

*Originalni članci/
Original articles*

PROTROMBIN I FRAGMENT
PROTROMBINA 1+2 U PRAĆENJU ORALNE
ANTIKOAGULANTNE TERAPIJE

PROTHROMBIN AND PROTHROMBIN
FRAGMENT 1+2 AS MARKERS OF ORAL
ANTICOAGULANT THERAPY

Correspondence to:

Mr. ph spec. Bioh.

Vesna Vuković-Dejanović,

Institut za rehabilitaciju

Beograd, Sokobanjska 17

Tel: 064/2137616,

e-mail: vdvesna@gmail.com

Vesna D. Vuković-Dejanović¹, Bratislav B. Dejanović²,
Slavka Mandić-Radić³

¹ Institut za rehabilitaciju, Beograd, Srbija

² Vojno-medicinski centar „Karaburma”, Beograd, Srbija

³ Institut za zdravstvenu zaštitu radnika ministarstva unutrašnjih poslova, Beograd, Srbija

Sažetak

Tromboza je patološki proces koji dovodi do aktivacije hemostaze "na pogrešnom mestu i u pogrešno vreme", što dovodi do nastanka tromba, često sa okluzijom krvnog suda. Uzroci tromboza mogu biti preterana aktivacija koagulacije, smanjena raspoloživost inhibitora koagulacije, smanjena aktivnost fibrinolitičkog sistema ili povreda endotela, a postoje i mnogi stečeni poremećaji i faktori rizika koji mogu dovesti do nastanka tromboze. Najvažnija reakcija u procesu koagulacije je pretvaranje protrombina (faktora IIa) u trombin. Tokom ove reakcije dolazi do oslobađanja fragmenata protrombina 1+2 (F 1+2) u cirkulaciju. Povećane koncentracije F 1+2 zapažene su u hiperkoagulabilnim stanjima, kada se javlja intenzivnije stvaranje trombina, dok se smanjenje nivoa F 1+2 nalazi kod pacijenata na oralnoj antikoagulantnoj terapiji.

Cilj ovog rada bio je da se odredi stepen postignutog antikoagulantnog efekta kod pacijenata na oralnoj antikoagulantnoj terapiji različitih indikacija. U studiju je uključeno 100 pacijenata koji su na terapiji sinkumarom ili varfarinom duže od tri meseca, i dve kontrolne grupe: jedna od 55 osoba bliskih po godinama sa grupom pacijenata, i druga od 20 statistički značajno mlađih osoba. Svima je određivano protrombinsko vreme, aktivnost F II i koncentracija F 1+2. Pacijenti su na osnovu vrednosti protrombinskog vremena podeljeni u tri grupe.

Dobili smo značajno niže vrednosti kod sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, vrednosti F1+2 u grupi pacijenata sa $INR \geq 3$ su se značajno razlikovale od pacijenata u grupi sa $INR \leq 2$, što ukazuje na bolje postignut antikoagulantni odgovor kod pacijenata sa višim vrednostima INR. Dobili smo jaku pozitivnu korelaciju između F1+2 i starosti ispitanika. Dobili smo značajnu razliku u aktivnosti F II između svih grupa pacijenata, kao i između sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Uočljiv je pad aktivnosti F II sa porastom INR, koji ukazuje na osetljivost ovog faktora kao pokazatelja postignutog antikoagulantnog efekta. Između kontrolne grupe i grupe zdravih osoba nema značajne razlike u aktivnosti F II.

