

Agata Szpera-Goździewicz

**Ilościowa ocena krążących komórek
śródbłonna, krążących komórek
progenitorowych i czynnika von Willebranda u
kobiet w ciąży powikłanej nadciśnieniem
tętnicznym**

Rozprawa doktorska



Klinika Perinatologii i Ginekologii
Katedra Perinatologii i Ginekologii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Promotor
Prof. dr hab. n. med. Grzegorz H. Bręborowicz

Poznań, 2014 rok

Składam serdeczne podziękowania

*Promotorowi- Prof. dr hab. Grzegorzowi H. Bręborowiczowi
za kształtowanie mojej postawy naukowej
oraz za wsparcie i cenne rady podczas prowadzenia badań.*

Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

*Rozprawę doktorską dedykuję
mojemu mężowi Tomaszowi oraz córce Helenie.*

Spis treści

Wykaz skrótów	7
1 Wstęp.....	9
1.1 Nadciśnienie tętnicze w ciąży	9
1.1.1 Epidemiologia	9
1.1.2 Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży	10
1.1.3 Etiopatogeneza nadciśnienia tętniczego ciążowego.....	12
1.1.4 Etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego.....	15
1.1.5 Rola przepływów dopplerowskich w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym.....	18
1.2 Śródbłonek.....	20
1.2.1 Angiogeneza i waskularyzacja.....	20
1.2.2 Krążące komórki śródbłonka.....	23
1.2.3 Krążące komórki progenitorowe śródbłonka	24
1.3 Czynniki von Willebranda.....	28
2 Cel pracy.....	30
3 Materiał.....	31
3.1 Grupy	31
3.1.1 Grupy badane	31
3.1.2 Grupa kontrolna	32
4 Metody	34
4.1 Oznaczenie ilości krążących komórek śródbłonka oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonka we krwi pełnej.....	34
4.1.1 Przeciwciała monoklonalne wykorzystane do oceny ilościowej krążących komórek śródbłonka oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonka za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej.....	34
4.1.2 Analiza krążących komórek śródbłonka i krążących komórek progenitorowych śródbłonka za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej.....	34
4.2 Oznaczenie stężenia czynnika von Willebranda w osoczu	37
4.3 Ocena przepływów dopplerowskich w tętnicach macicznych, tętnicy pępowinowej oraz tętnicy środkowej mózgu płodu.....	38
4.3.1 Ocena wydolności łożyska	38
4.3.2 Ocena przepływu krwi w tętnicy pępowinowej.....	40
4.3.3 Ocena przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu.....	40
4.4 Automatyczny 24-godzinny pomiar ciśnienia tętniczego.....	40
4.5 Oznaczenie poziomu białka w dobowej zbiórce moczu	41
4.6 Analiza statystyczna	41

5	Wyniki	42
5.1	Ilość krążących komórek śródbłonka we krwi obwodowej.....	42
5.2	Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłonka we krwi obwodowej 43	
5.3	Stężenie czynnika von Willebranda w osoczu	44
5.4	Wartości współczynnika CEPCs/CECs.....	45
5.5	Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, a ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs.....	46
5.6	Zależność między wartościami średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego całodobowego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnymi wartościami ciśnienia tętniczego skurczowego i maksymalnymi wartościami ciśnienia tętniczego rozkurczowego, a stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs.....	46
5.7	Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i punktacją w skali tętnic macicznych .	47
5.8	Zależność nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia czynnika von Willebranda, ilości krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz współczynnika CEPCs/CECs.....	48
6	Dyskusja	49
6.1	Krążące komórki śródbłonka	49
6.2	Krążące komórki progenitorowe śródbłonka	51
6.3	Współczynnik CEPCs/CECs.....	55
6.4	Czynnik von Willebranda.....	56
6.5	Zależność między wartościami średniego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnego ciśnienia tętniczego skurczowego i maksymalnego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, a stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs.....	59
6.6	Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i punktacją w skali tętnic macicznych .	60
6.7	Określenie zależności nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia czynnika von Willebranda, ilości krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz współczynnika CEPCs/CECs.....	61

7	Wnioski.....	63
8	Hipotezy do dalszych badań.....	64
9	Streszczenie	65
10	Summary	69
11	Piśmiennictwo.....	73

Wykaz skrótów

AEDF- brak przepływu końcowo-rozkurczowego (ang. absent end diastolic flow)

ANGII- angiotensyna II (ang. angiotensin II)

CECs- krążące komórki śródbłonna (ang. circulating endothelial cells)

CEPCs- krążące komórki progenitorowe śródbłonna (ang. circulating endothelial progenitor cells)

CUR- wskaźnik mózgowo-pępowinowy (ang. cerebro-umbilical ratio)

EDTA- etylenodwuaminocztteroctan (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA- test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

ET- endotelina (ang. endothelin)

ICAM-1- międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. (Intercellular Adhesion Molecule 1)

IL-1- interleukina 1 (ang. interleukin 1)

IL-10- interleukina 10 (ang. interleukin 10)

IL-6- interleukina 6 (ang. interleukin 6)

IL-8- interleukina 8 (ang. interleukin 8)

LtUtA- lewa tętnica maciczna (ang. left uterine artery)

MCA- tętnica środkowa mózgu (ang. middle cerebral artery)

NO- tlenek azotu (ang. nitric oxide)

PGI₂- prostacyklina (ang. prostacyclin)

PI- indeks pulsacji (ang. pulsatility index)

PlGF- łożyskopochodny czynnik wzrostu (ang. placental growth factor)

REDF- wsteczny przepływ końcowo-rozkurczowy (ang. reverse end diastolic flow)

RtUtA- prawa tętnica maciczna (ang. right uterine artery)

sEng- rozpuszczalna forma endogliny (ang. soluble endoglin)

sFlt-1- rozpuszczalna fms-podobna kinaza tyrozynowa 1 (ang. soluble fms-like tyrosine kinase-1)

TGF-beta- transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth

factor beta)

TNF- czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor)

TXA2- tromboksan A2 (ang. thromboxane A2)

UA- tętnica pępowinowa (ang. umbilical artery)

UAS- skala tętnic macicznych (ang. uterine artery score)

VCAM-1- naczyniowy czynnik adhezyjny (ang. vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF- czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

VEGFR-1- receptor dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego 1 (ang. vascular endothelial growth factor receptor 1)

VEGFR-2- receptor dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego 2 (ang. vascular endothelial growth factor receptor 2)

1 Wstęp

1.1 Nadciśnienie tętnicze w ciąży

Już Hipokrates, żyjący w latach ok. 460- 377 p.n.e., wiązał występowanie niektórych objawów towarzyszących nadciśnieniu tętniczemu w ciąży z jej niekorzystnym przebiegiem, co obrazuje aforyzm jego autorstwa: „...w ciąży senność z bólami głowy, którym towarzyszą drgawki są zwykle złym objawem...”¹. Aż do końca XIX wieku pomiary ciśnienia tętniczego nie były wykonywane rutynowo. Dopiero po zapoczątkowaniu tej praktyki powiązano charakterystyczne objawy oraz towarzyszące powikłania u kobiet ciężarnych z podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi ².

1.1.1 Epidemiologia

Nadciśnienie tętnicze stanowi jedno z najpowszechniejszych powikłań ciąży. Pojawia się ono u 6 do 8 % ciężarnych, jest jedną z głównych przyczyn jatrogennych porodów przedwczesnych, a jego wystąpienie wiąże się ze znacznym wzrostem zachorowalności i umieralności matek, płodów oraz noworodków. W krajach rozwiniętych aż 15% zgonów matek spowodowanych jest nadciśnieniem tętniczym. Kobiety w ciążach przebiegających z nadciśnieniem tętniczym narażone są na zwiększone ryzyko wystąpienia groźnych dla życia powikłań, a w szczególności przedwczesnego oddzielenia łożyska, zespołu wykrzepiania wewnątrzmacicznego, udaru krwotocznego mózgu, niewydolności wątroby oraz ostrej niewydolności nerek³. Ponadto udowodniono, że wystąpienie stanu przedrzucawkowego wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego oraz chorób metabolicznych w przyszłości ⁴⁻⁶. Wzrasta również ryzyko wystąpienia groźnych powikłań u płodu, takich jak przewlekłe i ostre niedotlenienie, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania, wcześniactwo, aż do zgonu wewnątrzmacicznego włącznie ³.

Należy pamiętać, że wczesne wykrycie nadciśnienia tętniczego i podjęcie odpowiedniego leczenia prowadzi do znacznej poprawy wyników położniczych, jednak mimo spektakularnych osiągnięć w dziedzinie medycyny perinatalnej jedynym, w pełni skutecznym sposobem leczenia pozostaje ukończenie ciąży.

1.1.2 Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży

Dotychczas nie powstała jedna, uniwersalna i powszechnie obowiązująca klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w przebiegu ciąży. Pierwszy, obecnie historyczny, podział wyodrębniał wczesne oraz późne zatrucia ciążowe. Następnie do 1972 roku obowiązywała klasyfikacja utworzona przez Organizację Gestozy, która dzieliła gestozy w zależności od występujących objawów, patogenezы i obecności schorzeń współwystępujących z nadciśnieniem tętnicznym. W 1972 roku Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów sklasyfikowało nadciśnienie towarzyszące ciąży w oparciu o występowanie dwóch głównych objawów: nadciśnienia tętniczego oraz białkomoczu ⁷. Następnie w 2000 roku Amerykańska grupa badawcza National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy zmodyfikowała klasyfikację Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów, dodając termin „nadciśnienie ciążowe”, określające kobiety mające nadciśnienie tętnicze w ciąży bez współistniejącego białkomoczu i zastrzegając, że ostateczna diagnoza może zostać postawiona dopiero retrospektywnie, już po porodzie.

Wytyczne te ostatecznie zaleciły posługiwanie się następującą terminologią:

- Nadciśnienie tętnicze przewlekłe. To nadciśnienie tętnicze, które rozpoznane zostało przed ciążą lub przed ukończeniem 20 tygodnia ciąży. Zalicza się tu również nadciśnienie tętnicze rozpoznane po raz pierwszy w dowolnym okresie ciąży, które utrzymuje się dłużej niż 12 tygodni po porodzie.
- Stan przedrzucawkowy/ rzucawka (preeklampsja/ eklampsja). Stan przedrzucawkowy to zaburzenie specyficzne jedynie dla okresu ciąży, którego cechą charakterystyczną jest pojawienie się po 20 tygodniu ciąży nadciśnienia tętniczego współistniejącego z białkomoczem; w wyjątkowych sytuacjach, takich jak ciążowa choroba trofoblastyczna, stan przedrzucawkowy można rozpoznać przed 20 tygodniem ciąży. Rzucawka to wystąpienie drgawek toniczno-klonicznych u kobiety w stanie przedrzucawkowym, których pojawienia się nie można wytłumaczyć inną przyczyną.

- Stan przedrzucawkowy nałożony na przewlekłe nadciśnienie tętnicze to współistnienie stanu przedrzucawkowego z występującym uprzednio nadciśnieniem tętniczym przewlekłym. Termin ten obejmuje kobiety:
 - z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym bez współistniejącego białkomoczu przed 20 tygodniem ciąży, u których pojawił się białkomocz;
 - kobiety z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym oraz białkomoczem występującym przed 20 tygodniem ciąży, u których po 20 tygodniu ciąży pojawiły się dodatkowo: nagły wzrost ilości wydalanego białka z moczem, nagły wzrost wartości ciśnienia tętniczego krwi, małopłytkowość ($< 100,000$ komórek/ m^3) lub nieprawidłowo wysokie stężenia aminotransferazy alaninowej lub aminotransferazy asparaginianowej.
- Nadciśnienie tętnicze ciążowe definiowane jest jako nadciśnienie bez współistniejącego białkomoczu, pojawiające się po 20 tygodniu ciąży. W przypadku, gdy wartości ciśnień tętniczych ulegają normalizacji w ciągu 12 tygodni po porodzie można postawić retrospektywną diagnozę nadciśnienia przemijającego, natomiast gdy podwyższone wartości ciśnienia utrzymują się po 12 tygodniach od porodu, rozpoznaje się nadciśnienie tętnicze przewlekłe.

Autorzy tej klasyfikacji rekomendują rozpoznanie nadciśnienia tętniczego przy wartościach ciśnienia skurczowego >140 mmHg i/lub ciśnienia rozkurczowego >90 mmHg. Białkomocz natomiast definiowany jest jako obecność $\geq 0,3g$ białka w objętości moczu z dobowej jego zbiórki. Standardowo rozkurczowe ciśnienie krwi określa się na podstawie V fazy Korotkowa. Przed postawieniem ostatecznej diagnozy zalecany jest co najmniej dwukrotny pomiar ciśnienia tętniczego, z zaznaczeniem, że drugi pomiar musi być wykonany w sposób minimalizujący występowanie artefaktów oraz lęku u pacjenta ³.

1.1.3 Etiopatogeneza nadciśnienia tętniczego ciążowego

Do dziś nie określono dokładnie podłoża patofizjologicznego nadciśnienia tętniczego ciążowego. Nie jest też jasne, czy nadciśnienie ciążowe i stan przedzucawkowy są różnymi chorobami o tym samym fenotypie, jakim jest nadciśnienie tętnicze, czy też nadciśnienie ciążowe stanowi wczesne stadium stanu przedzucawkowego. Istnieją dane sugerujące, że nadciśnienie ciążowe i preeklampsja są odmiennymi stanami chorobowymi:

- pierwsza ciąża jest silnym czynnikiem ryzyka wystąpienia stanu przedzucawkowego, natomiast nie zwiększa zagrożenia wystąpieniem nadciśnienia tętniczego ciążowego ⁸;
- ryzyko nawrotu nadciśnienia tętniczego ciążowego w kolejnej ciąży jest kilkukrotnie wyższe, niż ryzyko nawrotu preeklampsji (20- 47% *versus* 5%) ^{9,10};
- całkowita objętość krwi krążącej oraz osocza jest istotnie mniejsza u kobiet w stanie przedzucawkowym (odpowiednio średnio 2660 ml/m² i 1790 ml/m²), w porównaniu do tych objętości u kobiet chorujących na nadciśnienie ciążowe (odpowiednio 3139 ml/m² i 2132 ml/m²) ¹¹.

Z drugiej strony znany jest także fakt, że 15 do 25 % kobiet z pierwotnie zdiagnozowanym nadciśnieniem tętniczym ciążowym rozwinię stan przedzucawkowy.

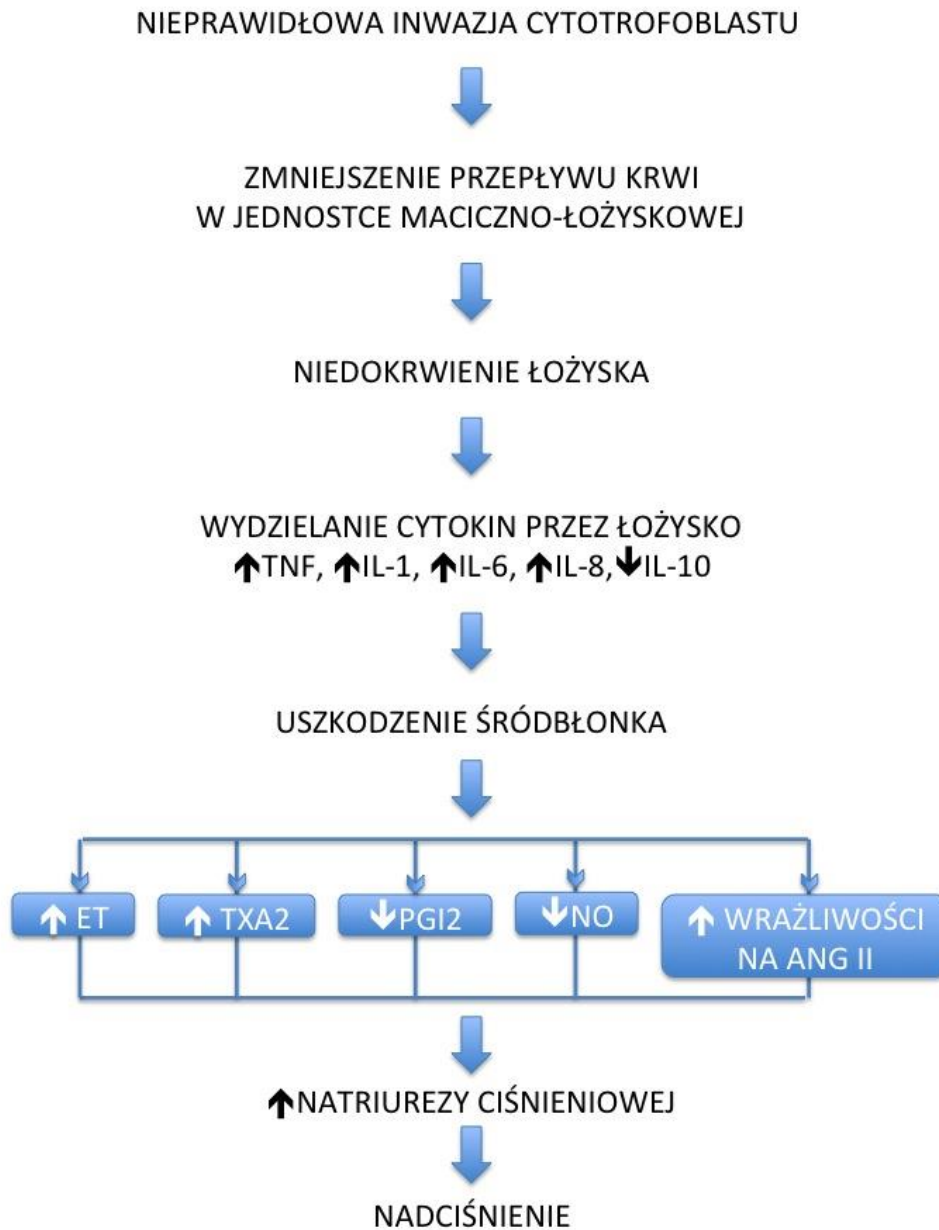
Obecnie najczęściej przyjmuje się, że ograniczone ukrwienie łożyska jest jedną z głównych przyczyn rozwoju nadciśnienia tętniczego ciążowego, choć etiologia prawdopodobnie jest wieloczynnikowa. W przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego dochodzi do zaburzenia proliferacji, migracji cytotrofoblastu oraz różnicowania się jego komórek w tętnicach spiralnych w kierunku komórek śródbłonkowych, co w efekcie prowadzi do upośledzonej inwazji trofoblastu w światło naczyń krwionośnych łożyska ¹². Ponadto w łożysku wykazano obecność substancji, które prowadzą do uszkodzenia lub aktywacji śródbłonka naczyniowego. W przypadku niedotlenienia dochodzi do zwiększenia uwalniania cytokin takich jak TNF czy IL-1, biorących udział w reakcjach zapalnych. Cytokiny te prowadzą do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, wzrostu poziomu aktywowanych płytek krwi oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych. Czynniki martwicy guza zmniejsza ponadto aktywność syntazy NO, i tym samym powoduje obniżenie

jego poziomu. Ponadto w przebiegu nadciśnienia ciążowego hipoksja prowadzi do zwiększonego wydzielania IL-6 i IL-8, natomiast ogranicza wydzielanie IL-10¹³.

W momencie uszkodzenia śródbłonna dochodzi do uwalniania wielu substancji zaburzających pracę mechanizmów regulujących prawidłowe napięcie naczyń krwionośnych oraz zapewniających równowagę w układzie krzepnięcia krwi. Do tych substancji należy endotelina-1, której podwyższone stężenia zaobserwowano w przebiegu nadciśnienia ciążowego; uważana jest ona także za marker uszkodzenia śródbłonna w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego^{14,15}. Tromboksan A2 oraz prostacyklina również są zaangażowane w regulację napięcia naczyń krwionośnych. Zaburzenie stosunku stężeń silnie rozkurczającej naczynia prostacykliny i znacznie je obkurczającego tromboksanu mogą przyczyniać się do zbyt płytkiej inwazji trofoblastu, upośledzając tym samym przepływ maczyno-łożyskowy i w konsekwencji prowadząc do rozwoju nadciśnienia tętniczego ciążowego^{16,17}. Ponadto w aktywowanym śródbłonie nasilona jest ekspresja cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1, selektyna P, selektyna E), co prowadzi do zintensyfikowania procesów zapalnych i dalszej destrukcji endotelium¹².

Kolejnym ważnym czynnikiem zapewniającym prawidłowe ciśnienie krwi jest tlenek azotu, którego wytwarzanie w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego jest zmniejszone, w porównaniu do ciężarnych z prawidłowymi wartościami ciśnienia krwi¹⁸. Niezwykle istotnym czynnikiem biorącym udział w regulacji napięcia naczyń krwionośnych jest układ renina-angiotensyna-aldosteron. Zwiększa on swoją aktywność podczas ciąży, jednak w przypadku ciąży przebiegającej fizjologicznie ciężarna jest zwykle niewrażliwa na podwyższone poziomy angiotensyny II. Inaczej dzieje się w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego, gdzie wrażliwość na podwyższoną aktywność angiotensyny II zwiększa się¹⁹.

