

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DARJA PUNGERTNIK

**PRIMERJAVA DVEH IMUNOKEMIJSKIH METOD ZA
DOLOČANJE PLACENTARNEGA RASTNEGA
DEJAVNIKA (PIGF) IN NJEGOV KLINIČNI POMEN PRI
PREEKLAMPSIJI**

**COMPARISON OF TWO IMMUNOCHEMICAL METHODS
FOR THE DETERMINATION OF PLACENTAL GROWTH
FACTOR (PIGF) AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE IN
PREECLAMPSIA**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. za strokovno vodstvo pri nastajanju magistrske naloge ter Stanki Sever dipl. inž. lab. biomed. za praktično pomoč.

Zahvaljujem se tudi mojemu možu mag. Danilu Pungertniku, MBA, univ. dipl. inž. rač. in inf. za spodbudo ter podporo v času študija.

Izjava

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

Darja Pungertnik

Ljubljana, november 2011

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Član komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

KAZALO

SEZNAM OKRAJŠAV	3
KAZALO SLIK	4
KAZALO GRAFOV	4
KAZALO PREGLEDNIC	5
POVZETEK.....	6
1. UVOD	7
1.1. Nosečnost in razvoj posteljice	7
1.2. Zapleti v nosečnosti, povezani s hipertenzijo	9
1.2.1. Preeklampsija	9
1.2.2. Novejše teorije nastanka preeklampsije	11
1.2.3. Napovedovanje in diagnostika preeklampsije	15
1.2.4. Zdravljenje preeklampsije	17
1.3. Placentarni rastni dejavnik (PIGF)	18
1.3.1. Splošne značilnosti	18
1.3.2. PIGF v vlogi kazalca preeklampsije	19
1.3.3. Določanje PIGF	20
1.3.4. Opredelitev parametrov vrednotenja metode in rezultatov	22
1.3.5. Referenčne vrednosti PIGF in sFlt-1	24
2. NAMEN DELA	25
3. MATERIALI IN METODE	26
3.1. Skupina preiskovank	26
3.2. Določanje koncentracije PIGF s testom Quantikine®	26
3.2.1. Princip metode	26
3.2.2. Reagenti in materiali	27
3.2.3. Izbira ter ravnanje z vzorci	27
3.2.4. Postopek določanja PIGF	28
3.2.5. Značilnosti metode	29

3.3.	Določanje koncentracije PIGF s testom DRG PIGF ELISA.....	30
3.3.1.	Princip metode.....	30
3.3.2.	Reagenti in materiali.....	31
3.3.3.	Izbira ter ravnanje z vzorci	31
3.3.4.	Postopek določanja PIGF.....	32
3.3.5.	Značilnosti metode	33
3.3.6.	Referenčne vrednosti	33
3.4.	Statistične metode in orodja	34
4.	REZULTATI.....	35
4.1.	Potek analize	35
4.2.	Standardni krivulji obeh testov.....	35
4.3.	Primerjava analitskih značilnosti obeh testov.....	37
4.4.	Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov	37
4.5.	Izločitev osamelih vrednosti.....	39
4.6.	Normalnost porazdelitve obeh vzorcev	41
4.7.	Moč povezave med testoma	42
4.8.	Diagnostična občutljivost in specifičnost.....	43
4.9.	Pozitivne in negativne napovedne vrednosti	46
4.10.	Razmerje verjetja.....	47
5.	RAZPRAVA.....	48
5.1.	Vrednotenje metode	48
5.2.	Primerjava dveh metod.....	49
5.3.	Klinična uporabnost obeh testov	51
6.	SKLEP	54
7.	LITERATURA.....	55
PRILOGA	59

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab.....	protitelo
ADMA.....	asimetrični dimetilarginin
Ag.....	antigen
ALT.....	alanin aminottransferaza
AST.....	aspartat aminottransferaza
ELISA.....	encimsko imunski testi na trdnem nosilcu (enzyme-linked immunosorbent assay)
Flt-1.....	fms-sorodna tirozin kinaza (fms like tyrosin kinase 1)
HELLP sindrom.....	sindrom, za katerega je značilna hemoliza, zvišani jetrni encimi in trombocitopenija (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)
hPGH.....	humani placentarni rastni hormon
ICAM.....	intracelularna adhezijska molekula
IGF.....	inzulinu podoben rastni faktor
IL-1, IL-6.....	interlevkin 1 in 6
KV.....	koeficient variacije
LDH.....	laktat dehidrogenaza
NNV.....	negativne napovedne vrednosti
NO.....	dušikov oksid
PAPP-A.....	z nosečnostjo povezan plazemski protein A
PIGF.....	placentarni rastni dejavnik
PNV.....	pozitivne napovedne vrednosti
PP-13.....	placentarni protein 13
SD.....	standardni odklon
sEng.....	topni endoglin
sFlt-1.....	topna fms-sorodna tirozin kinaza, imenovana tudi VEGFR-1 (soluble fms like tyrosin kinase 1)
TGF β 1.....	transformacijski rastni dejavnik β 1
VCAM.....	vaskularna adhezijska molekula
VEGF.....	vaskularni endotelijski rastni dejavnik
VEGFR-1.....	receptor za VEGF 1
VEGFR-2.....	receptor za VEGF 2

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prerez placente	8
Slika 2:	Normalna in nenormalna placentacija pri preeklampsiji	12
Slika 3:	Proteinska struktura Flt-1 in sFlt-1	13
Slika 4:	Vezava PlGF in VEGF na endotelij	14
Slika 5:	Umeritvena krivulja PlGF pri testu Quantikine.....	36
Slika 6:	Umeritvena krivulja pri testu DRG PlGF ELISA.....	36

KAZALO GRAFOV

Graf 1:	Grafična primerjava rezultatov obeh testov	38
Graf 2:	Grafični prikaz porazdelitve vzorcev brez osamelcev pri testu Quantikine	40
Graf 3:	Grafični prikaz porazdelitve vzorcev brez osamelcev pri testu DRG PlGF ELISA	40
Graf 4:	Normalna porazdelitev pri testu Quantikine.....	41
Graf 5:	Normalna porazdelitev pri testu DRG PlGF ELISA	42
Graf 6:	Razsevni diagram rezultatov obeh testov z regresijsko premico.....	43
Graf 7:	Razsevni diagram vzorcev s preeklampsijo	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Laboratorijski testi pri nosečnicah s hipertenzijo ali sumom na preeklampsijo	16
Preglednica 2:	Značilnosti sFlt-1, PlGF in sEng.....	19
Preglednica 3:	Referenčne vrednosti PlGF po tednih nosečnosti	24
Preglednica 4:	Referenčne vrednosti sFlt-1 po tednih nosečnosti	24
Preglednica 5:	Referenčne vrednosti PlGF z DRG testom.....	34
Preglednica 6:	Primerjava analitskih značilnosti obeh testov	37
Preglednica 7:	Srednji vrednosti in standardna odklona, izračunani iz vseh vrednosti.....	38
Preglednica 8:	Testiranje normalne porazdelitve vseh vzorcev pri obeh testih.....	39
Preglednica 9:	Srednji vrednosti in standardna odklona na vzorcu brez osamelcev	41
Preglednica 10:	Testiranje normalne porazdelitve pri obeh testih	42
Preglednica 11:	Razširjen vzorec in klinični podatki	43
Preglednica 12:	Klinični podatki o preeklampsiji in testih analize	45
Preglednica 13:	Diagnostična občutljivost in specifičnost za Quantikine in DRG PlGF ELISA test	45
Preglednica 14:	Pozitivne in negativne napovedne vrednosti za Quantikine in DRG PlGF ELISA test	46
Preglednica 15:	Primerjava razmerij verjetja med testoma.....	47

