

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO  
VISOKOŠOLSKI PROGRAM LABORATORISJKE BIOMEDICINE

Iva BLATNIK

**Z NOSEČNOSTJO POVEZAN PLAZEMSKI PROTEIN A  
KOT NAPOVEDNI DEJAVNIK ZA HIPERTENZIJO V  
NOSEČNOSTI**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski študij

**PREGNANCY ASSOCIATED PLASMA PROTEIN A AS A  
PROGNOSTIC FACTOR FOR HYPERTENSION IN  
PREGNANCY**

GRADUATION THESIS  
Higher education

Ljubljana, 2010



Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Klinični center Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju za strokovno pomoč ter svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Za pomoč se zahvaljujem tudi Stanki Cankar iz Laboratorija za analitiko hormonov in tumorskih markerjev. Hvala tudi vsem domačim, prijateljem in partnerju za spodbudo v času študija.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Ljubljana, junij 2010

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>II</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VIII</b>
<b>I. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1. NOSEČNOST NORMALNA .....	1
1. 1. Menstruacijski cikel .....	1
1. 2. Razvoj semenčic .....	2
1. 3. Ženski spolni hormoni in ovulacija .....	3
1. 4. Oploditev in ugnezdenje .....	5
1. 5. Pomen placente .....	6
1. 6. Razvoj ploda .....	7
1. 7. Spremembe na telesu nosečnice .....	8
2. NOSEČNOST ZAPLETI .....	10
2. 1. Hipertenzija .....	10
2. 1. 1. Hipertenzija v nosečnosti .....	10
2. 1. 2. Klasifikacija hipertenzije v nosečnosti .....	11
2. 2. Preeklampsija .....	13
2. 2. 1. Dejavniki, ki vplivajo na nastanek preeklampsije .....	15
2. 3. HELLP sindrom .....	16
2. 4. Eklampsija .....	16
3. DIAGNOSTIČNE ZMOŽNOSTI ZA ODKRIVANJE PREEKLAMPSIJE ..	17
3. 1. Diagnostični testi, ki slonijo na spremenjeni občutljivosti žilne stene na vazoaktivne snovi .....	17
3. 2. Ultrazvočna preiskava pretoka krvi v maternični arteriji .....	18

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

3. 3.	Laboratorijske preiskave .....	18
4.	MOŽNI BIOKEMIČNI KAZALCI ZA NAPOVEDOVANJE PREEKLAMPSIJE .....	20
4. 1.	PIGF, VEGF .....	20
4. 2.	hPGF .....	21
4. 3.	PP-13 .....	22
4. 4.	hCG .....	22
4. 5.	ICAM, VCAM .....	22
4. 6.	Aktivin A, inhibin A .....	23
4. 7.	Ostali označevalci .....	23
5.	Z NOSEČNOSTJO POVEZAN PLAZEMSKI PROTEIN A .....	24
5. 1.	Struktura PAPP-A .....	24
5. 2.	Sinteza in lokalizacija PAPP-A .....	25
5. 3.	Biološka funkcija PAPP-A .....	26
5. 4.	PAPP-A v nosečnosti .....	28
5. 5.	Klinična uporaba PAPP-A .....	29
<b>II.</b>	<b>NAMEN DELA .....</b>	<b>30</b>
<b>III.</b>	<b>PREISKOVANCI IN METODA DELA .....</b>	<b>31</b>
1.	OPIS SKUPINE PACIENTK .....	31
2.	METODA DELA .....	31
2. 1.	Instrumenti in oprema .....	31
2. 2.	Princip določanja PAPP-A .....	32
2. 3.	Reagenti, kalibratorji, kontrole .....	32
2. 4.	Kalibracija .....	33
2. 5.	Delovni postopek .....	33
2. 6.	Ponovljivost v seriji in izven serije .....	34
2. 7.	Referentne vrednosti PAPP-A v prvem tromesečju .....	35
<b>IV.</b>	<b>REZULTATI LABORATORIJSKIH MERITEV .....</b>	<b>36</b>

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

1.	STAROST IN VREDNOST PAPP-A NOSEČNIC .....	36
2.	STATISTIČNI IZRAČUNI .....	39
<b>V.</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	41
<b>VI.</b>	<b>SKLEP</b> .....	45
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	46

## POVZETEK

Čeprav je nosečnost normalno fiziološko stanje ženske, lahko privede do številnih zapletov, saj nosečnost spremljajo velike prilagoditve telesa na novo stanje. Eden od najpogostejših in nevarnih zapletov v nosečnosti so hipertenzivne bolezni. Večinski delež teh bolezni gre pripisati preeklampsiji, manjši delež pa preeksistentni kronični hipertenziji. Preeklampsija je multiorganska bolezen s še ne pojasnjenim vzrokom nastanka. Kaže se kot hipertenzija s proteinurijo in/ali edemom, ki se pojavi najpogosteje po 20. tednu nosečnosti. To bolezensko stanje v nosečnosti predstavlja velik problem, saj se lahko nosečnost konča tudi s smrtjo zarodka. Zaradi tega iščemo dejavnike, ki bi napovedali, da se bo med nosečnostjo razvila hipertenzija. Eden možnih biokemčnih označevalcev, ki bi napovedal razvoj hipertenzije v nosečnosti, bi lahko bil z nosečnostjo povezan plazemski protein A (PAPP-A). Z nosečnostjo povezan plazemski protein A je proteinaza odgovorna za cepitev kompleksa inzulinu podobnega rastnega faktorja vezanega na transportni protein 4 (IGFBP-4). Cepitev kompleksa povzroči sprostitvev inzulinu podobnega rastnega faktorja in njegovo aktivacijo. IGF v nosečnosti igra pomembno vlogo pri invaziji trofoblasta in pomaga pri zgodnjem razvoju in vaskularizaciji placente, kar je odločilno za njen razvoj in normalen potek nosečnosti. Kadar te dogodki ne potekajo pravilno, lahko privedejo do različnih bolezenskih stanj v nosečnosti in smrti ploda. Te dogodki so posledica zmanjšanega sproščanja IGF, ki se odraža v nizkih koncentracijah PAPP-A. V nalogi smo primerjali določitev PAPP-A s pojavom preeklampsije. 135 nosečnicam, ki so prišle v ambulantno ginekološke klinike na rutinski presejalni test za Dawnov sindrom v 14. tednu nosečnosti, smo določili vrednost PAPP-A. Koncentracija PAPP-A je bila izmerjena z analizatorjem BRAHMS Kryptor, ki deluje na principu fluorescence. Rezultati so pokazali, da je vrednost PAPP-A znižana pri 24,4 % preiskovankah, kar ne ustraja podatkom iz literature, tako da na osnovi naših rezultatov ne moremo trditi, da je PAPP-A dober napovednik za pojav preeklampsije. V literaturi je navedeno, da je pri nosečnicah starih 35 let ali več možnost za nastanek preeklampsije večja. Statistično smo primerjali srednje vrednosti PAPP-A nosečnic mlajših od 35 let z nosečnicami starih 35 let ali več ter ugotovili, da se vrednosti PAPP-A med skupinama bistveno ne razlikujeta. Enako primerjavo med skupinami smo opravili tudi z vrednostmi PAPP-A v določenem referentnem območju, ki daje enake rezultate kot prvi izračun.

## ABSTRACT

Although pregnancy is a normal physiological condition of a woman it can lead to many complications, because during the pregnancy body is accompanied by large adjustments to the new situation. One of the most common and dangerous complications during pregnancy are hypertensive diseases. Majority share of these diseases can be assigned to preeclampsia, minor share to pre-existent chronic hypertension. Preeclampsia is a multiorganic disease, where the cause of creation is still unknown. Most likely it breaks out because of mothers vascular response to placentation, actuated by incorrect invasion of the trophoblasts. It is shown as a hypertension with proteinuria and/or edema most often after 20<sup>th</sup> week of gestation. This medical condition represents a large problem in pregnancy, because it can also lead to fetal death. Therefore, we are searching for factors, that could predict the development of hypertension during pregnancy. One of the possible biochemical markers, that would predict the development of hypertension during pregnancy, could be pregnancy-associated plasma protein A (PAAP-A). PAAP-A is a proteinase responsible for cleavage of the insulin-like growth factor, bound to transport protein-4 complex (IGFBP-4), which causes the release of insulin-like growth factor and his activation. IGF plays an important role in trophoblast invasion during pregnancy and helps with early development and vascularization of the placenta, which is decisive for her progress and a normal course of pregnancy. When the course of events aren't proper, they can lead to various pathological conditions in pregnancy and fetal death. These occurrences are a consequence of the reduced release of IGF, which reflects in low concentrations of PAPP-A. In the assignment, we compared the determination of PAPP-A with the break out of preeclampsia. We determined the PAAP-A value of 135 pregnant women, when they came to dispensary of the gynaecological clinic for a routine screening test for the Down's syndrome in the 14<sup>th</sup> week of pregnancy. PAPP-A concentration was measured with Brahms Kryptor analyzer that operates on the principle of fluorescence. The results showed that the value of PAPP-A is decreased in 24.4% subjects, which is not suitable with the data in the literature, and therefore on the basis of our results we can't make an assertion that PAPP-A is a good predictor for the occurrence of preeclampsia. The literature indicates that in pregnant women aged 35 years or more the possibility of developing preeclampsia is bigger. We statistically compared middle values of PAPP-A of pregnant women younger than 35 years with those of pregnant women aged 35 years or



more, and ascertained that the levels of PAPP-A between the two groups do not differ significantly. The same comparison between groups was also carried out with the values of PAPP-A in a given reference areas, which gave the same results as the first calculation.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADA	Adenozin deaminaza
ADMA	Asimetrični dimetilarginin
Ag	Antigen
E	eklampsija
Flt 1	fms podoben tirozin kinazi 1
FSH	folikel stimulirajoč hormon
hCG	humani horinski gandotropin
hPGH	humani rastni placentni hormon
ICAM	intracelularne adhezijske molekule
IGF	inzulinu podoben rastni faktor (ang. Insulin like growth factor)
IGFBP	prenašalna beljakovina za inzulinu podoben rastni faktor (ang. Insulin like growth factor binding protein)
IU/L	mednarodna enota na liter (ang. International units per liter)
kDa	kiloDalton
KF	kalijev fluorid
KV	koeficient variacije
LH	luteinizirajoči hormon
LTH	luteotropni hormon
mmHg	milimetri živega srebra
NaOH	natrijev hidroksid
PAPP-A	z nosečnostjo povezan plazemski protein A (ang. Pregnancy-associated plasma protein A)
PE	preeklampsija
PIGF	placentni rastni faktor
PP-13	placentni protein 13
proMBP	bazni eozinofilni prorejin (ang. the proform of eosinophil major basic protein)

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

Pt	protitelo
RT PCR	reverzna transkripcija verižne reakcije s polimerizacijo (ang. reverse transcription polymerase chain reaction)
SD	Standardni odklon
SD x1x2	Skupen standardni odklon
sFlt	topen fms podoben tirozin kinazi 1
SHGB	vezalna beljakovina za spolne hormone
Te	T test eksperimentalen
Tt	T test tabelaričen
TRACE	ang. time resolved amplified cryptate emission
VCAM	vaskularna adhezijska molekula
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor
VEGFR-1 in -2	receptor za vaskularni endotelijski rastni faktor 1 in 2



## **I. UVOD**

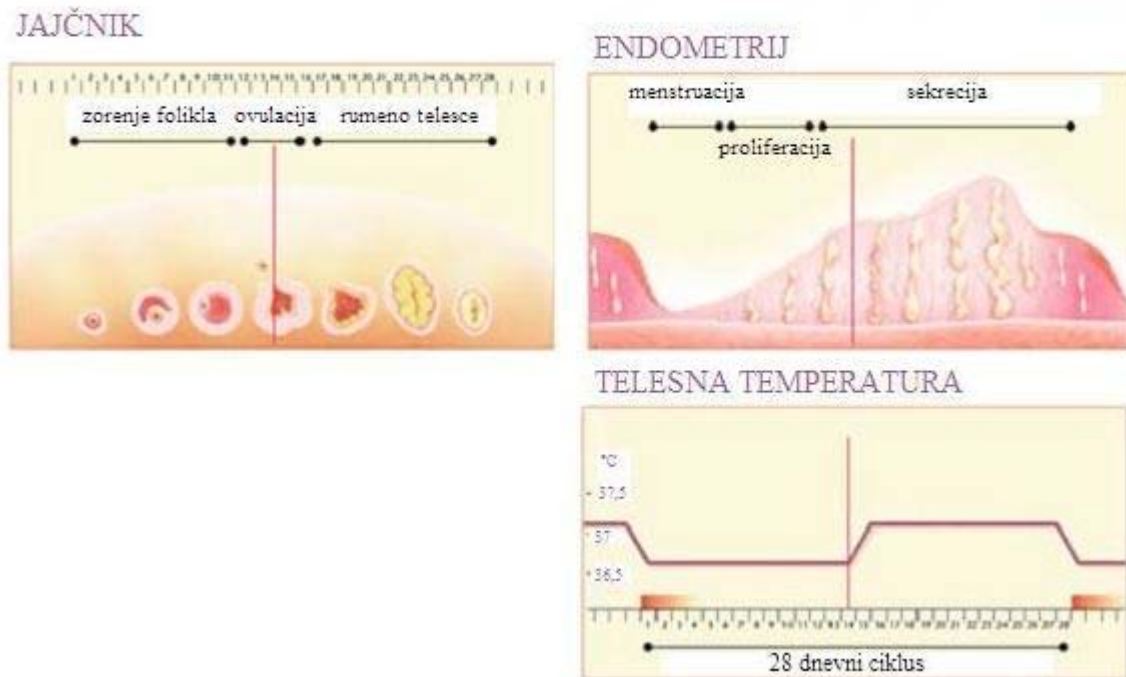
### **1. NOSEČNOST NORMALNA**

#### **1. 1. Menstruacijski cikel**

Menstruacija je glavni znak, da je dekle postalo spolno zrelo in lahko zanosi. Menstruacija (mesečno perilo, menstruacijski cikel) je krvavitev iz nožnice, ki se ciklično pojavlja praviloma vsak mesec. Traja različno dolgo - od enega do osmih dni, povprečno pa pet dni. V kateri starosti nastopi menstruacija, je odvisno od posameznice. Vemo, da so nekatera dekleta prej spolno zrela kot druga in imajo zato tudi prej menstruacijo. V večini primerov menstruacija nastopi med 11. in 15. letom starosti. Med vsakim menstruacijskim ciklom sprosti eden izmed jajčnikov zrelo jajčece (ovum). Ta dogodek imenujemo ovulacija. Od tega trenutka dalje obstaja možnost oploditve sproščenega jajčeca s semenčecem. Oploditev se zgodi normalno v jajcevodu. Jajčece propade 24 ur po ovulaciji in ni več sposobno oploditve. Semenčece propade v 48-72 urah. Tako so v vsakem menstruacijskem ciklu štirje plodni dnevi, v katerih lahko pride do oploditve: trije dnevi pred ovulacijo in en dan po ovulaciji. Če do oploditve ne pride, se maternična sluznica (endometrij) 14 dni po ovulaciji odlušči in iztisne kot menstruacijski izloček - menstruacijska krvavitev. Po vsaki menstruacijski krvavitvi se maternična sluznica zadebeli in tako pripravi maternico na oskrbo oplojenega jajčeca in nosečnost. Če se jajčece po ovulaciji spet ne oplodi, se maternična sluznica spet izloči skupaj z neoplojenim jajčecem. Cikel se ponovi (2).

