

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

DRAGANA N. MAGLIĆ

PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH
UROĐENIM TROMBOFILIJAMA

Doktorska disertacija

Beograd 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

DRAGANA N. MAGLIĆ

EVALUATION OF PREGNANCY OUTCOME
COMPLICATED BY INHERITED THROMBOPHYLIAS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

DRAGANA N. MAGLIĆ

PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH
UROĐENIM TROMBOFILIJAMA

Doktorska disertacija

Beograd 2016

MENTOR

Prof dr Željko Miković, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR

Dr sc. Jelena Bogdanović Pristov, komentor VNS Institut za multidisciplinarna
istraživanja, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Darko Plećaš, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije

Prof. dr Amira Hajrić Egić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije

Prof, dr Zorica Grujić, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, član komisije

Datum odbrane _____

Zahvaljujem se Prof. dr Željku Mikoviću na razumevanju i podršci u svakodnevnom radu na odeljenju kao i pomoći oko definisanja teme i korisnim sugestijama tokom pisanja rada.

Zahvalnost dugujem Ass dr Vesni Mandić - Marković na nesebičnoj pomoći prilikom kliničke obrade ispitanica, korisnim savetima i sugestijama.

Najiskrenije se zahvaljujem v. prof. dr Jeleni Bogdanović Pristor na pomoći prilikom eksperimentalne faze određivanja laboratorijskih parametara u laboratorijama Instituta za multidisciplinarna istraživanja

Zahvaljujem se kolegama i osoblju odeljenja Visoko rizičnih trudnoća i Kliničko biohemijske i hematološke laboratorije GAK „Narodni Front“ na pomoći prilikom sakupljanja uzoraka.

Svim ostalim profesorima i kolegama Instituta za medicinsku biohemiju i GAK „Narodni Front“, prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli najiskrenije se zahvaljujem.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, Luki, Nini i Rastku na bezgraničnom strpljenju, podršci i razumevanju.

PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH UROĐENIM TROMBOFILIJAMA

SAŽETAK

UVOD: Trudnice sa urođenom trombofilijom imaju veći rizik za razvoj venskih tromboembolijskih komplikacija, spontanih i habitualnih pobačaja, preeklampsije, intrauterusnog zastoja u rastu ploda i abrupcije posteljice. Etiopatogeneza obstetričkih komplikacija kod trombofilije nije jasno definisana, što je i jedan od razloga povremenih neuspeha terapije. Ključni faktor za normalan razvoj trudnoće je kontakt između fetalne i maternalne cirkulacije, kao i ravnoteža između koagulacije i fibrinolize u posteljici na nivou hemohorionske membrane. Najčešće se govori o trombozi fetoplacentne cirkulacije kao uzroku obstetričkih komplikacija kod trudnica sa urođenom trombofilijom. S obzirom na značajan broj neuspelih trudnoća i uz primenjenu antikoagulantnu terapiju, evidentno je da postoje i drugi uzroci obstetričkih komplikacija u trudnoćama sa naslednom trombofilijom. Obstetričke komplikacije tokom drugog i trećeg trimestra kod trudnica sa trombofilijom su slične komplikacijama preeklampsije. Kod trudnica sa preeklampsijom je dokazan porast koncentracije reaktivnih kiseoničkih vrsta kao i smanjena aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja, što za posledicu ima endotelijalnu disfunkciju, neadekvatnu invaziju trofoblasta i hipoperfuziju posteljice što pojačava oksidativni stres. Hipoteza studije bi bila, da je u trudnoćama sa naslednom trombofilijom oksidativni stres uzrok komplikacija.

CILJ RADA: Uticaj primene LMWH kod pacijentkinja sa opterećenom akušerskom anamnezom i dokazanom urođenom trombofilijom na broj živorođene dece i pojavu komplikacija u trudnoći (spontani pobačaj, intrauterusna smrt ploda, abrupcija posteljice, PE, IUGR, VTE). Ispitati i uporedi aktivnost antioksidativnog enzimskog zaštitnog sistema u krvi trudnica obolelih od trombofilije i zdravih trudnica nakon porodjaja.

METODOLOGIJA: Longitudinalnom studijom je obuhvaćeno 60 trudnica koje su bile hospitalizovane i kontrolisane u GAK "Narodni Front" u Beogradu u toku 2013 godine, a kod kojih je dijagnoza urođene trombofilije postavljena pre ispitivane trudnoće. Svim trudnicama uključenim u ispitivanje prvi put je ordinirana antikoagulantna terapija u vidu nisko molekularnog heparina.

Svi pregledi su vršeni i uzorci krvi uzimani tokom planiranih hospitalizacija: u prvom, drugom, trećem trimestru, neposredno pred porođaj i 2 dana nakon porođaja. Pri svakoj hospitalizaciji su kompletno klinički laboratorijski (KKS, biohemija, D dimer) i ultrazvučno ispitane (posteljica, količina plodove vode, telesna masa, dopler indexi u umbilikalnoj i uterinim arterijama). Gestacijska starost je određivana prema amenoreji. Iz maternalne krvi i iz posteljice su se određivali antioksidativni enzimi: superoksid dizmutaza, glutation reduktaza, glutation peroksidaza, katalaza). Koncentracije ovih enzima su bile određivane spektrofotometrijskom analizom, aktivnost enzima je bila izračunavana u jedinicama U/mg za proteine ekstrahovane iz tkiva posteljice i u jedinicama U/g hemoglobin za enzime određene u uzorcima krvi. Analiza prikupljenih podataka je bila rađena statističkom evaluacijom uz pomoć različitih modela deskriptivne i analitičke statistike. Od deskriptivnih modela su biti korišteni: Izračunavanje i određivanje mera centralne tendencije: aritmetička sredina i medijana. Od analitičkih metoda bili korišteni Hi kvadrat test za procenu značajnosti razlike multivariacione analize varijanse (MANOVA), neparametarska jednofazna ANOVA i Kruskal-Wallis test. Rezultati aktivnosti enzima su prikazivani kao +/- standardne greške. Analiza varijanse (ANOVA), jednofaktorska i dvofaktorska sa pratećom a priori Boniferonijevom t procedurom i post hoc Tuckey HSD, LSD i Dunnett-ovim testom za višestruka poređenja među grupama. Kvantifikacija povezanosti između varijabli je utvrđena Pirsonovom linearnom korelacijom. Celokupna statistička obrada biće urađena statističkim programom SPSS v. 10.0.

REZULTATI Nije postojala statistički značajna razlika u broju trudnica koje su imale VTE pre i nakon uvođenja LMWH $P=0,166$ nema statističu značajnost $X^2=1,922$. U grupi trudnica sa trombofilijom i terapijom LMWH postojala je visoko statistički značajna razlika u broju terminskih porođaja ($p=0,0004$, $X^2=12,51$) u odnosu na grupu bez terapije LMWH. Postojala je statistički značajana razlika u broju prevremenih porođaja između dve grupe ($p<0,00012$). $X^2=23,835$. Nije postojala statistički značajna razlika u pojavi PE kod trudnica koje su trudnoći uz terapiju LMWH-om razvile PE u odnosu na pojavu PE pre uvođenja LMWH ($X^2=0,831$, sign test $z=0,46$, $p=0,64$). Nije postojala statistička značajnost između dve grupe u pojavi abrupcije ($X^2=0,12$, $p=0,73$). Postojala je veoma visoka statistička značajnost između grupe kod koje nije uvedena terapija gde je broj pobačaja bio 53 u odnosu na grupu kod koje je u trudnoći uvedena terapija LMWH i gde su sve trudnoće završene porođajem ($X^2=76,7$ uz Yatesovu korekciju, $p<0,001$).

Među 60 trudnica u našoj studiji najveći broj je imao mutaciju PAI-1, njih 27 (31,67%) i kombinovanu mutaciju 16 (26,67%), mutaciju FV Leiden je imalo 10 (16,6%) trudnica, mutaciju FII 4 (2,4%) a najmanji broj trudnica je imao deficit proteina S 3 (5,00%). Aktivnost CuZnSOD u eritrocitima obolelih od trombofilije značajno opada posle porođaja. Ovaj rezultat ukazuje na povećanu koncentraciju vodonik peroksida u krvotoku obolelih od trombofilije nakon porođaja, jer je H_2O_2 inhibitor CuZnSOD.

Značajno povećanje aktivnosti enzima u placentalnom tkivu majki obolelih od trombofilije koji koriste vodonik peroksid kao supstrat- katalaze i glutation peroksidaze.

ZAKLJUČAK: Primena LMWH od momenta dijagnostikovanja trudnoće u terapiji kod trudnica sa urođenom trombofilijom značajno povećava broj živorođene dece. 52 (86,6%) živorođena deteta nakon terapije LMWH u odnosu na 9 (10,3%) bez terapije ($p < 0,00012$). $X^2 = 23,835$. Primena LMWH statistički značajno je smanjila broj pobačaja, prevremenih porođaja i IUGR-a. Nije uočena statistički značajna razlika u pojavi PE i abrupcije posteljice. grupi trudnica koje smo ispitivali najveća je učestalost mutacija PAI-1u formi homozigota 4G/4G. Značajno povećanje aktivnosti enzima u placentalnom tkivu majki obolelih od trombofilije koji koriste vodonik peroksid kao supstrat- katalaze i glutation peroksidaze. Aktivnost enzima koji proizvode vodonik peroksid, CuZnSOD i MnSOD nije povišena u tkivu placenti majki obolelih od trombofilije u poredjenju sa kontrolnim placentama. Aktivnost CuZnSOD u eritrocitima obolelih od trombofilije značajno opada posle porođaja. Ovaj rezultat ukazuje na povećanu koncentraciju vodonik peroksida u krvotoku obolelih od trombofilije nakon porođaja, jer je H_2O_2 inhibitor CuZnSOD.

Ključne reči: Urođena trombofilija, LMWH, IUGR, PE, pobačaj, FMU, abrupcija posteljice, oksidativni stres

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Humana reprodukcija

UDK broj: 130 (2012) 826-829 Thrombosis Research, Elsevier

EVALUATION OF PREGNANCY OUTCOME COMPLICATED BY INHERITED THROMBOPHYLIAS

ABSTRACT

BACKGROUND: Pregnant women with inherited thrombophilia have a higher risk for developing venous embolic complications, spontaneous and habitual miscarriages, preeclampsia, IUGR, and placental abruption. Genesis of obstetric complications is not clearly defined, and as such may present one of the reasons for therapy failure. The key for the development of a normal pregnancy is the contact between the fetal and maternal circulation, as is the balance between coagulation and fibrinolysis in the placenta at the chorionic membrane level. Usually we target fetoplacental thrombosis, as the main cause for obstetrical complication in pregnant women with congenital thrombophilia. Considering the number of unsuccessful pregnancies, even when using anticoagulant therapy, it becomes evident that other causes exist for obstetric complications in pregnancies with inherited thrombophilia. Obstetric complications during the second and third trimester, in pregnancies with inherited thrombophilia are similar to eclamptic complications. An elevated level of reactive oxygen is found in pregnant patients with preeclampsia, and an impaired enzyme protection from oxidative damage, which effect in endothelial dysfunction, less than adequate trophoblast invasion and a hypoperfusion of the placenta, which all increase oxidative stress.

THE GOALS: To examine the influence of LMWH application in patients with inherited thrombophilia on the number of live born children and number of manifest complications in pregnancy (spontaneous abortion, intrauterine fetal death, placental abruption, PE, IUGR, VTE). To investigate the activity of enzyme antioxidative protection system in patients with thrombophilia and to compare with healthy patients after live birth.

METHODS: Through this longitudinal study 60 gravide patients were followed. These patients were hospitalized and/or controlled in GAK "Narodni Front" in Beograd during 2013., with a diagnosis of inherited thrombophilia prior to pregnancy. For all of the patients this was the first administration of low molecular heparin.

All examinations and blood sampling was performed during planned hospitalizations: in first, second, third trimester, prior to childbirth and two days after delivery.

During each hospitalization they had a clinical, ultrasound (placenta, AFI, body weight, doppler indexes in umbilical and uterine arteries) and laboratory examination (blood count, biochemistry, D dimer). Gestational age was determined by amenorrhea. Antioxydative enzymes: superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase) were obtained from maternal blood and from placental samples. Enzyme concentrations will be established through spectrophotometric analysis, enzym activity will be calculated in U/mg units for za proteins extracted from placenta samples, and in U/g units for haemoglobin enzymes obtained from blood samples. Data analyses will be done by statistic evaluation using variuos models for descriptive and analitical statistics. The following descriptive statistics models were used: Calculating and determining central tendencies: average and median values. Calculating variability measures: variability interval, standard deviation and veriance, variance coefficient, relative number calculation, grouping and tabelating. Analitic methods used were: X2 test to determine significances in multivariance analyses (MANOVA), nonparametric singlefaze ANOVA and Krusskal-Wallis tests. Enzyme activity results were displayed as +/- of standard deviation. Variance analyses (ANOVA), single and multi - factor analysis with a priori Boniferoni t procedure and post hoc Tuckey HSD, LSD and Dunnetts test for multiple comparison between groups. Quantification of association between variables was established using Pirson's linear corelation. Full statistic calculation will be done using SPSS v. 10.0. statistic data package.

RESULTS: No statistic significance was established between the number of patients with VTE in anamnestic data between pregnancies without anticoagulant therapy and patients that used LMWH (P=0,166 no statistic significance X2=1,922). In the patient group with thrombophilia and LMWH therapy an high statistic significance was established for the number of term deliveries, (p=0,0004, X2=12,51) in comparison with the group without LMWH therapy. An statistic significance was found for the number of preterm deliveries between the two groups (p<0,00012, X2=23,835). There was no statistic difference in the apereance of PE, comparing patients that developed PE while on therapy with LMWH with patients that developed PE prior to thrombophilia diagnosis and therapy with LMWH (X2=0,831, sign test z-0,46, p-0,64). No statistic significance between the two groups was established for placental abruption (X2=0,12, p=0,73).

A high statistical significance was proved for patients without LMWH therapy (number of abortions 53) compared with patients with LMWH therapy (all pregnancies terminated by delivery) (X2=76,7 with Yates corection, p<0,001).

Among 60 pregnant patients in our study, largest number of them had a PAI-1 mutation 27 patients (31,67%), and combined thrombophilia 16 patients (26,67%), FV Leiden mutation 10 patients (16,67%), FII mutation 4 patients (6,67%) and the rarest mutation was S deficite 3 patients (5,0%). CuZnSOD activity in red blood cells in patients with thrombophilia has a marked decrease after delivery. This points to an increased concentration of hydrogen peroxide in the blood flow of patients with thrombophilia after delivery, as H₂O₂ is the inhibitor for CuZnSOD. There is an significant increase of enzymes in the blood of patients that use hydrogen peroxide as a substrate for catalase and glutation-peroxidase.

CONCLUSION: LMWH use from the very beginning of pregnancy as therapy for patients with inherited thrombophilia significantly increases the number of live births. 52 (86,6%) live births after LMWH therapy compared with 9 (10,3%) without therapy ($p < 0,00012$). $X^2 = 23,835$. Use of LMWH has an statistical significant benefit in reducing the number of abortions, preterm deliveries and IUGR. There has not been established a statistical significance in the appearance of PE and placental abruption. In our investigated group the most frequent mutation noted was PAI-1as 4G/4G. There is an significant increase of enzymes in the blood of patients that use hydrogen peroxide as a substrate for catalase and glutation-peroxidase. Activity of enzymes that produce hydrogen peroxide, CuZnSOD and MnSOD is not elevated in placental tissue of patients suffering from thrombophilia, when compared with placental tissue of healthy patients (control group). CuZnSOD activity in red blood cells of patients with inherited thrombophilia significantly decreases after delivery. This indicates an elevated hydrogen peroxide concentration in the blood flow od patients with thrombophilia after delivery, as H₂O₂ is a known inhibitor of CuZnSOD.

Key words: Inherited thrombophilia, LMWH, IUGR, PE, abortion, FMU, placental abruption, oxydative stress

Scientific area: Medicine, Humane Reproduction

UDK No: 130 (2012) 826-829 Thrombosis Research, Elsevier

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Trombofilija	1
1.2 Fiziološke promene tokom trudnoće-hiperkoagulabilnost.....	2
1.3 Urođene trombofilije.....	4
1.3.1 Deficit antitrombina III	4
1.3.2 Mutacija FV Leiden	5
1.3.3 Mutacija FII G20210A	6
1.3.4 Deficit proteina C.....	6
1.3.5 Deficit proteina S	7
1.3.6 Mutacija plasminogen activator inhibitora PAI-1.....	7
1.3.7 Ostale nasledne trombofilije	8
1.4 Patofiziološke promene kod pacijentkinja sa trombofilijom	9
1.4.1 Reaktivne vrste kiseonika i azota	12
1.4.2 Endogena antioksidativna zaštita	15
1.4.3 Superoksid dizmutaza (SOD)	16
1.4.4 Katalaza (CAT).....	17
1.4.5 Glutation peroksidaza (GSH-Px).....	18
1.4.6 Glutation reduktaza (GR).....	19
1.4.7 Signalana transdukcija i ROS	20
1.5 Obstetričke komplikacije i trombofilija.....	22
1.6 Preeklampsija i trudnoća.....	23
1.7 Trombofilija i IUGR	24
1.8 Trombofilija i abrupcija posteljice.....	25
1.9 Trombofilija i ponovljeni pobačaji	26
1.10 Trombofilija i intrauterusna smrt ploda	27
1.11 Trombofilija i VTE	28
1.12 Dijagnoza trombofilije	29
1.13 Tretman trudnica sa trombofilijom	31
1.14 Terapija kod trudnica sa urođenom trombofilijom	33
1.14.1 Smernice za primenu antikoagulantne terapije u trudnoći.....	35

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	39
3. METODOLOGIJA	41
3.1 Izvor podataka.....	41
3.2 Podaci o posmatranim poremećajima u trudnoći.....	42
3.3 Prikupljeni podaci	43
3.3.1 Biofizički podaci	43
3.3.2 Biohemijski pokazatelji	43
3.3.3 Hemodinamski pokazatelji.....	43
3.3.4 Praćenje ishoda trudnoće	44
3.3.5 Biohemijske procedure	44
3.4 Statistička obrada rezultata	54
4. REZULTATI.....	57
4.1 Osnovne karakteristike ispitivane grupe.....	57
4.2 Ishod trudnoće.....	58
4.3 Obstetričke komplikacije kod pacijentkinja sa urođenom trombofilijom.....	59
4.3.1 Učestalost VTE	59
4.3.2 Učestalost prevremenog porođaja.....	61
4.3.3 Učestalost PE	62
4.3.4 Učestalost abrupcije posteljice	64
4.3.5 Učestalost HTA i IUGR.....	65
4.3.6 Učestalost pobačaja.....	66
4.3.7 Učestalost FMU.....	69
4.4 Karakteristike porođaja kod trudnica sa terapijom LMWH.....	70
4.5 UZ parametri u trudnoći sa terapijom LMWH	73
4.5.1 Protok kroz uterine arterije u II i III trimestru	73
4.5.2 Protok kroz umbilikalnu arteriju u II i III trimestru.....	74
4.5.3 Odnos komplikacija i UPC cirkulacije	76
4.5.4 Pulsatilni index u ACM	69
4.5.5 Ostali UZ parametri	78
4.5.6 Vrednost D dimera.....	79
4.6 Distribucija urođenih trombofilija	80
4.7 Aktivnost enzima u eritrocitima trudnica	85
4.8 Aktivnost enzima u tkivu i placenti	91

5. DISKUSIJA	82
6. ZAKLJUČCI	104
7. LITERATURA	113

1.UVOD

1.1. TROMBOFILIJA

Trombofilija je urođeni ili stečeni poremećaj hemostatskog sistema koji povećava sklonost ka zgrušavanju krvi i nastanku arterijskih i venskih tromboza.¹ Trombofilije mogu biti urođene (nasledne) i stečene.

Pod urođenim trombofilijama smatraju se genetski determinisane abnormalnosti hemostatskih mehanizama koje rezultuju povećanom sklonosti ka nastanku tromboza.¹ Otkriće PCR tehnika dovelo je većih saznanja o promenama na genskom nivou koje su uzrok poremećaja koagulacionog sistema. Urođene trombofilije su prisutne u 15% opšte populacije i kod 50% pacijentkinja sa dubokom venskom trombozom u trudnoći (DVT)¹. Do sada opisane urođene trombofilije su: deficit antitrombina III, deficit proteina C, deficit proteina S, mutacija Faktora V Leiden (FVL), mutacija protombina (FII G20210A), mutacija gena za enzim metilentetrahidrofolat reduktazu C677T (MTHFR), mutacija plazminogen inhibitor aktivatora (mutatio PAI).²

Stečene trombofilije predstavljaju stanje stečene hiperkoagulabilnosti različite etiologije. Najčešća stečena trombofilija je antifosfolipidni sindrom (APSy). APSy podrazumeva prisustvo barem jednog od kliničkih i laboratorijskih znakova.^{1,2} Klinički znaci su: ponovljene tromboze, jedan ili više gubitaka trudnoće nakon 10 NG, jedan ili više porođaja pre 34 NG sa morfološki zdravim plodom koji su izazvani preeklampsijom (PE), eklampsijom ili placentnom insuficijencijom, tri i više spontanih pobačaja koji nisu praćeni hormonskim ili anatomskim anomalijama majke niti poremećajima u strukturi majčinih i očevih hromozoma pre 10NG.² Laboratorijski znaci su: pozitivan lupus antikoagulans (LAC) u dva merenja sa razmakom od 12 nedelja između merenja, prisustvo povišenih vrednosti antikardiolipinskih (ACA) i anti-beta2-glikoproteinskih antitela (antiB2GP-1) IgG i IgM. Razmak između dva merenja mora biti veći od 12 nedelja. U odnosu na kliničku pojavu razlikujemo primarni i sekundarni antifosfolipidni sindrom.² Primarni APSy se pojavljuje kao poseban entitet bez jasnih kliničkih znakova drugih bolesti, dok se sekundarni APSy javlja uz reumatske bolesti a najčešći je uz sistemski lupus.³ Postoji i trombofilija koja je kombinacija naslednih i stečenih poremećaja faktora VIII, hiperhomocisteinemija kao i rezistencija na aktivirani protein C.³

S obzirom da su u osnovi različitih trombofilija mutacije gena, moguće je prisustvo dve ili više mutacija kod jedne trudnice. Sem udruženog postojanja dve urođene trombofilije, mogu istovremeno postojati i urođena i stečena trombofilija. Kod postojanja udruženih trombofilija rizik za nastanak tromboza je veći od prostog sabiranja svake pojedinačne trombofilije.²

Najčešća klinička manifestacija urođene trombofilije je venski tromboembolizam (VTE). VTE se obično ispoljava kao tromboza dubokih vena (TVD) ili kao plućni embolizam (PEM). Urođena trombofilija se često prvi put manifestuje u trudnoći.⁴ Ona izaziva komplikacije u trudnoći: ponavljane spontane pobačaje tokom prvog i drugog trimestra, intrauterusnu smrt ploda (FMU), preeklampsiju (PE), težak zastoj u rastu ploda (IUGR) i abrupciju posteljice.⁴ S obzirom da je trudnoća stanje hiperkoagulabilnosti ono u kombinaciji sa urođenom ili stečenom trombofilijom dovodi do komplikacija.⁴

1.2. FIZIOLOŠKE PROMENE TOKOM TRUDNOĆE- HIPERKOAGULABILNOST

Tokom trudnoće se dešavaju fiziološke promene u sistemu koagulacije koje dovode do porasta trombogenosti naročito u peripartalnom periodu.⁵ Kao rezultat hormonskih promena dolazi do porasta vrednosti faktora VII, faktora VIII, faktora X, Von Willebrandovog faktora, porasta fibrinogena i povećanog stvaranja fibrina.⁵ Koncentracije faktora V i IX su nepromenjene.⁵

Porast koncentracije prokoagulansa ne prati i porast endogenih antikoagulansa.⁵ Inhibitor TF (tkivnog faktora) minimalno raste, vrednost proteina C se ne menja ali raste rezistencija na aktivirani protein C a tokom drugog i trećeg trimestra smanjena je aktivost proteina S.¹

Fibrinoliza je smanjena jer dolazi do porasta vrednosti inhibitora fibrinolitičke aktivnosti: aktivatora fibrinolitičkog inhibitora i plazminogen aktivator inhibitora 1 i 2 (PAI-1 i PAI-2).¹ Početni korak u kaskadi zgrušavanja (Slika 1) je oslobađanje tkivnog faktora (TF) i njegova ekspresija na površini endotelnih ćelija ili leukocita.⁶ TF aktivira F VII i formira kompleks tkivnog faktora zgrušavanja (TF) sa F VII-a.⁶ Kompleks F VII-a/TF, dalje aktivira nove količine F VII a u prisustvu jona kalcijuma aktivira F X i time započinje spoljni put zgrušavanja.⁶ F X takođe može biti aktiviran i preko unutrašnjeg puta. Kada trombin aktivira faktor VIII u F VIII-a onda F VIII-a aktivira F IX u F IX-a.⁶ Faktor IX-a dalje aktivira faktor X. F X-a sa F V-a, tkivnim i trombocitnim fosfolipidima stvara kompleks aktivatora protrombina koji protrombin pretvara u trombin.⁶

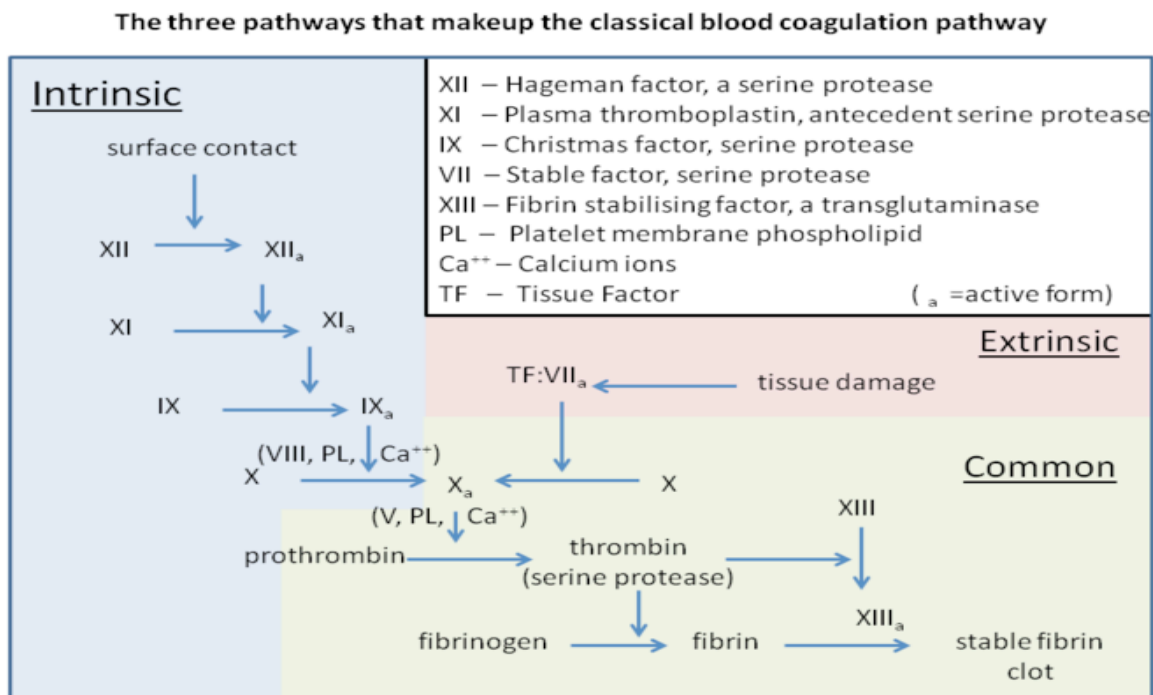
Faktor X se može aktivirati posredstvom faktora XII, koji se aktivira pri kontaktu sa krvi.⁷ F XII-a, aktivira F XI u prisustvu prekalikreina.⁷ Ovo je deo koji je značajan za ubrzavanje koagulacije. Aktivirani F XI-a, aktivira F IX. Aktivirani F IX-a zajedno sa F VIII i fosfolipidima iz trombocita deluje na faktor X i aktivira ga F X-a. F X-a i F V-a deluju na protrombin pretvarajući ga u trombin.⁷

Trombin deluje na fibrinogen, stvarajući monomere fibrina koji se polimerizuju i u prisustvu F XII-a stvaraju stabilni fibrin. Trombin vezivanjem za trombomodulin aktivira protein C.

Oba puta zgrušavanja mogu biti zaustavljena.⁵ Spoljni put zaustavlja TF inhibitor koji se vezuje za kompleks TF/F VII-a. Aktivirani proteini C i S inaktiviraju faktor VIII u unutrašnjem putu.⁵

Slika 1. Mehanizam koagulacije

(preuzeto sa commons.wikimedia.org)



Prilikom stvaranja tromba potroši se 80-85% stvorenog trombina čime se smanjuje njegova cirkulacija u krvi.⁵

Povišen pritisak u pelvičnim venama zbog pritiska od strane gravidnog uterusa i smanjen protok krvi u donjim ekstremitetima dovodi do staze koja dodatno pospešuje protrombotsko stanje.⁵

1.3. UROĐENE TROMBOFILIJE

1.3.1. DEFICIT ANTITROMBINA III

Deficit antitrombina III može biti urođeni ili stečeni poremećaj.⁸ Urođeni deficit AT III je autozomno dominantni poremećaj u zgrušavanju krvi, koji se među populacijom javlja u formi heterozigota.⁸ Homozigot za deficit AT III je letalni poremećaj koje se ispoljava in utero.⁸ Manifestuje se sniženjem njegove vrednost ispod 80%.⁸ Stečeni poremećaj je posledica oboljenja jetre, bubrega, malignih oboljenja hematopoetskog sistema, diseminovane intravaskularne koagulacije kao posledice infekcije.⁹ AT III je najznačajniji fiziološki inhibitor trombina i inhibitor faktora X-a, IX-a i XII-a.⁹

Ovo je najređa i najtrombogenija trombofilija. Javlja se sa učestalošću 1 na 5000 osoba.¹⁰

Postoje dva tipa deficita AT III. Tip I je najznačajniji a odlikuje se sniženom vrednošću antitrombina (<50%). Vrednosti AT III se menjaju tokom trudnoće, referentne vrednosti za prvi trimestar su 89-114%, za drugi trimestar 88-112%, a za treći trimestar 82-116%.¹¹

Kod II tipa, koji se deli na 3 podtipa, vrednosti antitrombina su normalne ali je snižena njegova aktivnost.¹⁰ Povećan rizik za nastanak VTE imaju i osobe sa umerenim sniženjem vrednost (70-80%).⁸

AT III je substrat za vezivanje heparina, koji njegovu aktivnost povećava 1000 puta. U odsustvu AT III heparin nema dejstvo.⁹

Deficit AT III ima najveći rizik od svih trombofilija za razvoj VTE komplikacija u trudnoći. VTE se najčešće javlja u puerperijumu i može se manifestovati plućnom embolijom. Sve trudnice koje pre trudnoće nisu imale VTE, imaju rizik do 33 % da razviju VTE u trudnoći.¹² Rizik za recidiv VTE u trudnoći je 49%.¹² Trudnice sa deficitom AT III imaju blago povećan rizik u odnosu na druge urođene trombofilije za pojavu intrauterusne smrt ploda (OR 5,2%) i pobačaja (OR 1,7%).¹²

1.3.2. MUTACIJA FAKTORA V LEIDEN

U 95% slučajeva za rezistenciju na aktivirani protein C je odgovorna tačkasta mutacija koja nastaje usled zamene arginina glutaminom na 506 mestu u proteinu.¹³

Usled ove FV Leiden mutacije dolazi do smanjene osetljivosti faktora pet na inhibitorno dejstvo aktiviranog proteina C, čime se produžava poluživot aktivisanog faktora pet.¹⁴ Na ovaj način se mehanizam koagulacije pomera ka stanju hiperkoagulabilnosti. Mutacija faktora V Leiden je autozomno dominantno hemostatsko oboljenje.¹⁴

FV Leiden je najčešća trombofilija u našoj populaciji, a njena učestalost je oko 5%.¹⁴ DVT je najčešća komplikacija venskog tromboembolizma, koja najčešće zahvata donje ekstremitete.¹⁴ Mutacija FV Leiden je prisutna kod 15 do 50% bolesnika sa venskom trombozom. Pacijentkinje koje su heterozigoti za ovu mutaciju najčešće nemaju simptome van trudnoće. U trudnoći je rizik kod njih za nastanak DVT povećan 3 do 7 puta.¹⁴ Kod homozigota za ovu mutaciju rizik za nastanak DVT je veći za 80-90 puta u odnosu na one koje nisu nosioci te mutacije.¹⁴ Prema podacima iz literature recidivi VTE su retki kod pacijentkinja koje su heterozigoti. U trudnoći je kod nosioca ove mutacije 2 do 3 puta povećan rizik za nastanak FMU-a, PE, IUGR-a i abrupcije posteljice.¹³ Ehrenforth je u velikoj kohortnoj studiji objavio da je kod homozigota za FVLeiden mutaciju najčešća manifestacija izolovana DVT.¹⁵ Murphy je manjoj prospektivnoj studiji uočio da je spontani pobačaj bio kod 11% trudnica sa heterozigotnom formom mutacije u odnosu 4,2% trudnica bez mutacije.¹⁶ Rey u metaanalizi koja je uključivala 3000 trudnica uočio da trudnice sa FV Leiden mutacijom imaju značajno veći rizik za habitualne pobačaje tokom prvog trimestra (OR 2,1) kao i gubitke trudnoće tokom drugog i trećeg trimestra (OR 7,8).¹⁷ Robertson je u meta analizi uočio da trudnice sa FV Leiden heterozigotnom mutacijom imaju dva puta veći rizik za neplaniran iznenadni gubitak trudnoće i četiri puta veći rizik za gubitak trudnoće tokom drugog u odnosu na prvi trimestra.¹⁸ U meta analizi sačinjenoj od 7 kohortnih studija je nađen statistički značajan rizik za PE kod trudnica sa FV Leiden mutacijom (OR=1,49), ali nije uočena statistički značajna veza sa IUGR-om.¹⁹

Howley je u metaanalizi uočio da FV Leiden mutacija povećava 3-4 puta rizik za intrauterusni zastoj u rastu ploda.²⁰ Nath u svojoj studiji nije našao korelaciju između pojave abrupcije i mutacije F V Leiden.²¹

1.3.3. MUTACIJA FII G20210A

U mutaciji FII G20210A na genu za protrombin, guanin se na mestu 20210 zamenjuje adeninom usled čega se povećava ekspresija gena što se manifestuje povišenim nivoom protrombina u krvi.¹

