

mgr Marcin Nowicki

**Przeciwwzkrzepowe i prozакrzepowe
działanie śródbłónka naczyniowego w ciąży
powikłanej stanem przedrzucawkowym
i wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania
płodу**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Dorota Formanowicz, prof. UMP

Katedra i Zakład Chemii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej



KOLEGIUM NAUK MEDYCZNYCH

UNIwersytet Medyczny Im. K. Marcinkowskiego W
POZNANIU

Poznań, 2021

Składam serdeczne podziękowania promotorowi pracy

dr hab. n. med. Dorocie Formanowicz, prof. UMP

za opiekę i nieocenioną pomoc, bez której praca ta nie powstałaby

dr n. med. Karolinie Grucy-Stryjak

serdeczne podziękowania za nieocenioną pomoc w zbieraniu materiału oraz
interpretacji wyników

Koleżankom i Kolegom

z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pragnę podziękować

za życzliwość i wsparcie w trakcie realizacji tej pracy

*Pracę dedykuję żonie Joannie,
dzieciom Hubertowi i Cecylii
oraz Rodzicom.*

SPIS TREŚCI

1	Wstęp.....	8
1.1	WPROWADZENIE	8
1.2	Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR)	10
1.3	Stan przedrzucawkowy	13
1.4	Udział śródbłónka w zaburzeniach hemostazy.....	15
1.4.1	Hemostaza - wprowadzenie	15
1.4.2	Rola śródbłónka naczyniowego w utrzymaniu naczyniowej homeostazy.....	16
1.4.3	Charakterystyka wybranych białek adhezyjnych, śródbłonkowych czynników pro- i przeciwzakrzepowych oraz CRP	17
2	Założenia pracy i cele pracy	25
3	Materiał i metody.....	26
3.1	Charakterystyka grupy badanej	26
3.2	Pobranie materiału do badań	31
3.2.1	Pobieranie i przechowywanie materiału.....	31
3.3	Metodyka badań.....	31
3.3.1	Metodyka badań - morfologia.....	31
3.3.2	Metodyka badań - parametry układu krzepnięcia	31
3.3.3	Metodyka badań wykonanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej i Medycyny Laboratoryjnej	32
3.4	Analiza statystyczna.....	43
4	Wyniki i ich omówienie	46
4.1	Ocena podstawowych parametrów laboratoryjnych w poszczególnych grupach badanych.....	46
4.2	Ocena stężenia hsCRP jako wykładnika stanu zapalnego w badanych grupach.....	48
4.3	Parametry układu krzepnięcia: APTT, D-dimery, fibrynogen, PT, INR, wskaźnik PT w grupach IUGR i IUGR+PE	53
4.4	Ocena markerów adhezji komórkowej, wybranych wykładników pro- i przeciwzakrzepowych.....	55

4.4.1	Ocena markerów adhezji komórkowej sICAM-1 i sVCAM-1 w badanych grupach.....	55
4.4.2	sTM	70
4.4.3	vWF.....	72
4.4.4	tPA.....	74
4.4.5	PAI-1	75
4.4.6	TFPI.....	78
4.4.7	Model złożoności procesu równowagi w układzie hemostazy – ujęcie systemowe.....	80
5	Dyskusja	83
6	Wnioski	101
7	Streszczenie	102
8	Summary	104
9	Piśmiennictwo.....	107
10	Załączniki.....	118
11	Spis tabel i rycin.....	120
11.1	Spis tabel.....	120
11.2	Spis rycin	120

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AC	obwód brzucha (ang. <i>abdominal circumference</i>)
APC	aktywowane białko C (ang. <i>activated protein C</i>)
ADP	adenozynodifosforan (ang. <i>adenosine diphosphate</i>)
APTT	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. <i>activated partial thromboplastin time</i>)
AT III	antytrombina III (ang. <i>antithrombin III</i>)
BPD	wymiar dwuciemienny (ang. <i>biparietal diameter</i>)
CAM	cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ang. <i>cell adhesion molecules</i>)
CRL	długość ciemieniowo-siedzeniowa płodu (ang. <i>crown-rump length</i>)
DIA	tętnicze ciśnienie rozkurczowe (ang. <i>diastolic blood pressure</i>)
DIC	zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. <i>disseminated intravascular coagulation</i>)
EFW	szacunkowa masa ciała (ang. <i>estimated fetal weight</i>)
FL	długość kości udowej (ang. <i>femur length</i>)
FDP	produkty degradacji fibrynogenu (ang. <i>fibrinogen degradation products</i>)
FGR	ograniczenie wzrastania płodu (ang. <i>fetal growth restriction</i>)
FOD	czołowo-potyliczny wymiar głowy (ang. <i>frontal-occipito diameter</i>)
HC	obwód głowy (ang. <i>head circumference</i>)
Hcy	homocysteina
hsCRP	białko C - reaktywne oznaczane metodą wysoce czułą (ang. <i>high sensitivity C-reactive protein</i>)
ICAM-1	międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IL	interleukina
INR	międzynarodowy współczynnik znormalizowany (ang. <i>international normalized ratio</i>)
IUGR	wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (ang. <i>intrauterine growth restriction</i>)
LBW	mała masa urodzeniowa (ang. <i>low birth weight</i>)
mCAM	błonowe formy cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ang. <i>mebrane cell adhesion molecules</i>)

PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAI-2	inhibitor aktywatora plazminogenu 2 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor-2</i>)
PE	stan przedrzucawkowy (ang. <i>preeclampsia</i>)
PT	czas protrombinowy (ang. <i>prothrombin time</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SGA	noworodek wykazujący cechy hipotroficzne (ang. <i>small for gestational age</i>)
sCAM	rozpuszczalne formy cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ang. <i>soluble cell adhesion molecules</i>)
sTM	rozpuszczalna forma trombomoduliny (ang. <i>soluble thrombomodulin</i>)
SYS	tętnicze ciśnienie skurczowe (ang. <i>systolic blood pressure</i>)
TAFI	aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (ang. <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>)
TCD	wymiar poprzeczny mózdzku (ang. <i>transverse cerebellar diameter</i>)
TF	czynnik tkankowy (ang. <i>tissue factor</i>)
TFPI	inhibitor układu zewnątrzpochodnego (ang. <i>tissue factor pathway inhibitor</i>)
TM	trombomodulina (ang. <i>thrombomodulin</i>)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>)
uPA	urokinaza, aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. <i>urokinase-type plasminogen activator</i>)
wskaźnik PT	wskaźnik protrombinowy, wskaźnik Quicka
VCAM-1	białko adhezyjne komórek naczyniowych 1, znane również jako cząsteczka adhezji komórek naczyniowych 1 (ang. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	czynnik von Willebranda (ang. <i>von Willebrand factor</i>)

1 WSTĘP

1.1 WPROWADZENIE

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR, ang. *intrauterine growth restriction*) oraz stan przedrzucawkowy - preeklampsja (PE, ang. *preeclampsia*) są zaburzeniami towarzyszącymi ludzkości od bardzo dawna. Już blisko 2000 lat temu Aulus Cornelius Celsus w swoim dziele *De Medicina* opisał przypadek kobiety, u której zaobserwowano drgawki podczas ciąży. Objawy te ustąpiły po urodzeniu dziecka. Chorobę, ze względu na charakterystyczne objawy, nazwano rzucawką. Dziś mianem rzucawki określa się wystąpienie stanu drgawkowego u kobiet z PE, po wykluczeniu innych przyczyn. Stan przedrzucawkowy dotyka od 2 do 15 procent ciąż i w krajach rozwijających się stanowi jedną z wiodących przyczyn śmierci ciężarnych, szacuje się, że na świecie, stan przedrzucawkowy i rzucawka są odpowiedzialne za ok. 14% zgonów wśród ciężarnych w ciągu roku.

Podobnie jak w przypadku stanu przedrzucawkowego, IUGR nie jest chorobą nową. Od stuleci obserwowano sytuacje poronień powiązanych z bardzo niską masą urodzeniową dziecka, czy też narodziny nieprawidłowo rozwiniętych noworodków. Szacuje się, że w krajach rozwijających się, częstość występowania niskiej masy urodzeniowej, dotyczy około 3–10% żywo urodzonych noworodków. Za najczęstszą przyczynę niskiej masy urodzeniowej uważa się IUGR, a około 10% umieralności okołoporodowej jest konsekwencją właśnie IUGR (1).

Pomimo faktu, że badania trwają od dziesiątek lat, nadal nie są znane bezpośrednio przyczyny rozwoju IUGR oraz PE. Obecnie istnieje wiele teorii próbujących wyjaśnić patomechanizm wspomnianych zaburzeń. Zakładają one udział licznych czynników, takich jak m.in.: dysfunkcja śródbłónka, nieprawidłowa inwazja trofoblastu, znaczenie stresu oksydacyjnego, wpływ nadciśnienia tętniczego, czy nikotynizm. Prawdopodobnie złożoność procesów, leżących u podłoża analizowanych zaburzeń sprawia, że wyniki prowadzonych do tej pory badań nie są jednoznaczne.

Ze względu na podnoszone kwestie znaczenia śródbłónka w zrozumieniu patomechanizmu IUGR i PE w rozprawie podjęto się oceny funkcji pro- i przeciwzakrzepowej śródbłónka naczyniowego we wspomnianych zaburzeniach.

W badaniach będących przedmiotem tej rozprawy, u zrekrutowanych ciężarnych, oznaczono wybrane parametry o charakterze pro- lub przeciwzakrzepowym, oraz oceniono wykładniki zapalne. Wybrane do oceny parametry mają związek z funkcjonowaniem śródbłonna naczyniowego, a ich ewentualne ilościowe zmiany mogą świadczyć o jego dysfunkcji, rozumianej jako możliwość aktywacji lub uszkodzenia śródbłonna, która jest sugerowana przez badaczy jako jeden z czynników biorących udział w patologii IUGR i PE.

Dodatkowo, aby lepiej poznać badane zagadnienie, w ramach podejścia systemowego do złożonego procesu patofizjologicznego, stworzono autorski model prezentujący funkcjonowanie układu krzepnięcia, zgodnie z koncepcją medycyny systemowej, gdzie organizm lub proces stanowią sieć wzajemnych powiązań. Przedstawiona w nim została część osoczowa hemostazy, obejmująca szlak zewnątrzpochodny, wewnątrzpochodny oraz wspólny, wraz z wzajemnymi zależnościami. W części płytkowej hemostazy zaprezentowano procesy aktywacji, adhezji i agregacji płytek wraz z czynnikami biorącymi w nich udział. W modelu uwzględnione zostały czynniki pro- i przeciwzakrzepowe, których stężenia oznaczone zostały w ramach prowadzonych przeze mnie badań. Pomysł na stworzenie takiego modelu pojawił się w momencie uzyskania pierwszych wyników laboratoryjnych prowadzonych w ramach rozprawy badań. Pojawiło się pytanie, dlaczego wyniki nie są tak jednoznaczne, jakby się tego można było spodziewać. Zaproponowany model ukazał dużą złożoność procesów, które od dysfunkcji śródbłonna prowadzą w efekcie końcowym do powstania trwałego skrzepu mającego na celu uniemożliwienie utraty krwi. To skomplikowanie wynikające zarówno z dużej ilości czynników, złożoności procesów i licznych zależności pomiędzy nimi, może stanowić poważny problem natury diagnostycznej. W tej sytuacji oznaczenie konkretnych parametrów biochemicznych może okazać się niewystarczające, gdyż ich prawidłowy poziom nie zawsze pozwala wykluczyć ryzyko wystąpienia zaburzeń, podobnie jak nieprawidłowe stężenie nie zawsze dowodzi wystąpienia choroby. Spowodowane jest to faktem, że IUGR czy PE są zaburzeniami o wieloczynnikowej etiologii i nie ma jednego konkretnego czynnika wywołującego chorobę, a pojawiające się zaburzenia w obrębie śródbłonna i jego konsekwencje mogą, lecz nie muszą doprowadzić do rozwoju choroby. Również w przypadku badań klinicznych konkretna grupa badana może zachowywać się odmiennie pod względem dynamiki zmian parametrów biochemicznych w stosunku do równolegle prowadzonych badań przez inne zespoły

badawcze. Przyczyny mogą być często nieoczywiste i trudne do wykrycia przy użyciu klasycznych metod badawczych. Otwiera to drogę medycynie systemowej, która umożliwia wykrycie pozornie niezwiązanych, a nawet nielogicznych zależności pomiędzy parametrami, czy procesami które dotychczas nie były brane pod uwagę. Tworzenie precyzyjnego modelu procesem stanowi wstęp do takich analiz.

1.2 WEWNĄTRZMACICZNE OGRANICZENIE WZRASTANIA PŁODU (IUGR)

Wewnątrzmaciczne ograniczanie wzrastania płodu (IUGR), termin wprowadzony w 1961 roku przez Warkany'ego, dotyczy zaburzenia, w którym płód z różnych przyczyn nie wykorzystał potencjału do wzrostu.

IUGR definiowane jest jako wzrastanie poniżej genetycznie oczekiwanego potencjału i dotyczy płodów, które:

- nie osiągają potencjalnego, optymalnego wzrostu i wielkości;
- charakteryzują się dynamiką wzrastania, która nie odpowiada wiekowi ciążowemu

Obecnie w literaturze nie ma jednoznacznej definicji IUGR, problematyczne jest również stosowane w literaturze różnorodne nazewnictwo. W ocenie rozwoju noworodków używane jest również pojęcie SGA (ang. *small for gestational age*), oznaczające noworodka wykazującego zbyt małą masę w stosunku do wieku ciążowego. Pojęcie to dotyczy masy i/lub długości ciała noworodka, które są mniejsze niż 2 odchylenia standardowe (SD) lub są poniżej 10. centyla należnego wieku płodowego. W związku z tym należy podkreślić, że nie wszystkie noworodki wykazujące cechy SGA będą posiadały cechy kwalifikujące je do grupy IUGR. Na przykład noworodek może mieć małą długość ciała ze względu na cechy rodziców (niska wysokość, bardzo drobna budowa ciała), a nie ze względu na patologię. Podobnie nie wszystkie przypadki IUGR będą wykazywały cechy SGA, np. w sytuacji gdy parametry noworodka nie są poniżej wartości uznawanych za prawidłowe, ale z różnych przyczyn doszło do zahamowania prawidłowego rozwoju. Oba pojęcia, pomimo faktu iż są podobne do siebie, nie powinny być stosowane zamiennie.

W chwili obecnej powszechniej stosowany jest termin ograniczenie wzrastania płodu (FGR, z ang. *fetal growth restriction*), którego synonimem jest IUGR. W momencie powstawania koncepcji badań w ramach tej rozprawy używano częściej nazwę IUGR, stąd to ona znalazła się w tytule i konsekwentnie była stosowana w niniejszej pracy. Należy pokreślić, że oba terminy określają to samo zaburzenie (2–4).

Najbardziej szerokim określeniem zaburzenia wzrastania jest termin „dystrofia”, obejmujący spektrum zaburzeń: od hipotrofii dotyczącej nieprawidłowego odżywienia do hipertrofii, gdzie obserwowany jest stan nadmiernego odżywienia płodu. Wspomniany już IUGR jest zaburzeniem dotyczącym upośledzenia (zahamowania, restrykcji) wzrastania. Z kolei mała masa urodzeniowa (LBW, ang. *low birth weight*) to masa nieprzekraczająca 2500 g w momencie porodu.

Brak jednoznacznej definicji IUGR zdecydowanie utrudnia ocenę tego zaburzenia. Aby w sposób zadowalający je zdiagnozować, konieczne jest zastosowanie odpowiednich krzywych uwzględniających dynamikę wzrastania i rodności, wzrostu kobiety ciężarnej, masy ciała sprzed ciąży, rasy, płci płodu, a także ciąży wielopłodowej z uwzględnieniem liczby płodów.

Nieprawidłowe wzrastanie płodu potwierdza się uzyskaniem, wykraczających poza normy należne dla danego wieku ciążowego, wyników pomiarów głowy, brzucha i kończyn. W celu ustalenia prawidłowego rozpoznania wykonywane są pomiary co 2-3 tygodnie. W schemacie postępowania, bardzo istotna jest prawidłowa ocena wieku ciążowego, oraz wykluczenie wad rozwojowych, a także wykładników zakażenia, mogących istotnie wpływać na rozpoznanie.

Podstawowe parametry oceniane w diagnostyce IUGR:

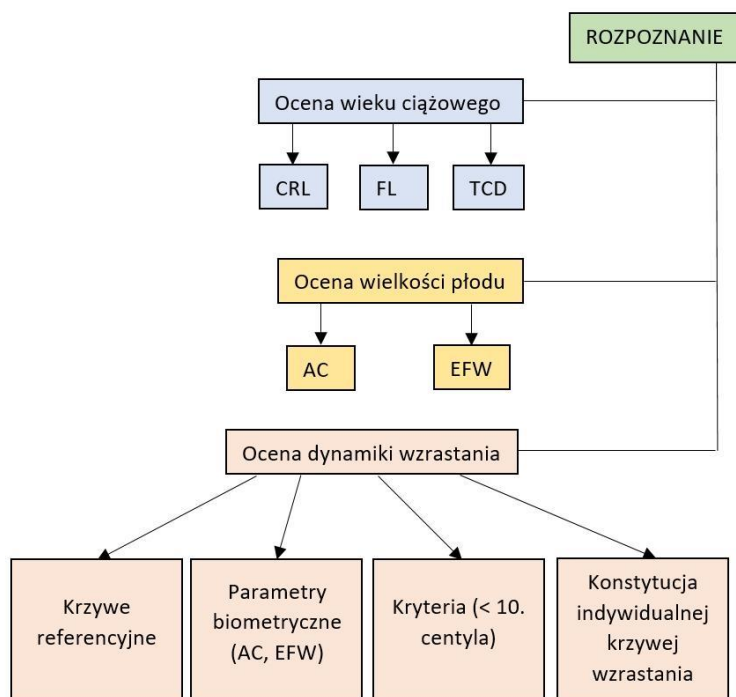
- wymiary główki płodu: (BPD – wymiar dwuciemieniowy główki płodu, ang. *biparietal diameter*; FOD – wymiar czołowo-potyliczny głowy, ang. *frontal-occipito diameter*; HC – obwód głowy, ang. *head circumference*);
- obwód brzucha (AC, ang. *abdominal circumference*);
- długość kości udowej (FL, ang. *femur length*);
- wzajemne relacje pomiędzy mierzonymi parametrami np. AC/FL.

W przebiegu IUGR obserwowane jest zmniejszenie objętości płynu owodniowego, co związane jest z niewydolnością łożyska, dlatego też bardzo przydatne dla postawienia

prawidłowej diagnozy jest stwierdzenie czy nie doszło do zmniejszenia objętości płynu owodniowego (AFI, ang. *amniotic fluid index* – wskaźnik Phalena). Większość stosowanych metod używanych do oceny IUGR to metody pośrednie, a postawienie ostatecznej diagnozy zwykle jest możliwe dopiero po urodzeniu. Rozpoznanie opiera się na badaniu klinicznym noworodka oraz w oparciu o wyniki badań biochemicznych. Ze względu na fakt, że niska masa urodzeniowa dziecka (<2500 g) może być spowodowana IUGR, wcześniactwem, przyczynami konstytucjonalnymi lub wszystkimi zaburzeniami/cechami jednocześnie, w diagnostyce stosuje się:

- w pierwszym trymestrze ciąży: ocenę wieku ciążowego na podstawie długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (CRL, ang. *crown-rump length*) lub długości kości udowej (FL, ang. *femur length*) lub wymiary poprzecznego mózdzku (TCD, ang. *transverse cerebellar diameter*);
- ocenę wielkości płodu na podstawie pomiaru obwodu brzucha płodu (AC) oraz szacunkowej masy ciała (EFW, ang. *estimated fetal weight*);
- ocenę dynamiki wzrastania płodu;

Na rycinie 1 (Ryc. 1.) zaprezentowano algorytm postępowania prezentujący zasady dokonywania oceny wieku ciążowego, wielkości płodu oraz dynamiki wzrastania (5).



Rycina 1. Algorytm postępowania w ocenie i weryfikacji wieku ciążowego, wielkości płodu oraz dynamiki wzrastania.

W niniejszej rozprawie przedstawiono jedynie ogólny zarys diagnostyki IUGR, gdyż ocena stosowanych metod kwalifikacji nie była przedmiotem pracy. Należy podkreślić, że złożoność procesu diagnostycznego w przypadku IUGR sprawia, że często postawienie jednoznacznego rozpoznania jest bardzo trudne i wymaga dużego doświadczenia od lekarza wykonującego badanie.

Ponadto w ciążach powikłanych IUGR występuje także niewydolność łożyska na skutek nieprawidłowej inwazji trofoblastu i uszkodzenia śródbłónki naczyniowej.

1.3 STAN PRZEDRZUCAWKOWY

Stan przedrzucawkowy (preeklampsja, PE) jest szczególną formą nadciśnienia indukowanego ciążą, pojawiającą się najczęściej po 20 tygodniu ciąży (przed 20 tygodniem ciąży można ją rozpoznać w wyjątkowych sytuacjach, jaką jest choroba trofoblastyczna), któremu może towarzyszyć ból w nadbrzuszu, zaburzenia widzenia u ciężarnej, bóle głowy, małopłytkowość, białkomocz czy IUGR.

Etiopatogeneza PE nadal pozostaje nie w pełni wyjaśniona. W jej złożonym i wieloczynnikowym charakterze podkreśla się rolę czynników genetycznych, immunologicznych i metabolicznych. Współcześnie za najbardziej prawdopodobny uważa się model dwuetapowego rozwoju PE.

W przebiegu PE często dochodzi do aktywacji układu krzepnięcia i zagrożenia rozwojem DIC. W miarę postępu badań określone zostały czynniki ryzyka wystąpienia PE, wśród których wyróżnia się:

- a) stwierdzone podczas zbierania wywiadu: pierwsza ciąża, wiek ciężarnej <20 lub >40 roku życia, choroby w wywiadzie (przewlekłe nadciśnienie tętnicze, zespół antyfosfolipidowy, cukrzyca, toczeń rumieniowaty układowy, przewlekłe schorzenia nerek, otyłość – BMI >30 kg/m²), PE w poprzedniej ciąży (niezależnie od nasilenia, zwłaszcza w przypadku wcześnie występującej ciężkiej PE), wystąpienie PE w najbliższej rodzinie (matka, siostra);
- b) związane z aktualną ciążą: ciąża wielopłodowa, cukrzyca ciążowa, uogólniony obrzęk płodu, trisomia płodu, ciążowa choroba trofoblastyczna;

c) inne potencjalne czynniki: wewnątrzmaciczne narażenie na PE, kobiety urodzone jako SGA, trombofilie, przyjmowanie hormonów tarczycy w trakcie ciąży.

Współcześnie PE nadal stanowi poważne zagrożenie zarówno dla zdrowia i życia płodu oraz noworodka, jak także bardzo istotną przyczyną zgonów kobiet w ciąży i w okresie połogu. Do bezpośrednich powikłań PE należą: niedotlenienie, IUGR oraz śmierć płodu. Stąd, PE jest często wskazaniem do wcześniejszego zakończenia ciąży skutkując wcześniactwem u noworodka i w konsekwencji przyczyniając się do wzrostu zachorowalności noworodków i niemowląt. U matek, PE, predysponuje do wystąpienia rzucawki, przedwczesnego oddzielenia się łożyska, zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC, ang. *disseminated intravascular coagulation*), udaru krwotocznego mózgu, niewydolności nerek i wątroby, obrzęku płuc oraz może być przyczyną zgonu pacjentki (6).

W obrazie klinicznym PE dominuje nadciśnienie tętnicze, a cechą charakterystyczną jest uogólniony skurcz naczyń krwionośnych. Podstawowym kryterium rozpoznania nadciśnienia tętniczego w ciąży jest stwierdzenie ciśnienia tętniczego krwi $\geq 140/90$ mm/Hg dwukrotnie w odstępie 4 godzin. Nadciśnienie u ciężarnych rozwija się stopniowo, jednym z początkowych zaburzeń jest odwrócenie rytmu dobowego, następnie brak obniżenia ciśnienia w godzinach nocnych. W kolejnym etapie pojawia się nadciśnienie o niewielkim nasileniu.

Ponadto, w PE dochodzi do wzrostu przepuszczalności lub uszkodzenia kłębuszków nerkowych, czego efektem jest wykrywany białkomocz. Jako podstawę rozpoznania przyjmuje się białkomocz ≥ 300 mg białka w dobowej zbiorce moczu oznaczonego metodą ilościową, lub współczynnik białko/kreatynina $\geq 0,3$, lub białkomocz oceniany jako +1 w teście półilościowym (metoda paskowa). Główną frakcją w moczu są albuminy. W chwili obecnej w schemacie rozpoznawania PE nie jest konieczne stwierdzenie białkomoczu. W przypadku jego braku, w celu rozpoznania PE, stosuje się obecność nadciśnienia oraz jednego z zaburzeń, takich jak:

- małopłytkowość – ilość płytek krwi $< 100\,000/\mu\text{l}$;
- choroby wątroby – wzrost aktywności aminotransferaz dwukrotnie powyżej górnej granicy normy;
- nieprawidłowe funkcjonowanie nerek – stężenie kreatyniny $> 1,1$ mg/dl lub dwukrotny wzrost stężenia kreatyniny przy braku chorób nerek w wywiadzie;

- obrzęk płuc;
- zaburzenia ze strony OUN lub zaburzenia wzroku (5).

1.4 UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKA W ZABURZENIACH HEMOSTAZY

1.4.1 HEMOSTAZA - WPROWADZENIE

W warunkach fizjologicznych układ hemostazy pełni w organizmie dwie zasadnicze funkcje:

- utrzymuje płynność krwi krążącej
- zatrzymuje krwawienie - poprzez tworzenie skrzepliny.

Krew występuje w dwóch stanach skupienia: cieczy i ciała stałego, co wynika z istnienia mechanizmów prozakrzepowych i przeciwzakrzepowych. Prawidłowa hemostaza jest procesem wysoce zintegrowanym i efektem precyzyjnej równowagi między różnorodnymi czynnikami hamującymi i aktywującymi krzepnięcie. Z jednej strony, dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, konieczne jest zapewnienie ciągłej płynności krwi i prawidłowego jej przepływu w układzie krążenia. Z kolei w momencie wynaczynienia (uraz, uszkodzenie naczynia krwionośnego) niezbędne jest szybkie uruchomienie mechanizmów prowadzących do zahamowania wypływu krwi w miejscu uszkodzenia. Zachwianie tej równowagi może leżeć u podstaw rozwoju skazy krwotocznej lub powikłań zakrzepowych. Z klinicznego punktu widzenia zakrzepica wydaje się być istotniejszym problemem, niż krwawienie, a rozpoznanie nadkrzepliwości czy stanu przedzakrzepowego staje się bardzo ważne w kontekście podjęcia działań prewencyjnych.

Dodatkowo, należy pamiętać o czynnikach nie-hemostatycznych, które poprzez wpływ na układ hemostazy, sprzyjają rozwojowi powikłań zakrzepowych, do których zalicza się przeciwciała antyfosfolipidowe (aPL), lipoproteinę a (Lp(a)) oraz homocysteinę (Hcy).

Zakrzepica, będąca jedną z najważniejszych bezpośrednich przyczyn śmiertelności z powodu współczesnych chorób cywilizacyjnych (choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, zatorowość płucna), może także dotyczyć kobiet ciężarnych. Równie istotny jest wpływ zakrzepicy łożyskowej na stan płodu (IUGR, wewnątrzmaciczny zgon płodu) (7,8).

1.4.2 ROLA ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W UTRZYMANIU NACZYNIOWEJ HOMEOSTAZY

Śródbłonek naczyniowy (endotelium), największy narząd wewnątrzwydzielniczy człowieka, zapewnia homeostazę naczyniową, poprzez syntezę wielu substancji kontrolujących: (1) napięcie naczyniowe; (2) adhezję i agregację płytek krwi; (3) rozrost komórek mięśni gładkich i tkanki łącznej oraz (4) procesy adhezji leukocytów (9,10).

W warunkach fizjologii, głównym zadaniem śródbłonna naczyniowego jest, poprzez regulację krzepliwości krwi, utrzymanie dynamicznej równowagi pomiędzy procesami pro- i antyzakrzepowymi, co sprzyja utrzymaniu stałego przepływu krwi. Komórki endotelium pozostają wówczas w stanie spoczynku, tj. nie prezentują receptorów adhezyjnych, a jednocześnie uwalniają do środowiska czynniki antyzakrzepowe, które przeważają nad czynnikami prozakrzepowymi.

Właściwości antyzakrzepowe endotelium związane są z syntezą i działaniem takich czynników jak m.in.: prostacyklina i tlenek azotu, tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI, ang. *tissue factor pathway inhibitor*), heparynopodobne glukozoaminy, ektonukleotydaza, ADP-aza, trombomodulina (TM, ang. *thrombomodulin*), czy produkowana we wątrobie antytrombina III (AT III, ang. *antithrombin III*).

Podczas ciąży dochodzi do przewagi procesów prozakrzepowych, co związane jest zarówno ze zwiększoną produkcją czynników prozakrzepowych, jak i zmniejszeniem stężenia inhibitorów krzepnięcia. Ma to na celu zabezpieczenie organizmu ciężarnej przed nadmiernym krwawieniem.

Należy zaznaczyć, że synteza i uwalnianie przez śródbłonek substancji o właściwościach prozakrzepowych, może następować w sposób ciągły lub okresowy. W sposób ciągły wydzielane są m.in. endotelina 1, czynnik von Willebranda (vWF, ang. *von Willebrand factor*), inhibitor tkankowy aktywatora plazminogenu (PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor-1*), tromboksan A₂, trombospondyna oraz czynniki V i VIII. Z kolei okresowe wydzielanie cząsteczek następuje przez aktywowane komórki śródbłonna. Do aktywacji lub uszkodzenia komórek śródbłonna i ich dysfunkcji dochodzi pod wpływem działania szkodliwych czynników, takich jak: nadciśnienie tętnicze, reperfuzja, stres psychiczny, stres oksydacyjny, cytokiny zapalne, niedotlenienie oraz przy udziale czynników genetycznych i wpływu wieku. W tej sytuacji wydzielane są m.in.

czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF), czynnik aktywujący płytki, czynniki stymulujące, czynniki wzrostu, molekuly adhezyjne: białko adhezyjne komórek naczyniowych 1, znane również jako cząsteczka adhezji komórek naczyniowych (VCAM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule-1*), międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule-1*) oraz interleukiny 1, 5, 6, 8 (IL-1, IL-5, IL-6, IL-8). Największe znaczenie ma tutaj IL-6, która nasila stężenie fibrynogenu, czynnika VIII, vWF, ekspresję tromboplastyny tkankowej (nazywanej czynnikiem tkankowym, TF) i produkcję płytek. Powoduje ona ponadto obniżenie stężenia antytrombiny III (AT III, ang. *antithrombin III*), białka S istotnych w procesie utrzymania równowagi hemostazy.

1.4.3 CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH BIAŁEK ADHEZYJNYCH, ŚRÓDBŁONKOWYCH CZYNNIKÓW PRO- I PRZECIWZAKRZEPOWYCH ORAZ CRP

1.4.3.1 BIAŁKO ADHEZYJNE KOMÓREK NACZYNIOWYCH 1, ZWANE RÓWNIEŻ CZĄSTECZKĄ ADHEZJI KOMÓREK NACZYNIOWYCH 1 (VCAM-1) ORAZ MIĘDZYKOMÓRKOWA CZĄSTECZKA ADHEZYJNA 1 (ICAM-1)

Białka adhezyjne to cząsteczki pojawiające się na powierzchni endotelium, które wchodzi w interakcje z antygenami występującymi na powierzchni białych krwinek i umożliwiają ich przyleganie do powierzchni śródbłónka, co jest pierwszym etapem procesu wejścia leukocytów komórek do ściany naczynia (11).

VCAM-1 jest transbłonową glikoproteiną o pojedynczym łańcuchu; należąca do nadrodziny immunoglobulin (12). VCAM-1 jest ligandem integrzyn i działa jak receptor transbłonowy w komórkach śródbłónka. Wśród cząsteczek adhezyjnych jest ona głównym regulatorem adhezji i migracji leukocytów przez śródbłonek. Regulacja ta odbywa się poprzez interakcję VCAM-1 - integryny, prowadząc do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych w aktywowanych komórkach śródbłónka. Aktywacja komórek endotelialnych pozwala na migrację leukocytów przez śródbłonek i stanowi warunek migracji leukocytów do otoczenia (13). Pod wpływem cytokin prozapalnych komórki śródbłónka zwiększają ekspresję VCAM-1, co nasila migrację leukocytów (14).

ICAM-1 jest białkiem przezbłonowym, pośredniczącym w adhezji i migracji leukocytów przez ścianę naczyń krwionośnych. ICAM-1 jest receptorem dla β_2 – integrzyn

leukocytów związanym z procesem adhezji i migracją leukocytów przez barierę komórek śródbłónka. Dodatkowo zauważono, że ligandem tego receptora jest również fibrynogen. Obecność ICAM-1 zwiększa zdolność leukocytów do wiązania się z komórkami śródbłónka.

ICAM-1 wiąże m.in. fibrynogen, hialuronian, a także rinowirusy. Mechanizm wiązania fibrynogenu może odpowiadać w pewnym stopniu za aterogenne działanie podwyższonych poziomów fibrynogenu.

W organizmie człowieka cząsteczki adhezji międzykomórkowej (CAM, ang. *cell adhesion molecules*), do których należą m.in. VCAM-1 i ICAM-1, mogą występować w dwóch postaciach: (1) jako białka transbłonowe (mCAM, ang. *membrane cell adhesion molecules*) oraz (2) jako białka rozpuszczalne (sCAM, ang. *soluble cell adhesion molecules*). sICAM-1 i sVCAM-1 powstają w następstwie alternatywnego splicingu i proteolizy związanego z błoną ICAM-1 i VCAM-1. Często są one wykorzystywane jako markery aktywacji komórek śródbłónka lub jego uszkodzenia.

Niektórzy badacze postulują, że ICAM-1 i VCAM-1 mogą być bezpośrednio zaangażowane w patofizjologię PE (15).

1.4.3.2 TROMBOMODULINA (TM)

Trombomodulina jest integralną glikoproteiną przezbłonową zlokalizowaną głównie na powierzchni komórek śródbłónka tętnic, żył oraz naczyń włosowatych, a także w zdecydowanie mniejszej ilości na powierzchni komórek piankowatych, trombocytów, megakariocytów oraz komórek mięśni gładkich kompleksu błony wewnętrznej i środkowej (intima-media) ścian naczynia. Wykryto, że TM pojawia się podczas rozwoju łożyska i wytwarzana jest zarówno przez syncytiotrofoblast, jak i komórki śródbłónka.

TM bierze udział w hamowaniu procesu krzepnięcia, wiążąc się z trombiną w stechiometrycznym stosunku 1:1. Kompleks trombomoduliny z trombiną nie posiada cech prozakrzepowych. TM zmniejsza również prozapalne działanie trombiny. Kompleks ten w obecności białka S jako kofaktora doprowadza do degradacji czynnika Va i VIIa oraz do inaktywacji inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1).

TM wywiera działanie przeciwzakrzepowe nie tylko poprzez hamowanie trombiny, ale także poprzez przyspieszanie wytwarzania aktywowanego białka C (APC, ang. *activated protein C*). Zaobserwowano u myszy, że utrata TM ze śródbłónka powoduje przerwanie szlaku, co prowadzi do śmiertelnej masywnej zakrzepicy. Oprócz działania przeciwzakrzepowego, APC pełni ważną funkcję ochronną dla śródbłónka; poprzez śródbłonkowy receptor białka C, wywiera bezpośredni wpływ przeciwzapalny i przeciwapoptotyczny na komórki śródbłónka. W eksperymentalnym modelu myszy ten efekt przeciwapoptotyczny chronił myszy przed nefropatią cukrzycową. Ponadto APC odgrywa rolę w przebudowie tkanek poprzez aktywację metaloproteinaz macierzy 2 i 9, które biorą udział w rozwoju łożyska i są rozregulowane w stanie przedrzucawkowym (16).

