

Lek. Katarzyna Grześkowiak-Fischbach

**Ekspresja genów wybranych czynników angiogennych w
łożysku oraz ich produktów białkowych we krwi pępowinowej
i żyłnej matki w nadciśnieniu tętniczym i hipotrofii płodu**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie położnictwo i ginekologia

Promotor: Prof. dr hab. Anna Markowska



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Spis treści

I. WSTĘP.....	7
1. ANGIOGENEZA.....	7
1.1 Wprowadzenie.....	7
1.2 Przedstawienie procesu angiogenezy.....	7
2. BADANE CZYNNIKI ANGIOGENNE.....	13
2.1. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF).....	13
2.2. Łożyskowy czynnik wzrostu (PLGF).....	14
2.3. Interleukina-10.....	14
2.4. Leptyna.....	15
2.5. Angiopoetyna-1.....	16
3. NADCIŚNIENIE W PRZEBIEGU CIĄŻY.....	18
3.1. Wstęp.....	18
3.2. Epidemiologia.....	22
3.3. Kryteria diagnostyczne nadciśnienia tętniczego w ciąży.....	22
3.3.1. Nadciśnienie ciążowe (PIH).....	25
3.3.2. Nadciśnienie przewlekłe.....	25
3.3.3. Nadciśnienie tętnicze późne (przemijające).....	26
3.3.4. Stan przedrzucawkowy (preeclampsia).....	26
3.3.5. Zespół HELLP.....	30
4. HIPOTROFIA PŁODU.....	32
4.1. Wstęp.....	32
4.2. Definicja.....	33
4.3. Rozpoznanie.....	37
4.3.1. Biometryczne wskaźniki IUGR.....	37
4.3.2. Dopplerowskie wskaźniki IUGR.....	38
II. CEL PRACY.....	42
III. MATERIAŁ.....	43
1. Grupa pierwsza - pacjentki z IUGR.....	43
2. Grupa druga- pacjentki z nadciśnieniem tętniczym w przebiegu ciąży.....	45
3. Grupa trzecia- pacjentki z grupy kontrolnej.....	47
IV. METODY.....	50

1. ELISA - Test immunoenzymatyczny ELISA	51
2. PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy.....	56
2.1. Materiał badawczy	56
2.2. Przygotowanie prób do analizy	56
2.3. Izolacja RNA	56
2.4. Sprawdzenie ilości oraz jakości wyizolowanego RNA	57
2.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji	57
2.6. Amplifikacja cDNA metodą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym	58
3. Analiza statystyczna.....	59
V. WYNIKI.....	61
1. Stężenia badanych białek.....	61
1.1 Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek i surowicy krwi pępowinowej..	61
1.2 Stężenie PLGF w surowicy krwi pacjentek i surowicy krwi pępowinowej..	67
1.3 Stężenie interleukiny 10 w surowicy krwi pacjentek i krwi pępowinowej...	75
1.4 Stężenie leptyny w surowicy krwi pacjentek i krwi pępowinowej.....	78
1.5 Stężenie angiopoetyny1 w surowicy krwi pacjentek i krwi pępowinowej....	84
2. Analiza PCR ekspresji genów badanych białek w łóżyskach badanych grup.....	92
2.1. Badanie ekspresji genu VEGF.....	92
2.2. Badanie ekspresji genu PLGF.....	93
2.3. Badanie ekspresji genu interleukiny 10.....	94
2.4. Badanie ekspresji genu leptyny	95
2.5. Badanie ekspresji genu angiopoetyny 1	96
VI. DYSKUSJA.....	97
VII. WNIOSKI.....	109
VIII. STRESZCZENIE.....	110
IX. PIŚMIENNICTWO.....	118
X. SPIS TABEL.....	137
XI. SPIS WYKRESÓW.....	138
XII. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ NA BADANIA.....	140

Wykaz skrótów i symboli użytych w pracy

ABPM- ambulatory blood pressure monitoring (całodobowy ambulatoryjny pomiar ciśnienia tętniczego)

AGA- appropriate for gestational age (odpowiedni do wieku ciążowego)

AGF- angiogenic factors (czynniki proangiogenne)

Ang-1,2- angiopoietin 1,2 (angiopoetyna 1 i 2)

AlAT- aminotransferaza alaninowa

AspAT- aminotransferaza asparaginianowa

AFLP- acute fatty liver of pregnancy (ostre stłuszczenie wątroby ciężarnych)

APS- antiphospholipid syndrome (zespół antyfosfolipidowy)

BMI- body mass index (wskaźnik masy ciała)

BP- blood pressure (ciśnienie tętnicze krwi)

CDI- inhibitor chrząstko-podobny

CD59- fragment dopełniacza

CSIF- cytokine synthesis inhibitory factor (czynnik hamujący syntezę cytokin)

CRL- crown-rump-length (długość ciemieniowo-siedzeniowa)

DBP- diastolic blood pressure (ciśnienie rozkurczowe)

Del-1- białko produkowane przez gen developmental endothelial locus-1

DIC- disseminated intravascular coagulation (zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego)

DNA- deoxyribonucleic acid (kwas deoksyrybonukleinowy)

(dT)18- primer

DV- ductus venosus (przewód żylny)

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay (test immunoenzymatyczny)

ELBW- extremely low birth weight (skrajnie niska masa urodzeniowa)

FGF- fibroblast growth factor (czynnik wzrostu fibroblastów)

GAPDH- gen referencyjny: dehydrogenaza aldehydu 3-foglicerynowego

G-CSF- czynnik stymulujący kolonie granulocytarne

GFR- glomerular filtration rate (współczynnik przesączania kłębuszkowego)

GPSK- Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny

HCG- ludzka gonadotropina kosmówkowa

HELLP- zespół : Haemolysis (niedokrwistość hemolityczna), Elevated Levels of Liver enzymes (podwyższone poziomy enzymów wątrobowych), low Platelets count (małopłytkowość)

HGF- czynnik wzrostu hepatocytów

HUS- hemolytic uremic syndrome (zespół hemolityczno-mocznicowy)

IL- interleukina

ITP- immune thrombocytopenic purpura (małopłytkowość immunologiczna)

IUGR- intrauterine growth restriction (wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu)

LBW- low birthweight (niska masa urodzeniowa noworodka)

LCHAD- dehydrogenaza 3-hydroksyacylokoenzymu A długłańcuchowych kwasów tłuszczowych

MAP- mean arterial pressure (średnie ciśnienie tętnicze krwi)

MCV- middle cerebral artery (tętnica środkowa mózgu)

mg/dl- miligramy na decylitr

mmHg- milimetry słupa rtęci

mRNA- matrycowy kwas rybonukleinowy

ng- nanogramy

NO- tlenek azotu

NIC- nadciśnienie indukowane ciążą

NT- nadciśnienie tętnicze

OUN- ośrodkowy układ nerwowy

PCR- polymerase chain reaction (reakcja łańcuchowa polimerazy)

PDGF- plateled drived growth factor (płytkopochodny czynnik wzrostu)

pg- pikogramy

PI- indeks pulsacji

PIH- pregnancy induced hypertension (nadciśnienie ciążowe)

PLGF- placenta growth factor (łożyskowy czynnik wzrostu)

PLT- platelets (płytki krwi, liczba płytek krwi)

PREE- preeclamsia (stan przedrzucawkowy)

qRT-PCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją; *real time*- w czasie rzeczywistym

RI- indeks oporu

RR- oznaczenie ciśnienia tętniczego przy użyciu sfigmomanometru Riva-Rocciego

sFlt1- rozpuszczalny receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu

SBP- systolic blood pressure (ciśnienie skurczowe)

SGA- small for gestational age (za mały w stosunku do wieku ciążowego)

SLE- systemic lupus erythematosus (toczeń rumieniowaty układowy)

sVEGFR-1/sFt- rozpuszczalna postać receptora dla naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu

t.c.- tydzień ciąży

Tie1, Tie2- tunica interna endothelial cell kinase (receptor dla kinazy tyrozynowej Tie1 i Tie2)

TTS- thrombotic thrombocytopenic purpura (plamica małopłytkowa)

UA- umbilical artery (tętnica pępowinowa)

USG- ultrasonografia/ badanie ultrasonograficzne

VEGF- vascular endothelial growth factor (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego)

VPF- vascular permeability factor (czynnik przepuszczalności naczyń)

vWf- von Willebrand factor (czynnik von Willebranda)

I. WSTĘP

1. ANGIOGENEZA

1.1 Wprowadzenie

Angiogeneza w warunkach fizjologicznych jest związana głównie z rozrodczością kobiet. Dynamiczna równowaga między czynnikami stymulującymi i hamującymi zachodzi w wielu procesach związanych z owulacją, miesiączkowaniem, implantacją zarodka i tworzeniem się jego naczyń, powstawaniem kosmówki i łożyska oraz porodem.

Ciąże powikłane wykazują często nieprawidłowe unaczynienie kosmków łożyskowych, co może być jednym z czynników odpowiedzialnych za nieprawidłowy rozwój płodu i rozwój u ciężarnych nadciśnienia indukowanego ciążą, stanu przedrzucawkowego z najcięższą postacią- rzucawką. [1]

Angiogeneza w początkowym okresie ciąży związana jest ze wzrostem i dojrzewaniem kosmków: (etap pierwszy), a w środkowym okresie ciąży następuje drugi etap: znaczna zmiana zawartości naczyń związana ze wzrostem stężeń tlenu oraz remodelowanie naczyń wynikające ze znacznej proliferacji naczyń śródbłonna. W badanych patologiiach ciąży wykazano nieprawidłowe unaczynienie tkanek łożyskowych i kosmków. [2-10]

1.2 Przedstawienie procesu angiogenezy

Angiogeneza nazywamy proces tworzenia nowych naczyń włosowatych na bazie już istniejących naczyń krwionośnych. Szczególnie uprzywilejowanym miejscem dla angiogenezy jest układ rozrodczy kobiet. W okresie płodowym powstawanie naczyń krwionośnych odbywa się na drodze waskulogenezy, która polega na powstawaniu naczyń krwionośnych poprzez różnicowanie i proliferację komórek śródbłonna z komórek macierzystych-angioblastów. [4,5,11]

W okresie pozapłodowym w stanach fizjologicznych rzadko tworzą się naczynia krwionośne *de novo*. Często dochodzi jednak do ich proliferacji w stanach patologicznych, szczególnie w procesach nowotworowych (rak jajnika, glejak). Neowaskularyzacja jest też główną odpowiedzią naczyniową na niedotlenienie i zapalenie (zawał serca, zmiany miażdżycowe kończyn dolnych).

Pod wpływem uwalnianych w tych stanach cytokin, dochodzi do wieloetapowego procesu angiogenezy: [2-4]

I ETAP: pobudzenie komórek śródbłónka przez czynniki proangiogenne (VEGF, FGF- czynnik wzrostu fibroblastów), wiążące się z odpowiednimi receptorami (VEGFR I FGFR). Następuje zwiększenie przepuszczalności naczyń i gromadzenie się białek pozakomórkowej macierzy.

II ETAP: pobudzenie enzymów proteolitycznych (MMP- metaloproteinaz macierzy) i degradacja błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej, co umożliwia migrację komórek śródbłónka

Procesy te umożliwiają i przygotowują tkankę do następnego etapu, w którym dochodzi do inwazji, migracji i proliferacji komórek śródbłónka. Nadmierna proteoliza będzie prowadzić do nieefektywnej angiogenezy, natomiast niewystarczająca destrukcja macierzy uniemożliwi proces inwazji i migracji.

III ETAP: poprzez integryny ułatwienie migracji i adhezji komórek śródbłónka.

IV ETAP: proliferacja endothelium z wytworzeniem rurkowatych struktur nowego naczynia krwionośnego.

V ETAP: poprzez działanie uwalnianej z komórek mezenchymalnych, wiążącej się z receptorem Tie -2 angiopoetyny-1, dojrzewanie komórek śródbłónka, stabilizacja naczynia z powstaniem błony podstawnej, rekrutacja komórek przydanki (pericytów) oraz komórek mięśni gładkich- spełniają rolę podporową, ale także biorą udział w wytwarzaniu elementów macierzy pozakomórkowej; następuje odtworzenie błony podstawnej oddzielającej komórki śródbłónka od składników macierzy pozakomórkowej. Za syntezę biomolekuł kompartmentu pozakomórkowego są odpowiedzialne głównie nowo powstałe komórki endotelialne. [7,8]

Czynniki angiogenne są odpowiedzialne i włączone w tworzenie nowych naczyń krwionośnych niezbędnych do rozwoju i funkcjonowania łożyska.

Angiogeneza jest związana ze wzrostem i dojrzewaniem kosmków doczesnowych szczególnie ważnym ok.20 tygodnia ciąży, gdy rozwój płyty łożyska jest najbardziej intensywny. [3,4,12]

Łożysko ludzkie jest typu krwiokosmkowego o dwóch oddzielnych systemach unaczynienia. Granicę między krążeniem maczynym i płodowym stanowi błona zespólniowo-włośniczkowa.

W następstwie niewyjaśnionych zaburzeń w rozwoju kosmków ok.10% ciąż u człowieka rozwija się nieprawidłowo. Konsekwencją nieprawidłowego rozwoju ciąży jest opóźniony wzrost wewnątrzmaciczny, niekiedy z upośledzeniem rozwoju umysłowego, jak również z wewnątrzmacicznym lub poporodowym zgonem noworodka. Istnieje ścisły związek między objętością, wielkością, rozmiarem łożyska przy porodzie a zachorowalnością i śmiertelnością na choroby sercowo-naczyniowe w wieku dojrzałym. [1,13]

Angiogeneza- powstanie nowych naczyń z już istniejących w danym narządzie kapilar, jest podstawą prawidłowego rozwoju zarodka, łożyska oraz wzrostu płodu i noworodka. Nieprawidłowy rozrost łożyskowego drzewa kosmkowego manifestuje się pod postacią takich patologii ciąży jak nadciśnienie ciążowe i IUGR. [5-9]

Hipowaskularyzacja pnia kosmków lub zmniejszenie obwodowe ich unaczynienia w łożysku w ciążach powikłanych IUGR i PIH może być następstwem nieprawidłowego różnicowania się siatki kapilar w niedojrzałych kosmkach we wczesnej ciąży. Obserwowane zmiany mogą mieć związek z zaburzoną ekspresją lub nieprawidłową funkcją angiogennych czynników wzrostu i ich receptorów.

Uważa się, że główną przyczyną patogenetyczną PIH i preeklamsji jest nieprawidłowa implantacja trofoblastu. Obserwuje się tu brak lub niekompletną inwazję komórek trofoblastu w tętnice spiralne, co w efekcie prowadzi do ich niedostatecznego rozszerzenia i nieprawidłowego przepływu krwi przez łożysko. Następstwem powyższych zmian jest stwierdzana lokalnie w obrębie łożyska hipoksja-niedotlenienie, a to z kolei jest odpowiedzialne za uruchomienie procesu angiogenezy. [2,5,14]

Wymiana przezłożyskowa dostarcza wszystkich niezbędnych metabolicznie składników do wzrostu płodu i jego rozwoju. Szybkość tej wymiany zależy od nasilenia przepływu krwi w macicy (przepływ maczyno-łożyskowy) oraz w pępowinie. Szybkość przepływu krwi przez łożysko zależy od rozwoju naczyń w łożysku. Angiogeneza łożyskowa jest zatem najbardziej istotna dla prawidłowego rozwoju płodu. [15]

Jednak rola zaburzonej angiogenezy w patogenezie nadciśnienia tętniczego nie została całkowicie wyjaśniona. Niniejsza praca będzie próbą zrozumienia roli AGF u pacjentek z NIC i IUGR.

Brak równowagi między krążącymi czynnikami regulującymi angiogenezę: hamującymi i promującymi, wynika z dysfunkcji śródbłonnków i nieprawidłowej budowy łożyska, co wpływa na rozwój nadciśnienia tętniczego i hipotrofii płodu. [16-18]

Tabela nr 1. Endogenne czynniki angiogenne. [4]

Endogenne czynniki angiogenne

STYMULUJĄCE

Angiogenina

Angiopoetyna – 1

Del-1 (*białko produkowane przez ge developmental andothelial locus-1*)

FGF (*czynnik wzrostu fibroblastów zasadowy i kwaśny*)

Follistatyna

G-CSF (*czynnik stymulujący kolonie granulocytarne*)

HGF (*czynnik wzrostu hepatocytów*)

IL-8 (*interleukina-8*)

Leptyna

HAMUJĄCE

Angiostatyna (*fragment plasminogenu*)

Antytrombina III

CDI (*inhibitor chrząstko-podobny*)

CD59 (*fragment dopełniacza*)

Endostatyna (*ragment kolagenu XVIII*)

Fragment fibronektyny

Heparynaza

Sześciosacharydowy fragment heparyny

HCG (*ludzka gonadotropina kosmówkowa*)

Midkine (<i>czynnik wzrostu wiążący heparynę</i>)	Interferony - α , β , γ
PLGF (<i>łożyskowy czynnik wzrostu</i>)	IP-10 (<i>białko indukujące interferon</i>)
PD-ECGF (<i>płytkopochodny czynnik wzrostu komórek śródbłonki</i>)	IL-12 (<i>interleukina-12</i>)
PDGF-BB (<i>płytkopochodny czynnik wzrostu z dwoma łańcuchami BB</i>)	TIMPs (<i>inhibitory metaloproteinaz</i>)
PTN (<i>pleiotropina</i>)	2-metoksy-estradiol
Proliferyna	Łóżyskowy inhibitor rybonukleazy
TGF α (<i>transformujący czynnik wzrostu-α</i>)	Inhibitor aktywatora plazminogenu
TGF β (<i>transformujący czynnik wzrostu-β</i>)	PF 4 (<i>czynnik płytkowy 4</i>)
TNF α (<i>czynnik martwicy nowotworów-α</i>)	16 kD (<i>fragment prolaktyny</i>)
VEGF (<i>naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu</i>)	PRP (<i>białko związane z proliferacją</i>)
	Retinoidy
	Tetrahydro-cortisol-S
	Trombospondyna-1
	Waskulostatyna
	Wazostatyna

Celem pracy było uzyskanie specyficznego markera biochemicznego w predykcji obu jednostek chorobowych u kobiet w ciąży. Do chwili obecnej zostało opisanych kilkanaście różnych markerów, które samodzielnie lub w połączeniu mogą spełniać te kryteria. [4,5]

2. BADANE CZYNNIKI ANGIOGENNE

2.1. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)

Głównym czynnikiem pobudzającym waskulogenezę i angiogenezę zarówno fizjologiczną jak i patologiczną jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF). Jest to cytokina – mitogen specyficzny dla śródbłonka naczyń. Powoduje on wzrost przepuszczalności naczyń i ich poszerzenie, stymulując produkcję tlenu azotu przez pobudzony śródbłonek naczyń. Pobudza również enzymy proteolityczne (metaloproteinazy MMP-1, MMP-2 i MMP-3) oraz ekspresję receptorów dla czynników angiogennych w endotelium. Chroni komórki śródbłonka przed apoptozą (śmiercią komórki). Jest białkiem o ciężarze 40-45 Da. Wydzielany jest również przez inne komórki niż śródbłonek, np. nowotworowe. U człowieka istnieje co najmniej 5 izoform VEGF (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆), z których najważniejsze to VEGF₁₆₅ i VEGF₁₂₁. [19,20,21]

Proangiogeny efekt wiąże się z obecnością odpowiednich receptorów swoistych dla kinazy tyrozyny VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1, które obecne są na komórkach śródbłonka oraz monocytach, makrofagach, jak również niektórych komórkach nowotworowych. Receptor VEGFR-4 obecny jest na komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych. VEGF jest członkiem rodziny wiążących się z heparyną czynników wzrostu (również płytkopochodny czynnik wzrostu PDGF, łożyskowy czynnik wzrostu PlGF, grupa czynników wzrostu fibroblastów i nabłonkowy czynnik wzrostu EGF). Receptory dla VEGF są typowymi formami III receptora kinazy tyrozynowej. Przez VEGFR-1/Flt-1 działa również PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu). [22,23]

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, zwany również czynnikiem przepuszczalności naczyń (VPF), jest uważany obecnie za kluczowy czynnik regulujący fizjologiczną i patologiczną angiogenezę. W prawidłowej ciąży VEGF zawarty jest zarówno w osoczu ciężarnych (zwłaszcza III trymestr) jak również w osoczu krwi pępowinowej. Obserwowano niższe stężenie tej substancji w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi już w II trymestrze ciąży, zanim rozwinęły się objawy nadciśnienia ciążowego, białkomoczu i stanu przedrzucawkowego. [24-26]

2.2. Łożyskowy czynnik wzrostu (PLGF)

Łożyskowy czynnik wzrostu (placental growth factor) pobudza podobnie jak VEGF proliferację komórek śródbłónka i odgrywa istotną rolę w fizjologicznej i patologicznej angiogenezie. Produkowany jest w dużej ilości przez kosmki łożyska i ma duże powinowactwo do receptora Flt-1. Potęguje on działanie małych ilości VEGF i przejawia aktywność angiogenną również niezależną od VEGF. Uważany jest za lokalny mediator angiogenezy w kosmkach łożyska a jego ekspresja regulowana jest przez niedotlenienie (stymulowana przy wzrastającym ciśnieniu parcjalnym tlenu a obniża się przy jego niskich wartościach). W dotychczasowych badaniach stwierdzono obniżoną w stosunku do normy zawartość PIGF w surowicy krwi u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym.

W przeciwieństwie do prac na temat prawidłowych łożysk ludzkich, mało jest doniesień odnośnie ekspresji molekuł VEGF, PIGF i ich receptorów w łożyskach uzyskanych z ciąży patologicznych. [20,23]

VEGF i PIGF są odpowiedzialne za regulację rozwoju naczyń w łożysku jak i funkcję śródbłonek w przebiegu ciąży. Oba łączą się z receptorem Flt-1, jak również z jego formą rozpuszczalną w surowicy sFlt-1. Krążący receptor sFlt-1 ma działanie antagonistyczne dla PIGF i VEGF poprzez łączenie się z nimi i uniemożliwienie interakcji z ich formami nierozpuszczalnymi (Flt-1). [11,25]

2.3. Interleukina-10

Wiele mediatorów zapalenia ma równocześnie pośrednie i bezpośrednie działanie proangiogenne. Sugeruje się ich znaczącą rolę w angiogenezie łożyskowej oraz w modulowaniu rozwoju PIH i IUGR indukowanego niedotlenieniem. Interleukina-10 (IL-10), jest produkowana przez makrofagi oraz limfocyty T pomocnicze i należy do głównych cytokin o działaniu przeciwzapalnym. Udowodniono, że IL-10 wspomaga inwazję trofoblastu do śródbłonek tętnic spiralnych. Podejrzewa się, że hipoksja połączona z niedoborem IL-10 bierze udział w patomechanizmie PIH i niektórych postaci hipotrofii, związanych z podwyższeniem stężeń czynników antyangiogennych oraz obumieraniem komórek śródbłonek i uszkodzeniem łożyska. IL-10 pełni istotną rolę w utrzymaniu równowagi między czynnikami pro- i antyangiogennymi w jednostce maczynopłodowej. [27,28]

Istotne znaczenie w patogenezie PIH mogą mieć reakcje odpornościowo-zapalne, wynikające z oddziaływań między leukocytami a komórkami śródbłonka naczyniowego. Mediatorami tych reakcji są cytokiny. Okazało się, że hipoksja może modyfikować wytwarzanie interleukin IL-6, IL-8 oraz IL-10 przez łożyskowe komórki trofoblastu. W przypadku PIH zwiększa wydzielanie IL-6 i IL-8, ale zmniejsza IL-10. Proces ten może być hamowany przez witaminę E, co może być wykorzystane do nowych terapii stanów przedrzucawkowych. [29-31]

Zaobserwowano zwiększoną ekspresję IL-10 w trofoblaście kosmkowym ludzkiego łożyska. Poprzez hamowanie produkcji cytokin zapalnych, makrofagów, wywiera protekcyjny wpływ na ciążę. [32]

Wykazano także działanie hamujące IL-10 na wzrost guza poprzez zmniejszenie syntezy VEGF, TNF α oraz MMP-S. Stwierdzono również jej działanie hamujące na wydzielanie VEGF w angiogenezie wywołanej niedokrwieniem. [11]

2.4. Leptyna

Jest hormonem zbudowanym u człowieka ze 167 aminokwasów. Jest produktem genu otyłości, zlokalizowanego w chromosomie 7q31.3. Hormon ten syntetyzowany jest głównie przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej, skąd ulega sekrecji do krążenia. Ekspresja leptyny stwierdzona jest w wielu narządach, ze szczególnym nasileniem w łożysku i odgrywa znaczącą rolę w regulacji procesów energetycznych i immunologicznych związanych z reprodukcją. (33)

Głównym źródłem leptyny w ciąży jest tkanka łożyskowa, a funkcją leptyny jest regulowanie poboru pokarmu i metabolizmu przez nasilenie wydatkowania energii. Badania ostatnich lat wykazały, że cytokina ta uczestniczy w procesie angiogenezy. [33,34]

W trakcie trwania ciąży fizjologicznej stężenie leptyny stale wzrasta, a jej rola pozostaje niejasna. [35]. Uważa się, że fizjologiczna hiperleptynemia poprzez indukowanie ekspresji enzymów utleniających tłuszcze, odpowiada za zwiększoną dostępność, uwalnianie i transport substratów lipidowych matki do płodu przy braku supresji jej apetytu, co wywiera korzystne działanie na bilans energetyczny w ciąży. [36,37]

Receptory dla leptyny zlokalizowane są zarówno w łożysku jak i w tkankach płodu, między innymi tkance chrzęstnej oraz kostnej, dlatego uważa się ją za regulator

procesów biochemicznych i wzrastania płodu z wyłączeniem regulacji endokrynej apetytu płodu odżywianego przezłożyskowo, niezależnie i w sposób ciągły - inaczej niż w życiu pozapłodowym. [33,34,38]

Ze względu na udział łożyska w metabolizmie leptyny, znaczenie mają patologie tego narządu. Zaobserwowano wyższe jej stężenia w surowicy krwi ciężarnych z preeklampsją w porównaniu z pacjentkami o prawidłowym przebiegu ciąży i korelację ze stopniem ciężkości choroby. [34,39-41]

2.5 Angiopoetyna-1

Angiopoetyna 1 jest proteiną zbudowaną z 498 aminokwasów, zidentyfikowaną przez Daviesa i wsp. w roku 1996 r., a jej gen znajduje się na chromosomie 8 i jego transkrypcja regulowana jest hipoksją.

Angiopoetyny należą podobnie jak VEGF do rodziny czynników wzrostu swoistych dla komórek śródbłónka. Pełnią ważną funkcję w formowaniu i utrzymaniu łożyska naczyniowego. Działają poprzez receptory o aktywności tyrozynowo-kinazowej Tie1 i Tie2 (zwane również Tec), zlokalizowane głównie na komórkach śródbłónka i niektórych komórkach progenitorowych, fibroblastach i monocytach o charakterze proangiogennym. [28,43]

Do tej pory odkryto, że z receptorem Tie2 wiążą się cztery poznane ligandy (Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4), natomiast ligand Tie2 nie został jeszcze poznany. Połączenie Ang-1 z Tie2 powoduje jego fosforylację, a to pobudza komórki śródbłónka w procesie angiogenezy. [11,42]

Ang-1 jest mediatorem w przekazywaniu sygnału między śródbłónkiem a otaczającą macierzą i mezenchymą. Ang-2 reguluje proces tworzenia się naczyń krwionośnych oraz zachowanie ich integralności przy ściśle skoordynowanej współpracy z VEGF, który promuje proliferację komórek śródbłónka naczyń, ich różnicowanie się i migrację. Ang-1 poprzez receptor Tie2 odpowiada za dojrzewania naczyń. Wrodzony brak receptora Tie1 lub Tie2 jest letalny. [42]

Angiotensyna 1 poprzez fosforylację tyrozyny komórek śródbłónka, pobudza tworzenie pęczka naczyniowego i podtrzymuje przeżycie komórek śródbłónka. Nie wpływa na ich proliferację i chemotaksję. Jej działanie wiąże się z komórkami mezenchymalnymi otaczającymi komórki śródbłónka. Nadmiar Ang-1 powoduje powstawanie liczniejszych i bardziej rozgałęzionych naczyń włosowatych. Mutacje

kinazy tyrozyny w domenie Tie2 powodują powstanie żylnych malformacji i niedobór komórek mięśni gładkich w ścianie naczyń. [43]

Ang-1 moduluje dojrzewanie naczyń w bardziej złożone i większe struktury, wpływa na spójność i stabilizację całego naczynia. Ang-1 jest aktywatorem receptora Tie-2 (agonistą), a jego antagonistą jest Ang-2, która łącząc się konkurencyjnie z Tie2, blokuje stabilizującą rolę Ang-1 prowadzi w nieobecności VEGF do regresji naczyń, a w jego obecności promuje odpowiedź angiogenną. Jednak przy dłuższym okresie ekspozycji na duże stężenia Ang-2, może wykazywać efekty analogiczne do agonisty Tie-2. Zwiększona ekspresja Ang-2 ma miejsce w angiogenezie zachodzącej w guzach nowotworowych i koreluje ze złym rokowaniem. [44,45]

Udowodniono, że do powstania prawidłowego łożyska naczyniowego niezbędne jest współdziałanie VEGF i Ang-1, a ich role w procesie angiogenezy się uzupełniają. VEGF poprzez receptor Flk-1 inicjuje migrację, proliferację i różnicowanie komórek śródbłonna, co prowadzi do tworzenia prymitywnych naczyń. Proces ten reguluje Ang-2, łącząc się konkurencyjnie z rec. Tie2. Natomiast Ang-1 promuje interakcje pomiędzy śródbłonkiem a otaczającą macierzą i mezenchymą, przez co odpowiada za przebudowę prymitywnych naczyń oraz utrzymanie i stabilizację dojrzałych naczyń. [28,46,47]

W wielu badaniach stwierdzono, że u kobiet ciężarnych w patologiach ciąży przebiegających z uszkodzeniem śródbłonnków jak preeklampsja czy hipotrofia płodu, poziom angiopoetyny 1 był dużo wyższy, a poziom angiopoetyny 2 znacząco niższy niż w grupach kontrolnych. [13,43,45,48]

3. NADCIŚNIENIE W PRZEBIEGU CIĄŻY

3.1 Wstęp

Nadciśnienie tętnicze w przebiegu ciąży występuje u około 5-10% kobiet, a u pierwiastek częstość ta wzrasta nawet do 20%. Do czynników warunkujących wystąpienie nadciśnienia tętniczego (NT) należy zaliczać uwarunkowania hormonalne, neurohormonalne, środowiskowe, nerkowe i genetyczne. Jest ono główną przyczyną zwiększonego ryzyka powikłań okołoporodowych oraz zgonów zarówno matek jak i noworodków. [49]

Istnieje wiele teorii dotyczących etiologii nadciśnienia, jak dotąd jednak nie poznano w pełni jego etiopatogenezy, szczególnie nadciśnienia indukowanego ciążą (NIC, PIH). W ostatnich badaniach pojawiło się nowe spojrzenie na nadciśnienie jako choroby wikłającej ciążę, jako efekt nieprawidłowej odpowiedzi na **czynniki proangiogenne** (AGF). [50]

Dowodzi się również spadku lub braku aktywności czynników proangiogennych w tej chorobie. Stanowi przedrzucawkowemu - jednej z postaci NIC, towarzyszy wysoki poziom rozpuszczalnego w surowicy receptora-1 VEGF – sFlt-1, który wiąże w nieaktywne kompleksy VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu) i PLGF (łożyskowy czynnik wzrostu), dwa najsilniejsze i najszerzej badane czynniki proangiogenne. [1,50-53]

W wielu badaniach nad NT w ciąży wykazano wysoki poziom krążących czynników proangiogennych, które mogą odpowiadać poprzez różne mechanizmy działania za zwiększone rozszerzenie naczyń krwionośnych, niedokrwienie i niedotlenienie tkanek. Mogą pojawiać się jako odpowiedź kompensacyjna lub przez zmniejszone oczyszczanie organizmu z substancji krążących i taki stan może rozwijać się w przebiegu preeklamsji (stan przedrzucawkowy, w skrócie PREE) z towarzyszącymi obrzękami obwodowymi, obrzękiem płuc, mikroalbuminurią i miażdżycą. [54,55]

Najbardziej znana teoria próbująca wyjaśnić NT w ciąży, wskazuje na zaburzony przepływ krwi przez łożysko jako źródło czynników mających restrykcyjny wpływ na naczynia krwionośne.

Dochodzi wtedy do zwiększonego wydzielania wolnych rodników tlenowych, które utleniają lipidy błon komórkowych, powodując zaburzenia funkcji komórek

endotelium (śródbłónka), co z kolei skutkuje dysfunkcją wielu narządów. Dochodzi wtedy do skurczu naczyń krwionośnych i uszkodzenia krążenia nerkowego, zaburzeń krzepnięcia u matki. Rozwijające się ograniczenie przepływu krwi przez łożysko może być główną przyczyną wystąpienia hipotrofii płodu (IUGR), która często towarzyszy nadciśnieniu tętniczemu. [30,54]

Pod wpływem niedotlenienia dochodzi do aktywacji śródbłonek i wydzielania czynników stymulujących angiogenezę, do których należą: najsilniejszy czynnik mitogeny i rozszerzający naczynia, regulujący przepływ maciczno-łożyskowy- VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, wydzielany przez łożysko PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu), niezbędna w prawidłowym szlaku angiogenezy, wydzielana przez komórki mezenchymalne angiopoetyna-1, jak również cytokiny Il-10 oraz leptyna. [17-18,43-44,48]

Przypuszcza się, że PIH jest następstwem zmniejszonej perfuzji łożyskowej spowodowanej brakiem przemiany tętnic spiralnych w tętnice maciczno-łożyskowe, które na skutek braku warstwy mięśniowej umożliwiają znaczne obniżenie oporu obwodowego w łożysku naczyniowym. [54,56-57]

W naszym badaniu oceniać będziemy zależność między stężeniem wybranych czynników proangiogennych a występowaniem nadciśnienia ciążowego i niektórych postaci hipotrofii.

Wykazano, że VEGF i jego receptory Flt-1 (VEGFR-1) i Flk-1 (VEGFR-2) oraz inny czynnik proangiogeny: angiopoetyna-1 i jej receptor TIE 2 stanowią kluczowy system transdukcji sygnałów odgrywający rolę w regulacji embrionalnych naczyń. [58-59]

W ciąży dochodzi do licznych zmian w układzie krążenia, który w sposób dynamiczny dostosowuje się do zmieniających się warunków w organizmie ciężarnej: zwiększenia unaczynienia, zwiększenia wielkości przepływu w narządach rodnych i łożysku, zwiększenia zapotrzebowania metabolicznego i staje się krążeniem hiperkinetycznym. Polega to na zwiększeniu objętości krwi krążącej, częstości pracy serca, jego pojemności minutowej oraz objętości wyrzutowej. [55-56].