NADCIŚNIENIE TĘTNICZE CIĄŻOWE



Rycina 1. Hipotetyczny mechanizm rozwoju nadciśnienia tętniczego ciążyowego

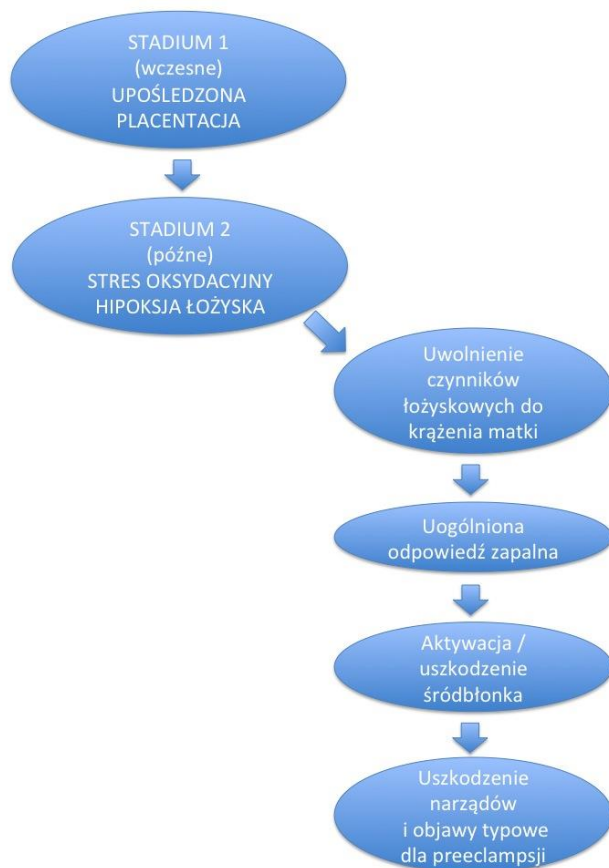
Wykazano ponadto istotne znaczenie w procesie angiogenezy i inwazji trofoblastu w błonę doczesną matki dwóch czynników: VEGF oraz PlGF. VEGF jest głównym czynnikiem wzrostowym komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Podstawowymi receptorami dla niego, zlokalizowanymi na komórkach endotelium są VEGFR-2 oraz VEGFR-1²⁰. VEGF jest ważnym regulatorem naczyniowej funkcji łożyska i w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążyowego zaobserwowano obniżony

jego poziom, równocześnie z podwyższoną ekspresją VEGFR-1²¹. PIGF wraz z VEGF uczestniczy w procesie angiogenezy oraz proliferacji trofoblastu, poprzez wiązanie się z receptorem VEGFR-1. Badania przeprowadzone wśród kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym wykazały nieprawidłowy poziom PIGF spowodowany podwyższoną ekspresją VEGFR-1, co w efekcie prowadzi do zaburzenia procesu łożyskowej angiogenezy²¹.

Hipotetyczny mechanizm rozwoju nadciśnienia tętniczego ciążowego przedstawiono obrazowo na Rycinie 1.

1.1.4 Etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego

Istnieje wiele teorii próbujących wytłumaczyć etiopatogenezę stanu przedrzucawkowego, niestety żadna z nich nie została do tej pory bezsprzecznie zaakceptowana. Jedną z najnowszych przedstawia model patogenetyczny, w którym wyróżniono dwa etapy. Etap pierwszy, w którym nie obserwuje się żadnych klinicznych oznak choroby, pojawia się po implantacji trofoblastu, a czynnikiem spustowym są prawdopodobnie zaburzenia w procesie placentacji, które to prowadzą do następnej hipoksji. Na tym etapie pojawiają się pewne nieprawidłowości przepływów Dopplerowskich w tętnicach macicznych, co może prowadzić do łatwiejszej identyfikacji pacjentek z grupy wysokiego ryzyka rozwinięcia stanu przedrzucawkowego. Etap drugi, w którym typowo pacjentka prezentuje objawy kliniczne, pojawia się z reguły po 20 tygodniu ciąży i spowodowany jest działaniem czynników łożyskowych uwalnianych do krwiobiegu matki pod wpływem stresu oksydacyjnego lub hipoksji, co powoduje uogólnioną reakcję zapalną. Te czynniki zapalne doprowadzają natomiast do uszkodzenia śródbłonna, co manifestuje się uszkodzeniem wielu narządów u matki i, co za tym idzie, wystąpieniem objawów typowych dla stanu przedrzucawkowego, takich jak białkomocz, ból w prawym nadbrzuszu, zaburzenia widzenia, bóle głowy, trudności w oddychaniu do drgawek włącznie [Rycina 2]²². Mechanizmy leżące u podłoża tych zmian pozostają do tej pory nie do końca wyjaśnione.



Rycina 2. Dwuetapowy model patogenetyczny stanu przedrzucawkowego. Adaptacja własna na podstawie ²².

Na dzień dzisiejszy najbardziej prawdopodobne wydaje się, że patogeneza stanu przedrzucawkowego jest złożona i wieloczynnikowa. Podstawy patofizjologiczne zapewne opierają się na czynnikach pochodzenia płodowego, łożyskowego i matczynego. Prawdopodobnie najistotniejszymi determinantami mającymi znaczenie w patogenezie preeklampsji są nieprawidłowości w rozwoju łożyska, układowe zaburzenie funkcjonowania śródbłónka wraz z aktywacją jego komórek oraz zaburzenia równowagi między czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi, z przewagą tych ostatnich. W stanie przedrzucawkowym obserwuje się nieprawidłowo przebiegający proces *remodelingu* tętnic spiralnych- komórki cytotrofoblastu wnikają jedynie w warstwę podstawną tętnic spiralnych, natomiast niezdolne są do penetracji w ich warstwę mięśniową, co w efekcie prowadzi do hipoperfuzji łożyska ²³. Hipoperfuzja z następującą hipoksją i niedokrwieniem stanowi kluczowe zagadnienie w patogenezie preeklampsji,

ponieważ łożysko w stanie niedokrwienia uwalnia do krążenia matczyne szeregi czynników zaburzających prawidłowe funkcjonowanie śródbłonna takich jak TNF oraz interleukiny prozapalne²⁴⁻²⁶. Zaburzenia czynności śródbłonna mogą tłumaczyć występowanie klinicznych objawów stanu przedrzucawkowego^{27,28}.

Istnieje wiele dowodów potwierdzających uogólnione uszkodzenie śródbłonna w przebiegu stanu przedrzucawkowego:

- Podwyższone stężenia krążącej fibronektyny, antygenu czynnika VIII oraz trombomoduliny²⁹⁻³¹;
- Upośledzone procesy zapewniające rozszerzanie naczyń krwionośnych^{32,33};
- Zmniejszenie produkcji wazodylatorów pochodzenia śródbłonkowego takich jak tlenek azotu czy prostacyklina, i zwiększenie wytwarzania substancji obkurczających naczynia (ET-1, TXA2);
- Osocze pochodzące od kobiet z preeklampsją prowadzi do aktywacji komórek śródbłonna w badaniach prowadzonych na ludzkiej żyłce pępowinowej w warunkach *in vitro*³⁴;
- Znacznie zwiększona ilość krążących komórek śródbłonna oraz mikrocząsteczek pochodzenia śródbłonkowego we krwi obwodowej ciężarnych, będących markerami uszkodzenia śródbłonna³⁵.

Niestety kwestia, czy uszkodzenie śródbłonna jest przyczyną, czy też może skutkiem stanu przedrzucawkowego, pozostaje nierozstrzygnięta.

Zaburzenia równowagi między czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi stanowią istotny aspekt w rozwoju naczyń łożyska. We krwi kobiet chorujących na preeklampsję wykazano podwyższone stężenia sFlt-1 (wariant receptora Flt-1 dla PlGF i VEGF, krążący antagonistą VEGF) oraz zmniejszone stężenia VEGF i PlGF, co prowadzi w konsekwencji do dysfunkcji śródbłonna³⁶. Ponadto we krwi kobiet ze stanem przedrzucawkowym wykazano zwiększone stężenia rozpuszczalnej formy endogliny - czynnika hamującego przyłączanie się TGF-beta do receptorów zlokalizowanych na komórkach śródbłonna i tym samym ograniczającego formowanie nowych naczyń krwionośnych i zależną od tlenu azotu wazodylację^{37,38}. Ponadto zwiększona wrażliwość na działanie angiotensyny II, krążące mikrocząsteczki syncytiotrofoblastu, stan zapalny u matki, czynniki immunologiczne, czynniki żywieniowe i podatność genetyczna mogą również odgrywać istotną rolę w patogenezie stanu przedrzucawkowego²⁷

1.1.5 Rola przepływów dopplerowskich w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym

Cechą charakterystyczną dla przebiegu stanu przedrzucawkowego jest upośledzona przebudowa ścian tętnic spiralnych w pierwszej połowie ciąży, która przyczynia się do ograniczenia przepływu łożyskowego²². Jednak Roberts i wsp. wykazali, że nieprawidłowy proces placentacji nie jest zjawiskiem występującym we wszystkich przypadkach preeklampsji³⁹. Dla potwierdzenia tej teorii dostępne są wyniki badań histopatologicznych łożysk przeprowadzone przez Pijnenborga oraz Meekinsa⁴⁰. Obecnie uważa się, że związek powikłań ciąży z podwyższonym oporem krążenia maciczno-łożyskowego, ocenianym na podstawie badania ultrasonograficznego, nie może być tłumaczony jedynie nieprawidłowościami w budowie histopatologicznej naczyń maciczno-łożyskowych⁴¹. Wyniki tych badań wskazują, że zaburzenia w przekształcaniu tętnic spiralnych nie są jedynymi procesami przyczyniającymi się do rozwoju stanu przedrzucawkowego, i jednocześnie potwierdzają teorię jego wieloczynnikowej etiologii.

Istnieją doniesienia, w których oceniano funkcję śródbłonna w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym w odniesieniu do obecności/braku wcięcia wczesnorozkurczowego („notch”) w trakcie badania dopplerowskiego tętnic macicznych. Wykazano, że obecność wcięć wczesnorozkurczowych w obydwu tętnicach macicznych wraz z obustronnie podwyższonymi indeksami pulsacji wskazuje na łożyska o większej oporności, niż w przypadku izolowanego obustronnego podwyższenia wartości PI. Należy jednak zaznaczyć, że u wielu pacjentek w stanie przedrzucawkowym identyfikuje się niskooporowe krążenie łożyskowe. Ponadto badanie histopatologiczne łożysk potwierdziło, że obustronne występowanie „notch” związane jest z podwyższoną opornością naczyń jednostki maciczno-łożyskowej, a co z tym idzie niedotlenieniem łożyska. Badanie to wykazało również, że dysfunkcja śródbłonna była silniej wyrażona w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym z obustronnym „notch”; dodatkowo w tejże grupie zaobserwowano wyższe średnie wartości wskaźnika PI w porównaniu do grupy kobiet bez obustronnego „notch” oraz kobiet z grupy kontrolnej. Dlatego też współwystępowanie podwyższonego oporu w krążeniu maciczno-łożyskowym z

obustronnym zjawiskiem „notch” związane jest z większego stopnia uszkodzeniem śródbłonna ⁴².

Istnieją dowody, że wystąpienie stanu przedrzucawkowego związane jest z wystąpieniem zwiększonego ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca w późniejszym wieku ⁴⁻⁶. Można spekulować, że u kobiet z preeklampsją ryzyko to będzie tym większe, im bardziej wyrażona będzie dysfunkcja śródbłonna. Dlatego badanie dopplerowskie tętnic macicznych może być nie tylko narzędziem do monitorowania jednostki maciczno-łożyskowej, ale może ułatwić identyfikację kobiet w stanie przedrzucawkowym zagrożonych szczególnie dużym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego w przyszłości.

Istnieją doniesienia, że w wielu ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym badania dopplerowskie wykazują nieprawidłowe spektrum przepływu w tętnicy pępowinowej z lub bez nieprawidłowości w przepływach w tętnicach macicznych. Daje to podstawy do konieczności równoczesnej oceny przepływu w tętnicy pępowinowej oraz tętnicach macicznych w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym ⁴³⁻⁴⁶.

W związku ze wzrostem oporu naczyniowego łożyska w przebiegu stanu przedrzucawkowego, dochodzi również do procesów adaptacyjnych w innych naczyniach krwionośnych, między innymi w tętnicy środkowej mózgu płodu. Typowe zmiany obejmują rozszerzenie naczyń mózgowych płodu wraz ze zmniejszeniem współczynnika skurczowo-rozkurczowego, co nazywamy efektem centralizacji krążenia. Mimo, że nie ma żadnych randomizowanych badań oceniających przydatność wykonywania przepływów dopplerowskich w tętnicy środkowej mózgu płodu w przebiegu stanu przedrzucawkowego wydaje się, że ta forma diagnostyki może być cenna w ciąży powikłanej preeklampsją o wczesnym początku i ciężkim przebiegu, a zwłaszcza ze współistniejącym ograniczeniem wzrastania płodu. Oczywiście ocena MCA nie może być stosowana jako jedyny wykładnik stanu płodu i powinna stanowić jedną z wielu metod jego nadzoru ⁴⁷.

W 2007 roku Schlembach i wsp. przeprowadzili pierwsze badanie oceniające zależność między stężeniami czynników angiogennych we krwi matki oraz płodu w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym, a wartościami PI w tętnicy pępowinowej oraz tętnicach macicznych. Wykazali oni odwrotnie proporcjonalną zależność między stężeniami PIGF we krwi matki, a średnimi wartościami PI w

tętnicach macicznych i w tętnicy pępowinowej, co może potwierdzić wcześniejsze doniesienia o badaniu dopplerowskim jako wartościowym narzędziu pomocnym w ocenie funkcjonowania śródbłonna ¹⁶².

1.2 Śródbłonek

1.2.1 Angiogeneza i waskularyzacja

Śródbłonek stanowi wyspecjalizowaną wyściółkę naczyń krwionośnych oraz limfatycznych. Zbudowany jest z jednej warstwy płaskich, jednojądrzastych komórek. W organizmie dorosłego człowieka znajduje się trylion komórek śródbłonna, które łącznie ważą ponad 100 g i pokrywają obszar większy niż 3000 metrów kwadratowych ⁴⁸.

Endotelium pełni wiele innych ważnych funkcji, które obejmują:

- (a) kontrolę procesów trombogenezy i trombolizy- w prawidłowych warunkach śródbłonek stanowi powierzchnię nietrombogenną;
- (b) zapewnienie prawidłowej interakcji płytek krwi oraz leukocytów ze ścianą naczyń krwionośnych;
- (c) regulację napięcia naczyń krwionośnych, i tym samym kontrolę ciśnienia tętniczego;
- (d) funkcję bariery- działa podobnie do półprzepuszczalnej błony pomiędzy światłem naczynia krwionośnego a otaczającymi je tkankami; zwiększenie przepuszczalności warstwy śródbłonna (np. w stanach przewlekłego stanu zapalnego) może prowadzić do obrzęku tkanek
- (e) oraz regulację angiogenezy.

W momencie jego uszkodzenia traci on zdolność wypełniania jednego lub kilku z powyżej wymienionych zadań. Dysfunkcja śródbłonna może manifestować się obkurczeniem naczyń krwionośnych, reakcją zapalną, adhezją leukocytów, zwiększoną trombogenezą i/lub patologiczną proliferacją naczyń krwionośnych ⁴⁹.

Występuje ona w większości chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca, przewlekła niewydolność serca, choroby naczyń obwodowych, cukrzyca, przewlekła niewydolność nerek oraz ostre infekcje wirusowe ⁵⁰.

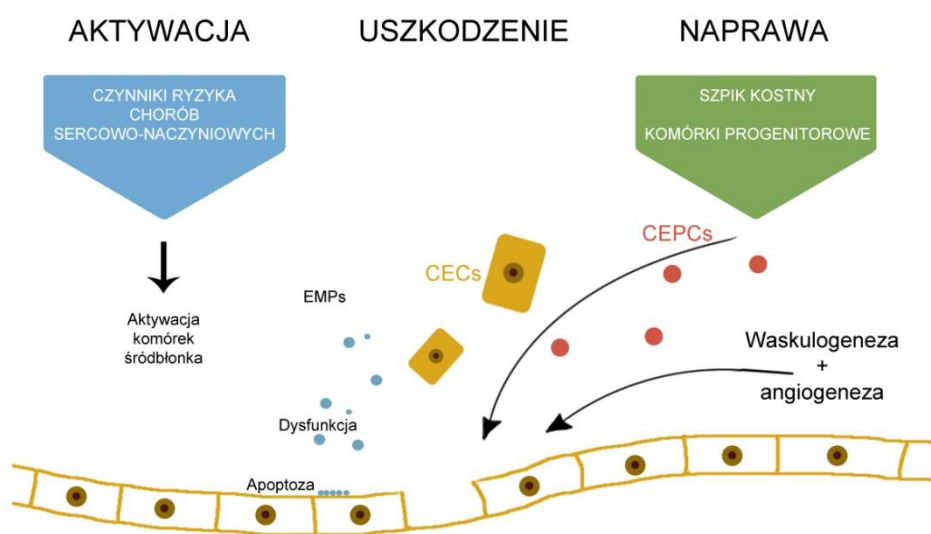
Wolne rodniki mogą prowadzić do obniżenia poziomu tlenu azotu, uszkodzenia struktury śródbłonka i zwiększenia jego przepuszczalności dla toksyn, umożliwiając ich swobodne przenikanie do tkanek⁵¹. Zdrowy organizm człowieka ma zapewnione optymalne zaopatrzenie w antyoksydanty pozyskiwane z pożywienia, które neutralizują wolne rodniki. Jednak w przypadku niedoborów antyoksydantów lub przy współistnieniu kilku niekorzystnych czynników, może dojść do uszkodzenia śródbłonka i zaburzenia równowagi tlenu azotu, co umożliwi migrację komórek prawidłowo pozostających we krwi krążącej do otaczających naczyń krwionośne tkanek. Czynniki, które prowadzą do zwiększenia ilości wolnych rodników w organizmie człowieka to, między innymi, otyłość, palenie tytoniu, niedobór snu, ostre choroby infekcyjne, nadmiar przyjmowanej glukozy oraz ekspozycja na metale ciężkie i zanieczyszczenia powietrza⁵⁰.

Uszkodzenie komórek śródbłonka jest konstytucjonalną cechą pojawiającą się w łożysku naczyniowym w przebiegu nadciśnienia tętniczego, jednak nadal nie znamy odpowiedzi na pytanie, czy podwyższone ciśnienie tętnicze krwi jest przyczyną, czy rezultatem tego uszkodzenia^{52,53}. Moncada i wsp. w 1978 roku zasugerowali, że dysfunkcja śródbłonka pojawia się w odpowiedzi na ekspozycję naczyń krwionośnych na wysokie wartości ciśnienia tętniczego i tym samym jest jego konsekwencją⁵⁰. Inny zespół badawczy wykazał z kolei, że farmakoterapia nadciśnienia tętniczego nie wpływa na poprawę funkcji śródbłonka, co przemawia przeciwko teorii jakoby dysfunkcja śródbłonka była skutkiem nadciśnienia tętniczego⁵⁴. Kolejnym dowodem wspierającym teorię dysfunkcji śródbłonka jako przyczyny nadciśnienia tętniczego było wykazanie nieprawidłowej funkcji endotelium u zdrowego potomstwa osób chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze⁵⁵.

Obecnie istnieje kilka testów służących ocenie funkcji śródbłonka; niestety większość z nich to badania inwazyjne i dlatego nadal trwają poszukiwania prostego i wiarygodnego badania diagnostycznego. Duże nadzieje pokłada się w wykorzystaniu do tego celu technik stosowanych w proteomice, w badaniach obrazowych (ocena przepływu krwi metodą Dopplera, angiografia rezonansu magnetycznego, tomografia komputerowa) oraz w badaniach wykorzystujących ilościową ocenę krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) i mikrocząsteczek pochodzenia śródbłonkowego⁵⁶⁻⁶⁵.

Dokładna rola CECs oraz CEPCs w patogenezie chorób przebiegających z nadciśnieniem tętniczym w czasie ciąży nie jest znana. Najprawdopodobniej prawidłowe ilości tych komórek odgrywają istotną rolę w procesach rozwoju oraz regulacji waskularyzacji w czasie ciąży, a zaburzona równowaga między poziomami tych komórek jest związana z niewydolnością śródbłonna (Rycina 3).

Jeszcze nie tak dawno panował powszechnie pogląd, że do regeneracji śródbłonna oraz powstawania nowych naczyń krwionośnych u osób dorosłych dochodzi jedynie w procesie angiogenezy. Angiogeneza charakteryzuje się tworzeniem nowych naczyń krwionośnych dzięki migracji i różnicowaniu *in situ* dojrzałych komórek śródbłonna i regulowana jest czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi ⁶⁶. Dopiero odkrycie w 1997 roku przez Asaharę i wsp. krążących komórek progenitorowych śródbłonna odmieniło całkowicie ten pogląd dowodząc, że waskulogeneza, podczas której nowe naczynia powstają z krążących komórek progenitorowych śródbłonna, jest procesem występującym również w okresie postnatalnym ⁶⁷.



Rycina 3. Rola krążących komórek śródbłonna oraz krążących komórek progenitorowych w procesach waskulogenezy i angiogenezy. Modyfikacja własna na podstawie ⁹⁴.

1.2.2 Krążące komórki śródbłónka

Po raz pierwszy krążące komórki śródbłónka zidentyfikowane zostały we krwi obwodowej w 1970 roku ⁶⁸. Są one dojrzałymi komórkami śródbłónka o średnicy od 15 do 50 μm , które mogą być wyizolowane z krwi za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej lub przy użyciu technik immunomagnetycznych. Powszechnie wiadomo, że CEPCs tracą antygen CD133 w momencie, gdy stają się dojrzałymi komórkami śródbłónka i właśnie tę właściwość wykorzystuje się do różnicowania CECs i CEPCs ⁶⁹. Są heterogenną grupą komórek; niektóre z nich są apoptotyczne, nekrotyczne, a jeszcze inne w pełni żywotne.