Zaobserwowano, że stan zapalny obniża ekspresję TM. TNF- α indukuje internalizację TM poprzez endocytozę, zmniejszając w ten sposób jej ekspresję powierzchniową (17). Taka zmniejszona ekspresja TM w miejscach uszkodzenia zapalnego może nasilać krzepnięcie krwi. Rzeczywiście, specyficzna dla śródbłónka delecja TM u myszy spowodowała spontaniczną i śmiertelną zakrzepicę w naczyniach tętniczych i żylnych (18), co wskazuje, że TM może odgrywać rolę w zapobieganiu tworzeniu się skrzepliny wewnątrznacyniowej.

Dodatkowo TM moduluje fibrynolizę i stan zapalny poprzez aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (TAFI, ang. *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*). TAFI to

krążący zymogen, który jest aktywowany przez kompleks trombiny-TM (19). Zatem zaburzenia aktywacji TAFI mogą przyczyniać się do nasilenia zaburzeń krzepnięcia, i odwrotnie, zwiększona aktywacja TAFI z powodu nasilonego wytwarzania trombiny może prowadzić do zaburzeń zakrzepowych (20).

W wyniku proteolitycznej degradacji komórek śródbłónka po uszkodzeniu przez produkty stresu oksydacyjnego, takie jak nadtlenek wodoru lub aktywowane leukocyty (21) dochodzi do nasilonego odłączania zewnątrz błonowego fragmentu TM. Ten fragment TM nazywany jest frakcją rozpuszczalną TM (sTM, ang. *soluble thrombomodulin*). Wzrost stężenia sTM prowadzi do zmniejszenia ekspresji TM na powierzchni komórek endotelium i wtedy cząsteczka TM traci swoje wazoprotekcyjne właściwości.

Krążące sTM są w stanach fizjologii występują w bardzo niskich stężeniach, przy czym w stanach patologicznych często dochodzi do ich umiarkowanego, ale znaczącego, ok. 1,5 do 2,0-krotnego wzrostu w osoczu pacjenta. Choć stężenia sTM są prawdopodobnie zbyt niskie, aby mieć znaczący wpływ na procesy krzepnięcia, stały wzrost poziomów krążącej TM w stanie patologii jest obecnie powszechnie uważany za ważny biomarker dysfunkcji śródbłónka i oceny ryzyka naczyniowego (22–25). Zgodnie z tym poglądem stwierdzono, że podwyższone poziomy TM w osoczu korelują z miażdżycą, wystąpieniem udaru, otyłością, zespołem metabolicznym (26), toczniem rumieniowatym, stanem PE (27) posocznicą związany z rozsianym wykrzepianiem wewnątrznaczyniowym (DIC) i ciężkim ostrym zespołem oddechowym (SARS) (28). Znacząco podwyższone poziomy sTM w osoczu obserwowano również u pacjentów po operacji pomostowania tętnic wieńcowych (29).

Z drugiej strony, kilka badań klinicznych ujawniło istnienie zaburzeń naczyniowych objawiających się obniżonymi poziomami sTM. Na przykład, odnotowano odwrotną zależność między sTM a ryzykiem choroby w przypadku cukrzycy typu 2 (30) i choroby niedokrwiennej serca (31), podczas gdy niższe poziomy sTM odnotowano w surowicy pacjentów cierpiących na ostry zawał mózgu, a badanie MONICA/KORA wskazało na brak jakiegokolwiek związku między poziomem sTM a ryzykiem choroby wieńcowej (32).

1.4.3.3 CZYNNIK VON WILLEBRANDA (vWF)

Czynnik von Willebrand (vWF, ang. *von Willebrand factor*) jest osoczymym czynnikiem krzepnięcia niezbędnym w prawidłowym procesie krzepnięcia. W stanie fizjologicznym występuje w osoczu w postaci nieaktywnej.

vWF jest glikoproteiną składającą się głównie z multimerów zbudowanych z identycznych podjednostek; w zależności od wielkości wyróżnia się, multimery wielko-średnio- i niskocząsteczkowe oraz tak zwane ultra duże multimery, niewystępujące we krwi w warunkach fizjologii.

Do syntezy vWF dochodzi przede wszystkim w komórkach śródbłónka oraz w mniejszym stopniu w megakariocytach. Potwierdzono obecność vWF w osoczu, w płytkach krwi oraz w tkance podśródbłónkowej. Większość multimerów vWF jest w sposób ciągły syntetyzowana przez komórki śródbłónka, jedynie ultra duże multimery są magazynowane w ziarnistościach Weibel-Palade komórek endotelialnych. Z kolei w megakariocytach, vWF jest w całości magazynowany w postaci ultra dużych multimerów w ziarnistościach alfa.

Wydzielanie vWF następuje w wyniku interakcji z trombiną oraz innymi czynnikami, takimi jak fibryna, histamina, czy kompleks układu dopełniacza. Zmagazynowany vWF w postaci ultra dużych multimerów, które są najbardziej trombogenne, jest uwalniany po stymulacji śródbłónka, zarówno fizjologicznej, jak i patologicznej. Wspomniane kompleksy vWF wspomagają adhezję płytek krwi, przez łączenie się z płytkami krwi, kolagenem lub innymi składnikami tkanki łącznej ściany naczyniowej uszkodzonego naczynia (33).

Dodatkowo vWF łączy się z czynnikiem VIII stabilizując go i chroniąc przed przedwczesną degradacją. Powstaje wówczas kompleks, który zostaje bezpośrednio dostarczony do miejsca uszkodzenia ściany naczyniowej w wyniku interakcji vW-warstwa podśródbłónkowa. Powstanie tego kompleksu wydłuża okres półtrwania czynnika VIII. W związku z tym nieprawidłowości związane z vWF objawowo przypominają krwawienia związane z dysfunkcją płytek, czy niedoborem czynnika VIII (34).

vWF jest również uznawany za jeden z markerów uszkodzenia śródbłónka (35) a jego zwiększoną ekspresję obserwowano u pacjentek w ciąży powikłanej IUGR (36).

1.4.3.4 TKANKOWY AKTYWATOR PLAZMINOGENU (tPA)

Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA, ang. *tissue plasminogen activator*) jest proteazą serynową wydzielaną przez śródbłonek naczyniowy. Działanie jego polega na przekształceniu plazminogenu (proenzym) w plazminę. Jest elementem wewnątrznaczyniowej fibrynolizy mającej na celu zachowanie płynności krążącej krwi. Plazminogen jest pojedynczym polipeptydem, który ulega rozbiciu na dwa łańcuchy polipeptydowe połączone mostkiem disiarczkowym. tPA bierze udział podczas przebudowy tkanek oraz w migracji komórek.

Wzrost aktywności enzymatycznej tPA powoduje zwiększoną fibrynolizę, co może się objawiać nadmiernym krwawieniem i jednocześnie może sugerować dysfunkcję śródbłonna, z kolei obniżona aktywność sprzyja zakrzepicy i zatorom.

W ciąży fizjologicznej następuje wzrost stężenia tPA w trzecim trymestrze. W przebiegu PE obserwowano zdecydowanie większe stężenia tPA w surowicy krwi w stosunku do prawidłowo przebiegającej ciąży (37).

1.4.3.5 INHIBITOR AKTYWATORA PLAZMINOGENU 1 (PAI-1)

Inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, ang. *plasma activator inhibitor 1*), glikoproteina o ciężarze 48kDa, jest głównym inhibitorem proteaz serynowych: aktywatora typu tkankowego (tPA) i typu urokinazy (uPA) w osoczu. Unieczynnienie tPA i uPA zachodzi poprzez utworzenie nieodwracalnego kompleksu w stosunku stechiometrycznym 1:1.

Inhibitor ten odgrywa istotną rolę w procesach fizjologicznych, a także w patologicznych, takich jak np. otyłość, zakrzepica żył głębokich czy choroby sercowo-naczyniowe. Początkowo PAI-1 wykryto w hodowlach ludzkiego śródbłonna, osoczu, płytkach krwi, łożysku i hepatocytach. Dalsze badania potwierdziły obecność PAI-1 również w innych tkankach, takich jak: mięśniówka gładka, mezangium, fibroblasty, makrofagi, monocyty, adipocyty. Może to wskazywać na istnienie komórki prekursorowej wytwarzającej PAI-1 (38).

PAI-1 jest uznawany za pośredni marker uszkodzenia śródbłonna, a także aktywacji płytek. We wczesnym PE obserwowano jego znaczący wzrost w stosunku do ciąży

niepowikłanych oraz powikłanych późnym PE. Może to czynić ten parametr cennym czynnikiem prognostycznym wczesnego PE (39).

Z drugiej strony, PAI-1 uznaje się, za potencjalny markerem niewydolności łożyska i zmiany jego stężeń w IUGR wiąże się z niedotlenieniem płodu i angiogenezą. Obserwowano w badaniach *in vitro* podwyższone stężenia PAI-1 we krwi pępowinowej w IUGR (40). Komórki cytotrofoblastów izolowane z łożyska ciąż IUGR wykazywały istotnie wyższy poziom PAI-1, przy istotnym spadku aktywności tPA w porównaniu z komórkami trofoblastów z normalnej ciąży hodowanych *in vitro* (40). To lokalne zwiększone wytwarzanie PAI-1 może odgrywać ważną rolę w ograniczaniu wewnątrznaczyniowej inwazji trofoblastu we wczesnej ciąży, zwiększaniu odkładania fibryny i zmniejszaniu macicznie-łożyskowego przepływu krwi w ciążach z IUGR (41).

1.4.3.6 INHIBITOR UKŁADU ZEWNĄTRZPOCHODNEGO (TFPI)

Inhibitor układu zewnątrzpochodnego (TFPI, ang. *tissue factor pathway inhibitor*), glikoproteina o masie cząsteczkowej 34-40 kDa, zaliczany do grupy białkowych inhibitorów typu Kunitza, jest głównym fizjologicznym inhibitorem szlaku krzepnięcia TF. Zadaniem TFPI jest hamowanie wytwarzania trombiny poprzez hamowanie aktywowanego czynnika X i kompleksu czynników VIIa (FVIIa)/TF.

TFPI w największej ilości zlokalizowany jest w śródbłonku naczyń – jest to 50 – 80% puli naczyń, z kolei 10% znajduje się w płytkach krwi i jest uwalnianie po aktywacji trombiną. 10 do 50% związane jest z lipoproteinami osocza. Aktywowane fibroblasty, monocyty również posiadają możliwość syntezy TFPI.

Stwierdzono, że średnie całkowite stężenie TFPI w osoczu matki wzrasta w pierwszej połowie ciąży aż do 20 tygodnia ciąży, a następnie utrzymuje się na względnie stałym poziomie do czasu rozwiązania i zmniejsza się podczas porodu (42,43).

1.4.3.7 BIAŁKO C-REAKTYWNE (CRP)

Białko C-reaktywne jest dodatnim białkiem ostrej fazy, wykrytym w 1930 r. przez Tilleta i Francisa podczas badania surowic pacjentów cierpiących z powodu ostrego stanu zapalnego wywołanego przez pneumokoki. W obecności wapnia CRP wiąże się z polisacharydami, takimi jak fosfocholina na mikroorganizmach i wyzwała klasyczną drogę aktywacji dopełniacza. Głównym miejscem syntezy CRP są hepatocyty oraz adipocyty (44).

Podwyższone stężenia CRP obserwuje się w licznych ostrych i przewlekłych infekcjach, głównie bakteryjnych, a także w chorobach, w których stan zapalny, leży u podłoża patologii, np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobach sercowo-naczyniowych (45). Najwyższe stężenia CRP występują w surowicy, a niektóre infekcje bakteryjne mogą doprowadzić nawet do 1000-krotnego wzrostu stężenia (46). Po ustaniu działania czynnika zapalnego następuje relatywnie szybki w stosunku do innych białek ostrej fazy powrót CRP do wartości wyjściowych, co związane jest z okresem półtrwania wynoszącym 18–20 godzin (47). Poziomy CRP w osoczu dynamicznie wzrastają z około 1 mg/l do ponad 500 mg/l w ciągu 24–72 godzin od poważnego uszkodzenia tkanek, jak np.: uraz i postępujący proces nowotworowy.

IL-6 jest najsilniejszym mediatorem procesu zapalnego indukującym syntezę CRP przez hepatocyty (44).

Istnieje wiele czynników, które mogą wpływać na stężenie CRP; zaobserwowano m.in. wpływ wieku, palenia tytoniu, masy ciała, poziomu lipoprotein i ciśnienia krwi, a także wieku, co ma związek z procesem starzenia (48). Średnie stężenia CRP w surowicy u zdrowych osób rasy białej wynoszą około 0,8 mg/l, ale ta linia bazowa może się znacznie różnić u poszczególnych osób z powodu innych czynników, w tym polimorfizmów w genie CRP (49).

Istotny statystycznie wzrost CRP obserwowano także w przypadku zaburzeń takich jak IUGR (50) czy PE. Jednakże wiadomo, że podczas ciąży przebiegającej u zdrowych kobiet obserwowane są wyższe wartości CRP w odniesieniu do zdrowych nieciężarnych. Potwierdza to koncepcję ciąży jako przewlekłego stanu zapalnego o niewielkim stopniu nasilenia, co może utrudniać wykorzystanie CRP jako parametru różnicująco-prognostycznego (51).

2 ZAŁOŻENIA PRACY I CELE PRACY

Patomechanizm leżący u podłoża IUGR oraz PE nie jest dokładnie poznany, pomimo wielu badań prowadzonych w tym zakresie. Prawdopodobną przyczyną tych trudności jest wieloaspektowość zagadnień, które należy wziąć pod uwagę, aby zrozumieć przyczyny tych zaburzeń.

Wielu badaczy podkreśla, że kluczem do zrozumienia nierównowagi pro- i przeciwzakrzepowej obserwowanej w patologii IUGR i IUGR+PE, jest dogłębne poznanie funkcjonowania śródbłónka u ciężarnej. Stąd w pracy postawiono sobie następujące cele:

1. Ocena czy w ciążach powikłanych IUGR lub IUGR+PE dochodzi do dysfunkcji śródbłónka.
2. Ocena czy w IUGR oraz IUGR+PE dochodzi do rozwoju stanu zapalnego, który może mieć udział w promowaniu dysfunkcji śródbłónka.
3. Analiza przydatności wybranych markerów dysfunkcji śródbłónka oraz CRP do różnicowania ciąż patologicznych (IUGR, IUGR+PE) i prawidłowych.
4. Ocena czy spośród ocenianych parametrów są takie, które mogłyby służyć do różnicowania pomiędzy IUGR i IUGR+PE.

3 MATERIAŁ I METODY

3.1 CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

W ramach realizacji zaplanowanych badań zabezpieczono do oceny próbki krwi pobrane od 214 kobiet (w 34 - 36 tygodniu ciąży). Do badania ostatecznie zakwalifikowano 74 ciężarne leczone w Klinice Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Polna 33 (współpraca z Panem Prof. Grzegorzem Bręborowiczem i Panią Dr n. med. Karoliną Gruć-Stryjak).

Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej i uzyskały one akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, uchwała nr 1212/16 (załącznik nr 1). Wszystkie badane pacjentki zostały poinformowane o celu i zakresie przeprowadzonych badań oraz wyraziły na nie świadomą, pisemną zgodę (załącznik nr 2 i nr 3).

W badaniu zastosowano następujące kryteria wykluczenia:

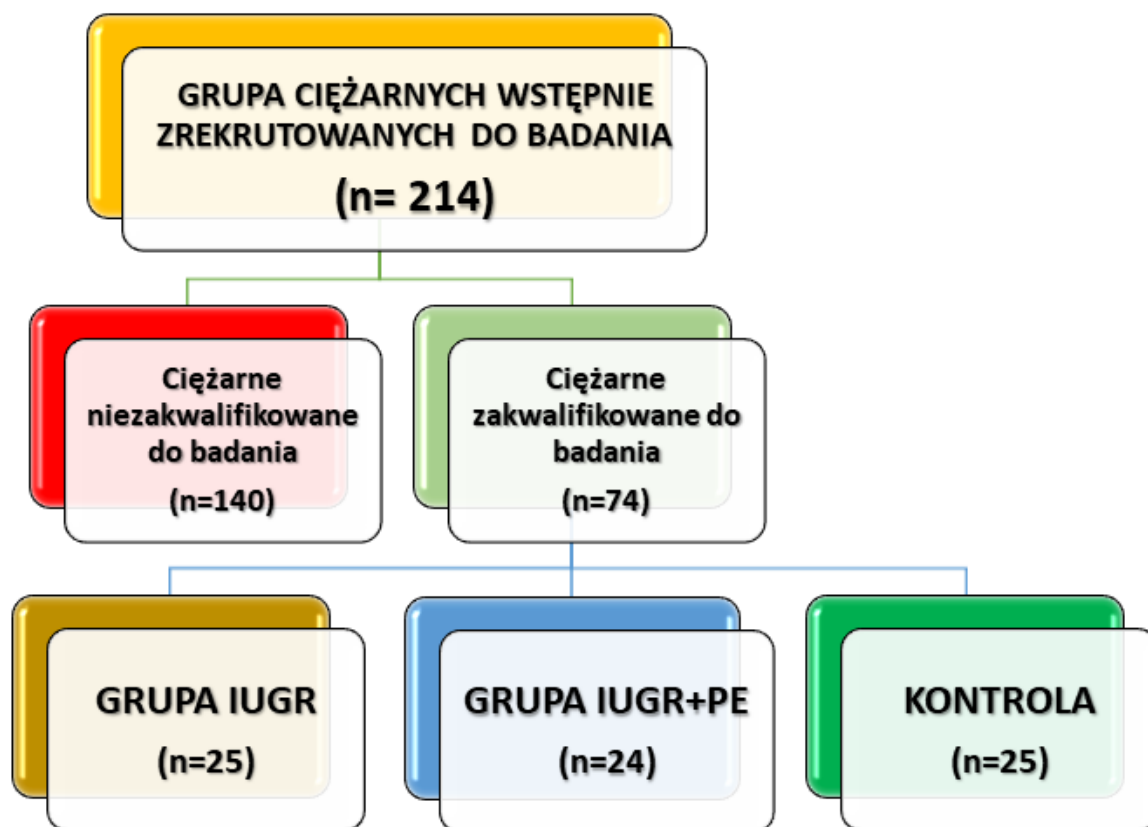
- choroby układu sercowo-naczyniowego ciężarnych;
- cukrzyca przed ciążą;
- cukrzyca ciężarnych;
- choroby nowotworowe w wywiadzie;
- tocząca się infekcja ogólnoustrojowa;
- choroby autoimmunologiczne;
- wad macicy;
- wady płodu.

Powodem odrzucenia 140 próbek był brak spełniania kryteriów włączenia do badania. Dyskwalifikacja dotyczyła głównie ciężarnych, początkowo zakwalifikowanych do grupy kontrolnej, przyczynami były tu: (1) nadciśnienie tętnicze w wywiadzie; (2) nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą; (3) płody konstytucjonalnie małe (SGA); (4) cukrzyca; (5) przyjmowane leki; (6) brak dostępnych danych na temat porodu i stanu noworodka, ponieważ poród nastąpił poza szpitalem, w którym prowadzono badanie; (7) obciążony wywiad położniczy. Z kolei w pozostałych grupach ciężarnych dyskwalifikacja nastąpiła z powodu niepełnej dokumentacji w momencie pobrania próbki, lub ze względów technicznych pobranego materiału.

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

- **GRUPA IUGR** - ciężarne z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu;
- **GRUPA IUGR+PE** - ciężarne z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu i stanem przedrzucawkowym;
- **KONTROLA** - ciężarne z prawidłowym przebiegiem ciąży, które na podstawie wywiadu chorobowego, badania podmiotowego i przedmiotowego zostały uznane za zdrowe i spełniły kryteria włączenia. Próbkę poprano w porównywalnym do grup IUGR i IUGR+PE wieku ciążowym.

Na rycinie 2 (Ryc. 2) przedstawiono schemat podziału grup badanych, z uwzględnieniem liczebności ciężarnych zakwalifikowanych do poszczególnych grup.



Rycina 2. Schemat podziału badanych grup

Zakwalifikowanie kobiet do odpowiednich grup następowało po zebraniu danych klinicznych oraz spełnieniu założonych kryteriów. Na podstawie uzyskanych informacji,

w oparciu o dokumentację medyczną oraz ankiety - załącznik nr 4, analizowane były również inne dane, takie jak: wiek, tydzień ciąży i rodność ciężarnych. Warto zauważyć, że po pobraniu i zabezpieczeniu krwi do zaplanowanych w rozprawia badań, ciężarne były monitorowane, aż do zakończenia porodu. W ten sposób pozyskano dane takie jak masa noworodka, skala APGAR i sposób zakończenia porodu, co było niezbędne do ewentualnej weryfikacji rozpoznania.

W grupach IUGR oraz IUGR+PE dodatkowo został oceniony stopień nasilenia patologii IUGR w skali 1-4 ° (łącznie w badanych grupach zaobserwowano: IUGR 1° (n=13), IUGR 2° (n=14), IUGR 3° (n=13), IUGR 4° (n=9)). Natomiast, jeśli chodzi o rozkład nasilenia patologii IUGR w grupie IUGR vs. IUGR+PE to był on porównywalny w obu grupach (IUGR vs. IUGR+PE - IUGR 1° n=6 vs. n=7; IUGR 2° n=7 vs. n=7; IUGR 3° n=7 vs. n=6; IUGR 4° n=5 vs. n=4).

Charakterystykę badanych grup, uwzględniającą dane pochodzące z wywiadu lekarskiego oraz badania przedmiotowego – w zakresie niezbędnym do analizy wyników rozprawy przedstawiono w tabeli 1 (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka badanych grup

Zmienna #	Grupa badanych (n = 74)			p*
	IUGR (n = 25)	IUGR+PE (n = 24)	KONTROLA (n = 25)	
Podstawowe informacje				
wiek [lata]	29,00 (17 - 43)	30,00 (21 - 42)	32,00 (23 - 48)	NS
tydzień ciąży w którym pobrano materiał [tygodnie]	35,00 (27 - 40)	35,50 (28 - 40)	36,00 (29 - 40)	NS
tydzień ciąży w którym nastąpił poród [tygodnie]	35,00 (27 - 40)	35,50 (28 - 40)	39,00 (38 - 41)	0,0101
rodzaj porodu: siły natury / poród wymuszony [n]	8/17	3/21	12/13	0,0341
BMI przed ciążą [kg/m²]	22,72 (19,02 - 27,77)	24,51 (16,18 - 35,51)	23,88 (17,65 - 40,83)	NS
Przybór masy ciała w czasie ciąży [kg]	11,29	12,14	13,00	NS
Przebyte ciążę [n]	1,00 (1 - 8)	1,00 (1 - 5)	2,00 (1 - 8)	NS
SYS [mmHg]	112,88 ± 21,68	132,88 ± 18,56	109,60 ± 6,60	0,0011
DIA [mmHg]	68,60 ± 9,74	82,75 ± 12,86	69,20 ± 5,53	< 0,0001

masa noworodka [g]	2032,76 ± 673,70	1734,75 ± 699,14	3531,60 ± 476,05	0,0001
masa noworodka: mniejsze od 2500 / większe lub równe 2500 g [n]	18/7	20/4	0/25	0,0001
APGAR1 1 minuta [punkty]	8,00 ± 2,60	8,08 ± 2,21	9,76 ± 0,66	0,0011
APGAR2 5 minuta [punkty]	9,12 ± 1,30	8,75 ± 1,67	9,88 ± 0,60	0,0012

Wynik podano jako średnia ± 1 odchylenie standardowe (X ± 1 SD), lub mediana (min-max). Wartość p ≤ 0,05 uznano za znamioną we wszystkich zastosowanych testach statystycznych.

* Za istotną statystycznie różnicę w analizach porównawczych uznano wartość p < 0,05. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami w zakresie analizowanych zmiennych (p > 0,05) wprowadzono oznaczenie „NS” – tj. statystycznie nieistotne.

Aby wyeliminować udział czynników mogących wpłynąć na przebieg badania, a nie będących kryterium kwalifikacji do odpowiedniej grupy badanej, grupy dobrano tak aby były jednorodne pod względem wieku ciężarnych i jeśli to możliwe wieku ciążowego w momencie pobrania materiału badań.

Kobiety ciężarne nie różniły się w zakresie BMI przed ciążą oraz przybojem masy ciała w trakcie ciąży.

W przypadku grupy KONTROLA 52% ciąż zakończyło się w sposób naturalny; w IUGR było to 32%, a w IUGR+PE jedynie 12%. Pozostałe ciążę zostały rozwiązane przez cięcie cesarskie.

W grupie KONTROLA wszystkie urodzone dzieci miały masę urodzeniową powyżej 2500 g (średnia 3531,6 g), w grupie IUGR tylko 7 noworodków miało masę urodzeniową powyżej 2500 g, a 18 miało masę urodzeniową mniejszą niż 2500 g (średnia masa urodzeniowa w tej grupie była równa 2032,76 g); z kolei w grupie IUGR+PE jedynie cztery noworodki miały masę urodzeniową powyżej 2500 g, a przeważająca liczba (n=20) miała masę urodzeniową <2500 g (przy średniej masie urodzeniowej 1734,75 g). Różnice w masie urodzeniowej dzieci stwierdzone w badanych grupach miały związek z charakterem zaburzenia.

Istotne różnice pomiędzy badanymi grupami wykazano w przypadku punktacji w skali APGAR w 1 i 5 minucie: wyższe wartości dla grupy KONTROLA, a niższe w grupach IUGR i IUGR+PE. Z kolei wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego

były najniższe w grupie KONTROLA, a najwyższe w grupie IUGR+PE, co ma związek z zaburzeniem w tej grupie (powikłanej stanem PE).

Odnotowano także istotne różnice pomiędzy grupami w zakresie farmakoterapii, co ma związek z analizowaną patologią; kobiety z grupy KONTROLA nie przyjmowały przewlekłe leków; w grupie IUGR były to: Acard 150 mg, Clexane 40 mg/0,4 ml - 60 mg/60 ml; Staveran 40 mg; a w grupie IUGR+PE: Acard 75 mg, Clexane 40 mg/0,4 ml - 60 mg/60 ml, Staveran 40 mg oraz Dopegyt 750-2000 mg, Nitrendypina 10 mg, Metocard 50 mg, Trandate 600 mg, Euthyrox 50 µg, 100 µg, 112 µg.

3.2 POBRANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

3.2.1 POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE MATERIAŁU

Próbki krwi od zakwalifikowanych do badania ciężarnych pobrano w trakcie hospitalizacji lub w przypadku zdrowych kobiet w trakcie rutynowej wizyty kontrolnej. Krew pobierano zawsze w godzinach porannych pomiędzy 8.00 a 9.00 ze zgięcia łokciowego w łącznej ilości około 9 ml do trzech probówek:

- zawierającej EDTA – wykonanie morfologii;
- zawierającej cytrynian – wykonanie oznaczeń koagulologicznych;
- bez antykoagulantu celem uzyskania surowicy do pozostałych oznaczeń biochemicznych.

Surowicę uzyskano po wykrzepieniu (10 minut) i odwirowaniu (10 min, 3000 RPM) pobranej krwi. Następnie rozdzielono do probówek typu eppendorf, zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń. Wszystkie próbki poddane zostały tej samej procedurze w celu wyeliminowania czynników mogących mieć istotny wpływ na wyniki oznaczeń.

3.3 METODYKA BADAŃ

3.3.1 METODYKA BADAŃ - MORFOLOGIA

Morfologia wykonana została w szpitalnym laboratorium na aparacie Sysmex XN100 w próbce krwi pełnej, pobranej do probówki zawierającej EDTA jako antykoagulant.

3.3.2 METODYKA BADAŃ - PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA

Badania koagulologiczne wykonane zostały w szpitalnym laboratorium na aparacie ACL TOP 300 firmy Werfen w osoczu cytrynianowym.

3.3.3 METODYKA BADAŃ WYKONANYCH W KATEDRZE I ZAKŁADZIE CHEMII MEDYCZNEJ I MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

3.3.3.1 OZNACZANIE STĘŻENIA ROZPUSZCZALNEJ FORMY MIĘDZYKOMÓRKOWEJ CZĄSTECZKI ADHEZYJNEJ 1 (sICAM-1)

Stężenie sICAM-1 oznaczano za pomocą testu DRG wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) przy użyciu czytnika TECAN- SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan

Antygen obecny w próbce badanej sICAM-1 ulega połączeniu z monoklonalnym przeciwciałem zaabsorbowanym na powierzchni studzienek. Do oznaczanego antygeny przyłączany jest koniugat strepawidyny z peroksydazą chrzanową oraz przeciwciałem przeciwko ludzkiej sICAM-1. Po inkubacji niezwiązany koniugat strepawidyna-peroksydazą chrzanową usuwany jest podczas płukania. W dalszym etapie oznaczenia dodany jest chromogen: tetrametylobenzydyna (TMB) reagujący z peroksydazą chrzanową w celu uzyskania barwnego produktu a następnie roztwór hamujący reakcję. Intensywność zabarwienia próby jest proporcjonalna do stężenia sICAM-1. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie badanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia sICAM-1.

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Na płytkę naniesiono:
 - 100 µl odczynnika rozcieńczającego do studzienek reprezentujących próbę ślepą
 - 100 µl zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 6,3, 12,5, 25, 50, 100 ng/ml
 - 10 µl próbek badanych oraz 90 µl odczynnika rozcieńczającego do studzienek reprezentujących próby badane (rozcieńczenie 10x)
3. Następnie do wszystkich studzienek dodano 50 µl roztworu koniugatu i mieszano przez 30 sekund
4. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej na mieszadle orbitalnym, częstotliwość 400 obrotów na minutę.
5. Przygotowano bufor płuczący (25 ml koncentratu + 450 ml wody destylowanej).
6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.

7. Do każdej studzienki dodano 100 µl chromogenu (TMB), delikatnie mieszano przez 5 sekund.
8. Próby inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem
9. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję.
10. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
11. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 10. Wyniki stężenia sICAM-1 wyrażono w ng/ml surowicy.

3.3.3.2 OZNACZANIE STĘŻENIA ROZPUSZCZALNEJ FORMY BIAŁKA ADHEZYJNEGO KOMÓREK NACZYNIOWYCH 1 (sVCAM-1)

Stężenie sVCAM-1 oznaczano za pomocą testu DRG wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN- SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan

Antygen obecny w próbce badanej sVCAM-1 ulega połączeniu z monoklonalnym przeciwciałem zaabsorbowanym na powierzchni studzienek. Do oznaczanego antygeny przyłączany jest koniugat strepawidyny z peroksydazą chrzanową oraz przeciwciałem przeciwko ludzkiej sVCAM-1. Po inkubacji niezwiązany koniugat strepawidyna-peroksydazą chrzanową usuwany jest podczas płukania. W dalszym etapie oznaczenia dodany jest chromogen: tetrametylobenzydyna (TMB) reagujący z peroksydazą chrzanową w celu uzyskania barwnego produktu a następnie roztwór hamujący reakcję. Intensywność zabarwienia próby jest proporcjonalna do stężenia sVCAM-1. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie badanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia sVCAM-1.

12. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
13. Na płytkę naniesiono:
 - 100 µl buforu do studzienek reprezentujących próbę ślepą
 - 100 µl zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 6,3, 12,5, 25, 50, 100 ng/ml

- 100 μ l wstępnie rozcieńczonych próbek badanych (rozc. 50x)
14. Następnie do wszystkich studzienek dodano 50 μ l roztworu koniugatu i mieszano przez 30 sekund
 15. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej na mieszadle orbitalnym, częstotliwość 400 obrotów na minutę.
 16. Przygotowano bufor płuczący (25 ml koncentratu + 450 ml wody destylowanej).
 17. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.
 18. Do każdej studzienki dodano 100 μ l chromogenu (TMB), delikatnie mieszano przez 5 sekund.
 19. Próby inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem
 20. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.
 21. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
 22. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 50. Wyniki stężenia sVCAM-1 wyrażono w ng/ml surowicy.

3.3.3.3 OZNACZENIE STĘŻENIA TROMBOMODULINY (TM)

Stężenie trombomoduliny (TM) oznaczano za pomocą testów firmy SunRed wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN-SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan. Zestaw wykorzystuje przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym TM. Oznaczane białko zostaje związane z przeciwciałami połączonymi z fazą stałą (umieszczonymi na powierzchni studzienek) następnie poliklonalnym przeciwciałem biotynylowanym anti-TM oraz koniugatem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (koniugat). W kolejnym etapie reakcji dodawany jest chromogen: tetrametylobenzzydina (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie TM odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia stężenia TM:

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Na płytkę naniesiono:
 - 50 μ l zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 0,75, 1,5, 3, 6, 12 ng/ml
 - 40 μ l próbek badanych
 - Pozostawiono 2 studzienki w celu odczytania próby ślepej, do których dodany zostanie chromogen oraz roztwór zatrzymujący reakcję
3. Do próbek badanych dodano 10 μ l biotynylowanych przeciwciał anti-TM
4. Następnie do studzienek zawierających próby badane oraz roztwory wzorcowe dodano 50 μ l roztworu koniugatu i mieszano przez 30 sekund
5. Płytkę z naniesionymi próbkami inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°C.
6. Przygotowano bufor płuczący (20 ml koncentratu + 580 ml wody destylowanej)
7. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.
8. Do każdej studzienki następnie dodano 100 μ l chromogenu (50 μ l Chromogenu A i 50 μ l Chromogenu B), delikatnie mieszano przez 5 sekund.
9. Próby inkubowano przez 10 min. w temperaturze 37°C chroniąc przed światłem

10. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 50 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.
11. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
12. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 10. Wyniki stężenia TM wyrażono w ng/ml surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania stężenia TM było stężenie 0,073 ng/ml. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio <10% i <12%.

3.3.3.4 OZNACZENIE STĘŻENIA CZYNNIKA VON WILLEBRANDA (VWF)

Stężenie czynnika von Willebranda (oznaczano za pomocą testów firmy AssayPro wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN-SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan. Zestaw wykorzystuje przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym VWF. Oznaczana glikoproteina zostaje związana z przeciwciałami połączonymi z fazą stałą (umieszczonymi na powierzchni studzienek) następnie poliklonalnym przeciwciałem biotynylowanym anty-VWF oraz koniugatem streptawidyna-peroksydaza chruzanowa (koniugat). W kolejnym etapie reakcji dodawana jest tetrametylobenzydyna (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie VWF odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia stężenia VWF:

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Badaną surowicę rozcieńczono 100-krotnie według zaleceń producenta testu (5 μ l surowicy + 495 μ l medium do rozcieńczania).
3. Na płytkę naniesiono 50 μ l zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 mIU/ml oraz przygotowane próby badane.

4. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano w temperaturze pokojowej 2 godziny w temperaturze pokojowej.
 5. Przygotowano bufor płuczący (30 ml koncentratu + 570 ml wody destylowanej)
 6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
 7. Dodano biotynylowane przeciwciała anti-VWF.
 8. Płytkę z naniesionymi przeciwciałami inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej.
 9. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
 10. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór koniugatu i mieszano przez 30 sekund.
 11. Inkubowano płytkę przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
 12. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
 13. Do każdej studzienki następnie dodano 100 μ l roztworu TMB, delikatnie mieszano przez 5 sekund.
 14. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. w temperaturze pokojowej.
 15. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.
 16. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
 17. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 100.
- Wyniki stężenia VWF wyrażono w mIU/ml surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania VWF było stężenie 1 mIU/ml. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio 4,5% i 10%.