Pod wpływem działania wielu hormonów, a głównie progesteronu, dochodzi do zmniejszenia napięcia i wzrostu podatności ścian naczyń krwionośnych, a to skutkuje już w I trymestrze spadkiem oporu obwodowego o ok. 30 %, a dalej obniżeniem wartości ciśnienia tętniczego krwi. W niepowikłanej ciąży zaistniałe zmiany hemodynamiczne powodują spadek ciśnienia tętniczego krwi skurczowego o 5-11 mm Hg, a rozkurczowego o 10-15 mm Hg. [57,60-61]

Obecność nowego w organizmie kobiety krążenia maciczno-łożyskowego jest drugim mechanizmem, decydującym nawet w 20% o zmniejszeniu całkowitego systemowego oporu naczyniowego. Proces ten warunkuje przebudowa ścian tętnic spiralnych macicy, polegająca na zaniku ich warstwy mięśniowej. Naczynia takie nie reagują na bodźce wazokonstrykcyjne, dzięki czemu zwiększa się przepływ przez łożysko wraz ze spadkiem całkowitego oporu systemowego naczyń. [62-63]

W etiopatogenezie nadciśnienia ciążowego oraz niektórych przypadkach IUGR upatruje się odmienną inwazję cytotrofoblastu do światła naczyń spiralnych w stosunku do obserwowanej w ciążach fizjologicznych. [1,13,58]

W prawidłowej ciąży w 8 tygodniu dochodzi do połączenia kosmków z tętnicami spiralnymi macicy, których średnica części doprowadzającej do przestrzeni międzykosmkowej wzrasta kilkakrotnie, tracąc mięśniówkę i zwiększając elastyczność. Proces kończy się około 18-20 tygodnia ciąży. Obecne u podstawy mikrokosmków cytotrofoblasty są zdolne (pod wpływem estrogenów i progesteronu) do różnicowania się i upodabniania do komórek doczesnej lub – w tętnicach spiralnych - do komórek śródbłonna. W nadciśnieniu ciążowym pod wpływem niedotlenienia dochodzi do zaburzeń różnicowania inwazyjności komórek syncytiotrofoblastu, a następnie upodabniania się do zastępowanych komórek śródbłonna tętnic spiralnych. [64-65]

Początkowo (8-10 tydzień ciąży), rozwój łożyska przebiega w środowisku o niskiej prężności tlenu (15-20 mmHg), która gwałtownie wzrasta do 55-60 mmHg w trakcie inwazji trofoblastu w błonę śluzową macicy ,aby w III trymestrze ciąży utrzymywać wartości do 40 mmHg. Zjawisku temu towarzyszy zmiana metabolizmu w komórkach trofoblastu z beztlenowego na tlenowy z intensywnym wykorzystaniem glukozy z krwioobiegu matki. [66-67]

Do pełnej implantacji trofoblastu niezbędna jest prawidłowa reakcja systemu immunologicznego matki. W przebiegu stanu przedrzucawkowego obserwuje się nasiloną apoptozę komórek trofoblastu, zaburzenia stężeń różnych cytokin i interleukin, a badania histopatologiczne płodów ujawniły naciekanie łożyska przez limfocyty i makrofagi. [29,68]

Aktywowane zaburzoną perfuzją łożysko produkuje substancje uszkodzające lub aktywujące śródbłonek naczyniowy (zaburzona produkcja integryn, angiopoetyny 1, VEGF), co może powodować jego obumieranie. Skutkiem uszkodzenia endotelium może być nadciśnienie, a także zaburzenie struktury i funkcji kłębuszków nerkowych (białkomocz). [14]

Czynnikiem uruchamiającym łańcuch patogenezy PIH mogą być nieprawidłowo zróżnicowane komórki trofoblastu, przedostające się do krwi obwodowej ciężarnej. Zaburzona inwazja trofoblastu powoduje wzrost ilości jego fragmentów w krążeniu kobiety ciężarnej, podczas gdy w ciąży fizjologicznej nie spotyka się ich lub w bardzo małej ilości. To właśnie te komórki mogą być odpowiedzialne za aktywację śródbłonników. Mikroosmki syncytiotrofoblastu mają zdolność hamowania proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego, co powoduje, że przyjmuje on postać plastra miodu. Dowodzi to działania uszkodzającego śródbłonki przez tkanki trofoblastu. [54,64]

Zaobserwowano również, że w ciążach powikłanych PIH we krwi matki podwyższone są stężenia wolnego DNA, zarówno płodowego jak i matczynego, pochodzącego najprawdopodobniej z umierających komórek. Poziomy obu rodzajów DNA korelowały z nasileniem stanu przedrzucawkowego. Zanim dojdzie do manifestacji objawów NIC we krwi obecny jest jedynie płodowy, krążący DNA, co sugeruje, że zaburzenia inicjujące stan przedrzucawkowy dotyczą początkowo samej jednostki płodowo-łożyskowej, a wraz z pojawieniem się objawów choroby obejmują cały organizm matki. [49,62,64]

Dotychczasowe badania wskazują wyraźnie, że podłożem stanu przedrzucawkowego mogą być zaburzenia łożyskowe, pojawiające się już we wczesnej ciąży, które prowadzą do nasilającej reakcji na obecność komórek płodowych. [6]

U kobiet z PIH obserwuje się masywne uszkodzenie śródbłonników nie tylko w łożysku, ale również w innych narządach.

W nerkach jest to tzw. endotelioza kłębuszkowa, powodująca zaburzenia filtracji. Następstwem utraty funkcji transportowej oraz ciągłości śródbłonka nerek są białkomocz oraz obrzęki. [5,7]

Uszkodzenie komórek śródbłonkowych indukuje pośrednio uwolnienie wielu substancji m.in. fibronektyny, aktywatora plazminogenu, czynnika VIII oraz cząsteczek adhezyjnych. Uszkodzone endotelium traci swoje właściwości antykoagulacyjne, w związku z czym w przebiegu PIH dochodzić może do zmian w układzie krzepnięcia. Wyraźne zaburzenia obserwuje się tylko w ciężkich postaciach choroby. Zwiększone jest tu zapotrzebowanie na czynnik krzepnięcia VIII, spada również aktywność antytrombiny III. Podobnie jak w ciążach fizjologicznych, zwiększa się wytwarzanie fibryny, ale obniża się równocześnie aktywność fibrynolityczna, co skutkuje wzrostem poziomu produktów degradacji fibrynogenu.

Z powodu uszkodzenia endotelium dochodzi również do upośledzenia regulacji napięcia naczyń krwionośnych. [69-76]

W NIC oraz w niektórych przypadkach hipotrofii płodu, wiele naczyń zaczopowanych jest przez złogi miażdżycowe oraz skupiska wypełnionych lipidami makrofagów. Zamknięcie światła naczyń blaszkami miażdżycowymi oraz zakrzepami, prowadzi do upośledzonego ukrwienia łożyska i nawet do jego zawałów. Zaburzenia krzepnięcia powodujące zamykanie światła naczyń oraz zwiększone obkurczenie łożyska naczyniowego, skutkują upośledzeniem perfuzji i ukrwienia, a to z kolei indukuje uszkodzenia w następnych naczyniach. Jest to samonapędzający się proces. [74]

Wciąż poszukuje się markerów biochemicznych nadciśnienia w przebiegu ciąży. Oznaczenie ich w trakcie implantacji trofoblastu zwiększyłoby możliwość predykcji tych zaburzeń.

3.2 Epidemiologia

Nadciśnienie tętnicze w ciąży występuje u ok 2-7 % ciężarnych w krajach rozwiniętych, natomiast w krajach uboższych częstość występowania tej patologii może być nawet trzy razy większa. W Polsce wykłó ok. 6-8% wszystkich ciąż. WHO podaje, że w krajach rozwijających się rocznie ginie z powodu powikłań NT w ciąży ok 63000 kobiet, a każdego dnia jest przyczyną zgonu ok 200 kobiet. Za wysoką śmiertelność okołoporodową kobiet w 20% odpowiada stan przedrzucawkowy. [49,77-78]

3.3 Kryteria diagnostyczne nadciśnienia tętniczego w ciąży.

Nadal obowiązuje podział wg Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego zgodny z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH) i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) z 2003 roku. ESH/ECH podtrzymały tę klasyfikację w ogłoszonych w 2007 roku wytycznych. [78-81]

Nadciśnienie tętnicze rozpoznajemy, gdy wartości ciśnienia skurczowego (SBP) przekraczają > 140 mm/Hg, a ciśnienia rozkurczowego (DBP) > 90 mm/Hg, zmierzone przynajmniej dwa razy w odstępach czterogodzinnych, aczkolwiek istotna jest także dynamika zmian ciśnienia.

Wzrost SBP o 30 mmHg i/lub DBP o 15 mmHg może sugerować rozwój nadciśnienia tętniczego u pacjentki nawet wówczas, gdy wartości BP nie spełniają jeszcze kryteriów jego rozpoznania. Rozpoznanie nadciśnienia tętniczego w ciąży może być utrudnione z powodu braku wiedzy na temat wartości BP pacjentki sprzed ciąży. W przypadku występowania jego podwyższonych wartości przed koncepcją, rozpoznać należy nadciśnienie tętnicze przewlekłe i może ono pozostać nierozpoznane w I połowie ciąży z powodu fizjologicznego spadku wartości BP w tym okresie. Aby nie przeoczyć rozwoju choroby nadciśnieniowej, należy mierzyć pacjentce ciśnienie tętnicze krwi podczas każdej wizyty kontrolnej. Aby wykluczyć nadciśnienie związane z „efektem białego fartucha” stosuje się całodobowe ambulatoryjne monitorowanie ciśnienia tętniczego (ABPM). [78]

Tabela nr 2. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według ESH/ESC .[79-80]

Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według ESH/ESC

Kategoria	Ciśnienie skurczowe (mm Hg)	Ciśnienie rozkurczowe (mm Hg)
Ciśnienie optymalne	< 120	< 80
Ciśnienie prawidłowe	120–129	80–84
Ciśnienie wysokie prawidłowe	130–139	85–89
Nadciśnienie stopień 1 (łagodne)	140–159	90–99
Nadciśnienie stopień 2 (umiarkowane)	160–179	100–109

Nadciśnienie stopień 3 (ciężkie)	≥ 180	≥ 110
Nadciśnienie izolowane skurczowe	≥ 140	< 90

W klasyfikacji amerykańskiej (JNC), ciśnienie wysokie prawidłowe zastąpiono określeniem – stan przednadciśnieniowy oraz wyszczególniono tylko 2 stopnie nadciśnienia tętniczego.[77]

Tabela nr 3. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według JNC7. [77]

Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według JNC7

Kategoria	Ciśnienie skurczowe (mmHg)	Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)
Ciśnienie prawidłowe	< 120	< 80
Stan przednadciśnieniowy	120–139	80–89
Nadciśnienie stopień 1	140–159	90–99
Nadciśnienie stopień 2	> 160	> 100

Według ACOG (Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów), uproszczony **podział nadciśnienia w ciąży** uwzględnia dwa główne objawy: nadciśnienie i białkomocz, rozróżnia nadciśnienie wywołane ciążą od współistniejącego z ciążą. [78]

Ustalono podział:

- ciążowe nadciśnienie i/lub białkomocz
- nadciśnienie ciążowe bez białkomoczu
- białkomocz ciążowy bez nadciśnienia
- nadciśnienie i białkomocz ciążowy: stan przedrzucawkowy łagodny i ciężki
- nadciśnienie i białkomocz ciążowy oraz drgawki: rzucawka
- przewlekłe nadciśnienie i przewlekłe choroby nerek
- przewlekłe nadciśnienie z nawracającym stanem przedrzucawkowym lub rzucawką
- ciążowe nadciśnienie przejściowe lub białkomocz u kobiet w badaniach przed 20 tygodniem ciąży, a które nie chorowały na przewlekłe nadciśnienie i przewlekłe choroby nerek

3.3.1. Nadciśnienie ciążowe (PIH)

Ciążowym nazywamy nadciśnienie rozwijające się po 20 tygodniu ciąży, a w przypadku zaśnięcia gronistego wcześniej i wracające do normy do 6 tygodni po porodzie.

Jest jednym z najpoważniejszych powikłań ciąży i jest związane ze zwiększoną śmiertelnością kobiet oraz płodów. [81]

Rozpoznajemy przy wartościach RR > 140 / 90 mm Hg , bez białkomoczu. [18-20]

Występuje u : ok 6 - 17% pierwsiastek/pierworódek

ok 2 - 4 % wieloródek

3.3.2. Nadciśnienie przewlekłe

Przewlekłym nazywamy nadciśnienie istniejące przed ciążą lub pojawiające się przed 20 tygodniem ciąży i utrzymujące się po porożu, czyli ponad 6 tygodni od porodu, z lub bez białkomoczu.

Dzielimy je na:

Łagodne - gdy RR rozkurczowe < 110 mm Hg

Ciężkie - gdy RR rozkurczowe > 110 mm Hg

Występuje u : ok 0,6- 2 % kobiet w wieku 18-29 lat

ok 4.6- 22,3 % kobiet w wieku 30-39 lat

3.3.3. Nadciśnienie tętnicze późne (przemijające)

Późnym nazywamy nadciśnienie, pojawiające się po 37 tygodniu ciąży lub w pierwszej dobie po porodzie, bez rozpoznanego wcześniej nadciśnienia oraz bez białkomoczu i świadczy często o rozwijającym się nadciśnieniu pierwotnym. Należy je potwierdzić po 6 (inne źródła podają po 12), tygodniach od porodu. [77-81]

3.3.4. Stan przedrzucawkowy (preeclampsia)

Stanem przedrzucawkowym nazywamy nadciśnienie, rozwijające się u ciężarnej po 20 tyg. trwania ciąży i przemijające w połogu, czyli utrzymujące się do maksymalnie 6 tygodni po porodzie.

Charakterystyczne dla tej patologii jest występowanie białkomoczu > 500 mg/ dobę (wg NHBPEP > 300 mg/ dobę), ze współistniejącym nadciśnieniem > 140/90 mmHg (MAP > 106 mm Hg). [69-70].

Jest to zespół patologii, które wiążą się z obecnością łożyska w organizmie kobiety. W prawidłowo rozwijającej się ciąży we wczesnych jej etapach dochodzi do fizjologicznego przekształcenia tętnic spiralnych, które posiadają dobrze rozwiniętą warstwę mięśniową w swoich ścianach, w naczynia o szerokich i wiotkich ścianach, nie reagujących na substancje wazoaktywne. W patologiach związanych z nadciśnieniem ciążowym, dochodzi do zaburzenia tych przemian naczyniowych, co skutkuje wzrostem, zamiast spadkiem oporu naczyniowego w krążeniu maciczo-łożyskowym, jako nowego kompartmentu układu krążenia ciężarnej.

Sugeruje się, że może to być związane z nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną organizmu matki na obcy antygen łożyskowy z grupy HLA-G, a to powoduje niewykształcenie pojemnościowych tętnic łożyska poprzez nieprawidłową inwazję komórek trofoblastu w ścianę tętnic spiralnych. Dochodzi do niedotlenienia łożyska, lokalnej produkcji wolnych rodników i substancji wazoaktywnych. Prowadzi to do stresu oksydacyjnego w organizmie i aktywacji śródbłonek poprzez peroksydację lipidów, migrację leukocytów, doprowadzając

do ich dysfunkcji. Śródbłonek kontroluje napięcie ścian naczyń, perfuzję tkanek i odgrywa podstawową rolę w regulacji ciśnienia krwi, na drodze utrzymywania właściwego oporu obwodowego. Odbywa się to dzięki zdolności śródbłonek do produkcji tlenku azotu, który ma silne właściwości naczyniorozszerzające. W obrazie stanu przedrzucawkowego dochodzi do zaburzenia tego procesu, co prowadzi do niedostatecznej produkcji tlenku azotu i uwrażliwienia naczyń na inne substancje wazokonstrykcyjne, jak endotelina, tromboksan A, angiotensyna II, a dalej do zmniejszenia przepływu przez tkanki i narządy i ich niedotlenienia. [49-50,65-69,82]

Etiologia stanu przedrzucawkowego wciąż nie została do końca poznana. Za główną przyczynę uznaje się nieadekwatną adaptację organizmu do ciąży, a dokładniej nieprawidłowym wykształcenie krążenia maciczno-łożyskowego. Znamienne dla tej choroby jest zaburzenie równowagi w układzie krzepnięcia. [82-83]

Uszkodzenie komórek śródbłonkowych indukuje pośrednio uwolnienie wielu substancji m.in. fibronektyny, aktywatora plazminogenu, czynnika VIII oraz cząsteczek adhezyjnych. Uszkodzone endotelium traci swoje właściwości antykoagulacyjne, w związku, z czym w przebiegu PIH dochodzić może do zmian w układzie krzepnięcia. Wyraźne zaburzenia obserwuje się tylko w ciężkich postaciach choroby. Zwiększone jest tu zapotrzebowanie na czynnik krzepnięcia VIII, spada również aktywność antytrombiny III. Podobnie jak w ciążach fizjologicznych, zwiększa się wytwarzanie fibryny, ale obniża się równocześnie aktywność fibrynolityczna, co skutkuje wzrostem poziomu produktów degradacji fibrynogenu.

W procesie tym uruchomiona zostaje kaskada krzepnięcia, dochodzi do spadku liczby płytek krwi i rozwoju skrajnego zespołu wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC). [13]

Dochodzi do wielonarządowej niewydolności z nieodwracalnym uszkodzeniem łożyska, wątroby, nerek i mózgu. [28-29,32-37,61].

Przewlekłe niedokrwienie **łożyska** w przebiegu stanu przedrzucawkowego stanowi zagrożenie dla rozwijającego się wewnątrzmacicznie dziecka. Może odpowiadać za wystąpienie porodu przedwczesnego i wcześniactwo dziecka, spowodować przedwczesne oddzielenie łożyska. Odpowiada za rozwój hipotrofii płodu, a może nawet spowodować jego wewnątrzmaciczny zgon. Dzieci z niską masą

urodzeniową mają zwiększoną chorobowość z niewydolnością oddechową oraz wylewami śródczaszkowymi. [71-76,84-85]

W **wątrobie** dochodzi na skutek skurczu naczyń, do tworzenia rozsianych zakrzepów, niedotlenienia, wylewów podtorebkowych, włóknienia tkanki, martwicy hepatocytów z pęknięciem narządu wącznie. [86]

W **nerkach** przez niedokrwienie obniża się przesączanie kłębuszkowe (GFR), które w fizjologicznej ciąży wzrasta. Następstwem endoteliozy kłębuszkowej, powodującej zaburzenia filtracji, utratę funkcji transportowej oraz ciągłości śródbłona nerek są białkomocz oraz obrzęki.

Stężenie kreatyniny może pozostać w granicach normy. Niedokrwienne uszkodzenie cewek nerkowych może spowodować wystąpienie hiperurikemii i hiperkalciurii. [58,87]

Zmiany w **OUN** mogą doprowadzić do objawowej rzucawki, a w badaniach obrazowych, do mających miejsce głównie w okolicy potylicznej kory: do obrzęku mózgu, wybroczyn i krwotoków oraz mikrozawałów. [71-72,75,88-89]

CZYNNIKI RYZYKA rozwoju stanu przedrzucawkowego wciąż nie są jeszcze dobrze poznane.

Częściej występuje on:

- * u kobiet z nadciśnieniem przewlekłym- największe ryzyko,
- * u kobiet rasy czarnej.
- * u pierwiastek,
- * u kobiet z wywiadem preeklampsii w poprzednich ciążach,
- * u młodych ciężarnych i rzadkie ciążę (przerwa między ciążami dłuższa niż 10 lat) - krótki okres współżycia może potwierdzać hipotezę o roli czynników immunologicznych w etiopatogenezie preeklampsii,
- * u kobiet poniżej 18 roku życia- dotyczy głównie pierwiastek oraz powyżej 40 roku życia- u wieloródek
- * gdy ojciec dziecka, posiada dzieci z ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym- również potwierdza teorię immunologiczną tej patologii,
- * u otyłych matek (wskaźnik BMI powyżej 35 kg/m²)
- * u kobiet z cukrzycą, hiperinsulinemią - w 50% koreluje z PIH [90]
- * w ciążach mnogich, zwłaszcza z dziećmi różnych płci,
- * w ciążach powikłanych wielowodziem,

- * u kobiet z chorobami nerek,
- * u kobiet z nadkrzepliwością,
- * w przebiegu stanów zapalnych m.in. układu moczowego,
- * w przebiegu infekcji *Helicobacter pylori*, [91]
- * u kobiet z podwyższonym poziomem cholesterolu w środkowym okresie ciąży,
- * w ciążach będących następstwem donacji oocytów,
- * w ciążach z wysoko osadzonym łożyskiem w macicy,

Inne czynniki predysponujące do rozwoju PIH:

- * obecność przeciwciał antyfosfolipidowych
- * czynnik genetyczny: PIH u matki w wywiadzie
- * aberracje chromosomowe u płodów (triploidia i trisomia 13 pary chromosomów)
- * nikotynizm – pogarsza już istniejący PIH, natomiast stwierdzono rzadsze występowanie PIH u kobiet palących w stosunku do niepalących
- * stosowanie prezerwatywy: częsta ekspozycja przyszłej matki na antygen HLA nasienia przyszłego ojca ma działanie ochronne przez wprowadzenie jej układu odpornościowego w stan tolerancji immunologicznej. [51-53,92-94]

Przebieg ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym bywa dynamiczny, trudny do przewidzenia i bardzo zróżnicowany: od stanu prawie fizjologicznego do ciężkich postaci, mogących się zakończyć zgonem ciężarnej i / lub dziecka.

PODZIAŁ preeclampsji, jaki wprowadzono dla ułatwienia postępowania w przebiegu stanu przedrzucawkowego, dzieli go na:

- * postać **łagodną** - rozwija się około 38 tygodnia ciąży i przebiega bez poważniejszych następstw;
- * **postać umiarkowaną** - gdy SBP $\geq 140 < 160$ mmHg, a DBP $\geq 90 < 110$ mmHg, i białkomocz nie przekracza 3 g/dobę;
- * **postać ciężką** - gdy wartości tych parametrów są wyższe, rozwija się przed 28 tygodniem ciąży i źle rokuje;

Zespół **HELLP** i rzucawkę część autorów uznaje za szczególne postaci stanu przedrzucawkowego. [71,75,92],

DIAGNOSTYKA preeclampsji [95]

Stan przedrzucawkowy

- nadciśnienie (skurczowe > 140 , rozkurczowe > 90), występujące po 20. Tygodniu ciąży
- białkomocz ($> 0,3$ g/dobę)

Ciężki stan przedrzucawkowy

- ciężkie nadciśnienie (skurczowe 160–180, rozkurczowe > 110)
- zaburzenia nerkowe: białkomocz (> 5 g/dobę), podwyższony poziom kreatyniny ($> 1,2$ mg/dl), oliguria (< 500 ml/dobę)
- zaburzenia neurologiczne: ból głowy, zaburzenia widzenia
- zaburzenia hematologiczne: małopłytkowość (PLT < 100 G/l), mikroangiopatywna niedokrwistość hemolityczna
- zaburzenia funkcji wątroby: podwyższony poziom aminotransferaz (10–20-krotny), ból w nadbrzuszu
- zaburzenia u płodu: zahamowanie wzrostu

Rzucawka

- drgawki u kobiet, u których występuje stan przedrzucawkowy [69,96-97]

U każdej ciężarnej ze stanem przedrzucawkowym może dojść do nagłego pogorszenia jej stanu zdrowia, dlatego ważne jest ścisłe monitorowanie chorej z preeclampsją oraz edukowanie jej w zakresie samokontroli BP i wczesnego rozpoznawania niepokojących objawów.

W wielu publikacjach wyróżnia się stan **przedrzucawkowy wczesny** (Early Preclampsia - EPE) i **późny** (Late preclampsia – LPE). Wczesny stan przedrzucawkowy to taki, którego wystąpienie było powodem zakończenia ciąży przed 34 t.c. [71-72,92,98-99]

3.3.5. Zespół HELLP (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)

Jest to zespół objawów występujący w 0.2-0.6 % wszystkich ciąż, wklajający 4-12 % ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym i rzucawką, manifestujący się :

- * śródnaczyniową hemolizą erytrocytów,

- * uszkodzeniem wątroby ze wzrostem jej enzymów (Alat, Aspat),
- * zmniejszeniem liczby płytek krwi. [69,71,98]

Największe ryzyko wystąpienia zespołu HELLP zachodzi w III trymestrze ciąży (69 %) oraz do 7 dni od porodu (31%). U 15% ciężarnych z zespołem HELLP nie stwierdzono ani proteinurii ani podwyższonych wartości BP.

Gorzej rokują ciężarne z rozwiniętym zespołem przed 28 tygodniem ciąży.

Blisko 1/3 przypadków tego zespołu ujawnia dopiero po porodzie. [69,100]

Na drodze przedstawionych w stanie przedrzucawkowym mechanizmów, w zespole HELLP dochodzi do obkurczenia łożyska naczyniowego, mechanicznego uszkodzenia erytrocytów i wskutek wewnątrznaczyniowego wykrzepiania do spadku liczby płytek. Powstające w naczyniach wątroby rozsiane zakrzepy, powodują jej uszkodzenie, co uznaje się za najbardziej charakterystyczne dla tego zespołu i może być różnie nasilone. [99-101]

Wszystkim pacjentkom z HELLP zagraża wystąpienie pełnoobjawowego zespołu wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC) - występuje u ok 20%, a w 84% przypadków rozwija się ostra niewydolność nerek.

Wczesne odróżnienie zespołu HELLP od stanu przedrzucawkowego, szczególnie

jego ciężkiej postaci, jest utrudnione z powodu niespecyficznych objawów klinicznych i laboratoryjnych obu chorób. Pacjentki z zespołem HELLP wymagają często opieki wielospecjalistycznej, nierzadko w oddziale intensywnej terapii. [95,97,100-105]

4. HIPOTROFIA PŁODU

4.1 Wstęp

Hipotrofia płodu jest częstym powikłaniem związanym z ciążą rozpoznawanym w momencie, gdy dwukrotnie wykonane pomiary płodu w czasie ciąży wykazują zbyt wolne tempo wzrastania i / lub masa ciała płodu mieści się poniżej 10 percentyla w stosunku do wieku płodowego. Obecnie ocenia się, że około 30% noworodków urodzonych przedwcześnie drogami natury ma masę ciała poniżej 10 percentyla. Znanych jest wiele czynników ryzyka tego powikłania, jednakże nadal często nie udaje się określić jego etiologii. Rozwój hipotrofii może wynikać ze schorzeń dotyczących samego płodu, stanu zdrowia matki, a także funkcji łożyska. Nieprawidłowości dotyczące płodu (zaburzenia chromosomalne, wady anatomiczne), choroby matki (cukrzyca, nadciśnienie, choroby zakaźne), styl życia (palenie papierosów, spożywanie alkoholu), a także niewydolność łożyska mogą stanowić przyczynę wystąpienia tego powikłania. Za istotne uważa się również czynniki genetyczne, które mogą mieć wpływ na zwiększoną predyspozycję do występowania hipotrofii. Patomechanizm opóźnienia wzrastania wewnątrzmacicznego płodu - w skrócie **IUGR**, ma charakter złożony i w dalszym ciągu jest przedmiotem badań. [106-108]

Uważa się, że jedną z możliwych przyczyn stanowić mogą zaburzenia łożyskowej angiogenezy. [109]

W 1961 roku Warkany i wsp. wprowadzili pojęcie wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu (IUGR- intrauterine growth retardation) w odniesieniu do noworodków donoszonych z niską masą urodzeniową, spowodowaną najczęściej przewlekłą niewydolnością łożyska. [110]

IUGR, czyli wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu jest głównym czynnikiem ryzyka umieralności okołoporodowej i zachorowalności noworodków. IUGR definiuje się jako wzrost płodu poniżej jego wewnątrzmacicznego potencjału wzrastania. Szacuje się, że jest związany ze śmiercią ok 60% z 4 mln noworodków rocznie, a zaburzenie to dotyczy 3-10% wszystkich ciąż. [111]

Hipotrofia- zamiennie stosowany termin IUGR, jest istotnym problemem klinicznym wiążącym się oprócz umieralności okołoporodowej noworodków z ich zwiększoną zachorowalnością gorszym rozwojem umysłowym i fizycznym.

Na masę urodzeniową mają wpływ również: wzrost i masa ciężarnej, rozrodczość, rasa i płeć noworodka. [112]

Wzrastanie płodu w okresie prenatalnym zależy w głównej mierze od funkcjonowania łożyska odpowiedzialnego za dostarczanie mu tlenu oraz substancji odżywczych. Niedobór substancji budulcowych doprowadza do nieprawidłowej masy płodu oraz zmiany ekspresji genów determinujących procesy metaboliczne. [111,113-114]

4.2 Definicja

W środowisku perinatologów istnieje wiele kontrowersji i dyskusji odnośnie kryteriów w rozpoznawaniu ograniczonego wzrastania płodu. W większości opiera się ono na centylowym rozkładzie masy ciała danej populacji, z przyjęciem za normę średnią masę ciała $\pm$ dwa odchylenia standardowe. [114,115,116]

Ograniczenie wzrastania płodu jest najczęściej rozpoznawane, jako:

- niska masa urodzeniowa LBW (*low birth weight*) z kryterium masy noworodka poniżej 2500 g (2500g odpowiada 10 centylowi w 37 tygodniu ciąży), niezależnie od wieku ciążowego, z wyodrębnieniem VLBW (*very low birth weight*) i masą poniżej 1500 g oraz ELBW (*extremely low birth weight*) i masą poniżej 1000 g; [112,117-118]
- płody i noworodki określane jako małe w stosunku do wieku ciążowego SGA (*small for gestational age*), wykazujące niedobór masy ciała w stosunku do spodziewanej w danym tygodniu ciąży, dla danej populacji. Za hipotrofię płodu przyjmuje się masę ciała płodu poniżej 10 centyla, a ciężkie IUGR przy masie płodu poniżej 3 centyla dla danego wieku ciążowego).

Definicja LBW nie wyodrębnia grupy noworodków o masie powyżej 2500 g i dotkniętych IUGR. [119-120]

Podział noworodków wg kryterium masy urodzeniowej dziecka:

- o odpowiedniej do wieku ciążowego (AGA- *appropriate for gestational age*),
- małej w stosunku do wieku ciążowego (SGA- *small for gestational age*),
- dużej w stosunku do wieku ciążowego (LGA- *large for gestational age*).

Przyjmuje się najczęściej, że noworodki SGA mają masę ciała poniżej 10 percentyla w stosunku do danego wieku ciążowego. Inne kryteria przyjmują masę poniżej 3 lub 5 percentyla lub 2 odchylenia standardowe poniżej średniej masy urodzeniowej danej populacji.

Wszystkie te kryteria oparte na danych statystycznych, bywają mniej przydatne klinicznie i są powodem nierozpoznania patologii IUGR. [121]

Zdarza się, bowiem, że płód pomimo ciężkiej hipotrofii, dzięki znacznemu, genetycznie zaprogramowanemu potencjałowi wzrostu, mieści się powyżej 5 percentyla danej populacji. [122-123]

Większość badaczy uznaje, że SGA jest markerem IUGR często stosowanym zamiennie, chociaż nie zawsze są identyczne. [121]

IUGR to patologiczny proces prowadzący do wewnątrzmacicznego ograniczenia jego wzrostu, podczas gdy SGA odnosi się do noworodków o małej masie urodzeniowej poniżej 10 percentyla i może nie mieć cech hipotrofii.

Analogicznie: noworodki AGA z prawidłową masą urodzeniową powyżej 10 percentyla mogą wykazywać cechy hipotrofii typu zaburzenia dynamiki wzrastania w kolejnych pomiarach ultrasonograficznych. [124]

Klasyfikacja IUGR opiera się na symetrii ciała płodu, wynikającej z działania na niego różnych czynników wywołujących hipotrofię płodu i wynika z twierdzenia Winnicka o trójfazowym rozwoju organów płodu i łożyska:

- 1) faza hiperplazji- zwiększenia się liczby komórek,
- 2) faza hipertrofii- wzrostu komórek,
- 3) faza mieszana- występowanie obu tych faz równocześnie. [112,123-124]

Wystąpienie określonego typu IUGR zależy od momentu działania na płód danego czynnika patologicznego:

I typ symetryczny: najczęściej są to wady rozwojowe z IUGR przy prawidłowej wielkości łożyska i charakteryzuje się proporcjonalnym (symetrycznym), zmniejszeniem wszystkich wymiarów ciała, narządów płodu i noworodka, jako skutek mniejszego potencjału wzrostu komórek zdeterminowanego przez czynniki genetyczne, wrodzone choroby metaboliczne, najczęściej aberracje chromosomalne dziedziczne lub wrodzone.

Przyczyną mogą być również czynniki szkodliwe, zaburzające prawidłowe podziały komórkowe po zakończeniu organogenezy, tj po 8 tygodniu od zapłodnienia (wcześniej między 3 a 8 tygodniem ciąży – wady rozwojowe), np. promieniowanie jonizujące, alkohol, niektóre leki, szkodliwe czynniki chemiczne oraz wczesne zakażenia wewnątrzmaciczne, szczególnie wirusowe, np. CMV.

Istotne jest współlistnienie hipotrofii symetrycznej z wadami rozwojowymi (10-20%).

II typ asymetryczny: 70-80% wszystkich przypadków hipotrofii. Najczęściej stwierdza się niską masę urodzeniową przy względnie prawidłowym obwodzie główki oraz długości ciała noworodka i rozpoczyna się zwykle pod koniec II lub na początku III trymestru ciąży. Ten typ hipotrofii wywołany jest głównie niewydolnością maciczno-łożyskową i stwierdza się małe łożysko. W sytuacji przewlekłej należy uznać to za mechanizm adaptacyjny. Przyczyną pierwotną są często choroby kobiety ciężarnej. Noworodek na dużą głowę, zapadnięty brzuch i brak tkanki podskórnej. Typ ten występuje w warunkach hipoksemii oraz przy niedoborze pożywienia. Niesymetryczny IUGR oznacza spadek dostaw macicznych do łożyska – wzrost oporu w tętnicach macicznych w badaniu dopplerowskim już w II trymestrze, lub zmniejszenie przenoszenia składników odżywczych przez łożysko do płodu - mniejsze łożysko przy zachowaniu prawidłowego ukrwienia mózgu i serca (brain sparing effect), a zmianach w narządach mięsnych: wątroba, śledziona.

Do prawidłowego wzrostu wewnątrzmacicznego płód potrzebuje stałego zaopatrzenia w składniki odżywcze i tlen, dlatego przyczyną hipotrofii asymetrycznej są:

- choroby nerek z proteinurią (utrata białek i nadciśnienie tętnicze)
- zespół złego wchłaniania
- przewlekłe zapalenie trzustki
- wrzodziejące zapalenia jelita grubego
- zaburzenia w zakresie odżywiania i oddychania ciężarnej
- zaburzenia krążenia: nadciśnienie tętnicze
- zaburzenia transportu łożyskowego, którego niniejsze badanie będzie dotyczyć.

[125]

Łožysko rozwijające się w warunkach istniejącego nadciśnienia charakteryzuje się stwardnieniem ścian tętnic spiralnych o typie hiperblastycznym. Dlatego ważna jest normalizacja ciśnienia tętniczego w czasie pierwszej połowy ciąży (czasie rozwoju łożyska). Rozpoczęcie leczenia NT w drugiej połowie ciąży w niewielkim stopniu

pozwała zapobiec hipotrofii, a zbyt intensywne leczenie NT pod koniec ciąży jest niebezpieczne dla płodu.[5,6,126]

Stwierdzono, że NT oraz proteinuria występujące osobno, powodują dwukrotny wzrost ryzyka hipotrofii. Natomiast NT z proteinurią występujące łącznie (stan przedrzucawkowy) - ośmiokrotnie.

Również w przypadku cukrzycy i tocznia układowego zmiany naczyniowe są głównym czynnikiem prowadzącym do hipotrofii płodu. Dobrym wskaźnikiem prognostycznym hipotrofii u płodu są tu retinopatia i nefropatia. [127]

Istotnym czynnikiem wpływającym na przepływ substratów do płodu oraz jego wzrost jest wielkość i wydajność łożyska. Istnieje korelacja między masą płodu i łożyska. Jednym z czynników obniżających rozwój i wielkość łożyska jest niedożywienie matki, które bardziej wpływa na rozwój łożyska niż na masę płodu. Wadliwe przenoszenie przez mniejsze łożysko wywołane jest również przez zmiany histologiczne, jak np. zgrubienie błony podstawnej i końcowych kosmków naczyniowych oraz zmiany w błonie mikrokosmkowej, połączone ze znacznym ograniczeniem powierzchni wymiany na poziomie kosmków peryferyjnych. Zmiany te charakteryzują się zwiększeniem gęstości powierzchni mikrokosmkowej, a zmniejszeniem przestrzeni międzymikrokosmkowej, mogące być adaptacją do redukcji powierzchni łożyska.

Mechanizm powstawania hipotrofii płodu w czasie trwania NIC jest podobny jak w wypadku przewlekłych chorób nerek oraz nadciśnienia przewlekłego.[19,48]

Ryzyko hipotrofii w ciąży bliźniaczej jest pięciokrotnie wyższe niż w ciąży pojedynczej i występuje najczęściej po 34 tygodniu ciąży, gdy łączna masa płodów przekracza 3000g, tj masę dla której krążenie maciczne zdrowej kobiety nie jest w stanie zaopatrzyć w składniki odżywcze oba płody. W ciążach trzy- i więcej płodowych zahamowanie wzrostu następuje jeszcze wcześniej.

Te dwa rodzaje ograniczenia wzrastania płodu odzwierciedlają dwa różne mechanizmy patofizjologiczne.

