

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA TURNŠEK

**INHIBIN A V DRUGEM TRIMESTRU NOSEČNOSTI KOT MARKER
PREEKLAMPSIJE**

**INHIBIN A IN THE SECOND TRIMESTER OF PREGNANCY AS A MARKER
OF PREECLAMPSIA**

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, spec. med. biokem., za strokovno pomoč pri nastajanju magistrske naloge.

Najlepše se zahvaljujem tudi svojim najbližjim, ki so mi ves čas stali ob strani in me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Urška Turnšek

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
SEZNAM SLIK	VI
SEZNAM PREGLEDNIC	VII
1 UVOD	1
1.1 NOSEČNOST	1
1.1.1 POSTELJICA	1
1.2 ZAPLETI V NOSEČNOSTI	1
1.2.1 POVIŠAN KRVNI TLAK (HIPERTENZIJA).....	2
1.3 PREEKLAMPSIJA	2
1.3.1 DEFINICIJA	2
1.3.3 KLINIČNI ZNAKI	4
1.3.4 DEJAVNIKI NASTANKA	5
1.3.4.1 NEPRAVILNA INVAZIJA TROFOBLASTA	5
1.3.4.2 OKSIDATIVNI STRES	6
1.3.4.3 NERAVNOTEŽJE MED PRO- IN ANTI- ANGIOGENIMI DEJAVNIKI	7
1.3.4.4 METABOLIČNI DEJAVNIKI.....	7
1.3.5 EKLAMPSIJA.....	8
1.3.6 ZDRAVLJENJE	8
1.4 LABORATORIJSKI TESTI	9
1.4.1 INHIBIN A IN AKTIVIN A	10
1.4.2 PIGF, VEGF, sFlt-1	12
2 NAMEN DELA	14

3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 VZORCI	15
3.2 DOLOČANJE INHIBINA A Z DVOSTOPENJSKO METODO NA ANALIZATORJU	15
3.2.1 PRIPRAVA ANALIZATORJA ZA IZVEDBO TESTA	16
3.2.1.1 PRIPRAVA REAGENTA	17
3.2.1.2 KALIBRACIJA	17
3.2.1.3 KOMERCIALNE KONTROLE.....	17
3.2.1.4 PRIPRAVA VZORCEV.....	18
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	18
4 REZULTATI	19
4.1 PREISKOVANCI	19
4.2 VREDNOSTI INHIBINA A	20
4.3 PORAZDELITEV VZORCEV	22
4.4 ANALIZA VARIANCE	22
4.5 UGOTAVLJANJE ZNAČILNIH RAZLIK MED SKUPINAMI Z NEPARAMETRIČNIM TESTOM	23
4.6 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	26
5 RAZPRAVA	28
6 SKLEP	32
7 LITERATURA	33
PRILOGA	38

POVZETEK

Povišan krvni tlak v nosečnosti je eden pogostejših zapletov, ki lahko vodi do prezgodnjega poroda. Če pride do povišanega krvnega tlaka po 20. tednu nosečnosti in sočasna pojava proteinurije, govorimo o preeklampsiji. Slednja je pogost vzrok smrti matere in/ali ploda. Za napoved zapletov še nimamo dovolj specifičnega parametra, ki bi nakazoval možnost zapletov.

Namen našega dela je bil določiti koncentracijo inhibina A v serumu, na analizatorju Access 2 Beckman Coulter s kemiluminiscenčno metodo, zdravim in obolelim nosečnicam s preeklampsijo. Vzorce smo odvzeli naključno izbranim 34-im zdravim nosečnicam, ki niso razvile preeklampsije in 64-im nosečnicam, ki so razvile preeklampsijo.

S statističnima testoma KruskalWallis in MannWhitney U test smo ugotovili, da je koncentracija inhibina A značilno povišana pri obolelih nosečnicah s preeklampsijo (1280 ng/L) v primerjavi z zdravimi nosečnicami (703 ng/L). Izračunali smo diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost metode za inhibin A. Diagnostična občutljivost je 86 %, specifičnost 71 %. Občutljivost je dobra za presejalni test.

ABSTRACT

High blood pressure during the pregnancy is one of the most common complications which can lead to premature birth. If increased blood pressure occurs after 20th week of pregnancy simultaneously with proteinuria we speak of preeclampsia. This is the most common cause of death of the mother and fetus. Right now we do not have a parameter that is specific enough to be able to predict any future complications.

The purpose of our work was to determine concentration of inhibin A with analyser Access 2 Beckman Coulter with chemiluminescence immunoassay, of healthy women and women suffering from preeclampsia. Samples were taken from randomly chosen from 34 healthy pregnant women not suffering from preeclampsia and 64 pregnant women who did.

Statistical tests KruskalWallis and MannWhitney U test proved higher levels of inhibin A in pregnant women suffering from preeclampsia compared to healthy pregnant women. We calculated diagnostic sensitivity and specificity of inhibin A method. Diagnostic sensitivity was 86% and specificity 71%. Sensitivity is good to perform a screening test.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALT – alanin aminotransferaza

AST – aspartat aminotransferaza

ELISA – encimsko-immunski test

FSH – folikle stimulirajoči hormon

HDL – lipoprotein z visoko gostoto (high density lipoprotein)

HELLP sindrom – (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) – hemoliza, povišana vrednost jetrnih encimov, trombocitopenija

IL – interlevkin

IUGR – zastoj rasti ploda v maternici (intrauterine growth restriction)

PlGF – placentarni rastni faktor

RLU – Relative Light Unit

ROS – reaktivne kisikove spojine

sFlt-1 – topna fms podoben tirozin-kinazi-1 (Soluble fms-like tyrosine kinase-1)

TGF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- alfa

TGF- β – transformirajoči rastni faktor- beta

VEGF – vaskularni endotelijski rastni faktor

SEZNAM SLIK

Slika 1: Levo – spiralne arterije pri normalni nosečnosti, desno – spiralne arterije pri preeklampsiji.	6
Slika 2: Dejavniki, ki povzročajo preeklampsijo in simptomi preeklampsije pri nosečnici. 8	
Slika 3: Inhibin A in Aktivin A.....	11
Slika 4: Shematski prikaz določanja inhibina A z dvostopenjsko sendvič tehniko.....	16
Slika 5: Število nosečnic v kontrolni skupini razporejenih v starostne skupine.....	19
Slika 6: Število nosečnic obolelih s PE razporejenih v starostno skupino.	20
Slika 7: Razsevni diagram vseh vzorcev, ki smo jim merili koncentracijo inhibina A.	21
Slika 8: Porazdelitev vzorcev, ki ni normalna.	22
Slika 9: Izpis Kruskal-Wallisovega testa iz SPSS programa.	23
Slika 10: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava kontrolne in PE skupine.	24
Slika 11: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava kontrolne in PE+IUGR skupine.....	24
Slika 12: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava PE in PE+IUGR skupine.....	25
Slika 13: ROC krivulja iz SPSS, za inhibin A.	26

SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica I:</i> Dejavniki tveganja za nastanek PE	3
<i>Preglednica II:</i> Težave pri blagi do hudi obliki preeklampsije.	5
<i>Preglednica III:</i> Prikaz laboratorijskih izvidov pri PE.....	10
<i>Preglednica IV:</i> Opis preiskovancev.	19
<i>Preglednica V:</i> Povprečna vrednost, mediana in kvartil inhibina A.....	20
<i>Preglednica VI:</i> Cut-off in AUC pridobljeni z ROC krivuljo.	26
<i>Preglednica VII:</i> Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti.....	27
<i>Preglednica VIII:</i> Občutljivost in specifičnost za inhibin A.	27
<i>Preglednica IX:</i> Uporabnost diagnostične metode.	29

1 UVOD

1.1 NOSEČNOST

Nosečnost je obdobje ženske, ko se s spermo oplojeno jajčece ugnezdijo v sluznico maternice. Najprej govorimo o zarodku, po devetem tednu pa o plodu. Nosečnost traja približno 40 tednov in je razdeljena na tri tromesečja. Prvo tromesečje je najbolj nevarno za spontani splav. V drugem tromesečju lahko plod že dobro spremljamo z različnimi diagnostičnimi metodami, v tretjem tromesečju se plod prične pripravljati na izvenmaternično življenje. (1)

1.1.1 POSTELJICA

Posteljica (placenta) je osnovna struktura, ki omogoča izmenjavo hranilnih snovi in dihalnih plinov med materjo in plodom. Sestavljena je iz plodovega dela, ki se razvije iz horijeve vreče, in iz materinega dela, ki se razvije iz endometrija. Osmi dan razvoja se začne trofoblast diferencirati v dve plasti: v notranjo plast enojedrnih celic–citrifoblast in zunanjo plast večjedrnih celic–sincitrifoblast. Ločimo tudi intermediarni trofoblast, ki udira globoko v endometrij proti spiralnim arterijam maternice, povzroči njihovo preoblikovanje ter poveča krvni obtok v maternici med nosečnostjo. Slabo oksigenirana kri zapušča plod in teče skozi popkovnične arterije v posteljico. Dobro oksigenirana kri vstopa v plod skozi popkovnično arterijo. (23)

1.2 ZAPLETI V NOSEČNOSTI

Zapleti v nosečnosti so zdravstvene težave, ki se pojavijo v času nosečnosti. Ti lahko vplivajo na zdravje matere, otroka ali obeh. Nekatere ženske imajo težave med nosečnostjo, druge pa še preden zanosijo in te težave lahko vplivajo na zaplete med nosečnostjo. (2)

Najpogostejše težave, ki jih zasledimo med nosečnostjo, so anemija, infekcije sečil, depresija, sladkorna bolezen, povišan krvni tlak, debelost, slabost, astma. (3)

1.2.1 POVIŠAN KRVNI TLAK (HIPERTENZIJA)

Krvni tlak je sila krvi, ki deluje na steno arterij. O visokem krvnem tlaku govorimo, kadar je sistolični tlak višji od 140 mmHg, diastolični pa od 90 mmHg.

