

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanja Z. Lalić-Ćosić

**ISPITIVANJE ZNAČAJA
MARKERA HIPERKOAGULABILNOSTI I
GLOBALNIH HEMOSTATSKIH TESTOVA U
TRUDNOĆI KOMPLIKOVANOJ
PREEKLAMPSIJOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Sanja Z. Lalić-Ćosić

**EVALUATION OF THE
HYPERCOAGULABILITY MARKERS AND
GLOBAL HAEMOSTATIC TESTS IN
PREGNANCIES COMPLICATED WITH
PRE-ECLAMPSIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentor:

Dr sc. Violeta Dopsaj
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Mirjana Kovač
viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Aleksandra Antović
vanredni profesor, Karolinska Institut, Štokholm, Švedska – Odsek za medicinu

Dr sc. Željko Miković
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr sc. Dragomir Marisavljević
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković
docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Najsrdajnije se zahvaljujem svojoj mentorki, prof. dr Violeti Dopsaj, za izuzetnu naučnu i stručnu pomoć, dobronamerne sugestije i savete, kao i razumevanje i podršku kako tokom izrade ove doktorske disertacije, tako i u mom profesionalnom razvoju.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Mirjani Kovač koja mi je ukazala poverenje i uvela me u čudesan svet istraživanja hemostatskih poremećaja. Iskreno sam zahvalna na njenom tutorstvu i nesebičnoj podršci od samog početka doktorskih studija, kao i svom pruženom znanju i mudrosti, uloženom trudu i vremenu, stalnom ohrabrenju i prijateljstvu.

Moja beskrajna zahvalnost upućena je prof. dr Aleksandri Antović, koja mi je pružila mogućnost da učestvujem u radu velike istraživačke grupe i realizujem deo svog istraživanja na Institutu Karolinska u Švedskoj, na nesebično podeljenom znanju i iskustvu, kao i podršci i pomoći u toku istraživanja i izrade doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Željku Mikoviću, koji je prihvatio predloge i podržao realizaciju istraživanja, dr Vesni Mandić-Marković na predusretljivosti i pomoći prilikom kliničke obrade ispitanica, korisnim savetima i sugestijama, kao i kolegama i osoblju Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ na pomoći prilikom sakupljanja uzoraka.

Koristim priliku da uputim veliku zahvalnost celokupnom kolektivu laboratorije Odeljenja za ispitivanje poremećaja hemostaze sa Registrom urođenih koagulopatija u Institutu za transfuziju krvi Srbije za izuzetnu saradnju i nesebičnu pomoć tokom sakupljanja uzoraka i eksperimentalne faze određivanja laboratorijskih parametara.

Zahvaljujem se prof. dr Jovanu Antoviću, prof. dr Fariborzu Mobarrezu, Nidi Mahmoud Hourani Soutari, Ivi Pruner, Janan Zong i ostalim članovima tima na gostoprimstvu, saradnji i pomoći u eksperimentalnom radu tokom boravka u Švedskoj.

Posebnu zahvalnost želim da izrazim svojoj porodici, svom sinu Relji i supruhu Srđanu, koji su imali bezgranično strpljenje i razumevanje za mene i moj rad i pomogli mi da istrajem na tom putu, svojoj sestri na motivaciji, podršci i pomoći u procesu nastajanja i pisanja doktorske disertacije, kao i svojim roditeljima na безусловnoj ljubavi i posvećenosti, podsticanju i stvaranju mogućnosti da tokom celog života učim i napredujem.

Zahvalnost i iskreno poštovanje upućujem svima koji su svojim učešćem doprineli sprovođenju istraživanja, kao i svim ispitanicama bez čijeg dobrovoljnog učešća izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Mojoj porodici

ISPITIVANJE ZNAČAJA MARKERA HIPERKOAGULABILNOSTI I GLOBALNIH HEMOSTATSKIH TESTOVA U TRUDNOĆI KOMPLIKOVANOJ PREEKLAMPSIJOM

SAŽETAK

Preeklampsija je multisistemski poremećaj koji se javlja kao komplikacija trudnoće i predstavlja jedan od vodećih uzroka mortaliteta i morbiditeta majki, ali i njihovog potomstva. Smatra se da preeklampsija nastaje kao posledica poremećaja u ranom razvoju placente koji dovodi do aktivacije maternalnog vaskularnog endotela što rezultuje generalizovanom vazokonstrikcijom, značajnim metaboličkim promenama, disfunkcijom endotela, pojačanim inflamatornim odgovorom i aktivacijom koagulacije. Takođe, dokazano je da pojava preeklampsije u trudnoći ukazuje na postojanje nepovoljnog kardio-metaboličkog profila žene, te je u novijim vodičima preeklampsija uvrštena u dugoročne faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Pored toga, preeklampsija i KVB imaju zajedničke faktore rizika, a oba poremećaja su okarakterisana i zajedničkim patofiziološkim promenama. Klinički simptomi preeklampsije, hipertenzija i proteinurija, ispoljavaju se nakon 20. nedelje gestacije, mada dijagnoza preeklampsije može da se postavi i u odsustvu proteinurije ukoliko je novonastala hipertenzija udružena sa pojavom trombocitopenije, poremećene funkcije jetre, novorazvijene bubrežne insuficijencije, plućnog edema ili novonastalih vizuelnih odnosno cerebralnih poremećaja, te uteroplacentalnog poremećaja koji rezultuje zastojem u rastu ploda.

S obzirom da je hiperkoagulabilno stanje u preeklampsiji dodatno pojačano u odnosu na normalnu trudnoću cilj ove studije je bio da se ispita korisnost globalnih testova hemostaze, endogenog trombinskog potencijala i ukupnog hemostatskog potencijala, u proceni poremećaja hemostaze u preeklampsiji, pre i nakon porođaja, kao i da se utvrdi povezanost ispitivanih parametara sa ishodima preeklamptične trudnoće. Analizirane su takođe i karakteristike fibrinskih ugrušaka u normalnoj i preeklamptičnoj trudnoći. Pored toga, određivani su različiti fenotipovi ekstracelularnih vezikula i analizirana je njihova povezanost sa ispitivanim hemostatskim parametrima.

U studiju je uključeno 46 trudnica sa preeklampsijom i 80 zdravih trudnica. U grupi trudnica sa preeklampsijom utvrđen je značajno viši indeks telesne mase, kao i povećano

prisustvo komorbiditeta, infertiliteta i komplikacija u prethodnoj trudnoći. Parametri ETP testa, ETP i visina pika, i ukupni hemostatski potencijal (OHP) su bili značajno povećani u preeklampsiji u poređenju sa normalnom trudnoćom ($P < 0,001$), dok su vrednosti ukupnog fibrinolitičkog potencijala (OFP) bile značajno snižene ($P < 0,001$). Vreme lize ugruška je bilo značajno produženo u preeklampsiji, čak i posle dodatka specifičnog TAFI inhibitora ($P < 0,001$). U grupi trudnica sa preeklampsijom nakon porođaja utvrđeno je dodatno povećanje visine pika ($P = 0,007$) i smanjenje OFP vrednosti ($P = 0,008$) u odnosu na vrednosti pre porođaja. Kod preeklamptičnih trudnica sa komplikacijama izmerene su značajno snižene koncentracije antitrombina ($P = 0,030$), dok su u pogrupi sa renalnim komplikacijama utvrđene značajno povećane vrednosti ETP, visine pika i D-dimera ($P = 0,014$; $P = 0,012$; $P = 0,015$; redom). ROC analizom je pokazano da je visina pika bolji pokazatelj renalnih komplikacija u odnosu na ETP (ROC AUC 0,846; 95% CI 0,714 – 0,979; $P = 0,013$ vs 0,767; 95% CI 0,601 – 0,933; $P = 0,054$). U pogledu fetalnih komplikacija u preeklampsiji, trudnice kod kojih je zabeležen zastoj u rastu ploda (IUGR) imale su značajno niže vrednosti D-dimera u odnosu na trudnice bez prisustva IUGR ($P = 0,006$), dok su kod preeklamptičnih trudnica sa oligohidramnionom utvrđene značajno snižene vrednosti OFP ($P = 0,033$). Vrednosti Apgar skora u 5. minutu su bile u korelaciji sa ETP vrednostima ($r = -0,309$; $P = 0,041$). Turbidimetrijskim merenjima i SEM utvrđena je poremećena struktura fibrinskih ugrušaka kod trudnica sa preeklampsijom, okarakterisana povećanom brzinom stvaranja fibrina ($P = 0,006$) i tanjim fibrinskim vlaknima ($P = 0,025$), što doprinosi čvrstoći fibrinskih ugrušaka. U preeklampsiji je takođe utvrđeno prisustvo značajno povećanih koncentracija PS+ CD42a+ trombocitnih EV ($P = 0,014$) i PS+ VCAM-1+ endotelih EV ($P = 0,002$) u poređenju sa normalnom trudnoćom. Kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja izmerene su povišene koncentracije svih ispitivanih fenotipova EV [PS+ EV ($P = 0,001$), PS+ CD42a+ EV ($P < 0,001$), PS+ CD62E+ EV ($P < 0,001$), PS+ VCAM-1+ EV ($P < 0,001$) i PS+ TF+ EV ($P = 0,015$)], izuzev PIGF+ EV, u poređenju sa vrednostima pre porođaja. Inverzna korelacija utvrđena je između EV koncentracija (PS+, PS+ TF+ i PIGF+) i parametara OHP testa i fibrinskog ugruška, dok su PS+ VCAM-1+ EV bile u direktnoj korelaciji sa vrednostima FVIII u plazmi.

Rezultati ove opsežne procene hemostatskog statusa u preeklampsiji su pokazali da je hiperkoagulabilno stanje perzistentno prisutno kod trudnica sa preeklampsijom, čak i nakon porođaja, kao i da se može pratiti primenom dva ispitivana globalna hemostatska testa. Pored toga, ova studija pruža dokaze da trudnice sa preeklampsijom imaju nepovoljne karakteristike

i strukturu fibrinskih ugrušaka, koji bi mogli da budu povezani sa razvojem KVB kasnije u toku života. Što se tiče maternalnih komplikacija u preeklampsiji, naši podaci pokazuju da su značajno povećane vrednosti ETP i visine pika prisutne kod preeklamptičnih trudnica sa renalnim komplikacijama, što sugerise na povećan rizik od tromboze u ovoj grupi, iako precizne kliničke implikacije takvog zapažanja tek treba da se utvrde. Povećana koncentracija PS+ CD42a+ trombocitnih EV i PS+ VCAM-1+ endotelnih EV kod preeklamptičnih trudnica pre i nakon porođaja, praćena dodatnim postpartalnim povećanjem koncentracije ukupnih PS+ EV, PS+ CD62E+ endotelnih EV i PS+ TF+ EV i inverzna povezanost PS+ EV, PS+ TF+ EV i PIGF+ EV sa vrednostima OHP i karakteristikama fibrinskih ugrušaka može da sugerise uključivanje EV u intravaskularno taloženje fibrina koje dovodi do poremećaja mikrocirkulacije u preeklampsiji, prvenstveno na nivou placentе i bubrega. Osim toga, doprinos EV nepovoljnim karakteristikama fibrinskih ugrušaka zajedno sa povećanim oslobađanjem PS+ VCAM-1+ EV u preeklampsiji može da bude povezan i sa kasnijim razvojem KVB kod ovih žena.

Ključne reči: preeklampsija, hiperkoagulabilnost, globalni testovi hemostaze, struktura fibrinskog ugruška, ekstracelularne vezikule

Naučna oblast: Medicinske nauke – farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

EVALUATION OF THE HYPERCOAGULABILITY MARKERS AND GLOBAL HAEMOSTATIC TESTS IN PREGNANCIES COMPLICATED WITH PRE-ECLAMPSIA

ABSTRACT

Pre-eclampsia is a multisystem disorder that occurs as a complication of pregnancy and is one of the leading causes of maternal mortality and morbidity, as well as of their offspring. The major cause of pre-eclampsia is considered to be a defect in early placental development leading to maternal vascular endothelial activation which results in generalized vasoconstriction, significant metabolic changes, endothelial dysfunction, enhanced inflammatory response, and coagulation activation. Also, it has been proven that the occurrence of pre-eclampsia in pregnancy indicates the existence of an unfavourable cardio-metabolic profile in women, and recent guidelines include pre-eclampsia as a long-term risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD). Moreover, pre-eclampsia and CVD share common risk factors, and both disorders are characterized by common pathophysiological changes. Clinical symptoms of preeclampsia, hypertension and proteinuria, can be seen after 20 weeks of gestation, although the diagnosis of pre-eclampsia can be made in the absence of proteinuria if the new-onset hypertension is associated with thrombocytopenia, impaired liver function, new-onset renal failure, pulmonary oedema or new-onset visual or cerebral disorders, and uteroplacental disorder that results in fetal growth retardation.

Bearing in mind that the hypercoagulable state in pre-eclampsia is further enhanced compared to normal pregnancy, the aim of this study was to evaluate the usefulness of global haemostatic assays, endogenous thrombin potential and overall haemostatic potential in the assessment of the haemostatic disorders in pre-eclampsia before and after delivery and to analyse the results of these assays in relation to the outcomes of preeclamptic pregnancy. The characteristics of fibrin clots in normal and preeclamptic pregnancies were also analyzed. Furthermore, different phenotypes of extracellular vesicles were determined and their association with the investigated hemostatic parameters was analyzed.

The study involved 46 pregnant women with pre-eclampsia and 80 healthy pregnant women. In the group of pregnant women with pre-eclampsia, a significantly higher body

mass index was found, as well as an increased presence of comorbidities, infertility and complications in previous pregnancies. ETP assay parameters, ETP and peak height, and overall haemostatic potential (OHP) were significantly increased ($P < 0.001$), whereas overall fibrinolytic potential (OFP) values were significantly reduced ($P < 0.001$) in pre-eclampsia compared to normal pregnancy. The clot lysis time was significantly prolonged in pre-eclampsia, even after the addition of a specific TAFI inhibitor ($P < 0.001$). In the group of pregnant women with pre-eclampsia after delivery, an additional increase in peak height ($P = 0.007$) and a decrease in OFP values ($P = 0.008$) compared to pre-delivery values were found. Significantly reduced antithrombin concentrations ($P = 0.030$) were measured in preeclamptic pregnant women with complications, while significantly increased values of ETP, peak height and D-dimer ($P = 0.014$; $P = 0.012$; $P = 0.015$, respectively) were found in the group with renal complications. ROC analysis revealed that peak height was a better indicator of renal complications compared to ETP (ROC AUC 0.846; 95% CI 0.714 - 0.979; $P = 0.013$ vs 0.767; 95% CI 0.601 - 0.933; $P = 0.054$). Regarding foetal complications in pre-eclampsia, pregnant women with intrauterine growth retardation (IUGR) had significantly lower D-dimer values compared to pregnant women without IUGR ($P = 0.006$), while in preeclamptic pregnant women with oligohydramnios, significantly lower OFP values ($P = 0.033$) were found. 5-minute APGAR score correlated with ETP values ($r = -0.309$; $P = 0.041$). Turbidimetric measurements and SEM revealed an altered structure of fibrin clots in pregnant women with pre-eclampsia, characterized by faster fibrin formation rate ($P = 0.006$) and thinner fibrin fibers ($P = 0.025$), which contributes to the strength of fibrin clots. Pre-eclampsia also showed the presence of significantly increased concentrations of PS+ CD42a+ platelet EVs ($P = 0.014$) and PS+ VCAM-1+ endothelial EVs ($P = 0.002$) compared to normal pregnancy. Concentrations of all investigated EV phenotypes [PS+ EVs ($P = 0.001$), PS+ CD42a+ EVs ($P < 0.001$), PS+ CD62E+ EVs ($P < 0.001$), PS+ VCAM-1+ EVs ($P < 0.001$) and PS+ TF+ EVs ($P = 0.015$)], except PlGF+ EVs, were significantly elevated in preeclamptic pregnant women after delivery compared to the values before delivery. An inverse correlation was observed between EVs concentrations (PS+, PS+ TF+ and PlGF+) and OHP assay and fibrin clot parameters, while PS+ VCAM-1+ EVs directly correlated with plasma FVIII values.

The results of this extensive assessment of haemostatic status in pre-eclampsia showed that the hypercoagulable state is persistently present in pregnant women with pre-eclampsia, even after delivery, and can be monitored using two global haemostatic assays. Moreover,

this study provides evidence that pregnant women with pre-eclampsia have unfavourable features and structure of fibrin clots, which could be associated with the development of CVD later in life. Regarding maternal complications in pre-eclampsia, our data show that significantly increased ETP and peak height values are present in preeclamptic pregnant women with renal complications, suggesting an increased thrombotic risk in this group, although the precise clinical implications of such an observation remain to be determined. Increased concentration of PS+ CD42a+ platelet EVs and PS+ VCAM-1+ endothelial EVs in preeclamptic pregnant women before and after delivery, followed by an additional postpartum increase in total PS+ EVs, PS+ CD62E+ endothelial EVs and PS+ TF+ EVs and inverse association of PS+ EVs, PS+ TF+ EVs and PlGF+ EVs with OHP values and fibrin clot characteristics may suggest the involvement of EVs in intravascular fibrin deposition leading to microcirculation disorders in pre-eclampsia, primarily at the placental and renal levels. In addition, the contribution of EVs to the unfavourable characteristics of fibrin clots together with the increased release of PS+ VCAM-1+ EVs in preeclampsia may be related to the subsequent CVD development in these women.

Key words: pre-eclampsia, hypercoagulability, global haemostatic assays, fibrin clot structure, extracellular vesicles

Scientific field: Medical sciences – Pharmacy

Scientific subfield: Medical biochemistry

LISTA SKRAĆENICA KORISĆENIH U TEKSTU

Skraćenica	Srpski naziv	Engleski naziv
aβ2GPI	Anti- β 2 glikoprotein I antitela	<i>Anti-β2-glycoprotein I antibodies</i>
aCL	Antikardiolipinska antitela	<i>Anticardiolipin antibodies</i>
ACOG	Američki koledž za ginekologiju i akušerstvo	<i>The American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
APC-R	Rezistencija na aktivirani protein C	<i>Activated protein C resistance</i>
APTT	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme	<i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
AT	Antitrombin	<i>Antithrombin</i>
AUC	Površina ispod ROC krive	<i>Area under the ROC Curve</i>
CLT	Vreme liziranja ugruška	<i>Clot Lysis Time</i>
DIK	Diseminovana intravaskularna koagulacija	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>
EV	Ekstracelularne vezikule	<i>Extracellular Vesicles</i>
ETP	Endogeni trombinski potencijal	<i>Endogenous Thrombin Potential</i>
F1+2	Protrombinski fragment 1 i 2	<i>Prothrombin fragment F1+2</i>
GH	Gestacijska hipertenzija	<i>Gestational hypertension</i>
HELLP	Hemoliza, povišena aktivnost enzima jetre i nizak broj trombocita	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count</i>
ICAM-1	Intercelularni adhezioni molekul 1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ISEV	Međunarodno udruženje za ekstracelularne vezikule	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
ISSHP	Međunarodno udruženje za proučavanje hipertenzije u trudnoći	<i>International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy</i>
ITM	Indeks telesne mase	<i>Body mass index</i>
IUGR	Intrauterusni zastoj u rastu ploda	<i>Intrauterine growth restriction</i>
KP	Krvni pritisak	<i>Blood pressure</i>
KVB	Kardiovaskularna bolest	<i>Cardiovascular Disease</i>
MPV	Srednji volumen trombocita	<i>Mean Platelet Volume</i>
MVP	Najveći vertikalni promer „prozora” amnionske tečnosti	<i>Maximum vertical pocket</i>
OCP	Ukupan koagulacioni potencijal	<i>Overall Coagulation Potential</i>
OFP	Ukupan fibrinolitički potencijal	<i>Overall Fibrinolytic Potential</i>
OHP	Ukupni hemostatski potencijal	<i>Overall Haemostatic Potential</i>
PAI	Inhibitor aktivatora plazminogena	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>

PEK	Preeklampsija	<i>Pre-eclampsia</i>
PIGF	Placentalni faktor rasta	<i>Placenta Growth Factor</i>
PPROM	Preterminsko prevremeno prsnuće plodovih ovojaka	<i>Preterm Premature Rupture of Membranes</i>
PS	Fosfatidilserin	<i>Phosphatidylserine</i>
PT	Protrombinsko vreme	<i>Prothrombin time</i>
PTCI	Inhibitor karboksipeptidaze	<i>Potato Tuber Carboxy-peptidase Inhibitor</i>
ROS	Reaktivne kiseonične vrste	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RCOG	Kraljevski koledž za ginekologiju i akušerstvo	<i>Royal College of Obstetricians and Gynaecologist</i>
sFlt-1	Solubilna forma fms-sličnih tirozin kinaza receptora 1	<i>Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1</i>
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SGA	Mala gestacijska dob novorođenčeta	<i>Small Gestational Age</i>
SOGC	Društvo akušera i ginekologa Kanade	<i>Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada</i>
STBM	Sinciciotrofoblastne ekstracelularne vezikule	<i>Syncytiotrophoblast microparticles</i>
TAFI	Trombinom aktivirani fibrinolitički inhibitor	<i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TAT	Trombin-antitrombin kompleks	<i>Thrombin-antithrombin complex</i>
TF	Tkivni faktor	<i>Tissue factor</i>
TFPI	Inhibitor puta tkivnog faktora	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGT	Test generacije trombina	<i>Thrombin generation test</i>
TiFaCT	TF vreme koagulacije	<i>Tissue Factor Clotting Time</i>
TM	Trombomodulin	<i>Thrombomodulin</i>
VCAM-1	Vaskularni adhezioni molekul 1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VTE	Venski tromboembolizam	<i>Venous thromboembolism</i>
vWF	von Willebrand-ov faktor	<i>von Willebrand factor</i>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija i definicija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći	2
1.2. Faktori rizika za razvoj preeklampsije	4
1.3. Kliničke karakteristike preeklampsije.....	5
1.4. Maternalne komplikacije	6
1.5. Fetalne/neonatalne komplikacije	7
1.6. Dugoročne posledice preeklampsije	8
1.7. Etiologija i patogeneza preeklampsije	9
1.8. Hemostaza u normalnoj trudnoći i preeklampsiji	18
1.9. Laboratorijsko ispitivanje hemostaze u normalnoj trudnoći i preeklampsiji.....	23
1.9.1. Globalni testovi hemostaze	23
1.9.2. Ekstracelularne vezikule	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJALI I METODE	30
3.1. Mesto i faze istraživanja	30
3.2. Populacija i uzorak istraživanja/ispitanice.....	30
3.3. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja	31
3.4. Protokol ispitivanja	32
3.5. Metode ispitivanja.....	33
3.5.1. Endogeni trombinski potencijal (ETP)	33
3.5.2. Ukupni hemostatski potencijal (OHP).....	34
3.5.3. Vreme liziranja ugruška (CLT).....	35
3.5.4. Parametri fibrinskog ugruška	36
3.5.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	37
3.5.6. Antitrombin (AT).....	38
3.5.7. D-dimer	38
3.5.8. Faktor VIII (FVIII)	38
3.5.9. Fibrinogen	38
3.5.10. Trombin-antitrombin III kompleks (TAT).....	39
3.5.11. C-reaktivni protein (CRP).....	39
3.5.12. Parametri lipidnog statusa.....	39

3.5.13. Antifosfolipidna antitela	40
3.5.14. Ekstracelularne vezikule (EV)	40
3.6. Metode statističke obrade podataka	42
4. REZULTATI	44
4.1. Opšte i kliničke karakteristike ispitanica studijske i kontrolne grupe	44
4.2. Maternalne komplikacije u toku hospitalizacije i ishodi trudnoće kod ispitanica studijske grupe	47
4.3. Globalni testovi hemostaze	50
4.4. Vreme liziranja ugruška	55
4.5. Parametri fibrinskog ugruška i njegova struktura	58
4.6. Ostali laboratorijski parametri	61
4.7. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom	63
4.7.1. Analiza rezultata ispitivanih parametara u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije	64
4.7.2. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo pridruženih bolesti i infertiliteta	65
4.7.3. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije	67
4.7.4. Analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u odnosu na ishod trudnoće i prisustvo fetalnih komplikacija	70
4.8. Korelaciona analiza	72
4.8.1. Korelaciona analiza između ispitivanih globalnih testova hemostaze	72
4.8.2. Korelaciona analiza između globalnih testova hemostaze i ostalih ispitivanih parametara	73
4.8.3. Korelaciona analiza između ispitivanih parametara i proteinurije u grupi ispitanica sa preeklampsijom	76
4.8.4. Korelaciona analiza između ispitivanih parametara hemostaze i ishoda trudnoće u grupi ispitanica sa preeklampsijom	77
4.9. Ekstracelularne vezikule	78
5. DISKUSIJA	88
5.1. Globalni testovi hemostaze	89
5.2. Ostali laboratorijski parametri	94
5.3. Povezanost ispitivanih parametara sa karakteristikama i ishodima preeklamptične trudnoće	98
5.4. Ekstracelularne vezikule	102

5.4.1. PS+ ekstracelularne vezikule	103
5.4.2. Trombocitne PS+ ekstracelularne vezikule	104
5.4.3. Endotelne (CD62E+ i VCAM-1+) ekstracelularne vezikule	105
5.4.4. TF+ ekstracelularne vezikule	107
5.4.5. PlGF+ ekstracelularne vezikule	109
6. ZAKLJUČAK	111
7. LITERATURA	113
8. PRILOZI	138
8.1. Prilog 1 – „Saglasnost za učešće u ispitivanju“ (formular)	138
8.2. Prilog 2 – „Upitnik za ispitanice“ (standardizovani upitnik br. 1)	139
8.3. Prilog 3 – „Podaci o ispitanicama“ (standardizovani upitnik br. 2)	141

1. UVOD

Hipertenzija u trudnoći predstavlja najučestaliju komplikaciju trudnoće i ozbiljan zdravstveni i medicinski problem, kako u zemljama u razvoju, tako i u industrijski razvijenim zemljama. I pored značajnog napretka medicine i razvoja savremenih medicinskih tehnologija kojima je omogućen bolji nadzor trudnica, hipertenzivni poremećaji u trudnoći su vodeći uzrok i maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) hipertenzivni poremećaji, posle hemoragije, predstavljaju najčešći uzrok smrtnosti majki u trudnoći i odgovorni su za 14 % maternalnih letalnih ishoda, od čega je oko 75 % posledica preeklampsije/eklampsije (1,2). Procenjuje se da na svaki smrtni ishod, odnosno svaku maternalnu smrt dolazi 20 žena sa ozbiljnim morbiditetima ili invaliditetom (3). Pored toga, ustanovljeno je da žene sa istorijom hipertenzivnih poremećaja u trudnoći imaju povećan rizik za razvoj hronične hipertenzije i kardiovaskularnih oboljenja kasnije u životu (4).

U literaturi postoje velike varijacije u prijavljenoj stopi incidencije kako za hipertenzivne poremećaje u trudnoći (4 – 25 %), tako i za preeklampsiju (1 – 9 %). Najviša incidencija, kao i smrtnost, beleže se u zemljama Afrike, jugoistočne Azije i Latinske Amerike gde su faktori rizika prisutni u većoj meri, a prenatalna zaštita i terapijske mogućnosti su ograničeni. Pored regionalnih, socio-ekonomskih i rasnih razlika, značajna odstupanja u zabeleženim stopama incidencije potiču i od razlika u dizajnu studija, karakteristika populacije, kao i primenjivanim definicijama i klasifikacijama. Zabrinjavajući podatak svakako predstavlja činjenica da se poslednjih godina beleži porast incidencije hipertenzivnih poremećaja u trudnoći u SAD, istočnoj i zapadnoj Evropi i Latinskoj Americi, pre svega kao rezultat uznapredovale maternalne starosti u prvoj trudnoći, porasta pregestacijskog indeksa telesne mase (ITM) i porasta prevalencije drugih kardiometaboličkih faktora. Treba imati u vidu i da se tradicionalno u populacionim studijama incidencija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći izveštava u odnosu na sve trudnoće majke, a ne u odnosu na broj trudnih žena sa ovim poremećajima u reproduktivnoj dobi, čime se stopa incidencije značajno umanjuje. Prema podacima Garović i saradnika incidencija je čak dvostruko viša ukoliko se izračunava u odnosu na broj trudnih žena umesto na broj trudnoća, što za hipertenzivne poremećaje u trudnoći iznosi 15,3 % vs 7,3 %, odnosno za preeklampsiju 7,5 % vs 3,3 % (5–7).

1.1. Klasifikacija i definicija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći predstavljaju heterogenu grupu oboljenja i do današnjeg dana ne postoje usaglašeni stavovi u pogledu njihove klasifikacije, dijagnostičkih kriterijuma i terapijskog pristupa. S obzirom da mnoge države nemaju nacionalne vodiče za dijagnostifikovanje i lečenje hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, u literaturi se najčešće koriste klasifikacije Međunarodnog udruženja za proučavanje hipertenzije u trudnoći (*engl.* International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy – ISSHP) i Američkog koledža za ginekologiju i akušerstvo (*engl.* The American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG).

U ovom radu korišćena je ISSHP klasifikacija i revidirani kriterijumi objavljeni 2014. godine prema kojoj se hipertenzivni poremećaji u trudnoći dele na: hroničnu hipertenziju, gestacijsku hipertenziju, preeklampsiju (*de novo* ili superponiranu na hroničnu hipertenziju) i hipertenziju „belog mantila“ (8).

Hronična hipertenzija je definisana kao povišen krvni pritisak (KP) koji je postojao i pre trudnoće, odnosno sistolni KP ≥ 140 mm Hg i/ili dijastolni KP ≥ 90 mm Hg koji se razvio u trudnoći, ali pre 20. nedelje gestacije (ng). Najčešće je posledica esencijalne hipertenzije, povezane sa porodičnom istorijom hipertenzije ili uzrokovane prekomernom težinom.

Gestacijska hipertenzija (GH) se definiše kao *de novo* razvoj hipertenzije nakon 20. ng bez poremećaja koji su odlika preeklampsije. Obično se radi o benignom poremećaju, ali u 25 % slučajeva prelazi u preeklampsiju, naročito ukoliko se javi pre 32. ng.

Preeklampsija (PEK) je definisana pojavom povišenog krvnog pritiska (sistolni KP ≥ 140 mm Hg i/ili dijastolni KP ≥ 90 mm Hg) koja se prvi put registruje posle 20. ng, mereno minimalno dva puta u razmaku od 4 ili 6 h, uz prisustvo jednog ili više novonastalih stanja:

- proteinurije okarakterisane sa ≥ 300 mg proteina u 24h urinu ili odnosa proteini/kreatinin > 30 mg/mmol u nasumičnom uzorku urina ili najmanje 1 g/L, odnosno [2 +] na urinskoj tračici;
- disfunkcije drugih organa: bubrežne insuficijencije (koncentracija kreatinina u serumu > 90 μ mol/L ili udvostručena koncentracija kreatinina u serumu u odsustvu drugih bubrežnih oboljenja), poremećene funkcije jetre (dvostruko povišena aktivnost transaminaza u odnosu na gornju granicu referentnog intervala sa ili bez bola u gornjem desnom kvadrantu ili epigastričnog abdominalnog bola), neuroloških poremećaja (poput eklampsije, poremećenog mentalnog statusa, slepila, moždanog

udara, hiperefleksije udružene sa klonusom, teških glavobolja udruženih sa hiperefleksijom, pojave skotoma) ili hematoloških komplikacija (trombocitopenije sa brojem trombocita $< 150 \times 10^9/L$, diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK), hemolize).

- uteroplacentalnog poremećaja koji rezultuje zaostajanjem u rastu ploda.

Kada se pomenuti poremećaji pojave kod trudnice sa hroničnom hipertenzijom govorimo o hroničnoj hipertenziji sa superponiranom preeklampsijom. Takođe, prema ISSHP smernicama HELLP sindrom (*engl.* Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count) se ne smatra izolovanim i zasebnim poremećajem već ozbiljnom komplikacijom preeklampsije. Dodatno, u kliničkim uslovima se ne preporučuje podela preeklampsije na blagu i tešku, niti na ranu (javlja se pre 34. ng) i kasnu (javlja se posle 34. ng) preeklampsiju.

Pojam hipertenzije „belog mantila“ se uvodi s obzirom na podatke da se ovaj tip hipertenzije javlja u opštoj populaciji kod čak 1 od 4 pacijenta pri merenju KP u ambulanti ili na klinici.

ISSHP je 2018. godine objavio revidirane kriterijume prema kojima se pored navedenih kategorija dodaje maskirana hipertenzija i tranzitorna gestacijska hipertenzija. Maskirana hipertenzija se odnosi na povišen KP izmeren van klinike ili ambulante, najčešće dijagnostifikovan 24-časovnim praćenjem KP ambulantno ili automatskim praćenjem u kućnim uslovima kod pacijentkinja kod kojih postoje nalazi neobjašnjenih poremećaja, a koji su u posledičnoj vezi sa oštećenjem ciljnog organa dejstvom hipertenzije. Tranzitorna gestacijska hipertenzija se definiše kao novonastala hipertenzija koja se javlja u toku trudnoće i nestaje bez primenjene terapije. Najčešće se javlja u drugom ili trećem trimestru trudnoće i obično se detektuje na klinici pri čemu nakon nekoliko časova nestaje. Smatra se da u 40 % slučajeva prelazi u gestacijsku hipertenziju ili preeklampsiju, pa se savetuje redovno praćenje ovih trudnica. Takođe, usaglašeni su stavovi sa ACOG i isključen je pojam teške preeklampsije s obzirom da preeklampsija može da ugrozi i majku i plod u bilo kom trenutku, te se uvode pojmovi lakše i teže forme preeklampsije. Prema najnovijim ACOG smernicama govorimo o teškoj formi preeklampsije ukoliko je prisutan jedan od sledećih kriterijuma: teška hipertenzija (sistolni KP od 160 mm Hg ili viši, ili dijastolni KP od 110 mm Hg ili viši izmeren najmanje dva puta u razmaku od najmanje 4 h), trombocitopenija (broj trombocita $< 100 \times 10^9/L$), poremećena funkcija jetre koja se ne može objasniti alternativnom dijagnozom (dvostruko povišena aktivnost enzima jetre u odnosu na gornju granicu referentnog intervala ili bol u gornjem desnom kvadrantu trbuha ili bol u epigastrijumu koji ne reaguju na terapiju

medikamentima), bubrežna insuficijencija (koncentracija kreatinina u serumu $> 97 \mu\text{mol/L}$ ili udvostručena koncentracija kreatinina u serumu u odsustvu drugih bubrežnih oboljenja), edem pluća, novonastala glavobolja koja ne reaguje na terapiju medikamentima i ne može se objasniti alternativnom dijagnozom, ili vizuelni poremećaji (9,10).

Svakako treba naglasti da i dalje postoje značajna neslaganja između kriterijuma i preporuka različitih nacionalnih i međunarodnih udruženja u odnosu na ISSHP, pre svega u pogledu definicije preeklampsije i stanovišta da proteinurija ili zaostajanje u rastu ploda budu deo kriterijuma za postavljanje dijagnoze preeklampsije, zatim obavezne rutinske terapije antihipertenzivima i ciljnog KP, primene MgSO_4 , kao i vremenskog okvira za porođaj i pospartalnog praćenja majke.

1.2. Faktori rizika za razvoj preeklampsije

Preeklampsija je najčešća forma hipertenzivnog sindroma trudnoće, a ujedno i sa najtežim posledicama po majku i plod. Uprkos intenzivnim istraživanjima i primeni multiparametarskih modela do danas nisu identifikovani faktori i parametri koji bi samostalno ili u kombinaciji mogli da se koriste u predikciji razvoja preeklampsije. Brojne studije su pokazale da postoje određeni maternalni faktori koji mogu da predisponiraju njenu pojavu. Međutim, treba imati u vidu da se preeklampsija često javlja kod zdravih žena u prvoj trudnoći koje nemaju očiglednih faktora rizika (11). Kao faktori koji nose najveći rizik za razvoj preeklampsije navode se: postojanje preeklampsije u prethodnoj trudnoći, hronična hipertenzija, pregestacijski dijabetes, autoimune bolesti, hronična bubrežna oboljenja i multifetalna trudnoća. Žena sa preeklampsijom u prethodnoj trudnoći ima 8 puta veći rizik za razvoj preeklampsije u narednoj trudnoći, naročito ako se radilo o teškoj formi preeklampsije (relativni rizik (RR) = 8,4; 95 % CI 7,1 – 9,9). Rizik je najveći (55 %) ukoliko je zbog ozbiljnih komplikacija porođaj izvršen pre 28. ng, dok je dvostruko manji (25 %) ukoliko je porođaj izvršen pre 34. ng, a iznosi 16 % ukoliko je porođaj izvršen u terminu. Isto tako hronična hipertenzija, iako nije uobičajena kod žena u reproduktivnoj dobi, povećava rizik za nastanak preeklampsije pet puta u odnosu na trudnice koje nemaju ovaj faktor rizika (RR = 5,1; 95 % CI 4,0 – 6,5). Rizik značajno povećavaju i prisustvo pregestacijskog dijabetesa (RR = 3,7; 95 % CI 3,1 – 4,3), antifosfolipidni sindrom (RR = 2,8; 95 % CI 1,8 – 4,3), sistemski lupus eritematosus (RR = 2,5; 95 % CI 1,0 – 6,3) i hronične bolesti bubrega (RR = 1,8; 95 % CI 1,5 – 2,1). Iako se preeklampsija javlja u najvećem broju slučajeva u jednoplodnoj trudnoći, multifetalna trudnoća nosi dvostruko veći rizik za njen nastanak (RR = 2,9; 95 % CI

2,6 – 3,1) (12). Kod žena bez faktora visokog rizika prisustvo ≥ 2 faktora umerenog rizika povezano je sa četiri puta većim rizikom od pojave preeklampsije (13). Maternalne karakteristike uključene u umerene faktore rizika su: starost preko 35 godina, pregestacijski ITM $> 30 \text{ kg/m}^2$, porodična istorija, rasa, nuliparitet, nizak socio-ekonomski status i prisustvo komplikacija u prethodnoj trudnoći (14). Komplikacije u prethodnoj trudnoći povezane sa insuficijencijom placente predstavljaju rizik za nastanak preeklampsije (intrauterusni zastoj u rastu ploda (RR = 1,4; 95 % CI 0,6 – 3,0), abrupcija placente (RR = 2,0; 95 % CI 1,4 – 2,7) i mrtvorodenost (RR = 2,4; 95 % CI 1,7 – 3,4)), ali je preeklampsija istovremeno faktor rizika za nastanak ovih komplikacija (12). Trudnoća ostvarena vantelesnom oplodnjom je dodata u grupu faktora umerenog rizika za razvoj preeklampsije u vodičima iz 2021. godine (15). Povećana incidencija među ženama sa porodičnom istorijom preeklampsije, kao i kod žena koje su promenile partnera u odnosu na prethodnu trudnoću sugerisali su ulogu genetske predispozicije za nastanak preeklampsije (16). Pojavi preeklampsije takođe doprinosi i povećan interval između trudnoća (> 4 godine) (17). Nasuprot prethodnom, pušenje cigareta tokom trudnoće smanjuje rizik od preeklampsije (RR = 0,67; 95 % CI 0,60 – 0,75). Iako mehanizam odgovoran za protektivnu ulogu pušenja nije u potpunosti jasan smatra se da potiče od dejstva ugljen-monoksida (CO) koji se stvara tokom pušenja cigareta (18).

Činjenica je da ne postoji jedan uzrok nastanka preeklampsije već se radi o istovremenom sadejstvu više faktora što zasigurno doprinosi multisistemskom i multiorganskom karakteru ovog oboljenja.

1.3. Kliničke karakteristike preeklampsije

Maternalne patofiziološke promene kod preeklampsije su multisistemske, pri čemu se najveći stepen oštećenja zapaža u placenti, bubrezima, jetri i srcu. Dijagnostički znaci obično prethode pojavi simptoma, a uobičajeni su povišen krvni pritisak i proteinurija, često udruženi sa edemima. U laboratorijskim nalazima pored proteinurije na poremećaj renalne funkcije ukazuju i povišene vrednosti mokraćne kiseline u serumu koje nastaju kao posledica smanjene glomerularne filtracije, ali i povećane produkcije usled oksidativnog stresa. Visoke vrednosti mokraćne kiseline predstavljaju najosetljiviji laboratorijski indikator preeklampsije i ukazuju na povećan rizik za neželjene maternalne i perinatalne ishode (19). Smanjen klirens kreatinina javlja se kod većine pacijentkinja sa teškom formom preeklampsije, dok tek značajan porast serumskih vrednosti kreatinina, kao i jetrenih enzima, aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT), može da ukaže na pogoršavanje

bolesti. Promene u lipidnom statusu, koje su prisutne i u normalnoj trudnoći dodatno su izražene u preeklampsiji i uočava se porast koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola (*engl.* Low Density Lipoprotein Cholesterol), dok je nivo HDL holesterola (*engl.* High Density Lipoprotein Cholesterol) snižen (20,21).

1.4. Maternalne komplikacije

Heterogenost preeklampsije ne ogleda se samo u pogledu njene manifestacije, već i posledica koje ostavlja na majku i njeno potomstvo. Maternalne komplikacije u preeklampsiji uključuju: abrupciju placente (1 – 4 %), DIK/HELLP (10 – 20 %), plućni edem (2 – 5 %), akutnu bubrežnu insuficijenciju (1 – 5 %), eklampsiju (1 %), poremećaj ili krvarenje u jetri (1 %), moždani udar i smrt (22).

HELLP sindrom je jedna od najčešćih i najozbiljnijih komplikacija preeklampsije, iako može biti i zaseban klinički entitet (23). Učestalost ovog sindroma u trudnoći je 0,2 – 0,6 %, dok je kod trudnica sa preeklampsijom znatno češći (4 – 14 %). Obično se javlja u trećem trimestru trudnoće, a u oko 1/3 pacijentkinja se razvije nakon porođaja (24). Dijagnoza se postavlja na osnovu nalaza hemolize u razmazu periferne krvi, sniženja broja trombocita ispod $100 \times 10^9/L$ i dvostrukog povećanja nivoa transaminaza u odnosu na normalne vrednosti. U laboratorijskim nalazima uočavaju se trombocitopenija, porast nivoa LDH i transaminaza, kao i nekonjugovanog bilirubina u serumu. Snižene vrednosti haptoglobina su najbolji pokazatelj prisustva hemolize, s obzirom da tek u toku razvoja HELLP sindroma dolazi do sniženja vrednosti hematokrita (25). Skrining testovi hemostaze (PT, APTT i fibrinogen) su obično u granicama normalnih vrednosti, ali značajan porast D-dimera i pad fibrinogena mogu da ukažu na razvoj diseminovane intravaskularne koagulopatije (DIK). Pored DIK oko 1 – 25 % trudnica sa HELLP sindromom razvije neku od ozbiljnih komplikacija kao što su cerebralno krvarenje, kardio-pulmonalni zastoj, abrupcija placente, akutni respiratorni distress sindrom, edem pluća, renalna insuficijencija, subkapsularni hematom ili ruptura jetre. Klinički tok često karakteriše naglo i progresivno pogoršanje stanja majke i ploda, te je pojava HELLP sindroma udružena sa drugim komplikacijama apsolutna indikacija za hitan porođaj (26).

Eklampsija predstavlja pojavu epileptičnih napada tipa grand mal kod trudnice sa znacima preeklampsije u odsustvu drugih organskih bolesti centralnog nervnog sistema. Javlja se kao komplikacija preeklampsije i značajno doprinosi maternalnom mortalitetu širom

sveta (27). Pojavi eklamptičkih konvulzija u oko 80 % slučajeva prethodi glavobolja ili vizuelne smetnje koje uključuju zamagljen vid, fotofobiju, skotome i retko reverzibilno kortikalno slepilo (uzrokovano reverzibilnom kortikalnom leukoencefalopatijom), a mogu se javiti i bol u epigastrijumu ili izmenjen mentalni status. U oko 20 – 30 % slučajeva pojavi eklampsije ne prethode klasični znaci preeklampsije, hipertenzija i proteinurija. Oštećenje mozga u eklampsiji posledica je edema mozga, a cerebrovaskularne komplikacije poput moždanog udara i cerebrovaskularnog krvarenja su najčešći uzok smrti kod eklampsije (28).

Neurološke komplikacije u preeklampsiji koje mogu da se jave i bez prisustva eklampsije su glavobolja, zamagljen vid, skotomi, hiperrefleksija, a veoma retko kod teških formi bolesti i privremeno slepilo (29).

Ozbiljne kliničke manifestacije kod trudnica sa teškom formom preeklampsije koje mogu da dovedu i do letalnog ishoda su abrupcija placente, ascites, infarkt jetre, ruptura jetre, intra-abdominalno krvarenje, plućna embolija i akutna bubrežna insuficijencija (30).

1.5. Fetalne/neonatalne komplikacije

Fetalne/neonatalne komplikacije preeklampsije uključuju prematuritet (15 – 67 %), intrauterusni zastoj u razvoju (10 – 25 %), oligohidramnion (10 – 30 %) i bronhopulmonalnu displaziju (1 %), kao i značajno povećan morbiditet i mortalitet (22,31). Indikacije za prekid trudnoće kako bi se sprečila progresija preeklampsije, najčešće u interesu majke, su odgovorne za približno 15 % smrtnih ishoda ploda usled prevremenog porođaja (32).

Intrauterusni zastoj u rastu ploda (engl. Intrauterine growth restriction – IUGR) je veoma važan uzrok perinatalnog mortaliteta, kao i neposrednog (hipoglikemija, hiperbilirubinemija, hipotermija, policitemija, dislipidemija, perinatalna asfiksija, respiratorni distres sindrom, sindrom aspiracije mekonijuma, intraventrikularna hemoragija, nekrotizirajući enterokolitis) i odloženog morbiditeta (kašnjenje u razvoju kognitivnih sposobnosti i drugi poremećaji neurološkog razvoja, metabolički sindrom: gojaznost, dijabetes, hipertenzija, kardiovaskularna oboljenja) (33,34). Definiše se kao zastoj u rastu ploda koji nije dostigao svoj sopstveni genetski potencijal rasta i čija je procenjena telesna masa ispod desetog percentila u odnosu na gestacijsku dob potvrđenu ranim ultrazvučnim pregledom (35). S obzirom da u IUGR fetus progresivno odstupava od normalne krive rasta preporučuje se primena serijskih biometrijskih merenja u razmaku ne kraćem od 2 nedelje

(33). U preeklampsiji rizik za razvoj IUGR je 3 – 4 puta veći u odnosu na normotenzivnu trudnoću (36).

Oligohidramnion se javlja kao komplikacija preeklamptične trudnoće u oko 10 – 30 % slučajeva, samostalno ili udružen sa IUGR. Definicija oligohidramniona podrazumeva smanjenje količine plodove vode, a kvantitativni kriterijumi uključuju merenje najvećeg džepa plodove vode, odnosno najveći vertikalni promer „prozora” amnionske tečnosti (*engl.* maximum vertical pocket, MVP) > 2 cm ili merenje indeksa amnionske tečnosti < 5 cm (37). Najčešće komplikacije kod novorođenčadi u trudnoćama sa oligohidramnionom su malformacije urinarnog trakta, hipoplazija pluća, respiratorni distres sindrom, asfiksija ploda i aspiracija mekonijuma, a često imaju i malu telesnu masu, niže vrednosti Apgar skora, anemiju i zadržavaju se na odeljenju intenzivne nege (38). Prisustvo oligohidramniona u preeklampsiji povezano je ne samo sa placentalom insuficijencijom i posledičnom hipoksijom, već i sa povećanim vrednostima maternalnog tkivnog faktora (TF), što sugeriše i moguću vezu sa povećanim stvaranjem trombina u preeklampsiji (39).

1.6. Dugoročne posledice preeklampsije

Žene sa preeklampsijom u prvoj trudnoći imaju povećan rizik za ponovni razvoj preeklampsije u sledećoj trudnoći, a pored toga, ove žene imaju i veći rizik za pojavu hronične hipertenzije, renalnih oboljenja i intrauterusnog zastoja u razvoju ploda u narednim trudnoćama (40). Međutim, iako kliničke manifestacije preeklampsije nestaju nekoliko dana nakon porođaja istraživanja pokazuju da žene koje su imale preeklampsiju i dalje pokazuju znake endotelne disfunkcije i imaju povećan rizik za pojavu kardiovaskularnih bolesti (KVB) i metaboličkog sindroma kasnije u životu. Rezultati nekoliko velikih epidemioloških studija potvrdili su povezanost preeklampsije i povećanog mortaliteta usled razvoja koronarnih bolesti srca i moždanog udara, što je u skladu sa potvrđenim rizikom od preranog razvoja kardiovaskularnih oboljenja nakon preeklampsije. Meta-analiza koju su sproveli Brown i saradnici je potvrdila da je preeklampsija udružena sa dvostruko većim rizikom za razvoj KVB (OR = 2,28; 95 % CI 1,87 – 2,77) i cerebrovaskularnih bolesti (OR = 1,77; 95 % CI 1,43 – 2,21) i trostruko većim rizikom za razvoj hipertenzije (RR = 3,13; 95 % CI 2,51 – 3,89) kasnije u toku života u poređenju sa ženama sa nekomplikovanom trudnoćom (41). Za žene sa ponovljenom preeklampsijom, ranom ili teškom formom, rizik od KVB i smrti se dodatno povećava 2 do 3 puta, a najveći rizik je primećen u slučajevima kada je

preeklampsija povezana sa prevremenim porođajem i/ili malom gestacijskom dobi novorođenčeta (*engl.* Small Gestational Age – SGA) (42–44).

Garović i saradnici su u nedavno objavljenoj studiji skrenuli pažnju da se dosadašnjim pristupom stopa incidencije preeklampsije i hipertenzivnih poremećaja u trudnoći značajno umanjuje i da, kada se ona računa u odnosu na broj trudnih žena pogođenih ovim stanjem u reproduktivnoj dobi, 1 od 6 žena je u riziku za nastanak KVB i bolesti bubrega. Takođe, autori su ukazali i na značajno veći rizik od nastanka višestrukih hroničnih stanja kod žena sa istorijom hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, odnosno na povećan rizik za razvoj „multimorbiditeta“, koji je mera ubrzanog starenja, i upravo može biti odraz multisistemskih poremećaja, ključne karakteristike preeklampsije (7). Svakako, zbog potvrđenog doprinosa razvoju KVB, zajedno sa gestacijskom hipertenzijom i gestacijskim dijabetes melitusom, preeklampsija je uključena u aktuelne smernice kao dugoročni faktor rizika za srčana oboljenja i moždani udar (45,46).