W I typie hipotrofii wzrost jest zmniejszony od wczesnego okresu ciąży i utrzymywany jest przez cały okres jej trwania. W II typie hipotrofii zahamowanie pojawia się w drugim trymestrze i za taki przebieg wzrastania płodu odpowiedzialna jest niewydolność maciczno-łożyskowa. [128-130]

4.3 Rozpoznanie

Aby rozpoznać nieprawidłowe wzrastanie płodu, bardzo istotne jest ustalenie dokładnego czasu trwania ciąży, co możliwe jest jedynie wykonując badania ultrasonograficzne w pierwszym trymestrze ciąży. Jedynie na podstawie prawidłowo wykonanego pomiaru długości siedzeniowo-ciemieniowej płodu (CRL crown-rump-length) możliwa jest precyzyjna ocena wieku ciążowego, a błąd metody wynosi jedynie 4-7 dni. [127]

W późniejszym przebiegu ciąży na wielkość płodu mają wpływ, oprócz wieku ciążowego, również inne czynniki modulujące jego wzrastanie. [131-133]

4.3.1 Biometryczne wskaźniki IUGR

IUGR jest procesem dynamicznym i żeby go rozpoznać, należy wykonać pomiary biometryczne płodu, co najmniej dwukrotnie w 2-3-tygodniowych odstępach czasu. Pojedyncze badanie usg nie przedstawia procesu wzrastania, na podstawie którego stawiane jest rozpoznanie. Brana jest pod uwagę jedynie zmiana parametrów wzrastania płodu, a nie jego masa urodzeniowa lub inne jeszcze parametry badania. Masa urodzeniowa wynika często z zaburzeń związanych z porodem przedwczesnym, natomiast prenatalna biometria płodu reprezentuje jego fizjologiczny wzrost i jest bardziej obiektywna porównawczo. [134-136]

Zalecane biometryczne wskaźniki ultrasonograficzne, które pozwalają na obliczenie szacunkowej masy płodu (EFW), to: obwód głowy (HC), obwód brzucha (AC) i długość kości udowej (FL). Szacunkowa masa płodu wraz z AC jest najbardziej odpowiednim wskaźnikiem dla badań przesiewowych. Formuła Hadlocka EFW z trzema wskaźnikami (HC, AC i FL) jest idealna do wykonywania tych pomiarów, natomiast raport ultrasonograficzny musi określać percentyl EFW. Niezbędna jest weryfikacja daty poczęcia opartej na zmierzeniu długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (CRL) między 11 a 14 tygodniem ciąży. [136-137]

W różnicowaniu hiportofii asymetrycznej od symetrycznej przydatny jest parametr obliczany w trakcie badania ultrasonograficznego, mianowicie stosunek HC/AC, który jest stały w IUGR symetrycznym, a podwyższony w IUGR asymetrycznym. [128-130]

4.3.2 Dopplerowskie wskaźniki IUGR

W roku 1980 roku Eik-Nes i wsp., a rok później Gill i wsp. opublikowali pionierskie badania przepływów dopplerowskich w wewnątrzbrzuszej części żyły pępowinowej [138].

Wprowadzenie rutynowych badań dopplerowskich przepływu krwi w naczyniach pępowinowych zmniejszyło odsetek obumarć płodów o około 50%, co zaobserwowali Gudmundsson i Dubiel [139].

Początkowo analizie podlegały jedynie przepływy w naczyniach tętniczych, głównie w tętnicach pępowinowych płodu. W późniejszym okresie wprowadzono do analiz naukowych część żylną układu krążenia płodu, szczególnie w diagnostyce płodu w chorobach z kwasicią i niedotlenieniem. [140-141]

Pierwsza praca, w której oceniano przepływ w przewodzie żylnym płodu DV (ductus venosus), opublikował Kiserund i wsp. w 1991 roku. [142]

Badanie przepływów dopplerowskich w naczyniach płodu pozwala na szybką i nieinwazyjną ocenę stanu płodu, a analiza ich spektrum pozwala wyprzedzić pojawienie się objawów zagrożenia życia płodu i umożliwia wczesne podjęcie decyzji o bezpiecznym zakończeniu ciąży. [143]

Obecnie badacze stosują ocenę przepływów dopplerowskich zarówno krążenia tętniczego jak i żylnego. [144-146]

Metoda dopplerowska jest przydatna szczególnie w identyfikacji tych przypadków IUGR, w których rozwinie się zagrożenie okołoporodowe.

A.

Ważnym parametrem w wykrywaniu płodów zagrożonych wysokim stopniem śmiertelności okołoporodowej jest wskaźnik pulsacji tętnic pępowinowych UA, które wykazują znaczne powiązanie z pH krwi i stężeniem mleczanów, szczególnie przydatne w diagnozowaniu i ocenie IUGR.

Patologiczne zjawisko nieobecnego lub odwróconego przepływu późnorozkurczowego w tym naczyniu wiąże się z ostrym niedotlenieniem płodu i często bezpośrednio poprzedza wystąpienie patologicznych cech zapisu kardiograficznego [146]. Najczęściej występuje w przypadku ciąż powikłanych nadciśnieniem tętniczym i wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu. Jego stwierdzenie wiąże się

z większą częstością powikłań okresu noworodkowego (np. krwawienia wewnątrzczaszkowe).

Równie ważnym parametrem jest wskaźnik oporów tętnicy pępowinowej, którego wartość tylko nieznacznie maleje wraz z rozwojem ciąży. Wartość RI $>0,65$ bardzo często towarzyszy IUGR.

[146-149]

B.

Drugim naczyniem ważnym w diagnostyce i monitorowaniu IUGR jest badanie fali dopplerowskiej przepływu w **przewodzie żylnym płodu DV** (ductus venosus).

Przewód żylny jest szczególnym naczyniem, które odpowiada za adaptację krążenia płodu do życia wewnątrzmacicznego. Odpowiada za dostarczanie jak największej ilości tlenu z żyły pępowinowej do górnej części ciała dziecka, w tym mózgu, z pominięciem sinusoid wątrobowych.

Bierze swój początek na tylnodolnej powierzchni wątroby z połączenia lewej żyły pępowinowej z lewą gałęzią żyły wrotnej, a kończy się wpadając do żyły głównej dolnej.

W obrębie przewodu żylnego działa mechanizm regulacyjny podobny do zwieracza, ograniczający nadmierny powrót żylny podczas skurczu mięśnia macicy matki. [154]

Zmniejszenie, brak lub odwrócona fala A może przedstawiać osłabienie mięśnia sercowego płodu i wzrost późnorozkurczowego ciśnienia komorowego, wynikające ze wzrostu obciążenia następczego prawej komory. Wszystkie trzy nieprawidłowe fale zostały zaobserwowane u płodów z IUGR i wiązały się ze zwiększoną śmiertelnością noworodków.

C.

Z kolei w badaniu dopplerowskim zmiany przepływu krwi w **naczyniach macicznych** (tętnice łukowate), zostały wykazane już w drugim trymestrze w ciążach związanych z NT, białkomoczem lub podejrzeniem płodowego upośledzenia wzrostu.

W tych powikłanych ciążach komórki trofoblastu nie wnikały do błony wewnętrznej i mięśniówki macicznych tętnic spiralnych, co daje brak obserwowanego

spadku wskaźników oporu macicznego. To wniknięcie odbywa się do 20 tygodnia ciąży, dlatego spadek wskaźników oporności obserwowany jest między 16 a 20 tygodniem ciąży i obrazuje się zanikaniem wcięcia wczesnorozkurczowego (notch) w obrazowaniu przepływu w obu tętnicach macicznych w późnym drugim i trzecim trymestrze, co zostało wykorzystane do identyfikacji nieprawidłowego krążenia macicy w czasie ciąży. Występowanie zjawiska notch w tętnicach macicznych może utrzymywać się do około 26 tygodnia ciąży o prawidłowym przebiegu. Obecność wcięcia wczesnoskurczowego po tym terminie wiązana jest z występowaniem wielu powikłań, w tym IUGR u płodu. [155-157]

W celu zidentyfikowania nieprawidłowego krążenia w macicy, klinicyści powinni również brać pod uwagę PI, którego wartość > 95 percentyla dla danego wieku ciążowego uważa się za nieprawidłowy. [156]

D.

Obszerna literatura naukowa donosi o znaczeniu badania przepływu krwi w **krążeniu mózgowym** płodu w diagnostyce chorób w ciąży, w tym IUGR , PIH, chorobie hemolitycznej oraz innych chorób przebiegających z niedotlenieniem płodu. [158-159]

Oceny krążenia mózgowego dokonuje się na podstawie analizy przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu MCA (Middle Cerebral Artery) [160]

MCA zajmuje szczególne miejsce w ocenie płodowych przepływów mózgowych. Jest naczyniem łatwo dostępnym w badaniu, powtarzalnym w pomiarach oraz o wysokiej czułości w ocenie zjawiska „brain-sparing effect”, dlatego nazywane jest naczyniem pierwszego rzutu.

W analizie przepływu dopplerowskiego MCA bierze się pod uwagę wskaźnik oporu RI, wskaźnik pulsacji PI , maksymalną prędkość skurczową PSV oraz kształt fali przepływu. [161-164]

Najwyższe wartości PI przypadają na okres między 25-30 tygodniem ciąży i spadają w III trymestrze, co daje obraz krzywej referencji PI MCA w kształcie paraboli. [163,165]

Y. Hsieh opisał zależność wskaźnika oporu MCA od czasu trwania ciąży, gdzie wzrost przypadła między 20-30 tygodniem, a następnie jego systematyczne obniżanie. [166]

Bardziej dokładnym wskaźnikiem stosowanym w diagnostyce patologii ciąży jest opracowany na pomiarze indeksu PI **wskaźnik mózgowo-pępowinowy CPR** (Cerebral Placental Ratio). Za normę przyjęto wartości $> 1,08$. [167-169]

Jest on zmienny w czasie trwania ciąży, nie wykazuje wartości stałych, a w przypadkach ciężkiego niedotlenienia dochodzi do uszkodzenia mechanizmu autoregulacji, co powoduje uzyskanie pozornie prawidłowych parametrów przepływu krwi. [170-171]

Turan i wsp. dokonali analizy progresji zmian przepływów dopplerowskich w MCA, UT.A i DV u płodów z IUGR. Największe znaczenie dla prognozyki terminu rozwiązania ciąży miały nieprawidłowości w przepływach w UT.A i DV i były one zależne od wieku ciążowego i nasilenia zmian w łożysku. Szczególną uwagę zwrócono się na kształt fali przepływu krwi w UA. [172]

Potwierdzenie zaniku lub odwrócenia końcowo-rozkurczowego przepływu krwi w tych naczyniach po 14 tygodniu ciąży zostało uznane za stan znacznego zagrożenia ciąży. [173]

Proces upośledzenia wzrostu wewnątrzmacicznego płodu wiąże się z poważnymi konsekwencjami dla noworodka, wpływającym na wzrost i rozwój długo po urodzeniu. IUGR przyczynia się do gorszego rozwoju psychofizycznego w okresie postnatalnym, przy czym wykazuje minimalne zmiany w IQ po wyłączeniu z tej grupy noworodków z zakażeniami i wadami wrodzonymi. Następstwa neurologiczne związane z IUGR są subtelne i obejmują zmiany w aktywności, uwadze, zachowaniu i napięciu. Jednakże duży wpływ na ocenę neurologiczną noworodków ma zagrożenie okołoporodowe, w tym stres i niedotlenienie, co utrudnia obiektywizację oceny postnatalnej płodów z IUGR. Na późniejszą ocenę ma wpływ działanie czynników społeczno-ekonomicznych. Udokumentowano, że noworodki z IUGR mają tendencję do obniżonego wzrostu pourodzeniowego (niższe, szczuplejsze). [106,174-176]

II. CEL PRACY:

Celem pracy jest ocena potencjalnej roli wybranych czynników angiogennych w nadciśnieniu ciążowym i hipotrofii płodu.

Cel ten realizowano przez :

1. ocenę stężeń wybranych czynników angiogennych: łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF), naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF), angiopoetyny-1 (Ang-1), interleukiny 10 (Il-10) oraz leptyny w surowicy krwi kobiet z nadciśnieniem ciążowym oraz hipotrofią płodu.
2. ocenę stężeń oznaczanych czynników angiogennych w surowicy krwi pępowinowej badanych grup pacjentek.
3. określenie, czy pomiar stężeń wymienionych czynników angiogennych w surowicach krwi może być użyteczny w predykcji obu jednostek chorobowych u ciężarnych.
4. ocenę ekspresji genów badanych czynników angiogennych metodą RT PCR w łożyskach analizowanych grup pacjentek.

III. MATERIAŁ

Badaniami objętych zostało 82 pacjentki hospitalizowane w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiecych oraz w Oddziale Porodowym GPSK w Poznaniu w latach 2013-2016, w tym 22 pacjentek z ciążą powikłaną IUGR, 30 pacjentek z ciążą powikłaną nadciśnieniem tętniczym oraz 30 pacjentek z ciążą o prawidłowym przebiegu.

1. Grupa pierwsza - pacjentki z IUGR

Grupa pierwsza obejmuje 22 pacjentki w wieku 30+/-5 lat z rozpoznaniem zaburzeniem wzrastania wewnątrzmacicznego płodu.

Wszystkie kobiety były badane w trakcie porodu w III trymestrze ciąży

Charakterystyka grupy:

- wszystkie pacjentki poddane badaniu miały prawidłową masę ciała przed ciążą (BMI 22+/-3)
- oraz miały przyrost masy ciała w ciąży o 12+/- 2 kg (BMI 25+/-3),
- były rasy kaukaskiej,
- nie były niedożywione ani wyniszczone,
- nie przyjmowały leków przewlekłe, a w ciąży jedynie leki bez wpływu na wzrastanie płodu,
- nie stosowały używek (alkohol, papierosy)
- nie chorowały przewlekłe: wykluczono cukrzycę, choroby układu sercowo-naczyniowego, wątroby, nerek, układowe,
- miały wykluczone choroby zakaźne , szczególnie z grupy TORCH,
- nie były poddane szkodliwemu działaniu promieniowania rtg czy substancji toksycznych , szczególnie w I trymestrze ciąży,
- nie miały obciążonego wywiadu położniczego ,
- nie były po leczeniu niepłodności, ciążę naturalne, nie po IVF,
- wywiad pozwolił wykluczyć u pacjentek koagulopatie wrodzone i zespół antyfosfolipidowy,

Grupa obejmowała pacjentki :

- 21 badanych kobiet w ciąży pojedynczej, jedna w ciąży bliźniaczej JKDO,

- 52% badanych ciąż zostało rozwiązanych przez cięcie cesarskie z powodu ostrych objawów zagrożenia życia płodu, położenia miednicowego płodu, stanu po cięciu cesarskim; pozostałe rodziły siłami natury,
- średni czas trwania ciąży wynosił 38+/- 2 tygodnia,
- średnia masa noworodka wynosiła 2300 +/- 350 g i u wszystkich znajdowała się poniżej 5 percentyla
- noworodki miały prawidłową budowę anatomiczną w badaniu fizykalnym,
- pourodzeniowa ocena w skali Apgar noworodków wynosiła 8-10 punktów,
- stwierdzono prawidłowe pH krwi pępowinowej w zakresie 7,26 / 7,28
- średnia masa łożysk wynosiła 390+/- 120 g,
- stwierdzono prawidłowe przyczepy oraz budowę sznurów pępowinowych
- stwierdzono silnie zaznaczoną budowę zrazów łożyska, bez widocznych ognisk niedokrwienia;

Tabela nr 4. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z IUGR u płodów (n = 22)

Badana wielkość	min	max	średnia +/-SD
Wiek (lata)	25	38	32+/-6
Wzrost (cm)	158	173	165+/-5
Termin porodu	33	40	38+/-2
Masa ciała przed ciążą (kg)	55	70	63+/-5
Masa ciała okołoporodowa (kg)	62	85	73+/-5
Przyrost masy ciała (kg)	5	15	12+/-2
BMI w I trymestrze	18	25	22+/-3
BMI okołoporodowe	21	28	25+/-3
Masa ciała noworodka (g)	1500	3020	2300+/-350
Percentyl masy ciała noworodka	< 3	5	< 5
Masa łożyska (g)	185	520	390+/-120
pH1	7,18	7,36	7,26+/- 0,07
pH2	7,12	7,32	7,28+/- 0,05

n- liczba badanych ciężarnych

2. Grupa druga - pacjentki z nadciśnieniem tętniczym w przebiegu ciąży

Grupa druga obejmuje 30 pacjentek w wieku 27+/-4 lat z rozpoznany nadciśnieniem tętniczym w przebiegu ciąży średnio w 26 tygodniu ciąży.

Rozpoznanie jednostki chorobowej bazowało na wywiadzie lekarskim wraz z kartą przebiegu ciąży, kartach wypisowych z hospitalizacji w ciąży jak i brano pod uwagę wartość MAP wyliczoną na podstawie pomiarów ciśnienia tętniczego krwi oraz badania moczu z oceną białkomoczu.

Wszystkie kobiety były badane w trakcie porodu w III trymestrze ciąży.

Charakterystyka grupy:

- 60% pacjentek poddanych badaniu miało prawidłową masę ciała przed ciążą (BMI 21+/-4)
- oraz miały prawidłowy przyrost masy ciała w ciąży o 11+/- 2 kg (BMI 25+/-3), a 40% badanych w grupie miało nadwagę z BMI sprzed ciąży 28+/- 4 i średnim przyrostem masy ciała w ciąży 7+/-3 kg (BMI 30+/-2)
- u 82% pacjentek stwierdzono obrzęki, głównie kończyn dolnych,
- 55% badanych pacjentek miało rozpoznany w badaniu laboratoryjnym białkomocz,
- wszystkie badane kobiety były rasy kaukaskiej,
- wszystkie pacjentki przyjmowały Dopegyt w dawkach od 750 mg- 2g/ dobę, część Metocard w dawce 2 x 50 mg/ dobę , a przy braku normalizacji ciśnienia miały podawane dodatkowo leki: Dihydralazyne, , Hydrochlorotiazyd, Cordafen oraz Ebrantil / Tachyben w przełomie nadciśnieniowym, ciężkich i bardzo ciężkich postaciach nadciśnienia tętniczego, w nadciśnieniu tętniczym opornym na leczenie bezpośrednio przed rozwiązaniem drogą cięcia cesarskiego,
- nie stosowały używek (alkohol, papierosy)
- 67% pacjentek to pierworódki,
- wykluczono pacjentki z rzucawką i zespołem HELLP,
- nie chorowały przewlekłe: wykluczono choroby wątroby, wcześniej rozpoznane choroby nerek, choroby układowe, choroby układu oddechowego -tylko jedna pacjentka z astmą oskrzelową;
- cukrzycę przedciążową- w grupie 4 pacjentki z cukrzycą ciążową typu G1,
- miały wykluczone choroby zakaźne , szczególnie z grupy TORCH,

- nie były poddane szkodliwemu działaniu promieniowania rtg czy substancji toksycznych , szczególnie w I trymestrze ciąży,
- w wywiadzie obciążone były maksymalnie jednym poronieniem,
- cztery pacjentki miały rozpoznaną niedoczynność tarczycy i były leczone Euthyrox / Letrox
- nie były po leczeniu niepłodności metodą pozaustrojową IVF,
- wywiad pozwolił wykluczyć u pacjentek koagulopatie wrodzone i zespół antyfosfolipidowy,

Grupa obejmowała pacjentki :

- wszystkie pacjentki były w ciąży pojedynczej,
- 50% badanych ciąż zostało rozwiązanych przez cięcie cesarskie z powodu ostrych objawów zagrożenia życia płodu, rozpoznania stanu przedrzucawkowego, podejrzenia makrosomii płodu, dystocji barkowej w wywiadzie, wielowodzia; pozostałe urodziły siłami natury,
- średni czas trwania ciąży wynosił 38+/- 3 tygodnia,
- średnia masa noworodka wynosiła 3500 +/- 350 g i mieściła się między 50-55 percentylem; 13% miało rozpoznaną hipotrofię płodu z masą urodzeniową poniżej 5 percentyla;
- noworodki miały prawidłową budowę anatomiczną w badaniu fizykalnym (brak wad rozwojowych),
- pourodzeniowa ocena w skali Apgar noworodków wynosiła 8-10 punktów,
- stwierdzono prawidłowe pH krwi pępowinowej w zakresie 7,25 / 7,27
- średnia masa łożysk wynosiła 620+/- 100 g,
- stwierdzono prawidłowe przyczepy oraz budowę sznurów pępowinowych,
- u 35% stwierdzono makroskopowo budowę łożyska mogącą wskazywać na jego upośledzoną wydolność: liczne zwapnienia i obwałowane brzegi,
- u 35 % pacjentek stwierdzono zaburzenia przepływów w naczyniach w badaniu dopplerowskim: centralizację krążenia, nieprawidłowe przepływy w tętnicach macicznych.

Tabela nr 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem w przebiegu ciąży (n = 30)

Badana wielkość	min	max	średnia +/-SD
Wiek (lata)	21	38	27+/-4
Wzrost (cm)	164	175	168+/-3
Termin porodu	30	40	38+/-3
Masa ciała przed ciążą (kg)	60	95	70+/-5
Masa ciała okołoporodowa (kg)	73	102	84+/-5
Przyrost masy ciała (kg)	5	12	8+/-3
BMI w I trymestrze	18	30	25+/-4
BMI okołoporodowe	24	34	29+/-3
Masa ciała noworodka (g)	1140	4260	3500+/-350
Percentyl masy ciała noworodka	< 5	95	52+/- 40
Masa łożyska (g)	410	850	620+/-150
pH1	7,12	7,38	7,25+/- 0,04
pH2	7,08	7,45	7,27+/- 0,05

n- liczba badanych ciężarnych

3. Grupa trzecia - pacjentki z grupy kontrolnej.

Grupa trzecia obejmuje 30 pacjentek w wieku 28+/-4 lat bez rozpoznanego nadciśnienia tętniczego w przebiegu ciąży oraz bez IUGR.

Do grupy z założenia i w większości włączone zostały pacjentki bez rozpoznanych chorób towarzyszących i bez leków przyjmowanych w sposób stały.

Wszystkie kobiety były badane w trakcie porodu w III trymestrze ciąży.

Charakterystyka grupy:

- u większości pacjentek nie stwierdzono chorób towarzyszących (n=23); jedynie trzy pacjentki miały rozpoznaną niedoczynność tarczycy, trzy cukrzycę ciążową typu G1 i jedna cholestazę ciążową,

- w większości nie przyjmowały leków przewlekłe (wyjątek trzy pacjentki z niedoczynnością tarczycy, które przyjmowały Euthyrox i wykazywały eutyreozę w bad. laboratoryjnych),
- z grupy wykluczone zostały pacjentki z otyłością i z niedowagą- wszystkie badane miały prawidłowe BMI przed ciążą w granicach 22 ± 4 kg i przyrost masy ciała w ciąży o 13 ± 4 kg,
- wykluczono pacjentki, które urodziły chore dzieci, ze zdiagnozowanymi wadami rozwojowymi, u których stwierdzono poporodowo wady pępowiny i naczyń pępowinowych, nieprawidłowości łożyska,
- masa poporodowa prawidłowego makroskopowo łożyska wynosiła średnio 700 ± 220 g,
- podczas porodu nie doszło do trudności w urodzeniu łożyska,
- pacjentki nie miały obciążonego wywiadu położniczego,
- wszystkie badane kobiety w grupie były w ciąży pojedynczej,
- 55% badanych to pierworódki a 45 % to wieloródki,
- większość pacjentek rodziła siłami natury - ok 75 %, pozostałe na drodze cięcia cesarskiego lub z użyciem wyciągacza próżniowego (25%) ze wskazań: ortopedycznych, okulistycznych, neurologicznych czy z powodu braku postępu porodu lub wczesnych objawów zagrożenia życia płodu przy prawidłowej gazometrii poporodowej w zakresie 7,25/ 7,29,
- ocena w skali Apgar noworodków wynosiła 9-10 punktów,
- wszystkie rodzące były w III trymestrze ciąży przy średnim czasie trwania ciąży 39 ± 2 tygodni,
- urodzone zdrowe noworodki miały średnią masę urodzeniową 3300 ± 400 g, co w większości odpowiada 50 percentylowi z odchyleniem ± 25 percentyli,

Tabela nr 6. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej (n = 30)

Badana wielkość	min	max	średnia +/-SD
Wiek (lata)	24	36	28+/-4
Wzrost (cm)	163	175	168+/-3
Termin porodu	38	41	39+/-2
Masa ciała przed ciążą (kg)	55	72	70+/-5
Masa ciała okołoporodowa (kg)	65	95	75+/- 12
Przyrost masy ciała (kg)	7	20	13+/-4
BMI w I trymestrze	18	26	22+/-4
BMI okołoporodowe	21	30	28+/-3
Masa ciała noworodka (g)	3100	3980	3300+/-400
Percentyl masy ciała noworodka	20	95	50+/- 25
Masa łożyska (g)	510	930	700+/-220
pH1	7,11	7,45	7,25+/- 0,2
pH2	7,15	7,48	7,29+/- 0,1

n- liczba badanych ciężarnych

IV. METODY

Do badań i pobrania potrzebnego do nich materiału biologicznego od pacjentek przystąpiono po otrzymaniu zgody Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - uchwała nr 1142/12.

Każda pacjentka była dokładnie poinformowana o celach przeprowadzanego badania naukowego, miała wyraźnie przedstawione i opisane w formularzu zgody na uczestniczenie w badaniu informacje na temat problemów i jednostek chorobowych poddanych badaniu, sposoby pobrania tkanek, przeprowadzane metody i stosowane narzędzia do badań, miejsce przechowywania tkanek oraz gwarancję anonimowości.

Pacjentki po zapoznaniu się z informacjami o badaniu podpisywały oświadczenie oraz świadome i dobrowolne zgody na uczestniczenie oraz prowadzenie zakodowanego rejestru służącego za bazę do dokumentacji naukowej badania.

Kobiety były poinformowane o możliwości zrezygnowania z udziału w badaniu bez konieczności podawania przyczyny i bez żadnego wpływu na dalszą opiekę medyczną czy prowadzone leczenie. Miały zagwarantowany dostęp do uzyskanych wyników.

Po uzyskaniu pisemnej, świadomej zgody pacjentki na wzięcie udziału w badaniu, przystąpiono do procedur pobrania materiału biologicznego do zaplanowanych badań :

1. przy okazji rutynowych badań laboratoryjnych do/w trakcie porodu pobierano około 5ml krwi z żyły odłokciowej oraz po porodzie około 5 ml krwi pępowinowej. Odwirowana z pobranej krwi surowica była zamrożona w -70°C do oznaczeń stężeń badanych czynników angiogennych **metodą ELISA**.
2. po porodzie pobierano fragment łożyska o wym. 0.5 x 0.5 cm, umieszczano go w płynie RNA later i zamrażano w temp -70°C do późniejszych oznaczeń **metodą PCR** : ekspresji genów badanych czynników proangiogennych.

Pobrana krew oraz tkanki łożyska przechowywane były w Pracowni Biologii Molekularnej Kliniki Perinatologii i Chorób Kobiety. Dostęp do danych miała tylko jedna osoba, a dane zostały zakodowane pod kolejnymi cyframi rzymskimi, literami alfabetu oraz numerami i takie oznaczenia stosowane były w opisie pracy podczas obliczeń statystycznych. Dane te nie są dostępne dla osób trzecich.

1. ELISA - Test immunoenzymatyczny ELISA (Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay)

Celem metody immunoenzymatycznej ELISA jest określenie, w jakim stężeniu badana substancja występuje w badanym materiale. ELISA jest metodą o wysokiej swoistości i czułości. Umożliwia wykrycie stężenia rzędu pikogramów lub nanogramów.

Test ELISA opiera się na swoistej reakcji antygen- przeciwciało. Istnieje kilka modyfikacji testu. Wyróżnia się test bezpośredni, pośredni- najczęściej stosowany oraz test ELISA typu „Sandwich” [Samara 2008]. Do wykonania testu używa się plastikowej płytki zbudowanej ze studzienek. W przypadku testu pośredniego w studzienkach reakcyjnych znajduje się antygen, rozpoznawany przez poszukiwane przeciwciało. Antygen związany ze studzienką stanowi fazę stałą. W pierwszym etapie testu, dochodzi do opłaszczania fazy stałej, poprzez dodanie badanej próby przypuszczalnie zawierającej szukane przeciwciało. W rezultacie powstaje kompleks antygen-przeciwciało. Następnie należy zablokować miejsca, które nie związały się z substancją opłaszczającą. W tym celu używa się czynnika blokującego, np. albuminy. Po tym etapie reakcji płytki są płukane w celu pozbycia się niezwiązanych przeciwciał i uniknięcia pojawienia się niespecyficznego tła reakcji. Po przepłukaniu studzienek reakcyjnych dodawany jest koniugat, czyli przeciwciało wyznakowane enzymem, najczęściej peroksydazą chrzanową. Jest to drugorzędowe przeciwciało skierowane przeciwko pierwszemu. Również po tym etapie studzienki reakcyjne muszą zostać wypłukane. Do wywołania reakcji barwnej stosuje się substrat - chromogen. W przypadku zastosowania enzymu peroksydazy chrzanowej, chromogenem może być tetrametylobenzydyna. W czasie reakcji enzymu ze swoistym substratem powstaje produkt, którego ilość jest proporcjonalna do ilości badanego przeciwciała. Po zablokowaniu reakcji, można przeprowadzić odczyt spektrofotometryczny [Wybrańska et al., 2009; Samara 2008]. Ilościowy wynik można uzyskać wykonując reakcję z roztworami wzorcowymi o znanym stężeniu. Odczytu stężenia badanego przeciwciała dokonuje się korzystając z krzywej kalibracyjnej roztworów wzorcowych [Wybrańska et al., 2009].

Test immunoenzymatyczny ELISA

Materiały, odczynniki, roztwory:

- Komercyjny zestaw do ELISY: SIGMA- ALDRICH TM Human IL-10 Elisa Kit:
 - Human IL-10 Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96-dołkowa płytka opłaszczona przeciwciałem przeciwko Human IL-10
 - Lyophilized Human IL-10 Protein Standard (Item C) - kalibrator
 - Biotinylated Human IL-10 Detection Antibody (Item F)- biotynylowane przeciwciało drugorzędowe
 - ELISA 1X Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - bufor do rozcieńczania surowicy lub osocza
 - HRP-Streptavidin (Item G) - streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową
 - ELISA Stop Solution (Item I) - roztwór zatrzymujący reakcję: 0.2 M kwas siarkowy
 - ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H₂O₂) w buforze
 - 20X Wash Buffer (Item B)- bufor płuczący 20x stężony

- Komercyjny zestaw do ELISY: SIGMA- ALDRICH TM Human Angiopoietin-1 Elisa Kit:
 - Human Angiopoietin-1 Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96-dołkowa płytka opłaszczona przeciwciałem przeciwko Human Angiopoietin- 1
 - Lyophilized Human Angiopoietin- 1 Protein Standard (Item C) - kalibrator
 - Biotinylated Human Angiopoietin- 1 Detection Antibody (Item F)- biotynylowane przeciwciało drugorzędowe
 - ELISA 1X Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - bufor do rozcieńczania surowicy lub osocza
 - HRP-Streptavidin (Item G) - streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową
 - ELISA Stop Solution (Item I) - roztwór zatrzymujący reakcję: 0.2 M kwas siarkowy

- ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) w buforze
- 20X Wash Buffer (Item B)- bufor płuczający 20x stężony

●Komercyjny zestaw do ELISY: SIGMA- ALDRICH TM Human VEGF Elisa Kit:

- Human VEGF Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96-dołkowa płytka opłaszczona przeciwciałem przeciwko Human VEGF
- Lyophilized Human VEGF Protein Standard (Item C) - kalibrator
- Biotinylated Human VEGF Detection Antibody (Item F)- biotynylowane przeciwciało drugorzędowe
- ELISA 1X Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - bufor do rozcieńczania surowicy lub osocza
- HRP-Streptavidin (Item G)- streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową
- ELISA Stop Solution (Item I) - roztwór zatrzymujący reakcję: 0.2 M kwas siarkowy
- ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) w buforze
- 20X Wash Buffer (Item B)- bufor płuczający 20x stężony

●Komercyjny zestaw do ELISY: SIGMA- ALDRICH TM Human PLGF Elisa Kit:

- Human PLGF Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96-dołkowa płytka opłaszczona przeciwciałem przeciwko Human PLGF
- Lyophilized Human PLGF Protein Standard (Item C) - kalibrator
- Biotinylated Human PLGF Detection Antibody (Item F)- biotynylowane przeciwciało drugorzędowe
- ELISA 1X Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - bufor do rozcieńczania surowicy lub osocza
- HRP-Streptavidin (Item G)- streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową
- ELISA Stop Solution (Item I) - roztwór zatrzymujący reakcję: 0.2 M kwas siarkowy

- ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) w buforze
- 20X Wash Buffer (Item B)- bufor płuczający 20x stężony

●Komercyjny zestaw do ELISY: SIGMA- ALDRICH TM Human leptin Elisa Kit:

- Human leptin Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96-dołkowa płytka opłaszczona przeciwciałem przeciwko Human leptin Lyophilized Human leptin Protein Standard (Item C) - kalibrator
- Biotinylated Human leptin Detection Antibody (Item F)- biotynylowane przeciwciało drugorzędowe
- ELISA 1X Assay/Sample Diluent Buffer A (Item D1) - bufor do rozcieńczania surowicy lub osocza
- HRP-Streptavidin (Item G)- streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową
- ELISA Stop Solution (Item I) - roztwór zatrzymujący reakcję: 0.2 M kwas siarkowy
- ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - roztwór substratu zawierający tetrametylobenzydynę (TMB) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) w buforze
- 20X Wash Buffer (Item B)- bufor płuczający 20x stężony
- Surowica / osocze grup badanych (nadciśnienie ciążowe, hipotrofia płodu) i grupy kontrolnej
- Pipety półautomatyczne wielokanałowe
- Pipety półautomatyczne jednokanałowe
- Wymienne plastikowe końcówki do pipet półautomatycznych (tipsy)
- Folia z samoprzylepnym spodem przeznaczona do zabezpieczenia płytek
- Papierowa bibuła
- Rynienki
- Woda destylowana do przyrządzenia buforu płuczającego
- Stoper - minutnik
- Środki ochrony osobistej: rękawiczki, fartuch, okulary

Aparatura:

- Analizator ze spektrofotometrem BioTek® Synergy 2 z oprogramowaniem GENE 5

- Votrex
- Wytrząsarka
- Wirówka

Płytkę wraz z odczynnikami przed przystąpieniem do pracy wyjęto z chłodni (-20°C) w celu doprowadzenia do temperatury $18-20^{\circ}\text{C}$. Próby badane rozmrożono odpowiednio wcześniej, w celu doprowadzenia ich do temperatury pokojowej. Następnie krótko je odwirowano. Wszystkie odczynniki pochodzące z komercyjnych zestawów do ELISY oraz próby były wymieszane bezpośrednio przed użyciem. Wykorzystane w badaniu zestawy do ELISY: SIGMA - ALDRICHTM wymagają samodzielnego przygotowania buforu płuczącego, rozcieńczenia standardów, rozcieńczenia badanych prób oraz rozcieńczenia koncentratu HRP-Streptavidin i przygotowania biotynylowanego przeciwciała według instrukcji. Procedura przebiegu reakcji immunoenzymatycznej we wszystkich wyżej wymienionych zestawach SIGMA-ALDRICHTM przebiega według tego samego protokołu.

Każdy test został rozpoczęty od napipetowania $100\ \mu\text{l}$ standardów i prób, w odpowiedniej ilości powtórzeń, do osobnych dołków w płytce. Dalej, zabezpieczoną folią samoprzylepną płytkę inkubowano 2,5 godziny z wykorzystaniem wytrząsarki do płytek. Po inkubacji przeprowadzono 4-krotnie płukanie, za każdym razem używając po $300\ \mu\text{l}$ buforu płuczącego na dołek. Po każdym płukaniu płytką uderzano w bibułę papierową w celu usunięcia jak największej ilości resztek buforu. Następnie do każdego z dołków płytki dodano $100\ \mu\text{l}$ wcześniej przygotowanego biotynylowanego przeciwciała drugorzędowego, po czym zabezpieczono płytkę i inkubowano przez 1 godzinę z wykorzystaniem wytrząsarki do płytek. Po upływie określonego czasu przeprowadzono 4-krotnie płukanie, za każdym razem używając po $300\ \mu\text{l}$ buforu płuczącego na dołek. Po usunięciu resztek buforu płuczącego do każdego z dołków dodano po $100\ \mu\text{l}$ wyznakowanego enzymu. Próby, wcześniej zabezpieczone folią samoprzylepną, inkubowano przez 1 godzinę na wytrząsarce do płytek. Po inkubacji powtórzono procedurę płukania i usunięcia jak największej ilości resztek buforu. Następnie do wszystkich prób i standardów dodano po $100\ \mu\text{l}$ substratu. Po czym, zabezpieczoną folią samoprzylepną, płytkę inkubowano w ciemności przez 30 minut bez wytrząsania. Po tym etapie do każdego z dołków dodano $50\ \mu\text{l}$ roztworu zatrzymującego reakcję.