Klasifikacija povišanega krvnega tlaka v nosečnosti:

- *Kronična hipertenzija*: diagnosticirana je pred nosečnostjo ali se pojavi pred 20. tednom nosečnosti. Med nosečnostjo je potreben poostren nadzor krvnega tlaka, ker se le-ta v času nosečnosti lahko še poslabša.
- *Preeklampsija – eklampsija*: specifični sindromi se pojavijo po 20. tednu nosečnosti. Zvišan krvni tlak spremlja proteinurija, glavoboli, zamegljen vid, bolečine v trebuhu ali patološki laboratorijski izvidi, kot so znižanje trombocitov (trombocitopenija), povišanje jetrnih encimov.
- *Nacepljena preeklampsija*: navezuje se na prej obstoječe bolezensko stanje. Pojavi se pred 20. tednom nosečnosti pri ženskah, ki so imele predhodno že hipertenzijo (uravnano). Spremljajo jo proteinurija, povišanje jetrnih encimov, trombocitopenija.
- *Gestacijska hipertenzija*:
 1. Prehodna hipertenzija: povišan krvni tlak se pojavi po 20. tednu nosečnosti pri nosečnicah, ki so imele predhodno normalen krvni tlak in izgine 12 tednov po porodu. Znakov preeklampsije ni.
 2. Kronična hipertenzija: Preeklampsija se ne razvije. Povišan krvni tlak ostane po porodu in se ga lahko zniža samo z zdravljenjem. (5, 7)

1.3 PREEKLAMPSIJA

1.3.1 DEFINICIJA

Preeklampsija (PE) »je fascinirajoča in frustrirajoča multisistemska bolezen z disfunkcijo endotelja pri človeku, kjer gre predvsem za motnjo v placentaciji in maternalnem žilju in porodničar potrebuje veliko srečo, da vidi bolnico v zgodnjem obdobju njene bolezni. Na

koncu se vse subtilne bolezni zgube v megli močno abnormalne fiziologije in odpovedi več organov.« (4)

PE je bolezen, ki se lahko razvije samo med nosečnostjo. Pojavi se lahko kadarkoli po 20. tednu nosečnosti in izzveni po porodu. Kaže se s povišanim krvnim tlakom in proteinurijo, pri nosečnicah, ki so pred 20. tednom nosečnosti imele normalen krvni tlak in brez proteinurije. Sistolični krvni tlak je nad 140mmHg, diastolični nad 90 mmHg. Proteinurija je pojav beljakovin v urinu več kot 300mg dnevno ali z reagenčnim trakom 2 ali več +. Pri hudih oblikah se pojavijo tudi edemi. Razvije se pri približno 5 % nosečnic v Sloveniji in pri 7 % nosečnic v Združenih državah Amerike. Na svetu umre najmanj 63000 žensk letno zaradi PE. (4, 5, 6)

1.3.2 VZROKI NASTANKA

Dejavniki nastanka niso popolnoma znani, zgodnja PE naj bi nastala zaradi nepravilnega razvoja posteljice, pozna pa zaradi genetskih vplivov. Povečana možnost nastanka je pri zelo mladih ali pri starejših ženskah, večplodni nosečnosti, pri kronični hipertenziji, sladkorni bolezni, obolenju ledvic, avtoimunih obolenjih, pri tistih, ki so že imele PE ali je v njihovi družini bila PE. Chelsey in Cooper sta naredila raziskavo pri prvi nosečnosti sester, hčera, vnukinj in snah s PE. Pri sestrah se je pojavila pri 37 %, hčerah 27 %, vnukinjah 16 %, in snahah 6 %. Slednje nakazuje, da se PE prenaša iz roda v rod. (4, 5, 6, 8)

Preglednica I: Dejavniki tveganja za nastanek PE

Dejavnik	Ogroženost
Osebna anamneza	Starejše ali mlajše ženske Sladkorna bolezen Avtoimune bolezni Debelost Druge kronične bolezni
Družinska anamneza	Mati ali sestra imela PE
Pariteta	Prvorodnice
Posteljica	Večplodne nosečnosti
Potek sedanje nosečnosti	Povišanje krvnega tlaka po 20. tednu nosečnosti Proteinurija Edemi

1.3.3 KLINIČNI ZNAKI

Preeklampsijo delimo na blago do zmerno in hudo obliko.

Blaga do zmerna oblika PE: nosečnice imajo običajno nekaj težav s krvnim tlakom, ki je običajno manjši kot 160/110 mmHg. Pojavijo se lahko edemi, ki so fiziološki odgovor na zadrževanje vode v telesu. Število trombocitov je večje kot $100 \times 10^9/L$ (ni še pojava trombocitopenije), jetrni encimi niso povišani, razdražljivost centralnega živčnega sistema (CŽS) je minimalna, lahko se pojavi hiperrefleksija (neuravnoteženo delovanje parasimpatika in simpatika), proteinurija je blaga (0.3–5g/24 h beljakovin v urinu).

Huda oblika PE: lahko se pojavijo glavobol, spremembe vida, razdražljivost, nehoteno krčenje mišic. Krvni tlak je povišan (160/110 mmHg), pojavi se trombocitopenija (trombociti nižji kot $100 \times 10^9/L$), vrednosti hemoglobina so povišane, epigastrična bolečina, povišani jetrni encimi (AST-aspartatna aminotransferaza, ALT-alaninska aminotransferaza), lahko pride tudi do raztrganja jeter. Zaradi povišanega krvnega tlaka lahko pride do krvavitve v mrežnico. Pri plodu pride do fetalnega distresa, zastoja v rasti ploda in do zmanjšanja plodovnice. Pri hudi obliki PE je prisoten tudi **HELLP sindrom** (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) – hemoliza, povišana vrednost jetrnih encimov, trombocitopenija. HELLP sindrom se pojavi pri 1 od 1000 nosečnic. (4, 5, 6)

Posledice PE lahko ostanejo tudi po porodu pri materi in se kažejo kot kasnejši zapleti. Posledice se na plodu vidijo kot zmanjšanje rasti le-tega. Raziskave so pokazale, da so otroci mater, ki so imele PE, v kasnejšem obdobju večkrat hospitalizirani in da imajo več možnosti za nastanek presnovnih in krvotvornih obolenj. (21)

Preglednica II: Težave pri blagi do hudi obliki preeklampsije.

ORGANI/ORGANSKI SISTEM	KAZALNIKI	OBLIKA	
		BLAGA DO ZMERNNA	HUDA
CENTRALNI ŽIVČNI SISTEM	Simptomi in znaki	Hiperrefleksija	Zamegljen vid
			Glavobol
			Razdražljivost
			Krčenje in iztezanje mišic
LEDVICE	Proteinurija	0.3-5g/24 h	>5g/24 h
JETRA	Jetni encimi (AST, ALT)	Normalne vrednosti jetrnih encimov	Povišanje vrednosti jetrnih encimov
			Epigastrična bolečina
			Raztrganje jeter
KRI	Trombociti	>100x10 ⁹ /L	<100x10 ⁹ /L
	Hemoglobin	Normalne vrednosti	>145g/L
ŽILNI SISTEM	Krvni tlak	< 160/110 mmHg	> 160/110 mmHg
	Mrežnica	Arteriolni krč	Krvavitev v mrežnico
PLOD IN POSTELJICA	Zastoj v rasti ploda	Ni prisoten	Prisoten
	Zmanjšana količina plodovnice	Ni prisoten	Prisoten
	Fetalni distres	Ni prisoten	Prisoten

1.3.4 DEJAVNIKI NASTANKA

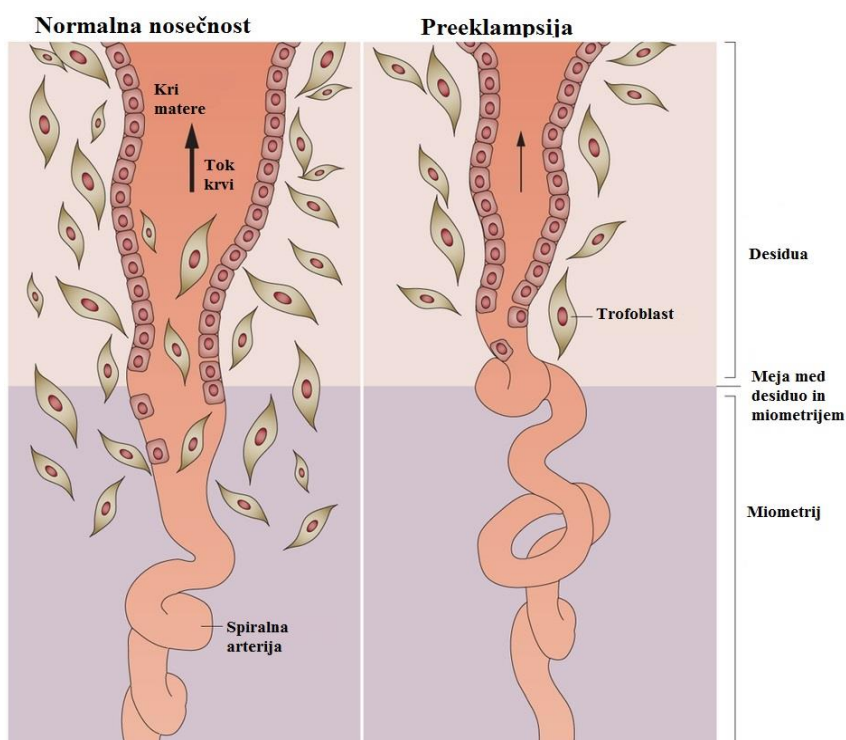
PE je bolezen matere in ploda. Patološke spremembe so predvsem ishemične narave in vplivajo na jetra, ledvice, placento ter možgane. Pomembno dejstvo je, da je PE več kot le hipertenzija, je sistemski sindrom, njeni znaki so lahko blagi do hudi. Vzroki nastanka PE niso popolnoma znani. Vzrok bolezn je v placenti, saj se bolezen pozdravi takoj, ko se porodi placenta. Novejše raziskave so se osredotočile na žile, ki oskrbujejo prekrvavitev placent. (7)

1.3.4.1 NEPRAVILNA INVAZIJA TROFOBLASTA

Osnovne spremembe pri PE se kažejo zaradi nevdora trofoblata v spiralne arterije (terminalna veja maternične arterije) in zaradi pomanjkanja fizioloških sprememb spiralnih arterij. Pri normalni nosečnosti izgine mišična plast iz spiralnih arterij, svetlina se poveča, tako da ima posteljica zadostno perfuzijo krvi. Pri PE ostane ohranjen mišično-elastični

sloj spiralnih arterij, zaradi tega ostane lumen arterij ozek tekom celotne nosečnosti. Na materničnih arterijah lahko najdemo spremembe podobne aterosklerotičnim, ki jih imenujemo akutna ateroza. Pri PE so spiralne arterije ožje za 60 %, njihova povečana vijugavost pa še dodatno upočasnjuje pretok krvi. Zaradi tega je prekrvavljenost posteljice zmanjšana, lahko pa pride tudi od infarkta posteljice (60 %). Takšno tkivo posteljice ogroža otroka. Ogroženost matere in otroka korelira s simptomi matere. Zmanjšana perfuzija placente ne zagotavlja zadostne izmenjave snovi med materjo in otrokom.