W warunkach fizjologicznych prawidłowy stan śródbłónka odzwierciedlony jest niskim poziomem CECs we krwi, i często z trudem udaje się wyizolować jakiegokolwiek tego rodzaju komórki z krwi obwodowej zdrowych osób. Ilość CECs we krwi jest trudna do jednoznacznego określenia z uwagi na niewystandaryzowane metody oceny liczby tych komórek. U zdrowych osób ich ilość jest niewielka i najczęściej podaje się wartości 0-12 komórek/ml krwi ^{60,70}, istnieją jednak doniesienia o ich większej liczbie u zdrowych osób dorosłych: 50 komórek/ml ⁷¹, 77 komórek/ml ⁷² i 1200 komórek/ml ⁷³. Ich ilość znacznie wzrasta, zwykle ponad dziesięciokrotnie, w przebiegu niektórych chorób związanych z uszkodzeniem śródbłónka, takich jak ostre zespoły wieńcowe, udar mózgu niedokrwienny, zapalenie małych naczyń, nadciśnienie tętnicze płucne, niedokrwistość sierpowatokrwinkowa, talasemia, infekcja riketsjami, cukrzyca, przewlekła niewydolność nerek, wstrząs septyczny, zakrzepowa plamica małopłytkowa czy układowy toczeń rumieniowaty ⁴⁹.

Istnieje wiele mechanizmów prowadzących do odczepiania komórek śródbłónka od ściany naczyń krwionośnych w przypadku ich uszkodzenia. Wśród tych mechanizmów wymienia się aktywację apoptozy, uszkodzenie mechaniczne, nierównowagę między czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi, osłabienie połączeń międzykomórkowych lub połączenia między komórkami śródbłónka a zwnętrzkomórkową macierzą, naruszenie struktury śródbłónka spowodowane działaniem cytokin/proteaz oraz wpływ niektórych leków ⁷⁴. Ilość CECs jest zatem odzwierciedleniem stanu oraz funkcji śródbłónka i można ją wykorzystać do oceny stopnia uszkodzenia naczyń krwionośnych, a nawet może być pewnego rodzaju

markerem nasilenia zmian chorobowych ^{70,71,75-77}. Opisano także wprost proporcjonalną zależność między ilością CECs, a poziomami markerów uszkodzenia/dysfunkcji śródbłonna, takimi jak czynnik von Willebrada lub E-selektyna, a także czynnika tkankowego będącego odzwierciedleniem procesów aktywujących szlaki prozakrzepowe ⁷⁸⁻⁸⁰. Ponadto Holmen i wsp. wykazali w badaniach *in vitro*, że CECs w istotny sposób ograniczają proliferację, migrację oraz ekspresję syntazy tlenu azotu na śródbłonkowych komórkach progenitorowych, co może w znaczny sposób ograniczać wydolność regeneracyjną naczyń krwionośnych ⁷¹.

1.2.3 Krążące komórki progenitorowe śródbłonna

CEPCs są niedojrzałymi komórkami prekursorowymi o średnicy mniejszej niż 15µm, wywodzącymi się ze szpiku kostnego oraz ściany naczyń krwionośnych i wykazującymi potencjał proliferacyjny ⁸¹.

Identyfikacji CEPCs można dokonać przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej, na podstawie określenia liczby krążących we krwi obwodowej komórek wykazujących ekspresję markerów linii komórek hematopoetycznych oraz śródbłonkowych. Należy jednak pamiętać, że podanie dokładnej definicji CEPCs w oparciu o obecność na ich powierzchni specyficznych antygenów pozostaje trudne, gdyż brak jest unikalnych dla tych komórek molekularnych determinant gwarantujących ich izolację. W celu wyizolowania CECs i CEPCs wykorzystuje się ekspresję na ich powierzchni antygeny CD146 oraz brak ekspresji antygeny CD45, co pozwala na odróżnienie tych komórek od aktywowanych komórek T, które to charakteryzują się ekspresją obu powyższych antygenów ⁸². Ekspresję antygeny CD34 wykazują zarówno komórki CECs, CEPCs oraz hematopoetyczne komórki macierzyste, jednak jednoczesne wyznaczenie antygenów CD34 i CD146 uznawane jest za prawidłową metodę określenia fenotypu CECs i CEPCs ^{82,83}. W celu odróżnienia CECs od CEPCs wykorzystuje się obecność antygeny CD133 na krążących komórkach progenitorowych śródbłonna i jego brak na CECs ⁸³.

Komórek tych jest we krwi niewiele, dlatego też dane na temat ich prawidłowej liczby, funkcji i typów są ograniczone ⁸⁴. Do ich mobilizacji ze szpiku kostnego dochodzi w przebiegu takich ostrych stanów, jak urazy, oparzenia, zawał serca, udar mózgu, implantacja stentów naczyniowych w sercu, terapia statynami,

intensywny wysiłek fizyczny, zapalenie stawów, choroby siatkówki oka, naczylniaki, łuszczyca, wzrost guzów nowotworowych oraz powstawanie przerzutów w przebiegu choroby nowotworowej⁸⁵⁻⁹⁰. Ilość CEPCs wraca do wartości wyjściowych zwykle w ciągu 48-72 godzin, co sugeruje ich znaczenie w zapoczątkowaniu procesu reendotelializacji w odpowiedzi na uszkodzenie naczyń⁸⁶.

Najnowsze badania dowodzą także, że liczba i funkcja krążących komórek progenitorowych śródbłonna są zmniejszone u przewlekle chorych na choroby układu sercowo- naczyniowego oraz u chorych ze zidentyfikowanymi czynnikami ryzyka wystąpienia tych chorób⁹¹⁻⁹⁴. Wpływ czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych na zmniejszenie dostępności CEPCs pozostaje nie do końca wyjaśniony. Rozważa się tutaj udział kilku mechanizmów:

- wyczerpanie puli komórek macierzystych/progenitorowych z depozytów szpikowych,
- nieprawidłowy proces mobilizacji związany ze zmniejszoną biodostępnością tlenu azotu,
- zaburzenia w osiągnięciu przez komórki miejsc docelowych spowodowane zmniejszeniem syntezy czynników chemotaktycznych,
- wzrost apoptozy i / lub zaburzone ich różnicowanie⁹⁵.

Vasa i wsp. wykazał, że nadciśnienie tętnicze jest najsilniejszym predyktorem upośledzenia zdolności migracyjnych CEPCs⁹⁶. Upośledzenie czynności krążących komórek progenitorowych śródbłonna może być przyczyną powikłań nadciśnienia tętniczego, ale także może stanowić podłoże patogenetyczne samego nadciśnienia⁹⁷. Ponadto inna grupa badaczy zaobserwowała odwrotnie proporcjonalną zależność między liczbą CEPCs we krwi obwodowej, a wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego w przebiegu nadciśnienia tętniczego opornego na leczenie⁹⁸.

Uważa się, że CEPCs odzwierciedlają zdolność organizmu do naprawy śródbłonna, a także podnosi się ich znaczenie w procesach przebudowy (*remodelingu*) naczyń krwionośnych i utrzymywaniu hemostazy śródbłonnków⁸¹. Istnieją doniesienia na temat roli tych komórek w procesach zachodzącej w okresie prenatalnym i postnatalnym waskulogenezy i reendotelializacji oraz ich znaczenia w przebiegu waskularyzacji błony śluzowej jamy macicy podczas implantacji zarodka oraz placentacji w czasie ciąży⁹⁹. Możliwy udział CEPCs we wzroście naczyń endometrium i przygotowanie go do potencjalnej implantacji zarodka przejawia się

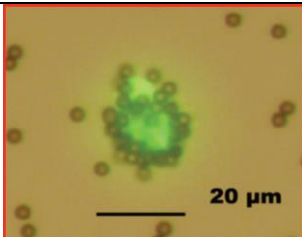
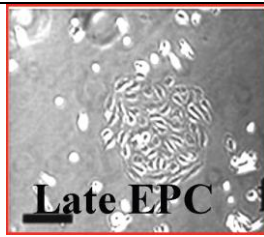
mobilizacją CEPCs w fazie lutealnej cyklu miesięczkowego i zwiększeniem ich ilości we krwi obwodowej w porównaniu do fazy folikularnej. Natomiast w przebiegu postnatalnej waskulogenezy komórki te osadzają się w naczyniach, a następnie w procesie migracji i różnicowania przyczyniają się do powstawania nowych naczyń krwionośnych. Stanowią w tym procesie podstawowy materiał budulcowy nowych naczyń, ale także stymulują waskulogenezę poprzez parakrynnie oddziaływanie na sąsiednie komórki. Pierwsze dowody waskulogenezy postnatalnej uwarunkowanej działaniem ludzkich komórek prekursorowych CD34+ zostały opracowane na modelu mysim przez Asaharę i wsp., którzy wywołując niedokrwienie kończyn tylnych tych zwierząt opisali migrację komórek progenitorowych pochodzących ze szpiku kostnego do uszkodzonych obszarów naczyń krwionośnych i doprowadzających do przywrócenia prawidłowego przepływu krwi poprzez formowanie nowych naczyń krwionośnych ⁶⁷. Z kolei Rafii i wsp. już w 2003 roku dokonali analizy dostępnych publikacji potwierdzających znaczenie postnatalnej waskulogenezy *in vivo* u człowieka ¹⁰⁰. Wiadomo już także, że komórki te stanowią około 25 % komórek śródbłonna w nowopowstałych naczyniach krwionośnych ¹⁰¹.

Obecnie prowadzone są także przedkliniczne badania na szczurzych modelach chorób układu krążenia polegające na podawaniu CEPCs, które stanowią początek dla przeprowadzenia pierwszych tego typu badań w wybranych sytuacjach klinicznych u ludzi ¹⁰². W przypadku niektórych chorób udokumentowano korzystny wpływ infuzji CEPCs na ich przebieg, choć nie tak spektakularny jak wykazały badania na modelach zwierzęcych, i do tej pory terapia tego typu pozostaje w fazie badań eksperymentalnych ¹⁰³.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach sugerują udział CEPCs w procesach stanowiących podłoże patogenetyczne stanu przedrzucawkowego. Mobilizacja CEPCs do krążenia zachodzi na drodze szlaków zależnych od tlenu azotu w odpowiedzi na stymulację między innymi czynnikiem wzrostu śródbłonnków naczyńiowych, łożyskowym czynnikiem wzrostu oraz estrogenami ¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Rehman i wsp. wykazał, że CEPCs zdolne są do wydzielania niektórych czynników wzrostu istotnych z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania śródbłonna, między innymi VEGF ¹⁰⁸. Ponadto w czasie ciąży dochodzi do uruchomienia CEPCs ze szpiku kostnego do krwi obwodowej. Mobilizacja ta może stanowić ważny mechanizm, za

pomocą którego estrogeny zapewniają ochronę śródbłonka naczyniowego w czasie ciąży ¹⁰⁹.

Tabela 1. Zbiorcza charakterystyka porównawcza CECs i CEPCs. Fotografie zaczerpnięto z ⁹⁴.

Cecha	CECs	CEPCs
		
Pochodzenie	Ściana naczyń krwionośnych	Głównie szpik kostny
Morfologia	Dojrzałe komórki o średnicy ok. 15- 50μm	Niedojrzałe komórki o średnicy < 15 μm
Metoda laboratoryjna	Izolacja immunomagnetyczna, cytometria przepływowa	Cytometria przepływowa, hodowla komórkowa (culture assays)
Charakterystyczne właściwości	CD 146	CD 34 i/lub CD 133
Potencjał proliferacyjny	Niski	Wysoki
Zastosowanie w terapii	Brak wykorzystania w terapii	Potencjalna wartość terapeutyczna
Poziomy w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego	Podwyższone	Zmienne
Korelacja z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego	Pozytywna	Negatywna
Patofizjologia	Uszkodzenie śródbłonka	Waskulogeneza/naprawa śródbłonka
Inne	Pozytywna korelacja z poziomami osoczowych markerów uszkodzenia naczyń krwionośnych	

1.3 Czynniki von Willebranda

Czynnik von Willebranda jest dużą, multimeryczną glikoproteiną pełniącą dwie podstawowe funkcje w procesie hemostazy. Działa jako molekula wiążąca płytki krwi z powierzchnią śródbłonnków, z podśródbłonkowymi strukturami naczyń (kolagen typu I, II, III, IV, V i VI) oraz z miejscem uszkodzenia śródbłonka, co jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu procesu adhezji płytek krwi oraz ich agregacji w miejscu uszkodzenia naczynia ¹¹⁰. Jest także nośnikiem dla czynnika VIII we krwi krążącej tworząc z nim nieaktywne kompleksy vWf/VIII, przez co wydłuża jego okres półtrwania nawet pięciokrotnie, zapewniając tym samym jego prawidłowe stężenia i odgrywając istotną rolę w tworzeniu skrzepów fibrynowych ¹¹¹. Dodatkowo vWf pełni rolę w procesach zapalnych poprzez pobudzanie rekrutacji leukocytów do powierzchni komórek śródbłonka, w angiogenezie, procesach angiodyplastycznych, proliferacji komórek oraz apoptozie ¹¹².

Najczęściej podaje się, że stężenie vWf w osoczu wynosi od 500 do 1000 µg/dl. Stężenia w osoczu wykazują jednak duże różnice międzyosobnicze w zdrowej populacji; czynniki odpowiedzialne za tę zmienność nie są poznane, choć istotnym wydaje się polimorfizm genu czynnika von Willebranda ¹¹³. vWf syntetyzowany jest zarówno przez komórki śródbłonka jak i megakariocyty. Może być sukcesywnie wydzielany przez komórki śródbłonka, ale może też być w nich magazynowany w wewnątrzkomórkowych organellach nazywanych ciałkami Weibel-Palade'a, skąd dochodzi do jego uwalniania pod wpływem różnorodnych czynników ¹¹⁴. Najnowsze badania z zakresu proteomiki zidentyfikowały szereg białek magazynowanych w ciałkach Weibel-Palade'a, które biorą udział w procesie angiogenezy ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Czynniki von Willebranda, jako podstawowa jednostka warunkująca powstawanie ciałek Weibel-Palade'a, reguluje także magazynowanie oraz wydzielanie tych białek.

Badania ostatnich lat wykazały rolę vWf w kontroli proliferacji komórek mięśni gładkich, kontroli zapalenia naczyń krwionośnych oraz śmierci komórek ¹¹⁸. W 2011 roku Starke i wsp. przedstawili jego nową funkcję, jaką jest nadzorowanie formowania naczyń krwionośnych ¹¹⁹. Mechanizm sprawowania kontroli nad procesami angiogenezy polega na stymulowaniu VEGFR2. Stymulacja ta odbywa się prawdopodobnie dwiema drogami kontrolującymi angiogenezę:

zewnątrzkomórkową z udziałem integryny $\alpha\beta 3$ oraz wewnątrzkomórkową, angażującą angiopoetynę-2 magazynowaną w ciałkach Weibel-Palade'a ^{119,120}.

Prawidłowo przebiegająca ciąża związana jest z występowaniem istotnych zmian w układzie hemostazy. Wzrastają stężenia większości czynników prozakrzepowych, natomiast zmniejszają się poziomy substancji o działaniu antykoagulacyjnym oraz zmniejsza się aktywność fibrynolityczna, co warunkuje prawidłowe funkcjonowanie łożyska i zapewnia optymalną hemostazę podczas porodu. Zmiany układu koagulologicznego oraz fibrynolitycznego w czasie ciąży tworzą w efekcie stan nadkrzepliwości ¹²¹. Mechanizm ten warunkowany jest wpływem hormonów i ma za zadanie chronić ciężarną przed krwotokiem okołoporodowym, z drugiej strony predysponuje ją do występowania zdarzeń zakrzepowo-zatorowych.

W czasie ciąży rośnie znacznie stężenie czynników krzepnięcia V, VII, VIII, IX, X, XII, czynnika von Willebranda oraz wzrasta koncentracja fibrynogenu w osoczu ^{121,122}. Poziom vWf oraz czynnika VIII wzrastają znacznie szczególnie w późnej ciąży, kiedy to aktywność krzepnięcia jest około dwukrotnie większa niż u kobiet nie ciężarnych. Stirling i wsp. wykazał, że między 11 a 15 tygodniem ciąży przeciętny poziom vWf stanowi 133 % jego stężenia u kobiet nie ciężarnych, między 21 a 25 tygodniem ciąży 167 %, między 31 a 35 tygodniem ciąży 262 %, a między 36 a 40 tygodniem ciąży aż 376 % ¹²¹. Proces jego syntezy regulowany jest m.in. działaniem hormonów, i tak komórki endotelium produkują zwiększone ilości vWf pod wpływem działania estrogenów, co implikuje jego zwiększone poziomy w II i III trymestrze ciąży ^{123,124}.

Czynnik von Willebranda jest także specyficznym osoczkowym markerem dysfunkcji/uszkodzenia śródbłoków. Poza ciążą jego zwiększone stężenia obserwuje się w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego, chorób tkanki łącznej oraz chorób nowotworowych. Istotnie zwiększone poziomy vWf w odniesieniu do populacji zdrowych ciężarnych zaobserwowano w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego oraz stanu przedrzucawkowego ¹²⁵⁻¹²⁸, jednak doniesienia na ten temat nie są jednoznaczne ¹²⁹.

Na podstawie powyższych informacji można przypuszczać, że panel markerów złożony z CECs, CEPCs, czynnika von Willebranda, mikrocząsteczek pochodzenia śródbłokowego może stanowić wartościowe narzędzie służące ocenie integralności naczyń oraz ich zdolności do odbudowy.

2 Cel pracy

Nadrzędnym celem pracy była ocena nieprawidłowości w obrębie śródbłonka w przebiegu ciąży powikłanych nadciśnieniem tętniczym. Cel pracy realizowany był przez:

1. Ocenę ilości krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs), wartości współczynnika CEPCs/CECs oraz stężenia czynnika von Willebranda;
2. Określenie zależności między stężeniem czynnika von Willebranda, a ilością krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs;
3. Ocenę związku między wartościami średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego całodobowego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnego ciśnienia skurczowego i maksymalnego ciśnienia rozkurczowego, a stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs;
4. Ocenę zależności między stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i zmianami punktacji w skali tętnic macicznych;
5. Określenie zależności nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia czynnika von Willebranda, ilości krążących komórek śródbłonka (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) oraz wartości współczynnika CEPCs/CECs.

3 Materiał

Badaniami objęto łącznie 71 kobiet hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Perinatologii i Ginekologii Katedry Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pomiędzy listopadem 2010 a styczniem 2014 roku. U wszystkich 71 kobiet wykonano automatyczny całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego oraz pobrano materiał do badań, który stanowiła krew obwodowa.

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań (zgoda numer 52/13). Wszystkie pacjentki otrzymały wyczerpującą informację na temat badania i podpisały świadomą zgodę na ich przeprowadzenie.

Badania zostały sfinansowane z grantu dla młodych naukowców przyznanego doktorantce przez Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr tematu: 502-14-02218346-50637).

W ramach realizacji projektu podjęto współpracę z Katedrą Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu im. Karola Marcinkiewicza przy ul. Rokietnickiej 5d, 60-806, Poznań. Współpraca polegała na umożliwieniu oraz pomocy w wykonaniu analiz laboratoryjnych z próbek krwi pacjentek.

3.1 Grupy

3.1.1 Grupy badane

Grupy badane utworzono w oparciu o dobór celowy pacjentek. Wyodrębniono 3 grupy badane:

- ciężarne z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (n= 10)
- ciężarne z nadciśnieniem tętniczym ciążowym (n=18)
- ciężarne ze stanem przedrzucawkowym (n=21)

Pacjentki kwalifikowano do grup zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy³. Każda z pacjentek miała wykonane badanie przepływów dopplerowskich w tętnicach macicznych, naczyniach pępowinowych oraz tętnicy środkowej mózgu płodu. Ponadto u pacjentek w stanie

przedrzucawkowym zanalizowano poziom białka w moczu. Wszystkie ciąży były ciążami pojedynczymi.

3.1.2 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną utworzono w oparciu o dobór celowy pacjentek i stanowią ją zdrowe kobiety ciężarne odpowiadające pod względem wieku pacjentki, wieku ciążowego i rodności grupom badanym (n= 22).

Każda z pacjentek miała wykonane badanie przepływów dopplerowskich w tętnicach macicznych, naczyniach pępowinowych oraz tętnicy środkowej mózgu płodu. Wszystkie ciąży były ciążami pojedynczymi. W grupie kontrolnej zastosowano następujące kryteria wykluczając włączenie do grupy: choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby metaboliczne, choroby nowotworowe, choroby zapalne oraz choroby autoimmunologiczne.

Charakterystykę analizowanych grup podsumowano w tabeli 2. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku pacjentki, wieku ciążowego oraz rodności pomiędzy grupami badanymi i grupą kontrolną.

W grupach badanych wartości średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego całodobowego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnego ciśnienia skurczowego oraz maksymalnego ciśnienia rozkurczowego były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej, a najwyższe wyniki odnotowano w grupie pacjentek ze stanem przedrzucawkowym.

Tabela 2. Charakterystyka grup badanych oraz grupy kontrolnej.