3.3.3.5 OZNACZENIE STĘŻENIA TKANKOWEGO AKTYWATORA PLAZMINOGENU (tPA)

Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) oznaczano za pomocą testów firmy AssayPro wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN-SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan. Zestaw wykorzystuje przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym tPA. Oznaczany polipeptyd zostaje

związany z przeciwciałami połączonymi z fazą stałą (umieszczonymi na powierzchni studzienek) następnie poliklonalnym przeciwciałem biotynylowanym anyty-tPA oraz koniugatem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (koniugat). W kolejnym etapie reakcji dodawana jest tetrametylobenzydyna (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia stężenia tPA:

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Badaną surowicę i kontrolę rozcieńczono 40-krotnie według zaleceń producenta testu:
 - A: 20 μ l surowicy + 380 μ l medium do rozcieńczania
 - B: 50 μ l rozcieńczenia A + 50 μ l medium do rozcieńczania).
3. Na płytkę naniesiono 50 μ l zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 0, 0,0156, 0,0313, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 ng/ml oraz przygotowane próby badane.
4. Płytkę z naniesionymi próbkami inkubowano w temperaturze pokojowej 2 godziny.
5. Przygotowano bufor płuczący (30 ml koncentratu + 570 ml wody destylowanej).
6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.
7. Dodano biotynylowane przeciwciała anty-tPA.
8. Płytkę z naniesionymi przeciwciałami inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
9. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
10. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór koniugatu i mieszano przez 30 sekund.
11. Inkubowano płytkę przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
12. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
13. Do każdej studzienki następnie dodano 100 μ l roztworu TMB, delikatnie mieszano przez 5 sekund.
14. Próby inkubowano przez 12 min w temperaturze pokojowej.

15. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.

16. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.

17. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 40. Wyniki stężenia tPA wyrażono w ng/ml surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania stężenia tPA było stężenie 0,01 ng/ml. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio 4,3% i 10,7%.

3.3.3.6 OZNACZENIE STĘŻENIA INHIBITORA AKTYWATORA PLAZMINOGENU 1 (PAI-1)

Stężenie inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) oznaczano za pomocą testów firmy AssayPro wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN-SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan. Zestaw wykorzystuje przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym PAI-1. Oznaczane białko zostaje związane z przeciwciałami połączonymi z fazą stałą (umieszczonymi na powierzchni studzienek) następnie poliklonalnym przeciwciałem biotynylowanym anyty-PAI-1 oraz koniugatem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (koniugat). W kolejnym etapie reakcji dodawana jest tetrametylobenzydyna (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie PAI-1 odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia stężenia PAI-1:

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Badaną surowicę i kontrolę rozcieńczono 10 -krotnie według zaleceń producenta testu:
(20 μ l surowicy + 180 μ l medium do rozcieńczania).
3. Na płytkę naniesiono 50 μ l zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 0, 0,039, 0,078, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 ng/ml oraz przygotowane próby badane.

4. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano w temperaturze pokojowej 2 godziny.
5. Przygotowano bufor płuczący (30 ml koncentratu + 570 ml wody destylowanej).
6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.
7. Dodano biotynylowane przeciwciała anty- PAI-1
8. Płytkę z naniesionymi przeciwciałami inkubowano 1 godzinę.
9. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
10. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór koniugatu i mieszano przez 30 sekund.
11. Inkubowano płytkę przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
12. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
13. Do każdej studzienki następnie dodano 100 µl roztworu TMB, delikatnie mieszano przez 5 sekund.
14. Próby inkubowano przez 8 min. w temperaturze pokojowej.
15. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję.
16. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
17. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 10. Wyniki stężenia PAI-1 wyrażono w ng/ml surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania stężenia PAI-1 było stężenie 0,02 ng/ml. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio 3,2 % i 9,4 %.

3.3.3.7 OZNACZENIE STĘŻENIA INHIBITORA UKŁADU ZEWNĄTRZPOCHODNEGO (TFPI)

Stężenie inhibitora układu zewnątrzpochodnego (TFPI) oznaczano za pomocą testów firmy AssayPro wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN- SUNRISE wraz z oprogramowaniem Magellan. Zestaw wykorzystuje przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym TFPI. Oznaczany polipeptyd zostaje związany z przeciwciałami połączonymi z fazą stałą (umieszczonymi na powierzchni studzienek) następnie poliklonalnym przeciwciałem biotynylowanym anty-TFPI oraz koniugatem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (koniugat). W kolejnym etapie reakcji

dodawana jest tetrametylobenzydyna (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie TFPI odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia stężenia TFPI:

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Badaną surowicę i kontrolę rozcieńczono 40-krotnie według zaleceń producenta testu:
 - A: 20 μ l surowicy + 380 μ l medium do rozcieńczania
 - B: 50 μ l rozcieńczenia A + 50 μ l medium do rozcieńczania).
3. Na płytkę naniesiono 50 μ l zawartych w zestawie standardów o stężeniu odpowiednio: 0, 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 ng/ml oraz przygotowane próby badane.
4. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano w temperaturze pokojowej 2 godziny w temperaturze pokojowej.
5. Przygotowano bufor płuczący (30 ml koncentratu + 570 ml wody destylowanej).
6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczącym.
7. Dodano biotynylowane przeciwciała anty-TFPI.
8. Płytkę z naniesionymi przeciwciałami inkubowano 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
9. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
10. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór koniugatu i mieszano przez 30 sekund.
11. Inkubowano płytkę przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
12. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy buforem płuczającym.
13. Do każdej studzienki następnie dodano 100 μ l roztworu TMB, delikatnie mieszano przez 5 sekund.
14. Próby inkubowano przez 7 min. w temperaturze pokojowej.
15. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.
16. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.

17. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 40. Wyniki stężenia czynnika inhibitora układu zewnątrzpochodnego wyrażono w ng/ml surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania stężenia TFPI było stężenie 0,12 ng/ml. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio 2,5% i 9,7%.

3.3.3.8 OZNACZANIE CRP METODĄ WYSOCE CZULĄ (hsCRP)

Stężenie białka C-reaktywnego metodą wysoce czulą (hsCRP) oznaczano za pomocą testów firmy DRG Diagnostics wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA (ang. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) przy użyciu czytnika TECAN-SUNRISE. Zestaw wykorzystuje przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko determinatom antygenowym CRP. Oznaczane białko zostaje umieszczone pomiędzy dwoma przeciwciałami, jednym związanym z fazą stałą (umieszczonym na powierzchni studzienek) oraz kozim przeciwciałem anti- CRP znakowanym peroksydazą chrzanową znajdującym się w koniugacie. W kolejnym etapie reakcji dodawana jest tetrametylobenzydyna (TMB) w wyniku czego roztwór badany zmienia barwę na niebieską. Reakcja barwna hamowana jest przez dodanie 1 mol/l H_2SO_4 . Absorbancję próby mierzono przy długości fali 450 nm. Stężenie hsCRP odczytywano z krzywej wzorcowej przygotowanej z szeregu rozcieńczeń wzorca o znanym stężeniu.

Sposób wykonania oznaczenia hsCRP

1. Odczynniki zawarte w zestawie przed przystąpieniem do oznaczeń ogrzano do temperatury pokojowej.
2. Badaną surowicę i kontrolę rozcieńczono 100-krotnie według zaleceń producenta testu (5 μ l surowicy + 495 μ l medium do rozcieńczania).
3. Na płytkę naniesiono zawarte w zestawie standardy o stężeniu odpowiednio 0, 0,005, 0,010, 0,025, 0,050, 0,100 mg/L oraz przygotowane próby badane.

4. Następnie do każdej studzienki dodano roztwór koniugatu i mieszano przez 30 sekund.
5. Płytkę z naniesionymi próbami inkubowano w temperaturze pokojowej 45 min.
6. Po inkubacji płytkę przemywano pięć razy wodą dejonizowaną.
7. Do każdej studzienki następnie dodano 100 μ l roztworu TMB, delikatnie mieszano przez 5 sekund.
8. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min.
9. W celu zatrzymania reakcji do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję.
10. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm.
11. Stężenie oznaczanego parametru odczytywano z krzywej wzorcowej, a następnie uzyskane wartości mnożono przez współczynnik rozcieńczenia 100. Wyniki stężenia hsCRP wyrażono w mg/l surowicy.

Wartością graniczną dla testu do oznaczania hsCRP było stężenie 0,1 mg/l. Współczynnik zmienności (CV) wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosił odpowiednio 3,2% i 4,4%.

3.4 ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu narzędzia R Studio wersja 1.2.5019, wykorzystano R w wersji 3.6.1. oraz za pomocą programu STATISTICA wersja 13.3., przy współpracy z Instytutem Informatyki Politechniki Poznańskiej

W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

Analizy porównawcze pomiędzy grupami wykonano z podziałem na 3 grupy (IUGR, IUGR+PE, KONTROLA). Dla zmiennych ilościowych (mierzalnych) przeprowadzono ocenę zgodności z rozkładem normalnym przy wykorzystaniu testu Shapiro-Wilka. Test Shapiro-Wilka jest wykorzystywany najczęściej ze względu na większą moc w porównaniu z innymi testami jak na przykład testem Kołmogorowa-Smirnowa czy Lillieforsa. Przy założeniu braku zgodności z rozkładem normalnym ($p < 0,05$) do analizy porównawczej użyty został nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Jeśli p jest mniejsze niż poziom istotności 0,05 możemy stwierdzić, że istnieją znaczące różnice między grupami. W przypadku danych zgodnych z rozkładem normalnym,

przeprowadzono ocenę jednorodności wariancji przy wykorzystaniu testu Levena. Przy niespełnieniu założenia o jednorodności wariancji dla $p < 0,05$ wykonano test Kruskala-Wallisa, podczas gdy w przypadku spełnienia założenia o jednorodności wariancji wykonano test Anova. Jeśli wartość p dla testu Anova jest mniejsza niż poziom istotności 0,05 możemy stwierdzić, że istnieją znaczące różnice między grupami. Natomiast w przypadku zmiennych jakościowych (niemierzalnych) wykonano test χ^2 .

Do oceny, czy istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy dwoma grupami (IUGR vs IUGR+PE, IUGR vs KONTROLA oraz IUGR+PE vs KONTROLA), wykorzystano, w zależności od charakteru zmiennych i ich zgodności z rozkładem normalnym, test t-Studenta lub test U-Manna-Whitneya (nieparametryczny odpowiednik testu t-Studenta dla prób niezależnych).

Ponadto wykonano analizę korelacji pomiędzy wybranymi parametrami. Przed przystąpieniem do analizy korelacji dla wszystkich parametrów wykonano test zgodności z rozkładem normalnym oraz przeprowadzono ocenę zależności liniowej. Dla potwierdzenia założeń i obliczenia wartości p wykorzystano test Shapiro-Wilka. Następnie po ocenie zgodności z rozkładem normalnym wykonano testy korelacji dla wyselekcjonowanych parametrów w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi parametrami: wykonano test korelacji Pearsona i Spearmana. Uzyskane wyniki wykorzystane zostały do analizy korelacji, gdzie dla zmiennych wykazujących zależności liniowe ($p < 0,05$ dla testu Pearsona) i jednocześnie zgodnych z rozkładem normalnym ($p > 0,05$ dla testu Shapiro-Wilka) wykorzystano współczynnik korelacji liniowej Pearsona. Dla zmiennych o charakterze niezgodnym z powyższymi założeniami (brak zależności liniowej lub brak zgodności z rozkładem normalnym) wykorzystano nieparametryczny odpowiednik korelacji Pearsona, czyli współczynnik korelacji Spearmana. W przypadku testu korelacji Pearsona i Spearmana, wartość $p < 0,05$ wskazuje na korelację pomiędzy zmiennymi. Współczynnik korelacji r interpretowano następująco:

- $r > 0$ korelacja dodatnia
- $r = 0$ brak korelacji
- $r < 0$ korelacja ujemna

Siłę korelacji interpretowano zgodnie z poniższymi przedziałami:

- $-1 < r < -0,7$ bardzo silna korelacja ujemna

- $-0,7 < r < -0,5$ silna korelacja ujemna
- $-0,5 < r < -0,3$ korelacja ujemna o średnim natężeniu
- $-0,3 < r < -0,2$ słaba korelacja ujemna
- $-0,2 < r < 0,2$ brak korelacji
- $0,2 < r < 0,3$ słaba korelacja dodatnia
- $0,3 < r < 0,5$ korelacja dodatnia o średnim natężeniu
- $0,5 < r < 0,7$ silna korelacja dodatnia
- $0,7 < r < 1$ bardzo silna korelacja dodatnia

4 WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

4.1 OCENA PODSTAWOWYCH PARAMETRÓW LABORATORYJNYCH W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH BADANYCH

Jednym z podstawowych badań jakie wykonano u każdej ciężarnej była ocena morfologii krwi obwodowej. W badaniu tym dla wszystkich parametrów układu czerwonokrwinkowego, białokrwinkowego oraz liczby płytek krwi nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami.

Wyniki podstawowych parametrów laboratoryjnych z uwzględnieniem podziału na trzy grupy badane zostały przedstawione w tabeli 2 (Tabela 2).

Tabela 2. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie podstawowych parametrów laboratoryjnych

Podstawowe parametry laboratoryjne				
Morfologia krwi*				
Parametr	Grupa badanych (n = 74)			
	IUGR (n = 25)	IUGR+PE (n = 24)	KONTROLA (n = 25)	p*
LEU [g/l]	11,66 (6,79 - 16,81)	11,71 (7,95 - 16,59)	10,68 (4,83 - 17,46)	NS
ERY [t/l]	4,19 (3,3 - 4,62)	4,29 (3,25 - 5,04)	3,98 (3,09 - 5,05)	NS
PLT [g/l]	217,00 (128 - 336)	196,50 (91 - 456)	214,00 (147 - 434)	NS
HGB [g/dl]	11,39 ± 1,12	11,85 ± 1,41	11,27 ± 1,06	NS
HCT[l/l]	0,34 ± 0,06	0,33 ± 0,13	0,34 ± 0,03	NS
MCV [fl]	86,70 (58,1 - 93,6)	87,05 (79,7 - 92,7)	86,30 (73,7 - 91,8)	NS
MCH [fmol]	1,85 (1,67 - 1,97)	1,83 (1,64 - 1,98)	1,80 (1,42 - 1,98)	NS
MCHC [g/dl]	113,94 ± 16,18	115,45 ± 1,34	114,94 ± 9,19	NS
RDW [%]	13,20 (12,3 - 15,9)	13,00 (11,4 - 15,4)	13,40 (12,3 - 17,1)	NS

LYMP [g/l]	2,04 (1,03 - 4,86)	2,21 (1 - 4,25)	1,84 (1,23 - 3,11)	NS
LYMP [%]	18,60 (8,8 - 30,8)	17,80 (2,5 - 37,6)	16,70 (8,8 - 29)	NS
MON [g/l]	0,76 (0,47 - 1,52)	0,68 (0,14 - 1,61)	0,76 (0,35 - 1,25)	NS
MON [%]	7,40 (3,7 - 10,2)	6,10 (1 - 15)	6,30 (4,4 - 9,9)	NS
GRAN [g/l]	8,30 (4,1 - 13)	8,50 (4,6 - 13,8)	8,20 (2,8 - 13,6)	NS
GRAN [%]	71,30 (58,8 - 81,9)	72,31 (54,9 - 89,2)	73,90 (58,9 - 85,5)	NS
EOZ [g/l]	0,08 (0,01 - 0,42)	0,08 (0 - 0,32)	0,06 (0 - 0,27)	NS
EOZ [%]	0,80 (0,1 - 4,6)	0,75 (0 - 3)	0,50 (0 - 2,4)	NS
BAZ [g/l]	0,04 (0,01 - 0,08)	0,04 (0,02 - 0,07)	0,04 (0,01 - 0,08)	NS
BAZ [%]	0,40 (0,1-0,6)	0,34 (0,1-0,6)	0,30 (0,1-0,6)	NS
PLV [fl]	10,80 (9,5 - 14,0)	11,03 (9,6 - 13,1)	10,80 (9,6 - 12,6)	NS

**Wartości ocenianych parametrów przedstawiono jako średnią $\pm$ SD lub medianę (min-max). Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallis lub parametrycznym testem Anova (w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji). W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami ($p > 0,05$) wprowadzono oznaczenie „NS” - nieistotne statystycznie.*

W analizach porównań wielokrotnych nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie żadnego z analizowanych podstawowych parametrów laboratoryjnych.

4.2 OCENA STĘŻENIA hsCRP JAKO WYKŁADNIKA STANU ZAPALNEGO W BADANYCH GRUPACH

Najwyższym stężeniem hsCRP charakteryzowały się ciężarne z grupy IUGR i IUGR+PE, natomiast ciężarne z grupy KONTROLA wykazywały stężenie hsCRP w granicach stężeń prawidłowych.

W badanych grupach analiza porównań wielokrotnych stężeń hsCRP ujawniła statystycznie istotne różnice pomiędzy wszystkimi analizowanymi grupami. Istotne okazały się różnice pomiędzy IUGR i KONTROLA, oraz IUGR+PE i KONTROLA. Z kolei porównanie grup IUGR i IUGR+PE w tym zakresie nie wykazało statystycznie istotnych różnic. Wyniki analiz stężenia hsCRP w badanych grupach przedstawiono w tabeli 3 (Tabela 3) oraz na rycinie 3 (Ryc. 3).

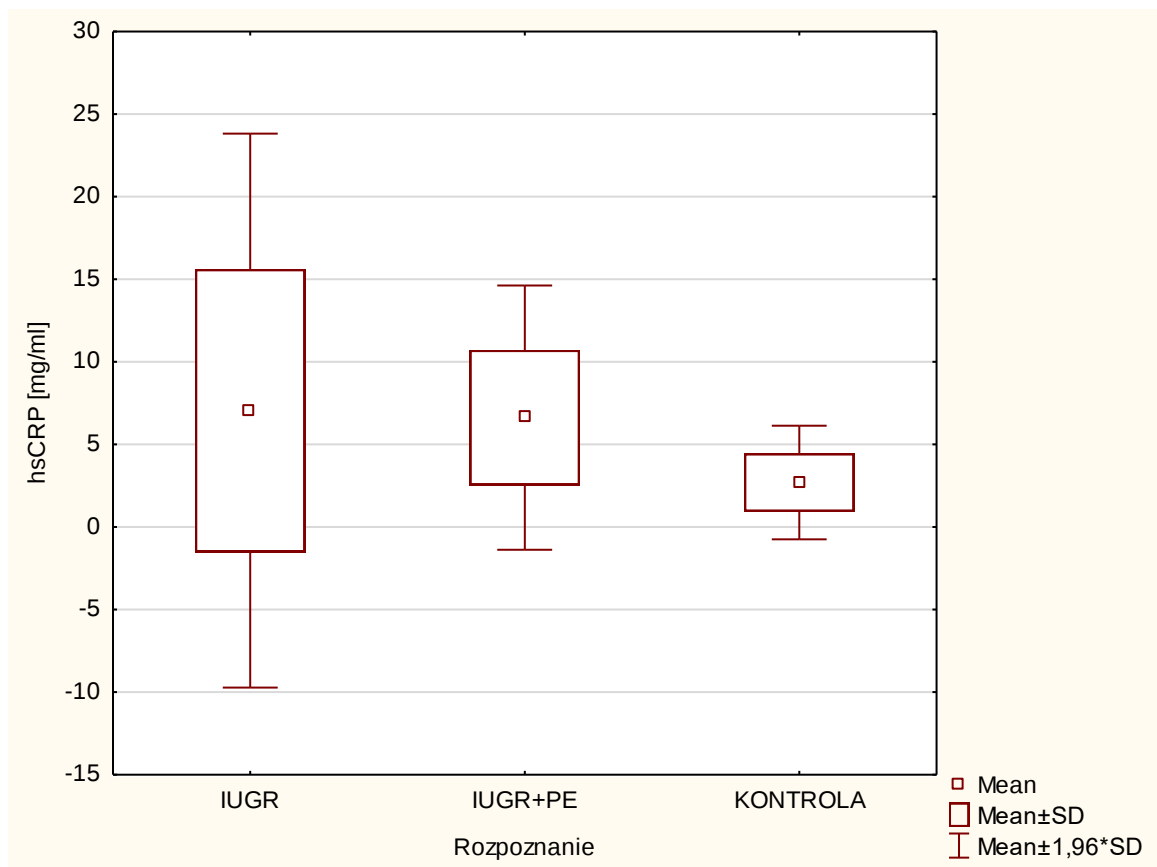
Tabela 3. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu hsCRP

<i>Marker stanu zapalnego</i>				
hsCRP [mg/l]	Grupa badanych (n=74)			<i>p</i> [*]
	IUGR (n = 25)	IUGR+PE (n = 24)	KONTROLA (n = 25)	
	7,04 ± 8,55	6,62 ± 4,08	2,69 ± 1,75 ^{##}	< 0,0001

* Wartości parametrów przedstawiono jako średnią ± SD. Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa lub parametrycznym testem Anova (w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji). Wartość *p* dla różnic pomiędzy grupami uznano za statystycznie istotną, jeśli *p* < 0,05.

Ocenę istotności różnic pomiędzy dwiema grupami przeprowadzono testem *t*-Studenta lub U Manna-Whitneya.

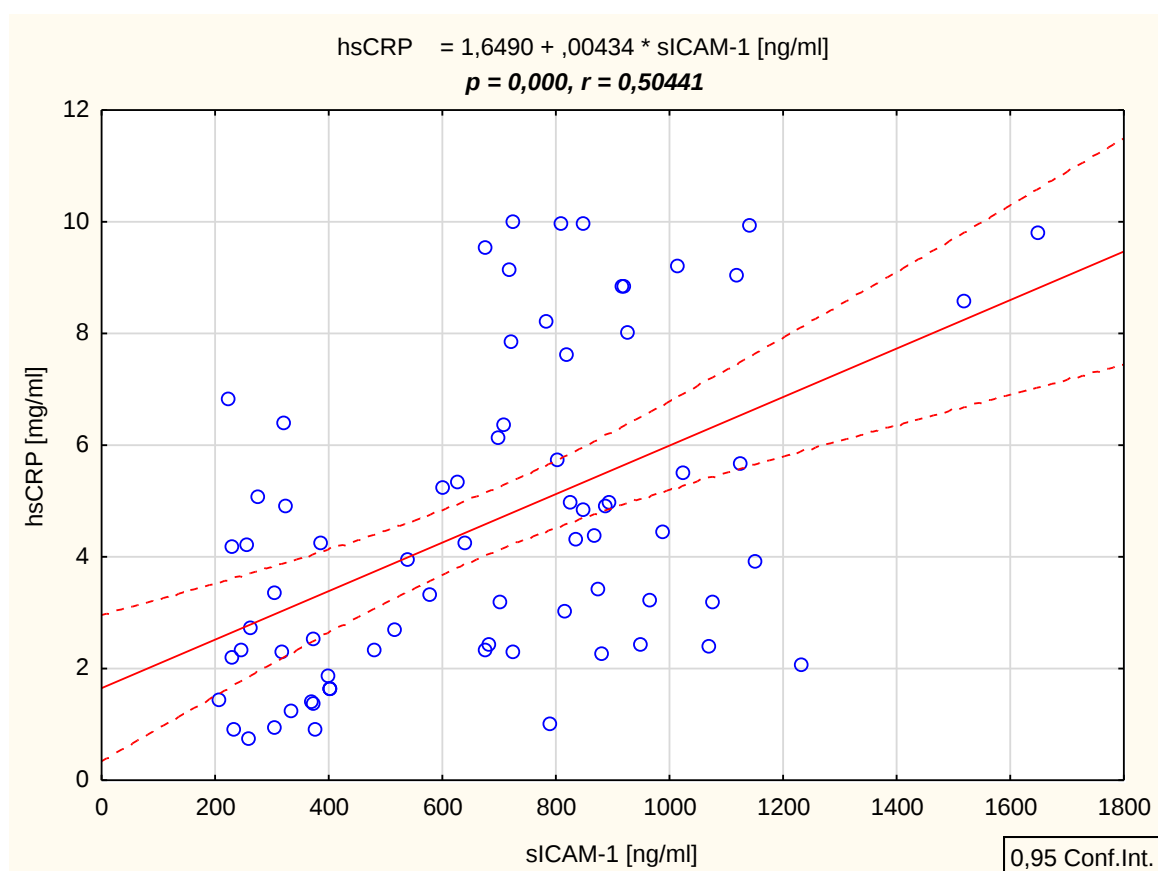
^{##} IUGR vs KONTROLA *p* = **0,003**; IUGR+PE vs KONTROLA *p* < **0,0001**



Rycina 3. Rozkład stężeń hsCRP w badanych grupach.

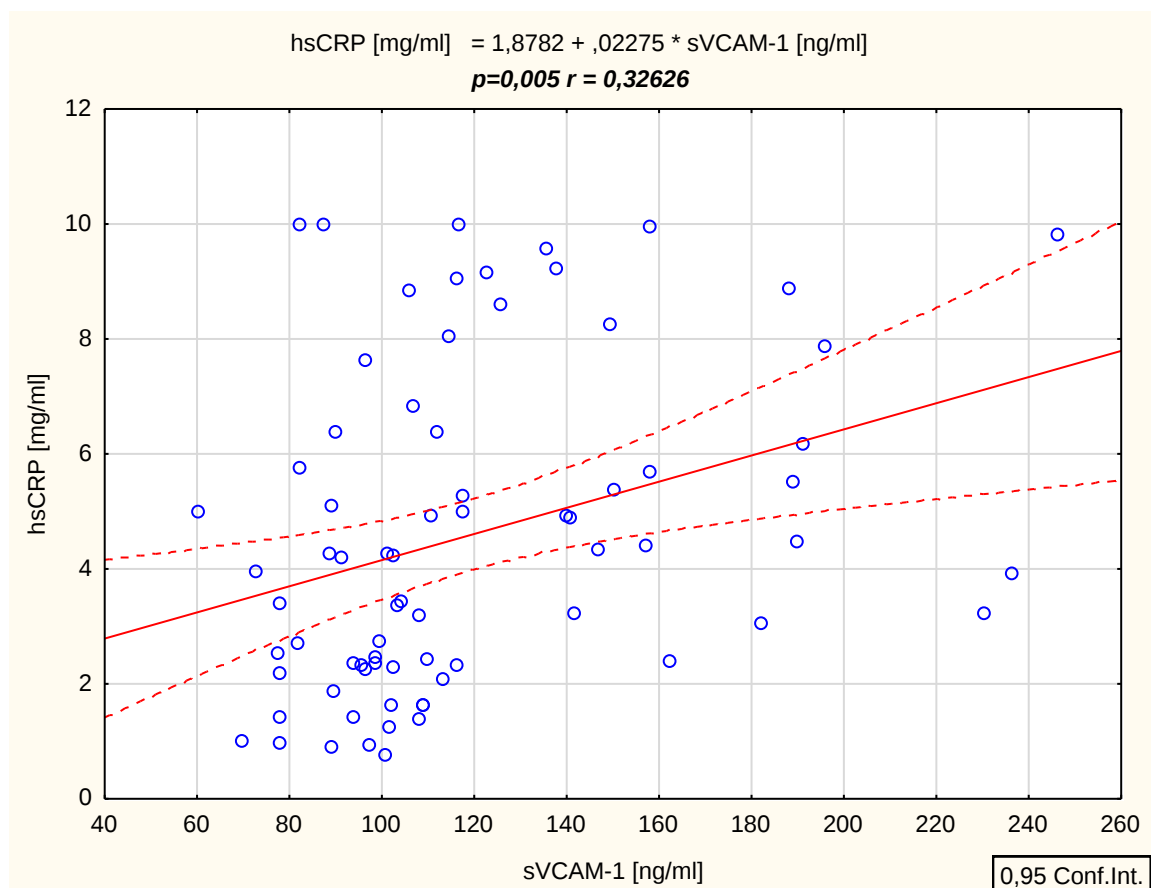
Zależności pomiędzy stężeniem hsCRP a wybranymi parametrami przedstawiono na rycinach 4-6 (Ryc. 4-6), wybrano te parametry względem których zależności z sICAM-1 były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

Na rycinie 4 (Ryc. 4) ukazano zależność pomiędzy hsCRP i sICAM-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji ($r = 0,504$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia hsCRP w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sICAM-1.



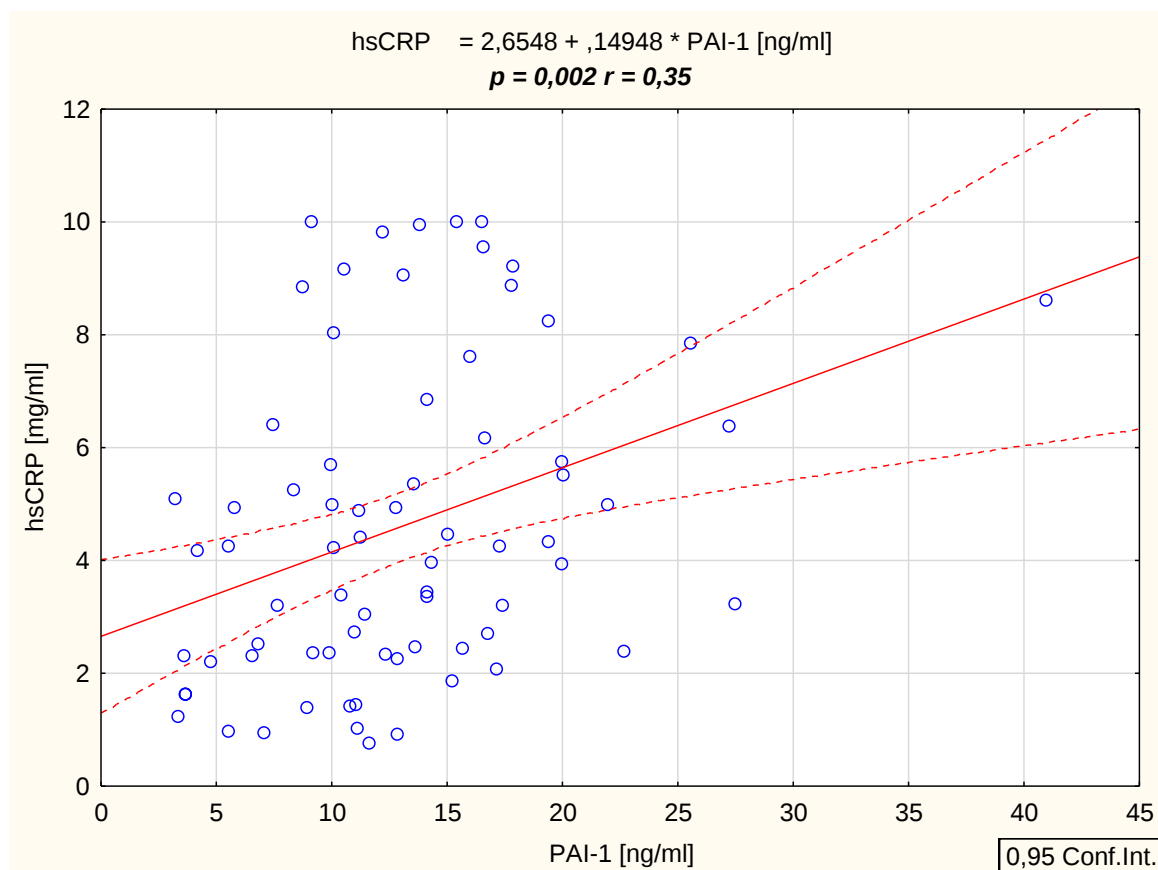
Rycina 4. Zależność pomiędzy stężeniem hsCRP a stężeniem sICAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 5 (Ryc. 5) ukazano zależność pomiędzy hsCRP i sVCAM-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,32626$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia hsCRP w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sVCAM-1.



Rycina 5. Zależność pomiędzy stężeniem hsCRP a stężeniem sVCAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 6 (Ryc. 6) ukazano zależność pomiędzy hsCRP i PAI-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,350$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia hsCRP w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia PAI-1.



Rycina 6. Zależność pomiędzy hsCRP i PAI-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach

4.3 PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA: APTT, D-DIMERY, FIBRYNOGEN, PT, INR, WSKAŹNIK PT W GRUPACH IUGR I IUGR+PE

W grupach IUGR (n = 18) oraz IUGR+PE (n = 16) wykonano oznaczenia następujących parametrów układu krzepnięcia: APTT, D-dimery, fibrynogen, PT, INR, wskaźnik PT. Ze względu na fakt, że oznaczeń tych nie wykonuje się rutynowo u zdrowych ciężarnych, kobiety z grupy KONTROLA nie miały wykonanych takich badań i w analizie porównawczej nie zostały uwzględnione. Wyniki przedstawiono w tabeli 4 (Tabela 4).

Tabela 4. Wyniki badań parametrów układu krzepnięcia w grupach IUGR oraz IUGR+PE

<i>Parametry koagulologiczne</i>			
parametr	<i>Grupa badanych (n=35)</i>		<i>p*</i>
	IUGR (n = 18)	IUGR+PE (n = 16)	
APTT [s]	25,87 ± 1,98	27,07 ± 2,39	NS
D-dimery [ng/ml]	1730,00 ± 53,1	1542,00 ± 1300,85	NS
fibrynogen [g/l]	4,61 ± 0,88	4,65 ± 1,187	NS
PT [s]	10,56 ± 0,05	10,27 ± 1,09	NS
INR	0,96 ± 0,5	1,495 ± 2,25	NS
wsk. PT [%]	104,44 ± 6,24	108,7 ± 10,85	NS

* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem U-Manna-Whitneya lub-parametrycznym testem-t-Studenta-(w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji).

W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami ($p > 0,05$) wprowadzono oznaczenie „NS” - nieistotnie statystycznie

Wartości parametrów koagulologicznych badanych ciężarnych z grup IUGR oraz IUGR+PE mieściły się w zakresie wartości obserwowanych u ciężarnych z prawidłowym przebiegiem ciąży. Wartości APTT, PT oscylujące przy dolnym zakresie normy, jak i wskaźnik PT oraz fibrynogen przy górnym zakresie wartości referencyjnych, mogą być przesłanką o zwiększonym ryzyku rozwoju nadkrzepliwości podczas ciąży.

Na odrębny komentarz zasługują stężenia D-dimerów. W badaniu zaobserwowano stężenie D-dimerów w grupach IUGR i IUGR+PE niemal trzykrotnie przewyższające wartości referencyjne obserwowane u zdrowych nieciężarnych kobiet. Gutiérrez (52) w swojej pracy zaproponował, aby dla zdrowych ciężarnych w trzecim trymestrze ciąży, uznać za prawidłowe wartości D-dimerów w surowicy krwi w zakresie 551-3333 ng/ml.

W obecnym badaniu, w grupach IUGR, jak i IUGR+PE, stężenia D-dimerów mieściły się w zaproponowanym przedziale wartości referencyjnych, i można stwierdzić, że obrazuje to fizjologiczny wzrost D-dimerów związany z ciążą.

Należy podkreślić, że przeprowadzona analiza porównawcza nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, tj. IUGR oraz IUGR+PE dla ocenionych parametrów koagulologicznych. Wydaje się jednak, że w przypadku D-dimerów, grupa IUGR w porównaniu z grupą IUGR+PE cechowała się nieznacznie wyższymi wartościami (choć różnice te były statystycznie nieistotne), co może być spowodowane nasileniem fibrynolizy w tej grupie badanych.

4.4 OCENA MARKERÓW ADHEZJI KOMÓRKOWEJ, WYBRANYCH WYKŁADNIKÓW PRO- I PRZECIWKAZEPOWYCH

4.4.1 OCENA MARKERÓW ADHEZJI KOMÓRKOWEJ sICAM-1 i sVCAM-1 W BADANYCH GRUPACH

Wykazano, że badane grupy różniły się istotnie statystycznie w zakresie stężenia cząsteczek sICAM-1 oraz sVCAM-1. Wyniki tych porównań wielokrotnych w zakresie różnic w stężeniu sICAM-1 i sVCAM-1 przedstawiono w tabelach 5 i 6 (Tabela 5-6) oraz dla ułatwienia analizy na rycinach 7 i 14 (Ryc. 7 i 14).

sICAM-1

Wyniki oznaczeń sICAM-1 w badanych grupach, wraz z analizą porównań wielokrotnych przedstawiono w tabeli 5 (Tabela 5) oraz na rycinie 7 (Ryc. 7).

Tabela 5. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sICAM-1.