POVZETEK

Preeklampsija je zaplet v nosečnosti, povezan s hipertenzijo in proteinurijo po 20. tednu nosečnosti. Predstavlja pogost vzrok smrti tako za mater kot za plod. Vzrok za nastanek preeklampsije je motnja v razvoju posteljice, katere posledica je znižan uteroplacentarni pretok. Natančnejši mehanizem nastanka bolezni še ni popolnoma razjasnjen, vendar novejša študije domnevajo, da zaradi okvare žilnega endotelija za razliko od normalne nosečnosti ne pride do povečanja spiralne arterije v placenti. Posledica je placentarna ishemija. Preeklampsija je opisana kot stanje neravnovesja med pro-angiogenimi in anti-angiogenimi dejavniki. Glavna dejavnika pro-angiogeneze sta placentarni rastni dejavnik (PIGF) in vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), katerih koncentraciji se pri normalni placentaciji v krvi zvišata.

Razvoj na tem področju poteka v smeri čim zgodnejše diagnostike, učinkovitega zdravljenja in preventive. Na področju biokemije z razvojem imunokemijskih metod potekajo raziskave v smeri odkrivanja novih biokemičnih označevalcev.

Namen naloge je bil 88 nosečnicam določiti PIGF z dvema različnima testoma, Quantikine in DRG PIGF ELISA, ki temeljita na ELISA principu, ju ovrednotiti ter medsebojno primerjati. S pomočjo naših rezultatov in kliničnih podatkov na širšem vzorcu ($n=527$) smo s testom Quantikine ugotavljali klinični pomen določanja PIGF pri preeklampsiji.

Ugotovili smo, da sta si oba testa po analitskih značilnostih zelo podobna. Kljub temu pa je bil korelacijski koeficient v območju klinično pomembnih vrednosti 0,367 ($p < \alpha$), kar kaže na šibko pozitivno povezavo med testoma. Povprečne vrednosti PIGF, določene s testom Quantikine (23,0 ng/L), so bile v pri nosečnicah, ki so razvile preeklampsijo, v povprečju za približno polovico nižje kot v skupini zdravih nosečnic (55,9 ng/L). Na podlagi analize vzorcev nosečnic s preeklampsijo in upoštevanja znanih referenčnih vrednosti smo določili prazno vrednost pri 35,7 ng/L. Pri testu Quantikine smo izračunali diagnostično občutljivost 87,5% in diagnostično specifičnost 69,4%. Pri DRG PIGF ELISA testu je diagnostična specifičnost veliko boljša, medtem ko imata oba testa diagnostično občutljivost precej podobno. Pri obeh testih so bile določene visoke negativne napovedne vrednosti (NNV) (Quantikine 99,7% in DRG PIGF ELISA 97,8%), pozitivne napovedne vrednosti (PNV) pa pri obeh zelo nizke, zato je smiselno istočasno določiti tudi druge biokemijske označevalce (s-Flt-1, sEng) in jih interpretirati skupaj, saj bi s tem zvišali njihovo klinično uporabnost.

1. UVOD

Preeklampsija je zaplet v nosečnosti in je eden vodilnih vzrokov maternalnih in neonatalnih smrti. Vzrok bolezni do danes še ni popolnoma razjasnjen, prav tako ni znano, kako bolezen preprečimo. Z zgodnjim napovedovanjem in odkrivanjem bolezni s pomočjo novejših biokemičnih označevalcev bi lahko bistveno pripomogli k čim hitrejšemu ukrepanju in s tem manjšemu tveganju za smrt matere ali ploda (1).

1.1. Nosečnost in razvoj posteljice

Nosečnost je obdobje od oploditve jajčeca do poroda otroka in traja normalno od 37-40 tednov. Glede na razvoj ploda jo razdelimo na trimesečja.

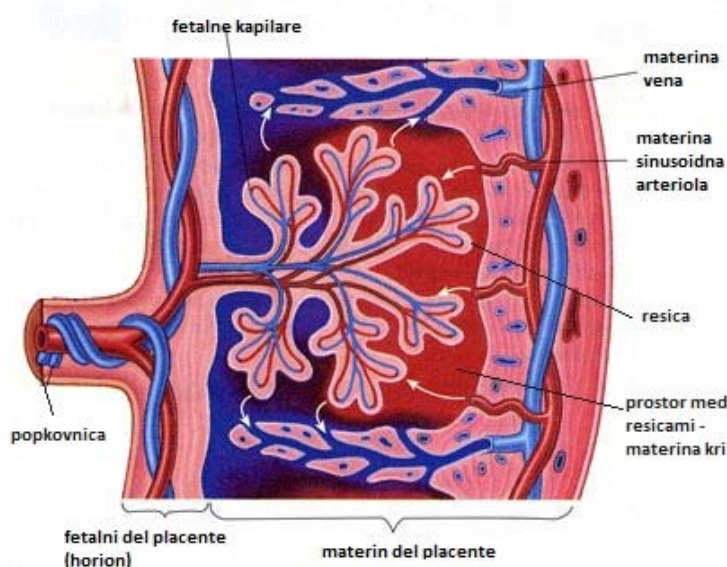
Prvo trimesečje je pomembno za razvoj osnov vseh plodovih sistemov. V tem obdobju imajo škodljivi dejavniki največji vpliv. Približno v 12. tednu se dokončno razvije posteljica ali placenta. Posteljica raste tudi pozneje z rastjo ploda, vendar se njena struktura ne spreminja več.

V drugem trimesečju plod hitro raste in je vedno dejavnejši. Dozorevajo vsi notranji organi. V tem obdobju lahko z ultrazvokom ocenjujemo vse organske sisteme ploda.

V tretjem trimesečju plod pridobiva na telesni teži. V tem času opazujemo, v kakšnem stanju je plod, ocenjujemo njegovo rast in morebiten zastoj v razvoju. Od tega je odvisno, ali je potrebno predčasno inducirati porod (2).