Zaradi nepravilne placentacije pride do disfunkcije endotela. Na to kažejo tromboksan A2, endotelin 1, fibronektin v krvi nosečnice s PE. Dokazali so, da so pri nekaterih spremembe endotela prisotne že pred razvojem kliničnih znakov PE, nekatere spremembe pa ostajajo tudi po koncu nosečnosti. (8)



Slika 1: Levo – spiralne arterije pri normalni nosečnosti, desno – spiralne arterije pri preeklampsiji.

1.3.4.2 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres nastane zaradi neravnotežja med prooksidanti in antioksidanti. Vzrok oksidativnega stresa v organizmu je prekomerna tvorba radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih/dušikovih spojin ali nezadosten obrambni antioksidantni sistem. Reaktivne kisikove spojine sodelujejo v signalnih poteh ženskega reproduktivnega cikla. Vplivajo na

motnje placentacije in uteroplacentarno okolje. Pri PE je motena invazivnost trofoblastov, kar povzroči zmanjšanje uteroplacentne perfuzije, ishemijo in hipoksijo posteljice. Posledica teh stanj pa je tudi povečana tvorba ROS (reaktivne kisikove spojine), ki lahko še dodatno vodijo do endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe. (20)

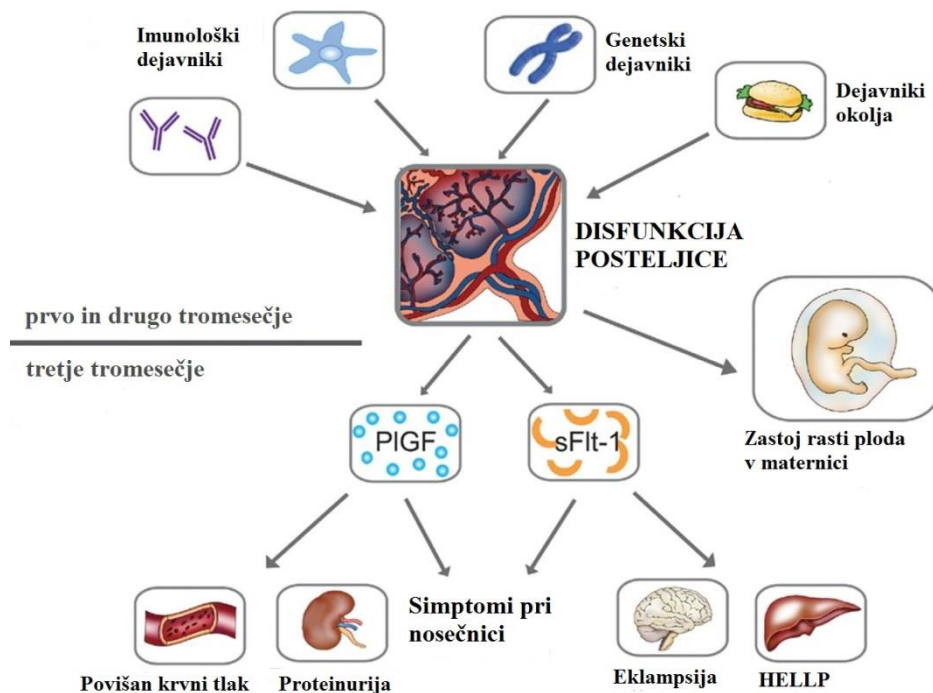
1.3.4.3 NERAVNOTEŽJE MED PRO- IN ANTI- ANGIOGENIMI DEJAVNIKI

Možen dejavnik PE je neravnotežje med pro- in anti- angiogenimi dejavniki. Angiogeni rastni faktor, vaskularni endoteljski rastni faktor (VEGF) in placentarni rastni faktor (PlGF) so pomembni zaradi vdora v spiralne arterije in pravilne placentacije. Angiogenist sFlt1 (topen fms podoben tirozin-kinazi-1) z vezavo na VEGF in PlGF onemogoči njuno vezavo na spiralne arterije. In vitro študije na podganah so pokazale, da presežek sFlt1 in zavrtje VEGF in PlGF povzroči albuminurijo, hipertenzijo in patološke spremembe v ledvicah. Pred pojavom kliničnih znakov PE vrednosti prostih VEGF in PlGF padejo, vrednost sFlt1 pa naraste. (9, 10)

Transformirajoči rastni faktor-beta (TGF- β), ki ima znano sposobnost da inhibira in preoblikuje celično rast, se izraža na žilnem endoteliju in trofoblastni celici. Koncentracija TGF- β se zviša v plazmi pred nastankom simptomov PE. Ugotavljali so tudi vpliv tumor nekrotizirajočega faktorja-alfa (TGF- α), ki vpliva na prehod trofoblasta in je močan aktivator žilnega endotelija. Interlevkini IL-2, IL-6 in IL-10 sodelujejo pri placentaciji in pripomorejo k nastanku endotelijske disfunkcije. (12)

1.3.4.4 METABOLIČNI DEJAVNIKI

Obstajajo tudi študije z dognanji, da naj bi povišani serumski trigliceridi, proste maščobne kisline, inzulinska rezistenca in glukozna intoleranca vplivali na pojav PE. Maščobne kisline vplivajo na endotelijsko disfunkcijo, za ostale dejavnike pa še ni popolnoma znano ali vplivajo na nastanek PE. (15)



Slika 2: Dejavniki, ki povzročajo preeklampsijo in simptomi preeklampsije pri nosečnici.

1.3.5 EKLAMPSIJA

Eklampsija je pojav generaliziranih tonično kloničnih krčev pri nosečnicah s PE, ki niso posledica drugih obolenj centralnega živčnega sistema (epilepsija, možganski tumor). Je eden vodilnih vzrokov smrtnosti matere in otroka po svetu. V Evropi je pojavnost 1/2000 porodov. V tonični fazi ženska izgubi zavest, postane cianotična s peno na ustih. Ta faza običajno traja pol minute. Sledi ji klonična faza, pri kateri pride do krčenja mišic, lahko traja tudi nekaj minut. Pri napadu lahko pride do aspiracije želodčne vsebine, ugriza v jezik ali padca iz postelje. Po eklamptičnem napadu je nosečnica še nekaj časa v nezavesti, nato krči prenehajo. Ko se nosečnica zave, se ničesar ne spomni. Če med napadom rodi, se krči običajno ne pojavijo več. Lahko pride do naslednjih zapletov: zastoj srca, edem pljuč, krvavitev v možgane, zadušitev z želodčno vsebino, odpoved ledvic in slepota. (4, 8)

1.3.6 ZDRAVLJENJE

Končno zdravljenje je porod. Zdravljenje je usmerjeno k izboljšanju zdravja matere, ki običajno izboljšuje tudi zdravje fetusa. Preventivno zdravljenje se pri nosečnicah izvaja z

nizkimi odmerki acetilsalicilne kisline, 60–100 mg/dan. Majhni odmerki acetilsalicilne kisline inhibirajo sintezo tromboksana. Pri PE se nosečnica običajno zdravi doma, ambulantno se spremlja na 2–3 dni. Ima strogo mirovanje v postelji, ležanje na levem boku, izogibati se mora stresu in ima dieto, pri kateri mora upoštevati zmanjšan vnos soli, zmanjšanje nasičenih živalskih maščob v prehrani. Zdravljenje z zdravili: izbira zdravil temelji na tem, da so varna za plod. Za zdravljenje hipertenzije se uporablja predvsem metildopa, večina drugih antihipertenzivov je varnih, potrebno se je izogibati blokatorjem renin angiotenzinskega sistema. Pri močno zvišanem tlaku se uporablja labetalol, ki je zaviralec beta receptorjev. Diuretikov se večinoma ne predpisuje zaradi nevarnosti znižanja znotrajžilnega volumna. Magnezijev sulfat se uporablja za antikonvulzivo zdravljenje, pri intravenozni ali intramuskularni terapiji ga je potrebno dajati počasi, saj lahko pride do srčne aritmije ali zastoja srca. Pri eklampsiji in pri PE s hudimi simptomi se nosečnico hospitalizira in se ji zniža krvni tlak na 140 do 155 mmHg in 90 do 105 mmHg, prepreči krče, pospešiti diurezo in izzove čimprejšnji porod. (4, 8, 22)

1.4 LABORATORIJSKI TESTI

Z laboratorijskimi testi težko napovemo bolezen, tako da z njimi merimo resnost PE. Z merjenjem hemoglobina lahko napovemo pojav PE, ki se pogosto pojavi pri nosečnicah z ravno hemoglobina nad 145 g/L. Hemoglobin je visok zaradi zmanjšanja volumna plazme, do katere pride pred povišanjem krvnega tlaka. Pri PE je povečana koncentracija proteinov v urinu, posledično se zviša krvni tlak. Pri nosečnici s PE pride do hemolize, ki se kaže kot povečana vrednost celokupnega železa, hemoglobina in bilirubina ter znižanje transferina. Zaradi prizadetosti ledvic je povečana koncentracija urata in kreatinina v serumu. Na jetrno okvaro kažejo povečane vrednosti AST in ALT zaradi povečane prepustnosti celičnih membran in zmanjšana vrednost HDL holesterola (lipoprotein z visoko gostoto). Skupaj z večjo prizadetostjo jeter se pojavijo motnje strjevanja krvi. Z merjenjem razmerja med PIGF in sFlt-1, v 20. do 24. tednu nosečnosti lahko z zelo visoko zanesljivostjo napovemo razvoj bolezni v nadaljnjih 4-ih do 6-ih tednih. Pri poslabšanju PE se razvije HELLP sindrom, kjer zaznamo tudi trombocitopenijo. Novejše raziskave kažejo, da povišane vrednosti inhibina A kažejo na PE. (11)

Preglednica III: Prikaz laboratorijskih izvidov pri PE.