<i>Markery adhezji komórkowej</i>				
sICAM-1 [ng/ml]	Grupa badanych (n = 74)			p*
	IUGR (n = 25)	IUGR+PE (n = 24)	KONTROLA (n = 25)	
	777,87 ± 143,44 [#]	951,63 ± 272,35	310,79 ± 65,96 ^{##}	
				< 0,0001

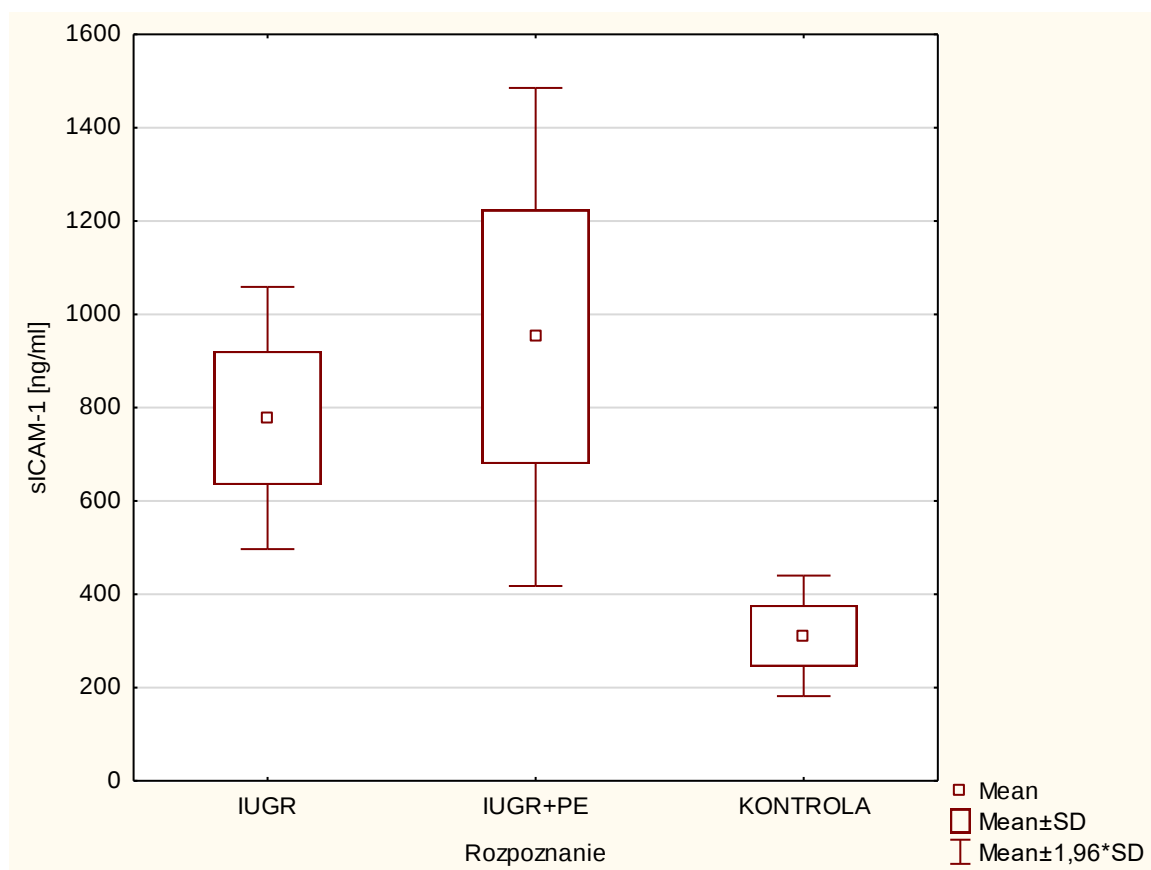
* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa lub parametrycznym testem Anova (w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji). Wartość p dla różnic pomiędzy grupami uznano za statystycznie istotną, jeśli $p < 0,05$.

Ocenę istotności różnic pomiędzy dwiema grupami przeprowadzono testem t-Studenta lub U Manna-Whitneya, w zależności od zgodności danych z rozkładem normalnym.

[#]IUGR vs IUGR+PE $p = 0,0007$;

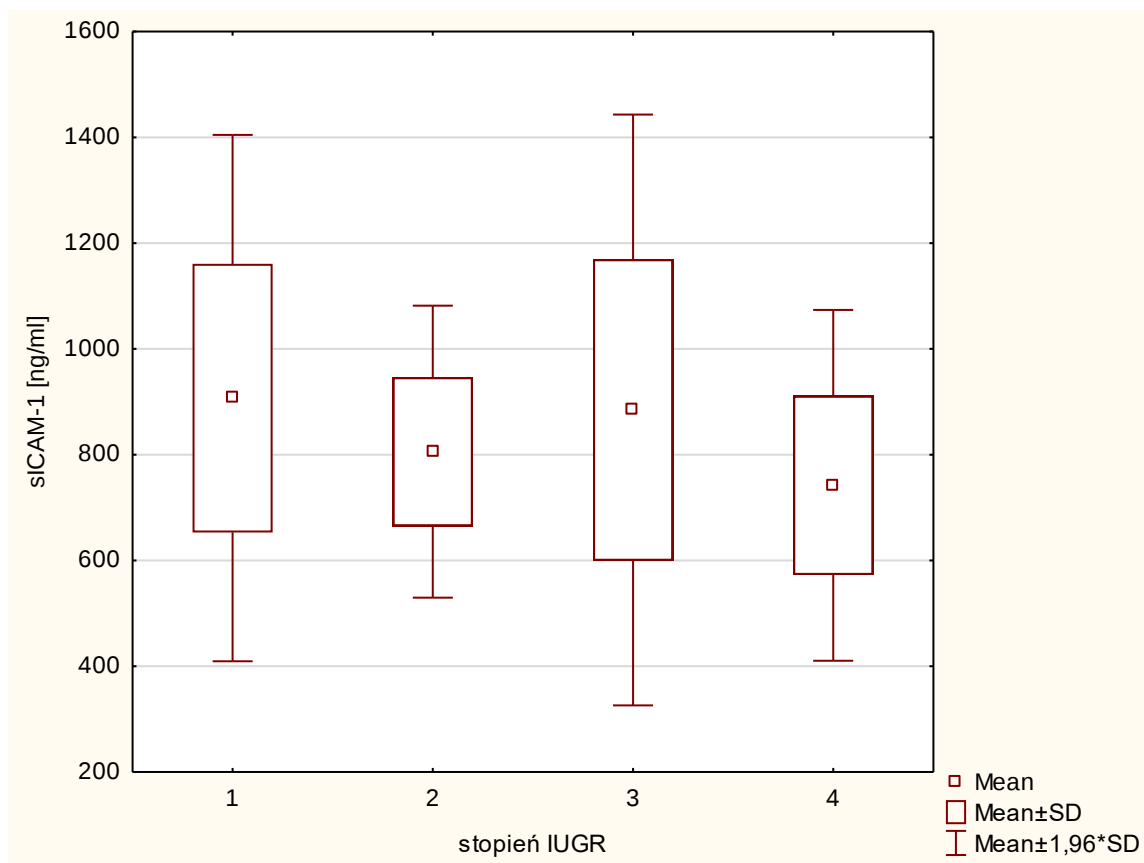
^{##} IUGR vs KONTROLA $p < 0,0001$, IUGR+PE vs KONTROLA $p < 0,0001$

Średnie stężenie sICAM-1 było najniższe w grupie KONTROLA, a najwyższe w grupie IUGR+PE. W grupach IUGR oraz IUGR+PE średnie stężenia sICAM-1 były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z grupą KONTROLA. Ponadto w grupie IUGR, średnie stężenie sICAM-1 było istotnie statystycznie niższe niż w grupie IUGR+PE (Rycina 7).



Rycina 7. Wyniki porównań wielokrotnych stężenia ICAM-1 pomiędzy wszystkimi grupami badanymi

Ponadto, nie stwierdzono różnic w zakresie stężenia sICAM w zależności od stopnia IUGR, co zostało przedstawione na rycinie 8 (Ryc. 8).

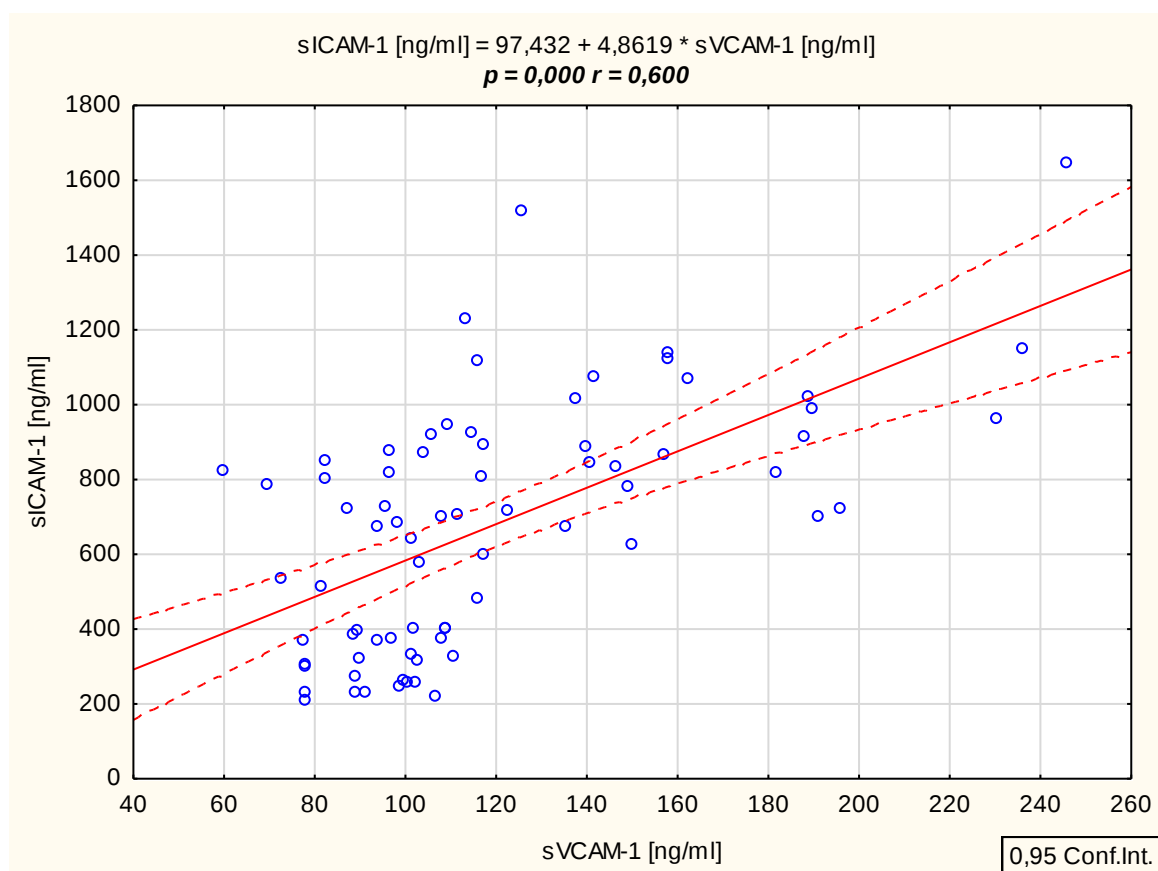


Rycina 8. Rozkład stężeń sICAM-1 w grupach IUGR i IUGR-PE w zależności od stopnia IUGR.

Zależności pomiędzy stężeniem sICAM-1 a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinach 9-13 (Ryc. 9-13), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z sICAM-1 były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

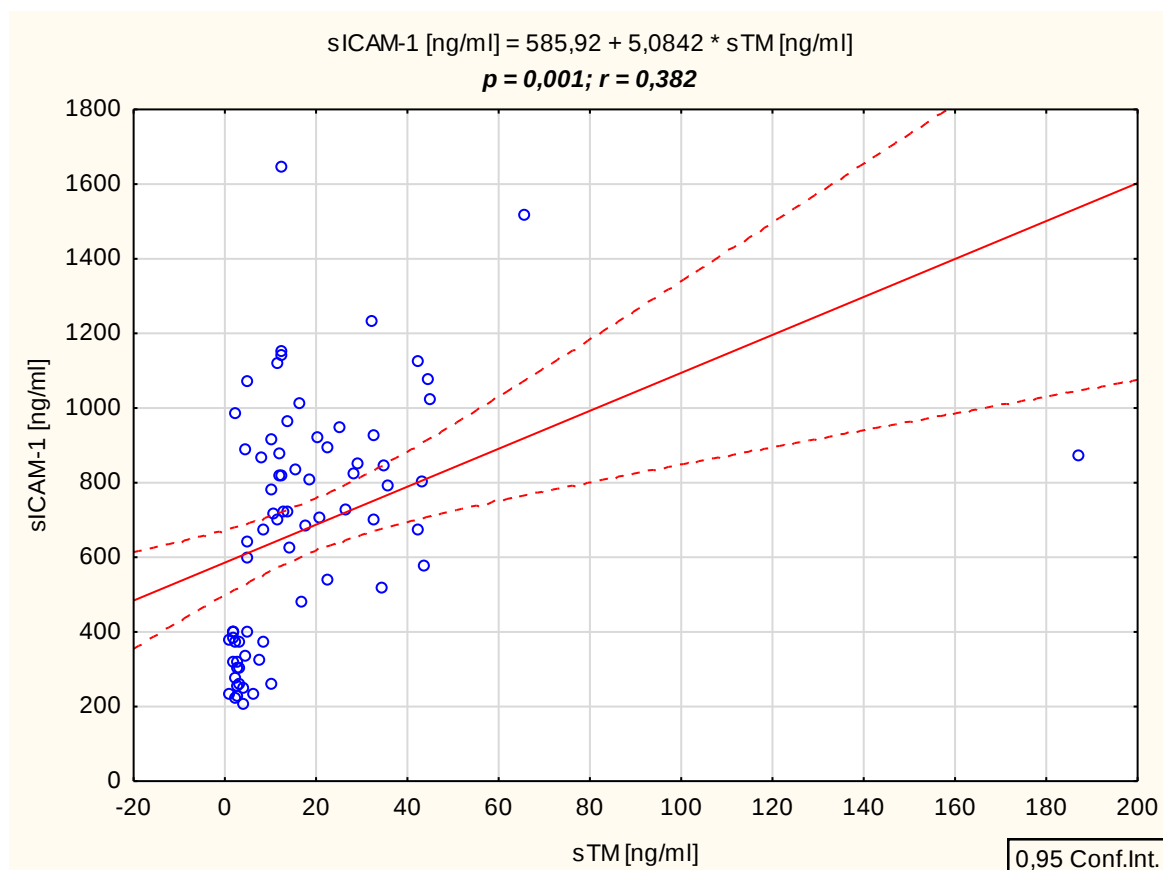
Na rycinie 4 (Ryc. 4) ukazano zależność pomiędzy sICAM-1 i hsCRP analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji.

Natomiast na rycinie 9 (Ryc. 9) ukazano zależność pomiędzy sICAM-1 i sVCAM-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter silnej dodatniej korelacji ($r = 0,6$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia sVCAM obserwowano wzrost stężenia sICAM-1 w surowicy krwi.



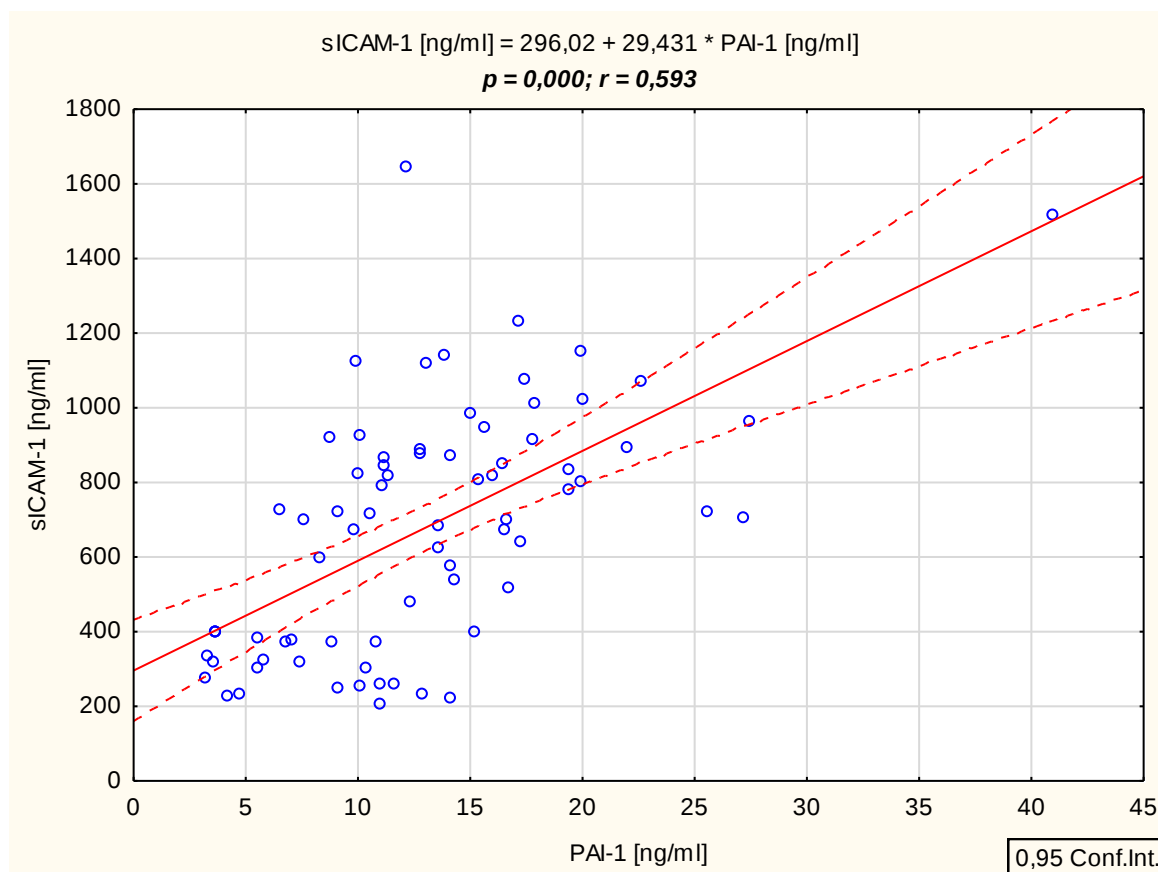
Rycina 9. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem sVCAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 10 (Ryc. 10) ukazano zależność pomiędzy sICAM-1 i sTM analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,38$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia sTM obserwowano wzrost stężenia sICAM-1 w surowicy krwi.



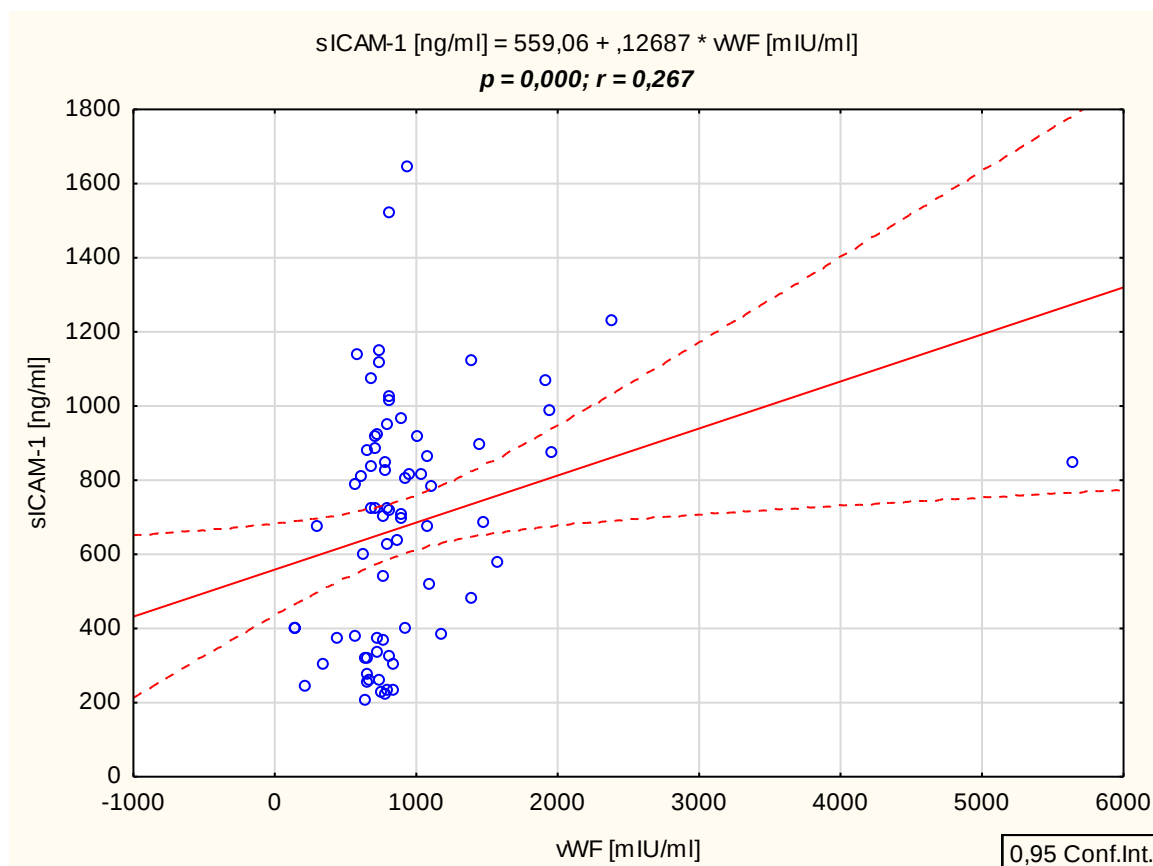
Rycina 10. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem sTM w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 11 (Ryc. 11) przedstawiono zależność pomiędzy sICAM 1 a PAI-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji ($r = 0,59$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia PAI-1 obserwowano wzrost stężenia sICAM-1 w surowicy krwi.



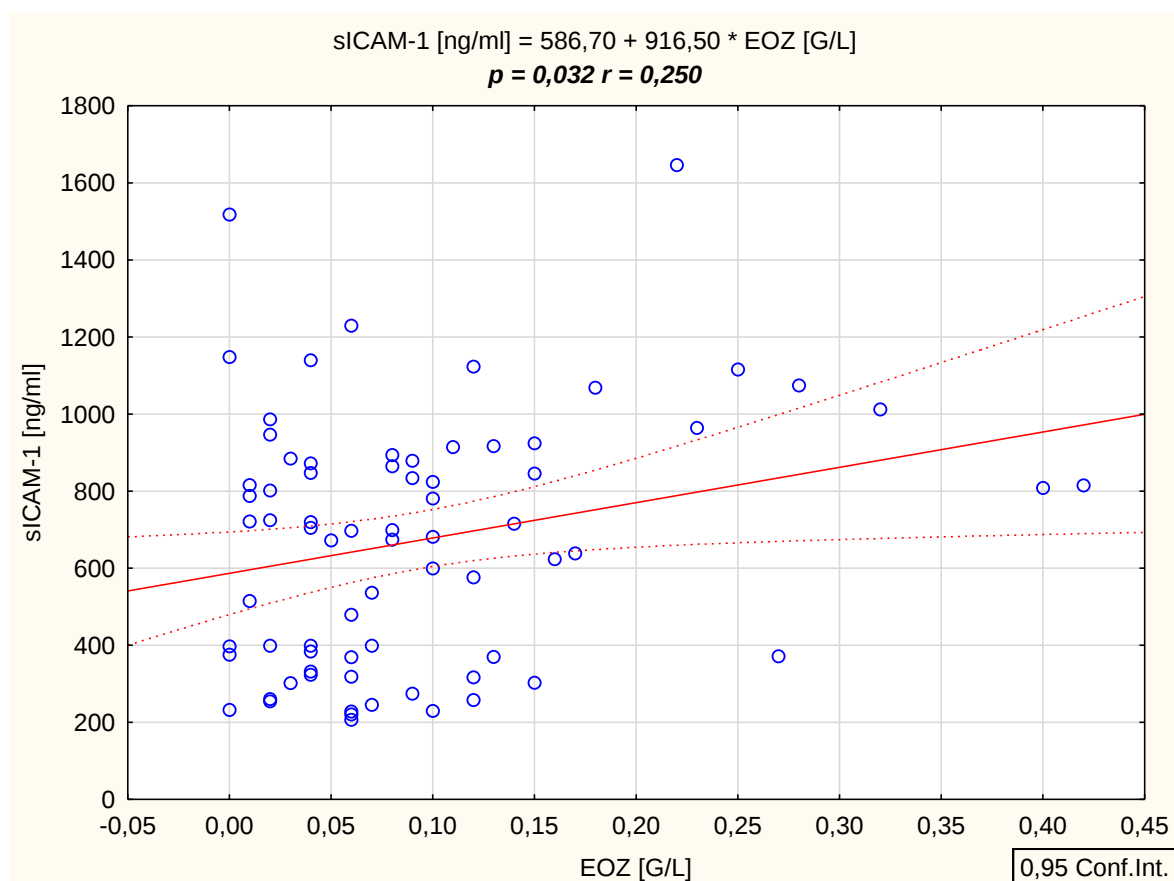
Rycina 11. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem PAI-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 12 (Ryc. 12) przedstawiono zależność pomiędzy sICAM 1 a vWF analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter bardzo słabej dodatniej korelacji ($r = 0,27$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia vWF obserwowano delikatną tendencję do wzrostu stężenia sICAM-1 w surowicy krwi.



Rycina 12. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem vWF w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 13 (Ryc. 13) przedstawiono zależność pomiędzy sICAM-1 i liczbą eozynofili analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,3$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem liczby eozynofiliów (EOZ) w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sICAM-1.



Rycina 13. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a liczbą eozynofiliów (EOZ) w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

sVCAM-1

Średnie stężenie sVCAM-1 było najniższe w grupie KONTROLA, a najwyższe w grupie IUGR+PE. W grupach IUGR oraz IUGR+PE średnie stężenia sVCAM-1 były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z grupą KONTROLA, jednak różnica była zdecydowanie większa w analizie porównawczej pomiędzy IUGR+PE i KONTROLA, niż przy porównaniu KONTROLA i IUGR. Średnie stężenie sVCAM-1 było istotnie statystycznie niższe w grupie IUGR w porównaniu z grupą IUGR+PE.

Wyniki oznaczeń sVCAM-1 w badanych grupach, wraz z analizą porównań wielokrotnych przedstawiono w tabeli 6 (Tabela 6) i na rycinie 14 (Ryc. 14).

Tabela 6. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu ICAM-1.

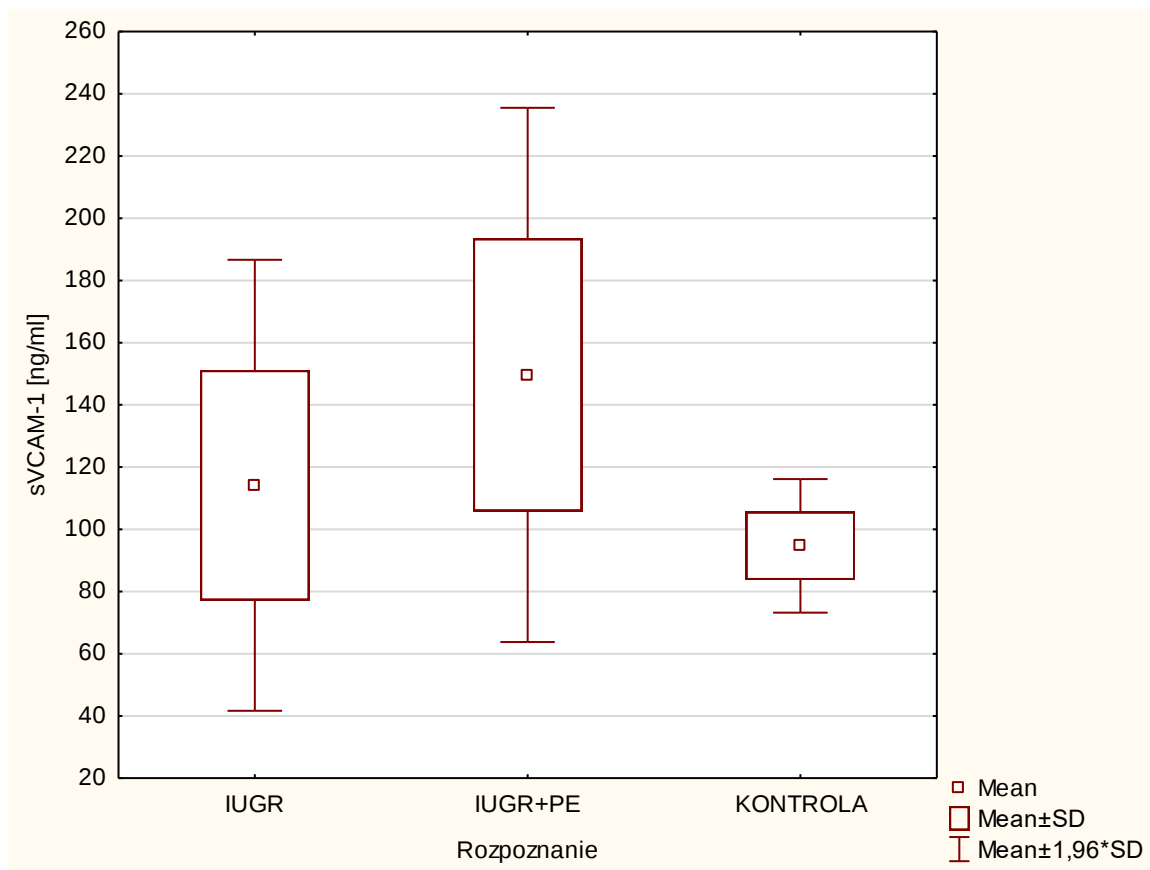
<i>Markery adhezji komórkowej</i>				
sVCAM-1 [ng/ml]	Grupa badanych (n=74)			<i>p</i> *
	IUGR (n=25)	IUGR+PE (n=24)	KONTROLA (n=25)	
	114,15 ± 36,99 [^]	149,65 ± 43,81	94,68 ± 10,95 ^{^^}	
				0,0001

* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa lub parametrycznym testem Anova (w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji). Wartość *p* dla różnic pomiędzy grupami uznano za statystycznie istotną, jeśli *p* < 0,05.

Ocenę istotności różnic pomiędzy dwiema grupami przeprowadzono testem *t*-Studenta lub *U* Manna-Whitneya, w zależności od zgodności danych z rozkładem normalnym.

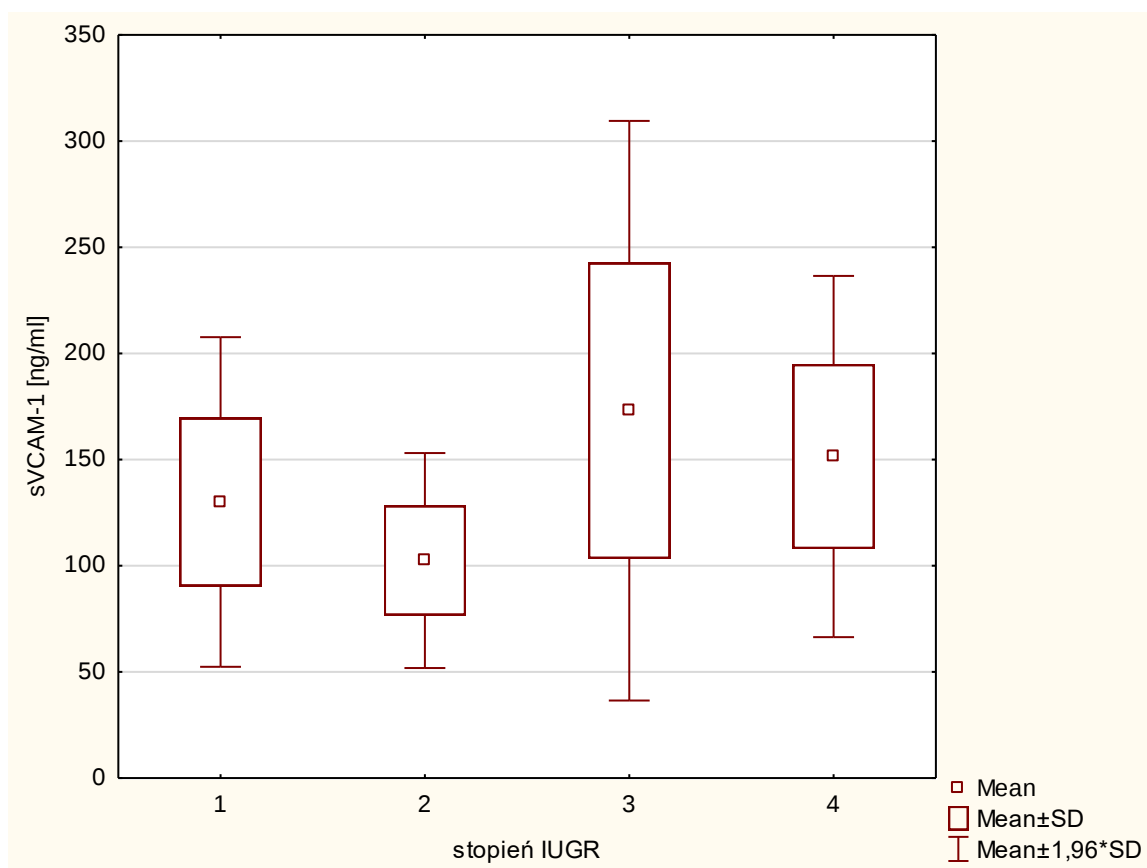
[^]IUGR vs IUGR+PE *p* = **0,0003**

^{^^}IUGR vs KONTROLA *p* = **0,0150**; IUGR+PE vs KONTROLA *p* < **0,0001**



Rycina 14. Rozkład zmian stężenia sVCAM-1 w surowicy krwi w zależności od grupy badanej

Uwzględnienie w analizach stopnia nasilenie patologii IUGR wykazało, że różnice w zakresie sVCAM-1 nie były statystycznie istotne przy porównaniach wielokrotnych. Jednak analiza przy użyciu testu t-studenta wykazała istotne statystycznie różnice w zakresie stężenia sVCAM-1 w surowicy krwi pomiędzy grupami ze stopniem IUGR 2 a IUGR 3 ($p = \mathbf{0,01}$) oraz ciężarnymi ze stopniem IUGR 2 a IUGR 4 ($p = \mathbf{0,01}$). Wyniki analizy przedstawiono na rycinie 15 (Ryc. 15).

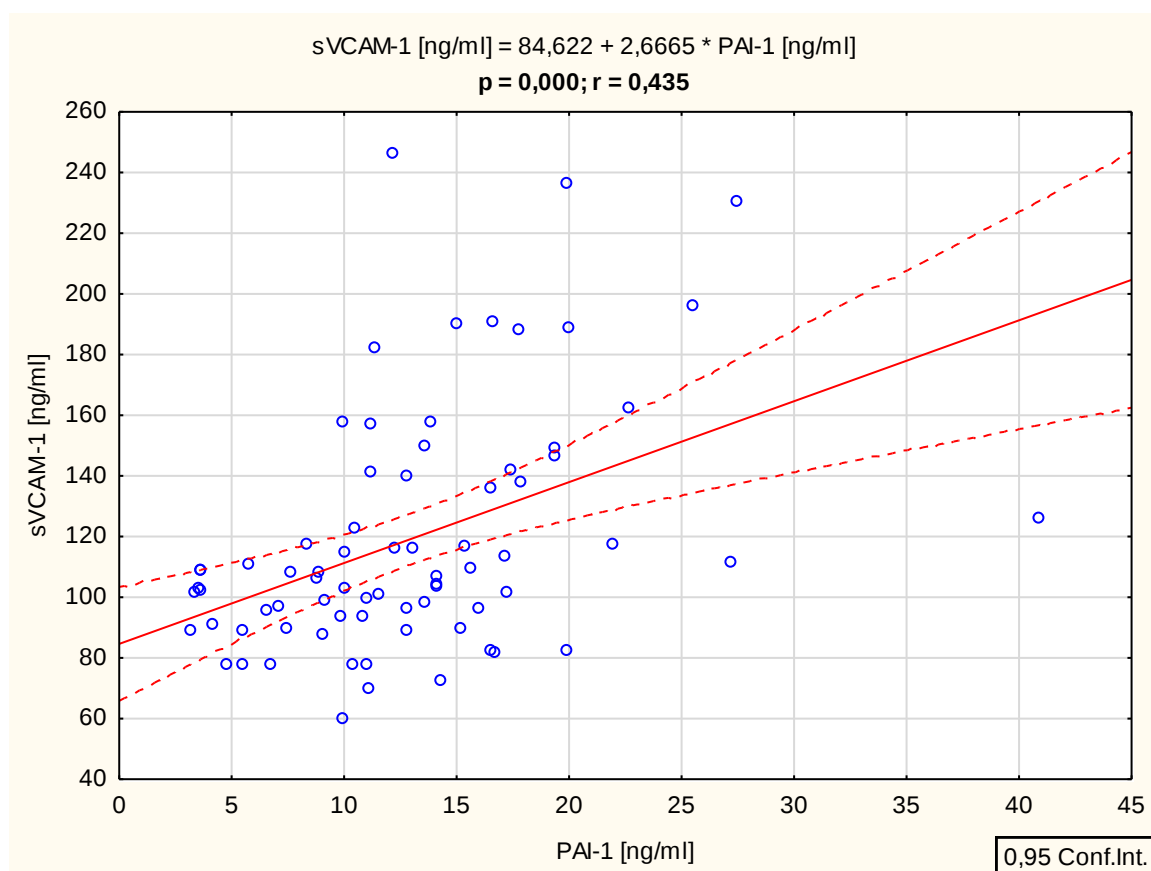


Rycina 15. Rozkład stężeń sVCAM-1 w grupach IUGR i IUGR+PE w zależności od stopnia IUGR.