Ključne reči

protrombin, fragment protrombina 1+2,
protrombinsko vreme

Key words

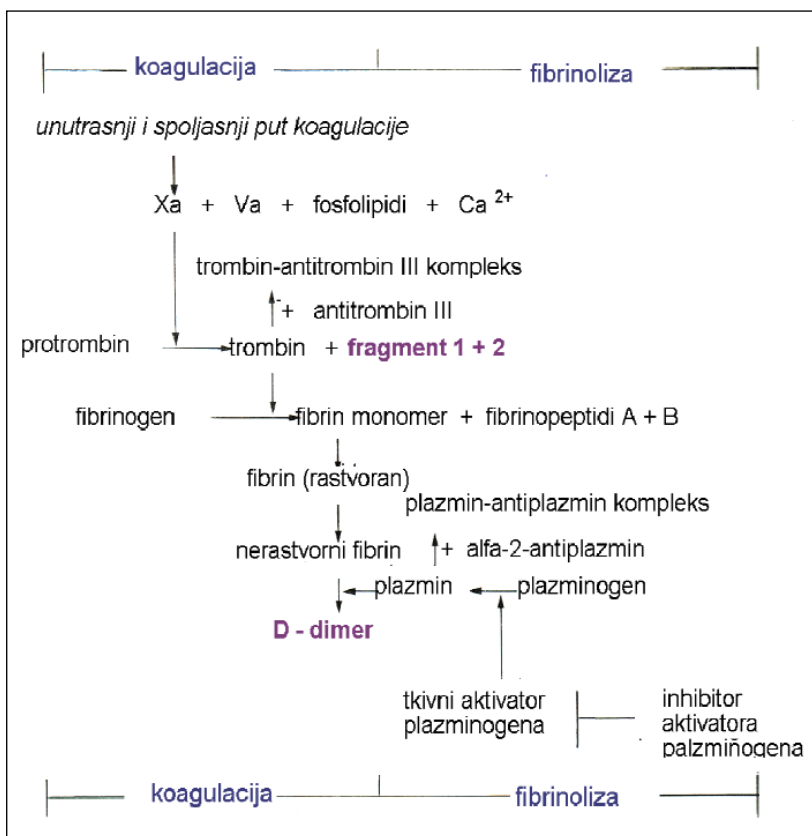
prothrombin, prothrombin fragment 1+2,
prothrombin time

UVOD

Tromboza je patološki proces koji dovodi do aktivacije hemostaze „na pogrešnom mestu i u pogrešno vreme”, što dovodi do nastanka tromba, često sa okluzijom krvnog suda. Uzroci tromboza mogu biti preterana aktivacija koagulacije, smanjena raspoloživost inhibitora koagulacije, smanjena aktivnost fibrinolitičkog sistema ili povreda endotela, a postoje i mnogi stečeni poremećaji i faktori rizika koji mogu dovesti do nastanka tromboze (1).

Najvažnija reakcija u procesu koagulacije je pretvaranje protrombina (faktora IIa) u trombin. Pod fiziološkim uslovima, ovaj proces se odvija u prisustvu faktora Xa, faktora Va, jona kalcijuma, i trombocita. Tokom ove reakcije faktor Xa cepa dve peptidne veze na amino-terminalnom kraju molekula protrombina, što dovodi do stvaranja trombina, i oslobađanja fragmenata protrombina 1+2 (Slika 1), pa tako ovaj fragment direktno reflektuje stvaranje trombina (2,3). Povećane koncentracije F 1+2 zapažene su u hiperkoagula-

bilnim stanjima (4,5,6), kada se javlja intenzivnije stvaranje trombina, dok se smanjenje nivoa F 1+2 nalazi kod pacijentata na oralnoj antikoagulantnoj terapiji (7,8).



Slika 1. Šema dela koagulacione i fibrinolitičke kaskade

(Adaptirano po van Wersch JWJ, van Mourik-Alderliesten CH, Coremans A. Comparison of markers of coagulation activation in patients under oral anticoagulation at different levels. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:462)

U prevenciji i lečenju tromboza koriste se antitrombozni lekovi koji svoj efekat ostvaruju inhibicijom stvaranja ili aktivacije trombina, ili ispoljavaju oba ova efekta. Na taj način antikoagulansi sprečavaju širenje postojećeg tromba, stvaranje novog tromba i smanjuju mogućnost nastajanja embolizacije i drugih komplikacija.

Oralni antikoagulansi su najšire korišćeni lekovi u terapiji pacijenata sa različitim kardiovaskularnim poremećajima, posebno kad su praćeni tromboembolijom. Preparati koji su u kliničkoj upotrebi su derivati 4-hiroksikumarina (9).

