укупно узорака	37			37			37		

**Табела 8.** Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса трудница с тромбофилијом

<b>Труднице са тромбофилијом</b>									
Ред. број	Цитогенетички биомаркери у првом триместру			Цитогенетички биомаркери у порођају			Цитогенетички биомаркери у крви неонатуса		
	МН	НПМ	НП	МН	НПМ	НП	МН	НПМ	НП
1.	8	2	0	3	0	1	1	1	0
2.	3	3	1	2	0	1	0	1	1
3.	5	0	0	3	0	0	1	0	0
4.	10	2	0	4	1	0	3	0	0
5.	11	1	0	5	2	0	2	1	0
6.	7	1	0	4	1	0	3	0	0
7.	7	2	2	4	1	1	2	0	0
8.	15	3	4	7	4	2	4	2	1
9.	13	2	1	4	1	1	3	0	0
10.	8	2	1	6	3	1	4	2	1
11.	5	2	2	9	3	0	3	1	2
12.	8	1	3	4	3	0	2	0	1
13.	4	3	0	2	1	0	1	0	0
14.	25	1	1	3	0	0	1	0	1
15.	7	2	1	4	1	0	4	0	0
16.	9	2	2	3	3	2	3	0	0
17.	5	1	1	/	/	/	/	/	0



<b>18.</b>	9	0	1	3	2	1	2	1	0
<b>19.</b>	25	1	3	5	3	1	3	1	0
<b>20.</b>	11	2	2	5	3	1	3	0	0
<b>21.</b>	5	0	1	3	1	0	1	0	0
<b>22.</b>	17	2	2	4	0	0	1	0	0
<b>23.</b>	7	1	1	4	0	2	2	1	2
<b>24.</b>	19	1	1	7	2	0	6	4	0
<b>25.</b>	4	2	0	4	1	0	3	1	0
<b>26.</b>	8	2	1	3	0	1	2	0	0
<b>27.</b>	9	1	4	4	2	0	3	0	0
<b>28.</b>	7	2	2	3	0	1	3	0	0
<b>29.</b>	5	1	1	3	3	0	3	0	0
<b>30.</b>	6	1	1	5	2	0	1	0	1
<b>31.</b>	9	1	0	/	/	/	/	/	/
<b>32.</b>	10	2	2	6	3	1	4	1	0
<b>33.</b>	4	2	1	2	2	0	1	0	1
<b>34.</b>	8	2	0	3	0	0	3	1	0
<b>35.</b>	4	2	1	3	2	0	2	0	0
<b>36.</b>	3	2	0	2	0	1	0	1	0
<b>37.</b>	10	2	4	5	3	1	3	0	1
<b>Укупно</b>		<b>37</b>			<b>35</b>			<b>35</b>	

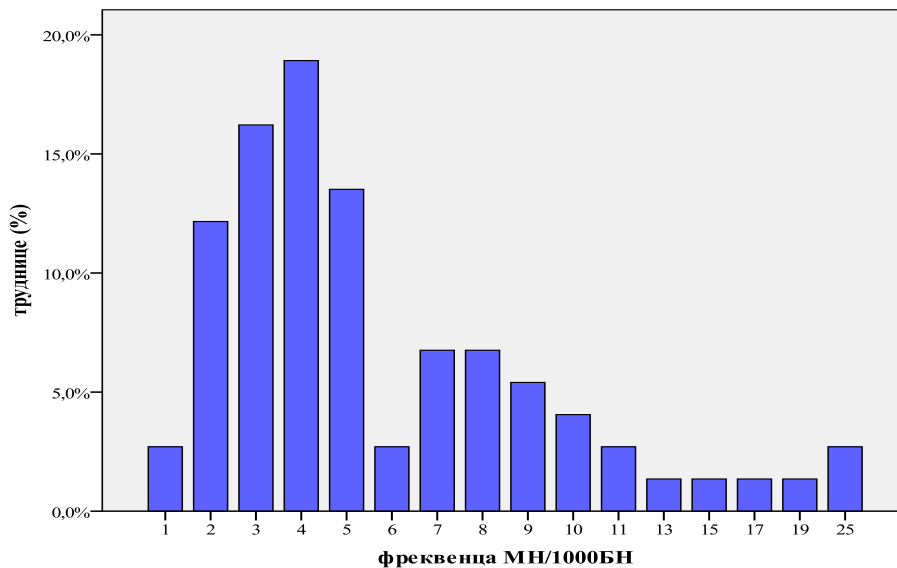
#### 4.5.2 Базалне вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће у целој испитиваној популацији трудница

Просечна вредност фреквенце МН за целокупну испитивану популацију (n=74) износила је  $6,09 \pm 4,781$  МН/1000БН, с медијаном од 4,5 МН/1000БН, измерним опсегом између 1 и 25 МН/1000БН и интерквartilним опсегом између 3-8 МН/1000БН, (Табела 9, Графикон 9).

**Табела 9.** Вредности цитогенетичких биомаркера у испитиваној популацији трудница у првом триместру гестације, на почетку студије, пре укључивања антикоагулантне терапије

Цитогенетички биомаркери (I триместар гестације)	Труднице (обе кохорте)	Перцентили		
		25.	50. (Med)	75.
<b>МН/1000БН</b> (X±SD)( min-max)	6,09±4,781 (1-25)	3	4,5	8
<b>НПМ/1000БН</b> (X±SD)(min-max)	1,19±0,855 (0-3)	0,75	1	2
<b>НП/1000БН</b> (X±SD)(min-max)	0,97±1,020 (0-4)	0	1	1

X – средња вредност, SD – стандардна девијација, Med – медијана



**Графикон 9.** Дистрибуција вредности базалних МН фреквенци у испитиваној популацији трудница (n=74) (популација обухвата труднице из обе кохорте)

Измерене вредности фреквенци за НПМ ( $1,19 \pm 0,855$ ) и НП ( $0,97 \pm 1,020$ ) биле су ниже него вредности за фреквенце МН. Опсег измерених вредности, медијана и интерквartilни опсег за фреквенце НПМ и НП приказане су у Табели 9.

#### **4.4.3 Базалне вредности цитогеничких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће у испитиваним кохортама**

Средње вредности фреквенци МН/1000БН, фреквенци НПМ/1000БН и фреквенци НП/1000БН у групи трудница с тромбофилијом на почетку трудноће, пре увођења антикоагуланте терапије (LMWH) и у групи здравих трудница приказане су у Табели 10.

Међугрупна анализа је показала статистички значајну разлику у измереним вредностима фреквенци МН између трудница с тромбофилијом и здравих трудница (*Man Withney U* тест;  $p < 0,05$ ), (Табела 10, Графикон 10). Средњи ранг (енгл. *mean rank*) за фреквенцу МН/1000 БН у групи трудница с тромбофилијом био је виши и износио је 53,19, у односу на групу трудница које немају тромбофилију и који је износио 21,81.

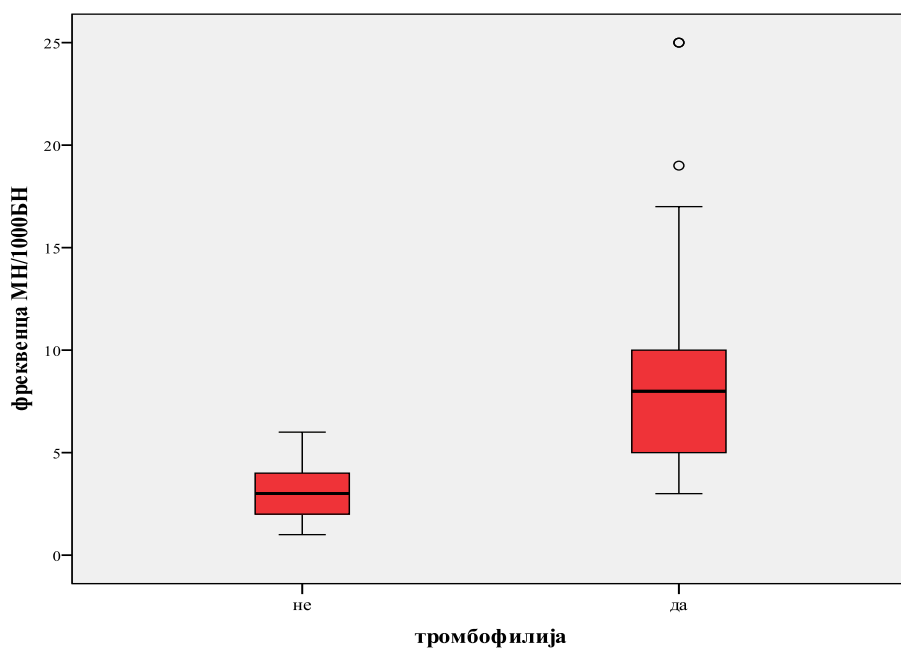
На исти начин извршена је међугрупна анализа која је показала статистички значајну разлику у измереним вредностима осталих цитогеничких биомаркера (НПМ и НП) између трудница с тромбофилијом и здравих трудница (*Man Withney U* теста;  $p < 0,05$ ), (Табела 10, Графикон 11 и Графикон 12). *Mean rank* за фреквенцу НПМ у групи трудница с тромбофилијом је био виши и износио је 46,95, у односу на групу трудница које немају тромбофилију од 28,05, док је *Mean rank* за НП у групи трудница с тромбофилијом био 42,80, у односу на групу трудница које немају тромбофилију од 32,20.

Средње вредности сва три цитогеничка биомаркера у групи трудница с тромбофилијом на почетку трудноће, а пре примене антикоагулантне терапије биле су значајно више у односу на здраве труднице (Табела 10).

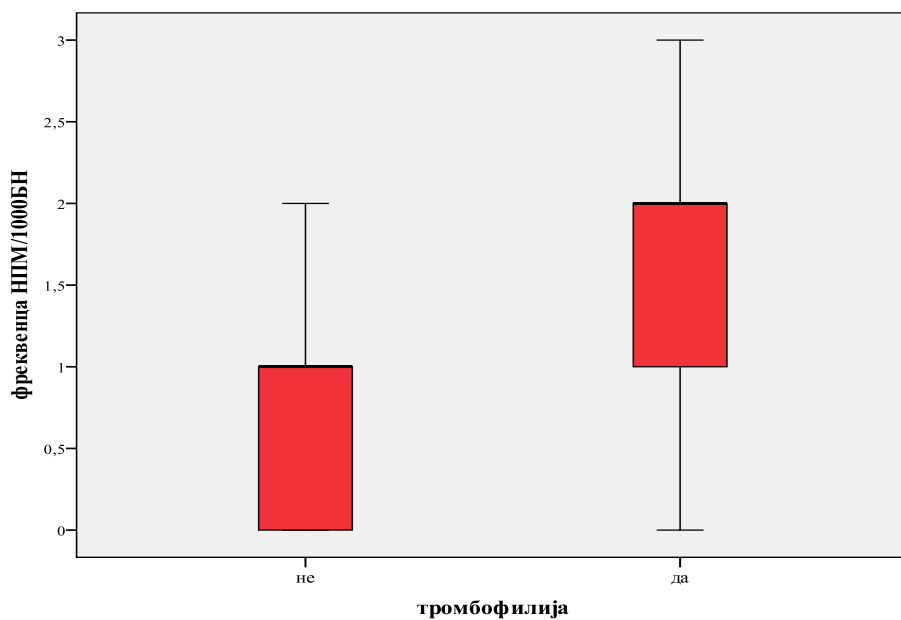
**Табела 10.** Међугрупна разлика у измереним вредностима фреквенци цитогенетичких биомаркер (МН,НПМ,НП) у испитиваној популацији трудница на почетку трудноће

Цитогенетички биомаркери ( I триместар гестације)	Труднице		Значајност
	тромбофилија	здраве	
<b>МН</b> (X±SD)(Med; min-max)	8,920 ± 5,335 (8; 3-25)	3,270 ± 1,217 (3;1-6)	<sup>a</sup> p=0,000*
<b>НПМ</b> (X±SD)( Med; min-max)	1,590 ± 0,762 (2; 0-3)	0,790 ± 0,755 (1; 0-2)	<sup>a</sup> p=0,000*
<b>НП</b> (X±SD)( Med; min-max)	1,270 ± 1,170 (1; 0-4)	0,680 ± 1,170 (1; 0-2)	<sup>a</sup> p=0,024*

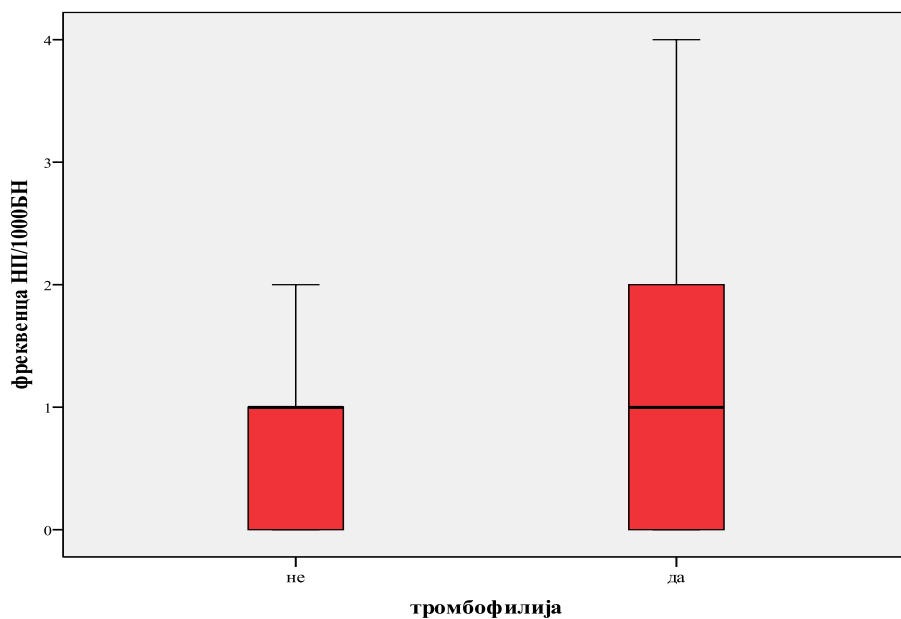
\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; X – средња вредност, SD стандардна девијација. Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности



**Графикон 10.** Правоугаоним дијаграмом представљене статистички значајне разлике у фреквенци МН у две кохорте (са и без тромбофилије)



**Графикон 11.** Правоугаоним дијаграмом представљене статистички разлике у фреквенци НПМ у две кохорте (са и без тромбофилије)



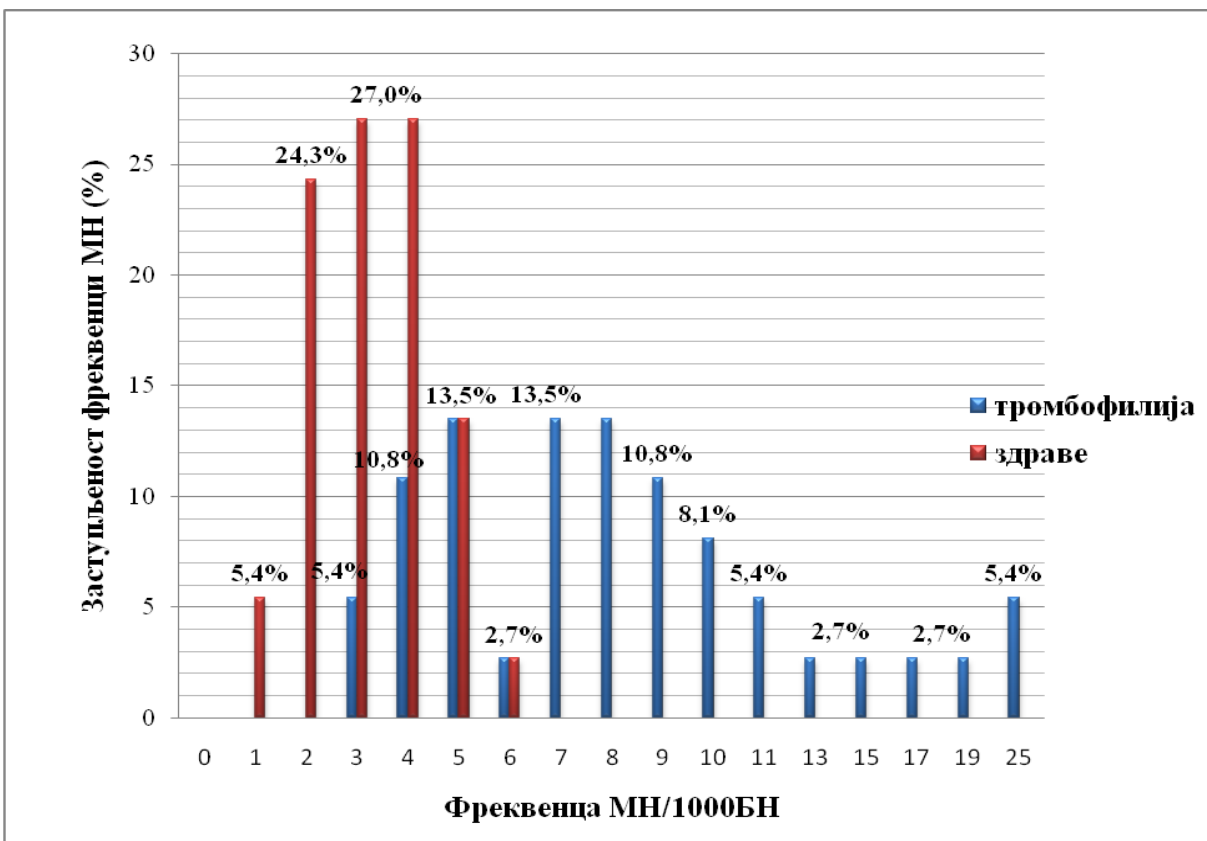
**Графикон 12.** Правоугаоним дијаграмом представљене статистички разлике у фреквенци НП у две кохорте (са и без тромбофилије)

#### 4.5.4 Дистрибуција цитогентичких биомаркера (МН, НПМ и НП) на почетку трудноће

На почетку трудноће пре укључивања LMWH у групи трудница с тромбофилијом уочена је појава МН код свих трудница са опсегом између 3 и 25 измерених МН/1000БН, с медијаном од 8МН/1000БН и инерквартилним опсегом 5-10 МН/1000БН. Појава НПМ уочена је код 34 труднице. Опсег измерених вредности се кретао од 0-3 НПМ/1000 БН, медијана је износила 2 НПМ/1000БН, а инерквартилни опсег 1-2 НПМ/1000БН, док су НП уочени код 24 труднице, са опсегом измерених вредности од 0-4 НП/1000БН, медијаном од 1 НП/1000БН и инерквартилним опсегом 0-2 НП/1000БН (Табеле 8 и 10, Графיקони 10, 11 и 12).

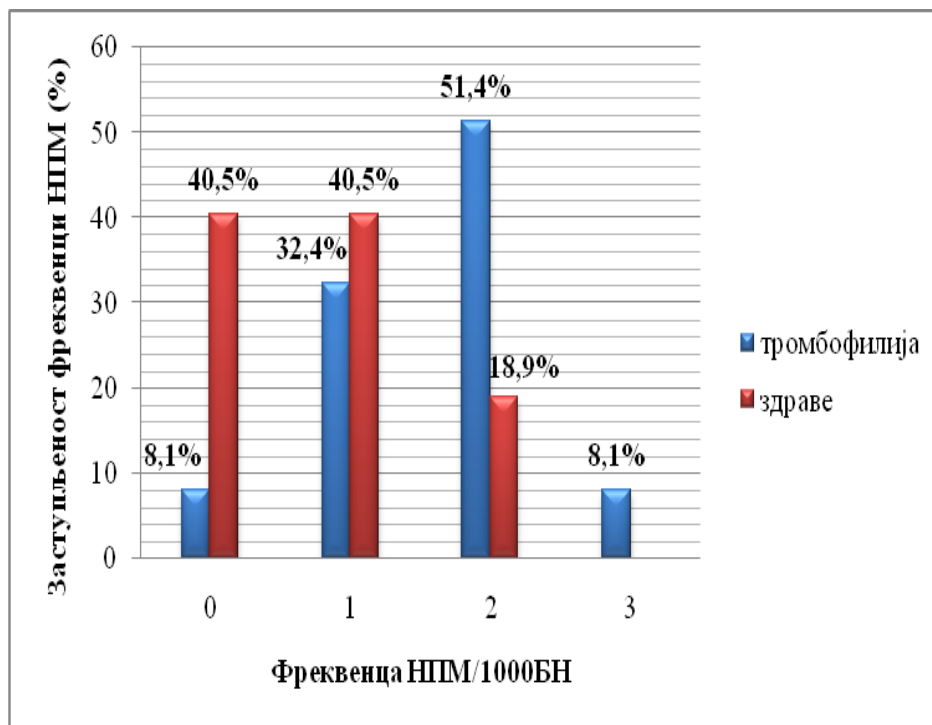
У групи здравих трудница на почетку трудноће појава МН уочена је код свих трудница са измереним опсегом од 1 до 6 МН/1000БН, са медијаном од 3 МН/1000БН, инерквартилним опсегом 2-4 МН/1000БН, НПМ су уочени код 22 труднице са опсегом од 0-2 НПМ/1000БН, са медијаном од 1 НПМ/1000БН, интерквартилним опсегом од 0-1, док су НП уочени код 19 трудница са измереним опсегом од 0-2 НП/1000БН, медијаном од 1 НП/1000БН и инерквартилним опсегом 0-1 НП/1000БН, (Табела 7 и 10, Графיקони 10, 11 и 12).

Труднице с тромбофилијом имале су чешћу заступљеност виших МН фреквенци у односу на здраве труднице. Најчешће фреквенце су биле 5 МН/1000БН, 7 МН/1000БН и 8 МН/1000БН са по 13,5% (по пет испитаница). Друге по учесталости биле су фреквенце од 4 МН/1000БН и 9 МН/1000БН са по 10,8% (по четири испитаница). У групи здравих трудница забележене су ниже фреквенце са пиковима на 3 МН/1000БН и 4 МН/1000БН и заступљеношћу од 27,0% за сваку фреквенцу (по 10 испитаница). Друга по учесталост била је фреквенца од 2 МН/1000БН код 24,3% (девет) здравих трудница (Графикон 13).



Графикон 13. Процентна заступљеност МН фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће

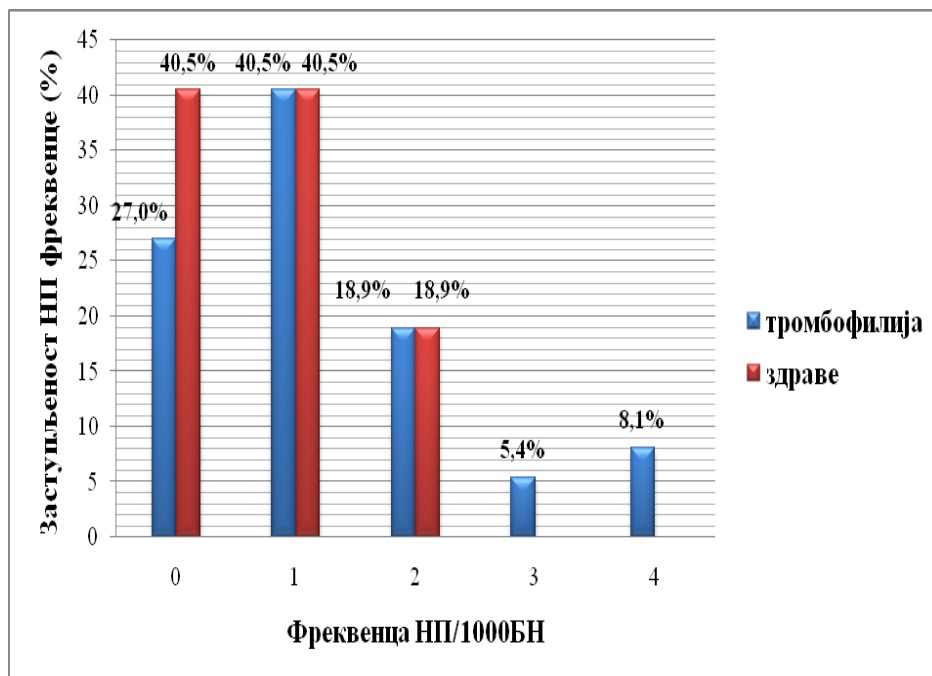
На почетку трудноће 51,4% (19) трудница с тромбофилијом имало је фреквенцу од 2 НПМ/1000БН. Само у овој групи била је заступљена фреквенца од 3 НПМ/1000БН код 8,1% (три) трудница. Код 40,5% (15) здравих и 8,1% (три) труднице с тромбофилијом није регистровано присуство НПМ. Високо заступљена фреквенца од 1 НПМ/1000БН регистрована је код 40,5% (15) здравих трудница (Графикон 14).



**Графикон 14.** Процентна заступљеност НПМ фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће

Подједнака заступљеност од 40,5% бележи се у обе групе трудница за фреквенцу од 1НП/1000БН. Петнаест здравих трудница (40,5%) и њих 10 (27,0%) с тромбофилијом није имало НП. Фреквенце од 3 НП/1000БН (5,4%) и 4 НП/1000БН (8,1%) забележене су само у групи с тромбофилијом (Графикон 15).





Графикон 15. Процентна заступљеност НП фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће

#### 4.5.5 Утицај присуства тромбоза, крвних група, животних навика, оптерећене акушерске и породичне анамнезе на цитогенетичке биомаркере на почетку трудноћа

Код трудница с тромбофилијом уочено је да средња вредност фреквенци МН/1000БН статистички значајно виша код трудница које су имале оптерећену акушерску анамнезу спонтаним побачајима, већи индекс телесне масе ( $BMI \geq 24,99$ ) и крвне групе различите од О (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ , Табела 11). У групи с тромбофилијом уочене су значајно више средње вредности фреквенце НП код трудница које су биле пушачи пре трудноће у односу на жене које нису пушиле (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ , Табела 11). Здраве труднице које су користиле дуван и конзумирале алкохол у трудноћи имале се значајно више средње вредности фреквенци МН, као и више средње вредности фреквенци НП (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ , Табела 11). Статистички виша фреквенца МН у групи здравих трудница утврђена је код испитаница које имају рођаке оболеле од карцинома, док је виша фреквенца НПМ утврђена код испитаница које имају рођаке оболеле од дијабетеса тип 1 (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ , Табела 12).