Zależności pomiędzy stężeniem sVCAM-1 a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinach 5, 16-18 (Ryc. 5, 16-18), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z sICAM-1 były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

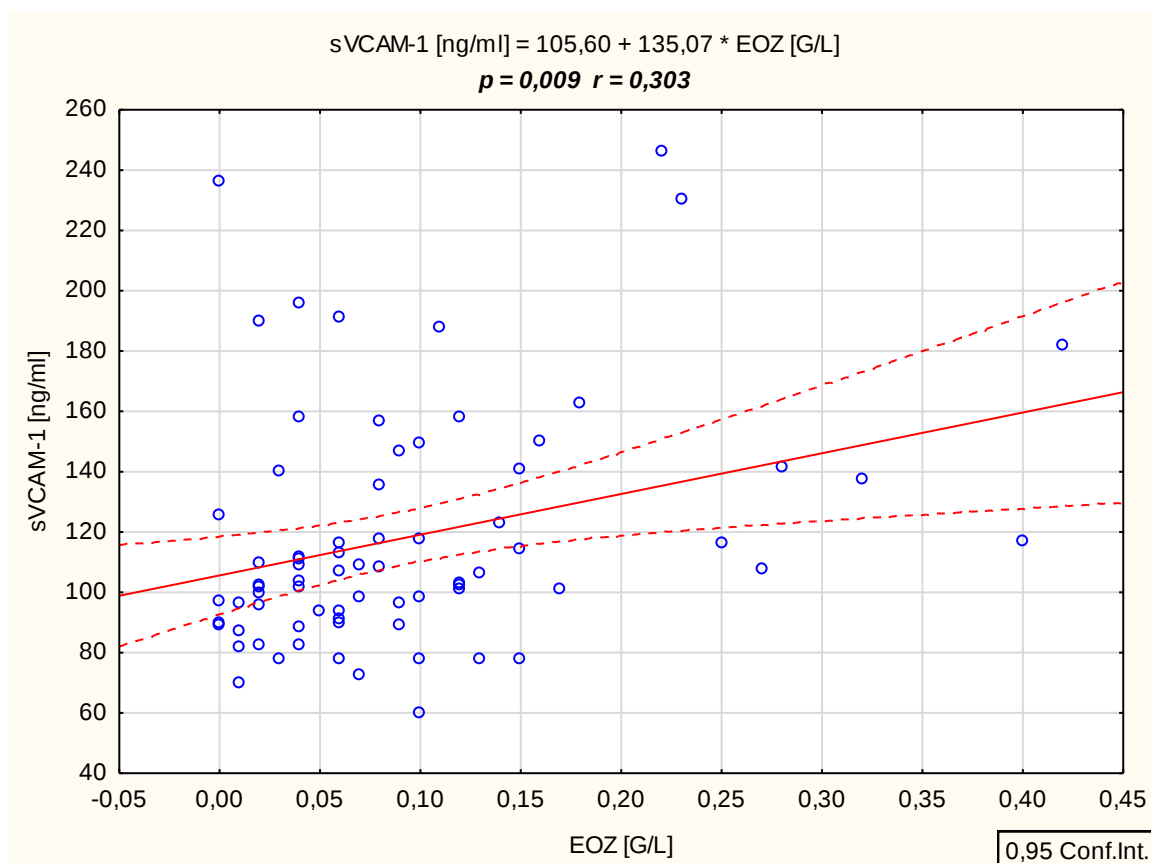
Na rycinie 5 (Ryc. 5) ukazano zależność pomiędzy hsCRP i sVCAM-1 o charakterze słabej dodatniej korelacji.

Z kolei na rycinie 9 (Ryc. 9) przedstawiono dodatnią korelację pomiędzy sVCAM-1 i sICAM-1. Z kolei na rycinie 16 (Ryc. 16) przedstawiono zależność pomiędzy sVCAM-1 i stężeniem PAI-1 w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji ($r = 0,435$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia PAI-1 obserwowano wzrost stężenia sVCAM-1 w surowicy krwi.



Rycina 16. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem PAI-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 17 (Ryc. 17) przedstawiono zależność pomiędzy sVCAM-1 i liczbą eozynofików (EOZ) w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji ($r = 0,303$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem liczby eozynofików (EOZ) w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sICAM-1.

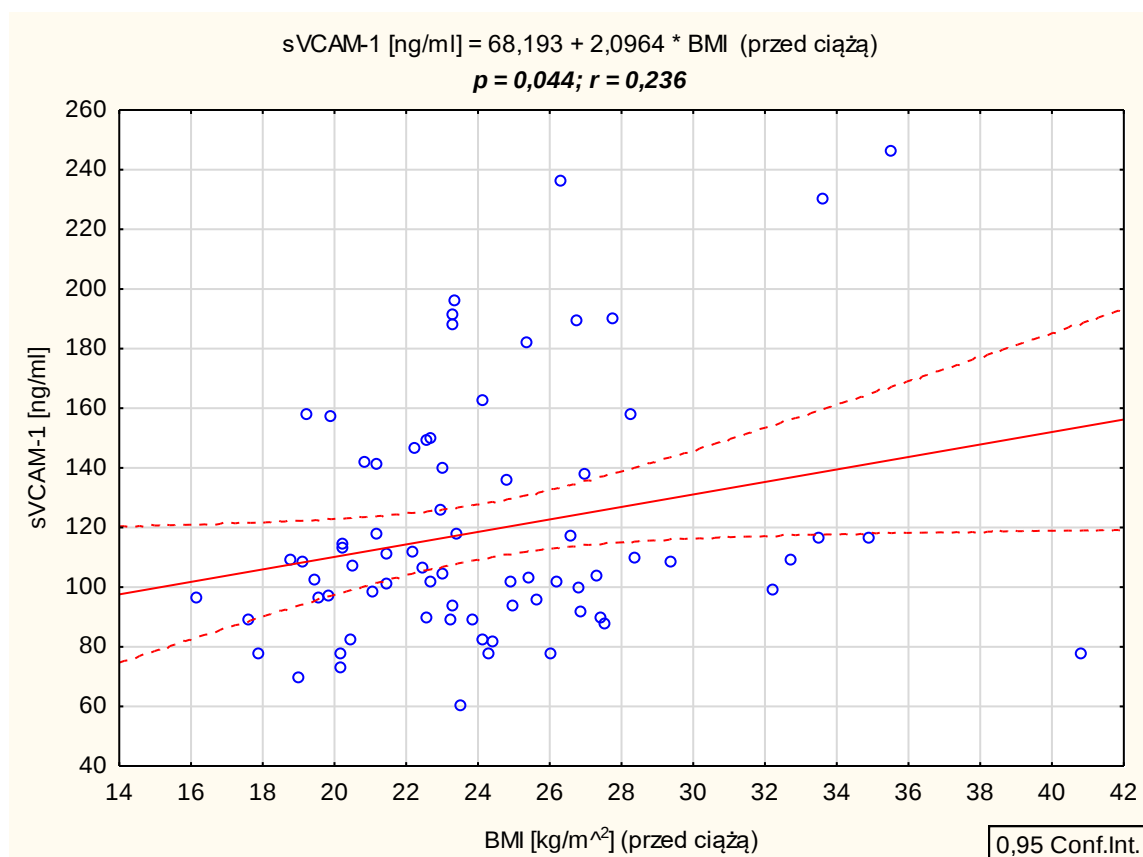


Rycina 17. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a liczbą eozynofików (EOZ) w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 18 (Ryc. 18) przedstawiono zależność pomiędzy sVCAM-1 i BMI ciężarnych przed ciążą, gdy wzięto pod uwagę wyniki wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,236$), co oznacza, że u badanych ciężarnych im wyższe było BMI w okresie przed ciążą tym obserwowano wyższe stężenie sVCAM-1 w surowicy krwi. Takiej zależności nie zaobserwowano w stosunku do wielkości BMI przed oraz w czasie ciąży, ani przyboru masy ciała w przebiegu ciąży. Przy analizach korelacji, przeprowadzonych z podziałem na badane grupy, nie zaobserwowano żadnych

istotnych zależności pomiędzy stężeniem surowiczym sVCAM-1 a wielkością BMI przed i w trakcie ciąży, ani z przyborem masy ciała w trakcie ciąży.

Żadnych istotnych zależności z BMI i zmianami masy ciała ciężarnych nie zaobserwowano natomiast w przypadku stężenia sICAM-1, zarówno w przypadku oceny całej grupy, jak i z podziałem na IUGR, IUGR+PE i KONTROLA.



Rycina 18. Zależność pomiędzy stężeniem sVCAM-1 a wielkością BMI w okresie przed ciążą analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Następnie oceniano śródbłonkowe czynniki pro- i przeciwzapalne. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sTM, tPA, TFPI, PAI-1 i vWF przedstawiono w tabeli 7 (Tabela 7)

Tabela 7. Porównanie śródbłonkowych parametrów zaangażowanych w proces hemostazy w analizowanych grupach ciężarnych.

<i>Śródbłonkowe czynniki pro- i przeciwzapalne</i>				
	Grupa badanych (n=74)			<i>p</i> *
	IUGR (n=25)	IUGR+PE (n=24)	KONTROLA (n=25)	
sTM [ng/ml]	22,69 ± 12,66	27,40 ± 37,26	3,69±2,30 ^{&}	< 0,0001
tPA [ng/ml]	4,56 ± 3,86	4,39 ± 2,42	2,86 ± 1,83 [#]	NS
TFPI [ng/ml]	48,93 ± 23,60	55,10 ± 16,65	58,18 ± 28,17	NS
PAI-1 [ng/ml]	12,82 ± 3,92 [^]	18,43 ± 6,71	7,73 ± 3,69 ^{^^}	< 0,0001
vWF [mIU/ml]	1107 ± 901,30	1036,46 ± 484,13	636,392 ± 260,41 [%]	0,0017

* Analizy porównawcze dla zmiennych o charakterze ilościowym wykonano nieparametrycznym testem Kruskala-Wallisa lub parametrycznym testem Anova (w zależności od zgodności z rozkładem normalnym oraz zgodnie z oceną jednorodności wariancji).

Wartość *p* dla różnic pomiędzy grupami uznano za statystycznie istotną, jeśli *p* < 0,05. W przypadku, gdy nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupami (*p* > 0,05) wprowadzono oznaczenie „NS” - nieistotne statystycznie.

Ocenę istotności różnic pomiędzy dwiema grupami przeprowadzono testem *t*-Studenta lub *U* Manna-Whitneya, w zależności od zgodności danych z rozkładem normalnym.

[&] IUGR vs KONTROLA *p* < **0,0001**; IUGR+PE vs KONTROLA *p* = **0,0026**

[#] IUGR+PE vs KONTROLA *p* = **0,0110**

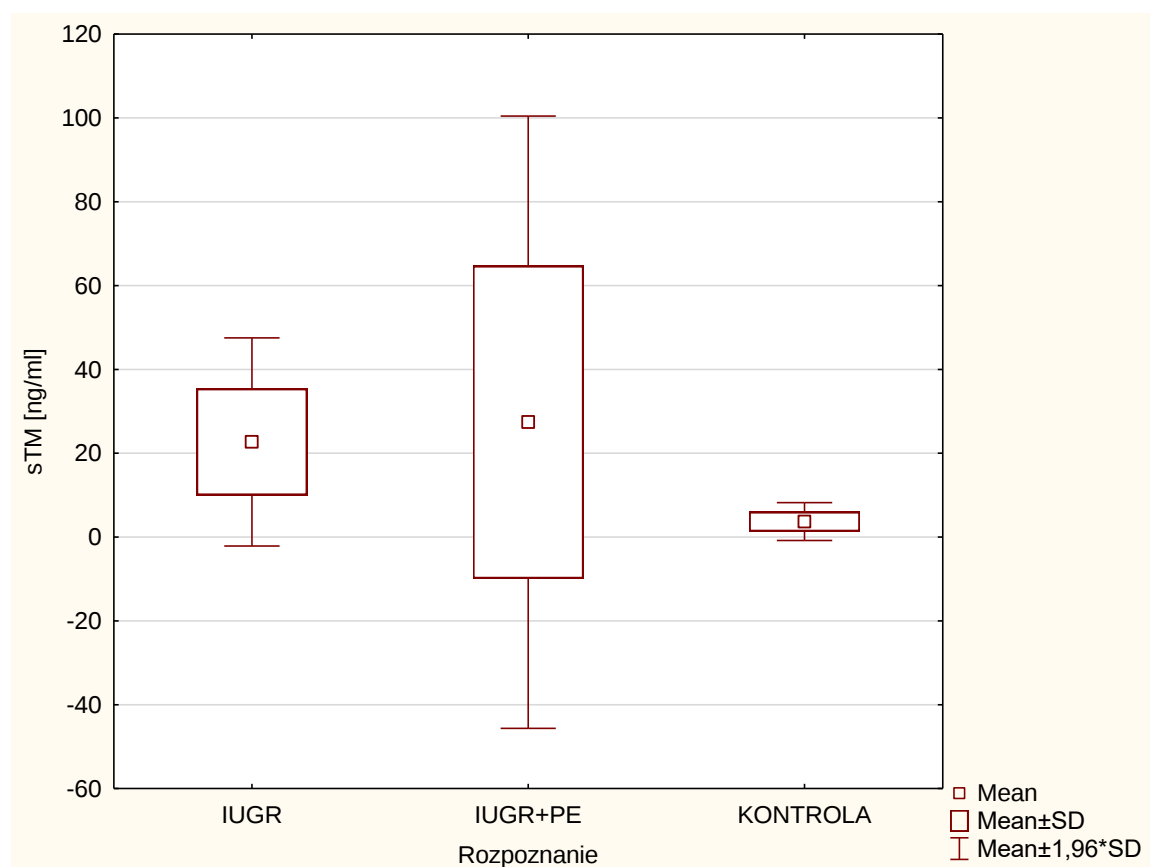
[^] IUGR vs IUGR+PE *p* = **0,0007**

^{^^} IUGR vs KONTROLA *p* < **0,0001**; IUGR+PE vs KONTROLA *p* = **0,0001**

[%] IUGR vs KONTROLA *p* = **0,0271**; IUGR+PE vs KONTROLA *p* = **0,0007**

4.4.2 sTM

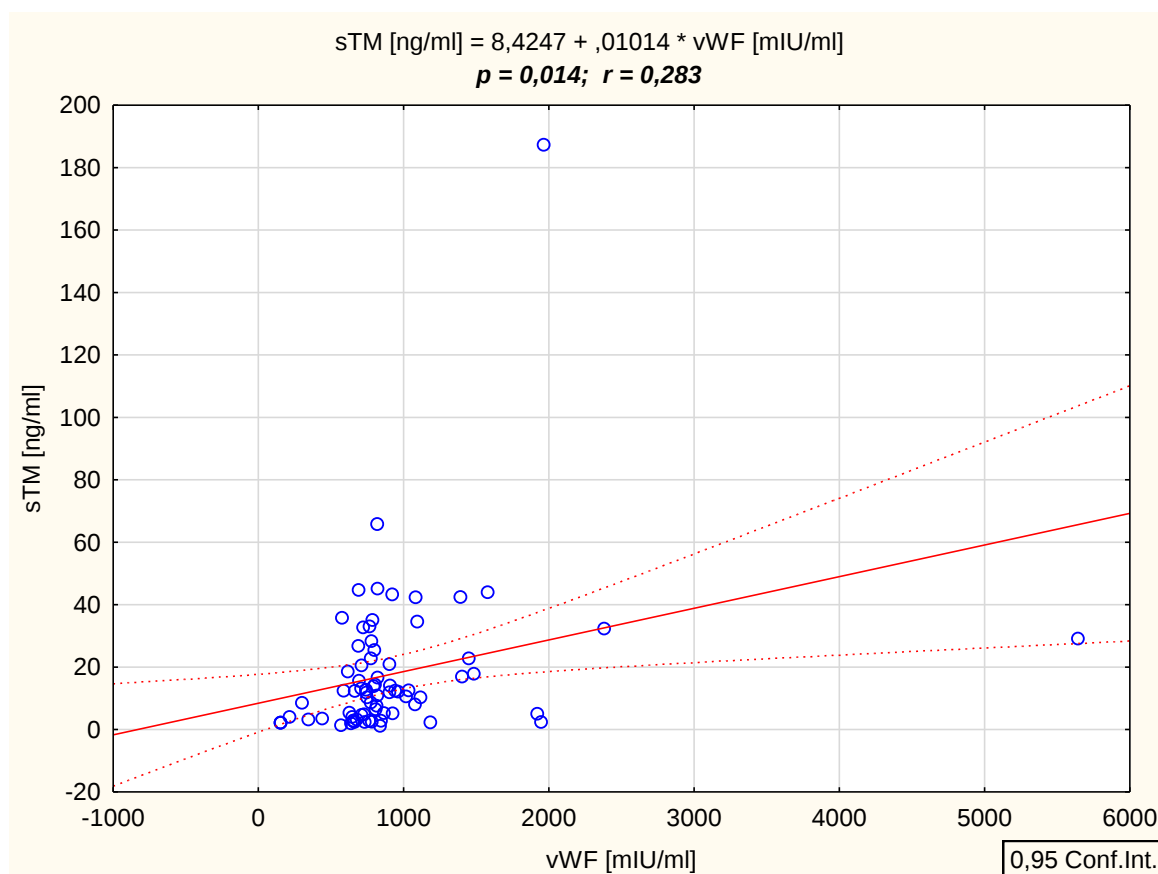
Trzy badane grupy różniły się statystycznie istotnie w zakresie stężenia sTM, co szczegółowo zostało zaprezentowane w tabeli 7 (Tabela 7). Najwyższe stężenie sTM stwierdzono w grupie IUGR+PE, a najniższe wśród ciężarnych z grupy KONTROLA. Zarówno analiza porównawcza grupy IUGR oraz IUGR+PE z grupą KONTROLA wykazała statystycznie istotne różnice w zakresie ocenianego parametru. Natomiast nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupami IUGR+PE i IUGR, aczkolwiek ciężarne z grupy IUGR+PE wykazywały tendencje do nieco wyższych wartości sTM w surowicy krwi. Na rycinie 19 (Ryc. 19) przedstawiono rozkład średnich stężeń $\pm$ SD dla sTM w badanych grupach.



Rycina 19. Rozkład stężeń sTM w badanych grupach.

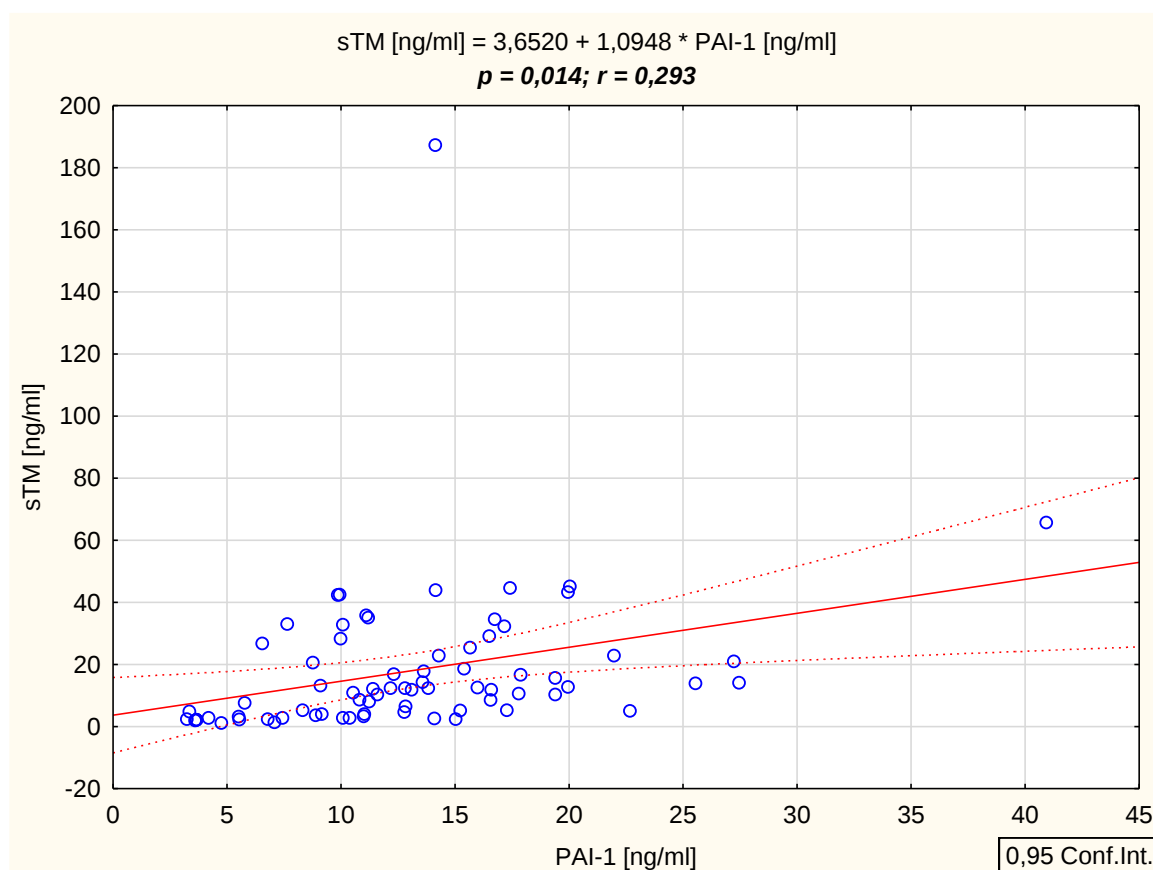
Zależności pomiędzy stężeniem sTM a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinach 20-21 (Ryc. 20-21), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z sICAM-1 były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

Na rycinie 20 (Ryc. 20) przedstawiono zależność pomiędzy sTM i stężeniem vWF w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,283$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia vWF w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sTM.



Rycina 20. Zależność pomiędzy stężeniem sTM a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Na rycinie 21 (Ryc. 21) przedstawiono zależność pomiędzy sTM i stężeniem PAI-1 w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,293$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia PAI-1 w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia sTM.



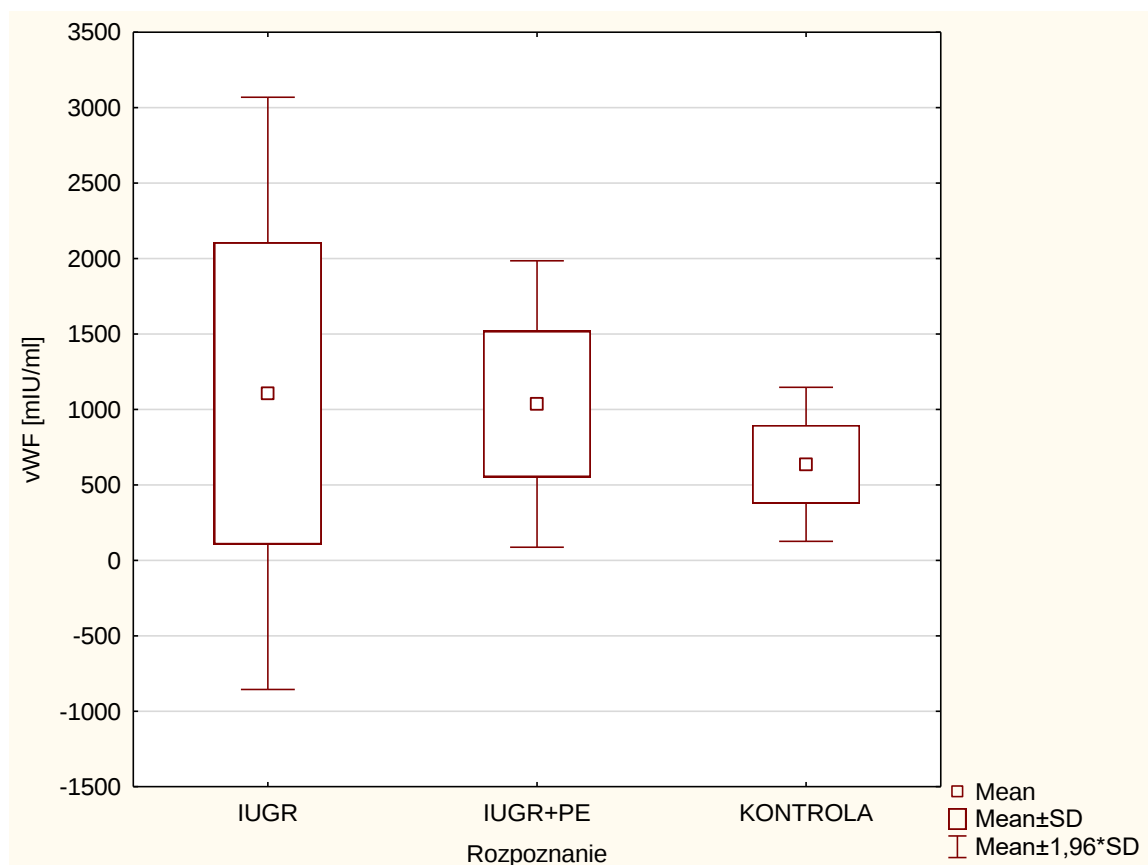
Rycina 21. Zależność pomiędzy stężeniem sTM a stężeniem PAI-1 analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

Ponadto zaobserwowano zależność pomiędzy sTM a sICAM-1 o charakterze słabej dodatniej korelacji ($r = 0,38$), co przedstawiono wcześniej, na rycinie 10 (Rycina 10).

4.4.3 vWF

W zakresie stężenia vWF analiza porównawcza trzech badanych grup wykazała istotnie statystycznie różnice, co szczegółowo zostało zaprezentowane w tabeli 7 (Tabela 7). Najwyższe stężenie vWF stwierdzono w grupie IUGR, a najniższe wśród ciężarnych z grupy KONTROLA. Zarówno analiza porównawcza grupy IUGR oraz IUGR+PE z grupą KONTROLA wykazała statystycznie istotne różnice w zakresie ocenianego parametru.

Natomiast nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupami IUGR+PE i IUGR, aczkolwiek ciężarne z grupy IUGR wykazywały tendencje do nieco wyższych wartości vWF w surowicy krwi w odniesieniu do IUGR+PE. Na rycinie 22 (Ryc. 22) przedstawiono rozkład średnich stężeń $\pm$ SD dla vWF w badanych grupach.

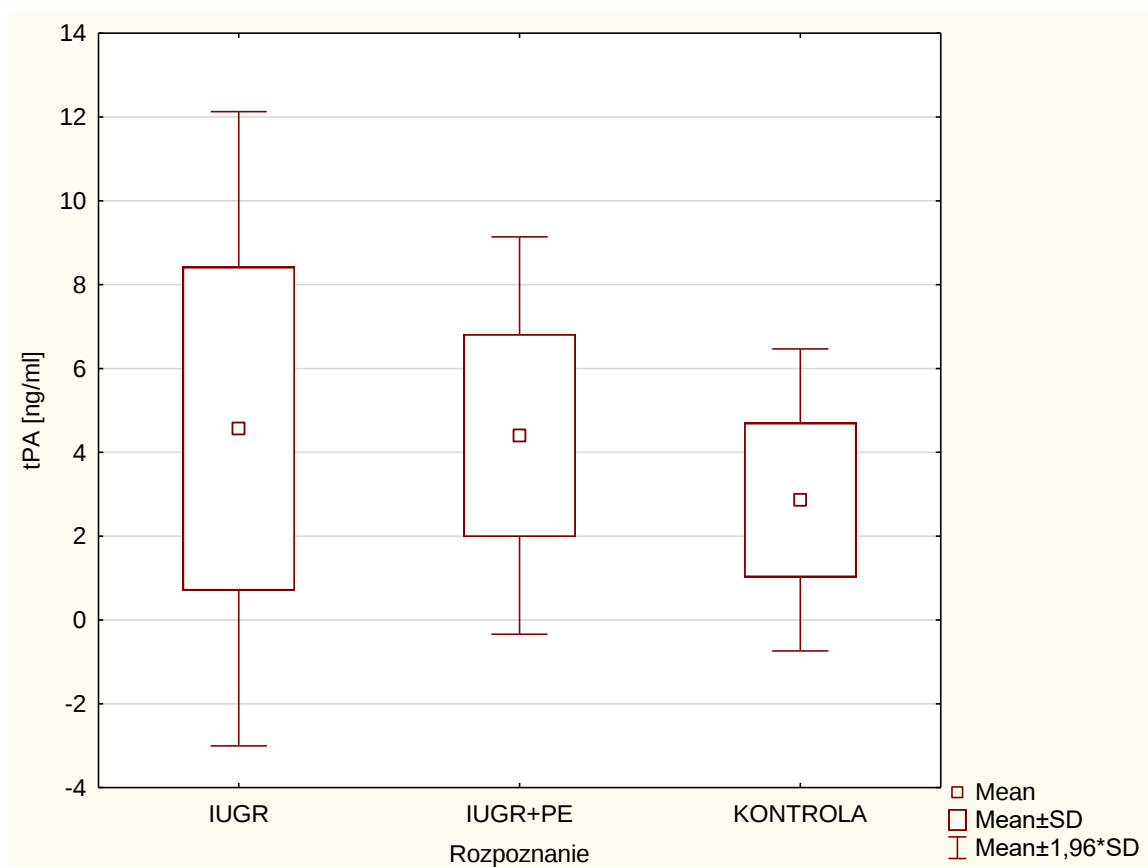


Rycina 22. Rozkład stężeń vWF w badanych grupach

Zależności pomiędzy stężeniem vWF a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinach 12, 20, 24, 26, 28 (Ryc. 12, 20, 24, 26, 28), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z tPA były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

4.4.4 tPA

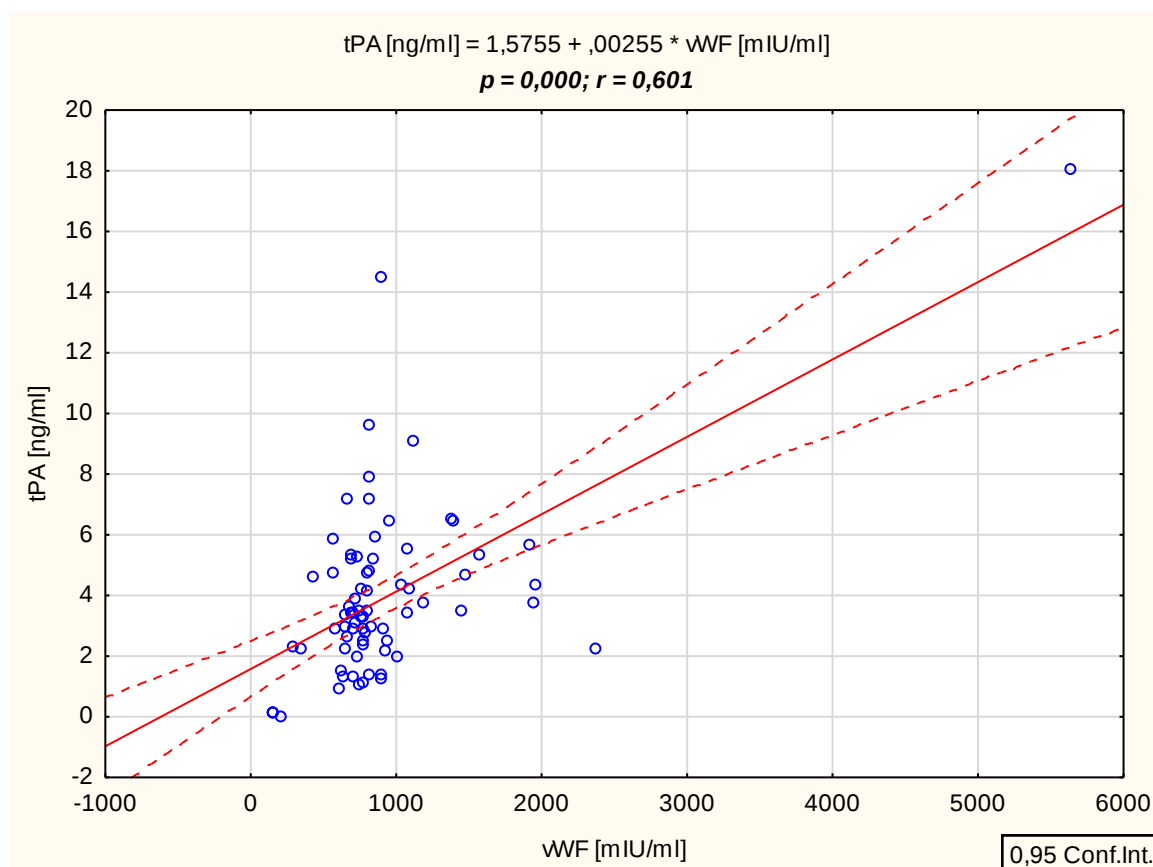
Z kolei w zakresie stężenia tPA analiza porównawcza trzech badanych grup nie wykazała istotnych statystycznie różnic, co szczegółowo zostało zaprezentowane w tabeli 7 (Tabela 7). Choć średnie stężenia w grupach IUGR i IUGR+PE wydawały się być wyższe niż w przypadku grupy KONTROLA, to nie zawsze były to różnice statystycznie istotne. Tylko statystycznie istotna okazała się różnica pomiędzy IUGR+PE i wynikami KONTROLI. Pomimo różnic w zakresie pojedynczych pacjentek z grupy IUGR, których stężenia tPA wydawały się wyższe niż u większości pacjentek z grupy IUGR+PE, to jednak analiza statystyczna nie wykazała aby grupy IUGR i IUGR+PE różniły się istotnie statystycznie pomiędzy sobą w zakresie stężenia tPA w surowicy krwi. Rozkład średnich stężeń $\pm$ SD dla tPA w badanych grupach zaprezentowano na rycinie 23 (Ryc. 23).



Rycina 23. Rozkład stężeń tPA w badanych grupach.

Zależność pomiędzy stężeniem tPA a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinie 24 (Ryc. 24), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z tPA były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

Na rycinie 24 (Ryc. 24) przedstawiono zależność pomiędzy tPA i stężeniem vWF w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter silnej dodatniej korelacji ($r = 0,601$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia vWF w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia tPA. Poza wspomnianą zależnością nie zaobserwowano innych istotnych korelacji w zakresie oznaczonych parametrów i ocenianych czynników.