Do pomiaru absorbancji wykorzystano spektrofotometr BioTek® Synergy 2 sprzężony z oprogramowaniem komputerowym GENE 5. Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm w czasie do 15 minut od zakończenia reakcji.

2. PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

2.1. Materiał badawczy

Do badania wykorzystano fragmenty z 82 łożysk pobranych po porodzie od pacjentek z trzech badanych grup: chorujących na nadciśnienie tętnicze, u których wystąpiło wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu oraz od zdrowych w grupie kontrolnej.

Pobrane tkanki łożyska umieszczano w probówce zawierającej RNA later. Tkanki przechowywano w temperaturze -70°C. Materiałem do badań było RNA izolowane z tkanek.

W pierwszym etapie wyizolowano RNA z łożyska, a następnie poddano je odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

2.2. Przygotowanie prób do analizy

Materiał poddano homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora mechanicznego z regulowaną siłą rozdrabniania (PRO Scientific Inc.) Każda badana tkanka została zhomogenizowana w oddzielnej 2ml probówce typu eppendorf w obecności Trizolu (Total RNA Isolation), który zapewnia lizę komórek oraz inaktywację endogennych RNaz.

2.3. Izolacja RNA

Liza komórek przeprowadzona została za pomocą Trizolu podczas homogenizacji. Kolejne etapy izolacji przebiegały następująco:

- próby inkubowano 5min. w temp. pokojowej;
- dodawano 200µl chloroformu, całość wytrząsano ręcznie przez 15 sek.;
- inkubacja w temp. pokojowej przez 3 min., wirowanie 10min.
- w 4°C/12 000 rpm;

- fazę górną przenoszono do nowej probówki i wytrącono RNA przez dodanie 0,5 ml izopropanolu;
- inkubacja 10min. w temp. pokojowej, następnie wirowano 10 min. w 4°C/12 000 rpm;
- do osadu RNA dodawano 1ml 75% etanolu i wytrząsano;
- próby wirowano 10 min. w 4°C/12 000 rpm;
- osad RNA suszono na powietrzu 5 – 10 min., a następnie zawieszano w 20 – 50 µl wody wolnej od RNaz;
- zawartość RNA w izolowanej próbce kalkulowano na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy $\lambda 260\text{nm}$.

RNA przechowywano krótkoterminowo w temperaturze – 20°C lub długoterminowo w temp. – 80°C.

2.4. Sprawdzenie ilości oraz jakości wyizolowanego RNA

Stężenie kwasów nukleinowych w próbkach oznaczono spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 260 nm przy zastosowaniu urządzenia Nanodrop. Przelicznik zastosowany do obliczenia stężenia kwasów nukleinowych w roztworze:

ssRNA 1 OD/ml - 40µg/ml

Jakość RNA sprawdzono elektroforezą w 1% żelu agarozowym wybarwionym SYBR®Safe DNA Gel Stain i wizualizowano przy wykorzystaniu systemu dokumentacji żeli GelDoc-it Gel Imaging System (UVP).

2.5. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) zgodnie z opisem załączonym przed producenta.

Reagenty używane do reakcji odwrotnej transkrypcji:

- RNA (0,2 µg)
- bufor dla odwrotnej transkryptazy 10x (2 µl)
- dNTP mix 100mM (0,8 µl)

- 10μM startery adaptorowy (1,0 μl)
- odwrotna transkryptaza (1 μl)
- woda (do 10 μl)

Po dodaniu wszystkich składników próby zostały lekko pomieszane oraz delikatnie zwirowane. Następnie próby poddano serii następujących po sobie inkubacji:

- 55°C, 15 min.
- 42°C, 30min.
- 95°C, 5min.

Po inkubacjach próby przeniesiono na лёd i dodano 20μl wody. Uzyskano ostatecznie 40μl każdej próby o stężeniu RNA 0,2μg/μl.

Uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji materiał cDNA wykorzystano jako matrycę do łańcuchowej reakcji polimerazy.

2.6. Amplifikacja cDNA metodą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym

Ilościową amplifikację cDNA w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative reverse transcriptase real – time PCR*, *qRT – PCR*) przeprowadzono przy użyciu termocyklera Light Cycler 480 II (*Roche*). Wyniki reakcji qRT – PCR analizowano w programie LightCycler® 480 SoftWare release 1.5.1.62 (*Roche*).

Oligonukleotydy starterowe zastosowane w badaniu zostały zsyntetyzowane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Tabela nr 7. Skład mieszaniny reakcji qRT - PCR

SKŁADNIKI	ILOŚĆ [μl]
matryca – cDNA	1
2x LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5
5 μM starter F	1
5 μM starter uniwersalny	1
Woda	2

Tabela nr 8. Warunki reakcji qRT - PCR

ETAP ANALIZY	LICZBA CYKLI	CZAS	TEMPERATURA
DENATURACJA WSTĘPNA	1	10 minut	95°C
AMPLIFIKACJA	42		
<i>Denaturacja</i>		10 sekund	95°C
<i>przyłączanie starterów</i>		10 sekund	59°C
<i>wydłużanie starterów</i>		20 sekund	72°C
TOPNIENIE PRODUKTU	1		
		0 sekund	95°C
		2 minuty	60°C
		0 sekund	95°C
CHŁODZENIE	1	2 minuty	37°C

3. Analiza statystyczna

- Wyniki badań opracowano przy użyciu programów Microsoft Excel 2019 i Statistica 13.0.
- Obliczano wielkość normalności rozkładu przy pomocy *testu Shapiro-Wilka*. Testowano grupy o podobnej liczebności.
- Stosowano *test Kruskala-Wallisa* z *testem post-hoc Dunna* dla określenia istotności statystycznej, a za istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0.05$.
- Do oceny i porównania między sobą modeli klasyfikacyjnych posłużono się **wykresami krzywych czułości i swoistości**, które umożliwiają wyznaczenie optymalnego punktu odcięcia oraz łączą w sobie opis czułości i specyficzności danego modelu i oceniają poprawność stosowanego kalkulatora;

* Czułość określamy jako prawdopodobieństwo, z jakim przeprowadzony test zakwalifikuje chorą osobę do grupy chorych, czyli jaki jest udział osób chorych, u których test wyszedł poprawnie w stosunku do wszystkich chorych, (true positives)

* Specyficzność to prawdopodobieństwo, z jakim stosowany przez nas test zakwalifikuje osobę zdrową jako osobę zdrową, (true negatives);

V. WYNIKI

1. Stężenia badanych białek

1.1 VEGF

A. Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek.

Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie VEGF w grupie kontrolnej wynosiło 45,64 +/- 32,56 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 84,99 +/- 31,09, a w grupie pacjentek z IUGR 28,06 +/- 18,18 pg/ml.

Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej (testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna), która :

- wykazała różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu.

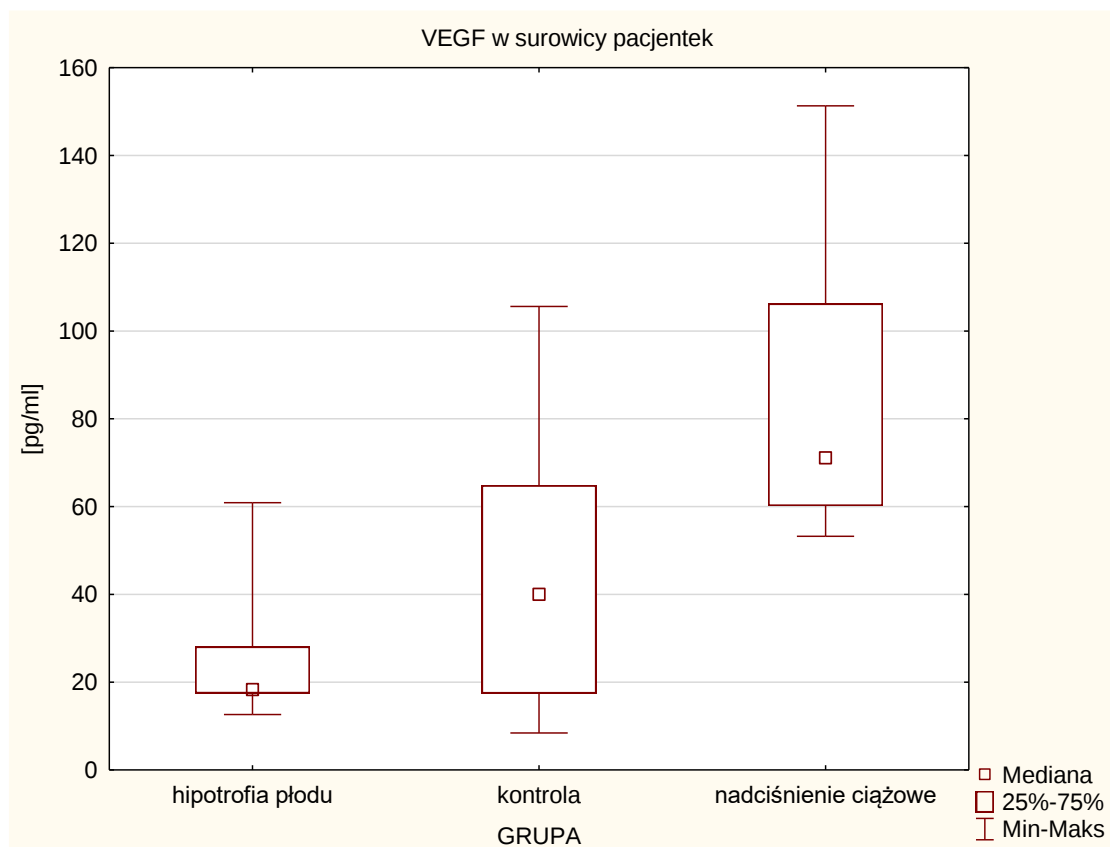
(p=0,0013)

- nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym (p>0,05).

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 9.

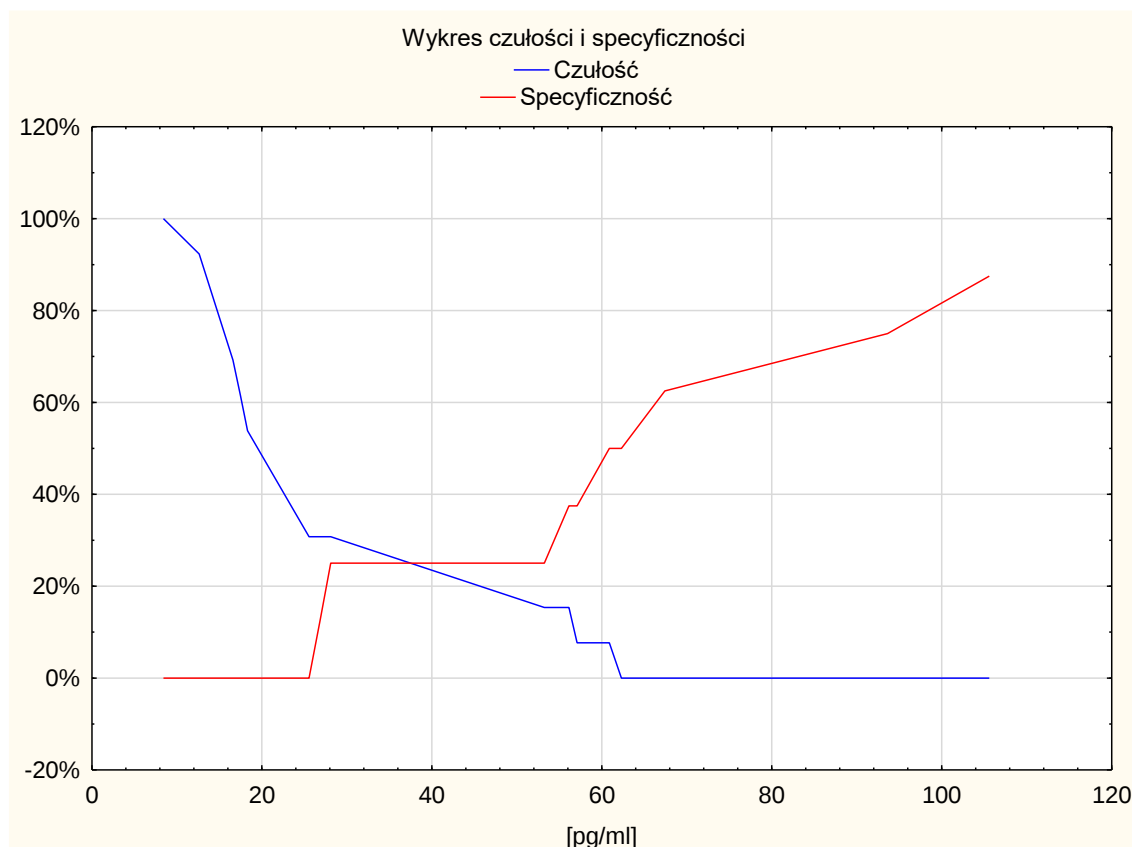
Tabela nr 9. Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	45,64	8,43	105,60	32,56
Grupa z IUGR	22	28,06 *	12,63	60,89	18,18
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	84,99	53,23	151,31	31,09
Ogółem	82	55,16	8,42	151,31	36,79



Wykres 1. Wykres przedstawiający stężenia VEGF w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Dla badanych stężeń VEGF we krwi pacjentek ciężarnych wykreślono *krzywą czułości i swoistości*. Wyznaczono punkt odcięcia dzielący populację pacjentek na grupy o istotnie wyższym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.



Wykres 2. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia VEGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia VEGF.

Wartość predykcyjna stężenia VEGF w surowicy krwi matki dla hipotrofii płodu = 37,93 mg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia VEGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 37,93 mg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.

B. Stężenie VEGF w surowicy krwi pępowinowej.

Stężenie VEGF w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie VEGF w grupie kontrolnej wynosiło 185,37 +/- 39,05 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 214,93 +/- 45,17, a w grupie pacjentek z IUGR 134,66 +/- 35,71 pg/ml.

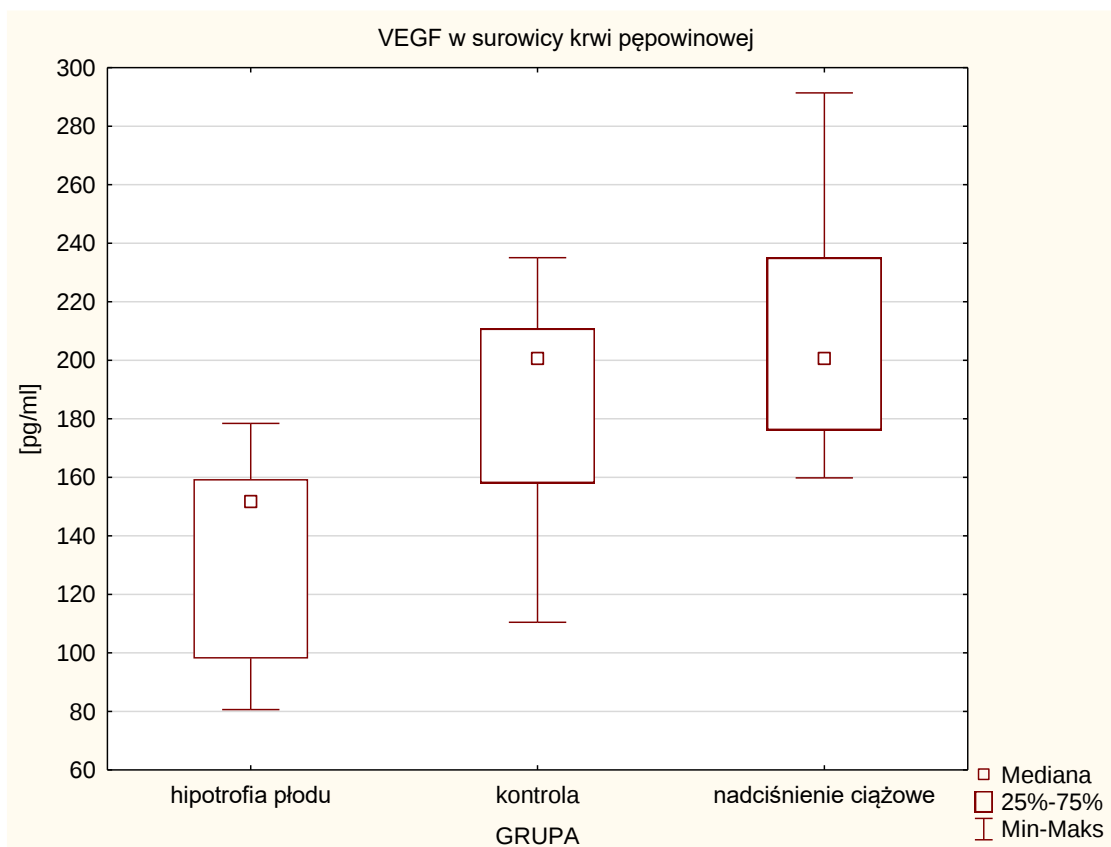
Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej (testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna), która:

- wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,0011$)
- nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p>0,05$).

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 10.

Tabela nr 10. Stężenie VEGF w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	185,37	110,46	235,06	39,05
Grupa z IUGR	22	134,66 *	80,65	178,43	35,71
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	214,93	159,84	291,41	45,17
Ogółem	82	183,19	80,65	291,41	51,32



Wykres 3. Wykres przedstawiający stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Dla badanych stężeń VEGF we krwi pępowinowej wykreślono krzywą czułości i swoistości. Wyznaczono punkt odcięcia dzielący populację pacjentek na grupy o istotnie wyższym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.



Wykres 4. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia VEGF.

Wartość predykcyjna stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej dla hipotrofii płodu = 168,88 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia VEGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 168,88 pg/ml . Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.

1.2. PLGF

A. Stężenie **PLGF** w surowicy krwi pacjentek

Stężenie PLGF w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie PLGF w grupie kontrolnej wynosiło 364,05 +/- 67,20 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 80,23 +/- 23,32, a w grupie pacjentek z IUGR 124,83 +/- 66,22 pg/ml.

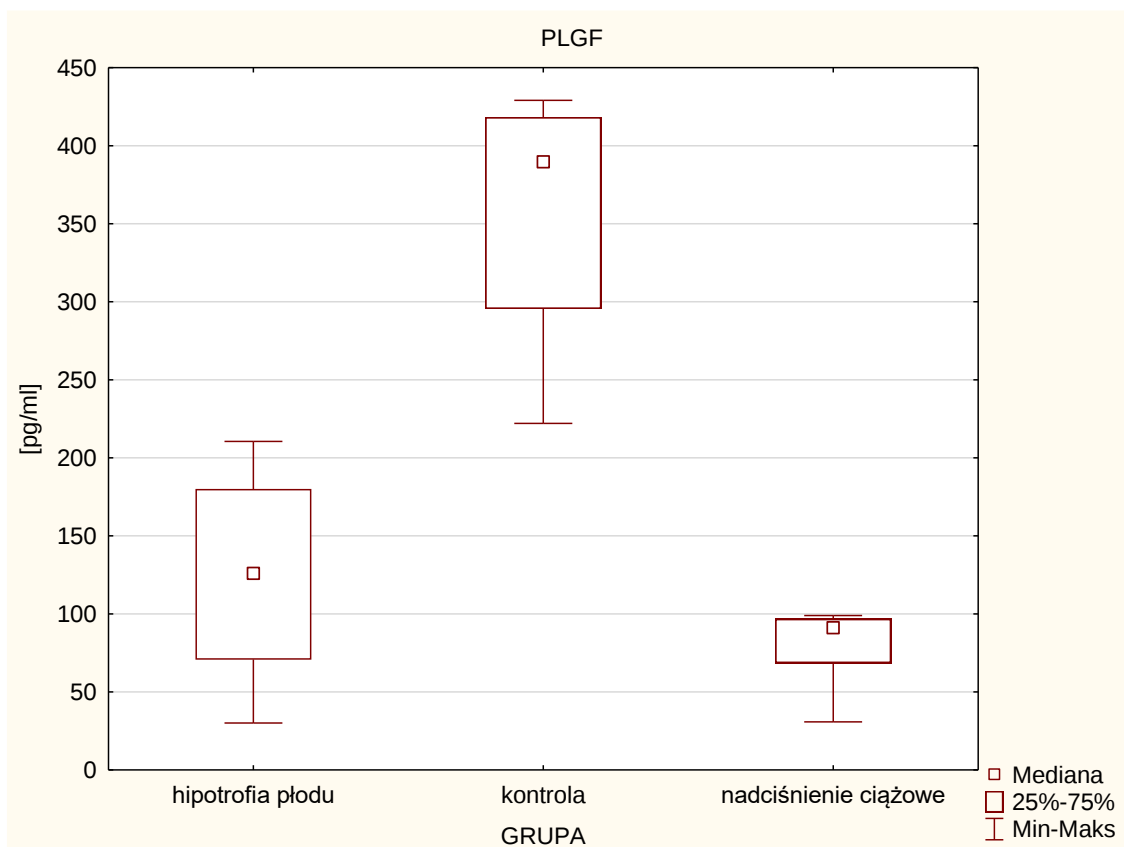
Poziomy stężen poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

- wykazała różnice istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000154$)
- wykazała różnice istotną statystycznie także pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,00001$)

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 11.

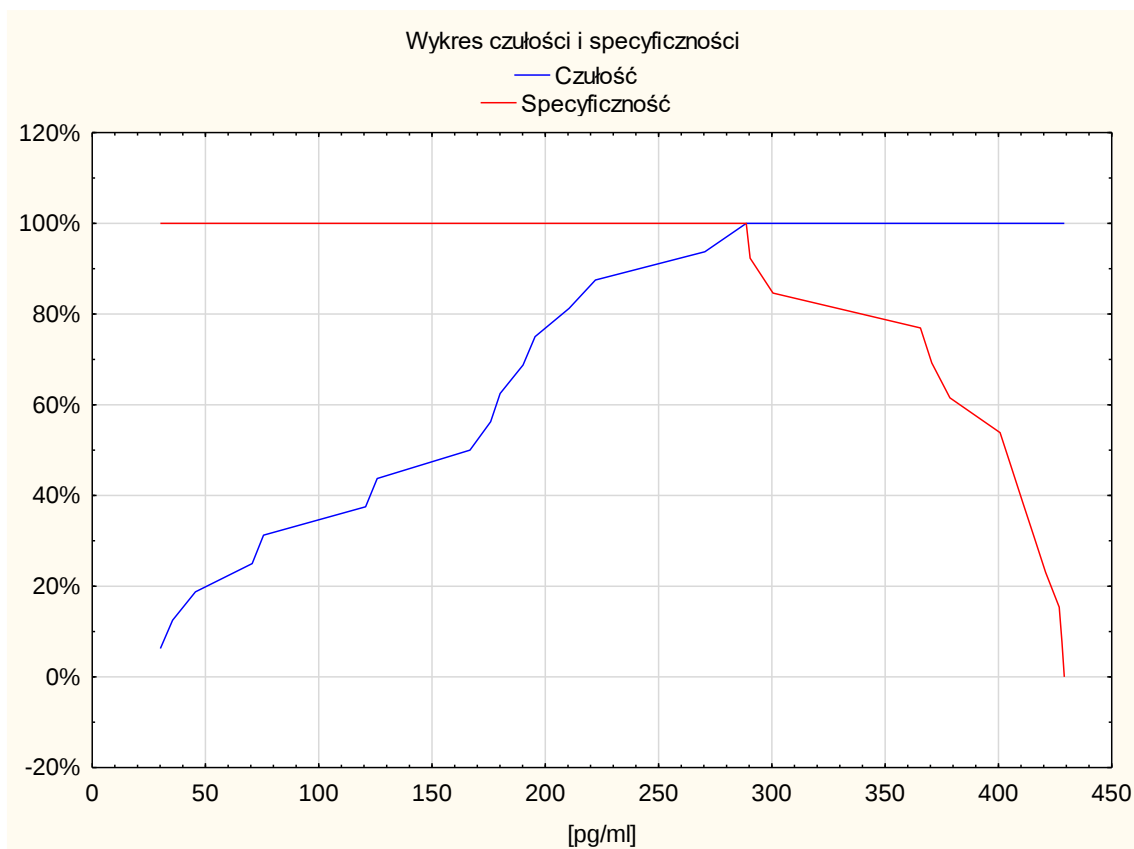
Tabela nr 11. Stężenie PLGF w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	364,05	222,11	429,09	67,20
Grupa z IUGR	22	124,83 *	30,11	210,50	66,22
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	80,23 *	30,77	98,99	23,32
Ogółem	82	196,62	30,11	429,09	140,33



Wykres 5. Wykres przedstawiający stężenia PLGF w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

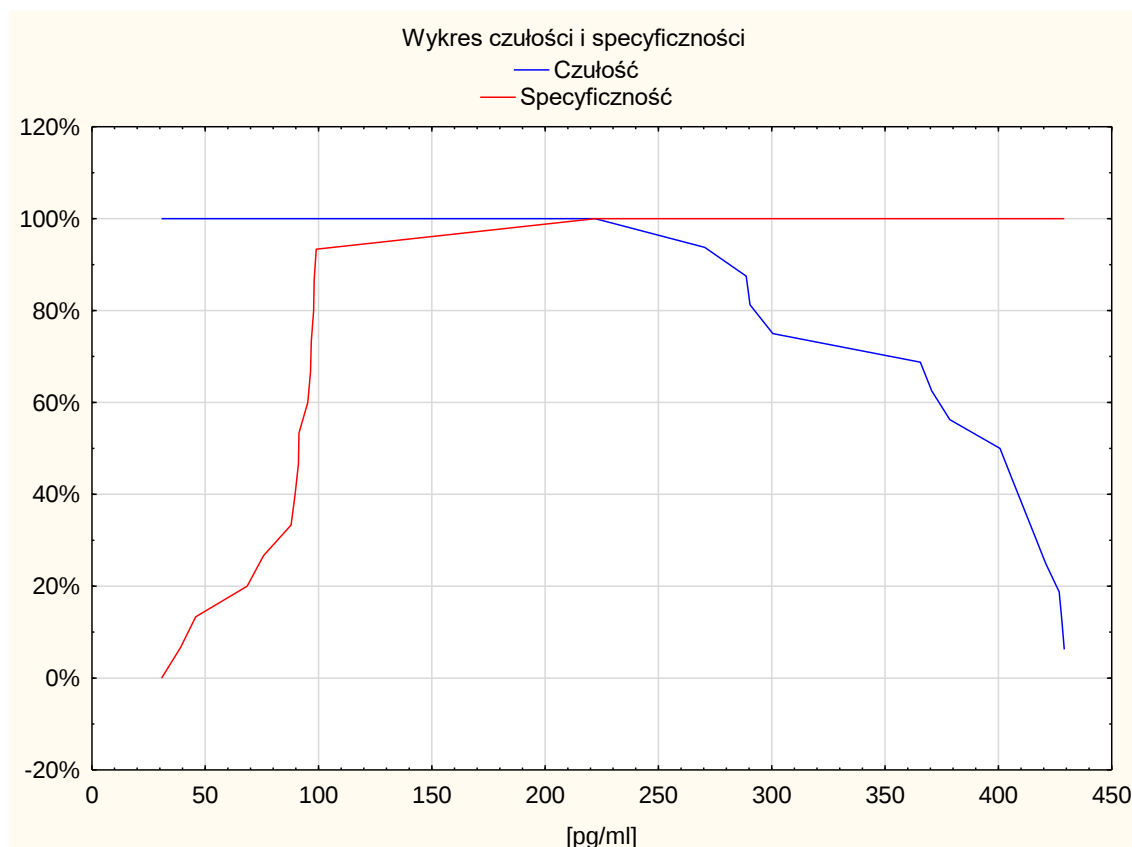
Dla badanych stężeń PLGF we krwi pacjentek ciężarnych wykreślono krzywą czułości i swoistości. Wyznaczono punkt odcięcia dzielący populację pacjentek na grupy o istotnie wyższym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu



Wykres 6. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia PLGF.

Wartość predykcyjna stężenia PLGF w surowicy krwi matki dla hipotrofii płodu = 288,73 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia PLGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 288,73 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.



Wykres 7. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia PLGF.

Wartość predykcyjna stężenia PLGF w surowicy krwi matki dla nadciśnienia ciążowego = 222,11 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia PLGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 222,11 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

B. Stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej.

Stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie PLGF w grupie kontrolnej wynosiło 522,81 +/- 64,29 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 130,96 +/- 35,20, a w grupie pacjentek z IUGR 268,22 +/- 31,21 pg/ml.

Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

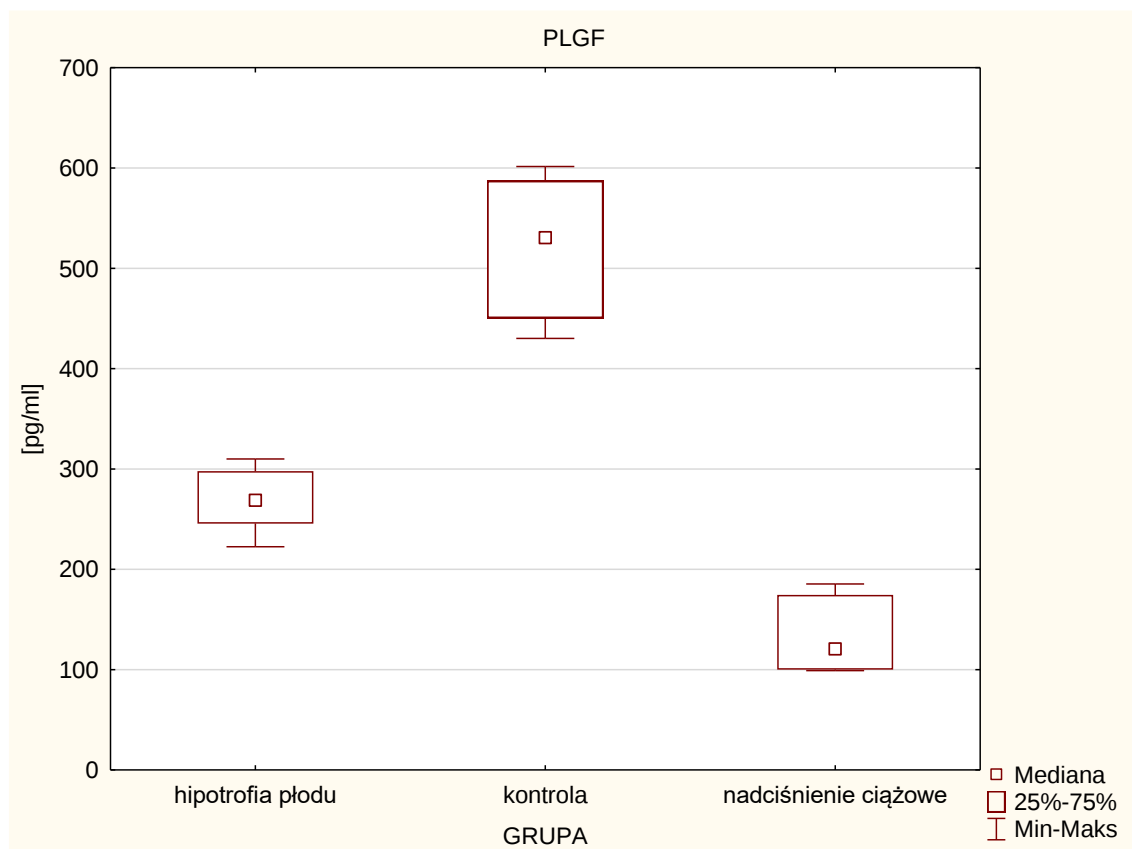
- wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,037665$)

- wykazała różnice istotną statystycznie także pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000001$)

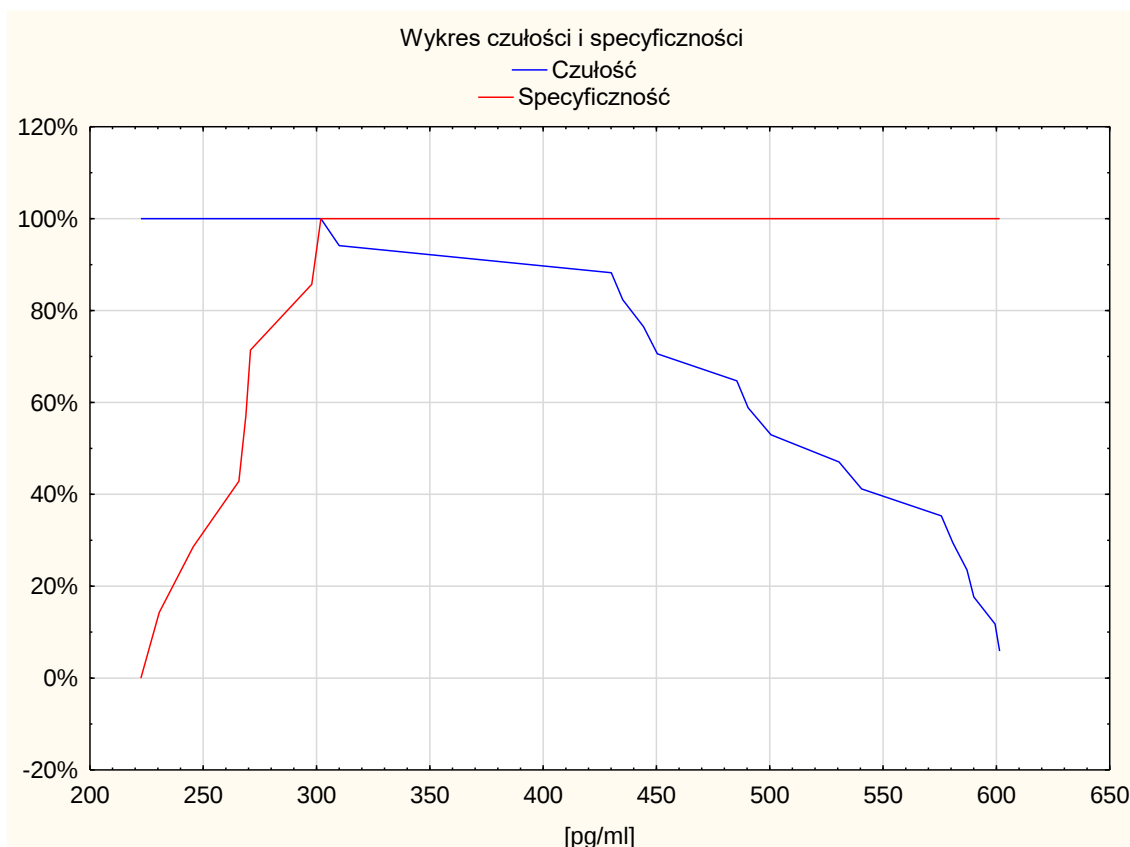
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 12.