Mesečni cikel traja od 23 do 35 dni, v povprečju 28 dni. Do ovulacije pride najpogosteje 14. dan ciklusa (1, 2).

## MENSTRUACIJSKI CIKEL



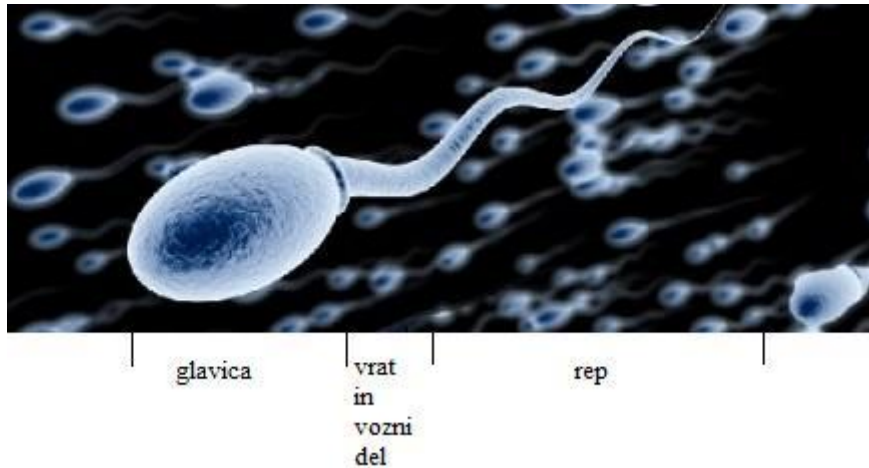
Slika 1: Menstruacijski cikel

### 1. 2. Razvoj semenčic

Proces nastajanja zrelih semenčic imenujemo spermatogeneza. Začne se v embriju, je nekaj časa v »status quo« fazi, do zrelih oblik spermijev pa pride šele z obdobjem pubertete. Celoten proces spermatogeneze traja 64 dni in poteka od pubertete pa vse do pozne starosti. Moški so torej v rodni fazi precej dlje kot ženske.

Poleg spermijev v modih nastaja tudi moški spolni hormon, testosteron, moda pa skupaj s spermiji izločajo še tekočino, v kateri le-ti plavajo. Spermiji v spermalni tekočini potujejo skozi obmodek po cevkah semenovodov, ki sta dolgi 30 cm. Na tej poti se jim pridruži tudi tekočina ostalih žlez, prostate in mehurčastih žlez, ki spermijem omogočajo boljšo gibljivost. Ob ejakulaciji se spermalna tekočina zakoaagulira, da se spermiji ne uničijo v kislem okolju vagine. Potujejo do materničnega vratu ter se tam sproščajo še približno 72 ur po ejakulaciji. Potujejo naprej po telesu maternice navzgor in vstopijo v jajcevoda, kjer

se najhitrejši spermij sreča z jajčno celico. Vsebovati mora vse potrebne encime, da predre zaščitno ovojnico jajčne celice in da pride do oploditve, združitve moškega in ženskega jedra, katerega vsak vsebuje 23 kromosomov. Novo nastala celica vsebuje 46 kromosomov in se imenuje zigota (3).



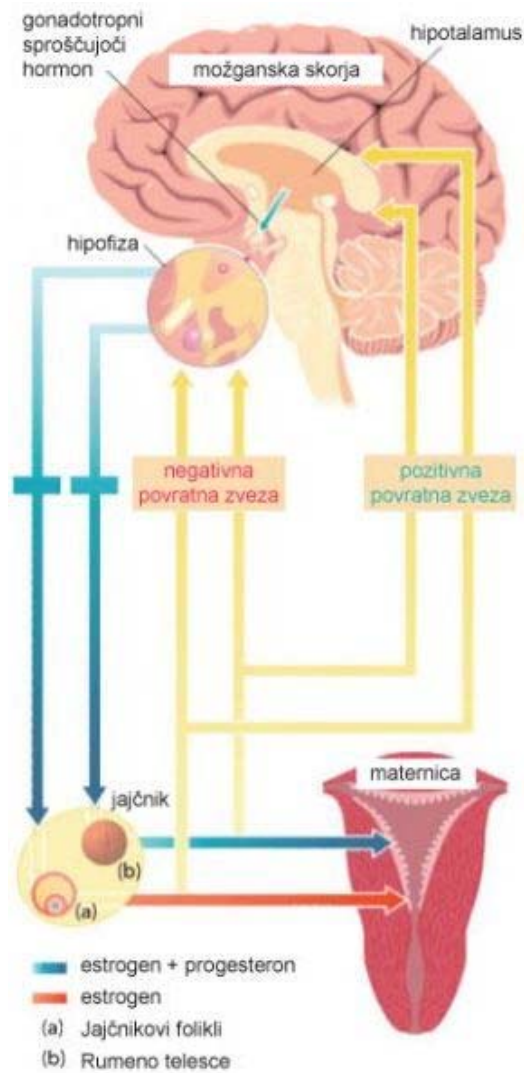
Slika 2: Zreli spermij

### 1. 3. Ženski spolni hormoni in ovulacija

Kemične snovi, imenovane hormoni, vzpodbujajo ženske spolne organe, da so le ti pripravljene vsak mesec za zanositev in da so usposobljeni za nosečnost (4).

Omenjeni hormoni nastajajo v različnih žlezah notranjicah in se od tam izločajo v krvni obtok. Kri jih nosi po vsem notranjem obtoku in jih odlaga v spolnih organih, ki delujejo pod njihovim vplivom (4). Vsakomesečno krvavitev sprožijo ravni spolnih hormonov, ki jih izloča žleza hipofiza (lat. Hypophysis – možganski privesek). Nanjo vpliva poseben možganski center, imenovan hipotalamus, ki ga uravnava delovanje možganske skorje. Hipofiza izloča gandotropne hormone - FSH, LH, LTH. Ti hormoni vzpodbujajo rast in dozorevanje jajčnih foliklov, ter vzpodbujajo jajčnike, da začno izločati poseben hormon estrogen. Estrogen je eden od dveh pomembnih ženskih spolnih hormonov, ki prevladuje v prvi polovici menstrualnega ciklusa, torej pred ovulacijo. Drugi spolni hormon, ki se začne izločati po ovulaciji, imenujemo progesteron (4,5).

Oba jajčnikova hormona, estrogen in progesteron, s svojim vplivom povzročata manjše spremembe na nožnici, dojkah, žlezah znojnicah in lojnicah ter na sami sluznici maternice (4). Ovulacija je razpok zrelega folikla (Graafovega folikla) in sprostitvev jajčeca v trebušno votlino.



Slika 3: Ženski spolni hormoni med ovulacijo

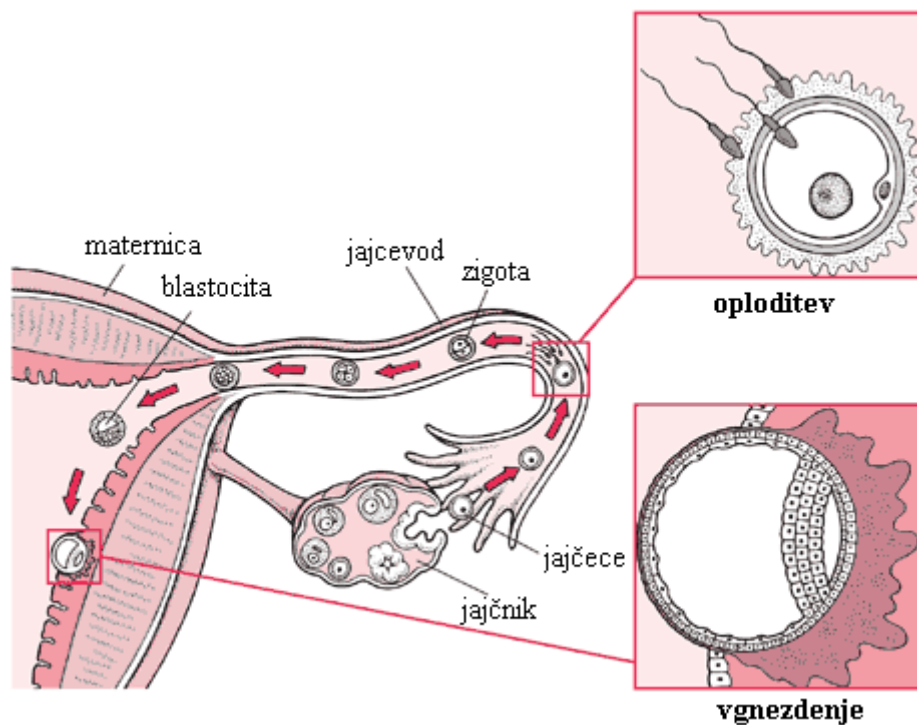
Do ovulacije pride 15. dan pred naslednjo menstruacijo. Sproščeno jajčece ujamejo resice jajceveda in ga usmerijo v kanal jajceveda. Po ovulaciji se v votlinico razpočenega mehurčka razlije kri. Zrnate celice se spremenijo v velike luteinske celice, ki vsebujejo rumeno barvilo – lutein. Za lešnik veliko rumeno telesce imenujemo corpus luteum. Če pride do oploditve, se rumeno telesce razvija in govorimo o rumenem telescu nosečnosti (corpus luteum graviditatis). Rumeno telesce raste 12 do 14 tednov in ustvarja vedno večje količine progesterona in estrogena, dokler njegove naloge ne prevzame v 4. lunarnem mesecu nosečnosti posteljica (placenta). Povečano izločanje jajčnikovih hormonov zavira



delovanje hipotalamusa in hipofize, zato proizvajata manj hormonov. Tako ne pride do ovulacije. Če pa ne pride do oploditve, se rumeno telesce spremeni v vezivno tkivo – belo telesce (corpus albicans). Količina estrogena in progesterona upade in začne se menstruacija. Padeč nivoja jajčnikovih hormonov povzroči ponovitev celega procesa (5).

#### 1.4. Oploditev in vgnezdenje

Po sprostitvi jajčeca iz zrelega folikla, potuje jajčece po jajcevodu. Med potjo po jajcevodu, ki traja nekaj ur, jajčece dokončno dozori in je tako pripravljeno za oploditev. Čas v katerem je jajčece pripravljeno za oploditev, je krajši kot 24 ur (4).



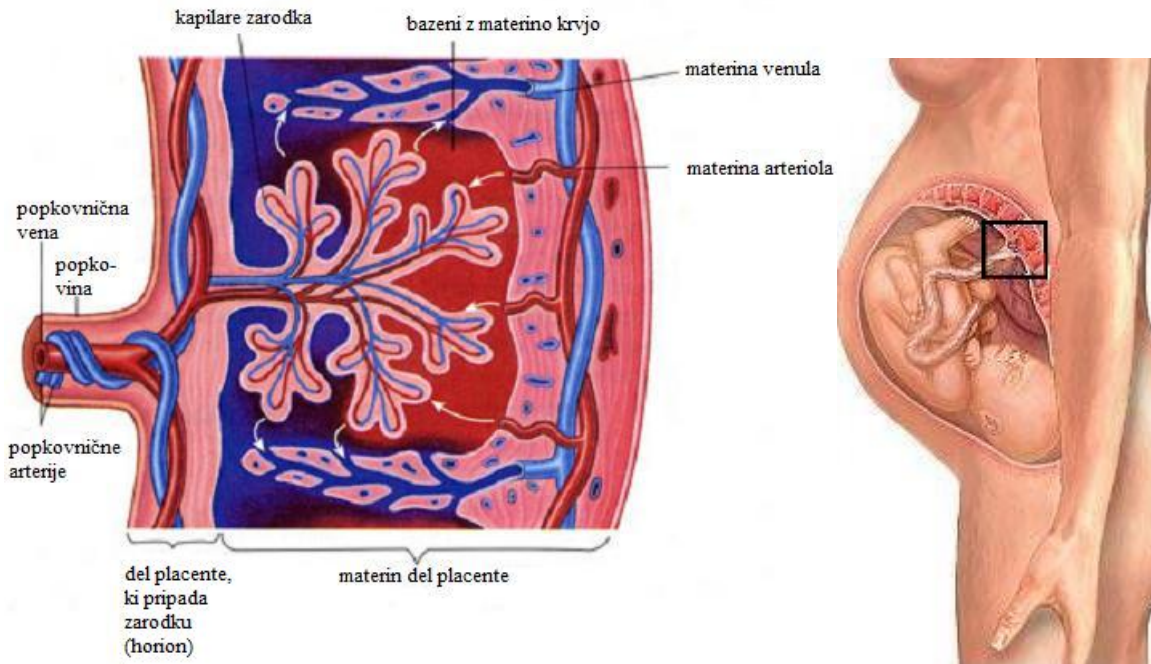
Slika 4: Ovulacija, potovanje jajčeca po jajcevodu, oploditev in vgnezdenje oplojenega jajčeca v maternično steno

Ob spolnem občevanju izbrizga moški seme v zadnji nožnični obok. Semenčice se hitro premikajo in v približno 2 urah pridejo skozi maternični vrat in maternično votlino do jajcevoda. V jajcevodu se najhitrejše semenčice združi z jajčecem (nastane zigota), kar imenujemo oploditev. Že v jajcevodu se prične razvoj oplojenega jajčeca.