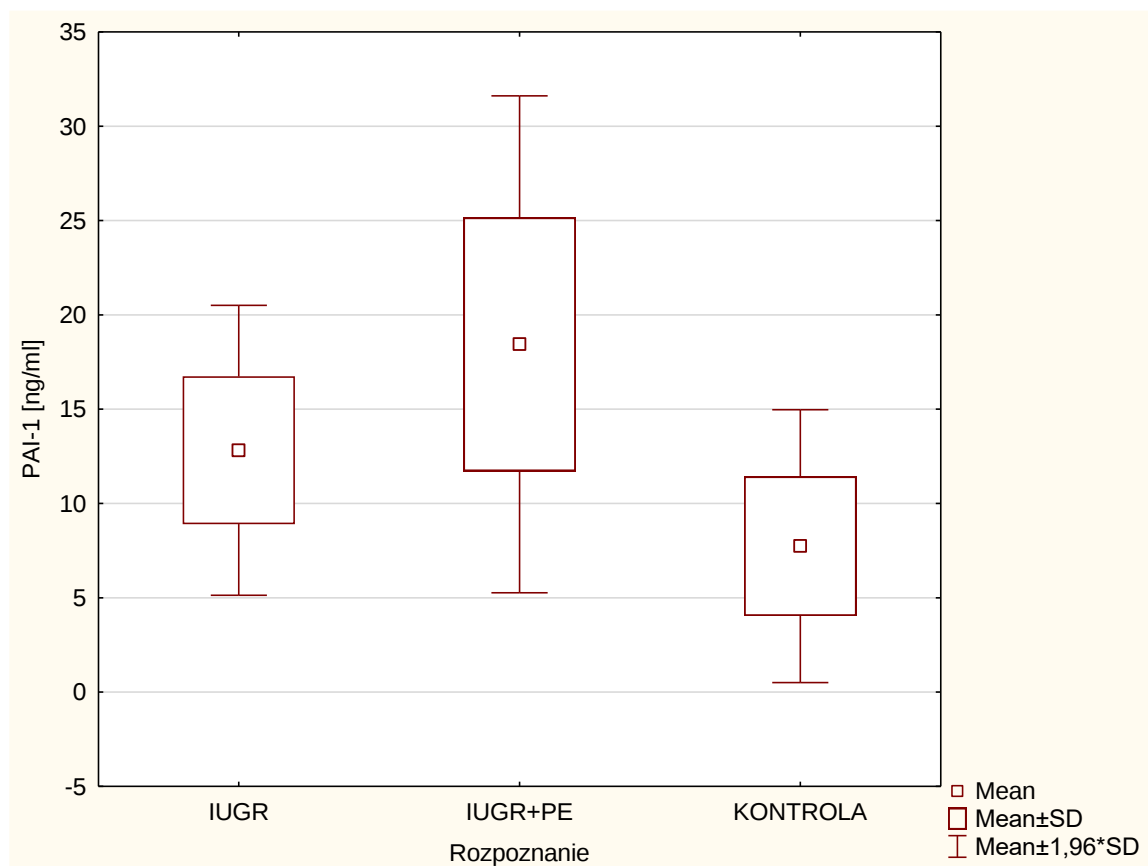


Rycina 24. Zależność pomiędzy stężeniem tPA a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

4.4.5 PAI-1

Stężenie PAI-1 w surowicy krwi było statystycznie istotnie różne we wszystkich zakwalifikowanych do badania grupach, co szczegółowo zostało zaprezentowane w tabeli 7 (Tabela 6). Najwyższe stężenie PAI-1 w surowicy krwi wykazywały ciężarne z grupy IUGR+PE, a najniższe ciężarne z grupy KONTROLA. Ponadto różnice pomiędzy ciężarnymi IUGR i IUGR+PE były statystycznie istotne, ciężarne z grupy IUGR+PE wykazywały się wyższymi stężeniami PAI w porównaniu z ciężarnymi z grupy IUGR.

Rozkład średnich stężeń $\pm$ SD dla PAI-1 w badanych grupach przedstawiono na rycinie 25 (Ryc. 25).

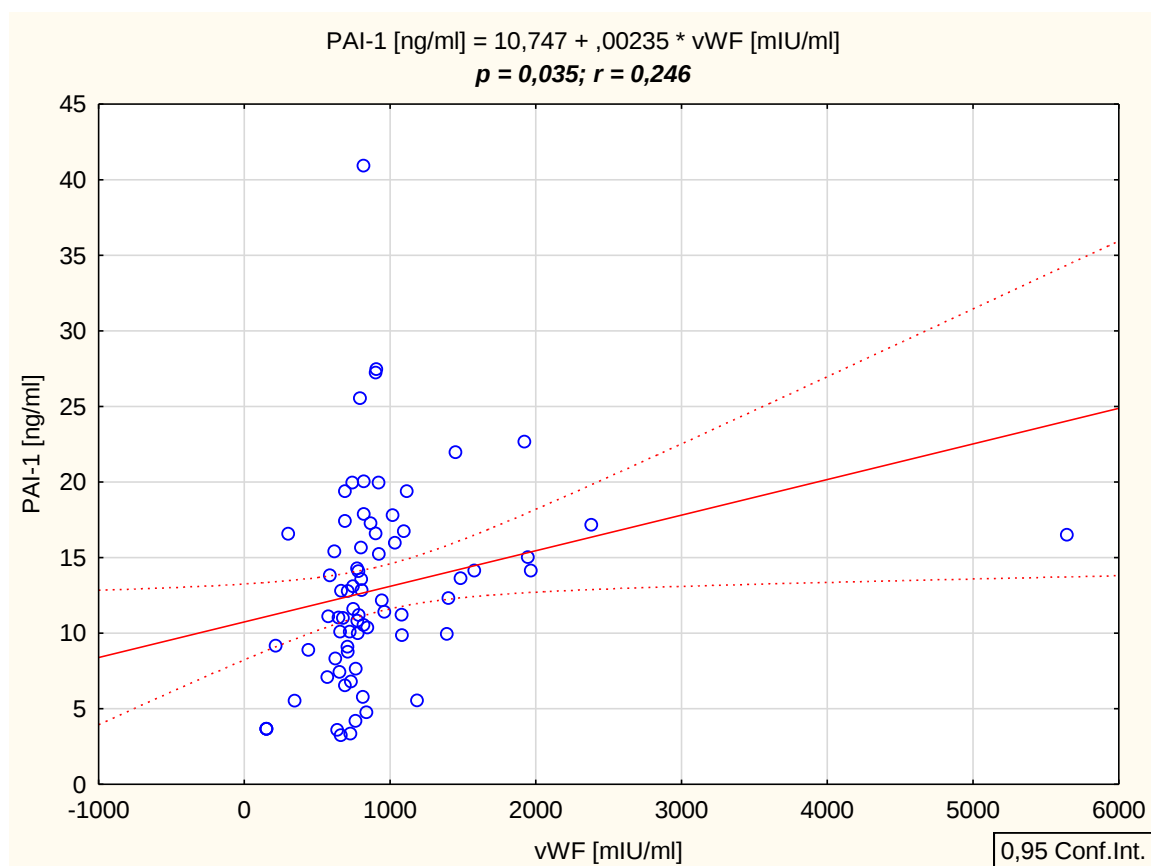


Rycina 25. Rozkład stężeń PAI-1 w badanych grupach.

Zależności pomiędzy stężeniem PAI-1 a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinach 11, 15, 21 i 26 (Ryc. 11, 15, 21, 26), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z PAI-1 były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

Na uwagę zasługuje zależność o charakterze słabej dodatniej korelacji pomiędzy PAI-1 a hsCRP, zaprezentowana na rycinie 6 (Ryc. 6).

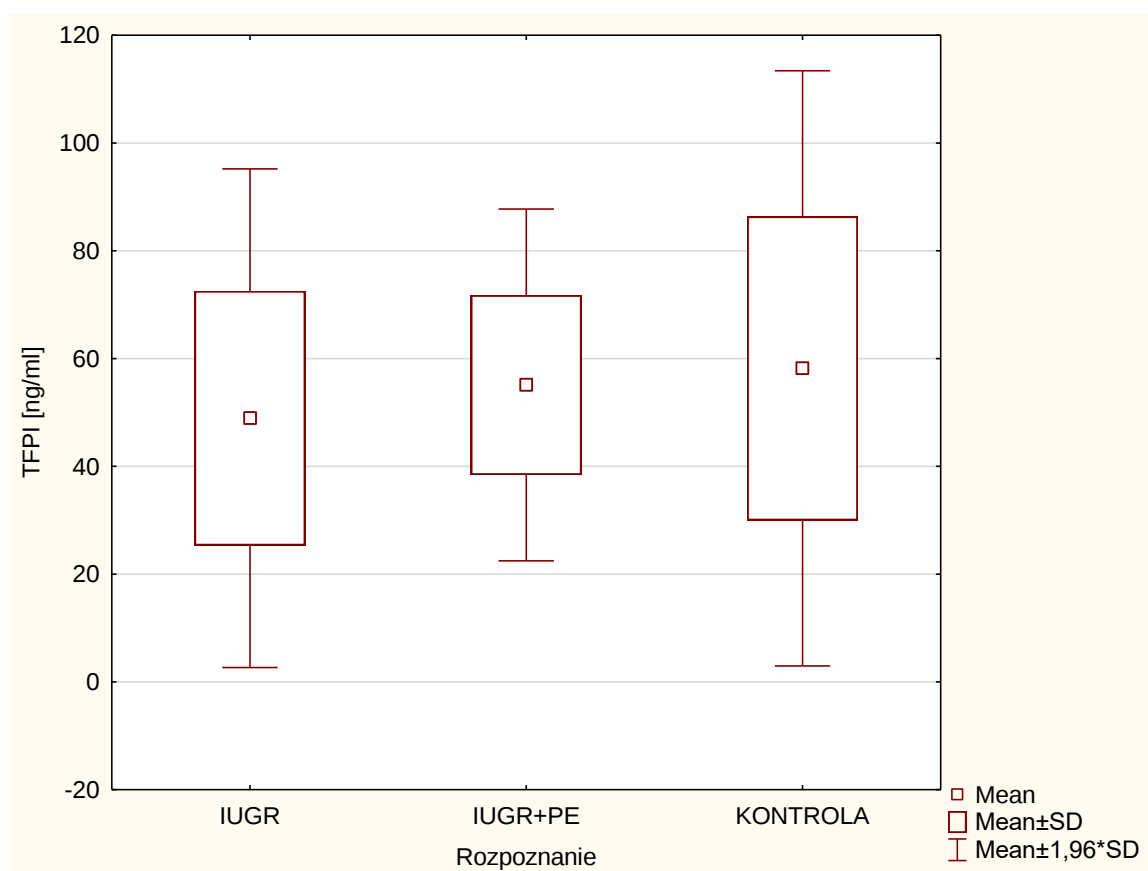
Z kolei, na rycinie 26 (Ryc. 26) przedstawiono zależność pomiędzy PAI-1 i stężeniem vWF w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter słabej dodatniej korelacji ($r = 0,24$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz ze wzrostem stężenia vWF w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia PAI-1.



Rycina 26. Zależność pomiędzy stężeniem PAI-1 a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

4.4.6 TFPI

Badane grupy nie różniły się statystycznie istotnie w zakresie stężenia TFPI w surowicy krwi, co szczegółowo zostało zaprezentowane w tabeli 7 (Tabela 7). Może to po części wynikać z dużej zmienności stężeń TFPI w grupach. Różnic nie zaobserwowano nawet po uwzględnieniu stopnia zaawansowania IUGR, ani przy porównaniach IUGR lub IUGR+PE z KONTROLĄ. Rozkład średnich stężeń $\pm$ SD dla TFPI przedstawiono na rycinie 27 (Ryc. 27).

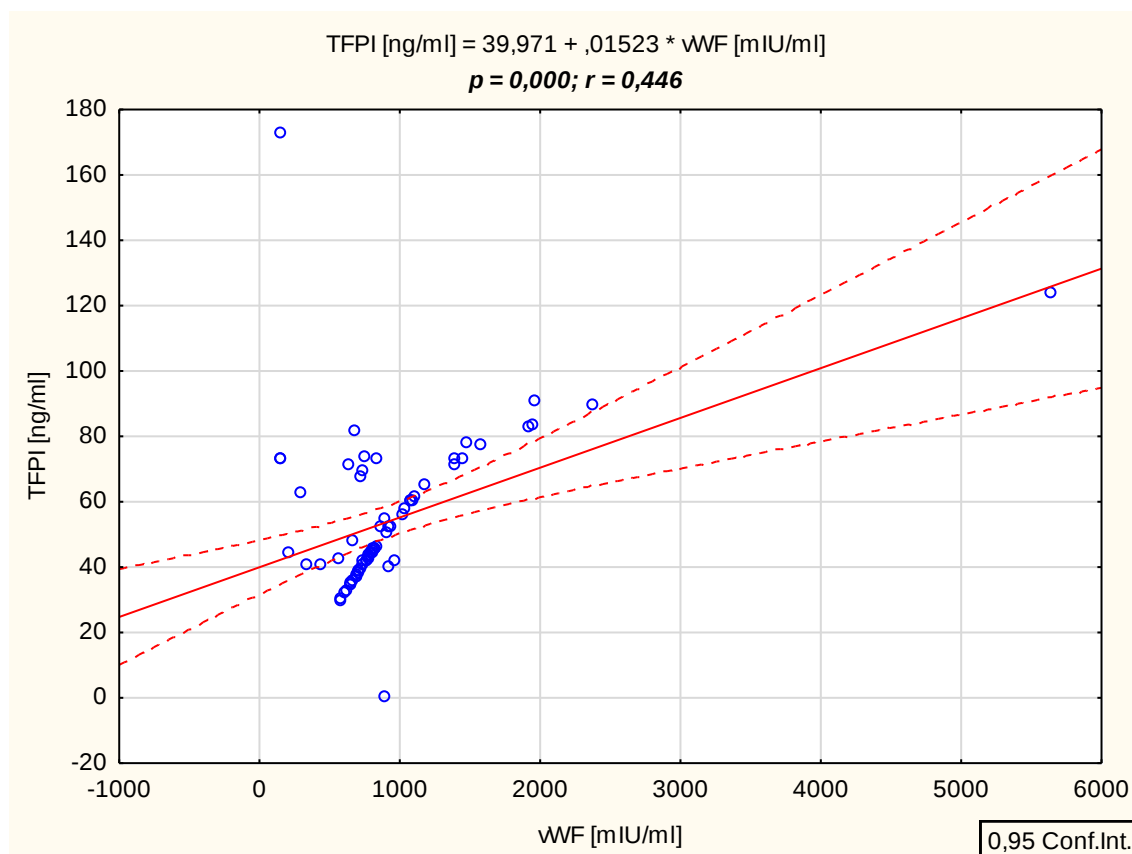


Rycina 27. Rozkład stężeń TFPI w badanych grupach.

Zależność pomiędzy stężeniem TFPI a wybranymi czynnikami i parametrami przedstawiono na rycinie 28 (Ryc. 28), wybrano te czynniki i parametry względem których zależności z tPA były statystycznie istotne z $p < 0,05$ i $r > 0,2$.

Na rycinie 28 (Ryc. 28) przedstawiono zależność pomiędzy TFPI i stężeniem vWF w surowicy krwi wszystkich badanych ciężarnych. Zależność ta ma charakter umiarkowanej dodatniej korelacji ($r = 0,446$), co oznacza, że u badanych ciężarnych wraz

ze wzrostem stężenia vWF w surowicy krwi obserwowano wzrost stężenia TFPI. Poza wspomnianą zależnością nie zaobserwowano innych istotnych korelacji w zakresie oznaczonych parametrów i ocenianych czynników.

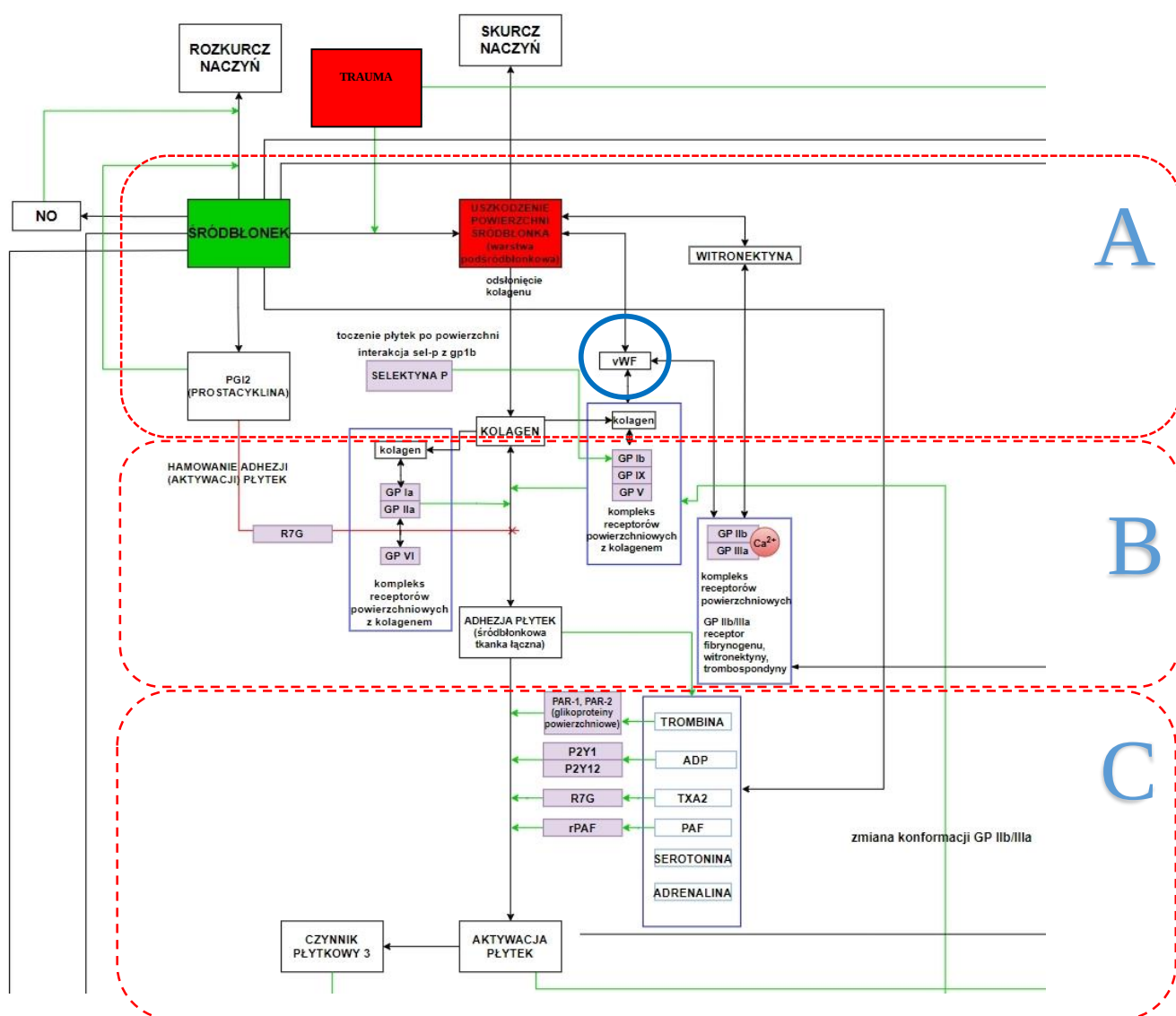


Rycina 28. Zależność pomiędzy stężeniem TFPI a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.

4.4.7 MODEL ZŁOŻONOŚCI PROCESU RÓWNOWAGI W UKŁADZIE HEMOSTAZY – UJĘCIE SYSTEMOWE

W rozprawie, w ramach podejścia systemowego do zrozumienia analizowanych zagadnień, podjęto się stworzenia autorskiego modelu sieci zależności panujących w układzie krzepnięcia. Model ten został umieszczony w ogólnodostępnym repozytorium baz danych <https://www.researchgate.net/project/Preeclampsia-and-IUGR-Studies>

Na potrzeby pracy model został podzielony na bloki w celu prezentacji poszczególnych etapów. Niebieskim okręgiem zaznaczono parametry oceniane w części doświadczalnej niniejszej pracy.



Rycina 29. Schemat ukazujący złożoność układu hemostazy w organizmie człowieka (część 1)

Tabela 8. Charakterystyka bloków układu hemostazy przedstawionych na rycinach 29-30 (Rycina 29–30)

	Opis	Źródła
Część płytkowa hemostazy		
A	Uszkodzenie śródbłonna powiązane z odsłonięciem kolagenu – rozpoczęcie działania płytek	[53–55]
B	Adhezja płytek – czynniki biorące udział w adhezji płytek (kolagen, glikoproteiny powierzchniowe, czynniki hamujące adhezję płytek)	[55–58]
C	Aktywacja płytek – czynniki i receptory prowadzące do aktywacji płytek	[55–59]
Część osoczowa hemostazy – klasyczna kaskada krzepnięcia		
D	Wewnątrzpochodny szlak aktywacji układu krzepnięcia	[55,60–62]
E	Zewnątrzpochodny szlak aktywacji układu krzepnięcia	[54,55,63–67]
F	Szlak wspólny	[55,63,68–70]

5 DYSKUSJA

Prawidłowe działanie śródbłónka ma istotne znaczenie dla właściwego funkcjonowania organizmu i jest kluczowe dla takich procesów jak hemostaza, angiogeneza, przebudowa tkanek, czy reprodukcja. W rozprawie podjęto się oceny funkcjonowania śródbłónka w kontekście jego roli w utrzymywaniu dynamicznej równowagi pomiędzy czynnikami pro i anty zakrzepowymi u ciężarnych z powikłaniami IUGR oraz IUGR+PE.

W badaniach *in vitro*, których wyniki nie znalazły się w rozprawie (71), oceniono morfologię komórek śródbłónka po ostrej i przewlekłej ekspozycji na medium wzbogacone surowicą pobraną od zdrowych kobiet w ciąży oraz kobiet z IUGR i IUGR z PE. W tych samych warunkach mierzono żywotność komórek śródbłónka, proliferację, wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz stężenie czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) w surowicy. Zaobserwowano, że kobiety ciężarne z IUGR i IUGR z PE charakteryzowały się obniżonym stężeniem VEGF. Ponadto, surowice pobrane od kobiet z IUGR i IUGR z PE wywierały szkodliwy wpływ na komórki śródbłónka naczyniowego, zmniejszając ich żywotność i proliferację i generując stres oksydacyjny z powodu dysfunkcyjnych mitochondriów. Wyniki tych badań wskazują, że w IUGR oraz IUGR+PE dochodzi do dysfunkcji śródbłónka (72–74).

Wiadomo, że gdy dochodzi do dysfunkcji śródbłónka, następuje zaburzenie w zakresie równowagi pomiędzy czynnikami pro i anty zakrzepowymi, co w konsekwencji powoduje upośledzony rozkurcz i zwiększoną przepuszczalność naczyń oraz zaburzenie właściwości ochronnych śródbłónka. Ta nierównowaga zapoczątkowuje wiele chorób, między innymi miażdżycę, nadciśnienie tętnicze, czy przerzuty nowotworowe i wydaje się być jednym z istotnych czynników w patologii IUGR i PE. Należy zauważyć, że bardzo często IUGR współwystępuje z PE, co może sugerować podobną etiologię obu zaburzeń (75).

Chociaż w ciąży występują duże zmiany w układach krzepnięcia i fibrylizacji, zachowana jest dynamiczna równowaga, która ułatwia implantację blastocysty i zapobiega zarówno nadmiernemu krzepnięciu, jak i krwotokowi. Z drugiej strony, należy podkreślić, że nawet podczas prawidłowo przebiegającej ciąży obserwuje się nieznaczne przesunięcie równowagi w kierunku nadkrzepliwości (76,77), co ma na celu zabezpieczenie przed

powikłaniami krwotocznymi związanymi z porodem. Jednocześnie układ fibrynolityczny ulega wyhamowaniu.

Jednak, w niektórych schorzeniach, obserwowanych u ciężarnych, występuje wyraźna tendencja w kierunku stanu prokoagulacyjnego, co zagraża dobrostanowi matki i płodu. Po części to wyjaśnia pojawianie się powikłań zatorowo-zakrzepowych mogących prowadzić do zaburzeń takich jak zgony wewnątrzmaciczne, nawracające poronienia, IUGR czy PE (78).

Dlaczego dochodzi do zaburzeń śródbłónka w utrzymywaniu równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyzakrzepowymi? Odpowiedzią może być przedłużona i nasilona aktywacja komórek śródbłónka, która powoduje nie tylko dysfunkcję komórek endotelium, lecz może prowadzić do nieodwracalnej utraty integralności tych komórek, oderwania ich od błony podstawnej, apoptozy i nekrozy. Należy podkreślić, że w łożysku wykazano obecność substancji, które mogą prowadzić do uszkodzenia lub aktywacji śródbłónka naczyniowego, m.in. gdy dochodzi do hipoksji następuje nasilone uwalnianie cytokin, takich jak $\text{TNF-}\alpha$ i IL-1, co wywołuje zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, wzrost poziomu aktywowanych płytek krwi oraz ekspresję cząsteczek adhezyjnych. We krwi krążącej pojawiają się wówczas zwiększone ilości komórek śródbłónka oraz mikrocząsteczki pochodzące z ich błon komórkowych, które charakteryzują się dużą zawartością prozakrzepowo działających molekuł: fosfolipidu fosfatydyloseryny i TF. Biochemicznymi markerami dysfunkcji śródbłónka mogą być zmiany stężeń cząsteczek takich jak sVCAM-1, sICAM-1, vWF, sTM czy też PAI-1. Jednak badania dotyczące ich udziału dostarczają sprzecznych wniosków (15,72,79–83). Te rozbieżności przemawiają za złożonym charakterem zaburzeń funkcji śródbłónka w ciąży powikłanej PE i IUGR, w związku z tym nadal zasadne jest prowadzenie badań mających na celu wyjaśnienie roli śródbłónka, a także udziału sICAM-1 i sVCAM-1 w patomechanizmie wspomnianych schorzeń.

Wydaje się, że wszystkie wspomniane zaburzenia funkcji śródbłónka, zarówno przewaga procesów prozakrzepowych oraz nieprawidłowe interakcje pomiędzy komórkami wraz z towarzyszącym nasilonym lokalnym procesem zapalnym, mogą przyczyniać się do rozwoju zarówno PE jak i IUGR.

Skoro dysfunkcja śródbłónka może stanowić klucz do zrozumienia zaburzeń równowagi w układzie hemostazy w IUGR oraz IUGR i PE, nie powinno dziwić,

że rutynowo oznaczane markery układu krzepnięcia mogą okazać się nieprzydatne, co zresztą zostało potwierdzone w obecnej pracy. Nie wykazano, żadnych istotnych zaburzeń w zakresie APTT, D-dimerów, fibrynogenu, PT, INR oraz wskaźnika PT w grupie ciężarnych z IUGR oraz IUGR+PE, które wskazywałyby na zaburzenie homeostazy układu krzepnięcia. Nie było też istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi dwoma grupami w zakresie ocenianych parametrów. Gdyby odnieść uzyskane wyniki parametrów układu krzepnięcia do wyników zdrowych ciężarnych w oparciu o dostępne dane literaturowe (takich badań nie prowadzono w ramach tej rozprawy) to można by stwierdzić, że wyniki ciężarnych z IUGR i IUGR+PE są zbliżone do tych uważanych za prawidłowe dla ciężarnych w danym tygodniu ciąży.

Jaka jest przypuszczalna etiopatogeneza IUGR oraz IUGR+PE? Większość badaczy uważa, że jest to proces dwuetapowy i wieloczynnikowy. W pierwszym etapie, który często jest niemy klinicznie, tuż po implantacji trofoblastu, dochodzi do zaburzeń w procesie placentacji, a w ich następstwie do hipoksji i zmniejszenia przepływu łożyskowego. Za najważniejsze zaburzenie leżące u podłoża zmniejszenia przepływu łożyskowego uważa się niedostateczną inwazję komórek trofoblastu w ściany tętnic spiralnych (84). Zaburzenie to, mimo znaczącego udziału w etiopatogenezie PE, nie wydaje się być jedynym czynnikiem indukującym chorobę. W związku z tym postuluje się udział innych czynników, które dodatkowo upośledzają przepływ naczyniowy. Do czynników tych należą: zaburzenia w układzie krzepnięcia, dyslipidemia, cukrzyca, kolagenozy czy przewlekłe nadciśnienie tętnicze. U niektórych kobiet powoduje to w konsekwencji rozwój matczynego wieloukładowego zespołu PE (85).

W drugim etapie, który typowo pojawia się po 20 tygodniu ciąży i jest najczęściej klinicznie jawny, pod wpływem stresu oksydacyjnego, hipoksji i innych nie do końca rozpoznanych czynników, dochodzi do uwalniania do krwioobiegu ciężarnej, czynników łożyskowych, w tym czynników antyangiogennych. Skutkuje to pozbawieniem śródbłoka i syncytiotrofoblastów podstawowych czynników przeżycia, co w konsekwencji przyczynia się to do rozwoju dysfunkcji śródbłoka, powodując wzrost ogólnoustrojowego oporu naczyniowego, nadciśnienie tętnicze i nadkrzepliwość. Tym zaburzeniom towarzyszy najczęściej reakcja zapalna, która może doprowadzić do uszkodzenia śródbłoka, co jest widoczne w postaci uszkodzeń narządowych u ciężarnej i w konsekwencji może stać się przyczyną PE. Niektórzy badacze podkreślają, że dochodzi nie do uszkodzenia, ale do aktywacji śródbłoka naczyniowego z następową jego

dysfunkcją oraz zaburzeniami krzepnięcia, manifestującymi się obniżeniem syntezy czynników przeciwzakrzepowych, wzrostem produkcji czynników prozakrzepowych, upośledzeniem fibrynolizy, nasileniem agregacji płytek krwi i penetracji makrofagów. Na powierzchni endotelium zwiększa się ekspresja czynnika tkankowego i molekuł adhezyjnych.

Należy pamiętać, że podczas odpowiedzi zapalnej śródbłonek ulega dysfunkcji, najczęściej o charakterze aktywacji (86). Aktywacja komórek śródbłonna odnosi się do zwiększonych właściwości adhezyjnych śródbłonna do leukocytów w odpowiedzi na bodźce biomechaniczne lub cytokiny. W dysfunkcji komórek śródbłonna występuje upośledzona relaksacja zależna od komórek śródbłonna, co początkowo zaobserwowano w modelu pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

Aktywacja komórek śródbłonna może zatem prowadzić do dysfunkcji śródbłonna, a głównym łącznikiem między tymi procesami jest kaskada adhezji leukocytów, która ma zasadnicze znaczenie dla rozwoju odpowiedzi zapalnej i jest regulowanym i wieloetapowym procesem. W interakcjach leukocytów i komórek śródbłonna pośredniczą głównie cząsteczki adhezyjne komórek należące do trzech rodzin (selektyny, integryny i białka immunoglobulinopodobne). Rodzina selektyn jest głównie odpowiedzialna za rolowanie leukocytów na powierzchni śródbłonna - selektyny E, L i P (nie badane w pracy), z kolei ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1 są ligandami integryn leukocytów i należą do nadrodziny immunoglobulin. Cząsteczki te są ważne dla adhezji, zatrzymania i transmigracji leukocytów.

W odpowiedzi na cytokiny prozapalne, specyficzne cząsteczki adhezyjne są usuwane z powierzchni śródbłonna i można je wykryć w krążeniu obwodowym. W miejscach niekontrolowanego zapalenia komórki śródbłonna są uszkodzane, przez co zwiększają ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, co nie tylko umożliwia akumulację leukocytów ale także zwiększa przepuszczalność, prowadząc w ten sposób do powstania obrzęku tkanek. Uszkodzone komórki śródbłonna wykazują nieprawidłowości morfologiczne, takie jak wakuolizacja jądrowa, wypukłość i fragmentacja cytoplazmatyczna, przez co podlegają oderwaniu od błony podstawnej (87).

Wcześniejsze badania wykazały, że rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne mogą być stosowane jako markery w różnych stanach zapalnych, takich jak posocznica, ostre zapalenie trzustki, reumatoidalne zapalenie stawów i przerzuty nowotworowe.

Środowisko zapalne, które wyzwała ekspresję ICAM-1, zwiększa adhezję leukocytów do komórek śródbłónka, równolegle ze zwiększonymi poziomami rozpuszczalnych ICAM-1 (88). Uważa się, że wzrost stężenia rozpuszczalnych postaci sVCAM-1 i sICAM-1 w surowicy wskazuje na aktywację/dysfunkcję śródbłónka i jest wykładnikiem dynamicznych zmian w jego obrębie.

W badaniach Coaty i wsp.(72) stwierdzono podwyższone stężenia sVCAM-1, sICAM-1 w PE. Z kolei takich zmian nie zaobserwowano w przypadku nadciśnienia indukowanego ciążą. Ponadto wspomniani badacze zauważyli, że podwyższone stężenia cząsteczek adhezyjnych mogą być czynnikiem prognostycznym wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Obserwowali oni wzrost stężenia sVCAM-1 i sICAM-1 w trzecim trymestrze ciąży w grupie początkowo zdrowych kobiet, u których w późniejszym okresie doszło do rozwoju PE. W przypadku IUGR Coata i wsp. zaobserwowali jedynie wzrost stężenia sVCAM-1, przy braku różnic istotnych statystycznie w zakresie stężeń sICAM-1 w porównaniu do zdrowych ciężarnych.

Zhang i wsp. w swoim badaniu również potwierdzili związek pomiędzy wzrostem stężenia sVCAM-1 a wystąpieniem PE. Z kolei Higgins i wsp. w swoim badaniu ujawnili, że ekspresja sVCAM-1 została zakłócona, a jej stężenie w surowicy było związane z nasileniem objawów klinicznych PE (79). Inny zespół badaczy (15) badał stężenia sVCAM-1 i sICAM-1 w PE i ujawnił, że były one podwyższone w ciężkim PE w porównaniu z prawidłową ciążą. Zauważono ponadto, że wzrost stężenia VCAM-1 wydaje się wskazywać na uszkodzenie komórek śródbłónka i aktywację leukocytów (15), co było zbieżne z wynikami odnotowanymi przez innych badaczy (89). Jednak wśród wyników badań cząsteczek adhezyjnych w PE i IUGR, można znaleźć takie, które wskazują, że poziomy sVCAM-1 w PE nie różni się w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi (83,90).

W badaniu prowadzonym w ramach rozprawy zaobserwowano podwyższone stężenia sICAM-1 w grupach IUGR i IUGR+PE. Najwyższe stężenie sICAM-1 występowało u ciężarnych z grupy IUGR+PE i było ono istotnie wyższe w porównaniu z grupą IUGR. Ponadto, ciężarne z obu tych grup wykazywały dwu- a nawet trzykrotnie wyższe stężenia sICAM w porównaniu z grupą KONTROLA. Podczas prawidłowo przebiegającej ciąży zmniejszenie ekspresji molekuł adhezyjnych śródbłónka naczyniowego minimalizuje adhezję leukocytów do śródbłónka, a tym samym zapewnia

drożność i utrzymanie przepływu krwi w tętnicach spiralnych. Natomiast, w IUGR oraz IUGR+PE, poziomy sICAM-1 i sVCAM-1 w osoczu są zwiększone, co może ułatwiać adhezję leukocytów i zmniejszać przepływ krwi w tętnicach spiralnych, co postulują niektórzy badacze (13,91). Ponadto prowadzone w Katedrze badania ujawniły, że stężenie sVCAM-1 może narastać w miarę nasilania stopnia zaawansowania IUGR. Do tej pory (15) dowiódł, że sVCAM-1 może być przydatny w przewidywaniu ciężkości PE. W ramach rozprawy nie oceniano zaawansowania PE, ale badania nasze i Kim dowodzą, że sVCAM-1 może być użyteczny w kontekście oceny zaawansowania patologii związanych z IUGR oraz IUGR+PE.