Laboratorijski izvidi
Hemoglobin ↑
Trombociti ↓
AST ↑, ALT ↑, HDL ↓
Celokupno železo ↑, transferin ↓
Bilirubin ↑
Kreatinin ↑, urati ↑
Proteini v urinu
Razmerje sFlt/PlGF ↓

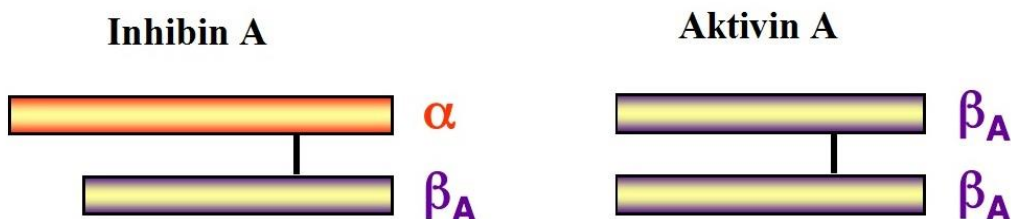
1.4.1 INHIBIN A IN AKTIVIN A

Inhibin je bil prvič v literaturi omenjen leta 1932 kot hormon v testisih, urinu in krvi. Danes vemo, da so inhibini glikoproteinski hormoni iz naddružine TGF- β , ki jih izločajo granulozne in teka celice jajčnika. Inhibin je dimerni disulfid povezan z glikoproteinsko molekulo, ki jo sestavljata α in β podenoti. Inhibin je klasificiran v inhibin A in B. Inhibin A je sestavljen iz α in β_A podenot. Inhibini so vključeni v nadzor fetomaternalne komunikacije za vzdrževanje nosečnosti. Posteljica, desidua in plodove membrane so glavni vir proizvodnje in izločanja inhibina v materin serum, plodovnico in popkovnično kri. Inhibin je lokaliziran v trofoblastu. Čeprav natančen spekter funkcij inhibina A med nosečnostjo v celoti še ni znan, abnormalne vrednosti povezujejo s komplikacijami v nosečnosti, kot so spontani splav, PE in prezgodnji porod. Uporablja se tudi kot napoved za plodove nepravilnosti, na primer za napovedovanje Downovega sindroma. Pri normalni nosečnosti se inhibin A v materinem serumu, poveča v 6. tednu nosečnosti in doseže maksimalno koncentracijo v 9. tednu nosečnosti, potem se postopoma zmanjšuje do 14. tedna nosečnosti. V tretjem tromesečju prične koncentracija inhibina A postopoma ponovno naraščati. To nakazuje, da ima inhibin A različne funkcije v času nosečnosti. Merjene koncentracije inhibina A v drugem tromesečju je lahko parameter napovedi PE, prezgodnjega poroda in zastoja rasti ploda v maternici. (24)

Inhibin A bi lahko bil uporaben za zgodnje odkrivanje PE, in sicer bi ob istočasnem odvzemu vzorca za ugotavljanje Downovega sindroma, napovedali verjetnost pojava PE.

Različne študije so pokazale, da je koncentracija inhibina A značilno povišana pri nosečnicah s PE v primerjavi z normalno nosečnostjo. Koncentracije inhibina A v serumu so pri nosečnicah, ki so razvile PE, približno 3–6 krat višje kot pri normalni nosečnosti. V študijah so izračunali, da je diagnostična občutljivost inhibina A srednja, specifičnost dobra. Ugotovili so tudi, da je koncentracija inhibina A v urinu, 25 krat višja pri nosečnicah s PE kot pri normalni nosečnosti. Glede na to, da je koncentracija v urinu višja kot v krvi, je test bolj diskriminatoren in bi mogoče bil boljši presejalni test za PE. (19) Koncentracije inhibina A v plodovnici so znatno višje kot v krvi pri nosečnicah s PE. Koncentracija inhibina A v plodovnici pozitivno korelira s koncentracijo v serumu pri nosečnicah s PE. To je lahko povezano z večjo prepustnostjo amnijske membrane pri nosečnicah s hudo PE. (25)

Aktivin A je glikoproteinski hormon iz naddružine TGF- β , ki ima nasprotujoče si biološke učinke kot inhibin A. Prav tako je dimerni disulfid, povezan z glikoproteinsko molekulo. Od inhibina A se razlikuje po sestavi podenot. Sestavljen je iz dveh enakih podenot β_A . Povečuje biosintezo ter izločanje FSH (folikle stimulirajoči hormon) in sodeluje pri urejanju menstrualnega cikla. Ima tudi druge funkcije, kot so vloga v celični proliferaciji, hemostazi, imunskem odzivu, celjenju ran ... Med nosečnostjo ga izloča placenta. Ima pomembno vlogo pri endokrini fiziologiji v nosečnosti. Koncentracija aktivina A med nosečnostjo pri PE je med prvim in drugim tromesečjem enaka, v tretjem tromesečju pa postopoma narašča. Koncentracija aktivina A bistveno naraste pri nosečnicah z zgodnjim pojavom bolezni kot pri normalni nosečnosti. (27)



Slika 3: Inhibin A in Aktivin A.

Kot parametra za napovedovanje bolezni PE imata majhno občutljivost in nizko napovedno vrednost pri populaciji z nizkim tveganjem za PE. Pri populaciji z visokim tveganjem pa imata visoko napovedno vrednost ob sočasnem spremljanju materničnih arterij z Dopplerjevim merilcem v drugem tromesečju. (18)

1.4.2 PIGF, VEGF, sFlt-1

VEGF (vaskularni endotelijski rastni faktor) je mitogen, specifičen za celice vaskularnega endotelija. Deluje angiogeno in ima pomembno vlogo pri neovaskularizaciji, znižuje krvni tlak in ima ključno vlogo pri glomerularni filtraciji. Je del sistema, ki obnavlja dovod kisika do tkiv, kadar je krvni obtok neustrezen. Vpliva na permeabilnost vaskularnega endotelija. Njegova funkcija je ustvarjanje novih krvnih žil med embriološkim razvojem po poškodbi mišic. Povišane koncentracije v serumu so pri astmi in sladkorni bolezni. Delimo jih na VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D in PIGF. Funkcije VEGF podvrst so različne. Spremenjene koncentracije v serumu povezujejo z različnimi vrstami bolezni. Znižane vrednosti VEGF lahko napovejo tudi PE. (28)

PIGF je placentarni rastni faktor iz družine VEGF. Nahaja se na 14q24 kromosomu. Poznamo štiri izoforme PIGF, in sicer 1–4. Izražati se začne med zgodnjim razvojem zarodka. Ključno vlogo ima pri angiogenezi in vaskulogenezi, zlasti med embriogenezo. Glavni vir med nosečnostjo je placentarni trofoblast. Pri normalni nosečnosti se koncentracija PIGF v prvih dveh tromesečjih zvišuje, proti koncu nosečnosti se začne zmanjševati. V nizki koncentraciji se izraža tudi v številnih drugih tkivih, kot so srce, pljuča, ščitnica, skeletne mišice in maščobno tkivo pod normalnimi pogoji. Povezan je z aterosklerotičnimi lezijami in neovaskularno rastjo. (26)

sFlt-1 je podoben tirozin-kinazi-1, poznan tudi kot VEGFR receptor-1, na katerega se vežeta VEGF in PIGF. Izloča ga placenta. sFlt-1 zavira angiogenezo in zaradi tega pride pri povišanih koncentracijah do hipertenzije in proteinurije. Koncentracija sFlt-1 je pri normalni nosečnosti v prvih dveh tromesečjih nespremenjena, proti koncu nosečnosti se zvišuje. Pri PE ugotavljajo, da so vrednosti sFlt-1 zvišane, PIGF pa manjše kot pri običajni nosečnosti. Pri PE v drugem tromesečju krvni tlak obratno korelira z vrednostjo PIGF in korelira z razmerjem sFlt-1/PIGF. Bolnice s PE imajo bistveno večje razmerje sFlt-1/PIGF

kot običajne nosečnice. Ugotavljajo, da povečana vrednost sFlt-1 izvira iz posteljice, saj se vrednosti sFlt-1 bistveno znižajo 48 ur po porodu. (13)

Razmerje sFlt-1/PlGF nam daje koristne informacije o stanju in napredovanju PE in je primerno za izvajanje diagnostičnega algoritma. sFlt-1 in PlGF se merita na avtomatskih analizatorjih, ampak še vedno obstaja težava v občutljivosti metode. Ugotovili so, da se sFlt-1 poveča približno 5 tednov pred nastopom znakov PE. Pri ženskah, ki so kasneje razvile PE, so bile vrednosti PlGF bistveno nižje v 13.–16. tednu nosečnosti kot pri ostalih nosečnicah. Največje razlike znižanja PlGF so se pokazale nekaj tednov pred nastopom PE, ko se je zviševala vrednost sFlt-1. Največje razlike med vrednostmi PlGF in sFlt-1 se začnejo kazati nekaj tednov pred pojavom znakov PE in pri ženskah z zgodnjim pojavom PE. Nosečnice z nizkimi vrednostmi PlGF v zgodnji nosečnosti imajo večje možnosti za razvoj PE. (14, 16)

Izmerili so znižanje PlGF, povišanje inhibina A in sFlt-1 pri nosečnicah med 24. in 28. tednom, ki so kasneje razvile PE. V tej zvezi bi se lahko vsi trije parametri uporabljali za napovedovanje PE. (17)

2 NAMEN DELA

Preeklampsija je kompleksna bolezen nosečnic, ki jo je težko napovedati z biokemičnimi parametri. Pri bolezni sta ogrožena tako nosečnica kot plod. Merjene koncentracije inhibina A v drugem tromesečju je lahko parameter za napoved PE, prezgodnji porod in zastoj rasti ploda v maternici.

V raziskavo smo vključili 98 nosečnic. 64 jih je zbolelo za PE, ostalih 34 je zdravih nosečnic, ki se jim v času nosečnosti ni razvila PE, to skupino bomo uporabili za kontrolno skupino. Vsem smo izmerili koncentracijo inhibina A na analizatorju Access 2 Beckman Coulter.

Namen našega raziskovalnega dela je ugotoviti, ali je koncentracija inhibina A značilno povišana pri obolelih nosečnicah s PE v primerjavi s kontrolno skupino. Obolele nosečnice smo razdelili v dve skupini glede na potek bolezni. Skupini, ki imata bolezen, bomo primerjali s kontrolno skupino in skušali ugotoviti, ali je inhibin A primeren parameter za določanje PE. Za to metodo bomo izračunali diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost.