Mutacija postoji kod 6% svih bolesnika sa DVT i 17% pacijentkinja sa tromboembolijom u trudnoći.²² Prisutna je kod 2-3% Evropljana.¹³ Može postojati kao hetero ili homozigot (imaju sa učestalost od 1:10000).²² Heterozigoti za mutaciju FII G20210A imaju 3 do 4 puta veći rizik za nastanak venskih tromboza.²² S obzirom na malu učestalost homozigota u opštoj populaciji ne postoje tačni podaci o riziku za razvoj DVT kod njih.^{22,23}

Ukoliko istovremeno postoji i mutacija F II G19911A mutacija, nosioci FII G20210A imaju dodatno povećan rizik za nastanak venske tromboze.²³

Povišen protrombin u cirkulaciji smanjuje fibrinolizu i snižava nivo trombin-aktivabilnog inhibitora (TAFI), koji je inhibitor fibrinolize.²³

U literaturi se navodi da trudice sa mutacijom FII imaju veći rizik za nastanak komplikacija u trudnoći: rani pobačaji (OR-2,49, 95% CI 1,24-5,00), habitualni pobačaji (OR-2.70, 95% CI 1.37–5.34), iznenadna intrauterusna smrt ploda u trećem trimestru (OR- 2.66, 95%, CI 1.28-5.53).⁴ James je u svojoj studiji izneo da se relativni rizik za VTE u trudnoći kod trudnica sa mutacijom FII i prethodnom VTE povećava 25 puta.⁷ Reznikoff-Etievan su takođe izneli da je kod trudnica sa mutacijom FII rizik za gubitak trudnoće u prvom trimestru povećan 2,7 puta (95%, CI 1–7).²⁴ Slične rezultate je objavio i Hui Gao, koji navodi da veću učestalost habitualnih pobačaja, (OR-1,81, 95%, CI, 1.26-2.60).²⁵

1.3.4. DEFICIT PROTEINA C

Deficit proteina C je redak u populaciji, njegova učestalost je između 0,2-0,5%.²⁷ Među pacijentima sa trombozom učestalost je od 2 do 8%.²⁷

Protein C je K vitamin zavisni protein koji ima ulogu u zaustavljanju procesa koagulacije i stimulisanju fibrinolize.²⁸

Najvećim delom se sintetise u jetri i njegova sinteza je pod kontrolom gena na 2 hromozomu (2q15-16).²⁶ Postoje dva tipa nedostatka proteina C. Tip I se odlikuje smanjenjem količine proteina C ali očuvanom funkcijom.⁶ Kod tipa II količina proteina C je dovoljna ali je smanjena njegova funkcija. Pacijenti koji su rođeni kao homozigoti za deficit proteina C

imaju težak oblik tromboze poznat kao purpura fulminans koja se manifestuje u najranijem uzrastu.⁶

1.3.5. DEFICIT PROTEINA S:

Deficit proteina S je retka trombofilija koja je često udružena sa gubitkom trudnoće. Učestalost joj je 1 na 500 do 1 na 3000 ljudi.²⁹ Deficit proteina S je autozomno dominantno oboljenje.²⁹ Kao i kod deficita proteina C, mutacija u formi homozigota izaziva purpuru fulminans.³⁰ Protein S je vitamin K zavisini prirodni antikoagulantni protein. Ima ulogu kofaktora u procesu aktivacije faktora V i VII od strane proteina C. Deficit proteina S povećava rizik za VTE 60 %. Do sada su opisana 3 tipa deficita proteina S. Tip I je kvantitativni defekt uzrokovan je genskom abnormalnošću koja izaziva smanjenu produkciju strukturno normalnog proteina. Tada su sniženi ukupni i slobodni protein S. Tip II je funkcionalni defekt, koji postoje evidentan tek kod postojanja rezistencije na aktivirani protein C. Tip III je snižena je vrednost slobodnog proteina S, dok je vrednost totalnog proteina S normalna.²⁹ Trudnice sa ovom trombofilijom su heterozigoti za ovu mutaciju.³⁰ U trudnoći i postpartalno postoji veliki rizik za razvoj venskog tromboembolizma.³¹

1.3.6. MUTACIJA PLAZMINOGEN AKTIVATOR INHIBITORA- PAI 1

Za uspešnu implantaciju neophodna je invazija trofoblasta u odgovarajuću dubinu uterusa.³² Urokinaza plasminogen aktivator je receptor koji sa plasminogen aktivator inhibitorom kontroliše proteolizu i promenu maternalnog tkiva tokom invazije trofoblasta.³² Formiranje posteljice bazalne ploče, Nitabuhov sloj, podrazumeva taloženje fibrina u decidualne vene na mestu invazije trofoblasta što dovodi do aktivacije maternalne prokoagulantne kaskade.³² U normalnim trudnoćama ovaj sistem je dobro balansiran ekstracelularnim matriksom i formacijom fibrina.³²

PAI je glikoprotein i glavni inhibitor fibrinolize koga proizvode vaskularni endotel, glatke mišićne ćelije, monociti i trombociti.³³ U normalnoj trudnoći smanjuje se fibrinoliza što je posledica povećanja inhibitora fibrinolize pre svega PAI-1.³³ On inhibiše tkivni plasminogen aktivator i urokinazu plasminogen aktivator usled čega se smanjuje pretvaranje plasminogena u plazmin.³² Plazmin razgrađuje fibrin i ugruške i stvara produkte degradacije fibrina.³³

4G polimorfizam podrazumeva deleciju guanin ostatka lociranog na promoter regiji PAI -1 gena lociranoj na hromozomu 7q.³⁴ Ovaj polimorfizam ne utiče na strukturu i funkciju gena ali povećava njegovu ekspresiju što dovodi do porasta nivoa PAI-1 u cirkulaciji.³⁴

Podaci o mutaciji PAI-1 gena i komplikacijama u trudnoći su oprečni. Autori navode podatke da je kod trudnica sa obstetričkim komplikacijama mutacija PAI 4G/4G (32%) bila mnogo češća u odnosu na kontrolnu grupu (19%).³⁵

Mutacija PAI -1 gena je imala značajnu vezu sa pojavom obstetričkih komplikacija (OR 1.56, 95% CI 1.005, 2.43).³⁵ Heterozigotna mutacija FV Leiden je češće udružena sa heterozigotnom PAI mutacijom u odnosu na homozigote (33% u odnosu na 0%, Fisher P 0.008).³⁵

D'Elia i saradnici su u svojoj studiji uočili da ne postoji značajna veza između pojave PE i mutacije PAI -1 gena.³⁶

Wiwantkit je uočio da mutacija PAI-1 4G/5G značajno povećava rizik za nastanak PE.³⁷

1.3.7. OSTALE NASLEDNE TROMBOFILIJE

Kao posledica zamene citozina timinom na 677 mestu MTHFR gena nastaje mutacija MTHFR C677T.³⁸ Usled ove mutacije stvara se termolabilna varijanta enzima metilentetrahidrofolat reduktaze, koji ima manju enzimsku aktivnost usled čega se smanjuje konverzija homocisteina u metionin.³⁸ Kod pacijentkinja koje ne unose dovoljno folata porast homocisteina utiče na promenu endotela u krvnih sudova i povećava mogućnost za nastanak tromba. Ova mutacija je veoma rasprostranjena (30-50% heterozigota i 9-12% homozigota).³⁹ Primenom folata i B6 i B12 vitamina mogu se smanjiti rizici za nastanak DVT i komplikacija u trudnoći.³⁹ Novo opisana mutacija MTHFR A1298C koja nastaje usled zamene adenina u citozinom dovodi do smanjena enzimске aktivnosti MTHFR i hiperhomocisteinemije.³⁹

Disfibrinogenemija je nasledni poremećaj koji se karakteriše stvaranjem strukturno, a često i funkcionalno, izmenjenih molekula fibrinogena.⁴⁰

U najvećem broju slučajeva disfibrinogenemija nema simptome. Različite varijante genetski determinisane disfibrinogenemije su dobile imena po gradovima gde su prvi put otkrivene.⁴⁰

Disfibrinogenemija Oslo 1 povezana je sa blagim rizikom za nastanak tromboze.⁴⁰ Nasledna disfibrinogenemija je opisana u 330 slučajeva do sada. 0,9% pacijentkinja sa trombozom ima ovaj poremećaj.⁴⁰

Kod pacijentkinja sa DVT česta je povišena koncentracija faktora VIII. Do sada nije poznata genetska osnova ovog poremećaja. Ova trombofilija je prisutna kod 11% opšte populacije i 25% bolesnika sa trombozama.⁴¹ Pretpostavka je da je povišena koncentracija faktora VIII posledica indukovane rezistencije FVIII na aktivirani protein C.⁴² Nastaje udruženim delovanjem naslednih i nenasledih činilaca.⁴²

Na faktoru V opisano je nekoliko novih mutacija. FV Cambridge je mutacija u kojoj je aminokiselina arginin na mestu 306 zamenjena treoninom i ona je povezana sa blagim oblikom APC rezistencije.⁴³ Mutacija F V Hong Kong nastaje zamenom arginina na mestu 306 glicinom i ne izaziva rezistenciju na APC. Obe nove mutacije nemaju povišen rizik za DVT i komplikacije u trudnoći. Mutacija nazvana HR2 halotip (nastala usled zamene histidina na mestu 1499 sa argininom) ukoliko je udružena sa FV Leiden mutacijom značajno povećava rizik za nastanak venske tromboze.⁴³ Rizik nastanak venske tromboze postoji i kod mutacije FV Liverpool.⁴³

1.4. PATOFIZIOLOŠKE PROMENE KOD PACIJENTKINJA SA TROMBOFILIJOM

Etiopatogeneza opstetričkih komplikacija kod trombofilije nije jasno definisana, što je i jedan od razloga povremenih neuspeha terapije.

U normalnoj trudnoći trofoblast vrši invaziju spiralnih arterija koje gube mišićni sloj i postaju šire što omogućava maksimalni protok krvi kroz posteljicu.⁴ Kod patološke placentacije ne dolazi do invazije spiralnih arterija od strane trofoblata, zbog čega se ne povećava širina lumena.⁴ Podaci sugerišu da su endotelijalna disfunkcija, vazokonstrikcija, placentna ishemija i povećana koagulabilnost udružene sa abnormalnim razvojem posteljice, neadekvatnom fetomaternalnom cirkulacijom i smanjenjem placentne perfuzije.¹

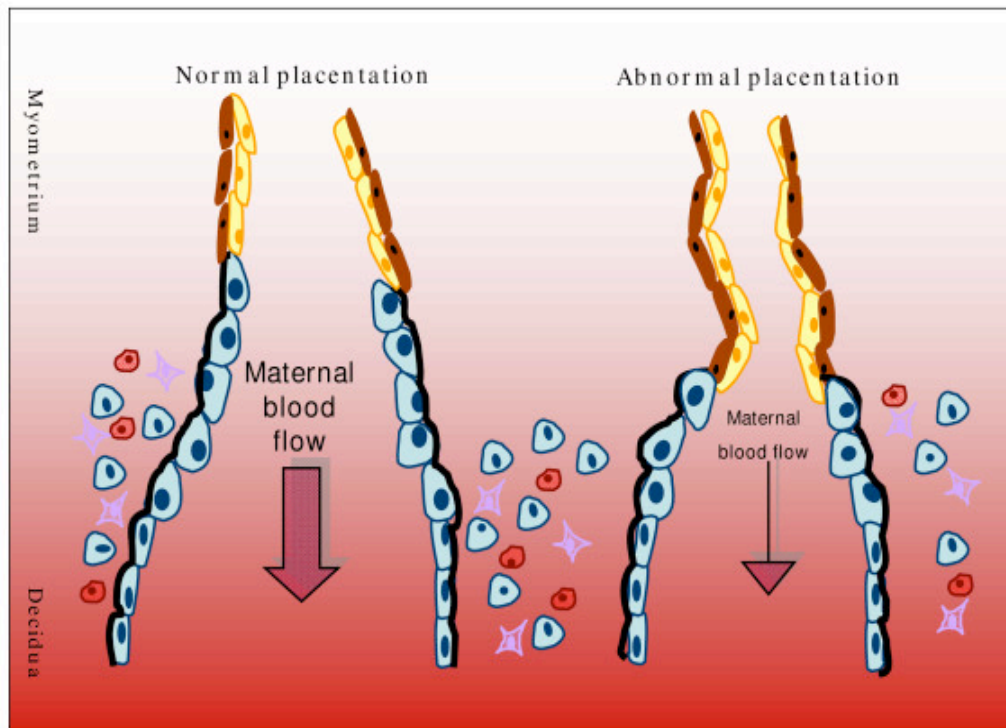
Naknadna vaskulopatija i sekundarna tromboza usled hiperkoagulabilnosti mogu izazvati neadekvatnu perfuziju interviloznih prostora, preeklampsiju, infarkte posteljice, IUGR, abrupciju i intrauterusnu smrt ploda.⁴

Patolozi vaskulopatiju opisuju kao patološke promene karakteristične za superficijalnu endovaskularnu invaziju citotrofoblata u spiralne arterije: akutnu aterosku, trombotske promene u spiralnim arterijama i interviloznim prostorima.⁴

Poznata trombotska priroda vaskularnih lezija u posteljici i povišen rizik za nastanak tromboze kod pacijentkinja sa trombofilijom ukazuje na vezu između urođene i stečene trombofilije i komplikacija u trudnoći.⁴

Slika 2: Invazija trofoblasta kod normalne i abnormalne placentacije

preuzeto sa www.biology-online.org



Redovnim UZ pregledima uočeno je da arterijski dopler signali nestaju u žumančanoj kesi i pojavljuju se na nivou umbilikoplacentne cirkulacije, što ukazuje na ulogu posteljice u ranom razvoju ploda. Neadekvatna placentacija i patološke promene na sitnim krvnim sudovima mogu narušiti permeabilnost fetomaternalne membrane u intervaloznim prostorima koja je neophodna za normalan razvoj trudnoće.⁴⁴

Hemostatski sistem igra značajnu ulogu u procesu implantacije i placentacije. Implantacija oplodjene jajne ćelije u deciduu je prvi kontakt između fetusa, posteljice i maternalne cirkulacije. Kontakt između posteljice i maternalne cirkulacije je ključan za razvoj uspešne trudnoće. Pro trombotske promene i tromboza mogu oštetiti taj proces i izazvati rani pobačaj.⁴⁵

Rodger je u svojoj studiji našao statistički značajnu razliku u povećanju sincicijalnih čvorova i hipervaskularnih resica kod trudnica sa mutacijom FVLeiden, što ukazuje da su kod njih hipoksija i loša vaskularizacija mnogo češće u odnosu na kontrolnu grupu zdravih trudnica (13% u odnosu na 4% p-0.004).⁴

Gogia i autori su našli promene na posteljici povezane sa trombofilijom. Oni su našli posteljične infarkte, masivne perivilozne fibrinske depozite i fetalnu trombotsku vaskulopatiju.⁴⁶

S obzirom na značajan broj neuspelih trudnoća i uz primenjenu antikoagulantnu terapiju, evidentno je da postoje i drugi uzroci opstetričkih komplikacija u trudnoćama sa naslednom trombofilijom.

Kod trudnica sa preeklampsijom je dokazan porast koncentracije reaktivnih kiseoničkih vrsta kao i smanjena aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja, što za posledicu ima endotelijalnu disfunkciju, neadekvatnu invaziju trofoblasta i hipoperfuziju posteljice što pojačava oksidativni stres.

Naš život u kiseoničnoj-oksidativnoj atmosferi, i oslanjanje humanih ćelja na molekularni kiseonik i oksidativno-reduktivne (redoks) procese u obavljanju osnovnih funkcija - ćelijskog disanja odnosno aktivnost mitohondrija i konverzija energije, nosi sa sobom određene rizike. To podrazumeva povišen nivo oksidacije biomolekula (npr. proteina, DNK) od strane reaktivnih vrsta koje nastaju kao derivati kiseonika (Reactive Oxygen Species – ROS). Nivo oksidacije koji prevazilazi fiziološke granice se označava kao oksidativni stres.⁴⁷

Dugo smatralo da ROS ima samo negativne biološke efekte, postoji veliki broj dokaza i o njegovoj pozitivnoj ulozi u raznim signalnim putevima.⁴⁷ ROS i redoks procesi učestvuju u nizu patofizioloških procesa, kao što su:

- ćelijska proliferacija i diferencijacija,
- prenos signala,
- regulacija metabolizma i međućelijska komunikacija
- citoprotektivni mehanizmi (inflamacija, odbrana od mikroorganizama)
- patofiziološki fenomeni (starenje, apoptoza, nekroza, kancerogeneza i dr)⁴⁸

Za normalnu ćelijsku funkciju neophodna je regulacija redoks sistema, kako bi se sa jedne strane sprečio oksidativni stres, a sa druge omogućili normalni redoks signali. Ovo je način za održavanje zdravog fenotipa, kao i preživljavanja ćelije. Za regulaciju redoks uslova u nekom tkivu je zadužen antioksidativni sistem (AntiOxidative System - AOS) u samom tkivu, kao i AOS u krvi koji puferuje uslove u tkivu, ali na koga utiču i uslovi u tkivu.^{49,50}

AOS se sastoji od niza enzima i malih molekula koji su međusobno povezani preko supstrata i kroz inhibitorne efekte. Oksidativni stres može ozbiljno da naruši ćelijsku homeostazu i da utiče na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i na aktivaciju maligne transformacije.^{48,51}

Na osnovu svega iznetog, ovo istraživanje ima za svrhu da utvrdi promene u antioksidativnom sistemu u krvi i tkivu pacijenata obolelih od trombofilije.

1.4.1. REAKTIVNE VRSTE KISEONIKA I AZOTA

ROS predstavlja grupu reaktivnih jedinjenja koja sadrže kiseonik i u kojima je kiseonik od centralnog značaja za reakcije sa biomolekulima. Reaktivne vrste se dele na slobodne radikale i neradikalske vrste. Slobodni radikali su hemijski entiteti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i mogu nezavisno da postoje. Zbog viška elektrona u omotaču radikali imaju snažan oksidativni potencijal i veoma su reaktivni. Radikali kiseonika spadaju među fiziološki najznačajnije jer služe kao osnova za stvaranje drugih reaktivnih vrsta. Centralno mesto zauzima superoksid anjon radikal ili superoksid radikal (O_2^-), koji nastaje dovođenjem jednog elektrona na kiseonik u osnovnom stanju. Od superoksid anjona nastaje većina ROS i nekih RNS. On se stvara u mitohondrijama, prilikom elektronskog transporta na unutrašnjoj membrani ovih organela, ali može nastati i aktivnošću različitih enzima (ksantin oksidaze i NADPH oksidaza). Poluživot O_2^- u biološkom miljeu je oko 10^{-6} s.

S obzirom da je naelektrisan nema interakciju sa membranom, ali može da bude protonovan do OOH (oko 3% na pH 7), što izaziva oksidativna oštećenja membranskih lipida - lipidnu peroksidaciju. Superoksid radikal ima i signalnu funkciju tako što interaguje sa Fe-S centrima nekih enzima. Interakcija sa metalnim centrima drugih proteina predstavlja osnovni način na koji O_2^- direktno indukuje oksidativna oštećenja odnosno ireverzibilnu inhibiciju. Superoksid ne može da napusti mitohondrije, ali može (u manjoj meri) ćeliju, kroz kanale za negativne jone, na ćelijskoj membrani. Stvaranje H_2O_2 nastaje usled dovođenja dva dodatna elektrona. Dovođenjem četiri dodatna elektrona (uz protonaciju) dolazi do stvaranja vode. Osnovni način nastanka H_2O_2 je od O_2^- kroz aktivnost SOD, ali i neenzimskom dismutacijom, i aktivnošću određenih enzima kao što je dualna oksidaza. Kod ćelija kancera, povećana mitohondrijalna aktivnost (vezana za ubrzani metabolizam) dovodi do povećane produkcije O_2^- i pojačanog izlaska H_2O_2 iz ovih organela. Značajno je da je produkcija ROS u mitohondrijama pojačana u uslovima hipoksije.⁵²

Vodonik peroksid je glavna signalna vrsta među ROS, i jedina za koju je ovakva funkcija široko potvrđena. Najvažniji redoks prekidači osetljivi na H₂O₂ su tiolne (-SH) grupe, koje se modifikuju u tri koraka. Prvi do -SOH je najvažniji za signalizaciju i reverzibilan je. Drugi korak je -SO₂H koji je mnogo manje reverzibilan i treća ireverzibilna forma je -SO₃H, koja je često znak intenzivnog oksidativnog stresa i uključena je u signalizaciju apoptoze. Dužina poluživota za H₂O₂ je preko 1s. H₂O₂ je relativno stabilan, a pošto nema naelektrisanje može da difunduje direktno kroz lipidni dvosloj. Postoje kanali - akvaporini, kroz koje može da se prenese u vanćelijsku sredinu (npr. krv). Osim direktne oksidacije tiolnih grupa, H₂O₂ može da reaguje se redoks-aktivnim metalima (Fe, Cu). Reakcija H₂O₂ sa redoks-aktivnim metalima (Fe, Cu) se zove Fentonova i za proizvod ima hidroksil radikal (.OH). Ovaj radikal je ekstremno reaktivan i skoro potpuno neselektivan. On najčešće reaguje sa najbližim biomolekulom izazivajući oksidativna oštećenja. Neke reaktivne vrste mogu da nastanu ne samo redukcijom već i dovođenjem energije molekulskom kisoniku. Tako na primer, nastaje singlet kiseonik (1O₂) koji nema nesparenih elektrona i nije radikal, ali je i pored toga izuzetno toksičan.^{55,56,57}

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

RADIKALI		NERADIKALI	
O ₂ ·-	Superoksid	H ₂ O ₂	vodonik peroksid
OH	Hidroksil	HOCl	hipohlorna kiselina
RO ₂ ·	Peroksil	O ₃	ozon
RO·	Alkosil	1O ₂	singlet kiseonik
HO ₂ ·	hidroperoksil		

Pored slobodnih radikala kiseonika, u organizmu se javljaju i radikali ugljenika (trihlormetil radikal CCl₃· i dr.), sumpora (tiol radikali -R-S·), kao i reaktivne vrste azota (Tabela 2).

Od RNS, najvažniji su NO i peroksinitrit. NO predstavlja dobro poznatu signalnu vrstu, ali kao i kod H₂O₂, povišena produkcija dovodi do porasta koncentracije koje prevazilaze fiziološki opseg i mogu da imaju patološke efekte. NO je nepolaran i ima veliki biološki radius, lako napušta tkivo i ulazi u cirkulaciju. Enzimi koji produkuju NO se nazivaju NO sintaze (NOS).

Postoje tri vrste: neuralna (nNOS), endotelijalna (eNOS) i induktibilna (iNOS). iNOS u normalnim ćelijama i pod normalnim uslovima nije prisutna, međutim kada se njena ekspresija indukuje, dolazi do formiranja velikog broja kopija ovog enzima. Kada iNOS postoji u ćeliji to dovodi do mnogo veće produkcije NO u odnosu na produkciju koju ostvaruju eNOS ili nNOS. Peroksinitrit nastaje u veoma brznoj reakciji NO sa O_2^- . On dalje može da se protonuje do peroksiazotne kiseline, koja se zatim razgrađuje na azot dioksid i $.OH$.^{57,58}

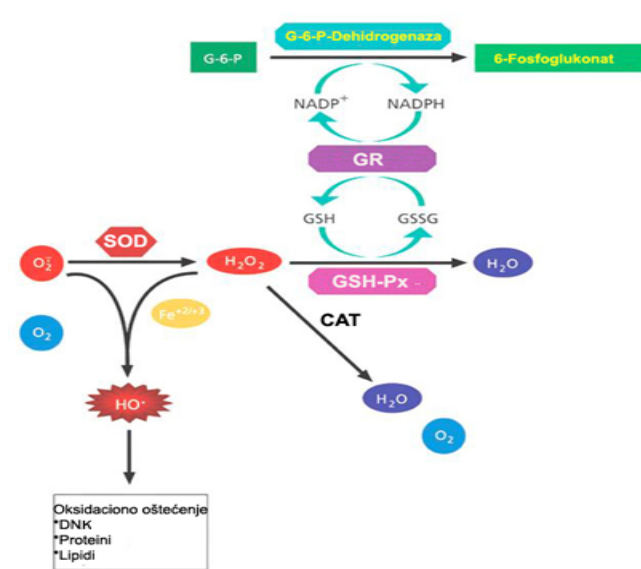
U organizmima slobodni radikali mogu da nastanu delovanjem raznih enzimskih i neenzimskih sistema smeštenih na ćelijskim membranama, u citoplazmi, plazma membrani i krvnim ćelijskim elementima. Slobodni radikali najvećim delom nastaju u mitohondrijama, ali i u peroksizomima, mikrozmima, ćelijskim membranama, i kao sporedni produkti aktivnosti određenih enzima (ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze).⁵⁷ Neki tipovi ćelija intenzivno produkuju reaktivne vrste kiseonika, kao što je slučaj sa inflamatornim ćelijama (polimorfonuklearni leukociti) i fagocitima (neutrofili, eozinofili, monociti makrofagi).⁵⁸

Tabela 2. Reaktivne vrste azota (RNS):

RADIKALI		NERADIKALI	
NO.	azot monoksid	HNO ₂	azotasta kiselina
NO ₂ .	azot dioksid	N ₂ O ₃	azot trioksid
		N ₂ O ₄	azot tetraoksid
		NO ₂ ⁺	nitronijum (nitril) jon
		ONOO ⁻	peroksinitrit
		ONOOH	peroksiazotna kiselina
		ROONO	alkil peroksinitrit
		NO ⁻	nitroksil anjon
		NO ⁺	nitrozil katjon
		NO ₂ Cl	nitril hlorid

1.4.2. ENDOGENA ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

AOS (endogena antioksidativna zaštita) nastao je tokom evolucije kod svih aerobnih organizama kako bi se sprečila, ograničila ili popravila oštećenja nastala delovanjem ROS. Antioksidativni zaštitni sistem obuhvata primarnu i sekundarnu antioksidativnu zaštitu. Primarna zaštita sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti.^{59,60} Ovaj sistem čine enzimi: SOD, CAT, GSH-Px i GR (slika 3)



Slika 3. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja (preuzeto od Matović i sarad., 2004)

Neenzimske komponente antioksidacionog primarnog zaštitnog sistema dele se na:^{61,62}

1. supstance rastvorljive u mastima (liposolubilne): vitamin E (tokoferol), vitamin A (retinol), provitamin A (karoten), koenzim Q (ubihinon)
2. supstance rastvorljive u vodi (hidrosolubilne): vitamin C (askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, albumin, transferin, ceruloplazmin, feritin, bilirubin, cistein, histidin i laktoferin.

Sekundarnu antioksidacionu zaštitu čine protein specifične oksidoreduktaze (tiol-reduktaze),⁶³ protein-ADP-ribozil-transferaze,⁶⁴ i ATP i Ca²⁺-nezavisne proteaze.⁶⁵

1.4.3. SUPEROKSID DIZMUTAZA (SOD)

Superoksid dismutase čine glavnu liniju odbrane od toksičnosti koju stvara kiseonik u živim ćelijama. SOD je metaloprotein koji katalizuje konverziju superoksid anjon radikala u molekulski kiseonik i vodonik-peroksid. Postoje četiri vrste u zavisnosti od metala koji sadrže u centru:

koja sadrži gvožđe-Fe SOD,

koja sadrži mangan - Mn SOD,

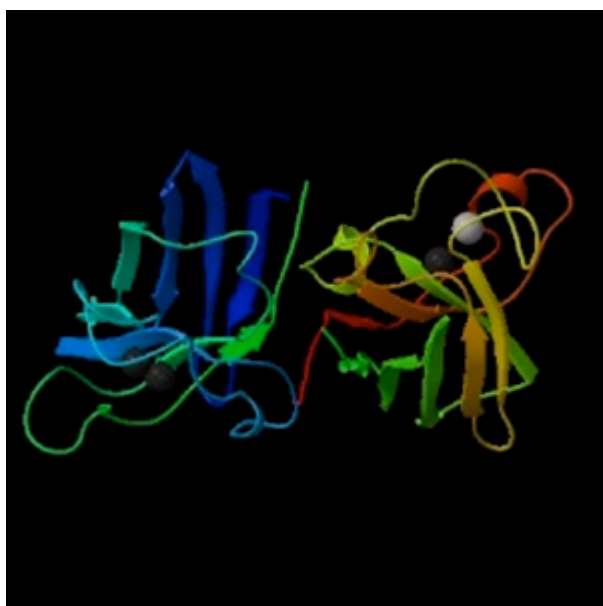
koja sadrži bakar i cink - CuZn SOD i

ekstracelularna EC SOD.⁵⁹

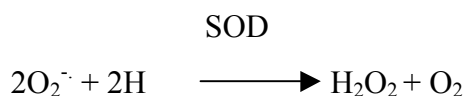
Struktura CuZn SOD je prikazana na Slici 3. U humanim ćelijama su zastupljene CuZn SOD (u citoplazmi) i MnSOD (u mitohondrijama). U eritrocitima (nemaju organele) je prisutna CuZnSOD koja ima funkciju da ukloni superoksid nastao autooksidacijom oksihemoglobina.⁶⁶ U endotelu, ovaj enzim igra veoma važnu ulogu u zaštiti NO od destrukcije od strane superoksida, čime sprečava i nastanak ONOO-.⁶⁷

Slika 3. Trodimenziona struktura CuZn SOD

(preuzeto sa www.en.wikipedia.org)



Reakcija dismutacije O_2^- . koju SOD katalizuje izgleda ovako:



Brzina enzimske reakcije iznosi $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, što je za oko 10^4 puta brže od spontane dismutacije superoksida anjon radikala pri normalnom pH. Važno je napomenuti da proizvod H_2O_2 , koji predstavlja proizvod SOD aktivnosti, može da ireverzibilno inhibira CuZnSOD. Vodonik peroksid može da redukuje bakar u Cu^{2+} u aktivnom centru ovog enzima do Cu^+ . Jednovalentni bakar ulazi u Fentonovu reakciju sa H_2O_2 pri čemu dolazi do lokalizovane produkcije OH^\cdot koji izaziva oksidaciju histidina u aktivnom centru.⁶⁸ Formira se 2-oksohistidin čime je SOD funkcija ugašena,⁶⁹ a enzim može da pokaže i pro-oksidativnu aktivnost.⁷⁰

1.4.4. KATALAZA (CAT)

Katalaza (Slika 3.) katalizuje redukciju vodonik-peroksida u vodu i molekularni kiseonik sa konstantom brzine "katalazne" reakcije od $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

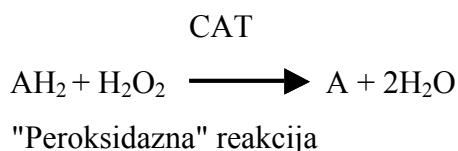
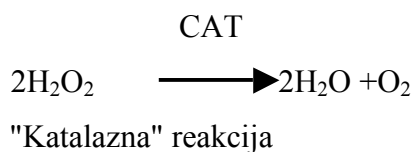
Katalaza može da vrši i oksidacije H-donora uz utrošak jednog molekula vodonik peroksida sa konstantom brzine "peroksidazne" reakcije (spore) od $10^2 - 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Da li će katalaza katalizovati brzu-"katalaznu" ili sporu-"peroksidaznu" reakciju, zavisi od brzine nastajanja vodonik peroksida kao i od koncentracije donora vodonika.⁷¹

Slika 4. Trodimenziona struktura CAT

(preuzeto sa www.en.wikipedia.org)



Aktivnost CAT se odvija kroz sledeće reakcije:⁵⁹

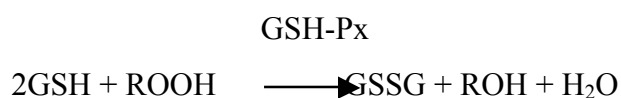
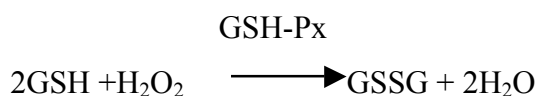


CAT je ključni enzim u eritrocitima odgovoran za uklanjanje kako egzogenog H_2O_2 (npr. poreklom iz tumorskog tkiva, disfunkcionalnog endotelijuma, ćelija uključenih u inflamaciju), tako i endogenog H_2O_2 (proizvedenog kroz auto-oksidaciju oksihemoglobina).^{72,73} Okolno tkivo može ostvariti efekat na CAT aktivnost u eritrocitima kroz pojačanu emisiju NO, koji je inhibitor ovog enzima.⁷⁴

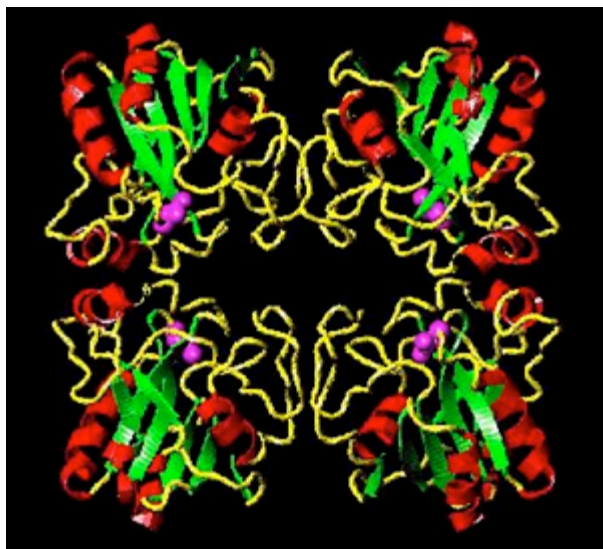
1.4.5. GLUTATION PEROKSIDAZA (GSH-Px)

Glutation redoks ciklus predstavlja glavni put redukcije organskih hidroperoksida u kome centralno mesto zauzima enzim glutation peroksidaza (Slika 5). Prisutna je u svim ćelijama kičmenjaka.