	Nadciśnienie tętnicze przewlekłe	Nadciśnienie tętnicze ciążowe	Stan przedrzucawkowy	Zdrowe ciążarne
Wiek pacjentki	33,3 ± 4,7	29,6 ± 3,7	31,9 ± 6,7	31,8 ± 5,6
Wiek ciążyowy	31,6 ± 7,2	37,3 ± 3,2	33,2 ± 2,6	35,8 ± 5,4
Rodność <i>mediana</i> <i>(min-max)</i>	2 (1- 8)	2 (1-3)	1 (1- 5)	2 (1- 5)
Średnie całodobowe ciśnienie tętnicze skurczowe <i>średnia±SD</i> <i>(mmHg)</i>	131,5 ± 12	134,1 ± 14,2	149,1 ± 15,7	110,9 ± 9,7
Średnie całodobowe ciśnienie tętnicze rozkurczowe <i>średnia±SD</i> <i>(mmHg)</i>	82,7 ± 7,5	83,9 ± 10,1	97,4 ± 13,1	68,8 ± 6,7
Maksymalne ciśnienie tętnicze skurczowe <i>średnia±SD</i> <i>(mmHg)</i>	163 ± 25,5	159,5 ± 19,7	182,2 ± 23,4	118,2 ± 11,9
Maksymalne ciśnienie tętnicze rozkurczowe <i>średnia±SD</i> <i>(mmHg)</i>	108,8 ± 21,4	107,6 ± 16,1	117,6 ± 13,1	75,9 ± 12,4

4 Metody

4.1 Oznaczenie ilości krążących komórek śródbłonka oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonka we krwi pełnej

4.1.1 Przeciwciała monoklonalne wykorzystane do oceny ilościowej krążących komórek śródbłonka oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonka za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej

Celem przeprowadzenia analizy wykorzystano następujące przeciwciała monoklonalne: CD146, anty-ludzkie, skoniugowane z fluorochromem peridynino-chlorofilem (PerCP) (Research &Diagnostics Systems, USA); CD45, anty-ludzkie, skoniugowane z fluorochromem allofikocyjaniną-cyjaniną (APC- Cy7) (Becton Dickinson, USA), CD34, anty-ludzkie, skoniugowane z fluorochromem allofikocyjaniną (APC) (Becton Dickinson, USA) oraz CD133, anty-ludzkie, skoniugowane z fluorochromem allofikocyjaniną (APC) (Miltenyi Biotec, Germany).

4.1.2 Analiza krążących komórek śródbłonka i krążących komórek progenitorowych śródbłonka za pomocą wielokolorowej cytometrii przepływowej

5 ml krwi żyłnej pobierano z żyły zgięcia łokciowego do probówek neutralnych oraz zawierających etylenodwuaminoczeroctan (EDTA). Krew z pierwszej probówki wirowano i osocze zamrażano w temperaturze -80 ° C , które następnie wykorzystano do oznaczenia poziomu czynnika von Willebranda, natomiast krew z drugiej probówki wykorzystano do analizy cytometrycznej. Krew do analizy cytometrycznej pobierana była zawsze w drugiej kolejności, co miało na celu zminimalizowanie prawdopodobieństwa wzrostu ilości złuszczonej komórek śródbłonka fenotypowo odpowiadających CECs, spowodowanego uszkodzeniem śródbłonka podczas procedury nakłucia żyły. Cytometrię przepływową wykonywano w ciągu 2 godzin od pobrania materiału.

W celu ilościowego oznaczenia CECs oraz CEPCs wykorzystano panel następujących skoniugowanych monoklonalnych przeciwciał anty-ludzkich: CD34 APC, CD146 PerCP, CD45 APC-Cy7 oraz CD133 APC.

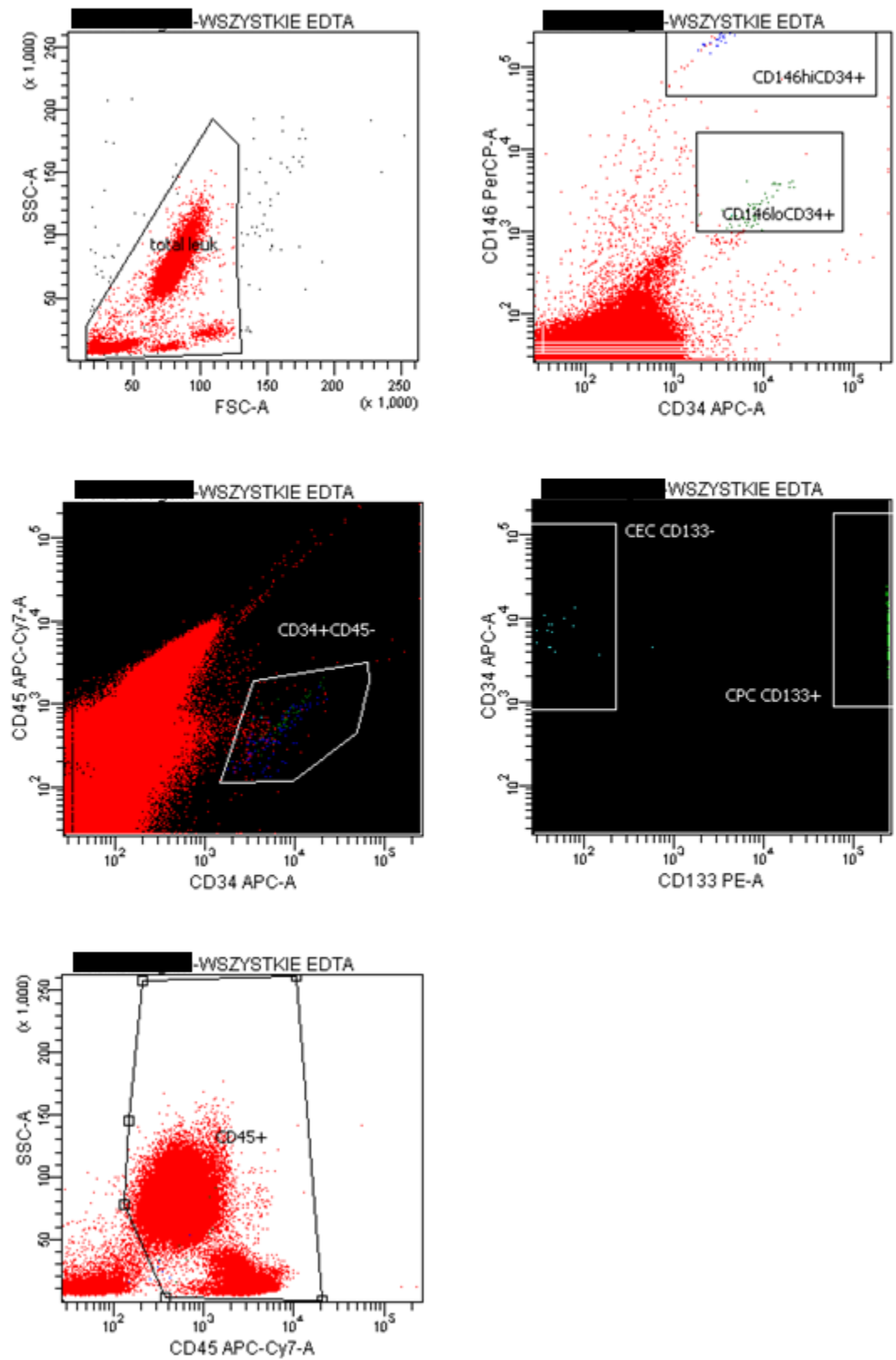
Po przeniesieniu 10 μ l krwi żyłnej do dwóch polipropylenowych próbek testowych i po delikatnym wymieszaniu, inkubowano materiał z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z fluorochromami, dodanymi w ilościach zalecanych przez producenta przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Do pierwszej próbki dodawano przeciwciała izotopowe, niereaktywne wobec antygenów ludzkich, wyznakowane fluorochromami. Do drugiej przeciwciała antyludzkie CD34, CD146, CD45 oraz CD133. Wyznakowane próbki krwi pełnej poddawano lizie erytrocytów przy użyciu 2 ml zbuforowanego roztworu lizującego, następnie 15- minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej w ciemności i odwirowaniu z przyspieszeniem 300 g przez 5 minut i usunięto supernatant. Następnie dodawano 2 ml buforowanego fosforanem roztworu soli fizjologicznej oraz ponownie wirowano z przyspieszeniem 300g przez 5 minut oraz usunięto supernatant. Tak przygotowane próbki były przechowywane w temperaturze pokojowej w ciemności i analizowane w ciągu 1 godziny.

Ocenę komórek jądrzastych we krwi pełnej wykonano przy użyciu 6-kolorowego cytometru przepływowego FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Następnie uzyskane dane były analizowane przy użyciu oprogramowania BD FACSDiva.

CEPCs zdefiniowano jako liczbę komórek CD45(-), CD34(+), CD146(+) i CD133(+) zebranych podczas 1,000,000 analizowanych komórek. CECs natomiast scharakteryzowano jako komórki CD45(-), CD34(+), CD146(+) i CD133(-) zebrane podczas 1,000,000 analizowanych komórek. Komórki jądrzaste bramkowano według parametrów fizycznych FSC/SSC. Kontrolę negatywną, używaną do ustalenia tła autofluorescencji oraz niespecyficznego reakcji przeciwciał, stanowiła próbka, do której dodane były skoniugowane przeciwciała izotypowe.

Celem zapewnienia odpowiedniej jakości badań wprowadzono kontrole wewnętrzne, polegające na codziennej kalibracji cytometru przepływowego oraz kontroli stabilności używanych płynów. Kontrola jakości przeciwciał prowadzona była na ludzkiej linii komórek śródbłonna żyły pępowinowej.

Na rycinie 4a i 4b przedstawiono przykładowy protokół z przeprowadzanego przez nas badania cytometrycznego.



Rycina 4a. Przykładowy protokół analizy cytometrycznej.

Tube: WSZYSTKIE EDTA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	962,816	###	100.0
total leuk	953,682	99.1	99.1
CD146hiCD34+	96	0.0	0.0
CD146loCD34+	62	0.0	0.0
CD34+CD45-	263	0.0	0.0
CD146hiCD34+CD45-	79	0.0	0.0
CD146loCD34+CD45-	57	0.0	0.0
CD45+	830,794	87.1	86.3
CD146hi OR CD146lo	136	0.0	0.0
CEC CD133-	56	41.2	0.0
CPC CD133+	79	58.1	0.0

Experiment Name: CPC
Specimen Name: XXXXXXXXXX
Tube Name: WSZYSTKIE EDTA
Record Date: Oct 4, 2012 7:26:36 PM
\$OP: Studenci
GUID: a1321dd8-ac5a-408a-bbd9-9c0e23171517

Population	#Events	%Parent
CD45+	830,794	87.1144
CEC CD133-	56	41.1765
CPC CD133+	79	58.0882

Rycina 4b. Przykładowy protokół analizy cytometrycznej.

4.2 Oznaczenie stężenia czynnika von Willebranda w osoczu

5 ml krwi pobierano do próbki neutralnej. Następnie odwirowywano ją przez 10 minut, a osocze przenoszono do próbek typu Eppendorfa 1,5 ml i zamrażano w temperaturze -80 °C do czasu wykonania oznaczeń. U wszystkich kobiet z grup badanych oraz u wszystkich kobiet z grupy kontrolnej oznaczono stężenie czynnika von Willebranda w osoczu przy pomocy komercyjnego zestawu Human VWF ELISA Kit (E90833Hu; Uscn Life Science Inc., USA).

Procedura oznaczania została przeprowadzona zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta w Katedrze Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4.3 Ocena przepływów dopplerowskich w tętnicach macicznych, tętnicy pępowinowej oraz tętnicy środkowej mózgu płodu

Ocena przepływu krwi w tętnicach macicznych, tętnicy pępowinowej oraz tętnicy środkowej mózgu wykonywana była przy użyciu aparatów Voluson E8 (GE Healthcare) oraz Voluson 730 Expert (GE Healthcare) wyposażonych w głowice o zmiennej częstotliwości 3,5 do 5 MHz typu Convex, pracujące w czasie rzeczywistym z opcjami kolorowego Dopplera i angiografii Dopplerowskiej.

Pomiarów dokonywano przy braku ruchów ciała oraz ruchów oddechowych płodu. Celem wyeliminowania możliwości wystąpienia zespołu żyły głównej dolnej, ciężarna znajdowała się w pozycji półleżącej i była przechylona na lewy bok. W trakcie wykonywania badania, w zależności od ocenianego naczynia, zachowywano kąt ustawienia bramki dopplerowskiej w przedziale od 0° do 30°.

Przepływ krwi w wyżej wymienionych naczyniach oceniano pod kątem wartości PI automatycznie obliczanego przez aparat ultrasonograficzny na podstawie widma kształtu fali przepływu według Goslinga i wsp.¹³⁰ z wzoru:

$$PI = \frac{S - D}{(S + D)/2}$$

gdzie: PI- indeks pulsacji

S- maksymalna prędkość skurczowa

D- minimalna prędkość rozkurczowa

Ponadto w tętnicach macicznych oceniano występowanie wcięcia wczesnorozkurczowego w widmie fali przepływu.

4.3.1 Ocena wydolności łożyska

4.3.1.1 Ocena przepływu krwi w lewej oraz prawej tętnicy macicznej ciężarnej

Badanie wykonywano przy użyciu sondy brzusznej z wykorzystaniem techniki kolorowego Dopplera, za pomocą którego uwidaczniano skrzyżowanie naczyń macicznych z tętnicą i żyłą biodrową zewnętrzną. Bramkę dopplerowską

wstawiano w światło naczynia w odcinku powyżej skrzyżowania tętnicy macicznej z naczyniami biodrowymi, przy zachowanym kącie insonacji $< 30^\circ$ i odpowiednim ustawieniu prędkości przepływu (40cm/s).

Przepływ krwi w tętnicach macicznych oceniany był w oparciu o wartości indeksu pulsacji oraz obecność wcięcia wczesnorozkurczowego w widmie fali przepływu, z wykorzystaniem skali tętnic macicznych¹³¹. Każda z pacjentek otrzymywała punkty w skali od 0 do 4 w zależności od wartości indeksu pulsacji oraz obecności lub braku wcięcia wczesnorozkurczowego („notch”). Ocena nieprawidłowych parametrów badania dopplerowskiego jest następująca:

1. Obecność „notch” w tętnicy macicznej prawej: 1 punkt
2. Obecność „notch” w tętnicy macicznej lewej: 1 punkt
3. Wartość PI $>1,2$ w tętnicy macicznej prawej: 1 punkt
4. Wartość PI $>1,2$ w tętnicy macicznej lewej: 1 punkt.

Wysoka punktacja w powyższej skali (3 i 4 punkty) koreluje z niewydolnością maciczno-łożyskową, obserwowaną między innymi w przebiegu stanu przedrzucawkowego czy nadciśnienia tętniczego ciążowego.

4.3.1.2 Wskaźnik mózgowo-pępowinowy

Celem oceny wydolności łożyska dodatkowo wykonano obliczenia wartości wskaźnika mózgowo- pępowinowego, który jest ilorazem wartości PI w tętnicy środkowej mózgu oraz w tętnicy pępowinowej.

Kryteria niewydolności łożyska zdefiniowano, jako występowanie co najmniej jednej z następujących nieprawidłowości:

- 1) Podwyższona wartość PI w tętnicy pępowinowej;
- 2) Obniżona wartość PI w tętnicy środkowej mózgu;
- 3) AEDF lub REDF w tętnicy pępowinowej;
- 4) Wartość CUR <5 centyla dla odpowiedniego tygodnia ciąży¹³².

4.3.2 Ocena przepływu krwi w tętnicy pępowinowej

Bramkę dopplerowską wstawiano w światło tętnicy pępowinowej w obrębie jej wolnej pętli przy kącie pomiaru mniejszym niż 10°. Wartości PI odniesiono do wartości referencyjnych według Merz'a ¹³³. Zwiększony opór naczynia określano jako wartości PI > wartość średnia + 2SD.

4.3.3 Ocena przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu

Celem zlokalizowania tętnicy środkowej mózgu uzyskiwano przekrój poprzeczny mózgowia płodu z uwidocznieniem wzgórza oraz jamy przegrody przezroczystej i przy pomocy techniki kolorowego Dopplera uwidacziano koło tętnicze Willisa. Następnie, po dokładnym zlokalizowaniu tętnicy środkowej mózgu, wstawiano bramkę dopplerowską w światło naczynia około 1-2 mm od miejsc odejścia tętnicy środkowej mózgu od koła tętniczego Willisa. Kąt pomiaru nie przekraczał 20°. Celem zmniejszenia prawdopodobieństwa zafałszowania wartości indeksu pulsacji w badanych naczyniach, dążono do niwelowania nadmiernego ucisku głowicą ultrasonograficzną na główkę płodu, gdyż działanie takie mogłoby prowadzić do zwiększenia ciśnienia wewnątrzczaszkowego ¹³⁴.

Wartości PI odniesiono do wartości referencyjnych według Baschata i Gembrucha ¹³⁵. Zmniejszony opór naczynia i wystąpienie efektu centralizacji krążenia zdefiniowano wartościami indeksu pulsacji w tętnicy środkowej mózgu < wartość średnia – 2SD.

4.4 Automatyczny 24-godzinny pomiar ciśnienia tętniczego

Całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego przeprowadzono z wykorzystaniem rejestratora ciśnienia krwi HolCARD CR-07 produkcji firmy Aspel. Pomiar ciśnienia tętniczego dokonywane były co 30 minut, rozmiar mankietu był odpowiednio dobrany do obwodu ramienia pacjentki i wyłączano podgląd pomiarów dla pacjentki celem wyeliminowania ewentualnego czynnika stresogenego.

Analizie statystycznej poddano:

- Średnie wartości całodobowe ciśnienia tętniczego skurczowego oraz rozkurczowego,
- Maksymalne wartości ciśnienia tętniczego skurczowego oraz rozkurczowego.

4.5 Oznaczenie poziomu białka w dobowej zbiórce moczu

Przed rozpoczęciem badania pacjentki zostały poinformowane o konieczności unikania znacznego wysiłku fizycznego w dniu poprzedzającym badanie oraz unikania spożywania znacznej ilości białka.

Pacjentki oddawały mocz do specjalnego pojemnika z podziałką przez 24 godziny, rozpoczynając magazynowanie moczu od drugiej porannej porcji moczu, a kończąc na pierwszej porannej porcji moczu dnia następnego. Pojemnik przechowywano w chłodnym i zaciemnionym miejscu. Na pojemniku umieszczone było imię i nazwisko pacjentki, numer księgi głównej, całkowita ilość oddanego moczu oraz dokładny czas rozpoczęcia i zakończenia zbiórki. Następnie mocz przekazany był do laboratorium, gdzie określano nasilenie białkomoczu.

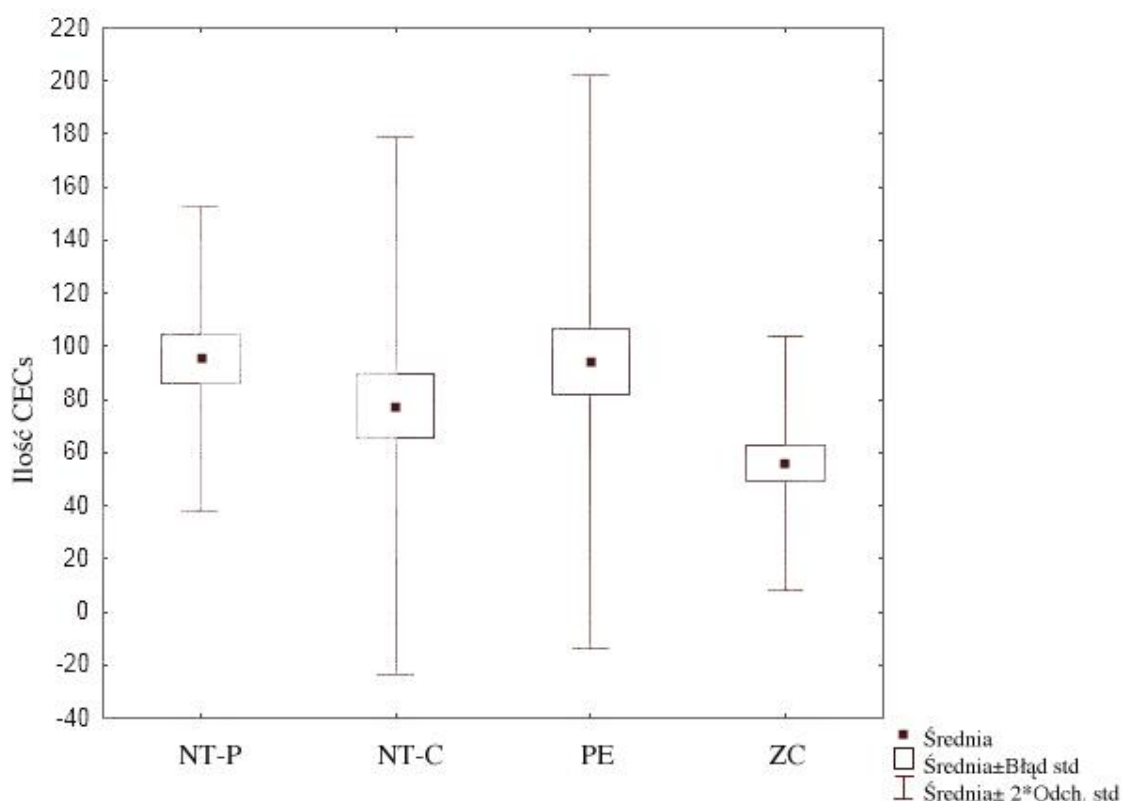
4.6 Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej użyto programu Statistica w wersji 10 firmy StatSoft. Do oceny normalności rozkładu badanych zmiennych w skali interwałowej użyto testu Shapiro-Wilka. W przypadku normalności rozkładu badanej zmiennej w porównywanych grupach do oceny istotności różnic użyto testu t-Studenta. Do oceny istotności różnic w przypadku braku normalności rozkładu zmiennej w skali interwałowej oraz zmiennych mierzonych w skali porządkowej użyto testu Manna-Whitneya. Do oceny korelacji zmiennych wykorzystano test korelacji rangowej Spearmana. Za granicę istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

