

Rola urotensyny II w etiologii nadciśnienia ciążowego
i hipotrofii płodu.

Lek. med. Agata Kuszerska

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: dr hab. n. med. Anna Markowska
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2013

Składam serdeczne podziękowania:

Pani promotor, dr hab. med. Annie Markowskiej za cierpliwość,
wrozumiałość i pomoc przy powstawaniu niniejszej pracy.

Panu prof. dr hab. med. Krzysztofowi Drewsowi za życzliwość i
dobrą wolę w trakcie przygotowania pracy.

Panu prof. dr hab. med. Ludwikowi Malendowiczowi za
umożliwienie realizacji badań w Katedrze Histologii i Embriologii
oraz za cenne rady i liczne wskazówki merytoryczne udzielone
podczas realizacji pracy.

Spis treści

Nadciśnienie ciążowe	9
1.1 Wstęp	9
1.2 Epidemiologia	10
1.3. Podział wg Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2003 roku.	11
1.3.1 Nadciśnienie przewlekłe	11
1.3.2 Nadciśnienie ciążowe (indukowane ciążą)	11
1.3.3 Stan przedrzucawkowy (preeclampsia).	11
1.3.4 Rzucawka (eclampsia)	12
1.3.5 HELLP	12
1.3.6. Nadciśnienie przewlekłe z nałożonym stanem przedrzucawkowym.....	13
1.4 Czynniki ryzyka nadciśnienia ciążowego.....	13
1.5 Wczesne markery stanu przedrzucawkowego	14
1.6 Etiopatogeneza.....	15
1.7 Kryteria rozpoznania oraz objawy nadciśnienia ciążowego.	23
1.8 Powikłania nadciśnienia ciążowego.	24
Zahamowanie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu	25
1.9 Wstęp	25
1.10 Rozpoznanie.....	28
1.11 Etiopatogeneza.....	29
1.12 Powikłania	35
Urotensyna	37
1.13 Wstęp	37
1.14 Receptor dla U-II	38
1.15 Działanie biologiczne U-II.....	39
II. Cel pracy	44
III. Materiał.....	45
3.1 Grupa kontrolna	45
3.2 Grupa druga – pacjentki z nadciśnieniem ciążowym	47
3.3 Grupa trzecia – pacjentki z IUGR.....	50
IV. Metody	52
4.1 ELISA	52

4.2 Immunohistochemia.....	53
4.3 PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy.	54
4.4 Analiza statystyczna.....	57
V. Wyniki	59
5.1 Stężenie U-II w surowicy krwi pacjentek.....	59
5.2 Stężenie U-II w surowicy krwi pępowinowej.....	60
5.3 Wartość MAP w badanych grupach pacjentek. Zależność MAP od stężenia U-II w surowicy krwi pacjentek i w surowicy krwi pępowinowej w grupie z nadciśnieniem ciążowym.....	61
5.4 Określenie wartości predykcyjnej stężenia U-II w surowicy krwi pacjentek dla ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego i białkomoczu.....	64
5.5 Określenie wartości predykcyjnej stężenia U-II w surowicy krwi pępowinowej dla ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego i białkomoczu.....	66
5.6 Badanie współzależności stężeń pomiędzy stężeniami U-II w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej.....	68
5.7 Analiza histopatologiczna łożysk pacjentek badanych grup oraz rozmieszczenie w nich substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II.	71
5.8 Analiza PCR ekspresji <i>U-II</i> oraz ekspresji <i>UTS2R</i> w łożyskach pacjentek badanych grup.....	79
VI. Dyskusja	82
VII. Wnioski	91
VIII. Streszczenie.....	92
IX. Piśmiennictwo	96
X. Spis tabel.....	114
XI. Spis rycin	115
XII. Spis wykresów.....	117

Wykaz skrótów i symboli użytych w pracy

$^{\circ}\text{C}$ – stopnie Celsjusza

2-ME – 2-metyloestradiol

AC – obwód brzucha płodu

ACTH – hormon adrenokortykotropowy

AGA – appropriate for gestational age - odpowiednie do wieku ciążowego

Alat – aminotransferaza alaninowa

AMV - Avian Myeloblastosis Virus, wirus ptasiej białaczki – polimeraza AMV - odwrotna transkryptaza, RNA-zależna polimeraza DNA

ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny

ARDS - Acute respiratory distress syndrome – zespół ostrej niewydolności oddechowej

Aspat – aminotransferaza asparaginianowa

AT1-AA - agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor – autoprzeciwciała wiążące się z receptorem Angiotensyny II

AUC – area under the curve - obszar pod krzywą ROC

BMI – body mass index

BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny

BSA – albumina serum wołowego

BeWo - komórki syncytiotrofoblastu

CA 9 – anhydraza węglanowa

Ca^{2+} - jony wapnia

cDNA – komplementarny DNA

COMT – katecholo-O-metylotransferaza

COX – enzym cyklooksygenaza

CRH – kortykoliberyna

DAB – 3,3' - diaminobenzodyna

DAG – diacyloglicerol

dNTP – roztwór deoksynukleotydów

(dT)₁₈ – primer

EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący

EIA – enzyme immuno assai (metody immunoenzymatyczne)

ELBW - extremely low birth weight - skrajnie niska masa urodzeniowa

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay czyli test immunoenzymatyczny

ER – siateczka śródplazmatyczna

FL – długość kości udowej płodu

GDP – guanozynodifosforan

GLUT1 – transporter glukozy

GPR 14, UTS2R – receptor urotensyny-II

GPSK – Ginekologiczno – Położniczy Szpital Kliniczny

GTP – guanozynotrifosforan

H + E – metoda barwienia hematoksyliną i eozyna

HbA1C – glikowana hemoglobina

HC – obwód głowy płodu

HCl – chlorowódór

HELLP - niedokrwistość hemolityczna (Hemolytic anemia), podwyższone poziomy enzymów wątrobowych (Elevated Liver enzymes), małopłytkowość (Low Platelet count).

HIF 1 alfa – czynnik indukowany niedotlenieniem

HIV – wirus ludzkiego niedoboru odporności

HLA - human leukocyte antigens – ludzkie antygeny leukocytarne

HtrA3 – proteaza serynowa

HUVECs - komórki śródbłonna naczyń pępowinowych

IgG – immunoglobulina klasy G

IL – interleukina

IP3 – 1,4,5-trifosforan inozytoli

IUGR – intrauterine growth retardation – wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu

j./l – jednostki na litr

KIRs – killer immunoglobulin receptors – receptor dla NK

LBW – low birth weight – niska masa urodzeniowa

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LGA – large for gestational age - duże w stosunku do wieku ciążowego

LGALS 13 – gen łożyskowy kodujący białko PP 13

MAP – mean arterial pressure – średnie ciśnienie tętnicze

mg/dl – miligramy na decylitr

micro RNAs – jednoniciowa cząsteczka kwasu rybonukleinowego

ml – mililitr
MLCK – Inhibitory kinazy łańcucha lekkiego miozyny
mmHg – milimetry słupa rtęci
mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy
ng – nanogramy
NHBPEP - National High Blood Pressure Education Program – narodowy program edukacyjny dotyczący nadciśnienia tętniczego
NK – natural killer – białe krwinki „naturalni zabójcy”
nm – nanometry
NO – tlenek azotu
NOS – syntaza tlenku azotu
NYHA - skala służąca do klasyfikacji ciężkości objawów niewydolności serca
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
oxy LDL – utleniona cząsteczka lipidowa o niskiej gęstości
OZW – ostry zespół wieńcowy
PAPPA – A - Pregnancy-associated plasma protein A – osoczowe białko A zależne od ciąży
PBS – Phosphate Buffered Saline - sól fizjologiczna buforowana
PCR – Polymerase Chain Reaction, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy
pg – pikogramy
PgI2 – prostacyklina
PIH – pregnancy induced hypertension – nadciśnienie indukowane ciążą – obecnie nadciśnienie ciążowe
PIP2 – 4,5-difosforan fosfatydyloinozytoli
PKC – C kinaza proteinowa
PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu
PP13 – białko produkowane w łożysku
PRL – prolaktyna
REM – rapid eye movement – ostatnia faza snu
Rho – rodzina kinaz
RIA – radio immuno assay, czyli metody immunochemiczne
ROC krzywa- Receiver Operating Characteristics – ocena poprawności klasyfikatora
RR – pomiar ciśnienia tętniczego metodą Riva - Rociego
sEng – rozpuszczalny receptor dla endogliny

sFlt1 – rozpuszczalny receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu
SGA – small for gestational age - małe w stosunku do wieku ciążowego
SNPs - single-nucleotide polymorphism – polimorfizm jednego nukleotydu
STOX1 – gen na chromosomie 10q22.1
sVEGFR – 1/sFlt – 1 – rozpuszczalna postać receptora dla naczyniowego
śródbłonkowego czynnika wzrostu
t.c. – tydzień ciąży
TGF – czynnik wzrostu nowotworów
Tie-1, Tie-2 – receptor dla kinazy tyrozynowej
TMB –3,3',5,5' - tertrametylobenzydyna
TNF – czynnik martwicy nowotworów
TORCH – skrót dla chorób zakaźnych: toksoplazmoza, różyczka, cytomegalia,
opryszczka, inne
TRI Reagent- bufor lizujący
TSH – hormon tyreotropowy
tys/mm³ – tysiąc na milimetr sześcienny
TXA₂ – tromboksan A₂
U-II – urotensyna II
U-II – gen urotensyny II
URP – białko podobne do urotensyny II
USG – ultrasonografia
UTS2R – gen receptora U-II
VEGF – naczyniowy czynnik wzrostu
VEGFR -1, VEGFR-2 – naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu typu 1 i 2
VLBW – very low birth weight – bardzo niska masa urodzeniowa
WZW - wirusowe zapalenie wątroby

I. Wstęp

Nadciśnienie ciążowe

1.1 Wstęp

W czasie trwania ciąży w układzie krążenia dochodzi do zmian hemodynamicznych. Zmiany te są odpowiedzią na zwiększone zapotrzebowanie metaboliczne wzrastających tkanek płodu, zwiększenie unaczynienia, wielkości przepływu w obrębie narządów rodnych i łożyska. Serce i układ krążenia ciężarnej w sposób dynamiczny dostosowuje się do zmieniających się warunków, stając się krążeniem hiperkinetycznym. Zmiany te obejmują zwiększenie objętości krwi krążącej, zwiększenie częstości pracy serca, jego objętości wyrzutowej i pojemności minutowej [1,2,3].

W odpowiedzi na zaistniałe zmiany, dzięki działaniom wielu hormonów, a w szczególności progesteronu, zmniejsza się napięcie i wzrasta podatność ścian naczyń krwionośnych – zarówno tętniczych, jak i żylnych, co skutkuje zmniejszeniem oporu obwodowego o około 30% już w I trymestrze ciąży i spadkiem wartości ciśnienia tętniczego krwi. Wartość oporu obwodowego maleje, a podatność dużych tętnic rośnie wraz ze stopniem zaawansowania ciąży [4,5,6].

Drugim mechanizmem, który ma wpływ na zmniejszenie całkowitego systemowego oporu naczyniowego u ciężarnej jest obecność krążenia maciczno – łożyskowego. W przypadku prawidłowo przebiegającej ciąży, zwiększenie pola powierzchni naczyń krwionośnych nie powoduje wzrostu całkowitego oporu obwodowego u ciężarnej dzięki przebudowie ścian tętnic spiralnych macicy. Polega ona na zaniku ich warstwy mięśniowej, a z nią reaktywności tych tętnic na bodźce wazokonstrykcyjne. Dzięki temu przepływ przez łożysko jest zwiększony, a całkowity systemowy opór naczyniowy spada. Mechanizm ten może odpowiadać za około 20% spadku całkowitego oporu naczyniowego u kobiety ciężarnej [7,8].

W ciąży niepowikłanej wypadkowa zachodzących zmian hemodynamicznych powoduje spadek ciśnienia tętniczego krwi. Redukcja ciśnienia skurczowego wynosi 5 – 11 mm Hg, a rozkurczowego 10 – 15 mm Hg. Fizjologicznie wartość ciśnienia tętniczego obniża się już w I trymestrze ciąży, osiągając najniższe wartości pomiędzy 22 a 26

tygodniem jej trwania i wracając do stanu wyjściowego sprzed ciąży w 36 tygodniu ciąży. Wartości MAP (średnie ciśnienie tętnicze) pozostają zwykle zbliżone do wyjściowych [9,10,11].

MAP czyli średnie ciśnienie tętnicze wyliczane jest ze wzoru $MAP \approx DP + (SP - DP) / 3$, gdzie DP oznacza ciśnienie rozkurczowe a SP – ciśnienie skurczowe. Norma średniego ciśnienia tętniczego wynosi od 75–100 mm Hg [10].

Dwukrotne stwierdzenie wartości ciśnienia tętniczego krwi równego lub przekraczającego 140/90 mmHg upoważnia nas do rozpoznania nadciśnienia tętniczego u kobiety ciężarnej [12].

1.2 Epidemiologia

Światowa Organizacja Zdrowia ocenia, że w przybliżeniu 192 kobiety umierają każdego dnia z powodu powikłań związanych z nadciśnieniem ciążowym. W krajach rozwiniętych nadciśnienie ciążowe występuje u 2 – 7% ciężarnych, natomiast w krajach uboższych częstość występowania może być do trzech razy większa. Ocenia się, że w krajach rozwijających się preeclampsia jest jednym z wiodących czynników śmiertelności kobiet ciężarnych i może wynosić > 60000 zgonów na świecie na rok.

W USA preeclampsia jest trzecią wiodącą przyczyną śmiertelności ciężarnych powodując, 20% zgonów kobiet w ciąży. W Polsce nadciśnienie tętnicze wikła ok. 6 – 8% wszystkich ciąż [13 – 19].

Aktualny podział nadciśnienia tętniczego występującego u kobiet ciężarnych z 2003 roku przedstawia się następująco:

1.3. Podział wg Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2003 roku.

1.3.1 Nadciśnienie przewlekłe

Jest to nadciśnienie, które istniało przed ciążą lub pojawiło się przed 20 tygodniem ciąży i utrzymujące się ponad 6 tygodni po porodzie. Może przebiegać z białkomoczem. Nadciśnienie tętnicze przewlekłe można podzielić na:

- łagodne – RR rozkurczowe < 110 mm Hg
- ciężkie – RR rozkurczowe > 110 mm Hg

Obecnie przewlekłe nadciśnienie w ciąży występuje u 0,6 – 2% kobiet w wieku 18 – 29 lat, natomiast w przedziale wiekowym 30 – 39 lat wzrasta do 4,6 – 22,3%.

1.3.2 Nadciśnienie ciążowe (indukowane ciążą)

Jest to nadciśnienie, które rozwija się po 20 tygodniu ciąży i ustępuje w porożu. Przebiega z RR > 140/90 mm Hg.

Rozwija się u 6 – 17% pierwsiastek/pierworódek i 2 – 4% wieloródek. Nadciśnienie ciążowe może występować pod postacią:

1.3.3 Stan przedrzucawkowy (preeclampsia).

Jest to nadciśnienie, które rozwija się po 20 tygodniu ciąży i ustępuje w porożu. Przebiega z RR > 140/90 mmHg (MAP powyżej 106 mmHg), a charakterystyczny dla tej postaci nadciśnienia jest białkomocz > 0,5 g/dobę (wg NHBPEP > 0,3 g/dobę).

Wyróżnia się dwie postacie stanu przedrzucawkowego:

- łagodny stan przedrzucawkowy:

RR \geq 140/90 mmHg mierzone dwukrotnie w odstępie 6 godzin

Białkomocz z dobową utratą białka 0,5 (0,3) g/dobę lub białkomocz na (+) w pojedynczej próbce moczu

- ciężki stan przedrzucawkowy:

RR \geq 160 skurczowe lub \geq 110 rozkurczowe (MAP powyżej 126 mm Hg) mierzone 2 razy w przeciągu 6 godzin w stanie spoczynku. Białkomocz z dobową utratą białka \geq 2 g/dobę. Skąpomocz: diureza poniżej 400ml/dobę. Zaburzenia ze strony OUN lub narządu wzroku: bóle i zawroty głowy, zaburzenia widzenia, zaburzenia świadomości. Obrzęk płuc lub sinica. Bóle w nadbrzuszu lub prawym podżebrzu. Upośledzenie funkcji wątroby. Małopłytkowość (liczba płytek $<$ 100 tys/mm³)

1.3.4 Rzucawka (eclampsia)

jest to stan, w którym u pacjentki z wykładnikami stanu przedrzucawkowego występują drgawki toniczno – kloniczne, które nie mają innej przyczyny np. padaczka. Może wystąpić w czasie ciąży (38 – 53%), porodu (18 – 36%) oraz w przeciągu pierwszych 48 godzin połogu (11 – 44%). Większość przypadków rzucawki (91%) rozwija się przed ukończeniem 28 tygodnia ciąży.

1.3.5 HELLP

to wielonarządowe powikłanie ciężkiego stanu przedrzucawkowego i rzucawki manifestujące się:

- hemolizą erytrocytów

- wzrostem aktywności enzymów wątrobowych (Alat, Aspat)

- trombocytopenią

Dotyczy 0,2 – 0,6% wszystkich ciąż i 4 – 12% ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym lub rzucawką.

Największe prawdopodobieństwo wystąpienia zespołu HELLP jest w III tryestrze ciąży (69%), jak i do 7 dni po porodzie (31%).

U 15% ciężarnych, u których wystąpił zespół HELLP nie stwierdzono podwyższonego ciśnienia, czy proteinurii.

1.3.6. Nadciśnienie przewlekłe z nałożonym stanem przedrzucawkowym.

Postać nadciśnienia, które występowało przed ciążą lub rozwinęło się przed 20 tygodniem ciąży z dalszym wzrostem wartości RR i pojawieniem się lub nasileniem białkomoczu po 20 tygodniu ciąży. Nie ustępuje po porodzie.

Częstość występowania: 10 – 25% kobiet z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym [20 – 31].

1.4 Czynniki ryzyka nadciśnienia ciążowego

Nadciśnienie ciążowe występuje znacznie częściej u pierworódek lub u wieloródek, które zaszły w ciążę z nowym partnerem. Wystąpienie nadciśnienia ciążowego w pierwszej ciąży podnosi ryzyko zachorowania w każdej kolejnej ciąży szczególnie, jeśli stan przedrzucawkowy pojawił się we wczesnym etapie ciąży. Ponadto czynnikiem ryzyka dla nadciśnienia ciążowego jest zapłodnienie pozaustrojowe z wykorzystaniem donacji oocytów.

Występowanie u kobiety chorób ogólnoustrojowych, takich jak insulinooporność, cukrzyca, choroby nerek, zespół metaboliczny, otyłość, przewlekłe nadciśnienie tętnicze, kolagenozy, trombofilia podnosi ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

Do czynników ryzyka zaliczyć można również bardzo młody, jak również zaawansowany wiek matki, obciążenia rodzinne ze strony partnera, a także wystąpienie nadciśnienia ciążowego u kobiet w pierwszym stopniu pokrewieństwa.

Ciąża wielopłodowa, zaśniad groniasty, zwiększona masa łożyska są czynnikami znacznie podnoszącymi ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego [32 – 37].

1.5 Wczesne markery stanu przedrzucawkowego

1. Łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF), rozpuszczalny naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu receptor1 (sVEGFR – 1/sFlt – 1), rozpuszczalna endogлина - wykryto wzrost ich stężenia w krwi matczynej na kilka tygodni przed klinicznym rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego. Jednakże substancje te nie są specyficzne, a zmiany w ich stężeniu występują w innych patologiach jak np. zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego [38,39,40,49].
2. Micro-RNAs – jego obecność we krwi wskazuje na ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego, a jego typowanie może pomóc w klasyfikacji preeklampsji [41,42].
3. Polimorfizm nukleotydu SNPs w genie *LGALS13* kodującym łożyskowe białko PP13 powoduje wytworzenie krótszych izoform tego białka, które nie są wykrywane w testach ELISA. Obserwuje się obniżenie stężenia białka PP13 we krwi matki. Zmiana stężenia tego białka w I trymestrze może być markerem wystąpienia preeklampsji w późniejszym etapie ciąży [43,44,45].
4. Stężenie poziomu pentraxyny PTX3 gwałtownie wzrasta w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Pomiędzy 11 a 14 tygodniem ciąży wykryto wzrost stężenia tego białka u ciężarnych, u których wystąpił stan przedrzucawkowy [46].
5. HtrA3 jest proteazą serynową pojawiającą się w komórkach trofoblastu zaraz po implantacji. Intensywny wzrost stężenia tej substancji między 13 a 14 tygodniem ciąży może być wskaźnikiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego [47,48].
6. PAPP-A – wykazano, że niskie stężenie tego peptydu w I trymestrze jest predykatorem stanu przedrzucawkowego oraz możliwe, że IUGR [49,50,51].
7. Aktywina A, inhibina A – wartość predykcyjna tych substancji jest w trakcie badań [52].

1.6 Etiopatogeneza

Etiopatogeneza nadciśnienia ciążowego i stanu przedrzucawkowego, mimo licznych hipotez, nie została w pełni wyjaśniona. Istnieje wiele czynników genetycznych, immunologicznych i metabolicznych, które odpowiedzialne są za wystąpienie nadciśnienia.

Współcześnie za bardzo prawdopodobny uważa się dwuetapowy model rozwoju stanu przedrzucawkowego. Pierwszym etapem jest zmniejszenie przepływu łożyskowego, drugim uszkodzenie śródbłonka i następne zaburzenie jego funkcji. W łożyskach pacjentek chorujących na nadciśnienie ciążowe znajduje się ogniska niedokrwienia, ostrego zapalenia naczyń, złogi fibrynogenu, ścieńczenie nabłonka naczyń krwionośnych oraz jego zniszczenie.

W warunkach prawidłowych proces inwazji trofoblastu ma charakter dwuetapowy. W pierwszej fazie następuje inwazja cytotrofoblastu pozakosmkowego do doczesnych odcinków tętnic spiralnych. Ma to miejsce między 6 a 8 tygodniem ciąży. W drugiej fazie pomiędzy 14 a 16 tygodniem ciąży dochodzi do wnikania trofoblastu w mięśniowe odcinki końcowych gałęzi tętnic macicznych. Dochodzi do zastąpienia śródbłonka tętnic spiralnych przez cytotrofoblast, co przekształca je w wysokoobjętościowe, niskooporowe naczynia zapewniające prawidłowy przepływ krwi do płodu. W preeklampsji proces ten jest niekompletny. Trofoblast wnika jedynie do doczesnych odcinków tętnic spiralnych, a mięśniowe odcinki pozostają zwężone.

Proces wnikania trofoblastu bywa nazywany pseudowaskulogenezą albo mimikrą naczyniową, która jest możliwa dzięki działaniu molekuł adhezyjnych pozwalających na przyleganie cytotrofoblastu do komórek śródbłonka. W stanie przedrzucawkowym przyleganie to jest zaburzone i dlatego dystalne odcinki naczyń pozostają niezmiennione [53 – 56].

Znaleziono wiele czynników biorących udział w regulacji rozwoju krążenia łożyskowego. Do głównych należą:

- naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu VEGFR-2 oraz jego receptor VEGFR-1(Flt1), Tie-1, Tie-2 uznane za niezbędne dla prawidłowego rozwoju łożyska
- łożyskowy czynnik wzrostu PlGF i naczyniowy czynnik wzrostu VEGF – ich brak zaburza prawidłowy rozwój naczyń łożyska

- czynnik wzrostu nowotworów TGF – beta – jego stężenie obniża się w 9 tygodniu ciąży promując inwazję trofoblastu
- endoglina będąca receptorem dla TGF – beta – wzrost jej stężenia zaburza prawidłowe namnażanie się komórek trofoblastu, hamując inwazję naczyń spiralnych
- sEng może być odpowiedzialny za zahamowanie przemiany śródbłonna; masywna produkcja endoglin prowadzi do znacznego wzrostu stężenia sEng, co w efekcie prowadzi do rozwoju nadciśnienia ciążowego [57 – 60].

Początek rozwoju preeklampsji ma miejsce w nieprawidłowo zbudowanych tętnicach spiralnych, jednakże główną przyczyną tego schorzenia jest nieprawidłowo działający śródbłonek naczyń maczynych. Uogólnione uszkodzenie śródbłonna dotyczy naczyń nerek, wątroby oraz mózgu i jest najprawdopodobniej efektem uwolnienia czynników wazopresyjnych z uszkodzonego łożyska. Uwolnienie między innymi czynnika von Willebrandta, komórkowej fibronektyny, rozpuszczalnych czynników tkankowych, rozpuszczalnej E-selektyny, płytkowego czynnika wzrostu, czy endoteliny prowadzi do obkurczenia obwodowych naczyń krwionośnych, wzrostu oporu naczyniowego dla przepływającej krwi, co skutkuje wzrostem ciśnienia. Dochodzi również do zwiększenia wrażliwości śródbłonna na wazoknostryktory, jak angiotensyna II czy norepinefryna oraz do zaburzenia wazorelaksacji zależnej od endotelium [61,62].

Analiza histopatologiczna organów kobiet chorujących na stan przedrzucawkowy lub rzucawkę wykazała liczne zmiany w strukturze wynikłe z niedokrwienia tych narządów [1, 10].

W rozwoju nadciśnienia ciążowego ogromną rolę odgrywają czynniki molekularne. Nie ma jasności czy działają one niezależnie, czy synergistycznie natomiast wiadomo, że efektem ich obecności jest zniszczenie śródbłonna naczyń, systemowa odpowiedź zapalna oraz niedotlenienie [10,35,63,71].

Kluczową rolę w patogenezie preeklampsji odgrywa brak równowagi pośród czynników angiogennych. Zwiększenie ekspresji sFlt1 związane ze zmniejszeniem stężenia PlGF i VEGF prowadzi do destabilizacji komórek endotelium w obrębie nerek, wątroby i mózgu oraz do obkurczenia naczyń krwionośnych. W ostatnim czasie odkryto nowy wariant sFlt1 – 14, który ma działanie hamujące produkcję VEGF, co bezpośrednio

może prowadzić do zapalenia śródbłonna w obrębie kłębuszków nerkowych i wystąpienia białkomoczu.

PlGF jest białkiem (czynnikiem) strukturalnie podobnym do VEGF-A. Działa przez wyparcie VEGF z Flt1 receptora i pobudza angiogenezę pod wpływem niedokrwienia lub stanu zapalnego. Zaburzenia jego stężenia są ważnym czynnikiem ryzyka stanu przedrzucawkowego. W badaniach u myszy wykazano, że inhibitory PlGF wywołują preeklampsję oraz mogą powodować sFlt1 zależną dysfunkcję śródbłonna [25, 27].

sEng jest ulokowanym na powierzchni komórek receptorem dla TGFβ. Oddziałuje on na śródbłonek podobne do sFlt1, potęgując jego działanie niszczące na śródbłonek, które powoduje najcięższe powikłanie nadciśnienia – zespół HELLP. W badaniach prowadzonych na gryzoniach udowodniono, że nadmierna produkcja sEng i sFlt1 powoduje skurcz naczyń, nadciśnienie, oraz zmiany w naczyniach mózgowych, które mogą prowadzić nawet do obrzęku mózgu. Stwierdzenie wzrostu stężenia sEng we krwi ciężarnej może na tydzień wyprzedzić rozpoznanie nadciśnienia ciążowego [25,33,39,40,58,64].

Patomechanizm nadciśnienia ciążowego związany jest również z zaburzeniami równowagi w produkcji eikozanoidów takich jak prostacyklina (PGI₂) oraz tromboksan A₂(TXA₂). Prostacyklina jest produkowana z kwasu arachidowego dzięki działaniu enzymu cykloogsygenazy (COX). Prostacyklina odgrywa dużą rolę w utrzymaniu równowagi sercowo – naczyniowej poprzez działanie naczyniorozkurczowe oraz zahamowanie agregacji płytek krwi. Ponadto moduluje reakcje zapalne oraz ma działanie cytoprotekcyjne. W opozycji do prostacykliny działa powstający również z kwasu arachidowego tromboksan TXA(2), który jest bardzo silnym wazokonstryktorem oraz ma działanie silnie agregujące płytki krwi. Podczas miejscowego stanu zapalnego, jaki ma miejsce w uszkodzonym naczyniu krwionośnym znacznie silniej od COX 1 działa cykloogsygenaza COX 2. Powoduje ona zwiększone wytwarzanie tromboksanu. Wiąże się to z nasileniem skurczu naczynia, zwiększeniem oporu obwodowego oraz z następowym zwiększeniem ciśnienia krwi. Ponadto może dochodzić do mikrozakrzepów związanych z nadmierną agregacją płytek. Nadmierna agregacja płytek jest dodatkowym źródłem produkcji tromboksanu i nasila uszkodzenie śródbłonna, przez co zmniejsza się produkcja tlenku azotu (NO), co daje w efekcie coraz silniejszy skurcz naczyń i coraz większy wzrost ciśnienia obwodowego [65 – 68].

NO – tlenek azotu jest istotnym przekaźnikiem w działaniu VEGF i TGFbeta. W modelach zwierzęcych stwierdzenie zablokowania syntezy NO skutkuje wystąpieniem zespołu podobnego do ludzkiej preeklampsji objawiającym się nadciśnieniem, białkomoczem, zaburzeniem wzrastania płodu, uszkodzeniem endotelium w obrębie kłębuszków nerkowych. Tlenek azotu działa rozszerzająco na naczynia krwionośne i zmniejsza obwodowy opór naczyniowy.

Zwiększony metabolizm NO jest związany z pojawieniem się sFlt1 oraz sEng w krwioobiegu kobiety ciężarnej [69 – 72].

Niekompletny remodeling tętnic spiralnych związany z niepełną inwazją cytotrofoblastu jest znanym czynnikiem wystąpienia nadciśnienia ciążowego. Jednakże nadal pozostaje niewiadomą, czy nadciśnienie powoduje, czy jest rezultatem niedokrwienia i niedotlenienia łożyska. W modelach zwierzęcych skurcz naczyń spiralnych powodował nadciśnienie i białkomocz, jednakże nie powodował drgawek czy zespołu HELLP. Nieprawidłowości w budowie naczyń spiralnych mogą być również odpowiedzialne za zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego płodu, które bardzo często towarzyszy nadciśnieniu ciążowemu [73,74,75].