**Табела 11.** Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП/1000БН у зависности од демографских карактеристика, претходних тромбоза и исхода трудноћа, као и животних навика у групама трудница у првом триместру гестације

		Труднице са тромбофилијом			Здраве труднице		
		МН (X±SD)	НПМ (X±SD)	НП (X±SD)	МН (X±SD)	НПМ (X±SD)	НП (X±SD)
		(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)
<b>Тромбозе</b>	Да	6,00±4,41 (6; 5-7)	1,50±0,70 (1,5; 1-2)	1,50±0,71 (1,5; 1-2)	-	-	-
	Не	9,09±5,46 (8; 3-25)	1,60±0,77 (2; 0-3)	1,26±1,20 (1; 0-4)	3,29±1,22 (3; 1-6)	0,79±0,75 (1; 0-2)	0,68±0,75 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,396</b>	<b>0,817</b>	<b>0,589</b>	-	-	-
<b>Спонтани побачаји</b>	Да	13,0±6,38 (13; 3-25)	1,57±0,77 (2; 0-3)	1,20±0,07 (1; 0-4)	3,67±1,36 (3,5; 2-6)	1,33±0,82 (1,5; 0-2)	0,50± 0,55 (0,5; 0-1)
	Не	7,97±4,56 (7,5; 5-25)	1,71±0,76 (2; 1-3)	1,57±1,27 (1; 0-4)	3,19±1,20 (3; 1-5)	0,69±0,71 (1; 0-2)	0,71± 0,78 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,049*</b>	<b>0,805</b>	<b>0,435</b>	<b>0,533</b>	<b>0,096</b>	<b>0,673</b>
<b>FMU</b>	Да	8,00±3,46 (7; 5-13)	1,50±1,00 (2; 0-2)	1,50±0,58 (1,5; 2-1)	-	-	-
	Не	9,03±5,46 (8; 3-25)	1,61±0,75 (2; 0-3)	1,24±1,27 (1; 0-4)	3,27± 1,22 (3; 1-6)	0,79±0,76 (1; 0-2)	0,68±0,75 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,832</b>	<b>0,981</b>	<b>0,407</b>	-	-	-
<b>Пушење пре</b>	Да	9,93±5,85 (8,5; 25-3)	1,43±0,85 (1,5; 0-3)	1,79±1,25 (1; 0-4)	3,64±1,22 (4; 1-5)	0,79±0,70 (1; 0-2)	0,79±0,89 (0,5; 0-2)
	Не	8,30±5,03 (7; 25-3)	1,70±0,70 (2; 0-3)	0,96±1,02 (1; 0-4)	3,04±1,18 (3; 1-6)	0,80±0,80 (1; 0-2)	0,61±0,66 (1; 0-2)

<b>трудноће</b>	<sup>a</sup> p	<b>0,257</b>	<b>0,377</b>	<b>0,049*</b>	<b>0,115</b>	<b>0,988</b>	<b>0,676</b>
<b>Пушење</b>	Да	9,11±4,62 (8; 3-19)	1,33±1,00 (1; 0-3)	1,44±1,24 (1; 0-4)	3,80±1,64 (4; 1-5)	0,60±0,55 (1; 0-1)	1,40±0,55 (1; 1-2)
	Не	8,86±5,62 (7; 2-25)	1,68±0,60 (2; 0-3)	1,21±1,17 (1; 0-4)	3,19±1,15 (3; 1-6)	0,82±0,78 (1; 0-2)	0,56±0,72 (0; 0-2)
<b>у трудноћи</b>	<sup>a</sup> p	<b>0,589</b>	<b>0,336</b>	<b>0,689</b>	<b>0,230</b>	<b>0,620</b>	<b>0,028*</b>
<b>Алкохол у</b>	Да	8,80±5,85 (7; 5-19)	1,20±0,88 (1; 0-2)	0,80±0,45 (1; 0-1)	5,00±0,00 (5; 0-5)	1,00±1,41 (1; 0-2)	1,00±1,41 (1; 0-2)
	Не	8,94±5,35 (8; 3-25)	1,66±0,74 (2; 0-3)	1,34±1,23 (1; 0-4)	3,17± 1,17 (3; 1-6)	0,81±0,72 (1; 0-2)	0,66±0,72 (1; 0-2)
<b>трудноћи</b>	<sup>a</sup> p	<b>0,780</b>	<b>0,307</b>	<b>0,449</b>	<b>0,036*</b>	<b>0,631</b>	<b>0,721</b>
<b>ВМI kg/m<sup>2</sup></b>	<24, 99	7,93±4,54 (7; 3-25)	1,69±0,71 (2; 0-3)	1,14±1,09 (1; 0-4)	3,00±1,16 (3; 1-5)	0,65±0,75 (0,50; 0-2)	0,69±0,74 (1; 0-2)
	≥24, 99	12,50±6,72 (10; 5-25)	1,25±,89 (1; 0-3)	1,75±1,39 (1; 0-4)	3,91±1,37 (2; 4-6)	1,12±0,70 (1; 0-2)	0,64±0,81 (0; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,035*</b>	<b>0,128</b>	<b>0,299</b>	<b>0,051</b>	<b>0,087</b>	<b>0,806</b>
<b>„Non O“ крвне групе</b>	Да	9,61±5,55 (8; 3-25)	1,58±0,72 (2; 0-3)	1,35±1,20 (1; 0-4)	3,06±1,16 (3; 1-5)	0,83±0,77 (1; 0-2)	0,67±0,67 (0; 0-2)
	Не	5,33±1,37 (5; 4-7)	1,67±1,03 (2; 0-3)	0,83±0,98 (0,5; 0-2)	3,47±1,26 (3; 1-6)	0,75±0,74 (1; 0-2)	0,68±0,67 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,017*</b>	<b>0,733</b>	<b>0,385</b>	<b>0,343</b>	<b>0,822</b>	<b>0,799</b>

Вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) су представљене као средње вредности ± стандардно одступање, медијана и опсег у коме су се вредности кретале; \* статистички значајна разлика ; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; интраутерусна смрт плода - (*fetus mortus in utero* – FMU)

**Табела 12.** Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП у зависности од оптерећене породичне анамнезе обољевања од карцинома, коронарих болести, тромбоза, инфаркта, дијабетеса тип 1 и дијабетеса тип 2

		Труднице са тромбофилијом			Здраве труднице		
		МН (X±SD)	НПМ (X±SD)	НП (X±SD)	МН (X±SD)	НПМ (X±SD)	НП (X±SD)
		(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)
<b>Карцином код рођака</b>	Да	10,50±7,21 (8,5; 4-25)	1,63±0,52 (2; 1-2)	2,00±0,76 (2; 1-3)	4,43±0,54 (4; 4-5)	0,86±0,90 (1; 0-2)	0,29±0,75 (1; 0-2)
	Не	8,62±4,99 (7,5; 3-25)	1,50±0,81 (1,5; 0-3)	1,08±1,23 (1; 0-4)	3,00 ± 1,17 (3; 1-6)	0,78±0,73 (1; 0-2)	0,77±0,73 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,574</b>	<b>0,957</b>	<b>0,012*</b>	<b>0,020*</b>	<b>0,894</b>	<b>0,109</b>
<b>Коронарна обољења код рођака</b>	Да	8,91±5,99 (8; 3-25)	1,27±0,65 (1; 0-2)	1,09±1,30 (1; 0-4)	3,00±1,19 (3,5; 1-4)	0,88±0,83 (1; 0-2)	0,50±0,76 (0; 0-2)
	Не	9,13±5,39 (8; 3-25)	1,65±0,77 (2; 0-3)	1,39±1,16 (1; 0-4)	3,34±1,23 (3; 1-6)	0,77± 0,75 (1; 0-2)	0,72±0,75 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,832</b>	<b>0,101</b>	<b>0,366</b>	<b>0,625</b>	<b>0,786</b>	<b>0,479</b>
<b>Инфаркт рођаци</b>	Да	9,22±7,23 (7; 3-25)	1,33±0,71 (1; 0-2)	1,00±1,00 (1; 0-3)	2,50±0,71 (3; 1-6)	1,00±1,41 (1; 0-2)	0,00
	Не	8,82±4,79 (8; 3-25)	1,68±0,77 (2; 0-3)	1,36±1,22 (1; 0-4)	3,31±1,23 (2,5; 2-3)	0,78±0,75 (1; 0-2)	0,71±0,75 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,566</b>	<b>0,286</b>	<b>0,497</b>	<b>0,363</b>	<b>0,817</b>	<b>0,243</b>

<b>Рођаци тромбозе</b>	Да	8,85±6,30 (7; 3-25)	1,54±0,66 (2; 0-2)	1,15±0,90 (1; 0-3)	3,50±0,71 (3,5; 1-4)	1,50±0,50(1,5; 1-2)	0,00
	Не	8,96±4,88 (8; 3-25)	1,63±0,82 (2; 0-3)	1,33±1,31 (1; 0-4)	3,26±1,25 (3; 1-6)	0,75±0,75 (1; 0-2)	0,71±0,75 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,441</b>	<b>0,737</b>	<b>0,275</b>	<b>0,769</b>	<b>0,243</b>	<b>0,243</b>
<b>Дијабетес тип 1 рођаци</b>	Да	8,33±3,05 (9; 5-11)	1,33±1,15 (2; 0-2)	1,33±1,15 (2; 0-2)	2,50±0,71 (2,5; 2-3)	2,00±0,00 (2; 0-2)	0,50±0,71 (0,5; 0-1)
	Не	9,13±5,71 (8; 3-25)	1,55±0,72 (2; 0-3)	1,29±1,22 (1; 0-4)	3,31±1,23 (3; 1-6)	0,72±0,72 (1; 0-2)	0,69±0,76 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,775</b>	<b>0,909</b>	<b>0,775</b>	<b>0,363</b>	<b>0,036*</b>	<b>0,817</b>
<b>Дијабетес тип 2 рођаци</b>	Да	9,43±7,55 (7; 4-25)	1,43±0,79 (2; 0-2)	1,00±1,00 (1; 0-3)	3,00±0,00 (3; 0-3)	1,50±0,71 (1,5; 1-2)	0,50±0,71 (0,5; 0-1)
	Не	8,80±4,84 (8; 3-25)	1,63±0,76 (2; 0-3)	1,33±1,21 (1; 0-4)	3,29±1,25 (3; 1-6)	0,75±0,75 (1; 0-2)	0,69±0,76 (1; 0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,662</b>	<b>0,662</b>	<b>0,531</b>	<b>0,769</b>	<b>0,243</b>	<b>0,817</b>

Вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) су представљене као средње вредности ± стандардно одступање, медијана и опсег у коме су се вредности кретале; \* статистички значајна разлика ; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест;

#### 4.5.6 Корелација фактора присутних пре актуелне трудноће с присуством тромбофилије

Како смо нашли да су фреквенце сва три цитогенетичка биомаркера виша у групи трудница с тромбофилијом на почетку трудноће, а пре увођења антикоагулантне терапије, испитивали смо међусобни однос присуства тромбофилије и већег броја параметара присутних код свих трудница у студији пре актуелне трудноће и узорковања крви. Испитивали смо корелацију тромбофилије с присуством тромбоза, спонтаних побачаја и FMU; с пушењем цигарета пре и у трудноћи, конзумацијом алкохола у трудноћи, ВМІ, „non O“ крвном групом; присуством карцинома, тромбоза, коронарних болести, инфаркта, дијабетеса тип 1 и дијабетеса тип 2 код рођака. У Табели 13 приказани су само статистички значајни фактори који су у корелацији са болешћу (Спирманова корелација ранга ( $\rho$ ),  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

Из добијених резултата може се уочити позитивна корелација испитиваних фактора ризика с присуством тромбофилије, и према Кохеновим смерницама за утврђивање јачине везе, показана је повезаност средње јачине између фактора ризика: спонтаних побачаја ( $\rho = 0,649$ ), броја спонтаних побачаја ( $\rho = 0,641$ ), тромбоза код рођака ( $\rho = 0,703$ ) с присуством тромбофилије у испитиваној популацији (Табела 13).

**Табела 13.** Корелација тромбофилије са факторима присутним пре актуелне трудноће

Испитивани фактори ризика	Присуство тромбофилије	
	$\rho$	значајност
Спонтани побачаји (да / не)	0,649**	0,000
Спонтани категорије (0 или 1 / $2 \geq$ )	0,316**	0,006
Број спонтаних побачаја (0, 1, 2, 3 $\geq$ )	0,641**	0,000
FMU (да / не)	0,239*	0,040
Број FMU (0,1)	0,239*	0,040
Трудноћа по реду (1., 2., 3., 4 $\geq$ )	0,423**	0,000
Тромбоза рођаци (да / не)	0,703**	0,000
Тромбоза рођаци (сродство)	0,459**	0,000
Инфаркт рођаци (да / не)	0,370**	0,001
Инфаркт сродство	0,268*	0,021

Спирманова корелација ранга;  $\rho$  - Спирманов коефицијент корелације; \* статистичка значајност корелације за  $p < 0,01$ , \*\* статистичка значајност корелације за  $p < 0,05$ ; интраутерусна смрт плода - (*fetus mortus in utero* – FMU)

#### 4.5.7 Корелација фактора присутних пре актуелне трудноће с присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП)

Базална фреквенца цитогенетичких биомаркера у првом триместру трудноће показала је статистички значајну повезаност с већим бројем фактора везаних за личну и породичну анамнезу (Табела 14). У Табели 14 приказани су само статистички значајни фактори који су у корелацији са појединачним цитогенетичким биомаркерима (Спирманова корелација ранга ( $\rho$ ),  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

**Табела 14.** Корелација базалних фреквенци МН, НПМ, НП у првом триместру гестације с различитим факторима ризика

Испитивани фактори ризика	МН		НПМ		НП	
	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност
Дијагностикованатромбофилија	0,740**	0,000	0,466**	0,000	0,263*	0,023
Трудноћа по реду (1., 2., 3., 4≥)	0,289*	0,012	0,299**	0,010	-	-
Спонтани побачаји (да / не)	0,421**	0,000	0,390**	0,001	-	-
Број спонтаних побачаја (0, 1, 2, 3≥)	0,400**	0,000	0,386**	0,001	-	-
Пушење у трудноћи (да / не)					0,243*	0,037
Број цигарета у трудноћи (0, 1-9, 10-19)					0,245*	0,035
Број цигарета пре трудноће (0, 1-9, 10-19, 20-29)	-	-	-0,283*	0,015	-	-
Тромбоза рођаци (сродство)	0,312*	0,007	-	-	-	-
Тромбоза рођаци (да/не)	-	-	-	-	-0,315**	0,006
Образовање (основно, средње, више, високо)	-	-	-	-	-0,343**	0,003
„поп О“ крвне групе	-0,277*	0,017				

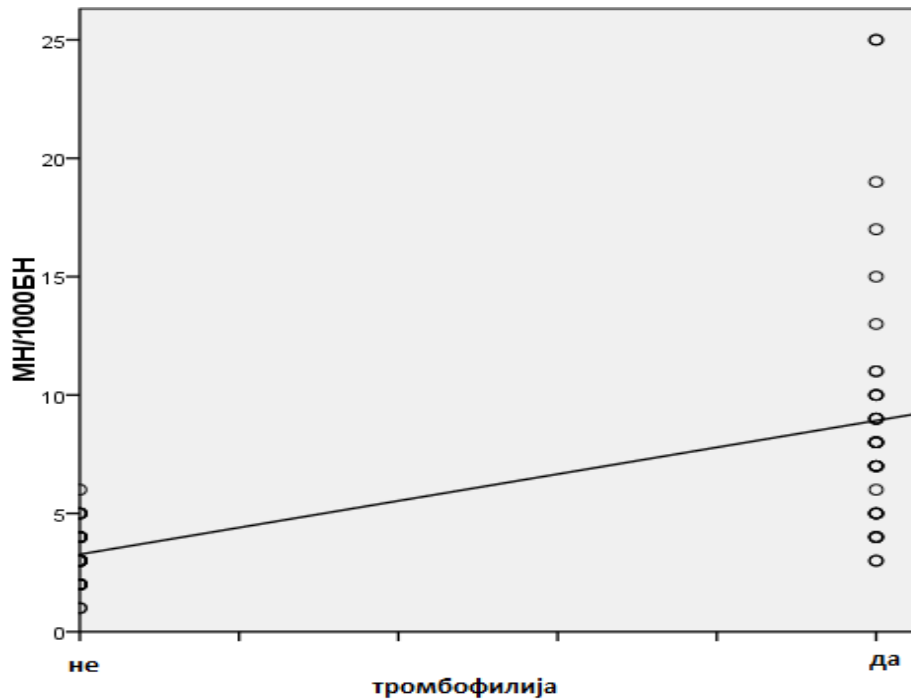
Спирманова корелација ранга;  $\rho$  - Сприманов коефицијент корелације; „поп О“ –крвне групе А, В и АВ; \* статистичка значајност корелације за  $p < 0,01$ , \*\* статистичка значајност корелације за  $p < 0,05$ ;



У испитиваној популацији уочена је статистички значајна позитивна повезаност присуства тромбофилије и фреквенци сва три цитогенетичка биомаркера (МН, НПМ и НП). Корелационом анализом, према Кохеновим смерницама за утврђивање јачине везе, нађена је јака веза тромбофилије и МН ( $p < 0,01$ ), веза средње јачине са НПМ ( $p < 0,01$ ), док је веза са НП слабе јачине ( $p < 0,05$ , Табела 14). Спонтани побачаји и њихов број су у значајној позитивној вези, средње јачине с фреквенцом МН и НПМ у крви трудница у испитиваној групи ( $p < 0,01$ , Табела 14). Степен сродства са рођацима оболелим од тромбоза, „поп О“ крвна група и фреквенца МН су у значајној позитивној вези, средње јачине ( $p < 0,05$ , Табела 14). Повезаност средње јачине показали су претходни спонтани побачаји и њихов број с фреквенцом НПМ ( $p < 0,01$ ) (табела 14). Остали статистички значајно повезани фактори с присуством цитогенетичких биомаркер у првом триместру гестације приказани су у Табели 14.

#### **4.5.8 Предиктори базалних фреквенци микронуклеуса, нуклеоплазматских мостова и нуклеотидних пупољака на почетку трудноће**

Униваријантном линеарном регресионом анализом за целокупну испитивану популацију трудница издвојени су значајни предиктори фреквенце микронуклеуса: тромбофилија ( $p = 0,000$ ), претходни спонтани побачаји ( $p = 0,042$ ) и „поп О“ крвне групе ( $p = 0,008$ ). У испитиваној популацији трудница постоји линеарна повезаност између значајних предиктора и фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви (Табела 15, Графикон 16).



**Графикон 16.** Дијаграм линеарне регресије тромбофилије и фреквенце МН. Једначина регресионе праве ( $y = 3,270 + 5,649 \cdot x$ ) добијена методом најмањих квадрата

На основу коригованих коефицијента детерминације (*Adjusted R Square*) у униваријантним моделима закључујемо да се 34,5% индивидуалних разлика у фреквенци МН у испитиваној популацији може објаснити присуством тромбофилије, 4,3% бројем спонтаних побачаја и 0,8% присуством крвних група различитих од О (Табела 15).

Мултиваријантна линеарна регресиона анализа фактора који су статистички значајни у униваријантном моделу показала је на основу F вредност у ANOVA тесту ( $F(3,70)=15,444$ ,  $p<0,05$ ) добро предвиђање фреквенце МН. На основу комбинације три значајна предиктора (тромбофилије, присуства спонтаних побачаја у претходним трудноћама и крвних група различитих од О) можемо да предвидимо 37,2% индивидуалне варијабилности у фреквенци МН у посматраној популацији (Табела 15). Из добијених резултата уочава се да је присуство тромбофилије једина статистички значајна предикторска варијабла у објашењу варијабилитета у МН фреквенци (Табела 15).

**Табела 15.** Посматрани фактори ризика као предиктори вредности фреквенци микронуклеуса (МН/1000БН) добијени линеарном регресионом анализом (униваријантном и мултиваријантном)

Посматрани фактори ризика	Униваријантна анализа				Мултиваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted R <sup>2</sup>	p	#B	SE	p	#Adjusted R <sup>2</sup>
<b>Тромбофилија</b>	5,649	0,900	0,345	0,000*	6,851	1,245	0,000*	<b>0,372</b>
<b>Спонтани побачаји</b>	2,250	1,088	0,043	0,042*	-2,272	1,176	0,057	
<b>Број спонтаних побачаја</b>	1,039	0,695	0,017	0,139				
<b>Трудноћа по реду</b>	0,202	0,553	-0,012	0,716				
<b>Тромбозе рођаци (сродство)</b>	0,786	0,456	0,027	0,088				
<b>„поп О“ крвне групе</b>	-3,051	1,116	0,082	0,008*	-0,836	0,996	0,404	

\*статистички значајно; B – нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка, #B – парцијални регресиони коефицијент; Adjusted R<sup>2</sup> – кориговани коефицијент детерминације; # Adjusted R<sup>2</sup> – кориговани коефицијент детерминације два предиктора: тромбофилија и спонтани побачаји; p – статистичка значајност

Мултиваријантна линеарна регресиона анализа значајних предиктора НПМ добијених униваријантном анализом (Табела 16) показала је да наш модел добро предвиђа зависну променљиву – фреквенцу НПМ на почетку трудноће (ANOVA тест, F(4.69)=5,265, p<0,05). Вишеструком линеарном анализом статистички значајних фактора може се

предвидети око 19% индивидуалне варијабилности у фреквенци НПМ и овим моделом само се тромбофилија издваја као значајан предиктор појаве НПМ код испитаница у студији (Табела 16).

**Табела 16.** Посматрани фактори ризика као предиктори вредности фреквенци нуклеоплазматских мостова ( НПМ/1000БН)

Посматрани фактори ризика	Униваријантна анализа				Мултиваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted R <sup>2</sup>	p	#B	SE	p	#Adjusted R <sup>2</sup>
Тромбофилија	0,802	0,176	0,212	0,000*	0,656	0,238	0,007*	
Спонтани побачаји	0,651	0,185	0,135	0,001*	0,007	0,373	0,632	
Број спонтаних побачаја	0,376	0,118	0,111	0,002*	0,017	0,252	0,947	<b>0,189</b>
Трудноћа по реду	0,227	0,095	0,060	0,020*	0,016	0,142	0,911	
Тромбозе рођаци	0,426	0,244	0,027	0,085				
Број цигарета пре трудноће	-0,066	0,211	-0,013	0,754				

\*статистички значајно; B – нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка, #B – парцијални регресиони коефицијент; Adjusted R<sup>2</sup> – кориговани коефицијент детерминације; # Adjusted R<sup>2</sup> – кориговани коефицијент детерминације у мултиваријантној анализи; p – значајност

У мултиваријантном моделу анализирани су статистички значајни предиктори НП добијени униваријантним моделом (Табела 17). Наш модел добро предвиђа фреквенцу НП на почетку трудноће (ANOVA тест даје F(2.71)=7,197, p<0,05). Комбинацијом ова два предиктора може се објаснити 14,5% индивидуалне варијабилности у фреквенци НП (Табела 17). Негативни предзнак регресионог коефицијента говори да је степен образовања

обрнуто пропорционалан фреквенци НП, док је присуство тромбофилије главни предиктор пораста фреквенце НП (Табела 17).

**Табела 17.** Посматрани фактори ризика као предиктори фреквенце НП (униваријантна и мултиваријантна анализа)

Посматрани фактори ризика	Униваријантна анализа				Мултиваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted $R^2$	p	<sup>#</sup> B	SE	p	<sup>#</sup> Adjusted $R^2$
<b>Тромбофилија</b>	0,595	0,228	0,073	0,011*	0,603	0,219	0,008*	<b>0,145</b>
<b>Тромбозе рођаци</b>	0,034	0,297	-0,014	0,909				
<b>Пушење у трудноћи (да/не)</b>	0,562	0,298	0,034	0,063				
<b>Број цигарета у трудноћи</b>	0,449	0,247	0,031	0,073				
<b>Образовање</b>	-0,310	0,124	0,067	0,015*	-0,315	0,119	0,010*	

\* статистички значајно; B – нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка, <sup>#</sup>B – парцијални регресиони коефицијент; Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације; <sup>#</sup>Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације у мултиваријантној анализи; p – значајност

Из добијених резултата закључује се да је тромбофилија најзначајнији предиктор и да највише доприноси варијанси цитогенетичких биомаркера (МН,НПМ,НП) у односу на остале испитиване факторе код трудница у студији. Униваријантном анализом запажено је да тромбофилија највише доприноси индивидуалној варијабилности фреквенце МН у односу на допринос варијанси НПМ и НП (34,5% vs. 21,2% vs. 7,3%, Табеле 15, 16 и 17).

## 4.6 Вредности цитогенетичких биомаркера у порођају и у крви неонатуса

### 4.6.1 Вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у порођају у испитиваним кохортама

Средње вредности фреквенци МН/1000БН, фреквенци НПМ/1000БН и фреквенци НП/1000БН у групи трудница с тромбофилијом и здравих трудница у порођају приказане су у Табели 18. Из добијених резултата истраживања може се запазити да средње вредности сва три цитогенетичка биомаркера нису биле статистички значајно различите између испитиваних кохорти трудница у порођају (*Mann Whitney U* тест;  $p > 0,05$ , Табела 18). Закључује се да је у обе кохорте испитиваних трудница у порођају хромозомска нестабилност била уједначена (Графикони 10, 11 и 12)

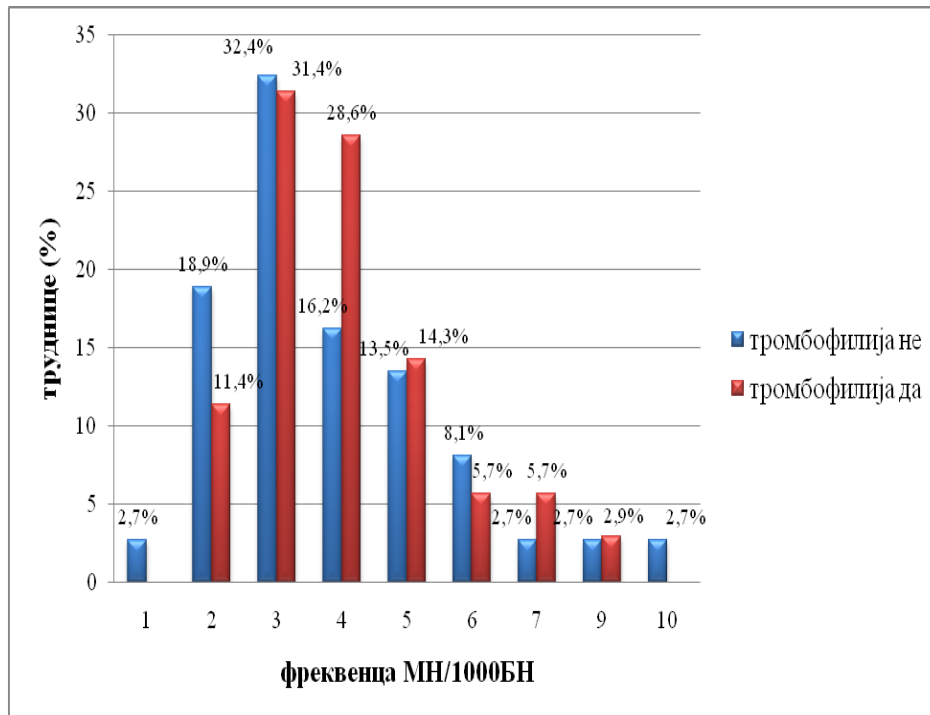
**Табела 18.** Средње вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) код испитиване популације трудница у порођају у две кохорте

Цитогенетички биомаркери у порођају	Труднице		Значајност
	тромбофилија	здраве	
МН (X±SD)(Med; min-max)	4,03 ± 1,562 (4; 2-9)	3,89 ± 1,941 (3; 1-10)	<sup>a</sup> p=0,442
НПМ (X±SD) (Med; min-max)	1,51 ± 1,245 (1; 0-4)	0,95 ± 0,911 (1; 0-3)	<sup>a</sup> p=0,056
НП (X±SD) (Med; min-max)	0,54 ± 0,657 (0; 0-2)	0,78 ± 1,109 (0; 0-4)	<sup>a</sup> p=0,633

\* статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности

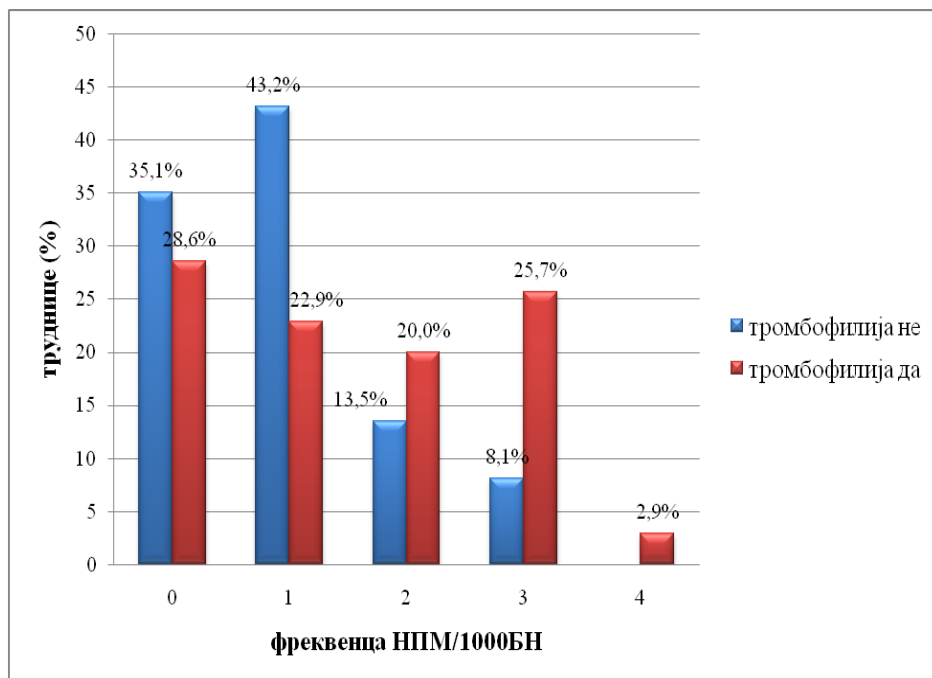
#### 4.6.2 Дистрибуција цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у порођају

Из измерених вредности цитогенетичких маркер запажа се да је опсег фреквенци МН код трудница с тромбофилијом у порођају ужи у односу на вредности пре увођења терапије (2-9 vs. 3-25)(Табеле 8 и 18), док је опсег фреквенци МН код здравих трудница у порођају шири него на почетку терапије (1-10 vs. 1-6, Табеле 7 и 18).



Графикон 17. Дистрибуција МН у испитиваним кохортама трудница у порођају

Појава МН уочена је код свих трудница у порођају. Најчешћа измерена МН фреквенца у обе кохорте је износила 3 МН/1000БН (32,4%, 31,4%, Графикон 17). У кохорти с тромбофилијом у порођају медијана МН фреквенце је износила 4 МН/1000БН, с интерквartilним опсегом 3-5 МН/1000БН, док је у кохорти здравих трудница у порођају медијана МН износила 3 МН/1000БН, са интерквartilним опсегом 3-5 МН/1000БН. Нетипичне вредности од 9МН и 10 МН присутне су код две труднице из здраве кохорте, а нетипична вредност од 9 МН забележена је код једне труднице с тромбофилијом.



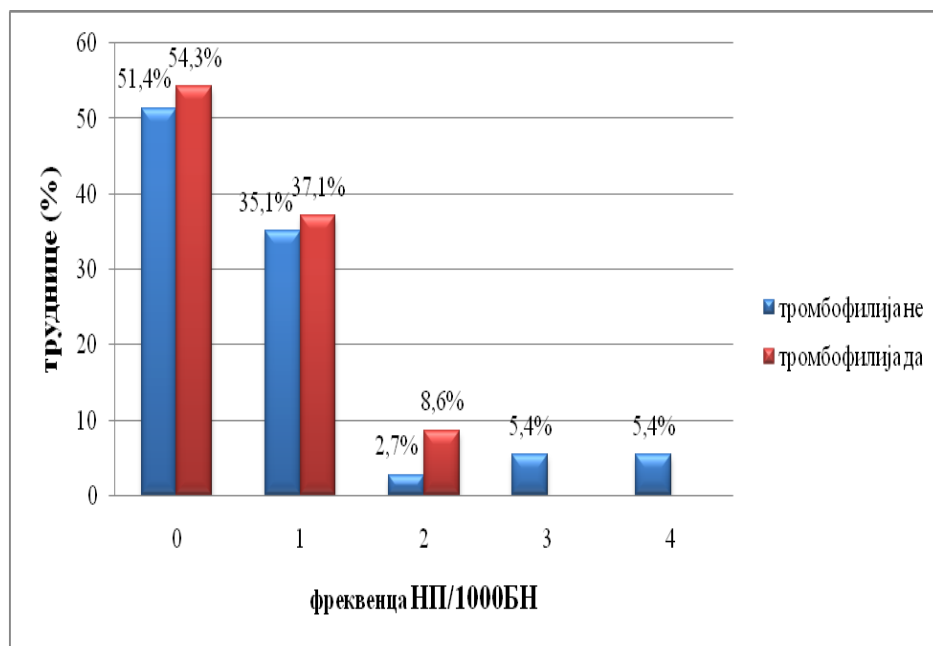
**Графикон 18.** Дистрибуција НПМ у испитиваним кохортама трудница у порођају

Фреквенца НПМ у порођају код здравих трудница се кретала од 0-3, а код трудница с тромбофилијом од 0-4 НПМ/1000БН. Фреквенца од 3 НПМ/1000БН нађена је код 25,7% (9/37) трудница с тромбофилијом, док је најчешћа измерена фреквенца од 1 НПМ/1000БН нађена код 43,2% (16/37) здравих трудница (Графикон 18). У кохорти с тромбофилијом у порођају медијана НПМ је износила 1 НПМ/1000БН са интерквartilним опсегом од 0-3 НПМ/1000БН, док је у кохорти здравих трудница у порођају медијана НПМ износила 0 НПМ/1000БН, са интерквartilним опсегом 0-1 НПМ/1000БН. Нетипична вредност од 3 НПМ забележена је код три здраве породиље.

У порођају код већине трудница није утврђено присуство НП (>50% у обе кохорте). Најчешће је забележена фреквенца од 1 НП/1000БН код обе кохорте трудница (тромбофилија: 37,1%, здраве труднице: 35,1%). Распон мерених НП фреквенци код трудница с тромбофилијом кретао се од 0-4, а код здравих од 0-2 НП/1000БН, (Графикон 19). У кохорти с тромбофилијом у порођају медијана за НП је износила 0 НП/1000БН, са интерквartilним опсегом од 0-1 НП/1000БН, док је у кохорти здравих испитаница у порођају медијана НП износила такође 0 НП/1000БН, са интерквartilним опсегом 0-1



НП/1000БН. Нетипичне вредности од 3 и 4 НП забележене су у здоровој кохорти код четири породиље (Графикон 19).



**Графикон 19.** Дистрибуција НП у испитиваним кохортама трудница у порођају

Из добијених резултата се види да је заступљеност вредности фреквенци цитогенетичких биомаркера слична код обе кохорте у порођају (Табела 18, Графикони 17-19).