3 MATERIALI IN METODE

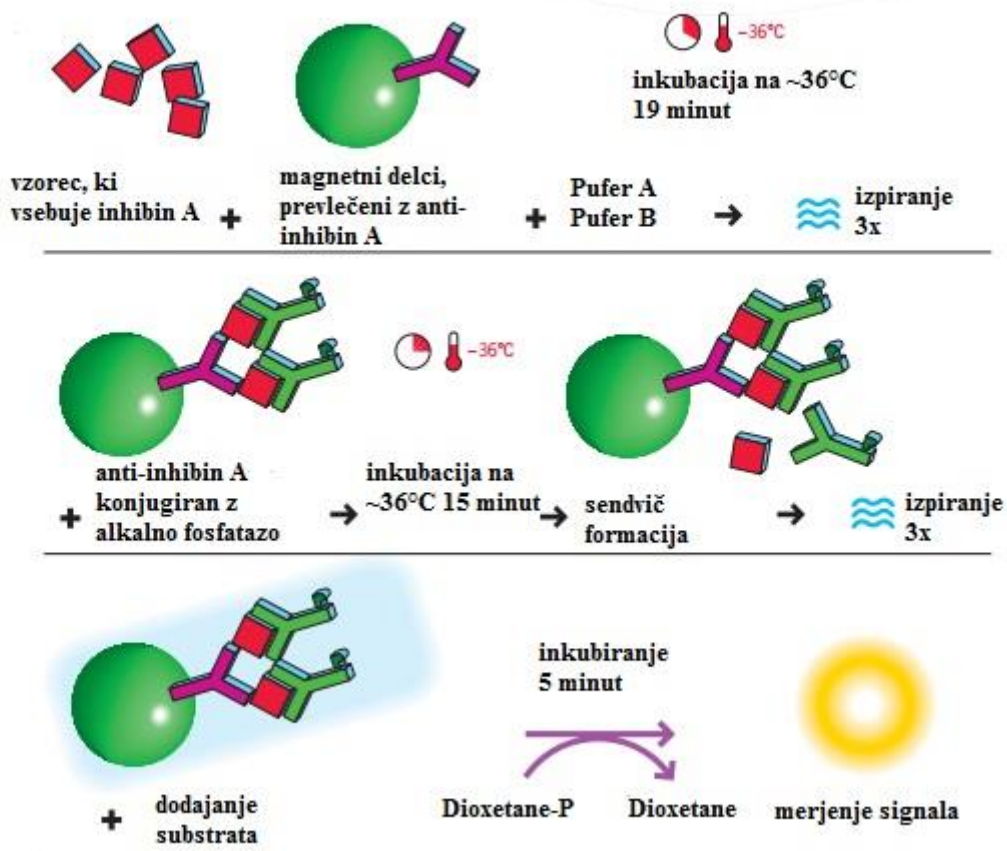
3.1 VZORCI

Uporabili smo 24 vzorcev nosečnic s potrjeno PE, 40 vzorcev nosečnic s PE, ki so imele hkrati IUGR (intrauterine growth restriction) – zastoj rasti ploda v maternici in 34 vzorcev zdravih nosečnic. Vzorci so bili odvzeti ob prvih znakih PE, v obdobju po 20. tednu nosečnosti in pred porodom. Kot kontrolno skupino smo vzeli vzorce zdravih nosečnic, pri katerih se v času nosečnosti ni razvila PE. Vzorci so se takoj po odvzemu centrifugirali, serum smo do analize shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 DOLOČANJE INHIBINA A Z DVOSTOPENJSKO METODO NA ANALIZATORJU

Test Inhibin A je dvostopenjski kemiluminiscenčni test (sendvič tehnika). Vzorec dodamo v reakcijsko posodo in inkubiramo skupaj z magnetnimi delci prevlečenimi z monoklonskim protitelesom anti- inhibin A. Presežek vzorcev in reagentov po inkubaciji odstranimo s spiranjem. Po spiranju dodamo k reakciji anti-inhibin A monoklonsko protitelo, konjugirano z alkalno fosfatazo, ki se veže na inhibin A iz vzorca, ki se je predhodno vezal na magnetne delce. Po inkubaciji v reakcijski posodi speremo nevezane materiale. Ostanje vezani materiali na magnetnih delcih. Nato dodamo v reakcijsko posodo kemiluminiscenčni substrat Lumi-Phos* 530. Svetlobo, ki se ustvari, merimo s luminometrom. Izmerjena svetloba je direktno proporcionalna koncentraciji inhibina A v vzorcu. Količino analita določimo iz večtočkovne kalibracijske krivulje, ki je shranjena v analizatorju. Vse stopnje se dogajajo v zaprtem sistemu analizatorja Access 2 Beckman Coulter. (29)

2-stopenjska sendvič tehnika



Slika 4: Shematski prikaz določanja inhibina A z dvostopenjsko sendvič tehniko.

3.2.1 PRIPRAVA ANALIZATORJA ZA IZVEDBO TESTA

Pred pričetkom dela na analizatorju je potrebno preveriti, ali je v analizatorju dovolj reagenta, izpiralnega pufra, reakcijskih posodic in ali sta tekoči in trdi odpad izpraznjena. Vsakodnevno je potrebno izvesti dnevno čiščenje in enkrat na teden tedensko čiščenje.

3.2.1.1 PRIPRAVA REAGENTA

Access Inhibin A reagentni paket vsebuje reagente, ki so že pripravljene za uporabo. Imamo 5 različnih reagenčnih stekleničk:

- R1a – magnetni delci prekriti z mišjimi monoklonalnimi anti-inhibin A protitelesi,
- R1b – mišji monoklonalni anti-inhibin A, konjugiran z alkalno fosfatazo,
- R1c – TRIS pufer,
- R1d – fosfatni pufer, oksidant,
- R1e – TRIS pufer, detergent.

Reagente shranjujemo na 2 do 8 °C. Pred uporabo na analizatorju jim odstranimo pokrove in jih vstavimo v stojalo, namenjeno za reagente.

3.2.1.2 KALIBRACIJA

Kvantitativna kalibracija je postopek, pri katerem vzorcu z znano koncentracijo analita (tovarniško pripravljen kalibrator) analizator izmeri koncentracijo analita. Na podlagi razmerja med izmerjenimi vrednostmi in podanimi vrednostmi se izriše kalibracijska umeritvena krivulja. Krivulja se uporablja za pretvorbo RLU (Relative Light Unit) meritve vzorcev preiskovancev v kvantitativno koncentracijo analita. Kalibracijo izvedemo ob vsakem novem lotu reagenta, vsakih 28 dni, po servisu analizatorja ali če izpadejo komercialne kontrole iz podanega območja. Pri testu inhibin A imamo 7 kalibratorjev različnih koncentracij – en nima merjenega analita, ostali so koncentracij 10, 50, 100, 500, 1000, 1500 ng/L. Analizator meri kalibratorje v dvojniku.

3.2.1.3 KOMERCIALNE KONTROLE

Vsak dan pred izvedbo testa je potrebno testirati komercialne kontrole, ki jih proizvajalec podaja za test. S tem preverimo reagentovo pravilno zaznavanje analita. Kontrole morajo biti v podanem območju, ki ga navaja proizvajalec. Če rezultati kontrol izpadejo, je potrebno reagent ponovno kalibrirati. Kontrole za inhibin A so v treh različnih koncentracijskih območjih, in sicer 150, 400, 800 ng/L.

3.2.1.4 PRIPRAVA VZORCEV

Po odvzemu smo počakali, da so vzorci dobro koagulirali, nato smo jih centrifugirali. Odpipetirali smo serum in ga zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred analizo smo vzorce odtalili in jih dobro premešali. Vzorce smo vstavili v posebno stojalo, ki je namenjeno vzorcem. Stojalo smo vstavili v analizator, kjer smo označili, kateri test naj analizator opravi določenemu vzorcu. Analizator uporabi za eno meritev $70\text{ }\mu\text{L}$ vzorca. Analizator avtomatsko podaja rezultate, ki so podani v ng/L. Najvišja izmerjena koncentracija je bila $1521,1\text{ ng/L}$.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo smo uporabili dva statistična programa, in sicer Microsoft Excel 2010 in IBM SPSS 20.0. S programom Microsoft Excel smo naredili predvsem deskriptivno statistiko in izrisali grafe. S programom IBM SPSS 20.0 smo naredili Kolmogorov-Smirnovim test, da smo ugotovili porazdelitev vzorcev, z Mann-Whitneyevim U testom smo testirali statistično povezavo med skupinami, z ROC krivuljo smo izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost metode.

4 REZULTATI

4.1 PREISKOVANCI

V raziskavo je bilo vključenih 34 zdravih nosečnic (34,7 %) kot kontrolna skupina in 64 nosečnic s potrjeno PE (65,3 %), ki smo jih uporabili kot testno skupino. Testno skupino smo razdelili na nosečnice, ki so zbolele za PE in nosečnice, ki so zbolele za PE in imele hkrati IUGR (intrauterine growth restriction)—zastoj rasti ploda v maternici.

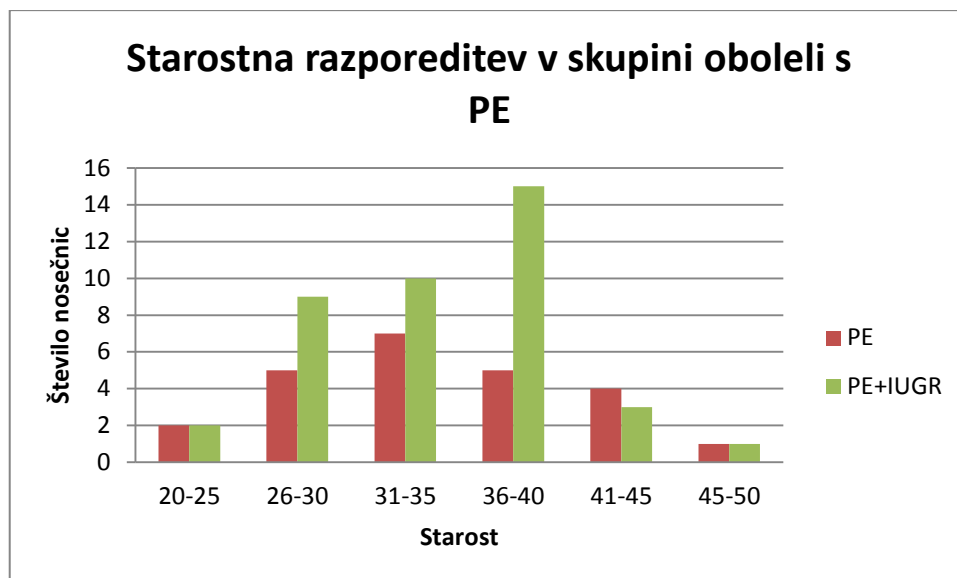
Preglednica IV: Opis preiskovancev.