Posteljica je ključna za preživetje ploda. Nastajati začne zelo zgodaj po zanositvi iz plodovega in materinega tkiva na mestu vgnezditev. Blastocista peti dan po oploditvi pripotuje v maternično votlino in ko se pritrdi na površino endometrija, se pričnejo celice trofoblasta na mestu stika z maternično sluznico intenzivno deliti. Nastane sinciotrofoblast ter celice pod njim (citotrofoblast), ki ohranijo plazemsko membrano. Blastocista prodira globlje v sluznico maternice. Za uspešno vgnezditev je potrebno usklajeno delovanje med maternično sluznico in trofoblastom. V zgodnjem obdobju razvoja se hranilne snovi med materjo in zarodkom izmenjujejo z difuzijo, ko pa zarodek intenzivno raste, tovrstna izmenjava snovi ne zadostuje. Vzpostaviti se mora

uteroplacentarni krvni obtok, ki bo omogočal tako prehranjevanje zarodka kot tudi odstranjevanje odpadnih snovi. Deveti dan po oploditvi se v sinciotrofoblastu pričenjajo tvoriti prostori (lakune), v katere se vlivajo krvne žile endometrija in jih zapolnijo z materino krvjo. Enajsti dan deleče se celice citotrofoblasta vdirajo v sinciotrofoblast in tvorijo primarne resice. Ko se 16. dan razvoja vrašča ekstraembrionalni mezoderm med celice citotrofoblasta, nastanejo sekundarne resice. Konec tretjega tedna se v ekstraembrionalnem mezodermu sekundarnih resic oblikujejo krvne žile, ki se povežejo s krvnim obtokom v zarodku in vzpostavijo uteroplacentarni krvni obtok. Ko se v resicah razvijejo krvne žile, govorimo o terciarnih resicah. Razvejane resice močno povečajo površino, skozi katero poteka izmenjava snovi, tako da ta znaša pred porodom tudi do 10m². Poleg tega površino povečajo tudi številni mikrovilusi na površini sinciotrofoblasta, ki pokriva resice (Slika 1) (3).



Slika 1: Prerez placentе

V novejšem času še posebej opazujejo eno od oblik trofoblasta, t.i. intermediarni invazivni trofoblast, ker naj bi imel po zadnjih dognanjih pomembno vlogo v povečanju uteroplacentarnega pretoka med nosečnostjo, saj s preoblikovanjem materinih spiralnih arterij olajša pritek krvi vanje. Za normalen potek nosečnosti je ključna tudi regulacija vdora intermediarnega invazivnega trofoblasta v stromo endometrija. Ob neravnotežju v trofoblastnem vdoru ali pri procesu decidualizacije pride do zapletov v nosečnosti, od

katerih so podrobneje predstavljena nova dognanja v etiopatogenezi preeklampsije in gestacijske trofoblastne bolezni (4,5).

Posteljico oskrbuje s krvjo približno 100 spiralnih arterij, ki vstopajo v intervulusne prostore. Materina kri vstopa v intervulusne prostore pod nizkim tlakom (približno 10 mm Hg), ki zadošča, da oksigenirana kri preide iz resic v intervulusne prostore. Približno 150 mL krvi se izmenja 3-krat do 4-krat v minuti (5).

Vež med plodom in posteljico predstavlja popkovernica. Oblikuje se v petem tednu nosečnosti z namenom, da se zavarujejo krvne žile, ki potekajo med plodom in posteljico. Svojo funkcijo nato opravlja vse do rojstva. Oviran pretok krvi skozi popkovernico lahko pred rojstvom resno ogrozi plod (3).

Naloga posteljice je, da skrbi za izmenjavo hranil in plinov, odstranjuje odpadne produkte zarodkove presnove, služi kot delna zaščita pred nevarnimi snovmi, ki krožijo po materinem krvnem obtoku, in sprošča hormone, ki vzdržujejo nosečnost. Posteljica ščiti plod pred mikroorganizmi in škodljivimi snovmi ter pred imunskim sistemom matere. Nekatere kemične snovi ali mikroorganizmi lahko vseeno preidejo skozi placento in povzročijo okužbe ploda ali prirojene anomalije (2, 6).

1.2. Zapleti v nosečnosti, povezani s hipertenzijo

Hipertenzivne bolezni v nosečnosti so pestra skupina bolezni, ki so pomemben vzrok umrljivosti mater in novorojenčkov. Hipertenzijo v nosečnosti ima od 12-22% nosečnic. Pri nekaterih je prisotna že pred nosečnostjo in je opredeljena kot **kronična hipertenzija**, pri drugih pa se pojavi le med nosečnostjo. Takrat govorimo o **gestacijski hipertenziji**. Pri gestacijski hipertenziji se povišan krvni tlak (sistolčni ≥ 140 mm Hg in diastolični ≥ 90 mm Hg), ki je bil pred tem normalen, prvič opazi po 20. tednu nosečnosti. Proteinurija ni prisotna. Pri **preeklampsiji** se poleg zvišanega krvnega tlaka, značilnega za gestacijsko hipertenzijo, istočasno pojavijo tudi proteini v urinu (7, 8).

1.2.1. Preeklampsija

Preeklampsija je večsistemsko obolenje v nosečnosti, karakterizirano s hipertenzijo in proteinurijo po 20. tednu nosečnosti. Zaradi nezadostnega krvnega pretoka posteljice pride

do endotelijske disfunkcije, ki vodi do vazokonstrikcije in agregacije trombocitov. Pojavi se v 3-5% vseh nosečnosti na svetu in je tako eden večjih zdravstvenih problemov, od tega se jih 15% konča s prezgodnjim porodom, 18% pa s smrtjo matere (9).

Definicija

Preeklampsija je opredeljena kot novo nastala hipertenzija, pri kateri pride do povišanja sistoličnega krvnega tlaka ≥ 140 mm Hg in/ali diastoličnega krvnega tlaka ≥ 90 mm Hg v zadnjih 4 urah ter z novim pojavom proteinurije. Vrednost proteinov v urinu je ≥ 300 mg/24ur oz. vrednost reagenčnega traku ≥ 2 . Pri hudi preeklampsiji, ko je sistolični krvni tlak ≥ 160 mm Hg in diastolični ≥ 110 mm Hg, lahko pride do pojava **eklampsije**, za katero so značilni generalizirani krči, ki lahko privedejo do izgube zavesti. Prisotni so glavobol, motnje vida, zmanjšano izločanje urina ter edemi. Eklampsija se lahko pojavi pred porodom, med porodom ali 48 ur do 23 dni po porodu. Pri hudi preeklampsiji lahko pride do dodatnega zapleta t.i. **HELLP sindroma** (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets). Kaže se s slabokrvnostjo zaradi pospešenega propadanja eritrocitov, zvišanimi vrednostmi bilirubina in jetrnih encimov ter trombocitopenijo (8, 10).

Vzroki nastanka

Vzrok za nastanek preeklampsije še ni povsem znan. V večini primerov gre za motnjo v razvoju posteljice, pri čemer se sproščajo različne kemične snovi, ki povzročijo okvaro žilnega endotelija - sloja celic, ki pokriva notranjo stran žil v telesu nosečnice. Natančnejši mehanizmi nastanka preeklampsije so še v fazi raziskovanja (9, 11).