Delitev jajca (oplojeno jajčece bom v nadaljevanju imenovala jajce), imenovana tudi cepljenje, se začne običajno nekaj ur po oploditvi. Jajce se deli potencialno, hkrati pa potuje proti maternici. To potovanje traja približno 5 dni (4). V tem času se izoblikuje morula, ki je okrogle oblike in grozdaste površine. V tem času maternična sluznica dozori in postane sposobna za sprejem oplojenega jajčeca. Ko jajce doseže maternico, je podobno votli grozdasti žogi in ga imenujemo blastocita. Naselitev blastocite v maternično sluznico imenujemo vgnezdenje, ki označuje pravi začetek nosečnosti (slika 4) (4,6). V času, ko se blastocita vgnezdi, je sestavljena iz najmanj 100 posameznih celic. Te tvorijo votlo kroglo, ki se vgnezdi običajno v zgornji polovici maternične votline. Iz majhnega števila omenjenih celic ene strani votle krogle se razvije plod. Večina preostalih celic se razvije v trofoblast in pozneje v posteljico in pripadajoče jajčne ovoje (4).

## 1. 5. Pomen placente

Po vgnezditvi je ves zarodek obdan s posebno kožico, ki ima polno resic in jo imenujemo horion. Ta izloča v materino kri posebni hormon hCG, ki ga lahko zaznamo v materinem urinu že v zgodnji nosečnosti in nam služi kot dokaz nosečnosti (1). Iz predela kjer se je jajce vsesalo v maternico, se razvije placenta (14. dan po oploditvi), v mehurčku samem pa se pojavijo prvi obrisi ploda ter popkovnica od ploda do placente. Sestavljajo jo 3 žile. Dve vodita kri od otroka, ena pa k otroku. Vse žile so obdane z ovojnico, tako da je popkovnica sorazmerno debela in dolga povprečno pol metra(1,6). Placenta je za otroka izrednega pomena. Služi kot posrednik med materjo in otrokom. Preko nje otrok dobiva vse potrebne snovi za razvoj in življenje ter oddaja vse snovi, ki jih mora izločiti pri presnovi. Njeno pravilno delovanje je močno odvisno od zdravja nosečnice (1). Prav tako kot horion, tudi placenta izloča hormon hCG. Z njegovo pomočjo se vzdržuje rumeno telesce, ki izloča spolne hormone. Ti so nujni za vzdrževanje maternične sluznice in preprečujejo dozorevanje novih jajčec (4). Plod plava v tekočini, ki jo imenujemo plodovnica. Njena količina se tekom nosečnosti spreminja. Največ jo je v 36. tednu nosečnosti. Služi kot zaščita pred udarci. Če je otrok v stiski, vanjo izloča svoje izločke, kar opazimo kot umazano plodovnico (1).



Slika 5: Placenta

## 1. 6. Razvoj ploda

Za razvoj ploda – otroka so posebno pomembni prvi trije meseci. V tem času se mu razvijejo vsi organi, zato imenujemo to prvo obdobje organogeneza (1). Istočasno pride do sprememb maternice potrebnih za implantacijo in nadaljno rast ploda. Plod v prvih 14 dneh razvoja v maternici imenujemo embrio (4). V tem času je zelo občutljiv in nanj lahko vplivajo različni vplivi, ki ga v tem času lahko poškodujejo. V tem času se približno 10 % nosečnosti konča s spontanim splavom (4). Na koncu embrionalnega razvoja (8. teden) ima zarodek zasnovano obliko telesa, ude in notranje organe. Dokončno so razvita obtočila, ki že funkcionirajo (6). Velik je približno 9 cm (1). Obdobje razvoja ploda ( lat. fetusa) se začne 9. teden in konča 38. teden. To obdobje imenujemo fetalno obdobje (6).

V prvem tromesečju fetus dobiva vedno bolj očitne človeške oblike. Glava raste počasneje kot ostalo telo, roke in noge se podaljšajo, pojavijo se nohti ter vnanji spolni organi. Plod se prehranjuje s presnovki iz materine krvi, ki vstopajo skozi popkovno veno v telo ploda. Krvna obtoka matere in fetusa sta tik drug ob drugem, kljub tej neposredni bližini pa se

krvna obtoka nikoli ne zlivata drug ob drugega in ostaneta ves čas strogo ločena (4). Delovanje ledvic in prebavil se začne v zgodnjem fetalnem obdobju in se nadaljuje do rojstva. Kardiovaskularni sistem ploda je posebno razvit. Kot dihalni organ služi posteljica. Centralni živčni sistem in periferno živčevje se razvijajo v 8. tednu embrionalnega razvoja; tako se mišični tonus in koordinirane kretnje pojavijo zelo zgodaj. Prav tako je razvit senzorični živčni sistem, kar omogoča zaznavanje zunanjega sveta in reakcije organizma na spremembe v okolju (6).

V drugem tromesečju je dolžina fetusa od temena do podplatov približno 30 cm. Fetus zelo hitro raste in tehta ta čas približno 600 do 700 g. Posteljica in plodni ovoji, ki obdajajo fetus, imajo ta čas le še tretjino celotne teže jajca. Vzporedno s hitrim razvojem fetusa narašča tudi velikost maternice.

V zadnjem tromesečju fetus zelo hitro pridobiva težo in dolžino. V zadnjih dveh in pol mesecih nosečnosti se njegova teža podvoji. V 38. tednu nosečnosti lahko že govorimo o zrelem fetusu. Glavo pokrivajo redki lasje, nohti segajo čez prstne jagodice, koža je pokrita z belkasto maščobno snovjo, ki jo izločajo kožne lojnice. Celotno telo je zalito zaradi maščobe, ki se je nalagala v času razvoja (4). Normalno ob porodu fetus tehta 3000 do 3500 g. Fetus, ki ob rojstvu tehta manj kot 2500 g, je nedonošenček (1, 4).

## **1. 7. Spremembe na telesu nosečnice**

Nosečnost spremljajo obsežne fiziološke spremembe, ki se pojavijo že zgodaj po zanositvi. Žensko telo se prilagodi, da lahko prenese izzive nosečnosti (7).

Največkrat se najprej opazijo spremembe na prsah. Prsa postanejo polnejše, napete in bolj občutljive. Tudi prsne bradavice se povečajo in nabreknejo. Kolobar okoli bradavic se poveča in potemni. Prsa se večajo do približno 6. meseca nosečnosti. V prsah se pod vplivom nosečnostnih hormonov, ki jih izloča placenta, celo nosečnost razvijajo mlečne žleze, ki se morajo pripraviti za dojenje po porodu (1).

Najizrazitejše pa so spremembe na spolnih organih. Maternica se v vsaki nosečnosti močno poveča. Njena teža poraste do 1 kg, podaljša pa se na 35 do 40 cm. Stena maternice se

zaradi raztezanja stanjša, ob koncu nosečnosti je debela le še dober centimeter. Poveča se tudi površina maternice. Maternično telo se poveča zaradi mišičnih vlaken, katera postanejo številnejša in daljša. Spremembe se pojavijo tudi na nožnici in jajčnikih. Nožnica postane širša, njena stena čvrstejša, izcedek iz nožnice je obilnejši. V jajčnikih zastane razvoj foliklov, dokler nosečnost oziroma dojenje ne mine (8).

V nosečnosti so obtočila bolj obremenjena. Volumen krvi pri enoplodni nosečnosti naraste za 30 % do 50 %. Še večji porast je pri velikih plodovih in pri več plodni nosečnosti. Ker volumnu krvi ne sledi porast rdečih krvnih teles – eritrocitov, imajo nosečnice nekoliko nižje vrednosti hemoglobina in eritrocitov, kot so jih imele pred nosečnostjo. Do tega pride predvsem zaradi pomanjkanja železa, ki je potreben za tvorbo hemoglobina. Fiziološka anemija – slabokrvnost je najbolj izražena v tretjem trimesečju nosečnosti (7, 8).

Srčni minutni volumen začne naraščati že zgodaj v prvem trimesečju. Poraste od 35 % do 50 % ali povprečno za 1,5 litra na minuto. Največjo raven doseže okrog 24. tedna in ostane takšen do poroda. Srčna frekvenca v mirovanju se poviša že v 7. tednu nosečnosti, vse do 15 utripov nad vrednostmi pred nosečnostjo.

Krvni tlak se v nosečnosti zniža, bolj diastolni kot sistolni. V sredini nosečnosti je sistolni tlak nižji za 5 do 10 mmHg in diastolni za 10 do 15 mmHg. Ob roku poroda se krvni tlak vrne na normalne vrednosti.

Za nosečnost so značilne tudi velike spremembe prsne stene in trebušne prepone. Zaradi naraščanja maternice se manjša prostor v trebušni in prsni votlini, tako je pomikanje trebušne prepone ovirano in dihanje postaja otežkočeno. 60 % do 70 % nosečnic občuti dispnejo – težko dihanje. Ta simptom se pojavi že v prvem trimesečju in doseže vrh v tretjem trimesečju.

Ledvice se povečajo v dolžino, poveča se njihova teža. Sečevodi se razširijo in podaljšajo, desni veliko bolj kot levi. To je posledica mehaničnih učinkov noseče maternice in povišane koncentracije progesterona. Poveča se zastoj urina in s tem možnost za okužbo sečil. Pogosto uriniranje v nosečnosti je povezano predvsem s pritiskom povečane maternice. Mehur je potisnjen navzgor in je sploščen. Zmanjšan tonus gladke miškulature hkrati poveča kapaciteto mehurja.

Jutranje slabosti, ki nato trajajo ves dan, zaprtje, zgaga in spremembe v potrebi po različni hrani so tipične nosečnostne težave. Slabost in bruhanje doživi 50 % do 90 % nosečnic. Odstotek nosečnic z bruhanjem v nosečnosti je odvisno od mnogih dejavnikov. Veliko simptomov povzročajo učinki progesterona na prebavila. Počasno praznjenje želodca in upočasnjena peristaltika skupaj z relaksacijo spodnje zažemalke požiralnika povzročajo zgago, zaprtje in hemeroide. V nosečnosti so pogostejši žolčni kamni, vnetje žolčnika in trebušne slinavke (7).

## **2. NOSEČNOST – ZAPLETI**

### **2. .1. Hipertenzija**

Hipertenzija je opredeljena kot enkratna opredelitev diastoličnega tlaka prek 110 mmHg ali dve meritvi v razmaku 4 ur narazen, kjer je diastolični tlak večji od 90 mmHg. Huda hipertenzija je tista, kjer je diastolični tlak, izmerjen enkrat, 120 mmHg, 110 mmHg pa, če je merjen dvakrat, 4 ure narazen (9).

#### **2. 1. 1 HIPERTENZIJA V NOSEČNOSTI**

Hipertenzija je kronična bolezen, katere glavni sindrom je zvišan krvni tlak in spremlja 10 % nosečnosti(10). Hipertenzivne bolezni so v nosečnosti najpogostejše bolezni in so s svojimi zapleti ene najpogostejših in nevarnih stanj v nosečnosti. 70 % teh bolezni v nosečnosti je pripisati preeklampsiji, preostalih 30 % pa preeksistentni kronični hipertenziji (10). V svetu umre zaradi hipertenzivnih bolezni v nosečnosti 12 % žensk (11).

V nosečnosti pomeni hipertenzija povišan sistolični tlak več kot 140 mmHg oziroma porast sistoličnega tlaka več kot 30 mmHg (od osnovnega tlaka v prvi polovici nosečnosti) oziroma diastolični tlak več kot 90 mmHg ali porast diastoličnega tlaka več kot 15 mmHg (10).

Različni avtorji uporabljajo različne nazive za poimenovanje problema hipertenzije v nosečnosti. Mnogi imajo najraje izraz toksemija, ki naj bi vključeval prisotnost neidentificiranega toksina. Drugo poimenovanje problema hipertenzije v nosečnosti je gestoza, ki lahko zajema veliko kliničnih oblik. Poleg teh dveh pa so v rabi še: EPH gestoza (edemi, proteinurija, hipertenzija), PIH (pregnancy induced hypertension), PET (preeclampsia – toxemia), PAH (pregnancy associated hypertension), HDP (hypertensive disease of pregnancy) in druga. Kljub različnim poimenovanjem še vedno stremijo k enotnemu, saj pri trenutni klasifikaciji še vedno ne vemo ali gre za isto bolezen ali za različne (9).