Cilj laboratorijske kontrole oralne antikoagulantne terapije je održavanje stabilno snižene aktivnosti II, VII, IX i X faktora koagulacije na onom nivou koji osigurava hipokoagulabilnost a mogućnost krvarenja i rekurentne tromboze svodi na najmanju moguću meru. Doziranje je individualano zbog velikog variranja u brzini apsorpcije, iskorištavanja i degradacije varfarina, pri čemu ista doza varfarina dovodi do neujednačenih efekata kod različitih pacijenata. Test koji se rutinski upotrebljava za kontrolu oralne antikoagulantne terapije je protrombinsko vreme.

Kumarini su jedinjenja koja svoj antikoagulantni efekat ostvaruju inhibicijom hepatične posttranslacione modifikacije četiri vitamin K-zavisna faktora koagulacije: pro-

trombina i faktora VII, IX i X. Prisustvo funkcionalno neaktivnih faktora koagulacije u plazmi usporava koagulaciju i izaziva hipokoagulabilnost krvi. Pored toga, kumarini inhibiraju i posttranslacionu modifikaciju prirodnih inhibitora koagulacije: proteina C i proteina S.

Oralni antikoagulantni lekovi smanjuju aktivnost vitamin K-zavisnih faktora koagulacije u plazmi zavisno od vremena njihovog poluživota. Najpre se smanjuje aktivnost F VII, čiji je poluživot 6 časova, dok aktivnosti ostalih faktora opadaju znatno sporije: poluživot F IX je 24 časa, F X je 40 časova, a protrombina 60 časova (9).

MATERIJAL I METODE

Eksperimentalnom grupom je obuhvaćeno 100 pacijenata oba pola (32 žene i 68 muškaraca), prosečne starosti $67,7 \pm 7,38$ godina, koji su na stabilnoj oralnoj antikoagulantnoj terapiji (duže od 3 meseca) Sintromom ili Farinom, i koji radi kontrole dolaze u Institut za medicinsku biohemiju VMA. Svi pacijenti su podeljeni u 3 grupe, prema vrednosti postignutog INR-a: I grupa sa $\text{INR} \leq 2$, II grupa sa $2 < \text{INR} < 3$, III grupa sa $\text{INR} \geq 3$.

Kontrolnu grupu je sačinjavalo 55 osoba (20 žena i 35 muškaraca), prosečne starosti $65,1 \pm 9,11$ godina, nepušača, koji nisu na antikoagulantnoj terapiji, i namaju hematološke, hepatične ili maligne bolesti.

Zbog očekivane kompromitacije hemostaze sa starenjem, pored kontrolne grupe, u ispitivanje je uključena i grupa zdravih, za koju je odabrano 20 mladih osoba, prosečne starosti $39,5 \pm 2,90$ godina, nepušača, bez zdravstvenih problema.

Određivani su parametri koagulacije: protrombinsko vreme (PV), faktor koagulacije II (F II), i fragmenti protrombina 1+2 (F 1+2). Pacijentima, kao i kontrolnoj grupi i grupi zdravih osoba, krv je uzeta sa natrijum-citratom kao antikoagulansom (odnos natrijum-citrat:plazma je 1:10), između 8 i 11 časova. Deo pokazatelja hemostaze je određivan u svežoj plazmi, a deo u plazmi koja je zamrznuta na -20°C i obrađivana posle 2 nedelje.

Protrombinsko vreme je određivano metodom po Quick-u, gde se meri vreme nastajanja fibrinskog ugruška u plazmi bolesnika, u prisustvu humanog tromboplastina i jona kalcijuma.

Faktor koagulacije II određivan je funkcionalnim testom, gde se aktiviranjem spoljašnjeg puta koagulacije tromboplastinom, vrši merenje protrombinskog vremena.

Fragmenti protrombina 1+2 su određivani ELISA „sendvič” metodom, sa peroksidazom kao hromogenom.

Svi parametri su određivani komercijalnim testovima firme Dade Behring, a merenja su vršena na analizatorima iste firme (BCT i ELISA Processor II).