Postoji nekoliko oblika ovog enzima: selen-zavisna glutation peroksidaza (Se GSH-Px), koja redukuje H_2O_2 do vode i organskih hidroperoksida uz prisustvo GSH kao drugog supstrata. Selen-nezavisna forma koja koristi samo organske hidroperokside kao supstrat i pripada familiji enzima glutation-S-transferaza (GST), koja katalizuje reakciju konjugacije GSH sa raznim organskim jedinjenjima. Enzim fosfolipid-hidroksiperoksid glutation peroksidaza (PH GSH-Px), koja reaguje samo sa fosfolipidnim hidroperoksidima.⁷⁵ Osnovne reakcije GSH-Px aktivnosti su sledeće:⁵⁹



Slika 5. Trodimenziona struktura GSH-Px
(preuzeto sa www.en.wikipedia.org)

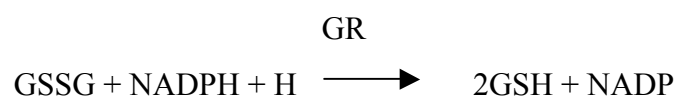


U eritrocitima GSH-Px ima specifičnu ulogu da zaštiti ćelisku membranu pre svega, ali i hemoglobin od oksidativnih oštećenja. Ona uklanja H_2O_2 koji ulazi kroz membranu (egzogeni), kao i H_2O_2 koji nastaje kroz auto-oksidaciju hemoglobina vezanog za membranu. Osim toga, za zaštitu membrane je esencijalna sposobnost GSH-Px da uklanja lipidne hidroperoksidge, čime se zaustavlja lančana reakcija lipidne peroksidacije.⁷³

1.4.6. GLUTATION REDUKTAZA (GR)

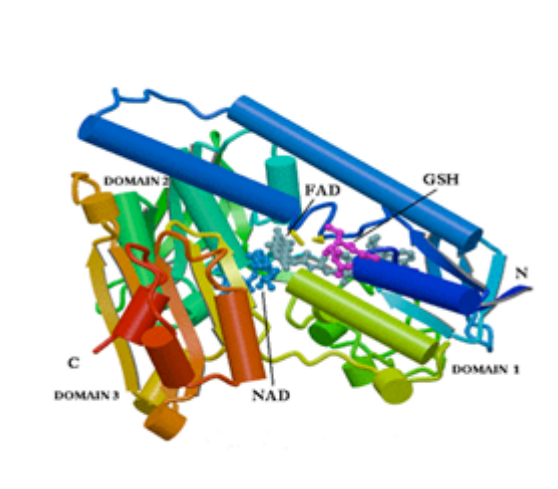
Enzim glutation reduktaza redukuje oksidovani glutation (GSSG) u redukovani, uz prisustvo NADPHm (Slika6). Redukovani NADPH se obezbeđuje preko pentozo-monofosfatnog puta u kome u metabolizmu glukoze učestvuju enzimi glukoze-6-fosfat-dehidrogenaza (G-6-PD), kao i 6-fosfo-glukonat-dehidrogenaza, (6-PGD), pri čemu iz glukoze nastaje ribulozo-5-fosfat.⁷⁷ Kod sisara se nalazi u citosolu i mitohondrijama. Glavna metabolička uloga GR je da održava glutation u redukovanom obliku.⁷⁶ ONOO- inhibira GR. Ovo se ostvaruje kroz nitraciju dva tirozinska aminkiselinska ostatka koja se nalaze na mestu vezivanja GSSG. Ovo sprečava vezivanje supstrata i smanjuje katalitičku efikasnost GR za oko 103 puta.⁷⁷

Reakcija koju GR katalizuje je:



Slika 6. Trodimenziona struktura GR

(preuzeto sa bioinformatica.upf.edu/)



Osim za potrebe aktivnosti GSH-Px, održavanje fiziološkog nivoa GSH je važno i za neenzimsko uklanjanje ROS. U eritrocitima, u slučaju inhibicije GSH-Px/GR aktivnosti, dolazi do oksidativnih oštećenja na membrani, hemolize i degradacije hema.^{78,79} Tumorske ćelije mogu da koriste ovaj sistem za uklanjanje različitih lekova i njihovih metabolita.⁸⁰

1.4.7. SIGNALNA TRANSDUKCIJA I ROS

Ćelije su osetljive na različite signale u svojoj okolini, na koje reaguju i koje integrišu. Signalna transdukcija na ćelijskom nivou podrazumeva kretanje signala kroz ćeliju od spolja ka unutra. To je visoko specijalizovan ćelijski sistem koji integriše, prenosi i umnožava vanćelijsku informaciju sadržanu u hemijskom signalu. Hemijski signali su najčešće prirodni ćelijski produkti - hormoni, citokini, neurotransmiteri i faktori rasta.⁸¹ Biohemijska osnova za pretvaranje vanćeliskih signala u unutar-ćelijski događaj je dugo predmet interesovanja.

Mehanizmi koji su u osnovi ROS posredovane signalne transdukcije uključuju direktnu promenu faktora transkripcije i kinaza i indirektnu modulaciju signalnih proteina bogatih cisteinom i osetljivih na redoks ćelijsku signalizaciju.

U signalnom proteinu, dejstvo slobodnih radikala indukuje ili gubitak funkcije ili sticanje funkcije ili promenu funkcije. Osnovni principi H_2O_2 signala kod sisara obuhvataju:^{82,83,84}

- Inaktivaciju fosfataza, gde oksidacija određenog cisteinskog lokusa, odnosno -SH grupe do -SOH čime se sprečava enzim da prihvati fosfat. U nekim slučajevima se formira disulfidna veza, koja ima za ulogu da spreči dalju oksidaciju (do -SO₃H), čime se izbegava ireverzibilna inaktivacija;
- Aktivaciju ili inhibiciju kinaza. Na primer, H_2O_2 aktivira Src kinazu, koja indukuje promene na citoskeletu i omogućava ćelijsku migraciju;
- Aktivaciju ili derepresiju transkripcionih faktora. NF- κ B, p53, HIF-1 α , protein aktivator-1 (AP-1), protein aktivator-2 (AP-2), i p21 ras imaju redoks-senzitivne -SH grupe u domenu preko koga se vezuju za DNK.

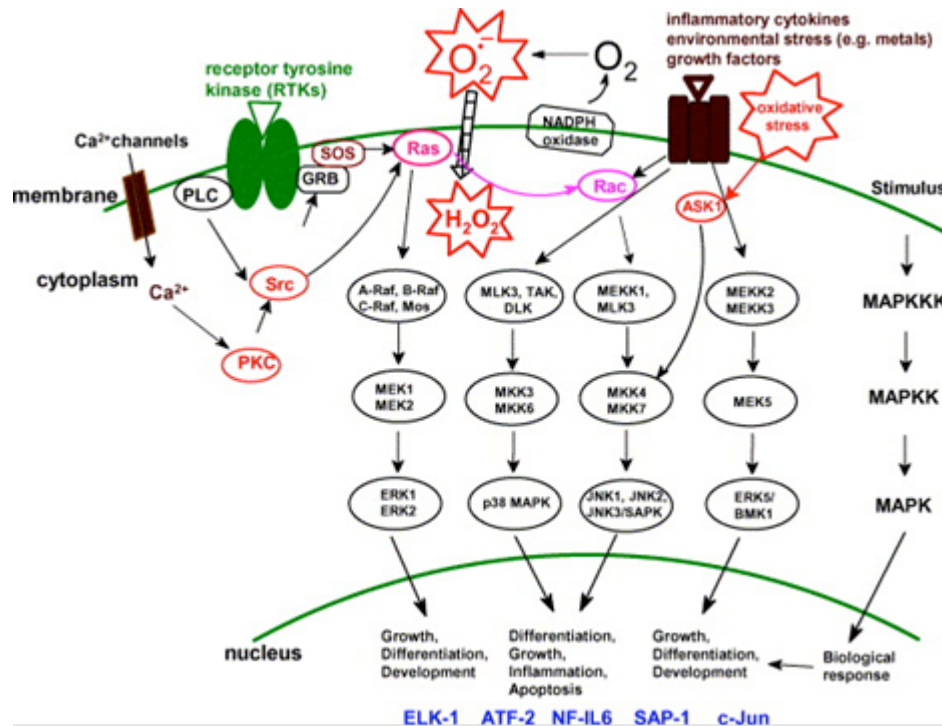
Ovi faktori imaju ključnu ulogu u kontroli ćelijske proliferacije, ćelijske diferencijacije i morfogeneze. Ovde je posebno od značaja da H_2O_2 -indukovana oksidacija tiolnih grupa na DJ-1 i KEAP1 (koji je inhibitor Nrf2) rezultuje u derepresiji Nrf2-regulisane transkripcije niza enzima koji su uključeni u antioksidativni i citoprotektivni odgovor. Jedan od tih enzima je i GST, koji je integrativni deo GSH sistema i ima važnu ulogu u nastanku rezistentnosti kancer ćelija na terapeutike i zračenje.⁸⁰

Verovatno najznačajniji efekat ROS-a na signalne puteve je posmatran kroz MAPK signalni put (protein kinaze-aktivatori mitoze).⁸⁵ MAPK put (slika 7.) podrazumeva aktivaciju nuklearnih transkripcionih faktora (NF- κ B, AP-1, p53 i dr.). Ovi faktori kontrolišu ekspresiju pojedinih gena koji popravljaju oštećenu DNA, zaustavljaju proliferaciju oštećenih ćelija i indukuju apoptozu. Nuklearni transkripcioni faktor NF- κ B je uključen u inflamatorni odgovor. AP-1 je odgovoran za ćelijski rast i diferencijaciju.⁸⁵ P53 je nuklearni faktor čija je ključna uloga zaštita ćelije od tumorigeneze, indukuje apoptozu u ćeliji koja je oštećena i zato se često naziva "tumor supresor". Mutacija u p53 dovodi do njegove inaktivacije što je pronađeno kod više od polovine karcinoma kod ljudi. P53 aktivira UV zračenje, γ -zračenje, hipoksija i drugo.⁸⁶ Generisanjem ROS u ćeliji, p53 indukuje ekspresiju p85 koji ima ulogu signalnog molekula u ROS-posredovanoj p53-zavisnoj apoptozu. Postoje rezultati koji pokazuju da pod normalnim/niskim oksidacionim stresom dolazi do ekspresije antioksidacionih gena što je pod kontrolom niske koncentracije p53.⁸⁷ U slučaju jakog

oksidacionog stresa postoje visoke koncentracije p53, dolazi do formiranja ROS i p53 posredovane apoptoze.⁷

Slika 7. MAPK signalni put

(preuzeto sa cellsignal.com)



1.5. OBSTETRIČKE KOMPLIKACIJE I TROMBOFILIJA

Preeklampsija, abrupcija posteljice, intrauterusni zastoj u rastu ploda, intrauterusna smrt ploda, ponovljeni gubitci trudnoće, prevremeni porođaj, VTE doprinose povećanju maternalnog i fetalnog mortaliteta i morbiditeta.¹ Uzroci njihovog nastanka su nepoznati. Njihova pojava je povezana sa lošom placentacijom i neadekvatnom feto-maternalnom cirkulacijom.¹

Ne postoji velika razlika između etničkih grupa i rasa po učestalosti arterijskih, venskih i placentnih tromboza u trudnoći.⁵ Mutacija FV Leiden ima veliku učestalost u beloj populaciji, prisutna je u 10-15% u Švedskoj, 4-8% u centralnoj Evropi, i 5% u SAD.⁵ Ova mutacija je vrlo retka u Aziji, Japanu, Africi i Severnoj Americi.⁵

Brojne kohortne i studije kontrolisanih slučajeva su našle vezu između teške preeklampsije i trombofilije, ali ne i vezu između trombofilije i blagih formi preeklampsije.^{88,89}

Dve velike prospektivne, kohortne studije nisu pokazale povezanost između trombofilije i nepovoljnog ishoda trudnoće.^{4,14}

Rezultati ovih studija naglašavaju činjenice: mnoge žene s trombofilijom imaju normalan ishod trudnoće, prethodne obstetričke komplikacije verovatno imaju veću prediktivnu vrednost na sledeću trudnoću nego trombofilija sama, žene s trombofilijom i prethodnim lošim ishodom trudnoće su drugačije (u smislu obstetričkog rizika) od žena sa samom trombofilijom (normalne prethodne trudnoće ili bez prethodne trudnoće).¹⁴ Uprkos navedenih činjenica i nejasnoća, brojne studije su dokazale povezanost trombofilije sa obstetričkim komplikacijama povezanim s placentnom insuficijencijom.⁵²

Usporen protok krvi kroz intervilozne prostore i prisustvo hiperkoagulabilnosti u trudnoći mogu biti uzrok deponovanja fibrina u placenti i placentnih infarkta koji se ispoljavaju kasnije.⁵²

Prema podacima iz literature pojava preeklampsije je udružena sa Mutacijom FV Leiden u formi heterozigota, deficitom AT III I deficitom proteina C i S.⁴

Manji broj studija je utvrdio vezu između IUGR-a i trombofilije.¹¹ IUGR je najčešće udružen sa mutacijom FII.¹¹ Komplikacije tokom trudnoće su češće kod trudnica sa kombinovanim trombofilijama.¹² Abrupcija posteljice je nađena u 26% trudnica sa hiperhomocisteinijom i deficitom proteina S.⁵³

Deficit proteina S, C i antitrombina su retki. Prisutni su kod 3% pacijenata sa venskom trombozom.⁷ FV Leiden mutacija praćena rezistencijom na aktivirani protein C je prisutna u 5% populacije, i u 20-30% trudnica sa venskom tromboembolijom.⁵⁴

Mutacija protrombina (guanine 20210 adenin) uzrokuje porast koncentracije protrombina i takođe povećava rizik za nastanak venske tromboze.⁵⁴ Homozigoti za mutaciju citozin 677 timidin u metilentetrahidrofolat reduktazi izazivaju porast vrednosti homocisteina u plazmi što povećava rizik za nastanak tromboze. MTHFR mutacija se nalazi kod 5-15% populacije.⁵⁴

1.6. PREEKLAMPSIJA I TRUDNOĆA

Preeklampsija (PE) se definiše kao sistolni krvni pritisak veći ili jednak od 140 mm Hg ili dijastolni krvni pritisak veći ili jednak od 90 mm Hg detektovani u 2 merenja sa minimalnim vremenskim intervalom od 6 sati koji se javlja posle 20. nedelje gestacije i koji je praćen

signifikantnom proteinurijom. Signifikantna proteinurija se definiše kao od 0.3 g proteina ili više u 24-časovnom urinu. U odnosu na stepen izraženosti simptoma i znakova preeklampsija se deli na blagi i teški oblik. Blagi oblik preeklampsije se odlikuje porastom krvnog pritiska iznad 140/90 mmHg i proteinurijom od 0,3 gr u 24 h.

Za težak oblik PE je karakteristično: krvni pritisak $\geq 160/110$ mm Hg, proteinurija veća od 2 g u 24 sata, oligurija < 500 mL u 24 sata, broj trombocita manji od $100.000 /\text{mm}^3$, povišen nivo serumskog kreatinina veći od 120 mg/L, glavobolja ili cerebralne ili vizuelne smetnje, epigastrični bol i mikroangiopatska hemolitička anemija (povišen nivo LDH).

Povezanost između teške PE i trombofilije opisana je još 1995 godine.⁸⁸ FV Leiden mutacija je postojala kod 4,5-26% pacijentkinja sa teškom PE, HELLP sy i eklampsijom.⁸⁹ U studiji je kod 0,9% pacijentkinja sa PE bila prisutna mutacija FII G20210A a kod 5-25% trudnica deficit proteina S.⁸⁹ Meta analiza pokazuje da je mutacija FV Leiden jedina povezana sa teškom PE.⁹² Rigo i saradnici su ispitivali 120 trudnica sa teškom PE i komparirali ih sa 101 zdravom trudnicom. Našli su da je 18,3% trudnica sa PE imalo FV Leiden mutaciju u poređenju sa 3% zdravih pacijentkinja sa PE.⁹⁰ U grupi FV Leiden pozitivnih trudnica postojala je značajno viša stopa trudnica sa HELLP Sy u odnosu na trudnice koje nisu imale ovu mutaciju.⁹⁰ Meta analiza je pokazala povećan rizik za tešku PE kod postojanja mutacija FII (OR-2.01) i mutacije faktora V (OR-1,90).⁹⁰ Rodger i autori u svom radu nisu našli značajnu povezanost između teške PE, mutacije FV Leiden i mutacije FII.⁴

Drugačije rezultate su objavili Lin i August, oni su uočili vezu između teške PE i mutacije FV Leiden (OR 2.24; 95% CI 1.28–3.94).⁹¹ Mutze i saradnici su takođe uočili udruženost mutacije FV Leiden i HELLP Sy (OR 4.45, 95% CI 1.31–15.1) ali nisu uočili statistički značajnu vezu između HELLP Sy, mutacije faktora II G20210A i MTHFR mutacije.⁹² Razlike u ispitivanim studijama mogu biti posledica različitih ispitivanih populacija, dizajna studije i različite definicije PE.⁹²

1.7. TROMBOFILIJA I IUGR

Intrauterusni zastoj u rastu ploda se definiše kao UZ procenjena telesna masa ploda koja je ispod 10 percentila telesne mase za datu gestacijsku starost.⁹⁴ IUGR je značajan faktor fetalnog mortaliteta i morbiditeta, sa dugoročnim posledicama.⁹⁴ Javlja se u 3–10% trudnoća, i kod 20% mrtvorodenih neonatusa.⁹⁴ Najčešće je nepoznate etiologije.⁹⁴

Kod trudnica sa trombofilijom s obzirom na placentnu etiologiju najčešće se radi o IUGR-u asimetričnog tipa, a najčešće se javlja kao posledica poremećene placentacije i neformirane utroplacentne cirkulacije. S obzirom na patofiziološki substrat veoma je čest komorbiditet sa preeklampsijom.

U literaturi postoje oprečni podaci o vezi urođene trombofilije i IUGR-a.⁹⁵ Mirzaei F je u svojoj studiji našao da je učestalost urođenih trombofilija 68% u grupi sa IUGR-om, u odnosu na kontrolnu grupu gde je IUGR registrovan u 32%.² U grupi sa IUGR-om najviše je bilo pacijentkinja sa MTHFR mutacijom (p-0.037; OR: 3.69), kao i pacijentkinja sa deficitom proteina S (p-0.034; OR: 5.41). Nije postojala statistički značajna veza između mutacije protrombina, deficita antitrombina, kombinovanih trombofilija (OR:2.1, 95% CI:0-0.2, p-0.009) i IUGR-a.² Brenner B. je pokazao da je deficit proteina C udružen sa pojavom IUGR-a i vaskularne tromboze.⁹⁶ Kupferminic je u svojoj studiji izneo da je mutacija FV Leiden česta u Evropi i da je zastupljenost kod 8,8% populacije, i da je često prisutna kod pacijentkinjama sa IUGR-om.⁹⁷ I drugi autori navode vezu između trudnica sa IUGR-om i urođenih trombofilija (68% na prema 32% (OR:1.5, p-0.011, 95% CI:1.3-14.8)).^{98,99}

1.8. TROMBOFILIJA I ABRUPCIJA POSTELJICE

Abrupcija placente (AP) predstavlja svako delimično ili potpuno odlublivanje normalno usađene posteljice.²⁸ Trombofilija povećava rizik za nastanak abrupcije posteljice.²⁸ Abrupcija placente je akutna i jedna od najtežih komplikacija koja istovremeno ugrožava zdravlje i život majke i ploda. Incidenca abrupcije se kreće od 4,9 do 12,9/1000 porođaja i predstavlja drugi uzrok perinatalne smrti po učestalosti.²⁸ Abrupciju mogu izazvati akutne situacije kao što su pad ili udar ili hronična stanja hipertenzija, eklampsija, trombofilija.²⁸ Posledice abrupcije placente su u direktnoj korelaciji sa stepenom abrupcije i mogu dovesti do pojave diseminovane intravaskularne koagulopatije (DIK), insuficijencije bubrega kao i do moguće vitalne ugroženost pacijentkinje. Posledice po zdravlje ploda su u korelaciji sa prevremenim porođajem i malom telesnom masom novorođenčeta.²⁹ Robertson je objavio da je učestalost abrupcije posteljice bila veća kod trudnica koje su nosioci heterozigotne mutacije F V Leiden (OR 4·70; 95% CI 1·13–19·59) i heterozigoti za mutaciju protrombina (OR 7·71; 95% CI 3·01–19·76).²⁸ Ananth je takođe u svom radu našao da je učestalost abrupcije posteljice veća kod trudnica sa mutacijom FV Leiden. Apsolutni rizik za abrupciju posteljice kod trudnica sa mutacijom FV Leiden je bio 1,3% (OR 1.85,

95%; CI 0,92-3,70) u odnosu na 0,9% kod kontrolne grupe trudnica bez trombofilije.¹⁰⁰ Slične rezultate u svojoj studiji objavio je i Said. On je uočio da je abrupcija značajno češća kod trudnica koje su heterozigoti FV Leiden mutaciju (OR 8.62, 95%, CI 1.57-47.17, p=0.01).⁹⁸

Patohistološki nalazi koji opisuju stare posteljicne infarkte (83.3%) i decidualnu nekrozu (4.5%) su bili češći kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na kontrolnu grupu trudnica sa abrupcijom a bez dokazane trombofilije (83.3% prema 44.4%, P=0.003), (4.5% prema 2.1%, P=0.023).¹⁰¹ Ovakve lezije upućuju na moguću hroničnu etiologiju abrupcije posteljice kod trudnica sa trombofilijom.¹⁰¹

Hronična redukcija uteroplacentnog protoka, izaziva ishemiju posteljice i pojavu placentalnih infarkta i nekroze što može dovesti abrupcije. Kod zdravih trudnica bez trombofilije abrupcija nastaje usled akutne disrupcije maternalno-fetalne površine.¹⁰¹ Ne postoje histopatološke promene na posteljici koje su patognomonične za trombofiliju.¹⁰²

1.9. TROMBOFILIJ I PONOVLJENI POBAČAJI

Biološka definicija pobačaja je neželjeni prekid trudnoće pre nego što je plod sposoban za život. Epidemiološka definicija pobačaja je neželjeni prekid trudnoće sa plodom lakšim od 500 grama ili kraćim od 25 cm, što odgovara približno 20. do 22. nedelji trudnoće.¹⁰³ Oko 15% svih trudnoća se završi pobačajem.¹⁰³ Habitualni pobačaji se definišu kao tri uzastopna gubitka trudnoće u prvom trimestru i javljaju se sa učestalošću 1-2% kod žena reproduktivne dobi.¹⁰³ Do 5% svih žena ima 2 i više pobačaja.¹⁰⁴ U 80 % slučajeva uzrok je nepoznat.³² Sporadični ne ponavljani pobačaji su najčešće komplikacije trudnoće čiji su uzrok hromozomske mutacije ploda.¹⁰³ Uzroci habitualnih pobačaja su mnogi a mogu biti izazvani protrombotskim stanjem u trudnoći, anatomskim anomalijama uterusa, hromozomskim mutacijama ploda i endokrinim poremećajima.¹⁰⁴

Mnoge žene sa istorijom ponovljenih pobačaja imaju veći rizik za nastanak PE, IUGR-a, intrauterusne smrti ploda, što ukazuje da ovaj spektar poremećaja ima zajedničko poreklo.¹⁰⁵ Žene sa ponovljenim pobačajima su u protrombotskom stanju i van trudnoće.¹⁰⁵ Kompleks trombin-antitrombin je značajno viši kod žena koje imaju gubitak trudnoće u prvom i drugom trimestru u odnosu na grupu koja nema anamnezu prethodnih pobačaja.¹⁰⁶ Žene se istorijom ponovljenih pobačaja imaju povećanu produkciju tromboksana u periodu od 4 do 7 nedelje

gestacije i sniženu vrednost prostaciklina između 8 i 11 NG u poređenju sa ženama bez prethodne istorije gubitaka trudnoće.¹⁰⁶

Poremećaj ravnoteže između tromboksana i trombiciklina u korist tromboksana može dovesti do vazospazma i agregacije trombocita u trofoblastu što dovodi do nastanka mikrotromba i placentne nekroze.¹⁰⁶

Direktni pokazatelj povezanosti su visoka učestalost žena sa trombofilijom i rekurentnim pobačajima.¹⁰⁶ Prema podacima iz literature postoji veća učestalost spontanih pobačaja kod trudnica sa trombofilijom.

U meta analizi objavljenoj od strane Rey-a, mutacija FV Leiden je česta kod trudnica sa habitualnim pobačajima (OR 2.01, 95%CI 1.13–3.58) i intrauterusnom smrti ploda tokom trećeg trimestra (OR 7.83, 95%; CI 2.83–21.67).¹⁰⁶

U studiji Gao je našao signifikantnu povezanost između mutacije FII G20210A i habitualnih pobačaja (OR 1,81, 95%; CI:1,26-2,60). Rizik za habitualne pobačaje je bio značajno viši kod trudnica starijih od 29 godina (OR: 1.91, 95%; CI: 1.61-6.11).¹⁰⁷

Mutacija FII G20210A u formi heterozigota je nađena kod 4-9% žena sa ponovljenim gubitcima trudnoće u prvom trimestru, u poređenju sa 1-2% kod trudnica sa nekomplikvanim trudnoćama (OR 2-9%).¹⁰⁷

Shakarami je ukazao da su habitualni pobačaji bili značajno češći kod trudnica koje su homozigoti za PAI-1 4G polimorfizam u odnosu na kontrolnu grupu (OR: 4.63, % 95; CI: 1.55-13.84).¹⁰⁹

Ali je u svojoj studiji naveo da je urođena trombofilija češća kod trudnica koje su imale više od 3 pobačaja.¹¹⁰

Kim u svojoj studiji nije našao da mutacija plasminogen aktivator inhibitora 1, bez obzira da li je u formi homo ili heterozigota utiče na pojavu habitualnih pobačaja.¹¹¹

1.10. TROMBOFILIJA I INTRAUTERUSNA SMRT PLODA

Intrauterusna smrt ploda (fetus mortus in utero, FMU) prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) se definiše kao odustvo srčane radnje ploda nakon 26 nedelje gestacije, odnosno kod ploda čija je telesna težina iznad 1000 grama.¹¹² Većina rezultata obavljenih istraživanja pokazuje da je najveći broj intrauterusnih smrti ploda posledica poremećene placentacije ili njenih komplikacija.¹¹²

Uzroci intrauterusne smrti ploda mogu biti od strane ploda (hromozomske abnormalnosti ili infekcije) majke (hronična oboljenja, preeklampsija, urođene i stečene trombofilije) i posteljice (abrupcija, infekcije).¹¹² Uzroci u 12 do 50% slučajeva su nepoznati.¹¹² Autori navode različite podatke o terminu kasne intrauterusne smrti ploda, pa se smatra da je to period nakon 24 ili 28 NG. Trombofilija može indirektno preko placentalne insuficijencije i komplikacija koje ona izaziva biti uzrok intrauterusne smrti ploda.

Many je u svojoj studiji komparirao trudnice sa intrauterusnom smrću ploda u trećem trimestru i grupu zdravih trudnica. U ispitivanoj grupi je otkrio 42% trudnica koje su nosioci urođene trombofilije u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj je učestalost bila 15% (OR 2.8, 95%; CI 1.5, 5.3, P =.001). Mutacija protrombina i deficit proteina S bili su značajno viši u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu grupu (OR 2.3, 95%; CI 1.3, 4.0, I OR 3.2, 95%; RI 2.4, 4.1).¹¹³

Santoro je našao da su mutacija FV Leiden i FII G20210A prisutniji kod trudnica sa intrauterusnom smrću ploda nakon 20 NG (19.6%, P=0.001).¹¹⁴ Sottilotta je ispitivao grupu trudnica sa neobjašnjenom intrauterusnom smrću ploda i našao značajno veću učestalost mutacije FV Leiden i mutacije FII G20210A (p<0.0005).¹¹⁵

Kocher u studiji od 5000 trudnica je uočio značajno veći rizik kod žena koje su nosioci FV Leiden mutacije od intrauterusne smrti ploda.¹¹⁶

Lissalde je u manjoj studiji koja je obuhvatila 100 trudnica, uočio češću pojavu FMU-a kod trudnica sa mutacijom FV Leiden i mutacijom faktora II G20210A.¹¹⁷

Preston je u kontrolisanoj prospektivnoj studiji uočio da trudnice koje imaju više od jedne trombofilije imaju veću šansu za FMU (OR 14,4%). Za pojedinačne trombofilije OR je bio 5,2% za deficit antitrombina, 2,3% za deficit proteina C, 3,3% za deficit proteina S i 2,0% za F V Leiden.¹¹⁸

Nosioci mutacije PAI u formi homo ili heterozigota imaju rizik za intrauterusnu smrt ploda (OR 2.4; 95%; CI 1.1–5.5; P 0.032).³⁵

1.11. TROMBOFILIJA I VTE

(PE).¹¹⁹ Iako je vrlo retka, jedan je od vodećih uzroka maternalnog morbiditeta i mortaliteta. Klinički simptomi DVT mogu biti diskretni i često ih je teško razlikovati od gestacijskog edema.

Dijagnostički test izbora je Doppler ultrazvučni pregled venske kompresije i određivanje D dimera. Plućna embolija se manifestuje kao dispneja i tahipneja.¹¹⁹ Venski tromboembolizam tokom trudnoće se javlja sa učestalošću od 1/1000 porođaja.¹²⁰ Trudnice imaju 4 do 5 puta povećan rizik za tromboembolijske komplikacije u odnosu na period van trudnoće.¹²⁰ Zbog protrombotskog stanja, usporenog toka krvi rizik za VTE je najizraženiji postpartalno naročito kod trudnica porođenih Carski rezom. Kod žena sa urođenom trombofilijom često se DVT ispolji prvi put u trudnoći. U SAD venski tromboembolizam uključujući i emboliju pluća je uzrok 9% svih maternalnih smrtnosti.¹²⁰ 50% svih trudnica sa VTE u trudnoći ima neku od urođenih trombofilija.^{121,122} Najčešće mutacije su FV Leiden i mutacija protrombina.¹²²

U studiji Middeldorp navodi da je 44% trudnica sa mutacijom FV Leiden ima istoriju VTE.¹²³ Trudnice sa mutacijom faktora II imaju 17% šansu da razviju VTE tokom trudnoće.¹²¹ U objavljenoj meta analizi koja je analizirala rizik za nastanak VTE u trudnoći komplikovanoj naslednom trombofilijom nađeno je da najveći rizik imaju trudnice sa FV Leiden homozigot mutacijom (OR 43,4%) i homozigoti za mutaciju FII G20210A (OR 24,4%).¹²²

Slične rezultate su objavili i drugi autori, VTE u trudnoći će razviti 1 od 500 trudnica koje su heterozigoti za FV Leiden i 1 od 200 trudnica koje su nosioci mutacije faktora II G20210A.¹²¹ Autori iznose podatke o mogućnosti nastanka VTE u trudnoći kod različitih oblika urođenih trombofilija: OR za trudnice sa VTE i deficitom proteina C je 4,8%, za trudnice sa deficitom proteina S je 3,2 %, a 4,7% za deficit antitrombina.¹²²

U velikoj meta analizi koja je obuhvatila 79 studija uočeno je da heterozigoti za mutaciju FII G20210A imaju tri puta veći rizik za razvoj VTE u trudnoći.¹¹⁹

Rizik za VTE je veći u trećem trimestru i nakon porođaja. Relativni rizik za nastanak VTE šest nedelja nakon porođaja je 20 puta veći nego tokom trudnoće.^{124,125}

Van trudnoće najčešća je tromboza potkolenica. U trudnoći je najčešća tromboza leve iliofemoralne vene. Ovo je posledica pritiska na levu ilijačnu venu od strane desne ilijačne arterije usled pritiska gravidnog uterusa na donju šuplju venu.^{31,126}

1.12. DIJAGNOZA TROMBOFILIJE

Još uvek postoje oprečna mišljenja o tome kada i koga treba testirati na trombofilije.¹²⁷ Testiranje ne treba sprovoditi za vreme akutnog ataka jer dokazivanje prisustva trombofilije ne utiče na terapiju.¹²⁷

Naprotiv, testiranje na trombofilije je potrebno uraditi kada je moguće tromboprofilaksom sprečiti komplikacije (u trudnoći) ili uticati na terapijski protokol (SLE, antifosfolipidni Sy). Kriterijumi za testiranje su: sve trudnice koje su imale jednu ili više intrauterusnih smrti nepoznate etiologije kod morfološki zdravog ploda, tri i više spontanih pobačaja pre 12 nedelje gestacije, jedan ili više porođaja pre 34 NG uzrokovanih preeklampsijom, eklampsijom, intrauterusnim zastojem u rastu ploda ili abrupcijom placente.¹²⁷ Pitanje se postavlja da li treba testirati pacijentkinje bez simptoma. Radi odluke o tromboprofilaksi u trudnoći treba testirati pre prve trudnoće: sve žene koje su imale VTE uz minimalni provocirajući faktor, a nisu bile na oralnoj kontracepciji i asimptomatske žene koje imaju u porodičnoj anamnezi (prvi stepen srodnosti) VTE sa nepoznatim trombofiličnim statusom. Takođe i sve žene koje su imale VTE u prethodnoj trudnoći, bilo nakon trudnoće ili tokom uzimanja oralne kontracepcije.¹²⁷

Testiranje ne treba sprovoditi tokom akutne faze tromboze jer utiče na rezultate. Idealno bi bilo da se testiranje sprovede 4-6 nedelja nakon završene antikoagulantne terapije. Ukoliko je pacijent doživotno na antikoagulantnoj terapiji potrebno je o tome obavestiti laboratoriju u kojoj se vrši testiranje. Da bi testiranje bilo adekvatno potrebno je da prođe 8 nedelja od prethodne trudnoće ili prekida uzimanja oralne kontracepcije. Za razliku od nefrakcioniranog heparina koji može izazvati sniženje AT III, primena niskomolekularnog heparina ne utiče na rezultate.¹²⁸

Američko udruženje obstetričara i ginekologa dalo je smernice za ispitivanje trudnica na urođene trombofilije:¹⁸⁸

1. Pacijentkinje koje su imale IUGR i PE u prethodnoj trudnoći nije neophodno da se testiraju i leče od trombofilije- preporuka Nivoa B
2. Pacijentkinje koje su imale rekurentne pobačaje ili abrupciju u prethodnoj trudnoći nije potrebo ispitivati na urođene trombofilije jer se ne zna da li postoji efekat primene antikoagulanasa-nivo B.
3. Nije potrebno ispitivanje na prisustvo MTHFR mutacije jer prisustvo ove mutacije nije povezano sa negativnim efektima na trudću-Nivo B
4. Skrining za urođene trombofilije uključuje mutaciju faktora V Leiden, mutaciju protrombina G20210A; mutacija protrombina, deficit proteina C i proteina S deficiencies (bazirano na nivou C utvrđeno konzensusom na osnovu stručnog mišljenja)

Ispitivanje na urođene trombofilije podrazumeva određivanje prirodnih inhibitora koagulacije određivanjem funkcionalne aktivnosti antitrombina III (0.8-1.2 IU/ml), Proteina C (0.7-1.4 IU/ml), Proteina S (0.7-1.0 IU/ml) i disfibrinogenemije.¹²⁸ Proširena ispitivanja podrazumevaju određivanje rezistencije na aktivirani protein C odnos (>2.5), mutacije F V Leiden (normalni aleli, heterozigoti, homozigoti), mutacije FII G20210A (normalan, homozigot, heterozigot), mutacija inhibitora aktivatora plazminogena PAI-1 (normalan, homozigot 4G/4G, 5G/5G, heterozigot 4G/5G).¹³⁰

Ispitivanje za stečene trombofilije podrazumeva određivanje LAC, anti beta 2 glikoproteinskih antitela (IgG I IgM) i antkardiolipinskih antitela (IgG I IgM).