Niedotlenienie jest specyficznym czynnikiem aktywującym określone geny. Są to przede wszystkim czynniki transkrypcyjne, czynniki wzrostu, onkoproteiny i enzymy glikolityczne. Produkty białkowe tych genów są odpowiedzialne za przeciwdziałanie niekorzystnym dla guza efektom hipoksji. Do produktów tych zalicza się czynniki wzrostowe śródbłonna (w tym VEGF) stymulujące powstawanie nowych naczyń, transportery glukozy i enzymy glikolityczne umożliwiające przestawienie metabolizmu komórek na bardziej efektywny. Odkryto ostatnio cząsteczki, które ściśle powiązane są z procesami opisanymi powyżej. Nazwano je markerami niedotlenienia. Należy do nich czynnik indukowany niedotlenieniem HIF-1 α (ang. hipoxia inducible factor 1 α), anhidraza węglanowa CA9 (ang. carboanhydrase 9) oraz transporter glukozy GLUT1 (ang. glucose transporter 1) [76,77,78].

U pacjentek ze stanem przedrzucawkowym można wyizolować z łożyska czynniki indukowane niedotlenieniem HIF oraz substancje będące celem jego działania: Flt-1, VEGFR-1 i 2, Tie-1, Tie-2, VEGF, PlGF, TGF-beta3. Substancje te są odpowiedzialne za prawidłową inwazję trofoblastu, prawidłowy przepływ krwi, których produkcja jest stymulowana poprzez HIF jako reakcja obronna na niedotlenienie.

Deficyt enzymu katecholo-O-metylotransferazy (COMT) powoduje brak konwersji estradiolu do 2-metyloestradiolu (2-ME), który w warunkach prawidłowych hamuje powstawanie takich czynników, jak HIF oraz sFlt1, chroniąc łożysko przed niedotlenieniem [79,80,81].

W warunkach prawidłowej ciąży stężenie aldosteronu oraz angiotensyny wzrastają. U kobiet z nadciśnieniem ciążowym stężenia tych hormonów zmniejszają się, śródbłonek naczyń jest bardziej wrażliwy na działanie angiotensyny II oraz innych czynników wazokonstrykcyjnych, zmienia się także stosunek reniny do aldosteronu w osoczu krwi. Istnieje hipoteza, że nadwrażliwość na angiotensynę zależna jest od autoprzeciwciał, które pojawiają się u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym i łączą z receptorami dla angiotensyny II pobudzając je. Pojawienie się przeciwciał powoduje zniszczenie śródbłonna naczyń w łożysku oraz zwiększoną syntezę sFlt1. Autoprzeciwciała dla receptora angiotensyny zaburzają także inwazję cytotrofoblastu w naczynia spiralne prowadząc do powstawania zwiększonej ilości czynników antyangiogennych oraz do zniszczenia śródbłonek naczyń.

Jednostka płodowo – łożyskowa może rozwijać się prawidłowo tylko wtedy, gdy dojdzie do deficytu immunologicznego kobiety ciężarnej. Adaptacja immunologiczna pozwala również na prawidłową inwazję cytotrofoblastu w naczynia spiralne. W sytuacji, gdy układ odpornościowy nie ulega modyfikacji ryzyko wystąpienia nadciśnienia jest bardzo wysokie. Badano pacjentki z HIV, które nieleczone nigdy nie chorowały na nadciśnienie ciążowe w odróżnieniu od tych, którym podano leki przeciwwirusowe hamujące odpowiedź układu immunologicznego, co w efekcie powodowało wystąpienie nadciśnienia ciążowego [82 – 86].

Nadciśnienie ciążowe występuje częściej u wieloródek, które zmieniły partnera oraz u kobiet, które zdecydowały się na kolejne dziecko po długiej przerwie. Badania nad ryzykiem wystąpienia nadciśnienia objęły również kobiety poddane zapłodnieniu pozaustrojowemu. Badania te wykazały, że nadciśnienie częściej wystąpiło u kobiet zapłodnionych nasieniem pobranym na drodze biopsji jąder niż na drodze ejakulacji. Podane przykłady potwierdzają teorię wskazującą na nieprawidłową odpowiedź immunologiczną organizmu matki w stosunku do antygenów płodu [87 – 90].

Komórki NK, makrofagi, komórki dendrytyczne są odpowiedzialne za wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Ponadto makrofagi i komórki dendrytyczne są głównymi komórkami prezentującymi antygen w macicy i właśnie te komórki są odpowiedzialne za tolerancję układu immunologicznego matki w stosunku do rozwijającego się płodu. Nieprawidłowe przenikanie makrofagów przez śródbłoki zaburza prawidłowe wnikanie cytotrofoblastu. Badania wykazały istotnie większą liczbę makrofagów i komórek dendrytycznych oraz chemokin i substancji odpowiedzialnych za rekrutację makrofagów w łożyskach pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu z łożyskami pacjentek zdrowych. Występowanie tych komórek potwierdza nieprawidłową odpowiedź immunologiczną związaną z nieprawidłowym wnikaniem trofoblastu w naczynia spiralne. Ponadto procesowi zapalnemu towarzyszy uwalnianie fragmentów syncytiotrofoblastu, które są dodatkowym źródłem sFlt1 i sEng, powodując uszkodzenie komórek śródbłoków. Wszystkie te komórki oraz substancje odgrywają istotną rolę w remodelingu naczyń i są ważnymi czynnikami ryzyka nadciśnienia.

Badania polimorfizmów KIRs (killer immunoglobulin receptors) na komórkach NK oraz haplotypów HLA – C (fetal human leukocyte antygen) sugerują, że pacjentki z genotypem KIR – AA oraz genotypem HLA – C2 są w grupie znacznie podwyższonego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego [91 – 95].

W etiopatogenezie preeklamsji wspomina się również stres oksydacyjny. W badaniach wykazano, że łożyska ciężarnych z nadciśnieniem wykazują zmniejszoną ekspresję antyoksydacyjnego genu *hemeoxygenase 1*, który odpowiada za regulację produkcji sFlt1 i sEng. Stwierdzono także, że podawanie antyoksydacyjnego leukogenu może zmniejszać ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego [96,97].

Czynniki genetyczne pełnią także istotną rolę w powstawaniu nadciśnienia. Występowało ono częściej u par w pierwszym stopniu pokrewieństwa, oraz u mężczyzn, których partnerki już raz przeszły ciążę powikłaną nadciśnieniem. U mężczyzn znaleziono czynnik transkrypcyjny STOX1, który może być odpowiedzialny za wywołanie zmian warunkujących nadciśnienie u ciężarnej [84, 93].

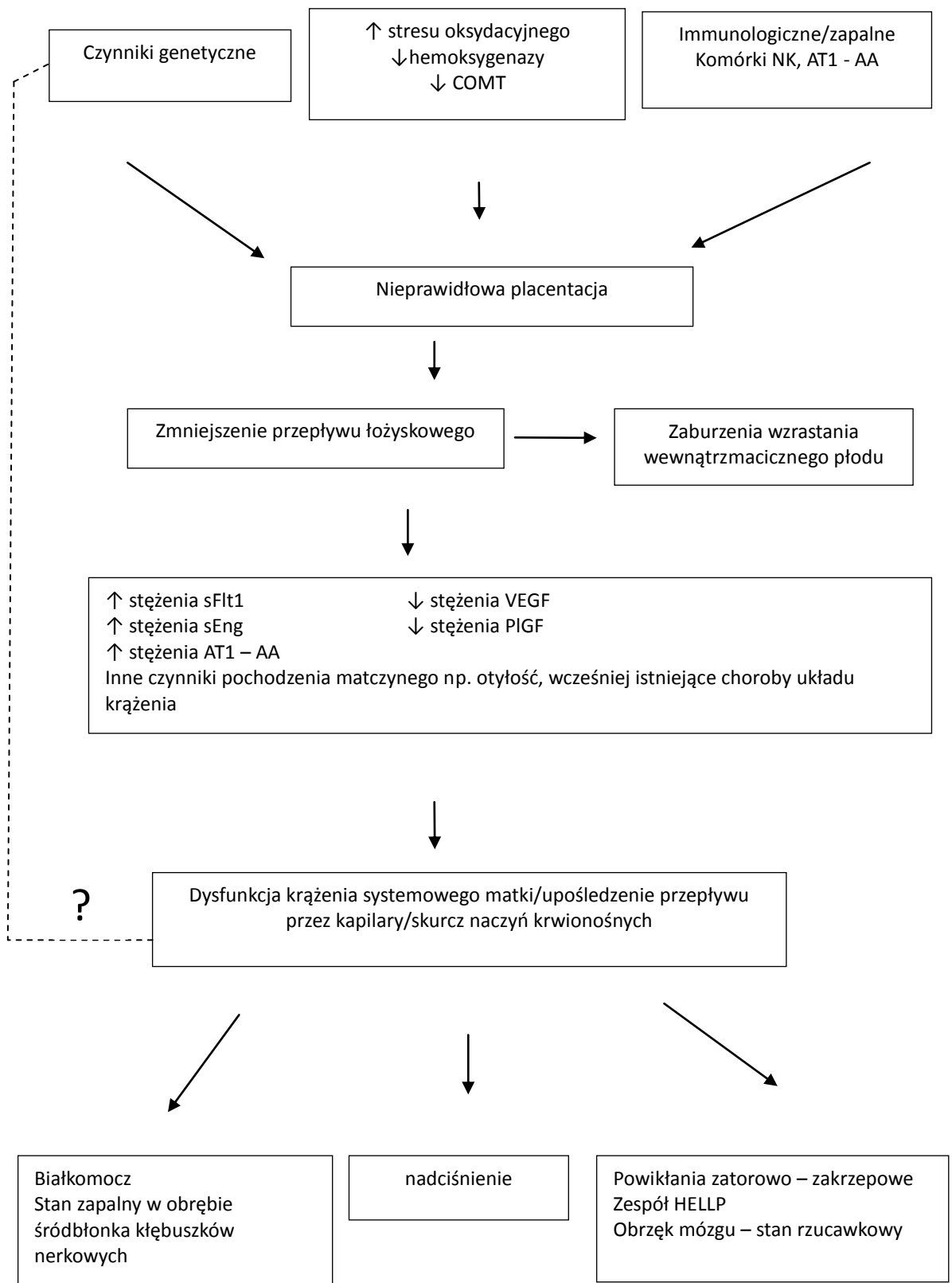
Wszystkie wymienione czynniki biorą udział w powstawaniu nadciśnienia ciążowego jednakże ich dokładne działanie nie jest do końca poznane. Podkreśla się rolę dwóch głównych substancji sFlt1 oraz sEng w etiopatogenezie nadciśnienia. Sugeruje się, że do czynników powodujących wzrost sFlt – należy ciąża mnoga, zaśnład groniasty,

trisomia 13 i pierwsza ciąża. Poza wzrostem stężenia sFlt1 istotne jest uwrażliwienie maczynego śródbłonna na ten czynnik. Wzrost uwrażliwienia mogą powodować takie czynniki jak otyłość, wcześniej istniejące nadciśnienie, choroby nerek, cukrzyca oraz wcześniej istniejące choroby naczyń krwionośnych. U takich kobiet mogą zdarzać się niewielkie zwyżki ciśnienia przed klinicznym rozpoznaniem nadciśnienia ciążowego. Może to sugerować wcześniejsze uszkodzenie śródbłonek i zmniejszenie produkcji czynników wazodylatacyjnych oraz dużą wrażliwość na krążące białka antyangiogenne. Dysproporcja pomiędzy czynnikami kurczącymi oraz rozszerzającymi naczynia krwionośne prowadzi do niedokrwienia tkanki łożyska, co z kolei jest czynnikiem wyzwalającym produkcję sFlt1.

Podsumowując, główną rolę w powstawaniu nadciśnienia ciążowego odgrywa brak równowagi pomiędzy czynnikami angiogennymi oraz antyangiogennymi, co pozostaje w zależności od nadmiernej produkcji sFlt1 i PlGF przez łożysko, zwiększonej wrażliwości śródbłonna naczyniowego dla sFlt1 i PlGF oraz niedotlenienie tkanek łożyska, jako wynik braku równowagi między wymienionymi czynnikami [98 – 102].

Rycina poniżej przedstawia podsumowanie czynników biorących udział w patogenezie nadciśnienia ciążowego. Czynniki genetyczne, zaburzenia w odpowiedzi immunologicznej organizmu, stres oksydacyjny mogą prowadzić do zaburzeń przepływu łożyskowego, który w następstwie prowadzi do uwolnienia czynników antyangiogennych (sFlt1, sEng) oraz czynników prozapalnych. Wszystkie uwolnione substancje są bezpośrednio odpowiedzialne za wystąpienie nadciśnienia ciążowego, białkomoczu oraz innych powikłań związanych ze stanem przedrzucawkowym oraz rzucawką. (Rycinę podano za B. C. Young, Pathogenesis of Preeclampsia, 2010).

Rycina 1. Czynniki biorące udział w etiologii nadciśnienia ciążowego



1.7 Kryteria rozpoznania oraz objawy nadciśnienia ciążowego.

Kryteria rozpoznania łagodnego stanu przedrzucawkowego:

- Wartości RR przekraczają 140/90 mmHg w dwóch niezależnych pomiarach
- Dobowa utrata białka przekracza 0,5 g/dobę (0,3 g/dobę)

Kryteria rozpoznania ciężkiego stanu przedrzucawkowego:

- Ciśnienie skurczowe przekracza 160mmHg a rozkurczowe 110 mmHg
- Białkomocz dobowy przekracza 5 g/dobę (3g/dobę); 2+ lub 3 + w teście paskowym
- Wzrost stężenia kreatyniny w surowicy krwi > 1,2 mg/dl
- Liczba płytek <100 tys/mm³ i(lub) objawy mikroangiopatycznej niedokrwistości hemolitycznej (ze wzrostem LDH w surowicy krwi)
- Stężenie kwasu moczowego >3,6 mg/dl
- Aktywność reninowa osocza < 4ng/ml/godzinę
- Zwiększona aktywność enzymów wątrobowych w surowicy (Alat, Aspat)
- Utrzymujący się ból głowy lub inne zaburzenia mózgowo lub wzrokowe
- Utrzymujący się ból w nadbrzuszu, nudności, wymioty

Kryteria rozpoznania zespołu HELLP:

- Nadciśnienie tętnicze, RR rozkurczowe >110 mmHg
- Ból w nadbrzuszu lub prawym podżebrzu
- Nudności, wymioty
- Objawy niespecyficznego infekcji wirusowej z ogólnie złym samopoczuciem
- Ból głowy
- Krwinkomocz
- Krwawienie z przewodu pokarmowego
- Wybroczyny i petechie
- Liczba płytek <100tys/mm³
- Hemoliza: nieprawidłowy rozmaz krwi obwodowej – rozfragmentowane erytrocyty, sferocytoza
- Stężenie bilirubiny > 1,2 mg% i/lub LDH > 600j./l
- Podwyższona aktywność enzymów wątrobowych: ASPAT > 70j./l [103,104,105].

1.8 Powikłania nadciśnienia ciążowego.

Powikłania nadciśnienia ciążowego można podzielić na matczyne i płodowe

Najczęstsze powikłania występujące u matki to: niewydolność nerek, niewydolność krążenia, zastoinowa niewydolność serca, rozsiane wykrzepianie wewnątrzmaczyniowe, przedwczesne oddzielenie łożyska, encefalopatia nadciśnieniowa, krwawienie do ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki.

Do powikłań, które najczęściej występują u płodu zaliczamy: wcześniactwo i jego konsekwencje, zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego, niedotlenienie wewnątrzmaciczne, małowodzie, następstwa przedwczesnego oddzielenia się łożyska, zgon wewnątrzmaciczny.

Osobnym zagadnieniem są powikłania w następstwie wystąpienia zespołu HELLP. Można je podzielić na matczyne i płodowe.

Powikłania zespołu HELLP u matki to: napad rzucawkowy, zgon (ok. 1%), rozsiane wykrzepianie wewnątrzmaczyniowe, przedwczesne oddzielenie łożyska, obrzęk płuc, niewydolność oddechowa (ARDS), niewydolność nerek, niewydolność wątroby, pęknięcie wątroby, powstanie krwiaka podtorebkowego, obrzęk mózgu, odwarstwienie siatkówki, wstrząs z niewydolnością wielonarządową.

U płodu najczęstszym powikłaniem zespołu HELLP jest zgon okołoporodowy, który występuje w 10 – 60% w zależności od szybkości wykrycia zespołu i szybkości rozwiązania ciąży. U noworodka może wystąpić zespół zaburzeń oddychania oraz wcześniactwo z zespołem powikłań typowych dla wcześniactwa [106 - 111].

Zahamowanie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu

1.9 Wstęp

Hipotrofia (hipoplazja) wewnątrzmaciczna, IUGR (ang.: *Intrauterine Growth Restriction* - wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu) występuje, gdy masa urodzeniowa noworodka jest poniżej lub na poziomie 10 percentyla, odpowiedniego do wieku ciążowego lub więcej niż dwa odchylenia standardowe poniżej średniej dla danego wieku ciążowego. Określenie to odnosi się do płodu, który nie zdołał wykorzystać swojego potencjału wzrastania.

W latach 60-tych opublikowano krzywe wzrostu w postaci percentyli i obecnie ten sposób przedstawiania wartości referencyjnych do oceny wzrastania jest już powszechnie przyjęty. Siatki percentylowe, zawierające wartości referencyjne powinny być opracowane dla konkretnej populacji [112,113,114].

Dookoła definicji IUGR narosło wiele kontrowersji i niejasności. W chwili obecnej zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego nie jest jedynym określeniem definiującym urodzenie noworodka o nieprawidłowej masie ciała. Określenie *niska masa urodzeniowa* (LBW – low birth weight) odnosi się do noworodków o masie poniżej 2 500 g, niezależnie od wieku ciążowego, analogicznie, wprowadzona później *bardzo niska masa urodzeniowa* (VLBW – very low birth weight) dotyczy masy poniżej 1 500 g, a skrajnie niska masa urodzeniowa (ELBW – extremely low birth weight) poniżej 1 000 g [113,115,116].

Płody i noworodki określane jako małe w stosunku do wieku ciążowego (SGA – *small for gestational age*) wykazują niedobór masy ciała w stosunku do spodziewanej dla danego wieku ciążowego, określonej dla konkretnej populacji, co może być dowodem wewnątrzmacicznego opóźnienia wzrastania płodu. Definicja LBW jednakże nie oddaje w pełni rangi problemu, jako że nie dotyczy m.in. noworodków o masie powyżej 2 500 g dotkniętych IUGR. Kierując się kryterium masy urodzeniowej noworodki można podzielić też na odpowiednie do wieku ciążowego (AGA – *appropriate for gestational age*), małe w stosunku do wieku ciążowego (SGA – *small for gestational age*) i duże w stosunku do wieku ciążowego (LGA – *large for gestational age*). Najczęściej przyjmuje się, że noworodki SGA mają masę ciała poniżej 10 percentyla w stosunku do danego

wieku ciążowego. Niektórzy badacze, jako warunek zakwalifikowania do SGA przyjmują masę niższą od 3 lub 5 percentyla, a inni 2 odchylenia standardowe poniżej średniej masy urodzeniowej w danej populacji. Przyjęcie tak zaostrzonych kryteriów, choć uzasadnione statystycznie, wydaje się wykazywać mniejszą przydatność kliniczną, gdyż może doprowadzić do przeoczenia sytuacji, w której szacunkowa masa płodu, pomimo ciężkiej hipotrofii mieści się powyżej 5 percentyla, ze względu na znaczny, genetycznie zaprogramowany potencjał wzrostu [117,118, 119].

Istnieje jeszcze jedno określenie bezpośrednio związane z nieprawidłowościami wzrastania wewnątrzmacicznego - niedożywienie płodu (FM – *fetal malnutrition*), które nie jest równoznaczne z SGA. Rozpoznanie to może zostać postawione niezależnie od jego masy. Niedożywienie płodu wiąże się z niedoborem masy ciała, lub niezdolnością do osiągnięcia prawidłowej ilości podskórnej tkanki tłuszczowej i mięśniowej, kiedy masa, długość ciała i obwód główki mogą mieścić się w normie. Problemy perinatologiczne i późniejsze następstwa neurologiczne pojawiają się przede wszystkim u niedożywionych płodów, zarówno w grupie AGA, jak i SGA, czego nie stwierdza się u płodów z SGA bez cech niedożywienia.

Obecnie większość badaczy zgadza się, że SGA stanowi marker dla IUGR i często stosuje się te pojęcia zamiennie, chociaż nie są one do końca identyczne. Terminem IUGR powinno określać się patologiczny proces prowadzący do ograniczenia wzrostu płodu, podczas gdy SGA odnosi się do grupy noworodków o masie urodzeniowej poniżej 10 percentyla. Noworodek urodzony jako SGA nie musi mieć cech hipotrofii, a z kolei noworodek urodzony jako AGA może nosić cechy zahamowania wzrastania wewnątrzmacicznego, mimo że jego waga nie spadła poniżej 10 percentyla, ale w pomiarach ultrasonograficznych wykryto zaburzenia dynamiki wzrastania płodu [120,121].

Obecnie jedynie ocena ultrasonograficzna pozwala na właściwe oszacowanie wzrastania płodu. Dla rozpoznania IUGR trzeba wykonać co najmniej 2-krotnie pomiary w określonym odstępie czasu, ponieważ IUGR jest procesem dynamicznym i pojedyncze badanie nie pozwala na rozróżnienie wymiarów i wzrastania. Diagnoza powinna być stawiana na podstawie zmiany parametrów wzrastania płodu, a nie masy urodzeniowej czy innych pomiarów dotyczących płodu lub noworodka [122 – 125].

Obecnie najczęściej stosuje się klasyfikację wewnątrzmacicznego opóźnionego wzrastania płodu opartą na stwierdzeniu Winnicka, że w rozwoju komórkowym organów płodu i łożyska wyróżnia się trzy fazy: zwiększenie się liczby komórek, wzrost ich wielkości oraz występowanie równocześnie obu tych faz. Wystąpienie określonego typu IUGR zależy od momentu zadziałania czynnika patologicznego.

Typ I – symetryczny, występuje w ok. 20 – 25% wszystkich przypadków hipotrofii. Płody mają proporcjonalnie mniejsze wartości AC, HC i wymiary kości długich oraz zmniejszoną masę organów wewnętrznych. Charakteryzuje się wczesnym początkiem związanym z zadziałaniem czynnika teratogennego na płód w okresie organogenezy. Tego typu IUGR związany jest najczęściej z nieprawidłowościami genetycznymi płodu lub infekcjami wewnątrzmacicznymi matki.

Typ II – asymetryczny, występuje w ok. 70 – 80% wszystkich przypadków hipotrofii. Klinicznie stwierdza się zmniejszoną masę ciała płodu przy dysproporcji w pomiarach płodu, gdzie AC jest bardziej obniżony niż HC. Ten typ IUGR jest najczęściej spowodowany zaburzeniami w krążeniu maciczno – łożyskowym [113, 116, 118, 121, 125].

1.10 Rozpoznanie

Rozpoznanie IUGR opiera się na badaniach USG wykonywanych w kolejnych tygodniach ciąży.

Najważniejsze jest określenie prawidłowego wieku ciążowego. Tylko 80 % ciężarnych pamięta dokładną datę ostatniej miesiączki według której określa się czas trwania ciąży. Dlatego też bardzo ważne jest pierwsze badanie ultrasonograficzne, kiedy pomiędzy 11 a 14 tygodniem ciąży błąd metody wynosi 4 – 7 dni, co oznacza, że z bardzo dużym prawdopodobieństwem można określić tydzień ciąży. Taki pomiar jest też punktem odniesienia dla późniejszych badań, kiedy podejrzewamy zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego płodu. Badania w II i III trymestrze ciąży umożliwiają ocenę tempa wzrastania płodu. Dokonując seryjnych pomiarów wymiaru dwuciemiowego (BPD), obwodu głowy (HC), obwodu brzucha (AC) i długości kości udowej (FL) można podejrzewać hipotrofię płodu. W celu potwierdzenia rozpoznania powinno wykonać się przynajmniej dwa pomiary ultrasonograficzne w odstępie 2 – 3 tygodni.

Wykonując pomiar BPD należy pamiętać o prawidłowym uwidocznieniu główki płodu; pomiar wykonuje się na wysokości wzgórz i po uwidocznieniu sierpa mózgu.

W celu prawidłowego ustalenia wymiarów brzucha płodu należy uwidocznić jego poprzeczny przekrój, w którym widoczny jest zarys żyły pępkowej oraz żołądek. Przy podejrzeniu zaburzeń wzrastania, kiedy płody rodzą się szczupłe ten parametr jest najbardziej użyteczny w prognozowaniu masy płodu. Uważa się, że wykonanie pomiaru jedynie AC jest najbardziej skutecznym parametrem w rozpoznaniu IUGR. Wysoką skuteczność łączy się z łatwością z jaką można ocenić obwód brzuszka płodu hipotroficznego w porównaniu z płodem makrosomicznym. Ponadto zaletą tego pomiaru jest najwyższa wiarygodność oraz powtarzalność w III trymestrze ciąży. Niektórzy klinicyści rozpoznają IUGR w przypadku, gdy wartość obwodu brzucha różni się o 3 lub więcej tygodni w stosunku do wartości oczekiwanej.

Stwierdzono, że wzajemny stosunek mierzonych parametrów HC, AC, FL może mieć znaczenie w stwierdzeniu i monitorowaniu IUGR. W hipotrofii symetrycznej stosunek HC/AC poniżej 32 tygodnia ciąży jest większy od 1, w przedziale 32 – 34 tygodniem ciąży jest równy 1, a powyżej 34 tygodnia ciąży jest mniejszy niż 1. W hipotrofii asymetrycznej stosunek HC/AC jest zawsze większy niż 1. Z kolei wzajemny stosunek

FL/AC jest stały niezależnie od tygodnia ciąży i podwyższony w hipotrofii. Dlatego część autorów uważa, że najlepsza do oceny wieku ciążowego w późniejszych etapach ciąży jest ocena ultrasonograficzna kości udowej. Błąd pomiaru masy płodu, uwzględniając wszystkie elementy zmieniające precyzyjność pomiarów, wynosi 4 – 15%. W chwili obecnej czułość ultrasonograficznej oceny masy wynosi ok. 89% i jest jedną z najważniejszych biofizycznych metod oceny stanu płodu i jego rozwoju [126 - 131].

1.11 Etiopatogeneza

W etiologii IUGR wyróżnia się przyczyny wewnętrzne – płodowe i zewnętrzne – matczyne i łożyskowe; jednakże w 40% nie udaje się znaleźć jednoznacznej przyczyny. W tabeli poniżej wymieniono czynniki ryzyka oraz przyczyny występowania IUGR w zależności od pochodzenia.

Tabela 1. Czynniki ryzyka wystąpienia IUGR.

matczyne	płodowe	łożyskowe
<ul style="list-style-type: none"> - niski wzrost (szczególnie <146 cm) - nikotynizm, alkoholizm, narkomania - niski status społeczno-ekonomiczny - rasa czarna - pierwsza ciąża - dotychczasowa ilość ciąż ≥ 4 - zbyt częste (<2 lat) lub zbyt rzadkie (>6 lat) porody - choroby układu krążenia (nadciśnienie tętnicze w ciąży, stan przedzucawkowy, siniczne wady serca, koarktacja aorty) - zespół antyfosfolipidowy i wrodzone trombofilie - choroby nerek - zaawansowana cukrzyca - niedożywienie, zespół złego wchłaniania, awitaminozy - wcześniejsze urodzenie dziecka z niską urodzeniową masą ciała - przewlekłe choroby układu oddechowego (gruźlica, sarkoidoza, astma oskrzelowa) - wady macicy (macica dwurożna, przegrody macicy) - przeszkody we wzroście macicy - zatrucia w trakcie ciąży - niedokrwistość - toczeń rumieniowaty układowy - choroby pasożytnicze - przebywanie na dużych wysokościach - złe przystosowanie układu krążenia do ciąży (mała frakcja wyrzutowa, nieprawidłowa adaptacja naczyń macicy) 	<ul style="list-style-type: none"> - płeć żeńska - ciąża mnoga - wady wrodzone (np. serca, układu nerwowego) - wrodzona niedokrwistość (zespół Fanconiego) - wady chromosomowe (np. zespół Turnera, trisomie, triploidie, delecje) - choroby genetyczne z pierwotnym uszkodzeniem procesu wzrastania - choroby genetyczne układu kostnego lub tkanki łącznej - zakażenia wewnątrzmaciczne (np. wirus różyczki, wirus cytomegalii) - ekspozycja na promieniowanie rentgenowskie (zwłaszcza dla dawki >10 rad) 	<ul style="list-style-type: none"> - niewydolność łożyska - łożysko przodujące - przedwczesne oddzielenie łożyska - pojedyncza tętnica pępowinowa - nieprawidłowy przebieg naczyń pępowinowych - rozległe zawały łożyska - nieprawidłowy przyczep pępowiny - anastomozy naczyniowe - duże guzy łożyska (np. hamartoma)

Do najważniejszych czynników ryzyka pochodzenia matczynego zalicza się przede wszystkim palenie papierosów, następnie zbyt mały wzrost masy ciała ciężarnej i małą masę ciała matki przed ciążą. Wymienione czynniki są odpowiedzialne za 2/3 wszystkich przypadków IUGR.

Wykazano, że istnieje niemal liniowa zależność między zwiększeniem masy ciała matki w okresie ciąży, a masą urodzeniową noworodka. Przyrost masy ciała poniżej 3 kg do 20 tygodnia ciąży lub mniejszy niż 1 kg na miesiąc może być czynnikiem ryzyka wystąpienia hipotrofii [132 – 136].

Nikotyna przenikająca przez łożysko powoduje uwolnienie adrenaliny, noradrenaliny, acetylocholinoz zwojów układu wegetatywnego i rdzenia nadnerczy, co w efekcie prowadzi do skurczu naczyń krwionośnych i zmniejszenia przepływu krwi w przestrzeni międzykosmkowej o 20%. Ponadto podnosi we krwi stężenie cyjanków i tiocyjanków, które blokują enzymy cyklu oddechowego oraz unieczynnijają anhidrazę węglanową, upośledzając zdolność erytrocytów do przenoszenia tlenu. Efektem tego jest przewlekłe niedotlenienie płodu [137,138].

Nadciśnienie tętnicze/stan przedrzucawkowy współistnieje z IUGR w 25 – 30% przypadków. Nadciśnienie i proteinuria (każde z osobna) powoduje 2-krotny wzrost ryzyka, natomiast ich współistnienie aż 5 – 8-krotny wzrost ryzyka wystąpienia hipotrofii. Oba schorzenia mogą prowadzić do angiopatii doczesnowej upośledzając przepływ maciczno – łożyskowy. W łożyskach pacjentek, które urodziły dzieci z IUGR stwierdza się większą liczbę pączków zespólni i grubszą błonę podstawną w kosmkach końcowych. Tworzenie się pączków zespólni jest jednym z mechanizmów usuwania starzejących się komórek syncytiotrofoblastu, zatem ich obecność świadczy o przedwcześnie starzejącym się łożysku. Pogrubienie błony podstawnej w kosmkach końcowych wiąże się z odkładaniem w macierzy kolagenu IV i lamininy, co wiąże się ze zmianą podatności ścian naczyń krwionośnych. Zmiany w budowie ścian naczyniowych mają swoje odbicie w badaniach dopplerowskich, kiedy stwierdza się zaburzenia w przepływie w tętnicy pępowinowej (*absent flow* lub *reverse flow*) [139 – 142].