Vrednosti parametara hemostaze predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost (\bar{x}) ± standardna devijacija (Sd), i kao medijane. Procena značajnosti razlika parametara unutar eksperimentalne grupe vršena je analizom varijanse i Tukey HSD testom, a poređenje srednjih vrednosti pojedinih pokazatelja u eksperimentalnoj grupi sa kontrolnom grupom i grupom zdravih vršeno je Student t-testom.

REZULTATI

Postoji značajna razlika u aktivnosti faktora II u sve tri eksperimentalne grupe ($p < 0,001$), kao i između sve tri grupe pacijenata i kontrolne grupe ($p < 0,001$). Između kontrolne grupe i grupe zdravih nema značajne razlike.

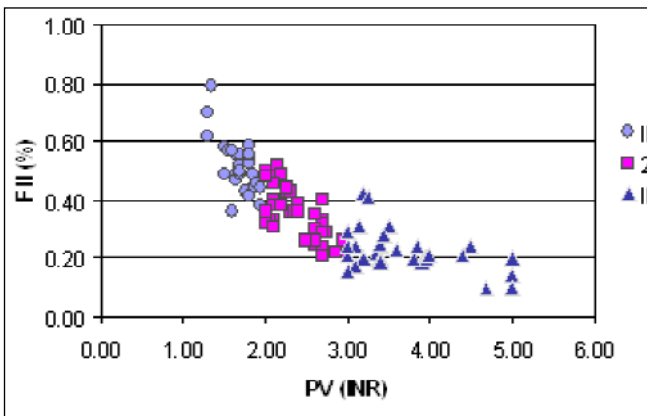
Srednje vrednosti F II navedene su u Tabeli 1, a grafički prikaz zavisnosti F II od INR u eksperimentalnoj grupi dat je na Slici 2.

Tabela 1. Aktivnost faktora II i koncentracija F1+2 u ispitivanim grupama

grupa		Faktor koagulacije II (%) $\bar{x} \pm Sd$	F 1+2 (nmol/L) $\bar{x} \pm Sd$
Eksperimentalna grupa	INR ≤ 2	0,52 ± 0,07 ***	0,67 ± 0,18 ***
	2 < INR < 3	0,36 ± 0,07 ***	0,53 ± 0,15 ***
	INR ≥ 3	0,23 ± 0,05 ***	0,39 ± 0,09 ***
kontrolna grupa		1,10 ± 0,11	1,18 ± 0,30
grupa zdravih		1,13 ± 0,10	0,53 ± 0,15 ***

*** $p < 0,001$

Rezultati, treći pasus (između Tabele 1 i Slike 2) : Dobijena je značajna razlika u koncentracijama F1+2 između grupa pacijenata sa INR ≤ 2 i INR ≥ 3 ($p < 0,001$), a uočljiv je blagi pad vrednosti F1+2 sa povećanjem INR. Postoji značajna razlika u nivoima F1+2 između kontrolne grupe i sve tri grupe unutar eksperimentalne ($p < 0,001$). Grupa zdravih se u koncentraciji F1+2 ne razlikuje značajno ni od jedne grupe pacijenata, ali ima značajno niže vrednosti od kontrolne grupe ($p < 0,001$) (Tabela 1)..