Laboratorijsko određivanje navedenih parametara bazira se na testovima koji se izvode iz plazme ispitanika (fenotipizacija) ili analizom pojedinih mutacija iz izolovane DNA ispitanika (genotipizacija). Mutacije FV Leiden, FII G20210A i MTHFR C677T se dokazuju umnožavanjem željenog segmenta gena reakcijom lančanog umnožavanja polimerazom (polimerase chain-reaction i PCR) direktno iz uzoraka pune krvi, bez prethodne izolacije DNK.¹³⁰

Dve najčešće mutacije u populaciji su mutacija FV Leiden (3-7%) i mutacija FII G20210A (1-3%). One povećavaju rizik skoro 5 puta za nastanak prve epizode VTE i nose mali rizik od ponovne tromboze. Deficit proteina C i proteina S su retke mutacije u populaciji. One povećavaju 10 puta rizik za nastanak prve epizode VTE i za dva puta rizik za ponovljenu VTE.⁵²

Trombofilije visokog rizika (visokotrombogene) su: deficit antitrombina III, deficit proteina C i S. Trombofilije umerenog rizika su: mutacija FV Leiden i mutacija FII G20210A. Trombofilije niskog rizika su: MTHFR mutacija i mutacija PAI.⁵²

1.13. TRETMAN TRUDNICA SA TROMBOFILIJOM

Sve komplikacije u trudnoći kod trudnica sa trombofilijom (ponovljeni pobačaji, FMU, IUGR, PE, abrupcija posteljice, VTE, prevremeni porođaj) su udružene sa insuficijentnom uteroplacentnom cirkulacijom^{131,132}.

Većina Doplerskih studija su analizirale protok kroz umbilikalnu arteriju i uterine arterije kod trudnica sa antifosfolipidnim sindromom. Prisustvo povišenog otpora i pojava notcha takođe su prisutni kod komplikacija u trudnoći pacijentkinja sa trombofilijom.¹³²

Cok je u svojoj studiji uočio da povećanje otpora u uterinim arterijama kod 25% trudnica koje su razvile PE. Prisustvo povišenog otpora u uterinim arterijama tokom drugog trimestra upućuje na moguću pojavu preeklampsije, IUGR-a kao i prematuriteta.¹³³

Merenje doplera uterinih krvnih sudova između 24 i 26 NG može ukazati na grupu trudnica sa visokim rizikom za perinatalne komplikacije.¹³⁴ Direktno oštećenje trofoblasta i uteroplacentna tromboza mogu biti jedan od patofizioloških mehanizama komplikacija trudnoće kod trudnica sa trombofilijom. Ultrasonografski oni se mogu prikazati kao patološki dopler indexi u fetoplacentnoj i uteroplacentnoj cirkulaciji, IUGR i oligoamnion.¹³⁴

Prema podacima kod trudnica sa APSy primena LMWH pospešuje invaziju trofoblasta i smanjuje učestalost tromboze u interviloznim prostorima i na taj način sprečava pojavu komplikacija u trudnoći.¹³⁶

Bujold je uočio da primena male doze Aspirina primenjena do 16 NG, kod pacijentkinja sa ultrazvučno utvrđenom lošom placentacijom, smanjuje incidencu PE.¹³⁵ Ovi podaci sugerišu da se kod pacijentkinja sa trombofilijom meri vrednost Ri i S/D u uterinim arterijama, kako bi se uočila neadekvatna placentacija a time dala mogućnost uvođenju dodatne terapije.

Povišen otpor u uterinim arterijama je udružen sa povišenim rizikom za razvoj PE, IUGR-a i FMU-a.

Grandon je u svojoj studiji našao da trudnice sa urođenom trombofilijom i obostrano prisutnim nočevima imaju 6 puta veći rizik za razvoj različitih komplikacija u trudnoći u odnosu na trudnice sa normalnim protokom.¹³²

U prvom trimestru je maksimalna invazija trofoblasta, što je moguće pratiti protokom kroz uterine krvne sudove. Melchiorre je pokazao značajnu vezu između otpora u uterinim arterijama i SGA ploda.¹³⁷

Magrples je u svojoj studiji prikazao da su patološki ultrazvučni parametri (odsutan protok u dijastoli, oligoamnion, zastoj u rastu ploda) bili češći u grupi pacijentkinja sa urođenom trombofilijom koje nisu tretirane LMWH u odnosu na grupu koju su primale LMWH (2.8 + 2.1 vs. 4.5 + 2.2; p 5 0.001).¹³⁸ Patološki UZ parametri su češće bili prisutni u drugom i trećem trimestru (2.8 + 2.1 vs. 4.5 + 2.2; p 5 0.001). Primena LMWH je značajno smanjila rizik od razvoja oligoamniona (27.3% u odnosu na 7%, p 1/4 0.03).¹³⁸

1.14. TERAPIJA KOD TRUDNICA SA UROĐENOM TROMBOFILIJOM

Kliničke studije sugerišu da primena nisko molekularnog heparina tokom trudnoće značajno smanjuje broj komplikacija u trudnoći kod trudnica sa opterećenom akušerskom anamnezom.⁴⁴ Primena LMWH se pokazala bezbednom tokom trudnoće.⁴⁴ U retrospektivnoj studiji Brennera analizirano je 50 trudnica sa ponovljenim gubicima trudnoće koje su bile tretirane Enoxaparinom 40 mg-80 mg dnevno. Primena ove terapije dovodi do značajnog smanjenja komplikacija tokom trudnoće sa povećanjem stope živorođenosti 69-83%.¹³⁹ Prema ovim podacima viša doza Enoxaparina (od 80 mg) ima potencijalno bolji efekat kod pacijentkinja sa trombogenijim trombofilijama ili kod istovremenog postojanja dve urođene trombofilije.

Stopa živorođenosti kod profilaktičke primene Enoxaparina je iznosila 78% kod trudnica sa mutacijom FV Leiden i 84,4% sa MTHFR C677T mutacijom.¹³⁹ Primena LMWH je udružena sa niskim rizikom za krvavljenje i niskom stopom HIT-a.^{44,139}

Prilikom odluke o antikoagulantnoj profilaksi tokom trudnoće postoje dva stava.

Prvi je baziran na nekontrolisanim publikovanim studijama, u kojima su se komparirale pacijentkinje sa prethodnim lošim ishodom trudnoće i koji savetuje primenu antikoagulantne terapije tokom naredne trudnoće.^{44,140}

Drugi stav, koji obzirom na odsustvo kontrolisanih studija, ne podržava profilaksu sa LMWH.¹⁴¹

Gris je u svojoj studiji izneo rezultate prema kojima je primena Enoxaparina značajno efikasnija kao profilaksa u sprečavanju gubitaka narednoj trudnoći u odnosu na primenu niskih doza Aspirina OR=15.5 (95% CI, 7-34, P < .0001). Autor nije uočio značajnu razliku u stopi živorođenih kod trudnica sa urođenom trombofilijom na profilaktičkim dozama LMWH, a sa prethodnim ranim gubitkom trudnoće, u odnosu na trudnice koje nisu bile na terapiji LMWH (RR 0.81, 95% CI, 0.55 to 1.19, p=0.28).¹⁴² U ALIFE kontrolisanoj placebo studiji praćen je ishod trudnoće (stopa živorođenih) kod trudnica sa gubitkom trudnoće nepoznate etiologije pre 20 NG. Jednu grupu su sačinjavale trudnice na terapiji Aspirinom sa ili bez Fraxiparina a drugu grupu su činile pacijentkinje sa placebo efektom. Uočeno da u grupi sa Aspirinom ili sa Fraxiparinom nije registrovano povećanje stope živorođenosti u odnosu na kontrolnu grupu.¹⁴³

S obzirom na moguć patofiziološki mehanizam koji dovodi do nastanka komplikacija u trudnoći kod trudnica sa urođenom trombofilijom primena LMWH se savetuje u periodu pre primarne invazije trofoblasta (idealno do 6 NG), ali i da primena ima efekta ukoliko se terapija uključi do 18 NG kada se završava druga faza trofoblaste invazije.¹⁴⁴

Mnoge studije sugerišu da je mehanizam delovanja LMWH mnogo komplikovaniji od jednostavne inhibicije trombina. An je u svojoj studiji analizirao visoko rizične trudnoće kod miševa i ustanovio značajno bolji ishod ukoliko su tretirani LMWH. On smatra da LMWH indirektno inhibira factor Xa preko svog efekta na antitrombin. Ovi efekti nisu uočeni kada su tretirani direktno inhibitorom trombina, i indirektnim specifičnim Xa inhibitorom.

Druga studija je prikazala da primena LMWH takodje blokira aktivaciju komplementa iniciranjem aPL-IgG meta na decidualnom tkivu.¹⁴⁶ Drugi efekat podrazumeva direktan efekat na trofoblast kao što je redukcija apoptoze, poboljšanje endometrijalne angiogeneze i modulacija imunog sistema.¹⁴⁷

Rodger i saradnici su objavili rezultate metaanalize u kojoj su komparirali pojavu ponovljenih opstetričkih komplikacija sa terapijom LMWH i bez nje. Praćena je pojava PE, IUGR-a, FMU nakon 20 NG ili abrupcije posteljice.

Od trudnica sa terapijom LMWH 18,7 je imalo ponovljene opstetričke komplikacije u odnosu na 42,9% pacijentkinja koje su bile bez terapije LMWH ($p < 0.01$).⁴ U prospektivnoj studiji Vossena i saradnika komparirali su u prvoj trudnoći trudnice sa trombofilijom i profilaksom LMWH i kontrolnu grupu bez profilakse. Rizik za gubitak ploda je bio blago povišen u grupi bez tromboprofilakse (10/48,21%) u odnosu na (7/83,8%).¹⁴⁸

S toga zaključak, na osnovu objavljene literature, je da ukoliko se dokaže prisustvo trombofilije kod trudnica sa prethodno opterećenom anamnezom treba uključiti profilaksu sa antikoagulantima. Potencijalne opasnosti po fetus zbog primene antikoagulantne terapije su teratogenost, krvavljenje i gubitak trudnoće.¹⁴⁹ Nefrakcionirani heparin i nisko-molekularni heparin ne prolaze kroz posteljicu i samim tim nisu štetni po fetus.¹⁴⁹ Naprotiv oralni antikoagulasi, antagonisti K vitamina, prolaze posteljicu i mogu biti teratogeni. Najznačajnije komplikacije antikoagulantne terapije kod majke su krvarenje (za sve antikoagulanse), heparinom indukovana trombocitopenija, osteoporoza, alergijske reakcije na koži (za heparin i derivate heparina) i nekroza kože (za kumarinske derivate).¹⁴⁹ Nefrakcionisani i niskomolekularni heparin se ne izlučuju majčinim mlekom tako da se mogu bezbedno primenjivati tokom dojenja.

1.14.1. SMERNICE ZA PRIMENU ANTIKOAGULANTNE TERAPIJE U TRUDNOĆI

Američko udruženje obstetričara i ginekologa da lo je preporuke za primenu LMWH:¹⁸⁸

1. Za trombofilije niskog rizika bez prethodne VTE, savetuje se praćenje trudnoće bez antikoagulantne terapije. Niskomolekularni heparin ili nefrakcionirani heparin se preporučuje prepartalno. Trombofilije niskog rizika podrazumevaju mutaciju heterozigotnu formu FV Leiden, mutaciju FII G20210A, protein C i protein S deficit. Antikoagulantu terapiju peripartalno treba uključiti samo ukoliko postoje dodatni razlozi.
2. Za trombofilije niskog rizika sa jednom prethodnom epizodom VTE koje nisu na dugotrajnoj terapiji, antepartalni tretman podrazumeva profilaktičku ili srednju dozu LMWH ili nadzor bez terapije. Postpartalni tretman uključuje antikoagulantu terapiju ili srednje doze LMWH ili nefrakcioniranog Heparina.
3. Za trombofilije visokog rizika bez prethodne VTE potrebna je profilaktička primena LMWH ili nefrakcionarnog heparina antepartalno i post partalno. Trombofilije visokog rizika su deficit antitrombina, postojenje dvostruke heterozigotne mutacije za FII G20210A i FV Leiden, homozigot FV Leiden i homozigot za mutaciju FII G20210A.
4. Kod trombofilija visokog rizika sa prethodnom epizodom VTE potrebna je antikoagulantna terapija tokom cele trudnoće i porođaja sa srednjim dozama LMWH ili nefrakcioniranog heparina.
Postpartalno je potrebno da pacijent još 6 nedelja prima LMWH, sa terapijskim nivoom višim ili, barem na vrednostima prepartalne terapije.
5. Trudnice sa prethodnom epizodom VTE a bez trombofilije udružene sa pojedinačnim prolaznim rizikom koji nije prisutan duže vreme (isključujući trudnoću ili drugi estrogenom uzrokovan riziko faktor) treba pratiti bez antikoagulantne terapije pre i postpartalno. Trudnice sa jednom epizodom VTE, a bez trombofilije, potrebno je da antepartalno i postpartalno primaju profilaktičku dozu LMWH.

6. Trudnice bez trombofilije koje su imale jednu epizodu VTE, udruženom sa trudnoćom ili estrogen zavisnim faktorom bez dodatnih faktora rizika i koje nisu primale dugotrajnu antikoagulantu terapiju, potrebno je da primaju profilaktičku dozu antepartalno i postpartalno.
7. Žene koje su imale 2 ili više epizoda VTE i ne primaju dugotrajnu antikoagulantu terapiju potrebno je antepartalno da dobijaju profilaktičku ili terapijsku dozu LMWH i antikoagulantnu terapiju postpartalno. Ukoliko one već primaju terapijsku dozu LMWH ili nefrakcionirani heparin, potrebno je da se antikoagulantna terapija nastavi antepartalno i postpartalno.

Tabela 3: Šema primene heparina:¹⁵¹

	Profilaktička doza	Intermedijarna doza	Terapijska doza
Nefrakcionirani heparin	5000ij 2 puta dnevno	10000ij 2 puta dnevno	
Enoxaparin (Clexane)	40mg dnevno	40 mg na svakih 12h ili 1mg/kg dnevno	1 mg/kg 12 sati
Dalteparin (Fragmin)	5000ij dnevno	5000ij na 12 h	100ij/kg na 12 sati
Nadroparin (Fraxiparin)	3800ij dnevno	3800ij na 12 h	100ij/kg na 12 sati

Lečenje duboke venske tromboze koja je prvi put nastala u trudnoći može se sprovesti nisko-molekularnim heparinorn (LMWH) ili nefrakcionisanim heparinorn (UFH). Za početak lečenja venskog tromboembolizma u trudnoći niskomolekularnim heparinorn primenjuje se doza prilagođena telesnoj masi (po preporuci proizvođača).¹⁵⁰

Kako trudnoća napreduje, menja se volumen distribucije LMWH a promene bubrezne funkcije utiču na farmakodinamiku, tako da su za nastavak lečenja moguća tri pristupa: održavanje početne doze tokom čitavog perioda lečenja (obično je to cela trudnoća); izmena doze proporcionalno promeni telesne mase, određivanje heparinemije jednom mesečno 4-6 sati nakon aplikacije leka i podešavanje doze tako da nivo antiXa o bude 0,5-1,2 U/ml ukoliko se heparin daje dvokratno, a 1,0-2,0 U/ml ukoliko se aplikuje jednom dnevno.¹⁵¹

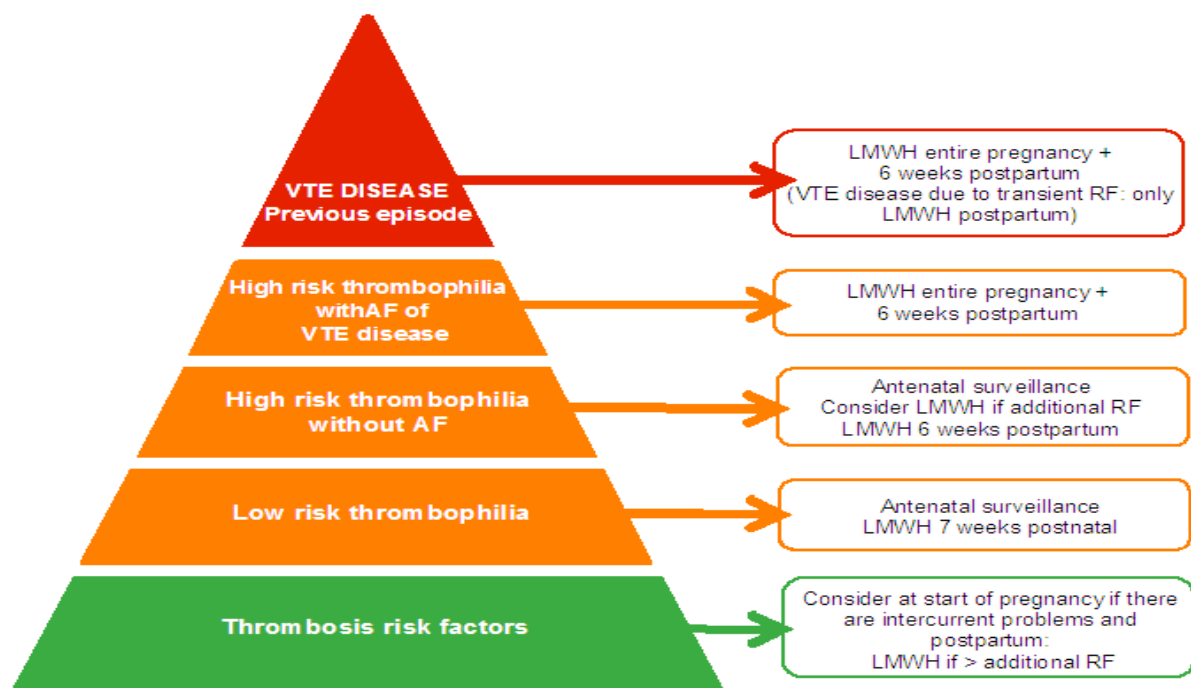
Da bi se izbegao neželjeni antikoagulantni efekat tokom porođaja se preporučuje se prekid primene heparina 24 sata pred elektivni porođaj.¹⁵¹

Ako postoji visok rizik od recidiva (proksimalna DVT ili PTE unutar 4 nedelje) lečenje se sprovodi i.v. heparinom koji se isključuje 4-6 sati pre očekivanog vremena porođaja. Ako porođaj započne spontano kod žena koje primaju s.c.

UFH neophodno je praćenje aPTT i ukoliko je test proizveden, pred sam porođaj potrebno je razmotriti davanje protamin sulfata u cilju neutralizacije heparina, ukoliko se proceni da je rizik od nastanka krvarenja veliki.¹⁵¹ Za sve prethodno nabrojane grupe indikovana je primena postpartalne profilakse heparinom ili oralnim antikoagulansima u trajanju od 4 do 8 nedelja.¹⁵¹

Slika 7: Postpartalna primena Fraxiparina

preuzeto sa www.anticoagulationinpregnancy.com



D dimer nastaje prilikom razgradnje stvorenog fibrinskog ugruška. Krajnji ishod koagulacije je stvaranje fibrina, što pokreće fibrinolizu. Stvaranje fibrinskih niti dovodi do vezivanja tkivnog plazminogen aktivatora za fibrin, što izaziva pretvaranje plazminogena u plazmin. Plazmin razgrađuje fibrin i fibrinogen. Krajnji raspadni produk fibrina je D dimer.

Vrednost D dimera se menja tokom tokom fiziološke trudnoće. Porast vrednosti D dimera je 46% od koncentracije u periodu 12 do 24 NG i od 24 do 34 NG. U toku prvog trimestra normalnu vrednost ima 84% pacijentkinja u drugom 33% i u trećem trimestru 1%.

Porast D dimera ukazuje na povećanu aktivnost trombina i povećanu fibrinolitičku aktivnost . S obzirom na porast vrednosti D dimera tokom trudnoće i doze LMWH treba prilagoditi tome.

Vrednost D dimera raste tokom DVT. Specifičnost nije visoka s obzirom da vrednost D dimera raste tokom fiziološke trudnoće. Povišen D dimer može biti kod: DIK (diseminirane intravaskularne koagulopatije), infekcije, nakon operacije, zbog maligniteta. Odsustvo porasta D dimera uz UZ ili kliničko odsustvo znakova DVT isključuje DVT.

Tabela 4: Vrednost D-dimera tokom trudnoće:

(preuzeto sa perinatology.com)

Jedinice	Van Trudnoće	Prvi trimestar	Drugi Trimestar	Treći trimestar
µg/mL	< 0.5	0.05 - 0.95	0.32 - 1.29	0.13 -1.7
µg/L ng/mL	< 500	50 - 950	320 - 1290	130 - 1700
nmol/L	< 2.7	0.3 - 5.2	1.8 - 7.1	0.7 - 9.3

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Smanjenje broja obstetričkih komplikacija kod trudnica sa trombofilijom predstavlja izazov u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Uprkos mnogobrojnim sprovedenim istraživanjima etiopatogeneza trombofilije nije do kraja razjašnjena. Verovatni etiološki faktori su, imunološki, genetski, oksidativni stres te bi idealni prediktivni model trebalo da obuhvati sve ove parametre.

S obzirom da je u osnovi svih komplikacija patofiziološki proces koji dovodi do poremećaja placentacije počinje u najranijoj gestaciji, pravovremena primena adekvatne terapije bi poboljšala ishod trudnoće.

1. Ispitati da li primena LMWH kod pacijentkinja sa opterećenom akušerskom anamnezom i dokazanom urođenom trombofilijom utiče na broj živorođene dece.
2. Odrediti učestalost obstetričkih komplikacija (spontani pobačaj, intrauterusna smrt ploda, abrupcija posteljice, PE, VTE, prevremeni porođaj i IUGR) kod trudnica sa opterećenom akušerskom anamnezom, dokazanom urođenom trombofilijom koje su na terapiji LMWH od momenta ultrasonografskog dijagnostikovanja trudnoće.
3. Utvrditi da li primena LMWH smanjuje učestalost obstetričkih komplikacija (VTE, PE, abrupcije, prevremenog porođaja, spontanog pobačaja, FMU) u odnosu na njihovu učestalost pre primene terapije.
4. Utvrditi da li je primena LMWH tok trudnoće bezbedna za trudnice sa dokazanom urođenom trombofilijom a praćenjem pojave eventualnog krvavljenja, trombocitopenije i alergije.
5. Utvrditi da li postoji korelacija između UZ nalaza (PTM, količine plodove vode, doplerskih indexa u arteriji umbilicalis i uterinim arterijama) i pojave komplikacija (IUGR, PE).
6. Ispitati da li primena Cardiopirina uz terapiju Fraxiparinom nakon detektovanja patološkog protoka kroz uterine arterije u 18 NG utiče na poboljšanja protoka kroz uterine arterije do termina porođaja a time i ishod trudnoće.
7. Da se utvrdi učestalost raličitih vrsta urođenih trombofilija u ispitivanoj grupi.
8. Da se ispita da li postoji razlika u učestalosti obstetričkih komplikacija u odnosu na vrstu urođene trombofilije.
9. Da se ispita učestalost pojave VTE 6 nedelja nakon porođaja kod trudnica sa urođenom trombofilijom koje su na profilaktičkim dozama LMWH i 6 nedelja nakon porođaja.

10. Utvrditi promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GSH-Px i GR) u eriocitima i plazmi kod trudnica sa trombofilijom pre i nakon porođaja u odnosu na zdrave trudnice.

11. Utvrditi promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, GSH-Px i GR) u posteljici trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice.

3. METODOLOGIJA

3.1. IZVOR PODATAKA

Longitudinalnom studijom je obuhvaćeno 60 trudnica koje su bile hospitalizovane i kontrolisane u GAK "Narodni Front" u Beogradu u toku 2013 godine, a kod kojih je dijagnoza urođene trombofilije postavljena pre ispitivane trudnoće. Svim trudnicama uključenim u ispitivanje prvi put je uključivana antikoagulantna terapija u vidu nisko molekularnom heparina-fraxiparina.

U studiju su uključene trudnice koje su:

- imale bar jednu trudnoću praćenu komplikacijama: spontani pobačaji, izostali pobačaji (missed abortion), intrauterusnu smrt ploda, prevremeni porođaj, preeklampsiju, gestacijsku hipertenziju, abrupciju posteljice, vensku tromboembolijsku komplikaciju.
- dokazanu urođenu trombofiliju
- jedноплодну trudnoću

U studiju nisu uključene trudnice:

- sa gemelarnom trudnoćom,
- -trudnoće ostvarene IVF-om,
- -trudnoće kod kojih je prekid indikovao hromozomskim ili anatomskim malformacijama ploda,
- trudnoće sa prethodno dijagnostikovanim autoimunim oboljenjem.

Na osnovu ovih kriterijuma, iz studije je isključeno 10 trudnica. Dve trudnice su samostalno napustile studiju, pet trudnica su trudnoću ostavile IVF-om, dve trudnice su prekinule trudnoću zbog patološkog kariotipa ploda a jedna trudnoća je prekinuta zbog srčane mane ploda. U studiji je ostalo 60 trudnica sa urođenom trombofilijom koje ispunjavaju postavljane kriterijume.

3.2. PODACI O POSMATRANIM POREMEĆAJIMA U TRUDNOĆI

- **Gestacijska hipertenzija** je definisana kao pojava povišenog krvnog pritiska iznad 140/90 mmHg nakon 20 NG.
- **Preeklampsija** je definisana kao pojava proteinurije više od 0,3 gr u 24 h urinu uz postojanje povišenog krvnog pritiska iznad 140/90 mmHg.
- **HELLP Sy** je definisan kao pojava trombocitopenije < 100.000 , porast transaminaza AST, ALT iznad graničnih vrednosti, proteinurije iznad 5 gr za 24 h i povišenog krvnog pritiska iznad 140/90 mmHg.
- Dijagnoza **abrupcije posteljice** je postavljena na osnovu kliničkih znakova (vaginalno krvavljenje, hipertonus uterusa, bol, retrohorioni hematoma, hemoragični šok ili potrošna koagulopatija).
- **IUGR** je definisan kao telesna masa manja od desetog percentila za datu gestacijsku dob.
- **Intrauterusna smrt ploda (FMU)** je definisana kao odsustvo srčane radnje ploda nakon 23 NG.
- **Missed abortion** je definisan kao prestanak srčane radnje ploda do 12 NG. Klasičan spontani pobačaj je definisan kao gubitak trudnoće koji je nastao usled krvavljenja do 12 NG.
- **Prevremeni porođaj** je definisan kao rođenje živog deteta od 25 do 34 NG.

Trudnice za hipertenzijom su lečene Methyldopom a 250 mg od 2x1, pa do 3x2, u slučajevima gde terapija nije pomogla u regulaciji pritiska uključivan je Amlopin.

Svi pregledi su vršeni i uzorci krvi uzimani tokom planiranih hospitalizacija: u prvom, drugom, trećem trimestru, neposredno pred porođaj i 2 dana nakon porođaja. Pri svakoj hospitalizaciji su kompletno klinički, laboratorijski (KKS, biohemija, D dimer) i ultrazvučno ispitane (posteljica, količina plodove vode, telesna masa, dopler indexi u umbilikalnoj i uterinim arterijama). Gestacijska starost je određivana prema amenoreji.

Sve ispitanice su dale pismeni pristanak za učešće u studiji koju je odobrila Etička Komisija Medicinskog Fakulteta u Beogradu.

Krvni pritisak je meren pri svakoj poseti, nakon 15-20 min mirovanja na desnoj nadlaktici sfigmomanometrom. Izražen je kao srednja vrednost dva uzastopna merenja. Svim trudnicama sa povišenim krvnim pritiskom je vođena šok lista.

Uzorci krvi su sakupljeni nakon prekonoćnog gladovanja (12 h) prema utvrđenom kalendaru poseta; u prvom trimestru (mediana 14. nedelja trudnoće), drugom trimestru (mediana 24. nedelja trudnoće), trećem trimestru (mediana 32. nedelja trudnoće), neposredno pred porođaj (mediana 38. nedelja trudnoće) i sedam nedelja posle porođaja.

Uzorci su uzimani u dva vakutejnera (1 serumski i 1 plazma sa EDTA kao antikoagulansom), centrifugirani na 1500 g 10 min na 40C; podeljeni u odgovarajuće alikvote od 200 µL i čuvani do analiziranja na temperaturi -800C.

3.3. PRIKUPLJENI PODACI

Kod ispitanica su određeni sledeći parametri:

3.3.1 Biofizički podaci

- godine
- paritet
- akušerska anamneza:
 - prethodni porođaji i njihov ishod-zdravo terminsko, dete, prevremeni porođaj, abrupcija, preeklampsija, intrauterusna smrt ploda, broj i vrsta pobačaja.

3.3.2 Biohemijski pokazatelji

- kompletna krvna slika: broj leukocita, eritrocita, trombocita, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), zapremina eritrocita (MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC)
- biohemijske analize: ureja, kreatinin, glukoza, ukupni proteini, mokraćna kiselina, gvožđe, CRP, ukupan bilirubin, alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST)
- vrednost D dimera

3.3.3 Hemodinamski pokazatelji

- utvrđivanje trudnoće (određivanje CRL-a i srčane radnje ploda)
- pregled u 12 NG (određivanje CRL-a i potvrđivanje starosti trudnoće, određivanje nuhealne translucence, protoka kroz ductus venosus)

- pregled u 24 NG (određivanje biometrije ploda i procena dinamike rasta ploda, određivanje količine plodove vode, lokalizacija i zrelost posteljice, određivanje protoka kroz a.umbilicalis Pi i S/D, određivanje protoka kroz a uterinu Ri)
- pregled u 36 NG ili pred porođaj ukoliko je nastupio ranije (određivanje biometrije ploda i procena rasta ploda, određivanje količine plodove vode, lokalizacija i zrelost posteljice, određivanje protoka kroz a.umbilicalis Pi I S/D, određivanje protoka kroz a uterinu Ri, protok kroz arteriu cerebri mediu Pi)
- pre porođaja (određivanje biometrije ploda i procena rasta ploda, određivanje količine plodove vode, lokalizacija i zrelost posteljice, određivanje protoka kroz a.umbilicalis Pi I S/D, određivanje protoka kroz a uterinu Ri, protok kroz arteriu cerebri mediu Pi)

3.3.4 Praćenje ishoda trudnoće

- pobačaj, vaginalni porođaj ili carski rez,
- Ap skor,
- pojava komplikacija u trudnoći: gestacijska hipertenzija, prevremeni porođaj, PE, abrupcija, IUGR, spontani pobačaj, FMU i VTE.

3.3.5 Biohemijske procedure

Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz eritocita

Biohemijska procedura uzorkovanja krvi

Od svih ispitanika uzeto je po 5 mL periferne venske krvi heparinizovanim špicem (0.2 ml heparina), pre i posle porođaja. Eritrociti i plazma su razdvojeni centrifugiranjem (10 min na 5000 rpm, 4°C). Izdvojeni eritrociti su ispirani tri puta fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje (10 min. na 5000 rpm, 4°C), i tako pripremljeni uzorci su zaleđeni na -82°C. Fetalna krv je uzimana odmah po porođaju iz pupčane vrpce u epruvete koje sadrže citrate i čuvana na -82°C. Pred početak rada uzorci su odmrznuti i u njima je određivana aktivnost enzima SOD, CAT, GSH-Px, i GR.

Biohemijske analize rađene su na: Institutu za Multidisciplinarna Istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

Određivanje aktivnosti enzima iz eritrocita

Alikvoti tri puta ispranih eritrocita su lizirani. U delu lizata određena je količina hemoglobina (Hb) metodom Drabkin & Austin, a lizati su korišćeni za određivanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite (CAT, GSH-Px, GR). Za određivanje aktivnosti Cu/Zn SOD bilo je neophodno prvo ukloniti hemoglobin metodom Tsuchihashi-ja.

Adrenalinska metoda za određivanje aktivnosti SOD

Metoda koju smo koristili u našem radu pripada grupi metoda "negativnog" tipa, jer se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od O_2^- . Ovu metodu su postavili Misra i Fridovich. Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina.

Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbanca na 480 nm. Porast apsorbanca na 480 nm potiče od akumulacije adrenohroma.

Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbcije. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima.

Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u citosolu predstavlja deo referentne vrednosti.

RASTVORI

1. Adrenalin, 3×10^{-4} M u 0.1 M HCl .

Rastvor se priprema neposredno pre merenja.

2. Karbonatni pufer, pH 10.2 , sastava:

Na_2CO_3 0.05 M

EDTA 1×10^{-4} M.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U 3.2 mL reakcione smeše koju čine: 3 mL karbonatnog pufera, pH 10.2 i 0.1 mL rastvora adrenalina, dodavano je 0.01 mL ranije pripremljenog supernatanta. Autooksidacija adrenalina praćena je u toku četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu od 26-30°C. Uporedo je rađena i kontrolna reakcija.

Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po g Hb (jedinica (U)/g Hb). Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorpcije.

Izračunavanje je urađeno po sledećoj jednačini:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times Hb \times \Delta K}$$

- ΔK - promena apsorpcije kontrolne reakcije u minuti
- ΔA - promena apsorpcije reakcije sa uzorkom u minuti
- V - zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (mL)
- Hb - količina hemoglobina (g /100 mL lizata)
- R - razblaženje.

Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT u lizatu određivana je po metodi Beutler-a. Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje H_2O_2 u prisustvu CAT na 230 nm. Na toj talasnoj dužini H_2O_2 apsorbuje svetlost.

RASTVORI

1. Pufer, pH 8.0 , sastava:

Tris HCl 1 M

EDTA 5 mM.

2. H_2O_2 10 mM

Tačna koncentracija H_2O_2 određivana je na sledeći način: u odnosu na apsorpciju razblaženog rastvora pufera (1:10), kao nula, očitavana je apsorpcija rastvora sastavljenog od 0.9 mL razblaženog pufera i 0.1 mL razblaženog 30% rastvora H_2O_2 (1:100). Koncentracija H_2O_2 izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji je za H_2O_2 na 230 nm 0.071, po formuli:

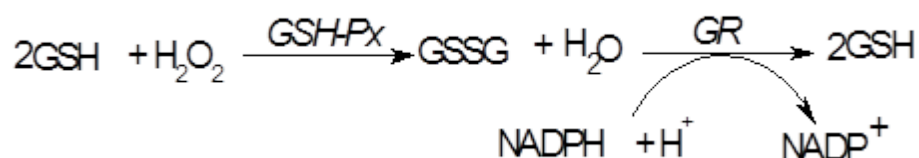
$$CAT = \frac{\Delta A \times R \times 100}{0,071 \times Hb \times V}$$

Dobijena koncentracija je potom razblaživana do 10 mM.