W obecnym badaniu stężenia sICAM-1 i sVCAM-1 narastały pod wpływem zapalenia. Pośrednio można to stwierdzić w oparciu o wyniki korelacji, gdzie stężenie obu cząsteczek wykazywały zależność o charakterze umiarkowanej dodatniej korelacji ze stężeniem hsCRP. Dodatkowo zaobserwowano zależność o charakterze silnej dodatniej korelacji pomiędzy stężeniami sICAM-1 i sVCAM-1, co jest zgodne z wiedzą na temat tych cząsteczek. Ponadto, ujawniono, istnienie zależności o charakterze umiarkowanych dodatnich korelacji pomiędzy stężeniami sICAM-1, sVCAM-1 a eozynofilami. Z pozostałymi rodzajami krwinek białych takich zależności nie wykryto. Mtali w swoich badaniach ujawnił istnienie odwrotnej zależności pomiędzy stężeniem IL-6 a eozynofilami w grupie ciężarnych z nadciśnieniem (92). W obecnych badaniach tendencja wydaje się być odwrotna, skoro jednocześnie zauważono, że stężenia sVCAM-1 i sICAM-1 narastały wraz ze wzrostem hsCRP, oznacza to, że czynnik zapalny najprawdopodobniej nasilał powstawanie form rozpuszczalnych cząsteczek adhezyjnych. Jest to zgodne z tym co powszechnie wiadomo na temat tworzenia form rozpuszczalnych cząsteczek adhezyjnych, które powstają na skutek zadziałania czynnika uszkodzającego na zakotwiczone w błonie komórkowej cząsteczki, to z kolei powoduje proteolizę i oderwanie się fragmentów do krwioobiegu, co jest równoznaczne z powstaniem form rozpuszczalnych. Czynnikiem uszkodzającym mógłby być proces zapalny. Skoro uwalnianie do krwioobiegu cząsteczek adhezyjnych było nasilone przez zapalenie, to zależność eozynofile i cząsteczki adhezyjne musiała być w pewnym sensie też zależna od procesu zapalnego, skoro wykryliśmy dodatnią zależność pomiędzy ICAM-1, VCAM-1 a liczbą eozynofilów. W tej sytuacji należałoby się spodziewać zależności wprost proporcjonalnej pomiędzy IL-6, wielofunkcyjną prozapalną cytokiną (nieoznaczana w obecnym badaniu), a eozynofilami.

Wydaje się zatem, że nadciśnienie u ciężarnych pomimo pewnych cech wspólnych z IUGR i PE, ma inne podłoże.

Wysoka ekspresja VCAM-1 jest odpowiedzialna za aktywację płytek krwi i leukocytów co w efekcie prowadzi do przyłączenia dużej liczby leukocytów do komórek śródbłónki, powodując w ten sposób jego uszkodzenie. Podczas interakcji leukocyt-śródbłonek limfocyty przyłączają się głównie do ICAM-1 i VCAM-1, podczas gdy neutrofile wiążą się z ICAM-1. Interakcja leukocyt - płytka - śródbłonek odgrywa kluczową rolę w homeostazie i mechanizmach obronnych. W PE dochodzi do zaburzonej przebudowy tętnic spiralnych macicy co w efekcie prowadzi do nieprawidłowej inwazji trofoblastów. Skutkiem tego jest indukowane niedotlenienie niedokrwienne w łożysku. Jednym z czynników powodujących taki stan rzeczy mogą być cząsteczki adhezyjne (sVCAM-1). Odgrywają one niezwykle istotną rolę we wczesnym rozwoju łożyska i inwazji trofoblastów w ścianę macicy. Podczas procesu inwazji naczyniowej poprzez ekspresję zestawu cząsteczek adhezyjnych cytotrofoblasty stymulując śródbłonek przyjmują fenotyp naczyniowy. Nieprawidłowa ekspresja cząsteczek adhezyjnych może skutkować nieprawidłowym zagnieżdżeniem i ograniczoną inwazją wewnątrznaczyniową (93). W związku z tym zwiększona ekspresja cząsteczek adhezyjnych prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania naczyń krwionośnych, które przez szereg patologicznych mechanizmów indukują pojawienie się klinicznych wykładników PE takich jak nadciśnienie, białkomocz, obrzęk i inne (83,94). Pojawiają się hipotezy, że podobny mechanizm przyczynia się do rozwoju IUGR. Powiązane jest to z nieprawidłową inwazją trofoblastu powodującą niewydolność łożyska (72,82).

Ponadto zwiększona ekspresja sVCAM-1 spowodowana zaburzonym ukrwieniem łożyska nasila procesy prowadzące do zwyrodnienia a następnie martwicy i złuszczenia komórek śródbłónki co pogłębia niedotlenienie spowodowane niedokrwieniem łożyska. Niska perfuzja w łożysku jest również odpowiedzialna za nieprawidłowy rozwój łożyska i może prowadzić do rozwoju wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu. Liczne prace potwierdzają, że oznaczanie stężeń cząstek adhezyjnych (VCAM-1) może pomóc wyjaśnić patomechanizm PE i IUGR. Dodatkowo brak wzrostu stężenia wspomnianych cząsteczek adhezyjnych w nadciśnieniu indukowanym ciążą sprawia, że sICAM, sVCAM mogą zostać użyte jako potencjalne marker rozwoju PE (15,72,83,95,96).

Ponadto badacze ci wykazali, że rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne takie jak sVCAM-1, sICAM-1 wykrywane są w wyższych stężeniach w osoczu wszystkich kobiet ciężarnych, zarówno zdrowych jak i tych chorych. Sugeruje to, że być może wzrost stężenia cząsteczek adhezyjnych w przebiegu ciąży można potraktować jako stan fizjologiczny. Należy podkreślić, że uważa się, że obecność w krążeniu złuszczonych z powierzchni endotelium wspomnianych cząsteczek adhezyjnych może być z jednej strony dowodem na aktywację śródbłonna i współistnienie stanu zapalnego, a z drugiej może być to następstwo uszkodzenia komórek endotelium. Jeśli tak, to wydaje się bardziej prawdopodobne wyjaśnienie, iż wzrost stężenia cząsteczek adhezyjnych w przebiegu ciężarów powikłanych PE lub IUGR+PE jest efektem aktywacji i lokalnego stanu zapalnego, niż uszkodzenia komórek śródbłonna. Trudno byłoby bowiem założyć, skoro ciąża to stan fizjologiczny, że dochodzi w jej przebiegu do patologii, jaką jest uszkodzenie śródbłonna. Raczej w tej sytuacji wydaje się bardziej prawdopodobne, że u zdrowych ciężarnych może dochodzić do kontrolowanej aktywacji śródbłonna i być może lokalnego stanu zapalnego, rozumianego jako pewna odpowiedź ze strony organizmu kobiety. W naszych badaniach, na podstawie analizy stężenia hsCRP w surowicy ciężarnych, widać wyraźnie, że kobiety w ciąży powikłanej PE lub IUGR+PE charakteryzują się wyższymi średnimi stężeniami tego markera stanu zapalnego w porównaniu z ciężarnymi zdrowymi, co także zdaje się potwierdzać znaczenie dysfunkcji śródbłonna, zarówno o charakterze aktywacji, jak i uszkodzenia w następstwie m.in. stanu zapalnego w badanej patologii. Ponadto w obecnym badaniu zauważono zależność, choć jedynie o charakterze słabej dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem sVCAM-1 a BMI ciężarnych sprzed ciąży. Może to świadczyć o udziale zaburzeń metabolicznych w patologii śródbłonna, co jest powszechnie akceptowanym związkiem przyczynowo - skutkowym.

hsCRP

A teraz przyjrzymy się zapaleniu w IUGR i IUGR+PE. W badaniach prowadzonych w ramach tej rozprawy oznaczono metodą wysoce czułą stężenie CRP. Jest to białko ostrej fazy produkowane głównie w hepatocytach w odpowiedzi na stan zapalny, uszkodzenie tkanek czy też infekcję. Jego prawidłowe lub nieznacznie podwyższone poziomy można zaobserwować w stanach takich jak depresja, otyłość, łagodne zapalenia dziąseł, u palaczy tytoniu a także podczas prawidłowo przebiegającej ciąży. W przypadku ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, chorób nowotworowych czy zawału dochodzi do umiarkowanego wzrostu, a infekcje, w tym ostre infekcje bakteryjne mogą spowodować bardzo

podwyższenie wartości CRP (97). Powoduje to, że użycie samego hsCRP jako potencjalnego markera jest kontrowersyjne, i konieczne jest wykluczenie wszystkich czynników mogących mieć wpływ na jego wzrost przed dalszą oceną zależności między jego stężeniem a obecnością IUGR czy PE. Wzrost stężenia CRP najczęściej obserwuje się w ciążach związanych ze stanem zapalnym czy powikłanych przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (98). Jednakże większość badaczy podczas prawidłowo przebiegającej ciąży obserwuje statystycznie istotne zwiększenie stężenia CRP w odniesieniu do grupy kobiet nie będących w ciąży (96,99). W chwili obecnej pojawia się coraz więcej dowodów świadczących o tym, że PE jak i IUGR są chorobami, w których jednym z czynników etiologicznych jest stan zapalny (100,101). W swoim badaniu Farzadnia i wsp. wykazali, że poziomy hsCRP są znacząco wyższe u kobiet z łagodnym i ciężkim PE, w odniesieniu do grupy ciężarnych z prawidłowym ciśnieniem w podobnym wieku ciążowym, a stężenia hsCRP osiągały najwyższe wartości w przypadku ciężkiego PE. Hwang i wsp. zbadali zależność stężenia hsCRP od wieku ciążowego. Mimo braku różnic istotnych statystycznie widoczny był stopniowy wzrost stężenia w miarę trwania ciąży. Ponadto Hwang i wsp. wykazali istotne statystycznie różnice w stężeniu hsCRP między grupą kobiet zdrowych między 30 a 39 tygodniem ciąży a grupą kobiet z ciężkim PE. Sugeruje to możliwość wykorzystania hsCRP jako markera nasilenia choroby w ciężkiej postaci PE (102).

Zaznaczyć należy, że nie wszystkie publikacje są jednomyślne w kwestii wzrostu stężenia hsCRP w przebiegu PE i IUGR. W swojej pracy Kara i wsp. nie zaobserwowali żadnych różnic istotnych statystycznie w odniesieniu do grupy kontrolnej zarówno w przypadku PE jak i IUGR (101), podobnie jak Stefanović i wsp. który również w przypadku PE nie zaobserwował wzrostu hsCRP (103). Wyjaśnieniem tego może być fakt, że ciąża sama w sobie jest postrzegana jako proces zapalny, a wahania poszczególnych markerów stanu zapalnego mogą być maskowane przez samą ciążę. W patogenezie PE i IUGR istotne znaczenie może odgrywać nie ogólnoustrojowe a lokalne subkliniczne zapalenie, którego wykrycie może być diagnostycznie utrudnione (101).

Auer i wsp. w swojej pracy podjęli się analizy białek i ich modyfikacji w przebiegu PE i IUGR w celu poszukiwania nowych potencjalnych markerów tych schorzeń. W uzyskanych wynikach zaobserwowano znaczący wzrost CRP w PE i nieznaczny w IUGR. W przypadku PE wraz z IUGR wyniki badań wykazały obniżenie stężenia CRP, a także innych białek, a stężenie CRP było nawet nieznacznie niższe niż w grupie kontrolnej. Na tej podstawie Auer i wsp. wysnuli hipotezę, że IUGR może powodować

zmniejszenie stężenia CRP w celu ochrony organizmu matki przed niekorzystnym wpływem reakcji ostrej fazy podczas PE (104).

W badaniach Tjoa i wsp. wykazali podwyższone stężenia hsCRP między 10 a 14 tygodniem ciąży w grupach kobiet, u których rozwinął się PE. Podwyższone wyniki zaobserwowano również w grupie ciążarnych, które urodziły dziecko z cechami IUGR. Grupy zostały indywidualnie dopasowane w celu wyeliminowania wpływu czynników takich jak wiek kobiety, czy termin porodu. Jest to potwierdzeniem faktu, że wspólnym czynnikiem etiologicznym PE jak i IUGR jest dysfunkcja łożyska zaczynająca się od dysfunkcji trofoblastu. W obu zaburzeniach ciąży modyfikacja tętnic spiralnych matki jest poważnie ograniczona. Ponadto wspólnym elementem łączącym te zaburzenia może być apoptoza. Biorąc pod uwagę związek CRP z apoptozą oraz związek apoptozy z PE, podwyższone stężenia hsCRP zarówno w IUGR jak i PE mogą odzwierciedlać lokalne zmiany funkcji łożyska związane z apoptozą, a niekoniecznie z ogólnoustrojowym stanem zapalnym (105). Łožyska zarówno w PE, jak i IUGR, charakteryzują się wysokim wskaźnikiem apoptozy (106,107). W związku z tym faktem wysoki wskaźnik apoptotyczny w łożysku PE i IUGR może prowadzić do zwiększonego uwalniania CRP, ponieważ uważa się, że CRP działa jako „zmiatacz” chromatyny uwalnianej z komórek apoptotycznych

i może stymulować usuwanie komórek apoptotycznych poprzez promowanie fagocytozy. Dzięki temu oznaczanie stężenia hsCRP pomiędzy 10 a 14 tygodniem ciąży mogłoby dostarczyć informacji o pierwszych oznakach uszkodzenia łożyska, jednakże ze względu na subtelne zmiany, samo hsCRP może być niewystarczające do samodzielnej oceny ryzyka (105).

W niniejszej pracy, wykazano różnicę w zakresie hsCRP pomiędzy ciążarnymi z grupy KONTROLA, a ciążarnymi z grup IUGR i IUGR+PE. Ciężarne z grup IUGR i IUGR+PE charakteryzowały się dwu-, a nawet trzykrotnie wyższymi stężeniami hsCRP w surowicy w porównaniu z ciążarnymi bez stwierdzonej patologii. Z kolei nie zaobserwowano różnic w tym zakresie pomiędzy grupami IUGR i IUGR+PE, choć ciężarne z IUGR wykazywały tendencje do wyższych średnich wartości w porównaniu z grupą IUGR+PE. Można więc stwierdzić, że hsCRP w obecnym badaniu mógłby być wykorzystany do przewidywania wystąpienia IUGR i IUGR+PE rozumianych jako patologii o podłożu zapalnym, o charakterze lokalnym. Nie stwierdzono bowiem istotnego wzrostu liczby leukocytów w morfologii krwi w żadnej z badanych grup. Wyniki naszych

badan raczej są bliższe potwierdzenia teorii Tjoa i wsp. (105), że wyższe stężenia hsCRP mogą odzwierciedlać lokalne zmiany funkcji łożyska związane z apoptozą i ewentualnie z lokalnym procesem zapalnym, a nie z uogólnionym zapaleniem.

Trombomodulina (TM)

Kolejną cząsteczką ocenianą w rozprawie była trombomodulina, podobnie jak VCAM-1 i ICAM-1 jest ona obecna na śródbłonku tętnic, żył i naczyń włosowatych matki i płodu, a także w łożysku oraz scyntiotrofoblastach, a jej stężenia mogą być oceniane w surowicy. TM ma właściwości antykoagulacyjne, ale także bezpośrednio wpływa na proliferację komórek, angiogenezę, adhezję komórek oraz stan zapalny. TM odgrywa istotną rolę w utrzymaniu drożności wewnątrznaczyniowej ze względu na jej właściwości przeciwwązrowe, przeciwapalne i cytoprotekcyjne. Jednak w stanach patologicznych, takich jak posocznica i ogólnoustrojowe zapalenie, ekspresja TM w śródbłonku jest obniżona, a jej funkcja upośledzona (108).

Z kolei stężenia TM w ciąży normotensyjnej pozostawały niezmienione w stosunku do wartości prawidłowych (109,110).

W badaniach dotyczących PE zaobserwowano podwyższone stężenie sTM w surowicy matki. Łožysko jest możliwym źródłem sTM, co może skutkować zmniejszeniem dostępnej TM na syncytiotrofoblastach (16,111). W konsekwencji może to przyczyniać się do zaburzenia równowagi angiogennej, czyli procesu tworzenia nowych naczyń, co jest kluczowe dla prawidłowego rozwoju płodu. Wskazuje się, że TM jest uwalniana do osocza po uszkodzeniu komórek śródbłonka, i jej zwiększone poziomy w surowicy powinny być interpretowane jako informacja raczej o uszkodzeniu, a nie jedynie aktywacji śródbłonka. Potwierdzają to wyniki badań uzyskane przez Hayashi i wsp. gdzie zaobserwowane zostały podwyższone stężenia TM zarówno w osoczu jak i próbkach moczu, a stężenia były tym wyższe im cięższy był przebieg stanu przedrzucawkowego (112). Również badania Prochazka i wsp. potwierdzają ścisłą zależność pomiędzy nasileniem choroby a stężeniem TM (35).

Z drugiej strony pamiętać należy o fakcie, że stan zapalny i stres oksydacyjny przebiegające w obrębie śródbłonka także mogą przyczyniać się do uwolnienia TM do krążenia co jednocześnie powoduje spadek jej ekspresji na powierzchni śródbłonka

(16,113). Uważa się, że stężenie sTM można wykorzystywać do monitorowania stanów zapalnych (16), co zostało szerzej przedstawione we wprowadzeniu niniejszej rozprawy.

Trzeba też dodać, że wiadomo, iż VEGF stymuluje ekspresję trombomoduliny. Czyli mogłoby to oznaczać, że wyjaśnienie tego zagadnienia jest o wiele bardziej skomplikowane. Skoro stężenie sTM jest wysokie i prowadzi do zmniejszenia ekspresji TM na powierzchni komórek endotelium, to dlaczego VEGF nie zwiększa ekspresji TM na powierzchni śródbłónka? Jedną z odpowiedzi znajdujemy w naszej publikacji (71) a mianowicie tam stężenia VEGF w surowicy krwi grup IUGR i IUGR +PE były kilka razy niższe niż w grupie ciężarnych bez patologii. Wiadomo, że VEGF warunkuje niepowikłany przebieg ciąży i prawidłowe wzrastanie płodu, poprzez wpływ na angiogenezę, napięcie mięśni macicy w ciąży, czy prawidłowy rozwój tzw. jednostki maciczno-łożyskowej (114). Sugerowałoby to złożony mechanizm, wpływ łożyskowy i śródbłonkowy.

W obecnym badaniu stężenie sTM było najwyższe w grupie IUGR+PE i zdecydowanie wyższe w grupach IUGR i IUGR+PE w porównaniu z grupą KONTROLA. Istniały też istotne różnice pomiędzy IUGR i IUGR+PE. Oznacza to, że stężenie sTM mogłoby posłużyć jako biomarker dla patologii IUGR i IUGR+PE, jednocześnie może ułatwić różnicowanie pomiędzy IUGR i IUGR+PE. Analiza korelacji wykazała słabą dodatnią zależność z sICAM, co zgadza się z koncepcją powstawania obu cząsteczek pod wpływem podobnego czynnika.

Czynnik von Willebranda (vWF)

Kolejną analizowaną cząsteczką, istotną z punktu widzenia układu krzepnięcia i roli śródbłonka był vWF, pełniący funkcję hemostatyczną, poprzez wiązanie się z czynnikiem VIII i stabilizowanie go w krążeniu. Bierze on udział także w adhezji i agregacji płytek krwi. vWF znajduje się również w różnych komórkach i strefach łożyska, w tym w syncytiotrofoblastach i śródbłonku (115). Podobnie jak sICAM-1 i sVCAM-1, czynnik vWF w ostatnich latach jest uważany przez wielu badaczy za biomarker aktywacji lub uszkodzenia komórek śródbłonka, związany z niedotlenieniem łożyska, co w swoim badaniu potwierdził m.in. Bosco i wsp. oraz Prochazka i wsp. (35,115). Badacze ci wykazali wzrost ekspresji vWF w łożysku. Niedotlenione łożysko powoduje wzrost śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), który sprawia, że syncytiotrofoblast może być porównywany wówczas do śródbłonka, lub zachowywać się tak jak śródbłonek i w warunkach niedotlenienia uwalniać vWF w wyniku stymulacji przez VEGF (115). Co ciekawe, w badaniach, które zostały opublikowane, ale nie są częścią rozprawy (71) zaobserwowano, zdecydowanie niższe stężenia w IUGR oraz IUGR+PE w porównaniu z kontrolą.

Z kolei Çelik i wsp. jako jeden z pierwszych zespołów zbadał ekspresję vWF u pacjentek z IUGR (36). Pomimo braku istotności statystycznej zaobserwowana została zwiększona ekspresja vWF w IUGR w porównaniu z normalnymi ciążami, co wyjaśniano wspomnianą już stymulacją wydzielania vWF przez VEGF w wyniku niedostatecznego ukrwienia łożyska.

W badaniu, które stało się podstawą niniejszej rozprawy, najwyższe stężenie vWF stwierdzono w grupie IUGR, a najniższe wśród ciężarnych z grupy KONTROLA. Grupy IUGR oraz IUGR+PE charakteryzowały się zdecydowanie wyższymi stężeniami vWF w porównaniu z grupą KONTROLA. Natomiast nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupami IUGR+PE i IUGR, jednak ciężarne z grupy IUGR wykazywały tendencje do nieco wyższych wartości vWF w surowicy krwi w odniesieniu do IUGR+PE.

Dodatkowo zaobserwowano istnienie zależności o charakterze słabych dodatnich korelacji pomiędzy vWF a sTM; vWF a PAI-1 (oba czynniki prozakrzepowe); umiarkowanej dodatniej korelacji pomiędzy vWF a TFPI; i silnej dodatniej korelacji pomiędzy vWF a tPa. Ta ostatnia silna korelacja pomiędzy vWF i tPA ukazuje

„determinację” organizmu do utrzymania równowagi w zakresie hemostazy, gdzie wraz z nasileniem stężenia prozakrzepowego vWF wzrasta stężenie fibrynolitycznego tPa. Podobnie można interpretować obserwowaną w badaniu zależność pomiędzy vWF a sTM oraz vWF a przeciwzakrzepowym TFPI.

tPA i PAI

Poza wspomnianą tendencją do nadkrzepliwości, w czasie ciąży zachodzą również zmiany w układzie fibrynolitycznym. Prawidłowa ciąża wiąże się ze wzrostem poziomu w osoczu aktywatorów plazminogenu: tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PA), a także inhibitorów aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI -1) i typu 2 (PAI-2) (116).

tPA jest wytwarzany przez komórki śródbłónka, wydzielany lokalnie w odpowiedzi na uszkodzenie śródbłónka, a w obecności fibryny jest silnym aktywatorem plazminogenu biorącego udział w degradacji fibryny (117). W trakcie ciąży dochodzi do wzrostu stężenia tPA w trzecim trymestrze, a podwyższone stężenia mogą się utrzymywać do 8 tygodni po porodzie (76,118). Wzrost stężenia PAI-1 powoduje iż przewyższa on stężenie t-PA, a w czasie ciąży utrzymuje się tendencja do stanu prokoagulacji. Dodatkowym wyjaśnieniem nadkrzepliwości może być inaktywacja tPA przez PAI-1 przez tworzenie kompleksów tPA-PAI-1 (37,118). Jest to naturalny mechanizm mający na celu zabezpieczenie organizmu kobiety podczas ciąży, a przede wszystkim porodu, który związany jest ze wzrostem ryzyka nadmiernego krwawienia.

W obecnym badaniu wykazano istotnie wyższe stężenia tPA w grupie IUGR+PE w porównaniu z wynikami KONTROLI. Pomimo różnic w zakresie pojedynczych pacjentek z grupy IUGR, których stężenia tPA wydawały się wyższe niż u większości pacjentek z grupy IUGR+PE, to jednak analiza statystyczna nie wykazała aby grupy IUGR i IUGR+PE różniły się istotnie statystycznie pomiędzy sobą w zakresie średnich surowiczych stężeń tPA. Stąd wydaje się, że tPA nie może służyć do różnicowania tych dwóch zaburzeń.

Obserwowane przez nas zmiany stężeń tPA są zgodne z innymi wynikami prac. Belo i wsp., zauważyli wzrost tPA w PE w stosunku do stężeń obserwowanych podczas prawidłowo przebiegającej ciąży (37). Podobnie Catarino i wsp. wykazali zwiększone poziomy tPA w grupie ciężarnych powikłanych PE, a także dodatnią korelację z białkomoczem będącym znanym markerem nasilenia PE. We wspomnianym badaniu

stwierdzone zostały również podwyższone poziomy PAI-1, o którym mowa w dalszej części dyskusji (119). Także badania Gilaberta i wsp. potwierdzają istnienie wzrostu tPA podczas ciąży powikłanej zarówno IUGR jak i PE, jednak podobnie jak w innych publikacjach poziomy PAI-1 przewyższał tPA, co przemawia za obniżeniem fibrynolizy i stanem nadkrzepliwości, które mogą prowadzić do rozwoju badanych schorzeń (120).

Ponadto w naszych badaniach zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy tPA a vWF, co zostało omówione wcześniej.

Stan hipofibrynolityczny obserwowany podczas prawidłowo przebiegającej ciąży związany jest ze wzrostem inhibitorów fibrynolitycznych takich jak m.in.: PAI-1 i PAI-2. PAI-1 jest głównym inhibitorem tPA w osoczu podczas ciąży. Co ciekawe, w naszych badaniach, nie zauważyliśmy istotnych zależności pomiędzy tymi dwoma białkami. Czyni to badania w tym zakresie jeszcze bardziej skomplikowanymi.

PAI-1 jest wytwarzany nie tylko przez komórki śródbłónka, ale także aktywowane płytki krwi, naczynia krwionośne i trofoblasty (37). Jego podwyższony poziom może być spowodowany hiperprodukcją PAI-1 w różnych miejscach ustroju, w tym trzewnych adipocytach i hepatocytach (39,121). PAI-1 wzrasta w różnych zaburzeniach charakteryzujących się nadciśnieniem i uszkodzeniem nerek. Zwiększone stężenie PAI-1 sprzyja uwalnianiu czynników wzrostu pochodzących z płytek krwi, o których wiadomo, że odgrywają ważną rolę w uszkodzeniu naczyń (37). PAI-1 może być wykorzystywany jako pośredni marker funkcji śródbłónka i może również odzwierciedlać aktywację płytek krwi i uszkodzenie nerek (39). Cytotrofoblasty izolowane z łożyska z ciąż powikłanych IUGR wraz z PE wykazywały wyższy poziom PAI-1 i obniżone poziomy t-PA w porównaniu z trofoblastami z normalnej ciąży.

Wiadomo, że podczas prawidłowo przebiegającej ciąży poziom PAI-1 w osoczu stopniowo wzrasta w drugim trymestrze ciąży i osiąga maksimum w 32–40 tygodniu ciąży. W ciągu 5–8 tygodni po porodzie poziom PAI-1 ponownie spadają do poziomów sprzed zajścia w ciążę. Maksymalne stężenie PAI-1 w ostatnim trymestrze ciąży jest około 3–5 razy wyższe niż u kobiet niebędących w ciąży (122). Ponadto w ciąży PAI-1 jest także wydzielany przez syncytiotrofoblast, gdzie jego podwyższone poziomy mRNA zostały histologicznie określone w łożysku z PE i IUGR (40).

Inwazja trofoblastów na granicy matka-płód jest kluczowym procesem podczas implantacji zarodka, a podczas tego procesu cytotrofoblasty nabywają właściwości inwazyjnych dzięki czemu możliwe jest przemodelowanie tkanek macicznych i tętnic

spiralnych macicy. Proces ten jest dokładnie kontrolowany przez wiele czynników produkowanych przez komórki matki i trofoblasty. PAI-1 jest głównym czynnikiem przeciwinwazyjnym zapobiegając inwazji trofoblastów poprzez hamowanie degradacji macierzy pozakomórkowej, co prowadzi do gromadzenia się fibryny po stronie matki. PAI-1 może również odgrywać rolę w przebudowie tętnic spiralnych macicy matki (123).

Mimo tego iż mechanizmy odpowiedzialne za patogenezę PE są słabo poznane badacze są zgodni, że jednymi z istotnych czynników mogą być hipoinwazja i nieudaną konwersja macicznych tętnic endometrium macicy w łożysku, z których oba są związane z PAI-1 i PAI-2 (124).

Poziomy PAI-1 u matki w osoczu są wyższe u pacjentów z PE w drugim trymestrze ciąży co w swoich badaniach zaobserwowali Bodova i wsp. (39), a jego poziomy mRNA są dodatnio skorelowane z nasileniem PE podczas 35–41 tygodni ciąży (125). W swoim badaniu Hunt i wsp. również zaobserwowali podwyższone stężenia PAI-1, t-PA a także sICAM-1 (111).

Stosunek PAI-1 do PAI-2 był zwiększony u kobiet z wczesnym stanem przedrzucawkowym (24–32 tygodnie ciążowe) w porównaniu z grupą kontrolną, ale nie z późnym PE (35–42 tygodnie ciążowe). Estelles i wsp. odkryli, że zarówno antygenowe, jak i funkcjonalne poziomy PAI-1 są zwiększone, podczas gdy antygenowe i funkcjonalne poziomy PAI-2 są zmniejszone w trzecim trymestrze (≥ 28 tygodni) w porównaniu ze zdrowymi kontrolami (126). PAI-1 został uznany za potencjalnie przydatny predyktor PE we wczesnym etapie rozwoju zaburzenia.

Z drugiej strony należy pamiętać, że nie wszystkie badania dotyczące PAI-1 wskazują na ich wzrost w ciążach patologicznych, na przykład obserwowano zmniejszone (127) lub niezmiennione stężenia PAI-1 (128). Z kolei badania Wikstrom i wsp. oraz Udenze i wsp. wskazywały, że podwyższone stężenia PAI-1 są obecne jedynie we wczesnym stanie przedrzucawkowym. W późnym stanie przedrzucawkowym w stosunku do późnej kontroli nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian (129), a nawet obserwowano zmniejszenie się stężeń PAI-1 w drugim trymestrze ciąży (130).

W badaniach, które są podstawą tej rozprawy stężenie PAI-1 w surowicy krwi było najwyższe w surowicy ciężarnych z grupy IUGR+PE, a najniższe wśród ciężarnych z grupy KONTROLA. Ponadto różnice pomiędzy ciężarnymi IUGR i IUGR+PE były statystycznie istotne, ciężarne z grupy IUGR+PE wykazywały się wyższymi stężeniami PAI w porównaniu z ciężarnymi z grupy IUGR. Czyli PAI-1 możnaby wykorzystać do różnicowania tych dwóch patologii. Dodatkowo stwierdzono zależności, o charakterze

słabych dodatnich korelacji pomiędzy PAI-1 i hsCRP, PAI-1 i sTM; oraz umiarkowanych dodatnich korelacji pomiędzy PAI-1 i sVCAM-1 oraz PAI-1 i sICAM-1.

Może to stanowić potwierdzenie hipotezy o wzroście PAI-1 w wyniku aktywacji śródbłónka, ale też w następstwie uszkodzenia komórek endotelialnych.

Inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI)

Ostatnim badanym markerem był inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI), który odgrywa kluczową rolę w hemostazie poprzez regulację kaskady krzepnięcia inicjowanej przez czynnik tkankowy (TF). W związku z faktem, że jest obecny w komórkach śródbłónka oraz trofoblastach, TFPI ma szczególne znaczenie w przypadku uszkodzeń na poziomie łożyska i w przypadku zaburzonej równowagi TF/TFPI brać udział w ciężowych powikłaniach naczyniowych w wyniku powstawania fibryny i trombiny (131). Implantacja i oddzielenie się łożyska od ściany macicy stanowi poważne wyzwanie dla układu hemostazy. Jest to wyjaśnieniem wysokiego poziomu TF w nabłonku macicy (132). TF jest niezbędny do prawidłowej embriogenezy, angiogenezy, implantacji i zachowania hemostazy (133). Ponadto sugeruje się, że odgrywa kluczową rolę w pierwszym trymestrze aby zapobiec krwotokowi podczas wewnątrzmacicznej inwazji trofoblastu (134).

W dostępnych pracach oceniane były stężenia lub aktywność zarówno TF jak i TFPI. Jednoczesna ocena TF i TFPI pozwala ocenić czy zachowana jest równowaga hemostatyczna. W przypadku zaburzeń związanych ze stanem nadkrzepliwości takich jak PE lub IUGR spodziewać się można wzrostu TF. Badania Godoi i wsp. nie potwierdzają tej hipotezy, gdyż zaobserwowano niezmienną poziomą stężenie TF. Ponadto w przypadku TFPI zauważono jego wzrost w PE. Jak sugerują autorzy może wynikać to z faktu, że ocena TF w osoczu nie odzwierciedla całego dostępnego TF u kobiet w ciąży. Niestety przeprowadzone do tej pory badania nie udzielają jednoznacznej odpowiedzi na temat udziału TF i TFPI oraz znaczenia TF/TFPI w patogenezie PE i IUGR. Obserwowane były podwyższone wartości TF (27,42,127,135), lub też niezmienną (136,137). W przypadku TFPI wykazano stężenia zarówno podwyższone (42), obniżone (138), a także niezmienną w patologii IUGR i PE (139).

W niniejszej pracy zbadane zostało stężenie TFPI-1, a uzyskane wyniki nie wykazały istnienia różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Brak

różnic w tym zakresie może wynikać z faktu, że osoczowy TFPI stanowi tylko niewielką część endogennej puli TFPI i może nie odzwierciedlać jego potencjału funkcjonalnego. Uzyskane wyniki a także doniesienia literaturowe nasuwają spostrzeżenie, że całkowite poziomy TFPI oznaczane w osoczu nie są dobrym markerem PE w ciąży.

Dodatkowo w naszych badaniach zaobserwowano zależność o charakterze dodatniej umiarkowanej korelacji pomiędzy TFPI i vWF, co zostało wcześniej omówione.

W oparciu o literaturę tematu i uzyskane wyniki stężeń wybranych parametrów w obecnym badaniu oraz w poprzednim badaniu (71) trudno jednoznacznie wskazać, że na pewno w IUGR i IUGR+PE dochodzi do zapalenia, albo tylko do uszkodzenia śródbłonna, wydaje się, że sprawa jest wieloaspektowa. Udział w odpowiedzi mają tu także łożysko i angiogeneza. Na pewno obserwuje się kaskadę zmian w układzie krzepnięcia i usilne próby organizmu aby nie dochodziło do zaburzeń zarówno w IUGR, jak i w IUGR+PE.

6 WNIOSKI

1. W ciążach powikłanych wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu jak i wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu powikłanym stanem przedrzucawkowym dochodzi do dysfunkcji śródbłónka, o charakterze zarówno aktywacji jak i uszkodzenia.
2. Wzrost stężenia hsCRP oraz korelacja z sICAM-1 i sVCAM-1 wskazuje na udział stanu zapalnego w promowaniu dysfunkcji śródbłónka w wewnątrzmacicznym ograniczeniu wzrastania płodu jak i wewnątrzmacicznym ograniczeniu wzrastania płodu powikłanym stanem przedrzucawkowym.
3. Zmiany stężeń cząsteczek sVCAM-1, sICAM-1, sTM, PAI-1, vWF mogą być przydatne w różnicowaniu ciężarnych z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu oraz wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu powikłanym stanem przedrzucawkowym z ciężarnymi, u których nie stwierdza się tych patologii.
4. Stężenia sVCAM-1, sICAM-1 oraz PAI-1 w surowicy krwi ciężarnych pozwalają na różnicowanie pomiędzy grupami z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu a wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu powikłanym stanem przedrzucawkowym.

7 STRESZCZENIE

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR) definiowane jest jako wzrastanie poniżej genetycznie oczekiwanego potencjału i dotyczy płodów, które nie osiągają potencjalnego optymalnego wzrostu i wielkości oraz charakteryzują się dynamiką wzrastania, która nie odpowiada wiekowi ciążowemu. Dotyka ok. 2-15% populacji w krajach wysoko rozwiniętych. Stan przedrzucawkowy (PE) to zespół objawów chorobowych charakteryzujący się podwyższonym ciśnieniem tętniczym (powyżej 140/90 mmHg), któremu towarzyszy białkomocz. Stan ten pojawia się po 20 tygodniu ciąży, w okresie porodu lub połogu, najczęściej po 37 tygodniu ciąży. Dotyka ok 3-10% populacji krajów wysoko rozwiniętych. W chwili obecnej nie są znane bezpośrednie przyczyny tych zaburzeń, proponowany jest wieloczynnikowy model ich rozwoju. Obejmuje on dysfunkcję śródbłónka, nieprawidłową inwazję trofoblastu, wystąpienie stresu oksydacyjnego, wpływ nadciśnienia tętniczego ale też czynniki takie jak nikotynizm, otyłość, predyspozycje genetyczne.