## 2. 1. 2. KLASIFIKACIJA HIPERTENZIJE V NOSEČNOSTI

Znane so različne klasifikacije hipertenzije v nosečnosti. Najboljša je tista razvrstitev, ki pove kakšno je tveganje za mater in plod in je vzročna. Ker vzroka bolezni zaenkrat še ne poznamo, je razvrstitev Daveya in MacGillivraya najbolj natančna. Prikazana je v preglednici 1. Podpira jo tudi mednarodna zveza za študij hipertenzije v nosečnost (ISSHP) (10).

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

Preglednica I: Klasifikacija hipertenzije v nosečnosti.

Gestacijska hipertenzija in/ali proteinurija	Pojavita se med nosečnostjo, porodom ali po njem pri prej normotenzivni ženski brez proteinurije	- gestacijska hipertenzija (brez proteinurije) - gestacijska proteinurija (brez hipertenzije) - gestacijska proteinurična hipertenzija (preeklampsija)
Kronična hipertenzija in kronična ledvična bolezen	Pojavi se v nosečnosti pri ženski s kronično hipertenzijo ali kronično ledvično boleznijo, ki je ugotovljena pred, med ali po nosečnosti.	- kronična hipertenzija (brez proteinurije) - kronična ledvična bolezen (proteinurija z/brez hipertenzije) - kronična hipertenzija z nacepljeno preeklampsijo
Neuverščena hipertenzija in/ali proteinurija	Ugotovimo jo pri prvem pregledu po 20. tednu nosečnosti pri ženski brez znane kronične hipertenzije ali kronične ledvične bolezni ali med nosečnostjo, porodom ali v puerperiju, kadar ni dovolj podatkov za klasifikacijo.	- neklasificirana hipertenzija (brez proteinurije) - neklasificirana proteinurija (brez hipertenzije) - naklasificirana proteinurična hipertenzija
Eklampsija	Pojavi se med nosečnostjo, porodom ali v obdobju 7 dni po porodu.	



## 2. 2. Preeklampsija

Preeklampsija je definirana kot razvoj hipertenzije s proteinurijo in/ali edemom, ki se pojavi najpogosteje po 20. tednu nosečnosti. Povišan krvni tlak je zato pomemben znak preeklampsije, katerega se da enostavno izmeriti. Je najpogostejša hipertenzivna komplikacija v nosečnosti (10, 12, 13).

### LAŽJA OBLIKA PREEKLAMPSIJE

Za to obliko je značilen povišan krvni tlak (višji kot 140/90 mmHg) z ali brez proteinurije (1). Laboratorijski izvidi ne kažejo težje oblike bolezni, plod primerno raste, znakov ogroženosti ploda ni (10, 14).

### TEŽJA OBLIKA PREEKLAMPSIJE

Za to obliko je značilna prisotnost enega ali več znakov (10, 12):

- krvni tlak je višji ali enak 160/110 mmHg izmerjen pri nosečnici v časovnem razmaku 6 ur, nosečnica naj počiva
- proteinurija – več kot 5g beljakovin v 24 urnem urinu (3+ ali 4+ tesntni urinski trakovi)
- oligurija (več kot 400 ml urina v 24 urah)
- nevrološke motnje, glavobol, motnje vida
- epigastrična bolečina
- pulmonalni edem ali cianoza
- trombocitopenija

Etiologija PE še ni povsem znana. Najnovejša definicija razlaga, da je PE multiorgansko obolenje z endotelno funkcijsko motnjo kot etiološkim in patogenetskim substratom, ki se klinično izraža z nezadostno prekrvavitvijo organov- z nekrozami in krvavitvami zaradi sproščanja vazoaktivnih snovi in povečane občutljivosti na njih ter aktivirano koagulacijsko kaskado (15).

Bolezen prizadene različne organske sisteme, kot so: obtočila, srce, ledvica, posteljica (glavni vzrok za pojav PE), jetra, možgani, pljuča, sistem strjevanja krvi in fibrinolizo (15).



## 2. 2. 1. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA NASTANEK PREEKLAMPSIJE

Točnih mehanizmov za nastanek PE še ne poznamo. Znani so različni dejavniki in različna klinična stanja (matere ali očeta), pri katerih je možnost nastanka preeklampsije večja.

Dejavniki, ki vplivajo na razvoj PE (9, 10, 16, 17):

- dednost (posebej, če se je PE pojavila pri materi ali sestri)
- prva nosečnost (normotenzivne nosečnice imajo 7,7 % možnosti za E ali PE)
- PE v prvi oz. predhodni nosečnosti (za 33,7 % večje možnosti, da se E ali PE pojavi v naslednji nosečnosti)
- če se je PE pojavila zgodaj v nosečnosti in trajala po 10. dnevu po porodu (v naslednjih nosečnostih pojavi večkrat)
- mnogoplodna nosečnost
- starost ženske pod 15 let in nad 35 let
- kronična ledvična bolezen
- kronična hipertenzija
- diabetes tipa I
- avtoimunske bolezni
- kromosomske nepravilnosti (navezane na mater ali očeta)
- zvišana rezistenca na inzulin
- vplivi okolja (debelost, uživanje drog in alkohola, vnašanje prevelike količine soli, stres,.....)
- predeli sveta, kjer je perinatalno varstvo slabo ali ga sploh ni
- črna rasa
- povišan testosteron v krvnem obtoku

### **2. 3. HELLP sindrom**

Je posebna oblika preeklampsije, pri kateri se pojavi hemoliza, povečana aktivnost encimov in manjše število trombocitov (**H**emolysis, **E**levated **L**iver enzymes and **L**ow **P**latelets – HELLP) (10). Le polovica nosečnic s HELLP sindromom ima obenem hujšo hipertenzijo, približno petina pa nima niti hipertenzije, niti proteinurije (9).

### **2. 4. Eklampsija**

Eklampsija je pojav tonično – kloničnih krčev (konvulzij) in/ali nepojasnjene nezavesti, ki niso posledica epilepsije ali možganskega tumorja ali drugega intrakranialnega procesa (9,16). Pojavi se lahko med nosečnostjo, med porodom ali po porodu pri bolnici z znaki in simptomi preeklampsije (10, 16). Pogostost eklampsije pred porodom je 38 do 53 % vseh eklamsij, pogostost poporodne eklampsije pa sega od 11 do 44 %. Čeprav se večina poporodnih eklamsij pojavi v prvih 48 urah po porodu, se jih nekaj pojavi po 48 urah in kasneje (pozna porodna eklampsija: > 48 ur < 4 tedne po porodu). Večina eklamsij ( 90% ) se pojavi v 28. tednu in kasneje. Ostali primeri se pojavijo med 21. in 27. tednom nosečnosti (7,5% ) ali v 20. tednu in še prej( 1,5% ) (10).

Nosečnice z eklampsijo lahko razvijejo zelo širok spekter znakov, od visoke hipertenzije, hude proteinurije in obsežnih edemov do minimalne ali odsotne hipertenzije, brez proteinurije in brez edemov. Povišan krvni tlak je glavni znak pri diagnozi eklampsije.

Hipertenzija je lahko zelo visoka (sistolični krvni tlak najmanj 160 mmHg in/ali diastolični krvni tlak najmanj 110 mmHg) pri 20 – 54 % primerov ali blaga (sistolični krvni tlak med 140 in 160 mmHg in/ali diastolični med 90 in 110 mmHg) v 30 – 60 % primerov. Hipertenzija je odsotna pri 16 % eklamsij (16).

Težke oblike bolezni smrtno ogrožajo mater in otroka. Maternalna smrtnost zaradi preeklampsije lahko v državah v razvoju pomeni 30 % maternalne umrljivosti, v razvitih okoljih pa okrog 7 % (9).

### **3. DIAGNOSTIČNE MOŽNOSTI ZA ODKRIVANJE PE**

Za zgodnje odkrivanje PE je bilo priporočenih že več kot 100 kliničnih, biofizikalnih in biokemičnih testov, vendar zaenkrat še ni testa, ki bi bil enostaven, ki bi ga naredili zgodaj v nosečnosti, ki ne bi bil invaziven in bi bil dovolj občutljiv in specifičen, ter z visoko napovedano vrednostjo za klinično uporabo (9, 18). Ne poznamo tudi načina, kako bolezen odkriti v zgodnji predklinični fazi, kako jo uspešno preprečiti in zdraviti. Vse to je posledica še ne razjasnene etiologije in zgodnjega razvoja bolezni v celoti. Pri zgodnjem odkrivanju PE ima še vedno najpomembnejšo vlogo dobro predporodno varstvo (19).

#### **3. 1. Diagnostični testi, ki slonijo na spremenjeni občutljivosti žilne stene na vazoaktivne snovi**

##### OBČUTLJIVOST NA ANGOTENZIN II

Nosečnice, ki bodo zbolele za PE, imajo povečano občutljivost žilne stene na angiotenzin II. Zaradi zapletene izvedbe, visoke cene in nevarnosti testa, za klinično uporabo ni primeren. Uspešno ga uporabljajo v študijske namene (20).

##### ‘ROLL OVER’ TEST

Ugotovljeno je bilo, da pri nosečnicah, ki kasneje zbolijo za PE, med 28. in 32. tednom nosečnosti krvni tlak naraste, če se iz levega boka prevalijo na hrbet. Test prav tako ni primeren za klinično uporabo, saj so študije pokazale spremenljive rezultate občutljivosti, specifičnosti in lažno pozitivnih rezultatov (20).

### 3. 2. Ultrazvočna preiskava pretoka krvi v maternični arteriji

V normalni nosečnosti se trofoblast vrašča v spralne arterije. V prvi tretjini nosečnosti poteka vraščanje v decidualni del, v drugi tretjini pa se prične vraščanje v miometrijski del spiralne arterije. Trofoblast zamenja endotel intime, mišičnoelastično tkivo žilne stene se razgradi, svetlina žile se razširi. Upor v spiralnih arterijah močno pade, pretok skozi nje naraste in začne se obnašati kot vene. Pri preeklampsiji je vraščanje trofoblasta v spiralne arterije moteno, tako da le-te delno ali v celoti ohranijo mišičnoelastični sloj. Posledica tega je povečan upor v spiralnih arterijah in v žilah, ki jih napajajo. Te so vidne že več tednov pred razvojem klinične slike. Z ultrazvočno meritvijo in analizo pretoka krvi v materničnih arterijah med 20. in 24. tednom nosečnosti, lahko napovemo kasnejši razvoj PE. Specifičnost testa in negativno napovedana vrednost sta visoki, občutljivost in pozitivno napovedana vrednost pa sta žal nizki (20).

### 3. 3. Laboratorijske preiskave

- **hemoglobin** (vrednosti hemoglobina so pri PE povišane)
- **trombociti** (število trombocitov pri PE pade, vendar spremembe nastopijo šele, ko je klinična slika že razvita)
- **železo in transferin** (v serumu nosečnice s PE vrednost celokupnega železa naraste, vrednost transferina pa pade)
- **urat** (koncentracija v serumu naraste pozno, ko je klinična slika PE že razvita)
- **kalcij v urinu in celicah** (pri nosečnicah s PE je izločanje kalcija v urin zmanjšano (ta nastopi že pred razvojem klinične slike), pri esencialni hipertenziji najdemo povišanje vrednosti znotrajceličnega kalcija)
- **volumen plazme** (volumen plazme je zmanjšan, do zmanjšanja pride še pred povišanjem krvnega tlaka)

- **hemostaza** (številni dejavniki, ki vplivajo na hemostazo, so pri PE spremenjeni, spremembe pa so večinoma vidne šele takrat, ko že pride do razvoja klinične slike)
- **Lipidiv serumu** (v plazmi je povišan nivo trigliceridov in prostih maščobnih kislin, nivo HDL-holesterola pa je znižan, spremembe so vidne, ko je klinična slika PE že razvita)
- **prostaciklin** (pri nosečnicah, ki bodo zbolele za PE, je že v prvi tretjini nosečnosti, pred razvojem klinične slike, sinteza prostaciklina nižja, kot pri zdravih nosečnicah)
- **nitrat** (vrednost dušikovega oksidula je pri PE nižja, kot pri normalni nosečnosti)
- **fibronektin** (Pri nosečnici s PE so vrednosti višje, posebna oblika fibronektina ED +1 se v povišani koncentraciji pojavi v prvem in drugem tromesečju nosečnosti, ki kasneje zbolijo za PE)
- **inhibin A** (pri PE so vrednosti povečane)
- **hCG** (v plazmi in urinu nosečnice, ki kasneje zbolijo za PE, je povišan)

Od vseh do sedaj uporabljenih laboratorijskih testov imajo povišane vrednosti fibronektina v plazmi ter serijske meritve volumna trombocitov še največjo napovedno vrednost za PE, vendar sta oba testa v praksi trenutno še neuporabna. Za prakso pride trenutno v poštev le določanje hemoglobina, serumskega železa in transferina. Visoke vrednosti hemoglobina in serumskega železa ter nizke vrednosti transferina napovedujejo preeklampsijo. Od vseh presejalnih testov je za vsakdanjo prakso še vedno najbolj uporabno ultrazvočno merjenje pretokov v obeh materničnih arterijah med 20. in 24. tednom nosečnosti (19).

#### **4. MOŽNI BIOKEMIČNI KAZALCI ZA NAPOVEDOVANJE PREEKLAMPSIJE**

Pri nosečnicah s preeklampsijo se pojavijo klinični znaki, kot so sprememba krvnega tlaka (ta se poviša), minutnega volumena srca, perifernega upora žil, koncentracije trombocitov, pogosto pa pride tudi do vazokonstrikcije. Znano je, da preeklampsija prizadene tudi različne organske sisteme, zato je zgodnje odkrivanje in zdravljenje preeklampsije zelo pomembno.