#### 4.6.3 Вредности цитогенетички биомаркера у крви неонатуса

Вредности цитогенетичких биомаркера неонатуса мајки с тромбофилијом и здравих мајки нису се статистички разликовале (*Mann Whitney U* тест;  $p > 0,05$ , Табела 19).

**Табела 19.** Средње вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) код неонатуса

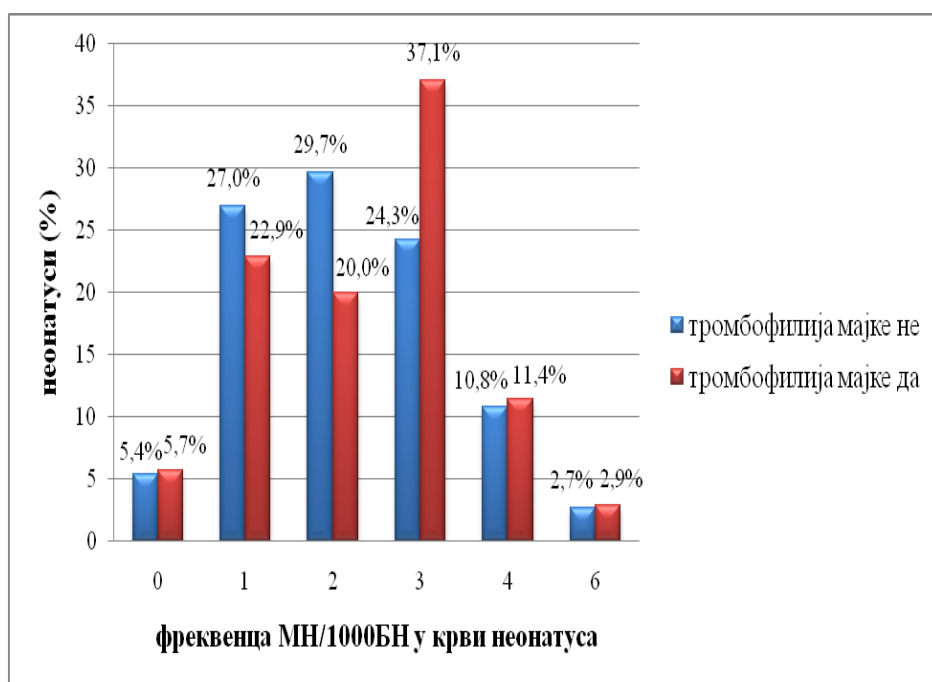
Цитогенетички биомаркери (неонатус)	Труднице-мајке		Значајност
	тромбофилија	здраве	
МН (X±SD) (Med; min-max)	2,371 ± 1,285 (3; 0-6)	2,189 ± 1,266 (2; 0-6)	<sup>a</sup> p=0,464
НПМ (X±SD) (Med; min-max)	0,543 ± 0,852 (0; 0-4)	0,459 ± 0,557 (0; 0-2)	<sup>a</sup> p=0,964
НП (X±SD) (Med; min-max)	0,333 ± 0,585 (0; 0-2)	0,459 ± 0,691 (0; 0-2)	<sup>a</sup> p=0,449

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; X – средња вредност, SD – стандардна девијација. Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности

Вредности медијана свих цитогенетичких биомаркера су биле на ниском нивоу (табела 19). Закључујемо да је у обе групе неонатуса хромозмска нестабилност била уједначено ниска.

#### 4.6.4 Дистрибуција цитогенетичких биомаркера код неонатуса

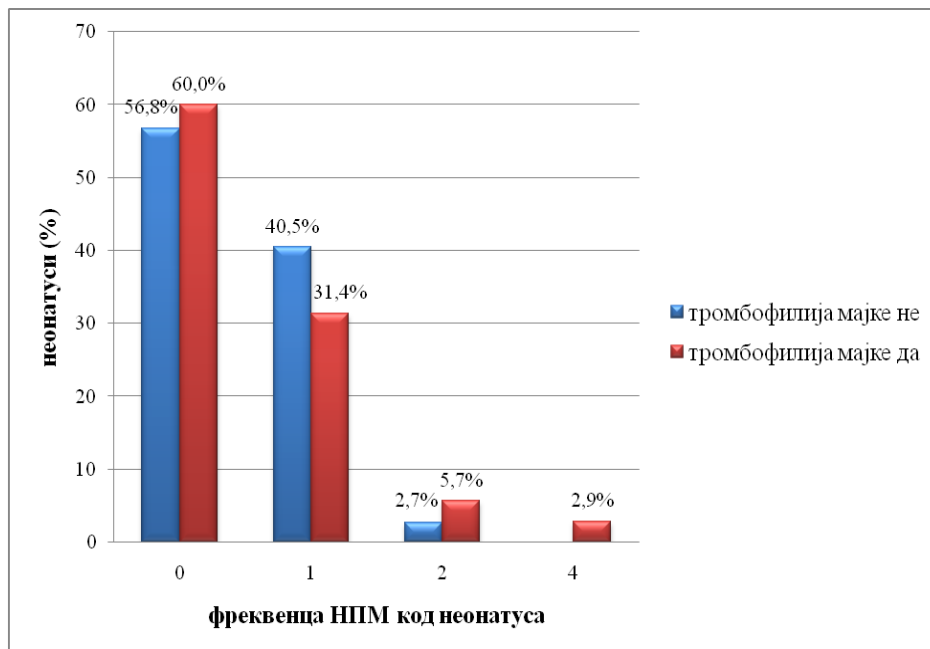
Појава МН уочена је код 94,6 % неонатуса здравих мајки и 94,3% неонатуса мајки с тромбофилијом. Најчешћа измерена МН фреквенца код неонатуса здравих мајки је износила 2 МН/1000БН (29,7%), а код неонатуса мајки с тромбофилијом 3 МН/1000БН (37,1%) (Графикон 20). Опсег измерених вредности фреквенци МН у обе групе је износио 0-6 МН/1000БН (Табела 19, Графикона 20). Медијана МН фреквенце код неонауса мајки с тромбофилијом је износила 3 МН/1000БН, док је медијана код неонатуса здравих мајки износила 2 МН/1000БН (Табела 19). У обе групе интерквartilни опсег је износио 1-3МН/1000БН.



Графикон 20. Дистрибуција МН у испитиваним групама неонатуса

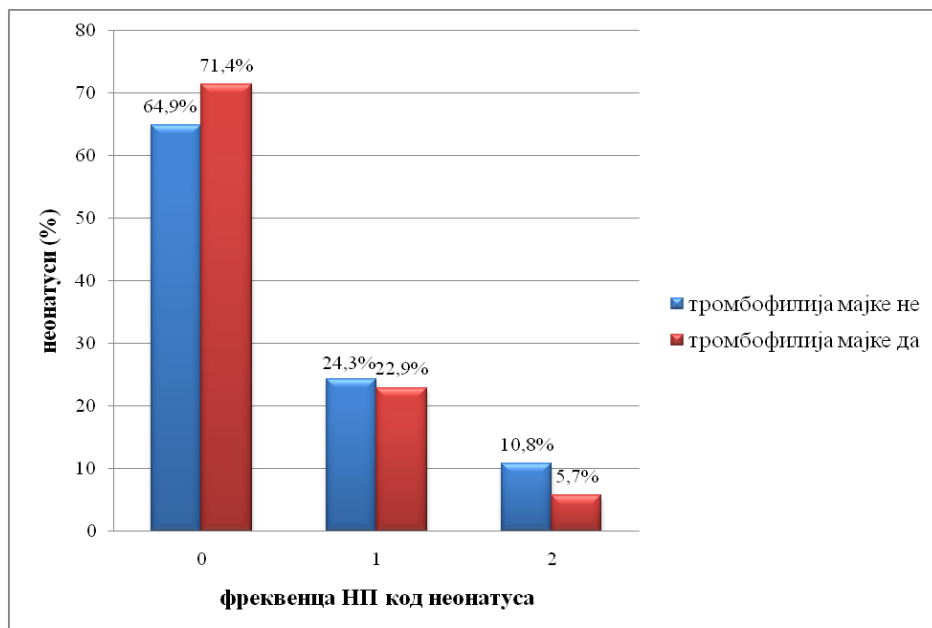
Код већине неонатуса у обе испитиване групе није забележено присуство НПМ у лимфоцитима периферне крви (56,8% од здравих мајки и 60,0% од мајки са

тромбофилијом). Фреквенца вредности НПМ код неонатуса здравих здравих мајки се кретала од 0-2 НПМ/1000БН, а код код неонатуса мајки с тромбофилијом од 0-4 НПМ/1000БН (Табела 19). Најчешће измерена фреквенца од 1 НПМ/1000БН нађена је код обе групе: 40,5% од здравих мајки и 31,4% од мајки с тромбофилијом (Графикон 14). У кохорти обе групе медијана НПМ је износила 0 НПМ/1000БН са интерквartilним опсегом од 0-1 НН/1000БН. Нетипична вредност од 4 НПМ забележена је код једног неонатуса мајке с тромбофилијом (Графикон 21).



**Графикон 21.** Дистрибуција НПМ у испитиваним групама неонатуса

У крви пупчаника код већине неонатуса није утврђено присуство НП у обе кохорте: 64,9% и 71,4% (Графикон 22). Најчешће је забележена фреквенца од 1НП/1000БН у обе групе неонатуса (мајке с тромбофилијом: 22,9%, здраве мајке: 24,3%). Распон НП фреквенци код обе групе неонатуса се кретао од 0-2 НП /1000БН, а медијана 0 НП/1000БН, (Графикони 22).



Графикон 22. Дистрибуција НП у испитиваним групама неонатуса

#### 4.6.5 Корелација фактора присутних код мајки у трудноћи с присуством цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) неонатуса

Испитивањем односа фреквенци цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ и НП) у лимфоцитима периферне крви неонатуса с присуством тромбофилије, пушачких навика мајки у трудноћи, конзумацијом алкохола у трудноћи и ВМІ на почетку трудноће уочена је статистички значајна позитивна повезаност између ВМІ и фреквенци МН и НПМ код неонатуса, као и између пушења мајки у трудноћи и вредности фреквенци НПМ код неонатуса (Спирманова корелација ранга;  $p < 0,05$ , Табела 20). Дијагностикована тромбофилија мајке и конзумација алкохола у трудноћи нису показали корелацију с присуством цитогенетичких биомаркера у крви неонатуса (Спирманова корелација ранга;  $p > 0,05$ , Табела 20).

**Табела 20.** Корелација присуства тромбофилије, пушења цигарета, конзумације алкохола у трудноћи и ВМІ мајки на почетку трудноће с вредностима цитогенетичких биомаркера код неонатуса

Испитивани фактори ризика	МН неонатуса		НПМ неонатуса		НП неонатуса	
	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност
Дијагностификована тромбофилија мајке	0,087	0,468	-0,005	0,964	-0,081	0,500
Пушење у трудноћи (да / не)	0,078	0,513	0,247*	0,037	-0,036	0,764
Алкохол у трудноћи (да / не)	0,191	0,108	-0,016	0,897	-0,131	-0,273
ВМІ (kg/m <sup>2</sup> ) на почетку трудноће	0,253*	0,032	0,266*	0,024	0,129	0,280

Спирманова корелација ранга;  $\rho$  - Спирманов коефицијент корелације; \* статистичка значајност корелације за  $p < 0,05$ ; индекс телесне масе (body mass index – BMI)

У Табели 21 показана је статистички значајно више фреквенце МН и НПМ код неонатуса мајки које су на почетку трудноће биле предгојазне и гојазне у односу на мајке нормалне телесне масе, као и значајна више фреквенце НПМ код неонатуса мајки које су пушиле цигарете током трудноће у односу на неонатусе мајки које нису пушиле цигарете током трудноће (*Mann Whitney U* тест;  $p < 0,05$ ).

**Табела 21.** Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП у крви неонатуса у зависности од пушачких навика, употребе алкохола током трудноће и ВМІ мајки на почетку трудноће

Фактори ризика присутни код мајки		Неонатуси		
		МН (X±SD)	НПМ (X±SD)	НП (X±SD)
		(Med; min-max)	(Med; min-max)	(Med; min-max)
Пушење у трудноћи	Да	2,64±1,146 (2;0-4)	0,93±1,072 (0;0-2)	1,44±1,24 (0;0-2)
	Не	2,19±1,692 (2,5;0-6)	0,40±0,560 (2;0-4)	0,41±,378 (0;0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,509</b>	<b>0,037*</b>	<b>0,761</b>
Алкохол у трудноћи	Да	3,43±1,988 (3; 1-6)	0,86±1,574 (0;0-4)	0,14±,378 (0;0-1)
	Не	2,15±1,121 (2;0-4)	0,46±0,561 (2;0-2)	0,43±,661 (0;0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,108</b>	<b>0,896</b>	<b>0,270</b>
ВМІ на почетку трудноће (kg/m <sup>2</sup> )	<24,99	2,06±1,140 (2;0-4)	0,37±0,525 (0;0-2)	0,37±0,653 (0;0-2)
	≥24,99	2,94±1,434 (3;1-6)	0,89±,1,023 (1;0-4)	0,50±,618 (0;0-2)
	<sup>a</sup> p	<b>0,033*</b>	<b>0,025*</b>	<b>0,277</b>

Вредности цитогенетичких биомаркер (МН, НПМ, НП) у крви неонатуса су представљене као средње вредности ±стандардно одступање, медијана и опсег у коме су се вредности кретале; \* статистички значајна разлика за  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; индекс телесне масе (*body mass index* – ВМІ)

Униваријантном линеарном регресионом анализом за целокупну испитивану популацију неонатуса (n=72) нађено је да је значајни предиктор МН фреквенце неонатуса ВМІ мајки на почетку трудноће ( $p=0,009$ ), док су као значајни предиктори фреквенце НПМ неонатуса издвојени: пушење мајки у трудноћи ( $p=0,011$ ) и ВМІ мајки на почетку трудноће ( $p=0,007$ ) што је приказано у Табелама 22 и 23.

**Табела 22.** Телесна маса мајки на почетку трудноће као предиктор вредности фреквенци МН (број МН/1000ВН) у крви неонатуса добијени униваријантном линеарном регресионом анализом

	Униваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted $R^2$	p
<b>ВМІ мајке на почетку трудноће (&lt;24,99; ≥24,99)</b>	0,889	0,331	0,080	0,009*

\*статистички значајно; B – нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка; Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације;

**Табела 23.** Пушење цигарета у трудноћи и телесна маса мајки на почетку трудноће као предиктори вредности фреквенци НПМ (број НПМ/1000ВН) у крви неонатуса добијени линеарном регресионом анализом (униваријантном и мултиваријантном)

Посматрани фактори ризика код мајке	Униваријантна анализа				Мултиваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted $R^2$	p	#B	SE	p	#Adjusted $R^2$
<b>Пушење у трудноћи</b>	0,532	0,204	0,076	0,011*	0,404	0,207	0,055	<b>0,123</b>
<b>ВМІ на почетку трудноће (&lt;24,99; ≥24,99)</b>	0,519	0,185	0,088	0,007*	0,414	0,189	0,032*	

\*статистички значајно; B – нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка, #B – парцијални регресиони коефицијент; Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације; #Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације два предиктора: пушење у трудноћи и ВМІ на почетку трудноће; p – статистичка значајност

На основу добијених резултата 8% индивидуалних разлика у вредностима фреквенци МН неонатуса се може објаснити телесном масом мајки на почетку трудноће, док се 7,6% индивидуалних разлика у фреквенци НПМ у испитиваној популацији

неонатуса може објаснити пушењем мајки у трудноћи, а 8,8% телесном масом мајке на почетку трудноће, (Табела 23 и 22).

Мултиваријантна линеарна регресиона анализа фактора који су статистички значајни у униваријантном моделу предвиђања фреквенце НПМ у крви неонатуса је показала да пушење у трудноћи и телесна маса мајке на почетку трудноће могу објаснити 12,3% индивидуалне варијабилности у фреквенци НПМ из крви пупчаника неонатуса, док се у овом моделу као статистички значајан предиктор издваја индекс телесне масе на почетку трудноће (Табела 23).

#### **4.6.6 Корелација цитогенетичких биомаркера присутних код мајки у порођају с биомаркерима неонатуса**

Испитивањем повезаности цитогенетичких биомаркера у крви мајки у порођају и у крви пупчаника неонатуса утврђена је статистички значајна корелација фреквенци МН код мајки у порођају са фреквенцама МН и НПМ код неонатуса, као и фреквенци НПМ код мајки у порођају с фреквенцама МН и НПМ код неонатуса (Спирманова корелација ранга;  $p < 0,05$ , Табела 24). Фреквенце НП код мајки у порођају су биле корелисане само са фреквенцама НП неонатуса (Спирманова корелација ранга;  $p < 0,05$ , Табела 24). Према Кохеновим смерницама, постоји јака веза између фреквенци МН мајки на порођају и фреквенци МН неонатуса и веза средње јачине између фреквенци МН мајки у порођају и НПМ неонатуса, као и фреквенци НП мајки у порођају и НП неонатуса. Остале статистички значајне корелације су имале слабу везу (Табела 24).

На основу униваријантних модела закључујемо да се 49,2% индивидуалних разлика у фреквенци МН у испитиваној популацији неонатуса може објаснити фреквенцом МН, а 18,5% фреквенцом НПМ у крви њихових мајки у порођају (Табела 25).



**Табела 24.** Корелација присуства цитогенетичких биомаркера код трудница у порођају с вредностима цитогенетичких биомаркера (МН,НПМ и НП) код неонатуса (n=72)

Цитогенетски биомаркери у крви мајки у порођају	МН неонатуса		НПМ неонатуса		НП неонатуса	
	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност	$\rho$	значајност
<b>МН</b>	0,682**	0,000	0,264*	0,025	0,158	0,185
<b>НПМ</b>	0,458**	0,000	0,259*	0,028	0,188	0,114
<b>НП</b>	0,208	0,080	0,207	0,081	0,301*	0,010

Спирманова корелација ранга;  $\rho$  - Спирманов коефицијент корелације; \*\* статистичка значајност корелације за  $p < 0,01$ ; \* статистичка значајност корелације за  $p < 0,05$ ;

Мултиваријантна линеарна регресиона анализа фактора који су статистички значајни у униваријантном моделу (фреквенце МН и НПМ у крви мајки у порођају) је показала добро предвиђање зависне променљиве – фреквенце МН у крви њихове деце на рођењу (ANOVA тесту:  $F(2,69) = 38,612$ ,  $p < 0,05$ ). Овим моделом може објаснити 51,4% варијабилитета у фреквенци МН код неонатуса (Табела 25).

**Табела 25.** Фреквенце цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ) у крви мајки у порођају као предиктори фреквенце МН у крви неонатуса

Цитогенетички биомаркери у крви породиља	Униваријантна анализа				Мултиваријантна анализа			
	B	SE	Adjusted $R^2$	p	#B	SE	p	#Adjusted $R^2$
<b>МН</b>	0,511	0,061	0,492	0,000*	0,456	0,065	0,000*	<b>0,514</b>
<b>НПМ</b>	0,504	0,122	0,185	0,000*	0,211	0,103	0,047*	

\*статистички значајно; B– нестандардизован регресиони коефицијент, SE – стандардна грешка, #B – парцијални регресиони коефицијент; Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације; #Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације за два предиктора: фреквенце МН и НПМ у крви породиља

## 4.7 Ефекат терапије нискомолекуларним хепарином на хромозомску стабилност

### 4.7.1 Разлике у вредностима цитогенетичких биомаркера пре и после антикоагулантне терапије

Ради испитивања хипотезе о дејству терапије LMWH на хромозомску стабилност коришћени су непараметријски тестови, јер се путем дескриптивне анализе показало да испитивани параметри (МН, НПМ и НП) не испуњавају нормалност расподеле. За поређење поновљених мерења (пре и после терапије) у групи трудница с тромбофилијом користили смо Вилкоксонов тест ранга (Z) (Табела 26).

**Табела 26.** Приказ статистике Вилкоксоновог теста за цитогенетичке биомаркере

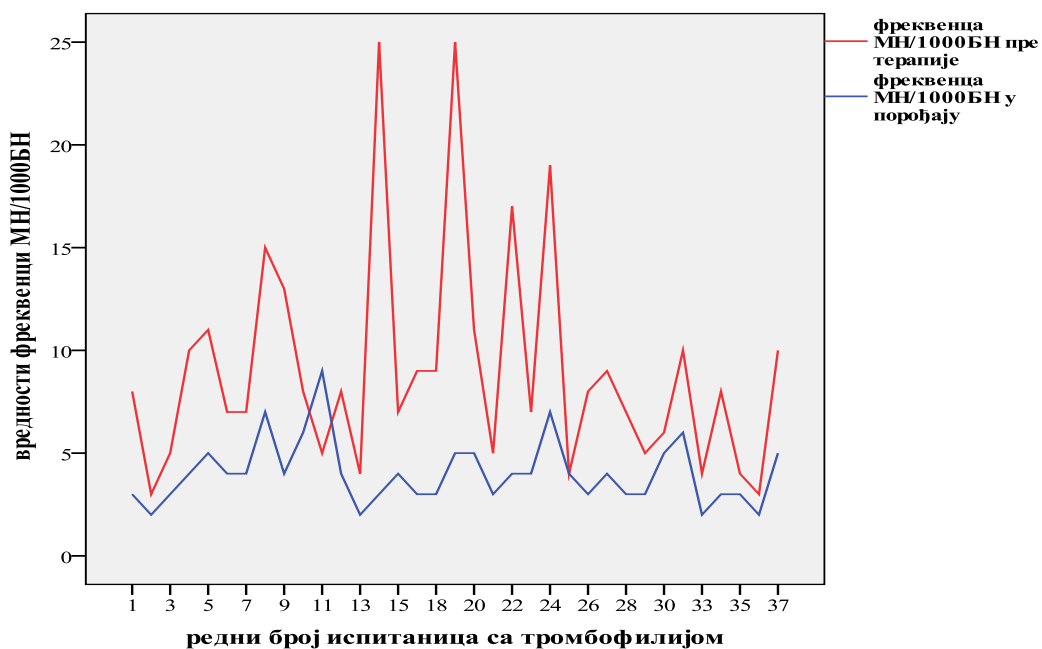
Поређење поновљених мерења	Z	значајност
МН у порођају/МН пре терапије	-4,813*	0,000**
НПМ у порођају/НПМ пре терапије	-0,568	0,570
НП у порођају/НП пре терапије	-3,460*	0,001**
МН неонатуса/МН код мајке пре терапије	-5,167*	0,000**
НПМ неонатуса/НПМ код мајке пре терапије	-4,022*	0,000**
НП неонатуса/НП код мајке пре терапије	-3,890*	0,000**

Z тест статистика; \* групе између којих разлика није случајна; \*\* статистички значајна разлика

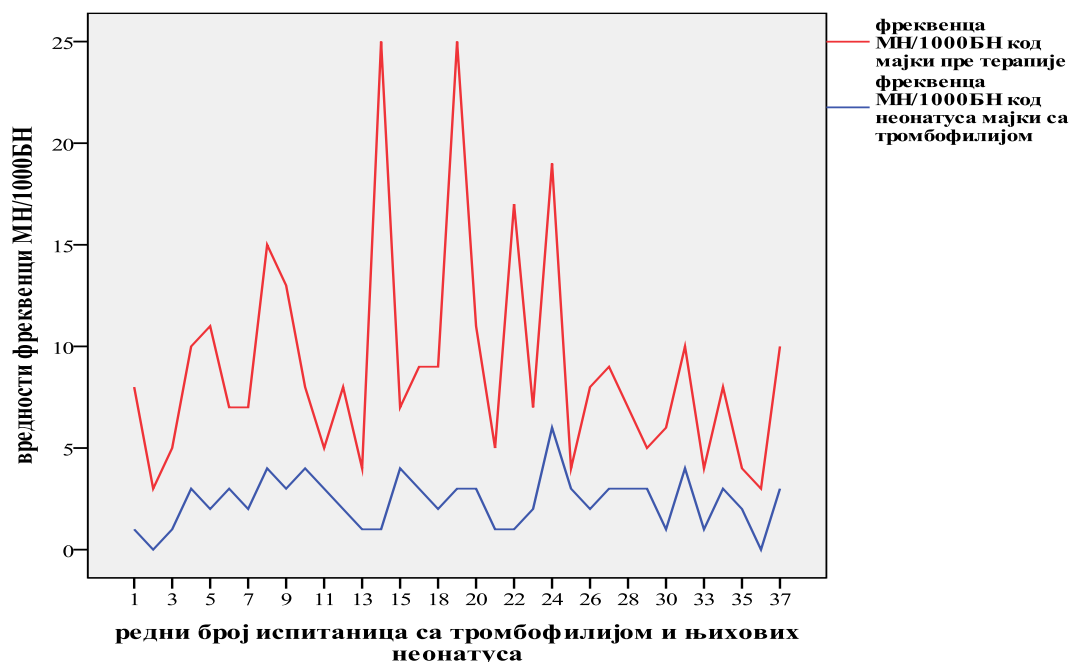
Поређењем поновљених мерења (на почетку трудноће и порођају) нађена је статистички значајна разлика између фреквенци МН у лимфоцитима периферне крви у порођају трудница с тромбофилијом које су током дате трудноће примењивале

антикоагулантну терапију (LWMH) и фреквенци МН у раној гестацији код истих трудница пре почетка примене терапије и то уз велику разлику  $Z = -4,813$ , (*Wilcoxon* тест ранга,  $p < 0,05$ , Табела 26). Закључује се да постоји значајно смањење фреквенце МН код трудница с тромбофилијом након вишемесечне примене антикоагуланте терапије при чему је за  $N=37$  добијена вредност  $R=Z/\sqrt{N}=0,80$ , која говори о високој величини утицаја. Такође за вредности НП постоји статистички значајна разлика уз вредност  $-3,460$  пре терапије и у порођају уз вредност  $Z = -3,460$  при чему је за  $N=37$  добијена вредност  $R=Z/\sqrt{N}=0,56$ .

Разлике у фреквенцама цитогенетичких биомаркера код деце и њихових мајки пре почетка терапије су статистички значајно разликовале, и то за фреквенце МН са вредностима  $Z=-5,167$  и  $R=0,85$ , за фреквенце НПМ са вредностима  $Z=-4,022$  и  $R=0,66$  и за фреквенце НП са вредностима  $Z=-3,890$  и  $R=0,64$  (*Wilcoxon* тест ранга,  $p < 0,05$ , Табела 26).



**Графикон 23.** Појединачне вредности фреквенци МН код трудница с тромбофилијом пре терапије LWMH (први триместар) и током примене терапије (у порођају)



**Графикон 24.** Појединачне вредности фреквенци МН код трудница с тромбофилијом пре терапије LWMH (први триместар) и њихових неонатуса

На основу анализе утицаја терапије LWMH на фреквенцу МН види се да је реч о високој величини утицаја и истовремено највећој величини утицаја у односу на остале цитогенетичке биомаркере (Графикони 23 и 24). Вредности за труднице под редним бројем 17. и 31. у порођају нису приказане на Графиконима 23 и 24 јер су имале спонтане побачаје у актуелној трудноћи.

Вредност медијане за фреквенцу МН пре антикоагулантне терапије трудница с дијагнозом тромбофилије износила је 8, а након вишемесечне примене LWMH терапије 4. Такође се запажа да је медијана и за остале цитогенетичке биомаркере код трудница с тромбофилијом (НПМ и НП) нижа у порођају него на почетку трудноће пре примене терапије LWMH (Табеле 10 и 18). Пад за вредности медијана се запажају и када се пореде цитогенетички биомаркери МН, НПМ и НП код неонатуса у односу на дате биомаркере који су били присутни у крви њихових мајки с тромбофилијом на почетку трудноћа, а пре почетка примене терапије LWMH (Табеле 10 и 19).

## 4.8 Трудноћа и порођај

### 4.8.1 Исходи и компликације у трудноћи

Испитивањем добијених резултата показано је постојање статистички значајне разлике између здравих и трудница са дијагнозом тромбофилије, а у вези с појавом компликација у трудноћи као што су: хипертензивни синдром, гестацијски дијабетес и анемија ( $\chi^2$ -тест;  $p < 0,05$ ). Тако је у групи трудница с тромбофилијом забележено статистички значајно виша појава ПИН, DMG и анемије ( $\chi^2$ -тест;  $p < 0,05$ , Табела 27).

Утврђено је да је појава ових болести статистички значајно повезана са присуством тромбофилије у трудноћи са вредностима за коефицијент Phi од 0,418 што се по Коеновим критеријумима сматра средњим утицајем.

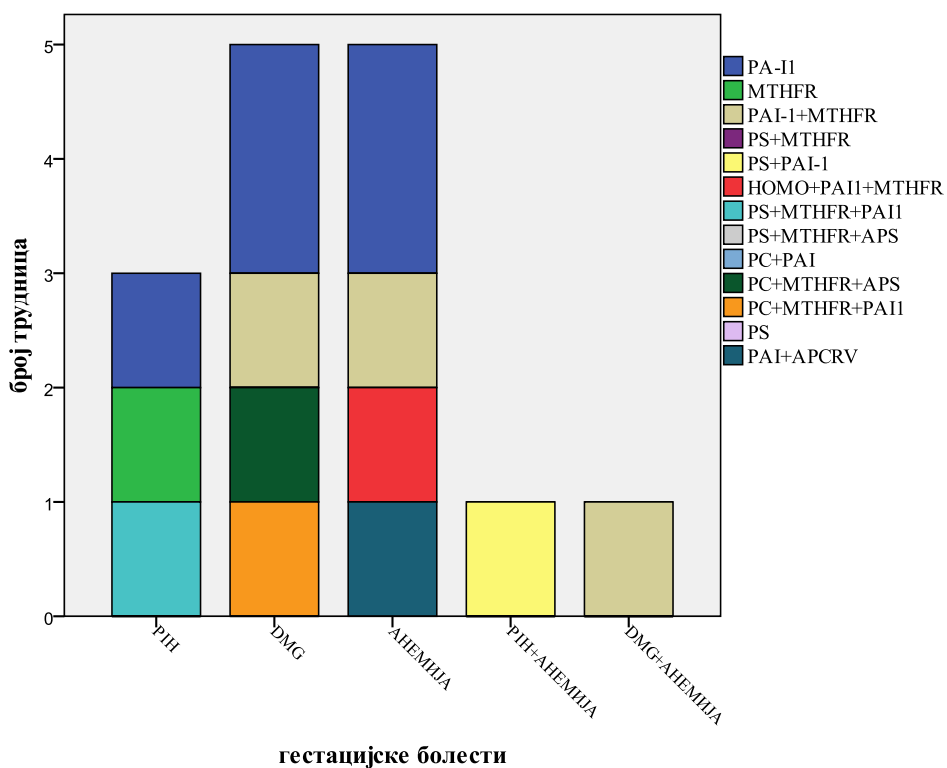
Исходи трудноћа нису се разликовали између група испитаница ( $\chi^2$ -тест;  $p > 0,05$ , Табела 27). Највећи број трудноћа у обе испитиване групе се завршио порођајем након 34 НГ. Код трудница с тромбофилијом забележено је два спонтана побачаја и један превремени порођај (пре 34 НГ). Учесталост компликација трудноћа није се разликовала између група трудница ( $\chi^2$ -тест;  $p > 0,05$ , Табела 27). Код једне здраве труднице дијагностикован је IUGR, а код једне труднице с тромбофилијом порођај се завршио након абрупције плаценте (Табела 27).

Шанса за појаву компликација у трудноћи (ПИН, DMG и анемије) у присуству тромбофилије у трудноћи након увођења LMWH терапије износила је OR =11,932 [95% CI (2,485–57,284)]. Релативан ризик за појаву гестацијских обољења код трудница с тромбофилијом на терапији LMWH износила је RR =2,286 [95% CI (1,578–3,312)] и виши је око 11 пута у односу на релативан ризик код здравих трудница чије су вредности: RR =0,192 [95% CI (0,051–,716)]. Резултати ове студије показују да труднице са дијагнозом тромбофилије имају 11 пута већу шансу за компликације у трудноћи у односу на здраве труднице.

**Табела 27.** Исходи трудноћа, појава IUGR и абрупције плаценте, компликације трудноћа у испитиваној популацији

		Мајке са тромбофилијом		Значајност
		Да	Не	
Завршетак трудноће n (%)	Порођај	35 (94,6%)	37 (100%)	<sup>b</sup> p =0,473
	Спонтани побачај	2 (5,4%)	0 (0%)	
	Порођај после 34НГ	34 (91,9%)	37 (100%)	<sup>b</sup> p =0,209
	Порођај пре 34НГ	1 (2,7%)	0 (0%)	
	Спонтани побачај	2 (5,4%)	0 (0%)	
IUGR или абрупција плаценте n (%)	Не	36 (97,3%)	36 (97,3%)	<sup>b</sup> p =1,000
	Да	1 (2,7%)	1 (2,7%)	
Компликације у трудноћи n (%)	Не	22 (59,5%)	35 (94,6%)	<sup>b</sup> p =0,001*
	Да	15 (40,5%)	2 (5,4%)	
Врсте компликација у трудноћи n (%)	Без обољења	22 (59,5%)	35 (94,6%)	<sup>b</sup> p=0,010*
	РИН	3 (8,1%)	2 (5,4%)	
	DMG	5 (13,5%)	0 (0%)	
	Анемија	5 (13,5%)	0 (0%)	
	РИН + анемија	1 (2,7%)	0 (0%)	
	DMG + анемија	1 (2,7%)	0 (0%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>b</sup>χ<sup>2</sup>-тест



**Графикон 25.** Присуство појединачних и комбинованих тромбофилија код трудница на тромбопрофилактици које су током трудноће развиле компликације у трудноћи

Из Графикона 25 се види да је присуство PA-1 генске варијанте било присутно код 75% (3/4) трудница које су оболеле од PIN, док је код трудница које су оболеле од DMG забележено присуство PA-1 генске варијанте у 66,67 % (4/6) случајева. MTHFR генска варијанта била је присутна код половине (2/4) оболелих од PIN и код 66,67% случајева (4/6) код оболелих од DMG.

#### 4.8.2 Карактеристике порођаја код здравих трудница и трудница с тромбофилијом

Начин завршетка порођаја се значајно разликовао ( $\chi^2$ -тест;  $p < 0,05$ ) између здравих и трудница са дијагнозом тромбофилије, тако да је порођај трудница с тромбофилијом у значајно већем броју завршаван оперативним путем (Табела 28). Повезаност начина завршетка порођаја са присуством трудноћа компликованих тромбофилијом с вредношћу за коефицијент Phi од 0,401 се сматра средњим утицајем.

**Табела 28.** Карактеристике порођаја у испитиваној популацији

		Мајке са тромбофилијом		значајност
		Да	Не	
<b>Начин завршетка порођаја</b> n (%)	<b>вагинални</b>	20 (57,1%)	34 (91,9%)	<sup>b</sup> p =0,002*
	<b>царски рез</b>	15 (42,9%)	3 (8,1%)	
<b>Недеља гестације у порођају</b> (X±SD)(Med;min-max)		38,986±2,365 (40; 28-41)	38,932 ±1,313 (39; 36-41)	<sup>a</sup> p=0,236
<b>Тежина детета на рођењу</b> (X±SD gr)(Med;min-max)		3298,000±621,770 (3400; 1100-4250)	3375,676±512,508 (3250; 2050-4600)	<sup>c</sup> p=0,765
<b>АПГАР скор</b> (X±SD)(Med;min-max)		9,014±1,018 (9; 4-10)	9,041±0,4146 (9; 8-10)	<sup>a</sup> p=0,457
<b>Пол новорођенчета</b>	<b>мушки</b> n (%)	22 (62,9%)	14 (37,8%)	<sup>b</sup> p=0,035*
	<b>женски</b> n (%)	13 (37,1%)	23 (62,2%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney U тест; <sup>b</sup>χ<sup>2</sup>-тест; <sup>c</sup>t-тест; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, Med – медијана, min-max – опсег измерених вредности

Разлика између група постојала је у односу на пол новорођене деце (χ<sup>2</sup>-тест; p<0,05). Тако су мајке с тромбофилијом родиле значајно више мушке деце (22/35; 62,9%) у односу на здраве мајке (14/37; 37,8%). Уочено је да је однос полова у целој испитиваној популацији једнак (1:1) (Табела 28).

Статистички значајна разлика није уочена у односу на недељу гестације у порођају и АПГАР скор детета (*Mann Whitney U* тест; p>0,05), као и у односу на порођајну тежину (*t*-тест; p>0,05) између деце мајки с тромбофилијом и здравих мајки (Табела 28). Нетипично ниже порођајне тежине, које се разликују у односу на измерене вредности у обе групе, забележене су код двоје деце. АПГАР скор 9 забележен је код највећег броја деце у обе испитиване групе.

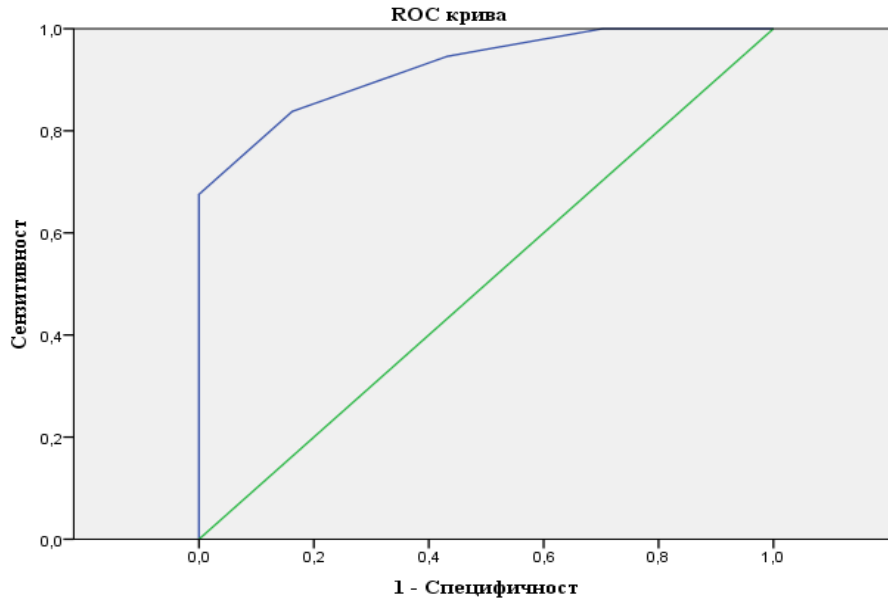


## 4.9 Дијагностичка тачност теста: сензитивност, специфичност и ROC крива

### 4.9.1 Дијагностичка тачност ЦБМН теста у одређивању присуства тромбофилије

Одређивање ROC (енгл. *Receiver Operating Characteristic – ROC*) криве за измерене вредности фреквенци МН у првом триместру гестације, пре укључивања антикоагулантне терапије, омогућила нам је да одредимо дијагностичку тачност ЦБМН теста у одређивању присуства тромбофилије у посматраној популацији трудница. Резултати ROC анализе су приказани на Графику 26. Површина испод ROC криве (*Area Under Curve – AUC*) је статистички значајно различита од површине испод дијагонале ( $area=0,5$ ) и износи 0,924 (95% CI=0,866-0,982,  $p=0,000<0,05$ ). Добијена вредност површине испод ROC криве је блиска јединици што указује на свеукупну високу дијагностичку корисност теста.

Гранични случаја (енгл. *cut off*) за фреквенцу МН је износио 4,5 МН/1000БН, са вредностима за сензитивност 83,8% и специфичност 83,8%, при чему је постигнута максимална осетљивост и дијагностичка специфичност теста, односно постигнута је свеукупна тачност теста од 83,8%. Позитивна предиктивна вредност од 83,8% и негативна предиктивна вредност 16,22% показује да је при вредностима већим од 4,5 МН/1000БН могуће идентификовати 83,8% трудница код којих постоји тромбофилија и 16,2% трудница код којих је се може искључити постојање тромбофилије.

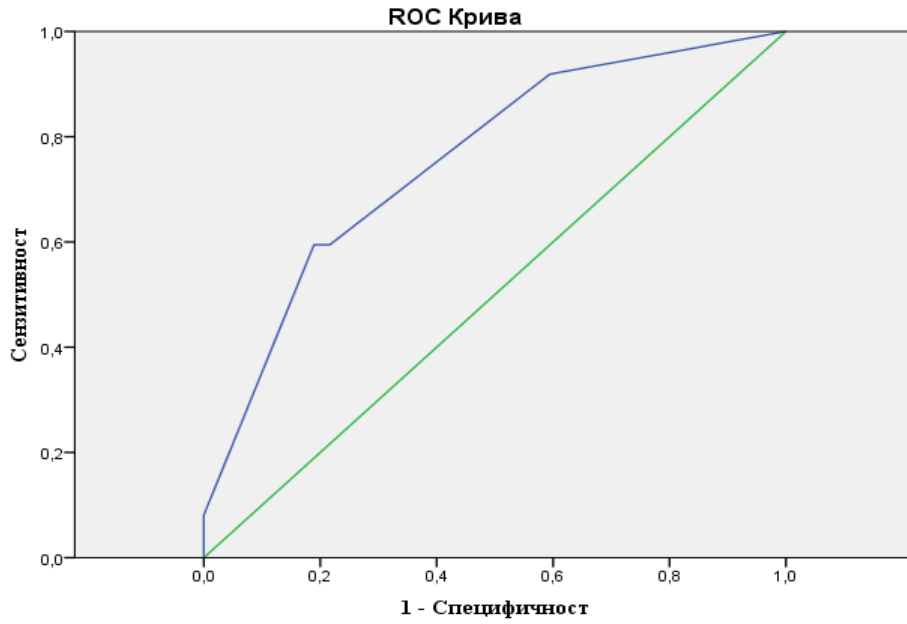


**Графикон 26.** Резултати ROC анализе за фреквенце МН и присуство тромбофилије

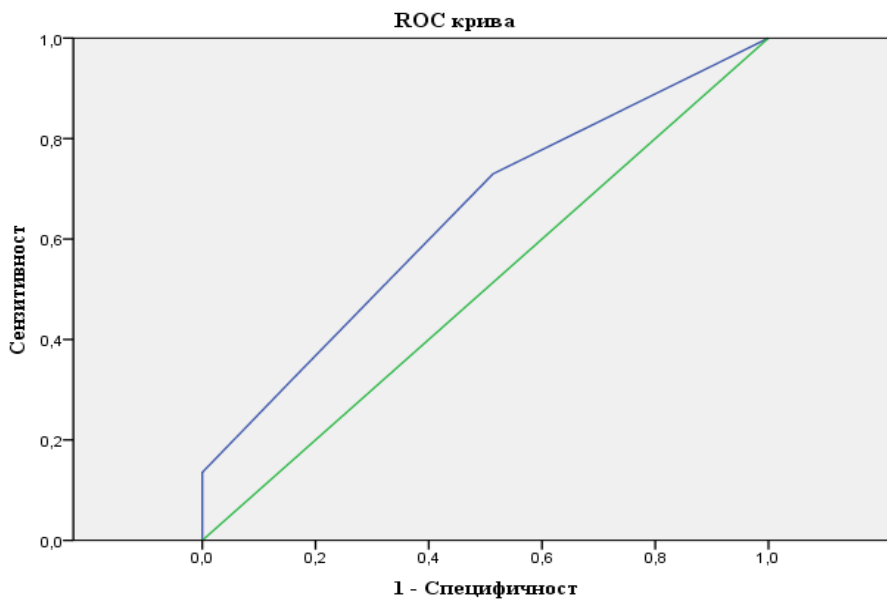
ROC анализом за НПМ нађено је статистички значајно различита AUC од 0,755 (95% CI=0,645-0,865,  $p=0,000<0,05$ ) у односу на површину испод дијагонале (area=0,5), са сензитивношћу од 59,5% и специфичношћу од 81,1% за *cut off* вредност фреквенце НПМ од 1,67 НПМ/1000БН (Графикон 27).

ROC анализом за НП нађено је статистички значајно различита AUC од 0,643 (95% CI=0,518-0,769,  $p=0,034<0,05$ ) у односу на површину испод дијагонале (area=0,5), са сензитивношћу од 73,0% и специфичношћу од 48,6% за *cut off* вредност фреквенце НП од 0,5 НП/1000БН (Графикон 28).

Од свих испитиваних цитогенетички биомаркера резултати су показали највишу сензитивност и специфичност у разликовању присуства тромбофилије у испитиваној популацији за измерене вредности МН.



**Графикон 27.** Резултати ROC анализе за фреквенце НПМ и присуство тромбофилије

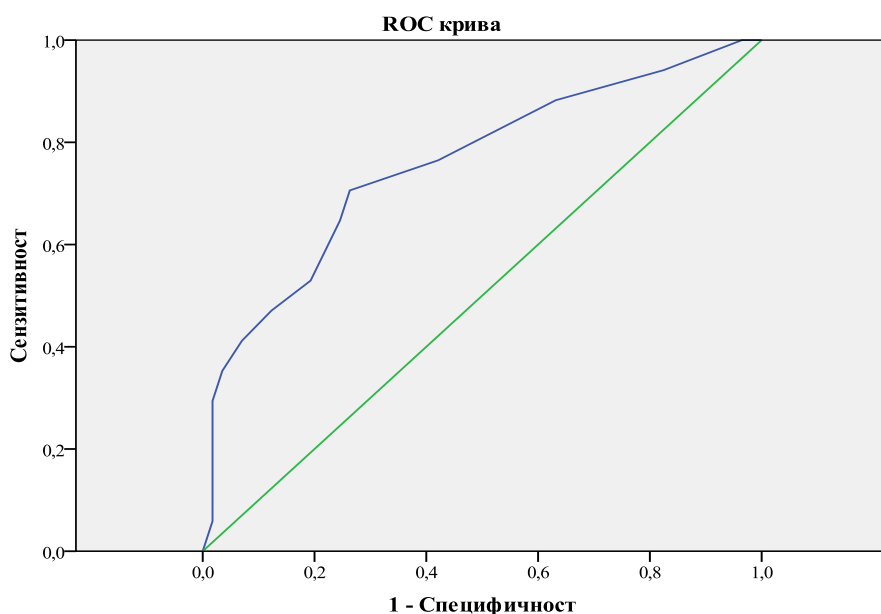


**Графикон 28.** Резултати ROC анализе фреквенци НП и присуство тромбофилије

#### 4.9.2 Дијагностичка тачност ЦБМН теста у одређивању појаве компликација у трудноћи

Одређивање ROC криве за измерене вредности фреквенци МН у првом триместру гестације, пре укључивања антикоагулантне терапије, омогућила нам је да одредимо дијагностичку тачност ЦБМН теста у идентификацији и предвиђању појаве компликација у трудноћи (ПН, DMG и анемије). Резултати ROC анализе су приказани на Графику 29. Добијена вредност AUC је статистички значајно различита од површине испод дијагонале и износи 0,757 (95% CI=0,618-0,897,  $p < 0,05$ ).

*Cut off* за фреквенцу МН је износио 5,5 МН/1000БН, при вредностима за сензитивност 70,6% и специфичност 73,7%, при чему је постигнута максимална осетљивост, дијагностичка специфичност теста и свукупна дијагностичка тачност теста од 73%. Позитивна предиктивна вредост за овај *cut off* износи 44,4%, а негативна предиктивна вредност 10,6%, односно да је при вредностима већим од 5,5 МН/1000БН могуће идентификовати 44,4 % трудница које имају ове компликације у трудноћи.



Графикон 29. Резултати ROC анализе фреквенце МН и компликација у трудноћи

## 5. ДИСКУСИЈА

У нашем истраживању које се бавило анализом хромозомске нестабилности у лимфоцитима периферне крви трудница код којих је након учињених хематолошких, имунолошких и генетичких анализа постављена дијагноза тромбофилије, као и анализа клиничких и биохемијских параметара из крви, спроведен је ЦБМН тест и анализа основних медицинских података и срединске изложености мутагенима и канцерогенима релевантним у цитогенетичким истраживањима, које се рутински не раде у оквиру студирања болести нигде у свету. Примена антикоагулантне терапије је спроведена на основу важећих болничких протокола и препорука. Пацијенткиње и контрола су проспективно праћене током трудноће када је извршено мерење хромозомске нестабилности настале под утицајем присуства тромбофилије, на почетку трудноће, и одговора након вишемесечне примене LMWH, у порођају. Утицај хромозомске нестабилности мајке на хромозомску нестабилност код фетуса, мерена је из крви неонатуса. Статистичка обрада добијених података показала је да присуство тромбофилије представља најзначајнији фактор ризика за настанак хромозомске нестабилности, да примена антикоагулантне терапије има заштитни ефекат на стабилност генома и да је хромозомска нестабилност у крви мајке у корелацији с хромозомском нестабилношћу у крви детета.

Тромбофилија није болест *per se* и овај термин се употребљава када су у питању хердитарни и аквизитарни поремећаји хемостазног система код којих постоји склоност најчешће ка венским тромбозама (285, 286, 287, 288).

У трудноћи тромбофилија се клинички може јавити као једна или више тромботичких манифестација као што су: понављајући спонтани побачаји и компликације трудноће (интраутерини застој у расту, интраутерина фетална смрт, тешка прееклампсија, абрупција плацента) (295, 311). У нормалној трудноћи плацента обезбеђује неколико важних функција које су неопходне за нормалан раст фетуса: транспортну функцију, која омогућава размену хранљивих и отпадних материја између мајчине и феталне циркулације, ендокрину функцију, при чему трофобласне ћелије производе естриол, прогестерон и хумани плацентални лактоген и имунолошку функцију, када имунски систем препознаје фетално ткиво. Болести у трудноћи везане за абнормалну плацентацију настају услед UPI која може ометати нормални фетални развој због смањене размене

хранљивих и отпадних материја. Утероплацентална инсуфицијенција се карактерише смањеном инвазијом трофобласта у децидуу и неадекватним одговором утериних артерија у њиховој физиолошкој трансформацији у судове мањег отпора ради омогућавања већег протока крви. Клинички фенотип повезан са UPI укључује PE и IUGR (312).

Преекламсија је специфични синдром који се карактерише артеријском хипертензијом, едемима и протеинуријом. Бројне студије које су проучавале етиологију PE указују на то да овај синдром у основи има мултифакторијално полигенско наслеђивање с генетском компонентом значајном за развој болести (313). Преекламсија почиње инадекватном инвазијом трофобласта у раној трудноћи, која изазива смањену перфузију плаценте, што за последицу има плаценталну хипоксију и локални оксидативни стрес, који даље доводе до системског инфламаторног одговора и развоја ендотелне дисфункције у каснијој фази болести (293, 313).

У литератури се наводи повезаност тромбофилије са преекламсијом (314, 315). Тако је показана значајно виша заступљеност и повишени ризик за настанак преекламсије код жена носилаца FV G1619A генске варијанте (316, 317, 318, 319), протромбин G20210A варијанте (317, 320), 4G/4G PAI1 хомозигота (321), MTHFR C677T генске варијанте (29), и код присуства хиперхомоцистенемије (322). Показано је да жене с повишеним титром антифосфолипидних антитела имају већу шансу за преекламсију или екламсију у трудноћи, због постојања патогених механизма (тромботски механизми, апоптоза и имуномодулаторни молекули) којима антифосфолипидна антитела оштећују трофобласт (323, 324). Међутим, велики број студија нису показале повезаност тромбофилних генских варијанти са PE (295, 325, 326, 327, 328). У испитиваној групи жена са тромбофилијом у нашој студији нису забележене појаве преекламсије у актуелној трудноћи и у претходним трудноћама.

Највећи број аутора прихвата дефиницију IUGR као ултразвучно процењена телесна маса плода која је испод 10 перцентила за дату гестацијску старост (288, 329). Вероватни патофизиолошки механизми који доводе до IUGR код тромбофилије су интервилозна тромбоза и поремећена плацентална перфузија (330, 331, 332) и то најчешће асиметричног типа (288). Већина студија налази да је преваленца тромбофилије значајно виша у групи трудноћа са IUGR у односу на здраву контролу, док су разлике присутне у односу на значај појединачних мутација и дефицијенција, на шта је могуће да су утицали

различити дизајни студија и различита етничка заступљености појединачних мутација. У различитим истраживањима код жена са IUGR као најчешће заступљене наводе се протеин S дефицијенција (332), фактор V Leiden, протромбин G20210A варијанта и протеин S дефицијенције (333), MTHFR C677T генска варијанта и протеин S дефицијенције (334, 335), док се протромбин G20210A варијанта издваја као једини статистички значајни фактор ризика за IUGR (336). У нашем истраживању није забележена IUGR у групи трудница с тромбофилијом у претходним, нити у актуелним трудноћама, док је код једне здраве труднице дијагностикован IUGR током актуелне трудноће (Табела 27).

Свако делимично или потпуно одљубљивање нормално усађене постељице пре трећег порођајног доба представља абрупцију плаценте (330). Сматра се да матернална тромбофилија представља предиспозицију за настанак плаценталне абрупције, узрокујући хроничну редукцију утероплацентног протока, што последично изазива исхемију постељице и појаву плацентних инфаркта и некрозе, док код здравих трудница без тромбофилије абрупција настаје услед акутне дисрупције матернално - феталне површине (288, 337). Код жена са абрупцијом плаценте наводи се преваленца од 70% урођене и стечене тромбофилије (338). Значајни фактори ризика за абрупцију плаценте су: фактор V Leiden (296, 335) и протромбин G20210A варијанта (296), и то хетерозиготне форме (333), анти тромбин дефицијенција (339), као и чешће присутна ННС (340). Међутим, на популацији чешког порекла нису нађене асоцијације између матернално или феталне урођене тромбофилије и абрупције плаценте (341). У испитиваној кохорти жена са тромбофилијом у нашој студији код једне труднице порођај је завршен након абрупције плаценте (Табела 27).

Спонтани побачај се дефинише као нежељени губитак трудноће пре 20 НГ (312) или уколико је гестација непозната, као губитак фетуса телесне масе <400 gr (342). Детектоване вредности хуманог хорионског гонадотропина откривају да се око 50% трудноћа изгуби после имплантације, али се од њих само мањина клинички дијагностикује (343). Појава спонтаних побачаја је релативно честа и износи 15-25% у односу на укупан број трудноћа, и бележи пораст преваленце са годинама живота мајке (290, 342).

Према дефиницији Европског удружења за хуману репродукцију и ембриологију - (*The European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE*), као и Краљевског колеџа за гинекологију и акушерство (*The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*

– RCOG), хабитуални спонтани побачаји дефинисани су као три и више узастопних губитка трудноће, док Америчко удружење за репродуктивну медицину (*The American Society for Reproductive Medicine – ASRM*) даје дефиницију хабитуалних побачаја као два или више клиничка губитка трудноћа која не морају да буду узастопна (342). Инциденца RPL зависи од дефиниције која се користи, тако да учесталост  $3 >$  узастопних побачаја се јавља код 1-2% жена у репродуктивном добу (288, 290) док су  $2 >$  спонтаних побачаја присутни су код 5% жена репродуктивне доби, од којих се 80% дешава у првом триместру трудноће (290, 342).

Етиологија спонтаних побачаја је разноврсна и обухвата: аномалије заметка (хромозомопатије и генопатије), анатомске и функционалне промене на грлићу материце, инфекције грлића и слузокоже материце, акутна и хронична обољења мајке (инфективна и неинфективна), енокринопатије (болести тиреоидне жлезде, *diabetes mellitus* и инсуфицијенција жутог тела), имунолошке поремећаје препознавања антигена страног феталног ткива, хемијске чиниоце спољашње средине и трауме, као и дефекте у хемостазном систему. Ипак, разлози за настанак спонтаних побачаја у 50% случајева остају неразјашњени (290). Дефектима у хемостазном систему могуће је објаснити потенцијални механизам губитка плода код 5-10% жена са APSy и око 10 % жена са урођеним тромбофилијама (290). Према подацима других студија чак 50% жена с необајшњеним узроцима спонтаних побачаја има предиспозицију ка тромбозама (312), док је код трудница с тромбофилијом забележена повећана учесталост спонтаних побачаја (288). Тако се као чести морфолошки налази у ткиву спонтаних побачаја могу наћи интравенозни крвни коагулуми и повећано интравилозно таложење фибрина, што указује на хемостазну дисфункцију која је основа плаценталне инсуфицијенције и понављајућих спонтаних побачаја (312). Код жена с поновљеним спонтаним побачајима бележи се повећана продукција тромбоксана од 4 до 7 НГ и снижене вредности простацклина између 8-11 НГ у односу на нормалну трудноћу. Поремећена ревнотежа у корист тромбоксана може довести до вазоспазма и агрегације тромбоцита у трофобласту, што последично води настанку микротромбова и плацентне некрозе (288).

Прва сазнања о тромбофилији као фактору ризика за спонтане побачаје односила су се на присуство антифосфолипидних антитела (343), затим је 1993. године као фактор ризика описана хиперхомоцистиенемија (344). У независним студијама 1996. године



утврђена је веза између RPL и различитих форми урођених тромбофилија (345, 346, 347). У литератури се наводе подаци о присуству тромбофилије код 40–50% жена са RPL (348) и урођене тромбофилије код 26% жена са RPL (312). Утврђена је значајна асоцијација присуства: фактор V Leiden хомо/хетерозиготне и протромбин G20210A хетерозиготне мутације, лупус антикоагуланс и антикардиолипинских антитела, хиперхомоцистиенемие и стечене APCR с раним губицима трудноћа, пре 24 НГ (296, 349), док је повезаност с касним губицима трудноћа, након 24 НГ, нађена код PS дефицијенције, хетерозигота за фактор V Leiden, протромбин G20210A и присуство LA антитела (350). У истраживању популације жена с хабитуалним побачајима из јужног Ирана нађена је значајно виша фреквенца дефицијенције PS (351), а у узорку жена из Турске позитивна корелација хабитуалних побачаја и варијанти фактор V Leiden и протромбин G20210A (352). Резултати мета-анализе коју су дали Ли (Li) и сарадици показали су значају везу PAI-1 4G/5G генске варијанте и повишеног ризика за RPL у популацији белаца, док оваква повезаност није нађена за популацију Азијата (353). С друге стране, у мета-анализи Ву (Wu) и сарадици налазе да резултати међу популацијом белаца не указују на везу генске варијанте C677T MTHFR и RPL, док ова варијанта представља фактор ризика за RPL међу кинеском Хан популацијом (354). Сматра се да код хетерозигота за C677T MTHFR, само у комбинацији с витаминском дефицијенцијом, долази до благо повишене концентрације хомоцистеине и да је ова генска варијанта фактор ризика за RPL само у констелацији са другим факторима ризика који утичу на фетали раст и развој (355).

Интраутерусна смрт плода (*intrauterine fetal death – IUFD; fetus mortus in utero–FMU*) према критеријумима светске здравствене организације (*World Health Organization–WHO*) дефинише се као одсуство срчане радње плода, након 26 НГ, односно плода чија је телесна тежина изнад 1000 gr (288). RCOG дефинише FMU као касну интраутерину смрт фетуса након комплетних 24 НГ, док се мртворођеност дефинише као рођење детета без знакова живота након 24 НГ (356). Етиологија IUFD може бити матерналног порекла и феталног порекла (288, 311). Већина истраживања показује да је највећи број IUFD последица поремећене плацентације или њених компликација (288). Присуство тромбофилије је значајно повезано са појавом IUFD (290) и она вероватно доприноси индиректно феталној смрти преко плаценте инсуфицијенције и компликација које она изазива (288, 357). У највећем броју истраживања тромбофилија је јаче повезана с

каснијим губицима трудноћа (после 10 НГ) у односу на ране губитке трудноћа (357). Мени (*Manu*) и сарадници (99) у групи трудница с FMU одредили су преваленцу урођене тромбофилије од 42,5% у односу на преваленцу од 15% у контролној групи здравих трудница, док Ковач и сарадници (358) бележе у групи трудница с FMU присуство 54,5% тромбофилије. Из већег броја различитих студија дошло се до података о повезаности и чешћег присуства FV Leiden (296, 359) и протромбин варијанте (296, 360, 358, 361, 362), PS дефицијенције (359) и антикардиолипинских антитела са појавом FMU (296, 363). Студије налазе да у је групи жена са FMU најчешће заступљена протромбин G20210A варијанта (359, 358, 361). Престон и сарадници (345) су учили да је код жена с комбинованом тромбофилијом 14,3 пута повишена шанса за FMU него код носилаца појединачних мутација. Тако се бележи да је шанса за FMU повишена код присутне AT дефицијенције 5,2 пута, код PC дефицијенције 3,3 пута, код дефицита PS 3,3 пута и код фактор V Leiden мутације 2 пута (345). Хомозиготни или хетерозиготни носиоци PAI-1 мутација имају 2,4 пута повишен ризик за FMU (288).

Код трудница са тромбофилијом у нашем истраживању налази претходних трудноћа, приказани у Табели 2, показали су статистички значајно вишу заступљеност спонтаних побачаја у кохорти трудница са тромбофилијом у односу на здраве труднице (81,1% vs. 16,2%), што је у сагласности са подацима из литературе (288). Поред тога, у нашем истраживању у претходним трудноћама у кохорти с тромбофилијом нађено је више поновљених спонтаних побачаја (24,3% vs. 2,7%), док је просечан број спонтаних побачаја био значајно виши у односу на здраву контролну групу (Табела 2). Инциденца RPL (два и више спонтаних побачаја) у нашој студији код трудница са тромбофилијом од 24,3% (Табела 2) је слична са литературним подацима од 26% забележених код носилаца урођене тромбофилије (312). Фреквенца афицираних особа са присуством претходних спонтаних побачаја од 48,65% (36/74) у целој испитиваној популацији (Табела 2) виша је у односу на литературне податке (15-25%), док је учесталост трудница са претходним поновљеним спонтаним побачајима (два и више) од 1,35% (10/74) нешто нижа (Табела 2) него забележени подаци за популацију жена репродуктивне доби (око 5%) (290, 311, 342).