Zaista, preeklampsija i KVB imaju mnoge zajedničke faktore rizika i osnovne patofiziološke procese. Nekoliko predisponirajućih faktora majke povezanih sa razvojem preeklampsije tokom trudnoće, kao što su gojaznost, insulinska rezistencija, dislipidemija i postojeća hipertenzija ili dijabetes, su tradicionalni faktori rizika za KVB. Štaviše, oba poremećaja karakteriše vazokonstrikcija, izražene metaboličke promene (npr. oksidativni stres, poremećeni metabolizam lipida, insulinska rezistencija), pojačan inflamatorni odgovor, aktivacija koagulacije i endotelna disfunkcija (47,48). Visok nivo fibrinogena u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom, nezavisno doprinosi riziku od KVB (49).

Svi ovi nalazi su u skladu sa široko prihvaćenom hipotezom koju su predložili Sattar i Greer da bi trudnoća trebalo da se smatra „stres testom“ za kardiovaskularno zdravlje žene koji rezultuje „razotkrivanjem“ kardiovaskularnog rizika koji bi inače ostao nezapažen do pojave KVB kasnije tokom života (50). Međutim, ostaje da se definiše mehanizam koji leži u osnovi ove asocijacije.

1.7. Etiologija i patogeneza preeklampsije

Još u staroj Grčkoj eklampsija je bila prepoznata kao stanje u kome istovremeno dolazi do pojave glavobolje i konvulzija (Hipokratovi aforizmi, oko 400. godine p.n.e.). Pojam odnosno naziv eklampsija pojavljuje se prvi put 1619. godine u Varandajevom traktatu o ginekologiji, ali tek 1739. godine Bossier de Sauvages razgraničava eklampsiju od

epilepsije. Krajem 18. i u 19. veku karakteristični simptomi preeklampsije/eklampsije bivaju podrobnije opisani i klasifikovani, a brojna istraživanja u 20. i 21. veku fokusirala su se na proučavanje ove patologije, te se pojavilo nekoliko teorija i predložene su brojne hipoteze (51). Međutim, do današnjeg dana uzrok i patogeneza preeklampsije i dalje ostaju nerazjašnjeni, zbog čega se preeklampsija često naziva „bolest teorija“ (52).

Nesumnjivo je da glavnu ulogu u razvoju preeklampsije ima placenta, s obzirom da preeklampsija može da nastane i u molarnoj trudnoći, bez prisustva vijabilnog ploda, kao i da se nakon izbacivanja placente povlače svi simptomi i znaci ovog kompleksnog progresivnog sindroma (53,54). Normalna placentacija je preduslov za uspešnu trudnoću, jer omogućava sve neophodne metaboličke, endokrinološke, imunološke i nutritivne procese čiji je krajnji cilj normalan embrionalni rast i razvoj. Naime, u ranoj fazi normalne trudnoće, između 8. i 18. nedelje gestacije, dolazi do morfoloških promena spiralnih arterija kako bi se smanjio otpor proticanju krvi i omogućio adekvatan protok kroz placentu. Ove promene su posledica migracije i invazije endovaskularnog citotrofoblasta u spiralne arterije (unutrašnje segmente u miometriju i terminalne decidualne segmente) što dovodi do razaranja endotela, glatkih mišićnih ćelija i elastičnih vlakana. Na njihovo mesto se taloži fibrinoid, pa gubitkom mišićno-elastične komponente izostaje kontrola autonomnog nervnog sistema na utero-placentalne arterije što dovodi do dilatacije spiralnih arterija (55,56). U isto vreme dolazi do opsežnih anatomskih i funkcionalnih promena kardiovaskularnog sistema majke koje rezultuju povećanjem ukupnog volumena krvi, srčane frekvence i udarnog volumena. Posledica opisanih modifikacija je stanje niskog otpora i povećan protok krvi u utero-placentalnim arterijama čime su omogućeni adekvatan dotok nutritivnih supstancija u fetoplacentalni prostor i fetomaternalna razmena materija.

U preeklampsiji remodelovanje spiralnih arterija je poremećeno, odnosno nepotpuno. U uzorcima placente preeklampsijskih žena uzetim biopsijom utvrđeno je da je endovaskularna invazija nepotpuna, ograničena na periferne, decidualne segmente spiralnih arterija, dok u oko 30 – 50 % ovih arterija u potpunosti izostaje. Kod jednog broja žena sa preeklampsijom je praćena i pojavom „akutne ateroze“, odnosno vaskularnih lezija nalik aterosklerozi, okarakterisanih prisustvom fibrinskih depozita, penastih ćelija, lipidnih kapi, infiltrata mononuklearnih inflamatornih ćelija i agregata trombocita. S obzirom da plitka endovaskularna invazija zahvata samo površinski sloj decidue i da se endotelni sloj ćelija i mišićno-elastično tkivo zadržavaju, spiralne arterije ostaju izuvijane i sa dvostruko manjim dijametrom u odnosu na normalnu trudnoću. Posledično dolazi do razvoja defektne utero-

placentalne cirkulacije i placentalne ishemije, što je potvrđeno i dopler ultrasonografskim merenjem indeksa rezistencije krvnih sudova (57). Smatra se da placentalna hipoksija dovodi do aktivacije maternalnog vaskularnog endotela koja rezultuje disfunkcijom endotela, generalizovanom vazokonstrikcijom, značajnim metaboličkim promenama, pojačanim inflamatornim odgovorom i aktivacijom koagulacije. Međutim, neki istraživači zastupaju stanovište da se nastale patološke promene, naročito trombotične nekroze, ne mogu objasniti samo postojanjem hipoksije, već pre fluktuacijom u koncentraciji kiseonika u placenti, odnosno insultom tipa ishemija-reperfuzija. Naizmenična ishemija i reperfuzija uzrokuju oksidativni stres, kao i apoptozu ćelija, odnosno oslobađanje ekstracelularnih vezikula (EV). Na ovaj način se pospešuje sistemski inflamatorni odgovor i disfunkcija maternalnog endotela (57,58).

Najveći broj istraživača podržava upravo model nastanka preeklampsije prema kome u prvom stadijumu kao posledica atipičnog maternalnog imunog odgovora na trofoblaste dolazi do poremećaja u njihovom prodiranju u spiralne arterije i smanjene perfuzije placente, što posledično, u drugom stadijumu, dovodi do ispoljavanja multisistemskog maternalnog sindroma. Ovaj drugi, tzv. klinički stadijum, nastupa nakon 20. nedelje gestacije (59). U prilog ovom stanovištu govori činjenica da se preeklampsija češće javlja u trudnoćama sa velikom placentom, poput multiplih i molarnih trudnoća. Štaviše, povećana incidencija preeklampsije kod trudnica sa prethodnim prisustvom medicinskih stanja okarakterisanih kao mikrovaskularne bolesti (hipertenzija, dijabetes, sistemski lupus eritematosus), dodatno potvrđuje navedeno stanovište. Takođe, iako je preeklampsija specifična za humanu trudnoću, eksperimentalnim smanjenjem perfuzije placente u životinjskim modelima indukovani su sindrom sličan preeklampsiji (48).

Definitivno, bez obzira na etiologiju, poremećaji na nivou placente imaju centralnu ulogu u nastanku preeklampsije, ali veza između neadekvatne invazije trofoblasta i sistemskog maternalnog odgovora nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da oslobađanje solubilnih faktora iz hipoksične placente dovodi do aktivacije i oštećenja maternalnog vaskularnog endotela koje uzrokuje sindrom sistemske disfunkcije endotela (60). Izvesno je da generalizovana diseminovana disfunkcija endotela predstavlja deo maternalnog sistemskog inflamatornog odgovora koji je prisutan i u normalnoj trudnoći, ali u daleko manjem intenzitetu („sterilna inflamacija“) (61). Nije poznato o kom placentalnom faktoru je reč i predloženi su brojni kandidati, poput sFlt-1, endoglina, citokina, peroksida, eikozanoida, sinciciotrofoblastnih ekstracelularnih vezikula (*engl.* syncytiotrophoblast

microparticles – STBM), ali ni jedan nije mogao da razjasni sve aspekte ovog heterogenog sindroma.

Poslednjih godina intenzivna istraživanja su bila usmerena na izučavanje angiogenog disbalansa i njegove uloge u indukciji preeklampičnog fenotipa. Koncentracije angiogenih proteina, solubilne forme fms-sličnih tirozin kinaza receptora 1 (*engl.* Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 – sFlt-1) i solubilnog endoglina (sEng), su povišene u preeklampsiji, dok su koncentracije proangiogenih faktora, vaskularnog endotelnog faktora rasta (*engl.* Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) i placentalnog faktora rasta (*engl.* Placenta Growth Factor – PlGF), snižene u poređenju sa normotenzivnom trudnoćom. Pretpostavlja se da nastali angiogeni disbalans pospešuje maternalnu vaskularnu inflamaciju i generalizovanu disfunkciju endotela i posledično izaziva maternalni sindrom koji karakterišu novonastala hipertenzija i proteinurija (62,63). VEGF i PlGF su potentni regulatori vaskularnog razvoja tokom embriogeneze, kao i u odraslom dobu. VEGF ostvaruje svoj angiogeni i mitogeni efekat preko 2 tipa visoko-specifičnih tirozin kinaza receptora, receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta 1 (VEGFR-1), poznatijeg kao Flt-1 (*engl.* Fms-like Tyrosine Kinase-1), i receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (VEGFR-2), odnosno KDR (*engl.* Kinase-insert Domain Region). PlGF se vezuje samo za VEGFR-1 i potencira dejstvo VEGF na vaskularne endotelne ćelije (64). sFlt-1 je endogeno sekretovani protein, anti-angiogena solubilna forma VEGFR-1, koji sadrži samo ekstracelularni ligand-vezujući domen, bez citoplazmatskog i transmembranskog domena. Smatra se da sFlt-1 antagonizuje dejstvo VEGF i PlGF tako što sprečava njihovu interakciju sa receptorom na površini endotelne ćelije, te dovodi do inhibicije složenih mehanizama ćelijske signalne transdukcije i njihovih efekata na endotel.

U prilog ovoj teoriji prikupljeni su brojni dokazi. Maynard i saradnici su u jednoj opsežnoj studiji pokazali da su u placentama trudnica sa preeklampsijom iRNK nivoi sFlt-1 povišeni u odnosu na zdrave trudnice, zatim da u eksperimentu *in vitro* formiranja endotelne tube dodatak seruma preeklampičnih trudnica ispoljava antiangiogeni efekat koji je reverzibilan kada se dodaju VEGF i PlGF, kao i da transfer sFlt-1 gena ostvaren preko adenovirusnog vektora kod trudnih ženki pacova dovodi do ispoljavanja hipertenzije, proteinurije i glomerularne endotelioze (uobičajene renalne lezije u preeklampsiji). U istoj studiji primenom sFlk-1 transgena, s obzirom da Flk-1 (VEGFR-2) ne antagonizuje dejstvo PlGF, dokazano je da je za pojavu simptoma sličnih preeklampsiji neophodno dejstvo sFlt-1 na oba proangiogena faktora, i VEGF i PlGF (62). Isto tako, primena blokatora tirozin kinaza

VEGF receptora u terapiji kancera kod velikog broja pacijenata dovodi do pojave hipertenzije i proteinurije (65). Dodatna potvrda su i nalazi povišenih koncentracija sFlt-1 u teškoj i ranoj formi preeklampsije, kao i njihova asocijacija sa nekim faktorima rizika, poput prisustva preeklampsije u prethodnoj trudnoći, nulipariteta, multifetalne trudnoće, dijabetesa i hronične hipertenzije (66). Zbog činjenice da se angiogeni disbalans javlja nekoliko nedelja pre pojave znaka i simptoma preeklampsije (67), ovi faktori se često predlažu za predikciju razvoja preeklampsije naročito u kombinaciji sa drugim biomarkerima, maternalnim karakteristikama i ultrasonografskim nalazima, kao i u prognozi, pošto još uvek ne postoji adekvatna terapija ovog često nepredvidivog sindroma (68,69). Međutim, bez obzira na sve navedene dokaze, i dalje ostaje nejasno da li je povezanost angiogenog disbalansa sa patofiziološkim promenama i sistemskim maternalnim poremećajima u preeklampsiji deo kauzalnog puta ili je samo njegov odraz.

„Sterilna inflamacija”, termin koji označava postojanje inflamacije niskog stepena bez prisustva infektivnog agensa, karakteristika je normalne trudnoće i smatra se fiziološkom adaptacijom na trudnoću (70). Dokazi postojanja sistemske inflamacije u trudnoći su reakcija akutne faze i aktivacija komponenti inflamatorne mreže. Jedna od predloženih teorija o nastanku preeklampsije zastupa koncept po kome je preeklampsija ekstremna forma sistemskog inflamatornog odgovora prisutnog u normalnoj trudnoći, čiji je integralni deo endotelna disfunkcija (71). Osnovno polazište ove teorije je činjenica da trudnoća predstavlja imunološki fenomen, s obzirom da semialogeni fetus ne biva odbačen od strane majke (72). Naime, proces placentacije u ranoj fazi normalne trudnoće predstavlja imunoadaptaciju majke i uključuje njen specifičan imuni odgovor na fetalne (paternalne) aloantigene. Smatra se da je za uspešnu placentaciju i trofoblastnu invaziju u spiralne arterije neophodno „prepoznavanje” između KIR proteina (*engl.* Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor – KIR) na površini maternalnih NK ćelija uterusa (*engl.* uterine Natural Killer cells, uNK) i fetalnih HLA-C proteina (humani leukocitni antigen, HLA) ispoljenih na površini trofoblasta. Uspešna interakcija između ovih ćelija dovodi do tolerancije i favorizuje adekvatnu aktivaciju uNK ćelija, odnosno produkciju imunoregulatornih citokina i angiogenih faktora neophodnih za invaziju trofoblasta i vaskularno remodelovanje. Nasuprot tome, nedovoljna aktivacija uNK ćelija rezultuje povećanom lizom trofoblasta i posledično poremećajem u remodelovanju spiralnih arterija, kao i povećanom ekspresijom antiangiogenih faktora što dovodi do endotelne disfunkcije (59,73). Poznato je da plitka invazija trofoblasta rezultuje formiranjem malih spiralnih arterija koje zadržavaju sloj glatkih mišićnih ćelija i uslovljavaju

pulsirajući protok pod visokim pritiskom. Naizмениčna ishemija i reperfuzija placente dalje uzrokuju oštećenje placente koje dovodi do povećanja oksidativnog stresa i stresa endoplazmatskog retikuluma (ER), kao i povećanog oslobađanja sinciotrofoblastnih EV (STBM). Kod teških formi preeklampsije jasno su uočljive morfološke promene na sinciotrofoblastima koje ukazuju na postojanje oksidativnog i ER stresa. Oksidativni stres, povećanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive Oxygen Species – ROS) i ER stres, nakupljanje pogrešno savijenih proteina, su moćni proinflamatorni stimuli koji pospešuju apoptozu i povećavaju sekreciju antiangiogenih i proinflamatornih produkata (56,74). Dodatno, „otpuštanje” STBM u maternalnu cirkulaciju omogućava interakciju ovih EV sa leukocitima i endotelnim ćelijama koja dovodi do povećane produkcije proinflamatornih citokina i tako uzrokuje inflamaciju i vaskularno oštećenje (75). Zaista, citokini predstavljaju potentne medijatore proinflamatornih procesa u preeklampsiji, a odgovorni su i za povećanje ekspresije endotelnih adhezionih molekula, ICAM-1 (*engl.* Intercellular Adhesion Molecule 1) i VCAM-1 (*engl.* Vascular Cell Adhesion Molecule 1), povećanje tkivnih prokoagulantnih faktora, inhibiciju trombomodulin-protein C aktivnosti, kao i stimulaciju inhibitora aktivatora plazminogena 1 (*engl.* Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1) koja blokira razgradnju fibrina. U prilog teoriji „prekomernog” inflamatornog odgovora govore i prisutna aktivacija neutrofila i sistema komplementa u preeklampsiji koji takođe mogu da stupe u interakciju sa komponentama sistema koagulacije, trombocitima i endotelnim ćelijama i izazovu vaskularno oštećenje. Pored navedenog, činjenica da se preeklampsija češće javlja u prvoj trudnoći, pri promeni partnera ili kod žena sa dugim intervalom između 2 trudnoće ukazuje na mogući uticaj poremećenog maternalnog imunog odgovora na fetalne antigene u razvoju preeklampsije. Pored toga, histopatološki pregledi preeklampsičnih placenti pokazali su prisustvo povećanog broja dendritičnih ćelija, infiltrirane makrofage i NK ćelije, kao i znake hronične inflamacije. Povećano prisustvo ovih ćelija za koje se smatra da su glavne antigen-prezentujuće ćelije uterusa stimuliše i sekreciju tumorskog faktora nekroze α (*engl.* Tumor Necrosis Factor α – TNF- α). TNF- α dovodi do aktivacije NAD(P)H oksidaze, produkcije superoksidnog anjona (O_2^-) i skraćuje poluživot iRNK za NOS (*engl.* Nitric Oxide Synthase), čime pospešuje vazokonstrikciju krvnih sudova u placenti te dodatno oštećuje endotel i indukuje apoptozu trofoblastnih ćelija (74,76).

Prema konceptu endotelno-trombocitne disfunkcije centralnu ulogu u patogenezi preeklampsije imaju endotel i trombociti, odnosno njihova interakcija koja postaje začarani krug: sistemska endotelna disfunkcija izaziva dalju vazokonstrikciju, adheziju i agregaciju

trombocita i aktivira koagulaciju što dovodi do dodatnog ishemijskog oštećenja endotela. Prekomerna aktivacija i potrošnja trombocita u preeklampsiji, kao i značajno povišene vrednosti srednjeg volumena trombocita (*engl.* Mean Platelet Volume – MPV) opisane su u brojnim studijama. Kod žena sa preeklampsijom aktivacija trombocita počinje još u prvim mesecima trudnoće i može da se javi i nekoliko nedelja pre pojave simptomatske preeklampsije, kao i porast MPV vrednosti koji često ukazuje na razvoj intrauterusnog zastoja u rastu ploda (77). Značajno sniženje broja trombocita povezano je sa lošim maternalnim ishodom i jedan je od ključnih dijagnostičkih kriterijuma za HELLP (20). Aktivacija trombocita uključuje povećanu površinsku ekspresiju P-selektina (CD62P), što predstavlja jedan od mehanizama kojim aktivirani trombociti učestvuju u procesu koagulacije u preeklampsiji. Naime, interakcija CD62P sa P-selektin glikoprotein ligandom-1 (*engl.* P-selectin glycoprotein ligand-1 – PSGL-1) na površini neutrofila i monocita dovodi do stvaranja trombocitno-leukocitnih agregata. Kao rezultat ove interakcije dolazi do površinske ekspresije tkivnog faktora na leukocitima, kao i integrina $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) kojim se stabilizuju nastali agregati. Na površini monocita aktivacijom izazvana konformaciona promena u CD11/CD18 dovodi do vezivanja FXa i/ili fibrinogena što dodatno pojačava prokoagulantne aktivnosti, a takođe dovodi i do njihove adhezije na endotelne ćelije. Pored navedenog, povećano stvaranje trombocitno-leukocitnih agregata doprinosi povećanoj ekspresiji ekstraplacentalnog sFlt-1 kod žena sa preeklampsijom tokom trudnoće, ali i mesecima nakon porođaja, te potencijalno može biti jedan od uzroka razvoja hipertenzije i KVB kod ovih žena kasnije u toku života (78,79).

U prilog navedenom konceptu govori i poremećaj ravnoteže vazodilatatornih i vazokonstriktornih faktora koji je takođe prisutan u preeklampsiji. Koncentracija prostaciklina u plazmi, snažnog vazodilatatora i inhibitora agregacije trombocita, značajno je smanjena. Nasuprot tome, u preeklampsiji je značajno povećana produkcija tromboksana u placenti, a u maternalnoj cirkulaciji porast koncentracije se uočava kod trudnica sa teškom formom preeklampsije prvenstveno kao posledica aktivacije trombocita. U preeklampsiji se odnos prostaciklin/tromboksan pomera ka vazokonstrikciji čime se mogu objasniti nastanak hipertenzije, povećana vaskularna reaktivnost na angiotenzin II i agregacija trombocita (80). Kod žena kod kojih dolazi do nastanka preeklampsije smanjen nivo prostaciklina javlja se čak od 13. – 16. ng, a povećani nivoi metabolita tromboksana u urinu koreliraju sa ozbiljnošću poremećaja (81). Na ovaj način može da se objasni značajno smanjenje incidencije i težine forme preeklampsije pri primeni niskih doza aspirina započetim pre 16.

nedelje gestacije, dok primena započeta posle 16. nedelje ima mali uticaj na ishod trudnoće (82). Smatra se da su navedeni poremećaji posledica oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije (83).

U hipotezi koju su predložili Lockwood i saradnici ključnu ulogu u nastanku preeklampsije bi mogao da ima upravo trombin (84,85). Njihovo stanovište proizilazi iz zapažanja da placentalna hipoksija selektivno pojačava ekspresiju sFlt-1 u kulturama humanih trofoblasta koji neutrališe VEGF i tako ometa vaskularnu transformaciju (86). U prilog ovoj hipotezi govore i nalazi da kod trudnica sa preeklampsijom postoji povećana prevalencija urođenih i stečenih trombofilija (87), zatim da trudnice sa vaginalnim krvarenjem u toku prvog trimestra imaju povećan rizik za nastanak preeklampsije, IUGR, prevremenog porođaja, abrupcije placente, PPRM (*engl.* Preterm Premature Rupture of Membranes) (88), kao i da je produženo krvarenje, od minimum 5 dana, povezano sa dvostruko većim rizikom za razvoj preeklampsije (11). S obzirom da uzrok placentalne hipoksije nije identifikovan neki autori smatraju da je povećana trofoblastna ekspresija sFlt-1 verovatno posledica, a ne uzrok plitke placentacije (89).

Sistem koagulacije igra značajnu ulogu i u implantaciji embriona i u placentaciji. Tokom implantacije, sinciciotrofoblasti prodiru između epitelnih ćelija endometrijuma, proteolitički razgrađuju bazalnu membranu i omogućavaju blastocisti da uroni u stromu uterusa. Dalja erozija strome uterusa zahvata i kapilare endometrijuma ugrađene u matriks decidualnih ćelija te krv majke dospeva u mrežu lakuna formiranu unutar sinciciotrofoblasta čime se uspostavlja primordijalna uteroplacentalna cirkulacija. Na ovaj način se, pre procesa placentacije, obezbeđuje izvor kiseonika i hranljivih materija neophodnih za razvoj embriona, kao i eliminacija ugljen-dioksida i drugih otpadnih materija. Međutim, tokom ovog procesa postoji i rizik od potencijalnog krvarenja koje može da dovede do prekida trudnoće. U uspešnim trudnoćama, nastupa faza placentacije u kojoj citotrofoblastne ćelije (ekstravilozni trofoblasti) nastavljaju invaziju u stromu decidue i deo miometrijuma (intersticijalna invazija) i prodor u spiralne arterije i arteriole koje remodeluju (endovaskularna invazija) (85,90). Pojava decidualnog krvarenja tokom ove faze placentacije povezana je sa abrupcijom placente, preeklampsijom i prevremenim porođajem (91).

Implantacija i placentacija su visoko regulisani procesi koji zavise od fizioloških promena u decidualnim ćelijama endometrijuma. Naime, kako bi se sprečilo krvarenje tokom invazije trofoblasta perivaskularne decidualne ćelije endometrijuma ispoljavaju na svojoj površini tkivni faktor (TF) i formiraju tzv. hemostatski omotač. Imunohistohemijским

bojenjem pokazano je da nivo decidualne ekspresije TF prevazilazi njegovu ekspresiju u svim drugim ćelijama koje učestvuju u feto-maternalnom kontaktu (92). TF je primarni ćelijski medijator procesa koagulacije koji posredstvom FVIIa, direktno ili indirektno preko stvaranja FIXa/FVIIIa kompleksa, aktivira FX. FXa gradi kompleks sa svojim kofaktorom FVa i prevodi protrombin u trombin, ključni enzim koagulacione kaskade. Nastali trombin deluje na fibrinogen i dovodi do stvaranja fibrina, kao i do aktivacije trombocita te tako dalje podstiče koagulaciju (93). Sa stvaranjem fibrinskog ugruška dolazi do aktivacije procesa fibrinolize, odnosno do aktivacije aktivatora plazminogena koji dovode do stvaranja plazmina, ključnog fibrinolitičkog enzima. Istovremeno se aktiviraju i inhibitori aktivacije plazminogena (PAI) koji sprečavaju preranu fibrinolizu i imaju važnu ulogu u modulaciji hemostaze (94).

Trombin takođe posredstvom receptora aktiviranih proteazom (*engl.* Protease Activated Receptor – PAR) eksprimiranih na površini različitih tipova ćelija deluje na angiogenezu, ćelijsku proliferaciju i apoptozu, oslobađanje citokina i inflamaciju (93,95). Dok PAR-1, PAR-3 i PAR-4 služe kao receptori za trombin, TF/FVIIa kompleks ili FXa mogu da aktiviraju PAR-1 i PAR-2 (85). U kulturi humanih decidualnih ćelija prvog trimestra bez prisustva leukocita trombin, vezivanjem za PAR-1 i PAR-3 receptore, značajno povećava nivo ekspresije sFlt-1 iRNK i sekrecije sFlt-1 proteina. Stoga, decidualno krvarenje u prvom trimestru trudnoće usled povećane ekspresije TF na membranama decidualnih ćelija može da dovede do lokalizovanog stvaranja znatnih količina trombina koji povećanjem ekspresije sFlt-1 dovodi do angiogenog disbalansa. U ćelijskim eksperimentima je pokazano da hirudin, najmoćniji direktni inhibitor trombina, blokira ove efekte, kao i da trombin ne utiče na ekspresiju sFlt-1 u kulturi decidualnih ćelija izolovanih iz zrele placente, niti ispoljava direktno dejstvo na VEGF, PlGF i endoglin (96). Pored toga, u primarnim kulturama decidualnih ćelija prvog trimestra sekrecija MCP-1 (*engl.* Macrophage/Monocyte Chemoattractant Protein 1), primarnog hemokina zaduženog za regrutaciju i aktivaciju monocita, značajno je povećana pod dejstvom trombina, ali i proinflamatornih citokina, TNF- α i IL-1 β . U decidui preeklampsijskih pacijentkinja je prisutno značajno povećanje aktivnosti makrofaga koje se povezuje sa apoptozom i poremećenom migracijom ekstravilusnih trofoblata koje pospešuje plitku endovaskularnu invaziju trofoblata i poremećaj remodelovanja spiralnih arterija. Međutim, u kulturi humanih decidualnih ćelija prvog trimestra ni TNF- α ni IL-1 β nisu pokazali nikakvo dejstvo na povećanu ekspresiju sFlt-1 (96,97).

Svakako i dalje je nepoznanica da li proces počinje oštećenjem endotela koje aktivira prokoagulantne proteine ili pak počinje sa aktivacijom koagulacije i trombocita koji posledično oštećuju endotel.

1.8. Hemostaza u normalnoj trudnoći i preeklampsiji

Normalna trudnoća praćena je značajnim promenama i u sistemu koagulacije i u sistemu fibrinolize koje rezultuju hiperkoagulabilnim stanjem (98). Smatra se da su ove promene deo kompleksne fiziološke adaptacije kojom se omogućava održavanje placentalne funkcije tokom trudnoće, kao i brza i efikasna kontrola krvarenja pri „hemostatskom izazovu“ kakav je porođaj, iako je kontrakcija materice pri porođaju najvažniji faktor za zaustavljanje postporođajnog krvarenja. Međutim, ove promene predstavljaju i faktor rizika za nastanak venskog tromboembolizma (VTE), pri čemu se rizik povećava sa napredovanjem trudnoće i najveći je odmah nakon porođaja, čak i kada se radi o vaginalnom porođaju. U poređenju sa stanjem van trudnoće rizik za VTE je 4 – 5 puta veći u trudnoći i postpartalnom periodu (99,100).

Tokom trudnoće postoji progresivni porast nivoa većine faktora koagulacije: faktora VII, VIII, X, XII, von Willebrand-ovog faktora (vWF) i fibrinogena, koji je najizraženiji u trećem trimestru (101). Koncentracije FVIII i vWF progresivno rastu od već od 6. nedelje gestacije, ali u drugoj polovini trudnoće dolazi do većeg porasta vWF tako da se pred kraj trudnoće beleži skoro dvostruki porast odnosa vWF antigen/FVIII (102). Koncentracija fibrinogena u plazmi je do dva puta veća, a aktivnost FVII i do deset puta u kasnoj trudnoći i na porođaju (103,104). Faktori II, V i IX su neznatno povećani ili nepromenjeni tokom trudnoće (103,105). Faktor XI je jedini faktor koagulacije koji opada i dostiže koncentracije od 60 – 70 % od normalnih vrednosti van trudnoće, a najniži nivo ima pred porođaj (104,106). Faktor XIII raste na početku trudnoće za oko 40 %, zatim sredinom trudnoće nivoi opadaju i pred kraj trudnoće dostiže vrednosti van trudnoće (107).

Vrednosti antitrombina, glavnog fiziološkog inhibitora koagulacije krvi, nisu značajno promenjene u trudnoći (105,108). Važni regulatorni faktori procesa koagulacije koji takođe imaju antikoagulantno dejstvo su protein C i njegov kofaktor, protein S. U trudnoći aktivnost proteina C ostaje skoro konstantna i kreće se unutar normalnog opsega van trudnoće, dok se nivo slobodnog proteina S progresivno smanjuje tokom trudnoće i dostiže vrednosti do 50 % niže od inicijalnih. Sa napredovanjem trudnoće raste rezistencija na aktivirani protein C

(APC-R) (105,109,110). Trombomodulin (TM) je transmembranski glikoprotein prisutan u velikoj meri na vaskularnim endotelnim ćelijama, a u trudnoći se javlja i na ćelijama sinciotrofoblasta. TM ima antikoagulantno dejstvo koje ostvaruje tako što vezuje trombin, inhibira njegovo prokoagulantno dejstvo i ubrzava aktivaciju proteina C trombinom. Međutim, TM preko trombina takođe aktivira TAFI, te stoga deluje i antifibrinolitički. Koncentracija trombomodulina (TM) u trudnoći se povećava nakon 24. ng kao posledica aktivacije neutrofila koja pokreće proteolizu endotelnog TM i oslobađa njegovu solubilnu formu u cirkulaciju. Međutim, naglo povećanje koncentracije TM u plazmi već nakon 12. ng u odnosu na vrednosti izmerene pre trudnoće može da ukaže na postojanje vaskularnog poremećaja u placenti (111,112).

Tokom normalne trudnoće dolazi do smanjenja ukupne fibrinolitičke aktivnosti, koja se normalizuje u prvoj nedelji nakon porođaja (108). Iako se vrednosti plazminogena i njegovih aktivatora, tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) i aktivatora plazminogena tipa urokinaze (u-PA), postepeno povećavaju tokom trudnoće, istovremeno rastu i inhibitori aktivatora plazminogena (PAI). PAI-1 je ključni regulator fibrinolize *in vivo* i njegove vrednosti u kasnoj trudnoći su povećane i do pet puta u odnosu na vrednosti na početku trudnoće. PAI-2 proizvode vilusne ćelije placentе te njegova koncentracija u plazmi zavisi od veličine placentе, ali, takođe, i od fetalnog rasta (98,113,114). Određeni markeri fibrinolitičkog procesa, produkti razgradnje fibrina (*engl.* Fibrin Degradation Products – FDP) i D-dimer, su takođe povišeni u trudnoći, te se smatra da je fibrinolitički sistem aktivan i da kompenzuje postojeću aktivaciju koagulacije (109,115–117). Pored toga, na poremećaj fibrinolize u normalnoj trudnoći ukazuje i progresivno povećanje nivoa trombinom aktiviranog fibrinolitičkog inhibitora (TAFI) koji u trećem trimestru dostiže plato, a u roku od 24 h od porođaja se snižava do normalnih vrednosti (118,119).

Aktivacija koagulacije dovodi do stvaranja trombina. Trombin je serinska proteaza i ključni je enzim procesa koagulacije koji dovodi do stvaranja fibrina i aktivacije trombocita i faktora FV, FVIII i FXIII. Povećano stvaranje trombina javlja se već od 7. ng i dostiže maksimalne vrednosti krajem trudnoće (120). Markeri *in vivo* povećanog stvaranja trombina su trombin-antitrombin kompleks (TAT) i protrombinski fragment 1 i 2 (F1+2). Bremme i saradnici su utvrdili da se povećani nivoi TAT javljaju kod 50 % trudnica u prvom trimestru, dok su značajno povećane vrednosti zabeležene kod svih trudnica tokom drugog i trećeg trimestra (108). Sa druge strane vrednosti F1+2 rastu od prvog trimestra i koreliraju sa gestacijskom dobi (121).

Pored povećanog stvaranja trombina, normalna trudnoća je povezana sa značajnim povećanjem koncentracije tkivnog faktora (TF) koji je glavni ćelijski pokretač procesa koagulacije *in vivo* i jedan od najvažnijih medijatora hiperkoagulabilnog stanja (122). TF je takođe neophodan za procese angiogeneze i embriogeneze, kao i normalnu placentaciju i hemostazu, posebno u prvom trimestru trudnoće kako bi se sprečilo krvarenje prilikom endovaskularne invazije trofoblasta (123,124). Čelije trofoblasta se ponašaju kao aktivirani endotel i eksprimiraju na svojoj površini TF (125). Pored placente TF je prisutan i u epitelu uterusa, fetalnom tkivu, amniotskoj tečnosti i u maternalnoj cirkulaciji (126–129). U solubilnoj formi u cirkulaciji TF (*engl.* blood-borne TF) se nalazi najvećim delom vezan za ekstracelularne vezikule i kao asTF (*engl.* alternatively spliced TF) (130), a smatra se da ima ulogu u fazi propagacije tromba na mestu vaskularne povrede (131). Važno je napomenuti da je tek oko 5 % aktivnosti TF u krvi povezano sa EV, što svakako ne umanjuje njihov značaj i potencijalnu ulogu u koagulaciji (132). Vrednosti TF Ag u plazmi tokom trudnoće se ne razlikuju od vrednosti van trudnoće, ali su značajano povećane u toku i neposredno nakon porođaja (133). Glavni antikoagulantni mehanizam kojim se inhibira aktivacija TF ostvaruje se posredstvom inhibitora puta tkivnog faktora (TFPI), čija je ekspresija takođe povećana u tkivu placente (134). Pored TFPI u regulaciji nivoa TF učestvuju i endotelni receptor proteina C (*engl.* Endothelial Protein C Receptor – EPCR) i trombomodulin (TM).

Za vreme porođaja dolazi do dodatnog povećanja aktivnosti koagulacije koje je povezano sa izbacivanjem placente i aktivacijom trombocita na mestu razdvajanja (135). Promene hemostaze tokom puerperijuma su, u principu, istog intenziteta kao nakon obimne operacije (136). Nakon porođaja, kao posledica reakcije akutne faze povećani su nivoi C-reaktivnog proteina, fibrinogena i trombocita, dok je nivo AT snižen ukoliko se porođaj završava carskim rezom. Aktivacija trombocita i sistema koagulacije dostiže maksimum odmah nakon porođaja. Koagulacija krvi uglavnom se normalizuje tokom prvih 4 do 6 nedelja, nivo PS u narednih 6 – 8 nedelja, a funkcija trombocita oko 12 nedelja nakon porođaja. Vrhunac fibrinolize uočava se tokom prva 3 sata nakon porođaja, što se odražava povećanjem vrednosti D-dimera u plazmi, a već u roku od 24 do 48 sati nakon porođaja fibrinolitička aktivnost se vraća na stanje pre trudnoće (104,137).

U preeklampsiji se hiperkoagulabilno stanje, prisutno u normalnoj trudnoći, dodatno pojačava. Kliničke manifestacije aktivirane koagulacije uključuju patološke nalaze fibrinskih depozita i mikrotromba kako u placenti, tako i u glomerulima, dok se kod teške forme bolesti (pogotovo sa letalnim ishodom) sreće široko rasprostranjeno formiranje fibrinskih depozita u

maternalnim organima: plućima, srcu, mozgu, slezini, jetri i bubrezima (138). Povećana intravaskularna koagulacija u preeklampsiji se ogleda u povišenim nivoima faktora koagulacije, fibrinogena, TF i vWF Ag i povećanoj potrošnji FVIII (138–141). Pored toga, u poređenju sa normotenzivnim trudnicama u preeklampsiji dolazi do dodatnog stvaranja trombina koje je okarakterisano povećanim vrednostima TAT i F1+2, *in vivo* markera stvaranja trombina. Važno je istaći da u preeklampsiji postoji povezanost, odnosno značajna korelacija između markera stvaranja trombina i povećane aktivacije trombocita, koja inače nije prisutna u normalnoj trudnoći (142–145). Na ovaj način takođe mogu da se objasne pozitivni efekti primene aspirina u preeklampsiji. Prema sumiranim podacima preglednog istraživanja iz 2021. godine primena aspirina kod trudnica sa pridruženim faktorima rizika dovodi do smanjenja rizika od razvoja preeklampsije (RR 0,85; 95 % CI 0,75 – 0,95), kao i smanjenja perinatalnog mortaliteta (RR 0,79; 95 % CI 0,66 – 0,96), prevremenog porođaja (RR 0,80; 95 % CI 0,67 – 0,95) i intrauterusnog zastoja u rastu (RR 0,82; 95 % CI 0,68 – 0,99) kod pacijentkinja sa dijagnostifikovanom preeklampsijom (146).

Smatra se da hiperkoagulabilnom stanju u preeklampsiji doprinosi i smanjenje nivoa regulatornih proteina koagulacije, proteina C i posebno antitrombina (AT) (142,147,148). AT ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti trombina, koga vezuje u stehiometrijskom odnosu 1:1 i gradi ireverzibilan kompleks. Sniženje nivoa AT usled povećanog stvaranja TAT kompleksa u preeklampsiji posredno ukazuje na povećano stvaranje trombina, mada ono može biti i posledica oštećenja jetre, kao što se viđa u HELLP, ili pak oštećenja bubrega (149). Pad u aktivnosti AT beleži se 2 nedelje pre ispoljavanja kliničkih simptoma preeklampsije, vraća se u normalu odmah nakon izbacivanja placente i korelira sa težinom maternalnih komplikacija, što može da ukaže na potencijalnu ulogu AT u patofiziologiji preeklampsije. Pored navedenog, niske vrednosti AT kod trudnica sa preeklampsijom ispoljavaju temporalnu zavisnost sa kliničkim tokom bolesti, pri čemu značajno sniženje AT može da ukaže na pogoršanje preeklampsije i nužnost prekida trudnoće (150,151). Maki i saradnici su pokazali da primena infuzije AT koncentrata dovodi do poboljšanja kliničkih simptoma, produženja trajanja trudnoće i smanjenja broja novorođenčadi sa veoma malom telesnom masom (152). Snižena aktivnost proteina C je takođe prisutna u preeklampsiji, mada neki autori nisu uočili razlike u nivoima PC između normalne i hipertenzivne trudnoće, dok su vrednosti proteina S, u odnosu na referentne vrednosti van trudnoće, jednako snižene kao u normalnoj trudnoći (142,147,153). Za razliku od normalne trudnoće u preeklampsiji nije zabeležen porast APC rezistencije, te se smatra da je povećan kapacitet stvaranja trombina u preeklampsiji

nezavisan od APC-R (154). U preeklampsiji su primetne i značajne promene u vrednostima trombomodulina (TM). Pretpostavlja se da je porast nivoa Ag i aktivnosti TM zabeležen kod preeklampsije posledica izraženije povrede endotela nego u normalnoj trudnoći, s obzirom da nađene vrednosti TM kod trudnica sa preeklampsijom značajno koreliraju sa povišenim nivoima vWF koji je potvrđen marker endotelnog oštećenja (155).

Inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI) je takođe važan prirodni antikoagulans i regulator stvaranja trombina. Poznata su dva tipa: TFPI-1, koji u najvećoj meri proizvode endotelne ćelije i prisutan je u cirkulaciji majke i fetusa, i TFPI-2, koji je izolovan iz placente (156). U poređenju sa normalnom trudnoćom koncentracija slobodnog TFPI je značajno povišena u plazmi pacijentkinja sa preeklampsijom, najverovatnije kao posledica endotelne disfunkcije i placentalne insuficijencije (153). Međutim, odnos TFPI/TF je značajno niži u preeklampsiji, što sugeriše da povećanje koncentracije TFPI nije dovoljno da kompenzuje dodatno povišenu koncentraciju TF u plazmi (155).

Promene u sistemu fibrinolize koje se uglavnom pripisuju izmenjenim nivoima PAI-1 i PAI-2 dodatno favorizuju prokoagulantno stanje u preeklampsiji (156,157). Porast vrednosti PAI-1 takođe ukazuje na vaskularnu povredu i prethodi pojavi kliničkih simptoma preeklampsije, a naročito je izražen kod pacijentkinja koje pokazuju rane znake placentalne insuficijencije vidljive na dopler ultrasonografskom pregledu uterinih arterija i kod kojih u drugom trimestru dolazi do intrauterusnog zastoja u razvoju ploda (158). Takođe, pretpostavlja se da je porast vrednosti PAI-1 delom posledica aktivacije trombocita, koja, kao i placentalna insuficijencija, pokazuje povezanost sa težinom preeklampsije (159). U odnosu na normalnu trudnoću u preeklampsiji dolazi do značajnog sniženja nivoa PAI-2 i u-PA. S obzirom da vrednosti PAI-2 i u-PA u plazmi koreliraju sa placentalnim i fetalnim rastom, smatra se da su njihovi niski nivoi u preeklampsiji pre svega posledica disfunkcije placente (160). Na ozbiljnost ovog multisistemskog generalizovanog poremećaja upućuje i nalaz povišenih vrednosti t-PA koga endotelne ćelije proizvode lokalno kao odgovor na povredu endotela, a koji ima ključnu ulogu u aktivaciji plazminogena i samim tim u razgradnji fibrina (161).

1.9. Laboratorijsko ispitivanje hemostaze u normalnoj trudnoći i preeklampsiji

Pravilna procena hemostaze u trudnoći, a posebno u njenim komplikacijama, predstavlja poseban izazov i već dugi niz godina je predmet istraživanja u brojnim naučnim studijama. Većina klasičnih laboratorijskih testova analizira samo pojedine aspekte sistema koagulacije ne uzimajući u obzir kompleksnost procesa hemostaze *in vivo*, te tako pruža samo delimičnu informaciju o hemostatskom statusu. Tradicionalni skrining testovi hemostaze, protrombinsko vreme (PT) i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT), nisu osetljivi na sistemske protrombotičke promene koje su karakteristika i normalne i patološke trudnoće, a čine i značajan deo komplikacija hemostaze u trudnoći. Sa druge strane, određivanjem pojedinačnih faktora koagulacije i/ili antikoagulantnih proteina dobijaju se statički podaci koji odražavaju akutnu situaciju, ali ne pružaju uvid u ukupnu (ne)ravnotežu sistema koagulacije. Naime, ključni enzim procesa koagulacije je trombin koji katalizuje reakciju prevođenja fibrinogena, proteina rastvorenog u plazmi, u nerastvorni fibrin. Dodatno, trombin stvoren nakon aktivacije koagulacije uključen je i u aktivaciju trombocita i regulaciju sledstvenih fibrinolitičkih procesa. Praktično, stvaranje trombina je neophodno kako za proces koagulacije, tako i za rast tromba i kontrolu njegovog rasta. Skrining testovi hemostaze daju procenu koagulacije merenjem vremena koagulacije, odnosno formiranja fibrinskog ugruška. Međutim, više od 95 % trombina nastaje nakon inicijalnog formiranja ugruška, tako da prekomerno stvaranje trombina, koje je uvek tendencija za trombozu, ne utiče na ove testove. Isto tako, ni jedan faktor koagulacije ne odražava direktno složenost mehanizama koji učestvuju u stvaranju trombina (162). Samim tim, rutinski testovi imaju ograničenu vrednost u proceni intravaskularne koagulopatije, a donošenje definitivnog zaključka otežava i činjenica da se normalne vrednosti u trudnoći menjaju, pri čemu ustanovljeni normalni rasponi najčešće nisu primenljivi u trudnoći (163).

1.9.1. Globalni testovi hemostaze

Poslednjih decenija intenzivirani su naponi da se razviju globalni testovi koji bi omogućili procenu ukupne funkcionalne aktivnosti kompleksnog i višekomponentnog hemostatskog sistema merenjem dinamičke interakcije komponenata hemostaze, odnosno ukupnog rezultata svih reakcija hemostaze u uslovima koji oponašaju situaciju *in vivo*, kako bi se omogućila adekvatna evaluacija njihovog doprinosa i međusobne interakcije. Nova

generacija globalnih testova hemostaze pruža mogućnost sveobuhvatne procene hemostaze. Predloženi kao indikatori ukupne hemostaze, ovi dinamički testovi omogućavaju kontinuirano praćenje hemostatskih procesa i procenu ravnoteže između prokoagulantnih i antikoagulantnih (i fibrinolitičkih) faktora, te tako pružaju uvid u sve faze procesa hemostaze uključujući inicijaciju, propagaciju i inaktivaciju (164).

Test generacije trombina (TGT) je jedan od potvrđenih i najviše korišćenih globalnih metoda. Zasniva se na kontinuiranom merenju amidolitičke aktivnosti trombina koji se stvara u plazmi i konvertuje specifični supstrat nakon aktivacije koagulacije dodatkom tkivnog faktora ili fosfolipida (165). Sa dobijene krive generacije trombina izvode se 4 parametra: tlag (vreme koje odgovara fazi inicijacije), endogeni trombinski potencijal – ETP (površina ispod krive koja odgovara ukupnoj količini stvorenog trombina), visina pika (koja odgovara maksimalnoj koncentraciji trombina) i tmax (vreme do maksimalne visine pika). TGT je funkcionalni globalni test koji meri ukupnu količinu i kinetiku stvaranja trombina tokom vremena i na taj način odražava „kapacitet plazme za stvaranje trombina“ nakon inicijalnog formiranja ugruška. Povećano ili smanjeno stvaranje trombina ukazuje na trombotičku ili hemoragijsku tendenciju (162). Primenom TGT testa dokazano je da je povećana produkcija trombina prisutna u trombofilnim stanjima poput venske tromboze (usled nedostatka antitrombina, proteina C/S, rezistencije na aktivirani protein C i antifosfolipidnog sindroma), arterijske tromboze i u akutnom koronarnom sindromu. Isto tako, pokazano je da TGT kod bolesnika koji boluju od hemofilije može da ukaže, bolje od tradicionalnih testova, na tendenciju ka krvarenju, a time i povećan rizik od krvarenja (162,166).

U normalnoj, nekomplikovanoj trudnoći primenom TGT testa potvrđeno je prisustvo prokoagulantnog fenotipa okarakterisano prekomernim stvaranjem trombina koje se javlja već u ranoj trudnoći, ali se značajan porast uočava u 2 trimestru trudnoće i dostiže plato koji se održava do kraja trudnoće (109,120,167–169). Nasuprot tome, Eichinger i saradnici su u studiji u kojoj su ETP vrednosti merene i 3 meseca nakon trudnoće pokazali da tokom trudnoće i nakon porođaja ne dolazi do promena u vrednostima ETP (170). Mogući razlozi odstupanja ovih nalaza najverovatnije potiču od razlika u primenjenim metodama, kao i razlike u koncentraciji TF koja je korišćena kao okidač za pokretanje stvaranja trombina. Poznato je da se pri primeni visokih koncentracija TF ne uočavaju promene u ETP vrednostima (171).

Ograničen broj studija koje su ispitivale ETP u preeklampsiji pokazao je da, za razliku od normalne trudnoće, u preeklampsiji dolazi do dodatnog povećanja ETP vrednosti koje je

praćeno aktivacijom trombocita, formiranjem trombocitno-leukocitnih agregata, kao i značajnim povećanjem nivoa ekstracelularnih vezikula (172,173). Dodatno, VanWijk i saradnici su pokazali da je prekomerna aktivacija koagulacije u preeklampsiji okarakterisana povišenim ETP vrednostima, odnosno povećanim stvaranjem trombina koje nije uslovljeno postojanjem APC rezistencije (154).

Ukupni hemostatski potencijal (*engl.* Overall Haemostatic Potential – OHP) je globalni test koji omogućava uvid u celokupnu dinamiku hemostatskog procesa, pružajući dodatno i informacije o brzini formiranja fibrina i njegovoj degradaciji. Ovaj brz i jednostavan test se zasniva na kontinuiranom merenju nivoa fibrina u plazmi kojoj su prethodno dodate male količine trombina za aktivaciju sistema koagulacije i t-PA za aktivaciju sistema fibrinolize, čime je omogućeno otkrivanje poremećaja koji remete delikatnu ravnotežu između ova dva suprotna entiteta hemostaze (174). Određivanjem vremena liziranja ugruška (*engl.* Clot Lysis Time – CLT) OHP test takođe omogućava indirektnu procenu aktivnosti trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI), koji se aktivira delovanjem trombina i ispoljava snažno antifibrinolitičko delovanje, te direktno povezuje sistem koagulacije i fibrinolize (175). Pored toga, istovremenom analizom strukture fibrina koji nastaje kao krajnji proizvod reakcije koagulacije, omogućen je uvid u stabilnost fibrinskog ugruška i njegovu podložnost razgradnji (176).

Ranija istraživanja su pokazala povećan ukupan hemostatski potencijal (OHP) i snižen ukupan fibrinolitički potencijal (*engl.* Overall Fibrinolytic Potential – OFP) u normalnoj trudnoći, sa daljim porastom OHP, kao i sniženjem OFP vrednosti kod žena sa preeklampsijom (175,177,178). Pored toga, utvrđeno je da je vreme liziranja ugruška (CLT) produženo kod žena sa preeklampsijom i/ili intrauterusnim zastojeom u rastu (IUGR), ali su nalazi kontradiktorni u pogledu uloge TAFI u poremećaju fibrinolize (178,179).

1.9.2. Ekstracelularne vezikule

Pre više od pola veka Wolf je uočio da aktivacija trombocita dovodi do oslobađanja membranskih fragmenata, „trombocitne prašine“ koja stimuliše stvaranje trombina u plazmi siromašnoj trombocitima (180). Kasnije su ove fosfolipidne strukture označene terminom mikropartikule/mikrovezikule, ali je, zbog velikog porasta broja naučnih publikacija o različitim podtipovima membranskih vezikula koje oslobađaju ćelije, Međunarodno udruženje za ekstracelularne vezikule (*engl.* International Society for Extracellular Vesicles –

ISEV) dalo preporuku da se za sve partikule ograničene lipidnim dvoslojem, a koje ćelije prirodno oslobađaju i koje se ne mogu replikovati, koristi generički termin ekstracelularne vezikule (181).