Z ultrazvokom ugotovljamo in merimo invazivnost trofoblastov maternalnih spinalnih arterij, pri katerih se pojavi povečan upor v le teh zaradi poslabšanja invazivnosti trofoblastov. Pogosteje pa se PE meri in ugotavlja v drugem trimesečju z Dopplerjevo metodo, s katero ugotovljamo pretočne indekse in zarez v maternalnih arterijah.

Ti dve metodi se pri diagnosticiranju PE uporabljata, ko je za preprečevanje bolezni že prepozno in moramo začeti z zdravljenjem, zato težimo k dokazovanju biokemičnih označevalcev, ki nam lahko pomagajo pri zgodnjem odkrivanju PE in E in pri napovedi rizika za preeklampsijo. Pri sami diagnozi moramo večinoma upoštevati klinične znake ter posamezne vrednosti biokemičnih označevalcev. Najpomembnejši so: placentni rastni faktor (PIGF), vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), humani horionski gonadotropin (hCG), humani placentni rastni hormon (hPGH), sFlt-1 (solube fms-like tyrosine kinase 1), insulinu podoben rastni faktor (IGF), asimetrični dimetilarginin (ADMA), intracelularne adhezijske molekule (ICAM), vaskularne adhezijske molekule (VCAM), placentni protein 13 (PP-13), inhibin A, aktivin A in izoprostan (21, 22).

##### **4. 1. PIGF, VEGF**

Placentarne arterije so pri nosečnicah s preeklampsijo bolj zavite in imajo manjši lumen ter tanjšo steno. Kapilare so krajše in imajo večji premer, kar vodi v zmanjšano placentno perfuzijo in placentno hipoksijo. Vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF) ima vlogo glavnega dejavnika za preživetje endotelijskih celic, poleg tega pa je tudi glavni stimulator



nastanka novih žil med angiogenezo in vaskulogenezo. Njegovo angiogenetsko aktivnost povečuje PIGF, ki spada v družino VEGF.

Pri njunem delovanju sodelujeta tudi dva receptorja: VEGFR-1 (prvotno imenovan Flt-1) in VEGFR-2 (prvotno imenovan KDR/Flk-1).

V serumu, urinu in mononuklearnih celicah periferne krvi lahko določimo pri nosečnicah topen (soluble) VEGFR-1, znan tudi kot sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1). Povišane koncentracije lahko izmerimo tudi pri plodu, glavni vir sVEGFR-1 pa je placenta. Njegove koncentracije so v uterini veni štiri do petkrat višje kot v uterini arteriji. Vzrok za disfunkcijo kapilar pri preeklampsiji je anti-angiogenetsko stanje, ki je posledica višjih vrednosti sVEGFR-1 in nižjih koncentracij VEGF in PIGF (23).

Diagnozo preeklampsije postavimo, kadar so povišane vrednosti sFlt-1, normalne do visoke vrednosti celokupnega VEGF in PIGF ter nizke vrednosti prostega VEGF in PIGF. Serumske vrednosti sFlt-1 začnejo naraščati 5 tednov preden se pojavi bolezen. Normalna vrednost pri nosečnici je 1643 pg/ml, pri nosečnici s preeklampsijo pa 4382 pg/ml. Obratno je pri vrednosti PIGF, ki je nižja pri nosečnicah s preeklampsijo in znaša 90 pg/ml, pri zdravih nosečnicah pa 142 pg/ml. Kadar preeklampsija nastopi zgodaj, so spremembe pri vrednostih sFlt-1 in PIGF večje (24).

## 4. 2. hPGF

hPGF se izloča konstantno tekom nosečnosti. Izločajo ga sinciotrofoblasti v maternalni krvni obtok, tam pa se veže na receptorje, ki so prisotni na vilusnih in ekstravilusnih trofoblastih. Pomemben je pri prilagajanju matere na nosečnost, invazivnosti trofoblastov in rasti ploda. Povzroča tudi inzulinsko rezistenco ter regulira dostavo hranilnih snovi preko posteljice z avtokrinimi in parakrinimi mehanizmi ali indirektno preko IGF-1 (24, 25).

Hormon hPGF v nosečnosti zamenja hipofizni rastni hormon. Njegove serumske vrednosti naraščajo od 7. tedna do 37. tedna nosečnosti, po porodu pa padejo (26).

#### **4. 3. PP – 13**

Placentni protein 13 se v večini nahaja v placenti, v manjših količinah ga najdemo tudi v vranici in mehurju zdravega človeka ter rakastih obolenjih (adenokarcinom, možganski tumor, maligni melanom). Njegove vrednosti med nosečnostjo počasi naraščajo, pri nosečnicah z zgodnjo obliko preeklampsije v prvem trimesečju pa so vrednosti nižje. Nižje so tudi pri zastoju poldovega razvoja (IUGR). Povišane vrednosti nastopijo v drugem in tretjem trimesečju pri IUGR, preeklampsiji in grozečem prezgodnjem porodu (27).

#### **4. 4. hCG**

Humani horionski gonadotropin se proizvaja in izloča iz placentnih citotrofoblastov in vpliva na vaskularno. Najvišjo koncentracijo v serumu doseže v 9. tednu nosečnosti pri zdravih nosečnicah. Njegove vrednosti padajo do 20. tedna. Pri gestacijski hipertenziji, preeklampsiji in gestacijskem diabetesu se njegove vrednosti povišajo med 15. in 18. tednom nosečnosti. Zvišane vrednosti zasledimo tudi pri boleznih trofoblastov, Downovem sindromu in multipli nosečnosti (28).

#### **4. 5. ICAM, VCAM**

ICAM (ICAM-1, ICAM-2) so intracelularne, VCAM (VCAM-1) pa vaskularne adhezijske molekule, ki skupaj z E-selektini (endotelijski) in P-selektini (platelet - trombocitni) omogočajo vezavo nevtrofilcev na endotelij žil, pri čemer lahko pride do poškodbe žil. Zvečane vrednosti E-selektinov, VCAM-1 in ICAM-1 so povezane s poškodbo endotelija in aktivacijo levkocitov (29).

Povišane vrednosti ICAM-1 in VCAM-1 se pojavijo 3 – 15 tednov pred kliničnimi znaki preeklampsije in jih lahko uporabljamo kot napovedovalce bolezni (28).

#### **4. 6. Aktivin A, inhibin A**

Nahajata se v mnogih endokrinih tkivih, vključno v ovarijih in placenti. Njuna koncentracija narašča tekom nosečnosti. Koncentracija aktivina A se poveča med 8. in 13. tednom nosečnosti pri nosečnicah s preeklampsijo. Za mejno vrednost napovedi preeklampsije se uporablja koncentracija 272 ng/l. Vrednosti inhibina A pri nosečnicah s preeklampsijo pa so povišane med 27. in 30. ter 35. in 38. tednom (30, 31, 32).

#### **4. 7. Ostali označevalci**

V namene zgodnjega odkrivanja preeklampsije raziskujejo povezavo med serumsko koncentracijo adenozin deaminaze (ADA) in razvojem preeklampsije. Ugotovili so, da so njegove vrednosti nižje pri zdravih nosečnicah (33).

Drugi potencialni označevalec bi lahko bil asimetrični dimetilarginin (ADMA). Njegove koncentracije se v serumu povečajo približno 10 tednov pred nastankom preeklampsije in ostanejo povišane pri nastanku bolezni (34).

Prav tako bi se lahko kot napovedni označevalec uporabljali tudi neodzivnost na inzulin v prvem tromesečju. Pri testu se meri koncentracija vezalne beljakovine za spolne hormone (SHGB), ki je označevalec neodzivnosti na insulin. Nosečnice s preeklampsijo imajo bistveno nižjo koncentracijo SHGB ( $302 \pm 130$  mmol/l) kot zdrave nosečnice ( $396 \pm 186$  mmol/l) (35).

## 5. Z NOSEČNOSTJO POVEZAN PLAZEMSKI PROTEIN A

Z nosečnostjo povezan plazemski protein A (PAPP-A - Pregnancy Associated Plasma Protein A) je bil odkrit leta 1974 v plazmi nosečnice. Po izolaciji proteina so prikazali, da je PAPP-A makromolekularni glikoprotein dimerne oblike (vsak monomer sestavljata dve enaki podenoti z molekulsko maso 200 kDa) z relativno molekulsko maso 800 kDa, da vsebuje 16 atomov cinka, ter ima izoelektrično točko pI 4,4 (36).

### 5. 1. Struktura PAPP-A

Danes je znano, da je PAPP-A pretežno prisoten v serumu nosečnice kot heterotetramerni proteinski kompleks z molekulsko maso približno 500 kDa (37). Z baznim eozinofilnim proteinom (proMBP) tvori kompleks v razmerju 2:2, imenovan PAPP-A/proMBP kompleks, kjer sta PAPP-A in proMBP podenoti med seboj kovalentno povezani z disulfidnimi vezmi (38, 39). Pri nenosečih osebah je PAPP-A v plazmi prisoten kot homodimer, molekulske mase 400 kDa(36). Ta nekompleksni aktivni PAPP-A je prav tako prisoten v plazmi in serumu nosečnice, vendar ob porodu predstavlja le do 1% celotnega PAPP-A (39). PAPP-A pripada met-cinkovi superdružini metaloproteinaz. Superdružina vsebuje 5 družin cinkovih peptidaz s člani iz prokariontov in evkariontov (preglednica II). PAPP-A pripada najnovejši met-cinkovi družini imenovani papalizin. Gen PAPP-A je lociran na kromosomu 9q33.1. Aminokislinsko zaporedje PAPP-A je bilo določeno iz delnega proteinskega zaporedja in zaporedja klonirane cDNA (36).

Preglednica II: Met-cinkova superdružina (36)

Družina	Predstavnik
Astacini	Kostni morfogenetični protein 1
Reprolizin	Proteinaze kačjega strupa
Seralizin	Alkalne proteinaze, bakterijske proteinaze
Matriks metaloproteinaze (MMPs)	Humane nevtrofilne kolagenaze, matrilizin
Papalizin	PAPP-A, PAPP-A2

## 5. 2. Sinteza in lokalizacija PAPP-A

Glavno mesto sinteze PAPP-A in proMBP med nosečnostjo je placenta. Oba proteina spadata med najbolj izražene gene placente. mRNA PAPP-A se sintetizira v sinciotrofoblastu placente in v septalnih x celicah, ki jih proizvaja trofoblast, medtem ko se mRNA proMBP nahaja v placentarnih x celicah (Tabela 3) (36). Ker se mRNA obeh proteinov sintetizira v različnih celicah se kovalentni kompleks formira v ekstracelularnem delu (40). Proizvodnja PAPP-A je nizka med sekretorno fazo, po decidualizaciji in v nosečnosti se močno poveča. Pri zdravih nosečnicah koncentracija PAPP-A progresivno narašča do poroda. V najvišjih koncentracijah se nahaja v perifernem krvnem obtoku nosečnice (41).

Z RT-PCR analizo so odkrili, da je mRNA PAPP-A in proMBP prisotna v številnih različnih reproduktivnih (pri ženskah se sintetizira v jajčnikih, jajcevodu, celicah rumenega telesca, endometriju in monometriju) in nereproduktivnih tkivih (ledvica, črevo, celice kostnega mozga, normalno in rakavo tkivo dojke), kjer je koncentracija PAPP-A veliko nižja kot v placenti (36, 41). Pri moških je PAPP-A prisoten tudi v semenski tekočini in seminalnih veziklih(41).

Opisano je bilo tudi, da se PAPP-A izloča iz osteoblastov, fibroblastov, granuloznih celic in celic gladkega mišičja. Pri vseh teh sistemih je bila opisana od IGF odvisna IGFBP-4 proteinazna aktivnost PAPP-A (40).

Preglednica III: Pomembnejši parametri PAPP-A in proMBP proteinov (36)

Parameter	PAPP-A	proMBP
Število aminokislin polipeptida	1547	207
Molekulska masa ogljikovega hidrata	26,5 kDa	14,8 kDa
Molekulska masa PAPP-A monomera	<200 kDa	38 kDa
Molekulska masa kompleksa PAPP-A/proMBP	>500 kDa	
Izoelektrična točka-pI	5.4	6.2
Kromosom	9	11
Glavni vir v nosečnosti	Sinciciotrofoblast  Placentarne x  celice	Placentarne x  celice

### 5. 3. Biološka funkcija PAPP-A

Vse od odkritja PAPP-A in do leta 1999 je bilo znanje o biološki funkciji PAPP-A pomanjkljivo. V preteklosti so PAPP-A označili kot transportni protein za cink in kot pregrado proti fagocitni-proteolitični obrambi. Opisan je bil tudi kot inhibitor levkocitne elastaze in z lektinom spodbujene limfoblastogeneze (36). Najnovejše raziskave so pokazale, da je PAPP-A proteinaza odgovorna za cepitev IGFBP-4 (od IGF odvisna IGFBP-4 proteinaza), enega od 6 IGFBP (IGFBP 1-6) (42).

IGFBP delujejo kot regulatorji biološke aktivnosti inzulinu podobnega rastnega faktorja I (IGF I) in inzulinu podobnega rastnega faktorja II (IGF II), ter služijo kot njihov

transportni protein. Nekateri IGFBP lahko omogočijo delovanje IGF v določenih bioloških sistemih, večina IGFBP pa inhibira miogeno delovanje IGF (42).

IGF I je beljakovina, ki je normalno prisotna v človeški krvi. Sodeluje v procesu ateroskleroze koronarnih žil, povzroča hipertrofijo celic srčne mišice ob povečanem krvnem tlaku ter modulira druga patofiziološka dogajanja v našem telesu (43).