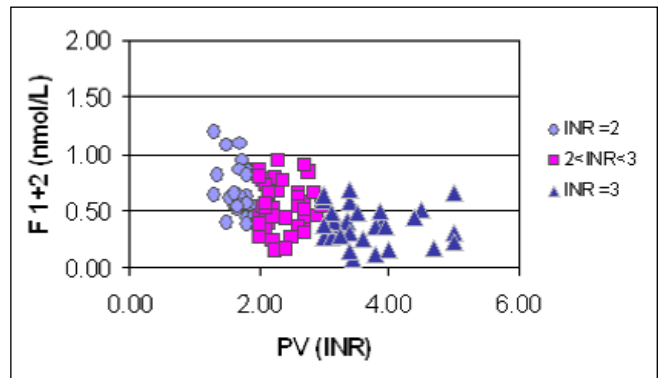


Slika 2. Promena aktivnosti F II u zavisnosti od INR u eksperimentalnoj grupi

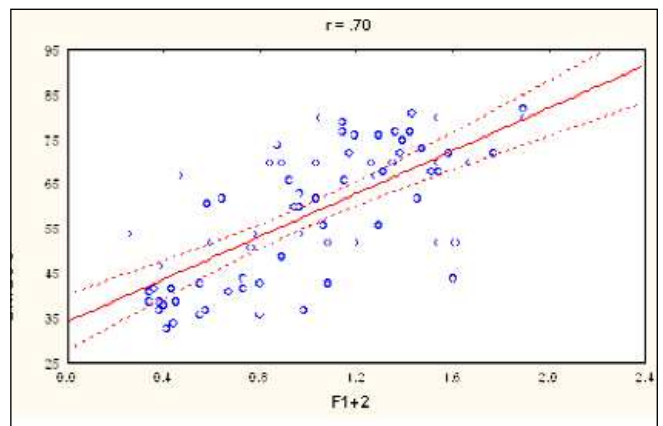
Srednje vrednosti koncentracija F 1+2 prikazane su u Tabeli 1, a grafički prikaz zavisnosti F 1+2 od INR dat je na Slici 3.

Poređenjem odnosa pokazatelja hemostaze u eksperimentalnoj grupi, dobijena je vrlo značajna obrnuta korelacija vrednosti INR sa F II ($r = -0,83$), sa PC ($r = -0,58$) i sa F 1+2 ($r = -0,41$).

Nađena je vrlo značajna korelacija između koncentracije F1+2 i broja godina ($r = 0,70$) (Slika 4).



Slika 3. Promena koncentracija F 1+2 u zavisnosti od INR u eksperimentalnoj grupi



Slika 4. Zavisnost koncentracije F1+2 od broja godina

DISKUSIJA

F1+2, koja nastaje in vivo cepanjem protrombina pomoću faktora Xa, predstavlja važan dijagnostički alat u proceni hiperkoagulabilnih stanja kao i u dijagnostici različitih kliničkih stanja koja nastaju kao posledica tromboze. Kako je vreme poluraspada F 1+2 oko 90 minuta, to čini merenje ovog markera u plazmi pouzdanijim od drugih markera za praćenje koagulacije (8,9,10,11).

Dobili smo značajno niže ($p < 0,001$) vrednosti F 1+2 kod sve tri grupe pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (12,13,14,15). Takođe, vrednosti kod pacijenata sa INR ≥ 3 značajno se razlikuju ($p < 0,001$) od onih dobijenih kod grupe sa INR ≤ 2, što ukazuje na bolje postignut antikoagulantni odgovor kod pacijenata sa većim INR. Slične rezultate dobili su u ranijim studijama Mannucci i sar. 1991. god (12) i van Wersch i sar. 1992. god (13), a kasnije Vene i sar. 2003. god (14), kao i Ota i sar. 2008. god (15). Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija F 1+2 sa grupom mladih, zdravih osoba, nije dobijena statistički značajna razlika ni kod jedne grupe pacijenata. To navodi na zaključak da se adekvatnom primenom antikoagulantne terapije mogu vrednosti F 1+2 sniziti do nivoa kao kod osoba kojima nije kompromitovana hemo-

staza. Dobijena je vrlo značajna razlika ($p < 0,001$) u nivoima F1+2 između kontrolne grupe i grupe zdravih osoba. Obzirom na značajnu razliku ($p < 0,001$) u godinama između ove dve grupe kontrolnih ispitanika, a u skladu sa dobijenom značajnom korelacijom u porastu koncentracija F 1+2 sa starenjem, ovakvi rezultati su i očekivani.

Dobijena je značajna razlika ($p < 0,001$) među svim grupama pacijenata u aktivnosti protrombina, kao i između sve tri grupe pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Uočljivo je sniženje aktivnosti protrombina sa porastom INR (Slika 2), što je pokazatelj osetljivosti ovog faktora kao indeksa postignute antikoagulacije.