Skupine		Število preiskovancev	Delež glede na vse preiskovance
Testna skupina	Nosečnice s PE	24	24,5 %
	Nosečnice s PE in IUGR	40	40,8 %
Kontrolna skupina	Zdrave nosečnice	34	34,7 %

Nosečnice, vključene v raziskavo, so bile stare od 23 do 50 let. V kontrolni skupini je povprečna starost 32,9 let, v skupini, oboleli za PE, 34,5 let.



Slika 5: Število nosečnic v kontrolni skupini razporejenih v starostne skupine.



Slika 6: Število nosečnic obolelih s PE razporejenih v starostno skupino.

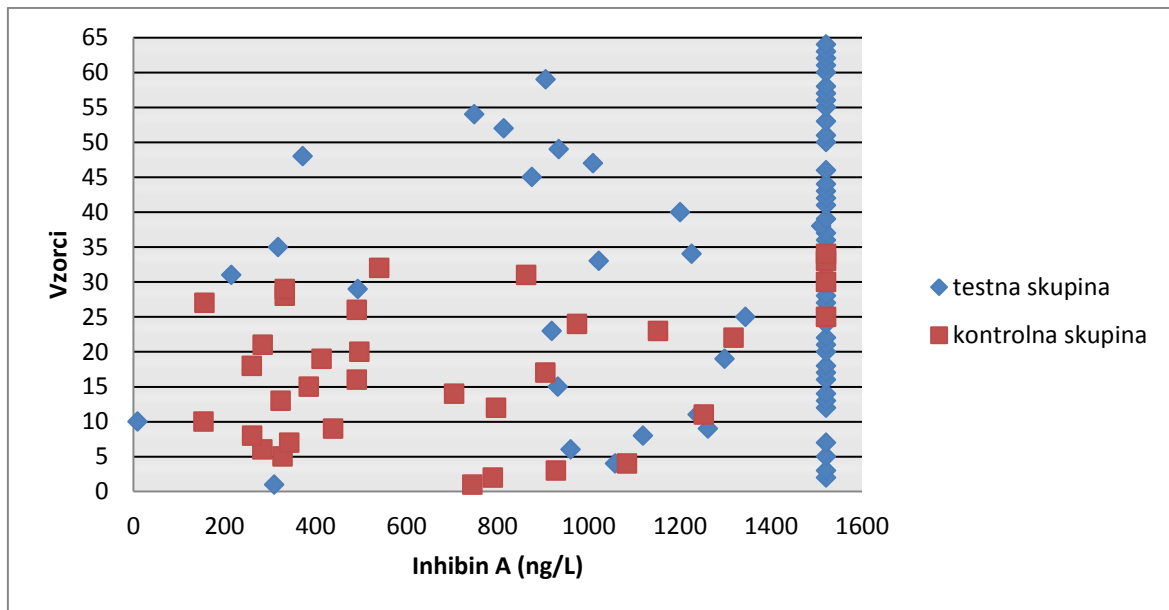
4.2 VREDNOSTI INHIBINA A

Skupno število meritev inhibina A je bilo 98. Izračunali smo povprečno vrednost, mediano in medkvartilni interval vsaki skupini posebej. Izračunane vrednosti so predstavljene v preglednici V.

Preglednica V: Povprečna vrednost, mediana in kvartil inhibina A.

Inhibina A (ng/L)	POVPREČNA VREDNOST	MEDIANA	KVARTIL (1. IN 3.)	MEDKVARTILNI INTERVAL
Kontrolna skupina	703,16	518	332 - 963	631
PE skupina	1313,21	1521,1	990 - 1521	531
PE+ IUGR skupina	1247,55	1521,1	1104 - 1521	417

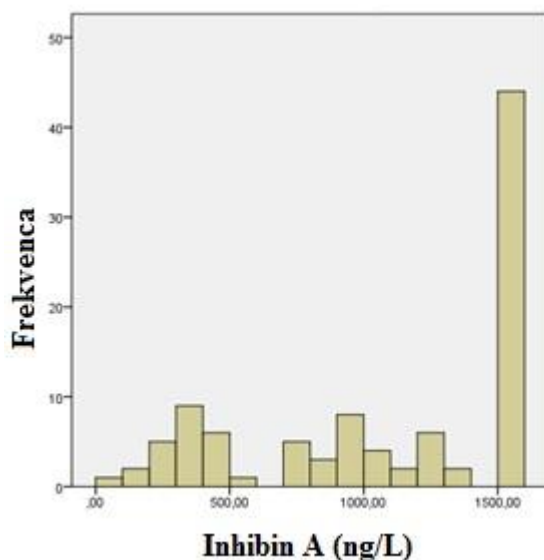
Vrednosti inhibina A smo predstavili tudi z razsevnim diagramom za vsak vzorec posebej.



Slika 7: Razsewni diagram vseh vzorcev, ki smo jim merili koncentracijo inhibina A.

4.3 PORAZDELITEV VZORCEV

Pomemben pogoj za izbiro ustreznega statističnega testa je porazdelitev vzorcev. Porazdelitev vzorcev smo naredili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Test primerja srednje vrednosti in standardne odklone naših meritev s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni normalno porazdeljene meritve. (30) Postavili smo si ničelno hipotezo: vzorci imajo normalno razporeditev in alternativno hipotezo: vzorci nimajo normalne razporeditve. Upoštevali smo stopnjo tveganja $\alpha=0,05$. Vrednost Sig. (p) je bila manjša od 0,001, kar velja da je $p<\alpha$. Sprejeli smo alternativno hipotezo, kar pomeni, da naši vzorci nimajo normalne razporeditve.



Slika 8: Porazdelitev vzorcev, ki ni normalna.

4.4 ANALIZA VARIANCE

Analizo variance smo opravili s Kruskal-Wallisovim testom, da smo ugotovili ali obstajajo statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi kontrolne skupine in skupine obolele z PE (obe skupini PE in PE+IUGR smo združili). Postavili smo si ničelno hipotezo: med skupinama ni statistično značilne razlike in alternativno hipotezo: med skupinami obstajajo statistično značilne razlike. Vrednost Sig. (p) je manjša kot 0,001. Z

upoštevanjem stopnje tveganja $\alpha=0,05$ smo ugotovili, da je $p<\alpha$. Sprejeli smo alternativno hipotezo, kar pomeni, da obstajajo statistično značilne razlike med skupinama.

	Inhibin A [ng/L]
Chi-Square	30,020
df	2
Asymp. Sig.	,000

Slika 9: Izpis Kruskal-Wallisovega testa iz SPSS programa.

4.5 UGOTAVLJANJE ZNAČILNIH RAZLIK MED SKUPINAMI Z NEPARAMETRIČNIM TESTOM

Za ugotavljanje značilnih razlik med skupinami smo uporabili Mann-Whitneyev U. Test se uporablja za neodvisne vzorce, ko spremenljivka ni normalno razporejena. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov. (30) Najprej smo primerjali kontrolno skupino s PE skupino, nato kontrolno skupino s PE+IUGR skupino ter PE in PE+IUGR skupini med sabo. Pri vseh primerjavah smo postavili ničelno hipotezo: med skupinami ni statistično značilnih razlik in alternativno hipotezo: med skupinami obstajajo statistično značilne razlike. Ob medsebojni primerjavi treh skupin je večja verjetnost, da pride do napake prve stopnje in da napačno zavrnemo ničelno hipotezo. Zato smo uporabili Bonferronijev popravek, ki pravi, da je:

$$\alpha_C = \alpha/k$$

α_C : stopnja tveganja z upoštevanjem Bonferronijevega popravka

α : stopnja tveganja

k: število primerjav

Stopnja tveganja z upoštevanjem Bonferronijevega popravka, ki jo bomo upoštevali, je $\alpha=0,02$.

- **Kontrolna skupina in PE skupina**

Skupina		Št.	Mean Rank	Sum of Ranks
Inhibin A [ng/L]	kontrola	34	21,06	716,00
	PE	24	41,46	995,00
	Skupaj	58		

	Inhibin A [ng/L]
Mann-Whitney U	121,000
Wilcoxon W	716,000
Z	-4,642
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

Slika 10: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava kontrolne in PE skupine.

Sig. (p) je manjša od 0,001, kar pomeni, da je $p < \alpha$. Sprejeli smo alternativno hipotezo, kar pomeni, da obstajajo statistično značilne razlike med kontrolno in PE skupino.

- **Kontrolna skupina in PE+IUGR skupina**

Skupina		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Inhibin A [ng/L]	kontrola	34	25,47	866,00
	PE+IUGR	40	47,73	1909,00
	Total	74		

	Inhibin A [ng/L]
Mann-Whitney U	271,000
Wilcoxon W	866,000
Z	-4,536
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

Slika 11: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava kontrolne in PE+IUGR skupine.

Sig. (p) je manjša od 0,001, kar pomeni, da je $p < \alpha$. Sprejeli smo alternativno hipotezo, kar pomeni, da obstajajo statistično značilne razlike med kontrolno in PE+IUGR skupino.

- **Skupina PE in PE+IUGR**

	Skupina	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Inhibin A [ng/L]	PEIUGR	40	31,20	1248,00
	PE	24	34,67	832,00
	Total	64		

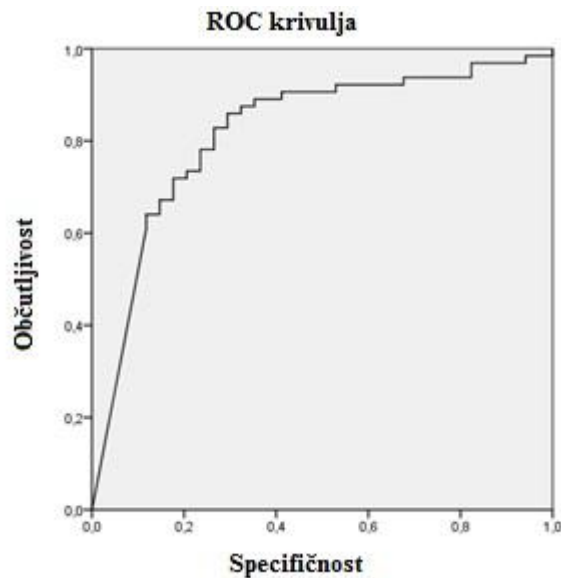
	Inhibin A [ng/L]
Mann-Whitney U	428,000
Wilcoxon W	1248,000
Z	-,820
Asymp. Sig. (2-tailed)	,412

Slika 12: Izpis Mann-Whitney U testa iz SPSS, primerjava PE in PE+IUGR skupine.