Dejavniki tveganja

Znani so nekateri rizični dejavniki, ki pomagajo pri nastanku preeklampsije. Večje tveganje je pri prvi nosečnosti, večplodni nosečnosti, pri pozitivni družinski anamnezi, predhodni preeklampsiji, kronični hipertenziji, diabetesu, povečanemu indeksu telesne mase, hiperkoagulabilnosti, jetrnih boleznih, starosti nad 35 let, antifosfolipidnem sindromu, srčno žilnih boleznih v družini in pri nekaterih drugih boleznih (1, 9, 12).

Klinični znaki

Osnovna klinična znaka sta hipertenzija in proteinurija, ki tudi definirata bolezen. Posledično se pojavijo edemi obraza in udov, znižana hitrost glomerulne filtracije (GFR) ter oligurija in anurija, ki sta značilni pri hudi obliki preeklampsije. V hematološki krvni sliki lahko zasledimo trombocitopenijo (pod $100 \times 10^9/L$), hemolizo in hemokonzracijo. Prisotne so tudi nepravilnosti koagulacijskega sistema: spremembe v koagulacijski kaskadi in fibrinolizi. Zaradi poslabševanja stanja se začnejo zviševati tudi vrednosti jetrnih encimov.

Pojavljajo se glavoboli, zamegljen vid, krči, lahko tudi petehije, vaskulopatije ter ishemične poškodbe možganov (13).

Posledice preeklampsije

Pri materi lahko pride do pojava krčev, ledvičnih obolenj, pljučnega edema, srčne kapi, možganskih krvavitev in smrti. Huda preeklampsija lahko povzroči odpoved organov. Plod največkrat utрпи zastoj v rasti (IUGR), ker je oskrba ploda okrnjena. Prezgodnji porod je lahko vzrok plodove smrti. Povečano je tveganje za perinatalno smrt (7, 14).

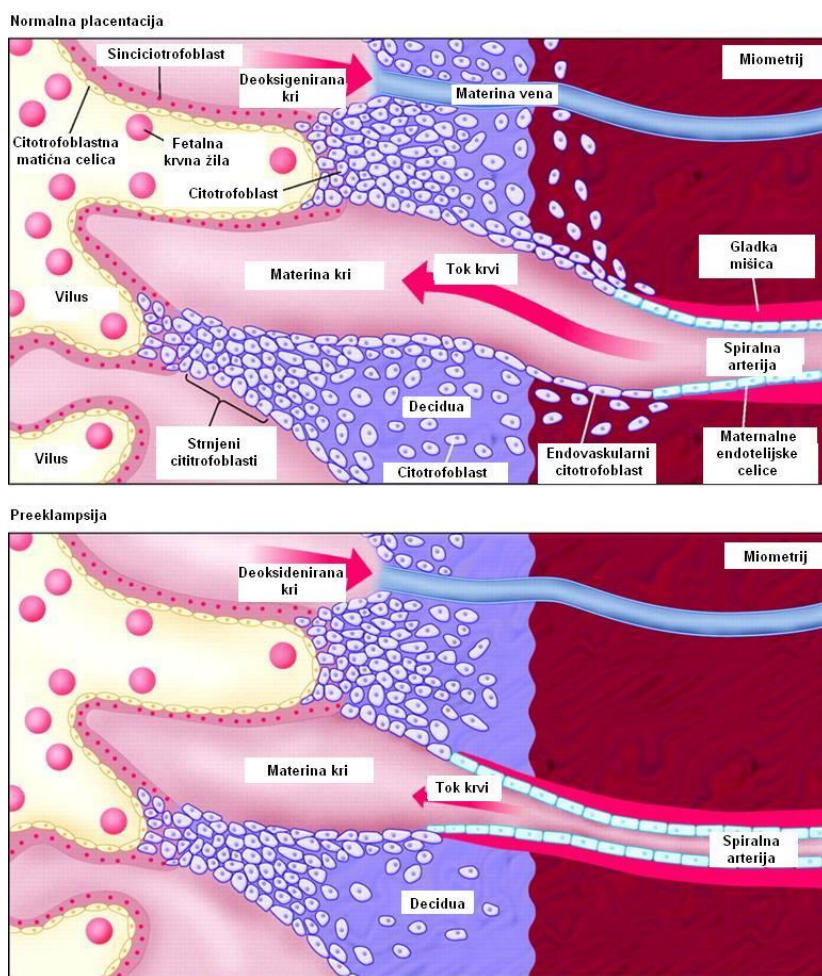
1.2.2. Novejše teorije nastanka preeklampsije

Etiološki dejavniki še niso povsem znani, vendar dokazi vključujejo genetske, imunske, angiogene in druge mehanizme. Dolgo so verjeli, da je preeklampsija povezana z enim ali več geni. Pri študiji na brejih podganah, katerim so vbrizgali topni sFlt-1, so zaznali hipertenzijo, proteinurijo in glomerulno endoteliozo, ki so značilni znaki za preeklampsijo. To odkritje je privedlo do velikega števila nadaljnjih študij, ki so se osredotočile na angiogenezo placente (1, 15).

Eden pomembnejših vzrokov preeklampsije je nenormalna placentacija. Izmenjava kisika in odpadnih snovi med materjo in plodom je odvisna od ustrezne perfuzije posteljice. Pri ženskah, pri katerih se je razvila preeklampsija, so ugotovili, da se je uteroplacentarni tok zmanjšal na 50-70%. Pri normalnem razvoju posteljice invazivni fetalni citotrofoblast poveča premer materine spiralne arterije, kar omogoča zadosten pretok krvi skozi placento in s tem zadovoljivo oskrbo ploda. Pri preeklampsiji zaradi epitelijskega fenotipa ne pride

do citotrofoblastne diferenciacije in premer spiralne arterije ostane ozek. S tem je pretok zmanjšan, kar privede do placentarne ishemije (Slika 2).

Pri normalni placentaciji invazivni citotrofoblast fetalnega izvora napade materine spirale arterije ter povzroči transformacijo tako, da se poveča njihova kapaciteta. Takšne spiralne arterije lahko zagotavljajo zadostno perfuzijo posteljice in rast ploda (1, 15).



Slika 2: Normalna in nenormalna placentacija pri preeklampsiji (15)

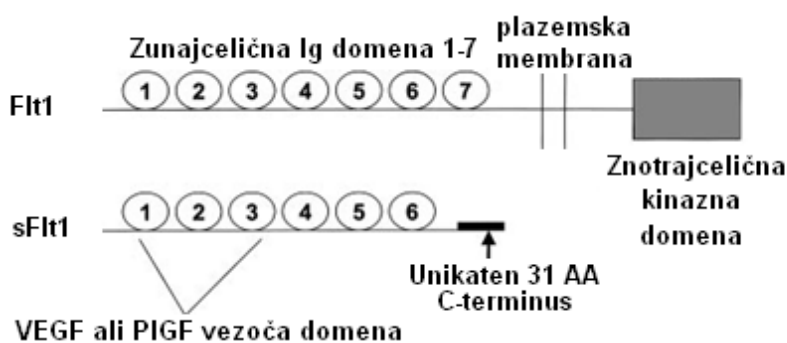
Preeklampsija je opisana kot stanje neravnovesja med pro-angiogenimi in anti-angiogenimi dejavniki. Glavni dejavniki, ki spodbujajo angiogenezo, spadajo v družino vaskularnih endotelijskih rastnih dejavnikov (VEGF), kot sta VEGF-A in PlGF. Glavni zaviralec angiogeneze, ki ga najdemo v posteljici, je sFlt-1. Kadar se ta pojavi v obtoku, se veže na VEGF in PlGF in prepreči vezavo le teh na receptor na površini celice. Predpostavili so, da zvišane koncentracije sFlt-1 v serumu matere povzročijo preeklampsijo, vendar še vedno ni

znano, kaj je vzrok in kaj je posledica oz. ali je placentarna hipoksija vzrok za povišanje sFlt-1 ali obratno.

In vitro študija, pri kateri so pri bolnicah s preeklampsijo izolirali trofoblast, kaže, da molekularne poti, ki urejajo psevdovaskularizacijo, vključujejo transkripcijske faktorje, rastne dejavnike in citokine. Pozornost so še posebej namenili VEGF in PlGF, ki imata pomembno vlogo v angiogenezi, ker blokiranje njihove signalne poti zmanjša psevdovaskularizacijo. Generalizirana endotelijska disfunkcija prav tako povečuje tveganje za preeklampsijo. Opisali so tudi vpliv vnetnih citokinov, ki poškodujejo materin endotelij (16). Med njimi so rastni dejavniki in kemične snovi, kot npr. dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1, fas ligand, oksidirani lipidni produkti, neokinin-B in asimetrični dimetilarginin (ADMA), ki so se sproščali v placento pri preeklampsiji (17).

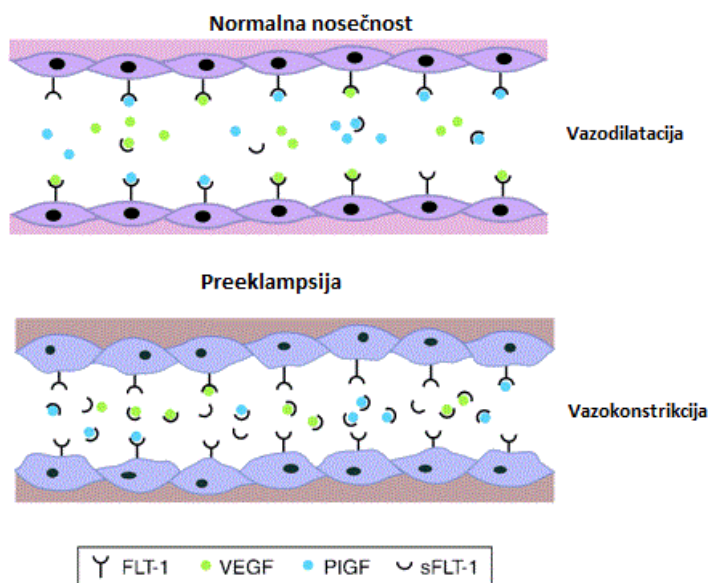
Študije molekule Flt-1, ki je membranski receptor, kažejo, da pride do cepitve molekule v topni sFlt-1, ta pa na VEGF in PlGF deluje zaviralno. Flt-1 se od sFlt-1 razlikuje tako, da ima na 7. domeni C terminalni del, ki prepreči vezavo na membrano. Zvišane koncentracije sFlt-1 v serumu mater so sovpadale z znižanimi vrednostmi VEGF in PlGF v serumu mater s preeklampsijo (Slika 3). Pomanjkanje PlGF onemogoči placentacijo in stimulira endotelijsko disfunkcijo, kar vodi v vazokonstrikcijo in koagulopatijo (18).

Vrednosti sFlt-1, VEGF in PlGF so merili ves čas nosečnosti ter opazili zvišane vrednosti sFlt-1 približno 5 tednov pred nastopom preeklampsije. Srednje vrednosti serumskih koncentracij sFlt-1 so pri nosečnicah, ki so razvile preeklampsijo, znašale 4.382 ng/L, v kontrolni skupini zdravih nosečnic pa je bila srednja vrednost 1.643 ng/L. Pri PlGF so opazili znatno znižane vrednosti v 13. do 16. tednu nosečnosti pri tistih, ki so pozneje razvile preeklampsijo. Srednja serumska vrednost je znašala 142 ng/L (17).



Slika 3: Proteinska struktura Flt-1 in sFlt-1 (18)

Na sliki 4 vidimo, kako topna molekula sFlt-1 veže proste molekule VEGF in PlGF in s tem onemogoči vezavo le teh na membranski receptor na endotelijskih celicah. To se kaže z endotelijsko disfunkcijo, vključno z znižanimi koncentracijami prostaciklina, dušikovega oksida (NO) in sproščanjem proantikoagulantnih beljakovin, kot so von Willebrandov faktor, endotelin, celični fibronektin in trombomodulin. Ti faktorji povzročijo vazokonstrikcijo, ki je značilna za preeklampsijo. Zaradi zvišane koncentracije dejavnika sFlt-1 dejavnika VEGF in PlGF ne moreta opraviti svoje angiogenetske oz. rastne funkcije placente (18).



Slika 4: Vezava PlGF in VEGF na endotelij (18)

Vpliv endotelijskih dejavnikov in njihovih inhibitorjev na preeklampsijo

Endotelijski dejavniki, kot so prostaglandini in NO, so bili predlagani kot mediatorji gestacijsko renalne vazodilatacije in hiperfiltracije. Prostaglandini v nosečnosti zvišajo hitrost glomerulne filtracije. NO v nosečnosti prispeva k sistemski vazodilataciji matere ter regulira materin in fetoplacentarni pretok krvi. Pomanjkanje NO vodi do hipertenzije v nosečnosti, kar povzroči preeklampsijo. NO težko merimo, ker ima zelo kratko razpolovno dobo in je izjemno kratek čas v krvnem obtoku. Produkcijo NO, ki je vazodilatator, inhibira ADMA, ki ga lahko uporabimo kot označevalec endotelijske disfunkcije. NO vpliva tudi na druge sisteme, npr. inhibira agregacijo trombocitov in adhezijo monocitov,

spodbuja sproščanje superoksidnega radikala, oksidacijo LDL ter proliferacijo gladkomišičnih celic (19).