Tabela nr 12. Stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	522,81	430,52	601,44	64,29
Grupa z IUGR	22	268,22 *	222,52	309,98	31,21
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	130,96 *	99,02	185,43	35,20
Ogółem	82	313,35	99,02	601,44	181,98



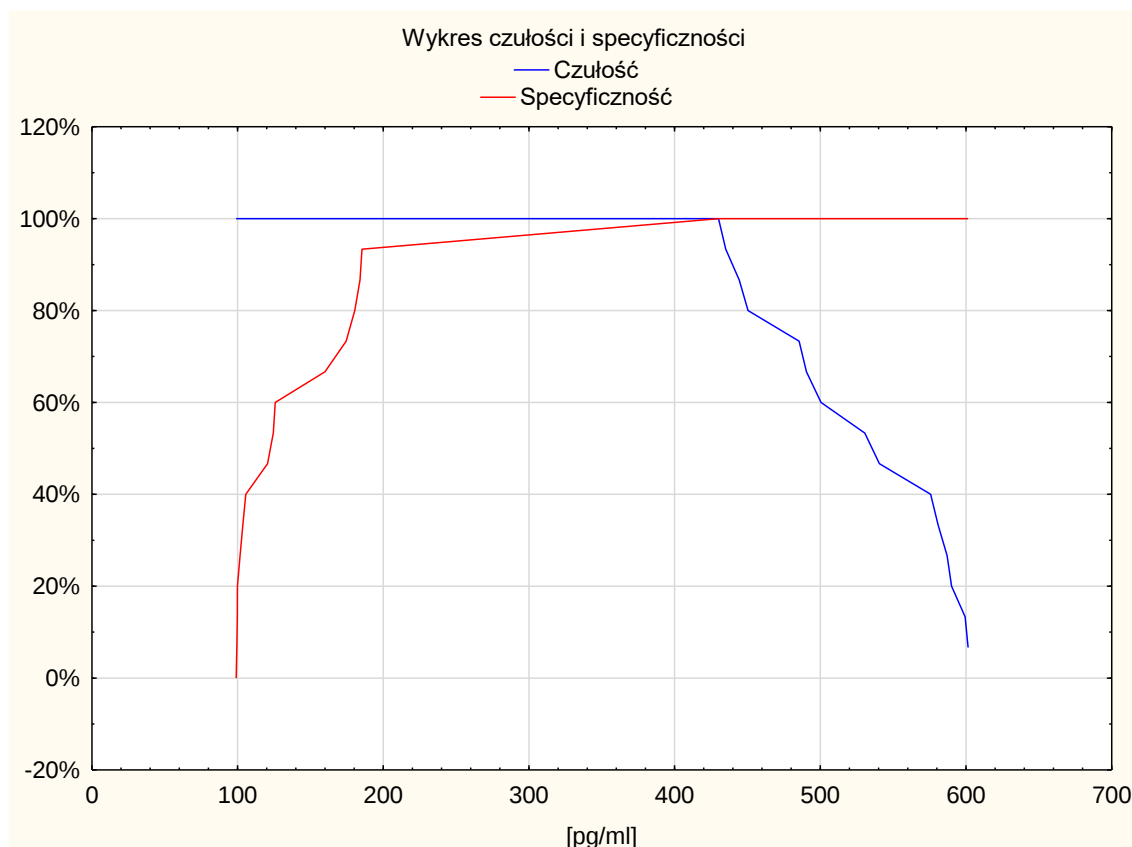
Wykres 8. Wykres przedstawiający stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml]



Wykres 9. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia PLGF.

Wartość predykcyjna stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej dla hipotrofii płodu = 301,92 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia PLGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 301,92 pg/ml . Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.



Wykres 10. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia PLGF.

Wartość predykcyjna stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej dla nadciśnienia ciążowego = 430,11 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia PLGF w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 430,11 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

1.3. Interleukina 10

A. Stężenie **IL-10** w surowicy krwi pacjentek

Stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentek *nie różni się istotnie statystycznie* między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie IL-10 w grupie kontrolnej wynosiło 90,01 +/- 97,35 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 105,86 +/- 121,80, a w grupie pacjentek z IUGR 61,74 +/- 110,14 pg/ml.

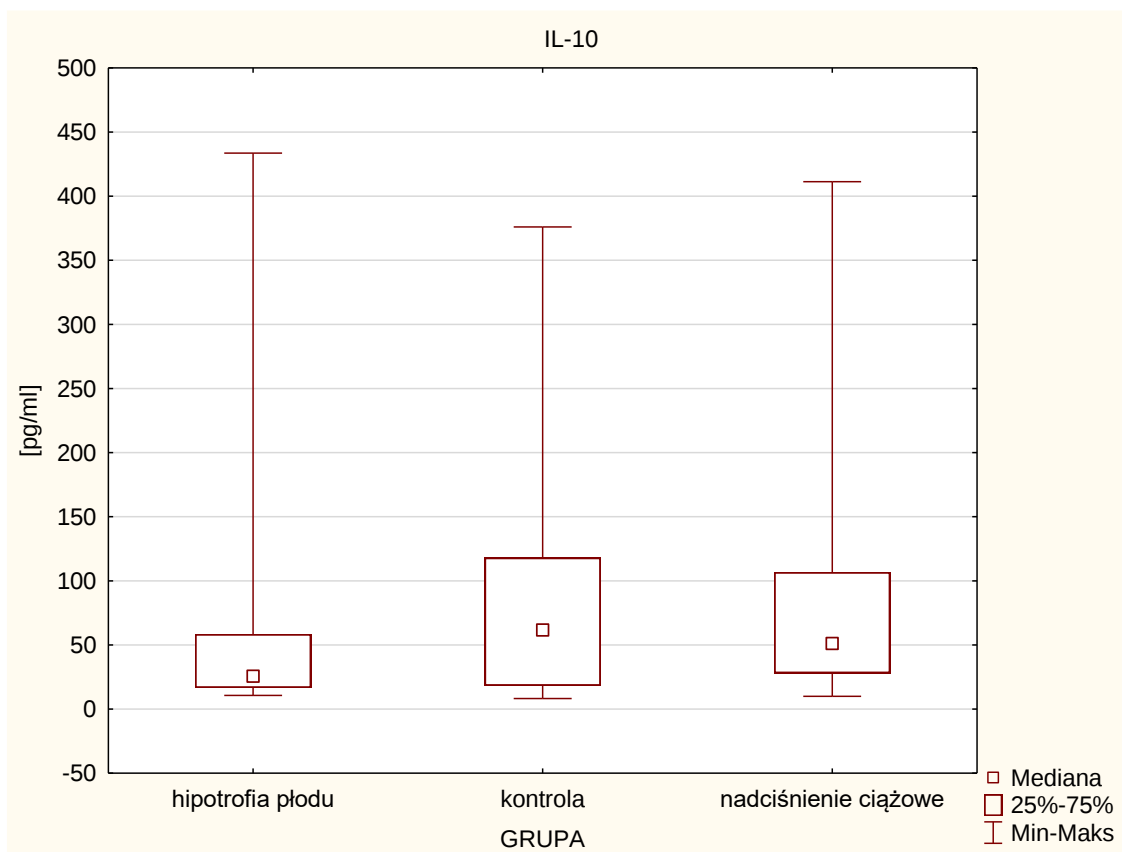
Poziomy stężeń poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która :

- *nie wykazała różnic istotnych statystycznie* pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem tętniczym, a także pomiędzy grupą kontrolną a hipotrofią płodu. ($p > 0,05$).

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 13.

Tabela nr 13. Stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	90,01	8,22	376,08	97,35
Grupa z IUGR	22	61,74	10,61	433,66	110,14
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	105,86	9,92	411,35	121,80
Ogółem	82	86,79	8,22	433,66	108,00



Wykres 11. Wykres przedstawiający stężenia IL-10 w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

B. Stężenie **IL-10** w surowicy krwi pępowinowej

Średnie stężenie IL-10 w grupie kontrolnej wynosiło 109,20 +/- 123,30 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 121,89 +/- 81,96, a w grupie pacjentek z IUGR 45,93 +/- 42,22 pg/ml.

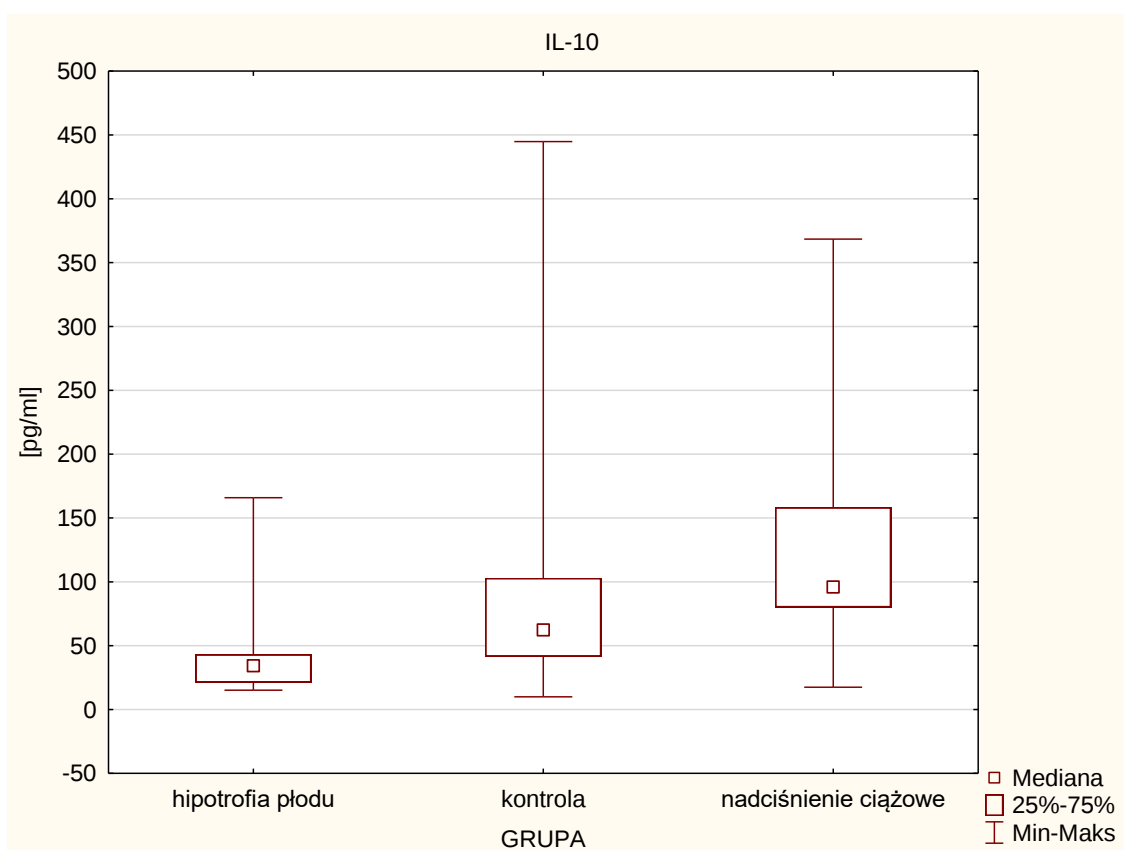
Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która

- nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem tętniczym ($p > 0,05$),
- nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a hipotrofią płodu ($p > 0,05$), mimo zauważalnego spadku stężeń IL-10 w surowicy krwi pępowinowej w badanej grupie z IUGR.

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 14.

Tabela nr 14. Stężenie IL-10 w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	109,20	9,92	444,82	123,30
Grupa z IUGR	22	45,93	15,10	165,95	42,22
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	121,89	17,42	368,49	81,96
Ogółem	82	95,46	9,92	444,82	96,57



Wykres 12. Wykres przedstawiający stężenia IL-10 w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

1.4. Leptyna

A. Stężenie leptyny w surowicy krwi pacjentek.

Stężenie leptyny w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie leptyny w grupie kontrolnej wynosiło 25,54 +/- 1,28 ng/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 39,02 +/- 6,16 ng/ml, a w grupie pacjentek z IUGR 26,02 +/- 1,39 ng/ml.

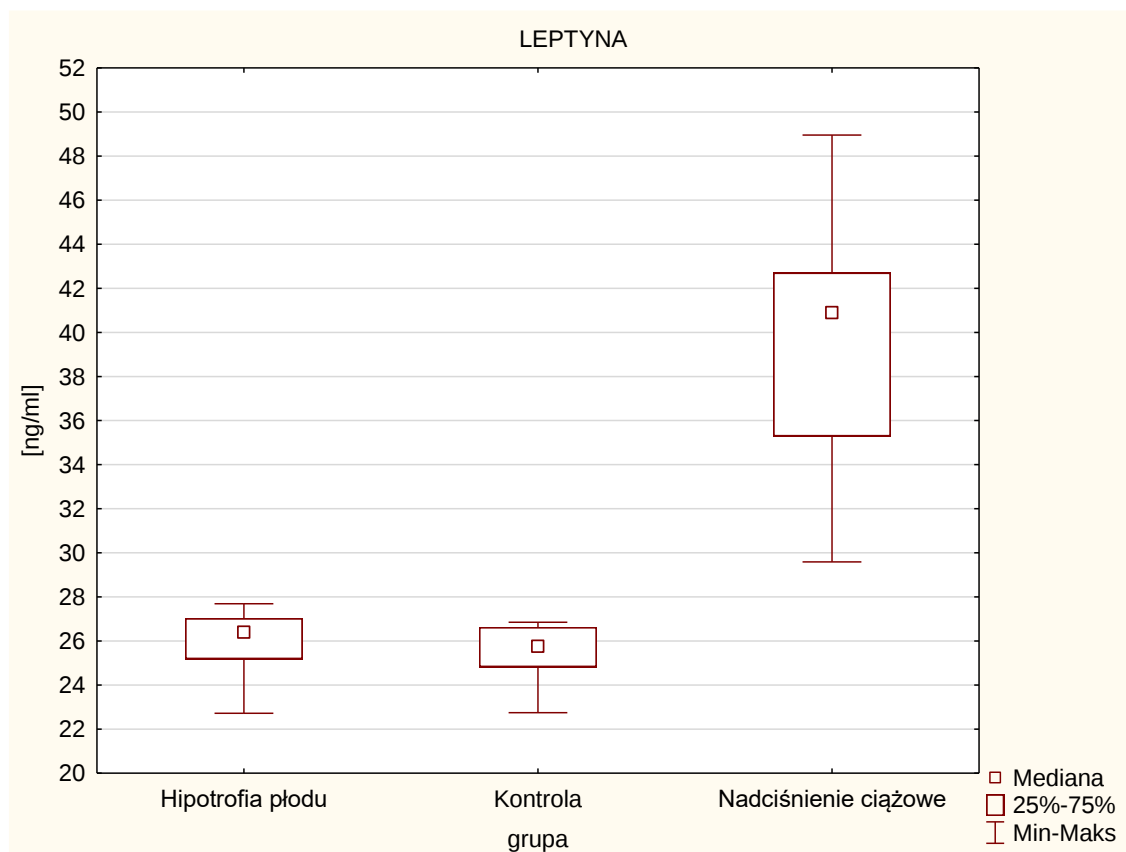
Poziomy stężęń poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

- wykazała różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000005$)
- nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a grupą z hipotrofią płodu ($p>0,05$).

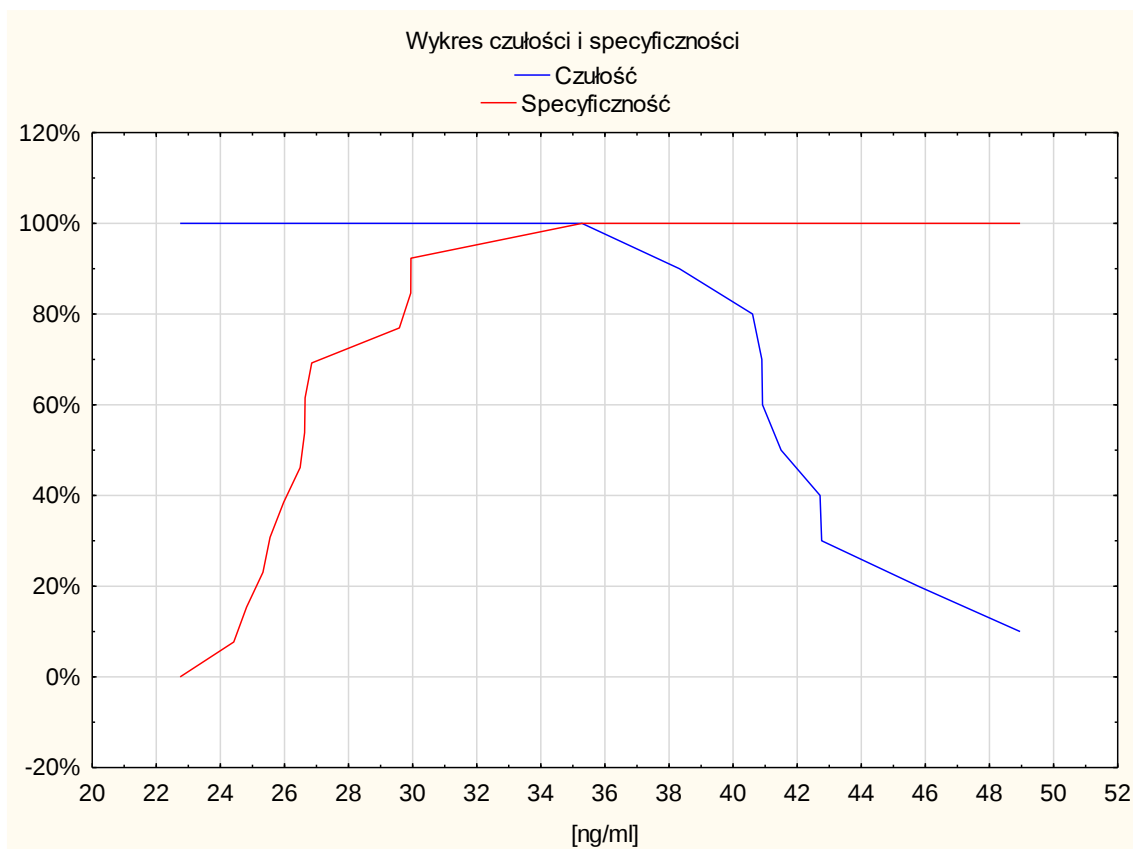
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 15.

Tabela nr 15. Stężenie leptyny w surowicy krwi pacjentek [ng/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	25,54	22,75	26,85	1,28
Grupa z IUGR	22	26,02	22,72	27,69	1,39
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	39,02 *	29,59	48,95	6,16
Ogółem	82	29,37	22,72	48,95	6,72



Wykres 13. Wykres przedstawiający stężenia leptyny w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [ng/ml].



Wykres 14. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia leptyny w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia leptyny.

Wartość predykcyjna stężenia leptyny w surowicy krwi matki dla nadciśnienia ciążowego = 35,28 ng/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia leptyny w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 35,28 ng/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

B. Stężenie leptyny w surowicy krwi pępowinowej.

Stężenie leptyny w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie leptyny w grupie kontrolnej wynosiło 28,28 +/- 1,32 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 53,14 +/- 3,93, a w grupie pacjentek z IUGR 29,74 +/- 1,23 pg/ml.

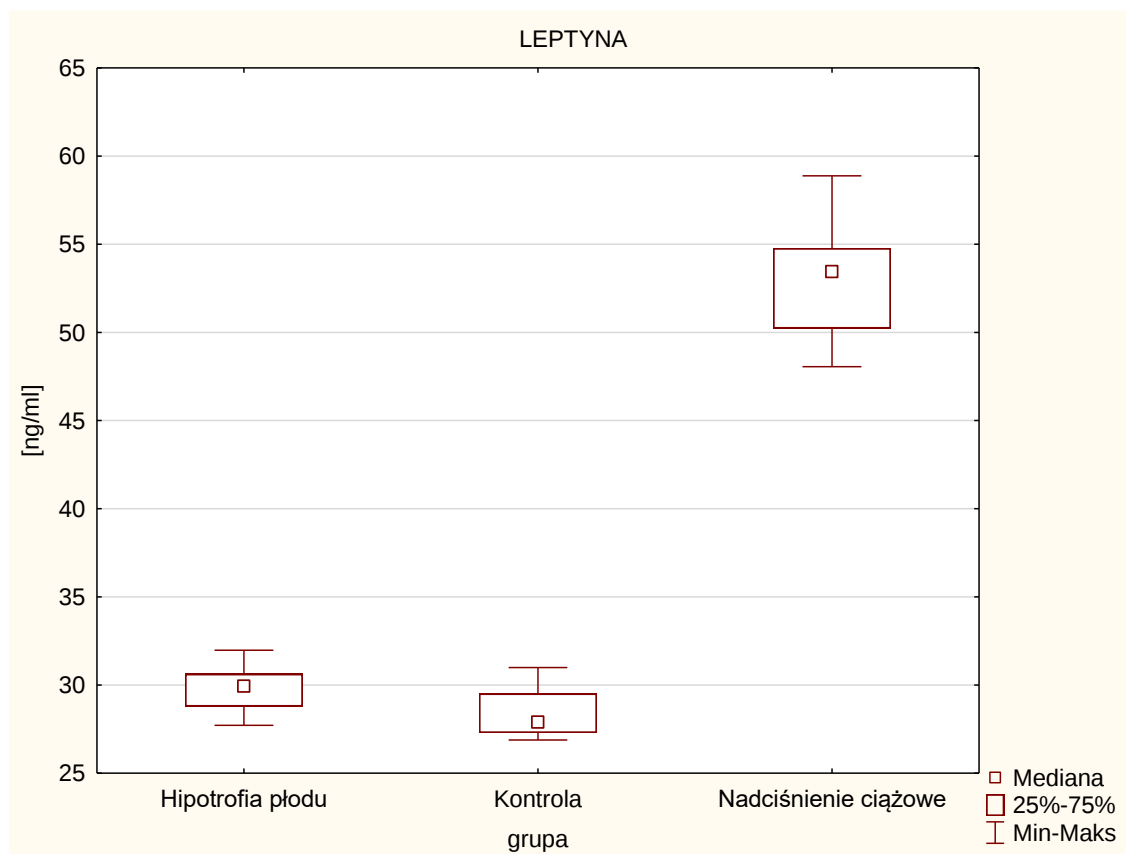
Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

- *wykazała różnice istotne statystycznie* pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000019$)
- *nie wykazała różnic istotnych statystycznie* pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p>0,05$)

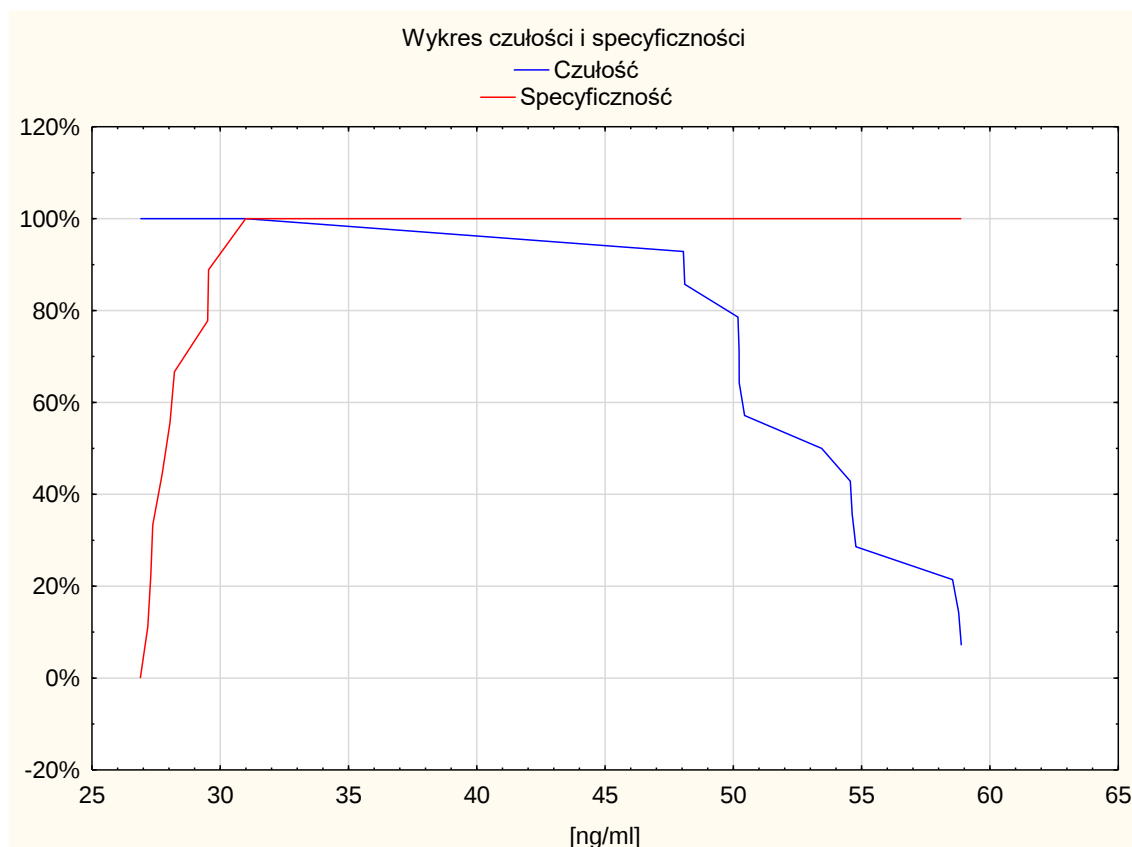
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 16.

Tabela nr 16. Stężenie leptyny w surowicy krwi pępowinowej [ng/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	28,28	26,88	30,99	1,32
Grupa z IUGR	22	29,74	27,71	31,98	1,23
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	53,14 *	48,05	58,88	3,93
Ogółem	82	35,42	26,88	58,88	10,71



Wykres 15. Wykres przedstawiający stężenia leptyny w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [ng/ml].



Wykres 16. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia leptyny w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia leptyny.

Wartość predykcyjna stężenia leptyny w surowicy krwi pępowinowej dla nadciśnienia ciążowego = 30,99 ng/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia leptyny w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 30,99 ng/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

1.5. Angiopoetyna 1

A. Stężenie angiopoetyny 1 w surowicy krwi pacjentek.

Stężenie angiopoetyny 1 w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie angiopoetyny 1 w grupie kontrolnej wynosiło 2611,54 +/- 1170,74 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 5954,26 +/- 2378,94, a w grupie pacjentek z IUGR 6485,22 +/- 2342,64 pg/ml.

Poziomy stężen poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

- wykazała różnice istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000063$)

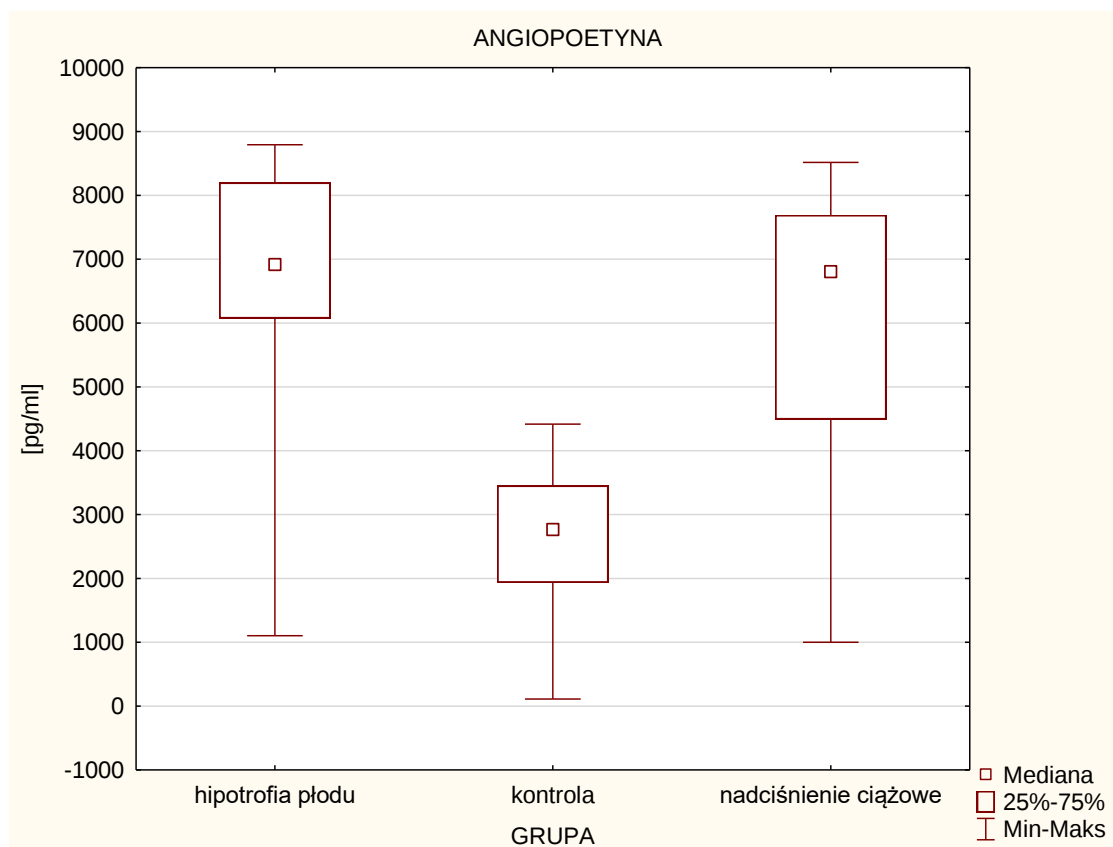
- wykazała różnice istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,0023$)

W obu patologiach ($p<0,05$).

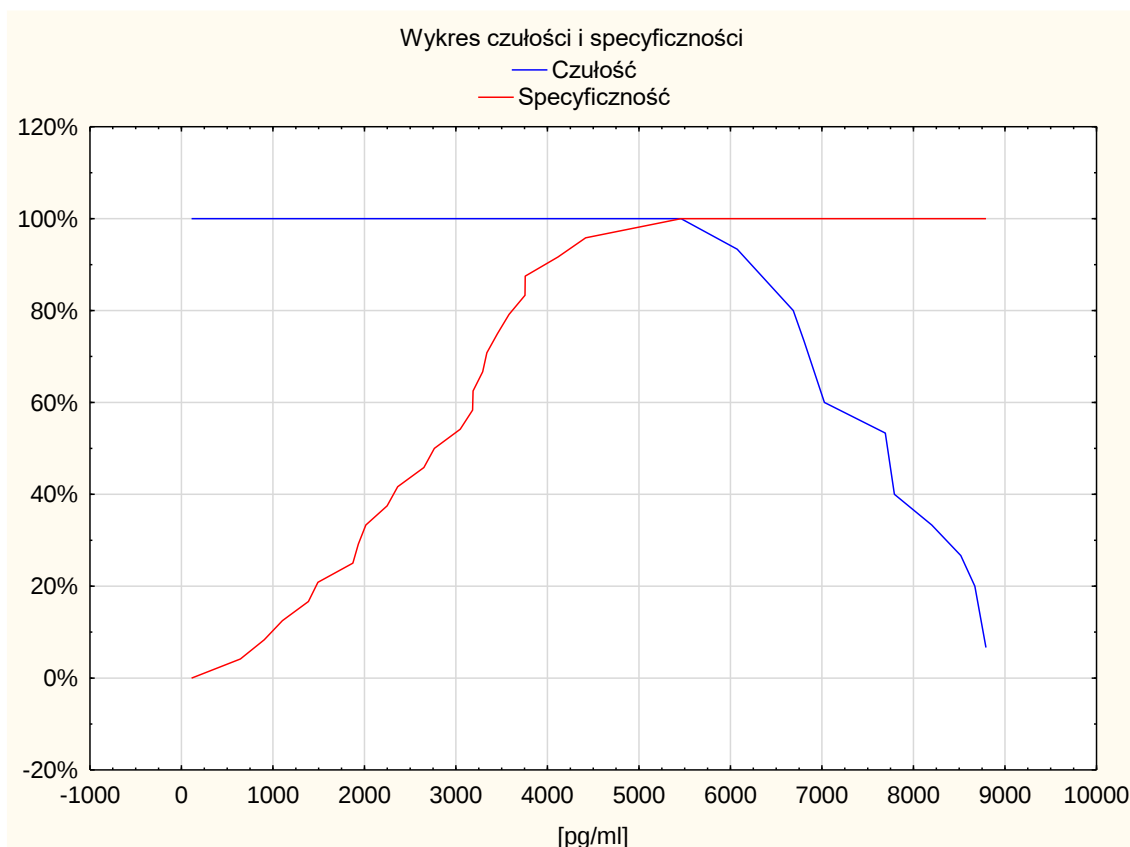
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 17.

Tabela nr 17. Stężenie angiopoetyny 1 w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	2611,54	111,28	4417,15	1170,74
Grupa z IUGR	22	6485,22 *	1103,80	8792,50	2342,64
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	5954,26 *	1000,24	8516,69	2378,94
Ogółem	82	4810,11	111,28	8792,50	2648,01



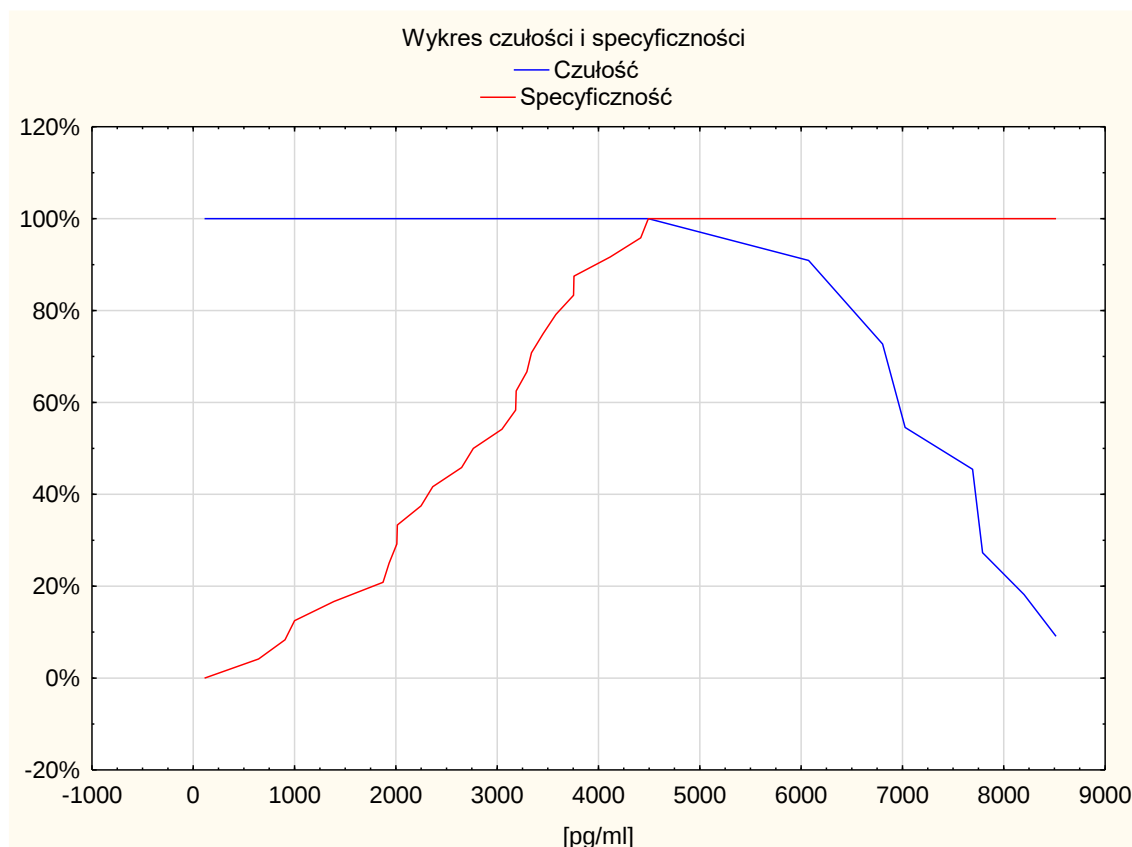
Wykres 17. Wykres przedstawiający stężenia angiotensyny I w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml].



Wykres 18. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

Wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki dla hipotrofii płodu = 5460,87 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 5460,87 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.



Wykres 19. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia angiopoetyny.

Wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki dla nadciśnienia ciążowego = 4491,37 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 4491,37 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

B. Stężenie angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej.

Stężenie angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie angiopoetyny 1 w grupie kontrolnej wynosiło 6659,72 +/- 1833,13 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 10993,34 +/- 1741,67, a w grupie pacjentek z IUGR 11180,64 +/- 1976,28 pg/ml.