U skladu sa očekivanjima, između kontrolne grupe i grupe zdravih nema značajne razlike u aktivnosti faktora II.

Nađena je vrlo jaka obrnuta korelacija protrombina ($r = -0,83$) i F 1+2 ($r = -0,41$) sa nivoom INR. Ovakvi rezultati potvrđuju značaj određivanja aktivnosti protrombina i koncentracije F 1+2 kao dodatnih pokazatelja stanja hemostaznog sistema kod pacijenata na oralnoj antikoagulantnoj terapiji, uz INR.

Dobijena je značajna korelacija ($r = 0,70$) porasta nivoa F 1+2 sa povećanjem broja godina, što se i može očekivati obzirom da se sa starošću pojačava aktivnost koagulacionog sistema, na račun fibrinolitičkog koji postaje manje aktivan, dok je kod mlađih osoba situacija obrnuta.

Neke novije studije su pokazale da se F 1+2 kao molekul male mase, izlučuje urinom, gde se takođe može određivati ELISA testom ⁽²⁾. Takođe je pokazano da su kod pacijenata sa

postoperativnim venskim tromboembolijama, bilo da se radi o dubokoj venskoj trombozi ili plućnoj tromboemboliji, u urinu nalaze povećane koncentracije F 1+2 u odnosu na pacijente bez tromboembolijskih komplikacija ^(16,17,18). Ukoliko bi se pokazalo da vrednosti F 1+2 u urinu značajno koreliraju sa koncentracijama u plazmi, to bi bio značajan doprinos u uvođenju jedne ovakve neinvazivne dijagnostičke procedure kod pacijenata sa sumnjom na postoperativne tromboembolijske komplikacije. Uticaj razlika u renalnoj funkciji može se izbeći istovremenim određivanjem mikroalbumina i kreatinina u urinu. Nema podataka o nivoima F 1+2 u urinu kod pacijenata na stabilnoj antikoagulantnoj terapiji, pa nam to ostavlja mogućnosti za dalja istraživanja.

ZAKLJUČCI

1. Faktor II najbolje odražava stepen suprimiranja koagulacione kaskade, i pokazuje najjaču obrnutu korelaciju sa vrednošću INR.

2. Fragment protrombina 1+2 je dobar pokazatelj postignute antikoagulacije i može se koristiti, uz INR, kao dodatni pokazatelj stanja hemostaznog sistema kod pacijenata na oralnoj antikoagulantnoj terapiji.

3. Kod osoba koje nisu na oralnoj antikoagulantnoj terapiji F 1+2 značajno korelira sa godinama.

Abstract

Thrombosis is pathological process that leads to activation of haemostasis „at the wrong place in the wrong time” which induce thrombi formation, often with the occlusion of blood vessel. The causes of thrombosis can be the over activation of coagulation, decreased availability of coagulation inhibitors, decreased activity of fibrinolysis, endothelial injury and many acquired disorders. The transformation of prothrombin (factor IIa) into thrombin is the most important reaction in coagulation process. During this reaction prothrombin fragment 1+2 (F 1+2) is releasing into circulation. Increased concentration of F 1+2 are found in hypercoagulabile states, when the forming of thrombin is more intensive; decreasing of F 1+2 is noticed at the patients on oral anticoagulant therapy.

The aim of this study was to determine the degree of achieved anticoagulant effect in patients on stable oral anticoagulant therapy with different indications. This study included 100 patients permanently receiving anticoagulant therapy with sincoumar or warfarin longer than 3 months, and two control groups: one of 55 persons matched by age with group of patients, and 20 significantly younger persons. We determined level of prothrombin time expressed as International Normalized Ratio (INR), activity of FII (in %) and concentration of F 1+2 in all groups. Patients are splitted in three groups based on value of prothrombin time

We obtained markedly lower values of F1+2 in all three groups of patients relating to control group. Also, values of F1+2 in group of patients with $INR \geq 3$ is significantly different of patients with $INR \leq 2$, which designate to better anticoagulant response in patients with higher INR. We obtained strong positive correlation between F 1+2 and aging. We obtained a significant difference of F II activity among all groups of patients, and between all three groups of patients relating to control group. It is noticeable decrease of prothrombin activity with increasing of INR, demonstrating the sensitivity of this factor as an index of anticoagulation achieved. Among the control group and healthy group there is no significant differences in the activities of F II.