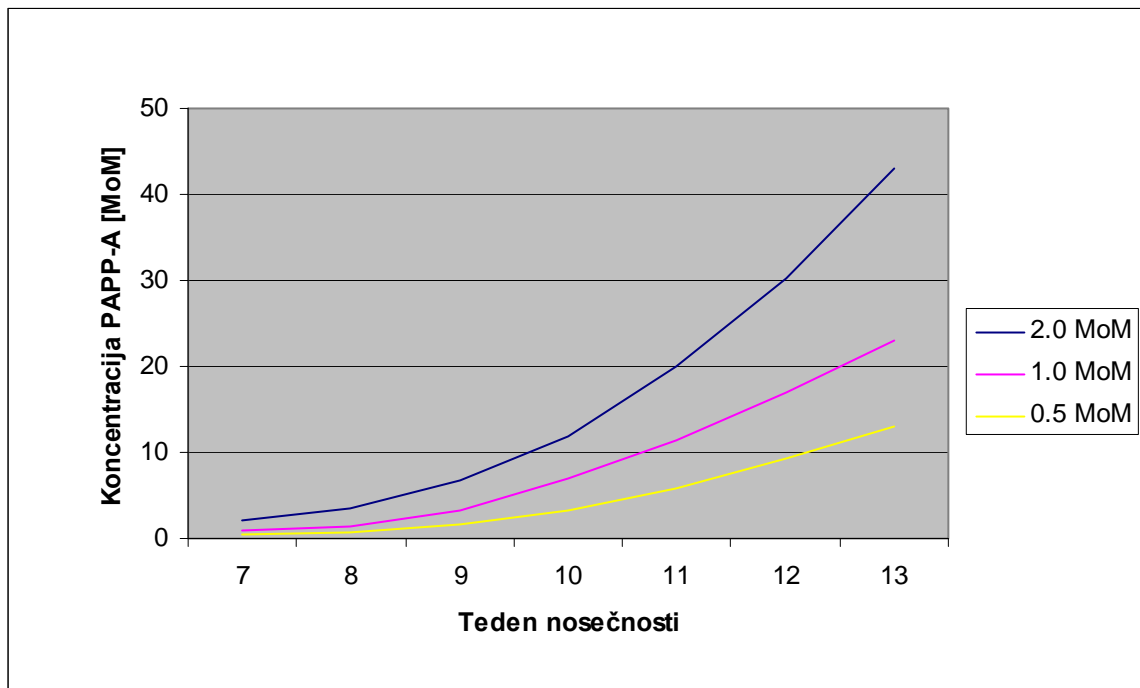
IGF v nosečnosti igra pomembno vlogo pri invaziji trofoblasta in pomaga pri zgodnjem razvoju in vaskularizaciji placente. Te zgodnji dogodki pri razvoju placente so odločilni za normalen potek nosečnosti, saj kadar ne potekajo pravilno, lahko privedejo do splava, znotrajmaternične omejitve rast ploda, z nosečnostjo povzročene hipertenzivne bolezni, smrti ploda v maternici, prezgodnjega poroda in carskega reza. Te dogodki so posledica zmanjšane sproščanja IGF, ki se odraža v nizkih koncentracijah PAPP-A (36).

Najpomembnejšo vlogo med vsemi šestimi IGFBP ima IGFBP-4, ki nastaja v gladkomišičnih celicah v žilni steni. IGFBP-4 je močan inhibitor delovanja IGF. Specifična IGFBP-4 proteinaza (PAPP-A) cepi IGFBP-4 v centralni regiji in tako povzroči sprostitve IGF-I in njegovo aktivacijo. Torej PAPP-A pospešuje delovanje IGF. Prosti IGF se nato veže na površinski receptor tarčne celice in vpliva na rast in metabolizem celic (42).

Kadar pa je PAPP-A vezan s proMBP v PAPP-A/proMBP kompleks, je le ta neaktiven. Primerjava med prostim in kompleksiranim PAPP-A je presenetljivo odkrila, da ima prosti PAPP-A 100-krat večjo proteolitično aktivnost kot v kompleksu. S to razlago so označili PAPP-A kot proteolitični lokalni regulator aktivnosti IGF, proMBP pa kot njegov inhibitor (36). Za normalno celično delovanje je torej potrebno uravnoteženo dinamično ravnovesje med IGF, IGFBP-4 in IGFBP proteinazami. Vsi trije skupaj delujejo tudi v večjih sistemih, še posebej v reproduktivnih in kardiovaskularnih sistemih (42, 43).

#### 5. 4. PAPP-A v nosečnosti

Koncentracija PAPP-A v plazmi je pri ženski najvišja med nosečnostjo, saj se nivo plazme med nosečnostjo v primerjavi z nenosečim stanjem poveča kar za 150-krat. PAPP-A je najizdatnejši v krvnem obtoku matere. Pri ženskah z enoplodno nosečnostjo je bil PAPP-A prvič zaznan v krvi matere 28 dni po oploditvi. Koncentracija v serumu eksponentno narašča v prvem tromesečju. V tem času je na vsake 3-4 dni koncentracija 2-krat večja. Nato narašča postopno do poroda. Po 36. tednu koncentracija le narašča malo hitreje in je najvišja ob porodu (do 250 ml) (36).



Graf 1: Nivo PAPP-A v serumu nosečnice konec prvega in začetek drugega tromesečja (36)

Po porodu je izločanje PAPP-A iz periferne krvi počasnejše, kot izločanje ostalih molekul proizvedenih v trofoblastu. Povprečen razpolovni čas PAPP-A po normalnem porodu je  $52,9 \pm 25,8$  ure.

Izven krvnega obtoka matere so porazdeljene le manjše količine PAPP-A. V sledih so ga zaznali v amnijski tekočini, v klostrumu in v krvi zarodka (koncentracija v krvnem obtoku zarodka je 100-krat manjša kot v krvnem obtoku matere).



Celotna količina PAPP-A, ki je porazdeljena izven krvnega obtoka matere, kaže na prevladovanje sekrecije iz trofoblastov v krvni obtok matere (36).

## 5. 5. Klinična uporaba PAPP-A

Kmalu po opisu in izolaciji PAPP-A so prve študije pokazale njegovo klinično uporabnost pri ugotavljanju različnih nepravilnosti v nosečnosti(36).

Nizke koncentracije PAPP-A, ki so odraz zmanjšanega sproščanja IGF so povezane z :

- kromosomskimi nepravilnostmi ( trisomija 21, 18 in 13, triploidija, na spolni kromosom vezana aneuploidija) (44)
- znotrajmaternično omejitev rasti ploda (nižja teža plodu) (45, 46)
- prezgodnjim porodom (45, 46)
- izgubo ploda pred ali v 24. tednu (47)
- mrtvorojenostjo (45, 46, 47)
- preeklampsijo (46, 47)

Najpogosteje se uporablja kot biokemijski označevalec za ugotavljanje Downovega sindroma (trisomija 21) zarodka v prvem tromesečju nosečnosti (36).

Koncentracijo PAPP-A se meri tudi pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom (nestabilna angina, akutni miokardni infarkt) in v nestabilnih plakih pri ljudeh s srčnimi boleznimi (48).

## II. NAMEN DELA

Med nosečnostjo lahko pride do povišanega krvnega pritiska , ki lahko vodi v preeklampsijo in eklampsijo. Ti dve bolezenski stanji predstavljata velik problem, saj se lahko nosečnost konča tudi s smrtjo zarodka in matere.

Zaradi tega iščemo dejavnike, ki bi napovedali, da se bo med nosečnostjo razvila hipertenzija.

Predpostavka je, da bi bil PAPP-A tisti dejavnik, ki bi lahko napovedoval to komplikacijo.

Namen naloge je, da bomo pri nosečnicah, ki gredo na presejalni test za Downov sindrom in jim rutinsko v 14. tednu nosečnosti določimo PAPP-A, določitev tega parametra primerjali s pojavom preeklampsije oz. eklampsije.

### **III. PREISKOVANCI IN METODA DELA**

#### **1. OPIS SKUPINE PACIENTK**

V raziskavo smo vključili 135 nosečnic, ki so prišle v ambulanto ginekološke klinike in katerim smo rutinsko v 14. tednu nosečnosti določili PAPP-A pri presajalnem testu za Downov sindrom.

Nosečnice smo razdelili v dve starostni skupini, saj je pri nosečnicah starih 35 let ali več večja možnost nastanka preeklampsije:

- nosečnice mlajše od 35 let (N=108)
- nosečnice stare 35 let ali več (N=27)

#### **2. METODA DELA**

##### **2. 1. Instrumenti in oprema**

Koncentracija PAPP-A je bila izmerjena z analizatorjem BRAHAMS Kryptor proizvajalca CEZANNE S.A.A., Francija. Kryptor je avtomatiziran analizator za imunske metode, ki deluje na principu fluorescence. Z njim se izvajajo komercialno pripravljene avtomatizirane teste, ki temeljijo na imunskih reakcijah. Potrebujemo še standardno laboratorijsko opremo.

## 2. 2. Princip določanja PAPP-A

Osnova določanja je imunska reakcija antigen(Ag)-protitelo(Pt). Fluorescenčna imunološka tehnika temelji na TRACE tehnologiji. Osnova je neradioaktivni prenos energije z donorja na akceptor, pri čemer se spremeni njena intenziteta in valovna dolžina. V testu so uporabljena dvojna protitelesa; primarno Pt, konjugirano z europijevim kriptatom (donor) in sekundarno Pt, konjugirano z molekulo XL665 (akceptor). Ag iz vzorca se veže s protitelesi, pri čemer nastanejo imunski kompleksi Eu-kriptat/primarno Pt/Ag/sekundarno Pt/XL665. Imunske komplekse obsevamo z laserjem pri 337 nm, pri čemer ti pričnejo oddajati energijo pri 665nm. Ločevanje faz ni potrebno, ker je signal imunskih kompleksov drugačen od signala nevezanih molekul donorja in akceptorja. Koncentracija Ag v vzorcu je premosorazmerna z intenziteto fluorescence.

## 2. 3. Reagenti, kalibratorji, kontrole

Raztopina 1: za rekonstitucijo liofiliziranih konjugatov, za spiranje igle

Raztopina 2: za rekonstitucijo liofiliziranih konjugatov, vsebuje KF

Raztopina 3: za spiranje sistema, vsebuje NaOH

Raztopina 4: za spiranje sistema, vsebuje NaOH

Dilucijska ploščica

Reagenčna ploščica

Pufer – liofiliziran

Vsi reagenti so iz komplev BRAHMS Buffer, BRAHMS Solution, BRAHMS Solution 2, BRAHMS Solution 3, BRAHMS Solution 4, BRAHMS

## 2. 4. Kalibracija

Kalibracija se izvaja z dvema kalibratorjema, ki sta v kompletu reagentov, ali posamično, odvisno od vrste testa. Izvaja se ob vsaki zamenjavi lot številke reagenta, ob uvedbi nove preiskave, ko kalibracija poteče in po potrebi (na vsake 14 dni).

## 2. 5. Delovni postopek

Delovni postopek zajema dnevno pripravo analizatorja za delo, delo na njem, ter vzdrževanje. Za redno delo pripravimo raztopuni 3 in 4, raztopini 1 in 2 sta potrebni samo pri rdnih vzdrževalnih servisih. Na usrezna mesta na analizatorju postavimo raztopini 3 in 4 in dilucijsko ploščico. Raztopimo pufer (1 vrečko na 10 litrov deionizirane vode) in pripravimo deionizirano vodo ter namestimo na ustrezna mesta.

Prižiganje analizatorja (med tednom se analizator ne ugaša, konec tedna se ugasne, reagente shranimo v hladilnik): naprej prižgemo računalnik, nato analizator. Počakamo, da se povežeta i nnto odpremo program Kryptor. Program odpremo z gumbom "File"- "Log on", "User" in se z geslom vpišemo v program. Analizator nam javlja posamezna opravila (dnevno, tedensko, mesečno), ki jih izvršimo in potrdimo z "OK". V analizator vložimo reagente s pravilno obrnjenimi kodami, zapremo pokrov, krožnik se zavrti in preveri reagente. Če je potrebna kalibracija, jih kalibriramo. Namestimo reagenčno ploščico z ukazom "Load reaction plate" in počakamo 30 minut, da se le-ta segreje.

Kalibracija: v analizator vložimo kalibrator z vidno kodo, na delovni listi označimo "Add calibrator"- "Ok" in začnemo preiskave. Po končani kalibraciji jo potrdimo z "Validate".

Priprava vzorcev: vzorce vnesemo v delvno listo v meniju "Add sample", označimo zeleno preiskavo in potrdimo z "OK", ter pričnemo z analizo.

Kontrola kvalitete: vsak dan pred začetkom analize analiziramo trinivojski kontrolni serum; vnesemo ga v meniju "Add Controle", "OK" rezultate validiramo in izpišem na list. Kontrolne serume hranimo po raztapljanju v alikvotih po 200 µL.

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

Vsak dan raztopimo svež alikvot, ostanek zavržemo. Če vrednosti kontrolnih serumov odstopajo, se ravnamo po določenih standardno operativnih postopkih.