Ekstracelularne vezikule (EV) su membranske strukture veličine od 0,1 – 1 µm, koje se oslobađaju sa različitih ćelija mehanizmima ćelijske aktivacije i apoptoze. U ovim procesima poremećaj aktivnosti membranskih transportera, flipaza, flopaza i skramblaza, dovodi do gubitka u asimetriji fosfolipidne distribucije u plazma membrani što uzrokuje lokalnu nestabilnost ćelijske membrane i rezultuje oslobađanjem ekstracelularnih vezikula sa njene površine. Nastale EV na svojoj površini ispoljavaju fosfatidilserin (*engl.* phosphatidylserine – PS), određene membranske receptore i druge proteine karakteristične za njihove roditeljske ćelije (182). Brojna istraživanja na ovom polju su pokazala da EV nisu samo neželjeni produkti ćelijskih procesa već da EV poseduju širok spektar bioloških aktivnosti, te učestvuju u ćelijskoj interakciji i regulaciji interćelijske komunikacije, a delujući kao transporteri prenose funkcionalne receptore ili druge proteine (npr. TF) između različitih tipova ćelija (183,184). U *in vitro* eksperimentima je pokazano da EV mogu da oslobađaju endotelne ćelije, vaskularne glatke mišićne ćelije, trombociti, leukociti, limfociti i eritrociti, a demonstrirano je i prisustvo svih ovih populacija EV u venskoj krvi zdravih dobrovoljaca i različitih grupa pacijenata. Praktično sve eukariotske ćelije mogu da stvaraju EV, a broj i sastav različitih EV populacija zavisi od prisustva ili odsustva određenih bolesti, s tim da uticaj ovih promena i *in vivo* funkcija EV nisu u potpunosti razjašnjeni.

Rezultati dosadašnjih studija upućuju na značajnu ulogu EV u koagulaciji, inflamaciji i vaskularnoj (dis)funkciji (185–187). Smatra se da je prokoagulantni efekat EV povezan sa ekspresijom PS na njihovoj površini. Ekspresijom negativno naelektrisanih fosfolipida EV obezbeđuju katalitičku površinu koja olakšava stvaranje tenaza i/ili protrombinaza kompleksa čime se ubrzava aktivacija FX praćena stvaranjem trombina i potom fibrina. Istovremena ekspresija TF na površini PS+ EV pojačava njihovu prokoagulantnu aktivnost i do 2 puta, mada su mehanizam aktivacije TF i njegovo stanje na površini EV (*truncated* ili *untruncated*) još uvek predmet debate (188–190). Neosporno je da EV imaju značajnu ulogu u koagulaciji o čemu govori i činjenica da su nivoi EV značajno sniženi u stanjima povezanim sa krvarenjem, poput Skotovog sindroma (191). Štaviše, EV imaju i proinflamatorno dejstvo, jer stupaju u interakciju sa endotelnim i imunim ćelijama, i tako mogu da doprinesu intravaskularnoj inflamaciji (192). Smatra se da EV upravo preko ekspresije prokoagulantnih fosfolipida i specifičnih receptora na njihovoj površini imaju ulogu bioloških „glasnika“ koji

povezuju procese inflamacije, koagulacije i angiogeneze te tako ostvaruju važnu ulogu u endotelnoj disfunkciji (193,194).

Normalna trudnoća je okarakterisana prisustvom različitih EV u cirkulaciji, pri čemu ove EV mogu biti maternalnog, fetalnog ili placentalnog porekla. Generalno, mali je broj studija u kome je određivan nivo EV u normalnoj trudnoći, a uglavnom su vezane za ispitivanje različitih patoloških stanja u trudnoći. U studiji Lok i saradnika nivoi EV su mereni počevši od 12. nedelje gestacije do 6. nedelje nakon porođaja. Najniže vrednosti su izmerene na početku, u 12. ng, zatim su progresivno rasle do 28. ng nakon čega se beleži pad vrednosti i u 32. i u 36. ng. EV nivoi 6. nedelja nakon porođaja bili su jednaki vrednostima u 28. ng. Najveća frakcija EV je bila poreklom iz trombocita (97 – 99 %), zatim eritocita (0,6 – 2,7 %) i endotelnih ćelija (0,4 – 1 %), a deo koji je poticao iz leukocita bio je zanemarljiv. Udeo placentalnih EV u ukupnoj populaciji iznosio je oko 1,5 – 3 % (195). Početno smanjenje koncentracije EV, zabeleženo i u studiji Desprez i saradnika, je najverovatnije posledica povećanja cirkulišućeg volumena krvi i prisustva manjeg broja aktiviranih ćelija na početku trudnoće (196). Povišeni nivoi trombocitnih i endotelnih EV u normalnoj trudnoći nađeni su i u drugim studijama, te je zastupljeno mišljenje da povećan nivo ovih EV subpopulacija reflektuje procese aktivacije trombocitnih i endotelnih ćelija koji se fiziološki dešavaju u zdravoj trudnoći (197,198). Takođe, Bretelle i saradnici su pokazali da su i ukupan broj i prokoagulantna aktivnost aneksin V pozitivnih EV značajno viši u normalnoj trudnoći u odnosu na žene koje nisu bile trudne.

Subpopulacije EV i njihove koncentracije u preeklampsiji su i dalje predmet ispitivanja velikog broja istraživača, ali su rezultati ovih istraživanja često kontradiktorni, te stoga još uvek ne postoji koncenzus. Velike varijacije prvenstveno postoje zbog razlike u selekciji ispitanica i metodologiji (priprema uzorka, korišćeni markeri, tehnologija merenja), ali one isto tako odražavaju i nepostojanje jasnih kriterijuma i definicija za ovaj heterogeni multisistemski poremećaj kakva je preeklampsija (199). Identifikacija i kvantifikovanje ukupnih EV zasnovani su na prisustvu PS na njihovoj površini, pri čemu je u najvećem broju studija u tu svrhu primenjen aneksin V, dok je u manjem broju korišćen laktadherin. Za detekciju EV poreklom iz trombocita, endotelnih ćelija, leukocita, eritocita i ćelija trofoblasta korišćena su specifična antitela primenom protočne citometrije ili ELISA tehnike (200). Stvarna prevalencija EV u vaskularnim komplikacijama trudnoće nije poznata, ali je utvrđeno da nivo EV u 24. ng nema prediktivnu vrednost za kasniji razvoj hipertenzije, preeklampsije, IUGR ili SGA (201).

U preeklampsiji su najviše ispitivane subpopulacije EV poreklom iz trombocita, endotelnih ćelija i placente. Nivo ukupnih EV u preeklampsiji ne razlikuje se u odnosu na vrednosti u normalnoj trudnoći (197,198,202,203), mada su neki autori uočili povećane vrednosti (204). Međutim, Lok i saradnici su utvrdili snižene nivoe ukupnih EV u periodu od 28. – 36. ng u preeklampsiji u odnosu na zdrave trudnice, pri čemu je 6. nedelja nakon porođaja nivo EV bio jednak u obe ispitivane grupe (195). Studije koje su određivale nivo trombocitnih EV u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom dale su oprečne rezultate, sa smanjenim ili nepromenjenim, pa čak i povišenim vrednostima u odnosu na zdrave trudnice (205,206). Isto tako, iako je zbog prisutne endotelne disfunkcije u preeklampsiji očekivan porast endotelnih EV, bilo je više autora koje nisu našli razliku u poređenju sa normalnom trudnoćom (195,202,207). Nivo EV placentalnog porekla, odnosno poreklom iz sinciotrofoblasta (STBM), bio je značajno povišen u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću u svim studijama (198,208,209), a pokazano je i da nivo STBM korelira sa težinom oboljenja (210). Pored toga, u preeklampsiji su uočene povećane koncentracije eritocitnih, monocitnih i granulocitnih EV (195,202,204).

Analiza iznesenih stanovišta upućuje na zaključak da preeklampsija sasvim izvesno nastaje kao rezultat interakcije, odnosno udruženog dejstva maternalnih karakteristika, placentalnih faktora i neadekvatne adaptacije na trudnoću, sa predominantnim učešćem kardiovaskularnog i inflamatornog sistema. Hiperkoagulabilnost i inflamacija su povezani procesi koji se međusobno pojačavaju i ispitivanje promena u sistemu koagulacije u preeklampsiji nesumnjivo ima važnu ulogu kako u razumevanju ovog heterogenog poremećaja, tako i dalekosežnih posledica koje preeklampsija ostavlja na majku i njeno potomstvo.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja doktorske disertacije su:

1. Ispitati parametre globalnih hemostatskih testova i indirektno aktivnost TAFI u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom, pre i posle porođaja.
2. Utvrditi da li postoji razlika u parametrima globalnih hemostatskih testova u plazmi trudnica sa preeklampsijom u poređenju sa zdravim trudnicama.
3. Ispitati razlike u koncentraciji markera aktivirane hemostaze: trombin-antitrombin kompleks (TAT), D-dimer i antitrombin (AT) i inflamacije: C reaktivni protein (CRP), fibrinogen i FVIII kod trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja, kao i u poređenju sa zdravim ispitanicama.
4. Ispitati karakteristike i odrediti vrednosti parametara *ex vivo* formiranih fibrinskih ugrušaka u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom, pre i posle porođaja, i kontrolnoj grupi.
5. Ispitati međusobne korelacije parametara globalnih hemostatskih testova, markera aktivirane hemostaze i inflamacije i parametara fibrinskog ugruška.
6. Utvrditi povezanost parametara globalnih hemostatskih testova, markera aktivirane hemostaze i inflamacije, kao i parametara fibrinskog ugruška sa kliničkim ishodom trudnoće komplikovane preeklampsijom.
7. Ispitati subpopulacije EV koje potencijalno mogu da ispolje prokoagulantne efekte i njihovu povezanost sa parametrima globalnih hemostatskih testova, markerima aktivirane hemostaze i inflamacije i parametrima fibrinskog ugruška.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Mesto i faze istraživanja

Istraživanje je sprovedeno u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“ i u Institutu za transfuziju krvi Srbije u Beogradu, u periodu od aprila 2014. do novembra 2016. godine, kao i u Institutu Karolinska u Štokholmu, Švedska, u periodu od februara 2017. do decembra 2018. godine, u skladu sa principima Dobre kliničke prakse i uz poštovanje Helsinške deklaracije i nacionalnih zakona i propisa. Sprovođenje istraživanja je odobreno od strane Etičkog odbora Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“ (Odluka zavedena pod brojem 24/5-1) i Etičkog odbora Instituta za transfuziju krvi Srbije (Odluka zavedena pod brojem 3828).

Prva faza istraživanja, koja je sprovedena u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“ i Institutu za transfuziju krvi Srbije, obuhvatila je regrutovanje trudnica prema definisanim kriterijumima za uključivanje u studiju. Sve ispitanice su detaljno upoznate sa ciljevima istraživanja i uključene u studiju nakon potpisivanja dobrovoljnog pristanka za učestvovanje u istraživanju (formular – „Saglasnost za učešće u ispitivanju“), pri čemu su uzeti detaljni anamnestički podaci (standardizovani upitnik br. 1 – „Upitnik za ispitanice“). Druga faza je obuhvatila prikupljanje kliničkih podataka o ispitivanim pacijentkinjama sa preeklampsijom uključenim u istraživanje (standardizovani upitnik br. 2 – „Podaci o ispitanicama“), uvidom u medicinsku dokumentaciju i istoriju bolesti, kao i pregledom podataka arhive Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“. Treća faza, koja je sprovedena u laboratoriji Odeljenja za ispitivanje poremećaja hemostaze sa Registrom urođenih koagulopatija u Institutu za transfuziju krvi Srbije i u laboratoriji Odeljenja za kliničku hemiju u Univerzitetnoj bolnici Karolinska, obuhvatila je laboratorijsku analizu uzoraka krvi.

3.2. Populacija i uzorak istraživanja

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 127 trudnica starosti od 18 – 47 godina. Ispitivanu grupu je činilo 47 trudnica koje su po definisanim kriterijumima razvile preeklampsiju (PEK). Za postavljanje dijagnoze preeklampsije korišćeni su revidirani kriterijumi koje je 2014. godine definisalo Međunarodno udruženje za proučavanje hipertenzije u trudnoći (*engl.* International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy – ISSHP) (8). Dijagnoza

preeklampsije se postavlja na osnovu nalaza novonastale arterijske hipertenzije, odnosno sistolnog pritiska ≥ 140 mm Hg i/ili dijastolnog pritiska ≥ 90 mm Hg, u najmanje dva merenja unutar 24 sata u intervalu dužem od 6 sati, i proteinurije ≥ 300 mg u 24-časovnom urinu posle 20. ng kod prethodno normotenzivnih žena. Prema revidiranim ISSHP kriterijumima dijagnoza preeklampsije može da se postavi i u odsustvu proteinurije ukoliko je novonastala hipertenzija udružena sa pojavom trombocitopenije (broj trombocita $< 150 \times 10^9/L$), poremećene funkcije jetre (dvostruko povišena aktivnost transaminaza u odnosu na gornju granicu referentnog intervala), novorazvijene bubrežne insuficijencije (koncentracija kreatinina u serumu $> 90 \mu\text{mol/L}$ ili udvostručena koncentracija kreatinina u serumu u odsustvu drugih bubrežnih oboljenja), plućnog edema ili novonastalih vizuelnih odnosno cerebralnih poremećaja, te uteroplacentalnim poremećajem koji za posledicu ima zaostajanje u rastu ploda. Kada se pomenuti poremećaji pojave kod trudnice sa hroničnom hipertenzijom govorimo o hroničnoj hipertenziji sa superponiranom preeklampsijom (8).

Kontrolnu grupu je činilo 80 zdravih trudnica sa jednoplodnom trudnoćom u periodu drugog i trećeg trimestra trudnoće (> 20 nedelja gestacije). Zdrave trudnice su uključene u istraživanje u toku svojih redovnih kontrola koje su obavljane u Institutu za transfuziju krvi, a nakon potpisane saglasnosti za učešće u studiji, bez daljeg praćenja ishoda trudnoće.

3.3. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje podrazumevali su:

- starost trudnice iznad 18 godina
- potpisan dobrovoljni pristanak za učestvovanje u istraživanju
- klinički potvrđena dijagnoza preeklampsije (za studijsku grupu)

Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja podrazumevali su prisustvo:

- kardiovaskularne bolesti
- renalne bolesti
- malignog oboljenja
- zapaljenskog procesa
- genetskih anomalija ploda

3.4. Protokol ispitivanja

Prilikom uključivanja u istraživanje svim trudnicama su uzeti anamnestički podaci o starosnoj dobi, visini i težini, gestacijskoj starosti u vreme uključivanja u istraživanje, broju prethodnih trudnoća, broju namernih i spontanih pobačaja, zatim podaci o ishodima prethodnih trudnoća i eventualnim komplikacijama i prisustvu preeklampsije u prethodnim trudnoćama, prisustvu hroničnih oboljenja, prisustvu preeklampsije i kardiovaskularnih oboljenja u porodici, pušačkom statusu, kao i primeni lekova propisanih od strane nadležnog lekara. Indeks telesne mase (ITM) je izračunat kao količnik telesne mase (TM) i kvadrata telesne visine (TV): $ITM = TM \text{ (kg)} / TV^2 \text{ (m}^2\text{)}$. Za pacijentkinje sa preeklampsijom su uzeti i klinički podaci o primenjivanoj terapiji i pojavi komplikacija u toku hospitalizacije, zatim podaci koji se odnose na pritisak, proteinuriju, biohemijske parametre i krvnu sliku (broj trombocita) u toku hospitalizacije, kao i ishod trudnoće. Zabeleženi su tip porođaja (carski rez ili vaginalni porođaj), gestacijska starost na porođaju, telesna težina i dužina novorođenčadi, Apgar skor i prisustvo fetalnih/neonatalnih komplikacija.

Uzorci krvi potrebni za izvođenje predviđenih laboratorijskih analiza su u grupi trudnica sa preeklampsijom uzeti na početku istraživanja (sledećeg jutra nakon prijema u bolnicu) i 2 – 10 dana nakon porođaja. U kontrolnoj grupi uzorci su sakupljeni prilikom uključivanja trudnica u istraživanje. Uzorkovanje je vršeno ujutru, posle 12 sati gladovanja, u tri epruvete – dve sa 0,109 mol/L Na₃-citratom (1 deo Na₃-citrata + 9 delova krvi, pH 7,4) i jednu biohemijsku epruvetu bez antikoagulansa, sa aktivatorom koagulacije. Nakon venepunkcije, plazma i serum su odvajani centrifugiranjem na 2600 × g u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Za dobijanje plazme siromašne trombocitima (*engl.* Platelet Poor Plasma – PPP) uzorci su centrifugirani dva puta. Ovako pripremljeni uzorci plazme i seruma su alikvotirani i čuvani na -70 °C do izvođenja analiza.

U uzorcima plazme siromašne trombocitima su određivani globalni testovi hemostaze: endogeni trombinski potencijal (*engl.* Endogenous Thrombin Potential – ETP) i ukupni hemostatski potencijal (*engl.* Overall Haemostatic Potential – OHP), kao i sledeći parametri: antitrombin, D-dimer, FVIII, fibrinogen i trombin-antitrombin kompleks (TAT). U uzorcima plazme su određivani i vreme liziranja fibrinskog ugruška (*engl.* Clot Lysis Time – CLT), sa i bez dodatka inhibitora karboksipeptidaze (*engl.* Potato Tuber Carboxy-peptidase Inhibitor – PTCI), zatim parametri fibrinskog ugruška, lag vreme, brzina polimerizacije (Vmax) i maksimalna apsorbancija (Max Abs), kao i struktura fibrinskog ugruška. PPP je takođe korišćena za određivanje koncentracije ekstracelularnih vezikula. U uzorcima seruma

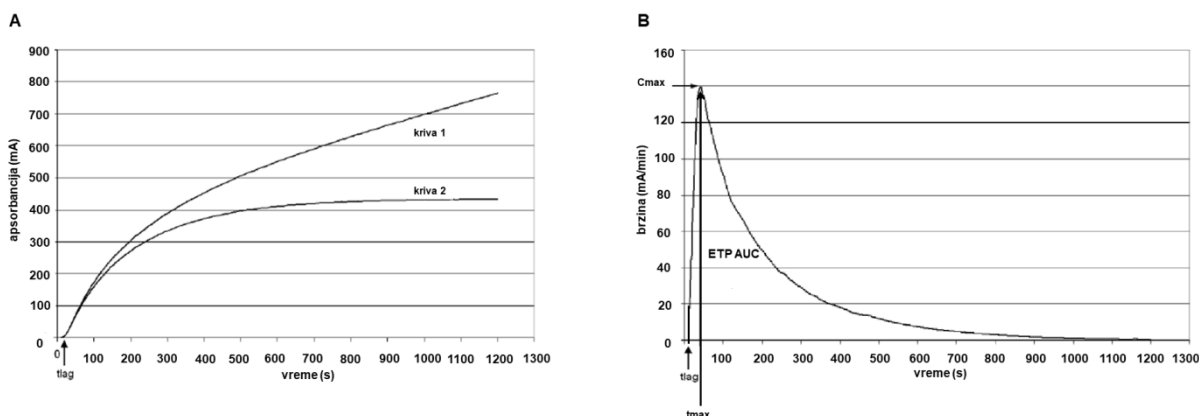
su određivani: CRP, parametri lipidnog statusa (holesterol, HDL holesterol, LDL holesterol, trigliceridi i lipoprotein (a), Lp(a)), kao i IgA, IgG i IgM antifosfolipidna antitela (anti- β_2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela).

3.5. Metode ispitivanja

3.5.1. Endogeni trombinski potencijal (ETP)

Endogeni trombinski potencijal (ETP) je određivan spektrofotometrijskom metodom na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) sa komercijalnim reagensom Innovance ETP (Siemens Healthcare Diagnostics) (165,211). Inkubacijom plazme siromašne trombocitima sa tkivnim faktorom, u prisustvu fosfolipida i jona kalcijuma, dolazi do aktivacije sistema koagulacije i stvaranja trombina (faktor IIa). Stvaranje trombina i njegova inaktivacija se beleže kontinuiranim merenjem konverzije spororeagujućeg hromogenog supstrata na 405 nm u toku 20 minuta (*Slika 1A, kriva 1*). Konverzija fibrinogena u fibrin dejstvom nastalog trombina se sprečava dodatkom inhibitora čime je omogućeno fotometrijsko merenje bez defibrinacije. Primenom matematičkog algoritma kriva konverzije supstrata se koriguje oduzimanjem aktivnosti trombina koji nema biološku aktivnost i vezan je za α_2 -makroglobulin. Korigovana kriva predstavlja aktivnost slobodnog trombina (*Slika 1A, kriva 2*). Prvi derivat korigovane krive konverzije supstrata predstavlja krivu stvaranja trombina (*Slika 1B*) sa koje se mogu očitati 4 parametra:

- endogeni trombinski potencijal (ETP) – površina ispod krive (ETP AUC) koja predstavlja ukupnu količinu stvorenog trombina u toku reakcije i meri se u mA,
- lag vreme (t_{lag}) – vreme od započinjanja reakcije do pojave stvaranja trombina mereno u sekundama,
- visina pika (C_{max}) – maksimalna aktivnost trombina tokom reakcije koja predstavlja pik koncentracije trombina i meri se u mA/min,
- vreme do pika (t_{max}) – vreme od započinjanja reakcije do pojave pika koncentracije trombina mereno u sekundama.



Slika 1. (A) šematski prikaz krive konverzije supstrata (kriva 1) i krive korigovane za aktivnost trombina vezanog za α_2 -makroglobulin (kriva 2); (B) šematski prikaz krive stvaranja trombina i odgovarajućih parametara ETP testa (slika prema uputstvu za upotrebu Innovance ETP, Siemens Healthcare Diagnostics).

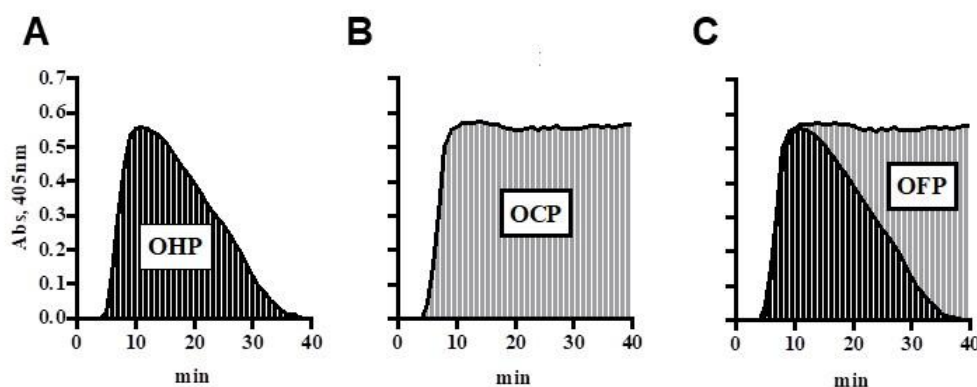
Korišćenjem komercijalnog standarda (Innovance ETP Standard, Siemens Healthcare Diagnostics), koji je dobijen iz *pool*-a citratne plazme zdravih dobrovoljaca i po definiciji za sve faktore ima aktivnost 100 %, izvršena je normalizacija i omogućeno izračunavanje rezultata ETP i visine pika u % od normale.

Neposredno pre merenja uzorci su otopljeni u vodenom kupatilu na 37 °C u periodu od 10 minuta. Sva merenja su vršena u seriji i sa svakom serijom su određivani prethodno pripremljeni normalni i hipokoagulabilni uzorci kao kontrole. Koeficijenti varijacije (KV) unutar serije i između serija za normalni *pool* plazme su iznosili 1,06 % i 1,74 %, dok su KV za hipokoagulabilni *pool* plazme bili 1,82 % i 3,92 %. Vrednosti medijane koje je proizvođač označio kao normalne vrednosti za ETP AUC iznose 100 %, odnosno 410 mA, dok za Cmax (visinu pika) iznose 94 %, odnosno 103 mA/min.

3.5.2. Ukupni hemostatski potencijal (OHP)

Za određivanje ukupnog hemostatskog potencijala (OHP) je primenjena modifikacija metode koju su prethodno opisali He i saradnici (174). OHP test se zasniva na spektrofotometrijskom merenju agregacije fibrina i fibrinolize u uzorku citratne plazme kojem su dodati fosfolipidi (Phospholipid-TGT, Rossix AB, Mölndal, Sweden), trombin (finalne koncentracije 0,04 U/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), CaCl_2 (finalne koncentracije 17 mmol/L) i tkivni aktivator plazminogena (t-PA; finalne koncentracije 300 ng/mL, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany). Apsorbancija (Abs) na 405 nm se

beleži svakih 12 sekundi u periodu od 60 minuta na spektrofotometru (Multiskan[®] FC, Thermo Fisher Scientific, USA), pri čemu se konstruiše kriva agregacije fibrina. OHP se izračunava sabiranjem površina Abs vrednosti (Abs-sum) ispod krive agregacije fibrina (Slika 2A). U ovom testu se određuju i dva dodatna parametra: ukupan koagulacioni potencijal (*engl.* Overall Coagulation Potential – OCP), koji predstavlja vrednost Abs-sum ispod krive agregacije fibrina dobijene bez dodatka t-PA (Slika 2B), i ukupan fibrinolitički potencijal (*engl.* Overall Fibrinolysis Potential – OFP), koji se izračunava pomoću jednačine: $OFP (\%) = ((OCP-OHP)/OCP) \times 100$ (Slika 2C).



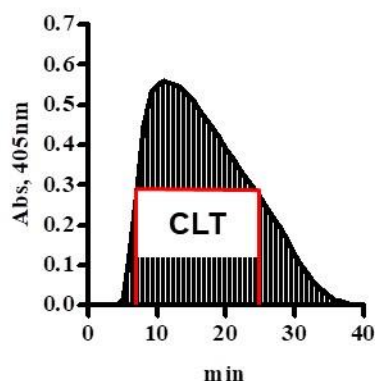
Slika 2. Šematski prikaz krive agregacije fibrina i odgovarajućih parametara OHP testa: A – ukupan hemostatski potencijal (OHP), B – ukupan koagulacioni potencijal (OCP) i C – ukupan fibrinolitički potencijal (OFP) (slika prema autoru Antovic A.)

Neposredno pre merenja uzorci su otopljeni u vodenom kupatilu na 37 °C u periodu od 10 minuta. Sva merenja su vršena u seriji i sa svakom serijom je, kao kontrola, određivan komercijalni *pool* normalne plazme (PNP; Cryocheck Pooled Normal Plasma, Precision Biologic, Dartmouth, Canada). Koeficijenti varijacije (KV) unutar serije i između serija za PNP su iznosili 1,61 % i 6,83 % za OHP, a 1,25 % i 5,75 % za OCP test.

3.5.3. Vreme liziranja ugruška (CLT)

Vreme liziranja ugruška (CLT) je određivano iz krivih agregacije fibrina dobijenih pomoću OHP testa izvedenog sa i bez dodatka PTCI (*engl.* Potato tuber carboxy-peptidase inhibitor), koji je specifični inhibitor trombinom aktiviranog fibrinolitičkog inhibitora – karboksipeptidaze B (TAFI). CLT se definiše kao vreme od središnje tačke (50 %) na delu krive između minimalne i maksimalne promene turbiditeta (koje odgovara vremenu

koagulacije) do središnje tačke (50 %) na delu krive između izmedju maksimalne i minimalne promene turbiditeta (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz određivanja vremena liziranja ugruška (CLT) sa krive agregacije fibrina (slika prema autoru Antovic A.).

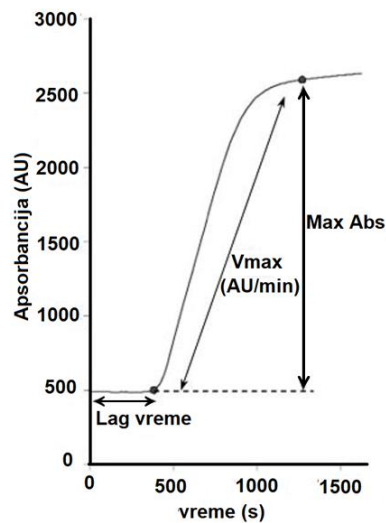
U OHP testu sa dodatkom TAFI inhibitora PTCI je dodat u uzorke plazme u finalnoj koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ i sa dobijenih krivih agregacije fibrina je određivano vreme liziranja ugruška koje se označava kao CLT PTCI. Blokiranjem TAFI aktivnosti PTCI ispoljava fibrinolitički efekat i dovodi do skraćivanja vremena liziranja ugruška. Oduzimanjem vrednosti vremena liziranja ugruška pre i nakon dodatka PTCI dobijen je ΔCLT , parametar koji posredno ukazuje na uticaj TAFI na fibrinolizu.

3.5.4. Parametri fibrinskog ugruška

Krive agregacije fibrina za OCP su korišćene za određivanje brzine polimerizacije i karakteristika fibrinskih vlakana prema prethodno opisanoj metodologiji (212). Na ovaj način su dobijeni sledeći parametri:

- (a) Lag vreme, koje se definiše kao vreme od započinjanja reakcije do pojave stvaranja fibrina, meri se u sekundama i određuje kao vremenska tačka od koje započinje eksponencijalni rast apsorbancije;
- (b) maksimalna brzina polimerizacije fibrina (V_{max}), koja se definiše kao nagib najstrmijeg dela krive polimerizacije fibrina, odražava brzinu lateralne agregacije i fazu formiranja fibrina i izražava u jedinicama AU/min;
- (c) maksimalna apsorbancija (Max Abs) kao mera prosečne debljine fibrinskih vlakana, koja se definiše kao porast apsorbancije od osnovne linije do maksimalne

vrednosti i izažava u jedinicama apsorbancije (*engl.* Absorbance units – AU) (Slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz parametara fibrinskog ugruška: Lag vreme – vreme do pojave stvaranja fibrina, Vmax – brzina polimerizacije fibrina i Max Abs – mera prosečne debljine fibrinskih vlakana (slika prema: Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ. Heritability of Clot Formation, Morphology, and Lysis: The EuroCLOT Study. ATVB. 2007 Dec;27(12):2783–9.).

3.5.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Za ispitivanje strukture i gustine fibrinskih ugrušaka reprezentativni ugrušci formirani tokom određivanja OCP su analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Kako bi se očuvala struktura fibrinskog ugruška, formirani ugrušci su dva puta ispirani u fiziološkom rastvoru puferovanom fosfatom (PBS) u intervalima od po 10 minuta, a zatim su, nakon fiksacije u 1 % paraformaldehidu u periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi, čuvani na 4 °C. Pre mikroskopiranja fiksirani uzorci su ispirani u destilovanoj vodi i vršena je dehidracija na sobnoj temperaturi serijski u 70 % i 95 % etanolu u intervalima od po 10 minuta, u apsolutnom etanolu u trajanju od 15 minuta i u čistom acetonu 10 minuta. Dehidratirani ugrušci su zatim stavljeni 10 minuta u tetrametilsilan (Merck, Darmstadt, Germany) i osušeni na vazduhu. Ovako pripremljeni ugrušci su pričvršćeni za aluminijumski nosač, presvučeni ugljenikom (MED 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) i pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa sa emisijom polja (Ultra-55 Field Emission Scanning Electron Microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) dobijene su odgovarajuće SEM fotografije. Gustina vlakana je određena modifikacijom metode koju su prethodno opisali Larange i saradnici (213), a zasniva se na prebrojavanju broja vlakana koje preseca linija od

4,44 μm postavljena horizontalno ili vertikalno u zavisnosti od pravca pružanja vlakana na fotografiji. Srednja gustina je zatim izračunata deljenjem rastojanja (4,44 μm) sa brojem vlakana u pet nasumično odabranih fotografija za svaki uzorak i izražena u $\mu\text{m}/\text{vlaknu}$.

3.5.6. Antitrombin (AT)

Aktivnost antitrombina u uzorcima plazme je određivana hromogenom metodom sa komercijalnim reagensom Berichrom Antithrombin III (Siemens Healthcare Diagnostics) na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics). Funkcionalno aktivan antitrombin iz uzorka u prisustvu heparina inaktivira trombin koji je dodat u višku. Preostala količina trombina se određuje kinetičkim testom na 405 nm, pri čemu je promena apsorpcije obrnuto srazmerna aktivnosti antitrombina u uzorku.

3.5.7. D-dimer

Koncentracija D-dimera u uzorcima plazme je određivana imunoturbidimetrijskom metodom sa komercijalnim reagensom Innovance D-dimer (Siemens Healthcare Diagnostics) na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics). Kada se uzorak koji sadrži D-dimer pomeša sa reagensom, koji predstavlja suspenziju polistirenskih čestica obloženih monoklonskim antitelima (8D3)¹⁴, dolazi do reakcije aglutinacije. Step en aglutinacije je proporcionalan koncentraciji D-dimera u uzorku i određuje se merenjem povećanja turbiditeta usled prisustva agregata.

3.5.8. Faktor VIII (FVIII)

Aktivnost FVIII u plazmi je određivana koagulometrijskom metodom zasnovanom na merenju aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT) u smeši uzorka i FVIII deficijentne plazme. Korišćeni su reagensi Pathromptin SL, CaCl_2 i Coagulation Factor VIII Deficient Plasma proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.5.9. Fibrinogen

Koncentracija fibrinogena u plazmi je određivana na automatskom koagulometru BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics) primenom modifikovane Clauss-ove metode bez

prethodnog razblaživanja uzoraka sa reagensom Multifibren U (Siemens Healthcare Diagnostics). Princip metode se zasniva na aktivaciji koagulacije u plazmi dejstvom trombina koji je dodat u velikom višku, pri čemu vreme koagulacije u velikoj meri zavisi od količine fibrinogena u uzorku.

3.5.10. Trombin-antitrombin III kompleks (TAT)

Za određivanje TAT u plazmi je korišćen komercijalni test kit Enzygnost[®] TAT micro (Siemens Healthcare Diagnostics). Princip određivanja podrazumeva dvostepeno „sendvič“ imunoodređivanje. U toku prve inkubacije TAT iz uzorka se vezuje za zečija antitela na humani trombin sa kojima je obložena površina mikrotitarske ploče. Posle ispiranja, u drugoj inkubaciji, zečija antitela na humani ATIII konjugovana sa peroksidazom se vezuju za slobodne ATIII determinante. Višak antitela se uklanja ispiranjem, a zatim se fotometrijski određuje aktivnost vezanog enzima i kvantifikuje preko kalibracione krive koja je dobijena pomoću standarda koji su uključeni u test kit.

3.5.11. C-reaktivni protein (CRP)

Koncentracije CRP u serumu su određivane na aparatu BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics) korišćenjem reagensa CardioPhase[®] hsCRP (Siemens Healthcare Diagnostics) koji je namenjen za kvantitativno određivanje CRP metodom imunonefelometrije pojačane česticama (*engl.* particle-enhanced immunonephelometry). Kada se polistirenske čestice obložene monoklonskim antitelima specifičnim na humani CRP pomešaju sa uzorkom koji sadrži CRP dolazi do formiranja agregata. Nastali agregati rasipaju snop svetlosti koji prolazi kroz uzorak, pri čemu je intenzitet rasute svetlosti proporcionalan sadržaju CRP u uzorku.

3.5.12. Parametri lipidnog statusa

Parametri lipidnog statusa, ukupan holesterol (UH), HDL holesterol (HDL-H) i trigliceridi (TG), su određivani u serumu rutinskim enzimskim metodama sa komercijalnim reagensima na analizatoru Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) u laboratoriji Univerzitetske bolnice Karolinska. LDL holesterol (LDL-H), u uzorcima u kojima je koncentracija triglicerida bila $\leq 4,5$ mmol/L, je izračunat korišćenjem Friedewald-ove formule: $C_{LDL-H} = C_{UH} - C_{HDL-H} - C_{TG}/2,2$. Lipoprotein (a) (Lp(a)) je određivan metodom

imunoturbidimetrije pojačane česticama (*engl.* particle enhanced turbidimetric immunoassay) korišćenjem komercijalnog testa Tina-quant Lipoprotein[a] Gen 2 (Roche Diagnostics) koji je standardizovan prema IFCC (*engl.* International Federation of Clinical Chemistry) referentnom materijalu (SRM 2B) i koncentraciju Lp(a) izražava u nmol/L.

3.5.13. Antifosfolipidna antitela

Antifosfolipidna antitela, anti- β_2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela, su određivana semikvantitativno u serumu korišćenjem komercijalnih IgA, IgG i IgM panela (BioPlex 2200 Antiphospholipid Syndrome (APLS) Panels, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) na automatskom analizatoru BioPlex 2200 (Bio-Rad Laboratories). Princip određivanja se zasniva na specifičnoj imunohemijskoj reakciji uz primenu dve populacije fluorescentno obojenih magnetnih čestica koje su obložene sa odgovarajućim antigenom. Prvu populaciju čine čestice obložene sa β_2 -glikoproteinom I, dok su u drugoj populaciji čestice istovremeno obložene sa kardiolipinom i β_2 -glikoproteinom I. Kvantifikovanje odgovarajućih antitela se vrši merenjem intenziteta fluorescencije nakon dodatka murinskih monoklonalnih anti-humanih IgA, IgG ili IgM antitela konjugovanih sa fikoeritriinom. Na ovaj način je omogućena simultana detekcija i identifikacija različitih vrsta autoantitela. Rezultati se izračunavaju pomoću kalibracione krive i porede u odnosu na odgovarajuću *cut-off* vrednost. Za evaluaciju rezultata su korišćene *cut-off* vrednosti koje je prilagodila laboratorija za imunologiju Karolinska Instituta:

- a β 2GPI IgA *cut-off* = 20 U/mL,
- a β 2GPI IgG *cut-off* = 10 U/mL,
- a β 2GPI IgM *cut-off* = 30 U/mL,
- aCL IgA *cut-off* = 20 APL-U/mL,
- aCL IgG *cut-off* = 10 GPL-U/mL,
- aCL IgM *cut-off* = 30 MPL-U/mL.

3.5.14. Ekstracelularne vezikule (EV)

Koncentracija ekstracelularnih vezikula i njihov fenotip su određivani u uzorcima 36 zdravih trudnica i 30 pacijentkinja sa preeklampsijom, pre i posle porođaja, prema ranije opisanoj metodi (214). Prethodno zamrznuti uzorci PPP su otopljeni u vodenom kupatilu na 37 °C u periodu od 5 minuta i zatim centrifugirani 20 minuta na 2000 × g na sobnoj

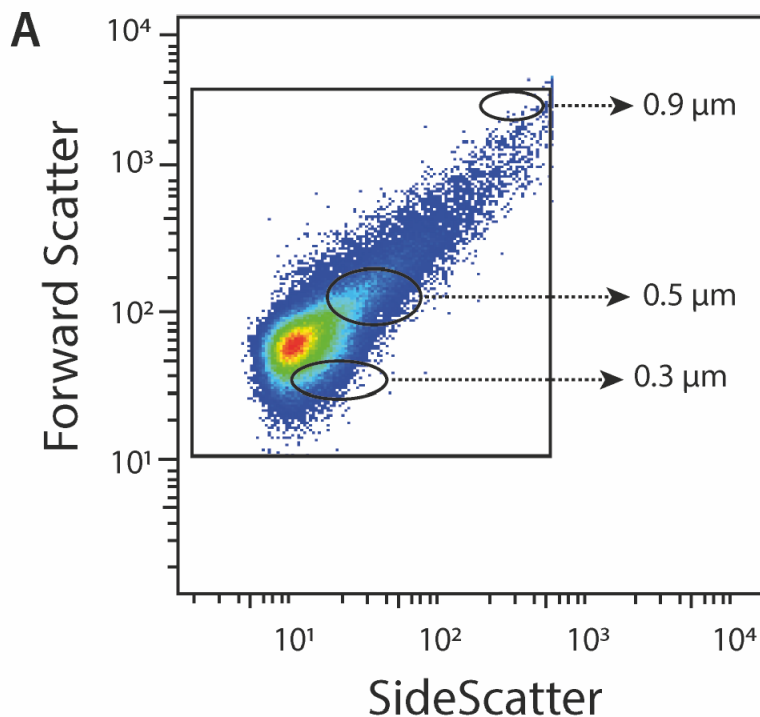
temperaturi. Nakon odvajanja supernatant je ponovno centrifugiran na $13000 \times g$ u trajanju od 2 minuta na sobnoj temperaturi. 20 μL supernatanta dobijenog nakon drugog centrifugiranja je potom inkubirano u mraku sa 5 μL anti-laktadherin antitelom konjugovanim sa fluorescein-izotiocijanatom (lactadherin-FITC; Haematologic Technologies Essex Junction, VT, USA) i 5 μL odgovarajućih monoklonalnih antitela korišćenih za fenotipizaciju ekstracelularnih vezikula:

- anti-CD42a antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD42a-PE; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), specifično za glikoprotein IX, marker trombocita;
- anti-CD62E antitelo konjugovano sa alofikocijaninom (CD62E-APC; AH diagnostics, Stockholm, Sweden), specifično za E-selektin, marker endotelnih ćelija;
- anti-CD142 antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD142-PE; BD, NJ, USA), specifično za tkivni faktor (TF), marker TF;
- anti-CD106 antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (CD106-PE; AH diagnostics, Stockholm, Sweden), specifično za adhezivni molekul vaskularnih ćelija 1 (VCAM-1), marker aktiviranih endotelnih ćelija.

Laktadherin je korišćen za identifikaciju inicijalne populacije EV koje na svojoj površini ispoljavaju fosfatidilserin (*engl.* phosphatidylserine – PS) s obzirom da poseduje veću osetljivost od aneksina V (*engl.* annexin V) za detekciju EV bogatih PS.

Dalja fenotipizacija je uključila detekciju EV koje na svojoj površini ispoljavaju placentalni faktor rasta (*engl.* Placental Growth Factor – PIGF) korišćenjem anti-PIGF antitela konjugovanih sa fluorescein-izotiocijanatom (Anti-PIGF-FITC; Abcam, Cambridge, UK).

Uzorci su analizirani na protočnom citometru Beckman Gallios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) pri čemu je prethodno određen opseg EV (*engl.* EV gate) pomoću Megamix-Plus FSC (Biocytex, Marseille, France), smeše čestica prečnika 0,1, 0,3, 0,5 i 0,9 μm (*Slika 5*). EV su definisane kao partikule veličine $< 1 \mu\text{m}$ i pozitivne na navedena antitela.



Slika 5. Dot plot prikaz strategije određivanja opsega EV (*engl.* EV gate) korišćenjem smeše čestica prečnika 0,3, 0,5 i 0,9 μm.

3.6. Metode statističke obrade podataka

Za statističku obradu podataka su korišćeni statistički programi SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) i R 3.4.2. Q18 (R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (URL <https://www.R-project.org/>)).

Metode deskriptivne statistike su korišćene za analizu i prikazivanje prikupljenih podataka, pri čemu su kategoričke promenljive predstavljene kao apsolutni i relativni brojevi (n, %), dok su kontinuirane promenljive, u zavisnosti od raspodele, predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom. Normalnost statističke raspodele podataka za svaku pojedinačnu promenljivu je testirana primenom Kolmogorov-Smirnov testa. Poređenje apsolutnih frekvencija kategoričkih promenljivih je vršeno Hi-kvadrat testom (*engl.* Chi-square test). Za ispitivanje statističke značajnosti razlika kontinuiranih promenljivih između pacijentkinja sa preeklampsijom i zdravih trudnica korišćeni su parametarski Studentov t-test, za promenljive sa normalnom raspedelom, i Mann-Whitney U test, za promenljive kod kojih je ustanovljeno da nemaju

normalnu raspodelu. Podaci dobijeni za uparene uzorke pre i posle porođaja pacijentkinja sa preeklampsijom su poređeni parametarskim t-testom za dva zavisna uzorka ili neparametarskim Wilcoxon Signed-Rank testom. Da bi se utvrdilo eventualno postojanje povezanosti između ispitivanih parametara izvršena je korelaciona analiza. U zavisnosti od vrste podataka i njihove raspodele jačina povezanosti ispitivanih promenljivih je određena pomoću Pearson-ovog koeficijenta linearne korelacije (r) za promenljive sa normalnom raspodelom, odnosno pomoću Spearman-ovog koeficijenta (ρ) za promenljive koje odstupaju od normalne raspodele. Zbog potencijalnog uticaja starosti, ITM i krvnog pritiska na rezultate korelacione analize kojom je ispitivana povezanost ekstracelularnih vezikula sa ostalim parametrima primenjena je i parcijalna Pearson-ova korelacija. Prethodno je izvršena logaritamska transformacija promenljivih koje odstupaju od normalne raspodele. Moguće interakcije su ispitane pomoću multivarijatne logističke regresione analize. U grupi pacijentkinja sa renalnim komplikacijama izvršena je procena prognostičke vrednosti pojedinačnih ETP parametara pomoću ROC (*engl.* Receiver operating characteristics) analize, pri čemu je određena površina ispod krive (AUC) sa 95 % intervalom pouzdanosti (*engl.* Confidence Interval – CI). Nivo statističke značajnosti P je smatran statistički značajnim za vrednosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Opšte i kliničke karakteristike ispitanica studijske i kontrolne grupe

U sprovedenom ispitivanju učestvovalo je ukupno 127 trudnica gestacijske starosti od 25 – 40 nedelja, ali su za jednu pacijentkinju sa preeklampsijom koja je imala višeploidnu trudnoću, podaci dobijeni u istraživanju naknadno isključeni iz statističke obrade. Stoga je ispitivanu grupu činilo 46 pacijentkinja sa preeklampsijom, a kontrolnu 80 zdravih trudnica. U *Tabeli 1.* prikazane su opšte karakteristike ispitivane i kontrolne grupe.

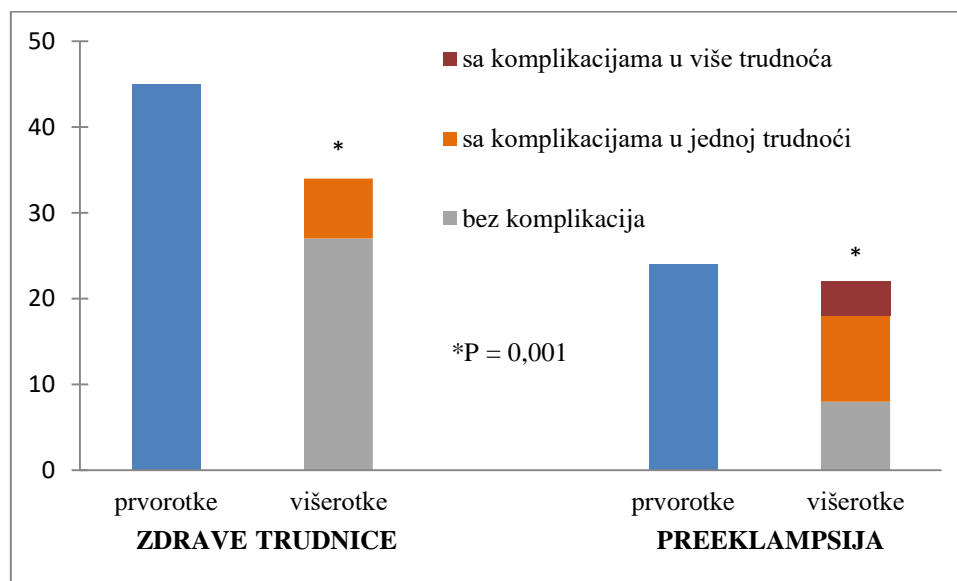
Tabela 1. Opšte karakteristike ispitanica sa preeklampsijom i kontrolne grupe

	Preeklampsija (PEK) (N=46)	Kontrolna grupa (KG) (N=80)	P
Starost, godine	31,2 ± 6,5	30,1 ± 4,9	0,324
Gestacijska starost, nedelje gestacije	32,9 ± 3,6	31,3 ± 3,5	0,017
ITM, kg/m ²	30,1 ± 0,9	25,8 ± 0,3	< 0,001
Pušački status, n (%)			
<i>nepušači</i>	41 (89)	66 (83)	
<i>pušači</i>	5 (11)	14 (17)	0,317 [†]
Paritet, n (%)			
<i>prvorotka</i>	24 (52)	45 (57)	
<i>višerotka</i>	22 (48)	34 (43)	0,604 [†]
Komplikacije u prethodnoj trudnoći, n (%)	14 (64)	7 (21)	0,001 [†]
Porodična istorija komplikacija u trudnoći, n (%)			
<i>da</i>	6 (14)	13 (16)	
<i>ne</i>	36 (86)	66 (84)	0,755 [†]

Prosečna starost, gestacijska starost i indeks telesne mase (ITM) su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$); n: broj; %: procenat; [†] Chi-kvadrat test za proporcije (procenante).

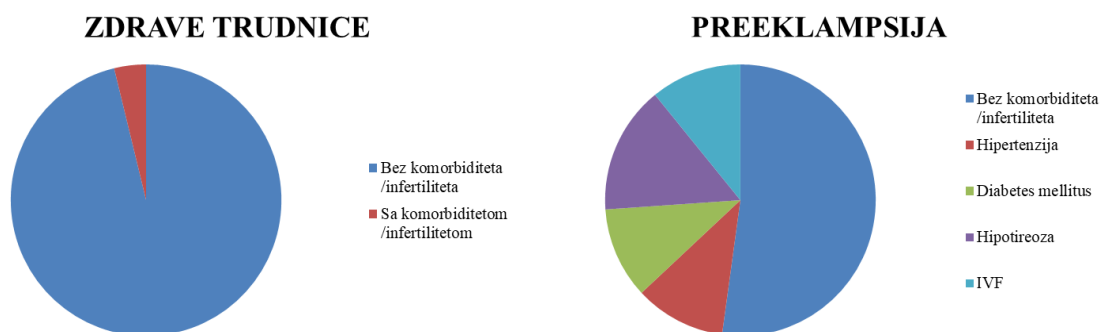
Statistički značajna razlika nije postojala između ispitivanih grupa u pogledu starosti, pariteta, pušačkog statusa i porodične istorije komplikacija u trudnoći. Trudnice sa preeklampsijom su imale veću gestacijsku starost i ITM prilikom uključivanja u studiju. Iako rezultati Chi-kvadrat testa nisu pokazali značajnu razliku u paritetu ispitanica, visoko statistički značajna razlika je nađena u procentu zastupljenosti komplikacija u prethodnoj

trudnoći ($P = 0,001$; *Slika 6.*). U grupi ispitanica sa preeklampsijom su zabeležene sledeće komplikacije u prethodnoj trudnoći: spontani pobačaj, izostali pobačaj (*missed abortion*), gestacijska hipertenzija, preeklampsija, eklampsija, intrauterusni zastoj u rastu ploda (*engl. Intrauterine Growth Restriction – IUGR*), prevremeni porođaj i intrauterina smrt ploda (*engl. Fetus Mortus in Utero – FMU*). 4/14 ispitanica u prethodnoj trudnoći su imale komplikacije u nekoliko trudnoća. U kontrolnoj grupi najveći broj trudnica je imao spontani pobačaj (5/7), dok su kod dve zabeleženi IUGR (1/7) i prevremeni porođaj (1/7).



Slika 6. Prisustvo komplikacija u prethodnoj trudnoći u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Između ispitivanih grupa je postojala statistički značajna razlika u prisustvu infertiliteta i pridruženih komorbiditeta ($P < 0,001$), koji su zabeleženi kod 47,8 % trudnica sa preeklampsijom i 3,8 % zdravih trudnica (*Slika 7.*).