Poziomy stężenie poddano analizie statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunna, która:

- wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000016$)

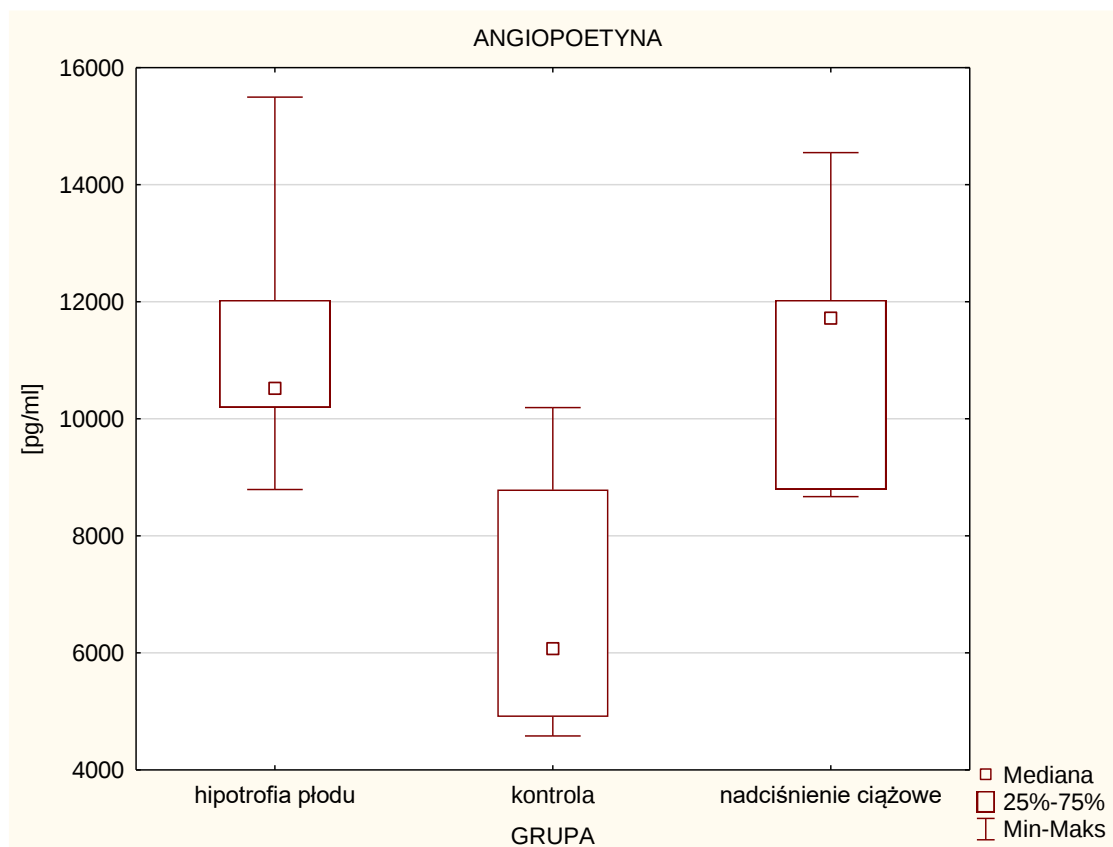
- wykazała różnice istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000128$)

W obu patologiach ($p<0,05$).

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 18:

Tabela nr 18. Stężenie Angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Zmienna	Nważnych	Średnia	Minimum	Maksimum	Odch.std
Grupa kontrolna	30	6659,72	4580,33	10192,16	1833,13
Grupa z IUGR	22	11180,64 *	8792,50	15496,41	1976,28
Grupa z nadciśnieniem ciążowym	30	10993,34 *	8670,74	14549,55	1741,67
Ogółem	82	9441,29	4580,33	15496,41	2828,48



Wykres 20. Wykres przedstawiający stężenia angiotensyny I w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml].



Wykres 21. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

Wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej dla hipotrofii płodu = 8792,50 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 8792,50 pg/ml. Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia IUGR.



Wykres 22. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

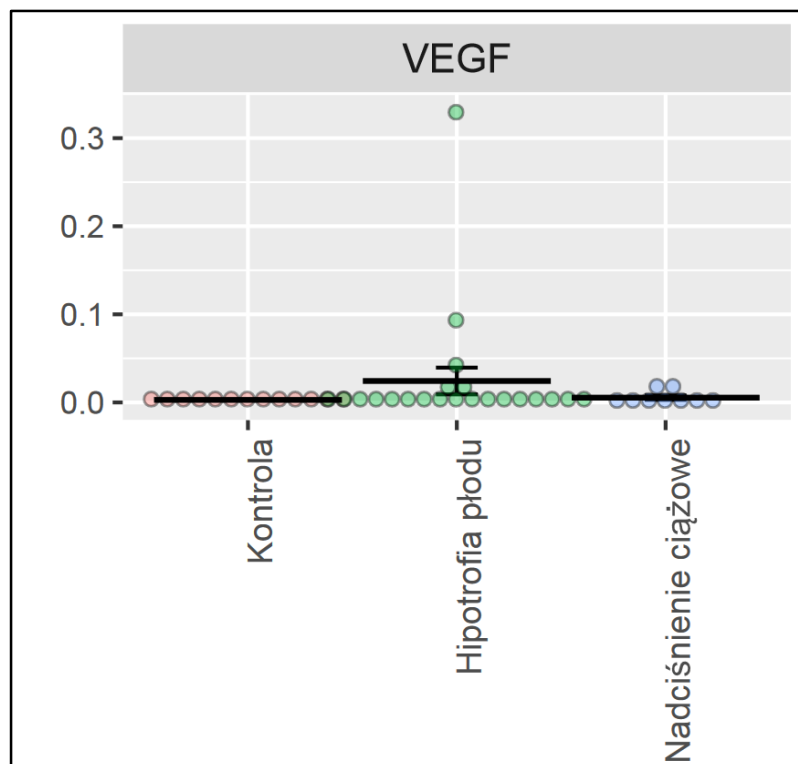
Wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej dla nadciśnienia ciążowego = 8670,74 pg/ml

Na powyższym wykresie wykazano, że wartość predykcyjna stężenia angiopoetyny 1 w odniesieniu do ryzyka wystąpienia nadciśnienia ciążowego wynosi 8670,74 pg/ml . Wartość ta dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

2. Analiza PCR ekspresji genów badanych bialek

Badanie ekspresji genów; naczyniowo-śródbłonkowy czynnika wzrostu (VEGF), łożyskowego czynnika wzrostu (PLGF), leptyny, angiopoetyny i interleukiny-10 względem genu referencyjnego GAPDH, przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-PCR = reverse transcription polimerase chain reaction)

2.1. Badanie ekspresji genu VEGF



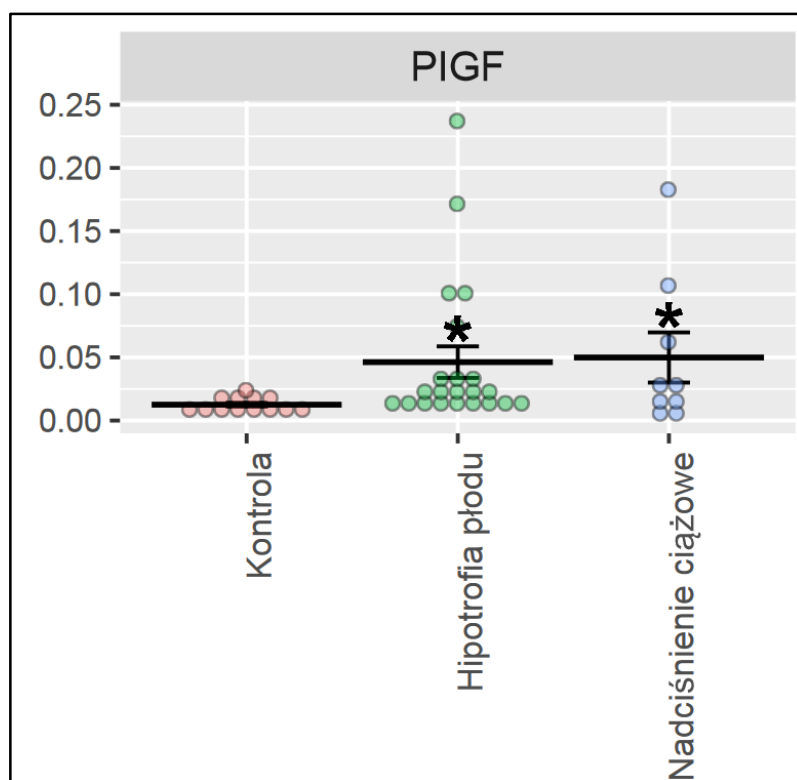
Wykres 23. Półilościowa ocena ekspresji genu VEGF w łożyskach badanych pacjentek.

Powyższy wykres przedstawia poziom ekspresji genu naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) względem genu referencyjnego GAPDH. Słupki przedstawiają słabą ekspresję badanych genów. Uzyskane wartości przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe: grupa kontrolna – 0,003 $\pm$ 0,001, hipotrofia płodu – 0,027 $\pm$ 0,017, naciski ciążowe – 0,006 $\pm$ 0,001.

Wyniki badań wskazują słabą ekspresję genu VEGF w badanych łożyskach, jednak największa ekspresja genu VEGF występuje w grupie z IUGR. Różnice między grupami nie są istotne statystycznie.

Wniosek: Nie stwierdza się zwiększonej ekspresji genu VEGF w badanych łożyskach.

2.2. Badanie ekspresji genu PLGF



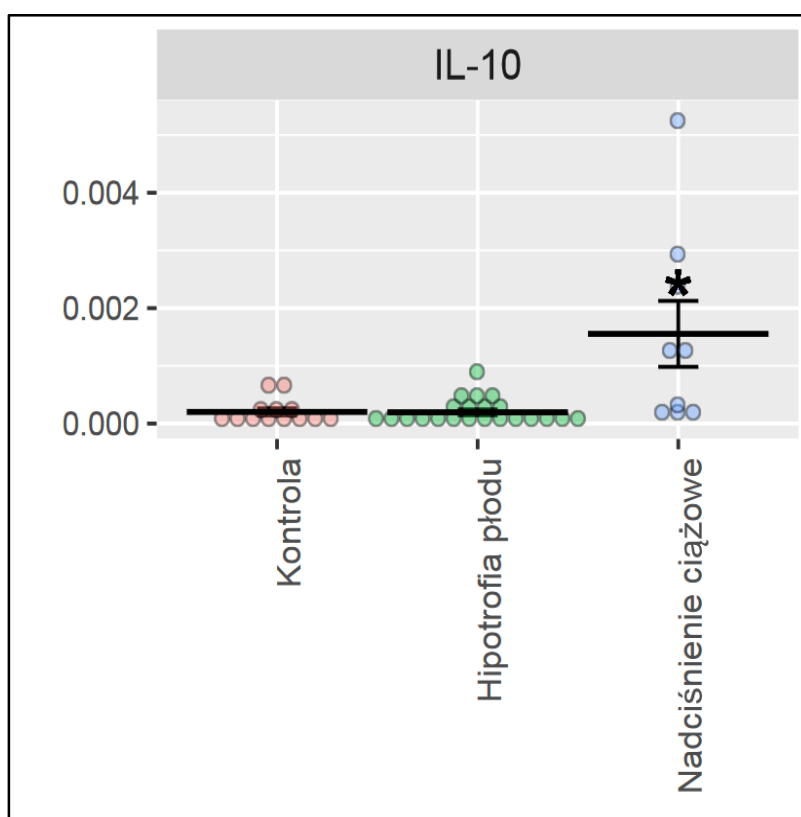
Wykres 24. Półilościowa ocena ekspresji genu PLGF w łożyskach badanych pacjentek.

Powyższy wykres przedstawia ekspresję genu łożyskowego czynnika wzrostu (PLGF) względem genu referencyjnego GAPDH. Słupki przedstawiają względną ekspresję badanych genów w stosunku do ekspresji genu GAPDH. Uzyskane wartości przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe: grupa kontrolna - 0,013 $\pm$ 0,002, hipotrofia płodu - 0,047 $\pm$ 0,014, nadciśnienie ciążowe - 0,098 $\pm$ 0,02 ($p < 0,05$).

Wyniki badań wskazują, że ekspresja PLGF występuje w każdym łożysku. Różnice między grupą kontrolną a grupą z IUGR oraz grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym, są istotne statystycznie, co oznacza zwiększoną ekspresję genu PLGF zarówno w hipotrofii płodu a także u kobiet z nadciśnieniem ciążowym.

Wniosek: Stwierdza się zwiększoną ekspresję genu PLGF w rozwoju IUGR i nadciśnienia ciążowego w badanych łożyskach.

2.3. Badanie ekspresji genu interleukiny 10



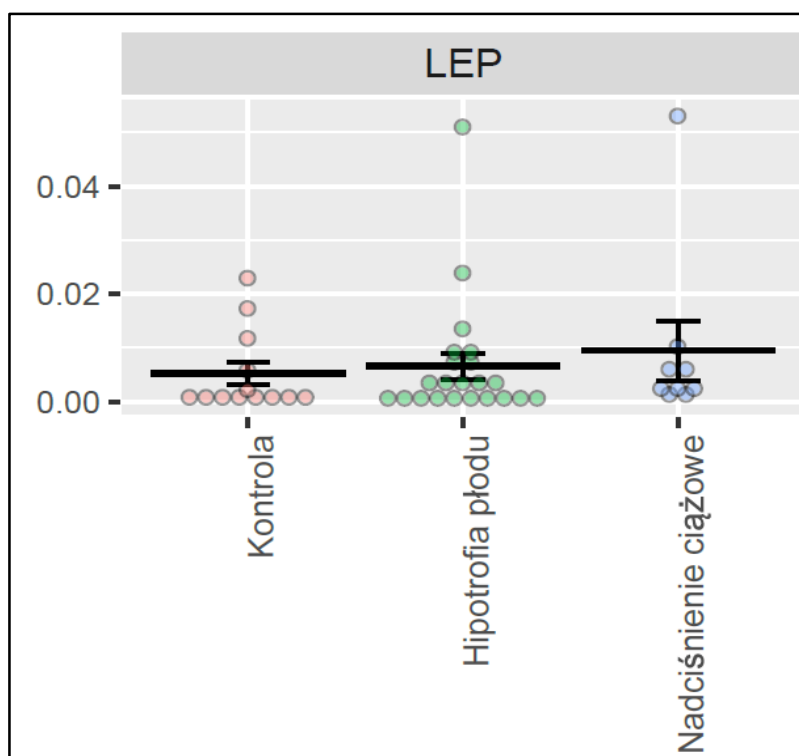
Wykres 25. Półilościowa ocena ekspresji genu IL-10 w łożyskach badanych pacjentek.

Powyższy wykres przedstawia poziom ekspresji genu interleukiny-10 względem genu referencyjnego GAPDH. Słupki przedstawiają słabą ekspresję genu IL-10 w grupie kontrolnej oraz w grupie z IUGR. Uzyskane wartości przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe: grupa kontrolna – 0,0002 $\pm$ 0,0001, hipotrofia płodu – 0,0002 $\pm$ 0,0001, nadciśnienie ciążowe - 0,0016 $\pm$ 0,0005 ($p < 0,05$).

Wyniki badań wskazują, że ekspresja genu IL-10 występuje w każdej grupie badanej, jednak w grupie z nadciśnieniem ciążowym jest ona największa. Różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem tętniczym.

Wniosek: stwierdzono zwiększoną ekspresję genu IL-10 w łożyskach od pacjentek z nadciśnieniem tętniczym.

2.4. Badanie ekspresji genu leptyny



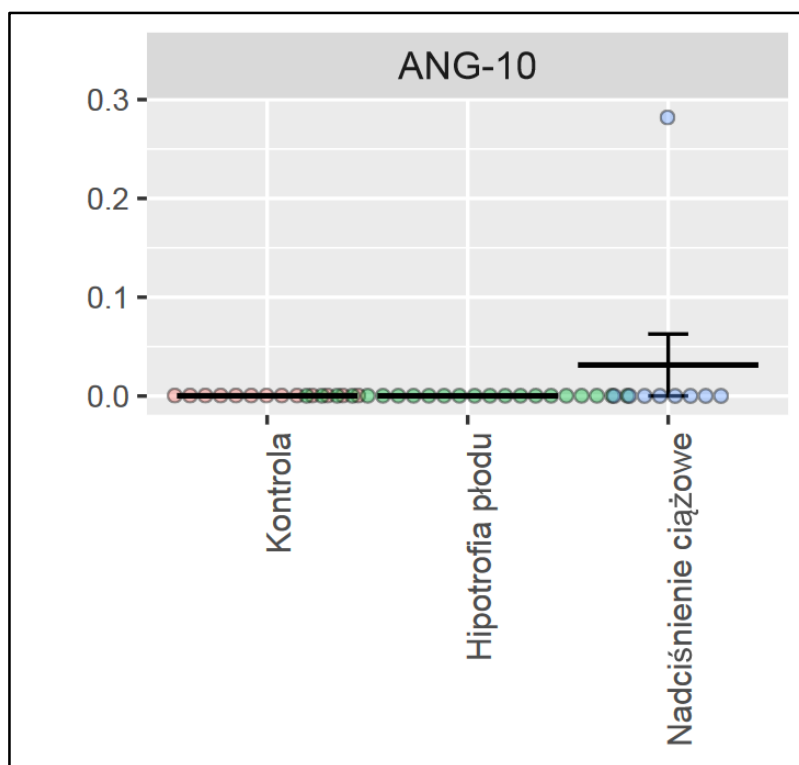
Wykres 26. Półilościowa ocena ekspresji genu leptyny w łożyskach badanych pacjentek.

Powyższy wykres przedstawia poziom ekspresji genu leptyny względem genu referencyjnego GAPDH. Słupki przedstawiają względną ekspresję badanych genów w stosunku do ekspresji genu GAPDH. Uzyskane wartości przedstawiono jako średnią +/- odchylenie standardowe: grupa kontrolna - 0,055 +/- 0,002, hipotrofia płodu - 0,072 +/- 0,002, nadciśnienie ciążowe - 0,096 +/- 0,005.

Wyniki badań wskazują, że ekspresja leptyny występuje w każdym łożysku. Różnice ekspresji pomiędzy badanymi grupami nie są istotne statystycznie.

Wniosek: Nie stwierdza się zwiększonej ekspresji genu leptyny w badanych łożyskach w przypadki rozwoju IUGR i nadciśnienia ciążowego.

2.5. Badanie ekspresji genu angiopoetyny 1



Wykres 27. Półilościowa ocena ekspresji genu Ang-1 w łożyskach badanych pacjentek.

Powyższy wykres przedstawia ekspresję genu angiopoetyny 1 względem genu referencyjnego GAPDH. Słupki przedstawiają brak ekspresji badanego genu w grupie kontrolnej oraz grupie z hipotrofią płodu. Uzyskane wartości przedstawiono jako średnią +/- odchylenie standardowe: grupa kontrolna – brak ekspresji, hipotrofia płodu – brak ekspresji, nadciśnienie ciążowe - 0,033 +/- 0,003.

Wyniki wskazują, że ekspresja genu angiopoetyny 1 występuje tylko w łożysku pacjentek z nadciśnieniem ciążowym.

Wniosek: Wynik nieistotny statystycznie.

VI. DYSKUSJA

W przeprowadzonym badaniu ocenialiśmy rolę czynników angiogennych w rozwoju nadciśnienia ciążowego oraz wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu płodu (IUGR) poprzez porównanie poziomów ekspresji ich genów i produktów białkowych: VEGF, PLGF, interleukiny 10, leptyny i angiopoetyny1. Dla prawidłowego funkcjonowania śródbłonek naczyń niezbędna jest równowaga pomiędzy czynnikami promującymi i hamującymi angiogenezę. [178]

Stan przedrzucawkowy jest zaburzeniem wynikającym z nieprawidłowości łożyska w przebiegu dysfunkcji pobudzonych śródbłonek, wydzielających między innymi substancje powodujące skurcz naczyń, stres oksydacyjny i ich niedotlenienie, co prowadzi w konsekwencji do jego niewydolności. Jednym z najważniejszych powikłań stanu przedrzucawkowego jest hipotrofia płodu, która wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością noworodków.[179]

Pierwsze odkryte jako białka prototypowe z rodziny czynników proangiogennych zostały białka VEGF i jego homolog PLGF. Oba są wydzielane przez łożysko i odpowiadają za proliferację i przeżycie śródbłonek oraz przepuszczalność naczyń. [18]

VEGF i PLGF

Wiele badań nad rolą AGF w angiogenezie i rozwoju patologii ciąży jak stan przedrzucawkowy i IUGR wykazało znaczącą rolę, jaką pełni równowaga między czynnikami pro i antyangiogennymi. W badaniach tych zauważono obniżone stężenia PLGF i VEGF u kobiet z IUGR oraz ze stanem przedrzucawkowym, podczas gdy poziom czynnika antyangiogenego sFlt1 (rozpuszczalna postać receptora dla naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu) u kobiet z tym schorzeniem był podwyższony. [174,180,184]

Wykazano, że ekspresja obu czynników jest stymulowana wzrastającym ciśnieniem parcjalnemu tlenu, a przy jego niskich wartościach zachowują się odwrotnie. [181]

Zaobserwowano, że już w 11–13 tygodniu ciąży stężenia PIGF są niższe u kobiet, u których rozwija się nadciśnienie ciążowe lub stan przedrzucawkowy. [182,183]

sFlt-1 jest silnym inhibitorem aktywności VEGF i PlGF i blokuje ich działanie rozszerzające naczynia oraz hamuje tworzenie rurek śródbłonka. Stwierdzono przyczynową rolę sFlt-1 w patogenezie stanu przedrzucawkowego u matki z podwyższoną ekspresją Flt-1 poprzez profilowanie ekspresji genów w łożyskach. [18]

W dotychczasowych badaniach wykazano, że osoczowe stężenia VEGF u kobiet w ciąży o przebiegu fizjologicznym były istotnie niższe niż u kobiet z preeklamsją. [183,184]

Semczuk-Sikora *et al.* oceniali poziomy stężenie VEGF i PlGF w surowicy krwi pacjentek ze stanem przedrzucawkowym. Wartości stężeń PLGF w surowicach pacjentek z preeklamsją były statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$). Z kolei poziomy stężenie VEGF były w większości przypadków niewykrywalne dostępnymi w handlu testami ELISA. Zbyt niska czułość testów ELISA uniemożliwiła ocenę stężeń VEGF w surowicy kobiet ze stanem przedrzucawkowym w ciąży i wyznaczenie wartości predykcyjnej stężenia VEGF, poniżej której możliwe jest rozwinięcie się badanej patologii ciąży. [191]

Podobne wyniki znacząco niższych stężeń PLGF i nieoznaczalnych stężeń VEGF uzyskano badając surowice ciężarnych z IUGR w II i III trymestrze ciąży i w porównaniu z grupą kontrolną. [192]

W jednym z badań amerykańskich udowodniono obniżony poziom VEGF u kobiet z PREE, jednak zauważono, że jego zmiany podczas ciąży nie zachodziły jak w przypadku PLGF. [188]

Bielecki i wsp. wykazali rozbieżną obserwację, mianowicie stwierdzili wzrost stężenia VEGF w surowicy krwi ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym i nie tłumaczy tego zjawiska. [194]

Główną rolę w obniżeniu stężenia naczyniowych, śródbłonkowych czynników wzrostu u kobiet z chorobami wikłającymi ciążę odgrywa rozpuszczalna forma receptora sFlt-1, który ma zdolność wiązania się zarówno z VEGF jak PLGF. Tam, gdzie dochodzi do nieprawidłowej placentacji, hipoksji śródbłonnów i ich aktywowania, dochodzi do nadprodukcji tego receptora i znaczącego wzrostu jego poziomu w surowicy. Silniejsze powinowactwo sFlt-1 do VEGF tłumaczy bardzo niskie, utrudniające pomiar komercyjnymi Kitami do ELISY poziomy stężenie tego ostatniego w badanych surowicach z patologicznych ciąż. [11,195,196]

Stężenia PLGF oznaczane w III trymestrze ciąży były statystycznie niższe grupie z IUGR. Stężenia VEGF były w większości badań nieoznaczalne zarówno

w II i III trymestrze, a stężenia VEGFR1(receptor) były statystycznie istotnie wyższe zarówno w II jak i III trymestrze. VEGFR1 ma powinowactwo zarówno do VEGF jak PLGF, a spadek obu czynników proangiogennych wraz z czasem trwania ciąży indukuje jego wzrost stężenia w surowicy. Zmiany te prowadzą do uszkodzenia śródbłónka naczyniowego. [185, 192]

Wyniki oznaczeń stężeń VEGF w przeprowadzonym przez nas badaniu są zgodne z powyższymi. Stwierdzono obniżone stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek w grupie z hipotrofią płodu i wyznaczono wartość predykcyjną stężenia VEGF 37,93 pg/ml . Stężenia VEGF tej i poniżej tej wartości mogą wskazywać ryzyko wystąpienia hipotrofii płodu w ciąży.

Natomiast w grupie z PIH zaobserwowaliśmy wzrost VEGF, podobnie jak Bielecki i wsp. w swoim badaniu. [194]. Różnice stężeń VEGF w surowicach matek pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym poddane analizie okazały się nieistotne statystycznie. ($p>0,05$).

Podobne wyniki uzyskaliśmy z analizy statystycznej poziomów stężeń VEGF z surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach kobiet. Wykazaliśmy różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu, natomiast nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p>0,05$). Wartość predykcyjna stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu wynosi 168,88 pg/ml i dzieli grupę badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia hipotrofii płodu.

Przeprowadzając analizę otrzymanych wyników stężeń VEGF w badanych surowicach, zauważyliśmy istotnie wyższy poziom VEGF w surowicy krwi pępowinowej we wszystkich badanych grupach kobiet, co sugeruje jego znaczne miejscowe wydzielanie i udział w angiogenezie łożyskowej.

PLGF uważany jest za obiecujący czynnik prognostyczny rozwoju preeklamsji w ciąży, szczególnie wśród kobiet z czynnikami ryzyka rozwoju tej patologii. Potencjalnie możliwe jest leczenie stanu przedrzucawkowego PLGF, lecz wymaga to dalszych badań. [186]

Henah *et al.* opublikowali badanie, w którym objęto 100 ciężarnych z IUGR ($n=11$) oraz SGA ($N=89$) i na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że PLGF może różnicować IUGR u płodów z małą masą i może stanowić narzędzie do identyfikacji tej patologii ciąży. [187]

Levine *et al.* udowodnili w swojej pracy, że niski poziom PLGF w pierwszym trymestrze ciąży, przed wzrostem sFlt-1, jest czynnikiem ryzyka późniejszego stanu przedrzucawkowego, a stosunek sFlt-1 do PLGF jest lepszym markerem stanu przedrzucawkowego niż którykolwiek sam czynnik. [188]

Stwierdzone w badaniach niskie poziomy wolnego VEGF w surowicach ciężarnych z rozwiniętym stanem przedrzucawkowym nie jest przydatne klinicznie, ponieważ są to poziomy poniżej granicy wykrywalności obecnie dostępnych zestawów ELISA. [188]

Ghosh *et al.* w swoim badaniu kohortowym przeprowadzonym na 722 kobietach w ciąży pojedynczej, przebywających w opiece perinatalnej, którym oznaczano poziom stężenia PLGF w surowicy krwi między 20-22 tygodniem ciąży wykazali, że badanie to może być przydatne w przewidywaniu wczesnego wystąpienia IUGR i preeklampsji w ciąży. [189]

Z kolei w pracy badawczej z podwójnie ślepą próbą przedstawioną przez Chaiworapongsa *et al.*, którzy przebadali 96 kobiet z podejrzaną hipotrofią płodu lub stanem przedrzucawkowym w ciąży i oznaczali u nich poziom stężenia PLGF w surowicy stwierdzili, że jego poziom jest znacząco niższy u kobiet podejrzanych o rozwinięcie tych patologii w ciąży. [190]

Wyniki naszych badań są zgodne z obserwacjami wymienianych autorów. Badania stężeń PLGF w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej cechują się dużą czułością oraz swoistością w predykcji hipotrofii płodu i nadciśnienia ciążowego.

Uzyskane wartości stężeń pozwoliły wyznaczyć wartość predykcyjną stężenia PLGF w surowicy krwi pacjentek w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu i wynosi ona 288,73 pg/ml, natomiast ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego możliwe jest przy wartości stężenia PLGF w surowicy krwi matki 222,11 pg/ml i mniej. Wartości te dzielą grupy badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia IUGR i nadciśnienia ciążowego.

Podobnie zachowywały się poziomy stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej. Uzyskane wyniki pozwoliły wyznaczyć możliwą wartość predykcyjną stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w odniesieniu do ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu i wynosi ona 301,92 pg/ml, natomiast ryzyko wystąpienia nadciśnienia ciążowego możliwe jest przy wartości stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej

430,11 pg/ml i mniej. Wartości te dzielą grupy badanych pacjentek na pacjentki zdrowe i o znacznym ryzyku wystąpienia IUGR i nadciśnienia ciążowego.

Zbliżone wartości stężeń VEGF i PLGF w obu badanych surowicach mogą świadczyć o ich przechodzeniu przez barierę łożyskową.

Jednoczesnym celem pracy było zbadanie ekspresji genów badanych białek proangiogennych, w tym kodujących naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu i łożyskowy czynnik wzrostu.

Semczuk i wsp. w swoim badaniu uzyskali wyższe poziomy transkrypcji PLGF i Flt-1 w tkankach łożyska chorej z PREE w porównaniu do ekspresji tego genu grupy zdrowej. Ekspresję genów normalizowano do β -aktyny. Uzyskane dane wskazywały na regulację w górę PLGF i Flt-1 w łożyskach kobiet z preeklamsją. Nie stwierdzono zwiększonej ekspresji genu dla PLGF w łożyskach kobiet IUGR, nie stwierdzono również zwiększonej transkrypcji VEGF w łożyskach z obu grup chorych. [193]

Szentpeteri *et al.* w badaniu ekspresji genu VEGF-A w łożyskach kobiet z IUGR wykazali jego nadekspresję w porównaniu z grupą kobiet z prawidłową ciążą. Wyniki sugerowały, że wzrost ekspresji genu VEGF-A stymulował angiogenezę w łożysku i był odpowiedzią na jego niedotlenienie w przebiegu IUGR. Zinterpretowano to zdarzenie jako wtórne w rozwoju hipotrofii płodu, a nie czynnik sprawczy. Zauważono dodatnią korelację między aktywnością genu VEGF-A w łożysku a wiekiem ciążowym. [197]

W przeprowadzonych przez nas badaniach ekspresji genów VEGF i PLGF względem genu referencyjnego GAPDH metodą PCR zauważono, że ekspresja PLGF występuje w każdym łożysku. Różnice między grupą kontrolną a grupą z IUGR oraz grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym, są istotne statystycznie, co oznacza zwiększoną ekspresję genu PLGF zarówno w hipotrofii płodu a także u kobiet z nadciśnieniem ciążowym.

Wyniki naszych badań wskazują słabą ekspresję genu VEGF w badanych łożyskach, jednak największa ekspresja genu VEGF występuje w grupie z IUGR. Różnice między grupami nie są istotne statystycznie.

Interleukina 10

Interleukina 10 jest czynnikiem hamującym syntezę cytokin z grupy CSIF czyli cytokiną przeciwzapalną, która hamuje produkcję cytokin prozapalnych. Hipoksja

połączona z niedoborem IL-10 bierze udział w patomechanizmie PIH i niektórych postaci hipotrofii. IL-10 pełni istotną rolę w utrzymaniu równowagi między czynnikami pro- i anty- angiogennymi w jednostce maczynopłodowej. Ma działanie protekcyjne na ciążę. [19,20]

Zespół Tarnowskiej-Mądrej porównywał stężenia cytokin zapalnych, charakterystycznych dla odpowiedzi typu Th1/Th2 w surowicy u kobiet z ciężką postacią nadciśnienia ciążowego i ze stanem przedrzucawkowym do zdrowych kobiet w ciąży. Stwierdzili, że stężenia IL-4 i IL-10 były w obu grupach podobne i stanowi o względnym niedoborze ich ochronnego wpływu na ciążę powikłane nadciśnieniem tętniczym. [198]

Celem badania zespołu Arriaga-Pizano było ustalenie różnicy ekspresji cytokin z grup Th1 i Th2 w surowicy krwi matki, surowicy krwi pępowinowej oraz łożysku u kobiet z preeklamsją w stosunku do zdrowych ciężarnych. Zgodnie z założeniem, że w stanie przedrzucawkowym istnieje zaburzona równowaga faworyzująca profil Th1 cytokin (interferonu gamma, IL2) w stosunku do Th2 (IL4, IL10), ustalono, że jest ona widoczna w pomiarach ich stężeń w krwi obwodowej matki. Dominacja linii cytokin Th1 nad Th2 determinuje odpowiedź immunologiczną w ciąży i prowadzi do nieprawidłowej implantacji łożyska, jego niedokrwienia, a to aktywuje komórki śródbłonna w całym organizmie. Takiego przesunięcia równowagi Th1 do Th2 nie zauważono w surowicy z krwi pępowinowej i kosmkach łożyska. [199]

Badanie Azizieh i Raghupathy potwierdziło wcześniejsze doniesienia wskazujące na jej ważną rolę w rozwoju prawidłowej ciąży. Porównano stężenia IL-10 w zdrowych ciążach z ich poziomami w ciążach patologicznych. Potwierdzili, że jej niskie poziomy stężeń w krwi obwodowej matki związane są z powikłaniami ciąży, w tym PREE oraz IUGR. [200]

Z kolei Celik *et al.* porównywali stężenia IL-2, IL-10 i IL-12 w surowicy krwi kobiet w stanie przedrzucawkowym z lub bez IUGR, ze zdrowymi kobietami w ciąży. Uzyskali podwyższone poziomy IL-10 i IL-2 w surowicy krwi w PREE powikłanym IUGR i może to świadczyć o ich prawdopodobnej roli w rozwoju hipotrofii płodu. [201]

W badaniu przeprowadzonym przez Conrad *et al.* nad rolą krążących cytokin zapalnych w patogenezie stanu przedrzucawkowego mierzono poziomy stężeń TNF α i β , IL-1 α i β oraz IL-6 i IL-10 w grupach kobiet z PREE, z przemijającym nadciśnieniem ciążowym i zdrowych ciężarnych.

W analizie wyników stężeń badanych cytokin stwierdzono wzrost TNF α i IL-6 w osoczu kobiet z preeklampsją i nadciśnieniem ciążowym w stosunku do zdrowych ciężarnych. Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w poziomach stężeń IL-1 β i IL-10 między grupami.

W naszym badaniu ocenialiśmy poziomy stężenie IL-10 w surowicy krwi matki i w surowicy krwi pępowinowej w ciążach z nadciśnieniem oraz powikłanych hipotrofią płodu.

Analiza statystyczna wyników otrzymanych z krwi matki nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem tętniczym, a także pomiędzy grupą kontrolną a hipotrofią płodu w obu badanych surowicach.

Opierając się na naszej analizie, można wysunąć wniosek, że nadciśnienie ciążowe oraz IUGR nie wpływają na zmiany stężeń IL-10 w surowicy krwi matki, jak również w surowicy krwi pępowinowej. Zauważono spadek stężeń IL-10 w surowicy krwi pępowinowej u pacjentek z IUGR w odniesieniu do pacjentek z grupy kontrolnej. Różnice stężeń poddane analizie okazały się nieistotne statystycznie.