Zespół antyfosfolipidowy, który cechuje obecność antykoagulantu tocznia lub wysokie stężenie przeciwciał antykardiolipinowych IgG we krwi matki jest obarczony 21% ryzykiem wystąpienia IUGR u płodu. Zmiany w łożysku, które zaburzają prawidłowe wzrastanie płodu to przede wszystkim zakrzepy międzykosmkowe i zakrzepy w tętnicach spiralnych. Dodatkowo w badaniach histopatologicznych tych łożysk znajduje się zwiększoną liczbę pączków zespólni i arteriopatię zaporową.

Za powstawanie wymienionych zmian odpowiedzialne są poniższe mechanizmy:

1. Zahamowanie wytwarzania endogennych antykoagulantów – trombomoduliny, antytrombiny, aktywowanych białek C i S oraz beta-2-glikoproteiny-1.
2. Indukowanie prokoagulantów komórek śródbłonna (czynnika tkankowego, inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1, czynnika von Willebrandta).
3. Pobudzenie agregacji płytek, co powoduje wzrost aktywności tromboksanu płytkowego i spadek aktywności prostacykliny śródbłonkowej.
4. Przemieszczenie białka przeciwkrzepliwego, aneksyny V z powierzchni syncytiotrofoblastu [143 – 146].

Cukrzyca najczęściej powoduje hipotrofię typu symetrycznego. Występowanie IUGR jest następstwem zaburzeń w metabolizmie glukozy, insuliny i laktogenu łożyskowego, które z kolei prowadzą do zmian naczyniowych podobnych do tych, jakie występują w toczniu układowym. Stężenie glukozy we krwi matki przekraczające 150mg/ml lub będące poniżej 100mg/ml prowadzą do zaburzeń wzrastania u płodu

Choroby układu pokarmowego związane z zaburzeniami wchłaniania wiążą się ze znacznym ryzykiem wystąpienia IUGR u płodu. Należy tu wymienić przewlekłe zapalenie trzustki, zespoły złego wchłaniania, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, chorobę Leśniowskiego – Crohna, niektóre choroby pasożytnicze.

Choroby nerek u matki, a zwłaszcza przewlekłe *pyelonephritis*, *glomerulosclerosis* i *lupus glomerulonephritis* prowadzą do upośledzenia wzrastania płodu w przypadku 25% ciąż.

Przewlekłe choroby płuc i serca, które powodują hipoksemię u matki, w konsekwencji prowadzą do nieprawidłowego utlenowania płodu. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku gruźlicy, sarkoidozy, astmy oskrzelowej oraz sinicznych wad serca i koarktacji aorty.

Ciężka niedokrwistość, kiedy wartości hemoglobiny wahają się poniżej 6g/dl oraz hemoglobinopatie prowadzą do przewlekłego niedotlenienia u matki i płodu zaburzając jego prawidłowy rozwój [147 – 151].

Wady macicy takie jak macica dwurożna lub występowanie przegrody są odpowiedzialne za 1 – 3 % przypadków IUGR. Rola mięśniaków jako jednego z czynników zaburzających wzrastanie płodu nie została jednoznacznie potwierdzona.

Czynniki ryzyka IUGR pochodzenia płodowego to przede wszystkim wady wrodzone, aberracje chromosomalne i choroby jednogenowe.

Do aberracji chromosomowych, którym najczęściej towarzyszy zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego należą: trisomia 18 (w 87% występuje IUGR), trisomia 13 (w 50%), trisomia 21 (w 29%). Zaburzenia jednogenowe prowadzą do zaburzeń wzrostu, które częściej występują po porodzie niż prenatalnie [152,153].

Najczęściej występujące wady związane z mutacją jednogenową prowadzące do hipotrofii płodu wymieniono w tabeli poniżej [152].

Tabela 2. Najczęściej występujące wady związane z mutacją jednogenową prowadzące do hipotrofii płodu.

Zaburzenie genowe	Charakterystyka
Achodroplazja	Karłowatość ze skróceniem kończyn
Różne dysplazje kostne <i>Osteogenesis imperfecta</i>	Skrócenie, złamania kości długich
Zaburzenia ekspresji genów receptora insuliny i naskórkowego czynnika wzrostu	Leprechaunizm (krasoludkowatość)
Zespół Meier – Gorfina	Zespół ucho – rzepka – niski wzrost
Zespół Silver – Russella	Niskorosłość, wady OUN, serca, nerek
Zespół Meckela – Grubera	Wady kończyn, OUN, nerek
Zespół Fanconiego	Niedokrwistość aplastyczna, malformacja kośćca

Wrodzone wady anatomiczne jak wytrzewienie, przepuklina pępkowa, wady serca mogą powodować zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego u płodów, które nie mają zaburzeń chromosomalnych czy jednogenowych.

Zakażenia przezłożyskowe są przyczyną 10% przypadków IUGR. Największe znaczenie mają: różyczka (u 60% zakażonych noworodków występuje IUGR) i cytomegalia (u 35% zakażonych noworodków występuje IUGR) a następnie opryszczka, ospa wietrzna, WZW typu B, toksoplazmoza, malaria, gruźlica, listerioza, kiła wrodzona. Typ zaburzeń wzrastania jest zależny od momentu zadziałania czynnika zakaźnego – jeśli zadziałała w I trymestrze mamy typ symetryczny, jeśli później typ asymetryczny. Zakażeniu w I trymestrze oprócz zaburzeń wzrastania często towarzyszą wady centralnego układu nerwowego.

Ekspozycja na promienie X w I trymestrze ciąży zwiększa ryzyko wystąpienia hipotrofii u płodu, co związane jest z wpływem promieniowania na dzielące się komórki. W wyniku promieniowania może dojść do pęknięć chromosomów, zaburzenia replikacji komórek, indukcji wad anatomicznych - przede wszystkim OUN. Ryzyko zmian w strukturze komórek jest szczególnie wysokie, kiedy dawka promieniowania przekroczy 10 radów [154 - 157].

Łożyskowe czynniki ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu obejmują nieprawidłową jego lokalizację oraz ograniczony mozaicyzm łożyska.

Nieprawidłowe zagnieżdżanie się łożyska związane jest z nieprawidłową inwazją trofoblastu w naczynia spiralne. Nie dochodzi do fizjologicznego zmniejszenia oporu naczyniowego, co prowadzi do upośledzenia przepływu maciczno-łożyskowego powodując nieprawidłowe utlenowanie płodu. Przyczyną nieprawidłowej inwazji łożyska mogą być mięśniaki macicy zlokalizowane podśluzówkowo, zrosty lub przegrody w jamie macicy.

Występowanie łożyska przodującego, szczególnie przodującego całkowicie związane jest z częstszym występowaniem IUGR. Przyczep błoniasty pępowiny stwierdzany jest w około 12% przypadków IUGR, przy częstości występowania w populacji równej 1%.

Naczynia przodujące, pojedyncza tętnica pępowinowa często współistnieje z wadami u płodu oraz z IUGR [158,159,160].

Przedwczesne oddzielenie się łożyska, jak również występowanie dużych guzów łożyska typu *haemangioma* i *hamartoma* jest związane z większą częstością występowania zaburzeń wzrastania wewnątrzmacicznego [161,162].

Ograniczony mozaicyzm łożyska rozpoznawany jest przy prawidłowym kariotypie płodu. Najczęściej występuje mozaicyzm w odniesieniu do chromosomu 16. Rozpoznanie tego typu zaburzenia jest możliwe jedynie po wykonaniu biopsji łożyska i najczęściej pozostaje pominięte w ustalaniu etiologii zaburzeń hipotrofii płodu [163].

1.12 Powikłania

Noworodki dotknięte wewnątrzmacicznym zaburzeniem wzrastania charakteryzują się 6 – 8 – krotnie większą umieralnością okołoporodową. Najpoważniejsze powikłania dotyczą IUGR wywołanego przez zakażenia wewnątrzmaciczne, wady wrodzone i zaburzenia genetyczne [164,165].

Hipotrofia występująca u płodu zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego, operacyjnego oraz niedotlenienia okołoporodowego wraz z jego konsekwencjami (przetrwałe krążenie płodowe, encefalopatia, kardiomiopatia). Noworodki z IUGR rodzą się częściej z zaburzeniami elektrolitowymi, kwasicą i niską punktacją w skali Apgar. Wzrasta także prawdopodobieństwo wystąpienia zespołu aspiracji smółki. W okresie okołoporodowym częściej występują również zaburzenia krzepnięcia krwi indukowane niedotlenieniem, prowadzące do nadciśnienia płucnego, zawałów mózgu i martwiczego zapalenia jelit. Rozpad dużych ilości krwinek wywołuje hiperbilirubinemię, obniżenie liczby płytek krwi prowadzi do zaburzeń krzepnięcia, a zmniejszona zdolność fagocytarna leukocytów prowadzi do osłabienia mechanizmów obronnych noworodka [166 – 169].

W okresie noworodkowym pojawiają się częściej problemy z wiązane z wystąpieniem kwasicy, hipoksemii, hipoksji, hipoglikemii, hipokalcemii i hiponatremii.

Dalszy przebieg choroby jest różnorodny, najczęściej (85%) następuje normalizacja wzrostu przed osiągnięciem przez dziecko 4. roku życia. U pozostałych 15% pacjentów w późniejszym okresie zmiany rzadko ustępują.

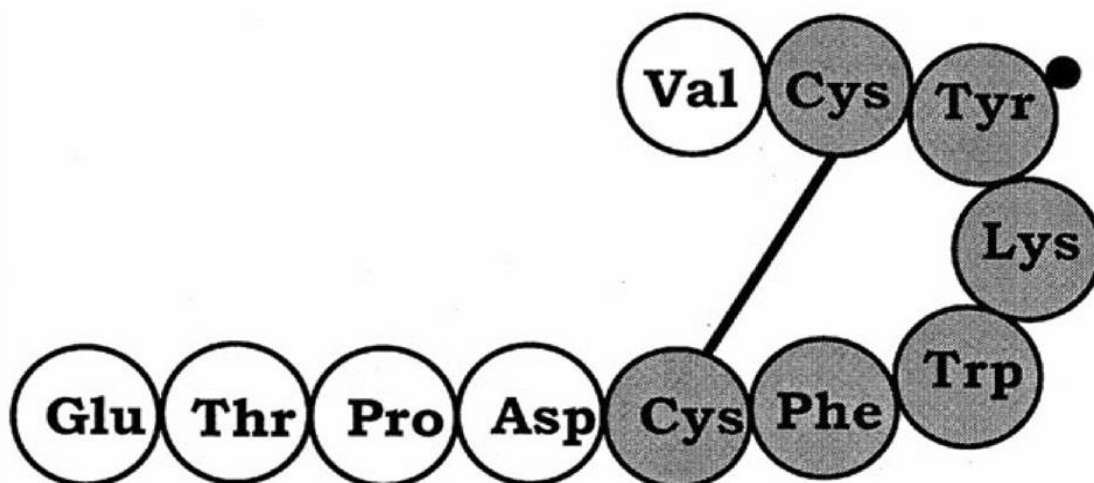
Hipotrofia wewnątrzmaciczna może być przyczyną niskorosłości oraz zwiększonego ryzyka wystąpienia w wieku dorosłym m. in. choroby wieńcowej, nadciśnienia tętniczego, insulinooporności, cukrzycy typu 2, zahamowania rozwoju fizycznego i opóźnienia rozwoju umysłowego [170 - 173].

Urotensyna

1.13 Wstęp

Urotensyna II (U-II) po raz pierwszy została wyizolowana w 1967 z rdzenia kręgowego ryb kostnoszkieletowych [176]. W kolejnych badaniach jej obecność potwierdzono także u ssaków, w tym u człowieka. Urotensyna II jest cyklicznym polipeptydem zbudowanym z 11 aminokwasów. Powstaje z prekursorowego peptydu: prepro – urotensyny II, który zostaje poddany działaniu proteolitycznego enzymu konwertującego urotensynę.

Rycina 2. Budowa ludzkiej urotensyny II



Aktywność biologiczną wykazuje C – końcowy fragment, złożony z 6 aminokwasów ułożonych cyklicznie, których sekwencja jest wspólna dla ssaków, fragment N – końcowy wykazuje specyficzność gatunkową [174 – 177].

Urotensyna II jest wytwarzana przez komórki śródbłonka naczyniowego naczyń krwionośnych, mięśnia sercowego, nerek, ośrodkowego układu nerwowego, przysadki mózgowej, nadnerczy, tarczycy, grasicy, jelit, śledziony oraz łożyska. Jej obecność wykryto także w blaszkach miażdżycowych, w leukocytach i makrofagach [178 – 181].

1.14 Receptor dla U-II

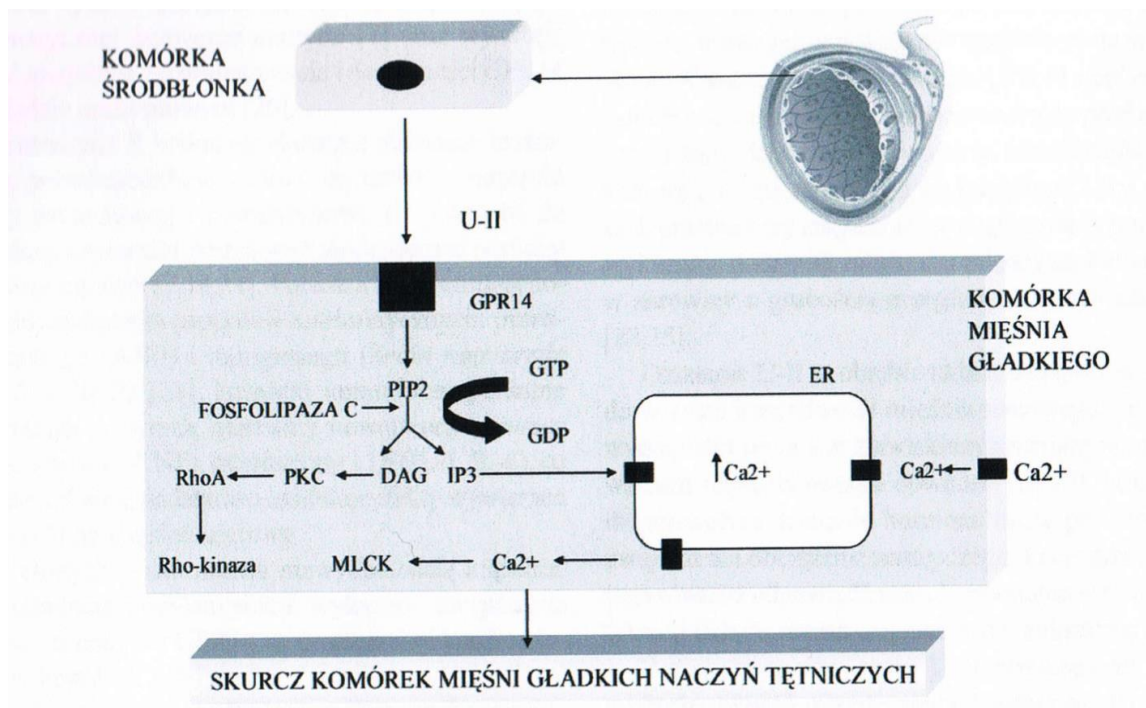
Urotensyna II działa przez swoisty receptor UTS2R (inne oznaczenia: GPR14, UR-2-R, UTR, UTR2), który w komórce działa poprzez pośrednika jakim jest białko G. Receptor UTS2R zbudowany jest z 389 aminokwasów tworzących 7 domen przezbłonowych, kodowanych przez gen zlokalizowany na chromosomie 17. Receptor zlokalizowany jest w kardiomiocytach, w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, w komórkach mięśni szkieletowych, mózgu, kory nerek, nadnerczy, przysadki mózgowej, grasicy, śledziony, jelita cienkiego oraz w łożysku. Receptor UTS2R znaleziono także w leukocytach, co może sugerować zarówno para jak i endokryne działanie U-II [182 – 184].

Receptor UTS2R nie jest unikatowy. Znaleziono jego podobieństwo do receptora somatostatynowego, więc może być również pobudzany przez somatostatynę oraz podobny do niej URP (urotenesin related peptide). URP ma mniejszą ekspresję tkankową niż U-II za wyjątkiem OUN i narządów rodnych, gdzie pobudzenie receptora UTS2R odbywa się w istotnym stopniu przez URP [176, 185,186,187].

1.15 Działanie biologiczne U-II

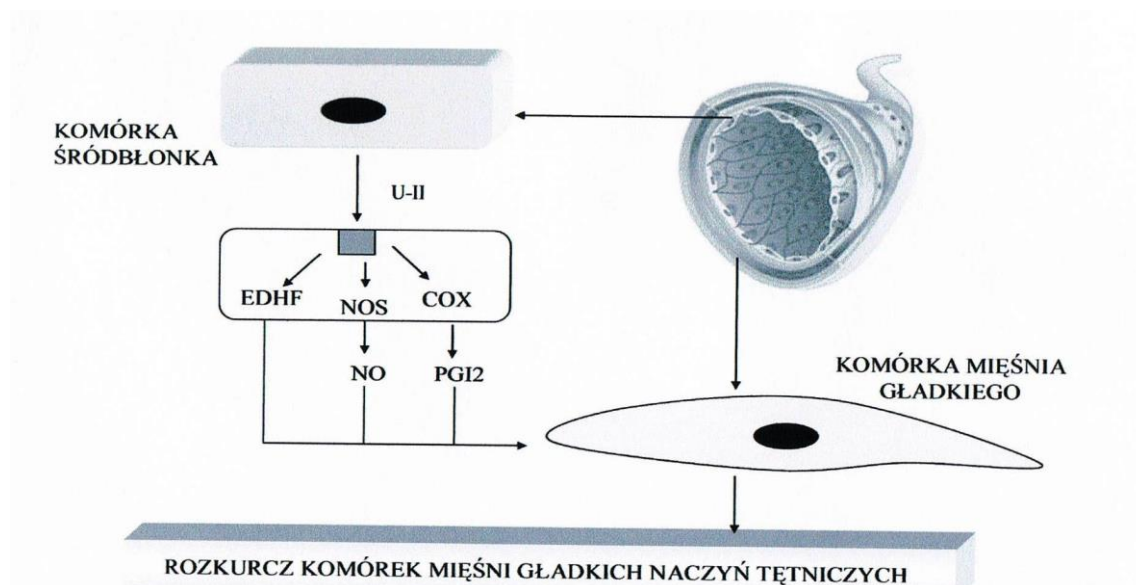
Efekt biologiczny działania U-II może być przeciwny w zależności od tego, czy białko będzie działało poprzez pobudzenie receptora, czy też poprzez pobudzenie układu prostacyklin z pominięciem receptora. Urotensyna uwolniona z komórek śródbłonna naczyń oraz makrofagów na drodze parakrynej pobudza UTS2R zlokalizowany na błonie komórkowej mięśni gładkich, który wykorzystując szereg przekaźników powoduje skurcz naczyń krwionośnych oraz proliferację komórek. (Ryc. 3, z J. Piech i wsp.) [174]. Skurcz wywołany działaniem U-II narasta powoli i trwa dłużej niż w przypadku działania angiotensyny II czy chlorku potasu.

Rycina 3. Mechanizm skurczu naczynia wywołanego pobudzeniem receptora UTS2R przez U-II.



Autokryny wpływ U-II na komórki śródbłonna naczyniowego, bez pobudzenia receptora UTS2R, polega na pobudzeniu cykloogsygenazy, która powoduje przemianę kwasu arachidowego w prostacyklinę (P_gI₂) oraz pobudzenie syntazy tlenku azotu (NO). Substancje te uwolnione z komórek śródbłonna przenikają do mięśniówki gładkiej działając silnie wazodylatacyjnie (Ryc. 4, z J. Piech i wsp) [174].

Rycina 4. Mechanizm rozkurczu naczyń wywołany przez pobudzenie enzymów przez U-II.



Wazoaktywne działanie U-II zależy od rodzaju badanego łożyska naczyniowego, kalibru naczyń oraz interakcji z innymi czynnikami wazo aktywnymi, a szczególnie z tymi, które są wydzielane podczas uszkodzenia śródbłonna naczyniowego. Parakryne działanie urotensyny odbywa się głównie poprzez takie przekaźniki jak fosfatydyloinozytol i diacyloglicerol, które oprócz pobudzenia działania pompy wapniowej pobudzają uwalnianie różnych enzymów. W chwili uszkodzenia naczyń krwionośnego uwalniane są m.in. inhibitory syntazy NO oraz cykloogsygenazy, które zmniejszają produkcję tlenku azotu hamując naczyniorozkurczowe działanie urotensyny. Dysfunkcja śródbłonna jednocześnie powoduje uwalnianie U-II i jej działanie parakryne oraz uwalnia substancje zmniejszające jej działanie autokryne, co w efekcie wywołuje skurcz naczyń krwionośnych [188 – 192].

Urotensyna II ma działanie inotropowe dodatnie na mięsień sercowy. Najprawdopodobniej jest to efekt zmian w napięciu ściany naczyniowej i wzrostu ciśnienia krwi, co prowadzi do modulacji czynności skurczowej serca poprzez odruchy z baroreceptorów. Pobudza także kardiomiocyty do produkcji peptydów natriuretycznych – przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) i mózgowego peptydu natriuretycznego (BNP). Pobudza komórki immunokompetentne do produkcji czynnika martwicy nowotworów (TNF), interleukiny 1 i 6 (IL-1, IL-6), co dodatkowo moduluje efekty wywierane na mięsień sercowy [185, 193, 194].

U chorych z zastoinową niewydolnością krążenia spowodowaną zawałem mięśnia sercowego wykazano zwiększoną gęstość receptorów UTS2R na powierzchni kardiomiocytów, komórek śródbłonna naczyniowego i mięśni gładkich, co skutkuje włóknieniem i hipertrofią mięśnia sercowego. U pacjentów, których serce zostało uszkodzone w następstwie epizodu wieńcowego znacznie wzrasta stężenie UTS2R na powierzchni fibroblastów, komórek śródbłonna oraz na mastocytach licznie występujących w uszkodzonym *myocardium*. Pobudzenie receptorów przez zwiększone stężenie urotensyny skutkuje przerostem kardiomiocytów, przebudową komórek mięśnia sercowego i w efekcie zmniejszeniem kurczliwości lewej komory serca [193,195].

Zwiększoną ekspresję U-II stwierdzono także w obrębie blaszek miażdżycowych aorty i innych dużych naczyń krwionośnych. Potwierdzono obecność mRNA U-II w limfocytach oraz mRNA UTS2R w monocytach i makrofagach. Wykazano synergistyczne działanie U-II z oxy-LDL (częściowo utlenione cząstki lipidów), serotoniną i lizofosfatydylocholiną powodujące proliferację mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz fibroblastów, co z kolei sprzyja gromadzeniu kolagenu w obrębie ścian naczynia tętniczego. Ponadto urotensyna zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni monocytów oraz na komórkach śródbłonna naczyniowego, co w efekcie powoduje rozwój przewlekłej reakcji zapalnej i w następstwie prowadzi do zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych [196 - 199].

Urotensyna odgrywa rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Stężenia U-II w surowicy chorych z nadciśnieniem tętniczym są znamienne wyższe niż u osób

zdrowych i wykazują dodatnią zależność ze skurczowym ciśnieniem tętniczym [200 - 202].

Urotensyna II pobudza rdzeń nadnerczy oraz oś podwzgórze – przysadka – gruczoły obwodowe, powodując uwalnianie TSH, ACTH i adrenaliny. Pobudzenie rdzenia nadnerczy jest wybiórcze, gdyż nie dochodzi do wzrostu stężenia noradrenaliny [184,191].

Zwiększone stężenie urotensyny stwierdzono u chorych z cukrzycą insulinozależną. Badania nie wykazały zależności pomiędzy poziomem hemoglobiny glikowanej (HbA1C), szybkością narastania glikemii czy współistniejącym białkomoczem. Wydaje się, że wzrost stężenia urotensyny zależy od stopnia uszkodzenia śródbłonka naczyniowego w przebiegu cukrzycy. Badania na modelu zwierzęcym wykazały hamujące działanie urotensyny na sekrecję insuliny a polimorfizm genu *U-II* jest związany z insulinoopornością i wystąpieniem cukrzycy typu 2. Urotensyna poprzez działanie naczynioskurczowe oraz mitogeny wpływ na komórki mięśni gładkich spełnia ważną rolę w rozwoju angiopatii cukrzycowej. Stwierdzono także znacznie podwyższone stężenie urotensyny w surowicy krwi oraz w moczu u chorych z niewydolnością nerek w przebiegu nefropatii cukrzycowej. Stężenie wzrasta w miarę spadku funkcji wydalniczej, co może być efektem zarówno uszkodzenia nerek jak i zwiększenia wydzielania U-II przez uszkodzone komórki cewek nerkowych. Peptyd ma działanie silnie natriuretyczne poprzez wpływ na transport sodu w cewkach nerkowych. Ponadto działa rozkurczowo w obszarze naczyń nerkowych powodując zwiększenie nerkowego przepływu krwi oraz przesączania kłębuszkowego. U chorych z nadciśnieniem tętniczym powikłanym dysfunkcją nerek stwierdza się bardzo istotne zwiększenie stężenia urotensyny w moczu. W przypadku glomerulopatii niepowikłanej nadciśnieniem nie stwierdza się wydzielania urotensyny z moczem [188,194,202,203].

Obecność U-II i jej receptora UTS2R wykryto na powierzchni komórek nowotworów. Wydaje się, że przez swoje działanie mitogenne może odgrywać istotną rolę w rozwoju takich nowotworów jak: *neuroblastoma*, *glioblastoma*, *adenocarcinoma* jelita grubego, guzy nerek, kory i rdzenia nadnerczy oraz rak szyjki macicy [181, 192, 198].

Badaniom poddawana jest substancja działająca antagonistycznie do urotensyny i blokująca receptor UTS2R. Substancja ta to palosuran. Wykazano, że podanie palosuranu hamuje naczyniokurczący efekt działania urotensyny oraz istotnie zmniejsza przerost kardiomiocytów i produkcję kolagenu, co hamuje remodeling i poprawia funkcję mięśnia sercowego po epizodach wieńcowych. Palosuran zwiększa wydzielanie insuliny, redukuje glikemię i korzystnie wpływa na stężenie lipidów w surowicy. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem tego antagonisty w leczeniu chorób nerek wynikających z ich niedokrwienia [186,200, 204].

Urotensyna II jest nowym, ważnym hormonem o silnym działaniu na naczynia krwionośne. W przypadku uszkodzenia śródbłonna naczyniowego U-II wywołuje silny efekt wazokonstrykcyjny, który prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego. Ponadto U-II przyczynia się do wzrostu proliferacji mięśni gładkich ściany naczyniowej i szybszego rozwoju zmian naczyniowych.

W licznych badaniach wykazano ważną rolę urotensyny w patogenezie chorób układu krążenia, miażdżycy, cukrzycy, niewydolności nerek, marskości wątroby oraz nadciśnienia tętniczego [175].

II. Cel pracy

Celem rozprawy była ocena potencjalnej roli urotensyny II w etiologii nadciśnienia ciążowego i hipotrofii płodu. Cel ten realizowano poprzez:

1. ocenę stężenia U-II w surowicy krwi ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym i IUGR,
2. ocenę stężenia U-II w surowicy krwi pępowinowej ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym i IUGR,
3. próbę wyznaczenia wartości stężenia U-II, która mogłaby wskazywać na ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego,
4. ocenę obecności białka U-II w łożyskach wymienionych grup ciężarnych,
5. ocenę ekspresji genu *U-II* oraz genu receptora *UTS2R* w łożyskach zdrowych ciężarnych oraz ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym i IUGR.

III. Materiał

Grupę badaną stanowi 80 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych oraz w Oddziale Porodowym GPSK w Poznaniu w 2009 roku. Pacjentki podzielono na 3 grupy:

1. 38 zdrowych pacjentek o prawidłowym przebiegu ciąży, które stanowiły grupę kontrolną
2. 30 pacjentek u których zdiagnozowano nadciśnienie ciążowe.
3. 12 zdrowych pacjentek, u płodów których rozpoznano zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego.

3.1 Grupa kontrolna

Grupa kontrolna obejmuje zdrowe pacjentki w wieku 29 +/- 4 lata. Do grupy dobrane były pacjentki, u których wykluczono nadciśnienie, cukrzycę, choroby tarczycy, wątroby, nerek oraz choroby układowe. Pacjentki nie przyjmowały leków przewlekłe, ani w czasie ciąży. W grupie badanej wyeliminowano pacjentki z otyłością. BMI sprzed ciąży wynosiło 22 +/- 3, co plasuje pacjentki w grupie wagi prawidłowej. Średni przyrost masy ciała w ciąży wyniósł 15 +/- 5 kg.

Badania objęły pacjentki w pojedynczej ciąży bez obciążonego wywiadu położniczego. 53% pacjentek to pierworódki, z czego 10% pacjentek jest po jednym poronieniu. 47% pacjentek to wieloródki, z czego 8% pacjentek urodziło po raz trzeci. Większość porodów odbyła się w sposób samoistny - 79% pacjentek. U 13% pacjentek wykonano cięcie cesarskie ze wskazań: ortopedycznych, objawy zagrożenia życia płodu oraz stan po cięciu cesarskim. U 8% pacjentek założono wyciągacz próżniowy ze wskazań: objawy zagrożenia życia płodu w II okresie porodu. Wszystkie zakwalifikowane do grupy kontrolnej pacjentki urodziły w III trymestrze ciąży, gdzie czas trwania ciąży wynosił 39 +/- 1 tygodni ciąży.

Z grupy kontrolnej wykluczono noworodki, u których zdiagnozowano wady rozwojowe, wady pępowiny lub przyspieszone starzenie się łożyska. Pacjentki urodziły zdrowe noworodki o średniej masie 3400 +/- 370g, co odpowiadało w większości 50 percentylowi z odchyleniem +/- 20 percentyli. Punktacja Apgar przyznana noworodkom waha się pomiędzy 9 a 10 punktów, przy pH pobranym z pępowiny 7,27/7,29.