- ΔA - promena apsorpcije u minuti,
- R - razblaženje,
- V - zapremina uzorka (mL) i
- Hb - količina Hb (g/100 ml lizata).

Određivanje aktivnosti GSH-Px

Aktivnost GSH-Px određivana je po modifikovanoj metodi Paglia i Valentine. Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz GR na 340 nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju sa drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

RASTVORI

1. Fosfatni pufer pH 7.0.....0.5 M
2. NADPH u 1% NaHCO₃.....0.2 mM
3. GSH.....10-3 M
4. t-butil hidroperoksid.....0.03 M
5. GR (TYPE II spec. akt. 105 IU/mg proteina).

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U staklenu kivetu dodaje se 1.6 mL vode, 0.3 mL pufera, 0.6 mL rastvora NADPH, 0.3 mL rastvora GSH, 0.1 mL t-butil hidroperoksida i oko 0.05 mL uzorka, preračunati tako da bude 5% (m/m) Hb. Reakcija otpočinje dodatkom GR u količini od 105 IU/mg proteina. Reakcija se odvija na temperaturi od 37°C. Apсорpcija se očitava na 340nm od prvog do četvrtog minuta. Uporedo se radi i kontrolna reakcija. U kiveti kontrolne reakcije nalaze se svi reagensi osim uzorka.

Aktivnost GSH-Px se izračunava na sledeći način:

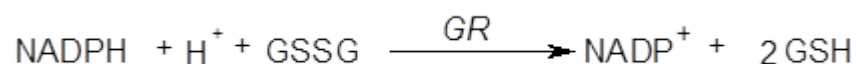
$$GSH - Px = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 100}{6.22 \times 0.833}$$

- ΔA -promena apsorpcije /min za uzorak i
- ΔB -promena apsorpcije/min za kontrolnu reakciju.

Rezultati se izražavaju u $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hb}$.

Određivanje aktivnosti GR

Određivanje aktivnosti GR rađeno je po metodi Glatzle i saradnika. GR katalizuje redukciju oksidovanog glutationa sa NADPH:



Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorpcije na 340 nm.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7,4.....0.5 M
2. EDTA.....0.5 M
3. GSSG.....2 mM
4. NADPH.....0.1 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U spektrofotometrijsku kivetu sipa se 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, 0,1 ml uzorka i vode do 3 ml (2ml). Reakcija otpočinje dodatkom 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorpcije u toku 3 minuta, a aktivnost izračunava pomoću jednačine:

$$GR = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 10^3 \times 3}{6.22 \times V \times Hb}$$

- ΔA -promena apsorpcije/minuti u uzorku,
- ΔB -promena apsorpcije/minuti u kontrolnom uzorku,
- V-zapremina uzorka i
- Hb-količina hemoglobina (g/100 ml lizata).

Aktivnost se izražava u $\mu\text{mol NADPH} / \text{min} / \text{g Hb}$.

Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima iz tkiva placente

Placente su uzimne odmah nakon porodjaja. Sa svake pojedinačne placente uzorkuje se sedam isečaka sa različitih kotiledona, koji su locirani između horionske i bazalne membrane i koji su bez vidljivih infekcija, hematoma i kalcifikacije. Uzorkovani isecci posteljica ispiraju se 0.9% rastvorom NaCl-a ohlađenog na 4°C, da bi se uklonili ostaci krvi. Isprani isecci placenta zamrzavaju se u tečnom azotu i čuvaju, do daljeg korišćenja u zamrzivaču na -85°C.

Deo mase od 1g placenti korišćen je za određivanje aktivnosti enzima SOD, CAT, GPX, GR. Priprema uzoraka i kompletna biohemijska analiza urađena je na Institutu za Multidisciplinarna Istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

Priprema uzoraka tkiva

Uzeto tkivo mase od 1g se macerira i homogenizuje u saharoznom puferu pH 7.4 (0.25 M saharoza, 0.05 M TRIS HCl i 1mM EDTA) blinder homogenizerom, 3 puta po 10 sekundi, po metodi Rossi-ja i saradnika, i de Waziers-a i Albrecht-a. Uzorci su potom sonifikovani 3 puta po 15 sekundi pri jačini od 10 kHz.

Sonifikat je centrifugiran u ultracentrifugi 90 minuta na 37500 rpm i 4°C, a zatim je izdvojen supernatant koji je dalje zamrznut na -82°C do određivanja količine proteina i enzimske aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, i GR-a.

Određivanje koncentracije proteina u tkivima

Koncentracija proteina u tkivima pacova određivana je po metodi Lowry-ja i saradnika. Vrednosti se očitavaju sa standardne krive poznatih koncentracija rastvora goveđeg albumina i izražavaju se u mg proteina po g tkiva.

Određivanje aktivnosti SOD

Metoda koju smo koristili u našem radu pripada grupi metoda "negativnog" tipa, jer se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od O₂. Prisutna SOD uklanja O₂- i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina.

Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbanca na 480 nm. Porast apsorbanca na 480 nm potiče od akumulacije adrenohroma.

Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorpcije. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u citosolu predstavlja deo referentne vrednosti.

RASTVORI:

1. Adrenalin, 3×10^{-4} M u 0.1 M HCl .

Rastvor se priprema neposredno pre merenja.

2. Karbonatni pufer, pH 10.2 , sastava:

Na₂CO₃ 0.05 M

EDTA 1×10^{-4} M.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U 3.2 mL reakcione smeše koju čine: 3 mL karbonatnog pufera, pH 10.2 i 0.1 mL rastvora adrenalina, dodavano je 0.01 mL ranije pripremljenog supernatanta. Autooksidacija adrenalina praćena je u toku četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu od 26-30°C. Uporedo je rađena i kontrolna reakcija. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti.

Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina. Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorpcije.

Izračunavanje je urađeno po sledećoj jednačini:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times L \times a \times \Delta K}$$

- ΔK - promena apsorpcije kontrolne reakcije u minuti
- ΔA - promena apsorpcije reakcije sa uzorkom u minuti
- V - zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (ml)
- L - količina proteina (mg / ml lizata)
- R - razblaženje.

Određivanje aktivnosti CAT

Aktivnost katalaze u sonifikatu određivana je po metodi Beutler-a. Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze na 230 nm. Na toj talasnoj dužini vodonik-peroksid apsorbuje svetlost.

RASTVORI:

1. Puffer, pH 8.0, sastava:

Tris HCl 1 M

EDTA 5 mM.

2. H₂O₂..... 10 mM.

Tačna koncentracija vodonik-peroksida određivana je na sledeći način: u odnosu na apsorpciju razblaženog rastvora pufera (1:10), kao nula, očitavana je apsorpcija rastvora sastavljenog od 0.9 mL razblaženog pufera i 0.1 mL razblaženog 30% rastvora H₂O₂ (1:100). Koncentracija H₂O₂ izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji je za H₂O₂ na 230 nm 0.071, po formuli:

$$C = \frac{\Delta A}{0,071}$$

Dobijena koncentracija je potom razblaživana do 10 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U kvarcnu kivetu u kojoj se nalazi 50 μL pufera dodavano je između 5 i 50 μL uzorka (zavisno od aktivnosti katalaze). Reakcija počinje dodatkom 1mL 10 mM rastvora vodonik-peroksida. Pad apsorbance praćen je na 230 nm u toku 3 minuta. Aktivnost je izražavana u jed./mg proteina odn. jed./g sveže mase, a jedinica je definisana kao količina redukovano H_2O_2 , izražena u μM , u minuti.

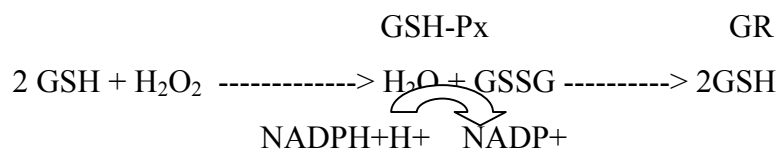
Izračunavanje je vršeno prema sledećoj jednačini:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times R}{0,071 \times \text{Low} \times V}$$

- * ΔA - promena absorbance u minuti
- * R - razblaženje
- * V - zapremina uzorka (ml)
- * Low - količina proteina (mg/ ml sonifikata).

Određivanje aktivnosti GSH-Px

Aktivnost glutation-peroksidaze određivana je po metodi Tamure i saradnika. Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz glutation reduktazu na 340nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju sa drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

RASTVORI

1. Fosfatni pufer pH 7.0.....0.5 M
2. NADPH u 1% NaHCO₃.....0.2 mM
3. GSH.....10⁻³ M
4. NaN₃1 mM
5. EDTA 1mM
6. t-butilhidroperoksid.....0,03 M
7. GR (TYPE II spec. akt. 105 IU/mg proteina).

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U staklenu kivetu spektrofotometra dodaje se 1.5 mL vode, 0.3 mL rastvora GSH, 0.6 mL rastvora NADPH, 0.1 mL NaN₃, 0.1 mL EDTA, 0.3 mL fosfatnog pufera, 0.1 mL t-butilhidroperoksida i oko 0.05 mL uzorka. Reakcija otpočinje dodatkom 105 IU/mg proteina GR. Reakcija se odvija na temperaturi 37°C. Absorpcija se očitava na 340nm, a reakcija traje 150 sekundi. Uporedo se radi i kontrolna reakcija. U kiveti kontrolne reakcije nalaze se svi reagensi osim uzorka.

Aktivnost GSH-Px se izračunava na sledeći način:

$$\text{GSH-Px} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3}{6,22 \times V \times \text{Low}}$$

* ΔA -promena apsorbance/min za uzorak

* ΔB -promena apsorbance/min za kontrolnu reakciju.

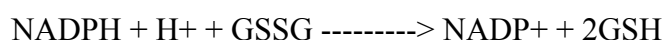
* V - zapremina uzorka u ml

* Low – koncentracija proteina u mg/ml

Rezultati su izraženi u nmol NADPH/min/mg proteina, odn. nmol NADPH/min/g vlažne mase.

Određivanje aktivnosti GR

Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze rađeno je po metodi Glatzle et al. Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovanu glutation.



Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorbance na 340nm.

RASTVORI:

1. Fosfatni pufer pH 7.4.....0,5 M
2. EDTA.....0.5 mM
3. GSSG.....2 mM
4. NADPH.....0.1 mM.

EKSPERIMENTALNI POSTUPAK

U spektrofotometrijsku kivetu sipa se 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, 0,1 ml uzorka i vode do 3 ml (2ml). Reakcija otpočinje dodatkom 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost izračunava pomoću jednačine:

$$\text{GR} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3}{6,22 \times V \times \text{Low}}$$

- * ΔA -promena absorbance/minuti u uzorku
- * ΔB -promena absorbance/minuti u kontrolnom uzorku
- * V- zapremina uzorka (ml)
- * Low- količina proteina (mg/ ml sonifikata)

Aktivnost je izražena u nmol NADPH/min/mg proteina,odn. nmol NADPH/min/g vlažne mase.

EPR spektroskopija za merenje oksidativnog statusa plazme

EPR (Elektron Paramagnetna Rezonanca) spektroskopija je korišćena za merenje nivoa askorbil radikala u plazmi, u cilju određivanja oksidacionog statusa. Alikvot plazme u zapremini od 60 μL je prebačen u kvarcnu kapilaru. EPR spektri su snimani na sobnoj temperature koristeći Varian E104-A EPR spectrometar, koji radi na 9,51 GHz pod sledećim uslovima: amplituda, 2 G; frekvencija 100 kHz; mikrotalasna snaga 10 mW. Spektri su dobijani korišćenjem softvera EW (Scientific Software; Bloomington, IL USA). Simulacije EPR spektara askorbil radikala radjene su u programu WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH; Rheinstetten, Germany).

3.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Pri analizi podataka primenjene su osnovne metode deskriptivne statistike: srednja vrednost (\bar{X}) sa merama disperzije (standardnom greškom (SE), standardnom devijacijom (SD), rasponom varijacije Min-Max i vrednostima medijane (Med) i moda (Mod)).

Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom.

Za testiranje statističke značajnosti i proveru hipoteza su korišćeni sledeći statistički testovi:

Studentov t-test (parametrijski test) za zavisne i nezavisne uzorke, analiza varijanse (ANOVA), jednofaktorska i dvofaktorska sa pratećom apriori Boniferonijevom t procedurom i post-hoc Tuckey HSD, LSD i Dunnett-ovim testom za višestruka poređenja među grupama.

Kvantifikacija povezanosti između varijabli je utvrđena Pirsonovom linearnom korelacijom.

Provera tipa raspodele kontinuiranih podataka u ovom istraživanju rađena je upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije ($\bar{x} \pm \text{SD}$) ukoliko su sledili normalnu raspodelu, odnosno kao geometrijske srednje vrednosti i intervali pouzdanosti (CI), ukoliko vrednosti nisu bile normalno distribuirane ali su nakon logaritmovanja sledile normalan tok.

Ukoliko varijable ni nakon logaritamske transformacije nisu sledile normalnu raspodelu prikazane su kao medijane i interkvartilni rasponi. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence. Poređenje normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli izvođeno je upotrebom Studentovog t-testa ili testa analize varijanse (ANOVA) sa Tukey's post-hoc testom, u zavisnosti od toga koliko grupa podataka se poredi.

Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovima. Razlike između kategoričkih varijabli proveravane su upotrebom χ^2 testa (tablice kontigencije). Provera postojanja značajnih korelacionih odnosa između ispitivanih varijabli rađena je Spearmanovom neparametarskom korelacionom analizom. Multipla regresiona analiza je korišćena za identifikaciju nezavisnih faktora uticaja na pojedine promenljive. Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio kada je verovatnoća (p, nivo značajnosti) bio manji ili jednak 0,05. Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa MS Excel i Medcalc (MedCalc ver. 11.4 Software, Belgium).

4. REZULTATI

4.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITIVANE GRUPE

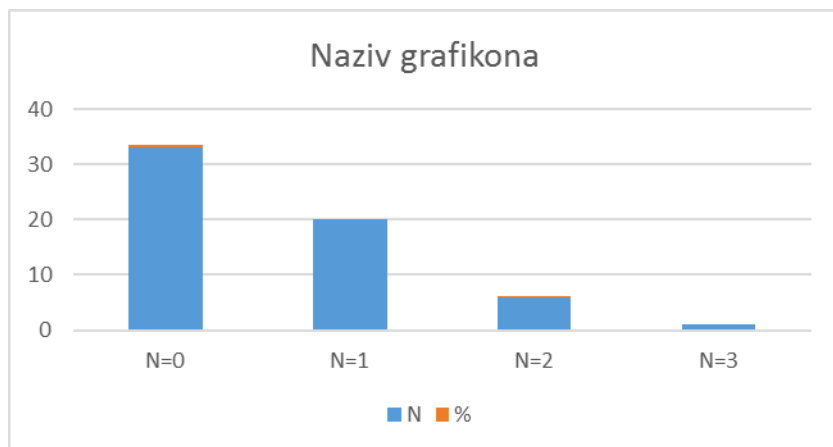
U sprovedenom ispitivanju učestvovalo je 60 trudnica koje su imale najmanje jednu prethodnu trudnoću koja je bila završena pobačajem ili porođajem uz obsteričke komplikacije (abrupciju, PE, HTA, prevremeni porođaj, VTE, FMU, spontani pobačaj). Trudnice su nakon toga ispitane i kod svih 60 trudnica uključenih u studiju dijagnostikovana je urođena trombofilija. Nakon UZ dijagnostikovane intrauterusne trudnoće svim trudnicama je u terapiju uključen LMWH u profilaktičkim ili terapijskim dozama.

Grafikon 1: Distribucija ispitivanih trudnica po godinama života (%)



Prosečna starost trudnica tokom ispitivanja je bila 33.1 godina života SD +/- 4.8.

Grafikon 2: Distribucija ispitivanih trudnica prema paritetu (%)



Sve trudnice su imale u anamnezi bar jednu trudnoću 60 (100%), najviše je bilo prvorođki 20 (33,3%)

4.2 ISHOD TRUDNOĆE

Tabela 4: Ishod trudnoće kod trudnica sa urođenim trombofilijama koje nisu imale terapiju LMWH.

Ishod trudnoće	Pobačaj	Porodaj pre 34 NG	Porodaj nakon 34 NG
N=60	33 (55%)	17 (28,3%)	10 (16,6%)

U grupi pacijentkinja koje su imale porodaj 27 (45%) nije postojala statistička značajnost između broja terminskih 10 (16,6%) i pretermijskih porođaja 17 (28,3%).

Tabela 5: Ishod trudnoće kod trudnica sa urođenim trombofilijama koje su imale terapiju LMWH uključenu od početka trudnoće.

Ishod trudnoće	Pobačaj	Porodaj pre 34 NG	Porodaj nakon 34 NG
N=60	0	8 (13,3%)	52 (86,6%)

Sve trudnoće su završene porođajem . Nije postojala statistički značajna razlika između broja terminskih i pretermijskih porođaja $p=0,13$ $X^2=2,28$

4.3 OBSTETRIČKE KOMPLIKACIJE KOD TRUDICA SA UROĐENOM TROMBOFILIJOM

4.3.1 Učestalost VTE

Tabela 6: Učestalost VTE kod trudnica sa urođenom trombofilijom koje u terapiji nisu imale LMWH

VTE	Učestalost	Procenat	Validni procenat	Kumulativni procenat
Ne	51	85.0	85.0	85.0
Da	9	15.0	15.0	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Od 60 ispitanih, 9 (15%) trudnica je imalo VTE kao komplikaciju, što nema statističku značajnost u odnosu na ispitivani uzorak $p= 0.027505$

Tabela 7: Učestalost VTE kod trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale terapiju LMWH.

VTE	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni Procenat
Ne	58	96.7	96.7	96.7
Da	2	3.3	3.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Samo 2 (3,3%) pacijentkinje su imale VTE u trudnoći nakon uvođenja LMWH u terapiju i nije postojala statistička značajnost u odnosu na ukupan uzorak $p=0,73$

Tabela 8: Komparacija učestalosti VTE kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama bez terapije LMWH i trudnoćama u kojima je uvedena terapija LMWH-om.

Učestalost VTE u trudnoći	Sa VTE	Bez VTE
Bez terapije LMWH	9 (15%)	51 (85%)
Sa terapijom LMWH	2 (3,33%)	58 (96,6%)

Postojala je statistički značajna razlika u broju trudnica sa VTE i urođenom trombofilijom koje su bile bez antikoagulantne terapije i onih kojima je bio uključen LMWH u terapiju od početka trudnoće $P=0,035$, $Z= -2,111$.

4.3.2 Učestalost prevremenog porođaja

Tabela 9: Učestalost prevremenog porođaja (pre 34 NG) kod kod trudnica sa urođenom trombofilijom a pre uvođenja Fraxiparina u terapiju

Prevremeni porođaj	Učestalost	Procenat	Validni proceat	Kumulativni procenat
Ne	42	70.0	70.0	70.0
Da	18	30.0	30.0	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Od 60 trudnica njih 18 (30%) je imalo prevremeni porođaj u anamnezi pre uvođenja terapije LMWH.

Tabela 10: Učestalost prevremenog porođaja (pre 34NG) kod trudnica sa urođenom trombofilijom a nakon uvođenja Fraxiparina u terapiju

Prevremeni porođaj	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni procenat
Ne	52	86.7	86.7	86.7
Da	8	13.3	13.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Nakon uvođena LMWH u terapiju broj prevremenih porođaja (pre 34 NG) je bio značajno niži, kod 8 (13,3%) pacijentkinja.

Tabela 11: Poređenje učestalosti terminskih i pretermijskih porođaja u trudnoćama sa urođenom trombofilijom kod kojih nije bila uključena terapija LMWH u odnosu na one kojima je od početka trudnoće LMWH bio uključen u terapiju.

Porodaj	Pre 34 NG	Posle 34 NG
Bez terapije LMWH	17 (20,7%)	9 (10,3%)
UZ terapiju LMWH	8 (13,3%)	52 (86,6%)

U grupi trudnica sa trombofilijom i terapijom LMWH postojala je visoko statistički značajna razlika u broju terminskih porođaja ($p=0,0004$, $X^2=12,51$) u odnosu na grupu bez terapije LMWH. Postojala statistički značajana razlika po broju prevremenih porođaja između dve grupe ($p<0,00012$). $X^2=23,835$

4.3.3 Učestalost PE

Tabela 12: Učestalost preeklampsije kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom a pre terapije LMWH

PE	Učestalost	Procenat	Validni procenat	Kumulativni procenat
Ne	41	68.3	68.3	68.3
Da	19	31.7	31.7	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Kod 19 odnosno 31,7% pacijentkinja se kao komplikacija javila PE u trudnoći pre uvođenja terapije.

Tabela 13: Učestalost PE kod trudnica sa urođenom trombofilijom a nakon uvođenja LMWH u terapiju

PE	Učestalost	Procenat	Validni procenat	Kumulativni procenat
Ne	46	76.7	76.7	76.7
Da	14	23.3	23.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Nakon terapije 14 (23,3%) pacijentkinja je imalo PE

Tabela 14: Poređenje učestalosti PE u trudnoćama sa urođenom pre i nakon uvođenja terapije LMWH.

PE	Bez PE	Sa PE
Bez terapije LMWH	41 (68,33%)	19 (31,67%)
Sa terapijom LMWH	46 (76,7)	14 (23,3%)

Nije postojala statistički značajna razlika u pojavi PE kod trudnica koje su trudnoći uz terapiju LMWH-om razvile PE, u odnosu na pojavu PE pre uvođenja LMWH ($\chi^2=0,831$, sign test z-0,46, p-0,64).

4.3.4 Učestalost abrupcije posteljice

Tabela 15: Učestalost abrupcije posteljice kod trudnica sa urođenom trombofilijom a pre uvođenja terapije LMWH

Abrupcija	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni procenat
Ne	55	91.7	91.7	91.7
Da	5	8.3	8.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

U trudnoćama pre uvođenja LMWH abrupcija posteljice kao komplikacije se javila kod 5 (8,3%) pacijentkinja.

Tabela 16: Učestalost abrupcije kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom u trudnoći u kojoj su primale LMWH

Abrupcija	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni procenat
Ne	56	93.3	93.3	93.3
Da	4	6,3	6,3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Nakon uvođenja LMWH u terapiju abrupcija je bila komplikacija kod 4(6,3%) pacijentkinja.

Tabela 17: Pojava abrupcije u trudnoćama sa urođenom trombofilijom pre uvođenja terapije LMWH u odnosu na trudnoće sa terapijom LMWH

abrupcija	Bez abrupcije	Sa abrupcijom
Bez terapije LMWH	55 (91,7%)	5 (8,3%)
Sa terapijom LMWH	56 (93,3%)	4 (6,3 %)

Nije postojala statistička značajnost između dve grupe u pojavi abrupcije ($X^2=0,12$, $p=0,73$)

4.3.5 Učestalost HTA i IUGR

Tabela 18: Pojava gestacijske hipertenzije u trudnoćama sa urođenom trombofilijom a pre uvođenja terapije LMWH u odnosu na trudnoće sa terapijom LMWH

HTA	Nije bilo HTA	Sa HTA
Bez terapije	28 (46,6%)	32 (53,3%)
Sa terapijom	38 (63,3%)	22 (36,6%)

Statistički veći broj trudnica u grupi sa HTA a bez terapije LMWH $\chi^2=8,85$, $P=0,003$.

Tabela 19: Učestalost IUGR-a kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama pre uvođenja terapije LMWH

IUGR	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni procenat
Ne	37	61.7	61.7	61.7
Da	23	38.3	38.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

IUGR je postojao kao komplikacija kod 23 (38,3%) trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoći bez terapije LMWH

Tabela 20: Učestalost IUGR-a u trudnoćama sa urođenom trombofilijom kojima je u terapiju uveden LMWH

IUGR	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni Procenat
Ne	37	61.7	61.7	61.7
Da	23	38.3	38.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

IUGR je postojao kod 23 pacijentkinje sa urođenom trombofilijom i nakon uvođenja LMWH.

Tabela 21: Poređenje učestalost IUGR-a u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom bez terapije LMWH u odnosu na trudnoće uz terapiju LMWH .

IUGR	Bez IUGR-a	Sa IUGR-om
Bez TH	37 (61,7%)	23 (38,3%)
Sa TH	37 (61,7%)	23 (38,3%)

Nije postojala statistička značajnost $p > 0,005$ u učestalosti IUGR kod trudnica sa urođenom trombofilijom bez obzira na terapiju LMWH.

4.3.6 Učestalost i karakteristike pobačaja

Tabela 22: Učestalost pobačaja kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama pre uvođenja terapije LMWH

Pobačaji	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni Procenat
Ne	6	10.0	10.0	10.0
Da	54	90.0	90.0	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

U trudnoćama pre uvođenja LMWH učestalost pobačaja je bila veoma visoka. Pobačaj su imale 54 (90%) pacijentkinje.

Tabela 23: Učestalost pobačaja kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama u kojima je uvedena terapija LMWH

Pobačaji	Učestaost	Procenat	Validni Procenat	Kumlativni procenat
Ne	60	100.0	100.0	100.0

U grupi od 60 kontrolisanih trudnoća uz terapiju LMWH nije bilo spontanijh pobačaja.

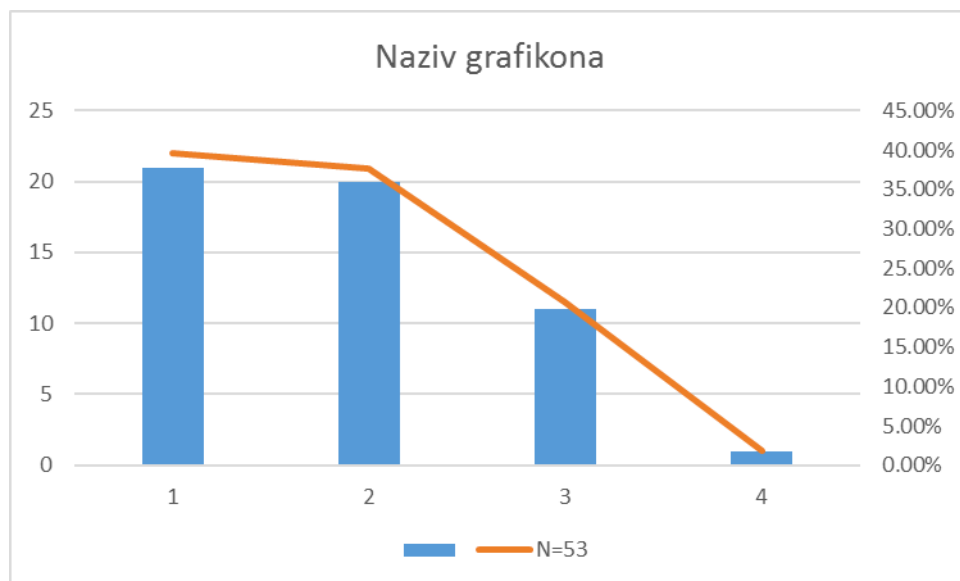
Tabela 24: Poređenje učestalost pobačaja u trudnoćama sa urođenom trombofilijom bez fraxiparinske terapije u odnosu na trudnoće sa terapijom LMWH

Pobačaj	Bez pobačaja	Sa pobačajem
Bez terapije LMWH	6 (10%)	54 (90%)
Sa terapijom LMWH	60 (100%)	0 (0%)

Postojala je veoma visoka statistička značajnost između grupe kod koje nije uvedena terapija gde je broj pobačaja bio 54 u odnosu na grupu kod koje je u trudnoći uvedena terapija LMWH i gde su sve trudnoće završene porođajem.

($\chi^2=76,7$ uz Yatesovu korekciju, $p<0,001$)

Grafikon 3: Distribucija učestalosti spontanih pobačaja u trudnoćama sa urođenom trombofilijom bez terapije LMWH



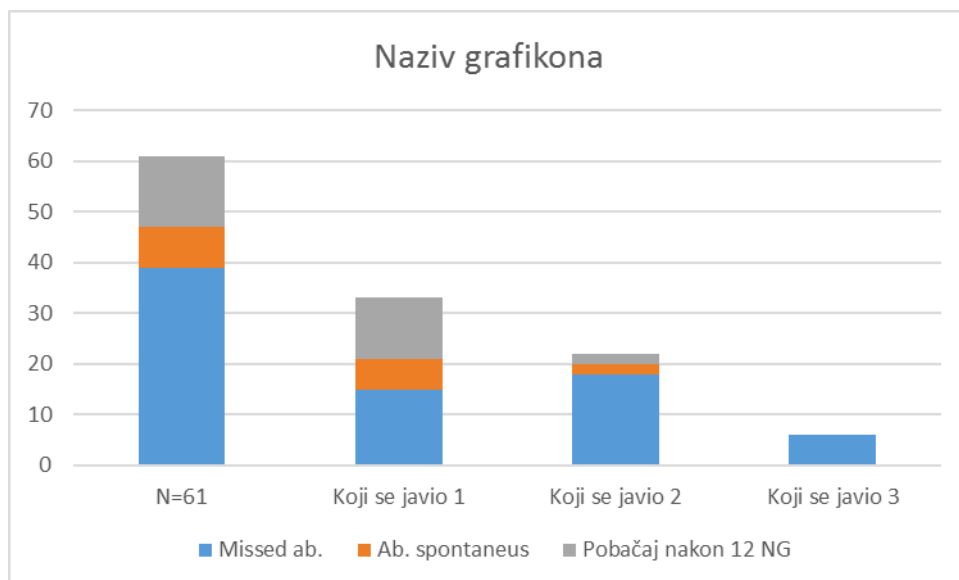
Ukupno je bilo 54 pacijentkinje koje su anamnezi imale pobačaj. 21 (39,6%) pacijentkinja je imala jedan pobačaja, 33 (62,37%) pacijentkinja su imale više pobačaja. Najveću učestalost su imale pacijentkinje sa dva pobačaja.

Tabela 25: Karakteristike pobačaja u trudnoćama sa urođenom trombofilijom i bez terapije LMWH terapije

pobačaj	Missed ab.	Ab. spontaneus	Pobačaj nakon 12 NG
N=61	39 (63,9%)	8 (13,1%)	14 (22,9%)
Koji se javio 1	15(38,4%)	6	12
Koji se javio 2	18(46,1%)	2	2
Koji se javio 3	6 (15,9%)	0	0

Postojao je statistički značajano veći broju missed ab u odnosu na klasičan spontani pobačaj ($Z=4,55$; $P<0,001$) i pobačaj nakon 12 NG ($Z=4,15$; $p<0,01$)

Grafikon 4: Distribucija pobačaja po karakteristikama u trudnoćama sa urođenom trombofilijom bez fraxiparinske terapije



4.3.7 Učestalost FMU

Tabela broj 26: Učestalost FMU kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama bez terapije LMWH

FMU	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni Procenat
Ne	43	71.7	71.7	71.7
Da	17	28.3	28.3	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Pre uvođenja terapije LMWH, FMU kao komplikacija je postojao kod 17 (28,3%) pacijentkinja

Tabela 27: Učestalost FMU kod trudnica sa urođenom trombofilijom u trudnoćama sa uvedenom terapijom LMWH

FMU	Učestalost	Procenat	Validni Procenat	Kumulativni Procenat
Ne	59	98.3	98.3	98.3
Da	1	1.7	1.7	100.0
Ukupno	60	100.0	100.0	

Samo 1 (1,7%) pacijentkinja je imala FMU kao komplikaciju a nakon uvođenja terapije LMWH.

Tabela 28: Poređenje učestalost FMU-a u trudnoćama sa urođenom trombofilijom bez terapije LMWH u odnosu na trudnoće sa dokazanom naslednom trombofilijom i terapijom LMWH

FMU	Bez FMU-a	Sa FMU-om
Bez LMWH	43 (71,7%)	17 (28,3%)
Sa LMWH	59 (98,3%)	1 (1,6%)

U grupi trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom i terapijom LMWH stopa trudnoća je bila statistički visoko značajna u odnosu na grupu bez terapije LMWH ($X^2=14,70$ sa Yatesovom korekcijom $p<0,001$)

4.4 KARAKTERISTIKE POROĐAJA KOD TRUDNICA UZ TERAPIJU LMWH

Tabela 29: Način završavanja porođaja kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom kojima je na početku trudnoće uveden LMWH

porođaj	vaginalni	Carski rez
N=60	23 (38,3%)	37 (61,6%)

Postoji statistički značajno veća učestalost porođaja završenih Carskim rezom u odnosu na vaginalni (sign test $Z 3,40$; $p=0,0007$)

Tabela 30: Telesna masa novorođenčeta na rođenju kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom kojima je na početku trudnoće u terapiju uveden LMWH

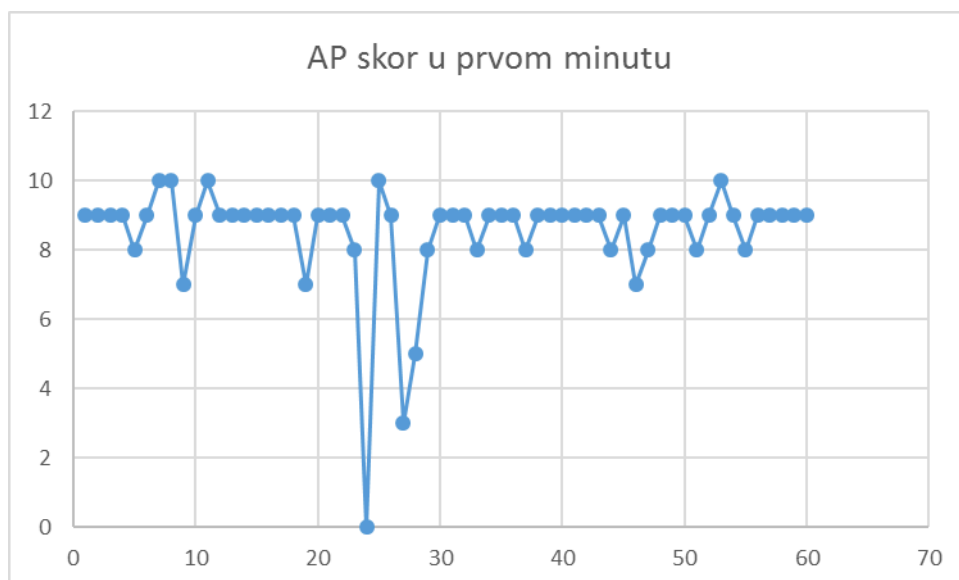
PTM	Do 1500	Do 2500	Do 3000	preko 3000
N	3 (5,08%)	14(23,3%)	14(23,3%)	29(48,33%)

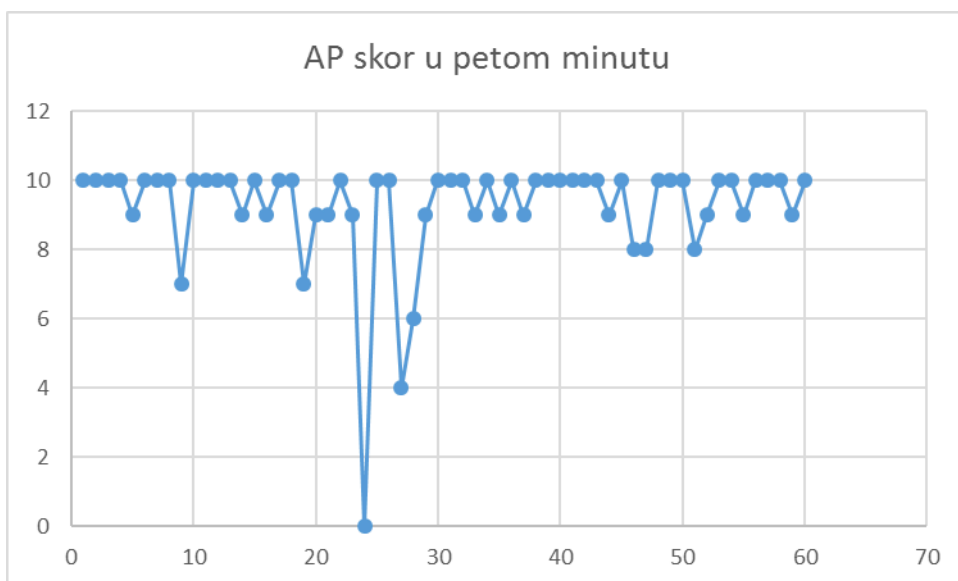
Prosečna telesna masa na rođenju je bila 2855,59 +/- 689,47; Najmanja telesna masa na rođenju je bila 1250 gr.