Sig. (p) je 0,412, kar pomeni, da je večja od stopnje tveganja $\alpha=0,02$. Privzeli smo ničelno hipotezo, kar pomeni, da ne obstajajo statistično značilne razlike med skupinama.

4.6 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Z ROC krivuljo smo določili cut-off vrednost, specifičnost in občutljivost metode za inhibin A pri PE.



Slika 13: ROC krivulja iz SPSS, za inhibin A.

Preglednica VI: Cut-off in AUC pridobljeni z ROC krivuljo.

CUT-OFF	905
AUC	0,820

Iz vrednosti cut-off bomo prešteli, koliko rezultatov je lažno pozitivnih, lažno negativnih, pravilno pozitivnih in pravilno negativnih. Iz dobljeni podatkov bomo izračunali specifičnost in občutljivost metode za inhibin A.

Preglednica VII: Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti.

INHIBIN A	PRISOTNA PREEKLAMPSIJA	NI PREEKLAMPSIJE
POZITIVEN	PP=55	LP=10
NEGATIVEN	LN=9	PN=24

Formula za izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti:

DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST: $(PP \times 100) / (PP + LN)$

DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST: $(PN \times 100) / (PN + LP)$

PP: pravilno pozitiven rezultat. Pri nosečnicah, ki imajo PE in je vrednost inhibina A višja od cut-off-a.

LN: lažno negativen rezultat. Pri nosečnicah, ki imajo PE in je vrednost inhibina A nižja od cut-off.

PN: pravilno negativen rezultat. Pri zdravih nosečnicah, vrednost inhibina A nižja od cut-off.

LP: lažno pozitiven rezultat. Pri zdravih nosečnicah, vrednost inhibina A višja od cut-off.

Preglednica VIII: Občutljivost in specifičnost za inhibin A.

OBČUTLJIVOST	SPECIFIČNOST
85,9 %	70,6 %

5 RAZPRAVA

Povišane vrednosti inhibina A med nosečnostjo povezujejo s PE, prezgodnjim porodom in zastojem rasti ploda v maternici.

V naši nalogi smo določili koncentracijo inhibina A 98-im nosečnicam. 64 nosečnic je imelo potrjeno diagnozo PE, kot kontrolno skupino pa smo uporabili 34 vzorcev naključno izbranih zdravih nosečnic. Koncentracijo inhibina A smo merili s kemiluminiscenčno metodo (2-stopenjsko sendvič tehniko). Nosečnice s PE smo razdelili na dve skupini, in sicer PE (ki so imele samo PE) in PE+IUGR (PE in hkrati zastoj rasti ploda v maternici).

Nosečnice so bile primerljive glede na teden nosečnosti in starost. Starostna skupina preiskovank je bila od 23 do 50 let. V kontrolni skupini je povprečna starost nosečnic 32,9 let, v skupini oboleli s PE 34,5 let. Večja ogroženost za nastanek PE je pri starejših ali zelo mladih nosečnicah.

Srednja vrednost koncentracije inhibina A v kontrolni skupini je bila 703,16 ng/L, v PE skupini 1312,21 ng/L in v PE+IUGR skupini 1247,55 ng/L. Vidimo, da je povprečna vrednost inhibina A v testni skupini bistveno večja kot v kontrolni skupini.

Vse tri skupine smo primerjali med sabo, da bi ugotovili, ali je kakšna statistična razlika med njimi. Najprej smo naredili porazdelitev vzorcev s Kolmogorov-Smirnovim testom, da bi videli, ali gre za normalno ali nenormalno porazdelitev. Porazdelitev vpliva na nadaljnji izbor statističnih testov za primerjavo skupin. Dobili smo nenormalno porazdelitev, zato smo naredili analizo variance s Kruskal-Wallisovim testom med kontrolno in testno (združili smo PE in PE+IUGR skupino) skupino. Analiza je pokazala, da obstajajo razlike med skupinama. Ker obstajajo razlike med skupinama, smo z Mann-Whitneyevim U testom primerjali kontrolno skupino s PE skupino, kontrolno skupino s PE+IUGR skupino in PE skupino s PE+IUGR skupino.

Zaradi primerjave treh skupin med sabo smo uporabili Bonferronijev popravek. To je metoda za preprečevanje nastanka napake pri primerjavi neenakosti več skupin. Statistična sklepanja običajno temeljijo na zavrnitvi ničelne hipoteze. Problem številčnosti izhaja iz dejstva, da smo s povečanjem števila hipotez, ki jih preizkušamo, povečali verjetnost napačne zavrnitve ničelne hipoteze (napaka tipa I). Bonferronijev popravek pravi, da je potrebno stopnjo tveganja α deliti s številom primerjav. (31) V našem primeru smo dobili

stopnjo tveganja z upoštevanim popravkom 0,02. Pri vseh primerjavah z Mann-Whitneyevim U testom smo upoštevali korekcijsko stopnjo tveganja ($\alpha=0,02$).

Pri primerjavi kontrolne skupine in PE skupine smo ugotovili, da obstajajo statistične razlike med skupinama, prav tako pri primerjavi kontrolne in PE+IUGR skupine. To pomeni, da so zdrave nosečnice imele bistveno nižje vrednosti inhibina A kot nosečnice obolele s PE. Primerjava PE in PE+IUGR skupine je pokazala, da statistične razlike ne obstajajo. Skupini sta imeli primerljive vrednosti inhibina A.

V drugem delu raziskave smo naredili ROC krivuljo. Pridobili smo podatek cut-off in vrednost AUC (površina pod krivuljo). Vrednost AUC nam pove, kako dobro metoda loči med zdravo in bolno populacijo. Vodnik za določanje uporabnosti diagnostične metode je naslednja razvrstitev: (32)

Preglednica IX: Uporabnost diagnostične metode.

VREDNOST AUC	Uporabnost diagnostične metode
1–0,9	Zelo dobra
0,9–0,8	Dobra
0,8–0,7	Srednja
0,7–0,6	Slaba
0,6–0,5	Neuporabna

Dobili smo podatek, da je AUC 0,82, kar pomeni, da naša diagnostična metoda dobro loči med zdravo in bolno populacijo.

Z ROC krivuljo smo pridobili tudi vrednost cut-off in tako smo lahko izračunali, koliko imamo lažno pozitivnih, lažno negativnih, pravilno pozitivnih in pravilno negativnih vrednosti. Lažno negativnih rezultatov je bilo 9, lažno pozitivnih pa 10. Na podlagi teh rezultatov smo izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost. Občutljivost je število pravilno pozitivnih rezultatov v skupini preiskovancev, ki imajo bolezen. Specifičnost je število pravilno negativnih rezultatov v skupini preiskovancev, ki nimajo bolezni. Naša diagnostična občutljivost je 85,9 % in specifičnost 70,6 %. Visoka občutljivost je lastnost dobrega presejalnega testa.

Rezultate naše analize težko primerjamo z drugimi študijami, ker so koncentracijo inhibina A večinoma merili z ELISA testi. Za primerjavo bomo prikazali nekaj raziskav, ki so jih naredili po svetu. Študija iz Indije, kjer so leta 2012 primerjali zdrave nosečnice in obolele s PE: V vsaki skupini je bilo 36 nosečnic. Ugotovili so, da je srednja vrednost koncentracije inhibina A pri testni skupini (1,373ng/L) večja kot pri kontrolni skupini (1160,2 ng/L), ampak statistične razlike med skupinama ne obstajajo. Laivuori in sodelavci so v študiji primerjave dobili srednjo vrednost inhibina A pri kontrolni skupini 882 ng/L, pri testni pa 1691 ng/L, kar je bistveno večja razlika med skupinama. Slednje so dokazali s statističnim testom in izidom, da obstaja statistična razlika med skupinama. Krissada in sodelavci so tudi dokazali, da je inhibin A signifikantno višji pri testni kot pri kontrolni skupini. Cuckle in sodelavci so preučevali 28 žensk v 13.–18. tednu nosečnosti in ugotovili, da je statistično zvišana koncentracija inhibina A pri nosečnicah, pri katerih se je kasneje razvila PE. S to študijo so prišli do zaključka, da zvišane koncentracije inhibina A napovedujejo PE mesec pred pojavom simptomov. (19)

V študiji, kjer so merili koncentracijo inhibina A pri nosečnicah s kronično hipertenzijo, so izračunali občutljivost in specifičnost metode za določanje inhibina A. Vključili so 61 nosečnic, od tega jih je razvila PE 21. Diagnostično občutljivost testa so dobili 38 %, specifičnost 95 %. Metodi direktno nista primerljivi, saj so merili koncentracijo z ELISA testom Serotec, Oxford, United Kingdom. (33).

Ree in sodelavci so med letoma 2005 in 2009 naredili študijo na 4746 nosečnicah med 15. in 26. tednom nosečnosti. Glede na vse zdravstvene zapise jih je 41 razvila PE. Merili so koncentracijo inhibina A in ostale parametre (alfa-fetoprotein, humani horionski gondotropin, nekonjugiran estriol). Koncentracija inhibina A je bila zelo povišana pri testni skupini napram kontrolni (1,76±2,68). AUC za inhibin A so dobili 0,715, občutljivost metode 60 %. Od vseh parametrov, ki so jih merili, so dobili z inhibinom A najboljše rezultate. (34)

Muttukrishna in sodelavci so merili koncentracijo inhibina A med celotno nosečnostjo, zdravim in obolelim s PE. Ugotovili so, da je koncentracija inhibina A pri zgodnjem pojavu PE bistveno višja kot pri zdravih nosečnicah. Po porodu je bila koncentracija pri vseh skupinah normalna. (35)

Phupong in sodelavci so leta 2007 v Bankoku merili koncentracijo inhibina A pri nosečnicah, ki so razvile hudo obliko PE in pri blagi obliki PE. Ugotovili so, da je

koncentracija inhibina A pri hudi obliki PE višja kot pri blagi obliki. Prišli so do zaključka, da inhibin A ni primeren za razlikovanje oblik PE, učinkovit je pa za dokazovanje PE. (36)

Lambert-Messerlian in sodelavci so merili koncentracijo inhibina A in druge parametre (PAPP-A, endoglina, VEGF, FLRG in PlGF) nosečnicam v prvem in drugem trimesečju nosečnosti. Naredili so korelacijo med vsemi parametri in prišli do zaključka, da je visoka korelacija med inhibinom A in VEGF v obeh trimestrih. Ugotovili so, da je inhibin A dober parameter za dokazovanje PE v drugem trimesečju nosečnosti. (37)

Študije po svetu prikazujejo, da je inhibin A primeren parameter za ugotavljanje PE pred pojavom simptomov. V naši nalogi smo dobili visoko vrednost diagnostične občutljivosti in specifičnosti, kar pomeni, da bi bil test primeren za presejalno testiranje nosečnic na PE. Vsemu navkljub bi bilo potrebno testirati še večje število nosečnic v zgodnejši nosečnosti pred pojavom znakov PE in spremljati vrednosti inhibina A. Tako bi lahko postavili mejne vrednosti in na podlagi le-teh spremljali in preprečevali pojav PE.