Śródbłonek naczyniowy jest narządem wydzielania wewnętrznego biorącym udział w wielu procesach biologicznych takich jak: hemostaza, zapalenie czy angiogeneza. Syntetyzuje on substancje, które kontrolują napięcie naczyniowe, adhezję i agregację płytek krwi, rozrost komórek mięśni gładkich i tkanki łącznej oraz procesy adhezji leukocytów. Bierze też aktywny udział w zachowaniu równowagi pomiędzy krzepnięciem a fibrylizacją przez produkcję czynników pro- i przeciwzakrzepowych. Ponadto bierze udział w procesie implantacji zarodka w ścianę macicy, a dysfunkcja śródbłónka w postaci jego aktywacji czy uszkodzenia może być jednym z istotniejszych mechanizmów prowadzącym do rozwoju IUGR oraz PE.

W niniejszej pracy ocenione zostały parametry pro- i przeciwzakrzepowe takie jak: sTM, tPA, TFPI, PAI-1, vWF, cząsteczki adhezyjne sICAM-1, sVCAM-1, które uznawane są za markery dysfunkcji (aktywacji, uszkodzenia) śródbłónka. Ponadto ocenie zostało poddane hsCRP jako bardzo czuły marker stanu zapalnego, a także parametry morfologii krwi obwodowej, oraz wybrane parametry koagulologiczne. Oceniono próbki pobrane od 74 ciężarnych, które podzielono na trzy grupy, tj. grupę kontrolną, IUGR oraz IUGR powikłany PE.

Celem pracy były: (1) ocena czy w ciążach powikłanych IUGR lub IUGR+PE dochodzi do dysfunkcji śródbłónka; (2) ocena czy w IUGR oraz IUGR+PE dochodzi do

rozwoju stanu zapalnego, który może mieć udział w promowaniu dysfunkcji śródbłónka; (3) analiza przydatności rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych oraz wybranych czynników śródbłonkowych, a także hsCRP do różnicowania pomiędzy ciężarnymi z IUGR oraz IUGR+PE a ciężarnymi bez tych patologii. Ponadto oceniono czy spośród badanych parametrów są takie, które mogłyby służyć do różnicowania pomiędzy IUGR i IUGR+PE.

W uzyskanych wynikach nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w parametrach morfologii oraz wybranych parametrach koagulologicznych. Podobnie w przypadku tPA oraz TFPI nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w porównaniach wielokrotnych dla żadnej z grup badanych co pokazuje, że parametry te są mało przydatne dla różnicowania wspomnianych zaburzeń. Dla hsCRP zaobserwowane zostały różnice istotne statystycznie pomiędzy wszystkimi grupami, a dodatkowo zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniami sICAM-1, sVCAM-1 oraz PAI-1 co jest potwierdzeniem doniesień o indukcji ich wydzielania przez białko C-reaktywne. Również w przypadku sTM, PAI-1 oraz vWF zaobserwowane zostały różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi grupami, a w większości przypadków najwyższe stężenia były obserwowane w przypadku IUGR powikłanego PE. Cząsteczki adhezyjne, których wzrost uznawany jest za wykładnik dysfunkcji śródbłónka osiągały najwyższe stężenia również w grupie IUGR powikłanym PE, a różnice były istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Ponadto porównania wielokrotne dla sVCAM-1 w zależności od stopnia IUGR wykazały różnice istotne statystycznie pomiędzy 2 i 3 oraz 2 i 4 stopniem ciężkości. Uzyskane wyniki oraz ich analiza statystyczna pozwoliły na sformułowanie wniosków: w ciążach powikłanych IUGR jak i IUGR+PE dochodzi do dysfunkcji śródbłónka, o charakterze zarówno aktywacji jak i uszkodzenia. Wzrost stężenia hsCRP oraz korelacja z sICAM-1 i sVCAM-1 wskazuje na udział stanu zapalnego w promowaniu dysfunkcji śródbłónka w IUGR oraz IUGR+PE. Zmiany stężeń cząsteczek sVCAM-1, sICAM-1, sTM, PAI-1, vWF mogą być przydatne w różnicowaniu ciężarnych z powikłaniem IUGR oraz IUGR+PE z ciężarnymi, u których nie stwierdza się tych patologii. Stężenia sVCAM-1, sICAM-1 oraz PAI-1 w surowicy krwi ciężarnych pozwalają na różnicowanie pomiędzy grupami IUGR a IUGR+PE.

8 SUMMARY

Anti- and procoagulated action of the endothelium in a pregnancy complicated due to preeclampsia condition and intrauterine growth restriction.

Intrauterine Growth Restriction (IUGR) is defined as the failure of a pregnancy where fetal growth is below the genetically expected potential. It refers to fetuses that do not reach their potential optimal growth and size and are characterized by growth dynamics that do not correspond to the gestational age. It affects between 2% and 15% of the population in highly developed countries. Preeclampsia (PE) is a group of symptoms characterized by high blood pressure (over 140/90 mmHg) accompanied by proteinuria. This condition starts to occur approximately no earlier than on the 20th week of pregnancy, during labour or puerperium, however, most often after the 37th week of pregnancy. It affects between 3% and 10% of the population of highly developed countries. At present, the direct causes of these disorders are unknown, and a multifactor model of their development is proposed. It includes endothelial dysfunction, abnormal trophoblast invasion, the occurrence of oxidative stress, the influence of arterial hypertension, but also factors such as smoking, obesity, and genetic predisposition.

The vascular endothelium is an endocrine organ that takes part in many biological processes such as haemostasis, inflammation and angiogenesis. It synthesizes substances that control vascular tone, adhesion and aggregation of platelets, the growth of smooth muscle cells and connective tissue, and the adhesion processes of leukocytes. It also takes an active part in maintaining the balance between coagulation and fibrinolysis by producing pro and anticoagulant factors. Additionally, it is involved in embryo implantation into the uterine wall; therefore, endothelial dysfunction in the form of its activation or damage may be one of the most important mechanisms leading to the development of IUGR and PE.

In this study, pro- and anticoagulated parameters such as sTM, tPA, TFPI, PAI-1, vWF, sICAM-1 and sVCAM-1 adhesive molecules are considered markers of endothelial dysfunction (activation, damage) were assessed. Moreover, hsCRP, which is a very sensitive marker of inflammation and parameters of peripheral blood counts and selected coagulological parameters, were evaluated as well. The study was performed on 74 women

in the control group and also on women diagnosed with IUGR and IUGR complicated with PE.

The aim of the study was: (1) to assess whether endothelial dysfunction occurs in pregnancies complicated with IUGR or IUGR + PE; (2) assessing whether IUGR and IUGR + PE develop inflammation that may contribute to the promotion of endothelial dysfunction; (3) analysis of the suitability of soluble forms of adhesion molecules and selected endothelial factors, as well as hsCRP for the differentiation between pregnant women with IUGR and IUGR + PE and those without these pathologies. Moreover, it was assessed whether, among the examined parameters, some could be used to differentiate between IUGR and IUGR + PE.

The obtained results did not show statistically significant differences in the morphology and selected coagulological parameters. Similarly, in the case of tPA and TFPI, no statistically significant differences were observed in multiple comparisons for any of the study groups, which indicated that these parameters were of little use for the differentiation of these disorders. For hsCRP, statistically significant differences were observed between all groups, and additionally, a positive correlation was observed between the concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and PAI-1, which confirms the reports on the induction of their secretion by C-reactive protein. Also, in the case of sTM, PAI-1 and vWF, statistically significant differences were observed between the addressed groups. In most cases, the highest concentrations were observed in the case of IUGR with PE. Adhesive molecules, the growth of which is considered to be an indicator of endothelial dysfunction, also reached the highest concentrations in the IUGR group with PE, and the differences were statistically significant between the studied groups. Moreover, multiple comparisons for sVCAM-1 depending on the degree of IUGR showed statistically significant differences between the 2nd and the 3rd and between the 2nd and 4th severity. The results and statistical analysis allowed for the formulation of conclusions: both in IUGR and IUGR + PE complicated pregnancies, endothelial dysfunction occurs, both of activation and damage. The increase in hsCRP concentration and correlation with sICAM-1 and sVCAM-1 indicates the participation of inflammation in promoting endothelial dysfunction in IUGR and IUGR + PE. Changes in the concentration of sVCAM-1, sICAM-1, sTM, PAI-1, vWF molecules may help differentiate pregnant women with IUGR and IUGR + PE complications from those who do not have these pathologies. The

concentrations of sVCAM-1, sICAM-1 and PAI-1 in the blood serum of pregnant women allow for the differentiation between the IUGR and IUGR + PE groups.

9 PIŚMIENICTWO

1. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin Perinatol.* czerwiec 2009;33(3):130–7.
2. Kwiatkowski S, Torbe A, Borowski D. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników w zakresie diagnostyki i postępowania w ciążach powikłanych ograniczeniem wzrastania płodu. *Ginekol Perinatol Prakt.* 2020;5(5):119–30.
3. Karowicz-Bilińska A. Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu. *Ginekol Perinatol Prakt.* 2018;3(3):93–102.
4. Salomon LJ, Alfirevic Z, Da Silva Costa F, Deter RL, Figueras F, Ghi T, i in. ISUOG Practice Guidelines: ultrasound assessment of fetal biometry and growth. *Ultrasound Obstet Gynecol.* czerwiec 2019;53(6):715–23.
5. Bręborowicz GH. *Położnictwo. T. 2.,* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2016.
6. Lam Chun, Lim Kee-Hak, Karumanchi S. Ananth. Circulating Angiogenic Factors in the Pathogenesis and Prediction of Preeclampsia. *Hypertension.* 1 listopad 2005;46(5):1077–85.
7. Konturek S, Brzozowski TM. *Fizjologia człowieka: podręcznik dla studentów medycyny.* Wrocław: Elsevier Urban & Partner; 2011.
8. Traczyk WZ. *Fizjologia człowieka w zarysie.* Warszawa: Wydaw. Lekarskie PZWL; 2002.
9. Tomczyk M, Nowak W, Jaźwa A. Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Postępy Biochem.* 2013;59(4):357–64.
10. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, i in. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057–69.
11. Deok-Hoon Kong, Young Kim, Mi Kim, Ji Jang, Sukmook Lee. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2 kwiecień 2018;19(4):1057.
12. Madej A, Reich A, Szepietowski JC. Vascular adhesion protein-1: an unusual adhesion molecule. *Postępy Hig Med Dosw.* 2005;59:172–9.
13. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 15 wrzesień 2011;15(6):1607–38.
14. Kwiatkowski P, Godlewski J, Śliwińska-Jewsiewicka A, Kmiec Z. Cząsteczki adhezyjne w procesie nowotworzenia i przerzutowania. 2009;16(1):128–37.

15. Kim S-Y, Ryu H-M, Yang JH, Kim M-Y, Ahn H-K, Lim H-J, i in. Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia. *J Korean Med Sci.* październik 2004;19(5):688–92.
16. Turner RJ, Bloemenkamp KWM, Bruijn JA, Baelde HJ. Loss of Thrombomodulin in Placental Dysfunction in Preeclampsia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* kwiecień 2016;36(4):728–35.
17. Moore KL, Esmon CT, Esmon NL. Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood.* styczeń 1989;73(1):159–65.
18. Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, Wing M, Cummiskey M, Kisanuki YY, i in. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J Clin Invest.* 15 sierpień 2001;108(4):537–46.
19. Morser J, Gabazza EC, Myles T, Leung LLK. What has been learnt from the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? *J Thromb Haemost JTH.* maj 2010;8(5):868–76.
20. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med.* 2006;38(6):378–88.
21. Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology.* 2002;107(3):340–9.
22. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 19 kwiecień 2013;304(12):H1585–97.
23. Chao T-H, Tsai W-C, Chen J-Y, Liu P-Y, Chung H-C, Tseng S-Y, i in. Soluble thrombomodulin is a paracrine anti-apoptotic factor for vascular endothelial protection. *Int J Cardiol.* marzec 2014;172(2):340–9.
24. Salomaa V, Wu KK. Soluble thrombomodulin as predictor of incident coronary heart disease. *Lancet Lond Engl.* 6 listopad 1999;354(9190):1646–7.
25. Ohlin A-K, Larsson K, Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J Thromb Haemost.* maj 2005;3(5):976–82.
26. Dharmasaroja P, Dharmasaroja PA, Sobhon P. Increased plasma soluble thrombomodulin levels in cardioembolic stroke. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* czerwiec 2012;18(3):289–93.
27. Rousseau A, Favier R, Van Dreden P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: New and useful markers for pre-eclampsia? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1 wrzesień 2009;146(1):46–9.

28. Liu Z-H, Wei R, Wu Y-P, Lisman T, Wang Z-X, Han J-J, i in. Elevated plasma tissue-type plasminogen activator (t-PA) and soluble thrombomodulin in patients suffering from severe acute respiratory syndrome (SARS) as a possible index for prognosis and treatment strategy. *Biomed Environ Sci BES.* sierpień 2005;18(4):260–4.
29. Arazi HC, Doiny DG, Torcivia RS, Grancelli H, Waldman SV, Nojek C, i in. Impaired anti-platelet effect of aspirin, inflammation and platelet turnover in cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* czerwiec 2010;10(6):863–7.
30. Thorand B, Baumert J, Herder C, Meisinger C, Koenig W. Soluble thrombomodulin as a predictor of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case–cohort study, 1984–1998. *Diabetologia.* 1 marzec 2007;50(3):545–8.
31. Wu KK. Soluble thrombomodulin and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* sierpień 2003;14(4):373–5.
32. Karakas M, Baumert J, Herder C, Rottbauer W, Meisinger C, Koenig W, i in. Soluble thrombomodulin in coronary heart disease: lack of an association in the MONICA/KORA case–cohort study. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):1078–80.
33. Bogusz M, Lewandowski K. Patofizjologia i leczenie choroby von Willebranda – aktualne poglądy. *Adv Clin Exp Med.* 2004;13(4):677–87.
34. Dembińska-Kieć A. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wrocław: Edra Urban & Partner; 2017.
35. Prochazka M, Procházková J, Lubušký M, Pilka R, Úlehlová J, Michalec I, i in. Markers of endothelial activation in preeclampsia. *Clin Lab.* 2015;61(1–2):39–46.
36. Çelik HG, Uhri M, Yildirim G. Expression of von Willebrand factor and caldesmon in the placental tissues of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 19 marzec 2019;32(6):916–21.
37. Belo L, Santos-Silva A, Rumley A, Lowe G, Pereira-Leite L, Quintanilha A, i in. Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* listopad 2002;109(11):1250–5.
38. Bogdański P, Szulińska M, Dytfeld J, Pupek-Musialik D. Ocena stężenia inhibitora aktywatora plazminogenu 1 u pacjentów z otyłością prostą. *Endokrynol Otyłość Zaburzenia Przemiany Materii.* 2012;8(1).
39. Bodova KB, Biringer K, Dokus K, Ivankova J, Stasko J, Danko J. Fibronectin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) And Uterine Artery Doppler Velocimetry as Markers of Preeclampsia. *Dis Markers.* 2011;30(4):191–6.
40. Seferovic MD, Gupta MB. Increased Umbilical Cord PAI-1 Levels in Placental Insufficiency Are Associated with Fetal Hypoxia and Angiogenesis. *Dis Markers* [Internet]. 2016 [cytowane 5 maj 2020];2016. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4745644/>

41. Sheppard BL, Bonnar J. Uteroplacental hemostasis in intrauterine fetal growth retardation. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25(5):443–6.
42. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Than NG, Fareed J, Mazaki-Tovi S, i in. Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* grudzień 2008;21(12):855–69.
43. Kotschy M, Kotschy D, Witkiewicz W. Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi oraz w powikłaniach zakrzepowych. *Kardiologia Pol.* 2010;68(10):1158–62.
44. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol.* 13 kwietnia 2018;9:754.
45. Du Clos TW, Mold C. C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity. *Immunol Res.* 2004;30(3):261–78.
46. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* luty 1999;7(2):169–77.
47. Ridker PM. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation.* 28 stycznia 2003;107(3):363–9.
48. Hage FG, Szalai AJ. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood Levels, and Cardiovascular Disease Risk. *J Am Coll Cardiol.* wrzesień 2007;50(12):1115–22.
49. Devaraj S, Venugopal S, Jialal I. Native pentameric C-reactive protein displays more potent pro-atherogenic activities in human aortic endothelial cells than modified C-reactive protein. *Atherosclerosis.* styczeń 2006;184(1):48–52.
50. Karlı P, Özdemir AZ, Ayan D. Maternal Serum and Fetal Cord Blood C-Reactive Protein Levels but not Procalcitonin Levels Are Increased in Idiopathic Intrauterine Growth Restriction. *Med Sci Monit.* 30 sierpień 2019;25:6512–7.
51. Raio L, Bersinger NA, Malek A, Schneider H, Messerli FH, Hürter H, i in. Ultra-high sensitive C-reactive protein during normal pregnancy and in preeclampsia: a pilot study. *J Hypertens.* maj 2019;37(5):1012–7.
52. Gutiérrez García I, Pérez Cañadas P, Martínez Uriarte J, García Izquierdo O, Angeles Jódar Pérez M, García de Gadiana Romualdo L. D-dimer during pregnancy: establishing trimester-specific reference intervals. *Scand J Clin Lab Invest.* październik 2018;78(6):439–42.
53. Holthenrich A, Gerke V. Regulation of von-Willebrand Factor Secretion from Endothelial Cells by the Annexin A2-S100A10 Complex. *Int J Mol Sci.* 13 czerwca 2018;19(6).
54. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 19 październik 2015;15:130.

55. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 8 listopad 2017;48(4):295–313.
56. Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 15 lipiec 2004;117(Pt 16):3415–25.
57. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest.* grudzień 2005;115(12):3355–62.
58. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest.* kwiecień 2007;117(4):953–60.
59. Adams MN, Ramachandran R, Yau M-K, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, i in. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther.* czerwiec 2011;130(3):248–82.
60. Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood.* 26 2018;131(17):1903–9.
61. Wheeler AP, Gailani D. Why factor XI deficiency is a clinical concern. *Expert Rev Hematol.* lipiec 2016;9(7):629–37.
62. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood.* 07 2017;130(23):2463–8.
63. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* styczeń 2013;93(1):327–58.
64. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* maj 2016;26(4):297–303.
65. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* maj 1989;134(5):1087–97.
66. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 8 maj 2014;123(19):2934–43.
67. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sierpień 2007;27(8):1687–93.
68. Collen D, Lijnen HR. The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sierpień 2009;29(8):1151–5.
69. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol.* kwiecień 2012;95(4):333–45.

70. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 luty 2006;103(9):3106–11.
71. Formanowicz D, Malińska A, Nowicki M, Kowalska K, Gruca-Stryjak K, Bręborowicz G, i in. Preeclampsia with Intrauterine Growth Restriction Generates Morphological Changes in Endothelial Cells Associated with Mitochondrial Swelling—An In Vitro Study. *J Clin Med*. 15 listopad 2019;8(11):1994.
72. Coata G, Pennacchi L, Bini V, Liotta L, Di Renzo GC. Soluble adhesion molecules: marker of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. lipiec 2002;12(1):28–34.
73. Ahmed A. New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications. *Thromb Res*. luty 2011;127 Suppl 3:S72-75.
74. Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*. grudzień 2011;39(6):1619–27.
75. Kwiatkowski S, Dołęgowska B, Kwiatkowska E, Rzepka R, Marczuk N, Loj B, i in. Maternal endothelial damage as a disorder shared by early preeclampsia, late preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med*. 26 październik 2017;45(7):793–802.
76. Hale SA, Sobel B, Benvenuto A, Schonberg A, Badger GJ, Bernstein IM. Coagulation and Fibrinolytic System Protein Profiles in Women with Normal Pregnancies and Pregnancies Complicated by Hypertension. *Pregnancy Hypertens*. 1 kwiecień 2012;2(2):152–7.
77. O’Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 1 czerwiec 2003;17(3):385–96.
78. Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost*. kwiecień 2003;29(2):125–30.
79. Higgins JR, Papayianni A, Brady HR, Darling MR, Walshe JJ. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 in pre-eclampsia, gestational hypertension, and normal pregnancy: evidence of selective dysregulation of vascular cell adhesion molecule-1 homeostasis in pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. sierpień 1998;179(2):464–9.
80. Austgulen R, Lien E, Vince G, Redman CW. Increased maternal plasma levels of soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. styczeń 1997;71(1):53–8.
81. Krauss T, Osmer R, Beran J, Diedrich F, Fleckenstein G, Kuhn W. [Soluble adhesion molecules in patients with pre-eclampsia]. *Zentralbl Gynakol*. 1998;120(6):279–83.

82. Daniel Y, Kupferminc MJ, Baram A, Jaffa AJ, Wolman I, Shenhav M, i in. Plasma soluble endothelial selectin is elevated in women with pre-eclampsia. *Hum Reprod Oxf Engl.* grudzień 1998;13(12):3537–41.
83. Chaiworapongsa T, Romero R, Yoshimatsu J, Espinoza J, Kim YM, Park K, i in. Soluble adhesion molecule profile in normal pregnancy and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 1 styczeń 2002;12(1):19–27.
84. Possomato-Vieira JS, Khalil RA. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 2016;77:361–431.
85. Roberts James M., Gammill Hilary S. Preeclampsia. *Hypertension.* 1 grudzień 2005;46(6):1243–9.
86. McElwain CJ, Tuboly E, McCarthy FP, McCarthy CM. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Pre-eclampsia and Gestational Diabetes Mellitus: Windows Into Future Cardiometabolic Health? *Front Endocrinol.* 11 wrzesień 2020;11:655.
87. Okamoto T, Tanigami H, Suzuki K, Shimaoka M. Thrombomodulin: A Bifunctional Modulator of Inflammation and Coagulation in Sepsis. *Crit Care Res Pract.* 2012;2012:1–10.
88. Echeverria C, Eltit F, Santibanez JF, Gatica S, Cabello-Verrugio C, Simon F. Endothelial dysfunction in pregnancy metabolic disorders. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* luty 2020;1866(2):165414.
89. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet Lond Engl.* 26 marzec 2005;365(9461):785–99.
90. Lyall F, Hayman RG, Ashworth JR, Duffie E, Baker PN. Relationship of cell adhesion molecule expression to endothelium-dependent relaxation in normal pregnancy and pregnancies complicated with preeclampsia or fetal growth restriction. *J Soc Gynecol Investig.* sierpień 1999;6(4):196–201.
91. Rios DRA, Alpoim PN, Godoi LC, Perucci LO, de Sousa LP, Gomes KB, i in. Increased Levels of sENG and sVCAM-1 and Decreased Levels of VEGF in Severe Preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1 listopad 2016;29(11):1307–10.
92. Mtali YS, Lyimo MA, Luzzatto L, Massawe SN. Hypertensive disorders of pregnancy are associated with an inflammatory state: evidence from hematological findings and cytokine levels. *BMC Pregnancy Childbirth.* grudzień 2019;19(1):237.
93. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1 maj 1997;99(9):2152–64.
94. Zeisler H, Livingston JC, Schatten C, Tempfer C, Knöfler M, Husslein P. Serum levels of adhesion molecules in women with pregnancy-induced hypertension. *Wien Klin Wochenschr.* 16 sierpień 2001;113(15–16):588–92.

95. Zhang HG, Guo W, Gu HF, Chen SB, Wang JQ, Qiao ZX, i in. Correlation of VCAM-1 expression in serum, cord blood, and placental tissue with gestational hypertension associated with fetal growth restriction in women from Xingtai Hebei, China. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016 [cytowane 24 luty 2020];15(3). Dostępne na: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-3/pdf/gmr8274.pdf>
96. Farzadnia M, Ayatollahi H, Hasan-Zade M, Rahimi HR. A Comparative Study of Serum Level of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1) and High Sensitive C - reactive protein (hs-CRP) in Normal and Pre-eclamptic Pregnancies. *Iran J Basic Med Sci.* maj 2013;16(5):689–93.
97. Nehring SM, Goyal A, Bansal P, Patel BC. C Reactive Protein (CRP). W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cytowane 29 czerwiec 2020]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441843/>
98. Rzepka R, Torbé A, Czajka R, Kwiatkowski S, Bartoszek M, Cymbaluk A. Szybka ocena stężenia IL-6 w wydzielinie szyjkowo-pochwowej w zagrażającym porodzie przedwczesnym. *Ginekol Pol.* wrzesień 2009;80(9):678–81.
99. Teran E, Escudero C, Moya W, Flores M, Vallance P, Lopez-Jaramillo P. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* 2001;75(3):243–9.
100. Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1 luty 1999;180(2):499–506.
101. Kara AE, Guney G, Tokmak A, Ozaksit G. The role of inflammatory markers hs-CRP, sialic acid, and IL-6 in the pathogenesis of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Eur Cytokine Netw.* 1 marzec 2019;30(1):29–33.
102. Hwang HS, Kwon JY, Kim MA, Park YW, Kim YH. Maternal serum highly sensitive C-reactive protein in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* 2007;98(2):105–9.
103. Stefanović M, Vukomanović P, Milosavljević M, Kutlešić R, Popović J, Tubić-Pavlović A. INSULIN RESISTANCE AND C-REACTIVE PROTEIN IN PREECLAMPSIA. *Bosn J Basic Med Sci.* sierpień 2009;9(3):235–8.
104. Auer J, Camoin L, Guillonneau F, Rigourd V, Chelbi ST, Leduc M, i in. Serum profile in preeclampsia and intra-uterine growth restriction revealed by iTRAQ technology. *J Proteomics.* 10 marzec 2010;73(5):1004–17.
105. Tjoa ML, van Vugt JMG, Go ATJJ, Blankenstein MA, Oudejans CBM, van Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod Immunol.* 1 czerwiec 2003;59(1):29–37.
106. Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS, Baker PN. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1 maj 2001;184(6):1249–50.

107. Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynecol Obstet.* 1 czerwiec 2001;73(3):229–35.
108. Ito T, Thachil J, Asakura H, Levy JH, Iba T. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions—a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential. *Crit Care.* grudzień 2019;23(1):280.
109. Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* lipiec 1995;9(10):946–55.
110. Bontis J, Vavilis D, Agorastos T, Zournatzi V, Konstantinidis T, Tagou K. Maternal plasma level of thrombomodulin is increased in mild preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* czerwiec 1995;60(2):139–41.
111. Hunt BJ, Missfelder-Lobos H, Parra-Cordero M, Fletcher O, Parmar K, Lefkou E, i in. Pregnancy outcome and fibrinolytic, endothelial and coagulation markers in women undergoing uterine artery Doppler screening at 23 weeks. *J Thromb Haemost.* 1 czerwiec 2009;7(6):955–61.
112. Hayashi M, Inoue T, Hoshimoto K, Negishi H, Ohkura T, Inaba N. Characterization of five marker levels of the hemostatic system and endothelial status in normotensive pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Haematol.* 2002;69(5–6):297–302.
113. Boehme MW, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, i in. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology.* styczeń 1996;87(1):134–40.
114. Perlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Kurzawińska G, Kraśnik W, Drews K. Warianty genetyczne śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym. 2012;83:652–9.
115. Bosco C, González J, Gutiérrez R, Parra-Cordero M, Barja P, Rodrigo R. Oxidative damage to pre-eclamptic placenta: immunohistochemical expression of VEGF, nitrotyrosine residues and von Willebrand factor. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 1 listopad 2012;25(11):2339–45.
116. Bonnar J, McNicol GP, Douglas AS. Fibrinolytic enzyme system and pregnancy. *Br Med J.* 16 sierpień 1969;3(5667):387–9.
117. Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1 czerwiec 2003;17(3):369–83.
118. Choi J, Pai S. Tissue plasminogen activator levels change with plasma fibrinogen concentrations during pregnancy. *Ann Hematol.* 1 listopad 2002;81(11):611–5.
119. Catarino C, Rebelo I, Belo L, Rocha S, Castro EB, Patricio B, i in. Relationship between maternal and cord blood hemostatic disturbances in preeclamptic pregnancies. *Thromb Res.* 1 grudzień 2008;123(2):219–24.

120. Gilaberta J, Estellés A, Ayuso MJ, España F, Chirivella M, Grancha S, i in. Evaluation of Plasminogen Activators and Plasminogen Activator Inhibitors in Plasma and Amniotic Fluid in Pregnancies Complicated with Intrauterine Fetal Growth Retardation. *Gynecol Obstet Invest.* 1994;38(3):157–62.
121. Juhan-Vague I, Alessi M-C, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost JTH.* lipiec 2003;1(7):1575–9.
122. Ye Y, Vattai A, Zhang X, Zhu J, Thaler CJ, Mahner S, i in. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 29 lipiec 2017 [cytowane 5 maj 2020];18(8). Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578041/>
123. Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhes Migr.* 03 2016;10(1–2):88–110.
124. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 10 czerwiec 2005;308(5728):1592–4.
125. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, i in. Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Chem.* marzec 2007;53(3):399–404.
126. Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood.* wrzesień 1989;74(4):1332–8.
127. Bellart J, Gilabert R, Anglès A, Piera V, Miralles RM, Monasterio J, i in. Tissue factor levels and high ratio of fibrinopeptide A:D-dimer as a measure of endothelial procoagulant disorder in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* czerwiec 1999;106(6):594–7.
128. Boutsikou T, Mastorakos G, Kyriakakou M, Margeli A, Hassiakos D, Papassotiriou I, i in. Circulating Levels of Inflammatory Markers in Intrauterine Growth Restriction. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1–7.
129. Wikström A-K, Nash P, Eriksson UJ, Olovsson MH. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1 grudzień 2009;201(6):597.e1-597.e8.
130. Udenze IC, Arikawe AP, Makwe CC. Early pregnancy plasminogen activator inhibitor-1 levels in Nigerian women and its relationship with preeclampsia. *Niger J Clin Pract.* 5 styczeń 2017;20(5):517.
131. Ittel A, Bretelle F, Gris J-C, Chau C, Sebahoun G, Boubli L, i in. Increased risk of gestational vascular complications in women with low free tissue factor pathway inhibitor plasma levels out of pregnancy: *Thromb Haemost.* 26 październik 2010;105(1):66–71.

132. Erlich J, Parry GCN, Fearn C, Muller M, Carmeliet P, Luther T, i in. Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci.* 6 lipiec 1999;96(14):8138–43.
133. Parry GCN, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest.* 1 czerwiec 2000;105(11):1547–54.
134. Dusse LMS, das Graças Carvalho M, Cooper AJ, Lwaleed BA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: A potential role in pregnancy and obstetric vascular complications? *Clin Chim Acta.* 1 październik 2006;372(1):43–6.
135. Di Paolo S, Volpe P, Grandaliano G, Stallone G, Schena A, Greco P, i in. Increased placental expression of tissue factor is associated with abnormal uterine and umbilical Doppler waveforms in severe preeclampsia with fetal growth restriction. *J Nephrol.* październik 2003;16(5):650–7.
136. López-Ramírez Y, Carvajal Z, Arocha-Piñango CL. [Hemostatic system parameters of placental extracts in normal pregnancy and severe preeclampsia]. *Invest Clin.* wrzesień 2006;47(3):233–40.
137. Godoi LC, Gomes KB, Alpoim PN, Carvalho M das G, Lwaleed BA, Sant’Ana Dusse LM. Preeclampsia: the role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Thrombolysis.* 1 lipiec 2012;34(1):1–6.
138. Teng Y, Jiang R, Lin Q, Ding C, Ye Z. The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. *Thromb Res.* lipiec 2010;126(1):e41-45.
139. Dusse LM, Carvalho MG, Getliffe K, Voegeli D, Cooper AJ, Lwaleed BA. Total plasma tissue factor pathway inhibitor levels in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta.* 1 luty 2008;388(1):230–2.

10 ZAŁĄCZNIKI



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
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1212/16

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy 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. 2008 Nr 45, poz. 271 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); Rozporządzenia 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); Ustawy 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, 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 oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 01 grudnia 2016 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownicy projektu:

prof. dr hab. n. med. Maria Pioruńska-Stolzmann
prof. dr hab. Grzegorz H. Bręborowicz

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej oraz Klinika Perinatologii i
Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr Marcin Nowicki

Członkowie zespołu

badawczego:

dr n. med. Karolina Gruca-Stryjak
dr n. med. Alicja Brożek
dr n. med. Anna Blacha

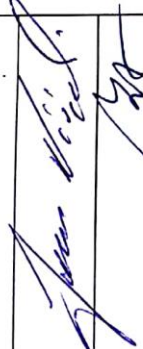
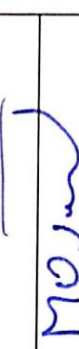
Temat badań:

**„Przeciwwązkrzepowe i prozakrzepowe działanie śródbłonnka
naczyniowego w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym i
wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu”.**

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodo UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, 61-111 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	

11 SPIS TABEL I RYCIN

11.1 SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka badanych grup	28
Tabela 2. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie podstawowych parametrów laboratoryjnych	46
Tabela 3. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu hsCRP	48
Tabela 4. Wyniki badań parametrów układu krzepnięcia w grupach IUGR oraz IUGR+PE	53
Tabela 5. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu ICAM-1.	55
Tabela 6. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu ICAM-1.	63
Tabela 7. Wyniki porównań wielokrotnych pomiędzy grupami w zakresie różnic w stężeniu sTM, tPA, TFPI, PAI-1 i vWF.....	69
Tabela 8. Charakterystyka bloków układu hemostazy przedstawionych na rycinach 29-30 (Rycina 29–30)	82

11.2 SPIS RYCIN

Rycina 1. Algorytm postępowania w ocenie i weryfikacji wieku ciążowego, wielkości płodu oraz dynamiki wzrastania.	12
Rycina 2. Schemat podziału badanych grup	27
Rycina 3. Rozkład stężeń hsCRP w badanych grupach.....	49
Rycina 4. Zależność pomiędzy stężeniem hsCRP a stężeniem sICAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	50
Rycina 5. Zależność pomiędzy stężeniem hsCRP a stężeniem sVCAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	51
Rycina 6. Zależność pomiędzy hsCRP i PAI-1 analizowaną łącznie we wszystkich badanych grupach.....	52
Rycina 7. Wyniki porównań wielokrotnych stężenia ICAM-1 pomiędzy wszystkimi grupami badanymi	56
Rycina 8. Rozkład stężeń sICAM-1 w grupach IUGR i IUGR-PE w zależności od stopnia IUGR.....	57
Rycina 9. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem sVCAM-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	58

Rycina 10. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem sTM w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	59
Rycina 11. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem PAI-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	60
Rycina 12. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem vWF w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	61
Rycina 13. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a liczbą eozynofiliów (EOZ) w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	62
Rycina 14. Rozkład zmian stężenia sVCAM-1 w surowicy krwi w zależności od grupy badanej	64
Rycina 15. Rozkład stężeń sVCAM-1 w grupach IUGR i IUGR+PE w zależności od stopnia IUGR.....	65
Rycina 16. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a stężeniem PAI-1 w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	66
Rycina 17. Zależność pomiędzy stężeniem sICAM-1 a liczbą eozynofiliów (EOZ) w surowicy krwi analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	67
Rycina 18. Zależność pomiędzy stężeniem sVCAM-1 a wielkością BMI w okresie przed ciążą analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.....	68
Rycina 19. Rozkład stężeń sTM w badanych grupach.	70
Rycina 20. Zależność pomiędzy stężeniem sTM a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	71
Rycina 21. Zależność pomiędzy stężeniem sTM a stężeniem PAI-1 analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	72
Rycina 22. Rozkład stężeń vWF w badanych grupach.....	73
Rycina 23. Rozkład stężeń tPA w badanych grupach.	74
Rycina 24. Zależność pomiędzy stężeniem tPA a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	75
Rycina 25. Rozkład stężeń PAI-1 w badanych grupach.	76
Rycina 26. Zależność pomiędzy stężeniem PAI-1 a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	77
Rycina 27. Rozkład stężeń TFPI w badanych grupach.	78
Rycina 28. Zależność pomiędzy stężeniem TFPI a stężeniem vWF analizowana łącznie we wszystkich badanych grupach.	79
Rycina 29. Schemat ukazujący złożoność układu hemostazy w organizmie człowieka (część 1)	80

Rycina 30. Schemat ukazujący złożoność układu hemostazy w organizmie człowieka (część 2)	81
---	----