Slika 7. Prisustvo komorbiditeta i infertiliteta u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Komorbidity majke zabeleženi u studijskoj grupi su: hipertenzija (11 %), dijabetes (11 %) i hipotireoidizam (15 %), dok je 5 ispitanica sa preeklampsijom imalo udružene komorbidity. U ovoj grupi 11 % trudnoća je ostvareno veštačkom oplodnjom (*In vitro* fertilizacija – IVF) (Tabela 2.).

Tabela 2. Pridružena medicinska stanja kod ispitanica sa preeklampsijom

Komorbidity majke	n = 46
Bez komorbidity	24
Sa jednim komorbidity	17
Sa dva komorbidity	4
Sa tri komorbidity	1
<i>Hipertenzija</i>	5
<i>Gestacijski DM klasa A1</i>	5
<i>Hipotireoidizam</i>	7
<i>IVF/ET</i>	5

n: broj; DM: Diabetes mellitus; IVF/ET: *In vitro* fertilizacija/embriotransfer.

Kod svih trudnica sa preeklampsijom u toku hospitalizacije i u vreme uzorkovanja krvi primenjivana je antihipertenzivna terapija. Dodatno, kod 6 pacijentkinja je primenjena profilaktička doza niskomolekularnog heparina (LMWH) i/ili Aspirin® u dozi od 100 mg na dan (Tabela 3.).

Tabela 3. Profilaktička antikoagulantna i/ili antiagregaciona terapija primenjivana kod ispitanica sa preeklampsijom u toku hospitalizacije

Profilaksa u toku trudnoće	n = 46
Bez profilaktičke terapije	40
Sa profilaktičkom terapijom	6
<i>LMWH</i>	2
<i>Aspirin</i> ®	2
<i>LMWH + Aspirin</i> ®	2

LMWH (*Low Molecular Weight Heparin*) - niskomolekularni heparin;

Aspirin® - acetilsalicilna kiselina (ASA).

Posle isključivanja 4 trudnice kod kojih je primenjivan LMWH, zbog mogućeg uticaja na ispitivane parametre hemostaze, između ispitivanih grupa i dalje je postojala statistički značajna razlika u pogledu gestacijske starosti i ITM, kao i u procentu zastupljenosti komplikacija u prethodnoj trudnoći (Tabela 4.).

Tabela 4. Opšte karakteristike ispitanica sa preeklampsijom i kontrolne grupe posle isključivanja ispitanica na profilaksi sa LMWH

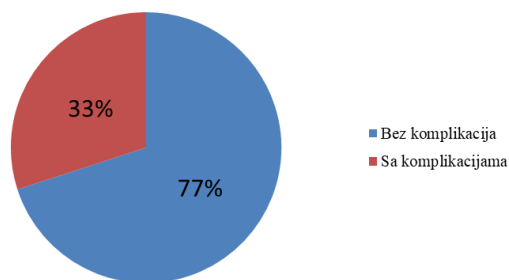
	PEK (N=42)	KG (N=80)	P
Starost, godine	31,2 ± 6,6	30,1 ± 4,9	0,315
Gestacijska starost, nedelje gestacije	33,1 ± 3,7	31,3 ± 3,5	0,009
ITM, kg/m ²	30,1 ± 5,7	25,8 ± 2,9	< 0,001
Pušački status, n (%)			
<i>nepušači</i>	37 (88)	66 (83)	0,418 [†]
<i>pušači</i>	5 (12)	14 (17)	
Paritet, n (%)			
<i>prvorotka</i>	22 (52)	45 (57)	0,629 [†]
<i>višerotka</i>	20 (48)	34 (43)	
Komplikacije u prethodnoj trudnoći, n (%)	12 (60)	7 (21)	0,003 [†]
Porodična istorija komplikacija u trudnoći, n (%)			
<i>da</i>	6 (14)	13 (16)	0,776 [†]
<i>ne</i>	36 (86)	67 (84)	

Prosečna starost, gestacijska starost i indeks telesne mase (ITM) su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$); n – broj; % – procenat; [†] Chi-kvadrat test za proporcije (procenat).

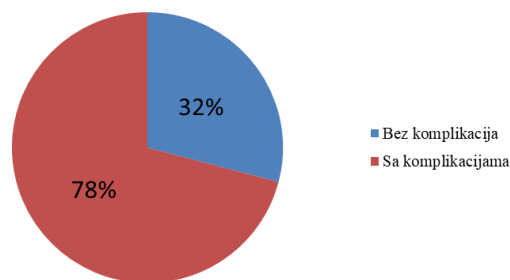
4.2. Maternalne komplikacije u toku hospitalizacije i ishodi trudnoće kod ispitanica studijske grupe

Učestalost maternalnih i fetalnih komplikacija u grupi ispitanica sa preeklampsijom prikazana je na *Slici 8*.

MATERNALNE KOMPLIKACIJE



FETALNE KOMPLIKACIJE



Slika 8. Prisustvo maternalnih i fetalnih komplikacija kod ispitanica sa preeklampsijom

Maternalne komplikacije zabeležene u toku hospitalizacije kod 15 (33 %) trudnica sa preeklampsijom su: HELLP sindrom (*Haemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count*), renalne komplikacije, trombocitopenija, abrupcija placente i neurološki poremećaji (Tabela 5.).

Tabela 5. Maternalne komplikacije zabeležene kod ispitanica sa preeklampsijom u toku hospitalizacije

Maternalne komplikacije	N = 46
Bez komplikacija	32
Sa komplikacijama	15*
HELLP	3
Renalne komplikacije	5
<i>Proteinurija, Oligurija, Anasarka</i>	1
<i>Nefrotski sindrom</i>	4
Trombocitopenija	3
Abrupcija placente	1
Neurološki poremećaji	4
*Jedna pacijentkinja je imala renalne komplikacije i neurološki poremećaj	

HELLP (Haemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count).

Kod 78 % (36/46) trudnica sa preeklampsijom trudnoća je bila praćena fetalnim komplikacijama. IUGR je zabeležen kod 31 ispitanice, s tim da je kod 5/46 (11 %) ispitanica IUGR bio udružen sa oligohidramnionom, a kod 13/46 (28 %) ispitanica sa fetalnom asfiksijom. Kod jedne ispitanice oligohidramnion se javio kao samostalna fetalna komplikacija, dok se kod jedne ispitanice izolovano javila fetalna asfiksija. Ishodi trudnoće i fetalne komplikacije kod trudnica sa preeklampsijom su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. Ishodi trudnoće i fetalne komplikacije kod ispitanica studijske grupe

Kategorije gestacijske starosti na porođaju, nedelje gestacije^a	n = 46^b
veoma rani pretermijski porođaj (< 28)	3
rani pretermijski porođaj (28 – < 32)	13
umereni – kasni pretermijski porođaj (32 – < 37)	17
rani termijski porođaj (37 – 39)	12
termijski porođaj (> 39)	1
Telesna masa, g	n = 46^b
> 3500	2
2500 – 3500	8
< 2500	36
1500 – 2499	15
1000 – 1499	13
750 – 999	7
< 750	1
Apgar skor posle 1 minuta	n = 46^b
< 7	22
≥ 7	24
Apgar skor posle 5 minuta	n = 46^b
< 7	15
≥ 7	31
Fetalne komplikacije	n = 46^b
Ne	10
Da	36
<i>IUGR</i>	34
<i>Oligohidramnion</i>	6
<i>Fetalna asfiksija</i>	14

^aprema preporuci SZO (215);

^bpodaci prikazani za sve pacijentkinje sa PEK;

Apgar skor (*Appearance, Pulse, Grimace, Activity, and Respiration*) – metod za procenu vitalnosti novorođenčeta neposredno nakon porođaja na osnovu: boje kože, srčane radnje, refleksnog nadražaja, mišićnog tonusa i respiracije.

IUGR (Intrauterine growth restriction) – intrauterusni zastoj u rastu ploda odnosi se na fetus sa procenjenom fetalnom masom < 10. percentila za određeno gestacijsko doba na ultrazvučnom pregledu;

Oligohidramnion – definiše se kao indeks amnijske tečnosti (AFI) od 5 cm ili manje.

4.3. Globalni testovi hemostaze

U Tabeli 7. su prikazani rezultati poređenja parametara globalnih testova hemostaze, endogenog trombinskog potencijala i ukupnog hemostatskog potencijala, u kontrolnoj grupi i grupi trudnica sa preeklampsijom pre i posle porođaja. Kod pacijentkinja sa preeklampsijom dobijene su značajno više vrednosti za ETP i visinu pika ($P < 0,001$), kao i produženo vreme lag faze u odnosu na kontrolnu grupu ($P = 0,025$). Vremena dostizanja pika nisu se statistički značajno razlikovala između poređenih grupa. Statistička analiza je pokazala i značajno povećanje vrednosti OHP ($P = 0,038$) i smanjenje vrednosti OFP ($P < 0,001$) u trudnoći komplikovanoj preeklampsijom, bez razlike u vrednostima OCP u poređenju sa kontrolnom grupom. Nakon porođaja u grupi ispitanica sa preeklampsijom uočeno je značajno povećanje visine pika ($P = 0,007$), praćeno skraćanjem vremena dostizanja pika ($P = 0,037$), a bez značajne razlike u vrednostima ETP i tlag. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima OCP i OHP pre i nakon porođaja, ali su vrednosti OFP bile značajno snižene ($P = 0,008$) u poređenju sa vrednostima pre porođaja.

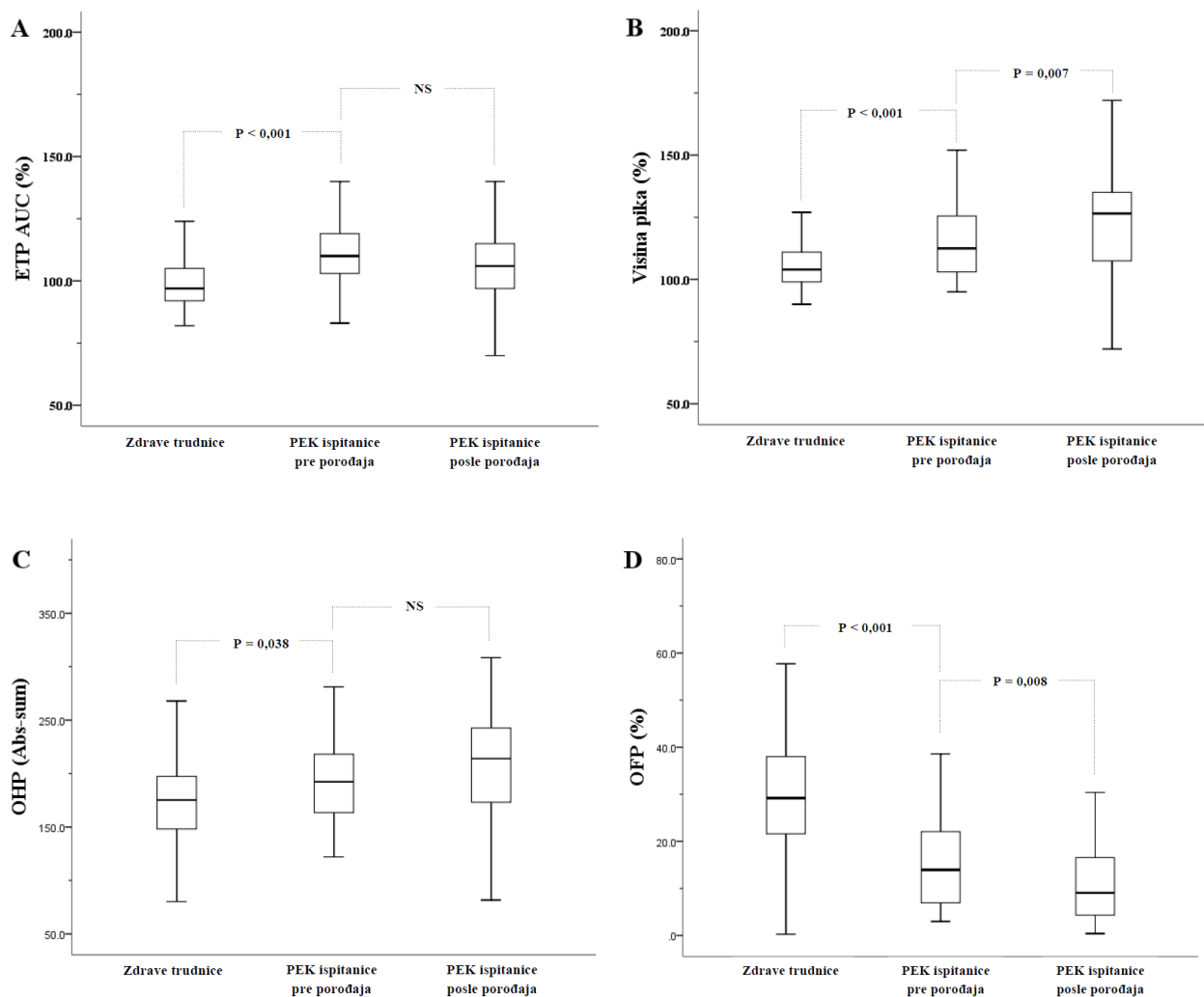
Tabela 7. Rezultati globalnih testova hemostaze u kontrolnoj grupi i grupi ispitanica sa preeklampsijom pre porođaja (pp) i nakon porođaja (np)

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
ETP AUC (%)	97,0 (92,0 – 105,0)	110,0 (103,0 – 119,0)	106,0 (97,0 – 118,0)	< 0,001	0,252
tlag (s)	23,0 ± 3,2	24,8 ± 4,7	23,8 ± 6,4	0,025	0,515
Cmax (%)	105,8 ± 11,7	115,4 ± 14,8	131,3 ± 39,5	< 0,001	0,007
tmax (s)	69,3 ± 14,4	67,0 ± 9,3	62,8 ± 11,7	0,270	0,037
OCP (Abs-sum)	242,2 ± 36,1	226,3 ± 49,6	236,2 ± 57,8	0,067	0,470
OHP (Abs-sum)	173,1 ± 46,0	191,1 ± 44,7	210,1 ± 50,3	0,038	0,110
OFP (%)	29,2 (21,6 – 38,0)	13,9 (7,0 – 22,1)	8,3 (4,5 – 15,5)	< 0,001	0,008

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

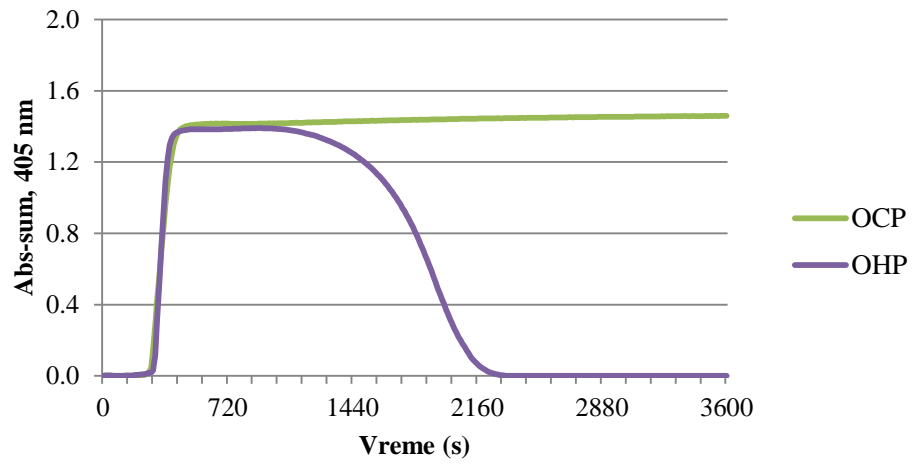
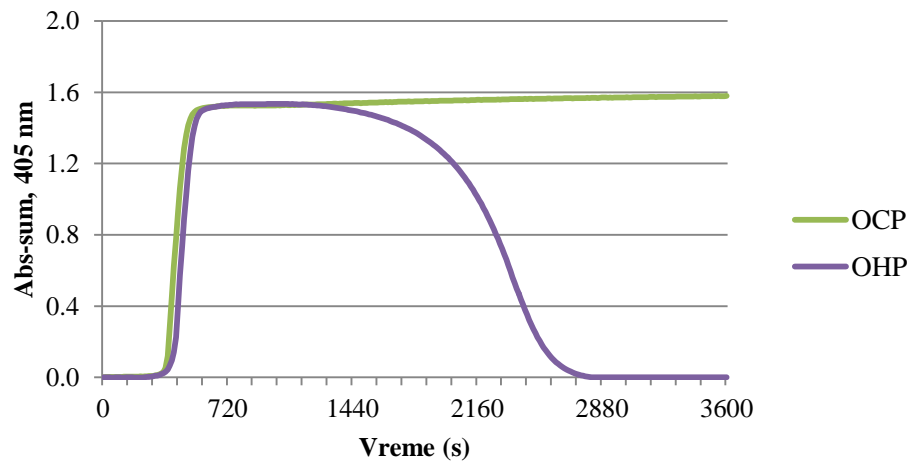
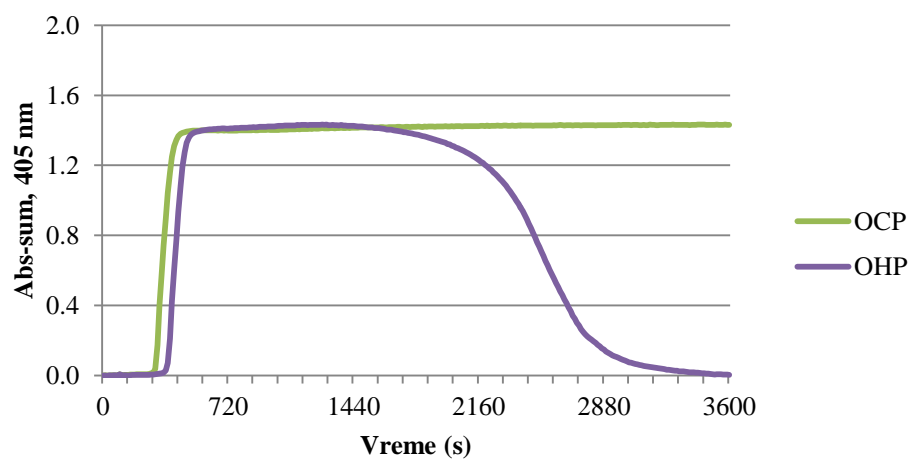
ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; tlag – vreme lag faze; Cmax – visina pika; tmax – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal.

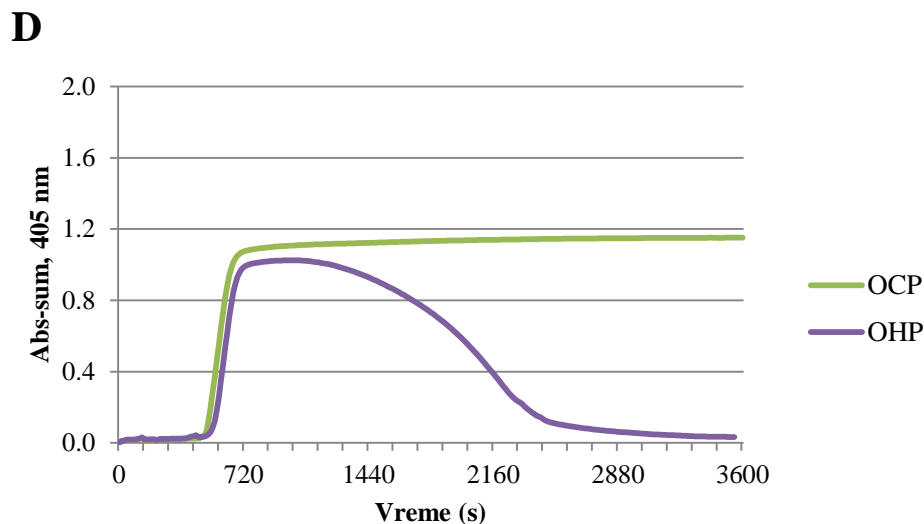
Distribucija vrednosti parametara globalnih testova hemostaze kod kojih je nađena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa prikazana je na *Slici 9*.



Slika 9. Grafički prikaz vrednosti parametara globalnih testova hemostaze u ispitivanim grupama: A) ETP AUC (%), B) Visina pika (%), C) OHP (Abs-sum) i D) OHP (%).

Povećana agregacija fibrina udružena sa produženom fibrinolizom je prisutna kod pacijentkinja sa preeklampsijom u odnosu na normalnu trudnoću i jasno se uočava na grafičkom prikazu reprezentativnih krivih agregacije fibrina za ukupni koagulacioni potencijal i ukupni hemostatski potencijal (*Slika 10.*). Kod pacijentkinja sa preeklampsijom nakon porođaja uočava se dodatno produženje fibrinolize.

A**B****C**



Slika 10. Reprezentativne krive ukupnog koagulacionog potencijala (OCP) i ukupnog hemostatskog potencijala (OHP): A) zdrava trudnica, B) pacijentkinja sa preeklampsijom pre porođaja, C) pacijentkinja sa preeklampsijom posle porođaja i D) normalni *pool* plazme.

S obzirom da je utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika u gestacijskoj starosti i ITM između pacijentkinja sa preeklampsijom i zdravih trudnica pri uključivanju u istraživanje izvršena je statistička analiza sa kontrolisanjem uticaja navedenih varijabli. Svi ispitivani parametri, izuzev tlag i OHP, su se i dalje statistički značajno razlikovali i posle korekcije uticaja gestacijske starosti i ITM. U *Tabeli 8.* dato je poređenje rezultata statističke analize pre i posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM, kao i posle kontrolisanja samo uticaja ITM. Mera veličine efekta izražena preko parcijalnog eta kvadrata pokazuje da je dovoljno uzeti u obzir samo kontrolisanje uticaja ITM uz ograničenje da se radi o ITM u trudnoći, s obzirom da nisu bili dostupni podaci o vrednostima ITM pre trudnoće.

Tabela 8. Rezultati statističke analize kontrole uticaja gestacijske starosti i ITM

PEK pacijentkinje pre porođaja vs kontrolna grupa			
	statistička analiza bez kontrole uticaja	statistička analiza posle kontrole uticaja gest. starosti i ITM	statistička analiza posle kontrole uticaja ITM
	P	P (η_p^2)	P (η_p^2)
ETP AUC (%)	< 0,001	< 0,001 (0,099)	< 0,001 (0,104)
t _{lag} (s)	0,025	0,066 (0,028)	0,070 (0,027)
C _{max} (%)	< 0,001	0,041 (0,035)	0,033 (0,038)
t _{max} (s)	0,270	0,190 (0,015)	0,232 (0,012)
OCP (Abs-sum)	0,067	0,115 (0,021)	0,169 (0,016)
OHP (Abs-sum)	0,038	0,261 (0,011)	0,114 (0,021)
OFP (%)	< 0,001	0,003 (0,073)	0,001 (0,093)

* Parcijalni eta kvadrat (η_p^2) - mera veličine efekta

Posle isključivanja pacijentkinja kod kojih je primenjivan LMWH između ispitivanih grupa i dalje je postojala statistički značajna razlika za navedene parametre (*Tabela 9.*).

Tabela 9. Rezultati globalnih testova hemostaze posle isključivanja ispitanica na profilaksi sa LMWH

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
ETP AUC (%)	97,0 (92,0 – 105,0)	109,5 (102,0 – 118,8)	106,0 (97,0 – 118,3)	< 0,001	0,321
t _{lag} (s)	23,0 ± 3,2	24,4 ± 3,7	23,9 ± 6,7	0,046	0,685
C _{max} (%)	105,8 ± 11,7	114,4 ± 14,5	134,1 ± 40,7	< 0,001	0,004
t _{max} (s)	69,3 ± 14,4	67,5 ± 9,4	62,2 ± 12,3	0,390	0,009
OCP (Abs-sum)	242,2 ± 36,1	231,6 ± 40,6	233,8 ± 58,0	0,006	0,873
OHP (Abs-sum)	173,1 ± 46,0	195,2 ± 36,7	208,4 ± 51,2	0,168	0,278
OFP (%)	29,2 (21,6 – 38,0)	15,2 (7,3 – 22,3)	7,0 (3,9 – 16,0)	< 0,001	0,011

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; t_{lag} – vreme lag faze; C_{max} – visina pika; t_{max} – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal.

4.4. Vreme liziranja ugruška

Statistički značajno produženje vremena liziranja ugruška (CLT) je nađeno u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice ($P < 0,001$). Nakon dodatka inhibitora karboksipeptidaze (PTCI), uočeno je značajno skraćanje vremena liziranja ugruška (CLT PTCI) u obe grupe, ali je vreme liziranja ugruška ostalo produženo u grupi sa preeklampsijom, čak i po dodatku PTCI ($P < 0,001$). Među grupama su se značajno razlikovale i srednje vrednosti Δ CLT ($P < 0,001$). Ovaj parametar predstavlja razliku između vremena liziranja ugruška merenih sa i bez dodatka PTCI i ukazuje na izmenjenu aktivnost TAFI. U grupi pacijentkinja sa preeklampsijom nakon porođaja uočeno je dodatno produženje vremena liziranja ugruška, i pre i nakon dodatka PTCI, ali bez statističke značajnosti. Takođe, razlika između ovih vremena (Δ CLT) nije bila značajna, iako su dobijene niže vrednosti nakon porođaja u odnosu na vrednosti pre porođaja. Vrednosti navedenih parametara, kao i statistička značajnost, su prikazani u *Tabeli 10*.

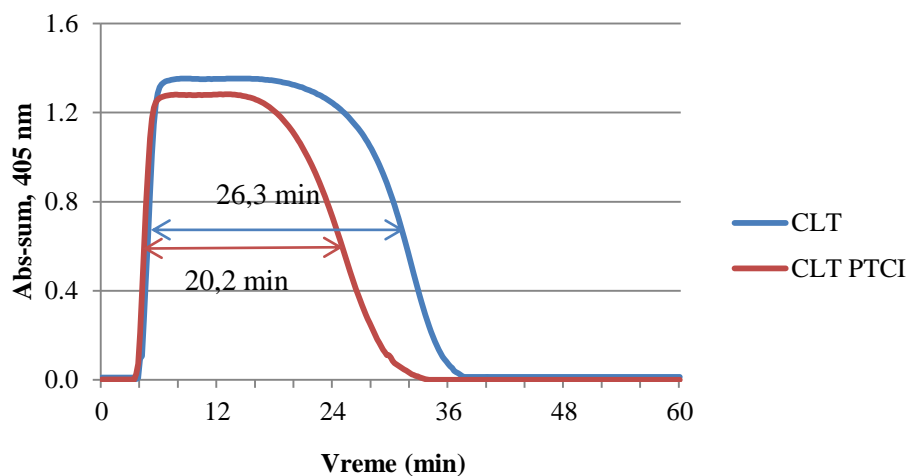
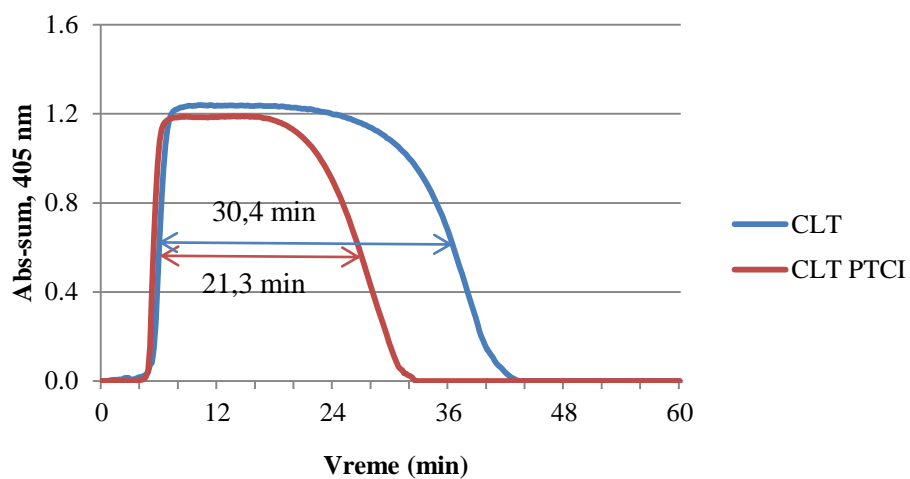
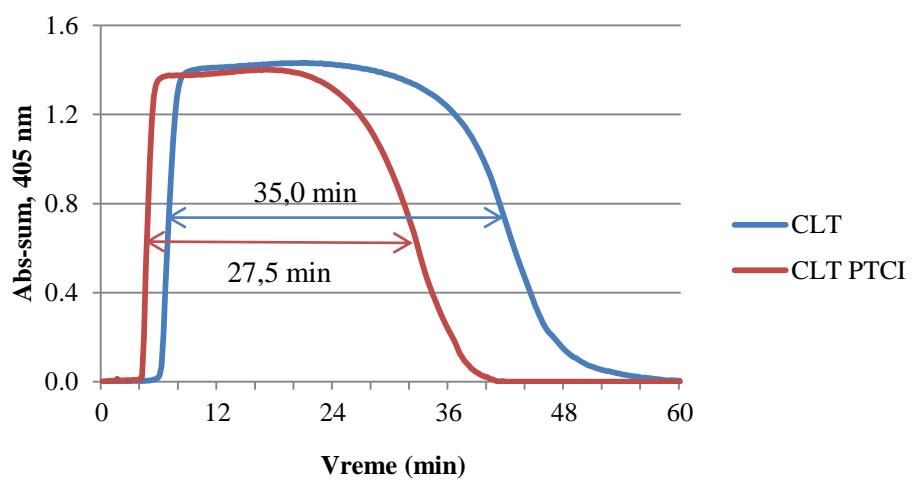
Tabela 10. Vrednosti parametara povezanih sa lizom ugruška

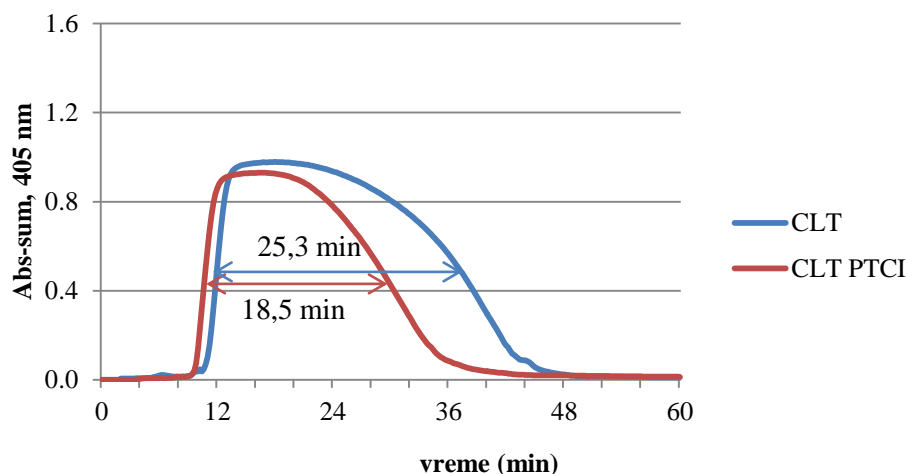
Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
CLT (min)	25,6 ± 4,8	33,6 ± 9,2	34,3 ± 6,2	< 0,001	0,075
CLT PTCI (min)	19,6 ± 3,4	24,2 ± 5,0	26,1 ± 2,9	< 0,001	0,057
Δ CLT	6,0 ± 2,2	10,4 ± 7,9	8,2 ± 4,4	< 0,001	0,555

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom;

CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCI – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; Δ CLT – delta CLT (Δ CLT = CLT – CLT PTCI).

Na *Slici 11*, prikazane su reprezentativne krive vremena liziranja ugruška sa i bez dodatka inhibitora karboksipeptidaze (PTCI) za uzorak zdrave trudnice, pacijentkinje sa preeklampsijom pre i posle porođaja, kao i normalni *pool* plazme.

A**B****C**

D

Slika 11. Uporedni prikaz reprezentativnih krivih vremena liziranja ugruška sa i bez dodatka inhibitora karboksipeptidaze (PTCI) za uzorak zdrave trudnice (A), uzorak pacijentkinje sa preeklampsijom pre (B) i posle (C) porođaja i normalni *pool* plazme (D).

Posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM nije bilo promene u rezultatima statističke analize. Takođe, vrednosti CLT parametara posle isključivanja pacijentkinja na profilaktičkoj terapiji sa LMWH (N = 4) nisu se značajno promenile, kao ni rezultati poređenja ispitivanih grupa (*Tabela 11.*).

Tabela 11. Vrednosti parametara povezanih sa lizom ugruška posle isključivanja ispitanica na profilaksi sa LMWH

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
CLT (min)	25,6 ± 4,8	33,5 ± 9,6	34,5 ± 6,0	< 0,001	0,161
CLT PTCI (min)	19,6 ± 3,4	24,4 ± 5,2	26,0 ± 2,8	< 0,001	0,137
ΔCLT	6,0 ± 2,2	10,3 ± 8,2	8,4 ± 4,3	0,004	0,107

Podaci su predstavljani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCI – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; ΔCLT – delta CLT ($\Delta CLT = CLT - CLT PTCI$).

4.5. Parametri fibrinskog ugruška i njegova struktura

Turbidimetrijski parametri dobijeni analizom krive agregacije ukupnog koagulacionog potencijala ukazuju da kod pacijentkinja sa preeklampsijom dolazi do bržeg stvaranja fibrina, odnosno vrednosti brzine polimerizacije (V_{max}) su 17 % veće u odnosu na vrednosti za zdrave trudnice iz kontrolne grupe, kao i da se fibrinski ugrušci sastoje od tanjih vlakana (vrednosti maksimalne apsorbancije (Max Abs) su niže za 9,6 %). Nisu dobijene statistički značajne razlike u pogledu karakteristika fibrinskih ugruška između pacijentkinja sa preeklampsijom pre i nakon porođaja, izuzev produženja lag faze (28,7 %) u grupi nakon porođaja (Tabela 12.).

Tabela 12. Vrednosti parametara fibrinskog ugruška

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
Lag vreme (s)	265,2 ± 57,9	279,3 ± 107,2	359,4 ± 174,7	0,425	0,008
V_{max} (AU/min)	0,47 ± 0,15	0,55 ± 0,11	0,52 ± 0,21	0,006	0,410
Max Abs (AU)	1,36 ± 0,18	1,27 ± 0,22	1,28 ± 0,36	0,025	0,988

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom; Lag vreme – vreme lag faze; V_{max} – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – Absorbance Units.

Posle isključivanja pacijentkinja kod kojih je primenjivan LMWH između ispitivanih grupa i dalje je postojala statistički značajna razlika za navedene parametre (Tabela 13.).

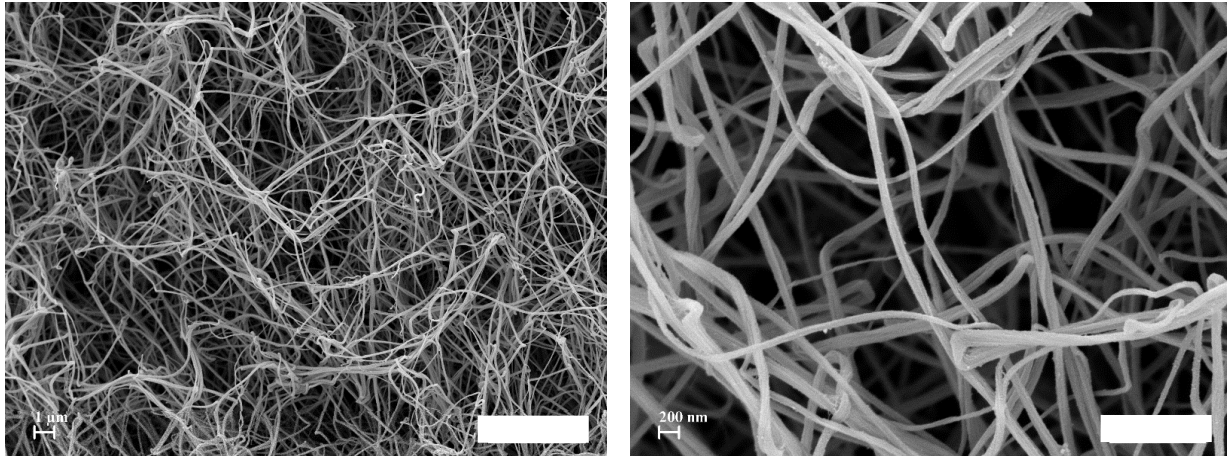
Tabela 13. Vrednosti parametara fibrinskog ugruška posle isključivanja ispitanica na profilaksi sa LMWH

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
Lag vreme (s)	265,2 ± 57,9	264,9 ± 60,4	363,9 ± 183,7	1,000	0,012
V_{max} (AU/min)	0,47 ± 0,15	0,56 ± 0,10	0,53 ± 0,21	< 0,001	0,906
Max Abs (AU)	1,36 ± 0,18	1,27 ± 0,21	1,29 ± 0,36	0,028	0,308

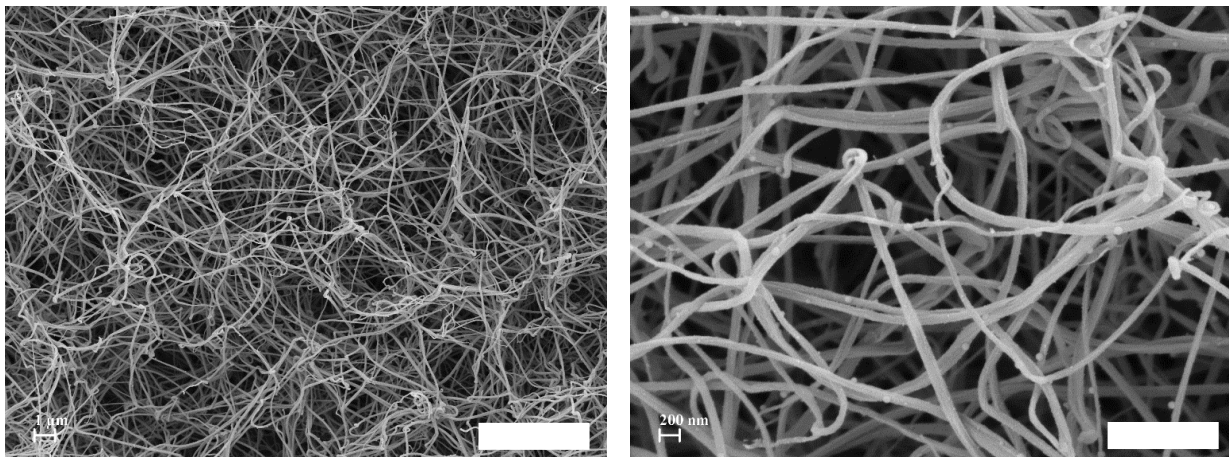
Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom; Lag vreme – vreme lag faze; V_{max} – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – Absorbance Units.

Struktura fibrinskih ugrušaka je ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na reprezentativnim uzorcima ispitivanih grupa (*Slika 12.*), pri čemu su izmerene srednje vrednosti gustine fibrinske mreže kod trudnica sa preeklampsijom ($0,32 \pm 0,03$ $\mu\text{m}/\text{vlaknu}$) ukazale na gušću fibrinsku strukturu u odnosu na srednje vrednosti gustine fibrinske mreže kod zdravih trudnica ($0,39 \pm 0,10$ $\mu\text{m}/\text{vlaknu}$) i u uzorku normalnog *pool*-a plazme ($0,44 \pm 0,07$ $\mu\text{m}/\text{vlaknu}$). Gušća struktura fibrinskog ugruška okarakterisana je prisustvom tanjih vlakana i manjim unutrašnjim porama, čime je manje podložna fibrinolizi. Na *Slici 12.* prikazani su snimci elektronske mikroskopije reprezentativnih fibrinskih ugrušaka iz uzorka normalnog *pool*-a plazme (A), zdrave trudnice (B) i trudnice sa preeklampsijom (C).

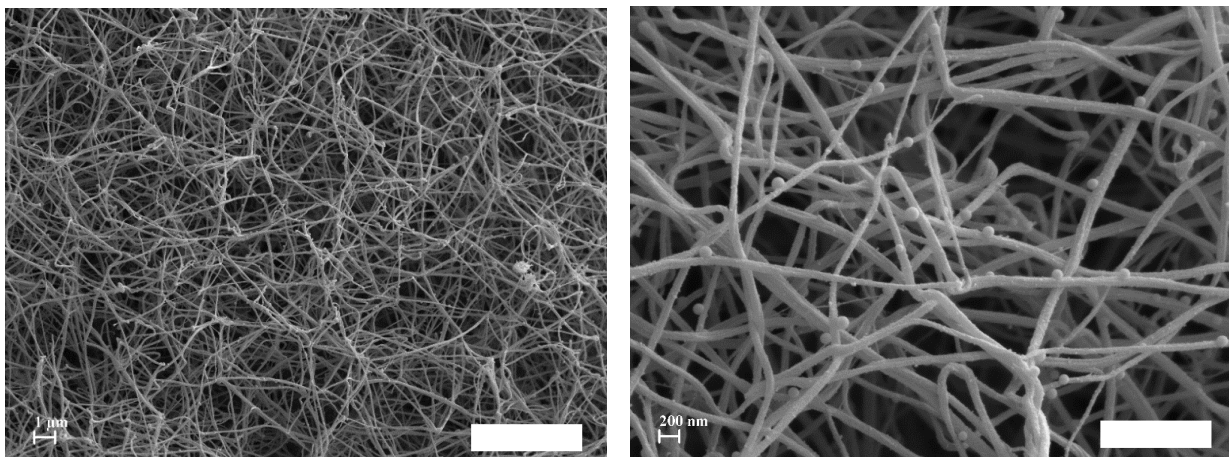
A



B



C



Slika 12. Uporedni prikaz reprezentativnih fibrinskih ugrušaka iz uzorka normalnog *pool*-a plazme (A), zdrave trudnice (B) i trudnice sa preeklampsijom (C) snimljenih elektronskom mikroskopijom pod uvećanjem od 1 μ m i 200 nm.

4.6. Ostali laboratorijski parametri

U plazmi ispitanica studijske i kontrolne grupe određivani su parametri hemostaze: antitrombin (AT), D-dimer, aktivnost FVIII, fibrinogen i trombin-antitrombin kompleks (TAT), dok su u serumu određivani hsCRP, parametri lipidnog statusa (ukupan kolesterol, LDL i HDL kolesterol, trigliceridi), lipoprotein (a) (Lp(a)), kao i IgA, IgG i IgM antifosfolipidna antitela (anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela). Rezultati ispitivanih parametara prikazani su u *Tabeli 14*.

Tabela 14. Rezultati laboratorijskih testova

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
AT (%)	100,2 ± 9,2	90,5 ± 13,7	103,4 ± 14,4	< 0,001	< 0,001
D-dimer (mg/L FEU)	1,4 (1,1 – 1,9)	1,5 (0,9 – 2,4)	2,3 (1,8 – 3,0)	0,163	0,005
FVIII (%)	182,9 ± 68,5	259,0 ± 108,2	335,9 ± 98,0	< 0,001	0,002
fibrinogen (g/L)	4,6 ± 1,2	5,0 ± 1,0	5,6 ± 1,3	0,088	0,018
TAT (μg/L)	6,4 (5,2 – 7,4)	7,2 (5,4 – 10,3)	5,6 (3,9 – 6,9)	0,063	0,022
hsCRP (mg/L)	3,0 (1,5 – 6,6)	5,1 (1,9 – 9,5)	38,4 (21,9 – 68,7)	0,030	< 0,001
ukupni kolesterol (mmol/L)	6,76 ± 1,30	7,05 ± 1,58	6,36 ± 1,16	0,301	0,001
LDL kolesterol (mmol/L)	3,74 ± 1,06	3,30 ± 1,02	3,54 ± 1,08	0,094	0,262
HDL kolesterol (mmol/L)	1,74 ± 0,35	1,54 ± 0,38	1,26 ± 0,34	0,003	< 0,001
trigliceridi (mmol/L)	2,74 ± 0,91	4,59 ± 1,73	3,40 ± 1,12	< 0,001	< 0,001
lipoprotein (a), (nmol/L)	21,6 (8,3 – 48,1)	39,7 (13,1 – 88,8)	45,5 (23,8 – 93,9)	0,065	< 0,001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (\bar{x} ±Sd) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

Aktivnost antitrombina (AT) u svim ispitivanim grupama je bila u opsegu normalnih vrednosti van trudnoće, ali je u grupi ispitanica sa preeklampsijom nađena 10 % niža aktivnost u odnosu na zdrave trudnice ($P < 0,001$). Nakon porođaja kod trudnica sa preeklampsijom aktivnost AT se vratila na nivo vrednosti izmerenih u kontrolnoj grupi ($P < 0,001$). Statistički značajna razlika u vrednostima D-dimera i fibrinogena zabeležena je samo između PEK trudnica pre i nakon porođaja ($P < 0,005$ i $P = 0,018$). Aktivnost FVIII i vrednosti CRP su bile značajno povišene u grupi trudnica sa preeklampsijom u poređenju sa kontrolnom grupom ($P < 0,001$ i $P = 0,030$), pri čemu je u PEK grupi nakon porođaja zabeleženo dodatno povećanje vrednosti ovih parametara [$335,9 \pm 98,0$ % i $38,4$ ($21,9 - 68,7$) mg/L, ($P < 0,001$)]. U pogledu parametara lipidnog statusa statistička analiza je pokazala značajno snižene vrednosti HDL holesterola ($P = 0,003$) i povišene vrednosti triglicerida ($P < 0,001$) u PEK grupi u odnosu na vrednosti nađene u kontrolnoj grupi, dok je kod trudnica sa preeklampsijom nakon porođaja zabeleženo značajno sniženje vrednosti ukupnog holesterola ($P = 0,001$), HDL holesterola ($P < 0,001$), kao i triglicerida ($P < 0,001$). Pomenute razlike između ispitanica sa preeklampsijom i zdravih trudnica zadržale su se i posle kontrolisanja uticaja gestacijske starosti pri uzokovanju krvi i ITM za sve ispitivane parametre izuzev za CRP ($P = 0,066$).

Nijedna trudnica sa preeklampsijom nije bila pozitivna na prisustvo antifosfolipidnih antitela (IgA, IgG i IgM), dok je u kontrolnoj grupi jedna trudnica imala nizak titar anti- β 2 glikoprotein I IgG antitela ($28,0$ U/mL) i jedna srednji titar antikardiolipinskih IgG antitela ($45,1$ U/mL), ali bez kliničkih manifestacija povezanih sa antifosfolipidnim sindromom (AFS). Zbog ograničenja u dostupnosti svežih plazmi za testiranje lupus antikoagulans (LA) nije određivan u ispitivanim grupama, međutim, nijedan od parametara ispitivanih u studiji nije se razlikovao kod ove dve trudnice u poređenju sa ostalim zdravim trudnicama.

Rezultati statističke analize posle isključivanja ispitanica kod kojih je primenjivan LMWH nisu se značajno razlikovali i prikazani su u *Tabeli 15*.

Tabela 15. Rezultati laboratorijskih testova posle isključivanja ispitanica na profilaksi sa LMWH

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
AT (%)	100,2 ± 9,2	91,6 ± 13,6	105,0 ± 13,7	< 0,001	< 0,001
D-dimer (mg/L FEU)	1,4 (1,1 – 1,9)	1,6 (1,1 – 2,4)	2,4 (2,0 – 3,0)	0,065	0,001
FVIII (%)	182,9 ± 68,5	260,3 ± 108,3	336,6 ± 99,2	< 0,001	0,006
fibrinogen (g/L)	4,6 ± 1,2	5,0 ± 1,0	5,6 ± 1,4	0,116	0,019
TAT (µg/L)	6,4 (5,2 – 7,4)	7,4 (5,4 – 10,4)	5,4 (3,7 – 7,0)	0,048	0,010
hsCRP (mg/L)	3,0 (1,5 – 6,6)	5,1 (2,0 – 9,6)	38,4 (24,0 – 69,4)	0,026	< 0,001
ukupni holesterol (mmol/L)	6,76 ± 1,30	7,03 ± 1,57	6,46 ± 1,15	0,328	0,001
LDL holesterol (mmol/L)	3,74 ± 1,06	3,37 ± 0,97	3,52 ± 0,90	0,177	0,796
HDL holesterol (mmol/L)	1,74 ± 0,35	1,53 ± 0,38	1,27 ± 0,35	0,005	< 0,001
trigliceridi (mmol/L)	2,74 ± 0,91	4,53 ± 1,59	3,44 ± 1,12	< 0,001	< 0,001
lipoprotein (a) (nmol/L)	21,6 (8,2 – 48,1)	41,5 (14,0 – 93,8)	50,2 (26,5 – 96,9)	0,037	< 0,001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

4.7. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom

U Tabelama 16. – 20. prikazani su rezultati analiziranih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije, prisustvo pridruženih bolesti i infertiliteta, prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije i ishode trudnoće.

4.7.1. Analiza rezultata ispitivanih parametara u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije

U Tabeli 16. predstavljeni su rezultati poređenja ispitivanih parametara u grupi trudnica sa preeklampsijom u odnosu na nedelju gestacije kada je preeklampsija dijagnostikovana.