5 Wyniki

5.1 Ilość krążących komórek śródbłónka we krwi obwodowej

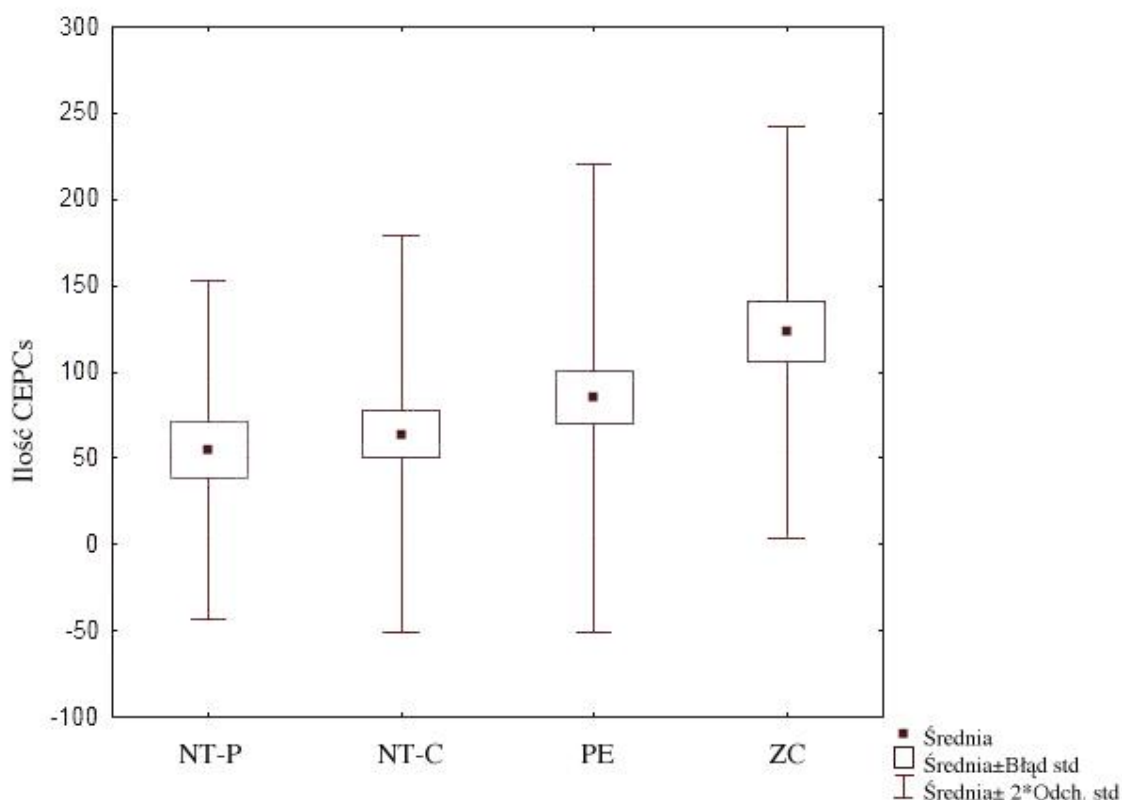
Największą średnią ilość CECs stwierdzono we krwi obwodowej ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (95 ± 29 komórek), natomiast najmniejszą średnią ilość wykazano w grupie kontrolnej (56 ± 24 komórki) ($p < 0.005$). Wykazano także istotną statystycznie różnicę w ilości CECs pomiędzy grupą ciężarnych w stanie przedrzucawkowym (94 ± 54 komórki), a grupą zdrowych ciężarnych (56 ± 24 komórki) ($p < 0.019$) (Rycina 5).



Rycina 5. Ilość CECs we krwi kobiet w ciąży powikłanych nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ciężarnych (NT-P- nadciśnienie tętnicze przewlekłe; NT-C- nadciśnienie tętnicze ciążowe; PE- stan przedrzucawkowy; ZC- zdrowe ciężarne).

5.2 Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłonna we krwi obwodowej

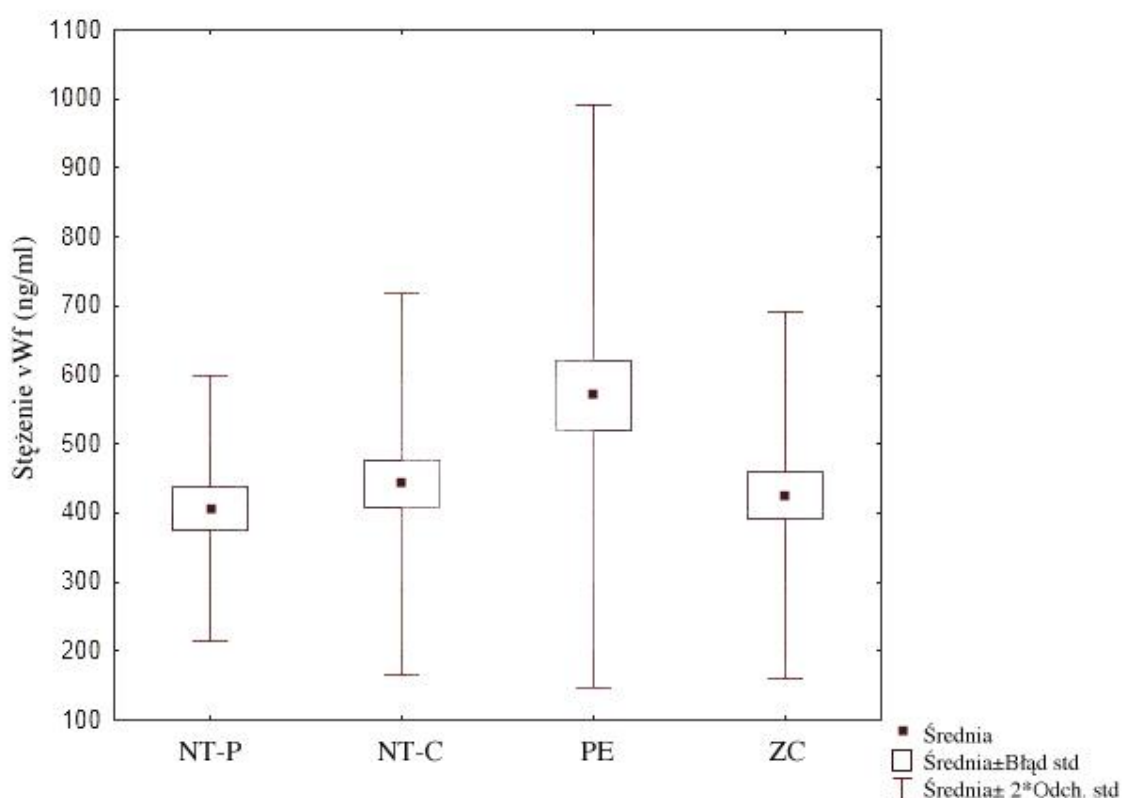
Największą średnią ilość CEPCs stwierdzono we krwi obwodowej zdrowych ciężarnych (123 ± 59 komórek), natomiast najmniejszą średnią ilość wykazano w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (55 ± 40 komórek) ($p < 0.008$). Istotnie statystycznie różnice w ilości CEPCs odnotowano również pomiędzy grupą kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym (64 ± 57 komórek) oraz grupą kontrolną (123 komórki ± 59) ($p < 0.005$) (Rycina 6).



Rycina 6. Ilość CEPCs we krwi kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ciężarnych (NT-P- nadciśnienie tętnicze przewlekłe; NT-C- nadciśnienie tętnicze ciążowe; PE- stan przedzucawkowy; ZC- zdrowe ciężarne).

5.3 Stężenie czynnika von Willebranda w osoczu

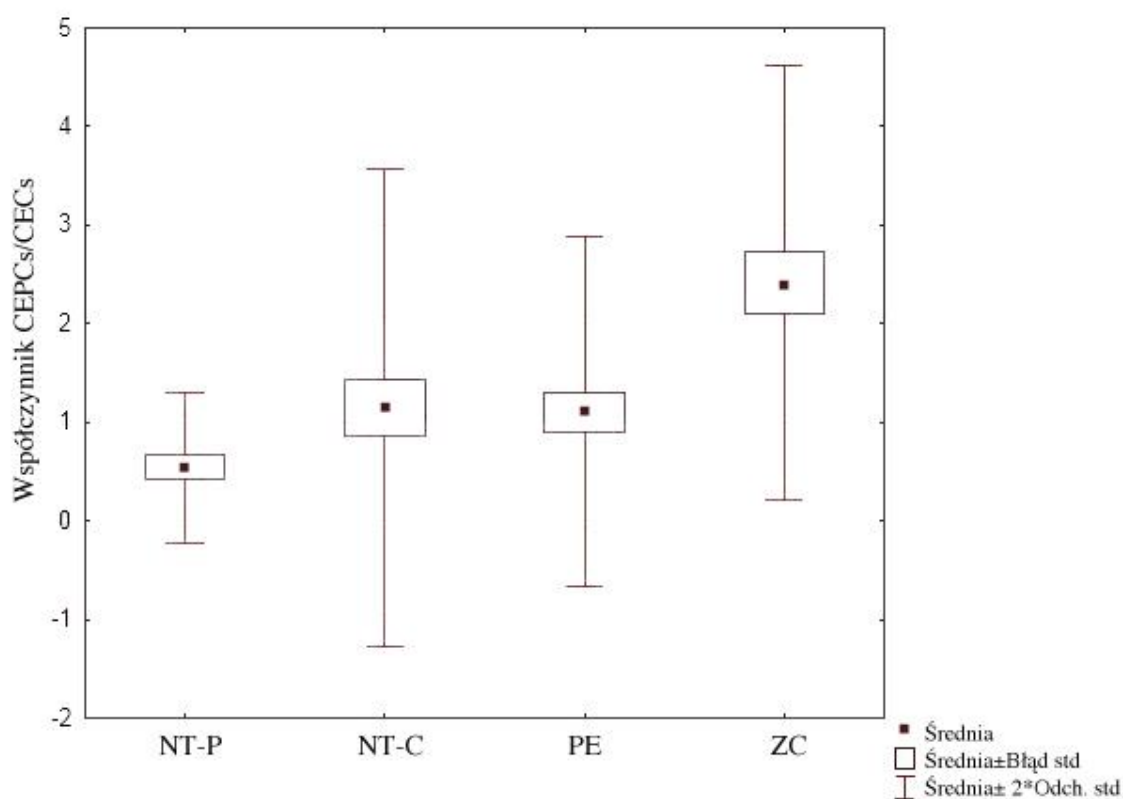
U kobiet w ciążach powikłanych stanem przedzucawkowym średnie stężenie vWf w osoczu wynosiło 569 ± 210 ng/ml i było wyższe w porównaniu do pozostałych grup badanych oraz grupy kontrolnej, różnice te jednak nie osiągnęły istotności statystycznej. Natomiast najniższe stężenie vWf wykazano w osoczu ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (407 ± 96 ng/ml) (Rycina 7).



Rycina 7. Stężenie czynnika von Willebranda w osoczu kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ciężarnych (NT-P- nadciśnienie tętnicze przewlekłe; NT-C- nadciśnienie tętnicze ciążowe; PE- stan przedzucawkowy; ZC- zdrowe ciężarne).

5.4 Wartości współczynnika CEPCs/CECs

Współczynnik CEPCs/CECs osiągnął najniższe wartości u kobiet w ciąży powikłanej nadciśnieniem tętniczym przewlekłym ($0,54 \pm 0,38$), natomiast najwyższą średnią osiągnął w grupie zdrowych kobiet ciężarnych ($2,41 \pm 1,1$) ($p < 0.0003$). Ponadto wykazano istotne statystycznie różnice w wartościach tego współczynnika między grupą kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym ($1,15 \pm 1,2$) ($p < 0.006$) i ze stanem przedzucawkowym ($1,1 \pm 0,9$) ($p < 0.0025$), a grupą kontrolną (Rycina 8).



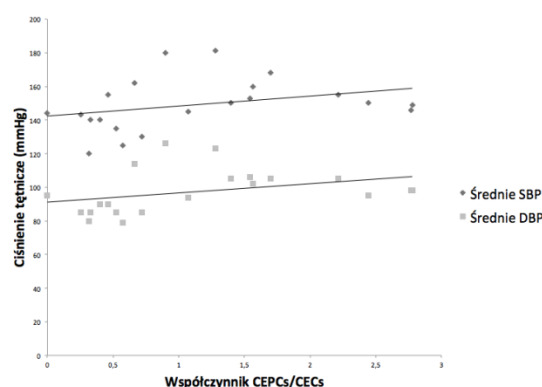
Rycina 8. Wartości współczynnika CEPCs/CECs u kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ciężarnych (NT-P- nadciśnienie tętnicze przewlekłe; NT-C- nadciśnienie tętnicze ciążowe; PE- stan przedzucawkowy; ZC- zdrowe ciężarne).

5.5 Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, a ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs

W żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem vWf, a średnią ilością CECs, CEPCs i współczynnika CEPCs/CECs.

5.6 Zależność między wartościami średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego całodobowego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnymi wartościami ciśnienia tętniczego skurczowego i maksymalnymi wartościami ciśnienia tętniczego rozkurczowego, a stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs

W grupie kobiet w ciążyach powikłanych stanem przedrzucawkowym stwierdzono pozytywną korelację między średnim całodobowym ciśnieniem tętniczym skurczowym oraz rozkurczowym, a wartościami współczynnika CEPCs/CECs (odpowiednio $R=0,49$; $p<0,03$ oraz $R=0,58$; $p<0,009$) (Rycina 9). W pozostałych grupach nie wykazano korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

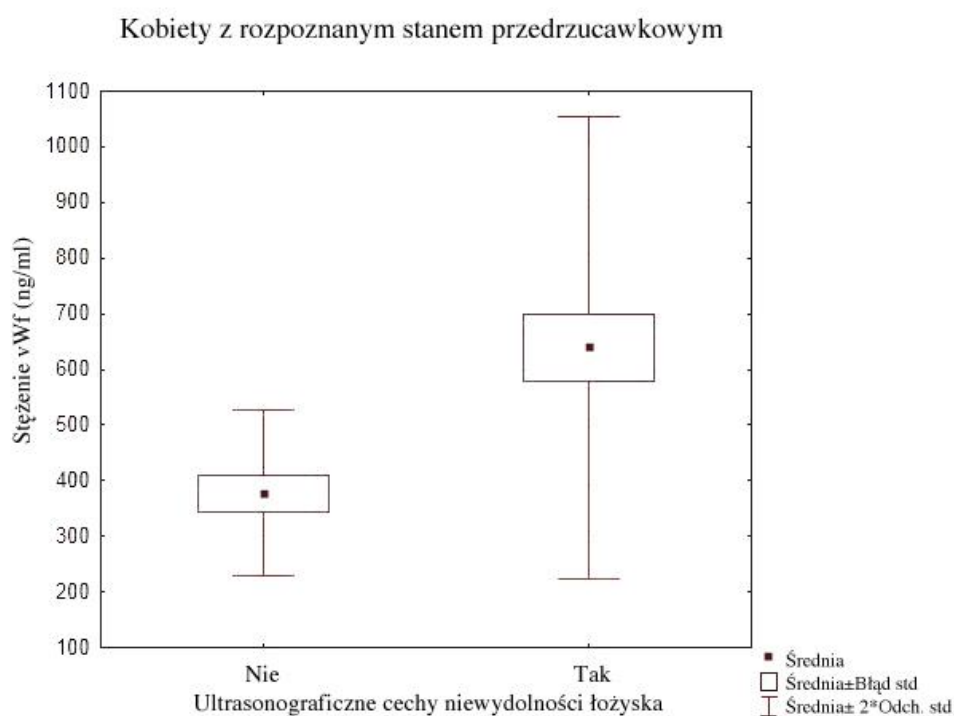


Rycina 9. Zależność między wartościami średniego ciśnienia skurczowego i średniego ciśnienia rozkurczowego, a wartościami współczynnika CEPCs/CECs w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym.

5.7 Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i punktacją w skali tętnic macicznych

Wykazano istotne różnice w grupie badanej kobiet w stanie przedrzucawkowym z ultrasonograficznymi cechami niewydolności łożyska, a stężeniem vWf. W przypadku cech niewydolności łożyska stężenie vWf było istotnie wyższe (638 ± 208 ng/ml vs 377 ± 74 ng/ml; $p < 0,017$) (Rycina 10). W pozostałych badanych grupach nie wykazano zależności pomiędzy badanymi parametrami.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki dopplerowskiego badania ultrasonograficznego w każdej z grup.



Rycina 10. Stężenie vWf u kobiet w stanie przedrzucawkowym w zależności od ultrasonograficznych cech niewydolności łożyska.

Tabela 3. Wyniki dopplerowskiego badania ultrasonograficznego w grupach badanych oraz w grupie kontrolnej.

	Nadciśnienie tętnicze przewlekłe	Nadciśnienie tętnicze ciążowe	Stan przedrzucawkowy	Zdrowe ciążarne
PI-UA (<i>średnia± SD</i>)	1,1± 0,36	1,01± 0,31	1,29± 0,51	0,8± 0,14
PI-MCA (<i>średnia± SD</i>)	1,56± 0,31	1,53± 0,25	1,37± 0,42	1,77± 0,3
CUR (<i>średnia± SD</i>)	1,55± 0,52	1,66± 0,64	1,23± 0,67	2,24± 0,4
PI-RtUtA (<i>średnia± SD</i>)	1,16± 0,5	1,18± 0,83	1,38± 0,52	0,59± 0,18
PI-LtUtA (<i>średnia± SD</i>)	2,05± 1,14	0,86± 0,41	1,62± 0,77	0,66± 0,11
UAS (<i>mediana; min- max</i>)	2 (0- 4)	0 (0- 4)	3 (0- 4)	0 (0- 0)

5.8 Zależność nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia czynnika von Willebranda, ilości krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz współczynnika CEPCs/CECs

Średnia dobowa utrata białka z moczem wynosiła 3,52± 2,48g. W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym nie stwierdzono zależności pomiędzy ilością utraty białka w dobowej zbiórce moczu a badanymi wskaźnikami uszkodzenia śródbłonka.

6 Dyskusja

Od momentu odkrycia CECs oraz CEPCs stały się one przedmiotem dużego zainteresowania ze strony wielu dziedzin nauk medycznych. Ich powiązanie z działaniem niemal każdego narządu człowieka sugeruje niewątpliwy udział w patofizjologii różnorodnych procesów zachodzących w organizmie ludzkim. Wynikiem tego jest duża ilość publikacji odnoszących się do patofizjologicznych właściwości tych komórek oraz implikacji klinicznych i potencjalnych możliwości terapeutycznych z ich wykorzystaniem. Doniesienia naukowe wskazują na prawdopodobny udział tych komórek w etiopatogenezie różnych rodzajów nadciśnienia tętniczego, w tym wiktającego ciężę. Podobnie czynnik von Willebranda, jako glikoproteina o wszechstronnym działaniu, cieszy się ciągle dużą popularnością wśród badaczy na całym świecie.

6.1 Krążące komórki śródbłónka

Konsekwencją procesów prowadzących do uszkodzenia śródbłónka jest odczepianie jego komórek i przedostawanie się do krwi obwodowej, gdzie następnie funkcjonują one jako krążące komórki endotelialne. Ich ilość jest zatem odzwierciedleniem stanu oraz funkcji śródbłónka i może służyć ocenie rozległości jego uszkodzenia.

W naszym materiale stwierdziliśmy największą średnią ilość CECs we krwi obwodowej ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (95 ± 29 komórki). Istnieje wiele doniesień na temat związku pomiędzy zwiększoną ilością tych komórek we krwi obwodowej, a chorobami układu sercowo-naczyniowego. Nie wykazano jednak jednoznacznie takiej zależności w przypadku nadciśnienia tętniczego. Nadar i wsp. porównując ilość CECs między grupą chorych z zawałem serca i nadciśnieniem do grupy chorych z izolowanym nadciśnieniem tętniczym oraz do grupy osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego wykazał istotnie statystycznie większe ilości tych komórek jedynie w tej pierwszej z grup ¹³⁶.

Do tej pory przeprowadzono jedno badanie oceniające ilość tych komórek we krwi ciężarnych chorujących na nadciśnienie tętnicze przewlekłe. Brytyjska grupa badawcza pod kierownictwem Karthikeyana oceniła ilość CECs w grupie ciężarnych z

nadciśnieniem tętniczym i wykazała zwiększoną ilość tych komórek w grupie kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do grupy zdrowych kobiet ciężarnych i nie ciężarnych¹³⁷. Można spekulować, że istotnie większa ilość CECs w badanej przez nas grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym w naszym badaniu może być związana z przetrwałymi podwyższonymi wartościami ciśnienia tętniczego, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia śródbłonna i oddzielania się jego komórek. Ponieważ proces ten jest stanem przewlekłym, a nie pojawiającym się dopiero po 20 tygodniu ciąży jak w przypadku pozostałych dwóch grup badanych, dlatego też ilość komórek w tej grupie kobiet będzie największa.

Z naszego materiału wynika, że populacja zdrowych ciężarnych charakteryzuje się statystycznie mniejszą liczbą tych komórek w porównaniu do grup kobiet ciężarnych z różnymi postaciami nadciśnienia tętniczego. Niestety brak doniesień na temat ilości tych komórek w populacji zdrowych kobiet ciężarnych. Trudno określić jednoznacznie, czy sam stan ciąży może prowadzić do zwiększania ich ilości we krwi, choć wydaje się, że brak jakichkolwiek przesłanek aby wysunąć takie przypuszczenia. Jedyna praca sugerująca brak wpływu ciąży na ilość tych komórek wykazała, że w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym ilość CECs gwałtownie spadła po ukończeniu ciąży, czego nie zaobserwowano w ciążach o przebiegu prawidłowym³⁵.