Oceniane łożyska nie wykazały wad w budowie, znamienych zwapnień czy nieprawidłowego przyczepu pępowiny. Średnia masa łożysk wynosiła 635 +/-212 grama. Podczas porodu nie występowały trudności w rodzeniu się łożysk.

Charakterystykę ciężarnych z grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli nr 3.

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej, n=38

badany parametr	średnia +/- SD	min	max
Wiek (lata)	29+/-4	19	37
Wzrost (cm)	166+/-5	158	176
RR skurczowe w dniu porodu	102+/-9,5	90	120
RR rozkurczowe w dniu porodu	64+/-7	50	80
MAP w dniu porodu	77+/- 6,5	70	90
Masa ciała przed ciążą (kg)	62+/-11	46	96
Masa ciała okołoporodowo (kg)	76,5+/-12,5	59	118
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)	15+/-5	5	26
BMI w I trymestrze (kg/m ²)	22+/-3	17	31,5
BMI okołoporodowo (kg/m ²)	27,5+/-3,5	23	38,5
Termin porodu (tydzień ciąży)	39+/-1	37	42
Masa ciała noworodka (g)	3400+/-370	2890	4610
Percentyl masy ciała noworodka	49+/-24	10	98
pH 1	7,27+/-0,1	7,11	7,46
pH 2	7,29+/-0,1	7,13	7,48
Masa łożyska	635+/-212	450	900

Objaśnienie: n – liczba przypadków

3.2 Grupa druga – pacjentki z nadciśnieniem ciążowym

Grupa druga obejmuje pacjentki w wieku 28+/-4 lat, u których rozpoznano nadciśnienie ciążowe. Średni wiek ciążowy, w którym rozpoznano nadciśnienie to 25 tydzień ciąży. Poza tym u pacjentek nie występowały inne choroby towarzyszące. Wykluczono pacjentki z cukrzycą, wcześniej rozpoznanymi chorobami nerek, z cholestazą ciążową lub innymi chorobami wątroby, z chorobami układu krążenia, z chorobami układu sercowego – naczyniowego oraz z chorobami układu oddechowego. Wykluczono także pacjentki w ciąży mnogiej. Nie wykluczono pacjentek z nadwagą, jako jednego z czynników wystąpienia nadciśnienia. BMI sprzed ciąży wynosi 28+/-6, co wskazuje, że 40% pacjentek znajduje się w przedziale BMI wskazującym na otyłość. Średni przyrost masy w czasie ciąży wyniósł 15+/-6 kg.

Nadciśnienie pacjentek charakteryzowano biorąc pod uwagę wartość MAP wyliczoną na podstawie pomiarów ciśnienia wykonanych okołoporodowo oraz badania moczu, w którym oceniano obecność białkomoczu. Jeśli nie było aktualnego badania dane opierano na podstawie wywiadu lekarskiego i karcie przebiegu ciąży bądź wypisach szpitalnych.

U 58% pacjentek wystąpił białkomocz. U 79% zanotowano wystąpienie obrzęków.

Wszystkie pacjentki leczone były doustnie Dopegytem zaczynając od dawki 750mg/dobę aż do 2g/dobę. U pacjentek, których wartości ciśnienia pozostawały wysokie, gdzie nie dochodziło do normalizacji ciśnienia po podaniu metyldopy dodatkowo włączano Cordafen, Dihydralazynę, Hydrochlorotiazyd, w przypadkach niepoddających się leczeniu bezpośrednio przed wykonaniem cięcia cesarskiego stosowano Ebrantil. U większości pacjentek występowały obrzęki kończyn dolnych. U żadnej pacjentki nie wystąpiły drgawki lub zespół HELLP.

Do badań zakwalifikowano pacjentki z nieobciążonym wywiadem położniczym. Z całej grupy badanej 16% pacjentek podawało w wywiadzie jedno poronienie. 73% pacjentek to pierworódki. Spośród grupy wieloródek tylko jedna pacjentka rodziła po raz trzeci. 44% pacjentek urodziły samoistnie, u jednej pacjentki wystąpiło obumarcie wewnątrzmaciczne w 28 t.c. Pozostałe pacjentki (56%) rozwiązano cięciem cesarskim ze wskazań: objawy zagrożenia życia płodu (27%), stan po cięciu cesarskim (10%), brak postępu porodu (7%), nieprawidłowe położenie lub ułożenie płodu (7%). Średni czas trwania ciąży to 38+/-3 tygodnie, z czego pacjentki, u których ciążę zakończono ze wskazań nagłych zostały rozwiązane przedwcześnie tj. przed ukończeniem 36 t.c.

Z grupy pacjentek obciążonych nadciśnieniem ciążowym wykluczono pacjentki, u których płodów wykryto wady rozwojowe i nieprawidłowości w budowie pępowiny. Urodzone noworodki ze względu na dużą rozbieżność w czasie trwania ciąży opisano stosując percentyle. Średnia masa noworodka mieściła się pomiędzy 40 a 45 percentylem, z czego 23% noworodków urodziło się z masą poniżej 3 percentyla. Noworodkom po urodzeniu przyznano 9-10 punktów w skali Apgar, a pH pobrane z pępowiny wynosiło średnio 7,25/7,26.

Przed porodem u 27% pacjentek stwierdzono w wykonanych badaniach dopplerowskich cechy centralizacji krążenia oraz nieprawidłowe przepływy w tętnicach macicznych. Oceniane po porodzie łożyska w 17% wykazały zmiany mogące świadczyć o niewydolności łożyska. Widoczne były liczne zwapnienia oraz obwałowane brzegi. Średnia masa łożyska wyniosła 560+/-170 gram. Nie stwierdzono nieprawidłowości przyczepu pępowiny, ani trudności w rodzeniu się płodu.

Charakterystykę ciężarnych z grupy z nadciśnieniem ciążowym przedstawiono w tabeli nr 4.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym, n=30

badany parametr	średnia +/- SD	min	max
Wiek (lata)	28,5+/-4	21	39
Wzrost (cm)	166+/-4	157	174
RR skurczowe w dniu porodu	155+/-17	130	200
RR rozkurczowe w dniu porodu	100+/-10	80	120
MAP w dniu porodu	118+/-12	97	140
Masa ciała przed ciążą (kg)	77+/-19	52	120
Masa ciała okołoporodowo (kg)	92+/-20	62	150
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)	15+/-6,5	3	31
BMI w I trymestrze (kg/m ²)	28+/-6	19	41,5
BMI okołoporodowo (kg/m ²)	33+/-6	25	51
Termin porodu (tydzień ciąży)	38+/-3	28	41
Masa ciała noworodka (g)	3005+/-1056	550	4780
Percentyl masy ciała noworodka	42+/-34	poniżej 3	98
pH1	7,25	7,08	7,41
pH2	7,26	7,04	7,45
Masa łożyska	562+/-169	270	950

Objaśnienie: n – liczba przypadków

3.3 Grupa trzecia – pacjentki z IUGR

Grupa trzecia obejmuje 12 pacjentek w wieku 29+/-5 lat, u których rozpoznano zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego u płodów. Pacjentki zakwalifikowane do tej grupy nie przyjmowały leków przewlekle ani w czasie ciąży. Nie paliły, nie piły alkoholu. Wykluczono choroby układu sercowo – naczyniowego, oddechowego, cukrzycę, choroby nerek, wątroby i układowe. Pacjentki w I trymestrze nie były poddane działaniu szkodliwych substancji czy promieniowaniu rtg. Wykluczono też możliwość wystąpienia chorób zakaźnych, szczególnie z grupy TORCH. Pacjentki zakwalifikowane do tej grupy nie miały obciążonego wywiadu położniczego, żadna z nich nie podawała w wywiadzie poronień. Na podstawie wywiadu wstępnie można wykluczyć koagulopatie wrodzone i zespół antyfosfolipidowy. Pacjentki nie były niedożywione lub wyniszczone, gdyż średnie BMI obliczone przed ciążą wynosiło 21+/-3 a przyrost masy ciała w ciąży był prawidłowy i wynosił 12+/-4 kg.

Grupa obejmowała pacjentki w ciąży pojedynczej. Poród samoistny odbył się tylko u 33,3% pacjentek. Pozostałe pacjentki rozwiązane były przez cięcie cesarskie ze wskazań: ostre objawy zagrożenia życia płodu (41,6%) oraz położenie miednicowe u pierwiastki (25%). Średni czas trwania ciąży wynosił 39+/-1,5 tygodnia. Masa wszystkich urodzonych noworodków znajdowała się poniżej 5 percentyla i wynosiła średnio 2205+/-500gram. Noworodki urodziły się w stanie dobrym z 9 – 10 punktów w skali Apgar oraz prawidłowym pH z krwi pępowinowej 7,25/7,28. Badanie fizykalne po porodzie potwierdziło prawidłową budowę anatomiczną noworodków.

Ocena popłodów wykazała prawidłową budowę sznurów pępowinowych oraz prawidłowe przyczepy. Średnia masa łożysk wynosiła 367+/-102gramy. W budowie zwracały uwagę bardzo liczne zwapnienia i silnie zaznaczone zrazy. W czasie cięć cesarskich nie stwierdzono przedwczesnego oddzielania się łożysk.

Charakterystykę ciężarnych z grupy z IUGR płodów przedstawiono w tabeli nr 5.

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z zaburzeniami wzrastania wewnątrzmacicznego u płodów, n=12

badany parametr	średnia +/- SD	min	max
Wiek (lata)	29+/-5	21	38
Wzrost (cm)	166+/-7	150	176
RR skurczowe w dniu porodu	104+/-12	90	120
RR rozkurczowe w dniu porodu	64+/-8	50	80
MAP w dniu porodu	78+/-5	70	83
Masa ciała przed ciążą (kg)	59+/-6	38	75
Masa ciała okołoporodowo (kg)	71+/-9	53	85
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)	12+/-3	3	19
BMI w I trymestrze (kg/m ²)	21+/-3	17	26
BMI okołoporodowo (kg/m ²)	26+/-2	23	30
Termin porodu (tydzień ciąży)	38+/-2	35	40
Masa ciała noworodka (g)	2205+/-500	880	2850
Percentyl masy ciała noworodka	poniżej 5	poniżej 3	5
pH1	7,25+/-0,06	7,17	7,37
pH2	7,29+/-0,07	7,14	7,34
Masa łożyska	367+/-102	175	510

Objaśnienie: n – liczba przypadków

IV. Metody

Pobranie materiału biologicznego od pacjentek nastąpiło po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr uchwały 175/09). Każda pacjentka przed włączeniem do badań była informowana o celu wykonywanych procedur oraz o anonimowości przeprowadzanego badania. Podpisywała też zgodę na wzięcie udziału w badaniach. Badania obejmowały niżej wymienione procedury.

1. Od pacjentek w trakcie porodu pobierano krew z żyły odłokciowej, odwirowywano surowicę zamrażano w -70°C do dalszych badań metodą ELISA celem oznaczenia stężenia urotensyny.
2. Krew pępowinową pobierano po porodzie z żyły pępowinowej, odwirowywano a surowicę zamrażano w temp. -70°C do dalszych badań metodą ELISA celem oznaczenia stężenia urotensyny.
3. Pobierano dwa fragmenty łożyska po porodzie. Pierwszy fragment umieszczano w płynie RNA later i zamrażano do temp. -70°C celem późniejszego wykonania badania PCR. Drugi fragment przeznaczony do badań immunohistochemicznych utrwalano w płynie Bouina.

4.1 ELISA

Analiza immunoenzymatyczna stężenia urotensyny II w surowicy krwi pacjentek oraz surowicy krwi pępowinowej przebiegała przy użyciu komercyjnego zestawu (Peninsula Laboratories, LLC, nr katalogowy S-1256). Oznaczenia dokonano według procedury podanej przez producenta. W kolejnych celkach płytki umieszczono znane stężenia urotensyny II w dwóch powtórzeniach, rozpuszczalnik peptydu oraz próbki surowicy pobrane od pacjentek jak również kolejno: przeciwciało przeciw urotensynie II i biotynylowane przeciwciało drugorzędowe. Po pięciokrotnym płukaniu (Labsystem, Wellwash 4) dodano kompleks streptawidyna-peroksydaza chrzanowa. Inkubacja z TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna) - substratem peroksydazy poprzedzona była kolejnym cyklem płukania. Uzyskano barwny produkt i po 30 minutach reakcja została zahamowana roztworem HCl. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm w ciągu 10 min od zakończenia reakcji. Stężenie urotensyny II w badanych próbkach

obliczono na podstawie uzyskanych wartości absorbancji w odniesieniu do wyznaczonej krzywej standardowej.

4.2 Immunohistochemia

Posłużono się enzymatyczną metodą immunohistochemiczną (z zastosowaniem peroksydazy chrzanowej) z klasycznym wzmocnieniem reakcji metodą ABC (Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (DAKO, K5007)). Materiał pobrano od 80 kobiet bezpośrednio po porodzie. Łożyska utrwalano przez 24 h w płynie Bouina, odwadniano i zatapiano w parafinie. Do badań stosowano skrawki o grubości 5-6 μm . Następnie preparaty odparafinowywano i doprowadzano do fazy wodnej. Preparaty płukano kolejno w wodzie kranowej i destylowanej po 10 min. Kolejne etapy inkubacji przeprowadzano w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej. Aktywność endogennej peroksydazy hamowano przez inkubację w 1% roztworze perhydrołu (30 min). Preparaty płukano kolejno w wodzie kranowej i destylowanej po 10 min, a następnie preinkubowano w roztworze surowicy koziej (w stosunku 1:20 w PBS z 0,1% BSA i 0,1% azydkiem sodu) w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po tym czasie surowicę kozią (surowica kozia normalna (Sigma, X-0907)) odsączano z preparatów za pomocą bibuły i nakładano swoiste przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciw urotensynie II (przeciwciała królicze przeciw urotensynie II-iej [Anti-UTS2, Antibody Produced in Rabbit, affinity isolated] (Sigma, HPA017000)). Na kontrolne skrawki nakładano rozpuszczalnik przeciwciała (PBS z 0,1% BSA i 0,1% azydkiem sodu). Po inkubacji trwającej 1 godzinę preparaty dokładnie płukano w PBS (3 razy po 5 min) i inkubowano 30 min w obecności biotynylowanego drugorzędowego przeciwciała i streptawidyny sprzężonej z peroksydazą. Pomiędzy tymi etapami, jak również po drugim z nich, preparaty płukano w PBS (3 razy po 5 min). Następnie na preparaty nakładano chromogen (w postaci roztworu 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) w buforze imidazolowym) - substrat dla peroksydazy. Po 40-60 sekundach skrawki płukano w wodzie destylowanej, podbarwiano hematoksyliną. Następnie przeprowadzano je przez szereg (alkohol etylowy 70%, 80% i 90%, 96%, alkohol absolutny –2 razy, alkohol z ksylenem w stosunku objętościowym 1:1, ksylen – 3 razy) i zatapiano w „syntetycznej żywicy” „Permout”.

4.3 PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy.

Badanie objęło 80 fragmentów łożysk pobranych po porodzie od pacjentek zdrowych, chorujących na nadciśnienie ciążowe oraz od pacjentek, u których wystąpiło wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu. Fragmenty łożyska pobierano do probówek zawierających RNA later. Fragmenty poddano izolacji RNA, następnie odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Izolacja RNA

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystano metodę z buforem lizującym TRI Reagent oraz metodą kolumnkową. Tkanki rozmrażano i usuwano płyn RNA later. Przeprowadzano homogenizację materiału, stosując 1 ml odczynnika lizującego. Następnie próbki przenoszono do probówek i dodawano 200 μ l chloroformu, energicznie wytrząsano przez 15 s, odstawiano na 10 minut, po czym wirowano przy 12000x g przez 15 min. w temp. 4° C. Po odwirowaniu zbierano górną frakcję zawierającą RNA i przenoszono ją do nowych probówek. Dodawano 0,5 ml izopropanolu. Całość umieszczano przez godzinę w temp. -20° C, po czym wirowano przy 12000x g przez 20 min. w temp. 4° C. Uzyskany supernatant usuwano, następnie dodawano 1 ml 70% etanolu. Mieszaninę wytrząsano, po czym wirowano przy 12000x g przez 15 min. w temp. 4° C. Przemycanie etanolem powtarzano kilkakrotnie. Następnie osad RNA suszono, po czym rozpuszczano go w 30 μ l wody. Pozostałości DNA usuwano za pomocą trawienia DNAzą. Uzyskane tą drogą RNA oczyszczano z mieszaniny reakcyjnej poprzez wirowanie na kolumnkach. Związane z membraną kolumnek RNA wypłukiwano 30. μ l wody. Stężenie wyizolowanego RNA określano za pomocą spektrofotometru, a następnie sprawdzano jego jakość poprzez rozdział elektroforetyczny na 1% żelu agarozowym z dodatkiem żelu Lonza.

Odwrotna transkrypcja

Odpowiednią ilość wyizolowanego RNA poddawano odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem polimerazy AMV firmy QIAGEN. W pierwszej kolejności przeprowadzano denaturację. W tym celu do mieszaniny reakcyjnej dodawano odpowiednią ilość RNA, startera (dT)₁₈ oraz wodę dejonizowaną, po czym inkubowano przez 5 min. w temp. 70° C, a następnie schładzano w lodzie. W dalszej kolejności przeprowadzano właściwą reakcję odwrotnej transkrypcji. W zależności od liczby

badanych prób przygotowywano mieszaninę reakcyjną w odpowiedniej proporcji. Dla pojedynczej próby jej skład zawierał: 4 μ l buforu reakcyjnego, 1 μ l 20 U/ μ l inhibitora RNAz i 2 μ l 10 mM dNTP oraz 2 μ l 200 U/ μ l odwrotnej transkryptazy AMV. Dla reakcji kontrolnych (-RT) przeprowadzano tę samą procedurę z zastąpieniem odwrotnej transkryptazy taką samą objętością wody dejonizowanej. Reakcję przeprowadzano z użyciem termocyklera UNO II (Biometra) w temperaturze 42° C w czasie 60 min. Uzyskane cDNA wykorzystywano do tradycyjnej reakcji PCR.

PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy)

Do reakcji PCR użyto starterów przedstawionych w tabeli 6. Startery zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) w taki sposób, aby nie powielały sekwencji genomowego DNA. W zależności od liczby badanych prób przygotowywano mieszaninę reakcyjną w odpowiedniej proporcji. Dla pojedynczej próby jej skład zawierał: 2,5 μ l 10 mM dNTP, 2,5 μ l buforu reakcyjnego, 2,5 μ l 5 μ M każdego ze starterów, 2,5 μ l uzyskanego cDNA, 0,25 μ l polimerazy Taq 1 U/ μ l oraz wodę dejonizowaną do końcowej objętości 25 μ l. Dla wszystkich badanych genów użyto następującego programu reakcji: 45 cykli według schematu: denaturacja 94° C, 30 sekund, przyłączenie startera 58° C, 30 sekund, wydłużenie startera 68° C, 120 sekund. Równocześnie przeprowadzano reakcje kontrolne, w których zamiast matrycy cDNA podawano wodę oraz drugą kontrolę bez odwrotnej transkryptazy (-RT). Produkty reakcji poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu na 2% żelu agarozowym z dodatkiem żelu Lonza, a prążki uwidocznione przy użyciu transilluminatora sfotografowano.

Tabela 6. Charakterystyka starterów dla urotensyny II i jej receptora wykorzystanych do reakcji RT-PCR, ich sekwencje, pozycja i długość produktów amplifikacji oraz numer dostępu do Genbank. β -2 mioglobina – gen referencyjny.

cDNA	Numer dostępu do bazy Genbank	Starter	Sekwencja startera (5'-3')	Pozycja	Wielkość produktu PCR (bp)
urotensyna II	NM_021995	L P	GGGATATTCTCAGGAAA GCAG CAATCAGGAGTCTCACG TT	299-319 440-458	160
receptor urotensyny II	NM_018949	L P	TGGGCATCGTGCTGCTC TT GAGGCAGGTGGTCAGG TAGTT	782-800 889-909	128
β -2 mioglobina	NM_012512	L P	ACCGAGACCGATGTATA TGC ACCGGATCTGGAGTTAA ACTG	284-303 400-420	137

Wykaz stosowanych odczynników (z numerem katalogowym, o ile dostępny) w poszczególnych etapach przygotowania materiału do PCR oraz podczas samego PCR:

- DNA ladder (wzorec wielkości DNA, FERMENTAS, SM0613)
- DNAza RNase – Free DNase Set (QIAGEN, 79254)
- Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I (ROCHE)
- Nucleic Acid Gel Stain (LONZA)
- Orange Loading Dye Solution (bufor obciążający, FERMENTAS, R0631)
- Prime RNase Inhibitor, 7 500 u (EPPENDORF, 0032 005 357)
- RNA later (QIAGEN, 1018087)
- TRI Reagent (trizol, SIGMA – ALDRICH, T-9424)

4.4 Analiza statystyczna

Opracowanie wyników wykonano przy użyciu programów Microsoft Excel 2013 i Statistica 6.0. Testowanie normalności rozkładu wykonano przy pomocy testu Shapiro – Wilka. Testowano grupy o podobnej liczebności. Dla określenia istotności statystycznej użyto testu t – Studenta dla grup niezależnych. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$. Badanie korelacji przeprowadzono za pomocą testu Spearmana. Siła związków korelacyjnych w zależności od współczynnika R opisywana jest następująco:

1. poniżej 0,2 - korelacja słaba (praktycznie brak związku)
2. 0,2 - 0,4 - korelacja niska (zależność wyraźna)
3. 0,4 - 0,6 - korelacja umiarkowana (zależność istotna)
4. 0,6 - 0,8 - korelacja wysoka (zależność znaczna)
5. 0,8 - 0,9 - korelacja bardzo wysoka (zależność bardzo duża)
6. 0,9 - 1,0 - zależność praktycznie pełna

Korelacyjne wykresy rozrzutu w zależności od współczynnika R opisywane są następująco:

zależność liniowa dodatnia ($R > 0$)

zależność liniowa ujemna ($R < 0$)

brak zależności ($R = 0$)

Ocenę i porównanie między sobą modeli klasyfikacyjnych przeprowadzono za pomocą wykreślenia krzywych ROC. Łączą one opis czułości i specyficzności danego modelu oraz oceniają poprawność klasyfikatora. Umożliwiają także wyznaczenie optymalnego punktu odcięcia.

Czułość określamy jako prawdopodobieństwo, że chorą osobę nasz test zakwalifikuje do grupy chorych. Innymi słowy miara ta będzie mówić jaki jest udział osób, które są chore i u których test wyszedł poprawnie, w stosunku do wszystkich chorych (true positives).

Specyficzność określamy prawdopodobieństwem, że osobę zdrową nasz test zakwalifikuje jako osobę zdrową (true negatives).

Wyznaczono także obszar pod wykresem krzywej ROC, oznaczany jako AUC. Obszar ten traktowany jest jako miara dobroci i trafności danego modelu. Wartość wskaźnika AUC mieści się w przedziale $[0,1]$; im większa wartość, tym lepszy model.

V. Wyniki

5.1 Stężenie U-II w surowicy krwi pacjentek.

Poziomy stężenie urotensyny II badane w surowicy krwi badanych pacjentek różnią się znacząco pomiędzy grupami. Średnie stężenia U-II w grupie kontrolnej wynosi 3,87±1,91 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 8,46±2,04 pg/ml, a w grupie pacjentek z IUGR 8,53±1,74 pg/ml. Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej, która wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy wartościami U-II w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy z nadciśnieniem ciążowym oraz z IUGR. Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniami U-II w grupie z nadciśnieniem oraz IUGR ($p > 0,05$). Wyniki przedstawione zostały w tabeli 7.

Tabela 7. Poziom stężenia urotensyny II [pg/ml] w surowicy krwi badanych pacjentek.

	Grupa kontrolna	Grupa z nadciśnieniem ciążowym	Grupa z hipotrofią płodu
n	38	30	12
średnia +/- SD	3,87±1,91	8,46±2,04 a	8,53±1,74 a
minimum	1,5	3,5	5,5
maximum	10,1	12,4	11,2

Objaśnienia: n= liczba badanych pacjentek.

Ocena statystyczna wyników testem t – Studenta:

różni się od grupy kontrolnej: a – $p < 0,0005$

porównanie grupy z nadciśnieniem ciążowym z grupą z hipotrofią płodu:

różnica nieznamienne statystycznie

5.2 Stężenie U-II w surowicy krwi pępowinowej.

Pomiar stężenia UII w surowicy krwi pępowinowej wynosi odpowiednio 23,45+/-7,68 pg/ml w grupie kontrolnej, 24,54+/-7,02 pg/ml w grupie z nadciśnieniem ciążowym, 23,77+/-8,2 pg/ml w grupie z IUGR. Analiza statystyczna nie wykazała istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami.

Wyniki przedstawione zostały w tabeli 8.

Tabela 8. Poziom stężenia urotensyny II [pg/ml] w surowicy krwi pępowinowej badanych pacjentek.

	Grupa kontrolna	Grupa z nadciśnieniem ciążowym	Grupa z hipotrofią płodu
n	38	30	12
średnia +/- SD	23,45+/-7,68	24,54+/-7,02	23,77+/-8,2
minimum	10,8	10,2	11,1
maximum	51,5	42,2	42,1

Objaśnienia: n= liczba badanych pacjentek.

Ocena statystyczna wyników testem t – Studenta: wszystkie różnice niezamienne statystycznie.

5.3 Wartość MAP w badanych grupach pacjentek. Zależność MAP od stężenia U-II w surowicy krwi pacjentek i w surowicy krwi pępowinowej w grupie z nadciśnieniem ciążowym.

Analizując dane pacjentek pod kątem wzrostu ciśnienia tętniczego krwi posługiwano się parametrem wyliczanym na podstawie zarówno ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego – MAP. Wykazano, że wartości MAP są istotnie statystycznie wyższe w grupie z nadciśnieniem ciążowym w stosunku do grupy kontrolnej i grupy z IUGR (tab. 9).

Tabela 9. Wartości średniego ciśnienia krwi (MAP) [mm Hg] w badanych grupach pacjentek.

	Grupa kontrolna	Grupa z nadciśnieniem ciążowym	Grupa z hipotrofią płodu
n	38	30	12
średnia +/- SD	77+/- 6,5	118+/-12 a	78+/-5
minimum	70	97	70
maximum	90	140	85

Objaśnienia: n= liczba badanych pacjentek.

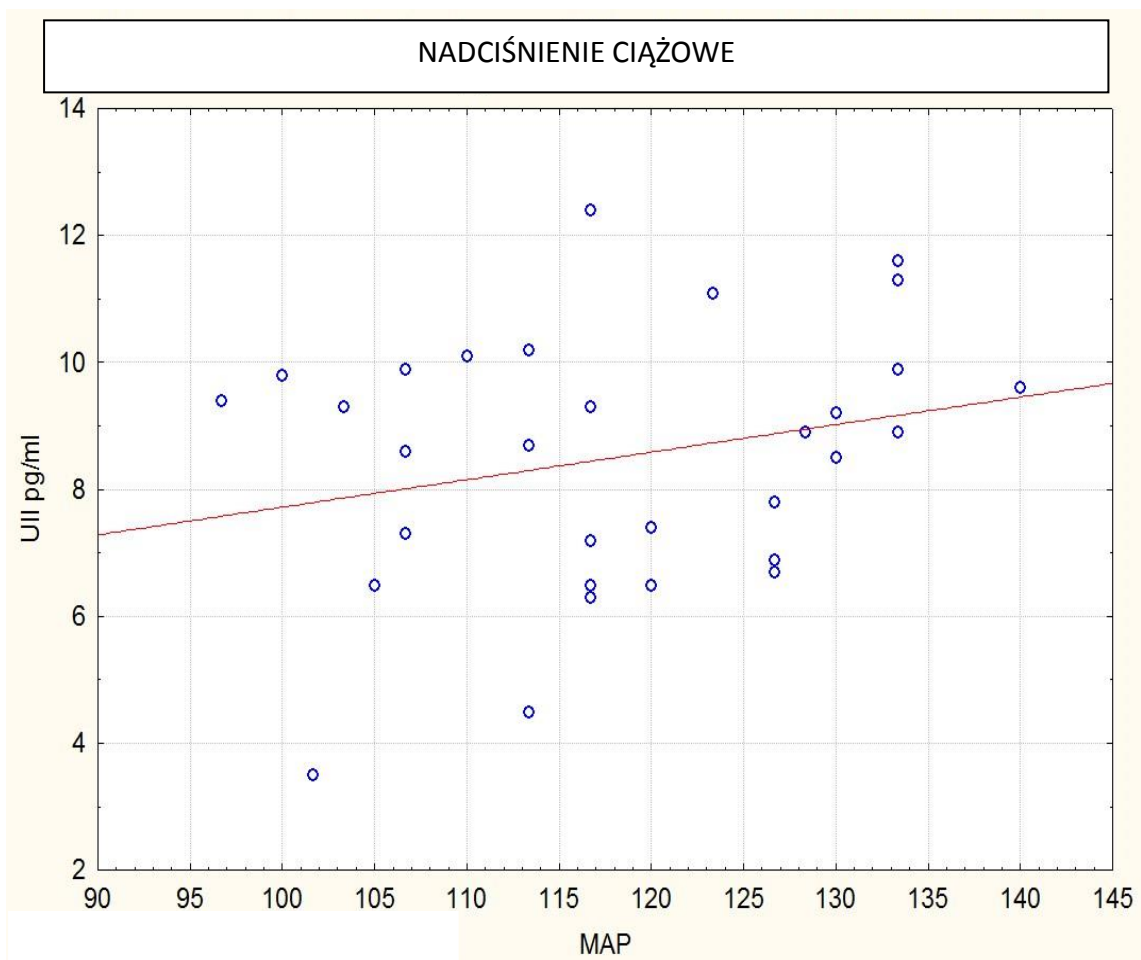
Ocena statystyczna wyników testem t – Studenta:

różni się od grupy kontrolnej i grupy z IUGR: a - $p < 0,05$

Następnie w grupie z nadciśnieniem ciążowym obliczono współczynnik korelacji między wartościami MAP a stężeniem U-II w surowicy krwi ciężarnych oraz stężeniem U-II we krwi pępowinowej. Z analizy wynika, że podwyższonemu stężeniu U-II w surowicy krwi pacjentek w grupie z nadciśnieniem ciążowym nie towarzyszy podwyższenie wartości MAP ($p > 0,05$, $R = 0,25$). Podobny brak zależności wykazano porównując wartości MAP i stężenia U-II we krwi pępowinowej ($p > 0,05$, $R = 0,32$). W obu przypadkach wartości współczynnika korelacji są bardzo niskie i wskazują na to, że badane parametry są raczej niezależne od siebie. W obliczeniach tych wyłączono

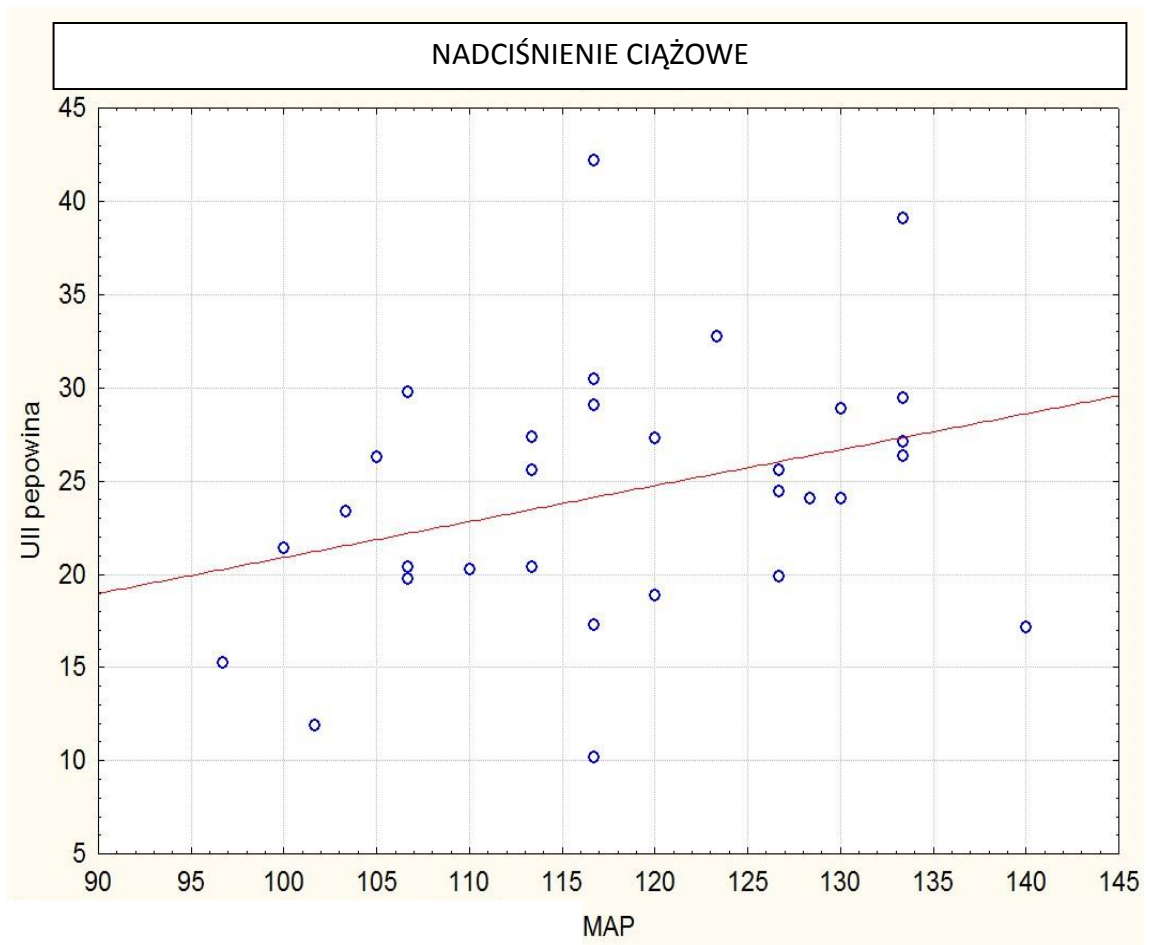
skrajnie niski, odosobniony wynik, który mógł znacząco wpływać na wartość R. Ocenę statystyczną wyników wykonano przy użyciu testu Spearmana. Wyniki przedstawiono na rycinach 5 i 6.