Tabela 16. Uporedna analiza rezultata ispitivanih parametara u odnosu na gestacijsku nedelju razvoja preeklampsije

Parametar	Rana PEK (N=27)	Kasna PEK (N=19)	P
ETP AUC (%)	112,0 (107,0 – 122,5)	106,0 (98,0 – 115,0)	0,035*
tlag (s)	24,5 ± 4,4	25,3 ± 5,3	0,580
Cmax (%)	117,6 ± 16,3	112,5 ± 12,5	0,265
tmax (s)	66,6 ± 8,3	67,5 ± 10,7	0,768
OCP (Abs-sum)	223,7 ± 44,0	229,8 ± 57,1	0,692
OHP (Abs-sum)	187,8 ± 41,3	195,6 ± 49,7	0,569
OFP (%)	13,4 (6,1 – 23,3)	14,5 (7,8 – 20,0)	0,981
CLT (min)	34,8 ± 12,0	32,2 ± 4,8	0,394
CLT PTCI (min)	24,8 ± 6,4	23,5 ± 2,2	0,393
ΔCLT	11,9 ± 10,3	8,8 ± 3,6	0,209
Lag vreme (s)	287,0 ± 133,7	277,3 ± 61,3	0,779
Vmax (AU/min)	0,54 ± 0,12	0,56 ± 0,11	0,512
Max Abs (AU)	1,25 ± 0,23	1,30 ± 0,21	0,456
AT (%)	88,3 ± 13,5	93,4 ± 13,7	0,223
D-dimer (mg/L FEU)	1,4 (0,8 – 2,3)	2,0 (1,2 – 2,7)	0,135
FVIII (%)	250,9 ± 109,1	269,7 ± 109,0	0,575
fibrinogen (g/L)	4,8 ± 1,0	5,3 ± 1,0	0,091
TAT (μg/L)	7,1 (4,8 – 9,2)	9,5 (6,4 – 13,8)	0,051
hsCRP (mg/L)	6,6 (1,7 – 12,2)	4,8 (2,0 – 7,9)	0,705
uk. holesterol (mmol/L)	6,66 ± 1,66	7,55 ± 1,37	0,066
LDL hol. (mmol/L)	3,03 ± 0,97	3,83 ± 0,94	0,088
HDL hol. (mmol/L)	1,53 ± 0,35	1,54 ± 0,42	0,858
trigliceridi (mmol/L)	4,22 ± 1,62	5,07 ± 1,80	0,108
lipoprotein (a) (nmol/L)	31,4 (15,0 – 80,2)	41,5 (9,7 – 103,4)	0,864

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; tlag – vreme lag faze; Cmax – visina pika; tmax – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCl – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; Δ CLT – delta CLT (Δ CLT = CLT – CLT PTCl); Lag vreme – vreme lag faze; Vmax – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – *Absorbance Units*; AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

*statistički značajna razlika – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

U sprovedenom ispitivanju od ukupno 46 trudnica sa preeklampsijom kod 27 ispitanica je došlo do razvoja rano manifestnog (pre 34. nedelje gestacije), težeg oblika preeklampsije (rana PEK), dok se kod preostalih 19 preeklampsija javila tokom ili nakon 34. nedelje gestacije (kasna PEK). Poređenjem analiziranih parametara nisu uočene statistički značajne razlike između rane i kasne PEK, izuzev za ETP čije su vrednosti bile statistički značajno niže u grupi ispitanica sa kasnom preeklampsijom [112,0 (107,0 – 122,5) vs 106,0 (98,0 – 115,0), (P = 0,035)], ali su i dalje bile povišene u odnosu na vrednosti ETP nađene u kontrolnoj grupi. Međutim, iako u grupi trudnica sa kasnom preeklampsijom postoje smanjene vrednosti ETP, to nije praćeno značajnom promenom u odnosu na vrednosti nađene u celokupnoj PEK grupi i u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.7.2. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo pridruženih bolesti i infertiliteta

Iako je u grupi trudnica sa preeklampsijom zabeleženo značajno veće prisustvo pridruženih bolesti u odnosu na kontrolnu grupu (47,8 % vs 3,8 %, P < 0,001), poređenjem ispitivanih i analiziranih parametara nisu uočene statistički značajne razlike između PEK ispitanica sa i bez prisustva komorbiditeta.

U *Tabeli 17.* predstavljeni su rezultati poređenja ispitivanih i analiziranih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo pridruženih bolesti.

Tabela 17. Uporedna analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u prisustvu komorbiditeta

Parametar	PEK + komorbiditeti	PEK	P
ETP AUC (%)	110,0 (101,0 – 115,0)	110,0 (105,0 – 122,0)	0,265
tlag (s)	24,9 ± 6,0	24,8 ± 3,3	0,962
Cmax (%)	112,1 ± 14,3	118,3 ± 15,0	0,172
tmax (s)	66,4 ± 8,6	67,4 ± 10,1	0,724
OCP (Abs-sum)	230,3 ± 57,4	222,7 ± 42,1	0,618
OHP (Abs-sum)	188,8 ± 51,3	193,3 ± 38,9	0,745
OFP (%)	16,8 (8,3 – 22,7)	12,2 (6,6 – 18,6)	0,101
CLT (min)	32,4 ± 9,0	35,0 ± 9,5	0,336
CLT PTCl (min)	23,2 ± 3,5	25,2 ± 6,0	0,193
ΔCLT	9,2 ± 6,5	11,6 ± 9,15	0,350
Lag vreme (s)	281,7 ± 69,8	283,6 ± 132,8	0,954
Vmax (AU/min)	0,56 ± 0,09	0,53 ± 0,13	0,408
Max Abs (AU)	1,33 ± 0,22	1,22 ± 0,21	0,131
AT (%)	88,0 ± 11,7	92,8 ± 15,2	0,259
D-dimer (mg/L FEU)	1,6 (1,0 – 2,4)	1,4 (0,9 – 2,7)	0,981
FVIII (%)	271,0 ± 120,8	248,1 ± 96,7	0,488
fibrinogen (g/L)	5,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	0,847
TAT (μg/L)	7,2 (5,3 – 9,8)	8,2 (5,3 – 12,9)	0,496
hsCRP (mg/L)	5,0 (1,9 – 11,8)	5,9 (2,0 – 9,3)	0,742
uk. holesterol (mmol/L)	6,98 ± 1,74	7,12 ± 1,45	0,773
LDL hol. (mmol/L)	3,27 ± 1,31	3,34 ± 0,62	0,883
HDL hol. (mmol/L)	1,55 ± 0,35	1,52 ± 0,41	0,841
trigliceridi (mmol/L)	4,64 ± 1,96	4,56 ± 1,53	0,882
lipoprotein (a) (nmol/L)	44,4 (20,4 – 93,1)	30,6 (9,4 – 85,2)	0,496

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; tlag – vreme lag faze; Cmax – visina pika; tmax – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCl – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; ΔCLT – delta CLT ($\Delta CLT = CLT - CLT PTCl$); Lag vreme – vreme lag faze; Vmax – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – *Absorbance Units*; AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

*statistički značajna razlika – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.7.3. Analiza ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije

U Tabeli 18. predstavljeni su rezultati poređenja ispitivanih parametara unutar grupe trudnica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo maternalnih komplikacija u toku hospitalizacije.

Tabela 18. Uporedna analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u prisustvu maternalnih komplikacija

Parametar	PEK + maternalne komplikacije	PEK	P
ETP AUC (%)	110,5 (105,8 – 118,2)	108,5 (99,0 – 119,0)	0,623
tlag (s)	25,0 ± 4,1	24,7 ± 5,1	0,852
Cmax (%)	115,9 ± 15,7	115,1 ± 14,7	0,882
tmax (s)	65,7 ± 9,4	67,6 ± 9,4	0,539
OCP (Abs-sum)	220,2 ± 48,8	229,2 ± 50,5	0,580
OHP (Abs-sum)	181,2 ± 41,8	195,8 ± 46,0	0,319
OFP (%)	14,7 (6,5 – 25,1)	13,8 (7,1 – 20,4)	0,571
CLT (min)	34,1 ± 10,7	33,3 ± 8,6	0,796
CLT PTCI (min)	22,6 ± 3,0	25,0 ± 5,7	0,146
ΔCLT	12,0 ± 10,0	9,7 ± 6,8	0,389
Lag vreme (s)	323,0 ± 165,5	266,1 ± 68,9	0,122
Vmax (AU/min)	0,54 ± 0,14	0,55 ± 0,10	0,900
Max Abs (AU)	1,28 ± 0,20	1,27 ± 0,23	0,977
AT (%)	84,0 ± 12,7	93,5 ± 13,2	0,030*
D-dimer (mg/L FEU)	2,2 (1,2 – 3,1)	1,4 (0,9 – 2,3)	0,115
FVIII (%)	254,9 ± 126,9	261,0 ± 100,6	0,865
fibrinogen (g/L)	4,7 ± 0,9	5,1 ± 1,0	0,195
TAT (μg/L)	6,4 (5,1 – 13,2)	7,9 (5,8 – 10,7)	0,641
hsCRP (mg/L)	8,7 (2,6 – 13,1)	4,5 (1,8 – 8,2)	0,162
uk. holesterol (mmol/L)	6,92 ± 2,03	7,12 ± 1,35	0,709
LDL hol. (mmol/L)	2,81 ± 1,25	3,54 ± 0,82	0,122
HDL hol. (mmol/L)	1,49 ± 0,41	1,56 ± 0,37	0,621
trigliceridi (mmol/L)	4,66 ± 1,84	4,56 ± 1,71	0,873
lipoprotein (a) (nmol/L)	46,0 (25,1 – 76,1)	31,1 (9,8 – 95,6)	0,641

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; tlag – vreme lag faze; Cmax – visina pika; tmax – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni

fibrinolitički potencijal; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCl – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; Δ CLT – delta CLT (Δ CLT = CLT – CLT PTCl); Lag vreme – vreme lag faze; Vmax – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – Absorbance Units; AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

*statistički značajna razlika – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

U grupi ispitanica sa preeklampsijom maternalne komplikacije u toku hospitalizacije zabeležene su kod 1/3 ispitanica. Poređenjem ispitivanih parametara utvrđeno je da su vrednosti antitrombina u grupi preeklamptičnih trudnica, čija je trudnoća praćena pojavom komplikacija, statistički značajno niže u odnosu na grupu bez komplikacija u toku hospitalizacije ($84,0 \pm 12,7$ vs $93,5 \pm 13,2$; P = 0,030). Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima ostalih parametara između ove dve grupe ispitanica.

Daljom analizom maternalnih komplikacija u grupi ispitanica sa značajnom proteinurijom i edemima koji su povezani sa nefrotskim sindromom (srednja vrednost 8,39 g/24 h) uočene su značajno više vrednosti za ETP [118,0 (112,5 – 131,0) vs 109,0 (100,0 – 119,0), (P = 0,054)], lag vreme [30,7 (25,4 – 31,2) vs 23,6 (21,9 – 25,1), (P = 0,014)], visinu pika [132,0 (121,0 – 139,0) vs 108,0 (103,0 – 124,0), (P = 0,012)], D-dimer [2,4 (2,3 – 5,5) vs 1,4 (0,9 – 2,3), (P = 0,015)], Δ CLT [13,5 (7,8 – 29,8) vs 7,3 (6,0 – 10,6), (P = 0,050)], ukupni holesterol [9,00 (7,64 – 10,16) vs 6,58 (5,76 – 7,95), (P = 0,015)] i trigliceride [5,71 (5,12 – 8,17) vs 3,85 (3,09 – 5,00), (P = 0,009)] u odnosu na pacijentkinje bez renalnih komplikacija u toku hospitalizacije (*Tabela 19.*).

Sve ispitanice sa poremećenom funkcijom bubrega u našem istraživanju, pored značajne proteinurije ($8,39 \pm 2,75$ vs $4,60 \pm 4,24$ g/24h; P = 0,018) i izraženog edema, imale su i povišene vrednosti kreatinina ($80,4 \pm 9,6$ vs $66,7 \pm 16,3$ mmol/L; P = 0,018), mokraćne kiseline (531 ± 101 vs 388 ± 86 μ mol/L; P = 0,013) i ukupnog holesterola ($8,9 \pm 1,6$ vs $6,8 \pm 1,4$ mmol/L; P = 0,011). Kod jedne trudnice sa renalnim komplikacijama je zabeležena anasarka, prisustvo generalizovanog edema, a nijedna nije prethodno imala bolesti bubrega.

Tabela 19. Usporedna analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u prisustvu renalnih komplikacija

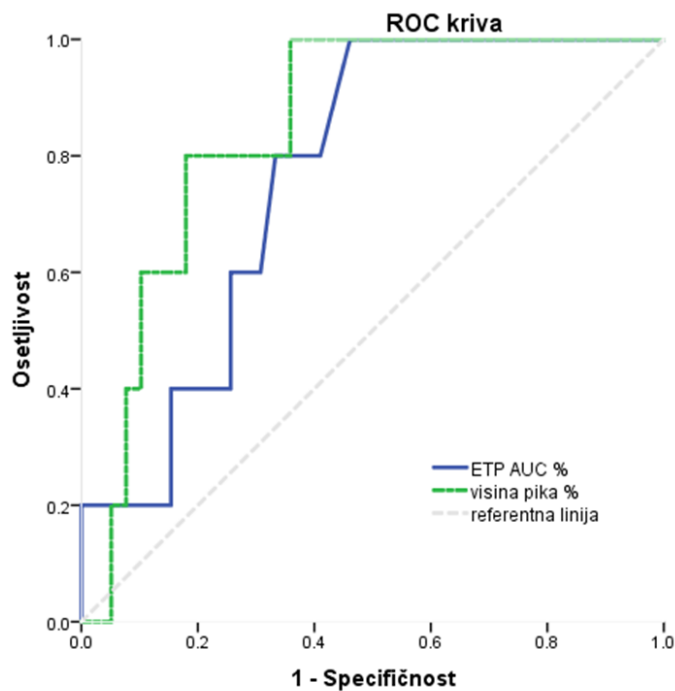
Parametar	PEK + renalne komplikacije	PEK	P
ETP AUC (%)	118,0 (112,5 – 131,0)	109,0 (100,0 – 119,0)	0,054
t _{lag} (s)	30,7 (25,4 – 31,2)	23,6 (21,9 – 25,1)	0,014*
C _{max} (%)	132,0 (121,0 – 139,0)	108,0 (103,0 – 124,0)	0,012*
t _{max} (s)	72,2 (54,4 – 73,7)	64,3 (59,3 – 75,2)	0,853
OCP (Abs-sum)	217,4 (149,2 – 249,4)	234,3 (196,1 – 263,3)	0,327
OHP (Abs-sum)	181,0 (140,6 – 217,4)	192,6 (165,1 – 219,3)	0,592
OFP (%)	12,2 (5,8 – 15,1)	16,0 (7,3 – 22,7)	0,259
CLT (min)	34,8 (29,8 – 52,8)	31,0 (27,9 – 34,8)	0,164
CLT PTCI (min)	22,1 (21,3 – 23,3)	23,6 (21,3 – 26,3)	0,283
ΔCLT	13,5 (7,8 – 29,8)	7,3 (6,0 – 10,6)	0,050*
Lag vreme (s)	312,0 (258,0 – 699,0)	264,0 (216,0 – 294,0)	0,152
V _{max} (AU/min)	0,59 (0,30 – 0,64)	0,56 (0,49 – 0,63)	0,965
Max Abs (AU)	1,25 (1,16 – 1,40)	1,25 (1,09 – 1,44)	0,930
AT (%)	82,8 (76,6 – 99,1)	89,3 (84,2 – 100,6)	0,494
D-dimer (mg/L FEU)	2,4 (2,3 – 5,5)	1,4 (0,9 – 2,3)	0,015*
FVIII (%)	254,1 (185,7 – 391,9)	242,9 (179,2 – 320,5)	0,592
fibrinogen (g/L)	5,2 (4,2 – 5,6)	5,2 (4,2 – 6,0)	0,912
TAT (μg/L)	7,1 (5,3 – 19,7)	7,3 (5,3 – 10,0)	0,912
hsCRP (mg/L)	9,4 (1,1 – 12,8)	5,0 (1,9 – 9,3)	0,671
uk. holesterol (mmol/L)	9,00 (7,64 – 10,16)	6,58 (5,76 – 7,95)	0,015*
LDL hol. (mmol/L)	-	3,16 (2,86 – 4,01)	-
HDL hol. (mmol/L)	1,28 (1,20 – 1,95)	1,45 (1,31 – 1,88)	0,570
trigliceridi (mmol/L)	5,71 (5,12 – 8,17)	3,85 (3,09 – 5,00)	0,006**
lipoprotein (a) (nmol/L)	59,9 (31,3 – 73,6)	31,4 (9,9 – 94,7)	0,570

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; t_{lag} – vreme lag faze; C_{max} – visina pika; t_{max} – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCI – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; ΔCLT – delta CLT (ΔCLT = CLT – CLT PTCI); Lag vreme – vreme lag faze; V_{max} – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – Absorbance Units; AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-

reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.
 *statistički značajna razlika – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analizom utvrđeno je da je visina pika sa površinom ispod ROC krive (*Area Under the ROC Curve*, ROC AUC) od 0,846 (95 % CI 0,714 – 0,979) bolji prognostički marker renalnih komplikacija u odnosu na ETP sa ROC AUC od 0,767 (95 % CI 0,601 – 0,933) (Slika 13.).



Površina ispod ROC krivih (Area Under the ROC Curve, AUC)		
Varijabla	P	Površina (95% CI)
ETP AUC (%)	0,054	0,767 (0,601 – 0,933)
Visina pika (%)	0,013	0,846 (0,714 – 0,979)

CI (*Confidence Interval*) – interval pouzdanosti

Slika 13. ROC kriva za generaciju trombina kod ispitanica sa renalnim komplikacijama.

4.7.4. Analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u odnosu na ishod trudnoće i prisustvo fetalnih komplikacija

U Tabeli 20. predstavljeni su rezultati poređenja analiziranih parametara u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na prisustvo fetalnih komplikacija.

Tabela 20. Uporedna analiza rezultata ispitivanih parametara u preeklampsiji u prisustvu fetalnih komplikacija

Parametar	PEK sa fetalnim komplikacijama	PEK	P
ETP AUC (%)	110,0 (104,0 – 119,7)	110,5 (97,0 – 117,5)	0,492
tlag (s)	25,0 ± 5,2	24,3 ± 2,8	0,723
Cmax (%)	116,9 ± 15,1	110,3 ± 13,4	0,224
tmax (s)	66,3 ± 9,2	69,1 ± 9,9	0,409
OCP (Abs-sum)	223,5 ± 53,3	235,8 ± 34,3	0,496
OHP (Abs-sum)	190,0 ± 47,4	195,0 ± 35,9	0,759
OFP (%)	12,6 (6,5 – 18,8)	20,8 (9,1 – 22,7)	0,251
CLT (min)	34,7 ± 10,2	30,1 ± 4,1	0,176
CLT PTCl (min)	24,7 ± 5,5	22,5 ± 2,1	0,220
ΔCLT	11,4 ± 8,8	7,6 ± 3,3	0,197
Lag vreme (s)	279,1 ± 115,6	294,0 ± 78,2	0,707
Vmax (AU/min)	0,55 ± 0,11	0,54 ± 0,13	0,730
Max Abs (AU)	1,27 ± 0,23	1,28 ± 0,19	0,851
AT (%)	89,8 ± 13,1	92,9 ± 15,9	0,531
D-dimer (mg/L FEU)	1,4 (0,9 – 2,2)	2,4 (1,9 – 3,3)	0,014*
FVIII (%)	255,1 ± 106,3	272,3 ± 119,2	0,665
fibrinogen (g/L)	5,0 ± 1,0	4,9 ± 1,2	0,771
TAT (μg/L)	7,2 (5,0 – 10,1)	8,2 (6,8 – 24,2)	0,218
hsCRP (mg/L)	6,3 (1,8 – 10,0)	3,9 (2,0 – 5,6)	0,334
uk. holesterol (mmol/L)	6,95 ± 1,57	7,39 ± 1,67	0,447
LDL hol. (mmol/L)	3,16 ± 0,98	3,64 ± 1,11	0,341
HDL hol. (mmol/L)	1,50 ± 0,36	1,64 ± 0,43	0,323
trigliceridi (mmol/L)	4,61 ± 1,70	4,55 ± 1,93	0,934
lipoprotein (a) (nmol/L)	39,7 (14,1 – 91,3)	38,5 (7,5 – 74,8)	0,386

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

ETP – endogeni trombinski potencijal; AUC – površina ispod krive; tlag – vreme lag faze; Cmax – visina pika; tmax – vreme dostizanja pika; OCP – ukupni koagulacioni potencijal; OHP – ukupni hemostatski potencijal; OFP – ukupni fibrinolitički potencijal; CLT – vreme liziranja ugruška; CLT PTCl – vreme liziranja ugruška u eksperimentu sa dodatkom inhibitora karboksipeptidaze; ΔCLT – delta CLT ($\Delta CLT = CLT - CLT PTCl$); Lag vreme – vreme lag faze; Vmax – brzina polimerizacije; Max Abs – maksimalna apsorbancija; AU – *Absorbance Units*; AT – antitrombin; FVIII – aktivnost faktora VIII; TAT – trombin-antitrombin kompleks; hsCRP (*high sensitive CRP*) – visoko osetljivi C-reaktivni protein; LDL (*low density lipoproteins*) – lipoproteini male gustine; HDL (*high density lipoproteins*) – lipoproteini velike gustine.

*statistički značajna razlika – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Zastupljenost fetalnih komplikacija u studijskoj grupi je iznosila 78 %, pri čemu je kod najvećeg broja ispitanica sa preeklampsijom, čak 67 %, IUGR zabeležen kao samostalna komplikacija ili udružena sa oligohidramnionom ili fetalnom asfiksijom. Statističkom analizom je utvrđeno da je prisustvo fetalnih komplikacija u PEK grupi praćeno značajno sniženim vrednostima D-dimera ($P = 0,014$) u poređenju sa ostalim ispitanicama sa preeklampsijom kod kojih nije došlo do pojave fetalnih komplikacija. Kada smo analizirali pojedinačne fetalne komplikacije niže vrednosti D-dimera ostale su značajne u grupi sa IUGR [1,3 (0,9 – 2,2) vs 2,4 (1,7 – 2,9), ($P = 0,006$)], dok su značajno snižene OFP vrednosti uočene u grupi sa oligohidramnionom [6,8 (5,5 – 9,6) vs 16,4 (7,8 – 22,7), ($P = 0,033$)].

4.8. Korelaciona analiza

U *Tabelama 21. – 24.* prikazana je korelaciona analiza između ispitivanih globalnih testova hemostaze, kao i korelacije sa ostalim ispitivanim parametrima i sa ishodom trudnoće u grupi ispitanica sa preeklampsijom.

4.8.1. Korelaciona analiza između ispitivanih globalnih testova hemostaze

Korelacionom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne povezanosti između parametara generacije trombina, ETP i visine pika, i vremena liziranja ugruška ($r = 0,480$; $P = 0,002$ za ETP i $r = 0,350$; $P = 0,027$ za Cmax), kao i Δ CLT ($r = 0,512$; $P = 0,001$ za ETP i $r = 0,356$; $P = 0,024$ za Cmax). Visina pika je takođe bila u značajnoj inverznoj korelaciji sa OFP vrednostima ($r = -0,362$; $P = 0,016$), dok je inverzna korelacija postojala i između tlag i OCP i OHP vrednosti ($r = -0,307$; $P = 0,042$ za OCP i $r = -0,334$; $P = 0,027$ za OHP). Vrednosti Lag vremena su bile u značajnoj korelaciji sa sva tri parametra generacije trombina, ETP, tlag i visinom pika ($r = 0,364$; $P = 0,019$ za ETP, $r = 0,380$; $P = 0,014$ za tlag i $r = 0,425$; $P = 0,006$ za Cmax). Kao što je bilo i očekivano, statistički značajne vrednosti korelacije su nađene između parametara ukupnog hemostatskog potencijala i vremena liziranja ugruška, kao i parametara fibrinskog ugruška.

U nastavku su predstavljeni rezultati korelacione analize između ispitivanih globalnih testova hemostaze (*Tabela 21.*).

Tabela 21. Korelacija između ispitivanih globalnih testova hemostaze

	ETP r (P*)	tlag r (P*)	Cmax r (P*)	tmax r (P*)	OCP r (P*)	OHP r (P*)	OFF r (P*)	CLT r (P*)	CLT PTCI r (P*)	ΔCLT r (P*)	Lag vreme r (P*)	Vmax r (P*)
tlag	-.151 (.329)											
Cmax	.585*** (< .001)	.462** (.002)										
tmax	.012 (.939)	-.162 (.292)	-.257 (.092)									
OCP	-.024 (.879)	-.307* (.042)	-.149 (.334)	.141 (.360)								
OHP	.110 (.476)	-.334* (.027)	-.006 (.971)	.231 (.132)	.893*** (< .001)							
OFF	-.285 (.061)	-.007 (.965)	-.362* (.016)	-.213 (.165)	.188 (.221)	-.267 (.080)						
CLT	.480** (.002)	-.072 (.658)	.350* (.027)	.115 (.478)	-.249 (.121)	.048 (.768)	-.688*** (< .001)					
CLT	.163 (.291)	-.156 (.313)	.150 (.330)	.145 (.346)	.054 (.725)	.338* (.025)	-.618*** (< .001)	.598*** (< .001)				
PTCI												
ΔCLT	.512** (.001)	-.011 (.947)	.356* (.024)	.106 (.516)	-.336* (.034)	-.099 (.542)	-.545*** (< .001)	.960*** (< .001)	.350* (.027)			
Lag	.364* (.019)	.380* (.014)	.425** (.006)	.073 (.650)	-.139 (.385)	-.009 (.957)	-.228 (.151)	.101 (.546)	-.018 (.911)	.132 (.430)		
vreme												
Vmax	-.251 (.114)	-.073 (.649)	-.146 (.363)	-.046 (.778)	.605*** (< .001)	.448** (.003)	.137 (.395)	-.113 (.498)	-.046 (.773)	-.184 (.269)	-.565*** (< .001)	
Max	-.065 (.688)	.189 (.236)	.108 (.500)	.075 (.642)	.927*** (< .001)	.805*** (< .001)	-.008 (.959)	-.080 (.633)	.065 (.686)	-.178 (.284)	.199 (.212)	.366* (.019)
Abs												

r – Pearson-ov koeficijent korelacije; *statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.8.2. Korelaciona analiza između globalnih testova hemostaze i ostalih ispitivanih parametara

U Tabeli 22. prikazana je korelaciona analiza između globalnih testova hemostaze i ostalih ispitivanih parametara. Značajne vrednosti Pearson-ovih koeficijenata korelacije su nađene između parametara generacije trombina i parametara lipidnog statusa, i to između vrednosti tlag i koncentracije triglicerida ($r = 0,365$; $P = 0,016$), visine pika i koncentracije ukupnog holesterola ($r = 0,325$; $P = 0,033$) i vrednosti tmax i koncentracije HDL holesterola ($r = 0,304$; $P = 0,048$). Dobijeni koeficijenti korelacije između vrednosti parametara ukupnog hemostatskog potencijala, OCP i OHP, i fibrinogena bili su, kako je i očekivano, jako visoki ($r = 0,446$; $P = 0,002$ za OCP i $r = 0,550$; $P < 0,001$ za OHP). Između OCP i OHP vrednosti i koncentracije triglicerida je uočeno postojanje značajne inverzne korelacije jakog intenziteta

($r = -0,615$; $P < 0,001$ za OCP i $r = -0,521$; $P < 0,001$ za OHP), dok su OHP vrednosti bile u korelaciji i sa koncentracijom LDL holesterola ($r = 0,469$; $P = 0,032$). Pored toga, statistički značajne inverzne korelacije su nađene između vrednosti ukupnog fibrinolitičkog potencijala (OFP) i koncentracije antitrombina ($r = -0,407$; $P = 0,006$), aktivnosti FVIII ($r = -0,305$; $P = 0,044$), koncentracije ukupnog holesterola ($r = -0,431$; $P = 0,004$) i LDL holesterola ($r = -0,519$; $P = 0,016$). Značajne korelacije su postojale i između vremena lize ugruška i koncentracije antitrombina ($r = 0,320$; $P = 0,044$) i koncentracije ukupnog holesterola ($r = 0,390$; $P = 0,013$), kao i između Δ CLT i koncentracije ukupnog holesterola ($r = 0,375$; $P = 0,017$). Od parametara fibrinskog ugruška, Max Abs je bila u značajnoj korelaciji sa koncentracijom fibrinogena ($r = 0,555$; $P < 0,001$) i koncentracijom triglicerida ($r = -0,363$; $P = 0,021$), dok je značajna korelacija nađena između brzine polimerizacije i aktivnosti FVIII ($r = 0,368$; $P = 0,018$).

Tabela 22. Korelacija između globalnih testova hemostaze i ostalih ispitivanih parametara.

	ETP AUC r (P*)	tIag r (P*)	Cmax r (P*)	tmax r (P*)	OCP r (P*)	OHP r (P*)	OFP r (P*)	CLT r (P*)	CLT PTCI r (P*)	ΔCLT r (P*)	Lag vreme r (P*)	Vmax r (P*)	Max Abs r (P*)
AT	-.036 (.819)	-.058 (.708)	.150 (.331)	.206 (.180)	.031 (.841)	.201 (.192)	-.407** (.006)	.320* (.044)	.176 (.253)	.216 (.181)	-.170 (.287)	.185 (.248)	.138 (.388)
D-dimer	.005 (.977)	-.090 (.561)	-.059 (.702)	-.164 (.287)	-.071 (.648)	-.097 (.530)	.075 (.628)	-.041 (.801)	-.279 (.067)	.034 (.835)	.051 (.751)	-.041 (.800)	-.179 (.262)
FVIII	-.027 (.864)	-.008 (.959)	.087 (.576)	-.007 (.963)	-.165 (.285)	-.015 (.924)	-.305* (.044)	.154 (.343)	.288 (.058)	.086 (.599)	-.245 (.122)	.368* (.018)	-.037 (.816)
Fbg	-.058 (.707)	.031 (.843)	.057 (.716)	-.069 (.658)	.446** (.002)	.550*** (<.001)	-.261 (.087)	.043 (.791)	.159 (.301)	-.135 (.406)	.226 (.155)	.135 (.399)	.555*** (<.001)
TAT	-.091 (.558)	-.141 (.360)	-.058 (.707)	.193 (.209)	-.154 (.319)	-.109 (.482)	-.094 (.543)	.002 (.992)	-.188 (.222)	.049 (.766)	.143 (.373)	-.281 (.076)	-.253 (.111)
hsCRP	.061 (.696)	-.211 (.169)	-.217 (.157)	.087 (.574)	.146 (.345)	.018 (.907)	.270 (.076)	-.271 (.090)	-.026 (.868)	-.266 (.097)	.155 (.333)	-.088 (.585)	.015 (.926)
ukupni holesterol	.257 (.096)	.086 (.584)	.325* (.033)	.038 (.810)	-.274 (.075)	-.092 (.557)	-.431** (.004)	.390* (.013)	-.007 (.964)	.375* (.017)	.311 (.051)	-.228 (.156)	-.185 (.254)
LDL holesterol	.114 (.621)	-.082 (.724)	.133 (.565)	.385 (.085)	.343 (.128)	.469* (.032)	-.519* (.016)	.143 (.560)	.146 (.527)	-.052 (.833)	.206 (.371)	.135 (.559)	.306 (.177)
HDL holesterol	.058 (.712)	-.247 (.111)	-.186 (.233)	.304* (.048)	.039 (.804)	.107 (.494)	-.124 (.428)	.266 (.098)	.050 (.752)	.298 (.062)	-.077 (.637)	.006 (.969)	.082 (.617)
Lp(a)	.017 (.912)	-.200 (.197)	-.094 (.549)	.055 (.727)	.076 (.629)	.063 (.689)	.034 (.827)	.042 (.795)	-.039 (.803)	.001 (.993)	.039 (.813)	.075 (.644)	-.035 (.830)
TG	.056 (.722)	.365* (.016)	.265 (.086)	-.158 (.313)	-.615*** (<.001)	-.521*** (<.001)	-.226 (.144)	.194 (.231)	-.122 (.436)	.219 (.174)	.187 (.248)	-.297 (.063)	-.363* (.021)

r – Pearson-ov koeficijent korelacije; *statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

4.8.3. Korelaciona analiza između ispitivanih parametara i proteinurije u grupi ispitanica sa preeklampsijom

S obzirom da je proteinurija, pored povišenog krvnog pritiska, jedno od glavnih, kliničkih obeležja preeklampsije urađena je korelaciona analiza između ispitivanih parametara i vrednosti proteinurije (Tabela 23.). Zbog činjenice da su sve ispitanice sa preeklampsijom bile na antihipertenzivnoj terapiji u toku hospitalizacije nije urađena korelaciona analiza između ispitivanih parametara i vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska.

Tabela 23. Korelaciona analiza između ispitivanih parametara i vrednosti proteinurije.

	Proteinurija	
	Rho	P
ETP AUC (%)	0,214	0,180
tlag (s)	0,196	0,221
Visina pika (%)	0,394	0,011*
tmax (s)	-0,240	0,130
OCP (Abs-sum)	-0,049	0,759
OHP (Abs-sum)	0,003	0,984
OFP (%)	-0,144	0,368
CLT (min)	0,131	0,439
CLT PTCI (min)	0,125	0,435
ΔCLT	0,107	0,528
Lag vreme (s)	0,119	0,478
Vmax (AU/min)	-0,143	0,392
Max Abs (AU)	0,032	0,848
AT (%)	-0,171	0,286
D-dimer (mg/L FEU)	0,119	0,458
FVIII (%)	0,376	0,016*
fibrinogen (g/L)	0,049	0,759
TAT (μg/L)	-0,178	0,266
hsCRP (mg/L)	-0,082	0,611
ukupni holesterol (mmol/L)	0,345	0,029*
LDL holesterol (mmol/L)	0,670	0,002**
HDL holesterol (mmol/L)	-0,121	0,459
trigliceridi (mmol/L)	0,193	0,233
lipoprotein (a) (nmol/L)	0,604	< 0,001***

Rho – Spearman-ov koeficijent korelacije;

*statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Statistički značajne vrednosti korelacije su nađene između vrednosti proteinurije i visine pika (Rho = 0,394; P = 0,011), aktivnosti FVIII (Rho = 0,376; P = 0,016), koncentracije ukupnog holesterola (Rho = 0,345; P = 0,029), LDL holesterola (Rho = 0,670; P = 0,002) i Lp(a) (Rho = 0,604; P = <0,001).

4.8.4. Korelaciona analiza između ispitivanih parametara hemostaze i ishoda trudnoće u grupi ispitanica sa preeklampsijom

Rezultati povezanosti ispitivanih parametara hemostaze i ishoda trudnoće u grupi ispitanica sa PEK dobijeni na osnovu korelacione analize prikazani su u *Tabeli 24*.

Tabela 24. Rezultati korelacione analize između ispitivanih parametara hemostaze i ishoda trudnoće.

	APGAR skor 1 min		APGAR skor 5 min	
	r	P	r	P
ETP AUC (%)	-0,268	0,078	-0,309	0,041*
t _{lag} (s)	0,134	0,387	0,178	0,247
C _{max} (%)	-0,080	0,606	-0,090	0,562
t _{max} (s)	-0,216	0,160	0,171	0,267
OCP (Abs-sum)	-0,064	0,682	0,014	0,927
OHP (Abs-sum)	0,024	0,879	0,058	0,708
OFP (%)	-0,233	0,128	-0,142	0,357
CLT (min)	-0,004	0,981	-0,073	0,656
CLT PTCI (min)	0,043	0,780	-0,029	0,850
ΔCLT	-0,056	0,733	-0,135	0,405
Lag vreme (s)	-0,066	0,680	-0,057	0,725
V _{max} (AU/min)	0,094	0,563	0,080	0,625
Max Abs (AU)	0,072	0,656	0,135	0,400
AT (%)	0,350	0,020*	0,310	0,040*
D-dimer (mg/L FEU)	0,080	0,606	0,072	0,644
FVIII (%)	0,277	0,069	0,185	0,230
fibrinogen (g/L)	-0,012	0,939	0,071	0,647
TAT (μg/L)	0,214	0,163	0,147	0,342
hsCRP (mg/L)	-0,356	0,018*	-0,324	0,032*
uk. holesterol (mmol/L)	0,360	0,018*	0,291	0,058
LDL hol. (mmol/L)	0,577	0,006**	0,558	0,009**
HDL hol. (mmol/L)	0,117	0,455	0,097	0,536
trigliceridi (mmol/L)	0,295	0,055	0,203	0,191
lipoprotein (a) (nmol/L)	0,165	0,290	0,206	0,186

r – Pearson-ov koeficijent korelacije; *statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Korelacionom analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne povezanosti koncentracije antitrombina ($r = 0,350$; $P = 0,020$), CRP ($r = -0,356$; $P = 0,018$), ukupnog holesterola ($r = 0,360$; $P = 0,018$) i LDL holesterola ($r = 0,577$; $P = 0,006$) sa vrednostima APGAR skora u 1 minutu. Značajna korelacija je nađena i između koncentracije antitrombina ($r = 0,310$; $P = 0,040$), CRP ($r = -0,324$; $P = 0,032$) i LDL holesterola ($r = 0,558$; $P = 0,009$) sa vrednostima APGAR skora u 5 minutu.

4.9. Ekstracelularne vezikule

Koncentracija ekstracelularnih vezikula (EV) i njihova povezanost sa ispitivanim parametrima analizirana je u podgrupi od 36 zdravih trudnica i 30 ispitanica sa preeklampsijom pre i nakon porođaja. U *Tabeli 25.* su prikazane opšte karakteristike ispitivanih podgrupa.

Tabela 25. Opšte karakteristike ispitanica sa preeklampsijom u analizi

	PEK (N=30)	KG (N=36)	P
Starost, godine	31,1 ± 6,2	30,6 ± 4,8	0,753
Gestacijska starost, nedelje gestacije	33,4 ± 3,7	33,5 ± 3,1	0,900
ITM, kg/m ²	30,9 ± 6,2	25,6 ± 2,6	< 0,001
Pušački status, n (%)			
<i>nepušači</i>	26 (87)	30 (83)	
<i>pušači</i>	4 (13)	6 (17)	0,745 [†]
Paritet, n (%)			
<i>prvorotka</i>	14 (47)	18 (50)	
<i>višerotka</i>	16 (53)	18 (50)	0,810 [†]
Komplikacije u prethodnoj trudnoći, n (%)	12 (75)	5 (27)	0,005 [†]
Porodična istorija komplikacija u trudnoći, n (%)			
<i>da</i>	8 (27)	2 (6)	
<i>ne</i>	22 (73)	34 (94)	0,041 [†]
Porodična istorija KVB, n (%)			
<i>da</i>	13 (43)	11 (31)	
<i>ne</i>	17 (57)	26 (69)	0,112 [†]

Prosečna starost, gestacijska starost i indeks telesne mase (ITM) su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$); n: broj; %: procenat; [†] Chi-kvadrat test za proporcije (procenat).

Prosečna starost, paritet i gestacijska starost u momentu uključivanja u studiju nisu se razlikovali između ispitivanih podgrupa. Takođe nije postojala statistički značajna razlika u pogledu pušačkog statusa i porodične istorije KVB, ali su rezultati Chi-kvadrat testa pokazali značajno veći procenat zastupljenosti komplikacija u prethodnoj trudnoći i pozitivne porodične istorije komplikacija u trudnoći u podgrupi pacijentkinja sa preeklampsijom. U odnosu na kontrolnu podgrupu trudnice sa preeklampsijom su u proseku imale i veći indeks telesne mase ($P < 0,001$).

Tabela 26. Koncentracije subpopulacija ekstracelularnih vezikula

EV	KG (N=36)	PEK (N=30)		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
PS+ EV/ μ L	957 (586,5 – 2022,5)	905 (700 – 2100)	2445,5 (1727 – 4235)	0,757	< 0,001 ^b
PS+ CD42a+ EV/ μ L	353 (151,5 – 455)	466 (327 – 560)	720,5 (585 – 1266)	0,012 ^a	< 0,001 ^b
PS+ CD62E+ EV/ μ L	108 (66 – 118)	91 (70 – 104)	136,5 (103 – 156)	0,119	< 0,001 ^b
PS+ CD142+ EV/ μ L	34 (15,5 – 69,5)	29 (15 – 59)	87 (20 – 189)	0,520	0,022 ^b
PS+ CD106 + EV/ μ L	39,5 (27 – 47)	58 (40 – 80)	102 (75 – 153) ^{†††}	< 0,001 ^a	< 0,001 ^b
PIGF+ EV/ μ L	295,5 (176,5 – 408,5)	198,5 (118 – 327)	263 (150 – 399)	0,065 ^a	0,173

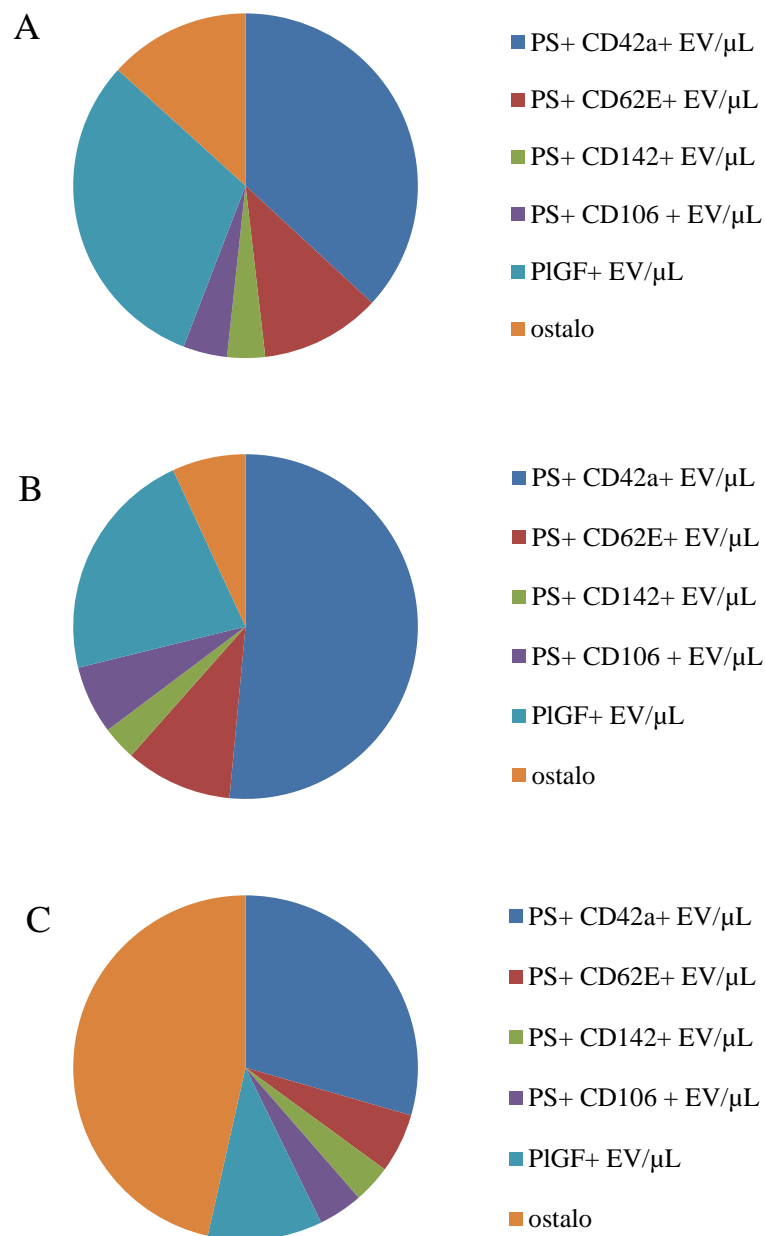
Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U post hoc testom;

PS – fosfatidilserin; EV – ekstracelularne vezikule; EV markeri: CD42a = glikoprotein IX (marker trombocita); CD62E = E-selektin (endotelni marker); CD142 = tkivni faktor (TF); CD106 = vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (VCAM-1); PIGF = placentalni faktor rasta.

^a Značajna razlika u odnosu na KG: ^a $P < 0,05$.

^b Značajna razlika u odnosu na PEK posle porođaja: ^b $P < 0,05$.

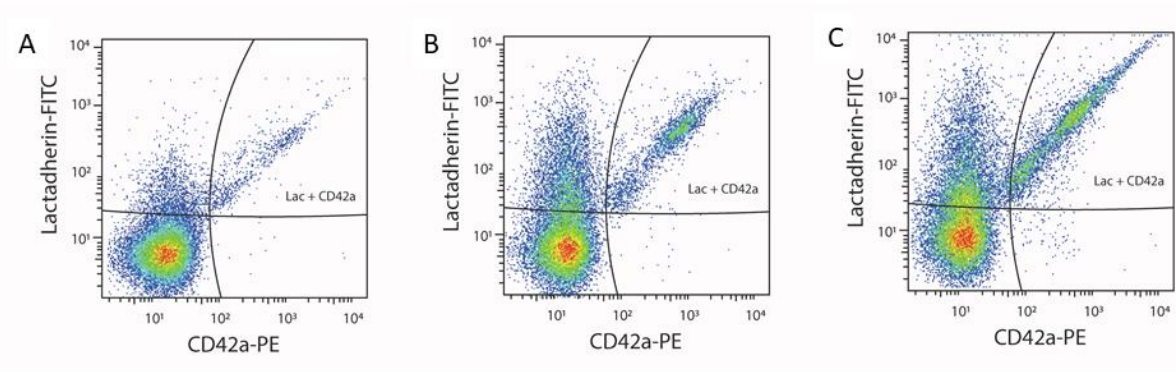
U Tabeli 26. su prikazane odgovarajuće subpopulacije ekstracelularnih vezikula pozitivnih na fosfatidilserin (PS+ EV) i njihove koncentracije koje su određivane u podgrupi zdravih trudnica i ispitanica sa preeklampsijom pre i nakon porođaja. Nije nađena statistički značajna razlika u ukupnoj koncentraciji PS+ EV između ispitanica studijske i kontrolne grupe, ali su statistički značajno više vrednosti nađene kod trudnica sa PEK nakon porođaja. U svim ispitivanim grupama najveći udeo PS+ EV poreklom je od trombocita (36,9 % u kontrolnoj grupi, 51,5 % u grupi ispitanica sa preeklampsijom pre porođaja i 29,5 % u PEK grupi nakon porođaja, Slika 14).



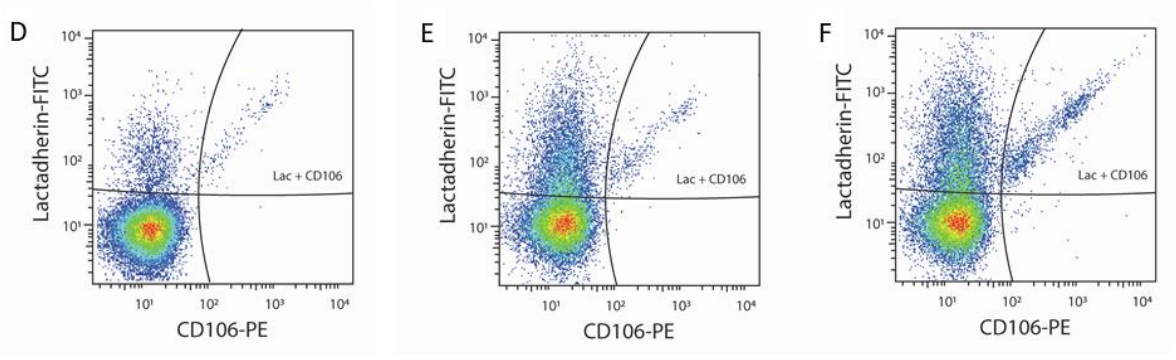
Slika 14. Uporedni prikaz zastupljenosti ispitivanih subpopulacija ekstracelularnih vezikula u ukupnoj koncentraciji PS+ EV u kontrolnoj grupi (A), PEK grupi pre porođaja (B) i nakon porođaja (C).

Poređenjem koncentracija PS+ EV izmerenih u plazmi ispitanica sa preeklampsijom sa koncentracijama izmerenim u kontrolnoj grupi, statistički značajne razlike nađene su samo za PS+ CD42a+ EV i PS+ VCAM-1+ EV, dok razlika u koncentracijama nije bilo za PS+ endotelne CD62E+ EV, PS+ TF+ EV i PIGF+ EV. U grupi ispitanica sa PEK nakon porođaja uočeno je povećanje koncentracija svih subpopulacija PS+ EV, koje jedino za PIGF+ EV nije bilo statistički značajno. Na *Slici 15.* dati su dot plot prikazi za PS+ CD42a+, PS+ VCAM-1+

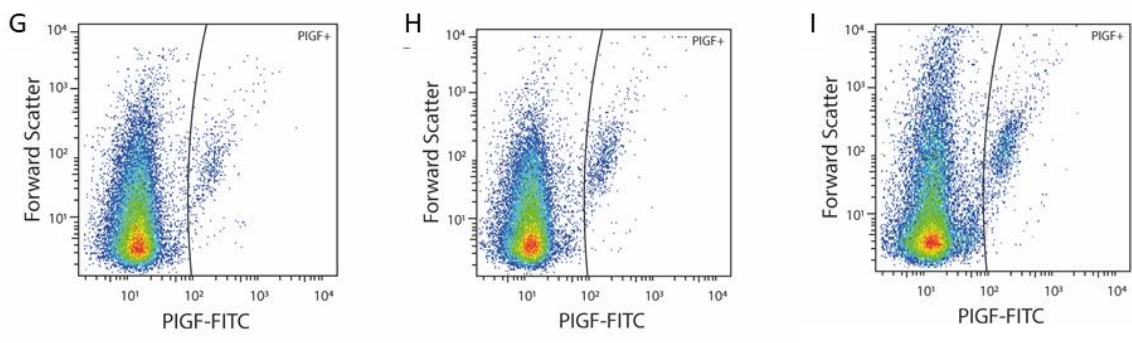
(CD106+) i PIGF+ subpopulacije ekstracelularnih vezikula za reprezentativne uzorke zdrave trudnice i ispitanice sa preeklampsijom pre i posle porođaja.



PS+ trombocitne (CD42a+) EV u uzorku zdrave trudnice (A) i uzorku ispitanice sa preeklampsijom pre i posle porođaja (B–C).



PS+ VCAM-1+ (CD106+) EV u uzorku zdrave trudnice (D) i uzorku ispitanice sa preeklampsijom pre i posle porođaja (E–F).



PIGF+ EV u uzorku zdrave trudnice (G) i uzorku ispitanice sa preeklampsijom pre i posle porođaja (H–I).

Slika 15. Grafički prikazi rezultata protočne citometrije za PS+ CD42a+, PS+ VCAM-1+ i PIGF+ subpopulacije ekstracelularnih vezikula za reprezentativne uzorke zdrave trudnice i ispitanice sa preeklampsijom pre i posle porođaja.

Posle isključivanja ispitanica kod kojih je primenjivan LMWH (n = 2) pomenute razlike su se zadržale (Tabela 27.). Statistički značajne razlike ostale su samo za PS+

CD42a+ EV i PS+ VCAM-1+ EV u podgrupi sa preeklampsijom pre porođaja u poređenju sa zdravim kontrolama. Takođe, i nakon porođaja statistički značajno povećane koncentracije EV su se zadržale u svim subpopulacijama sem PIGF+ EV.

Tabela 27. Koncentracije subpopulacija ekstracelularnih vezikula posle isključivanja ispitanica koje su primale profilaktičke doze LMWH

EV	KG (N=36)	PEK (N=28)		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
PS+ EV/ μ L	957 (586,5 – 2022,5)	905 (707 – 2069)	2591 (1727 – 4235) ^b	0,797	0,001^b
PS+ CD42a+ EV/ μ L	353 (150,5 – 455)	466 (334,5 – 558) ^a	814 (585 – 1271) ^b	0,014^a	< 0,001^b
PS+ CD62E+ EV/ μ L	108 (66 – 118)	91 (71,5 – 105)	137 (104 – 156) ^b	0,167	< 0,001^b
PS+ CD142+ EV/ μ L	34 (15,5 – 69,5)	29 (15 – 58)	104 (24 – 201) ^b	0,560	0,015^b
PS+ CD106+ EV/ μ L	39,5 (27 – 47)	58 (40 – 79) ^a	103 (85 – 164) ^b	0,002^a	< 0,001^b
PIGF+ EV/ μ L	295,5 (176,5 – 408,5)	198,5 (121 – 324)	266 (151 – 399)	0,059	0,244

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U post hoc testom; PS – fosfatidilserin; EV – ekstracelularne vezikule; EV markeri: CD42a = glikoprotein IX (marker trombocita); CD62E = E-selektin (endotelni marker); CD142 = tkivni faktor (TF); CD106 = vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (VCAM-1); PIGF = placentalni faktor rasta.