Grafikon 5: Distribucija telesne mase na rođenju:



Grafikon 6 i 7: Ap skor u 1 i 5 minutu kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom kojima je na početku trudnoće uveden LMWH





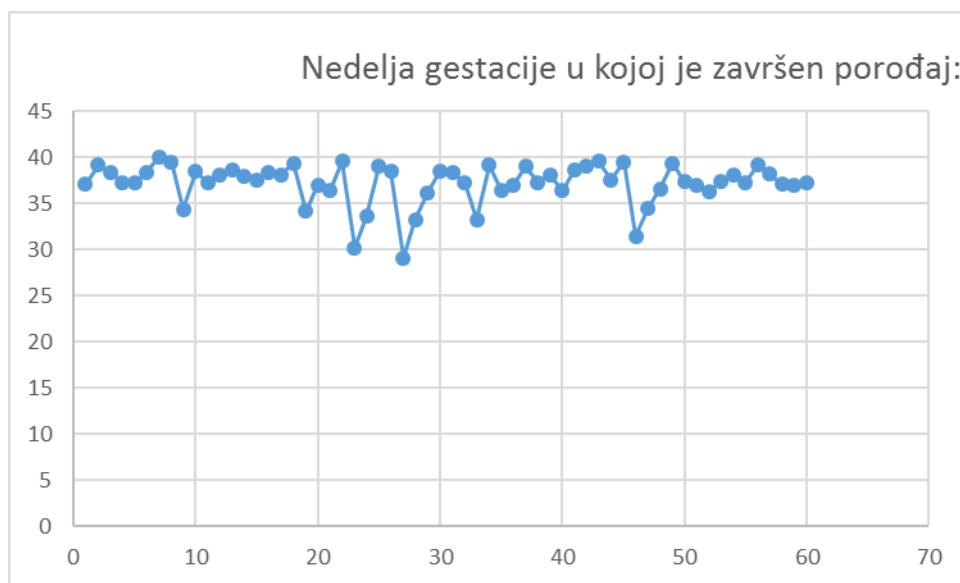
Prosečan Ap skor na rođenju u 1 minutu je iznosio 8,51(SD+/- 1,57), a u 5 min 9,23 (+/- 1,65).

Tabela 31: Doza LMWH koju su trudnice sa dokazanom naslednom trombofilijom primale od početka trudnoće

Fraxiparin	0,3ml	0,6 ml
N	20 (33,3%)	40 (66,6%)

Tokom trudnoće veći broj trudnica 40 (66,6%) je na osnovu dijagnoze, opterećene akušerske anamneze i vrednosti D dimera bio tretiran terapijskim dozama Fraxiparina (0,6 ml sc).

Grafikon 8: Distribucija vremena završavanja porođaja kod trudnica sa dokazanom naslednom trombofilijom kojima je na početku trudnoće uveden LMWH



Prosečno vreme završavanja trudnoće je bilo 38,67NG (SD+/- 11,03).

4.5 ULTRASONOGRAFSKI PARAMETRI U TRUDNOĆI SA TERAPIJOM LMWH

4.5.1 Protok kroz uterine arterije u II i III trimestru

Tabela 32: Prosečna vrednosti indexa otpora (Ri) u a uterinim arterijama tokom drugog i trećeg trimestra kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom kojima je na početku trudnoće uveden LMWH

A uterine	sinistri	dextri
II trimestar	0,57 (SD+/-12,08)	0,55 (SD+/-7,94)
III trimestra	0,52 (SD+/-11,02)	0,53 (SD+/- 6,39)

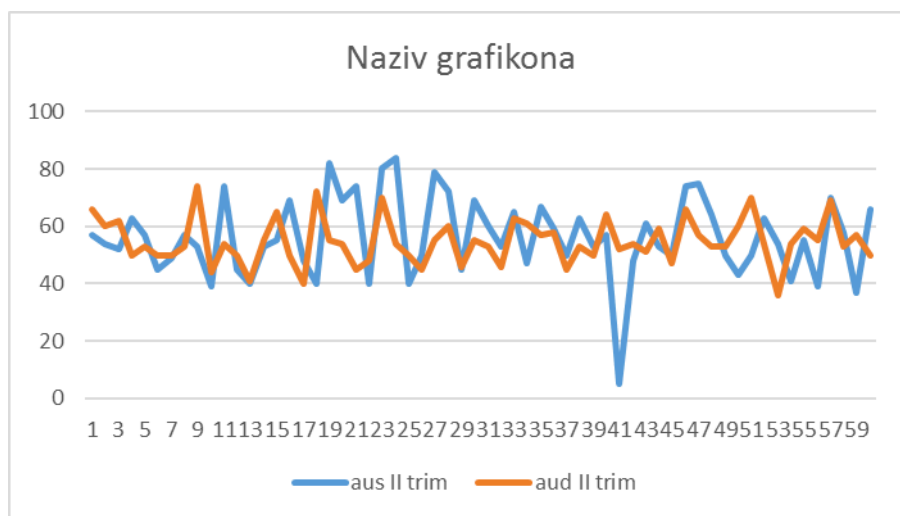
Kod svih pacijentkinja sa patološkim protokom kroz a.uterine registrovanim u drugom trimestru (u 18 NG) u terapiju je pored LMWH uključen Cardiopirin. Uočeno je statistički značajno poboljšanje protoka u III trimestru (parni t test-t=4,093,p<0,0001)

Tabela 33: Poređenje učestalosti povišenog Ri u uterinim arterijama u 18 NG u odnosu na period od 32-26 NG a nakon uvođenja Cardiopirina

	patološke	normalne
Ri a uterine u 18 NG	32 (53,3%)	28 (46,67%)
Ri a uterine u 36 NG	24 (40%)	36 (60%)

Ovi rezultati ukazuju na statistički značajno ($\chi^2=16,59$; $p<0,001$), poboljšanje protoka nakon uvođenja terapije Cardiopirinom.

Grafikon 9: Distribucija indexa otpora u uterinim arterijama u drugom i trećem trimestru



4.5.2 Protok kroz umbilikalnu arteriju u III trimestru

Tabela 34: Pulsatilni index u a.umbilicalis tokom III trimestra kod trudnica koje su primale LMWH tokom trudnoće

A umbil.	Povišen/patološki Pi za gestaciju	Povišen/patološki S/D za gestaciju
N	46 (76,6%)	14 (23,3%)

Prosečna brzina protoka kroz a. umbilicalis u terminu porođaja je bila $Pi=0,99$ $SD\pm 0,22$, $S/D=2,84$ $SD\pm 0,72$

Tabela 35: Komparacija učestalosti patološkog pulsatilnog indexa u a.umbilicalis u III trimestru kod trudnica koje su primale LMWH tokom trudnoće i AP skora na rođenju

	Normalan	Patološki
a.umbilicalis (Pi; S/D)	46 (76,6%)	14 (23,3%)
AP skor	53 (88,3%)	7 (11,67%)

Nije postojala statistički značajna razlika između patološkog protoka kroz a.umbilicalis i lošeg Ap skora na rođenju ($X=2,83$, $p=0,009$)

4.5.3 Odnos komplikacija i UPC cirkulacije

Tabela 36: Komparacija učestalosti patoloških vrednosti indexa otpora u uterinim arterijama tokom II trimestra i IUGR-a u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale LMWH

	prisutne	odsutne
A uterine patološke	32 (53,3%)	28 (46,6)
IUGR	21 (65%)	39 (35%)

Postojala je statistički značajna veza između patološkog protoka kroz uterine arterije tokom II trimestra kod trudnica koje su primale LMWH i pojave IUGR-a ($X^2=4,80$ $p<0,028$)

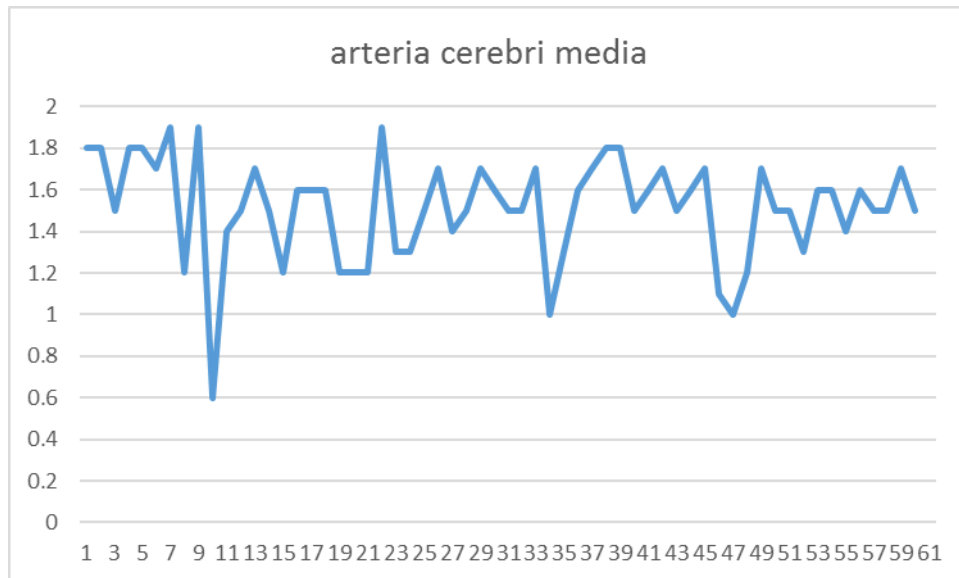
Tabela 37: Komparacija učestalosti povišenog indexa otpora u uterinim arterijama u III trimestru i PE u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale LMWH

	prisutan	odsutan
Patološki protok kroz a. uterine	32 (53,3%)	28 (46,67%)
PE	14 (23,3%)	46 (76,7%)

Uočena je statistički značajna veza između patološkog protoka kroz arterije uterine u III trimestru kod trudnica sa urođenom trombofilijom na terapiji LMWH i pojave PE ($X^2=16,59$; $p<0,001$)

4.5.4 Pulsatilni index u a. cerebri medii

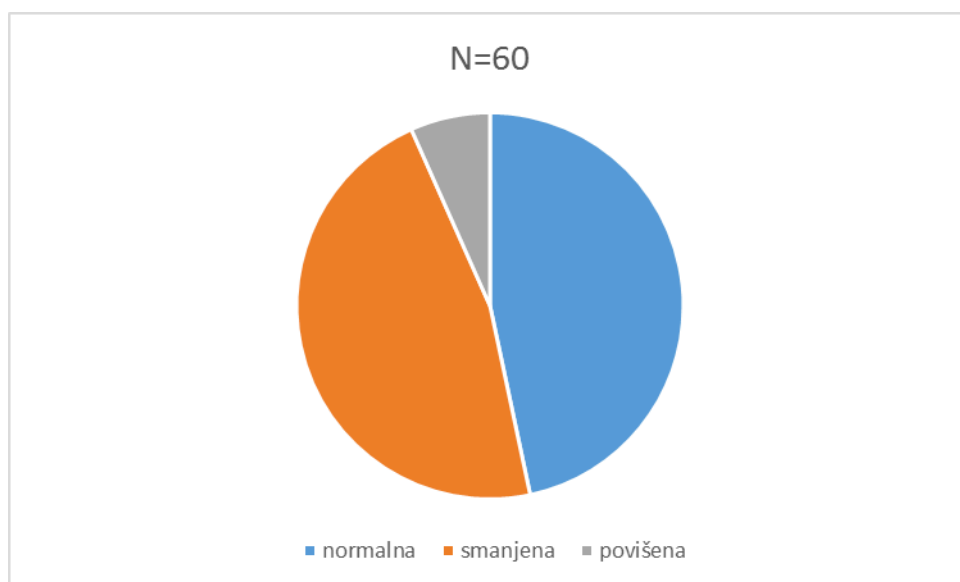
Grafikon 10: Brzina protoka kroz arteriju cerebri mediu pre porođaja u u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale LMWH



Prosečna brzina protoka je bila $Pi-1,4$ ($SD\pm 0,2-0,5$)

4.5.5. Ostali UZ parametri

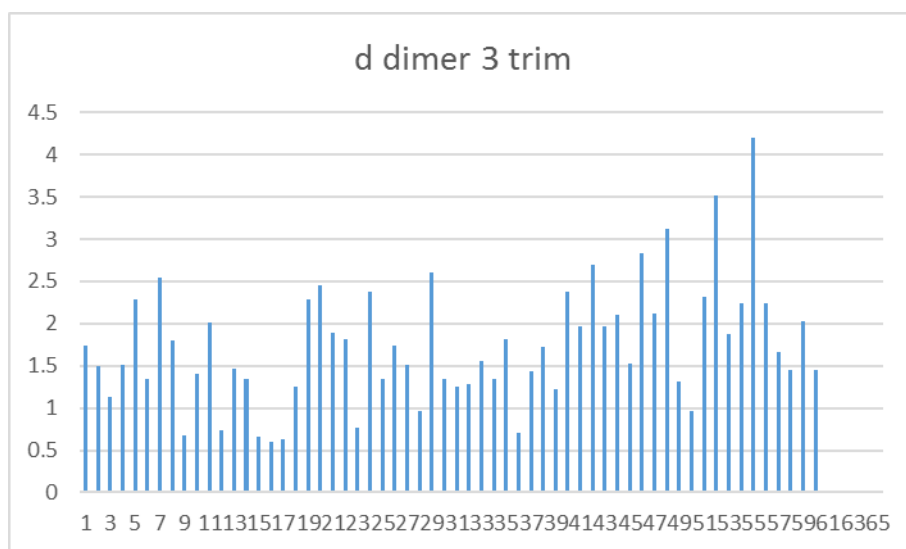
Grafikon 11: Ultrasonografski merena količina plodove u u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale LMWH



Kod polovine pacijentkinja količina plodove vode je bila smanjena 28 (46,67%), a kod druge polovine normalna 28 (46,67%).

4.5.6: Vrednost D dimera

Grafikon 12: Vrednost D dimera tokom trećeg trimestra u grupi trudnica sa urođenom trombofilijom koje su tokom trudnoće primale LMWH



Prosečna vrednost D dimera je bila 1,5 (SD +/- 0,4-0,6), i nije odstupala od referentnih vrednosti.

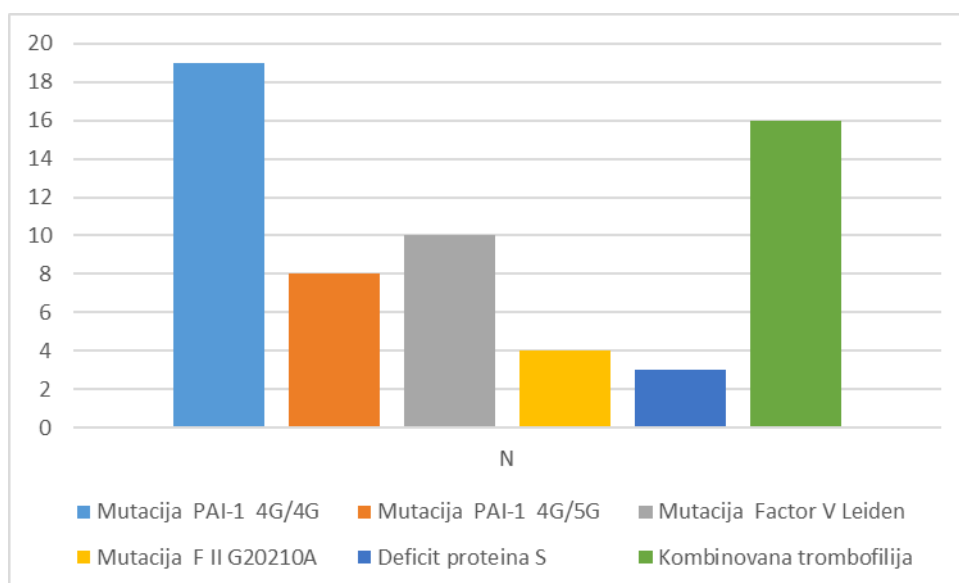
4.6 DISTRIBUCIJA UROĐENIH TROMBOFILIJA

Tabela 38: Distribucija urođenih trombofilija kod trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom

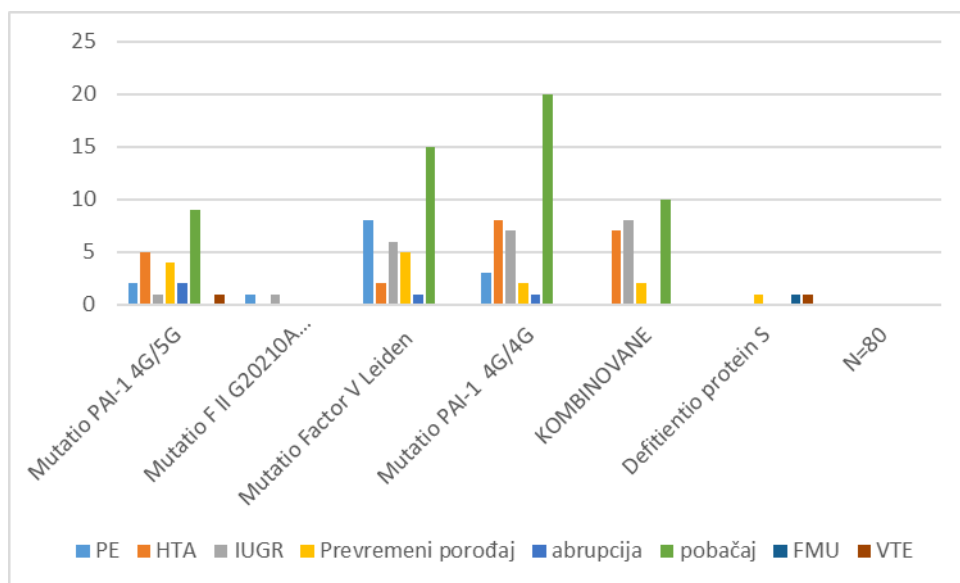
Nasledna trombofilija	N
Mutacija PAI-1 4G/4G	19 (11,4%)
Mutacija PAI-1 4G/5G	8 (4,8%)
Mutacija Factor V Leiden	10 (6%)
Mutacija F II G20210A	4 (2,4%)
Deficit proteina S	3 (1,8%)
Kombinovana trombofilija	16 (9,6%)

Među 60 trudnica u našoj studiji najveći broj je imao mutaciju PAI-1 27 (16,2%), kombinovanu mutaciju je imalo 16 (9,6%) trudnica, mutaciju FV Leiden je imalo 10 (6%) trudnica, mutaciju FII 4 (2,4%) a najmanji broj trudnica je imao deficit proteina S 3 (1,8%). Najčešća kombinovana trombofilija je bila mutacija MTHFR heterozigot i mutacija PAI 4G/5G.

Grafikon 13: Distribucija urođenih trombofilija



Grafikon 14: Distribucija vrsta urođenih trombofilija u odnosu na obstetričke komplikacije pre uvođenja LMWH:



Pacijentkinje koje su nosioci PAI 4G/5G mutacije pre uvođenja terapije su imale gestacijsku hipertenziju kao najčešću komplikaciju. Najčešća komplikacija Mutacije F V Leiden bila je PE i abrupcija. Pacijentkinje sa dokazanom mutacijom PAI 4G/4G su najčešće imale gestacijsku hipertenziju i intrauterusni zastoj u rastu ploda. Najčešća komplikacija kod kombinovanih trombofilija bio je IUGR.

Tabela 39: Distribucija komplikacija u odnosu na tipove urođenih trombofilija pre uvođenja terapije LMWH .

	PE	HTA	IUGR	Prevr em ni porođaj	abrupci ja	pobač aj	FMU	VTE
Mutatio PAI-1 4G/5G	2	5	1	4	2	9	0	1
Mutatio F II G20210A heterozigot	1	0	1	0	0	0	0	0
Mutatio Factor V Leiden	8	2	6	5	1	15	0	0
Mutatio PAI-1 4G/4G	3	8	7	2	1	20	0	0
KOMBINOVA NE	0	7	8	2	0	10	0	0
Defitientio protein S	0	0	0	1	0	0	1	1
N=80	N=14	N=22	N=23	N=14	N=4	N=56	N=2	N=2

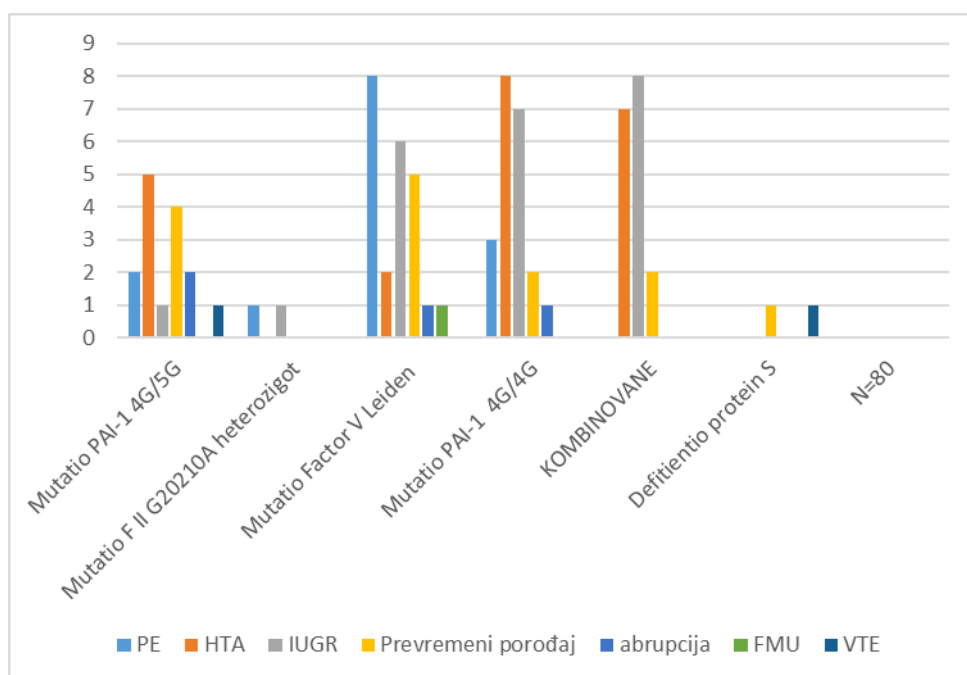
Najčešće komplikacije pre uvođenja terapije LMWH su bile spontani pobačaj, IUGR, gestacijska hipertenzija i FMU.

Tabela 40: Distribucija komplikacija u odnosu na vrste urođenih trombofilija nakon uvođenja terapije LMWH

	PE	HTA	IUGR	Prevremen i porođaj	abrupcija	FMU	VTE
Mutatio PAI-1 4G/5G	2	5	1	4	2	0	1
Mutatio F II G20210A heterozigot	1	0	1	0	0	0	0
Mutatio Factor V Leiden	8	2	6	5	1	1	0
Mutatio PAI-1 4G/4G	3	8	7	2	1	0	0
KOMBINOVA NE	0	7	8	2	0	0	0
Defitientio protein S	0	0	0	1	0	0	1
N=80	N=14	N=22	N=23	N=14	N=4	N=1	N=2

Nakon uvođenja terapije LMWH i dalje su najčešće komplikacije bile HTA i IUGR ali se značajno smanjio broj IUGR

Grafikon 15: Distribucija komplikacija u odnosu na tipove urođenih trombofilija nakon uvođenja terapije LMWH



Nakon uvođenja terapije ukupni broj komplikacija se značajno smanjio $X^2=10,08$ $p=0,039$ značajno. Pacijentkinje koje su nosioci PAI 4G/5G mutacije nakon uvođenja LMWH su i dalje imale najčešću komplikaciju gestacijsku hipertenziju. Najčešća komplikacija Mutacije F V Leiden bila je PE a broj abrupcija posteljice je bio značajno smanjen. Pacijentkinje sa dokazanom mutacijom PAI 4G/4G su i nakon uvođenja LMWH imale najčešću komplikaciju gestacijskiu hipertenziju i intrauterusni zastoj u rastu ploda. Najčešća komplikacija kod kombinovanih trombofilija bio je IUGR.

Tabela 41: Učestalost komplikacija tokom primene LMWH

	Alergija	Krvavljenje	Trombocitopenija
Fraxiparin	3 (5%)	0	10 (16,67%)

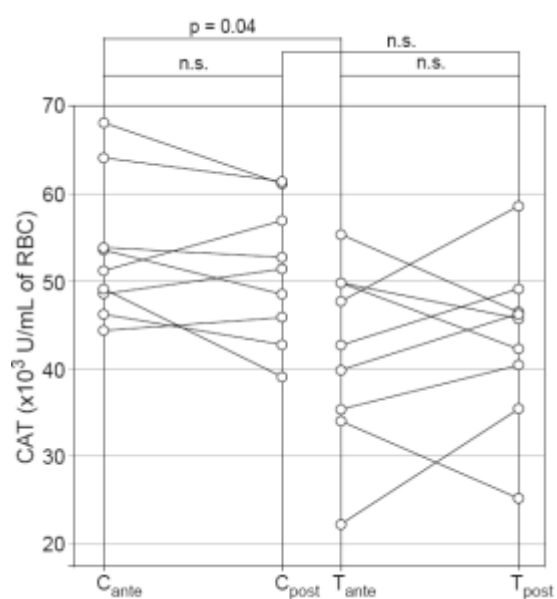
Mali broj komplikacija tokom primene LMWH ukazuje na sigurnost primene tokom trudnoće.

4.7 AKTIVNOST ENZIMA U ERITROCITIMA TRUDNICA:

Aktivnost enzimskih komponenti) antioksidativnog zaštitnog sistema: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px), glutation reduktaze (GR) određivane su u populaciji trudnica sa dokazanom urođenom trombofilijom, starosti od 22 do 40 godina. Enzimske aktivnosti su određivane i kod populacije zdravih trudnica prosečne starosti od 21 do 40 godina i te vrednosti su uzete kao kontrolne .

4.7.1 Aktivnost CAT u eritrocitima

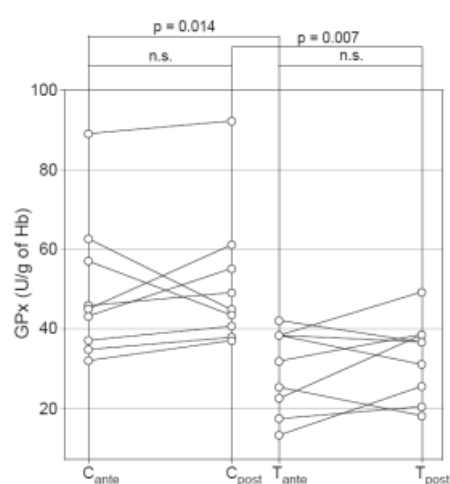
Grafikon 16: Aktivnost katalaze (CAT) u eritrocitima izolovanih iz krvi pacijentkinja pre porodjaja i posle porodjaja kontrolnih subjekata (Cante i Cpost) i obolelih od trombofilije (Tante i Tpost).



Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici. Grafikon pokazuje da je katalazna aktivnost u eritrocitima kod porodilja obolelih od trombofilije niža u odnosu na kontrole. Ovakvo stanje se može objasniti povećanim nivoom CAT inhibitora (NO) u cirkulaciji trudnica i porodilja obolelih od trombofilije.

4.7.2 Aktivnost (GSH-Px) u eritrocitima

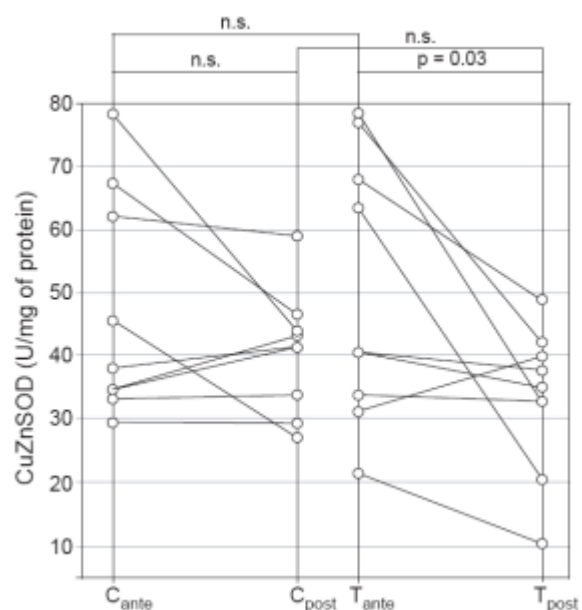
Grafikon 17: Glutation-peroksidazna (GSH-Px) aktivnost u eritrocitima izolovanih iz krvi pacijentkinja pre porodjaja i posle porodjaja kontrolnih subjekata (Cante i Cpost) i obolelih od trombofilije (Tante i Tpost).



Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici. Glutation peroksidaza pokazuje, isti trend kao i katalaza. GSH-Px se inhibira NO-derivatom - ONOO⁻. Promene aktivnosti ova dva enzima nisu detektovane u okviru iste grupe (obolelih i kontrola) pre porodjaja i nakon porodjaja.

4.7.3 Aktivnost CuZnSOD u eritrocitima

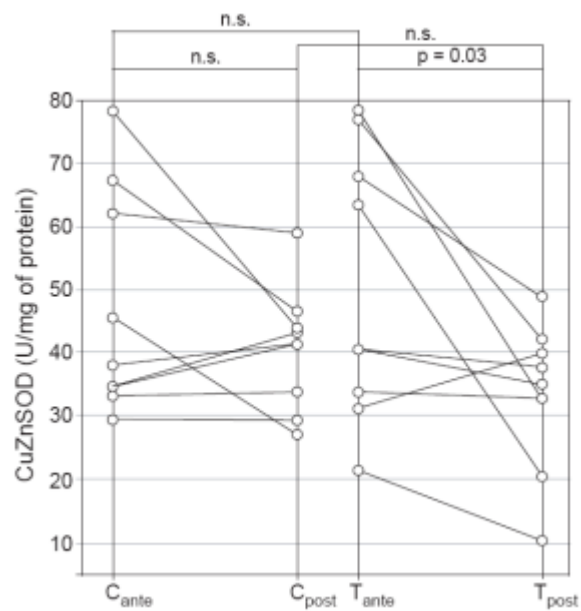
Grafikon 18: CuZnSOD aktivnost u eritrocitima izolovanih iz krvi pacijentkinja pre porodjaja i posle porodjaja kontrolnih subjekata (Cante i Cpost) i obolelih od trombofilije (Tante i Tpost).



Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici. Aktivnosti CuZnSOD u eritrocitima se ne razlikuju izmedju kontrola i obolelih od trombofilije. Medjutim značajna razlika u aktivnosti ovog enzima uočava se u eritrocitima obolelih od trombofilije pre i posle porodjaja. Aktivnost CuZnSOD u eritrocitima obolelih od trombofilije značajno opada posle porodjaja. Ovaj rezultat ukazuje na povećanu koncentraciju vodonik peroksida u krvotoku obolelih od trombofilije nakon porodjaja, jer je H₂O₂ inhibitor CuZnSOD.

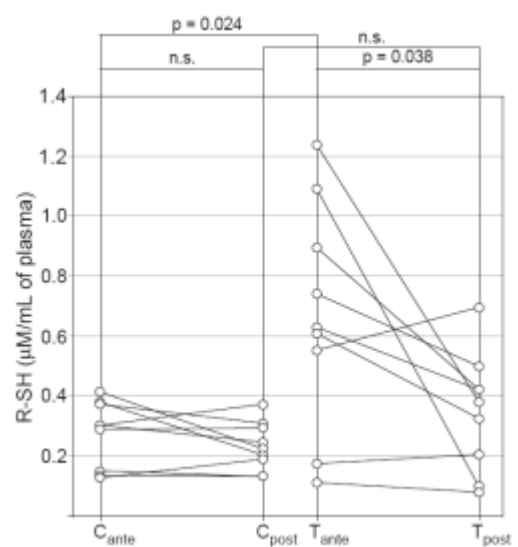
4.7.4 Aktivnost SH grupa i askorbil radikala u plazmi trudnica

Grafikon 19: Nivo SH grupa i askorbil radikala u plazmi trudnica



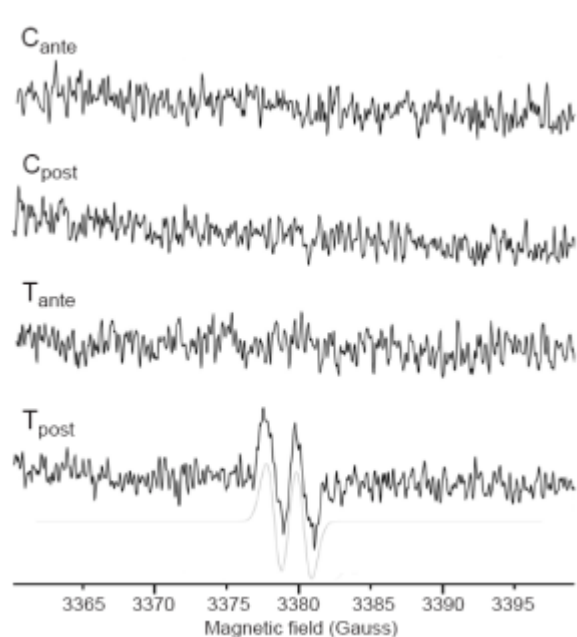
Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Grafikon 20: Nivo R-SH grupa u plazmi pacijentkinja pre porodjaja i posle porodjaja kontrolnih subjekata (Cante i Cpost) i obolelih od trombofilije (Tante i Tpost).



Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Grafikon 21: EPR spektri askorbil radikala u plazmi pacijentkinja pre porodjaja i posle porodjaja kontrolnih subjekata (Cante i Cpost) i obolelih od trombofilije (Tante i Tpost) .



Statistički značajne razlike i pripadajuće p vrednosti su prikazane na slici.

Grafikon pokazuje da se askorbil radikal ne detektuje u plazmi ni kontrolnih subjekata pre i posle porodjaja (Cante and Cpost) ni u plazmi obolelih od trombofilije pre porodjaja (Tante). EPR signal askorbil radikala je detektovan samo u plazmi obolelih od trombofilije posle porodjaja (Tpost). Ovaj rezultat ukazuje na razvijanje oksidativnog stresa u cirkulaciji obolelih od trombofilije nakon porodjaja. Ovaj zaključak je potvrđen i rezultatima dobijenim merenjem SH grupa u plazmi. Nivo SH grupa je značajno niži u plazmi obolelih od trombofilije posle porodjaja u odnosu na nivo u plazmi pre porodjaja. Kod kontrola nema značajnih razlika u nivou SH grupa u plazmi pre i posle porodjaja. Kada se porede vrednosti kontrola i obolelih pre porodjaja, nivo SH grupa u plazmi obolelih od trombofilije je viši u odnosu na vrednosti za kontrole. Ovaj rezultat ukazuje da nema oksidativnog stresa u cirkulaciji subjekata obolelih od trombofilije pre porodjaja.

4.8 AKTIVNOST ENZIMA U TKIVU PLACENTI

Tabela 41: Aktivnost enzima uključenih u sistem zaštite od oksidacionih oštećenja u tkivu placenti kontrola i obolelih od trombofilije

Enzimi	Kontrole	Trombofilija	p-vrednosti
H₂O₂ potrošači	Srednje vrednosti ± S.D. (U/mg proteina)		
Katalaze	87.4±21.6	266.0±73.8	<0.001
GSH peroksidaze	21.1±11.1	61.1±18.3	<0.001
GSH reduktaze	29.8±6.5	71.4±22.9	<0.001
Superoxide dismutirajući			
MnSOD	15.7±4.9	13.3±3.1	>0.05
CuZnSOD	11.8±5.0	17.5±5.2	>0.05

U Tabeli su prikazane aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja u tkivu placenti kod zdravih porodilja (kontrola) i obolelih od trombofilije. U prvu grupu su svrstani enzimi koji troše vodonik peroksid, a to su katalaza, glutation peroksidaza I glutation reduktaza. U drugu grupu je svrstana superoksid dismutaz (MnSOD I CuZnSOD) a, enzim koji proizvodi vodonik peroksid. Statistički značajne razlike su uzimane $p < 0.05$.

Rezultati aktivnosti enzima pokazuju da su enzimi koji koriste H₂O₂, I svojom aktivnošću smanjuju koncentraciju peroksida, su tri puta povišenih aktivnosti u tkivu placenti kod subjekata obolelih od trombofilije u odnosu na kontrolne subjekte. Ovaj rezultat ukazuje na povećanu proizvodnju H₂O₂ u placentama kod obolelih od trombofilije. Aktivnost superoksid dismutase nije značajno modifikovana u tkivu placenti obolelih od trombofilije u odnosu na kontrole.

5. DISKUSIJA

Trombofilija je česta kod žena s neobjašnjivim, ponavljanim neuspelim trudnoćama. Njena učestalost u opštoj populaciji je do 65%. Trudnice sa urođenom trombofilijom imaju rizik za razvoj ostalih ozbiljnih komplikacija u trudnoći: PE, IUGR-a, spontanih pobačaja, FMU-a, abrupcije posteljice, VTE. Tačan rizik za nastanak ovih komplikacija je nepoznat i zahteva dalje prospektivne i longitudinalne studije. Prema dostupnim informacijama iz literature povećan rizik za nastanak komplikacija postoji tokom cele trudnoće, a najveći je u drugom i trećem trimestru trudnoće.

U sprovedenom ispitivanju učestvovalo je 60 trudnica koje su u anamnezi imale najmanje jednu trudnoću koja je bila završena pobačajem ili porođajem uz obsteričke komplikacije (abrupciju, PE, HTA, prevremeni porođaj, IUGR, FMU). Svim trudnicama je nakon sprovedenih ispitivanja dijagnostikovana urođena trombofilija. Terapija profilaktičkim ili terapijskim dozama LMWH je u narednoj trudnoći ordinirana nakon ultrasonografski potvrđene trudnoće.

Prosečna starost trudnica sa urođenom trombofilijom a tokom aktuelne trudnoće je bila 33.1 godina života SD +/-4.8.

Jedna od najčešćih komplikacija u trudnoći i puerperijumu je VTE. Duboka venska tromboza je 80% svih VTE u trudnoći dok plućna embolija čini ostalih 20%.⁵³ Najčešće se DVT i plućna embolija javljaju u drugoj polovini trudnoće ili nakon porođaja.^{53,154} Po lokalizaciji DVT se najčešće javljaju proksimalno i na levoj nozi. Smatra se da je v. iliaca communis trpi pritisak od strane tela kičmenog pršljena i a. iliace communis te je lokalizacija tromboze češća na proksimalnom delu leve noge.¹⁵⁵ Distalne tromboze su najčešće lokalizovane na desnoj potkolenici.¹⁵⁵ Tromboza pelvičnih vena je retka van trudnoće (do 1%) ali se njena učestalost povećava tokom trudnoće i nakon porođaja.¹⁵⁶ U studiji Lenza VTE je bila značajno češća kod trudnica sa FVL mutacijom (41.7%; $p < 0.005$) i deficitom proteina S (25.0%; $p < 0.005$).¹⁵⁶

L Coriu je u svojoj studiji pronašla da je VTE u trudnoći češća kod trudnica sa mutacijom FV Leiden heterozigot, ali nije pronašla vezu između VTE i mutacije FII.¹⁵⁶ Veći broj autora navodi da je DVT češća kod trudnica sa mutacijom FV Leiden i mutacijom FII.^{157,158} Schenk je u takođe našao značajnu udruženost 4G/4G alela PAI-1 i VTE tokom trudnoće.

Homozigotna mutacija PAI-1 inhibitor gena (4G/4G) je relativno česta u opštoj populaciji, ali sa niskim rizikom za razvoj VTE u trudnoći.^{160,161} Nasuprot tome deficit antitrombina, mutacija FV Leiden i mutacija FII su retke u opštoj populaciji ali su visoko trombogene.^{160,161} U našoj studiji VTE je u trudnoći pre uvođenja LMWH bila prisutna kod 9 (15%) od 60 (100%) pacijentkinja, što nije imalo statističku značajnost u odnosu na ukupan uzorak $p=0.027505$. Najčešće se javljala u vidu DVT donjih ekstremiteta kod 9 (90%). Kod jedne pacijentkinje se nakon kiretaže javila se plućna embolija (10%).

Kod 2 pacijentkinje sa DVT-om dokazana je mutacija gena za PAI-1 4G/4G takođe 2 pacijentkinje su bile nosioci mutacije FV Leiden i kombinovane trombofilije. U trudnoći nakon uvođenja LMWH u terapiju statistički značajno je bio smanjen broj trudnica koje su imale VTE kao komplikaciju $P=0.035$, $Z=-2,111$.

25% svih koncepcija i 15% svih klinički prepoznatih trudnoća se završi pobačajem.¹⁶³ Gubitak trudnoće kod pacijentkinja u fertilnom periodu se javlja sa učestalošću od 9-13%. Tri i više ponovljenih pobačaja ima 1-2% žena reproduktivne dobi, dok 2 i više ponovljenih pobačaja se javlja kod 5% svih žena reproduktivne dobi.³¹ U zavisnosti perioda trudnoće pobačaj smo definisali kao rani gubitak trudnoće (pre 12 nedelje gestacije), kasni gubitak trudnoće (nakon 12 NG) i ponovljene pobačaje (2 i više vezanih ranih gubitaka trudnoće ili 2 kasna gubitka trudnoće).

Ivanov je u svojoj studiji opisao veću učestalost spontanih pobačaja ali ne i missed abortiona u periodu do 14 NG kod trudnica sa mutacijom FII i mutacijom FV Leiden.¹⁶² Mutacija inhibitora plazminogena-1 PAI 4G/4G (85,5%) i 4G/5G (22,4%) je uzrok spontanih pobačaja.¹⁶³ Druge studije navode značajnu učestalost rekurentnih pobačaja i mutacije FV Leiden.⁴ Greer navodi da je među 396 ispitanih trudnica sa najmanje jednim gubitkom trudnoće mutacija FV Leiden bila prisutna kod 29 trudnica (73%), mutacija FII kod 6 (1,5%) i samo kod 1 pacijentkinje (0,3%) sa obe mutacije.³¹

Od 60 trudnoća pre uvođenja LMWH 33 (55%) su završene pobačajem, a 27 (45%) porođajem. 10 (16,67%) pacijentkinja su u svojoj anamnezi imale i porođaj i pobačaj. Veći broj trudnoća završenih spontanim pobačajima u odnosu na porođaj kod trudnica koje nisu imale u terapiji LMWH govori u prilog lošeg ishoda trudnoće kod trudnica sa trombofilijom a bez antikoagulantne terapije. Ukupan broj porođaja je bilo 33 a pobačaja 97. Najveći broj pacijentkinja je imao jedan porođaj 20 (33%). Broj terminskih porođaja je bio statistički značajno viši kod trudnica koje su primale terapiju LMWH ($p=0,0004$, $X^2=12,51$).

Postojala je statistički značajan razlika u broju prevremenih porođaja između trudnoća bez i trudnoća sa LMWH (pmanje od 0,00012, X^2 -23,83).

Jedan pobačaj u anamnezi je imala 21 (35%), dva i više pobačaja imale su 32 (53,3%) trudnice. Trudnice koje su imale jedan pobačaj u anamnezi su imale i druge obstetričke komplikacije zbog čega su ispitivane na urođene trombofilije. Možemo uočiti da je kod trudnica sa urođenom trombofilijom a bez terapije LMWH bio značajan broj pobačaja, i da je broj ponovljenih veći od pojedinačnih pobačaja 32 (53,3%) u odnosu 21 (35%). Pojedinačni spontani pobačaji su najčešće posledica hromozomskih aberacija, dok su ponovljeni spontani pobačaji češći kod trudnica sa trombofilijom. Zbog toga svim pacijentkinjama koje u anamnezi imaju dva i više spontana pobačaja treba savetovati ispitivanje na urođene ili stečene trombofilije.

U ispitivanoj grupi pacijentkinja nakon uvođenja LMWH u terapiju ni jedna trudnoća nije završena pobačajem. Primena LMWH u terapiji statistički visoko značajno redukuje broj pobačaja ($X^2=76,7$ uz Yatesovu korekciju, $p<0,001$).

Anlizirali smo pobačaje po tipu pobačaja: spontani pobačaj čija definicija prema WHO predstavlja svaki neželjeni gubitak trudnoće pre 28 NG, prema epidemiološkim dijagnozama smatra se neželjenim gubitkom trudnoće sa plodom lakšim od 500 gr ili kraćim od 25 cm što odgovara 20-22 NG. Mi smo spontane pobačaje podelili na pobačaje pre i nakon 12 NG. Missed abortion je izostali pobačaj sa uginulim plodom i trofoblastom u kavumu uterusa nakon 12 NG, spontani pobačaj. Od ukupno 53 pacijentkinje koje su anamnezi imale pobačaj kod 28 (43,33) se radilo o missed abortionu, 12 (20%) pacijentkinja je imalo spontani pobačaj do 12 NG, a 14 (23,3%) pacijentkinja spontani pobačaj nakon 12 NG. U odnosu na tip pobačaja postojao je statistički značajano veći broj missed ab. u odnosu na klasičan spontani pobačaj ($Z=4,55$; $P<0,001$). Ovi podaci ukazuju da je teorija o lošoj placentaciji i pojava mikrotromba u posteljičnim krvnim sudovima u najranijem periodu placentacije tačna, jer je broj missed abortiona statistički veći u odnosu na druga dva tipa pobačaja.

Preeklampsija je multifaktorijalni vaskularni poremećaj u trudnoći. Njena pojava je vezana za hiperkoagulabilnost u trudnoći i poremećaje na nivou posteljice. PE je u 40% čini komplikaciju koja se javlja kod pacijentkinja sa urođenom trombofilijom.¹⁶⁴

U našoj studiji od 60 pacijentkinja PE kao komplikaciju nakon nakon koje je rađeno ispitivanje na trombofilije imalo je imalo 19 (31,6%) trudnica. Dokazanu mutaciju PAI -1 je imalo 5 (3%) trudnica dok je mutaciju FV Leiden imalo 10 (6%) trudnica, samo 1 trudnica je imala mutaciju F II (0,6%).

Autori u svojim istraživanjima navode da je među trudnicama sa PE najveći broj njih ima mutaciju F II, i mutaciju F V Leiden. Oni takođe nisu uočili vezu između pojave PE i deficita proteina S kao i deficita antitrombina.¹⁶⁴ U našem radu nije postojala veća učestalost PE kod pacijentkinja sa deficitom proteina S, što možemo objasniti malim brojem pacijentkinja sa ovom trombofilijom u ukupnom uzorku ispitivanih trudnica. U skladu sa rezultatima drugih autora PE je bila najčešća kod trudnica koje su bile nosioci mutacije F V Leiden.

Uvođenje LMWH nije uticalo na smanjenu pojavu PE i ona je postojala kod 14 (23,3%) trudnica. Nije postojalo statistički značajno smanjenje broja pacijentkinja sa PE nakon uvođenja terapije LMWH ($X^2=0,831$, sign test $z=0,46$, $p=0,64$). I u grupi pacijentkinja sa PE uz terapiju LMWH najveći broj je bio nosioc mutacije FV Leiden 8 (4,6%).

Deveer u svom radu nije uočio vezu između PE i mutacije FV Leiden kao i drugih oblika urođene trombofilije.¹⁶⁵ Iste rezultate izneo je i Vajira H u svom radu.¹⁶⁶ Morison i saradnici u svoj retrospektivnoj studiji nisu uočili značajnu vezu između mutacije inhibitora aktivatora plazminogena, gestacijske hipertenzije i PE.¹⁶⁷ Lin i saradnici su takođe uočili veliku učestalost trudnica sa FV Leiden mutacijom i pojavom PE.⁹³ Wiwanitkit je takođe uočio da je mutacija gena za PAI-1 udružena sa pojavom PE.¹⁶⁸

PE je uzrok fetalnog mortaliteta i morbiditeta. Od 19 pacijentkinja sa PE koje nisu primale terapiju LMWH kod 17 (10,3%) pacijentkinja porođaj je završen pre 34 NG. Nakon uvođenja LMWH u terapiju sve trudnoće su završene porođajem i nije postojala statistički značajna razlika u broju terminskih i prevremenih porođaja ($p=0,13$, $X^2=2,28$). Uspešan ishog trudnoće zavisi od adekvatnog razvoja placentalne cirkulacije.

Poremećaj placentalne cirkulacije značajno povećava broj komplikacija u trudnoći dovodeći do IUGR-a, koji povećava perinatalni mortalitet i morbiditet. IUGR definišemo kao telesna masa ispod 10% za gestacijsku starost. Prema literaturnim podacima oko 68% pacijentkinja sa IUGR-om ima uođenu trombofiliju.² Visoku učestalost trombofilije među pacijentkinjama sa IUGR-om je našao i Jamal u svojoj studiji.²⁵

U našoj studiji od 27 pacijentkinja koje su imale porođaj u anamnezi IUGR je bio prisutan u trudnoći kod 23 (38,3%), što se podudara sa rezultatima drugih autora. IUGR je bio podjednako zastupljen kod trudnica sa mutacijom PAI 4G/4G 7 (6,6%), trudnica sa mutacijom FV Leiden 6 (3,6%) i trudnica sa kombinovanim trombofilijama 8 (4,3%). U nekim studijama je uočena povezanost između IUGR-a i deficita proteina S.²² Među pacijentkinjama sa IUGR-om u našoj studiji nije bilo pacijentkinja sa deficitom proteina S.

Ni u studijama Jamala i Kupforminka nije nađena značajna učestalost deficita proteina S među pacijentkinjama sa IUGR-om. Oni su takođe uočili da pacijentkinje sa mutacijom FV Leiden imaju veću mogućnost nastanka IUGR-a.^{25,170} Podaci u literaturi prikazuju različite rezultate. Glueck je našao veću učestalost među trudnicama sa IUGR koje su imale mutaciju za PAI -1 gen.⁴⁸ Naprotiv Said navodi da nije bilo veze između mutacije PAI -1 i IUGR-a.²⁴ Verspyc je u svojoj studiji našao veći broj pacijentkinja sa IUGR-om i mutacijom FV Leiden (OR=2.58; 95% CI: 0.83-8.04) i mutacijom F II (OR=2.03; 95% CI 0.51-8.01).¹⁷³

Nakon uvođenja LMWH u terapiju nije postojalo statistički značajno smanjenje broja pacijentkinja sa IUGR-om $p > 0,005$.

U trudnoćama u kojima u terapiju nije bio uključen LMWH broj trudnica sa hipertenzijom je bio statistički značajno viši u odnosu na trudnice sa LMWH ($p = 0,003$, $X^2 = 8,85$).

S obzirom da je trombofilija povezana sa povećanim rizikom za IUGR, PE i abrupciju posteljice, ona nosi rizik i za nastanak intrauterusne smrti ploda.¹⁷³ Podaci u literaturi su različiti i obuhvataju manji broj trudnica. Incidenca mrtvorodenosti se nije menjala decenijama je iznosila 4.9 do 10.4 na 1000 porođaja.¹⁷³ Sarig je u svojoj studiji našao da je kod trudnica sa trombofilijom veća učestalost iznenadnih smrti ploda u trećem trimestru (66%) i naročito je udružena sa mutacijom FV Leiden.^{172,22} Ranije retrospektivne studije u EPCOT studiji su pokazale da je rizik za intrauterusnu smrt značajno veći kod trudnica sa trombofilijom (168/571 vs. 93/395; odds ratio 1.35; 95% CI 1.01, 1.82). Vossen i autori su u svojoj studiji našli sličan rizik za nastanak FMU kod urođenih trombofilija 1.4 (95% CI 0.3, 5.5) za FV Leiden mutaciju, 1.5 (95% CI 0.2, 12.9) za deficit proteina S, 1.5 (95% CI 0.3, 7.9) i za deficit proteina C 1.6 (0.3, 14.0).¹²⁶ Rodger u svojoj studiji nije našao češću pojavu FMU kod pacijentkinja sa mutacijom FV Leiden.¹⁷³

U našoj studiji 17 (28%) trudnica je u anamnezi imalo intrauterusnu smrt ploda u trudnoćama u kojima nisu tretirane LMWH. Podjednako među pacijentkinjama sa FMU su bile zastupljene mutacija gena za PAI-1 4G/4G kod 6 (3,6%) pacijentkinja i FV Leiden mutacija kod 5 (3%) pacijentkinja. Od 13 (7,8%) trudnoća koje su kontrolisane zbog IUGR u 4 (62,4%) trudnoće je zabeležen FMU.

Statistički visoko značajno se smanjio broj FMU u trudnoćama koje su bile tretirane LMWH, samo 1 pacijentkinja je imala FMU uz terapiju ($X^2 = 14,70$ sa Yatesovom korekcijom $p < 0,001$).

Abrupcija posteljice kao obstetrička komplikacija javila se kod samo 5 (8,3%) trudnica pre uvođenja LMWH u terapiju. Nakon uvođenja terapije broj abrupcija se nije statistički značajno smanjio ($p=0,73$, $X^2=0,12$).

Zbog opterećene lične ili akušerske anamneze kod svih trudnica kod kojih je dokazana urođena trombofilija je od momenta UZ dijagnostikovana trudnoće u terapiju uveden Fraxiparin. Odluka o profilaktičkoj ili terapijskoj dozi Fraxiparina je doneta od strane hematologa ili konzilijarno tokom hospitalizacije a na osnovu trombogenosti dokazane trombofilije, opterećenosti lične i akušerske anamneze, vrednosti D dimera. Tokom redovnih hospitalizacija pacijentkinjama je kontrolisana vrednost D dimera i UZ parametri i na osnovu toga eventualno korigovana terapija.

Na profilaktičkoj dozi Fraxiparina je bilo 20 (33,3%) pacijentkinja, na terapijskoj 38 (63,6%). Kod 2 pacijentkinje koje su imale DVT u trudnoći uključena je terapija 0,6x2 ml Fraxiparina. Kod 7 (11,67%) pacijentkinja je zbog porasta D dimera tokom drugog trimestra profilaktička doza LMWH korigovana u terapijsku. Nije postojala značajna razlika u vrednosti D Dimera između ovih grupa pacijentkinja (1,73 na prema 1,66). Vrednost D dimera je određivanja i pre porođaja. U našoj studiji vrednosti D dimera pred porođaj su bile u granicama referentnih vrednosti. Prosečna vrednost D dimera je bila 1,70 (SD+/-2,3).

Kod pacijentkinja su praćene moguće komplikacije od primene Fraxiparina: krvavljenje, trombocitopenija, alergija. Od neželjenih efekata kod 3 (5%) pacijentkinje se javila alergija na Fraxiparin te je on zamenjen Klexanom. Krvavljenje kao komplikacija primene Fraxiparinske terapije nije registrovano ni kod jedne pacijentkinje. Kod 10 (16,67%) pacijentkinja sa PE je postojala trombocitopenija, sa brojem PLT (102 SD+/- 12) ali to nije tumačeno kao komplikacija Fraxiparinske terapije jer se javljala uporedo sa porastom drugih laboratroijskih parametara (acidum urikum, LDH) u okviru PE Ovi podaci ukazuju na sigurnost primene Fraxiparina tokom trudnoće.

Trudnoća je prema akušerskim indikacijama završena operativnim putem (carskim rezom) ili vaginalnim porođajem. Statistički značajno više trudnoća 37 (61,6%) je završeno Carskim rezom u odnosu na 23 (38,3%) trudnoće koji su završene vaginalnim putem. Najčešći razlog za završavanje porođaja carskim rezom pored dijagnoze urođene trombofilije uzrok su bile godine pacijentkinje i opterećena akušerska anamneza (bez živorođene dece).

Patološki Ap skor smo definisali kao manji ili jednak 7 u prvom minutu. Samo 5 (8,3%) pacijentkinja je imalo Ap skor manji od sedam.

Prosečna vrednost Ap skora je za 1 min je iznosila 8,51 (SD +/- 1,57), za 5 min 9,23 (+/- 1,65), što ukazuje na opšte dobro stanje novorođenčadi na porođaju. Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da primena LMWH značajno poboljšava ishod trudnoće. U svim trudnoćama 8 (13,3 %) koje su završene pre 34 NG, radilo se o plodovima sa IUGR i sve su završene Carskim rezom.

Prosečno vreme završavanja porođaja je bilo 36.5 NG (SD +/- 6.3). Od 60 pacijentkinja koje su zbog dijagnostikovane urođene trombofilije bile tretirane terapijom LMWH njih 59 (98,3%) su rodile živo dete, a trudnoća je bila završena u intervalu od 29 do 40 NG. Samo jedna trudnoća je završena zbog FMU u 33+6 NG kod ploda sa IUGR. Od 59 porođaja 8 (13,3%) je završeno pre 34 NG, 52 (86,6%) je završeno od 35 NG do termina porođaja.

Komparacijom broja trudnoća koje su završene porođajem u grupi pacijentkinja koje nisu tretirane Fraxiparinom i grupe koja je bila na terapiji Fraxiparinom od početka trudnoće postojao je statistički veći broj porođaja u terminu grupi sa fraxiparinom 52 (86,6%) u odnosu na 9 (10,3%) ($p < 0,00012$). $X^2 = 23,835$. Statistički je značajno manji broj porođaja do 34 NG bio je u grupi trudnica koja je tretirana Fraxiparinom. Postojala je statistički značajana razlika po broju prevremenih porođaja između dve grupe (17-20,7% u odnosu 8-13,3% ($p < 0,00012$). $X^2 = 23,835$). Podaci ukazuju da je dužina trajanja trudnoće kao i ishod trudnoće čak i u slučaju razvoja komplikacija bio značajno bolji u grupi pacijentkinja sa urođenom trombofilijom koje su tretirane LMWH.

Na rođenju je bio najveći broj trudnica 29 (48,33%) sa decom telesne mase preko 3000gr. Samo 3 (5,08%) trudnice su imale novorođenčad sa telesnom masom ispod 1500 gr. Prosečna telesna masa na rođenju je bila 2855,59 +/- 689,47. Najmanja telesna masa na rođenju je bila 1250 gr.

S obzirom na hiperkoagulabilnost koja postoji i tokom fiziološke trudnoće a naročito je naglašena kod trudnica sa trombofilijom, patohistološke nalaze na posteljici tih trudnica i mogućim opstetričkim komplikacijama u terapiju je odmah po UZ potvrdi trudnoće uključivan LMWH, najčešće Fraxiparin. Cilj ove terapije je da pospeši placentaciju i spreči stvaranje mikrotromba u interviloznim postorima te na taj način spreči ili smanji mogućnost nastanka komplikacija u trudnoći. S obzirom da je PE česta komplikacija trudnica trombofilijom komparirali smo njeno prisustvo pre i nakon uvođenja terapije. Nije postojala statistički značajan razlika u broju trudnica sa PE pre i nakon uvođenja terapije (bez terapije- 19, 31,67% i 14 23,3%).

Odsustvo razlike možemo objasniti većim brojem pobačaja i manjim brojem terminskih porođaja u grupi trudnica bez terapije LMWH u odnosu na grupu koja je bila na terapiji LMWH-om.

Kod pacijentkinja sa urođenom trombofilijom povećan broj trudnoća sa IUGR komparirali smo njihovu učestalost u grupi koja je bila bez terapije i nakon uvođena Fraxiparinske terapije. IUGR smo definisali kao PTM ispod 10 percentila za gestacijsku dob. Od 27 pacijentkinja koje su imale porođaj u grupi trudnica bez terapije 21 pacijentkinja je imala IUGR (77,7). Nakon uvođenja terapije broj porođaja je bio 60, a IUGR je registrovan kod 21 pacijentkinje (35%). Statistički značajno je bio veći broj pacijentkinja sa IUGR u grupi pre uvođenja Fraxiparina ($p < 0,0005$).

Prema podacima iz literature abrupcija posteljice je češća kod trudnica sa urođenom trombofilijom.^{28,100,101} Komparacijom učestalosti abrupcije kod pacijentkinja sa urođenom trombofilijom koje nisu bile na terapiji LMWH i pacijentkinja koje su bile na terapiji želeli smo da vidimo da li primena Fraxiparina smanjuje učestalost abrupcije. U grupi trudnica koje su anamnezi imale porođaj njih 27 i nisu bile na terapiji LMWH abrupcija se javila kod 5 (18,52%). Kod 60 trudnica sa urođenom trombofilijom koje su primale terapiju LMWH-om abrupcija je postojala kod 4 (6,3%). Nije postojala statistička značajnost između dve grupe u pojavi abrupcije ($X^2=0,12$, $p=0,73$).

U našoj studiji primena LMWH je doprinela značajnom povećanju broja porođaja i smanjenu intrautrusne smrti ploda. Kao komplikacija u trudnoćama bez LMWH češća je bila pojava IUGR-a i PE što je najverovatnije bio uzrok povećanom broja FMU. Nakon uvođena terapije samo jedna pacijentkinja sa IUGR-om i abrupcijom posteljice je imala intrauterusnu smrt ploda (1,6%), što je visoko statistički značajano u odnosu na grupu bez LMWH ($X^2=14,70$ sa Yatesovom korekcijom $p < 0,001$).

Svim trudnicama je tokom hospitalizacije rađen UZ pregled radi praćenja biometrije ploda i doplerskih merenja. Određivanjem indexa otpora u uteroplacentnoj cirkulaciji smo pratili razvoj placentacije. Komparirali smo Ri u uterinim arterijama u 18 NG i 34 NG. Povišen otpor smo definisali kao Ri veći od 0,60 sa notchem u jednoj ili obe uterine arterije. U našoj studiji je bilo 32 (53,3%) trudnice sa patološkim uterinim arterijama u 18 NG. Njima je u terapiju pored Fraxiparina uveden i Cardiopirin od 75 mg jednom dnevno. Protok kroz uterine arterije smo merili tokom hospitalizacije.

Komparirali smo protok kroz a. uterine u 18 i u interval od 32 do 36 NG. U 34 NG je povišen otpor u uterinim arterijama registrovan kod 24 (40%). Ovi rezultati ukazuju na statistički značajno ($X^2=16,59$; $p<0,001$), poboljšanje protoka nakon uvođenja terapije Cardiopirinom. Pratili smo da li povišen otpor kroz uterine arterije u 18 NG utiče na pojavu komplikacija u trudnoći. Uočena je statistički značajna veza između patološkog protoka kroz arterije uterine u II trimestru kod trudnica sa urođenom trombofilijom na terapiji LMWH i pojave PE ($X^2=16,59$; $p<0,001$) i IUGR ($X^2=4,80$ $p<0,028$).

Kod svih pacijentkinja sa pobačajima u anamnezi urađeno je testiranje na urođene trombofilije i uočeno je da je najveći broj pacijentkinja bio nosilac za mutaciju PAI-1 27 (16,2%). U formi homozigota mutacija PAI 1 (4G/4G) je bila prisutna kod 19 (11,4%) trudnica, a 8 (4,8%) trudnica je imalo mutaciju PAI-1 heterozigot 4G/5G. Kod trudnica sa pobačajima u anamnezi značajan broj je imao kombinovanu trombofiliju 12 (20%). Druge urođene trombofilije su bile manje zastupljene kod trudnica sa pobačajima u anamnezi (mutacija F II G20210 A kod 6 (10%), mutacija FV Leiden kod 8 (13,3%), deficijencija proteina S kod 3 (5%)). S obzirom na visoku učestalost mutacije PAI-1 gena među trudnicama sa ponavljanim pobačajima možemo zaključiti da se i ona može da svrstati u visoko trombogene trombofilije, što opravdava primenu terapijskih doza Fraxiparina kod trudnica u narednoj trudnoći.

Prema podacima drugih autora najučestalije trombofilije su mutacija F V Leiden heterozigot, mutacija FII G20210A i mutacija PAI.¹¹² Glueck u svojoj studiji takođe navodi mutaciju PAI gena kao značajan uzrok komplikacija u trudnoći, što se slaže sa rezultatima naše studije.⁹⁹

S obzirom na najveću zastupljenost mutacije PAI-1 gena u ispitivanoj grupi i broj komplikacija koji smo pratili bio je najveći kod trudnica koje su nosioci mutacije za PAI-1 gen.

Pacijentkinje koje su nosioci PAI 4G/5G mutacije pre uvođenja terapije su imale gestacijsku hipertenziju kao najčešću komplikaciju. Najčešća komplikacija Mutacije F V Leiden bila je PE i abrupcija. Pacijentkinje je sa dokazanom mutacijom PAI 4G/4G su imale gestacijsku hipertenziju i intrauterusni zastoj u rastu ploda kao najčešću komplikaciju. Najčešća komplikacija kod kombinovanih trombofilija bio je IUGR.

Nakon uvođenja terapije LMWH značajno se smanjio ukupan broj komplikacija ($X^2=10,08$, $p=0,039$). Pacijentkinje koje su nosioci PAI mutacije i nakon uvođenja terapije LMWH su kao najčešću komplikaciju imale gestacijsku hipertenziju.

Pacijentkinje koje su nosioci mutacije FV Leiden i dalje su imale PE kao najčešću komplikaciju ali je broj abrupcija bio značajno smanjen. Najčešća obstetrička komplikacija kod trudnica sa kombinovanom trombofilijom je bio IUGR.

Iako se u mnogim studijama savetuje samo ekspektativni pristup pacijentkinja sa ovom urođenom trombofilijom uz eventualnu profilaktičku primenu Fraxiparina pre i postpartalno naši rezultati ukazuju na pozitivan efekat ove terapije.

Rezultati ove studije potvrđuju predhodno uočenu visoku korelaciju između oksidativnog statusa zdrave majke kao i rezultata da oksidativni stress igra važnu ulogu u razvoju komplikacija u toku trudnoće obolelih od trombofilije kao što su pobačaji, zastoji u rastu i preeklampsije^{17,107,174,175,176}

Povećana aktivnost enzima zaštite od oksidacionih oštećenja u tkivu placenti kod majki obolelih od trombofilije pokazuje da je u uslovima oboljenja povećana proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta i da je placenta izložena oksidativnom stresu. Značajno povećanje aktivnosti enzima koji koriste vodonik peroksid kao supstrat-katalaze i glutacion peroksidaze, ukazuju da je H₂O₂ glavna reaktivna vrsta kiseonika u placentalnom tkivu majki obolelih od trombofilije. Aktivnost enzima koji proizvode vodonik peroksid, CuZnSOD i MnSOD nije povišena u tkivu placenti majki obolelih od trombofilije u poredjenju sa kontrolnim placentama. Superoksid dismutaza je glavni enzim za proizvodnju vodonik peroksida u tkivu, tako da ovi rezultati ukazuju da H₂O₂ ne potiče iz placentalnog tkiva. Vodonik peroksid prolazi membranu, tako da može doći do placentalnog tkiva iz majčine ili fetalne cirkulacije, amnionske tečnosti ili glatke muskulature uterusa.

Rezultati u ovom istraživanju nesumljivo pokazuju da je placenta kod pacijentkinja obolelih od trombofilije izložena oksidativnom stresu izazvanim povišenom koncentracijom vodonik peroksida koji potiče iz endotelijuma, glatkih mišića uterusa i/ili majčine cirkulacije.