Oksidativni stres in njegova vloga v preeklampsiji

Povišanje reaktivnih kisikovih spojin je lahko rezultat endotelijske disfunkcije in posledično preeklampsije. Zarodek in fetalne celice so zaradi obsežne delitve še posebej občutljive na oksidativni stres zaradi podvojevanja DNA. Placentarni sinciotrofoblast je izpostavljen visokim koncentracijam kisika. V zgodnji nosečnosti posteljica vsebuje zelo malo antioksidativnih encimov (20). Povečan oksidativni stres se kaže s povečano tvorbo radikalov in s tem z večjim tveganjem za preeklampsijo. Zdravljenje z vitaminom C kot antioksidantom se ni izkazalo za učinkovito. Nekateri citokini prispevajo k endotelijski disfunkciji s povečano produkcijo reaktivnih kisikovih intermediatov, kot sta superoksidni radikal (O_2^-) in vodikov peroksid (17).

Nitritni stres

Nitriranje proteinov je kovalentna sprememba, ki lahko povzroči izgubo proteinske funkcije ali pridobljeno novo proteinsko funkcijo. Največjo škodo za ožilje povzroči, ko NO preide v peroksinitrit (ONOO⁻). Ta spremeni ključno funkcijo žilnih beljakovin, kot sta prostaciklin sintetaza in ciklooksigenaza.

Novejša dognanja tako kažejo, da povečan oksidativni in nitritni stres v sami placenti povzročata spremembe žilni funkciji. Etična vprašanja omejujejo izvesti študije, kjer bi proučili spremembe v placenti (20, 21).

1.2.3. Napovedovanje in diagnostika preeklampsije

Zaradi hudih zapletov, do katerih lahko pride pri razvoju preeklampsije, je zelo pomembna zgodnja diagnostika in zdravljenje bolezni. Zaenkrat še nimamo univerzalne preiskave oz. biokemičnega označevalca, ki bi z gotovostjo napovedala ali potrdila bolezen, zato glede na klinične znake izvedejo več različnih ultrazvočnih in laboratorijskih preiskav.

Ultrazvočna preiskava

Z Dopplerjevo metodo lahko med 20. in 24. tednom nosečnosti merimo pretok krvi v maternični arteriji in napovemo kasnejši razvoj preeklampsije. Pri preeklampsiji je

vrašcanje trofoblasta moteno, posledica pa je povečan upor v spiralnih arterijah in žilah, ki jih napajajo. Opazimo upočasnitev pretoka v začetku diastole, nižje hitrosti pretokov in povišane vrednosti kazalcev pretoka. Z ultrazvočno analizo pretoka krvi v maternični arteriji lahko preeklampsijo napovemo dokaj pozno, ko preprečevanje bolezni ni več tako učinkovito. Metoda je tudi klinično slabo uporabna, ker ima nizko občutljivost in nizko pozitivno napovedno vrednost (8, 22).

Laboratorijski testi

V diagnostiki preeklampsije in zapletov uporabljamo nekatere laboratorijske parametre, ki se posredno spremenijo zaradi bolezni, vendar z njimi bolezni ne moremo napovedati. Kažejo na resnost bolezni oz. poslabšanje stanja (Preglednica 1) (9).

Preglednica 1: Laboratorijski testi pri nosečnicah s hipertenzijo ali sumom na preeklampsijo (9)

Parameter	Vrednosti	Vzrok
S-Hemoglobin	zvišane	hemokoncentracija resnost bolezni
S-Trombociti	znižane pod $100 \times 10^9/L$	zvečana poraba
S-Železo	zvišane	hemoliza
S-Transferin	znižane	hemoliza
S-AST in S-ALT	zvišane	jetrna disfunkcija poslabšanje stanja
S-LDH	zvišane	hemoliza jetrna disfunkcija
S-Bilirubin	zvišane	hemoliza
S-Urat	zvišane	patološke spremembe v ledvicah
S-Kreatinin	zvišane	resnost bolezni
U-Proteini	zvišani nad 1 (reagenčni trak)	hipertenzija
dU-Proteini	zvišane: > 2 g/dan – nadzor > 3 g/dan – induciran porod	hipertenzija

Opisane so tudi spremembe v koncentracijah koagulacijskih faktorjev, ki so večinoma prisotne pri HELLP sindromu. Zaradi aktivacije koagulacijske kaskade se zviša koncentracija fibrina, fibronektina in tromboksana A₂. Prostaciklin in NO sta znižana (12).

Biokemični označevalci

Z novejšimi dognanji in natančnejšim razumevanjem mehanizmov v organizmu ter razvojem novih občutljivih in specifičnih metod so odkrili in še vedno odkrivajo posamezne proteine in druge mediatorje, ki so povezani s preeklampsijo in eklampsijo.

Najpomembnejši biokemični označevalci so VEGF, PlGF, sFlt-1, sEng in razmerje med sFlt-1/PlGF, vendar imajo večjo klinično uporabnost, če jih določamo istočasno. Obstajajo še drugi dejavniki, ki so povezani s preeklampsijo, npr. humani placentarni rastni hormon (hPGH), tumor nekrotizirajoči faktor (TNF- β), z nosečnostjo povezan plazemski protein A (PAPP-A), ADMA, inzulinu podoben rastni faktor (IGF), intracelularna adhezijska molekula (ICAM), vaskularna adhezijska molekula (VCAM), placentarni protein 13 (PP-13), izoprostan, inhibin A, aktivin A in avtoprotitelesa proti tipu angiotenzina II 1 (AT1) receptorja (10).

Idealen biokemični označevalec naj bi bil enostaven, neinvaziven, primeren za diagnostiko v zgodnji nosečnosti, visoko občutljiv in z visoko pozitivno diagnostično napovedno vrednostjo (9).

1.2.4. Zdravljenje preeklampsije

Učinkovitega zdravljenja pri preeklampsiji še ne poznamo, saj še vedno ni povsem poznan sam mehanizem bolezni. Zdravljenje je simptomatsko, s tem preprečimo zaplete pri materi in plodu. Možnosti zdravljenja so omejene tudi zaradi tveganja za plod. Pri nosečnicah s hipertenzijo in blago preeklampsijo je potrebno spremljati klinične znake, krvni tlak, laboratorijske parametre ter simptome stiske fetusa. S tem ugotavljajo morebitno poslabšanje bolezni (23).

Najučinkovitejša terapija je porod, če ima otrok dobro možnost preživetja, mati pa pri tem ni izpostavljena prevelikemu tveganju. Za preprečevanje bolezni se lahko uporablja nizke odmerke acetilsalicilne kisline, ker je pri preeklampsiji znižana tvorba prostaciklina in zvišana tvorba tromboksana. Visoke odmerke vitamina C in E dodajajo zaradi preprečevanja oksidativnih procesov, značilnih za preeklampsijo.

Magnezijev sulfat ($MgSO_4$) se uporablja za zmanjševanje pojavnosti epileptičnih napadov pri eklampsiji in hudi preeklampsiji. Parenteralna aplikacija je potrebna še 24 ur po porodu

oz. 24 ur po zadnjem napadu. Ves čas terapije je potrebno bolnice skrbno spremljati zaradi toksičnosti magnezija ter vpliva na jetrno in ledvično funkcijo (24).