У нашој FMU у претходним трудноћама забележен је само у групи с тромбофилијом у 10,8% (4/37) случајева, док код здравих трудница није забележен ниједан

(0/37) случај FMU у претходним трудноћама (Табела 2), што је била статистички значајна разлика.

ABO локус се налази на дугом краку хромозому 9 (9q34.1-q34.2), састоји се од 7 егзона и кодира 3 алела. Продукти А и В алела су различите гликозилтрансферазе (А-трансфераза и В-трансфераза) неопходне у синтези А и В антигена, док О алел не кодира функционални ензим, па особа са О крвном групом нема А и В антигене (364). Још је од 1960-их година забележен утицај АВО система на хемостазу, пре свега одређујући ниво vWF фактора у плазми. АВО крвне групе представљају важну детерминату вредности vWF и фактора VIII у плазми. Око 30% варијације нивоа vWF/фактор VIII у плазми одређено је генетичким варијацијама АВО система. Познато је да је код индивидуа с крвним групама различитим од О ниво vWF у плазми повишен за око 25% у односу на индивидуе с другим крвним групама (365). Ниво vWF у плазми јако је повезан са ВТЕ, тако што утиче на адхезију, агрегацију тромбоцита и стабилизацију фактора VIII у плазми (366).

Према подацима досадашњих судија присуство свих крвних група, осим О крвне групе АВО система сматрају се факторима ризика за настанак ВТЕ (367, 365, 364). Показано је да овај ризик расте у присуству тромбофилије. Тако носиоци крвних група А, В и АВ имају скоро 3 пута повишени ризик за дубоку венску тромбозу у односу на носиоце О крвне групе, а у присуству тромбофилије овај ризик је виши седам пута код А, В и АВ крвних група у односу на испитанике који су О крвна група и немају тромбофилију (367). Запажа се да, иако је релативан ризик за ВТЕ везан за присуство АВО крвних група нижи него ризик везан за присуство фактор V Leiden генске варијанте, постоји утицај високе популационе заступљеност „non-O“ крвних група у односу на фактор V Leiden јер је преваленца код белаца „non-O“ крвних група приближно око 54% (364). Коен (*Cohen*) и сарадници у свом истраживању из 2012. године наводе податак да индивидуе са АВ крвном групом имају четири пута, а у комбинацији с тромбофилијом високог ризика, 14 пута повишени ризик за ВТЕ у односу на индивидуе са крвном групом О које немају тромбофилију. Запажа се да је код индивидуа са АВ крвном групом највиши ниво vWF у односу на друге крвне групе. Индивидуе са А и В крвном групом имају средње повишени ризик (1,6 и 1,8 пута) у односу на О крвну групу. Аутори закључују да АВО крвне групе модификују ризик за ВТЕ код породица са урођеним тромбофилијам (364). Мета–анализа већег броја студија је показала повишени ризик за ВТЕ код „non-O“ крвних група између

1,26 до 3,92. На основу прикупљених података укупни удружени OR је био 1,79 (95% CI 1.56–2.05), док је за индивидуе које су такође биле и носиоци фактора V Leiden удружени OR износио 3,88 (95% CI 2.51–6.00) (368). Запажено је да је током трудноће и пуерперијума код жена са А и АВ крвном групом у односу на жене са О крвном два пута повећан ризик за ВТЕ, док повећан ризик није запажен за жене са В крвном групом групом (369).

Резултати наше студије у погледу доминантне заступљености „non-O“ крвних група код трудница с тромбофилијом се слажу с подацима добијеним из студија које су проучавале заступљеност крвних група АВО система код пацијената с ДВТ. Код већине трудница с тромбофилијом у студији заступљене су „non-O“ крвне групе (30/37, 81,1%), с доминантно заступљеном А крвном групом и најређе заступљеном АВ крвном групом (Табела 3). У групи здравих трудница забележена је скоро једнака заступљеност О крвне групе и „non-O“ крвних група (51,4 vs. 49,6, Табела 3), што су налази слични са инциденцама у општој популацији беле расе (364). Наша студија је показала на основу прикупљених података из претходних трудноћа да је код „non-O“ крвних група релативан ризик за настанак спонтаних побачаја и за FMU увећан за по 1,2 пута.

Хормон PAPP-A који кодира хумани PAPP ген, ослобађа се из плаценте трудних жена, али је укључен и у локалне пролиферативне процесе, па се може наћи током зарастања рана у тестисима, бубрезима, колону, глатким мишићним ћелијама и у кожи, учествује у ремоделовању костију и има улогу у инфламацији (370). PAPP-A је металопотеиназа која исеца IGFBP-4 (енгл. *insulin-like growth factor binding proteins-4*) и делује као активатор IGF-1 (енгл. *insulin-like growth factor-1*), који је важан фактор у патогенези артеросклерозе (371, 372). Различита истраживања наводе вредности PAPP-A као користан показатељ у популацијама које су под повишеним ризиком за настанак нежељених кардиоваскуларних догађаја (313). Показано је да је повишена концентрација PAPP-A у циркулацији присутна код акутног коронарног синдрома и да постоји значајна корелацију између концентрације PAPP-A у крви и кардиоваскуларног ризика код пацијената са дијабетесом тип 2 (372, 373).

У студији која се бавила утицајем урођене тромбофилије на вредности биохемијских маркера Дабл теста, нађено је да су код трудница са урођеном тромбофилијом измерене PAPP-A вредности биле статистички значајно више, док су

вредности за fbHCG и NT биле значајно ниже (374). У сличној студији којом је мерен ефекат урођене тромбофилије на биохемијске маркере Трипл теста (енгл. *Triple test*) нађено да су вредности за некоњуговани естриол биле значајно ниже код трудница са урођеном тромбофилијом (375), док до оваквих података не долазе Френк (*Frank*) и сарадници (376), већ налазе значајно повишену само концентрације hCG код трудница са стеченом тромбофилијом.

Нашом студијом је у складу са претходим истраживањима показано да су статистички значајно повишене вредности PAPP-A присутне у кохорти са ризиком за настанак тромбоза у односу на здраву кохорту, док су вредности за fbHCG и NT биле ниже код трудница са тромбофилијом, али разлика између група за ове маркере није била од статистичког значаја (Табела 4).

У литератури се бележе разлике у преваленцама урођене дефицијенција антикаогулантних протеина и тромбофилних генских варијанти између различитих изучавани популације. Разлике у подацима се могу наћи између опште популације и популација са присуством одређених обољења, али се бележе и полне, расне и етничке разлике. Тако се код Европљана као најчешће урођене тромбофилије бележе генске варијанте за фактор V Leiden G1691A и фактор II G20210A, док се код Азијата најчешће могу наћи дефицијенције PS и PC, а у неким етничким групама и AT дефицијенција (377, 378, 379, 380).

Код 4% породица са тромбофилијом, 2% пацијената са тромбоемболизмом (381) и код 1-8% пацијената оболелих од ДВТ (130, 135, 159) може се наћи хетерозиготна AT дефицијенција. Код популације немачких жена са историјом тромбоемболизма током трудноћа и пуерперијума нађено је присуство око 10% AT дефицијенције средњег и тешког степена (382). У нашој изучаваној популацији није било носилаца AT дефицијенције (Табела 5).

Код 3% болесника са ВТЕ и 6% породица са урођеном тромбофилијом присутна је урођена хетерозиготна PC дефицијенција (331). Забележене вредности преваленце PC дефицијенције у изучаваној кохорти трудница са тромбофилијом у нашој студији од 2,7% (Табела 5) су нешто ниже него литературни подаци за породице са тромбофилијом, али више него у општој популацији (0,2-0,3%)(190).

Код 1-13% код пацијената с венским тромбоемболизмом и 2-12% код пацијената с тромбофилијом присутна је урођена PS дефицијенција (381). У узорку жена из Немачке, са тромбоемболизмом у трудноћи и пуерперијуму, нађено је присуство 15% дефицијенције PS (382), док је у нашем истраживању забележено присуство 18,7% носилаца PS дефицијенције у групи трудница са тромбофилијом (Табела 5).

Мутација за фактор V Leiden је присутна у Европи с преваленцом која варира од 10-15% у популацијама Шведске и Грчке, до 2-3% у Италији и Шпанији. Код пацијената с првом епизодом ДВТ је присутна у око 15-20%, а код рекурентних тромбоза или естроген зависних тромбоза у око 40-50% случајева (383). У нашој кохорти трудница са тромбофилијом хетерозиготни носиоци FV G1691A варијанте били су присутни у 5,4% случајева, што је ниже него подаци за пацијете са рекурентни тромбозама (383), док су алелска и геотипска фреквенца (2,7% и 5,4%, Табела 5 и 6), биле сличне фреквенцама (2,9% и 5,8%) у здравој српској популацији (310).

Међу 6,2% болесника са венским тромбозама и 18% болесника са рекурентним тромбозама и појавом тромбоза у породици бележи се присуство FII G20210A генске мутације (193, 219). Преваленца мутираног алеле FII G20210A од 2,7% у групи трудница са тромбофилијом у нашем истраживању (Табела 6) није се разликовала у односу на здраву српску и светску популацију (2,1% и 2-3%) (310, 135), али је налаз био нижи у односу присуство код око 6% популације, оба пола, са тромбофилијом (310). Налаз преваленце хетерозиготних носилаца FII G20210A генске варијанте од 5,7% у испитиваној кохорти (Табела 5 и 6) није се разликовао у односу на забележене податке за здраву српску и светску популацију (5,75% и 4,2%)(96, 40), док је био нешто нижи и односу на преваленце међу жена са RPL у северним регионима Србије (7%)(358) и у складу са резултатима студија из Турске и Израела (98, 99, 100, 101).

Код здравих људи MTHFR C677T генска варијанта је присутна с релативно високом учесталошћу (30-50% хомозигота и 9-12% хетерозигота) (4,11). Хомозиготи TT су присутни у свакој популацији и етничкој групи. Учесталост ове мутације код Европљана је око 24%-40% (193). У нашем истраживању фреквенца носилаца MTHFR C677T генске варијанте код трудница са тромбофилијом износила је 48,6%, а алелска учесталост 28%, што је нешто више у односу на европски просек (Табела 5 и 6).

У нашој студији фреквенца PAI-1 4G мутиране алелске варијанте код трудница са тромбофилијом износила је 59% што је слично забележеној фреквенци 4G алела код пацијената са венским тромбоемболизмом у хрватској популацији (57%), док је присуство PAI-1 4G генотипа хетерозигота и хомозигота (43,2% и 37,8%, Табела 5 и 6) у складу са подацима за здраву популацију са територије Србије (119), али нешто ниже него код пацијената са тромбоемболизмом из Хрватске (51% хетерозигота и 31% хомозигота). Као и у нашем истраживању, Алфиревић и сарадници долазе до резултата о непостојању разлике у алелској и генотипској фреквенци између групе са венским тромбоемболизмом и здраве контроле у хрватској популацији (384).

Једно од основних обележја хумане популације је присуство интериндивидуалних разлика у базалној фреквенци МН (7). HUMN пројекат (9, 37) дао је податке да је општа медијана базалне МН фреквенце 6,5МН/1000БН са измереним интеркавртилним опсегом између 3-12 МН/1000БН. У истраживању Копјар и сарадници (7) налазе да је у здравој хрватској популацији оба пола средња вредност фреквенца МН  $6,90 \pm 3,32$ , медијана 7МН, опсег измерених вредности од 8-18МН/1000БН и интеркавртилни опсег 4-8 МН/1000МН.

У нашем истраживању просечна вредност фреквенце МН за целокупну испитивану популацију износила је  $6,09 \pm 4,781$  МН/1000БН, медијана 4,5МН/1000БН, а највећи број измерених вредности је био у опсегу између 2-8МН/1000БН (Табела 9, Графикон 9). Просечна МН фреквенца је биле у границама измерених за општу популацију, док је медијана фреквенце МН у целој изучаваној популацији на почетку трудноће била нешто нижа.

Запажено је да варијабилност у базалној фреквенци МН зависи од фактора домаћина и од изложености егзогеним мутагенима и канцерогенима. Фактори којим могу да утичу на фреквенцу МН су и пол, животне навике као што су пушење, конзумација алкохола, унос одређених лекова и витамина, коришћење наркотика, гојазност, физичка активност, предиспозиција ка одређеним болестима, а могу бити и под утицајем генетичких фактора (7, 21, 27).

Већи број студија утврдио је позитивну корелацију фреквенце МН и година живота (38, 39, 40, 41, 329, 330). У нашој студији учествовале су жене репродуктивне доби, са распоном година између 21 и 39 (медијана 30 година). Између кохорте са тромбофилијом

и здраве кохорте није постојала разлика у годинама, односно две кохорте су биле усклађене према годинама живота (Табела 1).

Међугрупна анализа у нашој студији је показала постојање статистички значајно више фреквенце свих цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) у групи трудница с тромбофилијом пре увођења антикоагулантне терапије (Табела 10, Графикони 10, 11 и 12), као и постојање унутар групне разлике у фреквенци различитих цитогенетичких биомаркера у зависности од присуства различитих егзогених и ендогених фактора ризика (Табела 11). Тако се у групи трудница са тромбофилијом запажају статистички значајно више фреквенце МН код испитаница са претходним спонтаним побачајима ( $13,0 \pm 6,38$  vs.  $7,97 \pm 4,56$ ), повишеним индексом телесне масе ( $12,50 \pm 6,72$  vs.  $7,93 \pm 4,54$ ) и код носилаца „*non O*“ крвне групе ( $9,61 \pm 5,55$  vs.  $5,33 \pm 1,37$ ) у односу на контролне групе (Табела 11).

Литературни подаци показују да МН може бити користан прогностички маркер успешности трудноће пружајући информацију о геномској нестабилности у оквиру родитељског и/или феталног ткива (1). Присуство повишених вредности фреквенце МН код пацијенткиња са RPL у односу на контролну групу забележено је у већем броју истраживања (13, 14, 95). Показао је да више фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви оца и мајке повећавају ризик за појаву RPL, што указује да је оштећење ДНК код оба пола значајан фактор ризика за RPL (358). Резултати наше студије су показали да је степен хромозомске нестабилности код трудница с тромбофилијом, мерен фреквенцом МН, виши код трудница које су имале претходне спонтане побачаје у односу на оне које нису имале спонтане побачаје у претходим трудноћама (Табела 11).

Подаци из литературе показују значајан утицај начина живота и исхране, како на настанак, тако и на превенцију оштећења генома, тако да унос одређених микронутријената у препорученим дозама, здрав начин живота и редовна физичка активност могу значано да редукују фреквенцу МН (42, 55), док се присуство гојазности као природне последице неумерене исхране и слабе физичке активности (58) доводи у везу с порастом нивоа оксидативног стреса који може узроковати оштећења ћелијских биомолекула, укључујући и ДНК. У студији која је користила Комет тест (енгл. *single-cell gel electrophoresis – Comet assay*) показано је да је ниво ДНК оштећења пет пута су виши код гојазних особа у односу на контролу са нормалном телесном масом (386), док је код предгојазне и гојазне деце запажена 2,5-2,7 пута виша спонтана фреквенца МН у поређењу



с децом нормалне тежине (58). Истраживања показују да су вредности цитогенетских биомаркера МН, НПМ и НП у позитивној корелацији са ВМІ (387), што се може објаснити тиме да присуство вишка масног ткива представља извор повишеног оксидацион стреса, тако што адипоцити и преадипоцити у великој мери продукују проинфламаторне цитикине (TNF-alpha, IL-1 beta и IL-6), који стимулише генерацију ROS или реактивних азотних врста (енгл. *reactive nitrogen species – RNS*) и доводе до стања оксидативног стреса (388).

Резултати наше студије показали су да је у кохорти са тромбофилијом на почетку трудноће постојала значајно виша фреквенца МН код трудница са повишеном телесном масом ( $BMI \geq 24,99 \text{ kg/m}^2$ , Табела 11).

Присуство значајно више фреквенца МН у нашој студији код носилаца „non O“ крвне групе у кохорти трудница са тромбофилијом (Табела 11) може се објаснити повишеним ризиком за ВТЕ, који у присуству тромбофилије расте више пута пута, што је одраз синергизма ова два фактора (364, 365, 367).

Студије које су се бавиле анализом утицаја пушења на МН фреквенцу показале су контрадикторне налазе. Тако су студије коју су спровели Копјар и сарадници, као и Нефић и сарадници показале да пушачи имају статистички значајно вишу фреквенцу МН у односу на непушаче (40). Међутим у већини истраживања није показана веза између пушења и пораста МН фреквенце. HUMN пројекту Фенек и сарадници су дошли до закључка да код пушача нема пораста фреквенце МН у лимфоцитима периферне крви и да се значајно повећање фреквенце МН уочава само код пушача који пуше више од 30 цигарета дневно (9).

Употреба дувана је водећи фактор ризика за настанак бројних хроничних незаразних болести, укључујући и малигне болести (389). Упркос добро познатим и у литератури потврђеним негативним ефектима по здравље пушење је широко распрострањено, а према подацима Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ за 2013. годину учесталост пушења у Србији код становништва изнад 15 година износила је 34,7%, што је било изнад европског просека (389). У Канади и САД на годишњем нивоу бележи се 10% трудница које употребљавају дуван (390, 391). Сматра се да је дим цигарета један од најјачих срединских модификатора ДНК метилације (392). Показано је да дувански дим цигарета модулира ефекат ДНК метилтрансферазе 1 (енгл. *DNA methyltransferase 1 - DNMT1*), ензима који катализује метилацију ДНК, како на нивоу

транскрипта, тако и на нивоу протеина, и ензимску активност посебно у различитим типовима ћелија, док двоструки прекид ДНК може бити индукован карциногеним састојцима дуванског дима (арсен, хром, формалдехид, полициклични ароматични угљоводоници и нитрозамини). У експериментима са мишевима показан је утицај на метилацију ДНК преко ефекта никотина, који се везује за ацетилхолинске рецептор, што повећава интрацелуларни калцијум и доводи до опадања активности цикличног аденозин монофосфата (енгл. *cyclic adenosine monophosphate* – *cAMP*), кључног транскрипционог фактора и последице утиче на опадање DNMT1 експресије у неуронима мишева (393). ДНК-везујући протеин, као што је Sp1, који се активира димом цигарета, је транскрипцијски фактор који се везује за GC-богате мотиве у промотерима гена и штити од метилације CpG. Студије показују да је ДНК метилација значајно нижа код пушача у односу на непушаче (394).

У нашем истраживању је утврђено да је број жена које су користиле дуван пре трудноће био једнак у обе испитиване кохорте (укупно 37,84%, Табела 1) што је било слично налазу за популацију у Србији (389). Број жена које су користиле дуван током трудноће је био нижи у обе кохорте (укупно 18,9%, Табела 1), али је нађена учесталост била виша него забележени подаци у свету (390, 391). У овом истраживању није постојала значајна разлика у броју пушача у трудноћи између две кохорте (Табела 1). Запажа се да је просечна дневна конзумација цигарета (број цигарета/дан) у обе кохорте била с вишим вредностима пре трудноће, него током трудноће. Резултати наше студије су показали да су у обе групе трудница које су пушиле пре и током трудноће запажене више фреквенце МН, али ова разлика није била од статистичког значаја (Табела 11). Код здравих трудница које су пушиле у трудноћи запажене су статистички значајно више фреквенце НП, док је у оквиру кохорте с тромбофилијом у групи пушача пре трудноће фреквенца НП била значајно виша у односу на непушаче ( $1,79 \pm 1,25$  vs.  $0,96 \pm 1,02$ , Табела 11).

Алкохол је доказан тератогени агенс који утиче на нормални ембрионални и фетални развој и укључен је у патогенезу феталног алкохолног синдрома. Није познато која количина конзумираног алкохола у трудноћи је безбедна, али постоје докази да чак и мале количине алкохола могу да нашkode плоду (32). Познато је да етанол може лако проћи фето-плаценталну баријеру у оба смера и на овај начин може доћи до изједначавања концентracија алкохола у феталној и матерналној циркулацији (395).

Токсичност алкохола се не огледа само у директном ефекту етанола, већ и у индиректном ефекту његових метаболичких продуката и ROS које се појављују током његове биотрансформације (62). Створени NADH при реакцијама метаболизма етанола се у митохондријама реоксидише до  $\text{NAD}^+$ , што може да доведе до даљег пораста ROS, док конверзија ксантин дехидрогеназе у ксантин оксигеназу индукована алкохолом такође може генерисати ROS (61, 396, 397). Изложеност етанолу може да смањи интрацелуларни антиоксидациони капацитет путем промене активности ендогених антиоксидативних ензима, што за последицу може имати смањену елиминацију ROS (131).

Студије на анималним моделима су показале да алкохол узрокује појаву оксидативног стреса при чему ROS реагује с протеинима, липидима и ДНК узрокујући њихово оштећење или потпуну деградацију (61), али може бити узрочник поремећаја на епигентском нивоу који доводе до нарушавања координисаног процеса ћелијске диференцијације (398). У неким истраживањима је показано да је фреквенца МН на епителним ћелијама букалне слузнице алкохоличара статистички значајно повишена у односу на аниалкохоличаре (40, 60), да хронична изложеност алкохолу индукује формирање МН у две хумане В лимфобластоидне ћелијске линије: WIL2-NS и GM13705 (63), док друге не налазе статистички значајну разлику у фреквенци МН између алкохоличара и контролне групе, али се налази значајна разлика у изменама сестринских хроматида (енгл. *sister chromatid exchange* – SCEs) и хромозомским аберацијама (енгл. *chromosomal aberrations* – CAs) (399).

У испитиваној популацији највећи број трудница није користио алкохол (90,54%), шест трудница је користило повремено (8,11%), а једна трудница (1,35%) седмично (Табела 1). У кохорти са тромбофилијом фреквенце МН, НПМ и НП нису биле статистички различите између групе које је конзумирала алкохол и групе која није конзумирала алкохол у трудноћи (Табела 11). У здравој кохорти постојала је статистички значајно виша фреквенца МН код трудница које су конзумирале алкохол у односу на групу која није конзумирала алкохол, док су за остале цитогенетичких биомаркере (НПМ и НП) забележене више фреквенце, али разлика није била статистички значајна (Табела 11). С обзиром да у нашој испитиваној групи већина трудница није конзумирала алкохола нити је било хроничне употребе, није забележен значајан утицај на пораста цитогенетичких биомаркера код већине трудница.

Канцер се сматра генетском болешћу повезаном са акумулацијом хромозомских аберација. Хипотеза да је повишена фреквенца МН у хуманим ткивима предиктивни биомаркер ризика за настанак карцинома у популацији здравих субјеката потврђена је у HUMN пројекту (9). Студије су показале да је код оболелих од карцинома дојке и утеруса и њихових рођака првог степена сродства присутан пораст фреквенце МН у ћелијама букалне слузнице у односу на здраву контролу (40). Значајан пораст фреквенце МН у ћелијама букалне слузнице детектовано је код пацијената са карциномом дојке, карциномом плућа, карциномом врата материце и лимфомом, Non-Hodgkin (40, 52, 75). Код карцинома дојке геномска нестабилност повезује с мутацијама у BRCA1 и BRCA2 генима, који су значајни у репарацији дволанчаних прекида ДНК (70). У студији Стошић и сардници (11) налазе да је највећа МН фреквенца забележена код жена с карциномом грлића материце (Ca in situ/Cainvasivum) и да фреквенца МН расте с порастом степена сквамозних интраепителијанх лезија (11).

У кохорти са тромбофилијом у нашем истраживању вредности сва три цитогенетска бимаркера су била повишена код трудница чији су рођаци имали карцином у односу на контролну групу, али разлика није била од статистичког значаја, док се у здравој кохорти код трудница с присуством карцинома код рођака запажа статистички значајно виша фреквенца МН и виша фреквенца НПМ без статистичке значајности (Табела 12).

Повишена фреквенца МН се повезује с могим болестима. Тако је нађено да се код оболелих од коронарних артеријских обољења (енгл. *coronary artery disease – CAD*) бележи повишена фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви која је позитивно корелисана са присуством и тежином CAD (56, 400). Код неких аутоимунских болести, као што је дијабетес тип 1, које се карактеришу континуираном продукцијом аутоимунских антитела и повишеним нивоом оксидативног стреса као последица локалне или системске инфламације, измерена је значајно повишена фреквенца МН (401). Код дијабетеса тип 2 детектована је значајна корелацију повишене МН са присуством болести (56), што се објашњава високом продукцијом ROS насталих аутооксидацијом глукозе и неензиматском гликозилацијом код пацијента са слабом гликемијском контролом, што за последицу може убрзати оксидативно оштећење макромолекула, укључујући и ДНК.

У испитиваним кохортама у нашој студији није било значајне разлике у фреквенцама цитогенетичких биомаркера између група чији су рођаци имали тромбозе у

односу на контролну групу (Табела 12). Исти налази су нађени при поређењу са групама чији су рођаци боловали од коронарних артеријских болести, имали инфаркт, имали дијабетес тип 2 у односу на труднице које у породици нису имале ова обољења (Табела 12). Значајна разлика је запажена за фреквенцу НПМ код здравих трудница чији су рођаци имали дијабетес тип 1 у односу на здраве труднице које нису имале оболеле рођаке (Табела 12).

Фреквенца МН у лимфоцитима периферне крви показују позитивну корелацију с нивоом хомоцистеина у плазми и присуством тромбофилне МТНFR 677Т генске варијанте (65). Литературни подаци показују да је један од гена асоциран с метилационим нивоом управо тромбофилни МТНFR полиморфизам. Овај ензим у метаболизму хомоцистеина катализира редукцију  $N^5,N^{10}$ -метил- $FH_4$  у  $N^5$ -метил- $FH_4$  који је донор метил групе за реметилацију хомоцистеина у метионин (402). МТНFR С667G генска варијанта даје термолабилну форму ензима са смањеном ензиматском активношћу, тако да хомозиготи ТТ имају нижи ниво ДНК метилације у односу на хетерозиготе СС (403) уз истовремено присутну повећану склоност ка тромбозама.

С обзиром на то да је МТНFR С677Т варијанта повезана с присуством тромбофилије, можемо закључити да се код трудница с тромбофилијом који су носиоци ове генске варијанте може очекивати пораст фреквенце МН. Шошић и сарадници (10) су показали да је тромбофилија значајни предиктор повишене фреквенце МН ( $>4,5$ МН/1000БН) код трудница у првом триместру гестације.

Анализа утицаја различитих фактора на базалне фреквенце цитогенетских биомаркера на почетку трудноће пре примене антикоагуланте терапије, показала је за целу испитивану популацију у нашој студији постојање јаке позитивне корелације између вредности фреквенце МН и тромбофилије (Табела 14). Остале забележене корелације су биле средње и слабе јачине. Анализом резултата појединачних утицаја као значајни предиктори фреквенце МН у нашој студији издвајају се тромбофилија мајке, претходни спонтани побачаји и „non O“ крвна група, док се анализом свеукупног утицаја фактора од значаја издваја само тромбофилија као предиктор фреквенце МН у испитиваној групи (Табела 15). Такође се у мултиваријантној анализи као значајни предиктор фреквенце НПМ и НП издвојила тромбофилија (Табела 16 и 17).

Велики број фактора могу утицати на промену структуре ДНК, као што су UV зрачење, ROS, RNS или хемијске супстанце из спољашње средине. У просеку ДНК сисарских ћелија дневно претрпе 200 дезаминација цитозина, 3000 метилација гуанина, 10000 спонтаних депуринација, оксидативних оштећења и једноструких ланчаних прекида и 10-50 двоструких ланчаних прекида ДНК (404). Карактеристично за сисарске ћелије је да сваки тип ДНК аберација има јединствени одговор у виду система детекције и репарације, тако да геномској стабилности не доприноси само регулација генске експресије путем транскрипционих фактора и епигентских механизма, него и у великој мери систем поправке ДНК оштећења (404). Одржавања хомеостатског нивоа ROS од виталног је значаја за ћелијску пролиферацију и друге ћелијске функције. Када ниво ROS превазиђе антиоксидантне капацитете настаје оксидативни стрес који има не само негативан ефекат на ДНК репараторне механизме, путем инхибиције различитих ДНК репараторних ензима, већ долази и до оштећења ћелијских макромолекула као што су липиди, протеини и ДНК. ROS изазивају најмање 100 различитих типова ДНК лезија које укључују базне модификације као што су 8-охо-dG, 8-nitro-dG или трансферзије GC у TA, једноланчане и дволанчане прекиде ДНК и стварање међуланчаних мостова у молекулу ДНК (405). Тако се у истраживању које је користило третирање са H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, култура ћелија доводила у стање оксидативног стреса који је индуковало појаву MN позитивних на фосфорилисани хистон ( $\gamma$ -H2AX) (405) који представља биомаркер двоструких прекида ДНК и геномске нестабилности (406).

Доказано је да повећано оштећење ДНК укључено у многе патолошке процесе, укључујући и компликације трудноће. Велика је вероватноћа да је заједничка основа патологије UPI оштећење ДНК, јер је могуће да се тиме умањи репликативни капацитет трофобласта и самим тим поремети инвазија децидуе и спиралних артерија на почетку трудноће (1). Код здраве трудноће ROS и антиоксиданси налазе се у равнотежи и оштећења ДНК се репарирају ефикасно. Ипак, трудноћа је проинфламаторно стање које показује повећану подложност оксидативном сресу, тако да овај баланс лако може бити нарушен (1, 92).

У тромбофилији присутни протромботски фактори и микротромбови могу довести до исхемије, повреде крвних судова и повећане продукције ROS. Маглић (288) код мајки с тромбофилијом у условима обољења бележи повишену продукција ROS и налази да је

$H_2O_2$  главна реактивна кисеонична врста која излаже плаценту мајке оксидационом стресу. С обзиром на то да активности ензима супероксид дисмутаза ( $CuZnSOD$  и  $MnSOD$ ), који производе  $H_2O_2$ , није повишена у ткиву плаценти мајки с тромбофилијом у односу на контролну групу, аутор закључује да постоји експлацентално порекло водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) који може потицати из мајчине или феталне циркулације, амнионске течности или глатке мускулатуре утеруса. Међутим, Пристов и сарадници (298) налазе да су активности каталаза и супероксид дисмутаза код фетуса, као и аскорбил радикала у амнионској течности, биле сличне код здравих и трудница с тромбофилијом, на основу чега закључују да  $H_2O_2$  који изазива оксидациони стрес у плаценти, може бити дистрибуиран из мајчине крви или ендотелијума, односно да је продукција  $H_2O_2$  иницирана протромботским стањем у мајчиној циркулацији везаним за тромбофилију (298). Оксидативни стрес као последица присутне тромбофилије даље активира каскаду догађаја које узрокује вазоконстрикцију, леукоцитну адхезију, оксидацију мембране и даље прокоагулацију (407), тако да сваки од ових појединачних процеса даље доводе до генерације ROS (28).