U pro-trombotskim uslovima u trombofiliji, hemostatski odgovor i mikro-trombi mogu dovesti do ishemije, povrede krvnih sudova i do povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Oksidativni stress, uzrokovan pro-trombotskim uslovima, aktivira kaskadu događaja koji uzrokuju vazokonstrikciju, leukocitnu atheziju, oksidaciju membrane, i dalju pro-koagulaciju.¹⁷⁷

Svaki ovaj pojedinačan process uzrokuje dalju generaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta. Vazokonstrikcija se dešava jer dolazi do smanjenja dostupnog NO, što je posledica ROS-a i može dalje uzrokovati ishemiju i krvarenje koje prati dalji razvoj oksidativnog stresa.¹⁷⁷ Endotelijalne povrede i disfunkcije uključuju aktivaciju pro-koagulantnih i pro-inflamatornih procesa. Krvne pločice koje su aktivirane oksidativnim stresom produkuju povećanu količinu H₂O₂.¹⁷⁷ Vodonik peroksid na posredan način aktivira transkripciju faktora kappa (NF-κB) u leukocitima koji aktivira inflamatorni odgovor.¹⁷⁸ U endotelijumu izloženom oksidativnom stresu, PAF lipidi (PAF – platelet-activating factor) mogu se pojaviti kroz oksidaciju membrane, i time uzrokovati inflamaciju i agregaciju krvnih pločica.¹⁷⁹ U povređenim krvnim sudovima, leukociti doprinose povećanoj proizvodnji reaktivnih kiseoničnih vrsta.¹⁸⁰ Mišići zida materice se razlikuju od ostale glatke muskulature po veoma finoj i osetljivoj regulaciji koncentracije azot monoksida, čiji dizbalans može dovesti do povećane produkcije ROS-a u mitohondrijama.¹⁸¹

Oksidativni stress uzrokovan lančanim reakcijama, može dovesti do oštećenja tkiva placente i dalje do zastoja u rastu ploda, pa čak i do pobačaja. Nekontrolisana produkcija radikalskih vrsta je povezana sa razvojem hipertenzije, koja je glavni simptom preeklampsije.^{177,182}

Hidrogen peroksid, glavna reaktivna kiseonična vrsta koja se generiše kod majki obolelih od trombofilije, kao membranski permeabilna molekulska vrsta može izazvati različite odgovore. Iz cirkulacije, može doći do glatke muskulature i do tkiva placente, gde može izazvati oštećenja proteina i mitohondrija, što dalje može uzrokovati disfunkcije placentalnih ćelija.^{183,56}

Placentalni protok krvi je ključan za normalno funkcionisanje placente i važan za razvoj ploda. Vodonik peroksid modulira funkciju krvnih sudova na vrlo složen način, delujući i kao vazokonstriktor i kao vazodilatator.^{184,185} Kao vazokonstriktor, H₂O₂ može uzrokovati smanjenje placentalne perfuzije. Ali kako vodonik peroksid ima bifazičan efekat, to može uzrokovati oksidativni stress koji dovodi do ishemije i krvavljenja.¹⁸⁵ Ujednačen protok krvi u placenti je presudan, jer fetus i placenta zahtevaju značajne količine kiseonika tokom drugog i trećeg trimestra i placentalno tkivo može biti pod uslovima hipoksije u periodima vazokonstrikcija. Kada se ponovo uspostavi normalan protok krvi, može doći do povećane oksigenacije lokalnog tkiva i takve promene mogu uzrokovati ishemiju i krvarenja. U zavisnosti od obima i učestalosti ovih promena, posledice mogu biti u rangu srednjeg oksidativnog stresa do ozbiljnih tkivnih oštećenja placente.¹⁸⁶

Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja ima ulogu da štiti placentu od oksidativnog stresa uzrokovanog trombofilijom. Disfunkcije uzrokovane oksidativnim stresom u placenti i placentalnoj cirkulaciji kod obolelih od trombofilije koje se dešavaju po opisanom mehanizmu mogu dovesti do pobačaja, preeklampsije i zastoja u rastu ploda, kada se AOS kapacitet istroši. Enzimi AOS-a prisutni u placentnom tkivu štite i krv majke od povećane količine H₂O₂ koja se proizvodi u trombofiliji. Ako ova odbrana izgubi efikasnost tokom trudnoće, protrombotski uslovi mogu dovesti do tromboze. Nakon porođaja, kada se placenta odbacuje, gubi se i njena zaštitna funkcija i filtriranje majčine krvi, a proizvodnja vodonik peroksida u miometriju, endoteliju i u krvi se nastavlja. U takvim uslovima, mogu se razviti tromboze sa smrtnim ishodom, koje se javljaju odmah nakon porođaja.¹⁸⁷

Rezultati ove studije ukazuju na oksidativni stress kao potencijalno polje za istraživanja komplikacija u trudnoći žena obolelih od trombofilije. Otvara se i nova meta za terapiju, korišćenjem antioksidanata.

Nakon porođaja, redoks milje se drastično menja u krvi obolelih od trombofilije. Nivo askorbil radikala je povišen, a nivo SH grupa je smanjen. Ovi rezultati ukazuju da se u cirkulaciji žena obolelih od trombofilije, nakon porođaja razvija oksidativni stress. Placenta je izgleda važna za održavanje redoks homeostaze tokom trudnoće. Ne samo da ishranjuje i štiti plod, već štiti i majku od oksidativnog stresa.¹⁷⁴

6. ZAKLJUČCI

1. Primena profilaktičkih ili terapijskih doza LMWH u terapiji kod trudnica sa urođenom trombofilijom od momenta UZ dijagnostikovanja intrauterusne trudnoće značajno povećava broj živorođene dece uz terapiju LMWH (59 (98,8%) u odnosu na 15 (25%) bez terapije LMWH ($p < 0,00012$)).
2. Primena LMWH je statistički značajno smanjila broj pobačaja, prevremenih porođaja i IUGR-a kod trudnica sa urođenom trombofilijom. Nije uočena statistički značajna razlika u pojavi PE i abrupcije posteljice kod pacijentkinja koje su primale terapiju LMWH u odnosu na one koje nisu primale terapiju.
3. Najčešće obstetričke komplikacije su bile spontani pobačaj, PE i IUGR.
4. S obzirom na mali broj komplikacija kod majke tokom primene Fraxiparina, alergija koja se javila kod samo 2 od 60 trudnica, odsustva krvavljenja i trombocitopenije možemo zaključiti da je primena LMWH tokom trudnoće bezbedna za majku.
5. Kod trudnica sa patološkim protokom u uterinim arterijama tokom drugog i trećeg trimestra postojalaja je češća pojava PE i IUGR-a. Nije uočena statistički značajna veza između količine plodove vode, doplerskih indexa u ateriji umbilikalis i komplikacija (PE, IUGR, abrupcija).
6. Uvođene Cardiopirina u terapiju kod trudnica kod kojih je registrovan patološki protok tokom drugog trimestra statistički značajno je dovelo do poljšanja protoka kroz uterine arterije u trećem trimestru.
7. U grupi trudnica koje smo ispitivali najveća je učestalost mutacija PAI-1 u formi homozigota 4G/4G, kombinovanih trombofilija i mutacije FV Leiden.
8. Uz primenu LMWH znčajno manji broj trudnica je imao atak VTE tokom trudnoće. Postpartalno uz profilaktičku dozu LMWH nije zabeležena ni jedna epizoda VTE.
9. Značajno povećanje aktivnosti enzima zaštite od oksidativnog stresa u placentalnom tkivu majki obolelih od trombofilije kao supstrat-katalaze i glutation peroksidaze ukazuje da je placenta majki obolelih od urođene trombofilije izloženijsa oksidativnom stresu.

10. H_2O_2 je glavna reaktivna vrsta kiseonika u placentalnom tkivu majki obolelih od trombofilije, s obzirom da aktivnost enzima koji proizvode vodonik peroksid, CuZnSOD i MnSOD nije povišena u tkivu placenti majki obolelih od trombofilije u poredjenju sa kontrolnim placentama. Povišena koncentracija vodonik peroksida u placenti potiče iz endotelijuma, glatkih mišića uterusa i/ili majčine cirkulacije.
11. Vodonik peroksid modulira funkciju krvnih sudova na vrlo složen način, delujući i kao vazokonstriktor i kao vazodilatator. Kao posledica nedovoljne aktivnosti AOS-a može se razviti srednje ili ozbiljno oštećenje placentnog tkiva.
12. Aktivnost CuZnSOD u eritrocitima obolelih od trombofilije značajno opada posle porodjaja. Ovaj rezultat ukazuje na povećanu koncentraciju vodonik peroksida u krvotoku obolelih od trombofilije nakon porodjaja, jer je H_2O_2 inhibitor CuZnSOD.
13. EPR signal askorbil radikala je detektovan samo u plazmi obolelih od trombofilije posle porodjaja. Ovaj rezultat ukazuje na razvijanje oksidativnog stresa u cirkulaciji obolelih od trombofilije nakon porodjaja. Ovaj zaključak je potvrđen i rezultatima dobijenim merenjem SH grupa u plazmi. Nivo SH grupa je značajno niži u plazmi obolelih od trombofilije posle porodjaja u odnosu na nivo u plazmi pre porodjaja.
14. Rezultati ove studije ukazuju na oksidativni stres kao potencijalno polje za istraživanja komplikacija u trudnoći žena obolelih od trombofilije. Uvodi se i nov postupak za terapiju, korišćenjem antioksidanasa.

7. LITERATURA

1. Lykke J, et al. Thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: Results from the Danish National Birth Cohort. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10:1320–1325
2. Fatemeh M, Mirzaei M, Zohreh F. Association of hereditary thrombophilia with intrauterine growth restriction. *Iran J Reprod Med.* 2013 ; 11: 275–278
3. Husar D, Đelmiš J. Thromboembolic disease in pregnancy. *Journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics.* 2008; 2:77-82
4. Rodger MA, Walker MC, Smith GN. Is thrombophilia associated with placenta-mediated pregnancy complications? A prospective cohort study. *J Thromb Haemost.* 2014;12:469-478.
5. Szecsi P, Jorgensen M, Klajnbard, A, Andersen M, Colov N, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb. Haemost.* 2010;103:718–727
6. Guyton AC, Hall EH. *Text book of medical physiology.* 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 419-429.
7. Ramström S. Clotting time analysis of citrated blood samples is strongly affected by the tube used for blood sampling. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:447-52.
8. Di Minno MN, Dentali F, Lupoli R, Ageno W. Mild Antithrombin Deficiency and the Risk of Recurrent Venous Thromboembolism: A Prospective Cohort Study *Circulation.* 2014;129:497–503
9. James HA, Rhee E, Thames B, Philippe C. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thrombosis Research.* 2014;134: 648–651.
10. Gerhard A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med.* 2000;342:374-380.

11. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol.* 2009;114(6):1326-31.
12. Kovac M, Miković Z, Rakičević L, Srzentić S, Mandić V, Djordjević V, et al. A successful outcome of pregnancy in a patient with congenital antithrombin deficiency. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(2): 175-177.
13. Đorđević V, Rakičević Lj, Spasić M, Miljić P, Miković D, Kovač M, et al. Mutacije FVLeiden, FII G20210A, i MTHFR C677T kao faktori za nastanak tromboze dubokih vena u toku trudnoće ili puerperijuma. *Vojnosanitetski pregl* 2005; 62(3):201-5.
14. Spina V, Aleandri V, Morini F. The impact of the Factor V Leiden mutation on pregnancy. *Human Reproduction.* 2000;6:301-306
15. Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FL, Koder S, Zoghalmi-Rintelen C, et al. Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V: G1691A. *J Thromb Haemost.* 2004;2:430–6.
16. Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2000;20:266–70
17. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet.* 2003;361:901–908.
18. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study Br J Haematol.* 2006;132(2):171-96.
19. Dudding J, et al. Factor V Leiden is associated with pre-eclampsia but not with fetal growth restriction: a genetic association study and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2008;6: 1868–1875

20. Howley HE, Walker M, Rodger MA. A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:694–708.
21. Nath CA, Ananth CV, DeMarco C, Vintzileos AM. Low birthweight in relation to placental abruption and maternal thrombophilia status. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198:293-298
22. Colman RW. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006; 428- 785.
23. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol.* 2012;87(1):63–67.
24. Reznikoff-Etievan MF, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage *BJOG.* 2001 Dec;108(12):1251-4.
25. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2006;166(7):729-36.
26. Knoebl PN. Severe congenital protein C deficiency. The use of protein C concentrates (human) as replacement therapy for life-threatening blood-clotting complications. *Biologics* 2008; 2: 285–96
27. Francis JL. An algorithmic approach to laboratory diagnosis of thrombotic risk factors. *Laboratory Hematology* 2003; 9: 82-83
28. Mitic G. Nasledna trombofilija i trombozne komplikacije u trudnoći [disertacija]. [Novi Sad]: Univerzitet u Novom Sadu; 2008; 163.

29. Lalan DM ,Jassawalla MJ, Bhalerao SA. Successful Pregnancy Outcome in a Case of Protein S Deficiency. *J Obstet Gynaecol India*. 2012; 62: 21–22.
30. Marlar RA, Gausman JN. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am J Hematol*. 2011;86(5):418-21
31. Greer IA. Inherited thrombophilia and venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003;17(3):413-25.
32. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sweep F, Sunde L, Teisner B. Does plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) control trophoblast invasion? A study of fetal and maternal tissue in intrauterine, tubal and molar pregnancies. *Placenta* 2000;21:754-762
33. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Lee KN, Christiansen VJ, McKee PA. Evidence that alpha2- antiplasmin becomes covalently ligated to plasma fibrinogen in the circulation: a new role for plasma factor XIII in fibrinolysis regulation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6:1565– 70.
34. Kathiresan S, Gabriel SB, Yang Q, Lochner AL, Larson MG, Levy D, et al. Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels. *Circulation* 2005;112: 1728–35.
35. Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 44–8
36. D’Elia AV, Fabbro D, Driul L, Barillari G, Marchesoni D, Damante G. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in pre-eclampsia. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37: 97–105
37. Wiwanitki V. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 273: 322–4.

38. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 2000;13(1): 20-33.
39. El-Sammak M, Kandil M, El- Hifni S, Hosni R, Ragab M. Elevated plasma homocysteine is positively associated with age independent C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Egyptian subjects. *Int J Med Sci.* 2004;1(3): 181-19.
40. Cunningham MT, Brandt JT, Laposata M, Olson JD. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126: 499- 505.
41. Kreuz W, Stoll M, Junker R, Heinecke A, Schobess R, Kurnik K, et al. Familial elevated factor VIII in children venous thrombosis and post thrombotic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 2006; 26: 1901- 1906
42. Viel KR, Machiah DK, Warren DM, Khachidze M, Bull A, Fernstrom K, et al. A sequence variation scan of the coagulation factor VIII (FVIII) activity levels. *Blood* 2007;109(9): 3713- 2444.
43. Steen M, Norstrom EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH, et all. Functional characterization of factor V- Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004; 103(9): 3381-7
44. Gris JC, Mercier E, Quéré I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M, et all. Low molecular weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood* 2004; 103: 3695–9.
45. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:1041–1044
46. Gogia N, Machin GA. Maternal thrombophilias are associated with specific placental lesions. *Pediatr Dev Pathol.* 2008;11(6):424-9

47. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press Inc. 2007;4:57
48. Jacob C, Winyard PG. Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine. Wiley. 2009. p.305
49. Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Spasić M. Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes. J Biochem Med. 2013;29:189-95.
50. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin Chim Acta. 2008;390:1-11.
51. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Free Radic Biol Med. 2004;36:718-44
52. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 2009;417:1-13.
53. James AH, Jamison MG, Brancazio LR, Myers ER. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality. Am J Obstet Gynecol. 2006;194(5):1311-5.
54. Silver RM, Zhao Y, Spong CY. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. Obstetrics and Gynecology. 2010; 115(1);14–20.
55. D'Elia AV, Driul L, Giacomello R. Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. Gyn.and Obstetric Investigation. 2002; 53(2):84–87.
56. Bajčetić M. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja kod dece sa dilatacionom kardiomiopatijom. Doktorska disertacija, Beograd, 2004, str. 15-20.
57. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82:47-95.

58. Spasojević I, Jones DR, Andrades ME. Hydrogen peroxide in adaptation. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:596019.
59. Bindoli A, Rigobello MP. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1557-93.
60. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19:595-637
61. Žikić R, Štajn A, Saičić Z, Spasić M, Milovanović S. Toksikološki Značaj Zaštite od Oksidacionih Oštećenja. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2000.
62. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999;32:595-603.
63. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull*. 1993;49:700-18.
64. Bonorden WR, Pariza MW. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: "Nutritional Toxicology", (Eds: F. N. Kotsonis, M. Mackey and J. Hjelle), 1994.
65. Brigelius R. Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress, In: "Oxidative Stress", (Ed: H. Sies), Academic Press, New York, 1985, pp. 243-271.
66. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res*. 1985;101:4-15.
67. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:79-110.
68. Tsuruga M, Matsuoka A, Hachimori A, Sugawara Y, Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin. Tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the beta chain. *J Biol Chem*. 1998;273:8607-15.

69. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:239-57.
70. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry.*1975;14:5299-303.
71. Uchida K, Kawakishi S. Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H₂O₂. Selective gene ration of 2-oxo-histidine at the histidine 118. *J Biol Chem.* 1994;269:2405-10.
72. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:192-208.
73. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood.* 1997;90:4973-8
74. Nagababu E, Chrest FJ and Rifkind JM. Hydrogen peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1620:211-7.
75. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et all. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990;51:283-97.
76. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275:3959-70
77. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharm.* 2002;64:1019-26
78. Savvides SN, Scheiwein M, Bohme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, et all. Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxyntirite. *J Biol Chem.* 2002;277:2779-84.

79. Gondo H, Ideguchi H, Hayashi S, Shibuya T. Acute hemolysis in glutathione peroxidase deficiency. *Int J Hematol.* 1992;55:215-8.
80. Piccinini G, Minetti G, Balduini C, Brovelli A. Oxidation state of glutathione and membrane proteins in human red cells of different age. *Mech Ageing Dev.* 1995;78:15-26.
81. Backos DS, Franklin CC, Reigan P. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:1005-12.
82. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:1005-28.
83. Paulsen CE, Carroll KS. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol.* 2010;5:47-62.
84. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 2010;49:835-42.
85. Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16:649-57.
86. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:335-48.
87. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:177-81.
88. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 2005;11:1306-13.
89. Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet Gynecol* 2005;106:517-24

90. Paidas MJ, Langhoff-Roos J, et al. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcome: screening and management. *Semin Perinat* 2005;29:150-63.
91. Rigo J, Nagy B, Fintor L, Tanyi J, Beke A, Karadi I, et al. Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Hypertens Pregnancy*. 2000;19:163-172.
92. Rodger MA, Walker MC, Smith GN, Wells PS, Ramsay T, Langlois NJ, et al. Is thrombophilia associated with placenta-mediated pregnancy complications? A prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2014;12(4):469-78.
93. Lin J, August P. Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2005;105:182–92.
94. Mutze S, Leeners B, Ortlepp JR, Kuse S, Tag CG, Weiskirchen R, et al. Maternal factor V Leiden mutation is associated with HELLP syndrome in Caucasian women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87: 635–42
95. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap L, Wenstrom KD. Fetal Growth Disorders. In: Rouse D, Rainey B, Spong C, Wendel GD, editors. *Williams Obstetrics*. 23th Ed. New York: Mc Graw-Hill; 2010. pp. 893–910.
96. Ogueh O, Chen MF, Spurrill G, Benjamin A. Outcome of pregnancy in women with hereditary thrombophilia. *Int J Gynecol Obstet*. 2001;74:247–253
97. Brenner B. Thrombophilia and Adverse Pregnancy Outcome. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2006;33:443–456
98. Kupferminc M. Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1:111.
99. Said JM, Higgins JR, Moses EK, Walker SP, Monagle PT, Brennecke SP. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a case-control study in an Australian population. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012 Feb;91(2):250-5.

100. Jamal A, Hantoshzadeh S, Hekmat H, Abbasi S. The association of thrombophilia with fetal growth restriction. *Arch Iran Med.* 2010;13:482–485
101. Ananth CV, Vintzileos AM. Maternal-fetal conditions *Gynecol.* 2006;195:1557–63
102. Wendy L, Kinzler MD, Prasad V, Cande V, Ananth CV. The Effect of Maternal Thrombophilia on Placental Abruption: Histologic Correlates. *Matern Fetal Neonatal Med.* 2009; 22(3): 243–248.
103. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:1041–4
104. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol.* 2012;157(5):529–42.
105. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, author. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2008;89:1603.
106. Habibovic Z, Zeybek B, Sanhal C, Eroglu Z, Karaca E, Ulukus M. Effects of inherited thrombophilia in women with recurrent pregnancy loss. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2011;38:347–350
107. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2002;55:163–180.
108. Gao, Tao. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res.* 2015;135(2):339-46.
109. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol.* 2001;46:124–31

110. Fatemeh S, Taghi Akbari M, Zare Karizi S. Thrombophilic genes alterations as risk factor for recurrent pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(8):1269-73.
111. Ali N, Bhatti FA, Khan SA. Frequency of hereditary thrombophilia in women with recurrent pregnancy loss in Northern Pakistan. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(6):1561-6.
112. Kim JJ, Choi YM, Lee SK, Yang KM, Paik EC, Jeong HJ, et al. The PAI-1 4G/5G and ACE I/D polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(6):571-6.
113. Graafmans WC, Richardus JH, Macfarlane A. Comparability of published perinatal mortality rates in Western Europe: the quantitative impact of differences in gestational age and birthweight criteria. *BJOG* 2001; 108:1237
114. Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupferminc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol.* 2002;99(5):684-7.
115. Santoro R, Iannaccaro P, Sottilotta G. Prothrombotic gene mutations in women with recurrent abortions and intrauterine fetal death *Minerva Ginecol.* 2005;57(4):447-50.
116. Sottilotta G, Oriana V, Latella C, Luise F, Piromalli A, Ramirez F, et al. Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res.* 2006;117(6):681-4.
117. Kocher O, Cirovic C, Malynn E. Obstetric complications in patients with hereditary thrombophilia identified using the LCx microparticle enzyme immunoassay: a controlled study of 5,000 patients. *American Journal of Clinical Pathology.* 2007;127(1):68–75.
118. Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E. Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control “NOHA First” study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2005;3(10): 2178–2184,.

119. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet*. 1996;(348): 913–916,
120. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost*. 2009;102:360–70
121. Heit JA, Kobbervig CE, James AH. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med*. 2005;143:697.
122. Robertson O, Wu P, Langhorne .Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British Journal of Haematology*. 2006;132(2): 171–196.
123. Benedetto C, Marozio L, Tavella AM, Salton L, Grivon S, Di Giampaolo F. Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1205:106–117,.
124. Middeldorp S, Libourel EJ, Hamulyák K, Van Meer JD, Büller HR. The risk of pregnancy-related venous thromboembolism in women who are homozygous for factor V Leiden. *British Journal of Haematology*. 2001;113(2):553–555.
125. Jacobsen AF, Skjeldestad FE, Sandset PM. Incidence and risk patterns of venous thromboembolism in pregnancy and puerperium: a register-based case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:233–234.
126. Heit JA, Kobbervig CE, James AH. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med*. 2005;143:697
127. Rodger M. Evidence Base for the Management of Venous Thromboembolism in Pregnancy. *Am Society of Hematology* 2010. *Hematology*. 2010:173–180

128. Baglin T, Gray E, Greaves M, Hunt BJ, Keeling D, Machin S. Clinical Guidelines for testing for heritable Thrombophilia. *British Journal of Haematology*. 2010;149; 209 – 22
129. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in medicine*. Saunders Elsevier, Philadelphia 2002;77(5):1091.
130. Shukla AN. *Genetic Material And Analysis 1*, New Delhi, Discovery Publishing House, 2009; 204.
131. Hartl DL, Ruvolo M. *Genetics: analysis of genes and genomes*. Jones& Bartlett Learning Burlington 2012;
132. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*.2006;34(6):447–45
133. Grandone E, Colaizzo D, Martinelli P, Paladini D, Di Minno G, Margaglione M. Adverse outcome in women with thrombophilia and bilateral uterine artery notches. *Fertil Steril*. 2006; 86(3):726–727
134. Harrington K, Goldfrad C, Carpenter RG, Campbell S. Transvaginal uterine and umbilical artery Doppler examination of 12–16 weeks and the subsequent development of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Ultrasound Obstet Gynecol*.2007; 9:94–100
135. Delle Chiaie L, Gramellini D, Piantelli G, Manotti C, Fieni S, Vadora E. Doppler velocimetry and thrombophilic screening at middle trimester of gestation: preliminary data. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;99(1):38-46.
136. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguère Y. Acetylsalicylic acid for the prevention of pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can*. 2009;31(9):818–826

137. Empson M, Lassere M, Craig JC, Scott JR. Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: A systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol* 2002;99:135–144
138. Melchiorre K, Leslie K, Prefumo F, Bhide A. First-trimester uterine artery Doppler indices in the prediction of small-for-gestational age pregnancy and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*.2009; 33(5):524–529
139. Magriples U, Ozcan T, Karne A, Copel JA. The effect of anticoagulation on antenatal ultrasound findings in pregnant women with thrombophilia *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006;19(1):27-30
140. Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000; 83: 693–7.
141. Grandone E, Brancaccio V, Colaizzo BS. Preventing adverse obstetric outcomes in women with genetic thrombophilia. *Fertil Steril*. 2002;78: 371-375.
142. Middeldorp S. Antithrombotic prophylaxis for women with thrombophilia and pregnancy complications—no. *J Thromb Haemost*. 2003;1: 2073-2074
143. Gris JC, Mercier E, Quéré I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M, et al. Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood*. 2004;103:10
144. Kaandorp SP, Goddijn M, Van der Post JA, Hutten BA, Verhoeve HR, Hamulyak K, et al. Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage. *N Engl J Med*. 2010;362:1586–96.
145. Simcox LE, Ormsher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(12): 28418–28428

146. Skeith L, Carrier M, Kaaja R, Martinelli I, Petroff D, Schleußner E, et al. A meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent pregnancy loss in women with inherited thrombophilia *Blood*. 2016;127(13):1650-5
147. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat. Med.* 2004;10:1222–1226
148. Nelson S.M, Greer I.A. The potential role of heparin in assisted conception. *Hum. Reprod. Update*. 2008;14:623–645
149. Vossen CY, Preston FE, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Van der Meer FJM, et al. Hereditary thrombophilia and fetal loss: a prospective follow-up study. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 592–6.
150. Bates SM, Greer, Hirsh T, Ginsberg IS. Use of antithrombotic agents during pregnancy: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004;126(3):627-44.
151. Bates SM. Ginsberg .IS. How we manage venous thromboembolism during pregnancy. *Blood* 2002; 100:3470-8.
152. Mitić G, Povazan Lj, Lučić A. Terapija venskog tromboembolizma tokom trudnoće. *Med. Pregl* 2009; (8): 346-351.
153. James AH, Tapson VF, Goldhaber SZ. Thrombosis during pregnancy and the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 216–219
154. Ulander VM, Lehtola A, Kaaja R. Long-term outcome of deep venous thrombosis during pregnancy treated with unfractionated heparin or low molecular weight heparin. *Thrombosis Research*. 2003;111(4-5):239-42

155. Lenz B, Samardzija M, Drenjancevic D, Zibar D, Samardzija M, Milostic-Srb A. The investigation of hereditary and acquired thrombophilia risk factors in the development of complications in pregnancy in Croatian women J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29(2):264-9
156. Coriu R, Ungureanu R, Talmaci R, Uscatescu V, Cirstoiu M, Coriu D. Hereditary Thrombophilia and thrombotic events in pregnancy: single-center experience J Med Life. 2014; 7(4): 567–571.
157. Villani M, Tiscia GL, Margaglioni M, Colaizzo D, Fishetti L, Vergura P. Risk of obstetric and thromboembolic complications in family members of women with previous adverse obstetric outcomes carrying common inherited thrombophilias Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012;10(2):223-228
158. James AH. Venous thromboembolism in pregnancy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 326–31.
159. Schenk JF, Stephan B, Zewinger S, Speer T, Pindur G.. Comparison of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in females with venous thromboembolism during pregnancy or spontaneous abortion.Clin Hemorheol Microcirc. 2008;39(1-4):329-32.
160. Roque H, Paidas M, Rebarber A, Khan S, Kuczynski E, Lockwood CJ. There is no association between maternal thrombophilia and recurrent first-trimester loss. Am J Obstet Gynecol 2001;184:S15.
161. Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients. Prenat Neonat Med 2001;6:3–14.
162. Ivanov PD, Komsa-Penkova RS, Konova EI, Kovacheva KS, Simeonova MN, Popov JD. Association of inherited thrombophilia with embryonic and postembryonic recurrent pregnancy loss. Blood Coagul Fibrinolysis 2009;20(2):134–140

163. Flores-Alatriste JD, Jacobo-Nájera S, Segura-Rodríguez R, Stern-Colin y Nunes JJ. Patients with inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss: incidence. *Ginecol Obstet Mex.* 2014;82(6):383-8.
164. Mello G, Parretti E, Marozio L, Pizzi C, Lojaco A, Frusca T, et al. Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study. *Hypertension.* 2005;46:1270–4.
165. Deveer R, Engin-Ustun Y, Akbaba E, Halisdemir B, Cakar E, Danisman N, et al. Association between pre-eclampsia and inherited thrombophilias *Fetal Pediatr Pathol.* 2013;32(3):213-7.
166. Vajira H. W. Dissanayake, Nirmala D. Sirisena¹, Lakshini Y. Weerasekera, et al. Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 2012;38(9);1168-76
167. Morrison ER, Miedzybrodzka ZH, Campbell DM, Haites NE, Wilson BJ, Watson MS, et al. Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review. *Thromb Haemost.* 2002;87:779–785.
- 168-Viroj Wiwanitkit. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2006;273(6): 322-324
169. Van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *AJOG.* 1999;180(5):1146–1150.
170. Kupferminc MJ, Many A, Bar-Am A, Lessing JB, Ascher-landsberg JA. Mid-trimester severe intrauterine growth restriction is associated with a high prevalence of thrombophilia. *BJOG.* 2002;109:1373–1376.

171. Verspyck E, Borg JY, Le Cam-Duchez V, Goffinet F, Degré S, Fournet P, et al. Thrombophilia and fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;15;113(1):36-40.
172. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage *Fertil Steril.* 2002;77(2):342-7.
173. Weiner Z, Beck-Fruchter R, Weiss A, Hujirat Y, Shalev E, Stavit A, et al. Thrombophilia and stillbirth: possible connection by intrauterine growth restriction *BJOG: International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2004;111;780–783
174. Aeguelles S, Machado MJ, Ayala A, Machado A, Hervias B. Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth. *Free Rad Res.*2006;40:565-570
175. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368:601-611.
176. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:412-424
177. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Rad Res.* 2007; 41:1364-1375.
178. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.*1995;270:296-299.
179. Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Stafforini DM. Sol Sherry lecture in thrombosis: Molecular events in acute inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:727-733.
180. Rowe GT, Eaton LR, Hess ML. Neutrophil-derived, active oxygen species-mediated cardiovascular dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 1984;16:1075-1079.

181. Buxton I. Regulation of uterine function: a biochemical concordium in the re regulation of smooth muscle relaxation *Mol Pharmacol.* 2004;65:1051-1059.
182. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: Recent insights *Hypertension.* 2005;46:1243-1249.
183. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in medicine and biology.* Clarendon Press, Oxford, 1999; 307(6909): 885–886.
184. Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens.* 2005; 23: 571-579.
185. Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee R. Mechanisms of hydrogen–peroxide–induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharm.* 2003;138:1085-1092
186. Hung TH, Skepper JN, Burton GJ. In vitro ischemia–reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol.* 2001;159: 1031-1043
187. Togli MR, Weg JG. Venous thromboembolism during pregnancy. *N Engl J Med.* 1996;335:108-114.
188. ACOG Practice Bulletin 138. Thromboembolism in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:706

LISTA SKRAĆENICA:

DVT-duboka venska tromboza
PE-preeklampsija
DVT- duboka venska tromboza
PCR-polimeraza chain reaction
FVL-mutacija faktora pet Leiden
FII G20210A-mutacija faktora dva
MTHFR-metilentetrahidrofolat reduktaza
APSy-antifosfolipidni sindrom
LAC-lupus antikoagulans
ACA-antikardiolipinska antitela
antiB2GP-1-antibetadva glikoproteinska antitela
IgG –imuno globulinska antitela klase G
IgM- imuno globulinska antitela klase M
VTE-venski tromboembolizam
TF-tkivni faktor, tkivni tromboplastin
PAI-1 i PAI-2- plazminogen aktivator inhibitora 1 i 2
F VII-faktor VII
F VII-a-aktivirani faktor VII
F X-faktor X
F VIII-a-aktivirani faktor VIII
F IX-faktor IX
F IX-a-aktivirani faktor IX
F X-a –aktivirani faktor X
F V-faktor V
F XII-a-aktivirani faktor XII
F XI-faktor jedanaest
AT III-antitrombin tri
FMU-intrauterusna smrt ploda
PE-preeklampsija
IUGR-intrauterusni zastoj u rastu ploda
UPC-uteroplacentna cirkulacija

BIOGRAFIJA AUTORA

Dragana Maglić je rođena 18.03.1973. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju skolu završila je u Novom Sadu. Medicinski fakultet, Univerziteta u Novom Sadu je upisala 1991 godine a diplomirala je 1997 godine sa prosečnom ocenom 8,47. Specijalizaciju iz Ginekologije i akušerstva je upisala 1999 godine, a 2003 godine je položila specijalistički ispit sa najvišom ocenom (odličan). Odbranila je magistarski rad u martu 2008, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod nazivom “Komparacija laparoskopske cistektomije i cistotomije u tretmanu endometrioze”. Govori, čita i piše engleski jezik. 2004 godine je pohađala Školu Ultrazvuka. 2008 je stekla diplomu teoretskog kursa iz kolposkopije i bazičnog kursa iz laparoskopije. Učesnik je nacionalnih i internacionalnih kongresa i simpozijuma. Svoje radove publikovala je u domaćim i međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Dragana N. Maglić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH UROĐENIM TROMBOFILIJAMA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.04.2016_____

Dragana Maglić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Dragana N. Maglić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH UROĐENIM
TROMBOFILIJAMA

Mentor dr sc. Željko Miković, redovni prof Medicinskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu

Potpisani Dragana N. Maglić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.04.2016

Dragana Maglić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

PROCENA ISHODA TRUDNOĆA KOMPLIKOVANIH UROĐENIM TROMBOFILIJAMA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, ___15.04.2016_____