Rycina 5. Zależność wartości MAP od stężenia U-II w surowicy pacjentek z grupy z nadciśnieniem ciążowym.



Dla powyższego wykresu wartość współczynnika R wynosi 0,25.

Rycina 6. Zależność wartości MAP od stężenia U-II w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy z nadciśnieniem ciążowym.

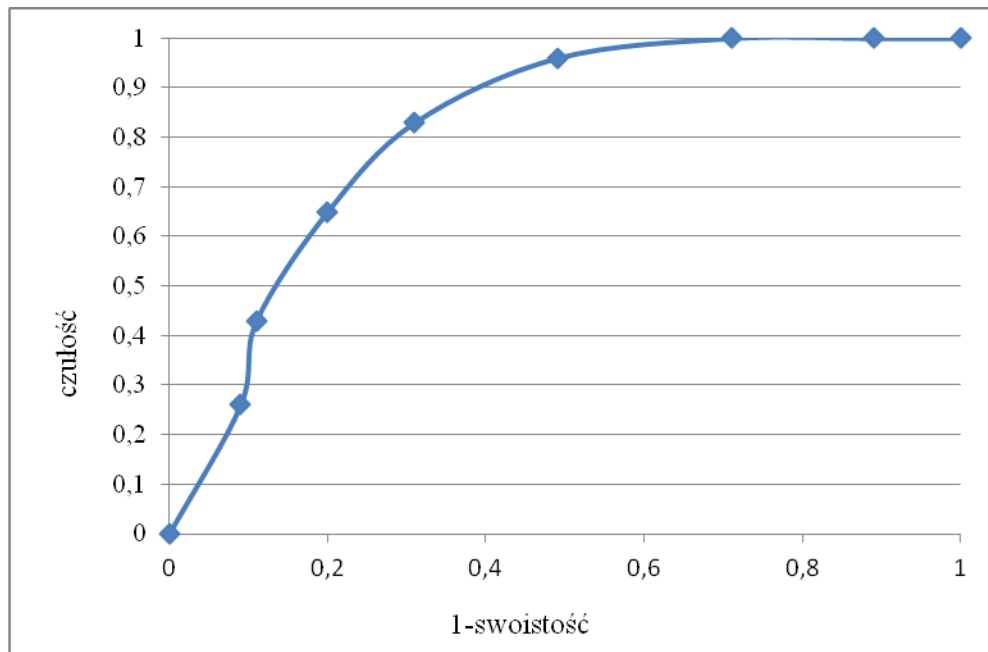


Dla powyższego wykresu wartość współczynnika R wynosi 0,32.

5.4 Określenie wartości predykcyjnej stężenia U-II w surowicy krwi pacjentek dla ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego i białkomoczu.

Dla badanych stężeń U-II we krwi pacjentek ciężarnych wykreślono krzywe ROC oraz obliczono pole powierzchni pod krzywą ROC (AUC). Wyznaczono punkt odcięcia dzielący populację kobiet na grupy o istotnie wyższym ryzyku wystąpienia nadciśnienia i białkomoczu odpowiednio wykres 1 i 2.

Wykres 1. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o wartości MAP.

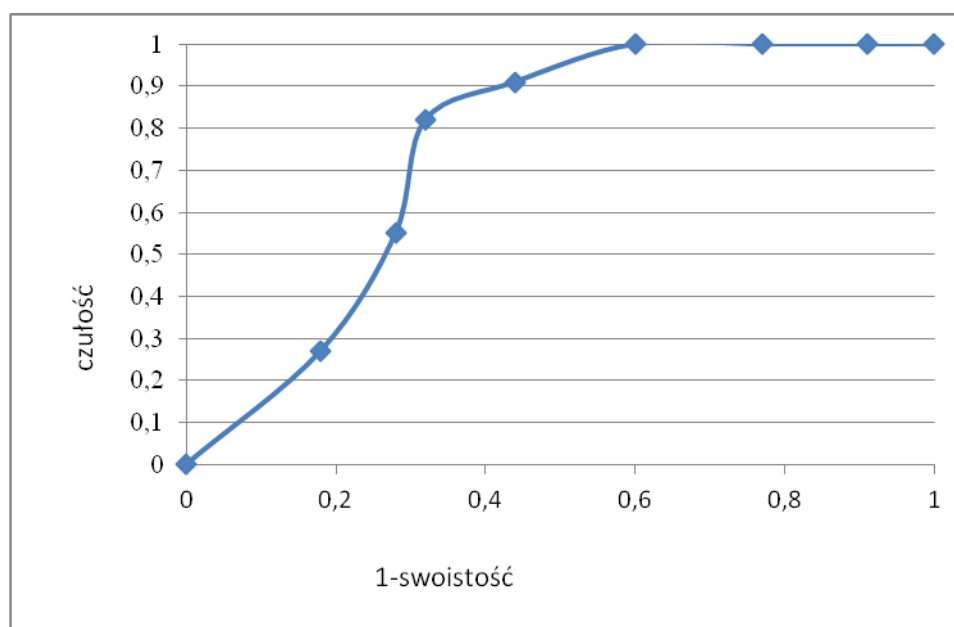


AUC	SE(AUC)	95 przedział % ufności	
0,892754	0,037406	0,819437	0,96607
wartość predykcyjna stężenia U-II w surowicy matki dla nadciśnienia ciążowego = 4pg/ml			

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia U-II w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 4pg/ml. Wartość ta

dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

Wykres 2. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia białkomoczu w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.



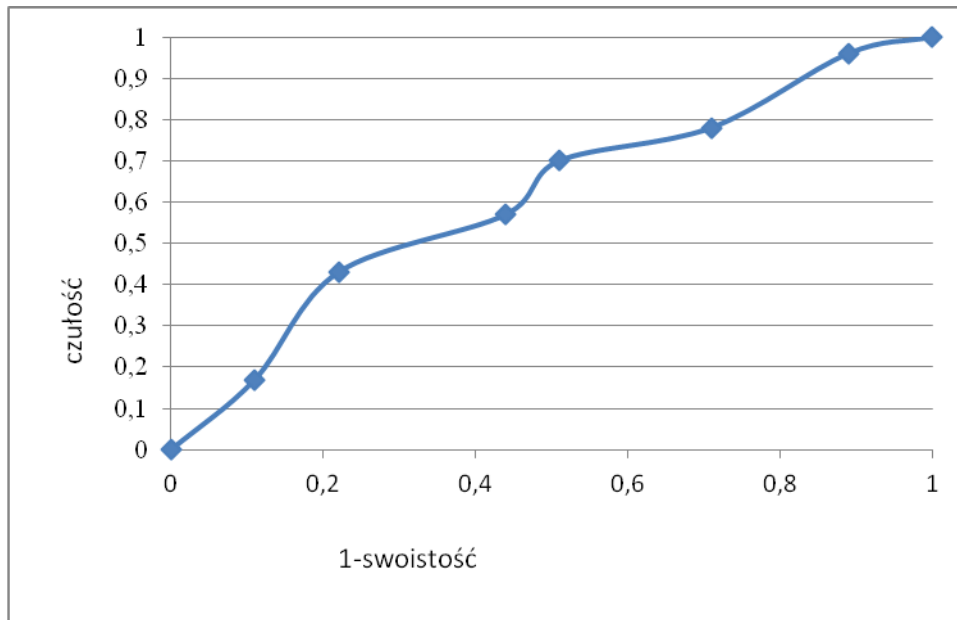
AUC	SE(AUC)	95% przedział ufności	
0,863636	0,046265	0,772957	0,954316
wartość predykcyjna stężenia U-II w surowicy matki dla białkomoczu = 8pg/ml			

Na powyższym wykresie oznaczono wartość predykcyjną stężenia U-II dla ryzyka wystąpienia białkomoczu. Oznaczono, że wartość stężenia U-II 8pg/ml w surowicy kobiet ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki ze wzrostem ciśnienia bez białkomoczu i te, u których występuje białkomocz.

5.5 Określenie wartości predykcyjnej stężenia U-II w surowicy krwi pępowinowej dla ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego i białkomoczu.

Dla badanych stężeń U-II we krwi pępowinowej wykreślono krzywe ROC oraz obliczono pole powierzchni pod krzywą ROC (AUC). Starano się wyznaczyć punkt odcięcia dzielący populację kobiet na grupy o istotnie wyższym ryzyku wystąpienia nadciśnienia i białkomoczu odpowiednio wykres 3 i 4.

Wykres 3. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o wartości MAP.

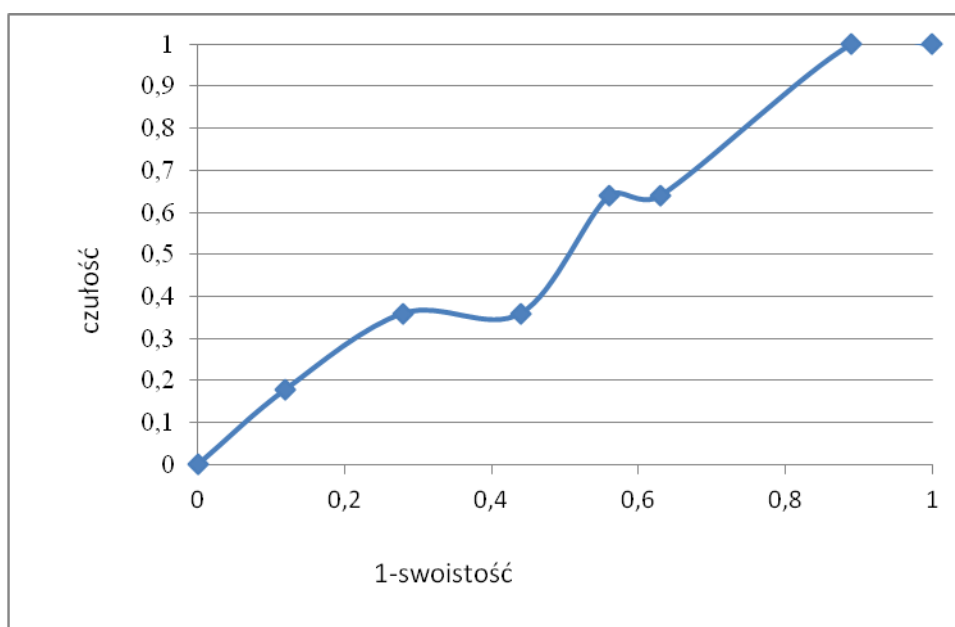


AUC	SE(AUC)	95% przedział ufności	
0,619324	0,072953	0,476335	0,762312
wartość predykcyjna stężenia U-II w krwi pępowinowej dla nadciśnienia ciążowego - nieistotna statystycznie			

Na powyższym wykresie starano się oznaczyć wartość predykcyjną stężenia U-II we krwi pępowinowej, powyżej której wzrasta ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego. Nie udało się oznaczyć punktu odcięcia, który dzieliłby grupę badanych pacjentek na

zdrowe i z nadciśnieniem ciążowym. Badanie jest nieistotne statystycznie dla przedziału ufności równemu 0,47.

Wykres 4. Krzywa ROC dla stężeń urotensyny II w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia białkomoczu w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.



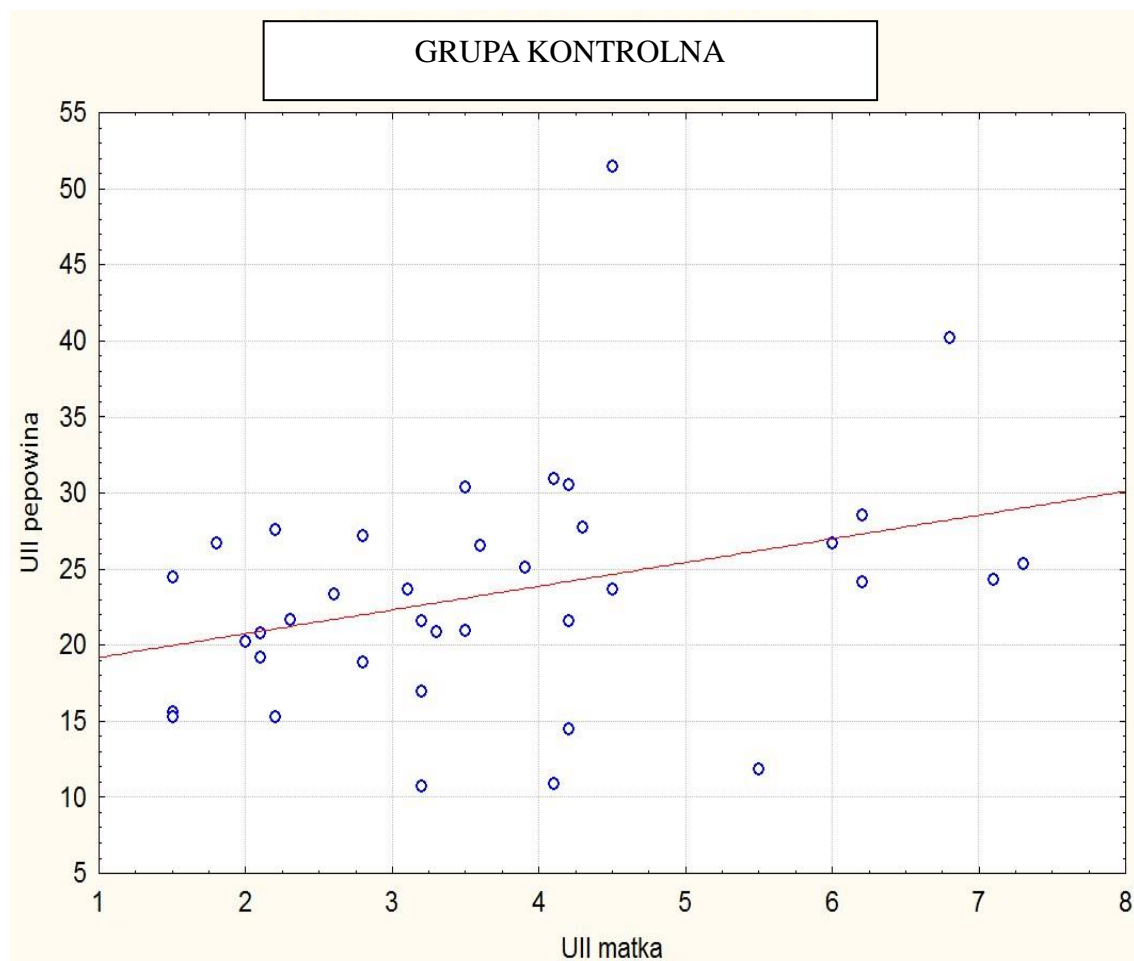
AUC	SE(AUC)	95% przedział ufności	
0,515949	0,098775	0,32235	0,709548
wartość predykcyjna stężenia U-II w krwi pępowinowej dla białkomoczu - nieistotna statystycznie			

Na powyższym wykresie starano się obliczyć wartość predykcyjną dla stężenia U-II w krwi pępowinowej, która wskazywałaby na ryzyko wystąpienia białkomoczu. Nie udało się określić punktu odcięcia, tj. wartości, która dzieliłaby grupę pacjentek na zdrowe i z białkomoczem. Badanie nieistotne statystycznie dla przedziału ufności 0,32.

5.6 Badanie współzależności stężeń pomiędzy stężeniami U-II w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej.

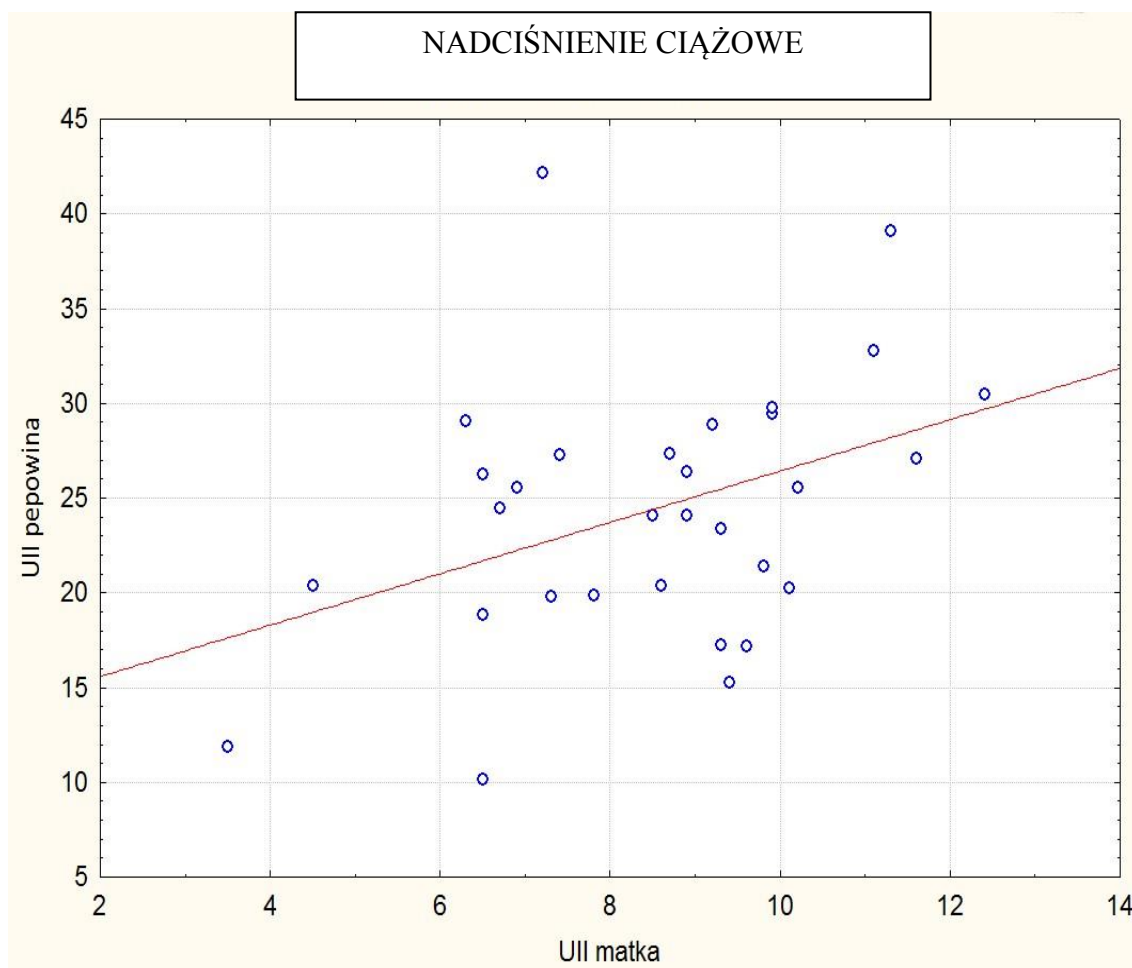
Korelację badano testem Spearmana a otrzymane wyniki przedstawiono na rycinach 7, 8, 9. Stwierdza się bardzo słabą, dodatnią korelację stężeń urotensyny w krwi pępowinowej i krwi matki w przypadkach kobiet z grupy kontrolnej i z nadciśnieniem ciążowym (odpowiednio $R=0,32$, $p>0,05$ i $R=0,39$, $p>0,05$). W obu przypadkach wartości współczynnika korelacji są bardzo niskie i wskazują na to, że badane parametry są niezależne od siebie. W przypadku grupy z IUGR stwierdzono ujemną korelację ($R= -0,38$, $p>0,05$). Wynikać to może z faktu, iż grupa ta obejmowała małą liczbę przypadków oraz duży rozrzut wyników.

Rycina 7. Korelacja stężeń UII w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy kontrolnej.



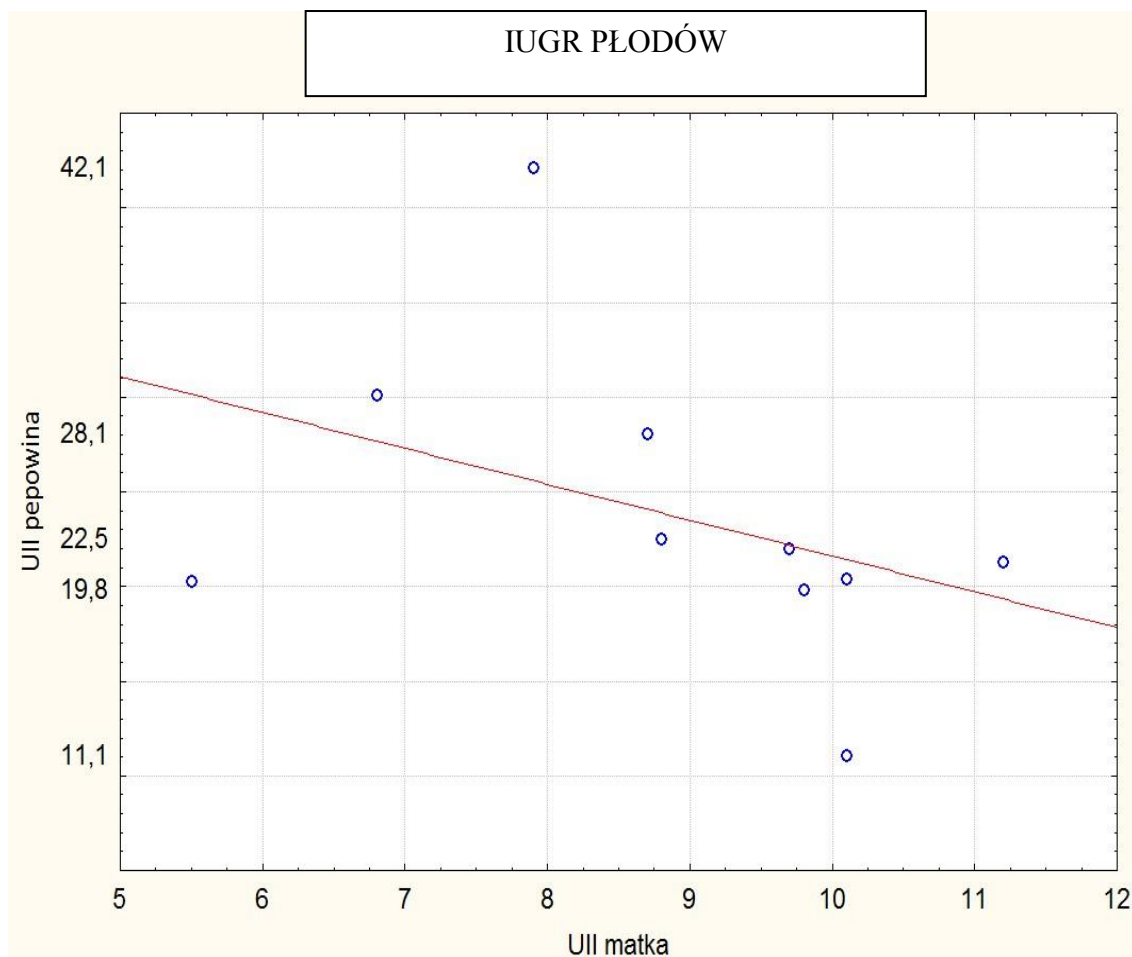
Dla powyższego wykresu wartość współczynnika R wynosi 0,32.

Rycina 8. Porównanie stężenia U-II w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.



Dla powyższego wykresu wartość współczynnika R wynosi 0,39.

Rycina 9. Porównanie stężenia U-II w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy z IUGR płodów.



Dla powyższego wykresu wartość współczynnika R wynosi - 0,38.

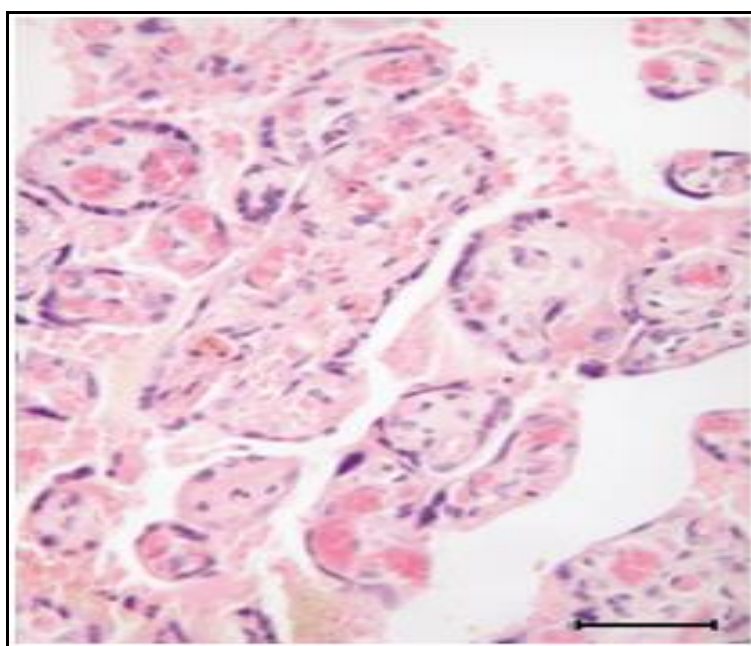
5.7 Analiza histopatologiczna łożysk pacjentek badanych grup oraz rozmieszczenie w nich substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II.

Pobrane od pacjentek po porodzie fragmenty łożyska utrwalono, a następnie barwiono metodą H + E. Preparaty oceniano pod kątem występowania patologii mogących zaburzyć wymianę matka – płód. Poza tym skrawki poddano reakcji immunohistochemicznej na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do UII.

Na poniższych rycinach uwidoczniono skrawki łożyska wybarwione metodą H + E oraz poddane reakcji immunohistochemicznej.

W łożyskach otrzymanych od pacjentek z grupy kontrolnej widoczne są wolne przestrzenie międzykosmkowe, prawidłowo zarysowane granice kosmków oraz prawidłowe naczynia z otwartym światłem (ryc. 10).

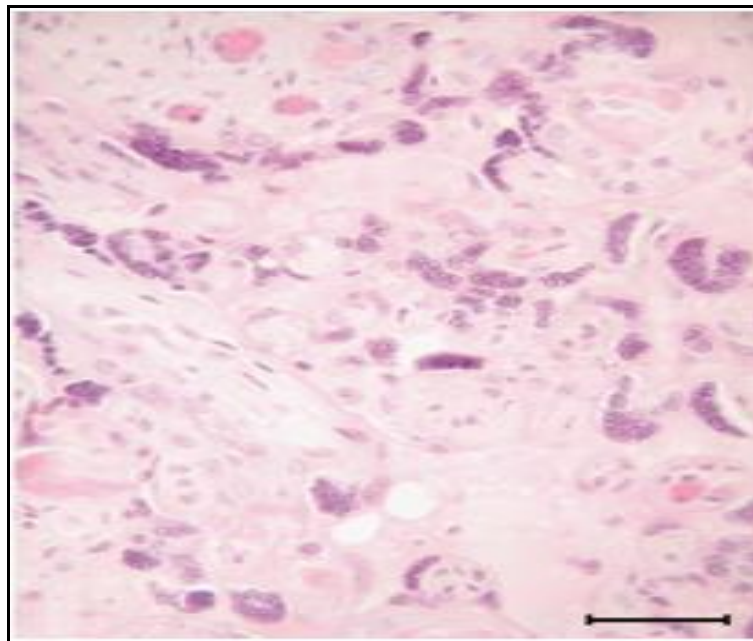
Rycina 10. Skrawek prawidłowego łożyska pacjentki z grupy kontrolnej, barwiony metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50µm.