Терапија избора у трудноћи компликованој тромбофилијом су нискомолекуларни хепарини – LMWH који се добијају ограниченом хидролизом стандардног хепарин (делтапарин натријум, еноксапарин, надропарин-калцијум и ревиварин). Према званичним препорукама Америчког удружења опстетричара и гинеколога (*American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG*), тромбопрофилактика се у трудноћи спроводи као антепартална, интрапартална и постпартална (295). Примена LMWH као антикоагулантног агенса се препоручује у трудноћи због немогућности трансплаценталног трансфера услед високе молекулске тежине, непостојања тератогеног дејства и минималних нежељених ефеката (408).

Већи број студија је показао позитиван утицај терапије LMWH на исходе трудноћа код трудница с тромбофилијом и претходним компликацијама трудноћа. Тако Арачић и сарадници (406) посматрајући исходе трудноћа између група трудница с конвенционалним тромбофилијама (мутације FVLeiden, протромбин G20210 и дефицијенције АТIII, PS, PC) и новим мутацијама (MTHFR C677T, PA-1 и ACE полиморфизими) долазе до резултата да терапија LMWH значајно побољшава исходе трудноћа и снижава стопу спонтаних побачаја независно од типа тромбофилије, док се у односу на специфичне компликације у групи конвенционалних тромбофилија при терапији са LMWH снижава инциденца IUFD, а

у групи нових тромбофилија редукује инциденца IUGR, IUFD и превремених порођаја. На основу ових података аутори препоручују скрининг на варијанте нових тромбофилија (406). И друге студије су показале ниску стопу мртворођености (6,6%), односно успешан исход трудноћа (96,6%) у којима је примењивана LMWH терапија као тромбопрофилактика код пацијенткиња с тромбоемболијски ризиком (408, 409). Маглић у свом истраживању налази појаву абрупције плаценте код 6,3% трудница са урођеном тромбофилијом које су примале LMWH у односу на 18,52% трудница са урођеном тромбофилијом које нису примале LMWH. У овој студији је показано да је примена LMWH терапије допринела значајном повећању броја порођаја и смањењу IUGR. Након увођења LMWH у ову групу само је једна трудница (1,6%) имала интраутерусну смрт плода са IUGR и абрупцијом постељице. У нашем истраживању није постојала разлика у исходима трудноћа између здравих породиља и породиља с тромбофилијом које су на терапији са LMWH (Табела 28). Највећи број трудноћа у обе групе је завршен порођајем, а стопа живорођености код мајки на тромбопрофилактици је износила 94,6%, док је стопа спонтаних побачаја износила 5,4% (Табела 27), што је у складу са досадашњим сазнањима о ефектима LMWH на исходе трудноћа компликованих тромбофилијом. Такође позитиван утицај терапије LMWH на успешан исход трудноћа може се приказати и кроз непостојањем разлика у живорођености, порођајној гестацији, порођајној тежини и АПГАР скору између неонатуса мајки са тромбофилијом, које су током трудноће биле на тромбопрофилактици и неонатуса здравих мајки у нашој студији (Табела 28).

Показано је да су најчешће матерналне и феталне компликације у групи трудница које су примале LMWH због различитих индикација биле хипертензија и IUGR (409). У нашој студији забележена је статистички значајна виша појава компликација у трудноћи (PIN, DMG и анемије) у групи на тромбопрофилактици у односу на здраву контролу (Табела 27). Тако се појава компликација у трудноћи бележи код 40,5% трудница на тромбопрофилактици. Најчешће је била присутна анемија код 18,9%, DMG код 16,2% и PIN код 16,2% (Табела 27). Труднице на тромбопрофилактици су имале 11 пута већу шансу да развију ове компликације у односу на здраве труднице. У нашој студији стопа компликација у трудноћи се није разликовала између испитиваних група, тако је у групи на тромбопрофилактици забележена абрупција плаценте само код једне труднице (2,7%), док је у здравој групи евидентиран један IUGR (2,7%, Табела 27).



Маглић у свом истраживању налази да је гестацијска хипертензија најчешће присутна код пацијенткиња с хомозиготном PAI 4G/4G тромбофилијом које нису биле на LMWH терапији, а најчешћа компликација IUGR. Аутор запажа да су пацијенткиње које су носиоци PAI 4G/4G варијанте након увођење LMWH и даље као најчешћу компликацију имале гестацијску хипертензију, иако се укупан број компликација значајно смањио. Наши резултати су слични овим налазима и показали су да је код испитаница на тромбопрофилактици, које су развиле PИH током трудноће, доминантно присутна PA-1 5G/4G генска варијанта (75%, Табела 25).

Тољић и сарадници (94) у свом истраживању налазе повезаност DGM и PИH с повишеним нивоом оксидациног стреса и оштећења ДНК мерено појавом цитогенетичких биомаркера (MН, НПМ, НП) у лимфоцитима периферне крви трудница. Цитогенетички биомаркери су били значајно повишени код обе групе гестацијских болести. Аутори закључују да чак и када су хипертензија и хипергликемија присутне само током трудноће, долази до индукције оксидативног стреса, оштећења ДНК и хромозомских аберација.

Фернес и сарадници (52) су у проспективној кохортној студији истраживали повезаност хромозомских оштећења мајке у 20 НГ са исходом трудноће. Код жена које ће проспективно развити PE и IUGR нађена је значајно повишена фреквенца MН пре настанка симптома болести. Код геномског оштећења од 36,7 MН/1000BH вредност OR за настанак PE и/или IUGR је био 15,97 у целој кохорти. Ипак, иако је специфичност на овом *cut-off* висока, сензитивност је ниска, што значи да ће овај биомаркер идентификовати 99% трудноћа које неће развити PE/IUGR, а регистровати само 14% трудноћа које ће развити PE/IUGR (1). У овој студији пораст фреквенце MН у лимфоцитима периферне крви у патолошким трудноћама доводи се у везу с појавом геномске нестабилности у другим ткивима: с ДНК оштећењем на нивоу *natural killer* ћелија цитотрофобласта, које може штетно утицати на њихову функцију, вијабилност и пролиферацију, а самим тим и модификовати процес плацентације; са оштећењем ДНК у ћелијама трофобласта што може довести до измењене генске дозе и формирање MН, уз истовремени утицај на пролиферативни потенцијал ћелија трофобласта и абнормалну плацентацију; и с присутним плаценталним оксидативним стресом, који је један од кључних механизма у патогенези PE/IUGR. Као што је већ напоменуто плацентални оксидативни стрес као последица дефицита ремоделирања спиралних артерија има за последицу

исхемијско/реперфузијске повреде које служе као окидач инфламаторног одговора и генерацију ROS који индукују хромозомска оштећења и настанка МН (1).

Поред антикоагулантног ефекта, истраживања показују да LMWH поседује и антиинфламаторни ефекат. У животињском експерименталом моделу дубоке венске тромбозе примена LMWH показала је да има значајан ефекат на супресију експресије тумор некрозис-фактора алфа (TNF-alpha), цитокина који учествује у системској инфламацији, чиме се може делимично објаснити антиинфламаторни ефекат LMWH (410). У другом експерименту који је испитивало оштећења ДНК индуковано применом адриамицина на срчаном и бубрежном ткиву пацова, долази се до података да примена LMWH има протективан ефекат на оксидативна оштећења снижавајући ниво оксидационог стреса, смањује цитотоксичан ефекат, тако што доводи до снижавања нивоа NO и RNS, уз истовремени протективни ефекат на апоптотска оштећења ДНК и снижавање нивоа проинфламаторних и проапоптотских цитокина (411, 412).

У нашем истраживању показано је да је фреквенца цитогенетичких биомаркера, као мера хромозомских оштећења повишена код трудница с тромбофилијом на почетку трудноће у односу на здраве труднице (Табела 10). Након вишемесечне примене терапије LMWH код трудница с тромбофилијом дошло је до смањења хромозомске нестабилности мерено статистички значајним падом вредности фреквенци МН и НП у порођају у односу на измерене вредности на почетку трудноће, при чему је посебно забележен велики утицај терапије LMWH на смањење фреквенце МН (Табела 26, Графикон 23). Вредности цитогенетичких биомаркера у порођају нису се статистички значајно разликовале између две кохорте (Табела 18), односно закључује се да је у обе кохорте хромозомска нестабилност у порођају била уједначено ниска. Може се констатовати да примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност, што се објашњава вероватним утицајем терапије LMWH на снижавање нивоа оксидационог стреса и антиинфламаторним ефектом.

Хумани фетуси су *in utero* константно изложени срединским агенсима и лековима који могу проћи кроз плаценту, а неки од ових агенаса могу изазвати оштећење ДНК (97). ЦБМН тест је могуће користити у проучавању оштећења генома код деце након трансплаценталне и постнаталне изложености различитим срединским факторима, као и екциденталним прекомерним изложеностима различитим генотоксинима (15, 98).

Фреквенца МН у лимфоцитима крви пупчаника представља просечну суму геномске феталне нестабилност и *in utero* изложености анеугеним/кластрогеним агенсима. Налази фреквенци МН код новорођенчади су релативно ниске и статистички значајно различите у односу на фреквенцу код оба родитеља, док је медијана фреквенце МН код мајки статистички значајно виша у односу на медијану МН из крви пупчаника новорођенчади (15, 99). Истовремено је присутна значајна корелација фреквенце МН код новорођене деце и фреквенци МН мајке (97, 15).

У нашем истраживању је показана да позитиван ефекат тромбопрофилактике на геномску стабилност мерену цитогенетичким биомаркерима. При вишемечној примени ове терапије у трудноћама компликованим тромбофилијом бележе се значајно ниже фреквенце цитогенетичких биомаркера код трудница и њихових неонатуса (Табела 26, Графикони 23 и 24), у односу на узмерене вредности на почетку трудноће код ових трудница, што нам говори о бенефиту LMWH терапије у смислу повећања геномске стабилности и снижавању степена компликација које се доводе у везу са оштећењем ДНК, као што су PE и IUGR. У порођају није постојала статистички значајна разлика у фреквенцама цитогенетичких биомаркера између породиља са тромбофилијом и здравих породиља (Табела 18), као и између њихове деце (Табела 19). Забележене су ниске фреквенце сва три цитогенетичка биомаркера код неонатуса из обе испитиване кохорте (Табела 19). Испитивањем корелације цитогенетичких биомаркера у крви мајки у порођају и крви из пупчаника неонатуса утврђена је статистички значајна повезаност фреквенци МН и НПМ за целу популацију трудница са фреквенцама МН и НПМ у крви неонатуса (Табела 24). Корелација НП код мајки у порођају постојала је само са фреквенцама НП код неонатуса, док корелисаност није постојала у односу на друге цитогенетичке биомаркере (Табела 24).

До 20% трудних жена пуше цигарете и постоје подаци да одређени метаболити дувана који могу да прођу плаценталну баријеру имају генотоксичан ефекат на фетус. Пренатална изложеност дувану може узроковати IUGR и постнатално повећава ризик од синдрома изненадне смрти, развоја зависности, абнормалности имунског система, гојазности и повезаних кардиометаболичких обољења. Део ових ефеката се могу објаснити модулацијом ДНК метилације по утицајем употребе дувана (390). Дим цигарете садржи угљен моноксид који се везује за хемоглобин и тиме доводи до хипоксије, тако да током пренаталне експозиције, дим цигарета индукује хипоксију у ембриону (390). Подаци

указују да број МН и апоптоличних ћелија расту са дозом изложености benzopyrene-7,8-diol-9,10 и да је фреквенца МН значајно виша у крви пупчаника код мајки које су пушиле током трудноће, односно подржава се хипотеза да компоненте дувана могу да индукују хромозомске губитке и ломове, а што може да се детектује као повишен број МН (70).

Ово се може објасити различитим утицајем пушења цигарета на ДНК метилацију код новорођене деце и одраслих, што у основи указује на могући посебан ефекат директе у односу на индиректну експозицију дуванском диму, као и потенцијални различити ефекат у зависности од узраста (411). Тако је нађено да пушење мајки у трудноћи има утицаја на плаценталу ДНК метилацију и на повишен ниво проинфламаторних цитокина (IL-8) у крви пупчаника неонатуса (412).

У нашем истраживању је утврђено да иако је мали број мајки пушило у трудноћи, и то се није одразило на базалну фреквенцу цитогенетичких биомаркера мајки, пушење током трудноће је имало значајан утицај на повишену фреквенцу НПМ тј. на настанак дицентрика (Табеле 21 и 23), код неонатуса што је у складу са налазима претходних студија о генотоксичном ефекту метаболита дувана.

Присуство предгојазности и обестатаса код мајки на почетку трудноће такође је имало значајан утицај на појаву МН и НПМ код неонатуса (Табеле 21, 22 и 23), што се може објаснити повишеним нивоом оксидационог стреса и нижим нивоом фолата у серуму код гојазних особа (413).

ROC анализа је показала да се при вредностима МН фреквенце већим од 4,5МН може идентификовати више од 4/5 трудница са тромбофилијом (Графикон 26), односно, при вредностима већим од 5,5МН могуће је очекивати да се код више од 70% развије нека од компликација трудноће (PIN, DMG и анемије, Графикон 29). Резултати ове студије показују да одређивање фреквенце МН у раној гестацији може бити користан параметар у праћењу трудноћа и развоју стратегије и адекватне терапије током трудноће.

Ова студија је показала потенцијалан генотоксичан ефекат тромбофилије у трудноћи, као и бенефит терапије LMWH на хромозомску стабилност. Досадашња истраживања говоре о томе да је плацента код трудница са тромбофилијом изложена оксидационом стресу (28). С обзиром да је оксидациони стрес повезан са оштећењем молекуле ДНК, отвара се поље за истраживање нових терапија, пре свега коришћењем антиоксиданаса.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу примене ЦБМН теста у нашем истраживању дошли смо до следећих закључака:

1. Труднице с дијагнозом тромбофилије пре примене LMWH имају значајно вишу базалну фреквенцу цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) у односу на контролну групу здравих трудница, што указује да су хромозомска оштећења и хромозомска нестабилност (прекиди хромозома, губици хромозома или амплификација гена) значајна карактеристика ових пацијенткиња.
2. Најзначајнији предиктор базалне фреквенце МН у целој испитиваној популацији трудница је присуство урођене и стечене тромбофилије.
3. Примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност. Код трудница с тромбофилијом запажа се значајно смањење фреквенце МН, НПМ, НП након вишемесечне LMWH терапије. У порођају нису утврђене значајне разлике у фреквенци МН између трудница на тромбопрофилакти и здравих трудница, док су ове разлике постојале на почетку трудноће, а пре примене LMWH.
4. Хромозомска нестабилност код мајки током трудноће има утицаја на хромозомску нестабилност фетуса. Ово истраживање је утврдило да постоји значајна корелисаност између фреквенци МН код мајки и фреквенци МН код неонатуса, али су фреквенце МН неонатуса статистички значајно ниже у односу на фреквенце МН код мајки.
5. Примена терапије LMWH током трудноће пацијенткиња с тромбофилијом има позитиван утицај на хромозомску стабилност код неонатуса. У нашем истраживању није утврђена разлика у фреквенци МН неонатуса мајки с тромбофилијом које су током своје трудноће биле под антикоагулантном LMWH терапијом и здравих мајки.
6. Одређивање фреквенце МН у раној гестацији може бити користан параметар у праћењу трудноћа и развоју стратегије и адекватне терапије током трудноће.

## 7. ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

#Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминаци у мултиваријантној анализи;

#B – парцијални регресиони коефицијент

A – аденин

a – активирани

ACA, aCL – антикардиолипинска антитела

ACOG – Америчо удружење опстетричара и гинеколога (енгл. *American College of Obstetricians and Gynecologists*)

ADH – алкохол дехидрогеназа

Adjusted  $R^2$  – кориговани коефицијент детерминације

ADP – аденозин дифосфат

ALDH – ацеталдехид-дехидрогеназа

ALDH2 – алкохолна дехидрогеназа 2

ANOVA – анализа варијансе (енгл. *analysis of variance*)

APA, aPL – антифосфолипидна антителиа

APC – активисани протеин Ц (енгл. *activated protein C*)

APSy – антифосфолипидни синдром

APTT – активирано парцијално тромбoplastинско време

AT – антитромбина III

AUC – површина испод ROC криве (енгл. *area under curve*)

B – нестандардизован регресиони коефицијент,

BFB – циклус прекид-фузија-мост (енгл. *breakage-fusion-bridge*)

BMI – индекс телесне масе (енгл. *body mass index*)

BRCA1 – ген за тумор дојке и јаника (енгл. *breast cancer 1*)

BRCA2 – ген за тумор дојке и јаника (енгл. *breast cancer 2*)

C – цитозин

Ca – карцином

CAD – коронарна аретијска обољења (енгл. *coronary artery disease*)

cAMP – циклични аденозин монофосфат (енгл. *cyclic adenosine monophosphat*)

CAs – хромозомске аберације (енгл. *chromosomal aberrations*)

cDNA – комплементарна ДНК (енгл. *complementary DNA – cDNA*)

CIN – цервикалана интраепителијална неоплазија (енгл. *cervical intraepithelial neoplasia*)

Comet assay – Комет тест (енгл. *single-cell gel electrophoresis*)

DIC – дисеминована интраваскуларна коагулација (енгл. *disemminated intravascular coagulation*)

DMs – двоструки минутни (енгл. *double minutes*)

DNMT1–ДНК метилтрансфераза 1 (енгл. *DNA methyltransferase 1*)

DSE – низводни елементи (енгл. *downstream element*)

ЕРСR – ендотелијалног РС рецептор (енгл. *endothelial protein C receptor*)

ESHRE – Европско удружење за хуману репродукцију и ембриологију (енгл. *The European Society of Human Reproduction and Embryology*),

F – фактор

FAM – 6-carboxyfluorescein

fbHCG – слободна бета субјединица хуманог хорионског гонадотопина (енгл. *free  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin*)

FH<sub>4</sub> – тетра hidrofolати

FISH – флуоресцентна in situ хибридизација (енгл. *fluorescent in situ hybridization*)

FMU – интраутерусна смрт плода (лат. *fetus mortus in utero*)

G – гуанин

GDM – гестацијски дијабетес (енгл. *gestational diabetes mellitus*)

GPIb-V-IX – тромбоцитни гликопротеински Ib-V-IX рецептор

GPIIb/IIIa – тромбоцитни гликопротеински IIb/IIIa рецептор

GSH – глутатион

GSTM1 – глутатион S трансфераза Mu 1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид

HELLP – синдром повезан са хемолизом, повишеним нивоима ензима јетре и смањењем броја тромбоцита (енгл. *H-hemolysis of erythrocytes, EL-elevated liver enzymes, LP-low platelet coun*)

HEX – hexachloro-fluorescein

HHC – хиперхемоцистиенемија

HLA – хумани леукоцитни антиген

HR – хомолога рекомбинација (енгл. *homologous recombination*)

HUMN – хумани микронуклеус (енгл. *Human MicroNucleus*)

HWE – Харди-Вајберговог еквилибријум

IGF-1 – фактор раста налик инсулину-1 (енгл. *insulin-like growth factor-1*)

IGFBP-4 – везујући протеин за фактор раста сличан инсулину-4 (енгл. *insulin-like growth factor binding proteins-4*)

IgG– имуноглобулин G

IgM – имуноглобулин М

IL – интерлеукин

INR – интернационални нормализовани однос (енгл. *international normalized ratio*)

IUFD – интраутерусна смрт плода (енгл. *intrauterine fetal death*)

IUGR – интраутерини застој раста (енгл. *intrauterine growth restriction*)

LA, LAC – лупус антикоагуланс

LMWH – нискомолекуларни хепарин (енгл. *low-molecular-weight heparin*)

max – максимум

Med – медијана

MEOS – микрозомски систем за оксидацију етанола

min – минимум

mRNA – информациона рибонуклеинска киселина (енгл. *messenger RNA*)

MTHFR – метилентерахидрофолат редуктаза

MTR – ген који кодира метионин синтазу

N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-метил-FH<sub>4</sub> – 5,10-метилентетрахидрофолат

N<sup>5</sup>-метил-FH<sub>4</sub> – 5-метилентетрахидрофолат

NAD<sup>+</sup> – никотинамид аденин динуклеотид

NADH – убихинон редуктаза

NADPH – редуктовани никотинамид-аденин динуклеотид фосфат

NDI – индекс нуклеусне деобе (енгл. *nuclear division index*)

NHEJ – нехомолого спајање крајева (енгл. *non-homologous end-joining*)

NO – азот моноксид

pop-O – крвне групе различите од O

NT – нухална тренслуценција (енгл. *nuchal translucency*).

OR – количник шанси

p – значајност

p – кратак крак хромозома (фра. *petit*)

PAF – тромбоцитни активирајући фактор (енгл. *platelet activated factor*)

PAI-1 – инхибитор активатора плазминогена тип 1

PAI-2 – инхибитор активатора плазминогена тип 2

PAI-3 – инхибитор активатора плазминогена тип 3

PAPP-A – плазма протеина А повезан с трудноћом (енгл. *pregnancy-associated plasma protein A*)

PC – протеин Ц

PCR – реакција ланчаног умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction*)



PE – преекламсија (енгл. *preeclamsia*)

PGI2– простацаклин

PIH – трудноћом индукована хипертензија (енгл. *pregnancy-induced hypertension*)

PROC – ген за хумани протеин Ц (енгл. *PROC gene*)

PROS1 – ген за хумани протеин С (енгл. *PROS1 gene*)

PROS2 – хумани протеин С псеудоген (енгл. *PROS2 gene*)

PS – протеин С

PT– протромбинско време

q – дугачак крак хромозома (фра. *queue*)

RCOG– Краљевски колеџ за гинекологију и акушерство (енгл. *The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*),

RNS – реактивне азотне врсте (енгл. *reactive nitrogen species*)

ROC – РОК крива (енгл. *receiver operating characteristic*)

ROS – реактивне кисеоничне врсте (енгл. *reactive oxygen species*)

RPL – рекурентни спонтани побачаји (енгл. *recurrent pregnancy loss*)

RR – релативан ризик

SAH – S-аденозилхомоцистеин

SAM – S-аденозилметионина

SCEs – измена сестринских хроматида

SD – стандардна девијација

SE – стандардна грешка

SERPINC1 – ген за антиромбин човека (енгл. *serpin family C member 1*)

SNP – појединачни нуклеотидни полиморфизам (енгл. *single nucleotide polymorphisms*)

SOD – супероксид дисмутаза

TAFI – тромбином активирани инхибитор фибринолизе (енгл. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)

TAT – тромбин-антитромбин

TF – ткивни фактор (енгл. *tissue factor*)

TFPI – инхибитора ткивног фактора (енгл. *tissue factor pathway inhibitor*).

TNF-alpha – фактор некрозе тумора-алфа

tPA – ткивни активатор плазминогена (енгл. *tissue plasminiogen activator*)

uPA – урокиназни плазминоген активатора

UPI – утероплацентална инсуфицијенција (енгл. *utero-placental insufficiency*)

USE – узводни елементи (енгл. *upstream element*)

vWF – *von Willebrandov* фактора

WHO – светска здравствена организација (енгл. *World Health Organization*)

XPD – ксеродерма пигментозум група D (*xeroderma pigmentosum group D*)

Z – Вилкоксонов тест ранга

$\alpha$ 2-AP –  $\alpha$ 2- антитрипсин

$\alpha$ 2-MG –  $\alpha$ 2-макроглобулин

$\beta$ 2GPI –  $\beta$ 2-гликопротеин 1

$\gamma$ -H2AX – фосфорилисани хистон

$\rho$  - Сприманов коефицијент корелације

a $\beta$ 2GPI – анти- $\beta$ 2-гликопротеинска антитела

БН – бинуклеус

ВТЕ – венски тромбоемболизам

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

МН – микронуклеус

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксида

НП – нуклеусни пупољак

НПМ – нуклеоплазматски мост

Т – тимин

ТМ – тромбомодулин

X – средња вредност

ЦБМН (СВМН) – цитокинезис блок микронуклеус тест (енгл. *cytokinesis-block micronucleus assay*)

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Furness DLF, Dekker GA, Hague WM, Khong TY, Fenech MF. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. *Mutagenesis*. 2010;25(5):489–498.
2. Sirbu BM, Cortez D. DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):10.
3. Vinson RK, Hales BF. DNA repair during organogenesis. *Mutat Res*. 2002;509(1-2):79-91.
4. Hayashi M. The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test—. *Genes Environ*. 2016;38:18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045625/>. Accessed February 4, 2018.
5. Šošić GM, Varjačić M. Uticaj fizičke aktivnosti na stepen hromozomskih aberacija. *TIMS. Acta*. 2015;9(1):49-61.
6. Milošević-Đorđević O. *Principi kliničke citogenetike*. Kragujevac, Srbija: Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu; 2010:189.
7. Kopjar N, Kasuba V, Milić M, Rozgaj R, Zeljezić D, Gajski G, et al. [Normal and cut-off values of the cytokinesis-block micronucleus assay on peripheral blood lymphocytes in the Croatian general population].[Article in Croatian]. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2010;61(2):219-234.
8. Slonina D, Spekl K, Panteleva A, Brankovic K, Hoinkis C, Dörr W. Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiat Environ Biophys*. 2003;42:55–61.
9. Bazyka D, Finch SC, Iliencko IM, Lyaskivska O, Dyagil I, Trotsiuk N, et al. Buccal mucosa micronuclei counts in relation to exposure to low dose-rate radiation from the Chernobyl nuclear accident and other medical and occupational radiation exposures. *Environmental Health*. 2017;16:70.
10. Šošić GM, Jović N, Rakić B, Dimitrijević A, Varjačić M. Association between thrombophilia in pregnancy and micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes. *Balkan J Med Genet*. 2017;20(2):5.
11. Стошић И. *Фреквенца микронуклеуса и полиморфизам GSTT1 И GSTM1 гена у лимфоцитима периферне крви пацијенткиња у зависности од стадијума интрацервикалне лезије* [дисертација]. Крагујевац, Србија: Универзитет у Крагујевцу; 2015.
12. Fenech. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084–1104.
13. Kumar K, Thilagavathi J, Deka D, Dada R. Unexplained early pregnancy loss: Role of paternal DNA. *Indian J Med Res*. 2012;136(2):296-298.

14. Bobadilla-Morales L, Cervantes-Luna MI, García-Cobián TA, Gómez-Meda BC, de la Torre CO, Corona-Rivera JR, et al. Chromosome instability in a patient with recurrent abortions. *Genet Couns.* 2009;20(2):153–159.
15. Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsch-Volders M. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis.* 2011;26(1):51-56.
16. Howell WH. The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journal of Morphology.* 1890-91;4:57–116.
17. Jolly JMJ: Sur la formation des globules rouges des mammifères. Comptes rendus de la Société de Biologie, Paris, 1905;58:528–531. Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. *Archives d'anatomie microscopique,* 1907;9:133–314.
18. Sears DA, Udden MM. Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci.* 2012;343(5):407–409.
19. Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology.* 2010;21(1):015102
20. Dawson DW, Bury HPR. The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *J Pathol.* 1961;14(4):374–380.
21. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet.* 2013;4:131.
22. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen: Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Rad Biol.* 1959;3:216–229.
23. Boller K, Schmid W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem. Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik.* 1970;11:35–54.
24. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973;18(2):187–190.
25. Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, MacGregor JT. Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis.* 2011;26(1):3–10.
26. Thierens H, Vral A. The micronucleus assay in radiation accidents. *Ann Ist Super Sanita.* 2009;45(3): 260–264.
27. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26:125–132.

28. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect.* 1993;101(Suppl 3):101–107.
29. Bull CF, Beetstra-Hill S, Benassi-Evans BJ, Crott JW, Kimura M, Teo T. Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis.* 2011;26(1):193–197.
30. Vral A, Fenech M, Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis.* 2011;26(1):11–17.
31. Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 2010;705(1):60–67.
32. Turnpenny PD, Ellard S. *Emerijevi osnovi medicinske genetike.* Beograd, Srbija; Data Status: 2009.
33. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. *The Journal of Cell Biology.* 1998;140(6):1307–1320.
34. Surowy H, Rinckleb A, Luedeke M, Stuber M, Wecker A, Varga D, et al. Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies. *Mutagenesis.* 2011;26(1):111–117.
35. Fenech MF, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis.* 1997;18(7):1329–1336.
36. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993; 285(1):35–44.
37. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis.* 2011;26(1):239–245.
38. Fenech M, Morley AA. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res.* 1985;148(1-2):99–105.
39. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res.* 1986;161(2):193–198.
40. Nefic H, Musanovic J, Kurteshi K, Prutina E, Turcalov E. The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. *Saglik Bilim Derg.* 2013;3(3):196–204.
41. Coşkun M, Cayır A, Coşkun M, Tok H. Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 2013;757(1):23–27.

42. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011;26(1):43–49.
43. Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, et al. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing*. 1999;28(4):393–397.
44. Neri M, Ceppi M, Knudsen LE, Merlo DF, Barale R, Puntoni R, et al. Baseline Micronuclei Frequency in Children: Estimates from Meta- and Pooled Analyses. *Environ Health Perspect*. 2005;113(9):1226–1229.
45. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M, et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6(4):249–256.
46. Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, et al. Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4(6):671–679.
47. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Marinković D. The lack of sex differences in the micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. *Tohoku J Exp Med*. 2007;29: 51–56.
48. Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003;18(3):221–233.
49. Catalán J, Falck GC-M, Norppa H. The X Chromosome Frequently Lags Behind in Female Lymphocyte Anaphase. *Am J Med Genet*. 2000;66(2):687–691.
50. Tucker JD, Nath J, Hando JC. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Hum Genet*. 1996;97(4):471–475.
51. Kazimírová A, Barancoková M, Krajcovicová-Kudlácková M, Volkovová K, Staruchová M, Valachovicová M et al. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and selected micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Mutat Res*. 2006;611:64–70.
52. Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res*. 2012;733(1-2):21–33.
53. Bull CF, Mayrhofer G, O'Callaghan NJ, Au AY, Pickett HA, Low GK, et al. Folate deficiency induces dysfunctional long and short telomeres; both states are associated with hypomethylation and DNA damage in human WIL2-NS cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(1):128–138.
54. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis*. 2005;26(5):991–999.