Leptyna

W czasie trwania ciąży obserwuje się zmiany stężeń leptyny we krwi, gdzie najwyższe wartości osiąga w II trymestrze i pozostają na stałym poziomie do końca ciąży, mimo dalszego wzrastania łożyska. [203]

Szybki spadek stężenia leptyny we krwi natychmiast po porodzie związany jest z wydalaniem łożyska. [204]

Obniżenie stężenia leptyny u ciężarnych i u noworodków kojarzone jest z opóźnieniem wewnątrzmacicznego wzrostu płodu. [205]

Hassink *et al.* w swoim badaniu nad rolą łożyskowej leptyny w rozwoju płodu i noworodków założyli, że produkowana przez łożysko leptyna spełnia zadanie czynnika wzrostu, odgrywa znaczącą rolę w sygnałach płodowo-matczyńskich i informuje płód o stanie odżywienia matki, przez co pełni istotną funkcję w jego rozwoju. Zauważyli, że stężenia leptyny w czasie porodu korelują dodatnio z masą urodzeniową noworodka, a to świadczy o jej zaangażowaniu w prawidłowy rozwój płodu. [206]

Część autorów uważa poziom leptyny we krwi za marker wydolności funkcjonalnej łożyska. [2007]

Karowicz-Bilińska zauważyła w swoim badaniu, że średnie stężenie leptyny u ciężarnych z hipotrofią wewnątrzmaciczną płodów jest niższe od występujących w ciąży fizjologicznej. Różnice średnich wartości stężeń w grupach wynikają z faktu, że leptyna jest produkowana również przez łożysko, a w IUGR łożyska są mniejsze i mamy do czynienia z ich dysfunkcją. [208]

Natomiast Pighetii tłumaczył, że niższe stężenia leptyny w surowicy krwi ciężarnych z IUGR są spowodowane mniejszą zawartością tkanki tłuszczowej u płodów hipotroficznych. [209]

Podobnie zachowuje się leptyna w krwi ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym. Jest to patologia, która również wiąże się z nieprawidłową budową łożyska i jego dysfunkcją, bez zmiany jego wielkości. Wydaje się, że łożyskowa produkcja leptyny jest swoistą odpowiedzią tego narządu na trudne warunki tlenowe i odżywcze dla rozwoju płodu. (hipoksja w PREE, niedożywienie w IUGR). [210]

Semczuk-Sikora i wsp. badali pacjentki z preeklampsją i wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrastania płodu i porównywali z kobietami w ciąży prawidłowej. Oznaczano poziomy stężenia leptyny w surowicy krwi matki w III trymestrze ciąży. Analizowano również masę urodzeniową noworodków w odniesieniu do stężeń surowiczej leptyny. Stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia tego parametru w grupie kobiet z PREE w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy z IUGR. Wyniki dowodzą udziału leptyny patomechanizmie preeklampsji. Nie stwierdzono takiej reguły w grupie z IUGR. W analizie korelacji stężeń leptyny z masą urodzeniową noworodka nie wykazano istotności statystycznej. [34]

Do podobnych wniosków doszli Al-Shahat *et al.* badając rolę leptyny i endotheliny-1 w IUGR pośród ciężarnych bez oraz z rozwiniętym zespołem przedrzucawkowym. Znacząco wyższy poziom stężeń leptyny uzyskali w surowicach krwi matek z PREE, w porównaniu z grupą kontrolną i z samym IUGR. Zbadali, że stężenie leptyny w krwi matki koreluje ze stopniem ograniczenia wzrostu płodu, który wynika z pogorszenia funkcji łożyska. [211]

W badaniu Yildiz *et al.* porównywano poziomy stężenie leptyny w surowicy krwi matki do pępowinowej w przebiegu IUGR. Stwierdzono jej znacząco niższe stężenia u noworodków z IUGR i u ich matek w porównaniu z grupą kobiet zdrowych i ich dziećmi o prawidłowej masie urodzeniowej. [205]

W naszym badaniu ocenialiśmy poziomy stężenie leptyny w ciążach z hipotrofią płodu i nadciśnieniem ciążowym odpowiednio w surowicy krwi matki i krwi

pępowinowej. Zauważyliśmy istotny wzrost stężenia leptyny w surowicy matek z NIC, co pozwoliło wyznaczyć wartość predykcijną stężenia leptyny 35,28 ng/ml, powyżej której może rozwinąć się choroba. Badanie nie wykazało natomiast różnic istotnych statystycznie w stężeniach leptyny u matek pomiędzy grupą kontrolną a grupą z hipotrofią płodu.

Podobne wyniki uzyskano badając krew pępowinową na obecność leptyny. Uzyskano zbliżone poziomy stężeń w grupie kontrolnej i z IUGR, a wykazane różnice nie były istotne statystycznie.

Wyższe stężenia pępowinowe leptyny odnotowano w grupie z nadciśnieniem ciążowym w stosunku do grupy kontrolnej, a różnice stężeń były istotne statystycznie. Pozwoliło to wykreślić wartość predykcijną stężenia leptyny w surowicy krwi pępowinowej 30,99 ng/ml. Wzrost leptyny w krwi pępowinowej powyżej tej wartości może świadczyć o ryzyku wystąpienia nadciśnienia ciążowego.

We wszystkich trzech badanych grupach poziomy stężeń leptyny były wyższe w surowicy krwi pępowinowej niż uzyskane z surowicy krwi pacjentek. Dowodzi to produkcji leptyny przez komórki trofoblastyczne łożyska.

Uzyskane wyniki w większości są zgodne z opisanymi przez innych autorów.

W badaniu ekspresji genu leptyny względem genu referencyjnego GAPDH w łożyskach badanych grup kobiet ustalono, że ekspresja leptyny występuje w każdym łożysku, a różnice ekspresji pomiędzy badanymi grupami nie są istotne statystycznie. Nie stwierdzono zwiększonej ekspresji genu leptyny w badanych łożyskach w przypadku rozwoju IUGR i nadciśnienia ciążowego.

Laivuori i inni oceniali związek pomiędzy ekspresją genów leptyny w łożysku, stężeniem białka leptyny w łożysku i stężeniem leptyny w osoczu zdrowych kobiet ciężarnych, kobiet ze stanem przedzucawkowym i kobiet z IUGR. Ustalili, że ekspresja genu leptyny w łożysku jest wyższa tylko w grupie kobiet z przedwczesnym stanem przedzucawkowym. Ekspresja genu łożyskowej leptyny nie różniła się pomiędzy grupami z IUGR i kontrolną. [212]

W badaniu zauważono, że mimo podobnych mechanizmów nieprawidłowej przebudowy łożyska w obu patologiiach ciąży, ekspresja genów leptyny wyższa była jedynie w grupie z wczesną postacią preeklampsji (z towarzyszącym IUGR) i wynika z niedotlenienia łożyska, które jest konsekwencją zmniejszonej perfuzji łożyska, natomiast stężenie leptyny w surowicy matki wyższe było w grupie z późną postacią stanu przedzucawkowego (bez IUGR). [212]

Grosfeld i wsp. rzeczywiście wykazali, że ekspresja genów leptyny jest regulowana w górę przez niedotlenienie za pośrednictwem mechanizmu transkrypcji i może obejmować różne patologie ciąży związane z niedotlenieniem. [213]

Odkrycie, że ekspresja genu leptyny w niedotlenionym łożysku z ciąż powikłanych IUGR nie różni się w porównaniu z grupą kontrolną sugeruje, że istnieją dodatkowe czynniki modulujące ekspresję tego genu w łożysku. Jednym z takich czynników jest insulina, która także odpowiada za regulację w górę ekspresji genu leptyny w łożyskach kobiet z hipotrofią płodu. Prawdopodobne jest, że w IUGR komórki łożyska produkujące leptynę nie są hipoksyczne, tzn., że ekspresja leptyny nie jest zależna od spadku prężności tlenu w komórce. [212]

W innym badaniu na poziomie molekularnym stwierdzono zwiększoną ekspresję genu i syntezy leptyny w łożysku ciężarnych z IUGR. [214]

Angiopoetyna 1

Istotną rolę w procesie angiogenezy odgrywa również angiopoetyna 1, która jest czynnikiem wzrostu swoistym dla komórek śródbłónka i we współpracy z VEGF bierze udział w tworzeniu się naczyń krwionośnych oraz zachowaniu ich integralności. Jej antagonistą jest angiopoetyna 2 i poprzez receptory Tie1 i Tie2 uczestniczą w patogenezie hipotrofii płodu oraz nadciśnienia ciążowego.

Ang-1 jest ligandem receptora kinazy tyrozynowej Tie2, którego obecność reguluje adhezję różnicujących się komórek śródbłónka oraz ich proliferację podczas formowania i dojrzewania naczyń. Ang-2 poprzez receptor Tie1 reguluje intensywność wzrostu naczyń. Obie działają w ścisłej współpracy z VEGF i odpowiadają za dojrzewanie nowotworzonych naczyń. Ang-1 moduluje dojrzewanie naczyń w bardziej złożone i większe struktury, wpływa na spójność i stabilizację całego naczynia. Nadmiar Ang-1 powoduje powstawanie liczniejszych i bardziej rozgałęzionych naczyń włosowatych. Ang-2 jest antagonistą Ang-1 i w takiej roli reguluje intensywność wzrostu naczyń. [19]

W stanie przedrzucawkowym i IUGR, patologiach ciąży, gdzie dochodzi do nieprawidłowego utlenowania łożyska oraz hipoksji płodu, zmieniona jest struktura naczyniowa łożyska. Zmniejszone ciśnienia parcjalne tlenu powodują w kosmkach łożyskowych zwiększoną transkrypcję mRNA Ang-2 i wzrost stężenia jego produktu

białkowego Ang-2, a zmniejszoną dla Ang-1. Hipoksja ma zatem przeciwny wpływ na ekspresję genów Ang-1 i Ang-2. [215]

Inne niż w założeniach wyniki otrzymali Zhang i wsp. w badaniu łożysk od kobiet z preeklampsją. W porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, tkanki łożyska od chorych kobiet miały obniżony poziom mRNA Ang-2, natomiast w poziomach mRNA Ang-1 nie było różnic. Wyniki świadczą o złożonym charakterze regulacji mechanizmów ekspresji genów obu angiopoetyn w łożysku. [215]

Nadar i wsp. badali hipotezę o zaburzonej równowadze między czynnikami pro i antyangiogennymi w PIH, w tym Ang-1 i Ang-2. W przeprowadzonej analizie wykazali, że w badanej grupie ciężarnych poziom stężenia Ang-1 w surowicy był istotnie wyższy, a Ang-2 znacząco niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Wyraźnie podwyższone poziomy Ang-1 oraz Tie2 z jednoczesnym obniżeniem poziomu Ang-2 u kobiet z nadciśnieniem ciążowym w stosunku do zdrowych, świadczą o niepodważalnej roli angiopoetyn w patogenezie tej patologii ciąży. [216]

Z kolei Stepan i wsp. w z swoim badaniu dowiedli, że zaburzona angiogeneza z nieprawidłową transformacją naczyń łożyskowych w hipotrofii płodu związana jest z obniżonymi stężeniami VEGF oraz angiopoetyny 1, a zwiększonymi stężeniami rozpuszczalnej endogliny. [217]

Dunk *et al.* wskazali obniżoną ekspresję Ang2 w IUGR i jej potencjalny udział w rozwoju naczyń w kosmkach łożyskowych. Ang-2 odgrywa rolę w angiogenezie łożyskowej przez cały okres trwania ciąży, a Ang-1 odpowiada za dojrzewanie i utrzymywanie powstałych naczyń w późnej ciąży. [218]

IUGR charakteryzuje się występowaniem małego łożyska ze zmniejszoną proliferacją cytotrofoblastów wraz ze słabo unaczynionymi kosmkami, co prowadzi do niedotlenienia płodu, a za cechy te odpowiadają zmiany w poziomach działających lokalnie czynników angiogennych. [219]

Badanie Dunk *et al.* pokazało znaczne obniżenie poziomu Ang-2 w ciężkiej hipotrofii płodu w porównaniu z prawidłowymi łożyskami w III trymestrze ciąży. Przy założeniu, że Ang-1 i Ang-2 działają antagonistycznie na komórki śródbłónka, wyniki tego badania sugerują przedwczesne dojrzewanie naczyń z nieprawidłowym rozwojem unaczynienia kosmków końcowych przy podwyższonym poziomie Ang-1, a obniżonym poziomie Ang-2. [218,220]

W naszym badaniu ocenialiśmy poziomy stężenie angiopoetyny 1 w ciążach z wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu i z nadciśnieniem ciążowym

w surowicy krwi pacjentek oraz krwi pępowinowej. Ujawniliśmy istotny wzrost stężenia angiopoetyny 1 w surowicy matek w obu patologiach ciąży i wyznaczyliśmy dla nich wartości predykcyjne stężenia angiopoetyny 1, powyżej których możliwe jest rozwinięcie się omawianych chorób. Dla IUGR wartość ta wyniosła 5460,87 pg/ml, a dla PIH 4491,37 pg/ml.

Podobne wyniki uzyskaliśmy badając krew pępowinową na obecność angiopoetyny1. Uzyskaliśmy wyższe poziomy stężen Ang-1 zarówno w grupie z IUGR, jak w grupie z PIH w porównaniu z grupą kontrolną, a wykazane różnice były istotne statystycznie.

Na podstawie takich wyników wykreśliliśmy wartości predykcyjne stężenia Ang-1 w surowicy krwi pępowinowej 8792,50 pg/ml w grupie z IUGR oraz 8670,74 pg/ml w grupie z nadciśnieniem ciążowym. Stężenia Ang-1 w krwi pępowinowej powyżej tych wartości może świadczyć o ryzyku wystąpienia obu patologii ciąży.

We wszystkich trzech badanych grupach poziomy stężen Ang-1 były wyższe w surowicy krwi pępowinowej niż uzyskane z surowicy krwi pacjentek. Dowodzi to zwiększonej lokalnie ekspresji Ang-1 w komórkach trofoblastycznych łożyska.

Otrzymane wyniki zgodne są z opisywanymi przez przytaczanych autorów: stężenia surowicze Ang-1 są większe w obu omawianych patologiach ciąży, przy czym wyższe poziomy tego czynnika angiogennego obserwuje się w krwi pępowinowej. Zaburzona angiogeneza w IUGR i PIH manifestuje się wyższym poziomem stężenia Ang-1 w surowicy krwi matki i najwyższymi w krwi pępowinowej.

W badaniu ekspresji genu angiopoetyny 1 względem genu referencyjnego GAPDH w łożyskach badanych grup kobiet nie stwierdzono ekspresji genu Ang-1 w grupie kontrolnej i grupie z IUGR. Stwierdzono słabą ekspresję badanego genu w grupie z nadciśnieniem ciążowym, jednak wyniki te nie są istotne statystycznie. Nie stwierdzono zwiększonej ekspresji genu Ang-1 w zdrowych łożyskach, jak również w przypadku rozwoju IUGR i nadciśnienia ciążowego.

VII. WNIOSKI

1. Wartości stężeń badanych czynników angiogennych w surowicy krwi matki i surowicy krwi pępowinowej kobiet z nadciśnieniem ciążowym oraz IUGR wskazują na rolę zaburzonej angiogenezy w tych patologiach.
2. Zmienione wartości stężeń VEGF, PlGF, IL-10, leptyny i angiopoetyny-1 wskazują na niedotlenienie i uszkodzenie komórek śródbłónka w przebiegu nadciśnienia ciążowego i IUGR.
3. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie wartości predykcyjnych wystąpienia nadciśnienia ciążowego bądź IUGR poprzez określenie stężeń analizowanych czynników angiogennych.
4. Analiza ekspresji genów badanych czynników angiogennych oceniana na poziomie mRNA w łożyskach kobiet z nadciśnieniem ciążowym i IUGR wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji genu PlGF w obu patologiach i IL-10 w nadciśnieniu ciążowym.

VIII. STRESZCZENIE

Nadciśnienie tętnicze w przebiegu ciąży występuje u około 5-10% kobiet, a u pierwiastek częstość ta wzrasta nawet do 20%. Jest ono przyczyną zwiększonego ryzyka powikłań okołoporodowych oraz zgonów zarówno matek jak i noworodków. Istnieje wiele teorii dotyczących etiologii nadciśnienia, jak dotąd jednak nie poznano w pełni jego etiopatogenezy, szczególnie nadciśnienia indukowanego ciążą (NIC, PIH). W ostatnich latach pojawiło się nowe spojrzenie na nadciśnienie jako choroby wynikającej z nieprawidłowej odpowiedzi na czynniki proangiogenne (AGF).

Hipotrofia płodu jest częstym powikłaniem związanym z ciążą rozpoznawanym w momencie, gdy dwukrotnie wykonane pomiary płodu w czasie ciąży wykazują zbyt wolne tempo wzrastania i / lub masa ciała płodu mieści się poniżej 10 percentyla w stosunku do wieku płodowego. Znanych jest wiele czynników ryzyka tego powikłania, jednakże nadal często nie udaje się określić jego etiologii. Rozwój hipotrofii może wynikać ze schorzeń dotyczących samego płodu, stanu zdrowia matki, a także funkcji łożyska. Nieprawidłowości dotyczące płodu (zaburzenia chromosomalne, wady anatomiczne), choroby matki (cukrzyca, nadciśnienie, choroby zakaźne), styl życia (palenie papierosów, spożywanie alkoholu), a także niewydolność łożyska mogą stanowić przyczynę wystąpienia tego powikłania. Patomechanizm opóźnienia wzrastania wewnątrzmacicznego płodu, ma charakter złożony i w dalszym ciągu jest przedmiotem badań. Uważa się, że jedną z możliwych przyczyn stanowią mogą zaburzenia łożyskowej angiogenezy.

Angiogeneza jest to proces tworzenia nowych naczyń włosowatych na bazie już istniejących naczyń krwionośnych. Szczególnie uprzywilejowanym miejscem dla angiogenezy jest układ rozrodczy kobiet (cykl miesięczkowy, jajczkowanie, regeneracja błony śluzowej macicy, podtrzymywanie funkcji ciała żółtego, implantacja zarodka w błonę śluzową macicy, utworzenie łożyska). Angiogeneza jest również podstawą prawidłowego rozwoju zarodka oraz wzrostu płodu i noworodka. Nieprawidłowy rozrost łożyskowego drzewa kosmkowego może skutkować rozwojem wielu chorób wikłających przebieg ciąży i rozwój płodu. Poznano wiele czynników regulujących angiogenezę, o działaniu pro- bądź antyangiogennym.

Celem pracy była ocena potencjalnej roli wybranych czynników angiogennych w nadciśnieniu ciążowym i hipotrofii płodu. Cel ten realizowano przez :

1. ocenę stężeń wybranych czynników angiogennych: łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF), naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF), angiopoetyny-1 (Ang-1), interleukiny 10 (Il-10) oraz leptyny (Lep) w surowicy krwi kobiet z nadciśnieniem ciążowym oraz hipotrofią płodu.
2. ocenę stężeń oznaczanych czynników angiogennych w surowicy krwi pępowinowej badanych grup pacjentek.
3. określenie, czy pomiar stężeń wymienionych czynników angiogennych w surowicach krwi może być użyteczny w predykcji obu jednostek chorobowych u ciężarnych.
4. ocenę ekspresji genów badanych czynników angiogennych metodą RT PCR w łożyskach analizowanych grup pacjentek.

Badaniami objęto 82 pacjentki hospitalizowane w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety oraz w Oddziale Porodowym GPSK w Poznaniu w latach 2013-2016, w tym 22 pacjentki z ciążą powikłaną IUGR, 30 pacjentek z ciążą powikłaną nadciśnieniem tętniczym oraz 30 pacjentek z ciążą o prawidłowym przebiegu. Po uzyskaniu pisemnej zgody pacjentek na wzięcie udziału w badaniu pobrano materiał biologiczny do zaplanowanych badań :

1. 5ml krwi z żyły odłokciowej oraz po porodzie 5 ml krwi pępowinowej. Surowicę odwirowywano i zamrażano w -70°C do oznaczeń stężeń badanych czynników angiogennych metodą ELISA.
2. po porodzie pobierano fragment łożyska o wym. 0.5×0.5 cm, umieszczano w płynie RNA later i zamrażano w temp -70°C do późniejszych oznaczeń ekspresji genów badanych czynników proangiogennych metodą RT PCR.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące wyniki:

Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie VEGF w grupie kontrolnej wynosiło $45,64 \pm 32,56$ pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym $84,99 \pm 31,09$, a w grupie pacjentek z IUGR $28,06 \pm 18,18$ pg/ml. Wykazano różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,0013$). Stężenie VEGF w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między

poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie VEGF w grupie kontrolnej wynosiło 185,37 +/- 39,05 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 214,93 +/- 45,17, a w grupie pacjentek z IUGR 134,66 +/- 35,71 pg/ml. Wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,0011$).

Stężenie PLGF w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie PLGF w grupie kontrolnej wynosiło 364,05 +/- 67,20 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 80,23 +/- 23,32, a w grupie pacjentek z IUGR 124,83 +/- 66,22 pg/ml. Wykazano różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000154$), a także pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,00001$). Stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie PLGF w grupie kontrolnej wynosiło 522,81 +/- 64,29 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 130,96 +/- 35,20, a w grupie pacjentek z IUGR 268,22 +/- 31,21 pg/ml. Wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,037665$), a także pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000001$).

Stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentek nie różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Stężenie IL-10 w grupie kontrolnej wynosiło 90,01 +/- 97,35 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 105,86 +/- 121,80, a w grupie pacjentek z IUGR 61,74 +/- 110,14 pg/ml. Średnie stężenie IL-10 w surowicy krwi pępowinowej w grupie kontrolnej wynosiło 109,20 +/- 123,30 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 121,89 +/- 81,96, a w grupie pacjentek z IUGR 45,93 +/- 42,22 pg/ml. W przypadku stężeń IL-10 nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami.

Stężenie leptyny w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie leptyny w grupie kontrolnej wynosiło 25,54 +/- 1,28 ng/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 39,02 +/- 6,16 ng/ml, a w grupie pacjentek z IUGR 26,02 +/- 1,39 ng/ml. Wykazano różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000005$). Stężenie leptyny w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie leptyny w grupie kontrolnej wynosiło 28,28 +/- 1,32 pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym 53,14 +/- 3,93, a w grupie pacjentek z IUGR 29,74 +/- 1,23 pg/ml. Wykazano różnice

istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000019$).

Stężenie angiopoetyny w surowicy krwi pacjentek różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie angiopoetyny w grupie kontrolnej wynosiło $2611,54 \pm 1170,74$ pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym $5954,26 \pm 2378,94$, a w grupie pacjentek z IUGR $6485,22 \pm 2342,64$ pg/ml. Wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000063$), a także pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,0023$). Stężenie angiopoetyny w surowicy krwi pępowinowej różni się istotnie statystycznie między poszczególnymi grupami badanych. Średnie stężenie angiopoetyny w grupie kontrolnej wynosiło $6659,72 \pm 1833,13$ pg/ml, w grupie z nadciśnieniem ciążowym $10993,34 \pm 1741,67$, a w grupie pacjentek z IUGR $11180,64 \pm 1976,28$ pg/ml. Wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z hipotrofią płodu ($p=0,000016$), a także pomiędzy grupą kontrolną a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p=0,000128$).

Analiza ekspresji genów badanych czynników angiogennych metodą RT PCR wykazała: w przypadku leptyny brak różnic ekspresji genu leptyny w łożyskach kobiet z nadciśnieniem ciążowym i IUGR w stosunku do ekspresji w grupie kontrolnej. W odniesieniu do angiopoetyny nie wykazano ekspresji badanego genu w łożyskach grup kontrolnej i hipotrofii płodu, a jedynie niewielką w łożyskach pacjentek z nadciśnieniem ciążowym. Badanie ekspresji genu PlGF wykazało wzrost istotny statystycznie ekspresji tego genu w łożyskach pacjentek z hipotrofią płodu i z nadciśnieniem ciążowym w stosunku do ekspresji w łożyskach grupy kontrolnej. Badanie ekspresji genu VEGF nie wykazało różnic istotnych statystycznie pomiędzy ekspresją genu w grupach badanych a grupą kontrolną. Ocena ekspresji genu interleukiny-10 wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji badanego genu w łożyskach pacjentek z nadciśnieniem ciążowym, w stosunku do ekspresji w łożyskach pacjentek z grup kontrolnej oraz z hipotrofią płodu.

Summary

Arterial hypertension in the course of the subscription process in about 5-10% of women, and in the element this frequency, even up to 20%. This is the output of an increased risk of perinatal complications and deaths both now. Many theories regarding the etiology of hypertension, however, its etiopathogenesis is not fully understood, especially pregnancy-induced hypertension (NIC, PIH).

Fetal hypotrophy is a common pregnancy-related complication diagnosed when double fetal measurements during pregnancy show too slow growth rate and / or fetal weight is below the 10th percentile for gestational age. There are many risk factors for this complication, but its etiology is still often unknown. The development of hypotrophy may result from diseases related to the fetus itself, maternal health, and the function of the placenta. Fetal abnormalities (chromosomal abnormalities, anatomical defects), maternal diseases (diabetes, hypertension, infectious diseases), lifestyle (smoking, alcohol consumption), and placental insufficiency may be the cause of this complication. The pathomechanism of intrauterine growth retardation is complex and is still under investigation. It is believed that one of the possible causes may be disturbances in placental angiogenesis.

Angiogenesis is the process of creating new capillaries from already existing blood vessels. A particularly privileged place for angiogenesis is the female reproductive system (menstrual cycle, ovulation, regeneration of the uterine mucosa, maintenance of the corpus luteum function, implantation of the embryo into the uterine mucosa, formation of the placenta). Angiogenesis is also the basis for the proper development of the embryo and the growth of the fetus and newborn. Abnormal growth of the placental chorion tree may result in the development of many diseases that complicate the course of pregnancy and the development of the fetus. Many factors regulating angiogenesis, with a pro-or anti-angiogenic effect, have been recognized.

The aim of the study was to assess the potential role of selected angiogenic factors in gestational hypertension and fetal hypotrophy. This goal was achieved by:

1. assessment of the concentrations of selected angiogenic factors: placental growth factor (PIGF), vascular growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang-1),

interleukin 10 (Il-10) and leptin (Lep) in the blood serum of women with gestational hypertension and fetal hypotrophy.

2. evaluation of the concentrations of the determined angiogenic factors in the umbilical cord blood serum of the studied groups of patients.

3. determining whether the measurement of the concentrations of the above-mentioned angiogenic factors in blood serum can be useful in the prediction of both disease entities in pregnant women.

4. assessment of gene expression of the analyzed angiogenic factors by RT PCR in the placenta of the analyzed groups of patients.

The study included 82 patients hospitalized at the Department of Perinatology and Women's Diseases and the Delivery Department of the GPSK in Poznań in 2013-2016, including 22 patients with a complicated IUGR pregnancy, 30 patients with pregnancy complicated by hypertension and 30 patients with a normal pregnancy. After obtaining the patients' written consent to participate in the study, biological material was collected for the planned studies:

1. 5 ml of blood from the antecubital vein and 5 ml of cord blood after delivery. The serum was centrifuged and frozen at -70°C for the determination of the concentrations of the angiogenic factors tested using the ELISA method.

2. after delivery, a fragment of the placenta of dimensions 0.5×0.5 cm, placed in RNA later fluid and frozen at -70°C for later gene expression determinations of the proangiogenic factors tested by RT PCR.

Based on the research, the following results were obtained:

The concentration of VEGF in the blood serum of patients differed statistically significantly between the different groups of patients. The mean concentration of VEGF in the control group was 45.64 ± 32.56 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 84.99 ± 31.09 , and in the group of patients with IUGR it was 28.06 ± 18.18 pg / ml. A statistically significant difference was found between the control group and the group with fetal hypotrophy ($p = 0.0013$). The concentration of VEGF in the serum of umbilical cord blood differed statistically significantly between different groups of respondents. The mean concentration of VEGF in the control group was 185.37 ± 39.05 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 214.93 ± 45.17 , and in the group of patients with IUGR it was 134.66 ± 35.71 pg / ml. There

were statistically significant differences between the control group and the group with fetal hypotrophy ($p = 0.0011$).

The concentration of PLGF in the blood serum of the patients differed statistically significantly between the different study groups. The mean concentration of PLGF in the control group was 364.05 ± 67.20 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 80.23 ± 23.32 , and in the group of patients with IUGR 124.83 ± 66.22 pg / ml. There were statistically significant differences between the control group and the group with fetal hypotrophy ($p = 0.000154$), and between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.00001$). The concentration of PLGF in the serum of umbilical cord blood differed statistically significantly between the different groups of respondents. The mean concentration of PLGF in the control group was 522.81 ± 64.29 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 130.96 ± 35.20 , and in the group of patients with IUGR it was 268.22 ± 31.21 pg / ml. There were statistically significant differences between the control group and the group with fetal hypertension ($p = 0.037665$), and between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.000001$).

The concentration of IL-10 in the blood serum of the patients does not differ statistically between the different groups of the examined patients. The concentration of IL-10 in the control group was 90.01 ± 97.35 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 105.86 ± 121.80 , and in the group of patients with IUGR 61.74 ± 110.14 pg / ml. The mean concentration of IL-10 in umbilical blood serum in the control group was 109.20 ± 123.30 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 121.89 ± 81.96 , and in the group of patients with IUGR it was 45.93 ± 42.22 pg / ml. In the case of IL-10 concentrations, no statistically significant differences were found between the studied groups.

The concentration of leptin in the blood serum of the patients differs statistically significantly between the different groups of subjects. The mean leptin concentration in the control group was 25.54 ± 1.28 ng / ml, in the group with gestational hypertension it was 39.02 ± 6.16 ng / ml, and in the group of patients with IUGR 26.02 ± 1.39 ng / ml. There was a statistically significant difference between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.000005$). The concentration of leptin in the serum of umbilical cord blood differed statistically significantly between different groups of subjects. The mean leptin concentration in the control group was 28.28 ± 1.32 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 53.14 ± 3.93 , and in the

group of patients with IUGR was 29.74 ± 1.23 pg / ml. There were statistically significant differences between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.000019$).

The concentration of angiopoietin in the blood serum of the patients differed statistically significantly between the different groups of patients. The mean concentration of angiopoietin in the control group was 2611.54 ± 1170.74 pg / ml, in the group with gestational hypertension it was 5954.26 ± 2378.94 , and in the group of patients with IUGR it was 6485.22 ± 2342.64 pg / ml. There were statistically significant differences between the control group and the group with fetal hypotrophy ($p = 0.000063$), as well as between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.0023$). The concentration of angiopoietin in the serum of umbilical cord blood differed statistically significantly between the different groups of respondents. The mean concentration of angiopoietin in the control group was 6659.72 ± 1833.13 pg / ml, in the group with gestational hypertension was 10993.34 ± 1741.67 , and in the group of patients with IUGR $11,180.64 \pm 1976.28$ pg / ml. There were statistically significant differences between the control group and the group with fetal hypotrophy ($p = 0.000016$), as well as between the control group and the group with gestational hypertension ($p = 0.000128$).

The analysis of the expression of genes of the analyzed angiogenic factors by RT PCR showed: in the case of leptin, no differences in the expression of the leptin gene in the placenta of women with gestational hypertension and IUGR compared to the expression in the control group. Regarding angiopoietin, no expression of the studied gene was found in placenta of the control group and fetal hypotrophy, and only slight expression in the placenta of patients with gestational hypertension. The study of the expression of the PlGF gene showed a statistically significant increase in the expression of this gene in the placenta of patients with hypotrophy of the fetus and with gestational hypertension compared to the expression in the placenta of the control group. The study of VEGF gene expression showed no statistically significant differences between the gene expression in the study groups and the control group. The evaluation of the expression of the interleukin-10 gene showed a statistically significant increase in the expression of the studied gene in the placenta of patients with gestational hypertension, as compared to the expression in the placenta of patients from the control group and with fetal hypotrophy.

IX. PIŚMIENNICTWO

1. Cerdeira AS, Karumanchi S.A. Angiogenic Factors in Preeclampsia and Related Disorders. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, Dec.16.
2. Semczuk M, Semczuk M. Angiogeneza w wybranych stanach ciąży patologicznej (PREE, IUGR, padaczka). Kliniczna Perinatologia i Ginekologia, 2006, 42 (4):17-21.
3. Kowalewska-Celejewska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J, Siebert J. Angiogenina i czynniki proangiogenne jako marker i cel terapii nowotworowych. Forum Medycyny Rodzinnej 2012, tom 6, nr 2, 68–73
4. Huang Z., Bao S. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. World J. Gastroenterol. 2004; 10: 463–470.
5. Markowska A, Drews K. Angiogeneza w rozrodczości. Adv Clin Exp Med. 2005, 14,1:123-127.
6. Smith SK Angiogenesis and reproduction. Br J Obstet Gynaecol 2001; 108, 777-783
7. Espinosa-Cervantes MC, Rosado-GarciaA. Angiogenesis in reproductive physiology. Follicular development, formation and maintenance of the corpus luteum. Ginecol Obstet Mex 2002, 70, 17-27
8. Risau W. Mechanism of angiogenesis. Nature 1997, 386, 671-674.
9. Danese S, Sans M, dela Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, Pola R, Rutella S, Willis J, Gasbarrini A, Fiocchi C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. Gastroenterology. 2006 Jun;130(7):2060-73
10. Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery, Lederman F, Rogers PA. Angiogenesis occur by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. Hum Reprod 2002, 17 (5), 1199-1206.
11. Zielonka M. Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. Alergia, Astma, Immunologia. 2004, 9(1), 25-31.
12. Sane C, Anton L, Brosnihan KB. Angiogenic growth factors and hypertension. Angiogenesis, 2004 - Springer.
13. Wenzel Wallner, Ruth Sengenberger, Reiner Strick, Pamela L. Strissel, Britta Meurer, Matthias W. Beckmann, Dietmar Schlembach; Angiogenic growth factors

- in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond)* 1 January 2007; 112 (1): 51–57.
14. Crispi F, Domínguez C, Llurba E, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(1):201-207.
 15. Brinkmann Christian, et al. Hypoxia and hyperoxia affect serum angiogenic regulators in t2dm men during cycling. *International journal of sports medicine*, 2017, 38.02: 92-98.
 16. Zhao, W., Qiao, J., Zhang, Q., Zhao, Y., & Chen, Q. Levels of antiangiogenic factors in preeclamptic pregnancies. *Growth Factors*, 2010, 28(4): 293-298.
 17. Maynard, S. E., & Karumanchi, S. A. Angiogenic factors and preeclampsia. *Seminars in nephrology*. 2011, Vol. 31 (1) :33-46.
 18. Levine R. J., Karumanchi, S. A. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clinical obstetrics and gynecology*, 2005, 48(2): 372-386.
 19. Heimrath J, Czeakański A, Krawczenko A, Duś D. Rola śródbłonek w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą. *Postępy Hig Med. Dosw.*, 2007,61:48-57
 20. Stepan H., Krämer T., Faber R. Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with intrauterine growth restriction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92(7): 2831-2834.
 21. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21,3. *Circulation* 1996, 93 (8), 1493-95 148
 22. Namiecińska M, Marciniak K. Nowak JZ. VEGF jako czynnik angiogeny, neuroficzny i neuroprotekcyny. *Postępy Hig Med. Dośw.* 2005, 59, 573-583
 23. Yang Gu, David F. Lewis, Yuping Wang, Placental Productions and Expressions of Soluble Endoglin, Soluble fms-Like Tyrosine Kinase Receptor-1, and Placental Growth Factor in Normal and Preeclamptic Pregnancies, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 93, Issue 1, 1 January 2008, Pages 260–266,
 24. Estemberg D, Kowalska-Koprek U, Szczerba A, Estemberg P, Karowicz- Bilińska A. Ocena stężenia śródbłonkowo-naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF) u kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym. *Gin.Pol.*, 2006, 77,11.

25. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011; Jun 21;123(24):2856-69.
26. Liberis A, Stanulov G, Ali EC, Hassan A, Pagalos A, Kontomanolis EN. Preeclampsia and the vascular endothelial growth factor: a new aspect. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2016; 43(1):9-13.
27. Lai Z., Kalkunte S., Sharma S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. *Hypertension*, 2011; 57(3):505-14
28. Swidzińska E., Naumnik W., Chyczewska E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 414–420
29. Tarnowska-Mądra U, Leibschang J, Kowalska B [i wsp.]; Stężenie immunoreaktywnych cytokin w surowicy krwi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym i ciężką postacią nadciśnienia ciążowego. *Ginekolog Pol*, 2010, 81: 192-196.
30. Krekora M, et al. Przydatność wybranych markerów biochemicznych w przewidywaniu wystąpienia preeklampsji u ciężarnych. *Perinatologia, neonatologia i ginekologia*, 2011, 4 (4): 197-201.
31. Semczuk-Sikora A, Krzyzanowski A, Stachowicz N, Robak J, Krackowski J, Kwiatek M. Semczuk M. Ocena łożyskowych czynników angiogennych (PLGF, VEGF, VEGF R1) oraz objętości łożyska w ciążach powikłanych opóźnieniem wzrastania wewnątrzmacicznego płodu (IUGR). *Ginekologia Polska*, 2007, 78: 783-786.
32. Krakowski L, Kostro K, Krakowska I, Wrona Z. Rola cytokin w rozwoju i utrzymaniu ciąży. *Med. Wet.* 2004; 60/10: 1034-1038.
33. Reitman ML, Bi S, Marcus-Samuels B, et al. Leptin and its role in pregnancy and fetal development: an overview. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 68-72.
34. Anna Semczuk-Sikora et al. Ocena poziomu leptyny w surowicy krwi kobiet z preeklampsją i opóźnieniem wzrastania wewnątrzmacicznego płodu. *Probl Hig Epidemiol* 2011; 92 (3): 504-507.
35. Forhead AJ, Fowden AL. The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *J Physiol* 2009; 587(6):1145-1152.