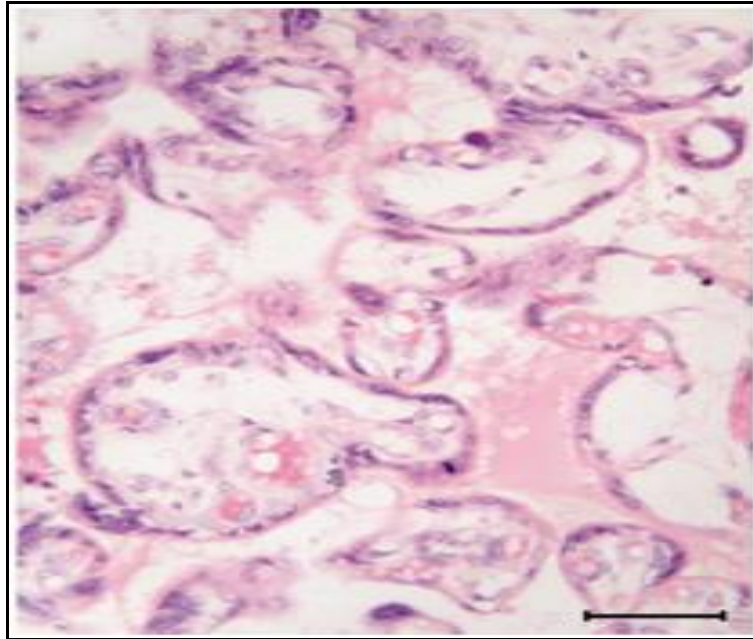
Obraz histologiczny łożyska prawidłowego.

W łożyskach otrzymanych od pacjentek z nadciśnieniem ciążowym oraz od pacjentek z IUGR płodów widoczne są zmiany włókniste podścieliska kosmków (ryc. 12 A) oraz nadmierne gromadzenie się mas włókniaka (fibrynowid) w obrębie przestrzeni okołokosmkowej (ryc. 11 B). Takie zmiany degeneracyjne w łożysku doprowadzają do zawałów w obrębie narządu, które cechują się utratą przestrzeni międzykosmkowej i zatarciem granic kosmków (ryc. 11 A). Kolejne nieprawidłowości uwidocznione w badaniu histopatologicznym łożysk dotyczą zmian naczyniowych obejmujących zarastanie i mikrozakrzepy zwężające światło naczynia (ryc. 12 B, C). Takie zmiany degeneracyjne w łożysku w efekcie doprowadzają do zawałów w obrębie tkanki łożyskowej (ryc. 11 A), które cechują się utratą przestrzeni międzykosmkowej i zatarciem granic kosmków.

Ryciny 11 A, B. Skrawki łożyska pacjentki z grupy z nadciśnieniem ciążowym barwione metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50µm.

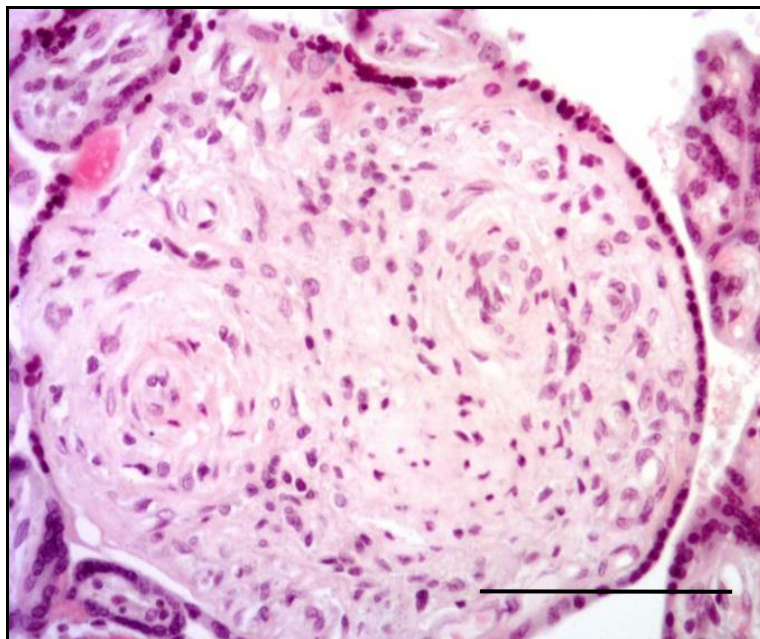


A – zawał łożyska

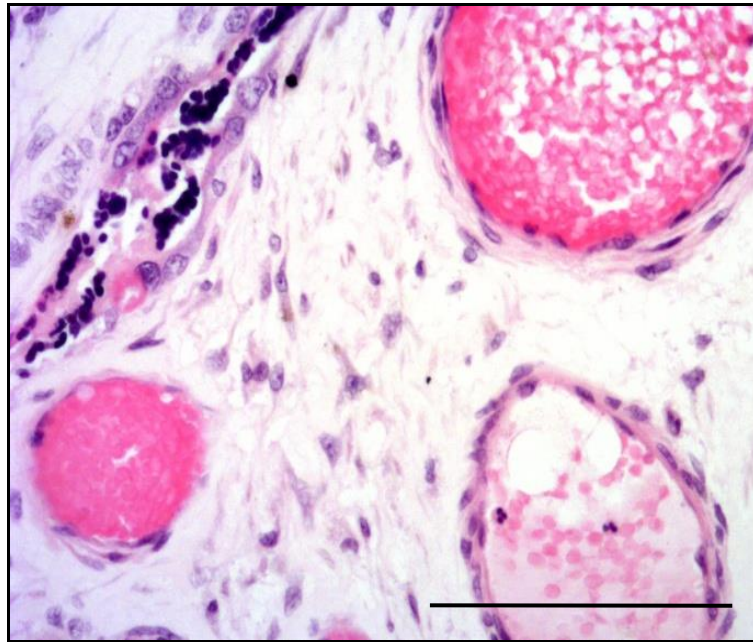


B – włóknie przestrzeni okołosmkowej

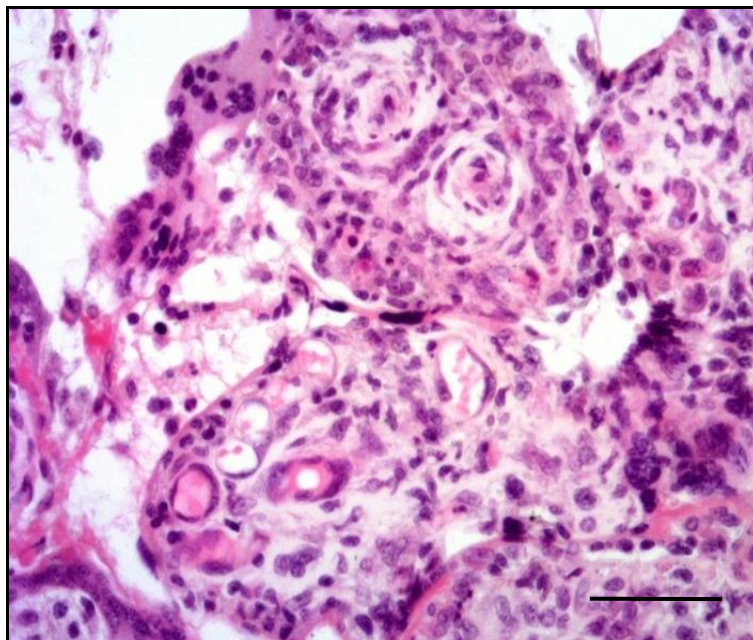
Ryciny 12 A, B, C. Skrawki łożyska pacjentki z grupy z IUGR płodów barwione metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50µm.



A – włóknienie zrębu kosmka



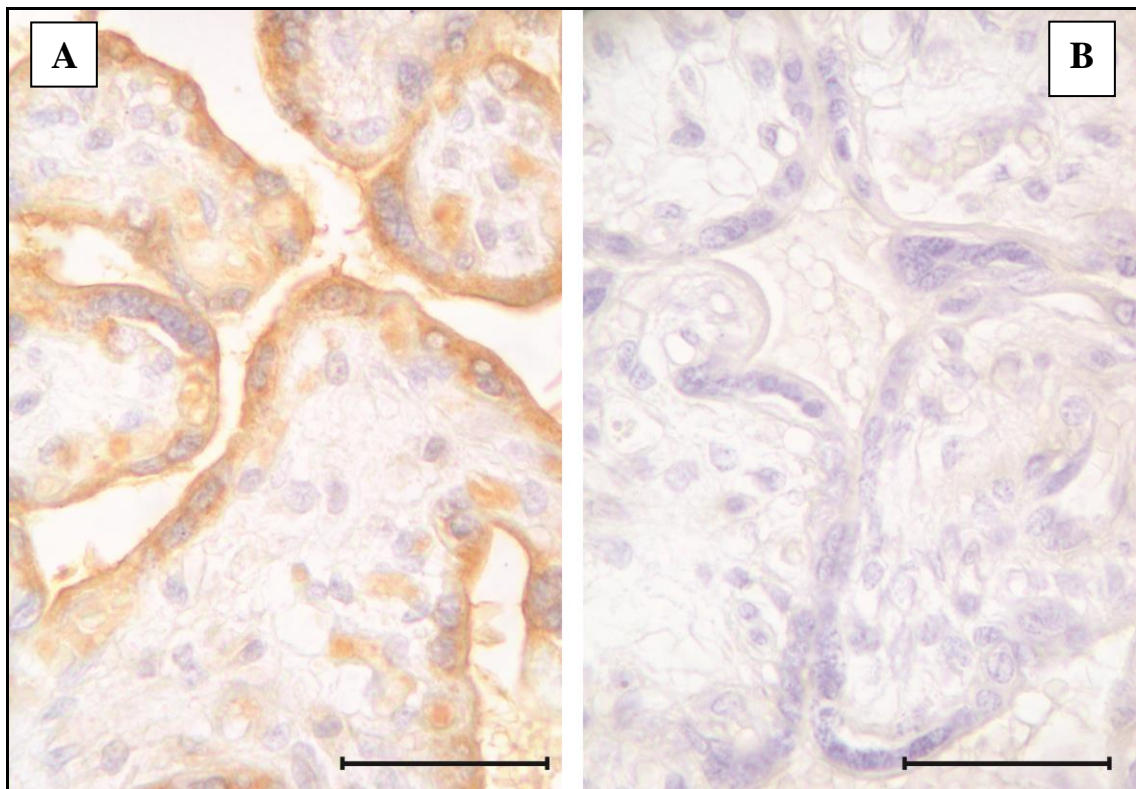
B – mikrozakrzepy w naczyniach kosmkach



C – zarastanie światła naczyń kosmków

Te same skrawki poddano reakcji immunohistochemicznej na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II. Ekspresję tego białka wykazano w zespólni komórkowej nabłonka kosmka łożyskowego (syncytiotrofoblast) zarówno w łożyskach z grupy kontrolnej (ryc. 13) jak i w łożyskach pacjentek obciążonych patologiami położniczymi (ryc. 14, 15).

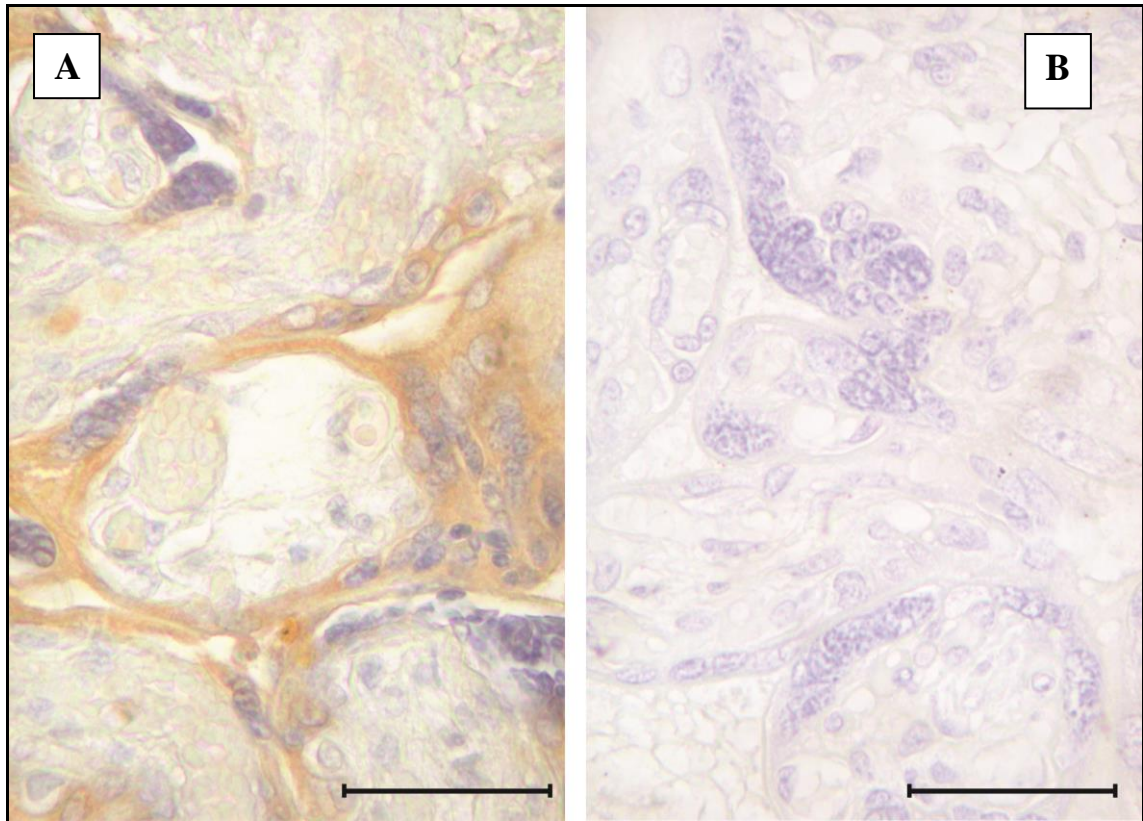
Rycina 13. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II w skrawkach łożyska od zdrowej pacjentki oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50 μ m.



A – immunoreaktywność podobna do U-II w syncytiotrofoblaście kosmka

B – skrawek kontrolny

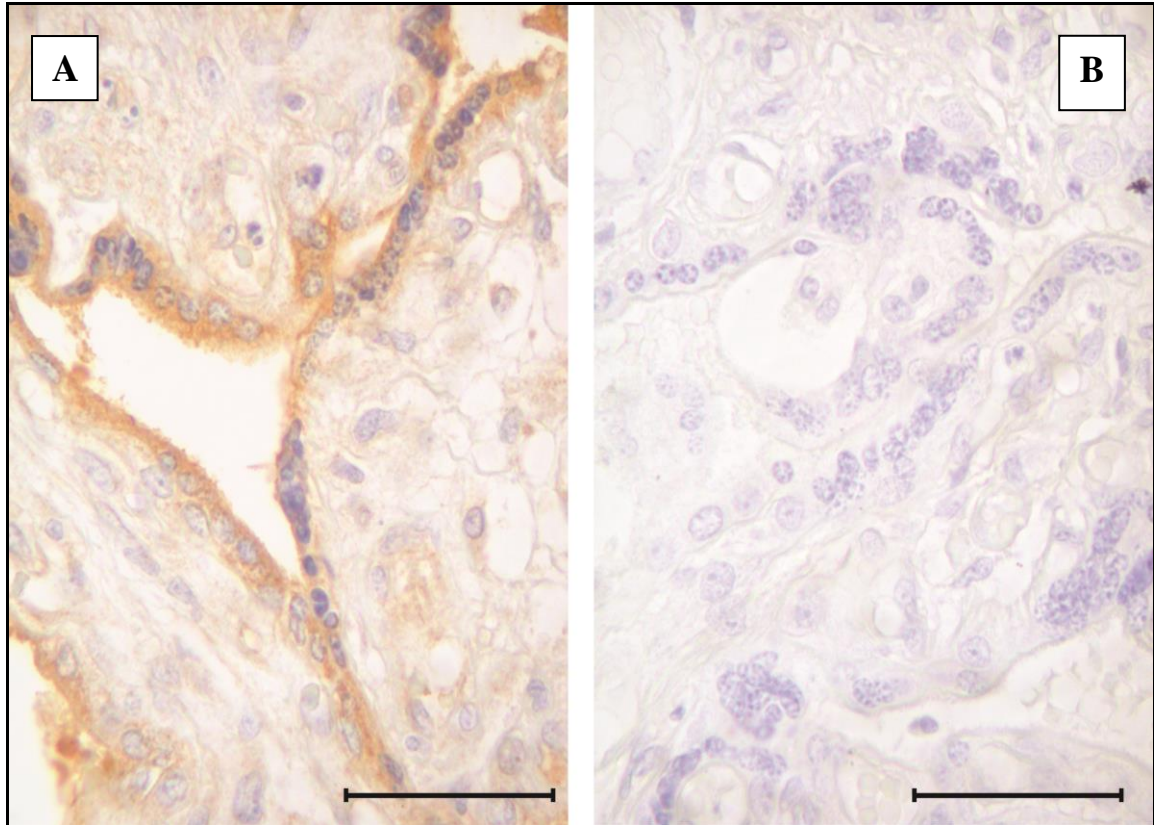
Rycina 14. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II w skrawkach łożyska od pacjentki z nadciśnieniem ciążowym oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50µm.



A – immunoreaktywność podobna do U-II w syncytiotrofoblaście kosmka

B – skrawek kontrolny

Rycina 15. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do U-II w skrawkach łożyska od pacjentki z IUGR płodu oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50 μ m.



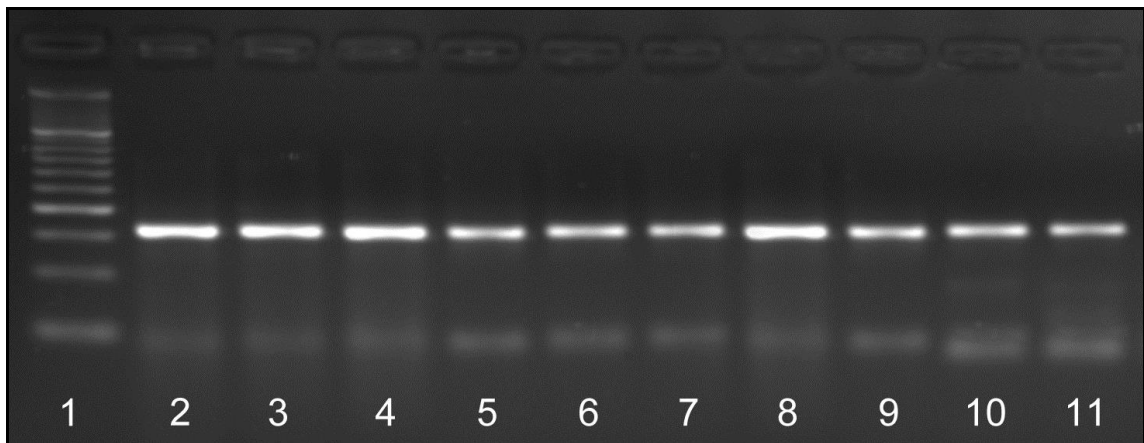
A – immunoreaktywność podobna do U-II w syncytiotrofoblaście kosmka

B – skrawek kontrolny

5.8 Analiza PCR ekspresji *U-II* oraz ekspresji *UTS2R* w łożyskach pacjentek badanych grup.

Badanie ekspresji genu urotensyny II na poziomie mRNA, przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (ang. RT-PCR reverse transcription polimerase chain reaction). Reakcja została przeprowadzona w łożyskach pobranych po porodzie pacjentek zdrowych, z nadciśnieniem ciążowym oraz z IUGR.

Rycina 16. Ekspresja genu *U-II* w łożyskach człowieka.



Produkty reakcji PCR poddano rozdzielni elektroforetycznemu na żelu agarozowym 1,2% z dodatkiem barwnika Lonza, a uwidocznione prążki sfotografowano. Primery były zaprojektowane tak, aby amplifikować fragment cDNA *U-II* o długości 160 nt. W reakcji kontrolnej z pominięciem odwrotnej transkrypcji nie uzyskano produktu, który mógłby świadczyć o niespecyficznej reakcji (na zdjęciach nie pokazano). Linie: 1 – marker mas,

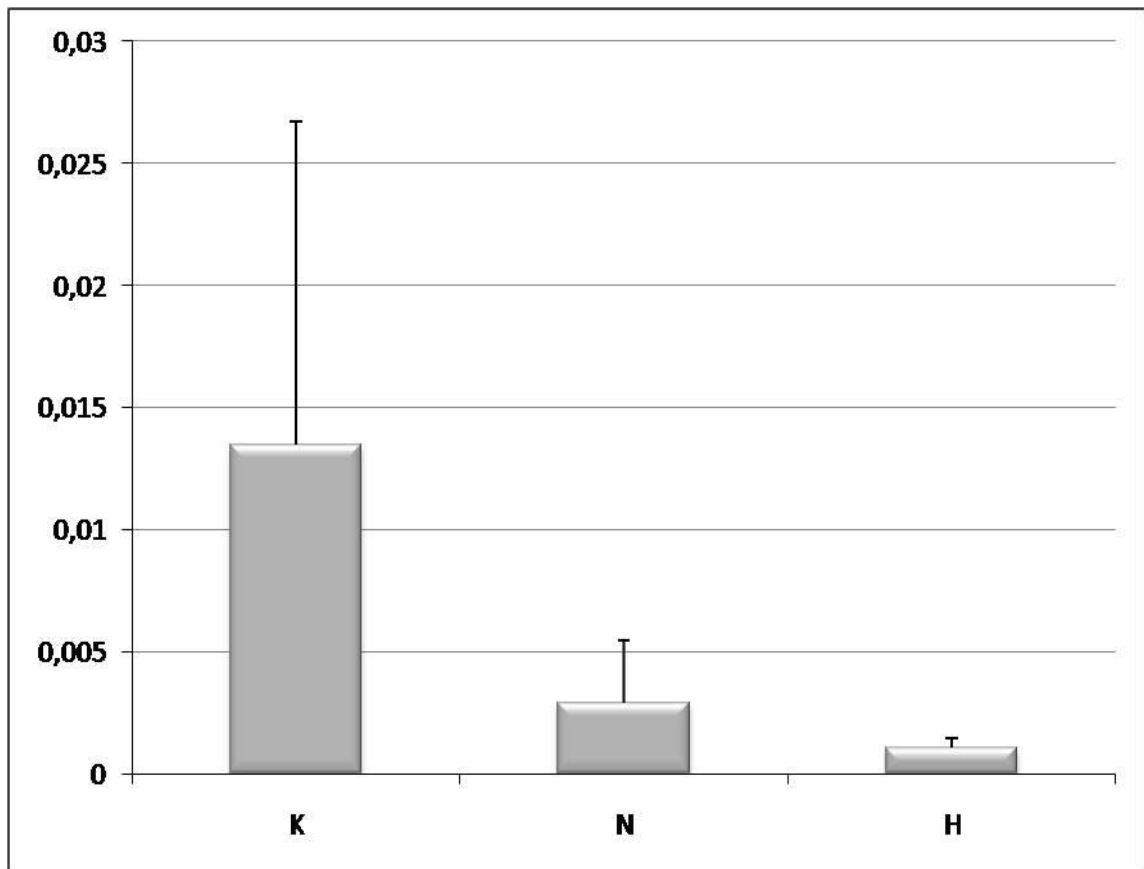
2 - 4 – łożyska od pacjentek z grupy kontrolnej

5 – 7 – łożyska od pacjentek z nadciśnieniem ciążowym,

8 – 10 – łożyska od pacjentek z IUGR

11 – kontrola pozytywna reakcji (kora nadnerczy człowieka).

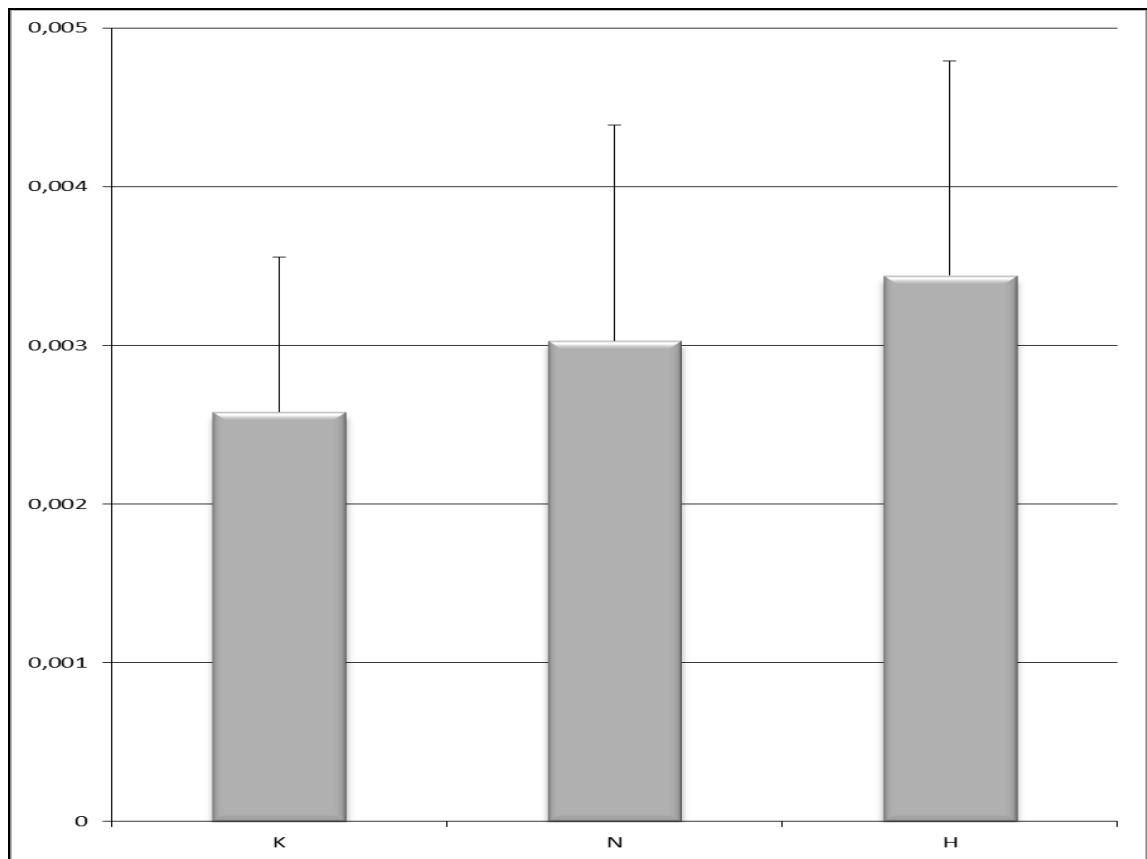
Rycina 17. Półościowa ocena ekspresji *U-II* w łóżykach badanych pacjentek.



Objaśnienia: K – grupa kontrolna, N – grupa z nadciśnieniem ciążowym, H – grupa z IUGR

Powyższy wykres przedstawia względną ekspresję *U-II* w stosunku do kontroli. Genem referencyjnym jest β 2mioglobiny (oś Y). Słupki przedstawiają względną ekspresję badanych genów w stosunku do ekspresji genu β 2mioglobiny, gdzie średnia z dwóch niezależnych odchyłeń nie jest istotna statystycznie ($p > 0,05$). W każdej grupie $n=3$.

Rycina 18. Półilościowa ocena ekspresji *UTS2R* w łożyskach badanych pacjentek.



Objaśnienia: K – grupa kontrolna, N – grupa z nadciśnieniem ciążowym, H – grupa z IUGR

Powyższy wykres przedstawia ekspresję *UTS2R* w porównaniu do kontroli. Genem referencyjnym jest β 2mioglobina (oś Y). Słupki przedstawiają względną ekspresję badanych genów w stosunku do ekspresji genu β 2mioglobiny, gdzie średnia z dwóch niezależnych odchyłeń nie jest istotna statystycznie ($p > 0,05$). W każdej grupie $n=3$.

Wyniki badań wskazują, że ekspresja *U-II* występuje w każdym łożysku. Różnice ekspresji pomiędzy badanymi grupami nie są istotne statystycznie ($p > 0,05$).

W badanych łożyskach stwierdzono słabą ekspresję *UTS2R* (ok 29 - 30 cyklu qPCR). Ilość badanego genu nie różni się statystycznie pomiędzy badanymi grupami ($p > 0,05$).

VI. Dyskusja

Urotensyna II jest czynnikiem naczyniowym, który w zależności od warunków, powoduje zarówno skurcz jak i rozkurcz naczyń krwionośnych. U pacjentów zdrowych, nieobciążonych, u których śródbłonek naczyniowy funkcjonuje prawidłowo peptyd ten wywiera działanie autokryne, między innymi pobudza on enzymy wytwarzające zarówno prostacykliny jak i tlenek azotu, które powodują rozkurcz naczynia krwionośnego.

U pacjentów obciążonych chorobami układu krążenia, wątroby, nerek, u których dochodzi do uszkodzenia śródbłonek naczyń, U-II działa parakrynnie poprzez receptor zlokalizowany na mięśniówce gładkiej ściany naczynia krwionośnego. Pobudzenie tego receptora wywołuje kaskadę zmian, w których głównymi przekaźnikami są fosfatydyloinozitol oraz triacyloglicerol powodujące skurcz naczyń krwionośnych [169,170].

Badania nad urotensyną II wykazały, że jej obecność można wykryć zarówno we krwi pacjentów zdrowych, jak i chorych. U pacjentów zdrowych stężenia U-II w surowicy wahają się w zależności od badań od 2 pg/ml do 3,6 ng/ml. Taka rozbieżność wynika z różnych metod pomiaru (RIA, ELISA, EIA), gdzie użyte przeciwciała mogą rozpoznawać nie tylko dojrzały produkt, ale również prekursor jak i niestabilne formy U-II. Sugeruje się, że stężenie U-II w surowicy jest zależne od płci i wieku, ale nie ma wystarczającej liczby badań potwierdzających tą hipotezę [205 – 207].

W obecnych badaniach (przy użyciu metody ELISA) poziom stężenia U-II w surowicy zdrowych kobiet wynosi $3,87 \pm 1,91$ pg/ml. Większość publikacji podaje wartości podobne do otrzymanych przez nas. Ze względu na to, że nie ma metaanalizy obejmującej i podsumowującej duże grupy badanych pacjentów zdrowych można przyjąć, że wartości U-II oscylujące pomiędzy 2 a 4 pg/ml są prawidłowe dla zdrowego człowieka i w zakresie takich wartości U-II może mieć działanie wazodylatacyjne [169, 208, 209].