55. Huang P, Huang B, Weng H, Nakayama K, Morimoto K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev Med.* 2009;48(4):383–388.
56. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis.* 2011;26(1):77–83.
57. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(6):899–904.
58. Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the-H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J.* 2011;25(2):685–693.
59. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, et al.; HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 2003;543:155–166.
60. Veerachari U, Venkatesh S, Yadav A, Narayanappa R. Biomonitoring genetic instability in normal healthy population using a simple cytogenetic marker – micronucleus test. *Int Multidiscip Res J.* 2011;1(2):01-09.
61. Singh S, Saini M, Yadav AS. Elevated frequencies of micronuclei and other nuclear anomalies in alcoholic subjects. *J Entomol Zool Stud.* 2015;3(2):243–245.
62. Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Christie BR. The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res Rev.* 2011;67(1-2):209–225.
63. Benassi-Evans B, Fenech M. Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell lines. *Mutagenesis.* 2011;26(3):421–429.
64. Maffei F, Fimognari C, Castelli E, Stefanini GF, Forti GC, Hrelia P. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. *Mutagenesis.* 2000;15(6):517–523.
65. Dhillon VS, Philip Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Michael Fenech. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26(1):33–42.
66. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GSTM1ID40768ch1p13.html>. Last update February 28. Accessed March 1, 2018.

67. Ribeiro RX, Nascimento CILL, Silva AMTC. GENOTYPE ASSOCIATION GSTM1 NULL AND GASTRIC CANCER: EVIDENCE-BASED META-ANALYSIS. *Arq Gastroenterol.* 2017;54(2):101–108.
68. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2004;149:309–334.
69. Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, Kawano M, Yamauchi T, Yokoyama K. Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers. *Mutat Res.* 2003;541(1-2):71–80.
70. Speit G, Trenz K. Chromosomal mutagen sensitivity associated with mutations in BRCA genes. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104(1-4):325–332.
71. Silva-Grecco RL, Navarro GC, Cruz RM, Balarin MA. Micronucleated lymphocytes in parents of Down syndrome children. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(7):573–577.
72. Ferreira FL, Prá D, Martino-Roth MG, Garcias GL. Buccal micronucleus frequency is associated with age in Down syndrome. *Genet Mol Res.* 2009;8(4):1231–1237.
73. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):93–108.
74. Milosević-Djordjević O, Grujčić D, Vasković Z, Marinković D. High micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients irrespective of gender, smoking and cancer sites. *Tohoku J Exp Med.* 2010;220:115–120.
75. Nersesyan AK, Vardazaryan NS, Gevorgyan AL, Arutyunyan RM. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology.* 2002;10(1):35–36.
76. Findri-Guštek Š, Oreščanin V, Kopjar N, Mlinarić-Missoni E, Fistončić I, Krivak Bolanča I. The Correlation of the Lifestyle and Medical Conditions with the Incidence of Micronuclei in the Vaginal Epithelial Cells. *J Womens Health.* 2013;6:1–6.
77. Bhat MA, Mahajan N, Gandhi G. DNA and chromosomal damage in coronary artery disease patients. *EXCLI Journal.* 2013;12:872–884.
78. Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S, et al. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol Sci.* 2002;23(2):97–98.
79. Migliore L, Testa A, Scarpato R, Pavese N, Petrozzi L, Bonuccelli U. Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 1997;101:299–305.



80. Witczak M, Ferenc T, Gulczyńska E, Nowakowska D, Łopaczyńska D, Wilczyński J. Elevated frequencies of micronuclei in pregnant women with type 1 diabetes mellitus and in their newborns. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;763:12–17.
81. Petcu I, Savu D, Thierens H, Nagels G, Vral A. In vitro radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Int J Radiat Biol*. 2006;82(11):793–803.
82. Donmez-Altuntas H, Sut Z, Ferahbas A, Hamurcu Z, Demirtas H. Increased micronucleus frequency in phytohaemagglutinin-stimulated blood cells of patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22(2):162–167.
83. Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Aceves-Avila FJ, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, et al. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(2):208–212.
84. Karaman A, Binici DN, Melikoğlu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutat Res*. 2011;721(1):1–5.
85. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis*. 1999;14(2): 227–231.
86. Hamurcu Z, Dönmez-Altuntas H, Borlu M, Demirtas H, Aşçioslu Ö. Micronucleus frequency in the oral mucosa and lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(5):565–569.
87. Milošević-Djordjević O, Stošić I, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2012;63:367–375.
88. Koskimies AI, Savander M, Ann-Marie N, Kurunmäki H. Sperm DNA damage and male infertility. *Duodecim*. 2010;126(24):2837–2842.
89. Fenech M. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. *Mutagenesis*. 2011; 26(1):63–67.
90. Moghbeli-Nejad S, Mozdarani H, Aleyasin A. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(1):89–94.
91. Trková M, Kapras J, Bobková K, Stanková J, Mejsnarová B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod Toxicol*. 2000;14(4):331–335.
92. Furness DL, Dekker GA, Roberts CT. DNA damage and health in pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2011;89(2):153–162.

93. Moreli JB, Santos JH, Rocha CR, Damasceno DC, Morceli G, Rudge MV, et al. DNA damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:676758.
94. Toljic M, Egic A, Munjas J, Karadzov Orlic N, Milovanovic Z, Radenkovic A, et al. Increased oxidative stress and cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. *Reprod Toxicol.* 2017;71:55–62.
95. Milošević-Djordjević O, Grujičić D, Marinković D, Arsenijević S, Banković S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. *Hum Reprod.* 2003;18(2):433–436.
96. Al-faisal AM, Nada SM, Mahood RA. Micronucleus formation and Sister Chromatid Exchange in Female Lymphocytes Associated with Recurrent Spontaneous Abortion. *Iraqi Journal of Biotechnology.* 2015;14(2):21-29.
97. Levario-Carrillo M, Sordo M, Rocha F, González-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegman P. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. *Mutat Res.* 2005;586(1):68–75.
98. Stanković M, Joksić G, Guč-Šćekić M. Incidence of micronuclei in pregnant women and cord blood samples before and after the bombing of Serbia. *Arch Oncol.* 2004;12(4):200–202.
99. Piestrzyńska A, Schmagier J, Lauterbach R, Kołodziejcki L. The frequency of micronuclei in lymphocytes from cord blood as a marker of exposure to mutagenic factors. *Przegl Lek.* 2004;61(4):244–247.
100. Zalacaín M, Sierrasesúmaga L, Larrañaga C, Patiño-García A. Effects of Benzopyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxide (BPDE) In Vitro and of Maternal Smoking In Vivo on Micronuclei Frequencies in Fetal Cord Blood. *Pediatr Res.* 2006;60(2):180–184.
101. Raičević R, Jovičić A, Mandić-Radić S, Đorđević D. Hemostazni sistem i ishemijska bolest mozga (opšti aspekt. *Vojnosanit Pregl.* 2002;59(5):515–522
102. Ribeiro ÂM, Zepeda-Mendoza ML, Bertelsen MF, et al. A refined model of the genomic basis for phenotypic variation in vertebrate hemostasis. *BMC Evol Biol.* 2015;15(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-015-0409-y> Accessed February 4, 2018.
103. Zupančić-Šelek S. Uvod u hemostazu. *Paediatr Croat.* 2005;49 (Supl 1):237-239.
104. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310–1312.
105. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature.* 1964;202:498–499.

106. Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001; 85:958–965.
107. Obradović D. Trombofilija i tromboza. *Med Pregl.* 2005;58(7–8):368–374.
108. Miković D. *Korelacija ukupog hemostatskog potencijala i fibrinolize zavisne od trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize sa težinom krvarenja i odgovorom na terapiju u hemofiliji A.* [disertacija]. Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu; 2014.
109. Astrup T. The hemostatic balance. *Thromb Diath Haemorrh.* 1958;2:347–356.
110. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:130.
111. Goto S, Hasebe T, Takagi S. Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine. *Circ J.* 2015;79(9):1871–1881.
112. Pavlović P, Tavčiovski D, Stamenković E. [Thrombocyte aggregation, endothelial dysfunction and acute myocardial infarction]. [Article in Serbian] *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(4):323–327.
113. Abshire TC, Jobe SM. Overview of the Coagulation System. In Shaz BH, Hillyer CD, Charles S, Abrams CS, Roshal eds. 2<sup>nd</sup> ed. *Transfusion Medicine and Hemostasis (Second Edition) Clinical and Laboratory Aspects.* Elsevier Inc, 2013;587–592.
114. Raković D, Uskoković D. Koagulacija krvi. *Biomaterjali.* Beograd, Srbija: Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti. Društvo za istraživanje materijala Srbije; 2010:167–185.
115. Pruner I. *Funkcionalana analiza genske varijante C20068T U 3' kraju gena za protrombi čoveka i njena uloga u patogenezi trombofilije.* [disertacija]. Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu; 2014.
116. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327–358.
117. Mitić G, Považan L, Lazić R, Spasić D, Maticki-Sekulić M. Nedostatak prirodnih inhibitora koagulacije kod žena sa venskim trombozama u trudnoći. *Med Pregl.* 2009;62(1-2):53-62.
118. Walker ID. Thrombophilia in pregnancy. *J Clin Pathol.* 2000;53:573–580.
119. Đorđević V, Gvozdenov M, Pruner I, Tomić B, Kovač M, Antonijević N, et al. The prevalence of PAI-1 4G/5G gene variant in Serbian population. *Med Glas.* 2013;18(49):28–41.
120. Guidelines on the investigation and management of thrombophilia. The British Committee for Standards in Haematology. *Journal of Clinical Pathology.* 1990;43(9):703-709.
121. Lim MY, Moll S. Thrombophilia. *Vasc Med.* 2015;20(2):193–196.
122. Heit JA. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007;127–135.

123. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. *Williams Obstetrics*. 23<sup>rd</sup> ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies Inc, 2010, 2005, 2001.
124. Bilić E, Kos T, Čulić S. Tromboembolije u djece. *Paediatr Croat*. 2013;57(1):185-191.
125. Vodnik T, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Parametri hemostaze kao pokazatelji hiperkoagulabilnosti u trudnoći. *Jugoslov Med Biohem*. 2003;22(2):119–126.
126. Salatić I, Kiralj K, Mitić G, Veselinović I, Vapa D. FV Leiden Mutation and Deep Venous Thrombosis in Vojvodina: A Case-Control Study. *J Med Biochem*. 2011;30(1):51–54.
127. Sparić R, Lazović B, Stajić Z, Mazić S, Đelić M, Kadija S. [Thromboembolic complications during pregnancy and delivery].[Article in Serbian]. *Med Pregl*. 2013;66(9/10):417–423.
128. Dickey TL. The hypercoagulable state as a risk factor for venous thromboembolism. Part 1. *JAAPA*. 2002;15(11):28–32, 35.
129. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):92–103.
130. Bereczky Z, Gindele R, Speker M, Kállai J. Deficiencies of the Natural Anticoagulants – Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC*. 2016;27(2):130–146.
131. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965;13:516–530.
132. Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;31(3):275–281.
133. Soria JM. The Genetic Component of Disorders of Coagulation and Thrombosis. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2009;9:58B–65B.
134. Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999;12(3):479–503.
135. Elezović I. [Role of gene polymorphism in development of thromboses].[Article in Serbian]. *Srp Arh Celok Lek*. 2006;134(1):64–71.
136. National Center for Biotechnology Information. Clin Var. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/642/>. Last update February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
137. National Center for Biotechnology Information. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13310/>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.

138. National Center for Biotechnology Information. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13572/>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
139. Bakić M. Trombofilije dijagnostika i tretman. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2002; 19(2):120–127.
140. National Center for Biotechnology Information. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/352>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
141. Boulton F. A hundred years of cascading - started by Paul Morawitz (1879-1936), a pioneer of haemostasis and of transfusion. *Transfus Med*. 2006;16(1):1–10.
142. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: A review. *Haemophilia*. 2008;14(6):1229–1239.
143. Lee SY, Kim EK, Kim MS, et al. The prevalence and clinical manifestation of hereditary thrombophilia in Korean patients with unprovoked venous thromboembolisms. Miyata T, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0185785. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5645010/> Accessed February 4, 2018.
144. RAU JC, BEAULIEU LM, HUNTINGTON JA, CHURCH FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(Suppl 1):102–115.
145. Bhakuni T, Sharma A, Rashid Q, et al. Antithrombin III Deficiency in Indian Patients with Deep Vein Thrombosis: Identification of First India Based AT Variants Including a Novel Point Mutation (T280A) that Leads to Aggregation. El-Maarri O, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0121889. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374914/> Accessed February 4, 2018.
146. Kumar R, Dawson JE, Chan AK, Forman-Kay JD, Kahr WH, Williams S. c.1058C>T variant in the SERPINC1 gene is pathogenic for antithrombin deficiency. *Br J Haematol*. 2015;170(1):123–125.
147. Heit C, Jackson BC, McAndrews M, et al. Update of the human and mouse *SERPIN* gene superfamily. *Human Genomics*. 2013;7(1):22.
148. Mammen EF. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24(1):19–25.
149. Huntington JA. Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:26–34.
150. James AH, Rhee E, Thames B, Philipp CS. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thromb Res*. 2014;134(3):648–651.

151. HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). [http://www.genenames.org/cgi-bin/search?search\\_type=all&search=SERPINC1&submit=Submit](http://www.genenames.org/cgi-bin/search?search_type=all&search=SERPINC1&submit=Submit). Published October 31, 2014. Accessed March 1, 2018.
152. Bock SC, Harris JF, Balazs I, Trent JM. Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q23-25. *Cytogenet Cell Genet*. 1985;39(1):67–69.
153. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINC1#location>. Published February 27, 2018. Accessed March 1, 2018.
154. Mulder R, Croles FN, Mulder AB, Huntington JA, Meijer K, Lukens MV. SERPINC1 gene mutations in antithrombin deficiency. *Br J Haematol*. 2017;178(2):279–285.
155. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH; GFHT study group on Genetic Thrombophilia. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost*. 2017;117(6):1040–1051.
156. Egeberg O. Thrombophilia caused by inheritable deficiency of blood antithrombin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1965;17:92.
157. Martínez-Martínez I, Navarro-Fernández J, Østergaard A, Gutiérrez-Gallego R, Padilla J, Bohdan N et al. Amelioration of the severity of heparin-binding antithrombin mutations by posttranslational mosaicism. *Blood*. 2012;120(4):900–904.
158. Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J*. 2006;4:15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1592479/> Accessed February 4, 2018.
159. Fischer R, Sachs UJ, Heidinger KS, Eisenburger D, Kemkes-Matthes B. Prevalence of hereditary antithrombin mutations is higher than estimated in patients with thrombotic events. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013;24(4):444–448.
160. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, Spannagl M, Krause M, Miesbach W et al. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2011;105(4):635–646.
161. Prochownik EV, Antonarakis S, Bauer KA, Rosenberg RD, Fearon ER, Orkin SH. Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency. *N Engl J Med*. 1983;308(26):1549–1552.
162. Toderici M, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, et al. Identification of Regulatory Mutations in *SERPINC1* Affecting Vitamin D Response Elements Associated with Antithrombin Deficiency. Wang J, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0152159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4803246/> Accessed February 4, 2018.
163. Puurunen M, Salo P, Engelbarth S, Javela K, Perola M. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost*. 2013;11(10):1844–1849.

164. Emmerich J, Vidaud D, Alhenc-Gelas M, Chadeuf G, Gouault-Heilmann M, Aillaud MF et al. Three novel mutations of antithrombin inducing high-molecular-mass compounds. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(12):1958–1965.
165. Lane DA, Olds RJ, Boisclair M, Chowdhury V, Thein SL, Cooper DN et al. Antithrombin III mutation database: first update. For the Thrombin and its Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1993;70(2):361–369.
166. Wang Z, Wang T, Chang J, Li H, Wang C, Li Y et al. Genetic association of PROC variants with pulmonary embolism in Northern Chinese Han population. *Springerplus.* 2016;5:147.
167. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem.* 1976;251(2):355–363.
168. Wildhagen KC, Lutgens E, Loubele ST, ten Cate H, Nicolaes GA. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations. *Thromb Haemost.* 2011;106(6):1034–1045.
169. Yamamoto K, Tanimoto M, Emi N, Matsushita T, Takamatsu J, Saito H. Impaired secretion of the elongated mutant of protein C (protein C-Nagoya). Molecular and cellular basis for hereditary protein C deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2439–2446.
170. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JC, Carmeliet P, Collen D, et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1481–1488.
171. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1525–1534.
172. Ding Q, Yang L, Dinarvand P, Wang X, Rezaie AR. Protein C Thr315Ala variant results in gain of function but manifests as type II deficiency in diagnostic assays. *Blood.* 2015;125(15):2428–2434.
173. Bovill EG, Tomczak JA, Grant B, Bhushan F, Pillemer E, Rainville IR, et al. Protein C Vermont: symptomatic type II protein C deficiency associated with two GLA domain mutations. *Blood.* 1992;79(6):1456–1465.
174. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):26S–32S.
175. HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). [http://www.genenames.org/cgi-bin/search?search\\_type=all&search=PROC&submit=Submit](http://www.genenames.org/cgi-bin/search?search_type=all&search=PROC&submit=Submit). Published October 31, 2014. Accessed March 1, 2018.
176. Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(3):546–550.

177. Rocchi M, Roncuzzi L, Santamaria R, Archidiacono N, Dente L, Romeo G. Mapping through somatic cell hybrids and cDNA probes of protein C to chromosome 2, factor X to chromosome 13, and alpha 1-acid glycoprotein to chromosome 9. *Hum Genet.* 1986;74(1):30–33.
178. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PROC#resources>. Published February 27, 2018. Accessed March 1, 2018.
179. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1370–1373.
180. Romeo G, Hassan HJ, Staempfli S, Roncuzzi L, Cianetti L, Leonardi A, et al. Hereditary thrombophilia: identification of nonsense and missense mutations in the protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(9):2829–2832.
181. Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalised genomics. *Hum Genomics.* 2009;4(2):69–72.
182. Đorđević V, Pruner I, Radojković D. Molecular basisi of trombofila. *J Med Biochem.* 2014; 33(1).
183. Tjeldhorn L, Iversen N, Sandvig K, Bergan J, Sandset PM, Skretting G. Functional characterization of the protein C A267T mutation: evidence for impaired secretion due to defective intracellular transport. *BMC Cell Biol.* 2010;11:67.
184. Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for protein C deficiency. *Am J Hematol.* 2010;85(6):440–442.
185. Dreyfus M, Magny JF, Bridey F, Schwarz HP, Planché C, Dehan M, et al. Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N Engl J Med.* 1991;325(22):1565–1568.
186. Hoshi S, Hijikata M, Togashi Y, Aoyagi T, Kono C, Yamada Y et al. Protein C deficiency in a family with thromboembolism and identified gene mutations. *Intern Med.* 2007;46(13):997–1003.
187. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry.* 1977;16(4):698–706.
188. Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T. ELISA-Based Detection System for Protein S K196E Mutation, a Genetic Risk Factor for Venous Thromboembolism. Garcia de Frutos P, ed. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0133196. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505939/> Accessed February 4, 2018.
189. Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Hampton KK, et al. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood.* 2000;95(6):1935–1941.



190. Tang L, Jian XR, Hamasaki N, Guo T, Wang HF, Lu X, et al. Molecular basis of protein S deficiency in China. *Am J Hematol*. 2013;88(10):899–905.
191. Marlar RA, Gausman JN. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am J Hematol*. 2011;86(5):418–421.
192. Inherited thrombophilia: memorandum from a joint WHO/International Society on Thrombosis and Haemostasis meeting. *Bulletin of the World Health Organization*. 1997;75(3):177–189.
193. Барјактаровић И. Улога наследних чинилаца у настанку тромбозе дубоких вена [дисертација]. Нови Сад, Србија: Универзитет у Новом Саду; 2015.
194. Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood*. 1995;85(12):3524–3531.
195. Lundwall A, Dackowski W, Cohen E, Shaffer M, Mahr A, Dahlback B, et al. Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc Nat Acad Sci*. 1986;83:6716–6720.
196. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PROS1#location>). Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
197. Pintao MC, Garcia AA, Borgel D, Alhenc-Gelas M, Spek CA, de Visser MC et al. Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency. *Hum Genet*. 2009;126(3):449.
198. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*. 1984;74(6):2082–2088.
199. Wang Z-H, Zhao Z-J, Xu K, Sun G-B, Song L, Yin H-X, et al. Hereditary protein S deficiency leads to ischemic stroke. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):3279–3284.
200. Cho EJ, Kim YC, Hwang JH, Lee H, Park SS, Kim SY, et al. Inherited protein S deficiency due to a novel nonsense mutation in the PROS1 gene in the patient with recurrent vascular access thrombosis: A case report. *Kidney Res Clin Pract [Internet]*. Elsevier; 2012;31(1):72–75.
201. Wypasek E, Undas A. Protein C and protein S deficiency - practical diagnostic issues. *Adv Clin Exp Med*. 2013
202. National Center for Biotechnology Information. Gene. PROS1 protein S [ *Homo sapiens* (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5627>. Last updated February 28, 2018. Accessed March 1, 2018.
203. Wagh SB, Anadure R, Dutta V, Sandhu MS, Trehan R. Isolated protein S deficiency presenting as catastrophic systemic arterial and subsequently venous thrombosis. *The Australas Med J*. 2012;5(8):424–428.

204. Pintao MC, Ribeiro DD, Bezemer ID, Garcia AA, de Visser MC, Doggen CJ et al. Protein S levels and the risk of venous thrombosis: results from the MEGA case-control study. *Blood*. 2013;122(18):3210–3219.
205. HEEB MJ, GANDRILLE S, FERNANDEZ JA, GRIFFIN JH, FEDULLO PF. Late onset thrombosis in a case of severe protein S deficiency due to compound heterozygosity for PROS1 mutations. *J Thromb Haemost*. 2008;6(7):1235–1237.
206. Edlich RF, Cross CL, Dahlstrom JJ, Long WB 3rd. Modern concepts of the diagnosis and treatment of purpura fulminans. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2008;27(3):191–196.
207. Nicolaes GA, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):530–538.
208. Steen M, Norström EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH et al. Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood*. 2004;103(9):3381–3387.
209. Slavik L, Krcova V, Hlusi A, Prochazkova J, Prochazka M, Ulehlova J et al. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009;153(1):19–25.
210. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*. 2003;101(1):20–30.
211. Cramer TJ, Griffin JH, Gale AJ. Factor V is an anticoagulant cofactor for activated protein C during inactivation of factor Va. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2010;37(1):17-23.
212. Sun X, Evatt B, Griffin JH. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood*. 1994;83(11):3120–3125.
213. Dahlbäck B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1396–1400.
214. Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*. 1992;31(15):3777–3785.
215. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F5#location>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
216. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(3):1004–1008.

217. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994;369(6475):64–67.
218. Dahlbäck B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1995;74(1):139-148.
219. Đorđević V, Rakićević LB, Spasić M, Miljić P, Miković D, Kovač M, et al. Mutacije FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T kao faktori rizika za nastanak tromboze dubokih vena u toku trudnoće ili puerperijuma. *Vojnosanit Pregl*. 2005; 62(3):201–205.
220. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood*. 1998;91(4):1135–1139.
221. Franco RF, Maffei FH, Lourenço D, Morelli V, Thomazini IA, Piccinato CE, et al. Factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in venous thrombotic disease. *Br J Haematol*. 1998;103(3):888–890.
222. de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood*. 1999;93(4):1271–1276.
223. Aleksova A, Di Nucci M, Gobbo M, Bevilacqua E, Pradella P, Salam K, et al. Factor-V HR2 haplotype and thromboembolic disease. *Acta Cardiol*. 2015;70(6):707–711.
224. Kidson-Gerber G. Hematological Complications in Obstetrics, Pregnancy and Gynecology. *Obstet Med*. 2010;3(4):166–167.
225. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(2):362–367.
226. Cox MJ, Rees DC, Martinson JJ, Clegg JB. Evidence for a single origin of factor V Leiden. *Br J Haematol*. 1996;92(4):1022–1025.
227. Jadaon MM. Epidemiology of Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden Mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011037. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3251907/> Accessed February 4, 2018.
228. Barnhart MI. Prothrombin synthesis: an example of hepatic function. *J Histochem Cytochem*. 1965;13(8):740–751.
229. Saito H, Takamatsu J. Disorders of Prothrombin Conversion. In Gross S, Roath S, eds. *Hematology. A Problem-Oriented Approach*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1996:569–611.
230. Krishnaswamy S. The Transition of Prothrombin to Thrombin. *J Thromb Haemos*. 2013;11(01):265–276.

231. Pozzi N, Di Cera E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):653–655.
232. Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC, Furie B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood*. 1996;88(7):2585–2593.
233. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*. 2005;106(8):2605-2612.
234. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2007;5 Suppl 1:95–101.
235. Huntington JA. Thrombin inhibition by the serpins. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:254–264.
236. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987;26(19):6165–6177.
237. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F2#location>). Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
238. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet*. 1987;13(3):285–292.
239. 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(10):3698–3703.
240. Bertina RM. The prothrombin 20210 G to A variation and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 1998;5(5):339–342.
241. Gao H, Tao FB. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res*. 2015;135(2):339–346.
242. MIERLA D, SZMAL C, NEAGOS D, CRETU R, STOIAN V, JARDAN D. Association of Prothrombin (A20210G) and Factor V Leiden (A506G) with Recurrent Pregnancy Loss. *Mædica*. 2012;7(3):222–226.
243. Wang X, Fu J, Li Q, Zeng D. Geographical and Ethnic Distributions of the MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in Chinese Populations: A Meta-Analysis. Wei Q-Y, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0152414.
244. Babić Božović I, Vraneković J. (2014). Folati i folna kiselina: dosadašnje spoznaje. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*. 2014;50(2):169–175.
245. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation*. 2015;132(1):e6–69.

246. Messika AH, Kaluski DN, Lev E, Iakobishvili Z, Shohat M, Hasdai D, et al. Nutrigenetic impact of daily folate intake on plasma homocysteine and folate levels in patients with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2010;17(6):701–705.
247. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
248. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998;9:652–656.
249. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat.* 2000;15(3):280–287.
250. National Center for Biotechnology Information. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3520/>. Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
251. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10(1):111–113.
252. Lewis SJ, Lawlor DA, Davey Smith G, Araya R, Timpson N, Day IN et al. The thermolabile variant of MTHFR is associated with depression in the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2006;11(4):352–360.
253. National Center for Biotechnology Information. ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3521/>
254. Wilcken DE, Wang XL, Sim AS, McCredie RM. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(7):878–882.
255. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862–877.
256. Lewis SJ, Araya R, Leary S, Smith GD, Ness A. Folic acid supplementation during pregnancy may protect against depression 21 months after pregnancy, an effect modified by MTHFR C677T genotype. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(1):97–103.
257. Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, Bandzeviciene R, Silkunas M, Bartkeviciene D. The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations. *Reprod Toxicol.* 2017;72:159–163.

258. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1258–1260.
259. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(5):e72–91.
260. Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, Aoki N. Plasminogen Tochigi: inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(20):6132–6136.
261. Aisina RB, Mukhametova LI. Structure and functions of plasminogen/plasmin system. *Russ J Bioorganic Chem.* 2014;40(6):590–605.
262. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, et al. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest.* 1986;78:1673–1680.
263. Schwartz CE, Stanislovitis P, Phelan MC, Klinger K, Taylor HA, Stevenson RE. Deletion mapping of plasminogen activator inhibitor, type I (PLANH1) and beta-glucuronidase (GUSB) in 7q21-q22. *Cytogenet Cell Genet.* 1991;51:152–153.
264. Van Zonneveld AJ, Curriden SA, Loskutoff DJ. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(15):5525–5529.
265. U.S National Library of Medicine, Genetics Home Reference <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINE1#location>). Last updated February 23, 2018. Accessed March 1, 2018.
266. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1993;268(15):10739–10745.
267. Al Sallout RJ, Sharif FA. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip. *Med Princ Pract.* 2010;19(2):99–104.
268. Zhao L, Bracken MB, Dewan AT, Chen S. Association between the SERPINE1 (PAI-1) 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism (rs1799889) and pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(3):136–143.
269. Ye Y, Vattai A, Zhang X, et al. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1651. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28758928>. Accessed February 4, 2018.

270. Shakarami F, Akbari MT, Zare Karizi S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin converting enzyme polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *Iran J Reprod Med.* 2015;13(10):627–632.
271. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem.* 2003;49(7):1081–1086.
272. D'Elia AV, Fabbro D, Driul L, Barillari G, Marchesoni D, Damante G. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in pre-eclampsia. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37(2):97-105.
273. Morgan JA, Bombell S, McGuire W. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 (-675 4G/5G) Polymorphism with Pre-Eclampsia: Systematic Review. Croy A, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e56907. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3574018/> Accessed February 4, 2018.
274. Hathaway WE. Clinical aspects of antithrombin III deficiency. *Semin Hematol.* 1991;28:19–23
275. Florian L. *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease.* Berlin, Heidelberg, Germany: Springer; 2009.
276. Mitic G. *Nasledna trombofilija i trombozne komplikacije u trudnoći* [disertacija]. Novi Sad, Srbija: Univerzitet u Novom Sadu; 2008.
277. Chaturvedi S, McCrae KR. The antiphospholipid syndrome: still an enigma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:53–60.
278. Camarena Cabrera DM, Rodriguez-Jaimes C, Acevedo-Gallegos S, Gallardo-Gaona JM, Velazquez-Torres B, Ramírez-Calvo JA. Controversies concerning the antiphospholipid syndrome in obstetrics. [Article in English, Spanish]. *Reumatol Clin.* 2017;13(1):30–36.
279. Di Prima FA, Valenti O, Hyseni E, Giorgio E, Faraci M, Renda E. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *J Prenat Med.* 2011;5(2):41–53.
280. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;287(6399):1088–1089.
281. Hudson N, Busque L, Rauch J, Kassis J, Fortin PR. Familial antiphospholipid syndrome and HLA–DRB gene associations. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1907–1908.
282. Guerra SG, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):211.
283. Willis R, Pierangeli SS. Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Auto Immun Highlights.* 2011;2(2):35–52.