LITERATURA

1. Stein CM, Brown N, Vaughan DE, et al. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonist in human vasculature. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:117.
2. Wexels F, Haslund A, Dahl O, et al. Thrombin split products (prothrombin fragment 1 + 2) in urine in patients with suspected deep vein thrombosis admitted for radiological verification *Thrombosis Research* 2013;131:560-563
3. Whelihan M, Zachary V, Orfeo T, Mann K. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood* 2012;120:3837-3845
4. Bauer KA, Rosenberg RD. Pathophysiology of the prothrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood* 1987;71:343-350.
5. Bauer KA, Broekmans AW, Bertina RM, Conrad J, Horellou MH, Samama MM, Rosenberg RD. Hemostatic enzyme generation in the blood of patients with hereditary protein C deficiency. *Blood* 1988;71:1418-1426.
6. Teitel JM, Bauer KA, Lau HK, Rosenberg RD. Studies of the prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1+2 fragment and thrombin-antithrombin III complexes. *Blood* 1982;59:1086-1097.
7. Conway EM, Baure KA, Barzegar S, Rosenberg RD. Suppression of hemostatic system activation by oral anticoagulants in the blood of patients with thrombotic diatheses. *J Clin Invest* 1987;80:1535-1544.
8. Tripodi A, Cattaneo M, Molteni A, et al. Changes of prothrombin fragment 1+2 (F 1+2) as a function of increasing intensity of oral anticoagulation-considerations on the suitability of F 1+2 to monitor oral anticoagulant treatment. *Thromb Haemost* 1998;79:571-573.
9. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. Guide to warfarin therapy. *Circulation* 2003;107:1692-1711.
10. Paramo, J. A., Orbe, J., Beloqui, O., Benito, A., Colina, I., Martinez-Vila, E., & Diez, J. (2004). Prothrombin fragment 1 + 2 is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical cardiovascular disease. *Stroke*,35(5), 1085-1089.
11. Ridker PM. Fibrinolytic and inflammatory markers for arterial occlusion: the evolving epidemiology of thrombosis and hemostasis. *Thromb Haemost* 1997;78:53-59.
12. Mannucci PM, Bottasso B, Tripodi A, Bianchi Bonomi A. Prothrombin fragment 1+2 and intensity of treatment with oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 1991;66:741
13. van Wersch JWJ, van Mourik-Alderliesten CH, Coremans A. Comparison of markers of coagulation activation in patients under oral anticoagulation at different levels. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:461-466.
14. Vene, N., Mavri, A., Kosmelj, K., & Stegnar, M. (2003). High D-dimer levels predict cardiovascular events in patients with chronic atrial fibrillation during oral anticoagulant therapy. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*,90(6), 1163-1172.
15. Ota S, Wada H, Abe Y, et al. Elevated levels of prothrombin fragment 1+2 indicate high risk of thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14:279-285.
16. Van Es, J., Biere-Rafi, S., Ahdi, M., Meijers, J. C., Kamphuisen, P. W., & Gerdes, V. E. Urinary prothrombin fragment 1+ 2 as a potential diagnostic tool for venous thrombosis and myocardial infarction. Associations between cardiovascular risk factors, hyper-and, 2011:87 <http://dare.uva.nl/document/228633>.
17. Gibson N, Sohne M, Gerdes V, Meijers J, Buller H. Clinical usefulness of prothrombin fragment 1+2 in patients with suspected pulmonary embolism. *Thrombosis research* 2010; 125: 97-99 <http://dare.uva.nl/document/116205>
18. Borris, L. C., Breindahl, M., Ryge, C., Sommer, H. M., & Lassen, M. R. (2007). Prothrombin fragment 1+ 2 in urine as an indicator of sustained coagulation activation after total hip arthroplasty. *Thrombosis research*, 121(3), 369-376.