^a Značajna razlika u odnosu na KG: ^a P < 0,05.

^b Značajna razlika u odnosu na PEK posle porođaja: ^b P < 0,05.

U cilju utvrđivanja poveznosti ispitivanih subpopulacija ekstracelularnih vezikula sa prethodno određivanim laboratorijskim parametrima, primenjena je Spearman-ova korelaciona analiza.

Distribucija ispitivanih parametara hemostaze, CRP-a kao markera inflamacije, i parametara lipidnog statusa u podgrupama prikazana je u *Tabeli 28*.

Tabela 28. Rezultati laboratorijskih testova u ispitivanim podgrupama.

Parametar	KG	PEK		P	
		pre porođaja (pp)	nakon porođaja (np)	KG vs PEK	pp vs np
ETP AUC (%)	93,5 (90,0 – 105,0)	112,5 (106,0 – 119,0)	107,0 (101,5 – 118,0)	< 0,001	0,108
tlag (s)	22,9 ± 3,6	23,8 ± 3,1	24,6 ± 6,4	0,290	0,511
Cmax (%)	104,8 ± 10,3	115,2 ± 13,1	128,4 ± 17,9	0,001	0,001
tmax (s)	68,8 ± 13,0	68,1 ± 9,2	63,1 ± 12,1	0,820	0,075
OCP (Abs-sum)	247,0 ± 32,9	229,4 ± 44,5	246,9 ± 50,8	0,070	0,140
OHP (Abs-sum)	177,1 ± 38,1	198,7 ± 40,7	219,2 ± 43,8	0,036	0,076
OFP (%)	27,3 (16,7 – 35,5)	12,2 (6,7 – 18,8)	8,8 (5,3 – 14,4)	< 0,001	0,030
CLT (min)	27,3 ± 4,5	33,8 ± 8,9	34,9 ± 6,4	0,001	0,241
CLT PTCI (min)	21,0 ± 3,0	23,9 ± 3,9	26,3 ± 2,8	0,003	0,004
ΔCLT	6,3 ± 1,8	10,7 ± 8,0	8,7 ± 4,6	0,008	0,060
Lag vreme (s)	265,3 ± 62,4	283,3 ± 61,8	322,0 ± 74,5	0,256	0,053
Vmax (AU/min)	0,47 ± 0,14	0,55 ± 0,10	0,57 ± 0,16	0,016	0,721
Max Abs (AU)	1,36 ± 0,18	1,25 ± 0,21	1,30 ± 0,24	0,042	0,165
AT (%)	99,1 ± 9,6	92,5 ± 14,3	105,4 ± 14,9	0,029	< 0,001
D-dimer (mg/L FEU)	1,4 (1,2 – 1,8)	1,5 (0,9 – 2,4)	2,4 (2,0 – 3,1)	0,580	0,003
FVIII (%)	189,1 ± 78,3	259,9 ± 115,4	343,2 ± 103,6	0,004	0,004
Fibrinogen (g/L)	5,0 ± 1,1	5,1 ± 1,0	5,6 ± 1,3	0,666	0,068
TAT (μg/L)	6,6 (5,5 – 8,7)	7,2 (5,6 – 9,9)	5,6 (3,9 – 7,8)	0,467	0,071
hsCRP (mg/L)	2,5 (1,4 – 4,7)	6,8 (3,0 – 9,8)	35,8 (20,2 – 65,9)	0,001	< 0,001
uk. holesterol (mmol/L)	6,85 ± 1,46	7,06 ± 1,58	6,54 ± 1,18	0,581	0,009
LDL hol. (mmol/L)	3,70 ± 1,11	3,40 ± 1,16	3,58 ± 1,02	0,421	0,113
HDL hol. (mmol/L)	1,69 ± 0,38	1,56 ± 0,41	1,29 ± 0,34	0,182	< 0,001
trigliceridi (mmol/L)	2,88 ± 0,91	4,67 ± 1,68	3,39 ± 1,22	< 0,001	< 0,001
Lp(a) (nmol/L)	15,5 (8,5 – 64,8)	31,1 (9,0 – 88,0)	42,4 (14,1 – 94,6)	0,448	< 0,001

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($\bar{x} \pm Sd$) i poređeni t-testom ili kao medijana sa interkvartilnim rasponom i poređeni Mann-Whitney U testom (naznačeno u tabeli);

U podgrupi ispitanica sa preeklampsijom su nađene povišene vrednosti ETP, visine pika i OHP, kao i snižene OFP vrednosti u odnosu na podgrupu zdravih trudnica. Vreme liziranja ugruška je bilo značajno produženo, i sa i bez dodatka PTCl, uz značajno veće vrednosti Δ CLT, povećanu brzinu polimerizacije fibrina i smanjenu debljinu fibrinskih vlakana u PEK podgrupi. Koncentracija antitrombina je bila značajno smanjena, dok su aktivnost FVIII, CRP i koncentracija triglicerida bili povišeni u odnosu na kontrolnu podgrupu. U PEK podgrupi nakon porođaja su zabeleženi značajan porast visine pika i dodatno smanjena fibrinoliza praćena izraženijim produženjem CLT PTCl, bez statistički značajne promene vrednosti parametara fibrinskog ugruška. Takođe je zabeleženo povećanje vrednosti AT, D-dimera, FVIII, CRP i Lp(a), kao i sniženje koncentracije ukupnog i HDL holesterola i triglicerida.

Rezultati Spearman-ove korelacione analize između pojedinih subpopulacija ekstracelularnih vezikula i ispitivanih parametara prikazani su u *Tabeli 29*. Korelacionom analizom utvrđeno je prisustvo značajnih vrednosti koeficijenta korelacije između ukupne koncentracije PS+ EV i ukupnog koagulacionog potencijala (OCP), i to inverzne korelacije umerenog stepena ($r = -0,47$; $P = 0,009$). Postojanje značajnih korelacija PS+ EV je utvrđeno i sa ukupnim hemostatskim potencijalom ((OHP) $r = -0,49$; $P = 0,007$), kao i parametrima fibrinskog ugruška: maksimalnom apsorbancijom ((Max Abs) $r = -0,49$; $P = 0,011$) i brzinom polimerizacije ((Vmax) $r = -0,41$; $P = 0,031$). Direktna korelacija je nađena između PS+ EV i TAT ($r = 0,39$; $P = 0,035$), kao i koncentracije triglicerida ($r = 0,44$; $P = 0,017$). Svi pomenuti parametri, izuzev TAT, pokazali su značajnu korelaciju i sa koncentracijom PS+ TF+ EV ((OCP) $r = -0,44$; $P = 0,016$; (OHP) $r = -0,49$; $P = 0,007$; (Max Abs) $r = -0,49$; $P = 0,019$; (Vmax) $r = -0,46$; $P = 0,013$; (trigliceridi) $r = 0,53$; $P = 0,003$). Takođe, utvrđeno je postojanje značajne negativne korelacije umerenog stepena koncentracije PlGF+ EV sa Max Abs i Vmax ($r = -0,46$; $P = 0,014$ i $r = -0,53$; $P = 0,004$), dok su za PS+ VCAM-1+ EV značajne vrednosti koeficijenta korelacije nađene samo za FVIII aktivnost ($r = 0,39$; $P = 0,034$). Korelacionom analizom nije utvrđeno postojanje statistički značajne povezanosti koncentracija PS+ trombocitnih i PS+ endotelnih EV i ispitivanih parametara.

Tabela 29. Rezultati korelacione analize između pojedinih subpopulacija ekstracelularnih vezikula i ispitivanih parametara

	PS+ EV/μL Rho (P)	PS+ CD42a+ EV/μL Rho (P)	PS+ CD62E+ EV/μL Rho (P)	PS+ CD142+ EV/μL Rho (P)	PS+ CD106+ EV/μL Rho (P)	PIGF+ EV/μL Rho (P)
ETP AUC (%)	-.175 (.356)	-.070 (.714)	-.200 (.289)	-.318 (.087)	-.053 (.780)	-.315 (.090)
tlag (s)	-.236 (.209)	-.163 (.390)	-.169 (.371)	.062 (.744)	.331 (.074)	-.269 (.151)
Cmax (%)	-.001 (.997)	.219 (.244)	-.118 (.533)	-.273 (.145)	.110 (.562)	-.164 (.386)
tmax (s)	-.162 (.393)	-.007 (.969)	-.124 (.514)	-.025 (.896)	.068 (.719)	-.115 (.543)
OCP (Abs-sum)	-.469** (.009)	-.138 (.468)	-.241 (.200)	-.436* (.016)	.003 (.987)	-.349 (.058)
OHP (Abs-sum)	-.489** (.007)	-.167 (.387)	-.237 (.468)	-.491** (.007)	-.071 (.716)	-.363 (.053)
OPF (%)	-.104 (.583)	.001 (.999)	-.125 (.509)	.232 (.218)	-.070 (.713)	.103 (.589)
CLT (min)	-.002 (.993)	-.170 (.396)	-.026 (.897)	-.338 (.084)	-.311 (.114)	-.208 (.299)
CLT PTCI (min)	.129 (.497)	.111 (.560)	.156 (.410)	-.170 (.370)	-.069 (.717)	.043 (.822)
ΔCLT	-.021 (.918)	-.208 (.299)	-.192 (.338)	-.225 (.258)	-.322 (.101)	-.268 (.177)
Lag time (s)	-.009 (.963)	.041 (.837)	.315 (.103)	-.129 (.512)	.368 (.054)	-.085 (.669)
Vmax (AU/min)	-.409* (.031)	-.198 (.312)	-.282 (.145)	-.465* (.013)	-.229 (.241)	-.525** (.004)
Max Abs (AU)	-.493* (.011)	-.285 (.159)	-.280 (.166)	-.458* (.019)	.069 (.738)	-.396* (.045)
ATIII (%)	.053 (.781)	.087 (.648)	.032 (.867)	-.174 (.358)	-.049 (.796)	-.061 (.749)
D-dimer (mg/L FEU)	.203 (.283)	.070 (.713)	.196 (.299)	.084 (.658)	-.126 (.509)	.026 (.892)
FVIII (%)	.117 (.537)	.183 (.334)	.207 (.273)	.030 (.875)	.389* (.034)	.093 (.627)
fibrinogen (g/L)	-.112 (.556)	.118 (.536)	.169 (.373)	-.133 (.482)	-.081 (.669)	.063 (.740)
TAT (μg/L)	.387* (.035)	.176 (.352)	.091 (.633)	.090 (.637)	-.143 (.452)	.201 (.288)
hsCRP (mg/L)	-.191 (.313)	.007 (.971)	.110 (.565)	.133 (.484)	-.007 (.971)	.077 (.684)
ukupni kolesterol (mmol/L)	.283 (.136)	.170 (.379)	.021 (.914)	.233 (.223)	-.010 (.959)	.201 (.296)
HDL kolesterol (mmol/L)	-.223 (.246)	-.182 (.345)	-.007 (.973)	-.171 (.375)	-.094 (.626)	-.097 (.615)
trigliceridi (mmol/L)	.440* (.017)	.170 (.377)	.175 (.363)	.529** (.003)	.111 (.568)	.350 (.063)
Lp(a) (nmol/L)	.176 (.360)	.140 (.469)	-.057 (.769)	.100 (.608)	-.048 (.803)	.125 (.519)

Rho – Spearman-ov koeficijent korelacije;

PS – fosfatidilserin; EV – ekstracelularne vezikule; EV markeri: CD42a = glikoprotein IX (marker trombocita); CD62E = E-selektin (endotelni marker); CD142 = tkivni faktor (TF); CD106 = vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (VCAM-1); PIGF = placentalni faktor rasta.

*statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

S obzirom da na količinu produkovanih EV utiču faktori poput krvnog pritiska, starosne dobi i ITM, urađena je Pearson-ova korelaciona analiza, kao i parcijalna korelacija koja omogućava kvantifikovanje linearne asocijacije između varijabli pri čemu se isključuje uticaj jednog ili više faktora. Prethodno je izvršena logaritamska transformacija vrednosti parametara koji nisu imali normalnu raspodelu. Sve značajne asocijacije utvrđene Spearman-ovom korelacionom analizom ranga su nađene i sa Pearson-ovom korelacionom analizom, izuzev korelacije između PIGF+ EV i Max Abs (Tabela 30.).

Tabela 30. Rezultati Pearson-ove korelacione analize između pojedinih subpopulacija ekstracelularnih vezikula i ispitivanih parametara

	Log PS+ EV/ μ L r (P)	PS+ CD42a+ EV/ μ L r (P)	PS+ CD62E+ EV/ μ L r (P)	Log PS+ CD142+ EV/ μ L r (P)	Log PS+ CD106+ EV/ μ L r (P)	Log PIGF+ EV/ μ L r (P)
ETP AUC (%)	-0.249 (.185)	-0.078 (.684)	-0.313 (.092)	-0.340 (.066)	-0.031 (.872)	-0.340 (.066)
tlag (s)	-0.127 (.504)	-0.152 (.424)	-0.112 (.555)	0.061 (.750)	0.314 (.091)	-0.208 (.269)
Cmax (%)	0.024 (.900)	0.129 (.496)	-0.124 (.515)	-0.302 (.105)	0.203 (.283)	-0.127 (.505)
tmax (s)	-0.124 (.513)	0.006 (.976)	-0.102 (.593)	-0.041 (.828)	0.082 (.667)	-0.112 (.556)
OCP (Abs-sum)	-0.399* (.029)	-0.135 (.478)	-0.172 (.364)	-0.495** (.005)	0.107 (.573)	-0.274 (.142)
OHP (Abs-sum)	-0.394* (.034)	-0.171 (.396)	-0.253 (.185)	-0.659*** (<.001)	-0.014 (.944)	-0.355 (.059)
Log OFP (%)	-0.209 (.268)	0.009 (.961)	-0.115 (.546)	0.248 (.186)	-0.045 (.812)	-0.011 (.954)
CLT (min)	-0.134 (.506)	-0.279 (.159)	-0.283 (.153)	-0.309 (.116)	-0.358 (.067)	-0.262 (.187)
CLT PTCI (min)	0.074 (.696)	0.091 (.632)	0.147 (.439)	-0.140 (.460)	0.087 (.647)	0.087 (.647)
Log ΔCLT	-0.096 (.632)	-0.303 (.125)	-0.286 (.148)	-0.267 (.178)	-0.335 (.088)	-0.281 (.155)
Lag time (s)	0.144 (.463)	-0.103 (.601)	0.151 (.442)	-0.200 (.307)	0.439* (.019)	0.027 (.891)
Vmax (AU/min)	-0.551** (.002)	-0.133 (.501)	-0.287 (.139)	-0.449* (.016)	-0.337 (.079)	-0.539** (.003)
Max Abs (AU)	-0.510** (.008)	-0.328 (.102)	-0.236 (.245)	-0.501** (.009)	0.186 (.364)	-0.357 (.074)
ATIII (%)	0.066 (.728)	0.056 (.767)	0.076 (.688)	-0.221 (.241)	-0.010 (.957)	-0.080 (.675)
Log D-dimer (mg/L FEU)	0.140 (.460)	0.051 (.788)	0.169 (.371)	0.134 (.480)	-0.206 (.275)	0.066 (.731)
FVIII (%)	0.136 (.473)	0.228 (.226)	0.305 (.101)	-0.103 (.587)	0.378* (.040)	0.106 (.578)
Log fibrinogen (g/L)	-0.075 (.695)	0.099 (.604)	0.124 (.512)	-0.167 (.379)	-0.059 (.755)	0.065 (.734)
Log TAT (μ g/L)	0.402* (.028)	0.198 (.295)	0.166 (.380)	0.133 (.483)	0.018 (.923)	0.237 (.207)
Log hsCRP (mg/L)	-0.079 (.678)	0.071 (.707)	0.112 (.555)	0.280 (.134)	0.045 (.814)	0.212 (.260)

Tabela 30. nastavak

	Log PS+ EV/μL r (P)	PS+ CD42a+ EV/μL r (P)	PS+ CD62E+ EV/μL r (P)	Log PS+ CD142+ EV/μL r (P)	Log PS+ CD106+ EV/μL r (P)	Log PIGF+ EV/μL r (P)
ukupni holesterol (mmol/L)	.267 (.161)	.113 (.558)	-.016 (.934)	.166 (.390)	.019 (.920)	.227 (.237)
HDL holesterol (mmol/L)	-.225 (.240)	-.300 (.114)	.001 (.996)	-.172 (.373)	-.056 (.771)	-.092 (.635)
trigliceridi (mmol/L)	.400* (.032)	.191 (.320)	.084 (.666)	.449* (.015)	.100 (.606)	.303 (.110)
Lp(a) (nmol/L)	.076 (.695)	.119 (.538)	-.056 (.774)	.091 (.638)	-.082 (.672)	.088 (.650)

r – Pearson-ov koeficijent korelacije; *statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Uzimajući u obzir prilagođeni uticaj maternalne starosti i ITM utvrđena je umerena korelacija između PS+ CD62E+ endotelnih EV i ETP ($r = -0,42$; $P = 0,030$), ali se izgubila značajnost Pearson-ovog koeficijenta korelacije između koncentracije PS+ CD106+ EV i aktivnosti FVIII (Tabela 31.). Dodatno uključivanje kontrole uticaja krvnog pritiska nije značajno uticalo na rezultate parcijalne korelacije.

Tabela 31. Rezultati parcijalne korelacione analize između pojedinih subpopulacija ekstracelularnih vezikula i ispitivanih parametara hemostaze posle prilagođenog uticaja maternalne starosti i ITM

	Log PS+ EV/μL r (P)	PS+ CD42a+ EV/μL r (P)	PS+ CD62E+ EV/μL r (P)	Log PS+ CD142+ EV/μL r (P)	Log PS+ CD106+ EV/μL r (P)	Log PIGF+ EV/μL r (P)
ETP AUC (%)	-.240 (.228)	-.123 (.540)	-.417** (.030)	-.326 (.097)	-.031 (.879)	-.362 (.063)
Cmax (%)	.048 (.814)	.084 (.678)	-.249 (.210)	-.283 (.153)	.216 (.279)	-.155 (.440)
OCP (Abs-sum)	-.416** (.031)	-.118 (.556)	-.158 (.431)	-.511* (.006)	.073 (.717)	-.288 (.145)
OHP (Abs-sum)	-.389* (.040)	-.169 (.400)	-.262 (.186)	-.665*** (.001)	-.032 (.874)	-.362 (.064)
Log OFP (%)	-.219 (.273)	.011 (.957)	-.067 (.740)	.233 (.242)	.011 (.958)	.010 (.960)
Vmax (AU/min)	-.551** (.004)	-.177 (.388)	-.359 (.071)	-.453* (.020)	-.306 (.129)	-.549** (.004)
Max Abs (AU)	-.507* (.011)	-.376 (.070)	-.313 (.136)	-.496* (.014)	.243 (.252)	-.369 (.076)
FVIII (%)	.164 (.412)	.207 (.299)	.215 (.280)	-.062 (.759)	.299 (.130)	.061 (.763)

r – Pearson-ov koeficijent korelacije; *statistički značajna korelacija – *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

5. DISKUSIJA

Preeklampsija predstavlja multisistemski poremećaj specifičan za humanu trudnoću i jedan je od vodećih uzroka perinatalnog i maternalnog morbiditeta i mortaliteta. Međutim, štetni efekti preeklampsije nisu ograničeni samo na period gestacije i puerperijuma, već ostavljaju dugoročne posledice kako na majku tako i na njeno potomstvo, naročito ukoliko je preeklamptična trudnoća bila udružena sa intrauterusnim zastojem u razvoju ploda ili završena prevremenim porođajem (31,43,44,216,217).

Smatra se da pojava preeklampsije pod fiziološkim stresom koji je prisutan u trudnoći može razotkriti rizik za nastanak nepovoljnog kardio-metaboličkog profila i kardiovaskularnih bolesti kasnije u toku života (218). Iako mehanizam nastanka ove uzročno-posledične veze nije u potpunosti razjašnjen, brojna istraživanja su doprinela da preeklampsija bude prepoznata kao dugoročni faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KVB) i uvrštena u važeće vodiče (45,46). Istovremeno, tradicionalni faktori rizika za KVB, kao što su hipertenzija, diabetes mellitus i gojaznost, predstavljaju predisponirajuće faktore za nastanak preeklampsije. U skladu sa prethodno navedenim, rezultati našeg istraživanja pokazuju značajno veći broj preeklamptičnih trudnica sa povišenim ITM, kao i značajno povećan broj ispitanica sa hipertenzijom i dijabetesom. Isto tako, nuliparitet nosi sa sobom značajan rizik za nastanak preeklampsije i poznato je da se preeklampsija znatno češće javlja u prvoj trudnoći, ali u našoj studiji nije bilo razlike u paritetu između ispitivanih grupa. Nasuprot tome, u grupi preeklamptičnih trudnica utvrđen je značajno povećan broj ispitanica sa prisustvom komplikacija u prethodnoj trudnoći, kao i značajno veći broj trudnoća koji je ostvaren veštačkom oplodnjom. Oba navedena faktora se svrstavaju u faktore umerenog rizika za preeklampsiju (15).

Pored navedenog, preeklampsija i KVB ne samo da imaju zajedničke faktore rizika, već se i patofiziološki procesi koji učestvuju u nastanku i razvoju ovih oboljenja značajno preklapaju. Centralni događaj u razvoju kako KVB, tako i preeklampsije, je disfunkcija endotela koju podstiču vazokonstrikcija, značajne metaboličke promene i prisutna sistemska inflamacija (219,220). Oba poremećaja su okarakterisana i aktivacijom sistema koagulacije koji u preeklampsiji dodatno doprinosi hiperkoagulabilnosti koja je fiziološki prisutna u trudnoći.

Međutim, iako postoje brojni dokazi o aktivaciji koagulacije i supresiji fibrinolize u preeklampsiji, povećanom intra- i perivaskularnom formiranju fibrinskih depozita, kao i

njihovoj ulozi u nastanku i razvoju preeklampsije, rutinski testovi hemostaze nisu dali značajan doprinos ni dijagnostifikovanju ni praćenju ovog sindroma (221). Može se reći da se heterogenost sindroma preeklampsije upravo ogleda i u kompleksnosti promena u sistemu koagulacije koje su svakako deo i patofiziologije i kliničkih manifestacija preeklampsije.

5.1. Globalni testovi hemostaze

S obzirom da prokoagulabilno stanje u preeklampsiji dovodi do povećanog stvaranja trombina, aktivacije trombocita i formiranja fibrinskih depozita u krvnim sudovima brojnih organa cilj ovog istraživanja je bio da se primenom globalnih testova ispituju hemostatske promene u preeklampsiji, pre i nakon porođaja, kao i da se utvrdi njihova eventualna povezanost sa ishodima preeklampsične trudnoće. Pored toga, ispitan je kvalitet fibrinskih ugrušaka i njihova struktura.

Normalna trudnoća je praćena promenama u svim aspektima hemostaze: povećanjem koncentracije većine faktora koagulacije (fibrinogena, faktora VII, VIII, IX, X i XII, vWF Ag) i smanjenjem koncentracije nekih prirodnih antikoagulantnih faktora (protein S) uz istovremeno smanjenje fibrinolize usled porasta vrednosti inhibitora fibrinolitičke aktivnosti: trombinom aktiviranog fibrinolitičkog inhibitora (TAFI) i inhibitora aktivatora plazminogena 1 i 2 (PAI-1 i PAI-2). Poremećaj delikatne hemostatske ravnoteže, odnosno ravnoteže između sistema koagulacije i fibrinolize, koji rezultuje prokoagulantnim stanjem u normalnoj trudnoći dodatno je izražen u preeklampsiji. Brojne studije su pokazale da je postojanje prekomerno aktivirane intravaskularne koagulacije u preeklampsiji praćeno formiranjem fibrinskih depozita u zidu glomerularnih kapilara i spiralnim arterijama placente. Ove promene su okarakterisane povišenim nivoima faktora koagulacije, postepenim povećanjem vrednosti markera *in vivo* stvaranja trombina (F1+2 i TAT) i smanjenjem koncentracije regulatornih proteina koagulacije, prevashodno antitrombina (AT) (149,222,223). Međutim, hemostatski disbalans u preeklampsiji ne može se pripisati samo aktiviranoj koagulaciji, jer postoje brojni nalazi i o prisustvu poremećene fibrinolize, koja se pre svega javlja zbog izmenjenih nivoa PAI-1 i PAI-2. Povišene vrednosti PAI-1 i odnosa PAI-1/PAI-2, kao i smanjena sinteza PAI-2 su povezani sa placentalom insuficijencijom i endotelnom disfunkcijom (159,224). Stečena hiperkoagulabilnost u preeklampsiji dodatno povećava rizik za razvoj VTE, koji je posebno izražen kod teške forme preeklampsije povezane sa intrauterusnim zastojem u razvoju ploda (225). Istovremeno preeklampsija je povezana i sa

značajnim rizicima od krvarenja usled komplikacija kao što su abrupcija placente, HELLP sindrom i oštećenje bubrega (226).

U skladu sa prethodno navedenim, analiza naših rezultata ETP testa je pokazala da preeklampsične trudnice imaju značajno veće vrednosti ETP i visinu pika u odnosu na zdrave trudnice ($P < 0,001$), čime su potvrđeni nalazi prethodnih studija i dokazano prisustvo prokoagulabilnog stanja u preeklampsiji. Takođe, imajući u vidu da povećano stvaranje trombina ukazuje na tendenciju ka trombozi, značajno veće količine stvorenog trombina i postizanje većih maksimalnih koncentracija trombina u preeklampsiji predstavljaju potvrdu postojanja dodatnog rizika za trombozu. Pored toga, nalaz produženog vremena koje odgovara fazi inicijacije je mogući razlog zbog kog rutinski skrining testovi koagulacije ne pokazuju odstupanje u preeklampsiji. Povišene ETP vrednosti su nađene i nakon 1 – 1,5 godine od preeklampsične trudnoće (227), ali nijedna od prethodno navedenih studija nije merila ETP (kapacitet za stvaranje trombina) kod preeklampsičnih pacijentkinja nakon porođaja. Iz tog razloga, kao i zbog činjenice da ne postoji efikasna terapija preeklampsije i da porođaj i dalje predstavlja jedini „lek”, u našoj studiji ispitivali smo i promene ETP vrednosti u periodu nakon porođaja. Naši rezultati pokazuju da je hiperkoagulabilno stanje okarakterisano povećanim stvaranjem trombina u preeklampsiji dodatno pospešeno nakon porođaja. Iako nije bilo razlike u količini stvorenog trombina pre i nakon porođaja, kod preeklampsičnih trudnica nakon porođaja su izmerene značajno povišene vrednosti maksimalnih koncentracija trombina. Poznato je da je rizik od nastanka tromboze u postpartalnom periodu i do 5 puta veći u odnosu na period trudnoće, dok je u odnosu na žene koje nisu trudne rizik čak od 21 – 84 puta veći. Rizik je najveći u periodu od 2 dana do 3 nedelje od porođaja, a značajno mu doprinosi i porođaj carskim rezom, kako se u najvećem broju slučajeva i završava preeklampsična trudnoća (228–230). Uzimajući u obzir rezultate našeg istraživanja može se zaključiti da je visina pika, odnosno maksimalna koncentracija trombina stvorena u ETP testu, bolji pokazatelj hiperkoagulabilnog stanja u odnosu na ETP AUC vrednosti.

Drugi globalni test korišćen u našoj studiji, ukupni hemostatski potencijal (*engl.* Overall Haemostatic Potential – OHP), omogućava istovremenu procenu koagulacionog i fibrinolitičkog potencijala. Naši rezultati, u skladu sa prethodnim nalazima, ukazuju na postojanje hipofibrinolitičkog stanja u preeklampsiji koje se ogleda u značajno povišenim OHP i sniženim OFP vrednostima u odnosu na normalnu trudnoću, kao i produženju vremena lize ugruška (CLT) (175,178). Po dodatku PTCI (specifičnog TAFI-inhibitora) zabeleženo je

značajno skraćivanje CLT vrednosti kod pacijentkinja sa preeklampsijom u poređenju na zdrave trudnice. Ovaj nalaz, zajedno sa značajnom korelacijom između Δ CLT i OFP, sugerise da se dodatno smanjenje fibrinolize u preeklampsiji može bar delimično pripisati dejstvu TAFI. Kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja, fibrinolitička aktivnost je bila dodatno suprimirana na šta ukazuje značajan pad u vrednostima OFP i dodatno produženje CLT. I OHP vrednosti su bile više u ovoj grupi, mada nije nađena statistički značajna razlika između vrednosti pre i posle porođaja. Produženje vremena lize se umanjilo nakon dodatka PTCl, ali nije bilo značajnih razlika u odnosu na CLT rezultate istih pacijentkinja pre porođaja. Do sada objavljene studije koje su istraživale nivoe TAFI i CLT u preeklampsiji pokazale su oprečne rezultate (178,179,231,232). Antović i saradnici su analizirali ulogu TAFI u poremećaju fibrinolize u preeklampsiji i IUGR u trećem trimestru trudnoće kod 46 preeklamptičnih i 16 zdravih trudnica i pokazali značajno niže srednje vrednosti TAFI Ag u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom. U podgrupi od 15 pacijentkinja i 10 zdravih trudnica određivani su takođe i CLT i ukupan fibrinolitički potencijal. Kod 10 (67 %) žena sa preeklampsijom liza ugruška nije postignuta nakon dva sata, a kod preostalih pet (33 %) CLT je bio značajno duži nego u kontrolnoj grupi. Međutim, nije bilo razlika u srednjim vrednostima CLT između ove dve grupe. Ukupan fibrinolitički potencijal koji je bio značajno niži u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom, nije se značajno promenio dodatkom PTCl. Autori su zaključili da poremećaj fibrinolize kod žena sa preeklampsijom i/ili IUGR nije posledica sniženih nivoa TAFI, koji su verovatno nastali kao rezultat poremećene funkcije jetre i povećanog izlučivanja urinom (178). Nasuprot tome, u studiji koja je uključila 30 trudnica sa preeklampsijom i 30 zdravih žena u trećem trimestru trudnoće nađene su neznatno povišene vrednosti TAFI Ag kod žena sa preeklampsijom, te su autori svoje rezultate pripisali mnogo manjem prisustvu teških formi preeklampsije u odnosu na prethodno pomenutu studiju (samo 7 % u poređenju sa 63 % u prethodnoj studiji) (231). Martinez-Zamora i saradnici ispitivali su promene CLT i TAFI Ag kod 76 zdravih trudnica i 82 pacijentkinje sa preeklampsijom tokom trudnoće i šest nedelja nakon porođaja. U kontrolnoj grupi je zabeleženo progresivno povećanja nivoa TAFI Ag, koji je zatim opao nakon porođaja, ali nije bilo statistički značajne razlike u nivoima TAFI Ag ili CLT između pacijentkinja i kontrolne grupe tokom trudnoće. Međutim, nakon porođaja žene sa preeklampsijom su imale značajno više nivoe TAFI Ag i duži CLT u odnosu na kontrolnu grupu, što je ukazivalo na zaostali poremećaj fibrinolize i nakon porođaja (179). Mada, ako se u obzir uzmu i naši prethodno opisani rezultati o povećanom stvaranju trombina u preeklampsiji, utvrđeno smanjenje fibrinolitičke aktivnosti bi upravo moglo da se objasni prekomernim stvaranjem trombina što

može da dovede do aktivacije TAFI. Pored toga, vrednosti OFP i CLT kod trudnica sa preeklampsijom nakon porođaja upućuju na zaključak da je postpartalni poremećaj fibrinolize najmanje u istom obimu kao i pre porođaja, ako ne i izraženiji. Međutim, i pored hipofibrinolitičkog stanja u ovoj grupi je zabeležen značajan porast vrednosti D-dimera u odnosu na vrednosti pre porođaja. S obzirom da nije bilo razlike između vrednosti D-dimera u kontrolnoj grupi i preeklampsiji, povišen nalaz D-dimera nakon porođaja pokazuje da je, i pored supresije fibrinolize, fibrinolitički sistem funkcionalno aktivan, kao i da su procesi koagulacije i stvaranje fibrina dodatno pojačani u odnosu na stanje pre porođaja.

Tome u prilog govore i rezultati ispitivanja karakteristika fibrinskog ugruška sprovedeni u ovom istraživanju. Poslednjih godina objavljen je veliki broj studija u kojima su različite tromboembolijske bolesti dovedene u vezu sa protrombotičkim strukturnim promenama fibrinskih ugrušaka. Stvaranje fibrinskih mreža koje su gušće, brzo se formiraju i sporije liziraju opisano je u idiopatskom VTE, akutnom koronarnom sindromu, moždanom udaru i drugim kardiovaskularnim oboljenjima, kao i u dijabetesu i autoimunim oboljenjima, ali su podaci o strukturi fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji oskudni (233–235). Svakako, povezanost strukture i karakteristika fibrinskih ugrušaka formiranih *in vitro* u plazmi pacijenata sa prethodno pomenutim oboljenjima omogućila je uvid u jedan značajan aspekt trombotičkih promena. U našem istraživanju primenom turbidimetrijskih merenja i SEM potvrđeno je da u uzorcima pacijentkinja sa preeklampsijom *ex vivo* dolazi do formiranja čvrstih fibrinskih ugrušaka veće gustine koji su relativno otporni na fibrinolizu. Štaviše, rezultati turbidimetrijskih merenja (veća brzina polimerizacije (V_{max}) i niže vrednosti Max Abs) ukazuju na brže formiranje kondenzovanih fibrinskih ugrušaka sastavljenih od tanjih vlakana, odnosno izmenjena svojstva fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji. S obzirom da se radi o *in vitro* ispitivanju poželjno je da se u razmatranju dobijenih rezultata osvrnemo na uticaj koncentracije trombina na strukturu fibrinskog ugruška u turbidimetrijskim merenjima. Poznato je da pri niskim koncentracijama trombina povećanje njegove koncentracije dovodi do skraćanja lag faze, povećanja maksimalne brzine nastanka turbiditeta i smanjenja maksimalnog turbiditeta. Pod elektronskim mikroskopom vidi se više snopova fibrinskih vlakana koja su tanja (236). Tokom izvođenja eksperimenta u našem istraživanju korišćeni su razblaženi uzorci i niže koncentracije trombina kako bi se povećala reproducibilnost određivanja vremena lag faze (212). S tim u vezi možemo pretpostaviti da značajno povišene vrednosti ETP u preeklampsiji, ukazuju na veću ukupnu količinu stvorenog trombina u *in vitro* aktiviranoj koagulaciji, što u turbidimetrijskim merenjima rezultuje porastom V_{max} i

smanjenjem Max Abs. Isto tako, nepostojanje razlika između vrednosti Vmax i Max Abs pre i nakon porođaja može da se objasni postojanjem istog kapaciteta za stvaranje trombina u ovim grupama, s obzirom na to da nije bilo razlike u ETP vrednostima pre i posle porođaja. Dužine lag faze između preeklampsije i zdrave trudnoće u našoj studiji nisu se razlikovale, ali je lag faza bila značajno produžena kod trudnica sa preeklampsijom nakon porođaja. Imajući u vidu pomenuti uticaj koncentracije trombina, kao i podatak da povećanje koncentracije fibrinogena dovodi do skraćanja lag faze (236), produženje lag vremena u preeklampsiji nakon porođaja je neočekivan nalaz. Produženo vreme lag faze ukazuje na inhibiranu polimerizaciju fibrina u početnoj fazi formiranja ugruška, pošto oligomeri fibrina treba da dostignu dovoljnu dužinu da bi mogli da se šire bočno i formiraju fibrinska vlakna, što se u turbidimetrijskim merenjima registruje naglim porastom apsorbancije. Slično je uočeno kod pacijenata u krajnjem stadijumu renalne bolesti (*engl.* end-stage renal disease, ESRD) gde su autori sugerisali da je moguć uticaj drugih sastojaka plazme, ali i da zbog velike varijabilnosti KV između serija merenja ove rezultate treba uzeti sa zadržkom (237). U jedinoj do sada objavljenoj studiji koja je ispitivala parametre stvaranja fibrina u preeklampsiji, Haire i saradnici nisu utvrdili značajne razlike u maksimalnoj brzini formiranja fibrina između preeklamptičnih i zdravih trudnica, ali su vrednosti u ove dve grupe bile značajno veće u odnosu na žene van trudnoće. Vrednosti lag faze se nisu razlikovale među ispitivanim grupama (238). Međutim, zbog razlike u metodologiji izvođenja turbidimetrijskih merenja, pre svega primene visoke koncentracije TF umesto trombina, teško je porediti rezultate pomenute studije sa nalazima dobijenim u našem istraživanju. Nesumnjivo mogućnost da rezultate turbidimetrijskih merenja uporedimo sa SEM fotografijama reprezentativnih fibrinskih ugruškara pružila nam je bolji uvid u strukturu reprezentativnih fibrinskih ugruškara i pomogla u tumačenju ostalih rezultata. Na prikazanim fotografijama (*Slika 12.*) jasno se može videti da reprezentativni fibrinski ugrušak pacijentkinje sa preeklampsijom ima znatno gušću strukturu u odnosu na ugruške dobijene iz uzorka zdrave trudnice i normalnog *pool*-a plazme, što je potvrđeno i merenjem vrednosti gustine fibrinske mreže na ovim fotografijama. Poznato je da fibrinski ugrušci koji se sastoje od tankih vlakana organizovanih u gustu mrežu pokazuju trombogene osobine zbog svoje otpornosti na liziranje koja je zapravo posledica takve strukture (176). Takođe, iako tačan mehanizam nije razjašnjen, utvrđeno je da su povećani nivoi fibrinogena, Lp(a) i CRP, kakvi se sreću u preeklampsiji, povezani su formiranjem čvrstih fibrinskih ugruškara otpornih na lizu (239). Stoga ove nepovoljne morfološke karakteristike i izmenjena struktura fibrinskih ugruškara udruženi sa potvrđenom aktivacijom koagulacije i supresijom fibrinolitičke aktivnosti u preeklampsiji

sigurno doprinose stvaranju fibrinskih depozita i samim tim i poremećajima u mikrocirkulaciji, kakvi se u ovom sindromu viđaju na nivou placente i bubrega. Na ovaj način navedeni poremećaji mogu dodatno da favorizuju hiperkoagulabilno stanje i povećaju rizik od tromboze. Naravno, treba imati u vidu da *in vivo* postoje značajni modulatori (protok krvi, ćelije, ekstracelularne vezikule, endotel, endogene i egzogene supstancije, posttranslacione modifikacije fibrinogena) koji utiču na karakteristike i strukturu fibrinske mreže i efikasnost fibrinolize, te stoga predstavljene nalaze treba posmatrati u širem kontekstu (176,240,241).

5.2. Ostali laboratorijski parametri

U našoj studiji određivani su sledeći parametri hemostaze: antitrombin (AT), D-dimer, aktivnost FVIII, fibrinogen i trombin-antitrombin kompleks (TAT). Pored toga određivani su: hsCRP, lipidni profil (ukupan holesterol, LDL i HDL holesterol, trigliceridi), lipoprotein (a) (Lp(a)), kao i IgA, IgG i IgM antifosfolipidna antitela (anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela). Rezultati laboratorijskih analiza u preeklampsiji nesumnjivo odražavaju poremećaj ravnoteže između procesa koagulacije i fibrinolize, kao i heterogenu prirodu ovog sindroma (138,148,156,242).

Mnogi autori su pokazali da u preeklampsiji dolazi do značajnog sniženja aktivnosti AT, koje se međutim normalizuje odmah nakon porođaja (142,243). Rezultati naše studije takođe, potvrđuju značajno snižene vrednosti AT u grupi trudnica sa preeklampsijom pre porođaja, kao i povećanje AT nakon porođaja na nivoe zabeležene u kontrolnoj grupi. Pretpostavlja se da su mogući uzroci: povećana potrošnja usled aktivacije intravaskularne koagulacije, smanjena sinteza u jetri i povećan gubitak urinom zbog niske molekulske težine AT (149,244,245). Kao dokaz povećane AT potrošnje u preeklampsiji u pojedinim studijama se navodi prisustvo povišenih vrednosti markera aktivirane koagulacije, F1+2 i TAT koji se smatraju indikatorima (neprekidnog) stvaranja trombina *in vivo* (142–144). Međutim, određeni autori nisu utvrdili značajno više nivoe TAT kod preeklampsije u poređenju sa normotenzivnom trudnoćom (157,246,247). U našoj studiji ustanovili smo da su stvaranje trombina, mereno preko TAT, i degradacija fibrina, merena određivanjem D-dimera, povećani kod žena sa preeklampsijom, ali ne značajno u poređenju sa normotenzivnom trudnoćom. Nalazi našeg istraživanja su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Hayashi i saradnika, koji takođe nisu našli razliku između vrednosti TAT u preeklampsiji i normalnoj trudnoći. Osim toga, nakon porođaja kod preeklamptičnih trudnica autori su

zabeležili statistički značajno sniženje, koje je ispod vrednosti zabeleženih kod zdravih trudnica. U navedenoj studiji, sa veoma sličnim dizajnom kao u našem istraživanju, utvrđeni su nivoi TAT kod pacijenata sa preeklampsijom pre porođaja, kao i 1. i 10. dana nakon porođaja carskim rezom (248). Važno je napomenuti da je nakon isključivanja pacijentkinja na profilaktičkim dozama LMWH dobijena statistički značajna razlika između TAT vrednosti u preeklampsiji i u normalnoj trudnoći (7,4 [5,4 – 10,4] vs 6,4 [5,2 – 7,4] $\mu\text{g/L}$; $P = 0,048$), ali nije bilo promene u odnosu na vrednosti nakon porođaja, odnosno TAT vrednosti nakon porođaja su ostale statistički značajno niže u odnosu na vrednosti pre porođaja. Iako ovaj nalaz zvuči paradoksalno, može se reći da sugerise da značajan rizik od tromboze koji postoji nakon porođaja nije samo posledica povećanog stvaranja trombina nego je neophodno sadejstvo više faktora koji bi usmerili koagulaciju ka trombozi i na taj način narušili hemostatsku ravnotežu. Naime, koncentracija TAT je osetljiv marker koji odražava stopu trenutnog *in vivo* stvaranja trombina u vreme uzimanja uzorka krvi, dok ETP kvantifikuje količinu *in vitro* stvorenog trombina kao odgovor na trombogeni stimulus i omogućava analiziranje i otkrivanje prokoagulantnih i antikoagulantnih uticaja na stvaranje trombina. Neslaganje između ETP i TAT parametara ukazuje na to da je prekid trudnoće kod pacijenata sa preeklampsijom doveo do smanjenog *in vivo* stvaranja trombina, ali povećani ETP, odnosno povećane maksimalne koncentracije trombina odražavaju postojanje većeg rizika za nastanak tromboze, posebno kada se preeklampsija javlja u kombinaciji sa IUGR što je dominantna odlika preeklamptičnih trudnica u našoj studiji (99,225). Ovaj koncept podržava i nalaz o značajno povećanim vrednostima D-dimera u grupi trudnica sa preeklampsijom nakon porođaja, iako nismo bili u mogućnosti da ih uporedimo sa vrednostima koje karakterišu zdravu trudnoću nakon porođaja. To istovremeno predstavlja jedno od ograničenja naše studije. Ipak, nepostojanje razlike u vrednostima D-dimera između zdravih i preeklamptičnih trudnica pre porođaja, i značajan porast nakon porođaja u grupi sa preeklampsijom utvrđeni su i u ranijim studijama (157,222,249). S obzirom na to da je D-dimer degradacioni proizvod fibrina čiji je prekursor fibrinogen, naši rezultati o nepromenjenoj koncentraciji fibrinogena u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću i značajnom porastu u grupi sa preeklampsijom nakon porođaja takođe, su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja. Pokazano je da povećanje koncentracije fibrinogena u normalnoj trudnoći nije posledica reakcije akutne faze već aktivirane koagulacije, kao i da se u preeklampsiji povišene vrednosti fibrinogena zadržavaju na nivou vrednosti nađenih u zdravoj trudnoći bez obzira na intenziviranje koagulacije i inflamacije (250,251).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju značajno povišene vrednosti FVIII kod trudnica sa preeklampsijom, kao i dodatni porast FVIII nakon porođaja, što je u skladu i sa nalazima drugih istraživanja. Povišene vrednosti FVIII se povezuju sa povećanim rizikom za trombozu, ali treba imati u vidu da vrednosti FVIII rastu u normalnoj trudnoći, kao i da je porast FVIII u preeklampsiji još izraženiji (140,141,252). Značajan porast FVIII u preeklampsiji može se delimično pripisati sniženim vrednostima proteina C koji svoje antikoagulantno dejstvo ostvaruje inaktivacijom faktora V i VIII (253). Ipak, treba uzeti u obzir da je povećana aktivnost FVIII takođe povezana sa inflamatornim procesom koji je prisutan u preeklampsiji, jer je FVIII protein akutne faze (242,254). Rezultati korelacione analize u našem istraživanju pokazali su značajnu povezanost između visoke aktivnosti FVIII i povišenih nivoa CRP u preeklampsiji. CRP je takođe, reaktant akutne faze i jedan od najosetljivijih markera inflamacije, pogotovo hsCRP, čije su vrednosti u preeklampsiji značajno povišene u odnosu na normalnu trudnoću (255). Inače, vrednosti CRP kod zdravih trudnica ne rastu tokom trudnoće i ostaju u rasponu normalnih vrednosti van trudnoće.

Jedna od specifičnih karakteristika preeklampsije je prisustvo „akutne ateroze“, odnosno lezija nalik aterosklerotskom plaku koje se javljaju na distalnim krajevima spiralnih arterija. Lipidni depoziti nađeni su takođe i u glomerulima bubrega kod preeklamptičnih trudnica. Smatra se da je njihov nastanak povezan sa sistemskom inflamacijom i proaterogenim lipidnim profilom koji su u preeklampsiji prenaplašeni u poređenju sa normalnom trudnoćom (21,256,257). Normalna trudnoća je okarakterisana povećanjem koncentracije ukupnog holesterola, LDL holesterola, HDL holesterola i triglicerida. Povećanje vrednosti HDL holesterola koji ima ateroprotektivnu ulogu predstavlja specifičnost normalne trudnoće po kojoj se ona razlikuje od hiperlipidemije koja je odgovorna za nastanak ateroskleroze (258,259). Izmenjen lipidni profil zadržava se i do godinu dana nakon porođaja (260). U preeklampsiji dolazi do daljeg porasta koncentracije triglicerida koje je praćeno smanjenjem koncentracije HDL holesterola. Kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja utvrđeno je značajno snižavanje vrednosti ukupnog holesterola i HDL holesterola (21,261). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa prethodno objavljenim studijama. U grupi trudnica sa preeklampsijom utvrdili smo značajno povećanu koncentraciju triglicerida i sniženu koncentraciju HDL holesterola u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja došlo do značajnog snižavanja vrednosti pomenutih parametara, kao i ukupnog holesterola. Pored toga, utvrđene korelacije između lipidnih parametara i parametara ETP i OHP testa, kao i parametara fibrinskog ugruška

predstavljaju potvrdu da ove lezije predisponiraju nastanak lokalne tromboze i opstrukcije arterija koje mogu da dovedu do infarkta placente ili bubrega. Dodatno, značajna povezanost ukupnog i LDL holesterola i triglicerida sa proteinurijom ($Rho = 0,345$ $P = 0,029$; $Rho = 0,670$ $P = 0,002$; $Rho = 0,604$ $P < 0,001$) koju smo utvrdili u preeklampsiji u skladu je sa ranijim nalazima da su glomerularne lezije povezane sa proteinurijom koja predstavlja prediktivni indikator težine poremećaja (257).

Pored parametara lipidnog statusa u našoj studiji ispitivali smo i koncentraciju lipoproteina a (Lp(a)). Pokazano je da su povišeni nivoi Lp(a) povezani sa rizikom od nastanka koronarne bolesti srca, kao i da imaju značajnu ulogu u procesu ateroskleroze (262). Pored toga, zbog sličnosti u strukturi sa plazminogenom Lp(a) se kompetitivno vezuje za endotelne receptore za plazminogen i tako redukuje njegovu fibrinolitičku aktivnost, odnosno deluje protrombotički (263). U normalnoj trudnoći nivoi Lp(a) su povišeni u odnosu na stanje van trudnoće (258). Pokazano je da Lp(a) raste tokom trudnoće do 35. ng, a zatim se beleži blagi pad vrednosti pre porođaja, dok se tek nakon 3 – 5 meseci od porođaja nivoi Lp(a) vraćaju na vrednosti pre trudnoće (264). Vrednosti Lp(a) u preeklampsiji ispitivane su u nekoliko studija i dobijeni rezultati su kontradiktorni. Nekoliko studija je utvrdilo povišene koncentracije Lp(a) u preeklampsiji, u jednoj su nivoi Lp(a) bili sniženi u teškoj formi preeklampsije, a u najvećem broju studija autori nisu našli značajne razlike u vrednostima Lp(a) između preeklamptičnih i zdravih trudnica (265). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa poslednje pomenutim, ali treba napomenuti da smo nakon isključivanja trudnica sa preeklampsijom kod kojih su primenjivane profilaktičke doze LMWH utvrdili statistički značajno povišene vrednosti Lp(a) u grupi sa preeklampsijom. Nakon porođaja u ovoj grupi utvrđeno je dodatno povećanje koncentracije Lp(a), koje je postojalo i pre isključivanja preeklamptičnih trudnica na LMWH. Smatra se da su vrednosti Lp(a) u normalnoj trudnoći povećane kao posledica metaboličkih zahteva za povećanu sintezu hormona, zatim zbog njegovog hipofibrinolitičkog dejstva koje je neophodno za normalnu placentaciju, kao i iz razloga što je Lp(a) protein akutne faze (264,265). Povišene vrednosti Lp(a) u preeklampsiji pre i nakon porođaja u našoj studiji svakako mogu da se dovedu u vezu sa povećanim inflamatornim odgovorom i oštećenjem endotela, supresijom fibrinolize i postojanjem aterosklerotskih lezija. Tome u prilog govori i postojanje značajne direktne korelacije koju smo utvrdili između koncentracije Lp(a) i proteinurije ($Rho = 0,604$ $P < 0,001$).