284. Hancer VS. Genetics of Antiphospholipid Syndrome. *Human Genet Embryol.* 2011;1:e103. <https://www.omicsonline.org/genetics-of-antiphospholipid-syndrome-2161-0436.1000e103.php?aid=2015>. Accessed February 4, 2018.
285. Husar D, Đelmiš J. Tromboembolijska bolest u trudnoći. *Gynaecologia et perinatologia.* 2008;17(2):77–82.
286. Lee RV. Thromboembolism in pregnancy: a continuing conundrum. *Ann Intern Med.* 2005;143(10):749–750.
287. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004;114:409–414.
288. Maglić D. *Procena ishoda trudnoća komplikovanih urođenim trombofilijama* [disertacija]. Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu; 2016.
289. Szecsi P, Jorgensen M, Klajnbard A, Andersen M, Colov N, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost.* 2010;103:718–727.
290. Kovač M. *Trombofilija i komplikacije u trudnoći.* Beograd, Srbija: Zadužbina Andrejević; 2010:75.
291. Simcox LE, Ormsher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and Pregnancy Complications. Baker PN, ed. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):28418–28428.
292. Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(10):a023473. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292986>. Accessed February 4, 2018.
293. Roland CS, Hu J, Ren CE, Chen H, Li J, Varvoutis MS, et al. Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):365–376.
294. Dawood F. Pregnancy and Thrombophilia. *J Blood Disorders Transf.* 2013;4:164.
295. Rodger MA, Walker MC, Smith GN, Wells PS, Ramsay T, Langlois NJ, et al. Is thrombophilia associated with placenta-mediated pregnancy complications? A prospective cohort study. *J Thromb Haemost.* 2014;12(4):469–478.
296. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, et al; Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol.* 2006;132:171–196.
297. Karadağ C, Yoldemir T, Karadağ SD, İnan C, Dolgun ZN, Aslanova L. Obstetric outcomes of recurrent pregnancy loss patients diagnosed with inherited thrombophilia. *Ir J Med Sci.* 2017;186(3):707–713.



298. Pristov JB, Spasojevic I, Mikovic Ž, Mandic V, Cerovic N, Spasic M. Antioxidative defense enzymes in placenta protect placenta and fetus in inherited thrombophilia from hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(1):14–18.
299. Radović-Janošević D, Popović J, Tubić-Pavlović A, Krtinić D. Thrombophilia in Pregnancy – Current Issue of Modern Perinatology. *Acta medica Medianae*. 2015;54(3):54–58.
300. Boskovic B, Koren G. Placental transfer of drugs. In: Yaffe J, Aranda JU, editors. *Neonatal and pediatric pharmacology*. Philadelphia, Pa: Lippincot Williams and Wilkins; 2005:136.
301. Dimitrakakis C, Papageorgiou P, Papageorgiou I, Antzaklis A, Sakarelou N, Michalas S. Absence of transplacental passage of the low molecular weight heparin enoxaparin. *Haemostasis*. 2000;30(5):243–248.
302. Many A, Koren G. Low-molecular-weight heparins during pregnancy. *Can Fam Physician*. 2005;51(2):199–201.
303. Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost*. 2000;83:693–697.
304. Mitić G, Novakov Mikić A, Povazan L, Mitreski A, Kopitović V, Vejnović T. Thromboprophylaxis implementation during pregnancy in women with recurrent foetal losses and thrombophilia. *Med Pregl*. 2011;64(9-10):471–475.
305. Magriples U, Ozcan T, Karne A, Copel JA. The effect of anticoagulation on antenatal ultrasound findings in pregnant women with thrombophilia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006;19(1):27–30.
306. American College of Obstetricians and Gynecologists Women's Health Care Physicians. ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122:706–717.
307. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985; 147:29–36.
308. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E; HUMAN Micronucleus project. HUMAN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003;534:65–75.
309. Thomas P, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol*. 2011;682:217–234.
310. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D, et al. Prevalence of factor V leiden, factor V cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol*. 2004;112(4):227–229.
311. Chatzidimitriou M, Chatzidimitriou D, Mavridou M, Anetakis C, Chatzopoulou F, Lialiaris T, et al. Thrombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Greek women. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(6):590–595.

312. Mohyiddin S, Ahmed ST. Recurrent pregnancy loss: An update. *Pak J Med Den.* 2014; 3(3):57–61.
313. Valenzuela FJ, Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM, Illanes SE. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *J Pregnancy.* 2012;2012:632732.
314. Saghafi N, Mohammadzadeh Vatanchi A, Tara F, Pournali L, Dadgar S. Evaluation of selected thrombotic factors among pregnant women with preeclampsia and normal pregnant women. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(12):793–798.
315. Polat M, Biberoglu EH, Güler İ, Biberoglu ÖK. Coexistence of preeclampsia and inherited thrombophilia in Turkish pregnant women. *Turk J Med Sci.* 2016;46(4):1094–1100.
316. Wang X, Bai T, Liu S, Pan H, Wang B. Association between Thrombophilia Gene Polymorphisms and Preeclampsia: A Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e100789. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4072713/> Accessed February 4, 2018.
317. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Wender-Ozegowska E, Mrozikiewicz PM. The significance of genetic polymorphisms of factor V Leiden and prothrombin in the preeclamptic Polish women. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;30(1):97–104.
318. Mello G, Parretti E, Marozio L, Pizzi C, Lojacono A, Frusca T, et al. Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study. *Hypertension.* 2005;46:1270–1274.
319. Dehkordi MA, Soleimani A, Haji-Gholami A, Vardanjani AK, Dehkordi SA. Association of Deficiency of Coagulation Factors (Prs, Prc, ATIII) and FVL Positivity with Preeclampsia and/or Eclampsia in Pregnant Women. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014;8(4):5–11.
320. Fong FM, Sahemey MK, Hamed G, Eyitayo R, Yates D, Kuan V, et al. Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2014;180(4):335–345.
321. Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, et al. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet.* 2000;45(3):138–141.
322. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(3):459–469.
323. Marchetti T, Cohen M, de Moerloose P. Obstetrical Antiphospholipid Syndrome: From the Pathogenesis to the Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:159124.
324. Nodler J, Moolamalla SR, Ledger EM, Nuwayhid BS, Mulla ZD. Elevated antiphospholipid antibody titers and adverse pregnancy outcomes: analysis of a population-based hospital dataset. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2009;9:11.

325. Laivuori H, Kaaja R, Ylikorkala O, Hiltunen T, Kontula K. 677 C→T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000;96(2):277–280.
326. Kim YJ, Williamson RA, Murray JC, Andrews J, Pietscher JJ, Peraud PJ, et al. Genetic susceptibility to preeclampsia: roles of cytosine-to-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine beta-synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(6):1211–1217.
327. Haram K, Mortensen JH, Nagy B. Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. *J Pregnancy.* 2014;2014:13.
328. Goddard KA, Tromp G, Romero R, Olson JM, Lu Q, Xu Z, et al. Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes. *Hum Hered.* 2007;63(1):1–16.
329. Dinulović D. *Opstetricija*. Beograd, SRJ: Novinsko-izdavačka ustanova Slizbeni list; 1996.
330. Mirzaei F, Farzad-Mahajeri Z. Association of hereditary thrombophilia with intrauterine growth restriction. *Iran J Reprod Med.* 2013;11(4):275-278.
331. Pileri P, Franchi F, Cetin I, Mandò C, Antonazzo P, Ibrahim B, et al. Maternal and fetal thrombophilia in intrauterine growth restriction in the presence or absence of maternal hypertensive disease. *Reprod Sci.* 2010;17(9):844–848.
332. Jamal A, Hantoshzadeh S, Hekmat H, Abbasi S. The association of thrombophilia with fetal growth restriction. *Arch Iran Med.* 2010;13(6):482–485.
333. Kupferminc MJ. Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:111.
334. Facco F, You W, Grobman W. Genetic thrombophilias and intrauterine growth restriction: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2009;113(6):1206-1216.
335. Livrinova V, Lega MH, Dimcheva AH, Samardziski I, Isjanovska R. *Factor V Leiden, Prothrombin and MTHFR Mutation in Patients with Preeclampsia, Intrauterine Growth Restriction and Placental Abruption.* *Open Access Maced J Med Sci.* 2015;3(4):590–594.
336. CORIU L, COPACIU E, TULBURE D, TALMACI R, SECARA D, CORIU D, et al. Inherited Thrombophilia in Pregnant Women with Intrauterine Growth Restriction. *Maedica (Buchar).* 2014;9(4):351–355.
337. Kinzler WL, Prasad V, Ananth CV. The Effect of Maternal Thrombophilia on Placental Abruption: Histologic Correlates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(3):243–248.
338. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Eng J Med.* 1999;340:9–13.

339. Battinelli EM, Marshall A, Connors JM. The Role of Thrombophilia in Pregnancy. *Thrombosis*. 2013;2013:9.
340. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;66(1):23–29.
341. Vavrinková B, Binder T, Hadacová I, Hrachovinová I, Salaj P, Hruda M. [Thrombophilic mutation by women with serious pregnancy complications ].[Article in Czech] *Ceska Gynekol*. 2012;77(2):171–174.
342. El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet P-E. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2017;9:331–345.
343. Pabinger I, Vormittag R. Thrombophilia and pregnancy outcomes. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1603–1610.
344. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, et al. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1993;60(5):820–825.
345. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briët E, Berntorp E, Conard J, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*. 1996;348(9032):913–916.
346. Rai R, Regan L, Hadley E, Dave M, Cohen H. Second-trimester pregnancy loss is associated with activated C resistance. *Br J Haematol*. 1996;92(2):489–490.
347. Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P, Zanardi S, Hilsman MV, Girolami A, et al. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost*. 1996;75(3):387–388.
348. Abu-Heija A. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: Is heparin still the drug of choice? *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014;14(1):e26–e36.
349. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003;361(9361):901–908.
350. Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G. Inherited thrombophilia and reproductive disorders. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2016;17(1):45–50.
351. Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(12):e13708.
352. Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, Yilmaz M, Kumtepe Y, Dogan H, et al. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(2):177–181.

353. Li X, Liu Y, Zhang R, Tan J, Chen L, Liu Y. Meta-Analysis of the Association between Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism and Recurrent Pregnancy Loss. *Med Sci Monit.* 2015;21:1051–1056.
354. Wu X, Zhao L, Zhu H, He D, Tang W, Luo Y. Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(7):806–811.
355. Luo L, Chen Y, Wang L, Zhuo G, Qiu C, Tu Q, et al. Polymorphisms of Genes Involved in the Folate Metabolic Pathway Impact the Occurrence of Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod Sci.* 2015;22(7):845–851.
356. Guidelines Committee of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. *Green-top Guideline No. 55. Late Intrauterine Fetal Death and Stillbirth.* London, UK: Royal College of Obstetricians and Gynaecologist; 2010. 1-33.
357. Silver RM. Fetal Death. *Obstet Gynecol.* 2007;109:153–167.
358. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Djordjevic V, Savic O, Mandic V, et al. Thrombophilia in women with pregnancy-associated complications: fetal loss and pregnancy-related venous thromboembolism. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(4):233–238.
359. Dekker JW, Lind J, Bloemenkamp KW, Quint WG, Kuijpers JC, van Doorn LJ, et al. Inherited risk of thrombosis of the fetus and intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;117(1):45–48.
360. Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupferminc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol.* 2002;99(5 Pt 1):684–687.
361. Helgadottir LB, Skjeldstad FE, Jacobsen AF, Sandset PM, Jacobsen EM. The association of inherited thrombophilia and intrauterine fetal death: a case-control study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011;22(8):651–656.
362. Santoro R, Iannaccaro P, Sottillotta G. [Prothrombotic gene mutations in women with recurrent abortions and intrauterine fetal death]. [Article in Italian]. *Minerva Ginecol.* 2005;57(4):447–450.
363. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos A-M, Vandvik PO. VTE, Thrombophilia, Antithrombotic Therapy, and Pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012;141(2 Suppl):e691S–e736S.
364. Cohen W, Castelli C, Alessi MC, Aillaud MF, Bouvet S, Saut N, et al. ABO blood group and von willebrand factor levels partially explained the incomplete penetrance of congenital thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):2021–2028.

365. Franchini M, Makris M. Non-O blood group: An important genetic risk factor for venous thromboembolism. *Blood Transfus.* 2013;11(2):164–165.
366. Zhou S, Welsby I. Is ABO blood group truly a risk factor for thrombosis and adverse outcomes? *World J Cardiol.* 2014;6(9):985–992.
367. Spiezia L, Campello E, Bon M, Tison T, Milan M, Simioni P, et al. ABO blood groups and the risk of venous thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Blood Transfus.* 2013;11(2):250–253.
368. Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):62–69.
369. Larsen TB, Johnsen SP, Gislum M, Møller CAI, Larsen H, Sørensen HT. ABO blood groups and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. A population-based, nested case-control study. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):300–304.
370. Polat M, Bugdayci G, Sahin A, Kaya H, Sezer T, Ozturk S. Can pregnancy-associated plasma protein-A be a marker for the assessment of atherosclerosis risk in patients with chronic plaque psoriasis? *Postepy Dermatol Alergol.* 2016;33(5):340–344.
371. Chen BK, Leiferman KM, Pittelkow MR, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Localization and regulation of pregnancy-associated plasma protein A expression in healing human skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4465–4471.
372. Babić G. *Ispitivanje dejstva estradiola na funkciju endotela i oksidativni status u preeklamsiji* [disertacija]. Kragujevac, Srbija: Univerzitet u Kragujevcu; 2007.
373. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2001;345:1022–1029.
374. Karsli MF, Baser E, Seckin KD, Yeral Mİ, Togrul C, Ugur M. The impact of inherited thrombophilia on first trimester combined aneuploidy screening test parameters. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27(4):346–349.
375. Cıkman MS, Seckin KD, Karsli MF, Baser E, Cıkman DI, Cicek MN. The effect of inherited thrombophilia on second trimester combined aneuploidy screening test markers. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;291(4):787–790.
376. Frank M, Maymon R, Wiener Y, Neeman O, Kurzweil Y, Bar J. The effect of hereditary versus acquired thrombophilia on triple test Down's syndrome screening. *Prenat Diagn.* 2013;33(2):191–195.
377. Hamasaki N, Kanaji T. Clinical Role of Protein S Deficiency in Asian Population. In: Tanaka K, Davie EW, Ikeda Y, Iwanaga S, Saito H, Sueishi K, eds. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis.* Tokyo, Japan: Springer; 2008:597–613.

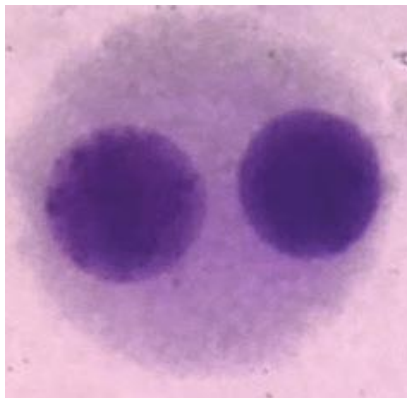
378. Hamasaki N. Unmasking Asian thrombophilia: is APC dysfunction the real culprit? *J Thromb Haemost.* 2012;10:2016–2018.
379. Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R. Thrombophilia in East Asian countries: are there any genetic differences in these countries? *Thromb J.* 2016;14(Suppl 1):25.
380. Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M. Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. *Pediatr Int.* 2013;55(3):267–271.
381. Ali N, Ayyub M, Khan SA. Protein C, protein S, Factor V Leiden mutation and antithrombin deficiency as a cause of hereditary thrombophilia in patients of venous thromboembolism and cerebrovascular accident. *Pak J Med Sci.* 2014;30(6):1323–1236.
382. Gerhardt A, Scharf RE, Greer IA, Zotz RB. Hereditary risk factors for thrombophilia and probability of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. *Blood.* 2016;128(19):2343–2349.
383. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011;13(1):1–16.
384. Alfirevic Z, Simundic A-M, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic, et al. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochem Med (Zagreb).* 2010;20(2):229–235.
385. Govindaiah V, Naushad SM, Prabhakara K, Krishna PC, Radha Rama Devi A. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Clin Biochem.* 2009;42(4-5):380–386.
386. Gandhi G, Amanjit Kaur Saini AK. DNA damage and obesity in diabetic patient. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences.* 2013; 2(1):5-16.
387. Donmez-Altuntas H, Sahin F, Bayram F, Bitgen N, Mert M, Guclu K, et al. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;771:30-36.
388. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):349–356.
389. Kilibarada B, Nikolić N. *Rezultati Istraživanja o efektima o efektima i stavovima u vezi sa Zakonom o zaštiti stanovništva od izloženosti duvanskom dimu.* Beograd, Srbija: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”; 2016: 1-32.
390. Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet.* 2013;4:132.
391. Haghghi A, Schwartz DH, Abrahamowicz M, Leonard GT, Perron M, Richer L, et al. Prenatal exposure to maternal cigarette smoking, amygdala volume, and fat intake in adolescence. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(1):98–105.

392. Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet.* 2011;88(4):450-457.
393. Satta R, Maloku E, Zhubi A, Pibiri F, Hajos M, Costa E, et al. Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16356–16361.
394. Breitling LP. Current genetics and epigenetics of smoking/tobacco-related cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1468–1472.
395. Sambolek-Hrbić E. Malformacijski sindromi uzrokovani vanjskim činiocima. In Zergollen Lj, ed. *Medicinska Genetika*, Vol. 1. Zagreb, Hrvatska: Školska Knjiga; 1987:150-159.
396. Lieberman M, Marks AD, Smith C. *Marksove osnove medicinske biohemije: klinički pristup.* Beograd, Srbija:Data Status; 2008.
397. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):277–284.
398. Veazey KJ, Carnahan MN, Muller D, Miranda RC, Golding MC. Alcohol-induced epigenetic alterations to developmentally crucial genes regulating neural stemness and differentiation. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37(7):1111–1122.
399. Santovito A, Cervella P, Delpero M. Evidence of genotoxicity in lymphocytes of non-smoking alcoholics. *Mol Biol Rep.* 2015;42(1):53–59.
400. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Rad Res.* 2007;41:1364–1375.
401. Cinkilic N, Kiyici S, Celikler S, Vatan O, Oz Gul O, Tuncel E et al. Evaluation of chromosome aberrations, sister chromatid exchange and micronuclei in patients with type-1 diabetes mellitus. *Mutat Res.* 2009;676(1-2):1–4.
402. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet.* 2004;41(6):454–458.
403. Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Dwyer T, Smith K, et al. Prospects for Epigenetic Epidemiology. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):389–400.
404. Xu B, Wang W, Guo H, Sun Z, Wei Z, Zhang X, et al. Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction. *Mutat Res.* 2014;770:1–8.
405. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res.* 2013;753(1):24–40.

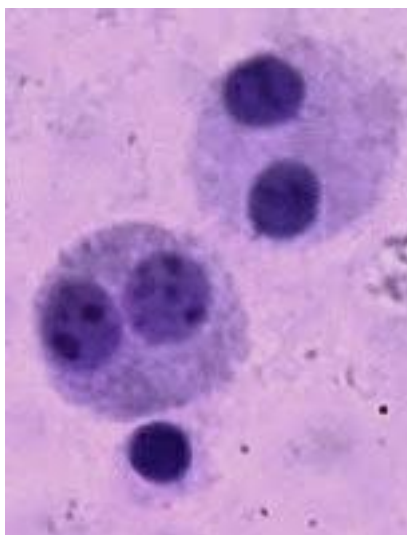


406. Aracic N, Roje D, Drmic Hofman I, Capkun V, Stefanovic V. Low molecular weight heparin treatment and impact of inherited thrombophilia type in pregnancies with previous adverse outcome. *J Matern Neonatal Med.* 2015;28(3):306–310.
407. Mikhed Y, Görlach A, Knaus UG, Daiber A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biology.* 2015;5:275–289.
408. De Sancho MT, Khalid S, Christos PJ. Outcomes in women receiving low-molecular-weight heparin during pregnancy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(8):751-755.
409. Greer IA, Nelson-Piercy C. Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy. *Blood.* 2005;106(2):401–407.
410. Carr JA, Cho JS. Low molecular weight heparin suppresses tumor necrosis factor expression from deep vein thrombosis. *Ann Vasc Surg.* 2007;21(1):50–55.
411. Markunas CA, Xu Z, Harlid S, Wade PA, Lie RT, Taylor JA, et al. Identification of DNA Methylation Changes in Newborns Related to Maternal Smoking during Pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2014;122(10):1147–1153.
412. van Otterdijk SD, Binder AM, Michels KB. Locus-specific DNA methylation in the placenta is associated with levels of pro-inflammatory proteins in cord blood and they are both independently affected by maternal smoking during pregnancy. *Epigenetics.* 2017;12(10):875–885.
413. Arabin B, Stupin JH. Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy: Part 2: Evidence-based Risk Factors and Interventions. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2014;74(7):646–655.

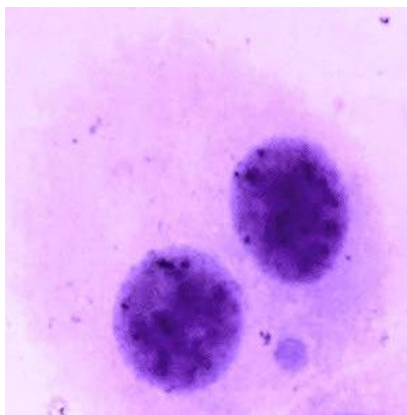
## 9. ПРИЛОГ



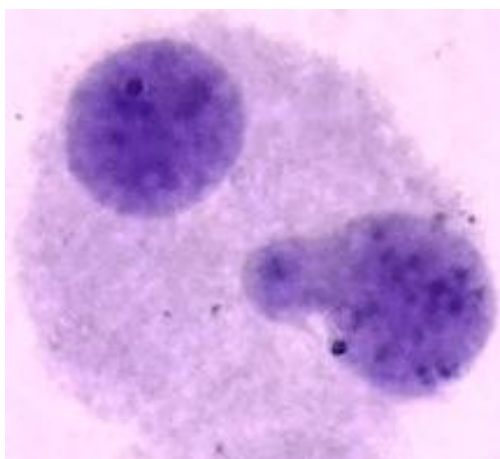
**Слика 1.** Бинуклеусна (БН) ћелија



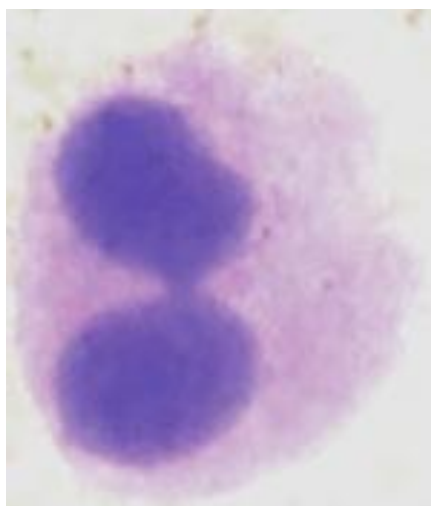
**Слика 2.** Две бинуклеусне (БН) и једна моноклеусна ћелија



**Слика 3.** Бинуклеусна ћелија (БН) са једним миконуклеусом (МН)



**Слика 4.** Бинуклеусна ћелија (БН) са нуклеусним пупољком (НП)



**Слика 5.** Нуклеоплазматски мост (НПМ) у бинуклеусној (БН) ћелији

## 10. СПИСАК СЛИКА, СХЕМА, ГРАФИКОНА И ТАБЕЛА

### 10.1 Сlike

Слика 1. Бинуклеусна (БН) ћелија.....	178
Слика 2. Две бинуклеусне (БН) и једна моноклеусна ћелија .....	178
Слика 3. Бинуклеусна ћелија (БН) са једим миконуклеусом (МН) .....	179
Слика 4. Бинуклеусна ћелија (БН) са нуклеусним пупољком (НП) .....	179
Слика 5. Нуклеоплазматски мост (НПМ) у бинуклеусној (БН) ћелији .....	179

### 10.2 Схеме

Схема 1. Механизми формирања микронуклеуса, нуклеусних пупољака и нуклеоплазматских мостова: МН (А;Б), НП (Ц) (жуте тачке указују на присуство ДМ - дуплог минутног хромозом са високо амплификованим генским секвенцама), НПМ (Д) (приказана ситуација након пуцања НПМ).. .....	12
Схема 2. Модел коагулационе каскаде (114) .....	24

### 10.3 Графикони

Графикон 1. Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелицом је приказана цитогенетска локација SERPINC1 гена, на дугом (q) краку хуманог хромозома 1 на позицији 25.1.....	30
Графикон 2. Идеограм другог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса PROC гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 2 на позицији 14.3.....	32
Графикон 3. Идеограм трећег хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса PROC гена на дугом краку (q) хуманог хромозма 3 на позицији 11.2.....	34
Графикон 4. Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса фактор V гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 1 на позицији 24.2.....	36
Графикон 5. Идеограм једанестог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса F2 гена на кратком (p) краку хуманог хромозома 11 на позицији 11.2 .....	39
Графикон 6. Идеограм првог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса MTHFR гена на кратком (p) краку хуманог хромозома 1 на позицији 36.22.....	41
Графикон 7. Идеограм седмог хуманог хромозома. Стрелица показује положај генског локуса SERPINE1 гена на дугом (q) краку хуманог хромозома 7 на позицији 22.1.....	45
Графикон 8. Најучесталији појединачни и комбиновани тромбофилни поремећаји хемостазног система код трудница с дијагностикованом тромбофилијом.....	69

Графикон 9. Дистрибуција вредности базалних МН фреквенци у испитиваној популацији трудница .....	74
Графикон 10. Правоугаоним дијаграмом представљене статистички значајне разлике у фреквенци МН у две кохорте (са и без тромбофилије).....	76
Графикон 11. Правоугаоним дијаграмом представљене су статистички разлике у фреквенци НПМ у две кохорте (са и без тромбофилије) .....	77
Графикон 12. Правоугаоним дијаграмом представљене су статистички разлике у фреквенци НП у две кохорте (са и без тромбофилије) .....	77
Графикон 13. Процентна заступљеност МН фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће.....	79
Графикон 14. Процентна заступљеност НПМ фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће.....	80
Графикон 15. Процентна заступљеност НП фреквенци у студијској популацији на почетку трудноће.....	81
Графикон 16. Дијаграм линеарне регресије тромбофилије и фреквенце МН.....	90
Графикон 17. Дистрибуција МН у испитиваним кохортама трудница у порођају .....	95
Графикон 18. Дистрибуција НПМ у испитиваним кохортама трудница у порођају .....	96
Графикон 19. Дистрибуција НП у испитиваним кохортама трудница у порођају .....	97
Графикон 20. Дистрибуција МН у испитиваним групама неонатуса .....	98
Графикон 21. Дистрибуција НПМ у испитиваним групама неонатуса .....	99
Графикон 22. Дистрибуција НП у испитиваним групама неонатуса.....	100
Графикон 23. Појединачне вредности фреквенци МН код трудница с тромбофилијом пре терапије LWMH (први триместар) и током примене терапије (у порођају) .....	107
Графикон 24. Појединачне вредности фреквенци МН код трудница с тромбофилијом пре терапије LWMH (први триместар) и њихових неонатуса .....	108
Графикон 25. Присуство појединачних и комбинованих тромбофилија код трудница на тромбопрофилактици које су током трудноће развиле компликације у трудноћи .....	111
Графикон 26. Резултати ROC анализе за фреквенце МН и присуство тромбофилије .....	114
Графикон 27. Резултати ROC анализе за фреквенце НПМ и присуство тромбофилије .....	115
Графикон 28. Резултати ROC анализе фреквенци НП и присуство тромбофилије .....	115
Графикон 29. Резултати ROC анализе фреквенце МН и компликација у трудноћи .....	116

## 10.4 Табеле

Табела 1. Демографска обележја и животне навике трудница у студији .....	62
Табела 2. Претходне тромбозе и акушерска анамнеза код трудница у студији.....	63
Табела 3. Присуство крвних група АВО и RhD система у испитиваној популацији.....	64
Табела 4. Биохемијски маркери анеуплодије у испитиваним кохортама .....	66
Табела 5. Присуство протеинске дефицијенције, појединачних генских варијанти и антифосфолипидних антитела код трудница с дијагностикованом тромбофилијом.....	67
Табела 6. Измерени генотипови и алелске фреквенце за четири генске варијанте (Фактор V Leiden, Фактор II G20210A, MTHFR C667T и PAI-1 5G/4G) код трудница с дијагностикованом тромбофилијом .....	68
Табела 7. Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса здравих трудница.....	70
Табела 8. Измерене вредности појединачних цитогенетички биомаркери у првом триместру гестације, у порођају и у крви неонатуса трудница с тромбофилијом .....	72
Табела 9. Вредности цитогенетичких биомаркера у испитиваној популацији трудница у првом триместру гестације, пре укључивања антикоагулантне терапије .....	74
Табела 10. Међугрупна разлика у измереним вредностима фреквенци цитогенетичких биомаркер (МН,НПМ,НП) у испитиваној популацији трудница на почетку трудноће .....	76
Табела 11. Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП/1000БН у зависности од демографских карактеристика, претходних тромбоза и исхода трудноћа, као и животних навика у групама трудница у првом триместру гестације.....	82
Табела 12. Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП у зависности од оптерећене породичне анамнезе обољевања од карцинома, коронарих болести, тромбоза, инфаркта, дијабетеса тип 1 и дијабетеса тип 2 .....	84
Табела 13. Корелација тромбофилије са факторима присутним пре актуелне трудноће.....	87
Табела 14. Корелација базалних фреквенци МН, НПМ, НП у првом триместру гестације с различитим факторима ризика .....	88
Табела 15. Посматрани фактори ризика као предиктори вредности фреквенци микронуклеуса (МН/1000БН) добијени линеарном регресионом анализом (униваријантном и мултиваријантном) 91	
Табела 16. Посматрани фактори ризика као предиктори вредности фреквенци нуклеоплазматских мостова ( НПМ/1000БН).....	92
Табела 17. Посматрани фактори ризика као предиктори фреквенце НП (униваријантна и мултиваријантна анализа) .....	93

Табела 18. Средње вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) код испитиване популације трудница у порођају у две кохорте .....	94
Табела 19. Средње вредности цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ, НП) код неонатуса .....	97
Табела 20. Корелација присуства тромбофилије, пушења цигарета, конзумације алкохола у трудноћи и ВМІ мајки на почетку трудноће с вредностима цитогенетичких биомаркера код неонатуса .....	101
Табела 21. Разлике у средњим вредностима фреквенци МН, НПМ, НП у крви неонатуса у зависности од пушачких навика и употребе алкохола током трудноће и ВМІ мајки на почетку трудноће.....	102
Табела 22. Телесна маса мајки на почетку трудноће као предиктор вредности фреквенци МН (број МН/1000ВН) у крви неонатуса добијени униваријантном линеарном регресионом анализом .....	103
Табела 23. Пушење цигарета у трудноћи и телесна маса мајки на почетку трудноће као предиктори вредности фреквенци НПМ (број НПМ/1000ВН) у крви неонатуса добијени линеарном регресионом анализом (униваријантном и мултиваријантном) .....	103
Табела 24. Корелација присуства цитогенетичких биомаркера код трудница у порођају с вредностима цитогенетичких биомаркера (МН,НПМ и НП) код неонатуса .....	105
Табела 25. Фреквенце цитогенетичких биомаркера (МН, НПМ) у крви мајки у порођају као предиктори фреквенце МН у крви неонатуса.....	105
Табела 26. Приказ статистике Вилкоксоновог теста за цитогенетичке биомаркере.....	106
Табела 27. Исходи трудноћа, појава IUGR и абрупције плаценте, компликације трудноћа у испитиваној популацији.....	110
Табела 28. Карактеристике порођаја у испитиваној популацији.....	112