## 2. 6. Ponovljivost v seriji in izven serije

Preglednica IV: Ponovljivost v serij

IU/L	KV v seriji
< 0.05	≤ 23%
0.05 – 0.3	≤ 10%
0.3 – 1.5	≤ 3%
1.5 – 2.5	≤ 2%
2.5 – 3.5	≤ 2%
> 3.5	≤ 2%

Preglednica V: Ponovljivost med serijama

IU/L	KV izven serije
< 0.05	≤ 24%
0.05 – 0.3	≤ 10%
0.3 – 1.5	≤ 3%
1.5 – 2.5	≤ 4%
2.5 – 3.5	≤ 5%
> 3.5	≤ 5%

## 2. 7. Referentne vrednosti PAPP-A v prvem tromesečju nosečnosti

Študija, v katero je bilo vključenih 5000 nosečnic in več kot 35000 potrjenih vzorcev, kaže naslednje rezultate:

Preglednica VI: Normalne vrednosti PAPP-A v prvem tromesečju nosečnosti (49)

Gestacijska doba (zaključeni tedni)	n	5. percentila ( IU/L)	Mediana (IU/L)	95. percentila (IU/L)
11 + 0	> 5000	0.632	1.587	3.986
12 + 0	> 5000	1.040	2.612	6.560
13 + 0	> 5000	1.543	3.874	9.730
<b>14 + 0</b>	<b>&gt; 5000</b>	<b>2.062</b>	<b>5.178</b>	<b>13.005</b>

## IV. REZULTATI LABORATORIJSKIH MERITEV

### 1. STAROST IN VREDNOST PAPP-A NOSEČNIC

Preglednica VII: Starost in vrednost PAPP-A ob odvzemu krvi nosečnic mlajših od 35 let ( 1 - 23 )

Preglednica VIII: Starost in vrednost PAPP-A ob odvzemu krvi nosečnic mlajših od 35 let ( 24 - 46 )

Vzorec	Starost nosečnice ob odvzemu krvi	PAPP-A [IU/L]
1	25	4,7
2	30	1,3
3	34	4,0
4	24	2,9
5	33	4,2
6	24	1,1
7	24	2,7
8	32	3,8
9	30	1,9
10	27	3,8
11	29	4,7
12	28	1,7
13	30	4,5
14	25	2,3
15	29	4,4
16	34	2,6
17	29	6,9
18	25	7,5
19	28	3,7
20	30	2,3
21	25	3,7
22	28	2,3
23	22	6,1

Vzorec	Starost nosečnice ob odvzemu krvi	PAPP-A [IU/L]
24	27	1,8
25	26	4,2
26	34	1,7
27	30	1,9
28	29	1,4
29	26	1,6
30	24	6,4
31	31	10,3
32	34	2,3
33	24	2,2
34	34	2,7
35	29	2,8
36	31	3,1
37	34	2,9
38	28	4,7
39	31	1,2
40	22	2,5
41	29	3,5
42	28	3,3
43	28	1,9
44	28	4,6
45	28	1,3
46	25	3,2



Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

Preglednica IX: Starost in vrednost PAPP-A ob odvzemu krvi nosečnic mlajših od 35 let ( 47 - 77 )

Preglednica X: Starost in vrednost PAPP-A ob odvzemu krvi nosečnic mlajših od 35 let ( 78 - 108 )

Vzorec	Starost nosečnice ob odvzemu krvi	PAPP-A [IU/L]
47	22	2,3
48	34	4,3
49	29	3,6
50	32	8,6
51	25	2,9
52	26	2,4
53	32	4,2
54	29	3,4
55	27	2,8
56	29	6,4
57	25	1,7
58	29	4,4
59	25	4,5
60	29	8,6
61	27	4,2
62	22	1,3
63	33	5,0
64	31	3,8
65	27	1,7
66	25	3,9
67	27	2,2
68	30	4,6
69	27	3,1
70	28	5,0
71	25	1,9
72	29	2,5
73	28	1,4
74	27	5,9
75	29	4,3
76	28	2,2
77	28	1,2

Vzorec	Starost nosečnice ob odvzemu krvi	PAPP-A [IU/L]
78	23	1,4
79	30	0,5
80	27	10,8
81	33	3,5
82	28	8,5
83	29	1,4
84	32	6,5
85	25	10,1
86	31	1,9
87	34	4,6
88	34	6,4
89	30	6,3
90	33	4,8
91	31	2,2
92	34	1,5
93	31	3,9
94	30	8,0
95	27	2,1
96	33	1,9
97	27	6,8
98	26	2,2
99	28	2,4
100	31	6,8
101	27	1,0
102	28	5,4
103	27	5,1
104	29	4,3
105	26	1,5
106	32	3,3
107	31	3,3
108	25	2,1

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

Preglednica XI: Starost in vrednost PAPP-A ob odvzemu krvi nosečnic starih 35 let ali več

Vzorec	Starost nosečnice ob odvzemu krvi	PAPP-A [IU/L]
1	36	7,1
2	36	6,3
3	35	5,8
4	39	8,7
5	36	2,8
6	42	4,8
7	41	1,4
8	35	1,2
9	37	4,7
10	39	3,8
11	35	0,9
12	40	3,6
13	35	1,6
14	35	3,8
15	36	4,4
16	36	1,2
17	36	2,8
18	35	4,5
19	35	11,2
20	40	8,0
21	35	2,0
22	35	5,9
23	35	4,1
24	35	4,0
25	35	3,9
26	37	2,7
27	38	1,4

## 2. STATISTIČNI IZRAČUNI

Vse podatke smo uredili v tabele in statistično obdelali v programu Microsoft Exel.

Preglednica XII: Število nosečnic, ki v določeni starostni skupini segajo v določeno referentno območje za PAPP-A

	5 percentila	5 – 95 percentila	95 percentila
Celotna skupina nosečnic	33	102	/
Skupina mlajših od 35 let	26	82	/
Skupina starih 35 let ali več	7	20	/

Preglednica XIII: Rezultati statističnih izračunov I

	X starost +/- SD	X PAPP-A +/- SD	SD x1x2 (PAPP-A)	Te (PAPP-A)	Prostost na stopnja	Tt 95% verjet.	Tt 99% verjet.
Skupina nosečnih mlajših od 35 let	28,5 +/- 3,14	3,7 +/- 2,17					
Skupina nosečnic starih 35 let in več	36,6 +/- 2,13	4,2 +/- 2,52					
Celotna skupina			2,244	0,973	133	1,96	2,58

Blatnik I. Z nosečnostjo povezan plazemski protein A kot napovedni dejavnik za hipertenzijo v nosečnosti

---

Preglednica XIV: Rezultati statističnih izračunov II (5 percentila)

	N	X PAPP- A	SD	SD x1x2	Te	Prostostna stopnja	Tt 95% verjet.	Tt 99% verjet.
Nosečnice mlajše od 35 let	26	1,504	0,345	0,345	0,803	31	2,04	2,75
Nosečnice stare 35 let ali več	7	1,386	0,348					

Preglednica XV: Rezultati statističnih izračunov III (5-95 percentila)

	N	X PAPP- A	SD	SD x1x2	Te	Prostostna stopnja	Tt 95% verjet.	Tt 99% verjet.
Nosečnice mlajše od 35 let	82	4,394	2,037	2,069	1,455	100	1,98	2,63
Nosečnice stare 35 let ali več	20	5,145	2,198					

## V. RAZPRAVA

Hipertenzija je kronična bolezen, katere glavni sindrom je zvišan krvni tlak in spremlja 10% nosečnosti. Hipertenzivne bolezni so v nosečnosti najpogostejše bolezni in so s svojimi zapleti ena najpogostejših in nevarnih stanj v nosečnosti. 70% teh bolezni je pripisati preeklampsiji, preostalih 30% pa preeksistentni kronični hipertenziji. Znanе so različne klasifikacije hipertenzije v nosečnosti. Najboljša klasifikacija je tista, ki pove kakšno je tveganje za mater in plod in je vzorčna. Razvrstitev Daveya in MacGillivraya je zaenkrat najbolj natančna in je prikazana v preglednici 1 (10).

Etiologija PE prav tako še ni povsem znana. Najnovejša definicija razlaga, da je PE multiorgansko obolenje z endotelno funkcijsko motnjo, ki se klinično izraža z nezadostno prekrvavitvijo organov – z nekrozami in krvavitvami zaradi sproščanja vazoaktivnih snovi, povečane občutljivosti nanje ter aktivirano koagulacijsko kaskado (15). Vzrok za nastanek PE je motnja v placentaciji, ki sproži sproščanje dejavnikov, ki okvarijo endotelij in pri hudi obliki bolezni povzroči avtoakceleracijo patofizioloških mehanizmov. Pri nosečnicah, pri katerih se bo pojavila PE, zaradi motene imunološke tolerance ne pride do izgube muskuloelastičnega medija sprilanih arterij, ki se tako ne razvijejo v uteroplacentarne kanale z nizkim uporom, nizkim tlakom in visokim pretokom. Spiralne arterije obdržijo možnost konstrikcije, okvarjen endotelij ne opravlja več svoje funkcije (9).

Znano je, da se pri nosečnicah s PE pojavijo različni klinični znaki, kot so sprememba krvnega tlaka, minutnega volumna srca, perifernega upora žil, koncentracije trombocitov, pogosto pa pride tudi do vazokonstrikcije. PE prizadene tudi različne organske sisteme, zato je zgodnje odkrivanje in zdravljenje PE zelo pomembno (21, 22).

Za odkrivanje PE se trenutno uporabljajo diagnostični testi, ki slonijo na spremenjeni občutljivosti žilne stene na vazoaktivne snovi (test občutljivosti na angiotenzin II in 'Roll over' test), ultrazvočna preiskava pretoka krvi v maternični arteriji, Dopplerjeva metoda s katero ugotavljamo pretočne indekse in zarezo v maternalnih arterijah ter določeni laboratorijski testi.

Te metode se izvajajo med 20. in 24. tednom nosečnosti, ko je za preprečevanje bolezni že prepozno, zato težimo k dokazovanju različnih biokemičnih označevalcev, ki nam lahko pomagajo pri zgodnjem odkrivanju PE in E in pri napovedi rizika za PE (20).

Eden možnih biokemičnih označevalcev, ki bi napovedal, da se bo med nosečnostjo razvila hipertenzija oz. PE, bi lahko bil tudi PAPP-A. PAPP-A je proteinaza odgovorna za cepitev IGFBP-4 (od IGF odvisna IGFBP-4 proteinaza). IGFBP delujejo kot regulatorji biološke aktivnosti IGF I in IGF II, ter služijo kot njihov transportni protein. IGFBP-4 je močan inhibitor delovanja IGF. Specifična IGFBP-4 proteinaza (PAPP-A) cepi IGFBP-4 v centralni regiji in tako povzroči sprostitvev IGF in njegovo aktivacijo. Torej PAPP-A pospešuje delovanje IGF (42). IGF v nosečnosti igra pomembno vlogo pri invaziji trofoblata in pomaga pri zgodnjem razvoju in vaskularizaciji placente, kar je odločilno za njen razvoj in normalen potek nosečnosti. Kadar te dogodki ne potekajo pravilno lahko, poleg z nosečnostjo povezane hipertenzije, privedejo tudi do splava, znotrajmaternične omejitve rasti ploda, smrti ploda v maternici, prezgodnjega poroda in carskega reza. Te dogodki so posledica zmanjšane sproščanja IGF, ki se odraža v nizkih koncentracijah PAPP-A (36).

V diplomski nalogi smo si postavili vprašanje o možnosti uporabe PAPP-A kot biokemičnega označevalca za odkrivanje nepravilne invazije trofoblata v prvem tromesečju nosečnosti. 135 nosečnicam, ki so prišle v ambulantno ginekološke klinike na rutinski presejalni test za Downov sindrom v 14. tednu nosečnosti, smo določili vrednost PAPP-A. Koncentracija PAPP-A je bila izmerjena z analizatorjem BRAHMS Kryptor, ki deluje na principu fluorescence. Z njim se izvajajo komercialno pripravljene avtomatizirani testi, ki temeljijo na imunskih reakcijah.

Izmerjene vrednosti PAPP-A nosečnic smo primerjali z referentnimi vrednostmi PAPP-A za 14. teden nosečnosti, ki so podane v literaturi (preglednica VI). V celotni skupini nosečnic ima znižano vrednost PAPP-A 33 preiskovank, kar ustreza 24,4% celotne skupine. Dobljeni rezultati niso skladni s podatki iz literature, ki navajajo, da hipertenzija spremlja 10% nosečnosti. Od teh 10 % pripada 7 % PE, 3 % pa preeksistentni kronični hipertenziji.

Samo na osnovi dobljenih vrednosti PAPP-A ne moremo trditi, da se bo pri nosečnicah, ki imajo znižane vrednosti PAPP-A zagotovo razvila hipertenzija in kasneje PE. Obravnavamo jih kot skupino nosečnic pri katerih je verjetnost za pojav hipertenzije oz. PE večja. Podrobneje spremljamo potek nosečnosti z rednim merjenjem krvnega tlaka in ultrazvočnimi preiskavami. Za bolj natančen odgovor o tem, kako in v kakšni meri nizke koncentracije PAPP-A vplivajo na razvoj hipertenzije in kasneje PE, bi bilo potrebno počakati do konca nosečnosti preiskovank. Takrat bi vedeli pri kateri nosečnici se je razvila PE in kdaj, ter tako bolj natančno napovedali vpliv znižane koncentracije PAPP-A na razvoj hipertenzije in PE. Naše preiskave smo zaključili pred koncem nosečnosti preiskovank.

Na razvoj PE v nosečnosti poleg ostalih dejavnikov vpliva tudi starost nosečnic. V literaturi je podano, da je pri nosečnicah mlajših od 15 let in starejših od 35 let možnost za razvoj PE večja (9). V preiskovani skupini nosečnic so vse nosečnice starejše od 15 let, tako da smo nosečnice razdelili v dve starostni skupini. V prvo skupino smo uvrstili nosečnice mlajše od 35 let (preglednice VII, VIII, XI, X), v drugo skupino pa smo uvrstili nosečnice stare 35 let ali več (preglednica XI). Dve starostni skupini smo med seboj primerjali in poskušali potrditi vpliv starosti nosečnice na znižano koncentracijo PAPP-A in na razvoj PE.