S obzirom da žene kod kojih je utvrđeno prisustvo antifosfolipidnih antitela imaju povećan rizik od nastanka preeklampsije u trudnoći (266), u našem istraživanju određivali

smo IgA, IgG i IgM anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinska antitela. Rezultati prethodnih studija o prisustvu antifosfolipidnih antitela u preeklampsiji su kontradiktorni. Nekoliko autora je utvrdilo povećan titar antifosfolipidnih antitela u preeklampsiji, pri čemu je najčešće detektovan povećan nivo antikardiolipinskih antitela. Isto tako pojedini autori pokazali su da ne postoji značajna povezanost između prisustva antifosfolipidnih antitela i preeklampsije (267). U našoj studiji utvrđeno je prisustvo IgG anti- β 2 glikoprotein I antitela i antikardiolipinskih antitela kod 2 zdrave trudnice koje nisu imale kliničke manifestacije antifosfolipidnog sindroma (AFS), dok nijedna od preeklampsijskih trudnica nije bila pozitivna na prisustvo antifosfolipidnih antitela. Lupus antikoagulans nije određivan ni u jednoj od ispitivanih grupa. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima Lee i saradnika koji takođe nisu određivali lupus antikoagulans i nisu pokazali povezanost prisustva antifosfolipidnih antitela sa preeklampsijom, a primenili su manje striktno kriterijume za evaluaciju rezultata određivanja antifosfolipidnih antitela (268).

5.3. Povezanost ispitivanih parametara sa karakteristikama i ishodima preeklampsijske trudnoće

S obzirom na to da preeklampsija predstavlja jednu od najozbiljnijih komplikacija trudnoće i da je uzrok povećanog morbiditeta i majki i novorođenčadi u ovom delu našeg istraživanja pokušali smo da utvrdimo eventualnu povezanost ispitivanih parametara sa ishodima preeklampsijske trudnoće. Zapravo, veliki broj istraživača je pokušao da utvrdi kako ulogu u nastanku i predviđanju preeklampsije, tako i primenjivost različitih parametara koagulacije, fibrinolize, inflamacije i angiogeneze za praćenje toka bolesti i određivanje najboljeg vremenskog okvira za porođaj, sa najboljim ishodom i za majku i za plod. Na žalost, do današnjeg dana nijedan parametar nije zadovoljio zahteve, ali se može smatrati da svaka ustanovljena povezanost u istraživanjima o fenomenu preeklampsije ima potencijalni doprinos u razumevanju ovog kompleksnog, heterogenog, multisistemskog sindroma i predstavlja bitan „deo slagalice“.

Podela preeklampsije na ranu i kasnu formu proistekla je iz nalaza da u zavisnosti od gestacijske nedelje u kojoj se razvila preeklampsija u osnovi postoje 2 različita patofiziološka mehanizma nastanka preeklampsije, ali na kraju oba rezultuju istim maternalnim sindromom (74,269). Rana forma preeklampsije se povezuje sa težim kliničkim simptomima, većim rizikom od nastanka komplikacija kako za majku tako i za plod, kao i lošijim ishodima (270).

Pored toga, pokazano je da, u odnosu na kasnu formu, rana forma preeklampsije nosi 5 – 8 puta veći rizik od nastanka KVB kasnije tokom života i da odražava nepovoljan kardiovaskularni fenotip žene (42). U našoj studiji nisu nađene statistički značajne razlike u vrednostima ispitivanih parametara između rane i kasne forme preeklampsije, osim za ETP čije su vrednosti bile statistički značajno niže u grupi pacijentkinja sa kasnom formom preeklampsije [112,0 (107,0 – 122,5) vs 106,0 (98,0 – 115,0); $P = 0,035$], ali su i dalje bile povišene u odnosu na vrednosti ETP nađene u kontrolnoj grupi [97,0 (92,0 – 105,0)]. S obzirom na to da povećano stvaranje trombina znači i veću sklonost ka trombozi moguće je da nađene razlike predstavljaju stratifikaciju rizika (rana forma PEK > kasna forma PEK > normalna trudnoća).

Razlike između ispitivanih parametara analizirane su i u odnosu na prisustvo pridruženih medicinskih stanja u grupi trudnica sa preeklampsijom. Međutim, iako utvrđeni komorbiditeti predstavljaju faktore rizika za nastanak preeklampsije nismo našli statistički značajnu razliku u ispitivanim parametrima između preeklampsičnih trudnica sa i bez prisustva komorbiditeta. Svakako, ne treba isključiti mogućnost da razlike postoje između grupa formiranih po vrsti komorbiditeta, što nije bilo moguće da se ispita u našoj studiji zbog prisustva malog broja trudnica u pojedinačnim grupama.

S obzirom na to da je kod 1/3 trudnica sa preeklampsijom došlo do razvoja maternalnih komplikacija izvršeno je i poređenje ispitivanih parametara između preeklampsičnih trudnica sa i bez prisustva komplikacija. Značajna razlika je utvrđena jedino za AT, pri čemu su niže vrednosti utvrđene u grupi sa komplikacijama ($84,0 \pm 12,7$ vs $93,5 \pm 13,2$; $P = 0,030$). Ukazujući na to da se ne javlja u drugim hipertenzivnim poremećajima u trudnoći pad u aktivnosti AT predstavlja obeležje preeklampsije, a značajno sniženje nivoa AT povezano je sa pojavom maternalnih komplikacija u preeklampsiji (150,271). Takođe, Marietta i saradnici su pokazali da značajan pad vrednosti AT ukazuje na progresiju bolesti, odnosno pogoršanje preeklampsije koje zahteva prekid trudnoće (151). U drugoj studiji je utvrđeno da praćenje snižavanja aktivnosti AT i broja trombocita kod žena sa preeklampsijom može biti od pomoći u predviđanju razvoja teškog oblika HELLP sindroma (272). Iz pomenutih razloga, a imajući u vidu da AT pored antikoagulatnih pokazuje i antiinflamatorne efekte, nekoliko studija je ispitivalo efekte primene AT u terapiji preeklampsije. Utvrđeno je da primena AT koncentrata pomaže u normalizaciji krvnog pritiska i povećava protok krvi u placenti, zatim redukuje proteinuriju, disfunkciju trombocita i adheziju neutrofila na endotel, a takođe inhibira produkciju proinflamatornih citokina,

redukuje trombozu i inhibira formiranje fibrinskih depozita. Navedeni efekti dovode do poboljšanja maternalnih simptoma, produženja trudnoće i boljeg ishoda (152,273,274).

Daljom analizom u podgrupi preeklampsijskih trudnica sa renalnim komplikacijama nađene su povišene vrednosti ETP, visine pika i D-dimera, ali nije postojala značajna razlika u nivoima AT u poređenju sa preeklampsijskim trudnicama bez komplikacija. Poznato je da je nefrotski sindrom povezan sa hiperkoagulabilnim stanjem (uglavnom zbog povećanog gubitka antikoagulantnog proteina antitrombina urinom), tako da su Međunarodno udruženje za proučavanje hipertenzije u trudnoći (ISSHP) i neka nacionalna društva (*Royal College of Obstetricians and Gynaecologist – RCOG, Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada – SOGC*) pojavu nefrotskog sindroma u toku trudnoće naveli kao indikaciju za primenu antenatalne trombopofilakse kod žena sa nefrotskim sindromom u trudnoći (9,275,276). U cilju procene prognostičke vrednosti ispitivanih ETP parametara konstruisane su ROC krive i izračunate su vrednosti površine ispod ROC krive (ROC AUC). Dobijeni rezultati ukazuju da vrednosti ETP i visine pika imaju statistički značajnu i visoku diskriminativnu sposobnost u poređenju grupe preeklampsijskih trudnica sa renalnim komplikacijama u odnosu na preeklampsijske trudnice bez komplikacija, pri čemu je visina pika (ROC AUC: 0,846) bolji marker renalnih komplikacija u odnosu na ETP (ROC AUC: 0,767).

U pogledu fetalnih komplikacija, u našoj studiji je zabeleženo dominantno prisustvo IUGR kod čak 36 trudnica (78 %), što je neočekivan podatak, jer se prema literaturnim podacima IUGR javlja u oko 20 % preeklampsijskih trudnoća (277). Pored toga, svega 27 trudnica je imalo ranu formu preeklampsije, što znači da se IUGR javio i kod 9 trudnica sa kasnom formom preeklampsije. Ovaj nalaz je verovatno posledica činjenice da smo istraživanje sproveli u ustanovi tercijernog nivoa zdravstvene zaštite u koju se često šalju komplikovani slučajevi iz ostalih delova naše države. U našem istraživanju utvrdili smo da preeklampsijske trudnice čija je trudnoća komplikovana prisustvom IUGR imaju značajno snižene vrednosti D-dimera u poređenju sa preeklampsijom bez IUGR [1,4 (0,9 – 2,2) vs 2,4 (1,9 – 3,3); P = 0,014]. Naravno, treba naglasiti da se ovde radi samo o relativnom sniženju, jer su ove vrednosti D-dimera i dalje značajno veće od nivoa D-dimera kod žena koje nisu trudne. Naši rezultati su u skladu sa nalazima istraživanja He i saradnika koji su pretpostavili da bi smanjenje nivoa D-dimera moglo da bude povezano sa ozbiljnom supresijom fibrinolize usled insuficijencije placente. S obzirom na to da u pomenutoj studiji nije bilo razlike u vrednostima markera aktivirane koagulacije TAT i solubilnog fibrina između

preeklamptičnih trudnica sa i bez SGA autori su sugerisali da su niže vrednosti D-dimera posledica smanjene fibrinolitičke aktivnosti uzrokovane placentalnom insuficijencijom (278). Isto tumačenje predstavlja moguće objašnjenje za smanjene OFP vrednosti koje smo utvrdili u preeklamptičnim trudnoćama u kojim je kao komplikacija prisutan oligohidramnion, s obzirom da se vaskularni poremećaji na nivou placente smatraju uzrokom ove komplikacije trudnoće (279). Sa druge strane, iako postoje nalazi da je oligohidramnion povezan sa trombotičkom vaskulopatijom i povećanim stvaranjem trombina (39), u našem istraživanju nismo utvrdili postojanje razlike u vrednostima ETP parametara, niti parametara fibrinskog ugruška između preeklamptičnih trudnoća sa i bez prisustva oligohidramniona.

S obzirom da u našem istraživanju nismo bili u mogućnosti da uporedimo vrednosti Apgar skora između preeklampsičnih i zdravih trudnica ispitali smo povezanost analiziranih parametara u preeklampsiji i vrednosti Apgar skora u 1. i 5. minutu. Rezultati korelacione analize pokazali su značajnu povezanost između Apgar skora u 1. minutu i nivoa AT, CRP, ukupnog i LDL holesterola, dok je Apgar skor u 5. minutu bio povezan sa vrednostima ETP, AT, CRP i LDL holesterola. Direktna korelacija umerenog stepena između koncentracije AT i Apgar skora u 1. i 5. minutu nesumnjivo predstavlja potvrdu rezultata našeg istraživanja da su snižene koncentracije AT povezane sa maternalnim komplikacijama, kao i rezultata ranijih studija u kojima je pokazano da nivoi AT koreliraju sa težinom maternalnih komplikacija i da primena AT koncentrata kod preeklampsičnih trudnica dovodi do poboljšanja kliničkih simptoma, produženja trajanja trudnoće i smanjenja broja novorođenčadi sa veoma malom telesnom masom, što verovatno rezultuje i boljim vrednostima Apgar skora novorođenčeta (151,152,271). Nalaz inverzne korelacije između koncentracije CRP i vrednosti Apgar skora u 1. i 5. minutu sugerise da stepen inflamacije utiče na ishod trudnoće, jer CRP nije samo marker inflamacije, već aktivno učestvuje u inflamaciji, a može i da deluje proaterogeno na vaskularni endotel i glatke mišićne ćelije, te tako doprinese endotelnoj disfunkciji. Pored toga, CRP stimuliše oslobađanje TF iz makrofaga i sintezu PAI-1, kao i agregaciju trombocita, te deluje i protrombotički (280,281). Nasuprot tome, iako u preeklampsiji postoji značajno povećanje koncentracije lipida koje je okarakterisano kao proaterogeno utvrđena direktna korelacija ukupnog i LDL holesterola sa vrednostima Apgar skora u 1. i 5. minutu u skladu je sa činjenicom da je izmenjen lipidni profil neophodan za normalan ishod trudnoće i rast fetusa (282). Inverzna korelacija umerenog stepena utvrđena je i između vrednosti ETP i Apgar skora u 5. minutu, što je u skladu sa našim nalazom o značajno povišenim vrednostima ETP u podgrupi trudnica sa ranom formom preeklampsije, koja se povezuje sa težim

kliničkim simptomima, većim rizikom od nastanka maternalnih i perinatalnih komplikacija, kao i lošijim ishodima trudnoće (270,283). Međutim, iako Apgar skor omogućava standardizovanu procenu statusa novorođenčeta na rođenju, odnosno procenu tranzicije fetusa u neonatusa, treba imati u vidu da na vrednosti Apgar skora značajno utiče zrelost novorođenčeta i medicinske intervencije koje se sprovode u porođajnoj sali, te se ne preporučuje njegova primena za predviđanje neželjenih ishoda (284).

5.4. Ekstracelularne vezikule

Od svog otkrića, pa do današnjih dana, ekstracelularne vezikule (EV) su predmet istraživanja brojnih studija. Povećana ekspresija ćelijskih EV u hipertenzivnim poremećajima u trudnoći smatra se patogenim faktorom zbog njihovog prokoagulantnog i proinflamatornog potencijala (197,208). EV nastaju kao posledica ćelijske aktivacije ili apoptoze. Nakon „otpuštanja” u cirkulaciju mogu da deluju na endotelne ćelije i na ćelije glatkih mišića i tako utiču na vazomotornu reaktivnost i angiogenezu, kao i na stvaranje fibrinskog ugruška, nakon interakcije sa TF (285). EV takođe imaju i proinflamatorne karakteristike i mogu značajno da utiču na funkciju endotela pokretanjem različitih puteva transdukcije signala i ekspresije gena u endotelnim ćelijama. Pored toga, mogu direktno da aktiviraju i stimulišu monocite da proizvode citokine i ROS, i tako dovedu do inflamatornog odgovora (78,192). S obzirom na to da je preeklampsija okarakterisana sistemskom disfunkcijom endotela i pomeranjem hemostatske raznoteže ka prokoagulantnom stanju, kao i da EV imaju značajnu ulogu u aktivaciji sistema koagulacije i inflamaciji, u ovom delu studije ispitivali smo subpopulacije ekstracelularnih vezikula koje na svojoj površini ekspimiraju PS i njihovu povezanost sa prethodno određivanim hemostatskim parametrima.

U ranijim studijama je pokazano da u preeklampsiji dolazi do promene u broju i fenotipu EV koje deluju kao potentni faktori protrombotičkog stanja identifikovanog u preeklampsiji (200). Prokoagulantni potencijal EV pripisuje se ekspresiji fosfatidilserina (PS) koji se u kombinaciji sa istovremenom ekspresijom TF dodatno potencira (188,189). Naši nalazi ukazuju da je preeklampsična trudnoća povezana sa značajno višim nivoima PS+ CD42a+ EV poreklom iz trombocita i PS+ VCAM-1+ EV poreklom iz endotelnih ćelija u poređenju sa normotenzivnom trudnoćom. Pored toga, trudnice sa preeklampsijom nakon porođaja su imale značajno povišene koncentracije PS+ CD42a+ EV, PS+ CD62E+ EV, PS+ TF+ EV i PS+ VCAM-1+ EV u poređenju sa vrednostima pre porođaja, dok jedino za PIGF+ EV nije bilo statistički značajnih razlika. Naši prethodni rezultati su potvrdili prisustvo

izraženog hiperkoagulabilnog stanja, kao i nepovoljne karakteristike fibrinskih ugrušaka kod trudnica sa preeklampsijom u poređenju sa zdravim trudnicama. Takođe, uprkos prekidu trudnoće, kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja uočeno je prisustvo dodatne aktivacije koagulacije i smanjenje fibrinolize.

5.4.1. PS+ ekstracelularne vezikule

U našoj studiji fokus je bio na ispitivanju ekspresije prokoagulantnog PS na nekoliko subpopulacija EV za koje smo smatrali da mogu da imaju važnu ulogu u procesima koagulacije i endotelne disfunkcije. Uvažavajući činjenicu da podaci različitih studija o EV u preeklampsiji pokazuju velike varijacije, kao i da je za detekciju PS, čija se ekspresija na površini EV smatra njihovom osnovnom odlikom, uglavnom korišćen aneksin V, u našem istraživanju za detekciju PS korišćen je laktadherin. U ranijim istraživanjima je utvrđeno da aneksin V nije osetljiv na delimičnu ili smanjenu ekspresiju PS, za razliku od laktadherina koji efikasnije vezuje PS na način koji ne zavisi od koncentracije kalcijuma (286). Rezultati prethodnih studija sa aneksinom V pokazali su izmenjenu, povišenu ili sniženu, ali i nepromenjenu ukupnu koncentraciju PS+ EV u preeklampsiji (195,202,204). Freeman i saradnici su, umesto protočne citometrije za određivanje ukupnih PS+ EV, koristili aneksin V u testu protrombinaze i nisu utvrdili razliku u nivou ukupnih EV između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica. Ovaj test analizira PS+ EV preko njihove sposobnosti da stimulišu prevođenje protrombina u trombin, i na taj način se posebno fokusira na prokoagulantna svojstva EV koje ekspimiraju PS (287). Rezultati našeg istraživanja, takođe, pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji PS+ EV između trudnica sa preeklampsijom i kontrolne grupe. Međutim, u grupi preeklamptičnih trudnica nakon porođaja utvrđeno je značajno povećanje koncentracije PS+ EV. Pored toga, pokazali smo i da su koncentracije PS+ EV u inverznoj korelaciji sa OHP, OCP i parametrima formiranja fibrinskog ugruška. Iako smo očekivali da prokoagulantne EV stimulišu proces koagulacije, ovi rezultati su u skladu sa nedavnim nalazima studije Mobarezz i saradnika, koji su utvrdili direktnu povezanost između Ks (koeficijenta permeabilnosti fibrinskog ugruška) i koncentracije EV. Autori su ukazali na to da inverzna korelacija EV sa aktivacijom hemostaze, odnosno čvrstinom fibrinskog ugruška, može da implicira da se EV ugrađuju u strukturu fibrinskog ugruška (288). Međutim, značajan porast koncentracije EV kod preeklamptičnih trudnica nakon porođaja, bez daljih promena u vrednostima OHP, OCP, Vmax i Max Abs u našoj studiji, može da sugerise dodatni antikoagulantni efekat visokih

nivoa PS+ TF+ EV ostvaren preko aktivacije proteina C (APC) posredstvom trombomodulina (TM). Povišeni nivoi TM prisutni su u preeklampsiji i nastaju kao posledica oštećenja endotela (155,289). Isto tako, pokazano je da je APC-katalizovana inaktivacija faktora Va značajno ubrzana u prisustvu negativno naelektrisanih fosfolipida (290). S obzirom na to da u našem istraživanju nismo ispitivali antikoagulantni efekat EV, nismo bili u mogućnosti da utvrdimo koje komponente sistema koagulacije u interakciji sa EV mogu da dovedu do potenciranja ovog efekta. Dalja istraživanja biće neophodna da se ispita potencijalna uloga EV u antikoagulantnim procesima u preeklampsiji.

5.4.2. Trombocitne PS+ ekstracelularne vezikule

Trombocitne EV predstavljaju najbrojniju subpopulaciju EV, kako kod zdravih žena van trudnoće, tako i u trudnoći (195,289). Pokazano je da trombocitne EV povećavaju produkciju prostaciklina i citokina, kao i ekspresiju adhezivnih molekula u endotelnim ćelijama, dovode do aktivacije trombocita i povećavaju mitogenezu i proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (291–293). U zdravoj trudnoći dolazi do značajnog porasta koncentracije trombocitnih EV, ali kada je reč o nivoima trombocitnih EV u preeklampsiji rezultati prethodnih studija su kontradiktorni (197,206,207). Treba napomenuti da ni u jednoj od ovih studija nije korišćen CD42a marker, odnosno glikoprotein IX (GPIX) koji je adhezivni marker trombocita. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su i apsolutni i relativni nivoi PS+ CD42a+ trombocitnih EV bili značajno povišeni kod trudnica sa preeklampsijom pre i nakon porođaja, ali nisu bili u korelaciji sa stvaranjem trombina, formiranjem i degradacijom fibrina, niti poremećenom strukturom fibrinske mreže. Odsustvo direktne povezanosti između PS+ CD42a+ EV i ispitivanih parametara koagulacije u našoj studiji potencijalno sugerise da PS sam po sebi možda nije dovoljan da doprinese formiranju tromba. VanWijk i saradnici su pomoću EV indukovali aktivaciju koagulacije preko TF/FVII, ali to nije dovelo do povećanog stvaranja trombina, te su zaključili da EV nisu direktno uključene u povećanu aktivaciju koagulacije u preeklampsiji (154). Međutim, nedavne *in vitro* studije su pokazale da trombocitne EV učestvuju u propagaciji koagulacije aktivirane dejstvom TF ili kontakt-zavisnog stvaranja trombina, ali ne ispoljavaju značajan uticaj na gustinu i stabilnost fibrinske mreže (294,295). Ipak, u inflamatornom okruženju, kao što je to slučaj u preeklampsiji, povećana ekspresija TF na aktiviranim monocitima može da inicira proces koagulacije. Pored toga, oslobođene trombocitne EV mogu da stupe u interakciju sa leukocitima ili endotelnim ćelijama, da ih aktiviraju i tako indukuju njihovu prokoagulantnu

aktivnost zavisnu od TF, dok istovremeno mogu da pojačaju postojeće inflamatorne reakcije (78). Pored toga, trombocitne EV, preko aktivacije komplementa, mogu da budu uključene i u regulaciju strukture i funkcije fibrinskog ugruška. Preeklampsija je povezana sa povećanom aktivacijom komplementa, dok je prekomerna aktivacija terminalnog puta opisana u preeklampsiji komplikovanoj sa IUGR. Može se pretpostaviti da sistem komplementa, odnosno njegova sistemska aktivacija, ima važan udeo u poremećajima koagulacije i inflamacije u preeklampsiji i povezuje ih sa maternalnim sindromom (296,297).

5.4.3. Endotelne (CD62E+ i VCAM-1+) ekstracelularne vezikule

Hiperkoagulabilnost, aktivacija trombocita i inflamacija su sistemske manifestacije preeklampsije praćene hipertenzijom i proteinurijom, kao kliničkim simptomima preeklampsije. Međutim, primarni poremećaj u preeklampsiji je povezan sa ishemijskom placente i oslobađanjem produkata koji dovode do aktivacije i oštećenja endotela, a koje dalje rezultuje sistemskom disfunkcijom endotela (48,74). Posledično može doći do formiranja i oslobađanja endotelnih EV koje na svojoj površini eksprimiraju različite antigene u zavisnosti od etiologije generativnog procesa: CD31 (PECAM-1), CD34, CD51, CD54 (ICAM-1), CD62E (E-selektin), CD62P (P-selektin), CD105 (endoglin), CD106 (VCAM-1), CD144 (VE-katherin) i CD146 (S endo 1). Utvrđeno je da su konstitutivni markeri endotelnih EV u apoptozu CD31 i CD105, dok su značajno povećani markeri CD62E > CD54 > CD106 na endotelnim EV koje nastaju tokom procesa aktivacije endotelnih ćelija (298,299). Oslobođene endotelne EV mogu da aktiviraju neutrofile i tako potenciraju njihovu adheziju na endotel, kao i da dovedu do stimulacije koagulacije, inflamacije i angiogeneze (194,300). Rezultati prethodnih studija o nivoima endotelnih EV u preeklampsiji pokazuju veliku heterogenost, a korišćeni su i različiti markeri za njihovu detekciju. U nekoliko studija u kojima su korišćeni CD31+/CD42-, CD62E+, CD144+ i/ili CD105+ markeri autori su pokazali značajno povišene koncentracije endotelnih EV kod trudnica sa preeklampsijom u poređenju sa zdravim trudnicama (198,205,301,302). Međutim, rezultati studije Bretelle i saradnika u kojoj je korišćen marker CD31+/CD42- nisu pokazali značajne razlike između endotelnih EV u preeklampsiji i normalnoj trudnoći (197). Isto tako, VanWijk i saradnici nisu utvrdili razliku između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica kada su kao markeri endotelnih EV korišćeni CD62E i CD144 (202). U studiji u kojoj je korišćen CD51 marker, autori takođe nisu našli razliku u koncentraciji EV endotelnog porekla (303). Između ostalog ni rezultati našeg istraživanja nisu pokazali razliku u koncentracijama PS+ CD62E endotelnih

EV između preeklampsije i kontrolne grupe, niti je nađena povezanost ovih EV sa ispitivanim parametrima koagulacije. Međutim, nakon kontrole uticaja maternalne starosti i ITM utvrđena je umerena korelacija između PS+ CD62E+ endotelnih EV i ETP ($r = -0,42$; $p = 0,030$), ali i dalje nije postojala povezanost sa visinom pika, parametrima OHP testa i fibrinskog ugruška, niti sa ostalim parametrima hemostaze. U grupi sa preeklampsijom nakon porođaja utvrđeno je značajno povećanje koncentracije PS+ CD62E+ EV. Prokoagulantna svojstva, koja endotelne EV ispoljavaju indukcijom TF zavisnog puta koagulacije, pokazana su u *in vitro* eksperimentima, ali i *in vivo* (304), premda ove EV mogu da ispolje i antikoagulantnu i fibrinolitičku aktivnost (305,306). U skladu sa tim, predstavljeni rezultati našeg istraživanja mogu da reflektuju njihovu ambivalentnu ulogu u koagulaciji i fibrinolizi.

U okviru našeg istraživanja merena je i koncentracija PS+ CD106+ EV, odnosno PS+ EV koje na svojoj površini ispoljavaju VCAM-1 (*engl.* vascular cell adhesion molecule-1), adhezivni molekul koji konstitutivno ekspimiraju aktivirane endotelne ćelije i koji podstiče čvrstu adheziju mononuklearnih ćelija za endotel. Centralni događaj u procesu inflamacije je adhezija leukocita za endotelne ćelije i njihova transmigracija u perivaskularni prostor posredovana adhezivnim molekulima na endotelnim ćelijama i odgovarajućim ligandima na leukocitima (307). Leukocitno-endotelna interakcija i adhezija dodatno stimulišu aktivaciju endotelnih ćelija i ekspresiju adhezivnih molekula, što rezultuje njihovim oslobađanjem sa površine endotelnih ćelija, ali nije poznato da li to predstavlja mehanizam kojim se prekida interakcija između ovih ćelija ili je u pitanju kontrola adhezivnosti endotela (308).

U studiji Sabatier i saradnika pokazano je da u *in vitro* uslovima stimulacijom kultivisanih endotelnih ćelija (*engl.* human umbilical vein endothelial cells – HUVECs) sa TNF- α dolazi do oslobađanja endotelnih EV koje na svojoj površini ekspimiraju adhezione molekule. S obzirom da ove adhezione molekule posreduju u adheziji i migraciji leukocita u arterijski zid autori su sugerisali da nastale endotelne EV predstavljaju „cirkulišući deo endotela” koji ima kapacitet da stupi u interakcije sa leukocitima. Isto tako ove endotelne EV zahvaljujući ekspimiranim adhezionim molekulima mogu da stupe u interakciju sa monocitima i stimulišu ekspresiju TF, odnosno indukuju TF-zavisnu koagulaciju i tako dovedu do amplifikacije prokoagulantne aktivnosti (309). Treba napomenuti, da pored proinflatornih citokina, TNF- α i IL-1 β , trombin i histamin takođe stimulišu povećanu produkciju adhezivnih molekula u kulturi humanih endotelnih ćelija (307). U serumu trudnica sa preeklampsijom utvrđene su povišene koncentracije TNF- α i IL-1 β , povećana je i intravaskularna aktivacija koagulacija praćena povećanim stvaranjem trombina, a pored toga

i hipoksija koja je prisutna u preeklampsiji može dovesti do povećane ekspresije adhezivnih molekula (142,310,311). Isto tako, u serumu preeklampsičnih trudnica nađene su značajno povećane koncentracije sVCAM-1 za koje se pretpostavlja da reflektuju aktivaciju ili oštećenje endotelnih ćelija, ali nije poznat mehanizam nastanka solubilne forme VCAM-1 niti njegova patofiziološka funkcija (312). Za razliku od preeklampsije, u normalnoj trudnoći ne dolazi do povećanja koncentracije sVCAM-1 u serumu, ali su značajno povećane koncentracije sP-selektina i snižene sL-selektina, što se može smatrati potvrdom da je u normalnoj trudnoći prisutna aktivacija trombocita i leukocita, ali ne i endotelnih ćelija (313). Osim toga VCAM-1 se povezuje i sa prisustvom ranih aterosklerotskih promena, kakve ne postoje u normalnoj trudnoći, ali se javljaju kod nekih trudnica sa preeklampsijom („akutna ateroza”). Povišene koncentracije VCAM-1, kao i VCAM-1+ EV utvrđene su u vaskularnim i inflamatornim oboljenjima. Osim što o ovim endotelnim EV postoje oskudni podaci u literaturi, one do sada nisu ni određivane u preeklampsiji (314–317). Naši rezultati pokazuju značajno povećanu koncentraciju PS+ EV koje na svojoj površini ekspimiraju VCAM-1, što je i očekivano s obzirom na to da je preeklampsija bolest maternalnog endotela i okarakterisana je prisustvom povišenih serumskih koncentracija VCAM-1. Nakon porođaja kod preeklampsičnih trudnica dolazi do daljeg porasta koncentracije ovih EV. Pored toga, u našoj studiji nivoi PS+ VCAM-1+ EV su pokazali značajnu korelaciju sa aktivnošću FVIII, što može da sugeriše da PS+ VCAM-1+ EV potencijalno deluju prokoagulantno i sklonije su interakciji sa ćelijama. Međutim, nakon kontrole maternalne starosti i ITM ova povezanost više nije bila značajna. S obzirom na to da ne postoje komparativne studije potrebna su dalja istraživanja da bi se razjasnilo da li se povećanje PS+ VCAM-1+ EV može pripisati promenama u funkciji endotela koje mogu da potenciraju stanje hiperkoagulabilnosti, kao i koja je funkcija ovih endotelnih EV u preeklampsiji.

5.4.4. TF+ ekstracelularne vezikule

Najveći udeo cirkulišućeg TF nevezanog za ćelije čine TF+ EV, te se smatra da ove EV predstavljaju rezervoar TF koga prenose u krvotok (318). Combes i saradnici su pokazali da EV koje se oslobađaju iz ćelija stimulisanih sa TNF dovode do aktivacije koagulacije *in vitro* TF/FVII zavisnim putem (319). Pored toga, istovremena ekspresija PS i TF potencira prokoagulantni efekat EV, te PS+ EV bogate TF pokazuju najveću prokoagulantnu aktivnost (188,320). Brojne studije su pokazale da je povećana ekspresija TF na endotelnim ćelijama nakon endotelne stimulacije, kao i TF ekspresija na površini cirkulišućih monocita, tkivnih

makrofaga i neutrofila indukovana inflamacijom, povezana sa oslobađanjem EV koje na svojoj površini ispoljavaju TF i prisutna je u brojnim oboljenjima (321–325). Međutim, prisustvo povišenog nivoa EV koje ispoljavaju na svojoj površini TF nije potvrđeno u preeklampsiji, niti u drugim hipertenzivnim oboljenjima u trudnoći (154,209). U skladu sa tim ni u našoj studiji nisu nađene značajne razlike između koncentracije PS+ TF+ EV u preeklampsiji i normalnoj trudnoći. No, iako nisu našli razliku u ekspresiji TF, Ahron i saradnici su utvrdili da je prokoagulantna aktivnost TF+ EV u stvari posledica smanjene EV ekspresije TFPI, odnosno poremećene ravnoteže između TF+ EV i TFPI+ EV i povećanog odnosa TF+ EV/TFPI+ EV. U istoj studiji merena je i koagulaciona aktivnost EV izražena u arbitrarnim jedinicama TF i pokazano je da je trombogenost EV najveća u grupi sa gestacijskim vaskularnim oboljenjima (GH/PEK), dok je u grupi trudnica na LMWH trombogenost EV bila jednaka kao u normalnoj trudnoći (209). Nasuprot tome, u našoj studiji je utvrđeno značajno povećanje PS+ TF+ EV u preeklampsičnoj grupi nakon porođaja. Postporođajna aktivacija TF-zavisne koagulacije u nekomplikovanoj trudnoći je prethodno opisana, ali je u ovoj studiji meren solubilni TF, a ne TF vezan za EV (133). Međutim, pored merenja solubilnog TF u pomenutoj studiji korišćen je koagulometrijski test – TF vreme koagulacije (TiFaCT) koji se zasniva na merenju vremena koagulacije sa i bez dodatka specifičnih TF-inhibitornih antitela. Test je pogodan za određivanje TF-zavisne aktivacije koagulacije i u drugoj studiji u kojoj je ispitivana prokoagulantna aktivnost i ekspresija TF na monocitima pokazano je da je aktivacija koagulacije u TiFaCT sistemu, izazvana TF, bar delimično povezana sa TF-pozitivnim vezikulama (326). S obzirom da TF+ EV čine većinski udeo cirkulišućeg TF možemo pretpostaviti da povećano oslobađanje placentalnih TF+ EV pri odvajanju placente od zida materice potencijalno predstavlja jedan od mehanizama aktivacije koagulacije koji potencira rizik za nastanak tromboze nakon porođaja i u ovoj grupi trudnica. Osim toga, utvrđena korelacija između PS+ TF+ EV i parametara ukupnog hemostatskog potencijala, OHP i OCP, kao i parametara fibrinskog ugruška, brzine polimerizacije i gustine fibrinskih vlakana, nesumnjivo može biti dodatna potvrda koncepta Nemersonove grupe da TF ispoljen na EV, odnosno funkcionalni TF u krvi, ima trombogeno dejstvo i doprinosi propagaciji tromba na mestu vakularne povrede (131). U studiji koju su objavili Biró i saradnici, trombogenost perikardijalnih EV (koje *in vitro* aktiviraju koagulaciju preko TF) potvrđena je na modelu venske staze izazvane trombozom i utvrđena je direktna veza sa masom indukovano tromba. Takođe, dodatak ovih EV doveo je do skraćanja lag faze u *in vitro* testu generacije fibrina (189).

5.4.5. PIGF+ ekstracelularne vezikule

Brojne studije su pokazale da snižene vrednosti PIGF mogu da se smatraju biomarkerom smanjene placentalne funkcije i da je PIGF osetljiviji i precizniji prediktor preeklampsije i intrauterusnog zastoja u rastu od bilo kog drugog pojedinačnog biomarkera (327,328). U prilog tome govori i činjenica da je placenta dominantan izvor PIGF i da su vrednosti PIGF niske, praktično nemerljive van trudnoće, iako ga u malim količinama proizvode i srce, pluća, štitasta žlezda, skeletni mišići, masno tkivo, kao i neki tumori (329). Nasuprot tome, pored placente, endotelne ćelije, mononuklearne ćelije periferne krvi i masno tkivo su značajni izvori solubilne forme Flt-1 (330). Uz to, promene u koncentraciji PIGF kod žena predodređenih za razvoj preeklampsije javljaju se već u prvom trimestru trudnoće, a pre značajnih promena u koncentraciji sFlt-1 (328). S tim u vezi kao jedan od ispitivanih fenotipova ekstracelularnih vezikula u ovoj studiji izabrane su i PIGF+ EV koje nisu proučavane ni u jednoj do sada objavljenoj studiji. Svega nekoliko studija je pokazalo da su nivoi ekstracelularnih vezikula koje na svojoj površini ispoljavaju Flt-1, poreklom iz placente ili trombocita, povećani u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću, jednako kao i solubilna forma ovog receptora (331,332). S obzirom na to da je endotelna disfunkcija trudnica sa preeklampsijom povezana sa smanjenim koncentracijama PIGF u plazmi, zbog njegovog vezivanja za prekomerno oslobođen sFlt-1 i delimično zbog smanjene produkcije, očekivano bi bilo i da nivoi PIGF+ EV budu sniženi ekvivalentno sniženim nivoima „slobodnog” PIGF u preeklampsiji. Međutim, u našoj studiji nije bilo značajnih razlika u koncentraciji PIGF+ EV između ispitivanih grupa, čak ni u PEK grupi nakon porođaja, iako je koncentracija PIGF+ EV bila viša nego u preeklamptičnoj grupi pre porođaja. Moguće objašnjenje ovog nalaza jeste da je placentalna produkcija PIGF, a samim tim i PIGF+ EV, neizmenjena u preeklamptičnoj trudnoći u odnosu na normalnu trudnoću i da su snižene vrednosti u plazmi isključivo posledica povećanog vezivanja za sFlt-1 što je prethodno pokazano u nekoliko drugih studija (62,330,333). Takođe, postoji mogućnost da merena populacija PIGF+ EV u našoj studiji obuhvata i izoforme PIGF-2 i PIGF-4 koje su vezane za ćelijsku membranu, a potencijalno se u preeklampsiji povećano oslobađaju preko placentalnih EV usled oksidativnog stresa i apoptoze. Postoje 4 izoforme PIGF proteina, pri čemu komercijalni testovi uglavnom mere slobodnu PIGF-1 izoformu (334,335). U jedinjoj studiji u kojoj su poređene koncentracije PIGF u plazmi pre i posle porođaja, Wikström i saradnici nisu našli razliku između vrednosti PIGF izmerenih, pre porođaja i u prvoj postpartalnoj nedelji, kod pacijentkinja sa ranom i kasnom formom preeklampsije, dok je u

kontrolnim grupama zabeleženo značajno sniženje posle porođaja. Autori su pretpostavili da je PlGF, s obzirom na to da je placenta jedini izvor ovog faktora, već neutralisan visokim koncentracijama sFlt-1 koje su prisutne kod preeklampsičnih trudnica (336). Sa druge strane, postojanje značajne inverzne korelacije između PlGF+ EV sa parametrima fibrinskog ugruška, brzinom polimerizacije i debljinom fibrinskih vlakana, kao i činjenica da je placenta najveći izvor PlGF, ukazuje na direktnu vezu između stvaranja EV i taloženja fibrina i infarkta placentе, odnosno implicira da je stvaranje placentalnih EV udruženo sa taloženjem fibrina u placenti i pojavom infarkta. Povezanost sniženih koncentracija PlGF u maternalnoj plazmi sa postojanjem patoloških lezija sa smanjenom perfuzijom pokazana je u nekoliko studija (337,338). Nedavno objavljeni rezultati ispitivanja profila angiogenih faktora i histomorfološkog nalaza placenti Mitilid-Mork i saradnika ukazali su na postojanje veze između angiogenog disbalansa (sniženih vrednosti PlGF i povišenih sFlt-1 vrednosti i sFlt-1/PlGF odnosa) i prisustva intravilusnih fibrinskih depozita u placenti (338). Ipak, jasan zaključak o našim nalazima u vezi sa EV koje ispoljavaju PlGF i njihovoj povezanosti sa hemostatskim parametrima nije se mogao doneti pošto nismo istraživali ćelijsko poreklo ovih cirkulišućih PlGF+ EV, niti merili koncentraciju PlGF u plazmi, te moguće implikacije ostaju da se utvrde u budućim istraživanjima.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovom radu može se zaključiti sledeće:

1. Globalni testovi hemostaze, endogeni trombinski potencijal (ETP) i ukupni hemostatski potencijal (OHP), mogu da se koriste za procenu hemostatskog statusa trudnica sa preeklampsijom pre i nakon porođaja.
2. Primenom globalnih hemostatskih parametara pokazali smo prisustvo aktivirane koagulacije i smanjene fibrinolize, čak i nakon porođaja i uprkos završetku trudnoće.
3. Hiperkoagulabilno stanje u preeklampsiji je okarakterisano značajno povećanim vrednostima ETP i visine pika, pri čemu nakon porođaja dolazi do dodatnog povećanja visine pika. Visina pika, odnosno maksimalna koncentracija trombina stvorena u ETP testu je bolji pokazatelj hiperkoagulabilnog stanja u odnosu na vrednosti ETP AUC koje predstavljaju količinu stvorenog trombina.
4. Vrednosti parametara OHP testa u preeklampsiji ukazuju na hipofibrinolitičko stanje koje se ogleda u značajno sniženim OFP vrednostima i produženom vremenu lize ugruška (CLT) u odnosu na normalnu trudnoću. Nakon porođaja utvrđena je dodatna supresija fibrinolize okarakterisana dodatnim sniženjem OFP vrednosti, bez statistički značajnog dodatnog produženja CLT, što sugerise da je postpartalni poremećaj fibrinolize najmanje u istom obimu kao i pre porođaja, ako ne i izraženiji.
5. Turbidimetrijski parametri dobijeni analizom krive agregacije ukupnog koagulacionog potencijala ukazuju da kod trudnica sa preeklampsijom dolazi do bržeg stvaranja fibrina, kao i da se fibrinski ugrušci sastoje od tanjih vlakana. Formiranje čvrstih i kondenzovanih fibrinskih ugrušaka koji su relativno otporni na fibrinolizu kod trudnica sa preeklampsijom je nov nalaz.
6. Ispitivanjem strukture fibrinskih ugrušaka pokazali smo da trudnice sa preeklampsijom imaju nepovoljnu strukturu fibrinskih ugrušaka. Ove morfološke karakteristike fibrinskih ugrušaka mogu da dodatno favorizuju hiperkoagulabilno stanje u preeklampsiji, odnosno da pospeše intravaskularno formiranje fibrinskih depozita koje je uzrok poremećaja mikrocirkulacije, posebno na nivou placente i bubrega. Na ovaj način navedeni poremećaji mogu dodatno da povećaju i rizik od tromboze.
7. Pored utvrđenih faktora kardiovaskularnog rizika koji su prisutni u preeklampsiji, kao što su visoke vrednosti fibrinogena i smanjene vrednosti HDL holesterola, naši *in vitro* nalazi o povećanom stvaranju trombina i smanjenoj fibrinolizi zajedno sa

izmenjenim svojstvima fibrinskih ugrušaka mogu biti dodatni teret koji kod ovih žena doprinosi razvoju kardiovaskularnih bolesti (KVB) kasnije u toku života.

8. Rana forma preeklampsije okarakterisana je značajno povišenim vrednostima ETP, što sugerise na veću sklonost ka trombozi, te je moguće da nađene razlike predstavljaju stratifikaciju rizika (rana forma PEK > kasna forma PEK > normalna trudnoća).
9. Maternalne komplikacije povezane su sa sniženim vrednostima antitrombina (AT).
10. U podgrupi preeklamptičnih trudnica sa renalnim komplikacijama utvrđeno je prisustvo povećanih vrednosti ETP, visine pika i D-dimera, pri čemu je ROC analizom pokazano da je visina pika bolji marker renalnih komplikacija u odnosu na ETP.
11. Preeklampsija komplikovana sa IUGR povezana je sa sniženim vrednostima D-dimera, dok je oligohidramnion povezan sa sniženim vrednostima OFP.
12. Koncentracija PS+ CD42a+ trombocitnih EV i PS+ VCAM-1+ EV je povećana kod trudnica sa preeklampsijom.
13. Nakon porođaja dolazi do povećanja koncentracije ukupnih PS+ EV, PS+ CD42a+ trombocitnih EV, PS+ CD62E+ i PS+ VCAM-1+ endotelnih EV i PS+ TF+ EV.
14. Inverzna povezanost koncentracije PS+ i PS+ TF+ EV sa OHP parametrima i karakteristikama fibrinskog ugruška sugerise uključivanje EV u intravaskularno taloženje fibrina, te zajedno sa nepovoljnom strukturom fibrinskih ugrušaka u preeklampsiji može da ukaže na veće opterećenje ukupnim kardiovaskularnim rizikom.
15. Utvrđena korelacija između PS+ TF+ EV i parametara ukupnog hemostatskog potencijala, OHP i OCP, kao i parametara fibrinskog ugruška, brzine polimerizacije i gustine fibrinskih vlakana, može biti dodatna potvrda da TF ispoljen na EV, odnosno funkcionalni TF u krvi, ima trombogeno dejstvo i doprinosi propagaciji tromba na mestu vakularne povrede.

7. LITERATURA

1. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Jun;2(6):e323–33.
2. Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal Mortality From Preeclampsia/Eclampsia. *Semin Perinatol*. 2012 Feb;36(1):56–9.
3. Abalos E, Cuesta C, Carroli G, Qureshi Z, Widmer M, Vogel J, et al. Pre-eclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG*. 2014 Mar;121(Suppl. 1):14–24.
4. Melchiorre K, Thilaganathan B, Giorgione V, Ridder A, Memmo A, Khalil A. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Future Cardiovascular Health. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Apr;7:59.
5. Wang W, Xie X, Yuan T, Wang Y, Zhao F, Zhou Z, et al. Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2021 May;21(1):364.
6. Umesawa M, Kobashi G. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: prevalence, risk factors, predictors and prognosis. *Hypertens Res*. 2017 Mar;40(3):213–20.
7. Garovic VD, White WM, Vaughan L, Saiki M, Parashuram S, Garcia-Valencia O, et al. Incidence and Long-Term Outcomes of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May;75(18):2323–34.
8. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014 Apr;4(2):97–104.
9. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension*. 2018 Jul;72(1):24–43.
10. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstet Gynecol*. 2020 Jun;135(6):e237–60.
11. North RA, McCowan LME, Dekker GA, Poston L, Chan EHY, Stewart AW, et al. Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. *BMJ*. 2011 Apr;342:d1875.
12. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ*. 2016 Apr;353:i1753.

13. Al-Rubaie ZTA, Askie LM, Hudson HM, Ray JG, Jenkins G, Lord SJ. Assessment of NICE and USPSTF guidelines for identifying women at high risk of pre-eclampsia for tailoring aspirin prophylaxis in pregnancy: An individual participant data meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018 Oct;229:159–66.
14. Garovic VD, Dechend R, Easterling T, Karumanchi SA, McMurtry Baird S, Magee LA, et al. American Heart Association Council on Hypertension; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, Kidney in Heart Disease Science Committee; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. Hypertension in Pregnancy: Diagnosis, Blood Pressure Goals, and Pharmacotherapy: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension.* 2022 Feb;79(2):e21–41.
15. Wheeler SM, Myers SO, Swamy GK, Myers ER. Estimated Prevalence of Risk Factors for Preeclampsia Among Individuals Giving Birth in the US in 2019. *JAMA Netw Open.* 2022 Jan 4;5(1):e2142343.
16. Esplin MS, Fausett M, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, et al. Paternal and Maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001 Mar;344(12):867–72.
17. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT. The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2002 Jan;346(1):33–8.
18. Wei J, Liu CX, Gong TT, Wu QJ, Wu L. Cigarette smoking during pregnancy and preeclampsia risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Oncotarget.* 2015 Dec;6(41):43667–78.
19. Hawkins TL, Roberts JM, Mangos GJ, Davis GK, Roberts LM, Brown MA. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG.* 2012 Mar;119(4):484–92.
20. Kozic JR, Benton SJ, Hutcheon JA, Payne BA, Magee LA, von Dadelszen P. PIERS (Preeclampsia Integrated Estimate of RiSk) Study Group. Abnormal liver function tests as predictors of adverse maternal outcomes in women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011 Oct;33(10):995–1004.
21. Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis.* 2002 Jun;162(2):425–32.
22. Eiland E, Nzerue C, Faulkner M. Preeclampsia 2012. *J Pregnancy.* 2012 Jul;2012:586578.
23. Sibai BM. Diagnosis, Controversies, and Management of the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count. *Obstet Gynecol.* 2004 May;103(5 Pt 1):981–91.
24. Mihiu D, Costin N, Mihiu CM, Seicean A, Ciortea R. HELLP syndrome - a multisystemic disorder. *J Gastrointest Liver Dis.* 2007 Dec;16(4):419–24.

25. Benedetto C, Marozio L, Tancredi A, Picardo E, Nardolillo P, Tavella AM, et al. Biochemistry of HELLP Syndrome. *Adv Clin Chem*. 2011;53:85–104.
26. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2009 Feb;9:8.
27. Katz VL, Farmer R, Kuller JA. Preeclampsia into eclampsia: Toward a new paradigm. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Jun;182(6):1389–96.
28. Sibai BM. Diagnosis, Prevention, and Management of Eclampsia: *Obstet Gynecol*. 2005 Feb;105(2):402–10.
29. Zeeman GG. Neurologic Complications of Pre-eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009 Jun;33(3):166–72.
30. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 Jun;123(24):2856–69.
31. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005 Feb;365(9461):785–99.
32. Goldenberg RL, Rouse DJ. Prevention of Premature Birth. *N Engl J Med*. 1998 Jul;339(5):313–20.
33. Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, et al. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med*. 2008 Jan;36(4):277–81.
34. Melamed N, Baschat A, Yinon Y, Athanasiadis A, Mecacci F, Figueras F, et al. FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) initiative on fetal growth: Best practice advice for screening, diagnosis, and management of fetal growth restriction. *Int J Gynecol Obstet*. 2021 Mar;152(S1):3–57.
35. Committee on Practice Bulletins--Gynecology, American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC 20090-6920, USA. Intrauterine growth restriction. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001 Jan;72(1):85–96.
36. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Feb;41(2):136–45.
37. Hughes DS, Magann EF, Whittington JR, Wendel MP, Sandlin AT, Ounpraseuth ST. Accuracy of the Ultrasound Estimate of the Amniotic Fluid Volume (Amniotic Fluid Index and Single Deepest Pocket) to Identify Actual Low, Normal, and High Amniotic Fluid Volumes as Determined by Quantile Regression. *J Ultrasound Med*. 2020 Feb;39(2):373–8.
38. Rabinovich A, Holtzman K, Shoham-Vardi I, Mazor M, Erez O. Oligohydramnios is an independent risk factor for perinatal morbidity among women with pre-eclampsia who delivered preterm. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019 Jun;32(11):1776–82.

39. Erez O, Romer R, Vaisbuch E, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, et al. Changes in amniotic fluid concentration of thrombin–antithrombin III complexes in patients with preterm labor: Evidence of an increased thrombin generation. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 Nov;22(11):971–82.
40. Roberts JM, Catov JM. Preeclampsia More Than 1 Disease: Or Is It? *Hypertension.* 2008 Apr;51(4):989–90.
41. Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, Bell R. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2013 Jan;28(1):1–19.
42. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007 Nov;335(7627):974.
43. McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: A systematic review and meta-analyses. *Am Heart J.* 2008 Nov;156(5):918–30.
44. Riise HKR, Sulo G, Tell GS, Igland J, Nygård O, Vollset SE, et al. Incident Coronary Heart Disease After Preeclampsia: Role of Reduced Fetal Growth, Preterm Delivery, and Parity. *JAHA.* 2017 Mar;6(3):e004158.
45. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. American Heart Association. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the American Heart Association. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Mar;57(12):1404–23.
46. Bushnell C, McCullough LD, Awad IA, Chireau MV, Fedder WN, Furie KL, et al. Guidelines for the Prevention of Stroke in Women: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014 May;45(5):1545–88.
47. Giguère Y, Charland M, Thériault S, Bujold E, Laroche M, Rousseau F, et al. Linking preeclampsia and cardiovascular disease later in life. *Clin Chem Lab Med.* 2012 Jan;50(6):985–93.
48. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: Recent Insights. *Hypertension.* 2005 Dec;46(6):1243–9.
49. Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost.* 2003 Apr;89(4):601–9.
50. Sattar N, Greer IA. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? *BMJ.* 2002 Jul;325(7356):157–60.
51. Bell MJ. A Historical Overview of Preeclampsia-Eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2010 Sep;39(5):510–8.
52. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.* 2001 Jan;357(9249):53–6.