Pri zdravljenju akutnih zapletov je pomembno zniževanje krvnega tlaka za preprečevanje hipertenzivne encefalopatije in cerebralne krvavitve. Bolnicam aplicirajo hidralazin, labetalol ali nifedipin. Pri blagi in zmerni hipertenziji uporabljajo metildopo, labetalol in blokatorje Ca-kanalčkov (25).

Nosečnice s preeklampsijo je potrebno spremljati tudi po porodu, ker imajo večje tveganje za srčno žilne bolezni, možgansko kap in mikroalbuminurijo. Možen je tudi pojav pljučnega edema (9, 10).

1.3. Placentarni rastni dejavnik (PlGF)

PlGF so prvič izolirali iz humane posteljice. Izraža se predvsem v vilusih citotrofoblasta in sincicotrofoblasta, ki imata pomembno vlogo pri nastanku placente. Poleg tega se PlGF izraža tudi v endotelijskih celicah, naravnih celicah ubijalkah, celicah kostnega mozga in v keratinocitih. V novejšem času so odkrili, da PlGF direktno stimulira proliferacijo in migracijo tumorskih celic, sodeluje pa tudi pri celjenju ran (26).

1.3.1. Splošne značilnosti

PlGF je član družine VEGF, saj sta si strukturno zelo podobna, ker imata 42% aminokislin identičnih, čeprav sta funkcionalno različna. PlGF se nahaja v štirih oblikah: PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 in PlGF-4, vendar prvi dve obliki prevladujeta. PlGF je majhen protein (približno 30 kDa) in se izloča z urinom. PlGF se veže le na VEGFR-1. Vloga PlGF je manj znana, vendar domnevajo, da sinergijsko krepi VEGF in povzroča angiogenezo. Interakcijo med PlGF in receptorjem lahko inhibira sFlt-1, ki povzroča endotelijsko disfunkcijo (Preglednica 2) (26,27).

Preglednica 2: Značilnosti sFlt-1, PlGF in sEng (26)

	sFlt-1	PlGF	sEng
Molekulska teža	100 kDa	~30 kDa	~65 kDa
Karakteristike in biološka funkcija	Okrnjena oblika VEGFR-1 Antagonist VEGF in PlGF signalizacije Anti-angiogen	Član VEGF družine Vezava na VEGFR-1 Pro-angiogen	Okrnjena oblika endoglina Poslabša TGF- β 1 signalizacijo Anti-angiogen
Vrednosti pri preeklampsiji	zvišane	znižane	zvišane

1.3.2. PlGF v vlogi kazalca preeklampsije

V normalni nosečnosti se pričnejo vrednosti PlGF v 8.-12. tednu nosečnosti zviševati in v 29.-32. tednu dosežejo svoj vrh. Koncentracije PlGF se znižujejo od 33.-40. tedna nosečnosti. Vrednosti PlGF so se pri ženskah, ki so pozneje razvile preeklampsijo, v 13.-16. tednu nosečnosti značilno znižale glede na kontrolno skupino. Meta analiza desetih študij je pokazala, da se je PlGF znižal v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti pri ženskah s preeklampsijo. Spremembe vrednosti PlGF se zgodijo prej kot spremembe sFlt-1, zato je PlGF boljši biokemijski označevalec za napovedovanje preeklampsije (26).

Drug pomemben vidik je, da bi PlGF zaradi majhnosti molekule lahko določali tudi v urinu. S presejalnim testom bi lahko zaznali znižane vrednosti PlGF v urinu, nato bi naredili še potrditven test v krvi. Vendar so vrednosti v urinu močno odvisne od tega, kdaj vzorec odvzamemo, zato se testi v diagnostiki niso uveljavili (28).

Pro in anti angiogeni dejavniki PlGF, VEGF, sFlt-1 in topni endoglin (sEng) so tesno povezani med seboj. Povečana placentarna ekspresija sFlt-1 je istočasna znižanju PlGF in VEGF, saj sFlt-1 zavira celično signalizacijo. To vodi v hipoksijo posteljice, kar povzroča dodatno proizvodnjo sFlt-1, kar pripelje v začaran krog, ki na koncu povzroči preeklampsijo (29).

sFlt-1 je znan kot topni vaskularni endotelijski rastni dejavnik receptor-1 (VEGFR-1). V skupini VEGF sta dva transmembranska receptorja: VEGFR-1, ki je bolj specifičen za angiogenezo (imenovan Flt-1), in VEGFR-2. Koncentracije sFlt-1 so signifikantno višje pri nosečnicah s preeklampsijo kot pri normalni nosečnosti (30, 31).

Endoglin (180 kDa) je transmembranski glikoprotein, znan kot CD105. Kot homodimerni koreceptor je močno izražen na membrani sinciotrofoblasta in invazivnega citotrofoblasta, na vaskularnih endotelijskih celicah, na monocitih in na krvotvornih matičnih celicah. Ima ključno vlogo pri transformaciji rastnih dejavnikov. **Topni endoglin** sEng je anti-angiogenezni dejavnik in prispeva k patogenezi preeklampsije. Dokazno je, da je neravnovesje med dejavniki PlGF, sFlt-1, sEng in razmerje med sFlt-1 in PlGF povezano z razvojem in stopnjo preeklampsije (26).

1.3.3. Določanje PlGF

Razvoj imunokemije in visoko občutljivih imunokemijskih tehnik je omogočil določanje in odkrivanje različnih snovi v organizmu, bodisi proteinov, hormonov in zdravil v serumu ali v tkivih. Nenehno se razvija široko področje serologije, ki proučuje protitelesa in njihove reakcije z antigeni. Vezanje protitelesa (Ab) z antigenom (Ag) je temelj za številne imunske pojave. Visoka specifičnost reakcij Ag-Ab je omogočila razvoj različnih imunskih testov, ki jih lahko uporabimo za določanje navzočnosti protiteles ali antigena.

Sile, ki delujejo pri vezanju antigena s protitelesom, so nekovalentne sile in vključujejo vodikove vezi, ionske vezi, hidrofobne interakcije in Van der Waalove sile. Jakost teh vezi je šibka, zato samo s tesnim stikom Ag-Ab nastane močna vez, kar se kaže s specifičnostjo (32).

Najbolj uporabljane metode za detekcijo antigenov in protiteles v medicinsko biokemičnih laboratorijih so difuzijsko precipitacijske metode, aglutinacijske metode, elektroforezne metode, radioimunske metode, encimsko imunske metode na trdnem nosilcu, imunofluorescentne metode, luminoimunološke metode, fizikalne metode (nefelometrija, turbidimetrija) in kromatografske metode.

Cela vrsta metod, ki se razlikujejo po občutljivosti, specifičnosti, enostavnosti izvedbe ali ceni, nam daje široke možnosti izbora ustrezne metode za analit, ki ga želimo določati. Vsekakor pa moramo pri izboru dobro poznati lastnosti analita ter možnosti, ki nam jih ponujajo posamezne metode.