36. White V, Gonzales E, Capobianco E, et al. Leptin modulates nitric oxide production and lipid metabolism in human placenta. *A Reprod Fertil Dev* 200; 18: 425-432.
37. Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet and Gynecol.*,2006; 194: 1537-1545.
38. Mise H, Yura S, Itoh H, et al. The relationship between maternal plasma leptin levels and fetal growth restriction. *Endocrine J* 2007, 54 (6): 945-951.
39. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, et al. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre- eclampsia. *Hum Reprod* 2000; 15: 2033-2036.
40. Kokot F, Ulman I, Więcek A, et al. Concentrations of leptin and neuropeptide Y in maternal plasma, umbilical cord blood and in amniotic fluid in pregnant women with EPH-gestosis. *Arch Immunol Ther Exper* 1998, 46: 311-316.
41. Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Circulating leptin and angiogenic factors in preeclampsia patients. *Endocr J.* 2008;55(3):565-573.
42. Malamitsi-Puchner A.,Boutsikou T., Economou E., Tzonou A., Makrakis E., Nikolaou KE, Hassiakos D. Angiopoietin-2 in the perinatal period and the role of intrauterine growth restriction. 2006. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* 2006; 85 (1): 45-8
43. Tjoa, M. L., Khankin, E. V., Rana, S., & Karumanchi, S. A. (2010). Angiogenic factors and preeclampsia. *Placenta Bed Disord Basic Sci its Transl to Obstet*, 2010, 31(1):229-42.
44. Cerdeira, A. S., & Karumanchi, S. A. (2012). Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012,2(11), a006585.
45. Verlohren S, Holger S, Dechend R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 1January 2012; 122 (2): 43–52
46. Veikkola T i wsp. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60: 203–212.
47. Tanaka F i wsp. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer *Cancer Res* 2002;62(23):7124–7129.
48. Masuyama, H., Suwaki, N., Nakatsukasa, H., Masumoto, A., Tateishi, Y., Hiramatsu Y. Circulating angiogenic factors in preeclampsia, gestational proteinuria, and preeclampsia superimposed on chronic glomerulonephritis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006, 194(2):551-556.

49. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Preeclampsia- study group consensus statement. Accessed June 8, 2011.
50. Nzelu Diane, et al. First trimester serum angiogenic and anti-angiogenic factors in women with chronic hypertension for the prediction of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2020; 222.4: 374. e1-374. e9.
51. Duley L. The global impact of preeclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 130-137.
52. Sibai B., Lindheimer M., Hauth J. et al. Risk factors for preeclampsia, abruption placentae and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. *N Engl J Med* 1998; 339: 667-671.
53. Zhang J., Zeisler J., Hatch M.C. et al. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 218-232.
54. Nandor Gabor Than, Roberto R. et al. Integrated Systems Biology Approach Identifies Novel Maternal and Placental Pathways of Preeclampsia. *Front Immunol* 2018; 9:1661.
55. Szczepaniak-Chicheł L., Ropacka M. Zmiany adaptacyjne w układzie krążenia kobiety w czasie ciąży. W: Bręborowicz G., Tykarski A. (red.). *Choroby układu krążenia a ciąża*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych Poznań 2007; 21-29.
56. Kempiak J. Zmiany ustrojowe w przebiegu ciąży. W: Bręborowicz G. (red.) *Położnictwo i Ginekologia PZWL Warszawa* 2005; t.1,41-45.
57. Osol G. et al. Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy. *Annu Rev Physiol.* 2019 Vol. 81 : 89-111
58. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc. Res.* 2008 Jan, 75 (1), 1-8
59. Masuyama H, Segawa T, Sumida Y, et al. Different profiles of circulating angiogenic factors and adipocytokines between early- and late-onset preeclampsia. *BJOG.* 2010;117(3):314-320
60. Ferrazzi E. et al. Maternal hemodynamics: a method to classify hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 ; 21 : 124. e1-11
61. Sternick L. et al. Imaging Considerations in Pregnancy. *Neurologic Clinics* 2019 Vol. 37 : 1-16
62. Chapman A.B., Abraham W.T., Zamudio S. et al. Temporal Relationship between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998; 54: 2056-2063

63. Edouard D.A., Pannier B.M., London G.M. et al. Venous and arterial behavior during normal pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ* 1998; 274 : 1604-1612.
64. Pollheimer J., Vondra S., Baltayeva J. et al. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Front Immunol*. 2018; 9 : 2597
65. Schneider R. Zmiany zachodzące w organizmie kobiety pod wpływem ciąży. W: G. Martius i wsp. (red.) *Ginekologia i Położnictwo* . Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004; p. 71.
66. Burton GJ, Scioscia M., Rademacher TW. Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 2011, 89: 118-125.
67. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O [et al.]; Molecular evidence of placental Hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(7): 4299-4308.
68. Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Perlik M [i wsp.]; Genetic variability of endothelin-1 system in gestational hypertension and preeclampsia. *Ginekolog Pol*, 2011, 82: 363-370.
69. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-99.
70. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia. Recent insights. *Hypertension* 2005; 46:1243-9.
71. Czajkowski K. Nadciśnienie ciążowe. W: Januszewicz A, Januszewicz W, Szczepańska-Sadowska E i wsp., red. *Nadciśnienie tętnicze*. Kraków: Wydawnictwo Medycyna Praktyczna; 2004: 717-32.
72. Podwyższone ciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży. Aktualny (2000) Raport National High Blood Pressure Education Program (USA). *Medycyna praktyczna* 2001, 4: 39-67.
73. Kuś E, Kazimierak W, Brzozowska M i wsp. Nadciśnienie tętnicze u kobiet ciężarnych. *Przegląd Lekarski* 2004; 61: 968-71.
74. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 944-8.
75. Mac Kay A., Berg C., Atrash H. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia, *Obstet Gynecol*. 2001; 97: 533-538.
76. Raijmakers MT, Dechend R, Poston L. Stres oksydacyjny a stan przedrzucawkowy - uzasadnienie prób klinicznych leczenia antyoksydantami. *Hypertension* 2004; 44: 374-80.

77. National High Blood Pressure Education Program (USA) raport: Podwyższone ciśnienie tętnicze u kobiet . Med Prakt 2001 ; 4 : 39-65.
78. World Health Organization (WHO); Make Ever Mother and Child Count. World Health Report 2005. WHO, Geneva, 2005
79. 2003 European Society of Hypertension–European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension Guidelines Committee. Journal of Hypertension 2003, 21: 1011 – 105
80. Guidelines Committee. 2003 European Society of Cardiology guidelines for the menagement of arterial hypertension. J Hypertens 2003; 21: 1011-53.
81. The Joint National Committee on Prevention Detection, Evaluation and Treatment of High Blond Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention Detection, Evaluation and Treatment of High Blond Pressure. Arch Intern Med 1999; 2413-46.
82. Korsak J., Łętowska M.: Transfuzjologia kliniczna. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała, 2009.
83. Levy J.A., Murphy L.D.: Thrombocytopenia in Pregnancy. J. Am. Board Fam. Pract., 2002, 15(4), 290-297.
84. Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia. Time to screen and treat in future pregnancies? Hypertension 2005; 46: 1252-3.
85. Wu Y., Xiong X., Fraser W. et all; Association of uric acid with progression to preeclampsia and development of adverse conditions in gestational hypertensive pregnancies, Am J Hypertens. 2012; 25(6): 7110-717.
86. Lee N.M., Brady C.W.: Liver disease in pregnancy. World J. Gastroenterol., 2009, 15(8), 897-906.
87. Mello G, Parretti E, Marozio L i wsp. Trombophilia is significantly associated with severe preeclampsia. Results of a large-scale, casecontrolled study. Hypertension 2005; 46: 1270-4.
88. Magann EF, Martin JN. Twelve steps to optimal management of HELLP syndrome. Clin Obstet Gynecol 1999; 42: 532-50.
89. Siai BM. Diagnosis, prevention and management of eclampsia. Obstet Gynecol 2005; 105: 402-10.
90. Berkowitz KM. Insulin resistance and preeclampsia. Clin Perinatol 1998; 25: 873-5.
91. Ponzetto A, Cardaropoli S, Piccoli E i wsp. Pre-eclampsia is associated with Helicobacter pylori seropositivity in Italy. J Hypertens 2006; 24: 2445-9.

92. Ghulmiyyah L., Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol* 2012; 36:56-59.
93. Young B.C., Levine R.J., Karumanchi S.A. Pathogenesis of Preeclampsia. *Annu Rev Patho Mech Dis* 2010; 5: 173-192.
94. Teliga-Czajkowska J. Ogólnoustrojowe zaburzenia w przebiegu nadciśnienia ciążowego- zespół HELLP. W: Januszewicz A, Januszewicz W: Szczepańska-Sadowska E i wsp., red. Nadciśnienie tętnicze. Krakow: Wydawnictwo Medycyna Praktyczna; 2004: 729-32.
95. Haddad B, Barton JR, Livingston JC i wsp. Risk factors for adverse maternal outcomes among women with HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 444-8.
96. Haram K., Svendsen E., Abildgaard U.: The HELLP syndrom: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2009, 9,8.
97. Satpathy H.K., Frey D.: HELLP syndrom. *J. Obstet. Gynecol., India*, 2009, 59(1), 30-40.
98. Padden M.O.: HELLP Syndrom: Recognition and perinatal management. *Am. Fam. Physican*, 1999, 60(3), 829-831.
99. Mariańska B., Fabijańska-Mitek J., Windyga J.: Badania laboratoryjne w hematologii, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2003.
100. McCrae K.R.: Thrombocytopenia in pregnancy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2010, 2010, 397-402.
101. Kirkpatrick C.A.: The HELLP syndrom. *Acta Clin Belg.*, 2010, 65(2), 91-97
102. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19.
103. Komwilaisak, R., Tangkiratichai, P. Maternal serum angiogenic growth factors in intrauterine growth restriction versus normal pregnancies. 2017, *J Med Assoc Thai*, 100(2), 119-124.
104. Von Dadalszen P, Ornstein MP, Bull SB i wsp. Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis. *Lancet* 2000; 355: 87-92.
105. Bręborowicz G.H. (red.). Położnictwo i ginekologia (t. I i II). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008. ISBN 978-83-200-3927-6.

106. Warkany J, Monroe B, Sutherland B. Intrauterine growth retardation. *Am J Dis Child.* 1961, 102, 249-256.
107. Sharma D., Sharma P., Shastri S.: Genetic, metabolic and endocrine aspect of intrauterine growth restriction: an update. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017, Oct;30(19):2263-2275.
108. Węgrzyn P., Kaźmierczak, Fiegler P. at al. Wewnątrzmaciczne opóźnione wzrastanie płodu- analiza sposobu rozwiązania ciąży, przebiegu porodu oraz pourodzeniowego stanu noworodka. *Ginek. Praktyczna* 2004; 12: 32-37
109. Duckitt K., Harrington D. Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005; 330; 565.
110. McMinn J.R., George J.N.: Evaluation of women with clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpurahemolytic uremic syndrome during pregnancy. *J. Clin. Apher.*, 2001, 16(4), 202-209.
111. Leszczyńska-Gorzelak B., Poniedziałek-Czajkowska E. Rzućawka w ciąży – aktualny problem kliniczny. *Perinatol. Neonatol Ginekol.*, 2009, 2, 94-101.
112. Leszczyńska-Gorzelak B., Poniedziałek-Czajkowska E.: Rzućawka w ciąży – aktualny problem kliniczny. *Perinatol. Neonatol Ginekol.*, 2009, 2, 94-101.
113. Bomba-Opoń D.A. Wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrastania płodu- postępowanie. *Ginekologia po Dyplomie* 2017, 05
114. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:136-45.
115. RCOG. The Investigation and Management of the Small for Gestational Age Fetus. Green-top Guideline No. 31 January 2014
116. Vayssière C, Sentilhes L, Ego A, et al. Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;193:10-8
117. Chatelain P. Children born with intrauterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocr. Regul.* 2000; 34: 33-36
118. Hay W.W., Thureen P.J., Anderson M.S. Intrauterine growth restriction. *Neo Reviews* 2001; 2: 129

119. Brodsky D, Christou H.: Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med.* 2004 Nov-Dec;19(6):307-19.
120. Intrauterine Growth Restriction. Archived from the original on 2007-06-09. Retrieved 2007-11-28.
121. Hunter, Stephen K.; Kennedy, Colleen M.; Peleg, David (August 1998). Intrauterine Growth Restriction: Identification and Management - August 1998 - American Academy of Family Physicians". *American Family Physician.* 58 (2): 453–60, 466–7. PMID 9713399. Retrieved 2007-11-28.
122. Miller J.Turan S., Baschat A.A. Fetal growth restriction. *Semin. Perinatol* 2008; 32: 274-280
123. Bakketeig L.S. Current growth standards, definitions, diagnosis and classification of fetal growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 1-4
124. Hutcheon J.A., Zhang X., Cnattingius S. et al.: Customized birthweight percentiles: does adjusting for maternal characteristics matter. *BJOG* 2008; 115 :137- 1404
125. Saccone G, Berghella V, Sarno L, Maruotti GM, Cetin I, Greco L, Khashan AS, McCarthy F, Martinelli D, Fortunato F, Martinelli P (Oct 9, 2015). "Celiac disease and obstetric complications: a systematic review and metaanalysis". *Am J Obstet Gynecol.* 214 (2): 225–34.
126. Kiefer, F. N., et al. Hypertension and angiogenesis. *Current pharmaceutical design* 9.21 (2003): 1733-1744.
127. Sheridan C.:Intrauterine growth restriction--diagnosis and management. *Aust Fam Physician.* 2005 Sep;34(9):717-23.
128. Laila A. Mohsen and Mohamed F. Amin: 3D and 2D ultrasound-based fetal weight estimation: a single center experience, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 10, 818-825, (2016).
129. Schild R.L., Maringa M., Siemer J., Meurer B., Hart N., Goecke T.W., Schmid M., Hothorn T., Hansmann M.E.: Weight estimation by three-dimensional ultrasound imaging in the small fetus. *Ultrasound Obstet.Gynecol.* 2008 Aug;32(2):168-75.
130. Battaglia, F.C. and Lubchenko, L.O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. (Level II-3)*J Pediatr.* 1967; 71: 159–163.
131. Marsal K., Perrson P.H., Larsen T. et al. Intrauterine growth curves based on ultrasonically estimated fetal weight. *Acta Paediatr* 1996; 85 :843-848

132. Ananth C.V. Menstrual versus clinical estimate of gestational age dating in the United States: temporal trends and variability in indices of perinatal outcomes. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007 Sep;21 Suppl 2:22-30. Review.
133. Callaghan W.M., Dietz P.M. Differences in birth weight for gestational age distributions according to the measures used to assign gestational age. *Am J Epidemiol.* 2010 Apr 1;171(7):826-36.
134. Deepak Sharma, Sweta Shastri, Nazanin Farahbakhsh & Pradeep Sharma (2016) Intrauterine growth restriction – part 1, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29:24, 3977-3987
135. Deepak Sharma, Nazanin Farahbakhsh, Sweta Shastri & Pradeep Sharma (2016) Intrauterine growth restriction – part 2, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29:24, 4037-4048.
136. Vayssière, C. et al.: Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Volume 193, 10-18.
137. Gallivan S, Robson SC, Chang TC, Vaughan J, Spencer JA.: An investigation of fetal growth using serial ultrasound data. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1993 Mar 1;3(2):109-14.
138. Kiserud T, Eik-Ves S, Blaas H, et al. Ultrasonic velocimetry of the fetal ductus venosus . *Lancet.* 1991, 338,1412-1414.
139. Wilczyński J, Podciechowski L, Krekora M, i wsp. Ocena wartości prognostycznych badań przepływów w tętnicy pępowinowej i wybranych naczyniach płodu w ocenie stanu wewnątrzmacicznego płodu w ciąży powikłaną cukrzycą insulinozależną. *Diab Pol.* 1997, 4, 37-44.
140. Baschat A. Arterial and venous Doppler in the diagnosis and management of early onset fetal growth restriction. *Early Human Dev.* 2005, 81, 877- 887.
141. Botsis D, Vrachnis N, Christodoulakos G. Doppler Assessment of the Intrauterine GrowthRestricted Fetus. *Ann NY Acad Sci.* 2006, 1092, 297-303.
142. Kiserud T, Eik-Nes S, Blaas H, [et al.]. Ultrasonic velocimetry of the fetal ductus venosus . *Lancet.* 1991, 338, 1412-1414.
143. Madazli R, Uludag S, Ocak V. Doppler assesement of umbilical artery, thoracic aorta and middle cerebral artery in the management of pregnancies with growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001, 80, 702-707.

144. Baschat A, Gembruch U, Gortner L, [et al.]. Coronary artery blood flow visualization signifies hemodynamic deterioration in growth restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000, 16, 425-431.
145. Mari G, Hanif F, Kruger M, et al. Middle cerebral artery peak systolic velocity: a new Doppler parameter in the assessment of growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007, 29, 310-316.
146. Gudmundsson S. et al.: Venous Doppler in the fetus with absent enddiastolic flow in the umbilical artery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996, 7:262-7
147. Baschat, A.A. Arterial and venous Doppler in the diagnosis and management of early onset fetal growth restriction. (Level III) *Early Hum Dev.* 2005; 81: 877–887.
148. Berkley, Eliza et al.(2012). Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Volume 206, Issue 4, 300 – 308.
149. Bręborowicz GH, Dubiel M, Szpurek D, [i wsp.]. Wartość prognostyczna zaniku lub odwrócenia końcowo-rozkurczowego przepływu krwi w tętnicy pępowinowej w diagnostyce zagrożenia płodu. *Ginekolog Pol.* 1994, 65, 341-345.
150. Cruz-Martinez, R., Figueras, F., Hernandez-Andrade, E., Oros, D., and Gratacos, E. Fetal brain Doppler to predict cesarean delivery for nonreassuring fetal status in term small-for-gestational-age fetuses. (Level II-1) *Obstet Gynecol.* 2011; 117: 618–626.
151. Baschat, A.A. Fetal responses to placental insufficiency: an update. (Level III) *BJOG.* 2004; 111: 1031–1041.
152. Behrman, R.E., Lees, M.H., Peterson, E.N., De Lannoy, C.W., and Seeds, A.E. Distribution of the circulation in the normal and asphyxiated fetal primate. (Level II-3) *Am J Obstet Gynecol.* 1970; 108: 956–969.
153. Berkley, Eliza et al. Doppler assessment of the fetus with intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2012; Volume 206, Issue 4, 300 - 308.
154. Pietryga M, Brązert J. Płodowe krążenie żylne. In: *Podstawy praktycznej ultrasonografii ginekologii i położnictwie.* 2009: 390, 394, 404, 407.
155. Skóra J, Biegus J, Pupka A, Barć P, Sikora J, Szyber P. Molekularne podstawy angiogenezy. *Postępy Hig Med. Dośw.* 2006, 60: 410-415

156. Pietryga M, Brązert J. Badanie dopplerowskie tętnicy macicznej w medycynie perinatalnej. Podstawy praktycznej ultrasonografii w ginekologii i położnictwie. Exem. 2009: 310, 315.
157. Baschat A, Gembruch U, Reiss I, [et al.]. Demonstration of fetal coronary blood flow by Doppler ultrasound in relation to arterial and venous flow velocity waveforms and perinatal outcome-the 'heart-sparing effect'. Ultrasound Obstet Gynecol. 1997, 9, 162-172.
158. Piazze, J., Padula, F., Cerekja, A., Cosmi, E. and Anceschi, M. Prognostic value of umbilical-middle cerebral artery pulsatility index ratio in fetuses with growth restriction. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2005; 91: 233-237.
159. Simanaviciute D, Gudmundsson S. Fetal middle cerebral to uterine artery pulsatility index ratios in normal and pre-eclamptic pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol. 2006 Nov;28(6):794-801
160. Pietryga M, Brązert J, Dubiel M, Meissner W, Krocze-Grządzielska B, Grewling-Szmit K, Brązert M. Krążenie mózgowe. In: Pietryga M, Brązert J. Podstawy praktycznej ultrasonografii w ginekologii i położnictwie. Pn: Exempl, 2009: 361.
161. Kassanos D, Siristatidis C, Vitoratos N, Salamalekis E, Creatsas G. The clinical significance of Doppler findings in fetal middle cerebral artery during labor. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003;109(1):45-50
162. Tarzamni, M. K., Nezami N. et al. Nomograms of Iranian fetal middle cerebral artery Doppler waveforms and uniformity of their pattern with other populations' nomograms. 2008. BMC Pregnancy and childbirth, 8(1), 50.
163. Mari G, Deter RL. Middle cerebral artery flow velocity waveforms in normal and small-for-gestational-age fetuses. Am J Obstet Gynecol. 1992; Apr;166(4):1262-70.
164. Yagel S, Cohen SM, Valsky et al. The fetal venous system, Part I: Normal embryology, anatomy, hemodynamics, ultrasound evaluation and Doppler investigation. Ultrasound in Obstetrics and Gynecology 2010; 35: 741-750.
165. Locci M, Nazzaro G, De Placido G, Montemagno U. Fetal cerebral haemodynamic adaptation: A progressive mechanism? Pulsed and color Doppler evaluation. Journal of Perinatal Medicine 1992; 20: 337-343.

166. Hsieh YY, Chang CC, Tsai HD, Tsai CH. Longitudinal survey of blood flow at three different locations in the middle cerebral artery in normal fetuses. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2001; 17: 125-128.
167. Ebbing C, Rasmussen S, Kiserud T. Middle cerebral artery blood flow velocities and pulsatility index and the cerebroplacental pulsatility ratio: Longitudinal reference ranges and terms for serial measurements. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2007; 30: 287-296.
168. Benavides-Serralde JA, Hernandez-Andrade E, Bello-Munoz JC, Figueroa-Diesel H, Gratacos E. Normal reference values for the anterior cerebral artery throughout pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2007; 30: 523.
169. Fuchs T, Zalewski J, Zimmer M, Florjański J, Pańczak K. Useful of cerebral placental ratio in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation and it correlation with perinatal outcome. *Ginekologia Polska* 2000; 71: 304-310.
170. Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2011; 204: 288-300.
171. Cheema R, Bayoumi MZ, Gudmundsson S. Multivascular Doppler surveillance in high risk pregnancies. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine: The Official Journal of The European Association of Perinatal Medicine* 2012; 25: 970-974.
172. Turan O, Turan S, S Gungor C, [et al.]. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008, 32, 160-167.
173. Farine D, Kelly E, Ryan G, [et al.]. Absent and reverse flow et umbilical artery end diastolic velocity. In: *Doppler ultrasound in obstetric and gynecology*. Ed. Copel J, Reed K. New York: Raven Press Ltd., 1995, 234-237.
174. Bataille D, Eixarch E, Figueras F, Muñoz-Moreno E, Bargallo N, Illa M, Acosta-Rojas R, Amat-Roldan I, Gratacos E (2012). Altered small-world topology of structural brain networks in infants with intrauterine growth restriction and its association with later neurodevelopmental outcome. *NeuroImage*. 60 (2): 1352-66.
175. Geva R, Eshel R, Leitner Y, Valevski AF, Harel S (2006). Neuropsychological Outcome of Children With Intrauterine Growth Restriction: A 9-Year Prospective Study". *Pediatrics*. 118(1): 91–100.

176. Kingdom, J.C., Burrell, S.J., and Kaufmann, P. Pathology and clinical implications of abnormal umbilical artery Doppler waveforms. (Level III) *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 9: 271–286.
177. Stepan, H., Krämer, T., & Faber, R. Maternal plasma concentrations of soluble endoglin in pregnancies with intrauterine growth restriction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92(7), 2831-2834.
178. Barut F, Barut A, Gun BD, et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol.* 2010;5:24. Published 2010 Apr 22.
179. Manaj A, Rrugia A, Manoku N. Wpływ stanu przedrzucawkowego na ciążę. *J Prenat Med.* 2011 styczeń-marzec; 5 (1) : 19–22.
180. Maynard S., Min J., Merchan J. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Inves.* 2003; 111: 649–658.
181. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S. Khaliq A. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen— A Review. *Placenta* 2000; 21, Supplement A, *Trophoblast Research*, 14, S16–S24
182. Poon L., Kametas N., Maiz N., Akolekar R., Nicolaides K.H. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension* 2009; 53: 812-818.
183. Akolekar R., Syngelaki A., Sarquis R., Zvanca M., Nicolaides K.H. Prediction of early, intermediate and late preeclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks. *Prenat. Diagn.* 2011; 31: 66–74.
184. Maksym M, Madej P, Lemm M.A. Etiopatogeneza nadciśnienia tętniczego u kobiet ciężarnych. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 2015; Jun 69: 69-75.
185. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Peter Kaufmann. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth, 2000; *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, Vol 92, Issue 1, Pages 35-43,
186. Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 2017 Dec;31(12):782-786.
187. Henan Dh, Skheel Al, Allazawy AZ. Maternal–Placental Growth Factor and the Identification of Fetuses with Placental Intrauterine Growth Restriction. 2018; *Dep.og Obst. And Gyn.*, December 25

188. Levine RJ, Maynard SE, Qian C et al. Krążące czynniki angiogenne i ryzyko stanu przedrzucawkowego. *Dziennik medycyny Nowej Anglii*. 2004; 350 : 672–683.
189. Ghosh SK, Raheja S, Tuli A, Raghunandan C, Agarwal S. Can maternal serum placental growth factor estimation in early second trimester predict the occurrence of early onset preeclampsia and/or early onset intrauterine growth restriction? A prospective cohort study. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 May;39(5):881-90.
190. Chaiworapongsa T, Romero R, Whitten AE, Korzeniewski SJ, Chaemsaitong P, Hernandez-Andrade E, Yeo L, Hassan SS. The use of angiogenic biomarkers in maternal blood to identify which SGA fetuses will require a preterm delivery and mothers who will develop pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(8):1214-28.
191. Semczuk-Sikora A, Krzyzanowski AR, Kwiatek M, Semczuk M. Maternal serum concentration of placental growth factor (PIGF) and endothelial growth factor (VEGF) in pregnancies complicated by preeclampsia. 2007; *Gin. Pol.* 78. 873-6.
192. Semczuk-Sikora A, Krzyzanowski AR, Stachowicz N, Robak J, Krackowski J, Kwiatek M, Semczuk M. Maternal serum concentration of angiogenic factors: PIGF, VEGF and VEGFR-1 and placental volume in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. 2007; *Gin. Pol.* 78. 783-6.
193. Semczuk M, Borczyńska A, Białas M, Rozwadowska N, Semczuk-Sikora A, Malcher A, Kurpisz M. Expression of genes coding for proangiogenic factors and their receptors in human placenta complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Reproductive Biology*. 2013; June Vol.13 133-138.
194. Bielecki D, Klonowska-Dziatkiewicz E, Jarocki S, [i wsp.]. Niektóre czynniki wzrostu w ciąży powikłanej preeklampsją. *Ginekol Pol.* 2002, 73, 422-429.
195. Taylor R, Grimwood J et al. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2003, 188, 177-182.
196. Thadhani R, Mutter W, Wolf M, et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004, 89, 770-775.
197. Szentpéteri I, Rab A, Kornya L, Kovács P, Gábor J. Wzorce ekspresji genów czynnika wzrostu śródbłona naczyniowego (VEGF-A) w łożysku ludzkim z cięż

- z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrostu, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2013; 26:10, 984-989.
198. Tarnowska-Mądra U, Leibschang J, Kowalska B, Filipp E, Kozar A, Nimer A. Stężenie immunoreaktywnych cytokin w surowicy krwi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym i ciężką postacią nadciśnienia ciążowego. *Ginekol Pol*. 2010; 81, 192-196.
 199. Arriaga-Pizano L, Jimenez-Zamudio L, Vadillo-Ortega F, [et al.]. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriondecidual and fetal compartments. *J Soc Gynecol Investig*. 2005, 12, 335-342.
 200. Azizieh FY, Raghupathy R. IL-10 and pregnancy complications. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2017;44(2):252-258. PMID: 29746033.
 201. Celik H, Avcı B, Alper T. Comparison of maternal serum levels of interleukin-10, interleukin-12, and interleukin-2 in normal and preeclamptic pregnancies. *Pregnancy Hypertens*. 2012 Jan;2 (1): 39-42.
 202. Conrad K, Miles T, Benyo D. Circulating Levels of Immunoreactive Cytokines in Women with Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1998, 40, 102-111.
 203. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, et al. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000,15: 2033-2036.
 204. Hoggard N, Haggarty P, Thomas L, et al. Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans* 2001, 29: 57-63.
 205. Yildiz L., Auci B., Ingec H. Umbilical cord and maternal blood leptin concentrations in intrauterine growth retardation. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2002, 40, 1114–1117.
 206. Hassink S. G., de Lancey E., Shelow D. V., Smith–Kirwin S. M., O’Connor D. M., Considine R. V., Opentanova I., Dostal K., Spear M. L., Leef K., Asch M., Funanage S. V. L. Placental leptin. An important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997; 100–101.
 207. Lepereq J., Challier J.C., Guerre-Millo M., Cauzac M., Vidal H., Hauguel-de Mouzon S. Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 2409- 2143.

208. Karowicz-Bilińska. Analiza zachowania się leptyny u kobiet z ciążą fizjologiczną oraz w hipotrofii wewnątrzmacicznej. *Ginekol. Pol.* 2004; 2004 : T. 75, nr 1, s. 10-14.
209. Pighetti M, Tommaselli GA, D'Elia A i wsp. Maternal serum and umbilical cord blood leptin concentrations with fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2003; 102(3): 535-543.
210. Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, et al. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006, 12: 551-556.
211. Al-Shahat et al. Endothelin-1 and leptin as markers of intrauterine growth restriction. *Indian J Pdiatr.* May 2009; 76(5): 485-8.
212. Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L, Crombleholme WR, Markovic N, Rajakumar A, Hubel CA, Roberts JM, Powers RW. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006 Sep;12(9):551-6.
213. Grosfeld A, Turban S, André J, Cauzac M, Challier JC , Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. Transcriptional effect of hypoxia on leptin. 2001; *FEBS Letters* , 502.
214. Rao Gurugubelli Krishna, B. Vishnu Bhat. Molecular mechanizmy ograniczenia wzrostu wewnątrzmacicznego. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2018; 31:19, 2634-2640.
215. Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. Regulacja i lokalizacja angiopoetyny-1, -2 i ich receptora Tie2 w normalnym i patologicznym łożysku człowieka. *Mol Med* . 2001; 7 (9): 624-635.
216. Nadar S.K., Karalis I., Al Yemeni E., Blann A.D., Lip G.Y.: Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. *Thromb. Haemost.*, 2005; 94: 1071-1076
217. Stepan H, Krämer T, Faber R. Maternal Plasma Concentrations of Soluble Endoglin in Pregnancies with Intrauterine Growth Restriction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2007; 92. 2831-4. 10.1210/jc.2006-2774.
218. Dunk C., Shams M., Nijjar S., Rhaman M., Qiu Y., Bussolati B., Ahmed A. Angiopoietin-1 i angiopoietin-2 aktywują trofoblast Tie-2 w celu promowania

wzrostu i migracji podczas rozwoju łożyska. *Jestem. J. Pathol.* 2000; 156 : 2185–2199.

219. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JCP: Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu z brakiem końcowo-rozkurczowej prędkości przepływu w tętnicy pępowinowej jest związane z nieprawidłowym rozwojem drzewa kosmków na końcu łożyska. *Am J Obstet Gynecol* 1996, 175 : 534-542.
220. Macara LM, Kingdom JCP, Kaufmann P, Kohnen G, Hair J, More IRA, Lyall F, Greer. Analiza strukturalna kosmków łożyskowych końcowych z ciąż z ograniczonym wzrostem z nieprawidłowymi falami Dopplera tętnicy pępowinowej. *Placenta* 1996, 17 : 37-48

X. SPIS TABEL

Tabela nr 1. Endogenne czynniki angiogenne.

Tabela nr 2. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według ESH/ESC.

Tabela nr 3. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego według JNC7.

Tabela nr 4. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z IUGR u płodów (n = 22)

Tabela nr 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem ciążowym (n = 30)

Tabela nr 6. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej (n = 30)

Tabela nr 7. Skład mieszaniny reakcji qRT - PCR

Tabela nr 8. Warunki reakcji qRT - PCR

Tabela nr 9. Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Tabela nr 10. Stężenie VEGF w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Tabela nr 11. Stężenie PLGF w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Tabela nr 12. Stężenie PLGF w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Tabela nr 13. Stężenie IL-10 w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Tabela nr 14. Stężenie IL-10 w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

Tabela nr 15. Stężenie Leptyny w surowicy krwi pacjentek [ng/ml]

Tabela nr 16. Stężenie Leptyny w surowicy krwi pępowinowej [ng/ml]

Tabela nr 17. Stężenie Angiopoetyny 1 w surowicy krwi pacjentek [pg/ml]

Tabela nr 18. Stężenie Angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej [pg/ml]

XI. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Wykres przedstawiający stężenia VEGF w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Wykres 2. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia VEGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia VEGF.

Wykres 3. Wykres przedstawiający stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Wykres 4. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia VEGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia VEGF.

Wykres 5. Wykres przedstawiający stężenia PLGF w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Wykres 6. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia PLGF.

Wykres 7. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia PLGF.

Wykres 8. Wykres przedstawiający stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml]

Wykres 9. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia PLGF.

Wykres 10. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia PLGF w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia PLGF.

Wykres 11. Wykres przedstawiający stężenia IL-10 w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

Wykres 12. Wykres przedstawiający stężenia IL-10 w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

Wykres 13. Wykres przedstawiający stężenia Leptyny w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [ng/ml].

Wykres 14. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia leptyny w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia leptyny.

Wykres 15. Wykres przedstawiający stężenia Leptyny w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [ng/ml].

Wykres 16. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia leptyny w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia leptyny.

Wykres 17. Wykres przedstawiający stężenia Angiopoetyny 1 w surowicy krwi pacjentek w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

Wykres 18. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

Wykres 19. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi matki w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia angiopoetyny.

Wykres 20. Wykres przedstawiający stężenia Angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej w badanych grupach pacjentek [pg/ml].

Wykres 21. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia hipotrofii płodu w grupie pacjentek z hipotrofią płodu w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

Wykres 22. Krzywa czułości i swoistości dla stężenia angiopoetyny 1 w surowicy krwi pępowinowej w przewidywaniu wystąpienia nadciśnienia ciążowego w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym w oparciu o stężenia angiopoetyny 1.

Wykres 23. Półilościowa ocena ekspresji genu VEGF w łożyskach badanych pacjentek.

Wykres 24. Półilościowa ocena ekspresji genu PLGF w łożyskach badanych pacjentek.

Wykres 25. Półilościowa ocena ekspresji genu Il-10 w łożyskach badanych pacjentek.

Wykres 26. Półilościowa ocena ekspresji genu Leptyny w łożyskach badanych pacjentek.

Wykres 27. Półilościowa ocena ekspresji genu Ang-1 w łożyskach badanych pacjentek.

XII. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ NA BADANIA



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1142/12

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 06 grudnia 2012 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawili:

Pan prof. dr hab. Krzysztof Drews

oraz Pani dr hab. Anna Markowska

w sprawie prowadzenia badań w

Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych UM w Poznaniu

Główny badacz: lek. med. Katarzyna Grześkowiak- Fischbach

Członkowie zespołu

badawczego:

**prof. dr hab. Krzysztof Drews
dr hab. Anna Markowska**

Temat

**badan: "Wybrane czynniki angiogenne w nadciśnieniu indukowanym
ciążą oraz hipotrofii płodu".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

1142/12

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr z dnia 06.12.2012r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

prof. dr hab. ZYGMUNT ADAMSKI

dr KRYSTYNA BABIAK

dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM

mgr JOLANTA ŁOJKO-KOŁODZIEJCZAK

mgr KRYSTYNA MALINGER

dr hab. n. med. ANDRZEJ MARSZAŁEK

dr hab. MACIEJ OWECKI

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. JOANNA TWAROWSKA-HAUSER

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
UNIwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

z dnia06.12.2012r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Zakład Mikologii Lekarskiej i Dermatologii UM, ul. Juraszów 7/19, Poznań
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu, ul. Chwaliszewo 69, Poznań
5.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM, ul. Polna 33, Poznań
8.	dr hab. n. med. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Pracownia Mikroskopii Elektronowej Katedry Patomorfologii Klinicznej UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
9.	dr hab. n. med. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
11.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Szamarzewskiego 82/84, Poznań
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska- Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UM, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań