

PARAMETRI HEMOSTAZE KAO POKAZATELJI HIPERKOAGULABILNOSTI U TRUDNOĆI

Tatjana Vodnik, Svetlana Ignjatović, Nada Majkić-Singh

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Kratak sadržaj: Koncentracije proteina plazme uključenih u proces koagulacije menjaju se tokom normalne trudnoće što remeti ravnotežu koja postoji između prokoagulantnog i antikoagulantnog sistema. Ove promene obuhvataju povećanje aktivnosti faktora koagulacije, povećano stvaranje fibrina i supresiju fibrinolize. Na ovaj način se fiziološkim mehanizmima smanjuje rizik od gubitka krvi u trudnoći, ali se povećava rizik od pojave tromboze. Usled tromboze placentarnih krvnih sudova može se javiti placentarna insuficijencija koja dovodi do pojave ponavljajućih abortusa, zastoja u rastu fetusa, eklampsije, intrauterine smrti ploda i prevremenog porođaja. Poslednjih godina istraživanja pokazuju da su mogući uzroci ovih pojava promene koje se dešavaju unutar proteina C koagulantnog sistema. Aktivirani protein C (APC) svoje antitrombotičko delovanje ispoljava proteolitičkom razgradnjom faktora V i VIII. Mutacija na genu za faktor V (tzv. Factor V Leiden mutacija) kad je arginin 506 zamenjen glutaminom, stvara mutirani faktor V koji ispoljava normalnu prokoagulantnu aktivnost ali je manje osetljiv na APC. Ove promene vode stabilizaciji kompleksa protrombinaze; stvara se više trombina koji aktivira još veće količine proteina C, ali rezistentnog, čime se postiže stanje hiperkoagulabilnosti. Stanje koje karakteriše slab antikoagulantni odgovor na APC uzrokovan mutacijom na genu za faktor V naziva se APC rezistencija. Ispitivanja sprovedena na trudnicama sa normalnom i komplikovanom trudnoćom različite gestacijske starosti, gde su posebnu grupu činile trudnice koje su imale dva ili više uzastopnih pobačaja, pokazala su da su fibrinogen, fibrin monomer, TAT kompleks i PAI kao parametri hemostaze dobri markeri veličine hiperkoagulabilnog stanja kod trudnica. Vrednosti proteina S kod većine trudnica su snižene, dok su za protein C u granicama normalnih vrednosti. Globalna aktivnost proteina C antikoagulantnog puta i odnos sa prokoagulantnim sistemom kvantitativno se meri pomoću ProC Global testa. Određivanje aktiviranog proteina C preko APC senzitivnosti koristi se kao pomoć u identifikaciji osoba sa APC rezistencijom odnosno sa povećanim rizikom od tromboze. Vrednosti PC-NR i APC-NR su statistički značajno niže kod trudnica sa ponavljajućim pobačajima i trudnica sa hipertenzijom u odnosu na trudnice sa normalnim tokom trudnoće čime je pokazano da je antikoagulantna aktivnost aktiviranog proteina C značajno smanjena u trudnoći, naročito u trudnoći praćenju komplikacijama. Dijagnostička vrednost parametara hemostaze kao markera trombotičkih promena kod trudnica najbolje se procenjuje ROC analizom. Sveukupna ispitivanja su potvrdila da PC-NR i APC-NR imaju zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost kao markeri trombotičkih promena u trudnoći tačnije dobri su pokazatelji razvoja rezistencije na aktivirani protein C u trudnoći.

Cljučne reči: trudnoća, tromboza placentae, protein C rezistencija

Uvod

Stvaranje tromba u arterijama i venama nastaje kao posledica poremećene dinamske ravnoteže između zida krvnog suda, trombocita, koagulationog i fibrinoliznog sistema. Interakcijom između patološki izmenjenog zida krvnog suda i trombocita uz oslobađanje tkivnog faktora koji aktivira koagulaciju i doprinosi stvaranju fibrina započinje tromboza (1).

Učestalost tromboze u izvesnoj meri zavisi od pola i uzrasta. Kod mlađih od 25 godina tromboze su

vrlo retke, a posle 40 godina starosti tendencija pojave tromboze značajno raste. Arterijske tromboze koje se manifestuju kao infarkt miokarda ili cerebralni infarkt i venski tromboembolizam imaju učestalost od 1/3 na 1000 osoba godišnje. Pojava tromboza nije jednaka ni po polu, pošto je infarkt miokarda 4/5 puta češći kod muškaraca do 55 godina, a cerebralni infarkt je 2 puta češći kod žena do 40 godina. Venske tromboze su 2/3 puta češće kod žena nego kod muškaraca i ta razlika je izraženija u reproduktivnom periodu. Kod žena od 15/39 godina 5 puta je veći rizik od venskih nego arterijskih tromboza (2).

Adresa autora

Tatjana Vodnik
Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije
Višegradska 26, 11000 Beograd, Srbija i Crna Gora

* Invited paper presented on 13th Congress of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, May 14-18, 2002, Niš, Yugoslavia

Tromboza je multifaktorijalna bolest koja nastaje kao posledica delovanja više od jednog faktora rizika. Osnovni faktori rizika za nastanak arterijske tromboze, odnosno infarkt miokarda i cerebralni infarkt su hipertenzija, pušenje, diabetes mellitus, hiperholesterolemija i gojaznost. Zajednički faktori rizika za arterijske i venske tromboze su oralni kontraceptivi, hiperhomocistenemija, lupus antikoagulans, visok nivo fibrinogena ili faktora VIII. Faktori rizika za venske tromboze razlikuju se od faktora rizika za arterijske tromboze jer nisu u vezi sa aterosklerozom. Među klasične faktore rizika za vensku trombozu ubrajaju se povreda tkiva, staza, trauma, hirurške intervencije, imobilizacija, malignitet, trudnoća i puerperijum.

APC rezistencija i rezistencija na aktivirani protein C

Sistem koagulacije krvi ima veliki biološki potencijal i zahteva preciznu regulaciju, tako da na svakom nivou sistema koagulacije molekuli sa površine endotela, cirkulišući inhibitori ili mehanizmi negativne povratne sprege obezbeđuju efikasnu kontrolu. Urođeni i stečeni molekularni defekti komponenata antikoagulantnog sistema uslovljavaju poremećaj njegove funkcije i mogu biti povezani sa stanjem hiperkoagulabilnosti i povećanim rizikom za nastanak tromboze. Podatak da kod oko 40% bolesnika sa venskim trombozama postoji porodična sklonost za nastanak tromboze ukazuje na značaj genetskih faktora u patogenezi tromboze. Dahlback (3, 4) je 1993. godine opisao novi poremećaj u sistemu koagulacije rezistenciju na aktivirani protein C (APC), kao predisponirajući faktor za venske tromboze i dokazao nasledni karakter poremećaja. Dalja ispitivanja su pokazala da je APC rezistencija najčešći do sada poznati genetski faktor rizika za venske tromboze i uzrok nasledne trombofilije.

Sistem proteina C reguliše proces koagulacije inaktivacijom dva značajna faktora sistema koagulacije. Centralni antikoagulantni enzim je APC, koji proteolizom inaktivira aktivirane faktore V i VIII i tako inhibira stvaranje trombina.

Rezistencija na APC je poremećaj koagulacije krvi koji karakteriše smanjena osetljivost na antikoagulantno delovanje APC. Ovaj poremećaj je u 95% slučajeva uzrokovan specifičnom tačkastom mutacijom na genu za faktor V i označava se kao F V Leiden (5). Ova mutacija uslovljava sintezu izmenjenog molekula F V, koji je delimično rezistentan na inaktivaciju delovanjem APC što dovodi do povećanog stvaranja trombina i doživotnog hiperkoagulabilnog stanja.

Dahlback (3) je 1993. god. opisao rezistenciju na APC kao novi uzrok nasledne trombofilije. On je pretpostavio da smanjen odgovor na antikoagulantno delovanje APC može biti uslov za vensku trombozu. Zapazio je da se dodavanjem APC u plazmu zdravih osoba produžava vreme koagulacije, a da kod nekih bolesnika sa venskim trombozama izostaje očekivano pro-

duženje vremena koagulacije. Na osnovu toga je rezistenciju na APC definisao kao smanjenu osetljivost plazme na antikoagulantno delovanje APC (3, 4). Razvio je jednostavan, na aPTT zasnovan, test za otkrivanje rezistencije na APC kojim se meri osetljivost plazme na antikoagulantno delovanje standardne količine APC.

Bertina (5) je 1994. godine opisao mutaciju gena za F V koja je u osnovi rezistencije na APC. Ova mutacija nazvana je mutacija F V Leiden po gradu Leiden u Holandiji gde je prvi put i opisana (6). Nakon otkrića mutacije F V Leiden pokazano je da kod nekih bolesnika postoje dva ili više genetskih faktora rizika za trombozu. Takođe, uočeno je i da prisustvo ove mutacije kod osoba sa nedostatkom AT III, proteina C ili proteina S višestruko povećava rizik pojave tromboze što ukazuje na koncept tromboze kao multigenetskog poremećaja. Poslednjih godina razvijeni su testovi koji imaju veliku osetljivost i specifičnost za detekciju rezistencije na APC, kao i testovi za brzu i preciznu detekciju mutacije F V Leiden. Ovi testovi postali su deo standardnog laboratorijskog ispitivanja bolesnika (5, 7).

Patofiziologija i molekularna osnova

Sistem proteina C, jedan od najvažnijih prirodnih antikoagulantnih sistema, sastoji se od proteina C, proteina S i trombomodulina. Inicijator aktivacije sistema proteina C je trombin. Trombin, nakon vezivanja za trombomodulin, usled promene konformacije gubi prokoagulantna, a stiče antikoagulantna svojstva i tako aktivira protein C. Nastali APC u prisustvu kofaktora proteina S i F V proteolizom razgrađuje i inaktivira F Va i F VIIIa što će smanjiti stvaranje trombina. Ovaj mehanizam negativne povratne sprege efikasno reguliše proces koagulacije krvi (8).

APC je serinska proteaza sa snažnim antikoagulantnim delovanjem. Za delovanje APC neophodno je prisustvo membranskih fosfolipida, jona kalcijuma i neenzimskih proteinskih kofaktora proteina S i F V. Slično trombinu, faktor V pospešuje i antikoagulantno i prokoagulantno delovanje. Faktor V je kofaktor F Xa u stvaranju trombina, ali je i kofaktor APC. Faktor V je jednolančani glikoprotein plazme, molekulske mase oko 300 kDa. Glavno mesto sinteze za F V je jetra ali se sintetise i u endotelnim ćelijama i megakariocitima. U cirkulaciji se nalazi kao profaktor koji se dejstvom trombina transformiše u F Va.

Rezistencija na APC je u oko 95% slučajeva posledica specifične mutacije za F V mutacije F V Leiden. To je tačkasta mutacija na mestu 1691 gde je guanin zamenjen adeninom što dovodi do sinteze izmenjenog molekula F V u kome je na mestu 506 arginin zamenjen glutaminom. Arginin 506 je mesto za koje se vezuje faktor Xa i on inhibira inaktivaciju faktora Va pod dejstvom APC.

Kada postoji faktor Va tip Leiden faktor Xa ne može da inhibira inaktivaciju i tada protein S ubrzava

inaktivaciju preko 20 puta. Arginin 306 je mesto vezivanja proteina S za faktor Va koji ubrzava njegovu inaktivaciju 2 puta. Protein S je kofaktor za proteolizu Arg 306 ali ne i Arg 506. Zbog genske mutacije inhibicija faktor V tip Leiden odvija se sporim putem preko proteolize Arg 306 koja je 10 puta sporija od uobičajene inaktivacije normalnog F Va preko Arg 506 i na taj način je omogućeno duže stvaranje trombina. To je objašnjenje zašto je faktor V Leiden relativno umeren faktor rizika za nastanak tromboze (9). Faktor V pojačava inaktivaciju faktora VIIIa pod dejstvom APC u prisustvu proteina S, ali faktor V Leiden 10 puta slabije pomaže inaktivaciju faktora VIIIa što, takođe, povećava rizik od tromboze (10). Ova supstitucija dovodi do gubitka jednog od mesta delovanja APC, dok su druga dva mesta neizmenjena. Faktor V je zato parcijalno rezistentan na APC tj. inaktivacija F Va Leiden nije izostala ali je oko 10 puta sporija u odnosu na neizmenjeni molekul. Aktivirani F V Leiden duže ostaje u cirkulaciji, stvaraju se veće količine trombina i tako nastaje doživotno hiperkoagulabilno stanje i povećan rizik za nastanak tromboze (4). Prema nekim ispitivanjima, a s obzirom na činjenicu da osobe sa F V Leiden mutacijom imaju predispoziciju za hiperkoagulabilno stanje kod tih ljudi izmerene su povećane vrednosti markera aktivirane koagulacije i to TAT kompleksa i fragmenta 1+2 (11).

Mutacija F V Leiden javlja se samo kod belaca. Učestalost mutacije je velika, ali varira među različitim populacijama. Poznati rezultati ukazuju na veliku učestalost u Švedskoj i zemljama Mediterana Grčka, Kipar. Poremećaj se javlja uglavnom kod belaca i nasleđuje se autosomno dominantno (6). Kod većine bolesnika tromboza nastaje spontano a kod ostalih je udružena s hirurškom intervencijom, imobilizacijom, traumom, trudnoćom, porođajem ili upotrebom oralnih kontraceptiva. Kod 60% žena kod kojih je tromboza nastala u trudnoći, dokazana je rezistencija na APC (4). Veliki broj istraživanja pokazao je da hiperestrogenizam jako povećava rizik od pojave tromboze. Naime ispitivanja su pokazala da su vrednosti proteina C i proteina S, kao glavnih inhibitora koagulacije, niže kod žena nego kod muškaraca što ukazuje na ulogu estrogena u regulaciji nivoa prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora (12).

Kliničke manifestacije

Prisustvo rezistencije na APC manifestuje se pojavom venskih tromboza. Kod polovine bolesnika tromboza nastaje spontano, a kod ostalih je udružena sa nekim spoljašnjim faktorom rizika (trudnoća, terapija oralnim kontraceptivima, operacija) (13). Pojava i izraženost kliničkih manifestacija je varijabilna i zavisi od stepena poremećaja (heterozigoti ili homozigoti za mutaciju F V Leiden). Kliničke manifestacije znatno su izraženije ako postoji kombinacija rezistencije na APC sa drugim genetskim ili stečenim faktorima rizika tipa deficita antitrombina, proteina C ili proteina S (5).

Rezistencija na APC kod žena može biti uzrok ponovljenih gubitka ploda, najčešće u drugom trimestru trudnoće, usled tromboze krvnih sudova placente i insuficijencije placentalne cirkulacije (14, 15). Takođe, postojanje APC rezistencije može dovesti i do zastoja u rastu fetusa, preeklampsije ili prevremenog porođaja. Ranije su ove komplikacije bile pripisivane postojanju antifosfolipidnog sindroma.

Laboratorijska ispitivanja

Laboratorijska ispitivanja obuhvataju (5, 16):

- o funkcionalna ispitivanja za detekciju rezistencije na APC, i
- o molekularna ispitivanja za detekciju mutacije F V Leiden.

Funkcionalna ispitivanja zasnivaju se na aPTT. Originalnim testom meri se aPTT ispitivane plazme pre i posle dodavanja standardne količine APC. Kada nema rezistencije na APC, dodati APC inaktivira F Va i F VIIIa i dolazi do dvostrukog ili većeg produženja vremena koagulacije. Kada postoji rezistencija na APC, inaktivacija na F Va je usporena i izostaje očekivano produženje vremena koagulacije. Rezultat se izražava kao APC ratio (APC-R) tj. kao odnos aPTT plazme nakon dodavanja APC i bez APC. Ako je APC-R manji od 2 smatra se da postoji rezistencija na APC. Da bi rezultati testa bili pouzdani aPTT ispitivane plazme mora biti u granicama normalnih vrednosti. Kada je aPTT produžen (nasledni ili stečeni deficit faktora koagulacije, prisustvo antikoagulansa heparin, LA) za ispitivanje se koristi modifikovani test (16).

Modifikovanim testom ispituje se plazma koja je prethodno razblažena plazmom deficitnom u F V u odnosu 1:5. U uzorku razblažene plazme meri se aPTT, pre i nakon dodavanja standardne količine APC. Ovim testom eliminiše se ili smanjuje uticaj drugih poremećaja koagulacije jer dilucija deficitnom plazmom: a) omogućava da se normalizuje nivo faktora koagulacije ako nedostaju ili b) eliminiše uticaj LA ili heparina. Ako se u plazmi nalazi LA tada se testiranje izvodi tako što se, nakon dilucije, u plazmu dodaje standardna količina fosfolipida za neutralizaciju LA (16).

Test kojim se u celini određuje uticaj F V Leiden mutacije i deficita proteina C i proteina S na funkcionalnost puta proteina C naziva se ProC Global. ProC Global odslikava ravnotežu između antikoagulantnog i prokoagulantnog sistema i na taj način patološki rezultat može ukazati na promene u smislu povećanog rizika od tromboze. ProC Global se zasniva na aktivaciji proteina C iz uzorka plazme aktiviranim proteinom C (dobijenim iz zmijskog otrova *Agkistrodon contortrix* Protac*) i unutrašnjeg puta koagulacije fosfolipidima sa aktivatorom (Pathromtin SL). Test je vrlo osetljiv na APC rezistenciju/F V Leiden (100%) i na PC deficit (90%), a i na PS deficit (63%). Test pruža podatak o

mogućnostima PC puta i odnos do unutrašnjeg puta koagulacije (17).

Molekularna ispitivanja za detekciju mutacije F V Leiden zasnivaju se na PCR tehnici (engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction) tj. na polimerazom indukovanoj amplifikaciji gena. Nakon amplifikacije dela gena za F V i digestije restrikcijom enzimom Mn11, dobijeni fragmenti se ispituju elektroforezom. Prisustvo mutacije F V Leiden ukida jedno restriktivno mesto za ovaj enzim, tako da se digestijom neizmenjenog gena dobijaju tri, a digestijom mutiranog gena dva fragmenta određene veličine. Ispitivanjem dobijenih fragmenata elektroforezom na gelu, utvrđuje se da li se radi o homozigotu ili heterozigotu (5). Detekcija mutacije molekularnim ispitivanjima je metoda najveće specifičnosti, ali su ova ispitivanja mnogo složenija i skuplja u odnosu na funkcionalna ispitivanja.

Savremeni dijagnostički pristup podrazumeva skrining za rezistenciju na APC primenom testa koji se zasniva na aPTT, a za potvrdu pozitivnih i ispitivanje nejasnih rezultata primenjuju se molekularna ispitivanja (6).

Lečenje

Terapija akutne venske tromboze i plućne embolije kod bolesnika sa rezistencijom na APC i mutacijom F V Leiden ne razlikuje se od terapije venskog tromboembolizma kod drugih bolesnika (8). Terapija se sprovodi primenom heparina i oralnih antikoagulantnih lekova. Profilaksa venskog tromboembolizma sprovodi se kod žena sa urođenom rezistencijom na APC, tokom trudnoće i puerperijuma. Kod žena koje su prethodno imale trombozu preporučuje se profilaktička primena heparina tokom trudnoće i tokom 4-6 nedelja nakon porođaja. Kod žena bez prethodnih tromboza tokom trudnoće preporučuje se kliničko praćenje ili profilaktička primena heparina uz profilaksu tromboze nakon porođaja. Kod 25 trudnica sa verifikovanim tromboembolijskim komplikacijama u terapiji je primenjen nisko molekularni heparin tzv. Dalteparin. Doziranje je vršeno prema telesnoj masi i vrlo brzo su uočeni pozitivni efekti (18).

Zbrinjavanje trudnica sa urođenom trombofilijom je poseban problem. U trudnoći subkutano davanje heparina predstavlja terapiju izbora zbog svoje efikasnosti i sigurnosti za plod. Trudnice sa visokim rizikom od tromboze treba da primaju subkutano heparin na 12 sati u drugom i trećem trimestru i 6 nedelja postpartalno (1).

Promene u sistemu hemostaze

U trudnoći nastaje stanje hiperkoagulabilnosti i hipofibrinolize. U normalnoj trudnoći odigrava se pozicija fibrina ne samo u spiralnim arterijama već i u prostoru između zida materice i placentarnih resica, što održava integritet placente. Iako je intravaskularna

koagulacija ograničena na placentu, ipak postoji rizik nastanka tromboze iz više razloga. S druge strane, trofoblast stvara fibrinolitičke proteine koji pomažu implantaciju i protok krvi kroz placentu i fetus. Tokom trudnoće koncentracije nekih proteina plazme uključenih u koagulaciju krvi kao što je protein C antikoagulantni sistem i fibrinolitički sistem menjaju se što direktno podstiče koagulaciju, smanjuje antikoagulaciju i inhibiše fibrinolizu. Ove promene su fiziološki važne jer se njima smanjuje rizik od gubitka krvi, ali se povećava rizik od tromboembolijskih komplikacija. Zastupljenost objektivno verifikovanih tromboembolijskih komplikacija u trudnoći kreće se između 0,018 % i 0,1 %, a u puerperijumu rizik je povećan dva do tri puta (19). Tromboza se javlja i u placentarnim krvnim sudovima što za posledicu ima pojavu uzastopnih spontanih pobačaja, zastoja u rastu fetusa i intrauterine smrti fetusa.

Aktivnost faktora VII, VIII, X, XII i fibrinogena značajno se povećava u trudnoći, dok aktivnost faktora XI i XIII opada. Ove promene odražavaju se i na pojavu produženog protrombinskog vremena dok se vrednost aPTT skraćuje. Aktivnost markera aktivirane koagulacije (protrombinski fragment 1+2, trombin-antitrombin kompleks, fibrinopeptid A) povećava se 2-3 puta u prvom trimestru, a 5-10 puta u trećem trimestru (20, 21). Aktivnost inhibitora koagulacije, antitrombina III i proteina S, smanjuje se za 10-30%. Vrednosti za plazminogen i α_2 -antiplazmin ostaju uglavnom nepromenjene tj. u granicama normalnih vrednosti, dok je vrednost za PAI povećana nekoliko puta. Nivo D-dimera u plazmi povećava se u trećem trimestru i kod normalne i kod patološke trudnoće. Povišene vrednosti za D-dimer utvrđene u trećem trimestru i kod normalne i kod patološke trudnoće imaju veliku ulogu u dijagnozi preeklampsije (19, 20).

Kod trudnica sa tromboembolijskim komplikacijama vrlo često se razvije i tzv. HELLP sindrom (engl. **H**emolysis, **E**levated **L**iver enzymes, **L**ow **P**latelets) praćen niskim brojem trombocita, povećanim aktivnostima enzima jetre i pojavom hemolize. Pretpostavka je da u osnovi ovog sindroma kao i tromboembolijskih komplikacija leži postojanje F V Leiden mutacije. Aktivacija koagulacije povećava se sa nedeljama gestacije. U komplikacijama tipa HELLP sindroma ili preeklampsije značajno raste nivo TAT kompleksa i fragmenta 1+2 u odnosu na referentni nivo kod normalnih zdravih trudnica (21, 22).

Kod trudnica sa povišenim arterijskim pritiskom dokazan je niz različitih promena u sistemu hemostaze. Ove promene odnose se na promene u funkcionalnosti trombocita, aktivnostima faktora koagulacije kao i u fibrinolitičkom sistemu. Naročito su uočene povišene vrednosti koncentracija za PAI-1 kod ovih trudnica u odnosu na zdrave trudnice, kao i smanjene vrednosti koncentracija za PAI-2 kod trudnica gde postoji zastoj u rastu deteta kao direktna posledica hipertenzivnog stanja (22).

Vrednosti parametara hemostaze kod normalne i komplikovane trudnoće

Trudnoća je izazov za hemostatski sistem. Uspesšan protok kiseonika i hranljivih materija do fetusa kao i transport nekorisnih produkata od fetusa jeste zadatak cirkulacije između fetusa i majke. Ako ovaj proces razmene nije u redu, povećava se rizik od zastoja u rastu fetusa, oštećenja mozga i finalno intrauterine smrti ploda. Smanjena cirkulacija fetoplacentarne jedinice igra važnu ulogu u nastanku preeklampsije i eklampsije, a poznate su u komplikacije u trudnoći tipa ateroze i tromboze. Neposredno nakon porođaja hemostaza nema važnu ulogu ali je kasnije neophodna dobra funkcija ovog sistema da se konsoliduje trombotični čep i fibrinska tvorevina. U stanjima poremećene hemostaze, produženo krvarenje iz materice može biti opasno po majčin život i produžiti fazu oporavka.

Promene u trudnoći, naročito endokrinološke, pod uticajem estrogena, stvaraju prokoagulantno stanje, gde su inhibitori koagulacije uglavnom nepromenjeni, a prokoagulantni faktori povećani. Fibrinolitički potencijal je suzbijen tokom trudnoće, sve u cilju da se smanji rizik od komplikacija tj. krvarenja. Određivanje parametara hemostaze tokom trudnoće može biti korisno za pravovremeno otkrivanje poremećaja hemostaze i uvođenje neophodne terapije (20, 23).

Ispitivanjem parametara hemostaze kod trudnica sa normalnom i komplikovanom, patološkom, trudnoćom različite gestacijske starosti došlo se do nekih vrlo važnih saznanja.

Fibrinogen je od svih faktora koagulacije najzastupljeniji u plazmi i zbog toga je kvantitativno najvažniji faktor koagulacije i prirodni supstrat za enzim trombin. U poslednjoj fazi koagulacije, stvoreni trombin deluje na fibrinogen, stvarajući monomere fibrina koji se potom polimerizuju u fibrinski koagulum. Vrednosti fibrinogena povećavaju se u trudnoći. Porast koncentracija je veći u patološkim trudnoćama u odnosu na normalne, a porast koncentracije korelira i sa nedeljama gestacije. Slično kao kod fibrinogena ponašaju se i vrednosti koncentracija fibrin monomera. Vrednosti su dva puta veće od gornje granice referentnog intervala i rastu sa starošću trudnoće, a veće su kod pacijentkinja sa patološkom nego sa normalnom trudnoćom (21, 23).

Antitrombin III je vrlo važan direktan i prirodni inhibitor serinskih proteaza (serpin) čija je glavna uloga da inaktivira trombin. U procesu inaktivacije trombina, kada on gradi kompleks sa antitrombinom, stvara se trombin-antitrombin kompleks (TAT). Koncentracije TAT kompleksa u trudnoći se povećavaju i nekoliko puta u odnosu na gornju granicu normalnih vrednosti. Svoj maksimum vrednosti TAT kompleksa dostižu u poslednjim nedeljama gestacije. Kao i kod fibrinogena i fibrin monomera uočljiv je porast vrednosti sa starošću trudnoće. Najveće vrednosti zabeležene su kod trudnica sa ponavljajućim pobačajima, nešto niže

kod hipertenzivnih trudnica, a visoke su i kod trudnica sa normalnim tokom trudnoće (23).

Plazmin je glavni enzim fibrinolize i u cirkulaciji se nalazi u neaktivnom obliku kao plazminogen. Delovanjem aktivatora plazminogen se pretvara u plazmin. Glavni supstrat za delovanje plazmina je fibrin, iako kao nespecifičan enzim, plazmin razgrađuje još neke faktore koagulacije. Fibrinolizu inhibiraju inhibitori aktivatora plazminogena tj. PAI (engl. plasminogen activator inhibitor). PAI je serinska proteaza, reaktant akutne faze i najznačajniji inhibitor plazmina tj. najvažniji inhibitor fibrinolize. Deficit ovog faktora dovodi do krvarenja, a porast do tromboze.

Hipofibrinoliza u trudnoći uzrokovana je smanjenjem nivoa fibrinolitičkih aktivatora i povećanjem fibrinolitičkih inhibitora. Povećanje vrednosti koncentracija za PAI veće je nego povećanje koncentracija aktivatora, usled čega se smanjuje fibrinolitička aktivnost. Poslednjih godina, razvojem specifičnih testova uvedena je direktna kvantifikacija fibrinolitičkih komponenti čime se dobijaju podaci o kretanju koncentracija plazminogen aktivatora kao i PAI kroz period graviditeta. U periodu graviditeta koncentracije plazminogen aktivator inhibitora se povećavaju. Porast vrednosti u korelaciji je sa nedeljama gestacije. Takođe, kod trudnica koje su imale nekoliko spontanih pobačaja kao i kod trudnoća praćenih hipertenzijom ove vrednosti su značajno veće nego kod trudnica sa normalnim tokom trudnoće (23). Mnoga dosadašnja ispitivanja su pokazala da normalna trudnoća predstavlja hipofibrinolitičko stanje u kome su vrednosti PAI-1 i PAI-2 povišene. Kod hipertenzivnih trudnoća i u preeklampsiji, fibrinolitički poremećaj koji postoji izazvaće još veće povećanje vrednosti PAI-1 u plazmi i placenti. Vrednosti za PAI-2 u placenti i plazmi su smanjene kod trudnoća kod kojih postoji zastoj u rastu deteta. Takođe postoji i pozitivna korelacija između koncentracije PAI-2 u plazmi i mase deteta čime je predloženo da je ovaj parametar adekvatan marker funkcije placentne. Dakle, PAI-1 i PAI-2 progresivno rastu u trudnoći i to više PAI-2 jer je njegovo mesto sinteze placentne. U puerperijumu vrednosti za PAI-1 vrlo brzo se normalizuju, već u toku 1-2 dana, a vrednosti za PAI-2 tek u roku od 7 dana (19, 22).

Protein C antikoagulantni sistem u trudnoći

Sistem koagulacije krvi ima veliki biološki potencijal i zahteva preciznu regulaciju. Urođeni i stečeni molekularni defekti komponenata antikoagulantnog sistema uslovljavaju poremećaj njegove funkcije i uzrokuju hiperkoagulabilnost i povećani rizik za nastanak tromboze. Ovo je naročito izraženo u stanjima gde je ispoljena hiperkoagulabilnost kao što je slučaj u periodu graviditeta.

Glavni fiziološki inhibicioni mehanizam za regulaciju koagulacije krvi je protein C antikoagulantni sis-

tem. Sistem proteina C reguliše proces koagulacije inaktivacijom dva značajna kofaktora sistema koagulacije. Centralni antikoagulantni enzim sistema proteina C ja aktivirani protein C (APC) koji proteolizom inaktivira aktivirane faktore Va i VIIIa i tako inhibira stvaranje trombina. Rezistencija na APC definisana je kao smanjena osetljivost na antikoagulantno delovanje APC. Kao posledica javlja se povećano stvaranje trombina i doživotno hiperkoagulabilno stanje. Otuda kaže-mo da je rezistencija na APC predisponirajući faktor za pojavu tromboze.

Vrednosti aktivnosti proteina C u trudnoći uglavnom ostaju u granicama normalnih vrednosti dok su vrednosti za protein S ispod donje granice normalnih vrednosti sa nedeljama gestacije vrednosti postepeno opadaju. Takođe, niže vrednosti proteina S uočene su kod trudnica sa patološkom trudnoćom u odnosu na trudnice sa normalnim tokom trudnoće.

Testovi za određivanje aktiviranog proteina C i ProC Globala su novijeg datuma i ne može se reći da pripadaju grupi rutinskih testova. Ipak, rezultati određivanja ovih parametara i zaključci koji iz njih proizilaze ukazuju na sve veću potrebu uvođenja ovih testova u rutinski rad (23, 24).

Globalna aktivnost protein C antikoagulantnog puta i odnos sa prokoagulantnim sistemom pokazana je kvantitativnim merenjem preko ProC Global testa. Određivanje aktiviranog proteina C preko testa APC senzitivnosti koristi se kao pomoć u identifikaciji osoba sa APC rezistencijom odnosno sa povećanim rizikom od tromboze. Za prikaz rezultata koristi se normalizovan odnos tj. NR (normalized ratio engl.). Dosadašnja ispitivanja pokazala su da osobe ženskog pola imaju niži APC-NR u odnosu na muški pol. Ova razlika se još više produbljuje u periodu trudnoće (10).

Ispitivanjem globalne aktivnosti proteina C i APC senzitivnosti u normalnoj, hipertenzivnoj i trudnoći kojoj je prethodilo više spontanih pobačaja pokazano je da je APC antikoagulantna aktivnost značajno smanjena u trudnoći. Manning i sar. (25). pokazali su da se APC antikoagulantna aktivnost značajno smanjuje tokom trudnoće što za posledicu ima niže vrednosti APC-NR nego kod zdravih negravidnih žena.

Dijagnostička tačnost ovih parametara kao markera trombotičkih promena u trudnoći ispitana je ROC analizom. Za dobijanje ROC dijagrama, kao i za ROC analizu korišćen je kompjuterski program Graph Roc™. ROC krivom (engl. Receiver operating characteristic curve) se u formi dijagrama prikazuje odnos osetljivosti i specifičnosti pri različitim nivoima odlučivanja. Osetljivost određivanja definišemo kao broj stvarno pozitivnih u procentima od ukupnog broja bolesnih, a specifičnost kao broj stvarno negativnih podeljen ukupnim brojem zdravih. Najopštiju meru dijagnostičke tačnosti predstavlja površina ispod ROC krive (AUC); to je osnovna osobina određivanja koja govori o njegovoj mogućnosti da vrši razdvajanje između dva

stanja. Vrednosti se nalaze između 1,0 (kompletno razdvajanje vrednosti određivanja dve grupe) i 0,5 (bez jasne distribucione razlike između vrednosti određivanja dve grupe) (26). S obzirom da AUC daje informaciju o tome koliko je ROC kriva blizu najboljoj mogućnosti (AUC = 1), PC-NR i APC-NR su pokazali zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost kao markeri trombotičkih promena u trudnoći (23).

Izračunate »cut-off« vrednosti pri razlikovanju grupe zdravih trudnica od grupe trudnica sa hipertenzijom tj. trudnica sa ponavljajućim pobačajima iznose: za PC-NR 0,760 tj. 0,720 i za APC-NR 1,140 tj. 0,940. Odgovarajuće vrednosti za dijagnostičke osetljivosti pri navedenim »cut-off« vrednostima iznose: za PC-NR 0,893 tj. 0,857; za APC-NR 0,946 tj. 0,929 dok odgovarajuće vrednosti za dijagnostičke specifičnosti pri navedenim »cut-off« vrednostima iznose: za PC-NR 0,576 tj. 0,606; za APC-NR 0,303 tj. 0,546 (23).

U toku trudnoće plazma koncentracije nekih proteina uključenih u hemostatske mehanizme dostižu jako visoke ili niske koncentracije. Sve ove promene dešavaju se u pravcu nastanka jednog hiperkoagulabilnog stanja. Ove promene su fiziološki važne jer smanjuju rizik od krvarenja prilikom porođaja, ali se zato povećava rizik od trombotičkih komplikacija. Ovaj rizik je izraženiji ako je trudnoća praćena komplikacijama kao što su povišen arterijski pritisak ili povećan nivo glukoze u krvi. Posebno rizičnu grupu čine trudnice sa dva i više spontanih pobačaja, uzrokovanih upravo trombotičkim promenama na placentarnim krvnim sudovima što se i može pokazati promenjenim parametrima hemostaze.

Vrednosti fibrinogena, fibrin monomera, TAT kompleksa i PAI su statistički značajno više kod trudnica sa komplikacijama nego kod zdravih trudnica, pa se ovi parametri svrstavaju u markere veličine hiperkoagulabilnog stanja kod trudnica.

Vrednosti parametara za procenu funkcije antikoagulantnog sistema i pokazatelja rezistencije na aktivirani protein C, PC-NR i APC-NR, su značajno niže kod hipertenzivnih trudnica u odnosu na zdrave, a još niže kod trudnica sa ponavljajućim pobačajima pa se može zaključiti da su PC-NR i APC-NR dobri pokazatelji trombotičkih promena u placentarnim krvnim sudovima, tačnije dobri pokazatelji razvoja rezistencije na aktivirani protein C u trudnoći (21).

Praćenje parametara hemostaze pruža precizniju sliku sistema hemostaze u periodu trudnoće, normalne ali i patološke. Kod trudnica sa utvrđenim trombotičkim promenama u placentarnim krvnim sudovima primenom efikasne terapije, može se izbeći zastoj u rastu fetusa, intrauterina smrt ploda, eklampsija i pre vremena porođaj. Prema tome, jako je važno pravovremeno otkrivanje poremećaja hemostaze u trudnoći, jer će ovi poremećaji usloviti razvoj niza vrlo teških stanja.

Određivanje navedenih parametara kao i fibrinogena, fibrin monomera, TAT kompleksa i PAI veoma

je korisno za otkrivanje i praćenje trudnica sa trombozom. Zbog velike uloge koju ovi parametri imaju u periodu trudnoće, postoje brojne preporuke za njihovo uvođenje u rutinsko određivanje, kako bi se pravovremeno utvrdilo odsustvo ili prisustvo jednog iz niza faktora rizika koji prati stanje trudnoće.

Zahvalnost: Ovaj rad je urađen po osnovu projekta 1260 koji finansira Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj Republike Srbije.