V skupini nosečnic, ki so mlajše od 35 let ima glede na referentne vrednosti podane v literature, znižano vrednost PAPP-A 26 nosečnic, kar ustreza 24,1 % celotne skupine. V skupini nosečnic, ki so stare 35 let ali več ima znižano vrednost PAPP-A 7 nosečnic, kar ustreza 25,9 % celotne skupine preiskovank. Te vrednosti kažejo, da signifikantnih razlik med skupinama ni. Razlog je mogoče iskati v veliki razliki števila preiskovank med skupinama, saj je skupina nosečnic starih 35 let ali več za 75 % manjša od skupine nosečnic mlajših od 35 let. Za natančnejše rezultate bodo potrebne nadaljnje raziskave.

Za natančnejšo primerjavo smo skupini nosečnic statistično primerjali in tako poskušali ugotoviti ali je pri nosečnicah starih 35 let ali več vrednost PAPP-A nižja. Ker imamo v raziskavi samo dve testni skupini je za iskanje razlik med skupinama najbolj primeren T test. S T testom testiramo razlike med povprečnimi vrednostmi dveh vzorcev. Obstajata 2 vrsti T testa: T test za odvisne vzorce (ena sama skupina enot) in T test za neodvisne vzorce (dve neodvisni skupini enot). Za statistično primerjavo smo uporabili slednjega.

Rezultati statističnih izračunov so prikazani v preglednici XIII. Vrednost T testa eksperimentalnega je manjša od T testa tabelaričnega pri 95% verjetnosti, kot pri 99% verjetnosti, torej ne moremo trditi, da se seriji razlikujeta, oziroma ne moremo trditi, da je vrednost PAPP-A nižja po 35 letu.

Nato smo statistično primerjali vrednosti PAPP-A starostnih skupin, ki segajo v določeno referentno območje za PAPP-A. Rezultati statističnih izračunov za referentno območje 5 percentile so prikazani v preglednici XIV. Izračuni kažejo, da je T test eksperimentalni manjši od T testa tabelaričnega pri 95 % verjetnosti, kot tudi pri 99 % verjetnosti, torej prav tako ne moremo trditi, da se seriji razlikujeta.

Rezultati statističnih izračunov vrednosti PAPP-A starostnih skupin, ki segajo v referentno območje 5 – 95 percentile so prikazani v preglednici XV. Tudi tukaj izračuni kažejo, da je T test eksperimentalni manjši od T testa tabelaričnega pri 95 % verjetnosti, kot tudi pri 99 % verjetnosti, torej ne moremo trditi, da je vrednost PAPP-A nižja po 35 letu.

Statistična primerjava skupin s T testom nam potrdi, da razlik v koncentraciji PAPP-A med testnima skupinama ni. Kot smo že predhodnje navedli, bi lahko bil glavni vzrok velika razlika v številu vzorcev med skupinama. Potrebne bi bile nadaljne raziskave, v katere bi bilo vključeno večje število nosečnic starih 35 let ali več.



## VI. SKLEP

V diplomski nalogi smo dokazovali vpliv PAPP-A na razvoj PE v nosečnosti in vpliv starosti nosečnice na znižane koncentracije PAPP-A v nosečnosti. Poglavitne ugotovitve so sledeče:

1. Pri nosečnicah s PE je v primerjavi z normotenzivnimi nosečnicami koncentracija PAPP-A v krvi nižja. Tudi v naši raziskavi smo izmerili znižano koncentracijo PAPP-A v krvi nosečnic in jih uvrstili v skupino nosečnic z večjo verjetnostjo za pojav PE.
2. Pri preiskovani skupini je odstotek nosečnic z znižano koncentracijo PAPP-A večji kot v literaturi podan odstotek nosečnic, pri katerih se razvije PE, torej na osnovi naših rezultatov ne moremo trditi, da je PAPP-A dober samostojni napovednik za pojav hipertenzije oz. PE v nosečnosti.
3. Pri statistični primerjavi starostnih skupin glede na koncentracije PAPP-A smo ugotavljali ali je razlika med skupinama v povprečni vrednosti PAPP-A signifikantna. Rezultati ne kažejo signifikantne razlike med povprečno vrednostjo PAPP-A nosečnic mlajših od 35 let in povprečno vrednostjo PAPP-A nosečnic starih 35 let ali več.
4. Ker smo želeli natančneje preučiti vpliv starosti na koncentracijo PAPP-A, smo dodatno statistično primerjali koncentracije PAPP-A med skupino nosečnic mlajših od 35 let in skupino nosečnic starih 35 let ali več v območju 5 oz. 5 - 95 percentile referentnih vrednosti. Signifikantnih razlik med skupinama v območju 5 oz. 5 – 95 percentile ni bilo.

## VII. LITERATURA

1. Lotrič-Pentek S., Lenart L., Serbec-Logar B.: nosečnost in novorojenček, Centralni zavod za napredek gospodinjstva, Ljubljana, 1977: 1-45
2. <http://virus.dsms.net/index.php/spolnost/anatomija-in-fiziologija/menstruacija.html>
3. [http://www.bambino.si/ovulacija\\_in\\_oploditev](http://www.bambino.si/ovulacija_in_oploditev)
4. Demarest R. J., Sciarra J. S.: Zanositev, porod, preprečevanje nosečnosti, Mladinska knjiga, Ljubljana, Beograd, Zagreb, 1977: 15-94
5. Borko E.: Ginekologija: za zdravstvene šole, Tehniška založba, Ljubljana, 1977: 9-77
6. Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomažević T.: Od nastanka gamet do rojstva-oploditev z biomedicinsko pomočjo, Didakta, Slovenija, 2002: 27-197
7. <http://www.ztm.si/res/publication/971.pdf>
8. Kolenc M.: Porodništvo, Zavod republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana, 1996: 6-65
9. Pajntar M., Novak-Antolič Ž.: Nosečnost in vodenje poroda, Cankarjeva založba, Ljubljana, 1994: 27-61

10. Slovensko zdravniško društvo, Sekcija za perinatalno medicino: Arterijska hipertenzija v nosečnosti, zbornik prispevkov, Ljubljana, 1995: 6-85
11. Kirar-Fazarinec I.: Načela preprečevanja maternalne umrljivosti in obolevnosti, Zdravstveno varstvo, 1998; 37: 93-95
12. Gabbe S., Niebyl J., Simpson J.L.: Obstetrics: normal and problem pregnancies, New York, Churchill Livingstone, 1991: 993-1022
13. <http://www.webmd.com/baby/tc/preeclampsia-and-high-blood-pressure-during-pregnancy-topic-overview>
14. Blejec T., Cerar V.: Načrtovanje poroda pri bolnicah s hipertenzijo v nosečnosti, Zdravstveno varstvo, Slovenija, 1998; 37: 150-151
15. Zbornica zdravstvene nege Slovenije: Nujna stanja v ginekologiji in porodništvu ter porod na terenu, Zveza društev medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov Slovenije, Sekcija zdravstvenih tehnikov in medicinskih sester-reševalcev, Zbornik predavanj, Ljubljana, 2003
16. Cerar V. M.: Eklampsija in drugi generalizirani krči v nosečnosti, Nevrološke bolezni in nosečnost, Zbornik predavanj VI, Medicinski razgledi, Portorož, 2005: 85-90
17. Roberts J.M., Pearson G., Cutler J., Lindheimer M.: Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy, Hypertension, 2003: 437-443

18. O'Brien P.M.S., Walker T.J., Singh P.K., Kilby M.D., Jones P.W.: Failure of Platelet Angiotensin II Binding to Predict Pregnancy Induced Hypertension, *Obstetrics and Gynecology*, 1993; 93: 203-206
19. Zbornik predavanj, Perinatološko-revmatološki simpozij: Medicinski razgledi, Slovenija, 2003: 1-11
20. Šajina-Stritar B.: Testi za napovedovanje preeklampsije, *Medicinski razgledi*, 2003; 42: 1-10
21. Myatt L., Miodovnik M.: Predoction of preeclampsia, *Seminars in perinatology*, 1999; 23: 45-57
22. Dekker G.A., Sibai B.M.: Early detection of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 1991; 165: 160-172
23. Reisinger K., Baal N., McKinnon T., Münstedt K., Zygmunt M.: The gonadotropins: Tissue specific angiogenic factors, *Molecular and cellular endocrinology*, 2007; 269: 65-80
24. Davison J.M., Homuth V., M., Jeyabalan A., Conrad K. P., Karumanchi S. A., Quaggin S., Dechend R., Luft C. F.: New aspects in the pathophysiology of preeclampsia, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004; 15: 2440-2448
25. Mittal P., M.D., Espinoza J., Hassan S., Kusanovic J.P., Edwin S.S., Nien J.K., Gotsch F., Than N.G., Erez O., Mazaki-Tovi S., Romero R.: Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia, *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2007; 20 (9): 651-659

26. Fuglsang J., Lauszus F., Flyvbjerg A., Ovesen P.: Human placental growth hormone, insuline-like growth factor I and II, and insulin requirements during pregnancy in type I diabetes, *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2003; 88 (9): 4355-4361
27. Burger O., Pick E., Zwickel J., Klayman M., Meiri H., Slotky R., Mandel S., Rabanovitch L., Paltieli Y., Admon A., Gonen R.: Placental protein 13 (PP-13): effect on cultured throphoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies, *Diagnostic Tehnology, Israel*, 2004; 25 (7): 608-622
28. Gragner J.P., Alexander B.T., Llinas T.M., Bennett W.A., Khalil R.A.: Pathophysiology of Hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelian dysfunction, *Hypertension*, 2001; 38: 718-722
29. Lyall F., Greer I.A.: The vascular endothelium in normal pregnancy and preeclampsia, *Reviews of Reproduction*, 1996; 1: 107-116
30. Keelan J.A., Taylor R., Schellenberg J.C.: Serum Activin A, Inhibin A, anf Follistant Concentrations in Preeclampsia or Small for Gestational Age Pregnancies, *Obstetrics and Gynecology*, 2002; 99: 267-274
31. Hamar B.D., Buhimschi I.A., Sfakianaki A.K., Pettker C.M., Magloire L.K., Funai E.F., Copel J.A., Buhimschi C.S., Serum and urine inhibin A but not free activin A are endocrine biomarkers of severe preeclampsia, *Obstetrics and Gynecology*, 2006; 195: 1636-1645

32. Salomon L.J., Benattar C., Audibert F., fernandez H., Duyme M., Taieb J., Frydman R.: Severe preeclampsia is associated with high inhibin A levels and normal leptin levels at 7 to 13 weeks into pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2003; 189: 1517-1522
33. Yoneyama Y., Sawa R., Suzuki S., Miura A., Kobayashi H., Doi D., Yoneyama K., Araki T.: Relation between adenosine deaminase activities and cytokine-producing T cells in woman with preeclampsia, *Clinical Biochemistry*, 2002; 35: 303-306
34. Seppa N.: Preeclampsia progress blood test for predicting pregnancy problems, *Science News*, 2003; 163: 293
35. Wolf M., Sandler L., Munoz K., Hsu K., Ecker J.L., Thadhani R.: First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: a prospective study, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002; 87: 1563-1568
36. Fialova L., Malbohan M.: pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A): theoretical and clinical aspects, *First Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, First Medical Faculty, Charles University, Prague*, 2002; 103(6): 194-205
37. <http://www.researchd.com/humanag/pappainfo.pdf>
38. Glerup S., Boldt H.,B., Overgaard M.T., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Oxvig C.: Proteinase Inhibition by Proform of Eozinophil Major basic Protein (pro-MBP) Is a Multistep Process of Intra- and Intermolecular Disulfide Rearrangements, *The Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280: 9823-9832

39. Gyrupe C., Christiansen M., Oxvig C.: Quantification of Proteolytically Active Pregnancy-Associated Plasma Protein-A with an Assay Based on Quenched Fluorescence, *Clinical Chemistry*, 2007; 53: 947-954
40. Laursen L.S., Overgaard M.T., Weyer K., Boldt H.B., Ebbesen P., Christiansen M., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Oxvig C.: Cell Surface Targeting of Pregnancy-Associated Plasma Protein A Proteolytic Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 27225-47234
41. Bischof P.: Three Pregnancy proteins (PP12, PP14, AND PAPP-A): Their Biological and Clinical Relevance, *American Journal of Perinatology*, 1989; 6 (2): 110-116
42. Overgaard M., Sørensen S.E., Stachowiak D., Boldt H.B., Kristensen L., Sottrup-Jensen L., Oxvig C.: Complex of pregnancy-associated plasma protein A and the proform of eosinophil major basic protein: Disulfide structure and carbohydrate attachment sites, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278: 2106-2117
43. Lawrencw J.B., Oxvig C., Overgaard M.T., Sottrup-Jensen L., Gleich G.J., Hays L.G., Yates III J.R., Conover C.A.: The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein A, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1999; 96: 3149-3153
44. Yaron Y., Heifetz S., Ochshorn Y., Lehavi O., Orr-Urtreger A.: Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome, *Prenatal Diagnosis*, 2002; 22 (9): 778-82

45. Smith G., Shah I., crossley J.A., Aitken D.A., Pell J.P., Nelson S.M., Cameron A.D., Connor M.J., Dobbie R.: Pregnancy-Associated Plasma Protein A and Alpha-fetoprotein and Prediction of Adverse Perinatal outcome, *Obstetrics and Gynecology*, 2006; 107: 161-166
  
46. <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=24602>
  
47. [http://www.healthline.com/blogs/pregnancy\\_childbirth/labels/fetal%20growth%20restriction.html](http://www.healthline.com/blogs/pregnancy_childbirth/labels/fetal%20growth%20restriction.html)
  
48. Bayes-Genis A., Conover C.A., Overgaard M.T., Bailey K.R., Christiansen M., Holmes D.R., Virmani R., Oxvig C., Schwartz R.S.: Pregnancy-Associated Plasma Protein A as a Marker of Acute Coronary Syndrom, *The New England Journal Of Medicine*, 2001; 345: 1022-1029
  
49. BRAHMS PAPP-A KRYPTOR, Instruction for use