W literaturze można znaleźć niewielką liczbę doniesień oceniających ilość CECs u kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym. Pierwsze tego typu badanie zostało przeprowadzone przez Canbakana i wsp. w 2007 roku. Jego grupa badawcza wykazała istotnie większą ilość CECs w grupie kobiet w stanie przedrzucawkowym w porównaniu do grupy zdrowych ciężarnych, zdrowych nie ciężarnych oraz grupy kobiet nie ciężarnych chorujących na nadciśnienie tętnicze¹³⁸. Podobnie Grundman i wsp. wykazali istotne statystycznie różnice w ilości CECs ocenianej w okresie przedporodowym między grupą zdrowych kobiet ciężarnych, a kobietami w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym³⁵. Potwierdzeniem powyższych obserwacji może być jedno z nowszych badań, które również wykazało istotnie wyższe ilości tych komórek we krwi pacjentek z preeklampją w porównaniu do grupy zdrowych kobiet ciężarnych¹³⁹. Wyniki przez nas uzyskane przychylają się do teorii zwiększenia ilości CECs w przebiegu stanu przedrzucawkowego, gdyż wykazały one istotną statystycznie różnicę w ich ilości pomiędzy grupą ciężarnych w stanie przedrzucawkowym (94 ± 54 komórki), a grupą zdrowych ciężarnych (56 ± 24

komórki)($p < 0.019$). Mimo, że stan przedrzucawkowy nie jest procesem przewlekłym i charakterystycznie jego objawy kliniczne można zaobserwować po 20 tygodniu ciąży, to wysokie ilości CECs w tej grupie kobiet mogą być związane z szybko postępującym, nagłym, masywnym uszkodzeniem śródbłonka w przebiegu tego często ciężkiego, wyrażonego bardzo wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego, przebiegającego z niewydolnością łożyska, agresywnie manifestującego się schorzenia. Jedynie jedno badanie nie wykazało istotnych statystycznie różnic w ilości CECs między grupą kobiet ze stanem przedrzucawkowym a grupą kontrolną zdrowych ciężarnych ¹⁴⁰.

Wyniki przez nas uzyskane nie wykazały istotnych statystycznie różnic w ilości CECs w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego w porównaniu do grupy kontrolnej, w przeciwieństwie do niedawno opublikowanej pracy polskiego autorstwa, w której to zaobserwowano zmniejszoną ich ilość w przebiegu nadciśnienia ciążowego w porównaniu do populacji zdrowych ciężarnych ¹⁴¹. Nadciśnienie tętnicze ciążowe z reguły przebiega łagodnie; w naszym materiale nie wykazano w tej grupie pacjentek ultrasonograficznych wykładników niewydolności łożyska, wartości ciśnienia tętniczego były najniższe spośród grup badanych, dlatego też spodziewamy się w tej grupie uszkodzenia śródbłonka minimalnego stopnia i tym samym braku lub nieistotnego zwiększenia ilości CECs.

Na podstawie powyższych danych można spekulować, że zwiększona ilość CECs jest skutkiem ekspozycji na podwyższone wartości ciśnienia tętniczego, a ich ilość wzrasta wraz z czasem trwania choroby. CECs mogą być zatem traktowane jako nowy marker dysfunkcji i uszkodzenia śródbłonka w przebiegu nadciśnienia tętniczego wnikającego ciążę i mogą też stanowić przydatne narzędzie do oceny rozległości i nasilenia procesu chorobowego. Zachodzi potrzeba przeprowadzenia dalszych badań we wczesnej ciąży celem ustalenia znaczenia CECs jako predyktora wystąpienia stanu przedrzucawkowego.

6.2 Krążące komórki progenitorowe śródbłonka

Zdolność krążących komórek progenitorowych śródbłonka do proliferacji może mieć istotne znaczenie dla procesu regeneracji naczyń krwionośnych. Pojawiły się także doniesienia sugerujące rolę tych komórek w prenatalnej i postnatalnej

neowaskularyzacji i reendotelializacji, w waskularyzacji endometrium podczas implantacji zarodka oraz w procesie placentacji. Ich nieprawidłowa ilość może być przyczyną nieprawidłowości w procesie placentacji, wraz z późniejszymi konsekwencjami w postaci rozwoju nadciśnienia tętniczego.

Istnieją nieliczne doniesienia na temat ilości CEPCs we krwi obwodowej zdrowych kobiet ciężarnych. Trudno też na podstawie dostępnych publikacji jednoznacznie stwierdzić, czy ich ilość wzrasta czy zmniejsza się wraz z czasem trwania ciąży¹⁴²⁻¹⁴⁷. W naszym materiale liczba komórek u zdrowych kobiet ciężarnych wynosiła 123 ± 59 komórek, trudno jednak w literaturze znaleźć odpowiedni punkt odniesienia, co spowodowane jest brakiem określenia dokładnej liczby tych komórek przez badaczy a jedynie tendencji wzrostowej/malejącej w czasie przebiegu ciąży, lub też wykorzystaniem innych metod diagnostycznych do określenia ich ilości.

Na dzień dzisiejszy, poza liczbą tych komórek w ciążach o przebiegu prawidłowym, poddano ocenie ich ilość w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym, nadciśnieniem tętniczym ciążowym oraz cukrzycą ciężarnych.

Wyniki przeprowadzonego przez nas badania nie wskazały na istotną statystycznie różnicę w ilości CEPCs pomiędzy grupą ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym (85 ± 68 komórki), a grupą kontrolną (123 ± 59 komórki). Podobne wyniki uzyskał Matsubara i wsp.; ponadto po 7 dniach hodowli CEPCs w warunkach *in vitro* wykazali oni znacznie zwiększony potencjał proliferacyjny komórek pozyskanych z krwi pacjentek chorych na preeklampsję¹⁴⁵. Odmienne wyniki przedstawił Sugawara, który stwierdził zmniejszoną ilość CEPCs oraz nasilone/ mocniej wyrażone procesy starzenia się tych komórek u pacjentek z preeklampsją w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych ciężarnych. Dodatkowo wykazał on odwrotnie proporcjonalną zależność między ilością wyhodowanych kolonii CEPCs, a stężeniem białka reaktywnego C, co sugeruje, że uogólniona reakcja zapalna towarzysząca stanowi przedrzucawkowemu jest powiązana z ilością CEPCs oraz przyspieszeniem procesów ich starzenia się i w efekcie może prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania śródbłonna¹⁴⁸. Grupa badaczy pod kierownictwem Luppi również wykazała mniejsze ilości tych komórek w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym w porównaniu do grupy kontrolnej, którą stanowiły zdrowe kobiety ciężarne w trzecim trymestrze ciąży¹⁴³. Uzyskana w

naszym materiale ilość CEPCs u kobiet ze stanem przedrzucawkowym może świadczyć nie tyle o zaburzonym procesie ich uwalniania z depozytów, co o upośledzeniu samych mechanizmów zaangażowanych w naprawę uszkodzonego śródbłonna. W efekcie niewydolności tych procesów śródbłonek pozostaje uszkodzony, czego efektem są objawy kliniczne stanu przedrzucawkowego takie jak białkomocz, obrzęk płuc czy też zaburzenia widzenia spowodowane wzrostem ciśnienia wewnątrzczaszkowego i obrzękiem mózgu.

W piśmiennictwie można znaleźć jedynie dwie publikacje, w których ocenie poddano ilość komórek CEPCs w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego. Buemi i wsp. odnotowali większą ilość CEPCs we krwi obwodowej kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym w porównaniu do populacji zdrowych ciężarnych¹⁴⁴. Najnowsze doniesienie polskiego zespołu badawczego wskazuje na istotnie statystycznie niższe ilości CEPCs we krwi obwodowej chorych na nadciśnienie tętnicze ciążowe w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych ciężarnych¹⁴¹. W naszym materiale uzyskaliśmy podobne wyniki. Istotnie wyższą liczbę CEPCs we krwi obwodowej zdrowych ciężarnych można tłumaczyć prawidłowo funkcjonującymi procesami ich uwalniania z depozytów oraz następowym minimalnym ich zużyciem do naprawy prawidłowo funkcjonującego śródbłonna. Z kolei w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego komórki te zaangażowane są w naprawę uszkodzonego śródbłonna, dlatego też ich ilość jest mniejsza niż w populacji zdrowych ciężarnych. Do rozwoju nadciśnienia tętniczego ciążowego dochodzi w drugiej połowie ciąży i proces uszkodzenia śródbłonna trwa znacznie krócej, niż ma to miejsce w przypadku pacjentek ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, co może wyrażać się odmienną ilością tych komórek w obu grupach (średnio 64 komórki w grupie z nadciśnieniem tętniczym ciążowym i 55 komórek w grupie z nadciśnieniem przewlekłym).

W materiale własnym najmniejszą ilość CEPCs stwierdziliśmy w grupie pacjentek z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (55 ± 40 komórki). Jedna z brytyjskich grup badawczych wykazała większą ilość CEPCs we krwi zdrowych kobiet ciężarnych w porównaniu do kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, różnica ta jednak nie osiągnęła istotności statystycznej¹³⁷. Ponadto w populacji dorosłych chorujących na nadciśnienie tętnicze wykazano, że leczenie hipotensyjne normalizuje nie tylko wartości ciśnienia tętniczego, ale także ma

korzystny wpływ na funkcję i liczbę CEPCs¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Należy zaznaczyć, że badania te dotyczyły farmakoterapii antagonistami receptora angiotensyny II oraz statynami, czyli lekami których stosowanie w ciąży jest niedozwolone. W naszym badaniu pacjentki z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym leczone były głównie metyldopą oraz nitrendypiną- być może leki te nie wywierają tak korzystnego działania na CEPCs i dlatego też ich liczba we krwi obwodowej pozostaje niewielka. Można też przypuszczać, że niska ilość CEPCs w grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym wynika z długotrwałości procesów uszkadzających śródbłonek i nieustannego wykorzystywania tych komórek do jego naprawy, co przejawia się zmniejszeniem ich liczby we krwi obwodowej.

Wciąż nieznana jest dokładna rola jaką spełniają krążące komórki progenitorowe w patogenezie nadciśnienia tętniczego w ciąży. Prawdopodobnym wydaje się, że ich niedobór może prowadzić do zwiększonej podatności kobiety ciężarnej na rozwinięcie chorób przebiegających z nadciśnieniem tętniczym. Z drugiej strony zmniejszona ilość tych komórek może być spowodowana ich większym wykorzystaniem do naprawy uszkodzonego śródbłonka spowodowanego podwyższonymi wartościami ciśnienia tętniczego. Nadal bez jednoznacznej odpowiedzi pozostaje też pytanie, czy zmniejszona ilość CEPCs w przebiegu nadciśnienia tętniczego w ciąży jest odzwierciedleniem podłoża etiologicznego czy raczej skutkiem choroby.

Dane wskazujące na zwiększającą się liczbę CEPCs wraz z zaawansowaniem wieku ciążowego w przebiegu niepowikłanych ciąż sugerują potencjalną rolę tych komórek w regulacji rozwoju łożyska oraz zapewnieniu optymalnej integralności naczyń w okresie ciąży. Konieczne jest przeprowadzenie szeregu badań, które poddałyby prospektywnej ocenie ilościowej i jakościowej krążące komórki progenitorowe śródbłonka jeszcze przed wystąpieniem objawów nadciśnienia tętniczego. Niestety brak wystandaryzowanej metody, która służyłaby ocenie CEPCs powoduje, że trudno o wiarygodne porównanie wyników badań, dlatego w pierwszej kolejności zachodzi potrzeba skonstruowania powszechnie obowiązujących protokołów diagnostycznych.

6.3 Współczynnik CEPCs/CECs

Uważa się, że współczynnik CEPCs/CECs może odzwierciedlać stan śródbłonka – poziom jego uszkodzenia oraz wydolność mechanizmów naprawczych ¹³⁷.

W materiale własnym współczynnik ten był najniższy w grupie kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym przewlekłym i kolejno stanem przedrzucawkowym i nadciśnieniem tętniczym ciążowym, a najwyższe wartości osiągnął on wśród kobiet z grupy kontrolnej. Z uwagi na długotrwałość procesów prowadzących do uszkodzenia śródbłonka i tym samym dużą ilość CECs we krwi obwodowej oraz intensywnie przebiegające i długotrwałe procesy naprawcze tego uszkodzenia prowadzące do wyczerpania zapasów CEPCs, współczynnik ten osiągnął najniższe wartości właśnie w grupie badanej z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym. W przebiegu stanu przedrzucawkowego współczynnik ten jest również istotnie niższy w odniesieniu do jego wartości u kobiet z grupy kontrolnej, co może wynikać w większym stopniu z ostrości/nagłości procesu chorobowego i masywności uszkodzenia śródbłonka, a mniej z czasu jego trwania. Jednak w przypadku preeklampsji należy brać również pod uwagę możliwe upośledzenie mechanizmów naprawczych śródbłonka, co wyrażone jest dwukrotnie jednak większą wartością tego współczynnika w porównaniu do kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym i stosunkowo dużą ilością CEPCs we krwi obwodowej tych pacjentek. Na podstawie uzyskanych przez nas wyników można przypuszczać, że im dłuższy czas narażenia śródbłonka na czynniki uszkadzające i im rozleglejsze uszkodzenia śródbłonka tym wartości współczynnika będą niższe. Tylko jedna grupa badaczy podjęła się próbie oceny współczynnika CEPCs/CECs, którego wartości mają określać równowagę między procesami degeneracyjnymi i regeneracyjnymi w obrębie śródbłonka. Współczynnik ten, podobnie jak w naszym materiale, osiągnął istotnie statystycznie niższe wartości w grupie kobiet w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, w porównaniu do jego wartości u zdrowych kobiet ciężarnych ¹³⁷.

Powyższe dane sugerują obecność dynamicznych procesów uszkodzenia śródbłonka będących skutkiem hiperdynamicznego przepływu krwi w naczyniach krwionośnych oraz próbę przywrócenia integralności śródbłonka, i tym samym zapobiegania wystąpieniu powikłań narządowych wynikających z podwyższonego ciśnienia krwi.

Implikacje kliniczne zastosowania współczynnika CEPCs/CECs jako biomarkera służącego do przewidywania dysfunkcji śródbłonka u kobiet ciężarnych wymagają przeprowadzenia dużych badań prospektywnych. Kolejnym, niezwykle znaczącym krokiem byłaby ocena tego współczynnika w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie zdrowych ciężarnych, z następową ich obserwacją w przyszłości pod kątem rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego.

6.4 Czynniki von Willebranda

Stwierdzone w przebiegu wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, tkanki łącznej czy chorób nowotworowych podwyższone poziomy czynnika von Willebranda są wykładnikiem uszkodzenia /dysfunkcji komórek śródbłonka ¹⁵², jednak w ciąży jego wysokie stężenia są zjawiskiem fizjologicznym ¹²¹. Mimo, że płytki krwi stanowią magazyn vWf, to jednak jego osoczowy poziom regulowany jest przede wszystkim uwalnianiem z komórek śródbłonka.

Pojawiło się kilka prac wykazujących istotnie zwiększone stężenia tego czynnika w przebiegu nadciśnienia tętniczego ciążowego oraz stanu przedrzucawkowego, jednak dane na ten temat nie są jednoznaczne ^{126,127,129,153}. W materiale własnym wykazaliśmy wyższe stężenia czynnika von Willebranda w osoczu pozyskanym od kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym w porównaniu do pozostałych grup badanych oraz grupy kontrolnej, różnice te jednak nie osiągnęły istotności statystycznej. Natomiast zaskakującym jest fakt, że najniższe stężenie tego czynnika zawierało osocze ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym. Ponadto nie wykazaliśmy w żadnej z grup korelacji pomiędzy jego stężeniem, a średnią ilością CECs, CEPCs oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs. Nasze wyniki są odmienne od wyników badań przeprowadzonych przez Karthikeyana i wsp., którzy jako pierwsi, a zarazem jedyni do tej pory, podjęli się próby określenia związku między CECs, CEPCs oraz vWf u kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym. Wykazali oni istotnie wyższe poziomy vWf we krwi kobiet ciężarnych, zarówno tych zdrowych, jak i chorujących na nadciśnienie tętnicze oraz pozytywną korelację stężenia tego czynnika z ilością CECs ¹³⁷. Nadar i wsp. wykazali istotny wzrost jego stężenia oraz innych markerów świadczących o aktywacji śródbłonka u kobiet chorych na nadciśnienie tętnicze ciążowe w

porównaniu do grupy zdrowych ciężarnych¹²⁶; podobne rezultaty osiągnął Molvarec badając kobiety w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym¹⁵³. Z kolei jedna z prac z 2000 roku, w której oceniano poziom vWf w 18 tygodniu ciąży w grupie zdrowych kobiet ciężarnych oraz w ciążach wysokiego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego, nie wykazała istotnych różnic w stężeniach tego czynnika pomiędzy grupami¹²⁹.

W naszym materiale wysokie stężenia czynnika von Willebranda u kobiet z preeklampsją potwierdzają znacznego stopnia i pojawiające się w ostrym mechanizmie uszkodzenie śródbłonna w przebiegu tego schorzenia. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że jego stężenie mówi nam o ostrości/nagłości procesów prowadzących do uszkodzenia śródbłonna. Do dłuższej refleksji skłoniły nas stosunkowo niskie stężenia tego czynnika w osoczu kobiet chorujących na nadciśnienie tętnicze przewlekłe.

W 2011 roku opublikowano wyniki badania wskazującego na rolę czynnika von Willebranda w kontrolowaniu formowania naczyń krwionośnych. Inhibicja ekspresji tego czynnika w komórkach śródbłonna w warunkach *in vitro* prowadziła do zwiększonej proliferacji komórek śródbłonna, migracji oraz formowania naczyń, czyli procesów związanych z angiogenezą¹¹⁹. W związku z faktem, że w przebiegu nadciśnienia tętniczego przewlekłego dochodzi do dużego stopnia uszkodzenia śródbłonna, niskie jego stężenia we krwi obwodowej można by tłumaczyć deponowaniem jego większych ilości w komórkach śródbłonna lub zaburzonym jego uwalnianiem z tych komórek, co w mechanizmie błędnego koła prowadzi do ograniczenia proliferacji tych komórek i zaburzonej angiogenezy, co może być istotnym czynnikiem w formowaniu łożyska w czasie ciąży. Zdziwiałoby, że odwrotny efekt zaobserwowano w odniesieniu do komórek innego pochodzenia. Po uszkodzeniu naczynia krwionośnego vWf może penetrować do błony wewnętrznej obwodowych naczyń krwionośnych, gdzie wchodzi w reakcję z komórkami mięśni gładkich¹⁵⁴. Jego zdeponowanie w warstwie wewnętrznej ściany naczyń związane jest z jej pogrubieniem, co sugeruje zaangażowanie tego czynnika w proliferację komórek¹⁵⁵. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że czynnik von Willebranda bezpośrednio stymuluje proliferację komórek mięśni gładkich, co uzasadnia obserwowaną hiperplazję¹⁵⁵.

Ostatnie doniesienia traktują go jako mitogen, który poprzez regulację działania specyficznych genów w mechanizmie sprzężenia zwrotnego dodatniego prowadzi do stymulacji różnorodnych czynników wzrostu ¹⁵⁶. Fizjologiczne znaczenie tej mitogennej aktywności zostało obrazowo przedstawione na przykładzie zaburzenia znanego jako autosomalnie dominująca arteriopatía mózgowa z podkorowymi zawałami i leukoencefalopatią, rzadkiej choroby genetycznej związanej z nawracającymi udarami oraz demencją. Koncentrycznie pogrubiona ściana tętnic podpajęczynówkowych w tej grupie pacjentów charakteryzuje się wysoką zawartością vWf ¹⁵⁶. Można spekulować, że czynnik ten odgrywa istotną rolę w pogrubieniu ściany naczyniowej w przebiegu wyżej wspomnianej choroby.

Podobnie może dziać się w przebiegu nadciśnienia tętniczego przewlekłego u kobiet ciężarnych. Hipotetycznie, czynnik von Willebranda mógłby być zużywany do reakcji zachodzących w ścianach naczyń krwionośnych, co wyraża się jego stosunkowo niskimi stężeniami we krwi obwodowej. Ponadto reakcje zachodzące z udziałem tego czynnika w ścianach naczyń krwionośnych mogą przyczyniać się do nieprawidłowej budowy łożyska, co zostaje odzwierciedlone w niewydolności łożyska zobrazowanej patologicznymi przepływami dopplerowskimi w tętnicach macicznych oraz znacznie niższymi wartościami współczynnika mózgowo-pępowinowego porównując do wyników badań w grupie zdrowych ciężarnych. Niestety brak danych na temat stężenia vWf we krwi obwodowej w przebiegu wyżej opisywanej arteriopatii mózgowej.

Zakłada się, że inna etiopatogeneza leży u podłoża stanu przedzucawkowego i nadciśnienia tętniczego przewlekłego, a do niewydolności łożyska dochodzi w odmiennym mechanizmie, co mogłoby poniekąd potwierdzać nasze wyniki i powyższe rozważania.

6.5 Zależność między wartościami średniego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, maksymalnego ciśnienia tętniczego skurczowego i maksymalnego ciśnienia tętniczego rozkurczowego, a stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonna, krążących komórek progenitorowych śródbłonna oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs

Wbrew oczekiwaniom, w naszym materiale stwierdziliśmy w grupie kobiet w ciążyach powikłanych stanem przedrzucawkowym pozytywną korelację między wartościami średniego ciśnienia skurczowego i średniego ciśnienia rozkurczowego, a wartościami współczynnika CEPCs/CECs. W pozostałych grupach nie wykazaliśmy korelacji pomiędzy badanymi parametrami.