HEMOSTATIC PARAMETERS AS HYPERCOAGULABILITY INDICATORS IN PREGNANCY

Tatjana Vodnik, Svetlana Ignjatović, Nada Majkić-Singh

Institute for Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia, Belgrade

Summary: The concentrations of plasma proteins involved in the process of coagulation are changed during the normal pregnancy, interfering with balance between procoagulant and anticoagulant systems. These changes include the increased activity of coagulation factors, the increased fibrin production and suppression of fibrinolysis. In this way, the risk of blood loss is reduced by physiological mechanisms, but the risk of thrombosis becomes higher. Thrombosis of placental blood vessels gives rise to placental insufficiency, causing the repeated miscarriages, retardation of fetal growth, eclampsia, intrauterine death of fetus and pre-term delivery. The causes of these incidents are the changes occurring within protein C coagulation system. The central anticoagulant enzyme is APC, which inactivates the activated factors V and VIII by proteolysis and, in that manner, inhibits the production of thrombin. The resistance to APC is the impairment of blood coagulation characterized by lower sensitivity to anticoagulant activity of APC. This disorder is in 95% of cases, caused by specific factor V gene point mutation and designated as F V Leiden. It is point mutation on locus 1691 where guanine is replaced by adenine what will lead to synthesis of modified F V molecule in which arginine is replaced by glutamine on locus 506. Arginine 506 is the locus of factor Xa binding, and it inhibits the inactivation of factor Va by the action of APC. The testing performed in pregnant women, with regular and complicated pregnancy, in different periods, has shown that fibrinogen, fibrin monomer, TAT complex and PAI were good markers of hypercoagulability in pregnancy. The values of protein C activity were within normal limits. Protein S values were below lower limits. Global activity of protein C-anticoagulant pathway and its relation with procoagulant system were presented by quantitative measurement using Pro C Global test, while determination of activated protein C by means of APC sensitivity test was used for identification of persons with APC resistance, e.g. with higher risk of thrombosis. Significantly lower PC-NR and APC-NR values were found in pregnant women with repeated miscarriages and in pregnant women with hypertension in relation to pregnant women with regular pregnancy. The results revealed significantly lower APC-anticoagulant activity in pregnancy, particularly in pregnancy associated with complications. Diagnostic accuracy of these parameters as markers of thrombotic changes in pregnancy was tested by ROC analysis. PC-NR and APC-NR showed satisfactory diagnostic accuracy as markers of thrombotic changes in pregnant women, more precisely, they were found to be good indicators of resistance to activated protein C in pregnancy.

Key words: pregnancy, placental thrombosis, Protein C resistance

Literatura

1. Bošković D, Elezović I. Klinička kardiovaskularna farmakologija. Urednici: Kažić T, Zdravković M. III izdanje, Integra, 1997.
2. Rosendaal FR. Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 1-6.
3. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-8.
4. Dahlback B. Physiological anticoagulation: resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; 94: 923-7.
5. Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 449-53.
6. Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJM. The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78: 631-5.
7. Hallak M, Senderowicz J, Cassel A, Shapira C, Aghai E, Auslender R, Abramovici H. Activated Protein C resistance (Factor V Leiden) associated with thrombosis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176 (4): 889-93.
8. Bauer KA. Hypercoagulability: A new cofactor in the protein C anticoagulant pathway. *N Engl J Med* 1994; 330: 566.

9. Rosendaal FR, Koster T, Reitsma PH et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
10. Cumming AM, Tait RC, Fildes S et al. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Br J Haematol* 1995; 90: 725-7.
11. Simioni P, Scarano L, Gavasso S. Prothrombin fragment 1+2 and TAT complex levels in patients with inherited APC resistance due to factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 1996; 92: 435-41.
12. Henkens CMA, Bom VJJ, Vanderschaaf W, Pelsma PM, Sibinga CTS, Dekam PJ, Vandermeer J. Plasma levels of Protein S, Protein C and Factor X effects of sex, hormonal state and age. *Thromb Haemost* 1995; 74 (5): 1271-75.
13. Hellgren M, Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism associated with pregnancy and oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 210-3.
14. Brenner B, Mandel H, Lanir N, Younis J et al. Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1997; 97: 551-4.
15. Brenner B, Blumenfeld Z. Thrombophilia and fetal loss. *Blood Reviews* 1997; 11 (2): 72-9.
16. Gemmati D, Serino ML, Scapoli GL. A modified functional global test to measure protein C, protein S activities and the activated protein C resistance phenotype. *Thromb Res* 1998; 92: 141-8.
17. Dati F, Hafner G, Erbes H, Kraus M, Niemann F, Noah M, Wagner C. Pro C* Global: The first functional screening assay for the complete protein C pathway. *Clin Chem* 1997; 43: 1719-23.
18. Blomback M, Bremme K, Hellgren M, Siegbahn A, Lindberg H. Thromboprophylaxis with low molecular mass heparin, fragmin (Dalteparin), during pregnancy a longitudinal safety study. *Blood Coag Fibrinol* 1998; 9 (1): 1-9.
19. Thomas L. Hemostasis. In: Thomas L, 1. ed. *Clinical laboratory diagnostics*. Frankfurt/Main: TH- Books-Verl.-Ges., 1998; 548-640.
20. Vodnik T. Parametri hemostaze kod normalne i komplikovane trudnoće. *Jugoslav Med Biohem* 2002; 21 (2): 120-1.
21. Vukosavljević D, Vodnik T, Dopsaj V, Ljubić A. F 1+2 i fibrin monomer kao parametri aktivirane koagulacije kod trudnica. *Jugoslav Med Biohem* 2000; 19 (3): 234.
22. Halligan A, Bonnar J, Sheppard B et al. Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 488.
23. Vodnik T. Izbor parametara hemostaze za praćenje normalne i komplikovane trudnoće. Magistarska teza. Farmaceutski fakultet. Univerzitet u Beogradu, 2001.
24. Vukosavljević D, Vodnik T, Dopsaj V, Obrenović R, Ljubić A. Significance of Pro C Global determination in pregnancy. 14th IFCC-FESC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 277.
25. Manning RM, Letsky EA, Nelson-Piercy C, Peek MJ et al. Activated protein C resistance in normal pregnancy. *Br J Haematol* 1997; 104: 1084-6.
26. Zveig MH, Campbell G. Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39/4: 561-77.

Rad primljen: 15. 01. 2003

Prihvaćen za štampu: 10. 04. 2003