Znaczna większość publikacji dotyczy badań nad U-II jako biomarkerem wczesnego wykrywania oraz progresji takich chorób, jak niewydolność mięśnia sercowego z

zawałem włącznie, nadciśnienia, chorób nerek, cukrzycy czy marskości wątroby. Część badań obejmuje również pacjentki ciężarne, u których wystąpił stan przedrzucawkowy lub rzucawka. W przebiegu wymienionych chorób stężenie U-II we krwi pacjentów wzrasta w znaczący sposób. Poniższa tabelka podaje przykładowe stężenia U-II w przebiegu wybranych chorób [210].

Tabela 10. Zestawienie stężeń urotensyny II [pmol/ml] w surowicy krwi w przebiegu wybranych chorób. Przedstawiono dane z Ong K.L i wsp. [210].

Choroba	Stężenie UII w surowicy krwi
Przewlekła niewydolność serca	31 pmol//ml
Ostry zespół wieńcowy	1,94 pmol//ml
Nadciśnienie tętnicze	9,29 pmol//ml
Kardiomiopatia niedokrwienna w stopniach NYHA I NYHA II NYHA III NYHA IV	1884 pmol//ml 2294 pmol//ml 4822 pmol//ml 6631 pmol//ml
Niewydolność nerek niedializowana dializowana	12,22 pmol//ml 18,33 pmol//ml
Marskość wątroby z nadciśnieniem wrotnym	1100 – 1300 pmol//ml
Cukrzyca bez proteinurii i przy prawidłowym klirensie kreatyniny	10,8 – 15,13 pmol//ml
Stan przedrzucawkowy Rzucawka	21,88 pmol//ml 10,11 pmol//ml

W naszych badaniach średnia wartość stężenia U-II w surowicy krwi matki z nadciśnieniem ciążowym wynosiła 8,46±/ - 2,04 pg/ml, a u pacjentek z IUGR płodów 8,53±/ - 1,74 pg/ml, a więc wartości te były znacznie podwyższone w stosunku do normy. Podobne zmiany obserwował Balat i wsp. u pacjentek z nadciśnieniem ciążowym [211]. W jego badaniach porównano również stężenia U-II w obrębie grupy pacjentek z nadciśnieniem ciążowym. Otrzymano wartości odpowiednio: 7,25 pg/ml dla umiarkowanego stanu przedrzucawkowego, 8,00 pg/ml dla ciężkiego stanu przedrzucawkowego oraz 9,5 pg/ml dla rzucawki. W badaniu tym nie wykazano istotnej zależności statystycznej pomiędzy badanymi podgrupami [211]. Wyniki cytowanych badań, a także późniejszej publikacji Lina i wsp. [212] są bardzo zbliżone do naszych.

Dostępne publikacje wskazują, że wpływ U-II na naczynia krwionośne uzależniony jest od stanu śródbłonka. W przypadku śródbłonka nieuszkodzonego peptyd ten wywiera głównie działanie autokrynowe, natomiast w uszkodzeniach śródbłonka naczyń krwionośnych działanie U-II związane jest z aktywacją swojego receptora prowadzącą do pobudzenia wydzielania różnorodnych czynników naczyniokurczących.

Nasze pomiary można porównać do badań prowadzonych nad chorobami naczyń i serca, gdzie stężenia U-II porównywano z wartościami ciśnienia tętniczego u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz z nadciśnieniem ciążowym [175, 205, 210]. W dostępnych publikacjach dotyczących nadciśnienia ciążowego stężenie U-II zależało od stopnia nasilenia nadciśnienia (stan przedrzucawkowy, rzucawka); im bardziej zaawansowana była postać choroby, tym wyższe stężenia U-II zostały zmierzone [211, 212]. Z powyższych publikacji wynika, że stężenie U-II w krwi matki może wykazywać zależność od ciśnieniem krwi. W naszych badaniach występuje bardzo słaba zależność pomiędzy wysokością ciśnienia tętniczego (MAP) a wzrostem stężenia U-II. Ponadto brak istotnej różnicy stężeń U-II w surowicy krwi pępowinowej pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym sugeruje, że podwyższenie stężenia U-II u chorej matki jest raczej niezależne od łożyska i płodu. To przypuszczenie popierają także wyższe stężenia U-II w krwi pępowinowej niż w krwi matczynej oraz to, że stężenia U-II we krwi pępowinowej są porównywalne pomiędzy badanymi grupami. To ostatnie spostrzeżenie sugeruje, iż U-II płodu nie przekracza bariery łożyskowo – płodowej.

Niewyjaśniona pozostaje etiopatogeneza podwyższonego stężenia U-II u matek z nadciśnieniem ciążowym i z IUGR. Cytowane wcześniej publikacje sugerują wzmożoną syntezę U-II przez uszkodzone śródbłonki naczyniowe. W tej sytuacji uzasadniona wydaje się być sugestia, iż nadciśnienie ciążowe może prowadzić do uszkodzenia śródbłonka naczyń matki, co w konsekwencji może doprowadzić do zwiększonego wydzielania przez nie U-II. W tej koncepcji stężenie U-II we krwi matki byłoby elementem wtórnym, zależnym od nadciśnienia i niedotlenienia.

W żadnym z publikowanych badań nie starano się wyznaczyć poziomu stężenia U-II, które mogłoby funkcjonować jako faktyczny biomarker służący do przewidywania

wystąpienia nadciśnienia ciążowego u pacjentek. Nasze badania obejmują takie obliczenia. Dzięki wykreśleniu krzywych ROC obliczono wartość predykcyjną dla wystąpienia nadciśnienia ciążowego oraz nadciśnienia powikłanego białkomoczem. Odpowiednio uzyskano wartość stężenia U-II 4 pg/ml dla predykcji nadciśnienia ciążowego oraz 8 pg/ml dla predykcji nadciśnienia powikłanego białkomoczem. Nie istnieje możliwość porównania naszych wartości z innymi pomiarami, nawet w odniesieniu do badań prowadzonych w zakresie chorób wewnętrznych. Jednakże jeszcze raz należy podkreślić, że stężenie UII wydaje się być elementem wtórnym do nadciśnienia ciążowego.

Obecne badania obejmowały również pomiar stężenia U-II we krwi pępowinowej pacjentek zdrowych. Wartość stężenia U-II wyniosła $23,45 \pm 7,68$ pg/ml. Można to porównać z jedyną pracą B. Ross i wsp., która mierzy wartość stężenia we krwi pępowinowej zdrowych pacjentek i jako maksymalne stężenie podaje 16,6 pg/ml [175]. I w tym przypadku jeszcze raz należy podkreślić, że stężenia U-II są znacznie wyższe, niż stężenia we krwi matki, a źródłem płodowej U-II może być łożysko.

W jednej z publikacji wysunięto hipotezę, że być może U-II jest także produkowana przez łożysko i pępowinę. Wyjaśniałoby to fakt różnicy stężeń U-II pomiędzy surowicą krwi matki oraz surowicą krwi pępowinowej. Zakłada to nieprzechodzenie U-II przez barierę łożyskową, co także sugerują wyniki naszych badań. W tej samej pracy autorzy sugerują, że aktywność metaboliczna łożyska i pępowiny jest znacznie zmniejszona w ciążach powikłanych nadciśnieniem [213].

W obecnych badaniach na podstawie analizy wyników próbowaliśmy wyznaczyć wartość stężenia U-II we krwi pępowinowej, powyżej której ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego lub białkomoczu byłoby wyższe, jednakże obliczenia okazały się nieistotne statystycznie. Nie ma również możliwości odniesienia się do piśmiennictwa, gdyż takich badań nie opublikowano w dostępnym piśmiennictwie. Cytowana publikacja [213] oraz brak możliwości odniesienia stężenia U-II we krwi pępowinowej do stopnia zaawansowania nadciśnienia tętniczego po raz kolejny sugerowałyby fakt nieprzechodzenia UII przez łożysko.

Integralną częścią dojrzałego łożyska są kosmki końcowe a prawidłowa wymiana matka – płód zależy od funkcji tętnic spiralnych dostarczających krew matki do przestrzeni międzykosmkowej oraz od stanu bariery łożyskowej. W tej ostatniej szczególne znaczenie ma prawidłowa odległość naczynia kosmkowego od przestrzeni międzykosmkowej. W prawidłowo zbudowanym kosmku w miarę starzenia się łożyska mogą odkładać się złogi włóknistego fibrynoidu. Zbyt duże nagromadzenie fibrynoidu w obrębie zrębu kosmka lub w przestrzeni okołokosmkowej zasadniczo zaburza prawidłową wymianę matka – płód. Zupełne zatarcie prawidłowej budowy kosmka może świadczyć o skrajnym niedotlenieniu kosmka i jest typowe dla zaawansowanych postaci zarówno nadciśnienia ciążowego jak i IUGR. Zmiany te powodują zaburzenia przepływu maciczno – łożyskowego i zaburzają prawidłowy rozwój płodu. Opisywane zmiany w naczyniach i podścielisku łożyska odpowiadają za zmniejszenie powierzchni wymiany między ciężarną a płodem i nasilają się wraz z czasem trwania ciąży. [214 – 218].

Jednym z głównych czynników wywołującym nadciśnienie ciążowe jest nieprawidłowa inwazja trofoblastu w tętnice spiralne, która powoduje niewłaściwy remodeling tych tętnic. Nieprawidłowe zmiany w przebudowie tętnic spiralnych powodują w efekcie wzrost oporu tych tętnic i zmniejszenie przepływu [219]. Zmniejszony przepływ krwi powoduje niedokrwienie, niedotlenienie łożyska. Niedotlenienie organu jakim jest łożysko powoduje nadmierną produkcję wazoaktywnych peptydów, które mogą wywoływać szereg różnorodnych reakcji w obrębie nabłonka naczyń krwionośnych, które między innymi prowadzą do zwiększonej produkcji endoteliny, tromboksanu, zwiększonej wrażliwości naczyń na angiotensynę II oraz zmniejszonej produkcji tlenku azotu i prostacyklin. Wymienione nieprawidłowości prowadzą do wystąpienia nadciśnienia ciążowego. W opisanych warunkach zwiększa się również wytwarzanie urotensyny II, czynnika który w warunkach uszkodzonego endotelium ma działanie naczyniokurczące porównywalne, a nawet opisywane jako silniejsze niż endotelina [220 – 222].

W naszych badaniach prześledzono także ekspresję *U-II* (na poziomie mRNA i białka) oraz jej receptora (na poziomie mRNA) w łożyskach badanych grup kobiet. W tym aspekcie w dostępnym piśmiennictwie tylko grupa Gould'a i wsp. [223] przeprowadziła porównywalne badania. W przeprowadzonych przez nas badaniach ekspresję *U-II*

zarówno na poziomie mRNA jak i białka obserwowano we wszystkich badanych łożyskach. Białkowy produkt tego genu zlokalizowany jest głównie w syncytiotrofoblaście. Ponadto qPCR nie wykazał różnic w poziomach ekspresji badanego genu w łożyskach kontrolnych, łożyskach od pacjentek z nadciśnieniem ciążowym i w łożyskach od pacjentek z IUGR. Podobnie nie wykazano różnic w ekspresji *UTS2R* w badanych łożyskach. We wszystkich przypadkach ekspresja tego genu była bardzo niska (do 30 cyklu qPCR).

Należy zaznaczyć, że wspomniana grupa [223] nie wykazała ekspresji *U-II* łożyskach normalnych oraz z nadciśnieniem ciążowym. W cytowanych badaniach w przeciwieństwie do *U-II*, ekspresja *UTS2R* na poziomie mRNA i białka była znacznie wyższa w łożyskach z nadciśnieniem. Receptor ten zidentyfikowano także w liniach komórek BeWo (komórki syncytiotrofoblastu) oraz HUVECs (komórki śródbłónka naczyń pępowinowych). Dodanie do tych hodowli *U-II* wywoływało zwiększenie ekspresji *UTS2R* w komórkach BeWo ale nie w linii komórek HUVECs. Te wyniki sugerują, że receptor *U-II* występuje w syncytiotrofoblaście i ulega „upregulation”.

Istnieją także obserwacje nad immunoreaktywnością *U-II* oraz nad immunoreaktywnością jej receptora w naczyniach łożysk zarówno zdrowych jak i obciążonych patologiami położniczymi [223 – 225]. Ich występowanie w naczyniach łożyska autorzy w różnorodny sposób wiążą z nadciśnieniem ciążowym.

Istnieje hipoteza, że podczas uszkodzenia śródbłonek naczyń, jakie ma miejsce w etiopatogenezie nadciśnienia ciążowego dochodzi do wzrostu wrażliwości na krążącą *U-II* poprzez zwiększenie ilości receptorów *U-II* w syncytiotrofoblaście w mechanizmie zwanym „upregulation”. W badaniu prowadzonym na ten temat udowodniono, że ekspresja receptora *U-II* (na poziomie mRNA i białka) była istotnie statystycznie wyższa w łożyskach powikłanych nadciśnieniem ciążowym, niż w łożyskach zdrowych. W związku z tym, że wiązanie urotensyny z jej receptorem jest praktycznie nieodwracalne, w tej samej pracy wysunięto hipotezę, iż znacznie większe znaczenie dla efektu działania *U-II* jest zwiększenie liczby receptorów, niż zwiększenie stężenia *U-II* w surowicy [223].

Kolejne publikacje wskazują na fakt, że ekspresja receptora urotensyny, w warunkach niedotlenienia może być regulowana przez HIF (hypoxia – inducible factor), którego

wzrost jest bardzo dobrze udokumentowany w narządach pacjentów ze stanem przedrzucawkowym [223; 226 - 228].

Hipoteza ta nie została potwierdzona się w naszych badaniach. Badanie PCR wykazuje słabą ekspresję genu receptora UII, na podstawie której nie można potwierdzić zjawiska „upregulation”.

W kontekście powyższej dyskusji należy podkreślić, że obecne badania nie potwierdzają sugestii o zwiększeniu ekspresji receptorów UTS2R w łożyskach zarówno od pacjentek z nadciśnieniem ciążowym jak i od pacjentek z IUGR.

Nie ma możliwości odniesienia się do literatury jeśli chodzi o pomiary stężeń U-II w surowicy krwi matki oraz krwi pępowinowej w grupie z IUGR, gdyż nie prowadzono badań nad pacjentkami, których dzieci wykazywały wewnątrzmaciczne zaburzenia wzrastania bez innych patologii. Nasze badania wykazały, że istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy stężeniem U-II we krwi pacjentek z grupy kontrolnej i pacjentek z IUGR. Taka różnica nie istnieje w odniesieniu do pomiarów stężenia U-II we krwi pępowinowej. Nie istnieje również statystycznie potwierdzona różnica pomiędzy stężeniem UII w surowicy krwi pacjentek w stosunku do stężeń UII w surowicy krwi pępowinowej. W przypadkach IUGR obecne badania wykazały w łożyskach zarówno ekspresję *U-II* w nabłonku kosmka łożyskowego oraz słabą ekspresję *UTS2R*. Nie ma możliwości porównania naszych badań z innymi pracami, gdyż nie istnieją publikacje opisujące występowanie UII oraz jej receptora w łożyskach pacjentek z IUGR.

Bezspornym faktem jest, że stężenie urotensyny II istotnie wzrasta w przebiegu nadciśnienia ciążowego. Obserwowany wzrost stężenia może być związany z nasileniem powikłania nadciśnienia ciążowego jakim jest białkomocz. Odnosząc się do dostępnych publikacji można rozważyć, czy podanie palosuranu tj. antagonisty U-II mogłoby zmniejszyć jej szkodliwe działanie na śródbłoni naczyń zmniejszając skalę powikłań. Jednakże nie ma dostępnych badań nad bezpieczeństwem podania tego związku ciążarnym. Nie wiadomo, czy palosuran przechodzi przez łożysko oraz czy oprócz blokowania receptora UTS2R nie będzie wpływał na gospodarkę węglowodanową oraz lipidową płodu.

W patogenezie zaburzeń wewnątrzmacicznego wzrastania płodów znaczenie urotensyny II nie jest zbadane. Nie mamy wielu odnośników w piśmiennictwie i nie wiemy w jaki sposób UII wpływa na naczynia matek płodów z IUGR ani też jakie zniszczenia UII może powodować w naczyniach samych płodów.

Odpowiedź na te pytania wymaga dalszych badań nad działaniem biologicznym UII w patologii ciąży.

VII. Wnioski

1. Wyniki przeprowadzonych badań nad rolą urotensyny II w etiologii nadciśnienia ciążowego i hipotrofii płodu wskazują, że peptyd ten nie jest pierwotną przyczyną badanych jednostek chorobowych.
2. Uzyskane wyniki wskazują, iż zmiany w stężeniu U-II w krwi matki i w krwi pępowinowej są od siebie niezależne, co sugeruje nieprzechodzenie U-II przez barierę łożyskową.
3. Podwyższone stężenia U-II w surowicy pacjentek z nadciśnieniem ciążowym oraz z IUGR może wskazywać na niedotlenienie i uszkodzenie śródbłonna występujące w przebiegu wymienionych patologii położniczych.
4. Stężenie urotensyny II 4pg/ml w surowicy krwi ciężarnych może wskazywać na ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego. Wartość 8pg/ml może być wskaźnikiem predykcijnym wystąpienia białkomoczu u pacjentek ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym.
5. Ekspresja systemu *U-II* i jej receptora, oceniana na poziomie mRNA i białka, w łożyskach pacjentek z nadciśnieniem ciążowym oraz z IUGR nie różni się w sposób znaczący w porównaniu z grupą kontrolną.

VIII. Streszczenie

Urotensyna II (U-II) po raz pierwszy została wyizolowana w 1969 z ogonowego układu neurosekrecyjnego ryb kostnoszkieletowych (*Gillichthys mirabilis*). W czasie ponad 40 lat badań obecność U-II potwierdzono u ssaków, w tym u człowieka. Urotensyna II jest 11 – aminokwasowym, cyklicznym polipeptydem kodowanym przez gen zlokalizowany na chromosomie 1p36. Powstaje z peptydu prekursorowego prepro – urotensyny II w wyniku proteolitycznego działania enzymu konwertującego urotensynę. Aktywność biologiczna U-II związana jest z konserwatywnym heksapeptydowym fragmentem C – końcowym, którego sekwencja jest wspólna dla ryb i ssaków; o specyficzności gatunkowej decyduje fragment N – końcowy U-II.

Ekspresję urotensyny II wykryto w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, mięśnia sercowego, nerek, ośrodkowego układu nerwowego, przysadki mózgowej, nadnerczy, tarczycy, grasicy, jelit, śledziony oraz łożyska. Jej obecność wykryto także w blaszkach miażdżycowych, w leukocytach i makrofagach.

Dzięki badaniom obejmującym wiele dziedzin medycyny zmiany stężenia urotensyny II wykazano w przypadku wystąpienia różnych chorób w tym: w chorobie niedokrwiennej serca, ostrym zespole wieńcowym, nadciśnieniu tętniczym, marskości wątroby, dysfunkcji nerek, cukrzycy, stanie przedrzucawkowym i rzucawkowym.

Celem pracy jest pomiar stężenia urotensyny II we krwi pacjentek i we krwi pępowinowej pobranej po porodzie od pacjentek zdrowych, obciążonych nadciśnieniem ciążowym oraz od kobiet u których płodów stwierdzono IUGR. Dodatkowo celem pracy jest próba wyznaczenia wartości stężenia U-II, która mogłaby wskazywać na ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

Ponadto w pracy oceniano ekspresję genu urotensyny II oraz genu receptora UTS2R metodą PCR a także potwierdzano obecność białka U-II metodą immunohistochemiczną w łożyskach zdrowych ciężarnych oraz ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym i IUGR.

Grupę badaną stanowiło 80 pacjentek hospitalizowanych w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety oraz w Oddziale Porodowym GPSK w Poznaniu w 2009 roku. Pacjentki podzielono na 3 grupy: 38 zdrowych pacjentek o prawidłowym przebiegu ciąży, które stanowiły grupę kontrolną, 30 pacjentek u których zdiagnozowano

nadciśnienie ciążowe, 12 zdrowych pacjentek u płodów których rozpoznano zaburzenia wzrastania wewnątrzmacicznego.

W przeprowadzonych badaniach stężenia urotensyny II oznaczane w surowicy krwi badanych pacjentek różnią się znacząco pomiędzy grupami. Średnie stężenie U-II w grupie kontrolnej wyniosło $3,87 \pm 1,91$ pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym $8,46 \pm 2,04$ pg/ml, a w grupie pacjentek z IUGR $8,53 \pm 1,74$ pg/ml. Poziomy stężen poddano analizie statystycznej, która wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy wartościami U-II w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy z nadciśnieniem ciążowym oraz z IUGR. Nie wykazano natomiast istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniami U-II w grupie z nadciśnieniem oraz IUGR ($p > 0,05$). Wykazano, że wartość predykcyjna stężenia U-II w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 4 pg/ml (95% przedział ufności $> 0,5$, AUC 0,89). Określono, że wartość predykcyjna stężenia U-II dla ryzyka wystąpienia białkomoczu wynosi 8 pg/ml (95% przedział ufności $> 0,5$, AUC 0,86)

Pomiar stężenia U-II w surowicy krwi pępowinowej wynosi odpowiednio $23,45 \pm 7,68$ pg/ml w grupie kontrolnej, $24,54 \pm 7,02$ pg/ml w grupie z nadciśnieniem ciążowym, $23,77 \pm 8,2$ pg/ml w grupie z IUGR. Analiza statystyczna nie wykazała istotnej różnicy pomiędzy badanymi grupami.

Obecność U-II, oznaczana metodą immunohistochemiczną, potwierdza jej koncentrację w komórkach nabłonka kosmków łożysk we wszystkich trzech badanych grupach.

Ekspresja *U-II* oraz *UTS2R* oceniona metodą PCR wskazuje na występowanie genu urotensyny II jak i jej receptora w każdym łożysku, zarówno u pacjentek zdrowych, jak i obarczonych patologiami położniczymi.

Summary

Urotensin II (U-II) was isolated for the first time in 1969 from the urophysis, a neurosecretory organ located in the caudal portion of the spinal cord of teleost (*Gillichthys mirabilis*). During 40 years of examination, presence of U-II has been confirmed in mammals and human. Urotensin II is 11 aminoacids, cyclic peptide, code by gen localized at 1 p 36 chromosome. It is produced from pre pro urotensin by proteolic converted urotensin enzyme to cyclic form. Biological activity depends on 6 peptides C-end which sequence is similar for fish and mammals. Specific for spice is N-end of U-II. U-II is expressed in endothelium, hearth muscle, kidneys, thyroid gland, thymus gland, intestines, spleen and placenta. It's present also in artherosclerotic plates, leukocytes and macrophages.

Thanks to many researches concerning U-II, elevated concentration of urotensin II was found in ischemic heart disease, acute myocardial syndrome, persistent hypertension, cirrhosis hepatitis, renal disfunction, in preeclampsia end eclampsia.

The aim of the study was to measure the concentration of urotensin II in blood serum and umbilical blood taken after the delivery. We measured this concentration at healthy patients and pregnant patients with hypertension or IUGR. The additional aim was to assess the specific U-II concentration that could be a risk marker of gestational hypertension.

We also analyzed the *U-II* gene and *UTS2R* gene expression by PCR and confirmed the presence of U-II by immunohistochemic methods in healthy placentas and placentas taken from patient with gestational hypertension and IUGR.

Study group involved 80 patients hospitalized in Perinatology and Women's Disease Department and in Delivery Ward of Obstetric - Gynecological Hospital in Poznan in 2009. Patients was divided into three groups: 38 healthy patients with uncomplicated course of pregnancy – control group; 30 patients with gestational hypertension and 12 patients with IUGR.

Average concentration of U-II in blood serum of healthy patients was 3.87 ± 1.91 pg/ml, in gestational hypertension group – 8.46 ± 2.04 pg/ml and respectively in IUGR group was 8.53 ± 1.74 pg/ml . The differences in U-II concentration between examined groups

were statistically significant. There was no statistical significant differences between gestational hypertension group and IUGR group ($p>0.05$).

We noticed that predictive value of U-II concentration for risk of gestational hypertension is 4pg/ml (95% criterion value >0.5 , AUC 0.89). Predictive value of U-II concentration for risk of proteinuria is 8pg/ml (95% criterion value >0.5 , AUC 0.86).

Concentration of U-II in umbilical blood serum was respectively 7.68 pg/ml in control group, 24.54 ± 7.02 pg/ml in gestational hypertension group and 23.77 ± 8.2 pg/ml in IUGR group. There were no statistically significant differences between examined groups.

Concentration of U-II assessed by immunohistochemic methods was found in all three group placentas.

PCR found expression of *U-II* gene and *UTS2R* gene in all examined placentas from all three groups.

IX. Piśmiennictwo

1. Szczepaniak – Chicheł L., Ropacka M. Zmiany adaptacyjne w układzie krążenia kobiety w czasie ciąży. W: Bręborowicz G, Tykarski A. (red.). Choroby układu krążenia a ciąża. Ośrodek Wydawnictw Naukowych Poznań 2007; 21 - 29.
2. Kempniak J. Zmiany ustrojowe w przebiegu ciąży. W: Bręborowicz G. (red.): Położnictwo i Ginekologia PZWL Warszawa 2005; t. 1, 41 – 45.
3. Kawecka – Jaszcz K., Lubaszewski W. Nadciśnienie tętnicze w ciąży. *Przew Lek* 2003; 1: 120 - 124.
4. Chapman A. B., Abraham W. T, Zamudio S. et al. Temporal relationship between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998; 54: 2056 – 2063.
5. Venkatesha S., Toporsian M., Lam C. et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia, *Nat Med* 2006; 12: 642 – 649.
6. Ramma W., Ahmed A., Is inflammation the cause of preeclampsia? *Biochem Soc Trans* 2011; 39: 1619 – 1627.
7. Edouard D. A., Pannier B. M., London G. M. et al. Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ* 1998; 274: 1605 – 1612.
8. Poppas A., Shroff S. G., Korcarz C. E. et al. Serial assesment of the cardiovascular system in normal pregnancy. Role of arterial compliance and pulsatile arterial load. *Circulation* 1997; 95: 2407 – 2415.
9. Curran – Everett D., Morris K. G., Moore L.G. Regional circulatory contributions to increased systemic vascular conductance in pregnancy. *Am J Physiol* 1991; 261: 1842 – 1847.
10. Schneider R. Zmiany zachodzące w organizmie kobiety pod wpływem ciąży. W: G. Martius i wsp. (red.) *Ginekologia i Położnictwo*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004; p. 71.
11. Ayala D. E., Hermida R. C. Mojon A. et al. Circadian blood pressure variability in healthy and complicated pregnancies. *Hypertension* 1997; 30: 603 - 610.
12. Jwa S.C., Arata N., Sakamoto N. et al. Prediction of pregnancy-induced hypertension by a shift of blood pressure class according to the JSH 2009 guidelines. *Hypertens Res*. 2011; 34: 1203 - 8.

13. Ochszenbein – Kolble N., Roos M., Gasser T. et al. Cross sectional study of automated blood pressure measurements throughout pregnancy. *BJOG* 2004; 111: 319 - 325.
14. National High Blood Pressure Education Program (USA) – aktualny raport: Podwyższone ciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży. *Med Prakt* 2001; 4: 39 - 65.
15. Gifford R. W., August P. A., Cunningham G. et al. Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1 – 22.
16. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Pre-eclampsia – study group consensus statement. Available from: <http://www.rcog.org.uk/womens-health/clinical-guidance/pre-eclampsia-study-groupconsensus-statement>. Accessed June 8, 2011.
17. Douglas K., Redman C. Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ* 1994; 309: 1395 – 1400.
18. WHO international collaborative study of hypertensive disorders of pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 80 - 83.
19. Crowther C. A. Eclampsia at Harare maternity hospital. An epidemiological study. *S Afr Med J* 1985; 68: 927 – 929.
20. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Preeclampsia and Eclampsia, WHO Department of Maternal and Child Health, Geneva, Switzerland, 2011.
21. Roberts J. M., Redman C. W. G. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447 – 1451.
22. Moodley J. Maternal deaths associated with hypertensive disorders of pregnancy: a population-based study. *Hypertens Pregnancy* 2004; 23: 247 – 256.
23. Bergstrom S., Povey G., Songane F. et al. Seasonal incidence of eclampsia and its relationship to meteorological data in Mozambique. *J Perinat Med* 1992; 20: 153 – 158.
24. Sibai B. M., Caritis S., Hauth J. Risks of preeclampsia and adverse neonatal outcomes among women with pregestational diabetes mellitus. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 182: 364 – 369.

25. Steinberg G, Khankin E. V., Karumanchi S. A. Angiogenic factors and preeclampsia. *Thromb Res* 2009; 123: 93 – 99.
26. Zhang J., Zeisler J., Hatch M. C. et al. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 218 - 232.
27. Young B. C., Levine R. J., Karumanchi S. A. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010; 5: 173 – 192.
28. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330: 565.
29. Ghulmiyyah L., Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol* 2012; 36: 56 – 59.
30. MacGillivray I. Pre-eclampsia. The hypertensive disease of pregnancy. London: WB Saunders, 1983.
31. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 130 – 137.
32. Sibai B, Lindheimer M, Hauth J, et al. Risk factors for preeclampsia, abruption placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. *N Engl J Med* 1998; 339: 667 – 671.
33. Hui D., Okun N., Murphy K. et al. Combinations of maternal serum markers to predict preeclampsia, small for gestational age, and stillbirth: a systematic review. *J Obst Gyn* 2012; 34: 142 – 153.
34. Conde-Agudelo A., Althabe F., Belizan J. M. et al. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:1026 – 1035.
35. Clifton V. L., Stark M. J., Osei-Kumah A. et al. Review: the feto-placental unit, pregnancy pathology and impact on long term maternal health. *Placenta*, 2012; 33: 37 – 41.
36. Eiland E., Nzerue C., Faulkner M. Preeclampsia 2012. *J Pregnancy*. 2012; 2012: 586578.
37. Osungbade O. K., Ige O. K. Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *J Pregnancy* 2011; 2011: 481095.
38. Odibo A. O., Zhong Y., Goetzinger K. R. et al. First-trimester placental protein 13, PAPP-A, uterine artery Doppler and maternal characteristics in the prediction of preeclampsia. *Placenta* 2011; 32: 598 – 602.