6 SKLEP

Sklepi naše magistrske naloge so naslednji:

- S primerjavo koncentracije inhibina A med kontrolno in obolelo skupino smo ugotovili, da je koncentracija pri oboleli skupini statistično povišana.
- Metoda je pokazala 86 % diagnostično občutljivost in 71 % specifičnost za inhibin A pri PE. Diagnostična občutljivost je dobra in bi metodo lahko uporabljali kot presejalni test.
- Merjenje koncentracije inhibina A bi bilo potrebno izvesti še na večjem številu nosečnic, predvsem pri nosečnicah, ki imajo povišan krvni tlak, nimajo pa še znakov PE.
- Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati še vrednosti drugih parametrov, anamnestične podatke in druge diagnostične metode. Skupaj z vsemi podatki bomo lahko bolj pravilno napovedali bolezen in jo zdravili.

7 LITERATURA

1. <http://womenshealth.gov/pregnancy/you-are-pregnant/stages-of-pregnancy.html>
(dostopano 8. 1. 2016)
2. <http://www.cdc.gov/reproductivehealth/maternalinfanthealth/pregcomplications.htm>
(dostopano 10. 1. 2016)
3. <http://www.merckmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/pregnancy-complicated-by-disease/introduction-to-pregnancy-complicated-by-disease>
(dostopano 13. 1. 2016)
4. Pajntar M, Novak-Antolič Ž: Nosečnost in vodenje poroda, 2. dopolnjena izdaja, Cankarjeva založba, Ljubljana, 2004: 60–64.
5. Rogers V.L., Worley K.C. (2014). Obstetrics & Obstetric Disorders. In Papadakis M.A., McPhee S.J., Rabow M.W. (Eds), Current Medical Diagnosis & Treatment 2015. Retrieved December 02, 2015.
<http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1019&Sectionid=57668>
(dostopano 2. 2. 2016)
6. Martins D, Norris K, Podymow T, August P (2009). Chapter 43. Hypertension in High-Risk Populations. In Lerma E.V., Berns J.S., Nissenson A.R. (Eds), CURRENT Diagnosis & Treatment: Nephrology & Hypertension. Retrieved December 02, 2015 .
<http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=372&Sectionid=39961183>
(dostopano 2. 2. 2016)
7. https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/hbp_preg_archive.pdf (dostopano 2. 2. 2016)

8. Đelmiš J: Hipertenzija i trudnoća, *Liječnički Vjesnik* 2006, 128: 357–68.
9. Martin E, Ray PD, Smeester L, Grace MR, Boggess K, Fry RC: Epigenetics and Preeclampsia: Defining Functional Epimutations in the Preeclamptic Placenta Related to the TGF- β Pathway, *Plos One* 2015, 1–14.
10. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi AS, Quaggin S, Dechend R, Luft FC: New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia, *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15: 2440–48.
11. Osredkar J, Vodušek Fabjan V, Premru-Sršen T, Pungartnik D, Suhadolc K: Biokemični, žilni in ultrazvočni označevalci za zaplete zaradi zvišanega krvnega tlaka v nosečnosti, *6. Jesenovčevi dnevi* 2014; 16–33.
12. Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N: Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* 2003; 82: 797–802.
13. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillmann IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation* 2003;111: 649–58.
14. Verlohren S, Stepan H, Dechend R: Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clinical Science* 2012; 122: 43–52.
15. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP: Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology* 2008; 294: 541–550.

16. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi AS: Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350: 672–683.
17. Sibai BM, Koch MA, Freire S, Pinto e Silva JL, Cunha Rudge MV, Martins-Costa S, Bartz J; de Barros Santos C, Guilherme Cecatti J, Costa R, Ramos JG, MD; Spinnato JA: Serum inhibin A and angiogenic factor levels in pregnancies with previous preeclampsia and/or chronic hypertension: are they useful markers for prediction of subsequent preeclampsia? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2008; 199: 268.e1–268.e9.
18. Florio P, Reis FM, Pezzani I, Luisi S, Severi FM, Petraglia F: The addition of activin A and inhibin A measurement to uterine artery Doppler velocimetry to improve the early prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2003. 21: 165–169.
19. Vana H, Thunga S: A comparison between serum inhibin A levels in pre-eclampsia and normotensive pregnancy. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research* 2012. 3: 147–151.
20. Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012, 63: 153–160.
21. Wu CS, Nohr EA, Bech BH, Vestergaard M, Catov JM, Olsen J: Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009, 201:269.e1–10.
22. <http://www.bambino.si/preeklampsija-%E2%80%93nove-smernice-za-strokovno-osebje.html> (dostopano 15. 2. 2016)
23. Štiblar Martinčič D: Embriologija človeka. Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Maribor 2011, 21–24.

24. Phupong V, Hanprasertpong T, Honsawek S: First trimester serum inhibin A in normal pregnant women. *Archives of Obstetrics and Gynecology* 2008, 277: 307–10.
25. Shin-Young K, Hyun-Mee R, Jae-Hyug Y, Moon-Young K, Hyun-Kyong A, Joong-Sik S, Jun-Seek C, So-Yeon P, Jin-Mi K, Bom-Yi L, Do-Jin K: Maternal Serum and Amniotic Fluid Inhibin A Levels in Women who Subsequently Develop Severe Preeclampsia. *Journal of Korean Medical Science* 2006, 21: 452–456.
26. De Falco S: The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental and Molecular Medicine* 2012, 44:1–9.
27. Florio P, Severi FM, Bocchi C, Luisi S, Mazzini M, Danero S, Torricelli M, Petraglia F: Single Serum Activin A Testing to Predict Ectopic Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007, 92:1748–53.
28. https://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor (dostopano 5. 3. 2016)
29. Navodila za uporabo: Access Immunoassay systems Inhibin A, Beckman Coulter.
30. Bastič M: Metode raziskovanja. Univerza v Mariboru, Ekonomsko-poslovna fakulteta Maribor. <http://shrani.si/f/2J/WJ/1HkYy8qF/file.pdf> (dostopano 10. 5. 2016)
31. https://en.wikipedia.org/wiki/Bonferroni_correction (dostopano 10. 5. 2016)
32. <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm> (dostopano 10. 5. 2016)

33. Zeeman GG, Alexander JM, McIntire DD, Byrd W, Leveno K J: Inhibin-A and Superimposed Preeclampsia in Women With Chronic Hypertension. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003, 101: 232–36.
34. Ree PH, Hahn WB, Chang SW, Jung SH, Kang JH, Cha DH, Kang MS, Huh JY: Early detection of preeclampsia using inhibin a and other second-trimester serum markers. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2011, 29: 280–86.
35. Muttukrishna S, North RA, Morris J, Schellenberg JC, Taylor RS, Asselin J, Ledger W, Groome N, Redman CWG: Serum inhibin A and activin A are elevated prior to the onset of pre-eclampsia. *Human Reproduction* 2000, 15:1640–45.
36. Phupong V, Pawaiwananupant K, Honsawek S: Inhibin A levels and severity of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009, 280:183–186.
37. Lambert-Messerlian G, Eklund EE, Chien K, Rosene-Montella K, Neveux LM, Haddow HRM, Palomaki GE: Use of first or second trimester serum markers, or both, to predict preeclampsia. *Journal of Women's Cardiovascular Health* 2014, 4: 271–278.

PRILOGA

Rezultati meritev:

- **Kontrolna skupina:**

Preiskovanka	Starost	Vrednosti inhibina A (ng/L)
1	40	744,45
2	39	789,56
3	36	927,8
4	36	1083,81
5	32	327,35
6	33	283,46
7	35	342,19
8	28	260,58
9	36	438,53
10	27	153,71
11	34	1252,89
12	32	796,36
13	37	323,41
14	27	704,5
15	23	385,6
16	39	490,66
17	35	904,61
18	27	260,24
19	33	413,63
20	27	496,11
21	29	283,76
22	34	1318,53
23	30	1152,22
24	31	974,52
25	31	1521,1
26	35	490,68
27	37	156,37
28	27	332,26
29	34	332,24
30	40	1521,1
31	35	862,81
32	30	540,15
33	37	1521,1
34	31	1521,1

- **PE skupina:**

Preiskovanka	Starost	Vrednosti inhibina A (ng/L)
1	28	1521,1
2	41	1521,1
3	40	1521,1
4	31	1521,1
5	37	874,97
6	35	1521,1
7	27	1009,36
8	38	371,89
9	33	934,51
10	46	1521,1
11	32	1521,1
12	28	813,21
13	25	1521,1
14	42	748,97
15	43	1521,1
16	40	1521,1
17	41	1521,1
18	32	1521,1
19	37	905,31
20	26	1521,1
21	30	1521,1
22	31	1521,1
23	25	1521,1
24	32	1521,1

- **PE+IUGR skupina:**

Preiskovanka	Starost	Vrednosti inhibina A (ng/L)
1	39	309,59
2	22	1521,1
3	36	1521,1
4	28	1058,39
5	29	1521,1
6	36	960,23
7	42	1521,1
8	39	1119,35
9	33	1261,71
10	44	8,82
11	40	1239,43
12	37	1521,1
13	33	1521,1
14	30	1521,1
15	36	932,04
16	30	1521,1
17	35	1521,1
18	36	1521,1
19	34	1298,45
20	35	1521,1
21	49	1521,1
22	29	1521,1
23	37	918,85
24	40	1521,1
25	31	1344,46
26	34	1521,1
27	26	1521,1
28	41	1521,1
29	40	492,81
30	38	1521,1
31	37	215,15
32	34	1521,1
33	35	1022,32
34	38	1226,29
35	40	317,8
36	28	1521,1
37	28	1521,1
38	33	1511,09
39	29	1521,1