W dostępnej literaturze Canbakan wykazał pozytywną korelację między ilością CECs we krwi obwodowej, a wartościami skurczowego oraz rozkurczowego ciśnienia tętniczego, zarówno w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym, jak i u zdrowych ciężarnych ¹³⁸. Z kolei Grundman przedstawiła pozytywną korelację jedynie między ilością CECs, a wartościami ciśnienia tętniczego skurczowego w grupie ciężarnych z preeklampsją ³⁵. Podobne wyniki do uzyskanych przez nas otrzymali badacze z Rotterdamu, nie wykazując istotnych statystycznie zależności między ilością CECs a wartościami ciśnienia tętniczego ¹⁴⁰. Tylko w jednej dostępnej publikacji oceniano korelację między współczynnikiem CEPCs/CECs, a wartościami ciśnienia tętniczego i uzyskano ujemną korelację pomiędzy badanym współczynnikiem, a wartościami rozkurczowego ciśnienia tętniczego; praca ta jednak dotyczyła ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, dlatego też trudno porównywać do niej uzyskane przez nas wyniki. Wykazali oni ponadto pozytywną korelację między ilością CECs, a wartościami ciśnienia tętniczego skurczowego oraz rozkurczowego ¹³⁷.

Wynik przez nas uzyskany może świadczyć o wcześniej wspomnianym uszkodzeniu mechanizmów naprawczych śródbłonna w przebiegu stanu przedrzucawkowego, co wiąże się z zaburzonym wykorzystywaniem CEPCs i tym samym stosunkowo dużą ich ilością we krwi obwodowej. Im wyższe wartości ciśnienia tętniczego tym większe uszkodzenie śródbłonna objawiające się

odczepianiem CECs, ale także tym intensywniejsze uwalnianie z depozytów CEPCs, które pozostają w dużej ilości we krwi obwodowej, gdyż nie mogą być prawidłowo wykorzystane do reperacji endotelium z uwagi na nieprawidłowy proces regeneracji śródbłonna.

6.6 Zależność między stężeniem czynnika von Willebranda, ilością krążących komórek śródbłonna, krążących komórek progenitorowych śródbłonna oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i punktacją w skali tętnic macicznych

Na podstawie dostępnej literatury wiadomo, że podwyższony opór w krążeniu maciczno-łożyskowym zdiagnozowany na podstawie badania dopplerowskiego, związany jest z większym stopniem uszkodzeniem śródbłonna. W naszym materiale wykazaliśmy istotne statystycznie różnice jedynie w grupie badanej kobiet w stanie przedrzucawkowym z ultrasonograficznymi cechami niewydolności łożyska, a stężeniem czynnika von Willebranda. W przypadku występowania cech niewydolności łożyska stężenie tego czynnika było istotnie wyższe.

W bazie PubMed brak jest prac analizujących takie zależności. Z dostępnej na dzień dzisiejszy literatury wiemy, że podwyższony opór krążenia maciczno-łożyskowego w badaniu dopplerowskim w przebiegu stanu przedrzucawkowego nie może być tłumaczony jedynie zaburzeniami w budowie histopatologicznej naczyń maciczno-łożyskowych. Między innymi na tej podstawie zakładać można wieloczynnikową etiologię stanu przedrzucawkowego. W oparciu o wyniki wyżej opisanych, najnowszych badań można spekulować, że w nadciśnieniu przewlekłym odkładanie się vWf w ścianie naczyń krwionośnych łożyska może prowadzić do hiperplazji naczyń łożyska, nieprawidłowej regeneracji śródbłonna i ograniczonej angiogenezy, i tym samym zwiększenia oporu naczyniowego wyrażonego nieprawidłowymi wynikami badań dopplerowskich. Natomiast w przebiegu preeklampsji występują większe stężenia czynnika von Willebranda we krwi obwodowej i można przypuszczać, że nieprawidłowa placentacja zachodzi w innym mechanizmie, niż ma to miejsce w przypadku nadciśnienia tętniczego przewlekłego.

6.7 Określenie zależności nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia czynnika von Willebranda, ilości krążących komórek śródbłonka, krążących komórek progenitorowych śródbłonka oraz współczynnika CEPCs/CECs

W bazie PubMed brak jest prac analizujących nasilenie białkomoczu w zależności od ilości CECs, CEPCs, współczynnika CEPCs/CECs, czy też stężenia czynnika von Willebranda u kobiet w stanie przedrzucawkowym. Jedynie Grundman oceniła zależność między ilością CECs, a wynikami półilościowego testu paskowego do oceny białkomoczu, nie wykazała jednak istotnej korelacji ³⁵.

Śródbłonek naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego wraz z komórkami mezangialnymi tej struktury odpowiedzialny jest za tworzenie skomplikowanej, trójwymiarowej błony filtracyjnej, która jest zarówno wysoce przepuszczalna dla wody i prawie nieprzepuszczalna dla dużych białek osocza o ujemnym ładunku ¹⁵⁷.

W przebiegu stanu przedrzucawkowego dochodzi do obrzęku komórek śródbłonka naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego oraz zmniejszenia średnicy i gęstości fenestracji w tych komórkach ¹⁵⁸. Powyższe zmiany znane są pod nazwą *glomerular endotheliosis*. Niegdyś uważano te zmiany za patognomoniczne dla stanu przedrzucawkowego, jednak badania wykazały ich obecność również u 30% kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym, a nawet w przebiegu niepowikłanych ciąż ^{159,160}. Dlatego poszukuje się innych mechanizmów mogących mieć znaczenie w rozwoju białkomoczu w przebiegu preeklampsji.

Matczyne objawy stanu przedrzucawkowego są wykładnikami uszkodzenia śródbłonka, ze szczególnym naciskiem na fenestrowane endotelium kłębuszka nerkowego ¹⁶¹. Za nieprawidłowościami w funkcjonowaniu śródbłonka naczyń kłębuszków nerkowych mogą przemawiać nieprawidłowe poziomy sFlt oraz sEng współwystępujące z preeklampsją. Czynniki te odpowiadają za skoordynowane działanie VEGF oraz TGF-beta, niezbędnych do zachowania funkcji endotelium kłębuszków ¹⁵⁷. Obecnie uważa się, że za występowanie białkomoczu w przebiegu stanu przedrzucawkowego odpowiedzialna jest dysfunkcja śródbłonka, a także zaburzenia w funkcjonowaniu podocytów.

Powyższe rozważania zachęciły nas to do wykonania analizy w tym kierunku. W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym nie stwierdzono zależności pomiędzy ilością utraty białka w dobowej zbiorce moczu, a badanymi wskaźnikami uszkodzenia śródbłonna. Może to potwierdzać hipotezę, że uszkodzenie śródbłonna nie jest jedynym mechanizmem odpowiedzialnym za pojawienie się w tej grupie kobiet białkomoczu.

7 Wnioski

1. Liczba krążących komórek śródbłonka (CECs) zależy od rodzaju nadciśnienia tętniczego wiktającego ciążę.
2. Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) mówi pośrednio o stopniu uszkodzenia śródbłonka i możliwościach organizmu do jego regeneracji.
3. Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs) u kobiet ze stanem przedrzucawkowym może świadczyć o niedostatecznym lub upośledzonym mechanizmie naprawy uszkodzenia śródbłonka, czego efektem są objawy kliniczne preeklampsji.
4. Nadciśnienie tętnicze w ciąży wiąże się z dysfunkcją śródbłonka naczyń krwionośnych, która wyraża się m.in. zmienioną ilością krążących komórek śródbłonka (CECs) oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonka (CEPCs).
5. Im dłuższy czas ekspozycji na podwyższone wartości ciśnienia tętniczego i im rozleglejsze uszkodzenie śródbłonka, tym wartości współczynnika CEPCs/CECs osiągały niższe wartości.
6. W grupie kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym pozytywna korelacja między średnim ciśnieniem tętniczym skurczowym oraz rozkurczowym, a wartościami współczynnika CEPCs/CECs może świadczyć uszkodzeniu mechanizmów naprawczych śródbłonka.
7. Uszkodzenie śródbłonka w przebiegu stanu przedrzucawkowego, wyrażone poprzez stężenie czynnika von Willebranda, wykazuje zależność z ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska.
8. Zmniejszenie ilości komórek śródbłonka kłębuszków nerkowych prawdopodobnie nie jest podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za pojawienie się białkomoczu w przebiegu stanu przedrzucawkowego.

8 Hipotezy do dalszych badań

1. Współczynnik CEPCs/CECs może być użytecznym parametrem w ocenie zaburzenia równowagi procesów degeneracyjnych i regeneracyjnych śródbłonna.
2. Zachodzi potrzeba przeprowadzenia dalszych badań we wczesnej ciąży celem ustalenia znaczenia krążących komórek śródbłonna (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonna (CEPCs) i współczynnika CEPCs/CECs jako predyktorów wystąpienia stanu przedrzucawkowego.
3. Istnieje prawdopodobieństwo, że im niższy współczynnik CEPCs/CECs, tym większe ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych w przyszłości.

9 Streszczenie

Nadciśnienie tętnicze pojawia się u 6 do 8 % ciężarnych, jest jedną z głównych przyczyn jatrogennych porodów przedwczesnych, a jego wystąpienie wiąże się ze znacznym wzrostem zachorowalności i umieralności matek, płodów oraz noworodków.

Istnieje wiele teorii próbujących wytłumaczyć etiopatogenezę stanu przedrzucawkowego i innych form nadciśnienia tętniczego w ciąży, jednak na dzień dzisiejszy przyjmuje się, że jest ona złożona i wieloczynnikowa. Prawdopodobnie jedną z istotniejszych determinant mających znaczenie w patogenezie jest układowe zaburzenie funkcjonowania śródbłónka wraz z aktywacją jego komórek.

Dokładna rola krążących komórek śródbłónka (CECs) oraz krążących komórek progenitorowych śródbłónka (CEPCs) w patogenezie chorób przebiegających z nadciśnieniem tętniczym w czasie ciąży nie jest znana. Najprawdopodobniej prawidłowe ilości tych komórek odgrywają istotną rolę w procesach waskularyzacji w czasie ciąży, a zaburzona równowaga między poziomami tych komórek jest związana z niewydolnością śródbłónka. CECs oraz CEPCs można wyizolować z krwi obwodowej przy pomocy wielokolorowej cytometrii przepływowej. W warunkach fizjologicznych prawidłowy stan śródbłónka odzwierciedlony jest niskim poziomem CECs we krwi obwodowej. CEPCs odzwierciedlają zdolność organizmu do naprawy śródbłónka. Czynniki von Willebranda jest specyficznym osoczymym markerem dysfunkcji/uszkodzenia śródbłónków.

Nadrzędnym celem pracy była ocena nieprawidłowości w obrębie śródbłónka w przebiegu ciąż powikłanych nadciśnieniem tętniczym. Cel pracy realizowany był przez:

1. Ocenę ilości CECs, CEPCs, współczynnika CEPCs/CECs oraz stężenia vWf;
2. Określenie zależności między stężeniem vWf, a ilością CECs, CEPCs oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs;
3. Ocenę związku między wartościami średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, średniego całodobowego ciśnienia tętniczego skurczowego, maksymalnego ciśnienia skurczowego i maksymalnego ciśnienia rozkurczowego, a stężeniem vWf, ilością CECs, CEPCs oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs;

4. Ocenę zależności między stężeniem vWf, CECs, CEPCs oraz wartościami współczynnika CEPCs/CECs, a ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska i zmianami punktacji w skali tętnic macicznych;

5. Określenie zależności nasilenia białkomoczu u kobiet w stanie przedrzucawkowym od stężenia vWf, ilości CECs, CEPCs oraz współczynnika CEPCs/CECs.

Badaniami objęto łącznie 71 kobiet hospitalizowanych i diagnozowanych w Klinice Perinatologii i Ginekologii Katedry Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pomiędzy listopadem 2010 a styczniem 2014 roku. Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań

Wyodrębniono 3 grupy badane: ciężarne z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (n= 10), ciężarne z nadciśnieniem tętniczym ciążowym (n=18) i ciężarne ze stanem przedrzucawkowym (n=21). Grupę kontrolną stanowią zdrowe kobiety ciężarne odpowiadające pod względem wieku pacjentki, wieku ciążowego i rodności grupom badanym (n= 22). W grupie kontrolnej zastosowano następujące kryteria wykluczające włączenie do grupy: choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby metaboliczne, choroby nowotworowe, choroby zapalne oraz choroby autoimmunologiczne.

Materiał do badań stanowiła krew żylna. Krew z pierwszej próbówki wykorzystano do oznaczenia poziomu czynnika von Willebranda przy pomocy komercyjnego zestawu Human VWF ELISA, natomiast krew z drugiej próbówki wykorzystano do analizy cytometrycznej. CEPCs zdefiniowano jako liczbę komórek CD45(-), CD34(+), CD146(+) i CD133(+) zebranych podczas 1,000,000 analizowanych zdarzeń. CECs scharakteryzowano jako komórki CD45(-), CD34(+), CD146(+) i CD133(-) zebrane podczas 1,000,000 analizowanych zdarzeń. W badaniu dopplerowskim oceniano PI w tętnicach macicznych, tętnicy pępowinowej oraz tętnicy środkowej mózgu płodu. Ponadto w tętnicach macicznych oceniano występowanie wcięcia wczesno-rozkurczowego w widmie fali przepływu. Celem oceny wydolności łożyska wykorzystano skalę tętnic macicznych oraz PIUA, PIMCA i wskaźnik mózgowo-pępowinowy. Całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego przeprowadzono z wykorzystaniem rejestratora ciśnienia krwi HolCARD CR-07 produkcji firmy Aspel. Do analizy statystycznej użyto programu Statistica w wersji 10 firmy StatSoft.

Największą średnią ilość CECs stwierdzono we krwi obwodowej ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, natomiast najmniejszą średnią ilość wykazano w grupie kontrolnej ($p < 0.005$). Wykazano także istotną statystycznie różnicę w ilości CECs pomiędzy grupą ciężarnych w stanie przedrzucawkowym, a grupą zdrowych ciężarnych. Największą średnią ilość CEPCs stwierdzono we krwi obwodowej zdrowych ciężarnych, natomiast najmniejszą średnią ilość wykazano w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym. Istotne statystycznie różnice w ilości CEPCs odnotowano również pomiędzy grupą kobiet z nadciśnieniem tętniczym ciążowym oraz grupą kontrolną. U kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym średnie stężenie vWf w osoczu było wyższe w porównaniu do pozostałych grup badanych oraz grupy kontrolnej, różnice te jednak nie osiągnęły istotności statystycznej. Współczynnik CEPCs/CECs osiągnął najniższe wartości u kobiet w ciąży powikłanej nadciśnieniem tętniczym przewlekłym, natomiast najwyższą średnią osiągnął w grupie zdrowych kobiet. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem vWf, a średnią ilością CECs, CEPCs i współczynnika CEPCs/CECs.

W grupie kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym stwierdzono pozytywną korelację między SBP-ŚR oraz DBP-ŚR a wartościami współczynnika CEPCs/CECs. Wykazano istotne różnice w grupie badanej kobiet w stanie przedrzucawkowym z ultrasonograficznymi cechami niewydolności łożyska a stężeniem vWf. W przypadku cech niewydolności łożyska stężenie vWf było istotnie wyższe. W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym nie stwierdzono zależności pomiędzy ilością utraty białka w dobowej zbiorce moczu a badanymi wskaźnikami uszkodzenia śródbłona.

Wnioski

1. Liczba krążących komórek śródbłona (CECs) zależy od rodzaju nadciśnienia tętniczego wiktającego ciążę.
2. Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłona (CEPCs) mówi pośrednio o stopniu uszkodzenia śródbłona i możliwościach organizmu do jego regeneracji.
3. Ilość krążących komórek progenitorowych śródbłona (CEPCs) u kobiet ze stanem przedrzucawkowym może świadczyć o niedostatecznym lub upośledzonym mechanizmie naprawy uszkodzenia śródbłona, czego efektem są objawy kliniczne preeklampsji.

4. Nadciśnienie tętnicze w ciąży wiąże się z dysfunkcją śródbłonna naczyń krwionośnych, która wyraża się m.in. zmienioną ilością krążących komórek śródbłonna (CECs) oraz krążących komórek progenitorowych śródbłonna (CEPCs).
5. Im dłuższy czas ekspozycji na podwyższone wartości ciśnienia tętniczego i im rozleglejsze uszkodzenie śródbłonna, tym wartości współczynnika CEPCs/CECs osiągały niższe wartości.
6. W grupie kobiet w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym pozytywna korelacja między średnim ciśnieniem tętniczym skurczowym oraz rozkurczowym, a wartościami współczynnika CEPCs/CECs może świadczyć uszkodzeniu mechanizmów naprawczych śródbłonna.
7. Uszkodzenie śródbłonna w przebiegu stanu przedrzucawkowego, wyrażone poprzez stężenie czynnika von Willebranda, wykazuje zależność z ultrasonograficznymi wykładnikami niewydolności łożyska.
8. Zmniejszenie ilości komórek śródbłonna kłębuszków nerkowych prawdopodobnie nie jest podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za pojawienie się białkomoczu w przebiegu stanu przedrzucawkowego.

Hipotezy do dalszych badań:

1. Współczynnik CEPCs/CECs może być użytecznym parametrem w ocenie zaburzenia równowagi procesów degeneracyjnych i regeneracyjnych śródbłonna.
2. Zachodzi potrzeba przeprowadzenia dalszych badań we wczesnej ciąży celem ustalenia znaczenia krążących komórek śródbłonna (CECs), krążących komórek progenitorowych śródbłonna (CEPCs) i współczynnika CEPCs/CECs jako predyktorów wystąpienia stanu przedrzucawkowego.
3. Istnieje prawdopodobieństwo, że im niższy współczynnik CEPCs/CECs, tym większe ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych w przyszłości.

10 Summary

Hypertensive disorders occur in 6% to 8% of pregnancies and contribute significantly to stillbirths and neonatal and maternal morbidity and mortality. Moreover, hypertension is one of the main cause of iatrogenic preterm births.

There are many theories which try to explain the etiopathogenesis of pre-eclampsia and other forms of hypertension in pregnancy, but nowadays it is assumed that it is complex and multifactorial. Presumably, one of the most important factor in this pathogenesis is systemic endothelial dysfunction with activation of endothelial cells. The exact role of circulating endothelial cells (CECs) and circulating endothelial progenitor cells (CEPCs) in the pathogenesis of hypertensive disorders during pregnancy is unknown. Most likely, the correct amounts of these cells play an important role in vascularisation during pregnancy, and an imbalance between the levels of these cells is associated with endothelial insufficiency. CECs and CEPCs can be isolated from peripheral blood by multi-color flow cytometry. Under physiological conditions low level of CECs is in the peripheral blood. CEPCs reflect the body's ability to repair endothelium. Von Willebrand factor is a specific plasma marker of endothelial dysfunction / damage.

The primary aim of this study was to evaluate endothelial abnormalities in pregnancies complicated by hypertension. Aim of the study was carried out by :

1. Estimating the number of CECs, CEPCs, the CEPCs / CECs ratio and vWf level;
2. Determine the relationship between plasma vWf level , and the number of CECs , CEPCs and CEPCs / CECs ratio ;
3. The evaluation of the relationship between the mean systolic blood pressure , mean diastolic blood pressure , maximum systolic and diastolic blood pressure and the concentration of vWf , the amount of CECs , CEPCs and the CEPCs / CECs ratio ;
4. The evaluation of the relationship between vWf level , CECs , CEPCs and CEPCs/CECs ratio and the ultrasound parameters of placental insufficiency;
5. The evaluation of relationship between proteinuria severity in women with pre-eclampsia and vWf level , amount of CECs , CEPCs and CEPCs / CECs ratio .

The study and control groups consisted of 71 women hospitalized and diagnosed at the Department of Perinatology and Gynecology, Poznan University of Medical Sciences , between November 2010 and January 2014. Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences has agreed to carry out the study.

We created 3 study groups : pregnant patients with chronic hypertension (n = 10), pregnant patients with gestational hypertension (n = 18) and pregnant patients with preeclampsia (n = 21). Control group consisted of healthy pregnant women (n=22). There were not significantly differences between groups in patient's age, gestational age and parity. The following exclusion criteria in control group was applied: cardiovascular disorders , metabolic diseases , cancer , inflammatory diseases and autoimmune diseases .

Venous blood from the first tube was used to determine vWf level by commercial ELISA. Second tube of blood was used for flow cytometric analysis . CEPCs was defined as CD45 (-) CD34 (+) , CD146 (+) and CD133 (+) collected during 1,000,000 analyzed events. CECs was defined as CD45 (-) CD34 (+) , CD146 (+) and CD133 (-) collected through 1,000,000 analyzed events. The evaluation of PI was performed in the uterine arteries , umbilical artery and fetal middle cerebral artery. Moreover, the presence or absence of early-diastolic notch in the spectrum of the wave flow was assessed in the uterine arteries. In order to evaluate the placental efficiency the uterine artery score and cerebro-umbilical ratio was used. 24-hour blood pressure monitoring was carried out using a recorder HolCARD CR-07 (Aspel). StatSoft Statistica v.10 software was used for statistical analysis.