53. Soto-Wright V, Bernstein M, Goldstein DP, Berkowitz RS. The changing clinical presentation of complete molar pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1995 Nov;86(5):775–9.
54. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat A. Late Postpartum Eclampsia: Report of Two Cases Managed by Uterine Curettage and Review of the Literature. *Amer J Perinatol.* 2007 Apr;24(4):257–66.
55. Bischof P, Campana A. A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update.* 1996 May;2(3):262–70.
56. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. *Placenta.* 2009 Jun;30(6):473–82.
57. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost.* 2009 Mar;7(3):375–84.
58. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-Reoxygenation: A Potent Inducer of Apoptotic Changes in the Human Placenta and Possible Etiological Factor in Preeclampsia. *Circ Res.* 2002 Jun;90(12):1274–81.
59. Redman CW, Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science.* 2005 Jun;308(5728):1592–4.
60. Cockell AP, Learmont JG, Smarason AK, Redman CWG, Sargent IL, Poston L. Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 Feb;104(2):235–40.
61. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Feb;180(2 Pt 1):499–506.
62. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):649–58.
63. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006 Sep;355(10):992–1005.
64. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994 Oct;269(41):25646–54.
65. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for Metastatic Renal Cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jul;349(5):427–34.
66. Levine RJ, Karumanchi SA. Circulating Angiogenic Factors in Preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 2005 Jun;48(2):372–86.

67. Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Kim MR, Espinoza J, et al. Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005 Jan;17(1):3–18.
68. Giguère Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F, et al. Combining Biochemical and Ultrasonographic Markers in Predicting Preeclampsia: A Systematic Review. *Clin Chem.* 2010 Mar;56(3):361–75.
69. Agrawal S, Shinar S, Cerdeira AS, Redman C, Vatish M. Predictive Performance of PlGF (Placental Growth Factor) for Screening Preeclampsia in Asymptomatic Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hypertension.* 2019 Nov;74(5):1124–35.
70. Kohli S, Isermann B. Placental hemostasis and sterile inflammation: New insights into gestational vascular disease. *Thromb Res.* 2017 Mar;151 Suppl 1:S30–3.
71. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol.* 2004 Nov;24(6):565–70.
72. Redman CW, Sargent IL. Immunology of Pre-Eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):534–43.
73. King A, Hiby SE, Verma S, Burrows T, Gardner L, Loke YW. Uterine NK Cells and Trophoblast HLA Class I Molecules. *Am J Reprod Immunol.* 1997 Jun;37(6):459–62.
74. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014 Aug;10(8):466–80.
75. Redman CW, Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 2007 Dec;76(1–2):61–7.
76. Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, et al. Tumor Necrosis Factor- α Induces Endothelial Dysfunction in Lepr(db) Mice. *Circulation.* 2007 Jan;115(2):245–54.
77. Jakobsen C, Larsen JB, Fuglsang J, Hvas AM. Platelet function in preeclampsia – a systematic review and meta-analysis. *Platelets.* 2019 Jul;30(5):549–62.
78. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998 Jul;102(1):136–44.
79. Major HD, Campbell RA, Silver RM, Branch DW, Weyrich AS. Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Jun;210(6):547.e1-7.
80. Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Feb;70(2):223–32.
81. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts II LJ, Clemens JD, et al. Prostacyclin and Thromboxane Changes Predating Clinical Onset of Preeclampsia: A Multicenter Prospective Study. *JAMA.* 1999 Jul;282(4):356–62.

82. Roberge S, Giguère Y, Villa P, Nicolaides K, Vainio M, Forest JC, et al. Early Administration of Low-Dose Aspirin for the Prevention of Severe and Mild Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Amer J Perinatol*. 2012 Apr;29(7):551–6.
83. Hubel CA. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec;222(3):222–35.
84. Lockwood CJ, Krikun G, Caze R, Rahman M, Buchwalder LF, Schatz F. Decidual Cell-expressed Tissue Factor in Human Pregnancy and Its Involvement in Hemostasis and Preeclampsia-related Angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1127:67–72.
85. Lockwood CJ, Huang SJ, Krikun G, Caze R, Rahman M, Buchwalder L, et al. Decidual Hemostasis, Inflammation, and Angiogenesis in Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2011 Mar;37(02):158–64.
86. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, et al. Cytotrophoblasts Up-Regulate Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Expression under Reduced Oxygen: An Implication for the Placental Vascular Development and the Pathophysiology of Preeclampsia. *Endocrinology*. 2004 Nov;145(11):4838–45.
87. Kupferminc MJ, Eldor A. Inherited Thrombophilia and Gestational Vascular Complications. *Semin Thromb Hemost*. 2003 Apr;29(2):185–94.
88. Weiss JL, Malone FD, Vidaver J, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Threatened abortion: a risk factor for poor pregnancy outcome, a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Mar;190(3):745–50.
89. Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in Preeclampsia: The “Chicken-and-Egg” Question. *Endocrinology*. 2004 Nov;145(11):4835–7.
90. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*. 2006 Sep;27(9–10):939–58.
91. Lykke JA, Dideriksen KL, Lidgaard Ø, Langhoff-Roos J. First-Trimester Vaginal Bleeding and Complications Later in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2010 May;115(5):935–44.
92. Lockwood CJ, Paidas M, Murk WK, Kayisli UA, Gopinath A, Huang SJ, et al. Involvement of human decidual cell-expressed tissue factor in uterine hemostasis and abruption. *Thromb Res*. 2009 Nov;124(5):516–20.
93. Chu AJ. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. *Int J Inflamm*. 2011 Sep;2011:367284.
94. Draxler DF, Medcalf RL. The Fibrinolytic System—More Than Fibrinolysis? *Transfus Med Rev*. 2015 Apr;29(2):102–9.
95. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1800–14.

96. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, Norwitz E, Funai EF, Huang STJ, et al. Thrombin Regulates Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 (sFlt-1) Expression in First Trimester Decidua. *Am J Pathol.* 2007 Apr;170(4):1398–405.
97. Brünnert D, Kumar V, Kaushik V, Ehrhardt J, Chahar KR, Sharma PK, et al. Thrombin impairs the angiogenic activity of extravillous trophoblast cells via monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1): A possible link with preeclampsia. *Reprod Biol.* 2021 Sep;21(3):100516.
98. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res.* 2004 Jan;114(5–6):409–14.
99. Jacobsen AF, Skjeldestad FE, Sandset PM. Ante- and postnatal risk factors of venous thrombosis: a hospital-based case–control study. *J Thromb Haemost.* 2008 Jun;6(6):905–12.
100. James AH. Pregnancy-associated thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009 Jan;2009:277–85.
101. Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost.* 2006 Mar;95(3):401–13.
102. Thornton CA, Bonnar J. Factor VIII-related antigen and factor VIII coagulant activity in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1977 Dec;84(12):919–23.
103. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984 Oct;52(2):176–82.
104. Hellgren M, Blombäck M. Studies on Blood Coagulation and Fibrinolysis in Pregnancy, during Delivery and in the Puerperium. I. Normal condition. *Gynecol Obstet Invest.* 1981;12(3):141–54.
105. Clark P, Brennand J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Walker ID. Activated protein C sensitivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1998 Jun;79(6):1166–70.
106. Phillips LL, Rosano L, Skrodellis V. Changes in factor XI (plasma thromboplastin antecedent) levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1973 Aug;116(8):1114–6.
107. Persson BL, Stenberg P, Holmberg L, Astedt B. Transamidating enzymes in maternal plasma and placenta in human pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *J Dev Physiol.* 1980 Apr;2(1–2):37–46.
108. Bremme K, Ostlund E, Almqvist I, Heinonen K, Blombäck M. Enhanced thrombin generation and fibrinolytic activity in normal pregnancy and the puerperium. *Obstet Gynecol.* 1992 Jul;80(1):132–7.
109. Kovac MK, Lalic-Cosic SZ, Dmitrovic JM, Djordjevic VJ, Radojkovic DP. Thrombin generation, D-dimer and protein S in uncomplicated pregnancy. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Nov;53(12):1975–9.

110. Kjellberg U, Andersson NE, Rosén S, Tengborn L, Hellgren M. APC resistance and other haemostatic variables during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost.* 1999 Apr;81(4):527–31.
111. Ohlin AK, Larsson K, Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J Thromb Haemost.* 2005 May;3(5):976–82.
112. Boffa MC, Valsecchi L, Fausto A, Gozin D, Vigano' D'Angelo S, Safa O, et al. Predictive value of plasma thrombomodulin in preeclampsia and gestational hypertension. *Thromb Haemost.* 1998 Jun;79(6):1092–5.
113. Hellgren M. Hemostasis during Normal Pregnancy and Puerperium. *Semin Thromb Hemost.* 2003 Apr;29(2):125–30.
114. He S, Bremme K, Almqvist I, Blomback M. Decrease in Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 Related More to Placental Function and Intrauterine Fetal Growth than to Severity of Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 1996 Jan;15(2):171–82.
115. Cerneca F, Ricci G, Simeone R, Malisano M, Alberico S, Guaschino S. Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997 May;73(1):31–6.
116. Kovac M, Mikovic Z, Rakicevic L, Srzentic S, Mandic V, Djordjevic V, et al. The use of D-dimer with new cutoff can be useful in diagnosis of venous thromboembolism in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Jan;148(1):27–30.
117. Giavarina D, Mezzena G, Dorizzi RM, Soffiati G. Reference interval of D-dimer in pregnant women. *Clin Biochem.* 2001 Jun;34(4):331–3.
118. Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Sato I, Suzuki M. Changes in Activity of Plasma Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2004 Mar;58(1):19–21.
119. Mousa HA, Downey C, Alfirevic Z, Toh CH. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and its fibrinolytic effect in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 2004 Nov;92(5):1025–31.
120. Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, Weiss EC, Schlembach D, Lang U, et al. Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thromb Haemost.* 2008 Feb;99(2):331–7.
121. Comeglio P, Fedi S, Liotta AA, Cellai AP, Chiarantini E, Prisco D, et al. Blood clotting activation during normal pregnancy. *Thromb Res.* 1996 Nov;84(3):199–202.
122. Mackman N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jun;24(6):1015–22.
123. Beller FK, Ebert C. The coagulation and fibrinolytic enzyme system in pregnancy and in the puerperium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1982 May;13(3):177–97.

124. Parry GC, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(11):1547–54.
125. Erlich J, Parry GCN, Fearn C, Muller M, Carmeliet P, Luther T, et al. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Jul;96(14):8138–43.
126. Kuczyński J, Uszyński W, Żekanowska E, Soszka T, Uszyński M. Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in the placenta and myometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002 Oct;105(1):15–9.
127. Lockwood CJ, Krikun G, Schatz F. Decidual Cell-Expressed Tissue Factor Maintains Hemostasis in Human Endometrium. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep;943:77–88.
128. Edstrom CS, Calhoun DA, Christensen RD. Expression of tissue factor pathway inhibitor in human fetal and placental tissues. *Early Hum Dev.* 2000 Aug;59(2):77–84.
129. Uszyński M, Żekanowska E, Uszyński W, Kuczyński J. Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in amniotic fluid and blood plasma: implications for the mechanism of amniotic fluid embolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Apr;95(2):163–6.
130. Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue Factor in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation.* 2006 Feb;113(5):722–31.
131. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Mar;96(5):2311–5.
132. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR. Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost.* 2009 Oct;102(4):728–34.
133. Boer K, Den Hollander IA, Meijers JC, Levi M. Tissue factor-dependent blood coagulation is enhanced following delivery irrespective of the mode of delivery. *J Thromb Haemost.* 2007 Dec;5(12):2415–20.
134. Dusse LM, Carvalho M, Cooper AJ, Lwaleed BA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: A potential role in pregnancy and obstetric vascular complications? *Clin Chim Acta.* 2006 Oct;372(1–2):43–6.
135. Gilabert J, Aznar J, Parrilla JJ, Regañon E, Vila V, Estelles A. Alterations in the coagulation and fibrinolysis system in pregnancy, labour and puerperium, with special reference to a possible transitory state of intravascular coagulation during labour. *Thromb Haemost.* 1978 Oct;40(2):387–96.
136. Ygge J. Changes in blood coagulation and fibrinolysis during the puerperium. *Am J Obstet Gynecol.* 1969 May;104(1):2–12.
137. Dahlman T, Hellgren M, Blombäck M. Changes in Blood Coagulation and Fibrinolysis in the Normal Puerperium. *Gynecol Obstet Invest.* 1985;20(1):37–44.

138. Perry KG, Martin JN. Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 1992 Jun;35(2):338–50.
139. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Than NG, Fareed J, Mazaki-Tovi S, et al. Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008 Dec;21(12):855–69.
140. Williams VK, Griffiths ABM, Carbone S, Hague WM. Fibrinogen Concentration and Factor VIII Activity in Women with Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2007 Jan;26(4):415–21.
141. Redman CW, Denson KW, Beilin LJ, Bolton FG, Stirrat GM. Factor-VIII consumption in pre-eclampsia. *Lancet*. 1977 Dec;2(8051):1249–52.
142. de Boer K, ten Cate JW, Sturk A, Borm JJ, Treffers PE. Enhanced thrombin generation in normal and hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 Jan;160(1):95–100.
143. Reinthaller A, Mursch-Edlmayr G, Tatra G. Thrombin-antithrombin III complex levels in normal pregnancy with hypertensive disorders and after delivery. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990 Jun;97(6):506–10.
144. Cadroy Y, Grandjean H, Pichon J, Desprats R, Berrebi A, Fournie A, et al. Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 May;100(5):416–20.
145. Tomer A. Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Jun;18(2):172–7.
146. Henderson JT, Vesco KK, Senger CA. Aspirin Use to Prevent Preeclampsia and Related Morbidity and Mortality: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2021 Sep;326(12):1192–206.
147. Aznar J, Gilabert J, Estellés A, España F. Fibrinolytic activity and protein C in preeclampsia. *Thromb Haemost*. 1986 Jun;55(3):314–7.
148. Halligan A, Bonnar J, Sheppard B, Darling M, Walshe J. Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994 Jun;101(6):488–92.
149. He S, Bremme K, Blombäck M. Acquired deficiency of antithrombin in association with a hypercoagulable state and impaired function of liver and/or kidney in preeclampsia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1997 Jun;8(4):232–8.
150. Kobayashi T, Tokunaga N, Sugimura M, Kanayama N, Terao T. Predictive Values of Coagulation/Fibrinolysis Parameters for the Termination of Pregnancy Complicated by Severe Preeclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27(2):137–41.
151. Marietta M, Simoni L, Pedrazzi P, Facchini L, D’Amico R, Facchinetti F. Antithrombin plasma levels decrease is associated with preeclampsia worsening. *Int J Lab Hematol*. 2009 Apr;31(2):227–32.

152. Maki M, Kobayashi T, Terao T, Ikenoue T, Satoh K, Nakabayashi M, et al. Antithrombin therapy for severe preeclampsia: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. BI51.017 Study Group. *Thromb Haemost.* 2000 Oct;84(4):583–90.
153. Schjetlein R, Abdelnoor M, Haugen G, Husby H, Sandset PM, Wisløff F. Hemostatic variables as independent predictors for fetal growth retardation in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999 Mar;78(3):191–7.
154. VanWijk MJ, Boer K, Berckmans RJ, Meijers JCM, van der Post JAM, Sturk A, et al. Enhanced coagulation activation in preeclampsia: the role of APC resistance, microparticles and other plasma constituents. *Thromb Haemost.* 2002 Sep;88(3):415–20.
155. Rousseau A, Favier R, Van Dreden P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: New and useful markers for pre-eclampsia? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Sep;146(1):46–9.
156. Ismail SK, Higgins JR. Hemostasis in Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost.* 2011 Mar;37(2):111–7.
157. Koh SC, Anandakumar C, Montan S, Ratnam SS. Plasminogen Activators, Plasminogen Activator Inhibitors and Markers of Intravascular Coagulation in Pre-Eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 1993;35(4):214–21.
158. Hunt BJ, Missfelder-Lobos H, Parra-Cordero M, Fletcher O, Parmar K, Lefkou E, et al. Pregnancy outcome and fibrinolytic, endothelial and coagulation markers in women undergoing uterine artery Doppler screening at 23 weeks. *J Thromb Haemost.* 2009 Jun;7(6):955–61.
159. Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood.* 1989 Sep;74(4):1332–8.
160. Lindoff C, Åstedt B. Plasminogen activator of urokinase type and its inhibitor of placental type in hypertensive pregnancies and in intrauterine growth retardation: Possible markers of placental function. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Jul;171(1):60–4.
161. Tanjung MT, Siddik HD, Hariman H, Koh SC. Coagulation and Fibrinolysis in Preeclampsia and Neonates. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005 Oct;11(4):467–73.
162. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006 Nov;96(5):553–61.
163. Szecsi PB, Jørgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost.* 2010 Apr;103(4):718–27.
164. Panteleev MA, Hemker HC. Global/integral assays in hemostasis diagnostics: promises, successes, problems and prospects. *Thromb J.* 2015 Jan;13(1):5.

165. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1993 Oct;70(4):617–24.
166. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016 May;62(5):699–707.
167. Dargaud Y, Hierso S, Rugeri L, Battie C, Gaucherand P, Negrier C, et al. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment 1+2 and D-dimers during pregnancy. *Thromb Haemost.* 2010 Feb;103(2):469–71.
168. Joly B, Barbay V, Borg JY, Le Cam-Duchez V. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thromb Res.* 2013 Sep;132(3):386–91.
169. Bagot CN, Leishman E, Onyiaodike CC, Jordan F, Freeman DJ. Normal pregnancy is associated with an increase in thrombin generation from the very early stages of the first trimester. *Thromb Res.* 2017 Sep;157:49–54.
170. Eichinger S, Weltermann A, Philipp K, Hafner E, Kaider A, Kittl EM, et al. Prospective evaluation of hemostatic system activation and thrombin potential in healthy pregnant women with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 1999 Oct;82(4):1232–6.
171. Ku DH, Arkel YS, Paidas MP, Lockwood CJ. Circulating levels of inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), resistance to activated protein C, thrombin and fibrin generation in uncomplicated pregnancies. *Thromb Haemost.* 2003 Dec;90(6):1074–9.
172. Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, Weiss EC, Schlembach D, Lang U, et al. Thrombin generation in women with preeclampsia. *Hamostaseologie.* 2008 Jan;28(S 01):S81-s82.
173. Macey MG, Bevan S, Alam S, Verghese L, Agrawal S, Beski S, et al. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb Res.* 2010 Mar;125(3):e76–81.
174. He S, Antovic A, Blombäck M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostasis potential in plasma. II. Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res.* 2001 Sep;103(5):355–61.
175. Antovic A. The Overall Hemostasis Potential: A Laboratory Tool for the Investigation of Global Hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Oct;36(7):772–9.
176. Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, et al. Influence of Fibrin Network Conformation and Fibrin Fiber Diameter on Fibrinolysis Speed: Dynamic and Structural Approaches by Confocal Microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1354–61.
177. He S, Bremme K, Blombäck M. A Laboratory Method for Determination of Overall Haemostatic Potential in Plasma. I. Method Design and Preliminary Results. *Thromb Res.* 1999 Oct;96(2):145–56.

178. Antovic JP, Rafik Hamad R, Antovic A, Blombäck M, Bremme K. Does thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) contribute to impairment of fibrinolysis in patients with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation? *Thromb Haemost.* 2002 Oct;88(4):644–7.
179. Martínez-Zamora MA, Tassies D, Carmona F, Espinosa G, Cervera R, Reverter JC, et al. Clot lysis time and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in severe preeclampsia with or without associated antiphospholipid antibodies. *J Reprod Immunol.* 2010 Nov;86(2):133–40.
180. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967 May;13(3):269–88.
181. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018 Nov;7(1):1535750.
182. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):15–26.
183. Simak J, Gelderman MP. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers. *Transfus Med Rev.* 2006 Jan;20(1):1–26.
184. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005 Sep;106(5):1604–11.
185. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost.* 2003 Jul;1(7):1655–62.
186. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3337–48.
187. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci.* 2004 May;9:1118–35.
188. Spronk HM, ten Cate H, van der Meijden PE. Differential roles of Tissue Factor and Phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thromb Res.* 2014 May;133 Suppl 1:S54–6.
189. Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* 2003 Dec;1(12):2561–8.
190. Bach RR. Tissue Factor Encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Mar;26(3):456–61.

191. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem.* 1989 Oct;264(29):17049–57.
192. Lok CA, Snijder KS, Nieuwland R, Van Der Post JA, de Vos P, Faas MM. Microparticles of pregnant women and preeclamptic patients activate endothelial cells in the presence of monocytes. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Mar;67(3):206–15.
193. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circ Res.* 2011 May;108(10):1284–97.
194. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, et al. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2010 Sep;104(3):456–63.
195. Lok CA, Van Der Post JA, Sargent IL, Hau CM, Sturk A, Boer K, et al. Changes in Microparticle Numbers and Cellular Origin During Pregnancy and Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2008 Jan;27(4):344–60.
196. Desprez D, Zobairi F, Aucouturier JS, Leymarie F, Freyssinet JM, Grunebaum L, et al. Evolution of circulating procoagulant microparticles during normal pregnancy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008 Mar;19(2):179–81.
197. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, et al. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost.* 2003 Mar;89(3):486–92.
198. Alijotas-Reig J, Palacio-Garcia C, Farran-Codina I, Ruiz-Romance M, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Circulating Cell-Derived Microparticles in Severe Preeclampsia and in Fetal Growth Restriction. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Feb;67(2):140–51.
199. Lok CA, Van der Post JA, Sturk A, Sargent IL, Nieuwland R. The functions of microparticles in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2011 Jan;1(1):59–65.
200. Alijotas-Reig J, Palacio-Garcia C, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertil Steril.* 2013 Feb;99(2):441–9.
201. Salomon O, Katz BZ, Dardik R, Livnat T, Steinberg DM, Achiron R, et al. Plasma levels of microparticles at 24 weeks of gestation do not predict subsequent pregnancy complications. *Fertil Steril.* 2009 Aug;92(2):682–7.
202. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: Possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Aug;187(2):450–6.
203. Biró E, Lok CA, Hack CE, van der Post JA, Schaap MC, Sturk A, et al. Cell-Derived Microparticles and Complement Activation in Preeclampsia Versus Normal Pregnancy. *Placenta.* 2007 Aug;28(8–9):928–35.

204. Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F, et al. Shed Membrane Particles from Preeclamptic Women Generate Vascular Wall Inflammation and Blunt Vascular Contractility. *Am J Pathol.* 2006 Oct;169(4):1473–83.
205. González-Quintero VH, Jiménez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, O’Sullivan MJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Aug;189(2):589–93.
206. Lok CA, Nieuwland R, Sturk A, Hau CM, Boer K, Vanbavel E, et al. Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. *Platelets.* 2007 Feb;18(1):68–72.
207. González-Quintero VH, Smarkusky LP, Jiménez JJ, Mauro LM, Jy W, Hortsman LL, et al. Elevated plasma endothelial microparticles: Preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Oct;191(4):1418–24.
208. Germain SJ, Sacks GP, Soorana SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic Inflammatory Priming in Normal Pregnancy and Preeclampsia: The Role of Circulating Syncytiotrophoblast Microparticles. *J Immunol.* 2007 May;178(9):5949–56.
209. Aharon A, Katzenell S, Tamari T, Brenner B. Microparticles bearing tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in gestational vascular complications. *J Thromb Haemost.* 2009 Jun;7(6):1047–50.
210. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset preeclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta.* 2006 Jan;27(1):56–61.
211. Hemker HC, Béguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):134–8.
212. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ. Heritability of Clot Formation, Morphology, and Lysis: The EuroCLOT Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2783–9.
213. Lagrange J, Didelot M, Mohamadi A, Walton LA, Bloemen S, de Laat B, et al. Implication of Free Fatty Acids in Thrombin Generation and Fibrinolysis in Vascular Inflammation in Zucker Rats and Evolution with Aging. *Front Physiol.* 2017 Nov 22;8:949.
214. Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, Hansson M, Jörneskog G, Hultenby K, et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. *Thromb Res.* 2010 Mar;125(3):e110–6.
215. Howson CP, Kinney MV, Lawn JE. March of Dimes, PMNCH, Save the children, WHO. Born too soon: the global action report on preterm birth. Geneva: World Health Organization; 2012.
216. Kajantie E, Eriksson JG, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Pre-Eclampsia Is Associated With Increased Risk of Stroke in the Adult Offspring: The Helsinki Birth Cohort Study. *Stroke.* 2009 Apr;40(4):1176–80.

217. Ozanne SE, Fernandez-Twinn D, Hales CN. Fetal growth and adult diseases. *Semin Perinatol.* 2004 Feb;28(1):81–7.
218. Williams D. Pregnancy: a stress test for life. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003 Dec;15(6):465–71.
219. Roberts JM. Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998 Mar;16(01):5–15.
220. Rodie V, Freeman DJ, Sattar N, Greer IA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? *Atherosclerosis.* 2004 Aug;175(2):189–202.
221. Barron W, Heckerling P, Hibbard JU, Fisher S. Reducing unnecessary coagulation testing in hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1999 Sep;94(3):364–70.
222. Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta J, Borrell M, Miralles RM, Cabero L. Coagulation and Fibrinolysis Parameters in Normal and in Hypertensive Pregnancies. *Hypertens Pregnancy.* 1998 Jul;17(2):115–23.
223. Schjetlein R, Haugen G, Wisløff F. Markers of intravascular coagulation and fibrinolysis in preeclampsia: association with intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997 Jul;76(6):541–6.
224. Pinheiro MB, Gomes KB, Dusse LM. Fibrinolytic system in preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2013 Feb;416:67–71.
225. Kevane B, Donnelly J, D’Alton M, Cooley S, Preston RJ, Ní Ainle F. Risk factors for pregnancy-associated venous thromboembolism: a review. *J Perinat Med.* 2014 Jul;42(4):417–25.
226. Eskild A, Vatten LJ. Abnormal bleeding associated with preeclampsia: A population study of 315,085 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009 Jan;88(2):154–8.
227. Rafik Hamad R, Curvers J, Berntorp E, Eriksson M, Bremme K. Increased thrombin generation in women with a history of preeclampsia. *Thromb Res.* 2009 Feb;123(4):580–6.
228. Heit JA, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ 3rd. Trends in the Incidence of Venous Thromboembolism during Pregnancy or Postpartum: A 30-Year Population-Based Study. *Ann Intern Med.* 2005 Nov;143(10):697–706.
229. Sultan AA, West J, Tata LJ, Fleming KM, Nelson-Piercy C, Grainge MJ. Risk of first venous thromboembolism in and around pregnancy: a population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2012 Feb;156(3):366–73.
230. Liu S, Liston RM, Joseph KS, Heaman M, Sauve R, Kramer MS, et al. Maternal Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. Maternal mortality and severe morbidity associated with low-risk planned cesarean delivery versus planned vaginal delivery at term. *CMAJ.* 2007 Feb;176(4):455–60.

231. Alacacıoğlu İ, Özcan MA, Alacacıoğlu A, Polat M, Yüksel F, Demirkan F, et al. Plasma levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in normal and preeclamptic pregnant women. *Thromb Res.* 2004;114(3):155–9.
232. Duse LM, Cooper AJ, Lwaleed BA. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): A role in pre-eclampsia? *Clin Chim Acta.* 2007 Mar;378(1–2):1–6.
233. Undas A. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. *Thromb Haemost.* 2014 Jul;112(1):32–42.
234. Bridge KI, Philippou H, Ariëns R. Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2014 Nov;112(5):901–8.
235. Tehrani S, Jörneskog G, Ågren A, Lins PE, Wallén H, Antovic A. Fibrin clot properties and haemostatic function in men and women with type 1 diabetes. *Thromb Haemost.* 2015 Feb;113(2):312–8.
236. Weisel JW, Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.* 1992 Jul;63(1):111–28.
237. Sjøland JA, Sidelmann JJ, Brabrand M, Pedersen RS, Pedersen JH, Esbensen K, et al. Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease. *Thromb Haemost.* 2007 Aug;98(2):339–45.
238. Haire G, Egan K, Parmar K, McKinnon T, Monteith C, O'Connor H, et al. Alterations in fibrin formation and fibrinolysis in early onset-preeclampsia: Association with disease severity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019 Oct;241:19–23.
239. Undas A, Plicner D, Stepień E, Drwiła R, Sadowski J. Altered fibrin clot structure in patients with advanced coronary artery disease: a role of C-reactive protein, lipoprotein(a) and homocysteine. *J Thromb Haemost.* 2007 Sep;5(9):1988–90.
240. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013 Mar;121(10):1712–9.
241. Campbell RA, Overmyer KA, Selzman CH, Sheridan BC, Wolberg AS. Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood.* 2009 Nov;114(23):4886–96.
242. Duse LM, Rios DR, Pinheiro MB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Pre-eclampsia: Relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Clin Chim Acta.* 2011 Jan;412(1–2):17–21.
243. Weenink GH, Borm JJ, Ten Cate JW, Treffers PE. Antithrombin III Levels in Normotensive and Hypertensive Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1983;16(4):230–42.
244. Kobayashi T, Terao T. Preeclampsia as chronic disseminated intravascular coagulation. Study of two parameters: thrombin-antithrombin III complex and D-dimers. *Gynecol Obstet Invest.* 1987;24(3):170–8.

245. Barton JR, Sibai BM. Care of the pregnancy complicated by HELLP syndrome. *Gastroenterol Clin North Am.* 1992 Dec;21(4):937–50.
246. Higgins JR, Walshe JJ, Darling MR, Norris L, Bonnar J. Hemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Aug;179(2):520–6.
247. Hayashi M, Inoue T, Hoshimoto K, Negishi H, Ohkura T, Inaba N. Characterization of five marker levels of the hemostatic system and endothelial status in normotensive pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Haematol.* 2002 Nov;69(5–6):297–302.
248. Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T. Thrombin-antithrombin complex and α_2 -plasmin inhibitor-plasmin complex levels after cesarean section in normal pregnancies and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003 Aug;82(2):213–6.
249. Xiong Y, Zhou SF, Zhou R, Yang D, Xu ZF, Lou YT, et al. Alternations of Maternal and Cord Plasma Hemostasis in Preeclampsia Before and After Delivery. *Hypertens Pregnancy.* 2011 Aug;30(3):347–58.
250. Réger B, Péterfalvi A, Litter I, Pótó L, Mózes R, Tóth O, et al. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thromb Res.* 2013 Apr;131(4):e183–7.
251. Hale SA, Sobel B, Benvenuto A, Schonberg A, Badger GJ, Bernstein IM. Coagulation and fibrinolytic system protein profiles in women with normal pregnancies and pregnancies complicated by hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 2012 Apr;2(2):152–7.
252. Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2000 Jan;83(1):5–9.
253. España F, Gilabert J, Aznar J, Estellés A, Kobayashi T, Griffin JH. Complexes of activated protein C with α_1 -antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 May;164(5 Pt 1):1310–6.
254. Witsenburg CP, Rosendaal FR, Middeldorp JM, Van der Meer FJ, Scherjon SA. Factor VIII levels and the risk of pre-eclampsia, HELLP syndrome, pregnancy related hypertension and severe intrauterine growth retardation. *Thromb Res.* 2005;115(5):387–92.
255. Paternoster DM, Fantinato S, Stella A, Nanhornguè KN, Milani M, Plebani M, et al. C-Reactive Protein in Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006 Jul;12(3):330–7.
256. Harsem NK, Roald B, Braekke K, Staff AC. Acute Atherosclerosis in Decidual Tissue: Not Associated with Systemic Oxidative Stress in Preeclampsia. *Placenta.* 2007 Aug;28(8–9):958–64.
257. Airoidi J, Weinstein L. Clinical Significance of Proteinuria in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2007 Feb;62(2):117–24.

258. Lippi G, Albiero A, Montagnana M, Salvagno GL, Scevarolli S, Franchi M, et al. Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. *Clin Lab*. 2007;53(3–4):173–7.
259. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep;407(6801):233–41.
260. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids Health Dis*. 2010 Jun;9:58.
261. Kaaja R. Lipid abnormalities in pre-eclampsia: implications for vascular health. *Clinical Lipidology*. 2011 Feb;6(1):71–8.
262. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010 Dec;31(23):2844–53.
263. Hajjar KA, Gavishi D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature*. 1989 May;339(6222):303–5.
264. Manten GT, Franx A, van der Hoek YY, Hameeteman TM, Voorbij HAM, Smolders HC, et al. Changes of plasma lipoprotein(a) during and after normal pregnancy in Caucasians. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2003 Aug;14(2):91–5.
265. Fanshawe AE, Ibrahim M. The current status of lipoprotein (a) in pregnancy: A literature review. *J Cardiol*. 2013 Feb;61(2):99–106.
266. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005 Mar;330(7491):565.
267. Heilmann L, Schorsch M, Hahn T, Fared J. Antiphospholipid Syndrome and Pre-Eclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2011 Mar;37(2):141–5.
268. Lee RM, Brown MA, Branch DW, Ward K, Silver RM. Anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein-I antibodies in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003 Aug;102(2):294–300.
269. Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. Early and Late Preeclampsia: Two Different Maternal Hemodynamic States in the Latent Phase of the Disease. *Hypertension*. 2008 Nov;52(5):873–80.
270. Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2000 Jan;19(2):221–31.
271. Halim A, Bhuiyan AB, Azim FA, Khatun S, Kanayama N, El Maradny E, et al. Blood Coagulation and Fibrinolysis in Eclamptic Patients and Their Correlation with the Clinical Signs. *Gynecol Obstet Invest*. 1995;39(2):97–102.
272. Minakami H, Watanabe T, Izumi A, Matsubara S, Koike T, Sayama M, et al. Association of a decrease in antithrombin III activity with a perinatal elevation in aspartate aminotransferase in women with twin pregnancies: relevance to the HELLP syndrome. *J Hepatol*. 1999 Apr;30(4):603–11.

273. Terao T, Kobayashi T, Imai N, Oda H, Karasawa T. Pathological State of the Coagulatory and Fibrinolytic System in Preeclampsia and the Possibility of Its Treatment with AT III Concentrate. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol.* 1989 Mar;15(1):25–32.
274. Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F, Milani M, Nicolini U, Girolami A. Efficacy of AT in pre-eclampsia: a case-control prospective trial. *Thromb Haemost.* 2004 Feb;91(2):283–9.
275. Joseph G, Hladunewich M. Renal Disease in Pregnancy. *Obstet Med.* 2009 Sep;2(3):130.
276. Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014 Jul;36(7):575–6.
277. Zhu YC, Lin L, Li BY, Li XT, Chen DJ, Zhao XL, et al. Incidence and Clinical Features of Fetal Growth Restriction in 4 451 Women with Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Mat Fetal Med.* 2020 Oct;2(4):207–10.
278. He S, Bremme K, Blombäck M. Fibrin d-Dimer Levels in Preeclamptic Pregnancies with Birth of Small-for-Gestational-Age Neonates. *Hypertens Pregnancy.* 1998 Jan;17(2):217–26.
279. Spinillo A, Cesari S, Bariselli S, Tzialla C, Gardella B, Silini EM. Placental lesions associated with oligohydramnios in fetal growth restricted (FGR) pregnancies. *Placenta.* 2015 May;36(5):538–44.
280. Daigo K, Inforzato A, Barajon I, Garlanda C, Bottazzi B, Meri S, et al. Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. *Immunol Rev.* 2016 Nov;274(1):202–17.
281. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The Evolving Role of C-Reactive Protein in Atherothrombosis. *Clin Chem.* 2009 Feb;55(2):229–38.
282. Herrera E. Lipid Metabolism in Pregnancy and its Consequences in the Fetus and Newborn. *Endocrine.* 2002 Oct;19(1):43–55.
283. van Rijn BB, Hoeks LB, Bots ML, Franx A, Bruinse HW. Outcomes of subsequent pregnancy after first pregnancy with early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Sep;195(3):723–8.
284. Committee Opinion No. 644: The Apgar Score. *Obstet Gynecol.* 2015 Oct;126(4):e52–5.
285. Aharon A, Brenner B. Microparticles and pregnancy complications. *Thromb Res.* 2011 Feb;127 Suppl 3:S67-71.
286. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-l-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov;1667(1):82–90.

287. Freeman DJ, Tham K, Brown EA, Rumley A, Lowe GD, Greer IA. Fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA, but not phosphatidylserine-exposing microparticles, in maternal plasma are associated with factor VII activity in pre-eclampsia. *J Thromb Haemost.* 2008 Mar;6(3):421–7.
288. Mobarrez F, Mikovic D, Antovic A, Antovic JP. Is a decrease of microparticles related to improvement of hemostasis after FVIII injection in hemophilia A patients treated on demand? *J Thromb Haemost.* 2013 Apr;11(4):697–703.
289. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived Microparticles Circulate in Healthy Humans and Support Low Grade Thrombin Generation. *Thromb Haemost.* 2001 Apr;85(4):639–46.
290. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem.* 1981 Nov;256(21):11128–31.
291. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997 May;99(9):2118–27.
292. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001 Oct;158(2):277–87.
293. Weber A, Köppen HO, Schrör K. Platelet-Derived Microparticles Stimulate Coronary Artery Smooth Muscle Cell Mitogenesis by a PDGF-Independent Mechanism. *Thromb Res.* 2000 Jun;98(5):461–6.
294. Tripisciano C, Weiss R, Eichhorn T, Spittler A, Heuser T, Fischer MB, et al. Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin. *Sci Rep.* 2017 Jul;7(1):6522.
295. Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J Thromb Haemost.* 2011 Nov;9(11):2251–61.
296. He Y, Xu B, Song D, Yu F, Chen Q, Zhao M. Expression of the complement system's activation factors in plasma of patients with early/late-onset severe pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2016 Sep;76(3):205–11.
297. Derzsy Z, Prohászka Z, Rigó J Jr, Füst G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol.* 2010 Apr;47(7–8):1500–6.
298. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 2003 Feb;109(4):175–80.
299. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost.* 2003 Nov;1(11):2434–43.

300. Dignat-George F, Boulanger CM. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):27–33.
301. Katzenell S, Shomer E, Zipori Y, Zylberfisz A, Brenner B, Aharon A. Characterization of negatively charged phospholipids and cell origin of microparticles in women with gestational vascular complications. *Thromb Res.* 2012 Sep;130(3):479–84.
302. Petrozella L, Mahendroo M, Timmons B, Roberts S, McIntire D, Alexander JM. Endothelial microparticles and the antiangiogenic state in preeclampsia and the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Aug;207(2):140.e20-6.
303. Marques FK, Campos FM, Filho OA, Carvalho AT, Dusse LM, Gomes KB. Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2012 Dec;414:253–8.
304. Abid Hussein MN, Böing AN, Biró É, Hoek FJ, Vogel GM, Meuleman DG, et al. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res.* 2008;121(6):865–71.
305. Pérez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood.* 2005 Feb;105(4):1515–22.
306. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, Doeuvre L, Sabatier F, Martinez de Lizarrondo S, et al. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica.* 2012 Dec;97(12):1864–72.
307. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994 May;8(8):504–12.
308. Gearing AJ, Hemingway I, Pigoit R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble Forms of Vascular Adhesion Molecules, E-Selectin, ICAM-1, and VCAM-1: Pathological Significance. *Ann NY Acad Sci.* 1992 Dec;667:324–31.
309. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood.* 2002 Jun;99(11):3962–70.
310. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995 Jan;102(1):20–5.
311. Clark ET, Desai TR, Hynes KL, Gewertz BL. Endothelial Cell Response to Hypoxia-Reoxygenation Is Mediated by IL-1. *J Surg Res.* 1995 Jun;58(6):675–81.
312. Heyl W, Handt S, Reister F, Gehlen J, Mittermayer C, Rath W. The role of soluble adhesion molecules in evaluating endothelial cell activation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Jan;180(1 Pt 1):68–72.
313. Chaiworapongsa T, Romero R, Yoshimatsu J, Espinoza J, Kim YM, Park K, et al. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002 Jul;12(1):19–27.

314. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Nijpels G, Dekker JM, et al. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn study. *Diabetes*. 2000 Mar;49(3):485–91.
315. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al. Circulating Cell Adhesion Molecules and Death in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2001 Sep;104(12):1336–42.
316. Radecke C, Warrick A, Singh G, Rogers J, Simon S, Armstrong E. Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2015 May;113(03):605–16.
317. Mobarrez F, Vikerfors A, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Zickert A, Larsson A, et al. Microparticles in the blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE): phenotypic characterization and clinical associations. *Sci Rep*. 2016 Oct;6:36025.
318. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2000 Feb;101(8):841–3.
319. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):93–102.
320. Key NS. Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb Res*. 2010 Apr;125 Suppl 1(Suppl 1):S42–5.
321. Montoro-García S, Shantsila E, Marín F, Blann A, Lip GY. Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basic Res Cardiol*. 2011 Nov;106(6):911–23.
322. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, et al. Cell-Derived Microparticles Generated in Patients During Cardiopulmonary Bypass Are Highly Procoagulant. *Circulation*. 1997 Nov;96(10):3534–41.
323. Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer LC, Choong S, Panoskaltis-Mortari A, et al. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*. 2004 Aug;104(3):840–6.
324. van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):211–20.
325. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000 Feb;95(3):930–5.

326. Marsik C, Quehenberger P, Mackman N, Osterud B, Luther T, Jilma B. Validation of a novel tissue factor assay in experimental human endotoxemia. *Thromb Res.* 2003 Jan;111(4-5):311-5.
327. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, Torry RJ, Torry DS. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 May;184(6):1267-72.
328. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, et al. First Trimester Placental Growth Factor and Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 and Risk for Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):770-5.
329. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med.* 2012 Jan;44(1):1-9.
330. Staff AC, Benton SJ, von Dadelszen P, Roberts JM, Taylor RN, Powers RW, et al. Redefining Preeclampsia Using Placenta-Derived Biomarkers. *Hypertension.* 2013 May;61(5):932-42.
331. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of Syncytiotrophoblast Vesicles in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia: Expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS ONE.* 2013 Feb;8(2):e56754.
332. Lok CA, Böing AN, Sargent IL, Sooranna SR, van der Post JA, Nieuwland R, et al. Circulating Platelet-derived and Placenta-derived Microparticles Expose Flt-1 in Preeclampsia. *Reprod Sci.* 2008 Dec;15(10):1002-10.
333. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.* 2008 Jan;75(1):1-8.
334. Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, Torry RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig.* 2003 May;10(4):178-88.
335. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PIGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol.* 2003 Oct;60(1):53-60.
336. Wikström AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Olovsson M. Early postpartum changes in circulating pro- and anti-angiogenic factors in early-onset and late-onset pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008 Jan;87(2):146-53.
337. Soto E, Romero R, Kusanovic JP, Ogge G, Hussein Y, Yeo L, et al. Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 May;25(5):498-507.
338. Mitlid-Mork B, Turowski G, Bowe S, Staff AC, Sugulle M. Circulating angiogenic profiles and histo-morphological placental characteristics of uncomplicated post-date pregnancies. *Placenta.* 2021 Jun;109:55-63.

8. PRILOZI

8.1. Prilog 1 – „Saglasnost za učešće u ispitivanju“ (formular)

SAGLASNOST ZA UČEŠĆE U ISPITIVANJU MARKERA AKTIVIRANE HEMOSTAZE I INFLAMACIJE I NJIHOVOG ZNAČAJA U OTKRIVANJU I PRAĆENJU PREEKLAMPSIJE

OBAVEŠTENJE O ISPITIVANJU

Preeklampsija se javlja u toku druge polovine trudnoće kod oko 5% trudnica, a klinički se manifestuje povišenim krvnim pritiskom i proteinurijom sa ili bez pojave edema. Uzroci i način nastanka preeklampsije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Ovo ispitivanje ima za cilj utvrđivanje potencijalne uloge markera aktivirane hemostaze i inflamacije u predviđanju nastanka i praćenju preeklampsije, i da na taj način doprinese poboljšanju praćenja i tretmana trudnica kod kojih se kao komplikacija javlja preeklampsija.

Nakon što mi je detaljno objašnjen cilj ispitivanja i nakon dobijanja odgovora na sva postavljena pitanja u vezi sa ovim ispitivanjem, dajem dobrovoljnu saglasnost za učešće u ispitivanju pod nazivom „Značaj markera aktivirane hemostaze i inflamacije u otkrivanju i praćenju preeklampsije”.

Jasno mi je da za potrebe ispitivanja pristajem da dam uzorak venske krvi od tri epruvete od 4,5 mL za određivanje testova hemostaze i inflamacije, kao i da dam podatke koji su vezani za moju sadašnju trudnoću, podatke o prethodnim trudnoćama i o postojanju preeklampsije i eklampsije u porodici.

Takođe mi je jasno predočeno da za učešće u ovom ispitivanju ne dobijam nikakvu materijalnu naknadu i da je učešće potpuno dobrovoljno i ni na koji način obavezujuće, kao i da odbijanje učešća ni na koji način ne može remetiti moje redovno lečenje ili kontrole.

Ime i prezime ispitanice

Datum

Ime i prezime istraživača

Datum

8.2. Prilog 2 – „Upitnik za ispitanice“ (standardizovani upitnik br. 1)

UPITNIK ZA ISPITANICE

I OPŠTI PODACI

1. Godina rođenja _____
2. Gestaciona nedelja _____
3. Telesna težina _____
4. Visina _____

II ZDRAVSTVENI PODACI

1. Da li ste pušač? DA NE

2. Da li bolujete ili ste lečeni od neke bolesti:
srca, pluća, bubrega, jetre, želuca i creva,
kostiju i zglobova, nervnog sistema,
krvi i krvnih sudova, malignih oboljenja? DA NE

3. Da li koristite neke lekove? DA NE

Ako je odgovor potvrđan zaokružiti koje:

- a) antihipertenzivne lekove
- b) hormonsku terapiju
- c) dijetetske preparate / vitamine
- d) antiagregacijske lekove (Aspirin®, Plavix® i sl.)
- e) druge lekove, navesti koje _____

8.3. Prilog 3 – „Podaci o ispitanicama“ (standardizovani upitnik br. 2)

Podaci o ispitanicama

I OPŠTI PODACI na prijemu

1. Ime i prezime _____
2. Godina rođenja _____
3. Gestaciona nedelja _____
4. Telesna težina _____
5. Visina _____

II ZDRAVSTVENI PODACI

1. Prethodno prisustvo bolesti:
srca, pluća, bubrega, jetre, želuca i creva, DA NE
kostiju i zglobova, nervnog sistema,
krvi i krvnih sudova, malignih oboljenja?

Ako je odgovor potvrđan zaokružiti ili navesti:

- f) diabetes melitus
- g) bolesti bubrega
- h) esencijalna hipertenzija
- i) sistemske bolesti
- j) prethodno lečene bolesti kardiovaskularnog sistema koje zahtevaju primenu
antikoagulantne terapije
- k) druge bolesti, navesti koje _____

2. Da li su primenjivani lekovi? DA NE

Ako je odgovor potvrdan zaokružiti ili navesti primenjene lekove:

- l) antihipertenzivni lekovi _____
- m) hormonska terapija _____
- n) dijetetski preparati / vitamini _____
- o) antikoagulantna terapija (OAT, LMWH) ili antiagregacijski lekovi (Aspirin®, Plavix® i sl.), navesti koji

- p) drugi lekovi, navesti koji _____

3. Da li je bilo komplikacija u toku hospitalizacije? DA NE

Ako je odgovor pozitivan zaokružiti jedan od ponuđenih odgovora

- a) cerebralni poremećaji (poremećaj vida, skotom, glavobolja, cerebrovaskularni događaji)
- b) epigastrični bol ili bol u gornjem desnom kvadrantu
- c) bubrežna insuficijencija
- d) plućni edem
- e) poremećaj funkcije jetre (2x ili više povećanje serumskih transaminaza)
- f) infekcije
- g) trombocitopenija (≤ 100.000 trombocita/mm³)
- h) eklampsija (generalizovane konvulzije)
- i) HELLP sindrom
- j) drugo, navesti koje _____

Konačna dijagnoza _____

III KLINIČKI PODACI (iz bolničke istorije)

1. Vrednost krvnog pritiska na prijemu _____
2. Vrednost proteinurije _____
3. Prisustvo edema DA NE
4. Vrednosti biohemijskih parametara (transaminaze, bilirubin, urea, kreatinin, holesterol, LDL C, HDL C, trigliceridi)

5. KKS/broj trombocita _____
6. Ishod trudnoće _____

Gestaciona nedelja na porođaju _____

Status majke _____

Težina novorođenčeta _____

Visina novorođenčeta _____

Apgar skor _____

Da li je bilo komplikacija po plod (IUGR,FMU)? _____

Biografija autora

Sanja Lalić-Ćosić rođena je 1976. godine u Sarajevu. Diplomirala je 2004. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer medicinska biohemija, sa prosečnom ocenom 9,00. Obavezan pripravnički staž za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare obavila je u Institutu za medicinsku biohemiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, gde je u biohemijskoj laboratoriji Klinike za urologiju volontirala do prijema u stalni radni odnos u kompaniji „Interlab exim“ u martu 2006. godine. Od aprila 2021. godine zaposlena je u kompaniji „Yunycom“ na mestu rukovodioca sektora za hemostazu. Stručni ispit je položila januara 2006. godine.

Doktorske akademske studije – modul Medicinska biohemija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2012/13. godine. U okviru međunarodnog programa za razmenu studenata doktorskih studija Erasmus + (Key Action 1) provela je 6 meseci na Odeljenju za medicinu Solna, Karolinska Instituta u Štokholmu, Švedska. Tokom ovog studijskog boravka u laboratoriji za kliničku hemiju i istraživanje koagulacije krvi bila je deo međunarodne istraživačke grupe sa preko 50 članova i radila je na projektu „Hemostatski parametri kod trudnica sa preeklampsijom” u okviru kog je savladala metodologiju i izvođenje testa Ukupni hemostatski potencijal (Overall Haemostatic Potential – OHP) i učestvovala u ispitivanju primene pomenute metode za određivanje parametara fibrinskog ugruška.

Autor je 1 rada objavljenog u nacionalnom časopisu i 7 radova objavljenih u međunarodnim časopisima. Takođe, autor je 3 posterske prezentacije i bila je jedan od predavača na 15. Beogradskom Simpozijumu za balkanski region 2019. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сања Лалић-Ћосић

број уписа 13/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање значаја маркера хиперкоагулабилности и глобалних хемостатских тестова у трудноћи компликованој прееклампсијом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2022.

Сања Лалић-Ћосић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Лалић-Ћосић

Број уписа 13/12

Студијски програм Докторске академске студије из медицинске биохемије

Наслов рада Испитивање значаја маркера хиперкоагулабилности
и глобалних хемостатских тестова у трудноћи компликованој прееклампсијом

Ментор Проф. др Виолета Допсај

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2022.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање значаја маркера хиперкоагулабилности и глобалних хемостатских тестова у трудноћи компликованој прееклампсијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2022.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.