39. Jung J. J., Tiwari A., Inamdar S. M. et al. Secretion of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR1/sFlt1) requires Arf1, Arf6, and Rab11 GTPases. *PLoS One*. 2012; 7: 44572.
40. Rolfo A. Pre-eclampsia: Serum sFlt-1 and PlGF levels can be used to distinguish between CKD and pre-eclampsia in pregnant women. *Nat Rev Nephrol* 2012;13: 680.
41. Wang D., Song W., Na Q. The emerging roles of placenta-specific microRNAs in regulating trophoblast proliferation during the first trimester. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2012; 52: 565 -570.
42. Wu L., Zhou H., Lin H. et al. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction*. 2012; 143: 389 - 397.
43. Moslemi Zadeh N., Naghshvar F., Peyvandi S. et al. PP13 and PAPP-A in the First and Second Trimesters: Predictive Factors for Preeclampsia? *Obstet Gynecol* 2012; 2012: 263871.
44. Weed S., Bastek J. A., Anton L. et al. Examining the correlation between placental and serum placenta growth factor in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207: 140.- 146.
45. Rohra D. K., Zeb A., Qureishi R. N. et al. Prediction of pre-eclampsia during early pregnancy in primiparas with soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor. *Natl Med J India* 2012; 25: 68 - 73.
46. Baschat A. A., Kasdaglis T. L., Aberdeen G. W. et al. Serum pentraxin-3 levels at 11 to 14 weeks' gestation: association with maternal and placental characteristics. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 201: 298 e1 – 298 e6.
47. Dynon K., Heng S., Puryer M. et al. HtrA3 as an Early Marker for Preeclampsia: Specific Monoclonal Antibodies and Sensitive High-Throughput Assays for Serum Screening. *PLoS One*. 2012; 7: 45956.
48. Li Y., Puryer M., Lin E. et al. Placental HtrA3 is regulated by oxygen tension and serum levels are altered during early pregnancy in women destined to develop preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 403 - 411.
49. Rana S., Cerdeira A. S., Wenger J. et al. Plasma Concentrations of Soluble Endoglin versus Standard Evaluation in Patients with Suspected Preeclampsia. *PLoS One*. 2012; 7: 48259.

50. Spencer K., Cowans N. J., Chefetz I. et al. First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 29:128 – 134.
51. Romero R., Kusanovic J. P., Than N. G. et al. First-trimester maternal serum PP13 in the risk assessment for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 122 e1 – 122 e11.
52. Akolekar R., Syngelaki A., Beta J. et al. Maternal serum placental protein 13 at 11-13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat Diagn* 2009; 29: 1103 – 1108.
53. Clifton V. L., Stark M. J., Osei-Kumah A. et al. Review: the feto-placental unit, pregnancy pathology and impact on long term maternal health. *Placenta* 2012; 33: 37 – 41.
54. McDonald S. D., Malinowski A., Zhou Q. et al. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J* 2008; 156: 918 – 930.
55. Redman C. W. Sacks G. P., Sargent I. L., Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obst Gynecol* 1999; 180: 499 – 506.
56. Szarka A., Rig J., L'azar L, et al. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010; 11: 59.
57. Sharma A., Satyam A. Sharma J. B. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF- α , IL-6 and IL-8) in preeclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 21 – 30.
58. Aggarwal P. K., Chandel N., Jain V., The relationship between circulating endothelin-1, soluble fmslike tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in preeclampsia *J Hum Hypertension* 2011; 26: 236 – 241.
59. Henriksen T. Absence of enhanced systemic inflammatory response at 18 weeks of gestation in women with subsequent pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109: 759 – 764.
60. George E. M., Granger J. P. Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. *Am J Hypertens* 2011; 249: 964 – 969.
61. Sandrim V. C., Palei A. C. T., Metzger I. F. Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. *Hypertension* 2008; 52: 402 – 407.

62. Chen Q., Chen L., Liu B. et al. The role of autocrine TGF β 1 in endothelial cell activation induced by phagocytosis of necrotic trophoblasts: a possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Journal Pathol* 2010; 221: 87 – 95.
63. Redline R. W. Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta* 2008; 29: 86 – 91.
64. Hertig A., Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2010; 11: 21 - 22
65. Goeschen K., Henkel E., Behrens O. Plasma prostacyclin and thromboxane concentrations in 160 normotensive, hypotensive, and preeclamptic patients during pregnancy, delivery, and the postpartum period. *J Perinat Med* 1994; 22: 481 – 489.
66. Wang Y., Zhang Y., Canzoneri B. J. et al. Prostacyclin and thromboxane levels in women with severe preeclampsia undergoing magnesium sulfate therapy during antepartum and postpartum periods. *Hypertens Pregnancy* 2008; 27: 17 - 27.
67. Okawara M., Seki H., Matsuoka K. et al. Examination of the expression of cyclooxygenase – 2 in placenta villi from suffers of pregnancy induced hypertension. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 2053 - 2056.
68. Roland L., Gagné A., Bélanger M. C. Existence of compensatory defense mechanism against oxidative stress and hypertension in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2010; 29: 21 - 37.
69. Roberts J. M., Cooper D. W. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet*. 2001; 357: 53 – 6.
70. Lyell D. J., Lambert-Messerlian G. M., Giudice L. C. Prenatal screening, epidemiology, diagnosis, and management of preeclampsia. *Clin Lab Med* 2003; 23: 413 – 442.
71. Serrano N. C., Casas J. P, D'iaz L. A. et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension* 2004; 44: 702 – 707.
72. Masoura S., Kalogiannidis I. A., Gitas G. et al. Biomarkers in pre-eclampsia: a novel approach to early detection of the disease. *J Obstet Gynaecol* 2012; 32: 609 - 616.
73. Mutter W. P., Karumanchi S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia.. *Microvasc Res* 2008; 75: 1 - 8.
74. van der Graaf A. M., Toering T. J., Faas M. M. et al. From preeclampsia to renal disease: a role of angiogenic factors and the renin-angiotensin aldosterone system. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 51 – 55.

75. Roberts J. M., Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 2012; 1: 72 - 83.
76. Fyles A., Milosevic M., Hedley D. et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 680 - 687.
77. Brown J. M. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 2003; 179: 801 – 811.
78. Huang L. E., Willmore W. G., Gu J. et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 9038 – 9044.
79. Sibai B., Dekker G., Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365: 785 – 799.
80. Dietl J. The pathogenesis of pre-eclampsia: new aspects. *J PerinatMed* 2000; 28: 464 – 471.
81. Eskenazi B., Fenster L., Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for pre-eclampsia. *JAMA* 1991; 266: 237 – 241.
82. Kestlerová A., Feyereisl J., Frisová V. et al Immunological and biochemical markers in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2012; 96: 90 - 94.
83. Dasgupta C., Chen M., Zhang H. et al. Chronic hypoxia during gestation causes epigenetic repression of the estrogen receptor- α gene in ovine uterine arteries via heightened promoter methylation. *Hypertension* 2012; 60: 697 - 704.
84. Pennington K. A., Schlitt J. M., Jackson D. L, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech* 2012; 5: 9 - 18.
85. Aquilina J., Harrington K. Pregnancy hypertension and uterine artery Doppler ultrasound. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1996; 8: 435 - 440.
86. Brozos C., Mavrogianni V. S., Fthenakis G. C. Treatment and control of periparturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2011; 27: 105 - 113.
87. Caniggia I., Winter J., Lye S. J. et al. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of preeclampsia. *Placenta* 2000; 21: 25 - 30.
88. Craven C. M., Morgan T., Ward K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 1998; 19: 241 - 252.
89. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330: 565.

90. Hunkapiller N. M., Fisher S. J. Chapter 12. Placental remodeling of the uterine vasculature. *Methods Enzymol* 2008; 445: 281 - 302.
91. Li L., Obinata M., Hori, K. Role of peroxiredoxin III in the pathogenesis of pre-eclampsia as evidenced in mice. *Oxid. Med. Cell. Longev* 2010; 3: 71 - 73.
92. Levine R. J., Maynard S. E., Qian C. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med* 2004; 350: 672 - 683.
93. Dekker G., Robillard P. Y. Pre-eclampsia: is the immune mal-adaptation hypothesis still standing? An epidemiological update. *J Reprod Immunol* 2007; 76: 8 – 16.
94. Kanasaki K., Palmsten K., Sugimoto H. et al. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008; 453: 1117 - 1121.
95. Maynard S. E., Min J. Y., Merchan J. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin Invest* 2003; 111: 649 - 658.
96. Kaufmann P., Black S. Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69: 1 - 7.
97. Mess A., Zaki N., Kadyrov M. et al. Caviomorph placentation as a model for trophoblast invasion. *Placenta* 2007; 28: 1234 - 1238.
98. Redman C. W., Sargent I. L. Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol* 2010; 63: 534 - 543.
99. Roberts J. M., Hubel C. A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009; 30: 32 - 37.
100. Robertson S. A., Guerin L. R., Bromfield, J. J. et al. Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod* 2009; 80: 1036 - 1045.
101. Wu F. T., Stefanini M. O., Mac Gabhann T. et al. A systemsbiology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 528 - 552.
102. Venkatesha S., Toporsian M., Lam, C. et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12: 642 - 649.
103. McDonald S. D., Malinowski A., Zhou Q., S et al. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J* 2008; 156: 918 – 930.

104. Vikse B. E., Irgens L. M. , Leivestad T., et al. Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 800 – 809.
105. Ahmad A, Samuelsen S. Hypertensive disorders in pregnancy and fetal death at different gestational lengths: a population study of 2 pregnancies. *BJOG* 2012; 119: 1521 - 1528.
106. Ray J. G., Burrows R. F., Burrows E. A. et al. Outcome study of hypertension in pregnancy. *Early Hum Dev* 2001; 64: 129 – 143.
107. Berg C. J., Mackay A. P., Qin C. et al. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. *Obstet Gynecol* 2009; 113: 1075 - 1081.
108. American College of Obstetricians and Gynecologists practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77: 67 - 75.
109. Wagner, M. What every midwife should know about ACOG and VBAC. Critique of ACOG Practice Bulletin #5, July 1999. Vaginal birth after previous cesarean section. *Midwifery Today Int. Midwife* Fall 2001; 41 - 43.
110. Sibai B. M. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 981 - 991.
111. Kennedy D. A., Woodland C., Koren G. Lead exposure, gestational hypertension and pre-eclampsia: a systematic review of cause and effect. *J Obstet Gynaecol.* 2012;Aug; 2(6):512-7.
112. World Health Organisation. Public health aspects of low birth weight. Third report of the Expert Committee on Maternal and Child Health. *WHO Tech Report Serv* 1961; 217: 13.
113. Węgrzyn P., Kaźmierczak W., Fiegler P. et al. Wewnątrzmaciczne opóźnione wzrastanie płodu – analiza sposobu rozwiązania ciąży, przebiegu porodu oraz pourodzeniowego stanu noworodka. *Ginek Prakt* 2004; 12: 32 - 37.
114. Hay W. W., Thureen P. J., Anderson M. S. Intrauterine growth restriction. *Neo Reviews* 2001; 2: 129.
115. Chatelain P. Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocr Regul* 2000; 34: 33 - 36.

116. Lubchenco L. O., Hansman C., Dressler M. et al. Intrauterine growth as estimated from liveborns birth weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 1963; 32: 793.
117. Metcalf J. Clinical assessment of nutritional status at birth. Fetal malnutrition and SGA are not synonymous. *Pediatr Clin North Am* 1994; 4: 875.
118. Bakketeig L. S. Current growth standards, definitions, diagnosis and classification of fetal growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 1 - 4.
119. Miller J., Turan S., Baschat A. A. Fetal growth restriction. *Semin Perinatol* 2008; 32: 274 - 280.
120. American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin Clinical Management Guidelines for Obstetricians-Gynecologists No. 12. 2000
121. Hutcheon J. A., Zhang X., Cnattingius S. et al. Customized birthweight percentiles: does adjusting for maternal characteristics matter? *BJOG* 2008; 115: 1397 – 1404.
122. Ott W. J., Doyle S. Normal ultrasound fetal weight curve. *Obstet Gynecol* 1982; 59: 603 – 606.
123. Marsal K., Persson P. H., Larsen T. et al. Intrauterine growth curves based on ultrasonically estimated foetal weights. *Acta Paediatr* 1996; 85:843–848.
124. Jeanty P., Cantraine F., Romero R. et al. A longitudinal study of fetal weight growth. *J Ultrasound Med* 1984; 3: 321 – 328
125. Gallivan S., Robson S. C., Chang T. C. et al. An investigation of fetal growth using serial ultrasound data. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1993; 3: 109 – 114
126. Snijders R. J. M., Nicolaides K. H. Fetal biometry at 14 – 40 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994; 4: 34 – 48.
127. Kurmanavicius J., Wright E. M., Royston P. et al. Fetal ultrasound biometry. abdomen and femur length reference values. *BJOG* 1999; 106: 136 – 143.
128. Johnsen S. L., Rasmussen S., Wilsgaard T. et al. Longitudinal reference ranges for estimated fetal weight. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85: 286 – 297.
129. Leung T. N., Pang M. W., Daljit S. S. et al. Fetal biometry in ethnic Chinese: biparietal diameter, head circumference, abdominal circumference and femur length. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 321 – 327.
130. Owen P., Donnet M. L., Ogston S. A. et al. Standards for ultrasound fetal growth velocity. *BJOG* 1996; 103: 60 – 69.

131. Clausson B., Gardosi J., Francis A. et al. Perinatal outcome in SGA births defined by customized versus population-based birthweight standards. *Br J Obstet Gynecol* 2001; 108: 830 – 834.
132. Haws R. A., Yakoob M. Y., Soomro T. et al. Reducing stillbirths: screening and monitoring during pregnancy and labour. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009; 9: 5.
133. Andres R. L., Day M. C. Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Semin Neonatol* 2000; 5: 231 - 241.
134. Nahar S., Mascie-Taylor C. G., Begum H. A. Maternal anthropometry as a predictor of birth weight. *Public Health Nutr* 2007; 10: 965 - 970.
135. Taimur S., Nida S., Sanna F. et al. Intrauterine growth retardation - small events, big consequences. *Ital J Pediatr* 2011; 7: 37 – 41.
136. Aamer I., Mohammad Y. Y., Saad S. et al. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 13: 1
137. Kliegman R. M. Intrauterine Growth Retardation. *Neonatal-perinatal medicine: diseases of the fetus and neonate. vol 1: 6th. ed. Mosby: St. Louis, Mo.; 1997. p. 203-40.*
138. Burstyn I., Kuhle S., Allen A. C. et al. The role of maternal smoking in effect of fetal growth restriction on poor scholastic achievement in elementary school. *Int J Environ Res Public Health* 2012; 9: 408 - 420.
139. Longo S., Bollani L., Decembrino L. et al. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growthretardation (IUGR). *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 222 - 225
140. Shavit T., Ashual E., Regev R. et al. Cord blood oxidative stress markers correlate with umbilical artery pulsatility in fetal growth restriction. *J Perinat Med* 2012; 40: 539 - 543.
141. Romo A., Carceller R., Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009; 6: 332 - 336.
142. Chauhan S. P., Dahlke J. D., Magann E. F. et al. Isolated intrauterine growth restriction: a survey of Central Association of Obstetricians Gynecologists (CAOG) members. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26: 497 – 502.

143. Bersinger N. A., Øpdegård R. A. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 37 – 45.
144. Shehata H. A., Nelson-Piercy C., Khamashta M. A. Management of pregnancy in antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27: 643 - 659.
145. Brewster J. A., Shaw N. J., Farquharson R. G. Neonatal and pediatric outcome of infants born to mothers with antiphospholipid syndrome. *J Perinat Med* 1999; 27: 183 - 187.
146. Arias F., Romero R., Joist H. et al. Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med* 1998; 7: 277 - 286.
147. Alfirevic Z., Roberts D., Martlew V. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 101: 6 - 14.
148. Bugatto F., Quintero-Prado R., Melero-Jiménez V. Intrauterine growth retardation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36: 724 - 727.
143. Vasilopoulou E., Loubière L. S., Martín-Santos A. Differential triiodothyronine responsiveness and transport by human cytotrophoblasts from normal and growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 4762 - 4770.
149. Zohdi V., Sutherland M. R., Lim K. et al. Low Birth Weight due to Intrauterine Growth Restriction and/or Preterm Birth: Effects on Nephron Number and Long-Term Renal Health. *Int J Nephrol* 2012; 2012: 136942
150. Dessì A., Ottonello G., Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 13 - 18.
151. Thorn S. R., Rozance P. J., Brown L. D. et al. The intrauterine growth restriction phenotype: fetal adaptations and potential implications for later life insulin resistance and diabetes. *Fetal Diagn Ther* 2012; 32: 116 – 122.
152. Demasio K. A., Bahado – Singh R. O. Zahamowanie wewnątrzmacicznego wzrostu płodu: zgodnie z zasadami medycyny opartej na dowodach naukowych – część I i II. *Ginekol dypl* 2003; 5: 84 – 96.
153. Moore G. E., Ali Z., Khan R. U. The incidence of uniparental disomy associated with intrauterine growth retardation in a cohort of thirty-five severely affected babies. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 294 - 299.

154. Williams P. M., Fletcher S. Health effects of prenatal radiation exposure. *Am Fam Physician* 2010; 1: 488 - 493.
155. Diderholm B. Perinatal energy metabolism with reference to IUGR & SGA: Studies in pregnant women & newborn infants. *Indian J Med Res* 2009; 130: 612 – 617.
156. Dunger D. B., Petry C. J., Ong K. K. Genetic variations and normal fetal growth. *Horm Res* 2006; 65: 34 - 40.
157. Snijders R. J., Sherrod C., Gosden C. M. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 547–555.
158. Bugatto F., Quintero-Prado R., Melero-Jiménez V. et al. Ultrasound predictors of birth weight in euploid fetuses with isolated single umbilical artery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36: 724 – 727.
159. Saks E., McCoy M. C., Damron J. et al. Confined placental mosaicism for trisomy 8 and intra-uterine growth retardation. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1202 - 1204.
160. Artan S., Başaran N., Hassa H. et al. Confined placental mosaicism in term placentae: analysis of 125 cases. *Prenat Diagn* 1995; 15: 1135 - 1142.
161. Abu-Heija A., al-Chalabi H., el-Iloubani N. Abruptio placentae: risk factors and perinatal outcome. *J Obstet Gynaecol Res* 1998; 24: 141 - 144.
162. Rolschau J. Circumvallate placenta and intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1978; 72: 11 - 14.
163. Hsu W. T., Shchepin D. A., Mao R. Mosaic trisomy 16 ascertained through amniocentesis: evaluation of 11 new cases. *Am J Med Genet* 1998; 28: 473 - 480.
164. McIntire D. D., Bloom S. L., Casey B. M. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 1999; 340: 1234 – 1238.
165. Bernstein I. M., Horbar J. D., Badger G. J. et al. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 198 - 206.
166. Sheridan C. Intrauterine growth restriction—diagnosis and management. *Aust Fam Physician* 2005; 34: 717-723.
167. Peleg F. D., Kennedy C. M., Hunter S. K. Intrauterine Growth Restriction: Identification and Management. *Am Fam Physician* 1998; 58: 453 - 460.

168. Durousseau S., Chavez G. F. Associations of Intrauterine Growth Restriction Among Term Infants and Maternal Pregnancy Intendedness, Initial Happiness About Being Pregnant, and Sense of Control. *Pediatrics* 2003; 111: 1171 - 1175.
169. Dahl L. B., Kaaresen P. I., Tunby J. Emotional, behavioral, social, and academic outcomes in adolescents born with very low birth weight. *Pediatrics* 2006; 118: 449 - 459.
170. Malhotra N., Chanana C., Kumar S. Comparison of perinatal outcome of growth-restricted fetuses with normal and abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Indian J Med Sci* 2006; 60: 311 - 317.
171. Pinheiro A., David A., Joseph B. Pregnancy weight gain and its correlation to birth weight. *Indian J Med Sci* 2001; 55: 266 - 270.
172. Imdad A., Yakoob M. Y., Siddiqui S. Screening and triage of intrauterine growth restriction (IUGR) in general population and high risk pregnancies: a systematic review with a focus on reduction of IUGR related stillbirths. *BMC Public Health* 2011; 11: 1.
173. Bukowski R. Fetal growth potential and pregnancy outcome. *Semin Perinatol* 2004; 28: 51 – 58.
174. Piech J., Skoczylas A. Rola Urotensyny II w patofizjologii człowieka. *Wiad Lek* 2008; 61: 10 - 12.
175. Ross B., McKend K., Giaid A. Role of urotensin II in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: 1156 - 1172.
176. Pearson D., Shively J. E., Clark B. R. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5021 – 5024.
177. Conlon J., Arnold-Reed D., Balment R. J. Post-translational processing of pre-urotensin II. *FEBS Lett* 1990; 266: 37 – 40.
178. Coulouarn Y., Lihmann I., Jegou S. et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15803 – 15808.
179. Itoh H., Itoh Y., Rivier J. et al. Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1987; 252: 361 – 366.

180. Charles C. J., Rademaker M. T., Richards A. M. et al. Urotensin II: Evidence for cardiac, hepatic and renal production. *Peptides* 2005; 26: 2211 – 2214.
181. Chen Y. H., Yandle T. G., Richards A. M., et al. Urotensin II immunoreactivity in the human circulation: evidence for widespread tissue release. *Clin Chem* 2009; 55: 2040 – 2048.
182. Sugo T., Mori M. Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14: discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides* 2008; 29: 809 – 812.
183. Sugo T., Murakami Y., Shimomura Y. et al. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 860 – 868.
184. Marchese A., Heiber M., Nguyen T. et al. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995; 29: 335 – 344.
185. Ames R. S., Sarau H. M., Chambers J. K. et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282 – 286.
186. Labarrère P., Chatenet D., Leprince J. et al. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003; 18: 77 – 88.
187. Ziltener P., Mueller C., Haenig B. et al. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J. Recept. Signal Transduction Res.* 2002; 22: 155 – 168.
188. Sauzeau V., Le Mellionec E., Bertoglio J. et al. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ. Res* 2001; 88: 1102 – 1104.
189. Liu Q., Pong S. S., Zeng Z. et al. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 174 – 178.
190. Do Rego J. C., Leprince J., Scalbert E et al. Behavioral actions of urotensin-II. *Peptides* 2008; 29: 838 – 844.
191. Nothacker H. P., Clark S From heart to mind: the urotensin II system and its evolving neurophysiological role. *FEBS J* 2005; 272: 5694 – 5702.

192. Takahashi K., Totsune K., Murakami O. et al. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 2001; 22: 1175 – 1179.
193. Lin Y., Tsuchihashi T., Matsumura K. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2003; 26: 839 – 845.
194. Shi L., Ding W., Li D. Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2006; 188: 260 – 264.
195. Qi J. S., Minor L. K., Smith C. et al. Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* 2005; 26: 683 – 690.
196. McLaughlin S., Wang J., Gambhir A. et al. PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002; 31: 151 – 175.
197. Itoh T., Seki N., Suzuki S. Membrane hyperpolarization inhibits agonist - induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 1992; 451: 307 – 328.
198. MacVicar B. A., Tse, F. W. Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia* 1988; 1: 359 – 365
199. Jarry M., Diallo M., Lecointre C. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* 2010; 428: 113 – 124.
200. Vogt L., Chiurciu C., Chadha-Boreham H. Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. *Hypertension*. 2010; 55: 1206 - 1209.
201. Russell F. D. Urotensin II in cardiovascular regulation. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 775 - 785.
202. Pakala R. Role of urotensin II in atherosclerotic cardiovascular diseases. *Cardiovasc Revasc Med* 2008; 9: 166 - 178.
203. Zomer E., de Ridder I., Kompa A. et al. Effect of urotensin II on skin microvessel tone in diabetic patients without heart failure or essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 1147 - 1150.

204. Cosenzi A. Non peptidic urotensin II antagonists: perspectives for a new class of drugs. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 80 - 91.
205. Mc Donald J., Batuwangala M., Lambert D. Role of urotensin II and its receptor in health and disease. *J Anesth* 2007; 21: 378 – 389.
206. Totsune K. , Takahashi K., Arihara Z. et al. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 1 – 5.
207. Heller J., Schepke M., Neef M. et al. Increased urotensin II levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 767 – 772.
208. Gibson A. Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol* 1987; 91: 205 – 212.
209. Lin L., Ding W. H., Jiang W. et al. Urotensin-II activates L-arginine/nitric oxide pathway in isolated rat aortic adventitia. *Peptides* 2004; 25: 1977 – 1984.
210. Ong K.L., Lam K., Ceung B. Urotensin II: Its Function in Health and Its Role in Disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19: 65 - 75.
211. Balat O., Aksoy F., Kutlar I. et al. Increased plasma levels of Urotensin-II in preeclampsia-eclampsia: a new mediator in pathogenesis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 1; 120: 33 - 38.
212. Liu Y., Li Y., Xu X. et al. Neurokinin B and urotensin II levels in pre – eclampsia. *J Matern Neonatal Med* 2010; 23: 869 – 873.
213. Cowley E., Thompson J. P., Sharpe P. et al. Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br J Anaesth* 2005; 95: 495 - 499.
214. Dearden L., Ockleford C. D. Structure of human trophoblast: correlation with function. In: Loke C, White H (eds). *Biology of Trophoblast*. London: Elsevier, 1983; 69: 110.
215. Kaufmann P., Burton G. J. Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994; 441 - 484.
216. Jackson M. R., Joy C. F., Mayhew T. M et al. Stereological studies on the true thickness of the villous membrane in human term placentae: a study of placentae from highaltitude pregnancies. *Placenta* 1985; 6: 249 - 258.
217. Sen D. K., Kaufmann P., Schweikhart G. Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res* 1979; 200: 425 - 434.

218. Leach L., Frith J. A. Fine structure of the paracellular junctions of terminal villous capillaries in the perfused human placenta. *Cell Tiss Res* 1992; 268: 447 - 452.
219. Arnholdt H., Meisel F., Fandrey K. et al. Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991; 60: 365 - 372.
220. Nelson D. M. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* 1996; 17: 387 - 391.
221. Salgado S. S., Salgado M. K. R. Structural changes in pre-eclamptic and eclamptic placentas--an ultrastructural study. *J Coll Physicians Surg Pak* 2011; 21: 482 – 486.
222. Soma H., Yoshida K., Mukaida T. et al. Morphologic changes in the hypertensive placenta. *Contrib Gynecol Obstet* 1982; 9: 58 - 75.
223. Gould P. S, Gu M., Liao J. et al. Upregulation of Urotensin II Receptor in Preeclampsia Causes In Vitro Placental Release of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 in Hypoxia. *Hypertension*. 2010; 56: 172 - 178.
224. Maguire J. J., Kuc R. E., Wiley K. E. et al. Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides*. 2004; 25: 1767 – 1774.
225. Totsune K., Takahashi K., Arihara Z. et al. Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet*. 2001; 358: 810 – 811.
226. Caniggia I., Winter J. L. Adriana and luisa castellucci award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies—a review. *Placenta*. 2002; 23: 47 – 57.
227. Iwagaki S., Yokoyama Y., Tang L. et al. Augmentation of leptin and hypoxia-inducible factor 1_ mRNAs in the preeclamptic placenta evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Gynecol Endocrinol* 2004; 18: 263 – 268.
228. Rajakumar A., Brandon H. M., Daftary A. et al. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta*. 2004; 25: 763 – 769.

X. Spis tabel

Tabela 1. Czynniki ryzyka wystąpienia IUGR.

Tabela 2. Najczęściej występujące wady związane z mutacją jednogenną prowadzące do hipotrofii płodu.

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej n=38

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym n=30

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z zaburzeniami wzrastania wewnątrzmacicznego u płodów n=12.

Tabela 6. Charakterystyka starterów dla urotensyny II i jej receptora wykorzystanych do reakcji RT-PCR, ich sekwencje, pozycja i długość produktów amplifikacji oraz numer dostępu do Genbank. Beta-2 mioglobina – gen referencyjny.

Tabela 7. Poziom stężenia urotensyny [pg/ml] w surowicy krwi badanych pacjentek.

Tabela 8. Poziom stężenia urotensyny [pg/ml] w surowicy krwi pępowinowej badanych pacjentek.

Tabela 9. Wartości średniego ciśnienia krwi (MAP) [mm Hg] w badanych grupach pacjentek.

Tabela 10. Zestawienie stężeń urotensyny II w przebiegu wybranych chorób.

XI. Spis rycin

Rycina 1. Czynniki biorące udział w etiologii nadciśnienia ciążowego.

Rycina 2. Budowa ludzkiej urotensyny II.

Rycina 3. Mechanizm skurczu naczynia wywołanego pobudzeniem rec. GPR 14 przez UII.

Rycina 4. Mechanizm rozkurczu naczynia wywołany przez pobudzenie enzymów przez UII.

Rycina 5. Zależność wartości MAP od stężenia UII w surowicy pacjentek z grupy z nadciśnieniem ciążowym.

Rycina 6. Zależność wartości MAP od stężenia UII w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy z nadciśnieniem ciążowym.

Rycina 7. Korelacja stężeń UII w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy kontrolnej.

Rycina 8. Porównanie stężenia UII w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy z nadciśnieniem ciążowym.

Rycina 9. Porównanie stężenia UII w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej pacjentek z grupy z IUGR płodów.

Rycina 10. Skrawek prawidłowego łożyska pacjentki z grupy kontrolnej barwione metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50 μ m.

Rycina 11. Skrawki łożyska pacjentki z grupy z nadciśnieniem ciążowym barwione metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50 μ m.

Rycina 12. Skrawki łożyska pacjentki z grupy z IUGR płodów barwione metodą H+E. Powiększenie określone skalą 50 μ m.

Rycina 13. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do UII w skrawkach łożyska od zdrowej pacjentki oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50 μ m

Rycina 14. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do UII w skrawkach łożyska od pacjentki z nadciśnieniem ciążowym oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50 μ m.

Rycina 15. Reakcja immunohistochemiczna na obecność substancji o immunoreaktywności podobnej do UII w skrawkach łożyska od pacjentki z IUGR płodu oraz skrawek kontrolny. Powiększenie określone skalą 50 μ m.

Rycina 16. Ekspresja genu UII w łożyskach człowieka.

Rycina 17. Półilościowa ocena ekspresji genu UII w łożyskach badanych pacjentek.

Rycina 18. Półilościowa ocena ekspresji genu receptora UII w łożyskach badanych pacjentek.

XII. Spis wykresów

Wykres 1. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o wartości MAP.

Wykres 2. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia białkomoczu w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.

Wykres 3. Krzywa ROC dla stężenia urotensyny II w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o wartości MAP.

Wykres 4. Krzywa ROC dla stężeń urotensyny II w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia białkomoczu w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.