The highest mean number of CECs were found in the peripheral blood of pregnant women with chronic hypertension , and the lowest mean number of CECs were found in the control group ($p < 0.005$). There was also statistically significant difference in amount of CECs between group with pre-eclampsia and control group. The highest mean number of CEPCs were found in the peripheral blood of healthy pregnant women , and the lowest mean number were found in group of pregnant women with chronic hypertension. Significant differences in the amount of CEPCs have also been reported between group of women with gestational hypertension and control group . Mean level of vWf was the highest in women in pregnancies complicated by pre-eclampsia when compared to other groups, but these differences did not reach statistical significance. CEPCs/CECs ratio reached the lowest values in pregnant women with chronic hypertension, and the highest in control group. There was no correlation between plasma vWf concentration and the mean number of CECs, CEPCs and CEPCs/CECs ratio. In group of women in pregnancies complicated by

pre-eclampsia we found a positive correlation between mean systolic and diastolic blood pressure and CEPCs/CECs ratio. In pre-eclamptic women with abnormal Doppler flows which indicated insufficiency of the placenta, vWf level was significantly higher. There was no correlation in pre-eclamptic women between the amount of protein loss in 24-hour urine protein test and indicators of endothelial dysfunction.

Conclusions:

1. The number of circulating endothelial cells (CECs) depends on type of hypertension complicating pregnancy; increased number of circulating endothelial cells (CECs) is the result of exposure to elevated blood pressure.
2. Number of circulating endothelial progenitor cells (CEPCs) reflects indirectly degree of endothelial damage and possibilities to its regeneration.
3. The number of CEPCs in women with preeclampsia may reflect the insufficient or impaired repair mechanism of endothelial damage, which resulted in clinical symptoms of pre-eclampsia .
4. Hypertensive disorders in pregnancy are associated with endothelial dysfunction with incorrect numbers of CECs and CEPCs .
5. The longer duration of exposure to elevated blood pressure and more extensive damage to the endothelium, the lower CEPCs / CECs ratio.
6. In the group of women in pregnancies complicated by preeclampsia positive correlation between the mean systolic blood pressure and mean diastolic blood pressure, and the values of CEPCs / CECs ratio may reflect the insufficiency of endothelial repair mechanisms.
7. Endothelial injury in pre-eclamptic patients , expressed by the higher levels of vWf, showed the relationship with ultrasound features of placental insufficiency.
8. Reduction of glomerular endothelial cells is probably not the primary mechanism responsible for the appearance of proteinuria in the course of pre-eclampsia.

Hypotheses for further research:

1. CEPCs/CECs ratio may be a useful tool in assessment of imbalance between regenerative and degenerative processes of endothelium.
2. There is a need for further studies in early pregnancy to determine the significance of number of CECs , CEPCs and CEPCs/CECs ratio as predictors of pre-eclampsia.

3. The lower CEPCs / CECs ratio, the greater risk of cardiovascular diseases in the future.

11 Piśmiennictwo

1. Eskes TKAB, Leon C, Chesley and hypertension in pregnant women. *Eur J Obs Gynecol.* 2000; 90: 181–186.
2. Sinclair RG. High blood pressure- ancient, modern and natural. *J Roy Coll Gen Pract.* 1969; 18: 207–213.
3. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy . Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: s1–s22.
4. Harskamp RE, Zeeman GG. Pre-eclampsia: at risk for remote cardiovascular disease. *Am J Med Sci.* 2007; 334: 291– 295.
5. Thadhani R, Solomon CG. Pre-eclampsia- a glimpse into the future? *N Engl J Med.* 2008; 359: 858–860.
6. Wolf M, Hubel CA, Lam C, Sampson M, Ecker JL i wsp. Pre-eclampsia and future cardiovascular disease: potential role of altered angiogenesis and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 6239–6243.
7. Hughes E. Obstetric-gynecologic terminology. Philadelphia: Davis Company 1972; 422.
8. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D i wsp. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194: 921–931.
9. Hjartardottir S, Leifsson BG, Geirsson RT, Steinthorsdottir V. Recurrence of hypertensive disorder in second pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194: 916–920.
10. Brown MA, Mackenzie C, Dunsmuir W, Roberts L, Ikin K i wsp. Can we predict recurrence of pre-eclampsia or gestational hypertension? *BJOG.* 2007; 114: 984–993.
11. Silver HM, Seebeck M, Carlson R. Comparison of total blood volume in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestational hypertensive pregnancy by simultaneous measurement of red blood cell and plasma volumes. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179: 87–93.
12. Heimrath J, Czeakański A, Krawczenko A, Duś D. Rola śródbłonnków w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 48–57.
13. Nakabayashi M, Sakura M, Takeda Y, Sato K. Elevated IL-6 in midtrimester amniotic fluid is involved with the onset of preeclampsia. *Am. J Reprod Immunol.* 1998; 39: 329–334.

14. Heimrath J, Krawczenko A, Duś D. Endothelin-1 (ET-1) as a mediator of pregnancy induced hypertension (PIH). *Ginekol Pol.* 2002; 73: 512–516.
15. Zafirovska KG, Maleska VT, Bogdanovska SV, Lozance LA, Masin-Paneva J i wsp. Plasma human atrial natriuretic peptide, endothelin-1, aldosterone and plasma-renin activity in pregnancy- induced hypertension. *J Hypertens.* 1999; 17: 1317–1322.
16. Meagher EA, FitzGerald GA. Disordered eicosanoid formation in pregnancy-induced hypertension. *Circulation.* 1993; 88: 1324–1333.
17. Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2004; 70: 223–232.
18. Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Massé J, Dastugue B i wsp. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem.* 2003; 36: 323–331.
19. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2001 ;14: 178S–185S.
20. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25: 581–611.
21. Nadar SK, Karalis I, Al Yemeni E, Blann AD, Lip GY. Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 1071–1076.
22. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding pre-eclampsia. *Science.* 2005; 308: 1592– 1594.
23. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaec.* 1994; 101: 669–674.
24. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 499–506.
25. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 61–78.
26. Wang X, Athayde N, Trudinger B. A proinflammatory cytokine response is present in the fetal placental vasculature in placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 1445–1451.
27. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 499–506.

28. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens*. 1991; 4: 700–708.
29. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 172: 202–203.
30. Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC i wsp. High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165: 895–901.
31. Hsu CD, Iriye B, Johnson TR, Witter FR, Hong SF i wsp. Elevated circulating thrombomodulin in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169: 148–149.
32. Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension*. 1997; 30: 247–251.
33. McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 168: 1323–1330.
34. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol*. 1992; 27: 101–108.
35. Grundmann M, Woywodt A, Kirsch T, Hollwitz B, Oehler K i wsp. Circulating endothelial cells: a marker of vascular damage in patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198: e1–5.
36. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J i wsp. 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.
37. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE i wsp. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. 2006; 355: 992–1005.
38. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T i wsp. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006; 12: 642–649.
39. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M, NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*. 2003; 41: 437–445.
40. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994; 101: 669–674.

41. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 175: 1365–1370.
42. Brodzki J, Länne T, Laurini R, Strevens H, Wide-Swensson D, Marsál K. Vascular mechanical properties and endothelial function in pre-eclampsia with special reference to bilateral uterine artery notch. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008; 87: 154–162.
43. Campbell S, Diaz-Recasens J, Griffin DR, Cohen-Overbeek TE, Pearce JM i wsp. New doppler technique for assessing uteroplacental blood flow. *Lancet*. 1983; 1: 675–677.
44. Thaler I, Weiner Z, Itskovitz J. Systolic or diastolic notch in uterine artery blood flow velocity waveforms in hypertensive pregnant patients: relationship to outcome. *Obstet Gynecol*. 1992; 80: 277–282.
45. Kofinas AD, Penry M, Nelson LH, Meis PJ, Swain M. Uterine and umbilical artery flow velocity waveform analysis in pregnancies complicated by chronic hypertension or preeclampsia. *South Med J*. 1990; 83: 150–155.
46. Kofinas AD, Penry M, Simon N V, Swain M. Interrelationship and clinical significance of increased resistance in the uterine arteries in patients with hypertension or preeclampsia or both. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 601–606.
47. Gruslin A, Lemyre B. Pre-eclampsia: fetal assessment and neonatal outcomes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011; 25: 491–507.
48. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987; 18: 234.
49. Szpera-Gozdziwicz A, Breborowicz GH. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014; 1: 734–746.
50. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D i wsp. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013; 9: 1057–1069.
51. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol*. 1986; 250: H822–H827.
52. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000; 101: 1653–1659.
53. Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2001; 19: 415–420.
54. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21: 1145–1151.

55. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998; 97: 2222–2229.
56. Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E i wsp. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 104: 340.
57. Baird AE, Wright VL. Vascular biology: cellular and molecular profiling. *Semin Neurol*. 2006; 26: 65.
58. Mor I, Natarajan K, Chacko V, Artemov D, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolites of human vascular endothelial cells altered by cyclooxygenase inhibition, growth factor depletion, and paracrine factors secreted by cancer cells. *Mol Imaging*. 2003; 2: 2124-2130.
59. Padera TP, Stoll BR, So PT, Jain RK. Conventional and high-speed intravital multiphoton laser scanning microscopy of microvasculature, lymphatics, and leukocyte-endothelial interactions. *Mol Imaging*. 2002; 1: 9–15.
60. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 228–235.
61. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN i wsp. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007; 109: 1801–1809.
62. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol*. 2007; 137: 36–48.
63. Erdbruegger U, Woywodt A, Kirsch T, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as a prognostic marker in thrombotic microangiopathy. *Am J Kidney Dis*. 2006; 48: 564–570.
64. Woywodt A, Goldberg C, Kirsch T, de Groot K, Erdbruegger U i wsp. Circulating endothelial cells in relapse and limited granulomatous disease due to ANCA associated vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65: 164–168.
65. Georgescu A, Alexandru N, Popov D, Amuzescu M, Andrei E i wsp. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 1566–1575.
66. Wiśniewski T, Makarewicz R, Ziółkowska E, Danuta Rystok, Ewa Żekanowska. Angiogeneza nowotworowa - mechanizmy, czynniki regulujące, leki. *Onkol Info*. 2009; VI: 172–178.
67. Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964–966.

68. Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh.* 1970; 40: 163.
69. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/ Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 715–719.
70. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H i wsp. Circulating endothelial cells as marker for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet.* 2003; 361: 206–210.
71. Holmén C, Elsheikh E, Stenvinkel P, Qureshi AR, Pettersson E i wsp. Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 3110–3120.
72. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F i wsp. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 1296–1304.
73. Mancuso P, Calleri A, Cassi C, Gobbi A, Capillo M i wsp. Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 522: 83–87.
74. Hunting CB, Noort WA, Zwaginga JJ. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization. *Vox Sang.* 2005; 88: 1–9.
75. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta.* 2006; 373: 17–26.
76. Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells and vasculitis. *Intern Med.* 2004; 43: 660–667.
77. Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 33: 2003/2004: 495–499.
78. Makin A, Chung N, Silverman SH, Silverman SH, Lip GY. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. *Eur Heart J.* 2004; 25: 371–376.
79. George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M i wsp. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in-vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood.* 1993; 82: 2109–2116.
80. Kas-Deelen AM, Harmsen MC, De Maar EF, Oost-Kort WW, Tervaert JW. i wsp. Acute rejection before cytomegalovirus infection enhances von Willebrand factor and soluble VCAM-1 in blood. *Kidney Int.* 2000; 58: 2533–2542.

81. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens*. 2012; 6: 85–99.
82. Khan SS, Solomon MA, McCoy Jr JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytom B Clin Cytom*. 2005; 64: 1–8.
83. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ i wsp. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952–958.
84. Głowińska-olszewska B, Łuczyński W, Bossowski A. Komórki progenitorowe śródbłonna jako nowy marker funkcji endotelium w ocenie ryzyka chorób układu sercowo- naczyniowego. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011; 3: 8–15.
85. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*. 2000; 105: 17–19.
86. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D i wsp. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+)AC133 (+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001; 88: 167–174
87. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6: 389–395.
88. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9: 653–660.
89. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353–364.
90. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002; 29(6 Suppl 16): 15–18.
91. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 741–752.
92. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C i wsp. Number and migratory activity of circulating progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001; 89: e1–e7.
93. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1538–1547.
94. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 454–471.
95. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis. *J Mol Med*. 2004; 82: 671–677.

96. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C i wsp. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001; 89: E1–7.
97. Hadoke PW. Is endothelial progenitor cells senescence a therapeutic target in hypertension? *J Hypertens*. 2010; 28: 887–888.
98. Magen E, Feldman A, Cohen Z, Alon DB, Minz E i wsp. Circulating endothelial progenitor cells, Th1/Th2/Th17-related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension. *Am J Med Sci*. 2010; 339: 117–122.
99. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C i wsp. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999; 85: 221–228.
100. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003; 9: 702–712.
101. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW i wsp. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30: 967–972.
102. Yoder MC. Endothelial progenitor cell: a blood cell by many other names may serve similar functions. *J Mol Med (Berl)*. 2013; 91: 285–295.
103. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004; 109: 2692–2697.
104. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U i wsp. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003; 107: 3059–3065.
105. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005; 45: 321–325.
106. Rafii S, Avecilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R i wsp. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 996: 49–60.
107. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M i wsp. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to re-endothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003; 108: 3115–3121.
108. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003; 107: 1164–1169.

109. Robb AO, Mills NL, Newby DE, Denison FC. Endothelial progenitor cells in pregnancy. *Reproduction*. 2007; 133: 1–9.
110. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J*. 1993; 7: 308–316.
111. De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. von Willebrand factor to the rescue. *Blood*. 2009; 113: 5049–5057.
112. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis C V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost*. 2012; 10: 2428–2437.
113. Campos M, Sun W, Yu F, Barbalic M, Tang W i wsp. Genetic determinants of plasma von Willebrand factor antigen levels: a target gene SNP and haplotype analysis of ARIC cohort. *Blood*. 2011; 117: 5224–5230.
114. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1002–1007.
115. Metcalf DJ, Nightingale TD, Zenner HL, Lui-Roberts WW, Cutler DF. Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci*. 2008; 121: 19–27.
116. Van Breevoort D, van Agtmaal EL, Dragt BS, Gebbinck JK, Dienava-Verdoold I i wsp. Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies. *J Proteome Res*. 2012; 11: 2925–2936.
117. Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009; 12: 125–137.
118. Randi AM, Laffan M a, Starke RD. Von Willebrand Factor, Angiodysplasia and Angiogenesis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013; 5: e2013060.
119. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA i wsp. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood*. 2011; 117: 1071–1080.
120. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11205–11210.
121. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost*. 1984; 52: 176–182.
122. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. 2003; 16: 153–168.
123. Harrison RL, McKee PA. Estrogen stimulates von Willebrand factor production by cultured endothelial cells. *Blood*. 1984; 63: 657–664.

124. Mahieu B, Jacobs N, Mahieu S, Naelaerts K, Vertessen F i wsp. Haemostatic changes and acquired activated protein C resistance in normal pregnancy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007; 18: 685–688.
125. Redman CWG, Denson KWE, Beilin LJ, Bolton FG, Stirrat GM. Factor VIII consumption in preeclampsia. *Lancet*. 1977; 17: 1249- 1252.
126. Nadar SK, Al Yemeni E, Blann AD, Lip GY. Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. *Thromb Res*. 2004; 113: 123–128.
127. Ogawa T, Suzuki Y, Sayama S, Soma H. Possible relationship between the ratio of Factor VIII complex and placental insufficiency in preeclampsia. *Biol Res Pregnancy Perinatol*. 1983; 4: 155–157.
128. Velzing-Aarts FV, Muskiet FAJ, van der Dijks FPL, Duits AJ. High serum interleukin-8 levels in afro-caribbean women with pre-eclampsia. Relations with tumor necrosis factor-alpha, duffy negative phenotype and von Willebrand factor. *Am J Reprod Immunol*. 2002; 48: 319–322.
129. Clausen T, Djurovic S, Brosstad FR, Berg K, Henriksen T. Altered circulating levels of adhesion molecules at 18 weeks' gestation among women with eventual preeclampsia: indicators of disturbed placentation in absence of evidence of endothelial dysfunction? *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182: 321–325.
130. Gosling RG, Dunbar G, King DH, Newman DL, Side CD i wsp. The quantitative analysis of occlusive peripheral arterial disease by a non-intrusive ultrasonic technique. *Angiology*. 1971; 22: 52–55.
131. Gudmundsson S, Korszun P, Olofsson P, Dubiel M. New score indicating placental vascular resistance. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003; 82: 807–812.
132. Kornacki J, Kornacka A, Rajewski M, Goździewicz T, Skrzypczak J, Szczapa J. Czy nieprawidłowe wyniki badania dopplerowskiego u płodów z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania zwiększają częstość powikłań pourodzeniowych. *Ginekol Pol*. 2009; 80: 839–844.
133. Merz E. Uteroplacental circulation. *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*. 2005; 1: 469–480, 614.
134. Vyas S, Campbell S, Bower S, Nicolaidis KH. Maternal abdominal pressure alters fetal cerebral blood flow. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97: 740–742.
135. Baschat A, Gembruch U. The cerebroplacental Doppler ratio revisited. *Ultrasound Obs Gynecol*. 2003; 21: 124–127.
136. Nadar SK, Lip GYH, Lee KW, Blann AD. Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost*. 2005; 94: 707–712.

137. Karthikeyan V, Blann A, Baghdadi S, Lane DA, Gareth Beevers D i wsp. Endothelial dysfunction in hypertension in pregnancy: associations between circulating endothelial cells, circulating progenitor cells and plasma von Willebrand factor. *Clin Res Cardiol.* 2011; 100: 531–537.
138. Canbakan, K. Keven, H. Tutkak, N. Danisman I, Ergun GN i wsp. Circulating endothelial cells in preeclampsia. *J Hum Hypertens.* 2007; 21: 558–563.
139. Mehrabian F, Jazi S, Javanmard S, Kaviani M, Homayouni V. Circulating endothelial cells (CECs) and E-selectin: Predictors of pre-eclampsia. *J Res Med Sci.* 2012; 17: 15–21.
140. Strijbos M, Snijder C, Kraan J, Lamers C, Gratama J i wsp. Levels of circulating endothelial cells in normotensive and severe pre-eclamptic pregnancies. *Cytom B Clin Cytom.* 2010; 78: 382–386.
141. Heimrath J, Paprocka M, Czekanski A, Ledwozyw A, Kantor A i wsp. Pregnancy-Induced Hypertension is Accompanied by Decreased Number of Circulating Endothelial Cells and Circulating Endothelial Progenitor Cells. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014;in press:published online: 23 February 2014.
142. Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hoshiai T, Hayashi C, Kimura Y i wsp. Circulating endothelial progenitor cells during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1845–1848.
143. Luppi P, Powers R, Verma V, Edmunds L, Plymire D i wsp. Maternal circulating CD34+VEGFR-2+ and CD133+VEGFR-2+ progenitor cells increase during normal pregnancy but are reduced in women with preeclampsia. *Reprod Sci.* 2010; 17: 643–652.
144. Buemi M, Allegra A, D’Anna R, Coppolino G, Crasci E i wsp. Concentration of circulating endothelial progenitor cells (EPC) in normal pregnancy and in pregnant women with diabetes and hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196: 68.e1–68.e6.
145. Matsubara K, Abe E, Matsubara Y, Kameda K, Ito M. Circulating endothelial progenitor cells during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2006; 56: 79–85.
146. Savvidou M, Xiao Q, Kaihura C, Anderson J, Nicolaidis K. Maternal circulating endothelial progenitor cells in normal singleton and twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198: 414.e1–414.e5.
147. Gussin H, Bischoff F, Hoffman R, Elias S. Endothelial precursor cells in the peripheral blood of pregnant women. *J Soc Gynecol Investig.* 2002; 9: 357–361.
148. Sugawara J, Mitsui-Saito M, Hayashi C, Hoshiai T, Senoo M i wsp. Decrease and senescence of endothelial progenitor cells in patients with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 5329–5332.

149. Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz P, Mersin N, Meneveau N i wsp. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2007; 562: 111–118.
150. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005; 23: 97–104.
151. Westerweel P, Visseren F, Hajer G, Olijhoek JK, Hoefer IE i wsp. Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur Heart J* 2008; 29: 2808–2817.
152. Blann A. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost.* 2006; 95: 49–55.
153. Molvarec A, Rigo JJ, Boze T, Derzsy Z, Cervenak L i wsp. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost.* 2009; 101: 305–311.
154. Bosmans J, Kockx M, Vrints C, Bult H, De Meyer G i wsp. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 634–645.
155. Qin F, Impeduglia T, Schaffer P, Dardik H. Overexpression of von Willebrand factor is an independent risk factor for pathogenesis of intimal hyperplasia: preliminary studies. *J Vasc Surg.* 2003; 37: 433–439.
156. Zhang X, Meng H, Blaivas M, Rushing EJ, Moore BE i wsp. Von Willebrand factor permeates small vessels in CADASIL and inhibits smooth muscle gene expression. *Transl Stroke Res.* 2012; 3: 138–145.
157. Obeidat M, Obeidat M, Ballermann BJ. Glomerular endothelium: a porous sieve and formidable barrier. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 964–972.
158. Lafayette R, Druzin M, Sibley R, Derby G, Malik T i wsp. Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia. *Kidney Int.* 1998; 54: 1240–1249.
159. Fisher K, Luger A, Spargo B, Lindheimer M. Hypertension in pregnancy: Clinicalpathological correlations and remote prognosis. *Med.* 1981; 60: 267–276.
160. Strevens H, Wide-Swensson D, Hansen A, Horn T, Ingemarsson I i wsp. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG.* 2003; 110: 831–836.
161. Powe C, Levine R, Karumanchi S. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011; 123: 2856–2869.

162. Schlembach D1, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M i wsp.
Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler
ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine
growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 29: 407-413.