Nizke koncentracije proteinov lahko določamo z radioimunskimi metodami, encimsko imunskimi metodami, imunofluorescentnimi metodami, luminoimunološkimi metodami ter imuno elektrokemiluminescenco.

Za določanje PIGF so razvili **encimsko imunske metode (ELISA)** in metode, ki temeljijo na **imunoelektrokemiluminescenci (ECLIA)**.

Pri ELISA testih protitelesa, konjugirana z encimom (hrenova peroksidaza, alkalna fosfataza...), reagirajo s substratom. Nastane obarvan produkt, katerega absorbanco merimo. Obstajajo različne izvedbe glede na to, ali označimo antigen ali protitelo. Razvili so številne variante ELISA testov, s katerimi lahko kvalitativno in kvantitativno določimo protitelesa ali antigene. Pripravimo umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protiteles ali antigena, iz katere lahko razberemo koncentracijo v vzorcu. Za ELISA teste je značilno, da so visoko občutljivi in specifični, v primerjavi z radioimunskimi metodami pa so varnejši in cenejši (32).

Elektrokemiluminescenca (ECLIA Electrochemiluminescence immunoassay) je proces, pri katerem sprožimo nastanek svetlobe z električnim signalom in se odvija na številnih molekulah, kot so spojine rutenija, osmija, renija... Z električno energijo vzbudimo imunske komplekse (vključno z ruteniumskim kompleksom), ki so pritrjeni na mikrodelce s streptavidinskim plaščem. Iz stabilnih prekurzorjev na površini elektrode prihaja do nastanka visoko reaktivnih spojin, ki med seboj reagirajo, pri tem pa nastane svetloba. Kemiluminiscentna reakcija, ki vodi do emisije svetlobe, značilne za rutenij, je sprožena električno in poteka na površini platinaste elektrode. Količina nastale svetlobe je direktno proporcionalna koncentraciji analita v vzorcu. Določimo jo s pomočjo kalibracijske krivulje, ki je za instrument specifična, dobljena z 2- točkovno kalibracijo. Analiza traja približno 18 minut (33).

Diagnostični postopki z ECLIA metodo se izvajajo na analizatorjih Elecsys, Cobas in Modular analytics (Roche). Testi so validirani za diagnostične namene.

Na tržišču so se pojavili tudi testi za kvantitativno določanje PIGF v plazmi. Temeljijo na principu **imunofluorescence** in se izvajajo na manjših prenosnih analizatorjih proizvajalca Triage Alere ter so namenjeni tudi za POCT (point-of-care testing) testiranje. Z metodo imunofluorescence lahko PIGF določamo tudi na analizatorjih Delfia Xpress (PerkinElmer) (34, 35).

Študije, ki so bile do sedaj izvedene na področju določanja PIGF v serumih nosečnic s sumom na preeklampsijo, poudarjajo smiselnost in večjo klinično uporabnost rezultatov, če določamo več biokemičnih označevalcev hkrati (poleg PIGF še sFlt-1 in sEng ter razmerja med njimi) ter jih hkrati tudi interpretiramo, saj so odvisni drug od drugega.

1.3.4. Opredelitev parametrov vrednotenja metode in rezultatov

Natančnost je sposobnost metode, da nam poda čim bolj ponovljive rezultate. Določamo jo lahko kot ponovljivost znotraj analize, kjer določamo variabilnost vrednosti paralelke istega vzorca znotraj ene analize, ali kot medanalizno ponovljivost, kjer v več analizah znotraj enega laboratorija večkrat testiramo iste referenčne vzorce. Izražamo jo kot relativno standardno deviacijo oziroma kot koeficient variabilnosti (KV) v odstotkih. Natančnost določene metode podaja sipanje rezultatov pri posameznih meritvah. Nanaša se na velikost razlik med kvantitativnimi rezultati, ki jih dobimo s ponavljanjem poskusa na istem vzorcu (36).

Meja zaznavanja ali meja detekcije je parameter, ki ima analitski pomen in je najmanjša količina merjene snovi, ki jo z metodo še zanesljivo izmerimo ob upoštevanju totalne merilne napake (najnižja vrednost, ki značilno odstopa od vrednosti ozadja).

Analizna specifičnost je sposobnost metode, da izmeri samo iskano snov v vzorcu (36).

Diagnostična občutljivost predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Izražamo jo v odstotkih, predstavlja pa verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Večja ko je diagnostična občutljivost testa, manjše je število lažno negativnih rezultatov (37).

Metoda je občutljiva, kadar lahko z njo dobimo pozitiven rezultat in vzorec resnično vsebuje merjeno sestavino. Če v vzorcu, ki vsebuje določeno sestavino, z neko metodo ne izmerimo njene navzočnosti, pričakujemo pa, da jo vsebuje, pravimo, da smo dobili lažno negativen rezultat. Vzroka za lažno negativen rezultat sta dva, bodisi metoda ne zazna sestavine, ki je v vzorcu in je rezultat tudi analitsko napačen, bodisi je lažno negativen rezultat vezan na biološko raznolikost in ne na samo metodo (bolnik dejansko nima patološkega parametra, ki ga pričakujemo in je rezultat z analitskega vidika pravilen) (36).

Diagnostična specifičnost je definirana kot delež oseb, ki nimajo preiskovane bolezni in pri katerih je rezultat testa negativen. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov, ki smo jih pravilno ugotovili. V veliki meri je diagnostična specifičnost odvisna od prazne vrednosti (ki je dogovorna vrednost) med zdravo in bolno populacijo, ki se v posameznih lastnostih pogosto deloma prekrivata. Na prekrivanje vpliva tudi nenatančnost metode z velikim sipanjem rezultatov, zato je za visoko klinično uporabnost rezultatov pomembno, da izvajamo zanesljive teste z veliko natančnostjo.

Pri določanju specifičnosti predvidevamo, da v vzorcu ni iskane sestavine. Če s testom dobimo pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja ko je diagnostična specifičnost testa, manjše je število lažno pozitivnih rezultatov (36, 37).

Prevalenca je ena od mer, ki jih uporabljamo za merjenje pogostnosti neke bolezni v populaciji. Pove nam, koliko posameznikov ima določeno bolezen ob določenem času (36).

Napovedna vrednost združuje diagnostično občutljivost in specifičnost testa s prevalenco določene bolezni. Število pravilno pozitivnih in lažno pozitivnih rezultatov je odvisno od razširjenosti bolezni v populaciji, diagnostične občutljivosti ter diagnostične specifičnosti testa. V primeru, ko je prevalenca bolezni majhna, je tudi napovedna vrednost pozitivnega testnega izvida majhna. Tedaj tudi najbolj specifični in občutljivi testi dajejo veliko število lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov.

Pozitivna napovedna vrednost (PNV) predstavlja verjetnost, da bi oseba, ki ima pozitiven testni izvid, resnično imela bolezen. Izražamo jo v odstotkih, pove nam odstotek pravilnih pozitivnih rezultatov (36, 37).

Negativna napovedna vrednost (NNV) predstavlja verjetnost, da bi oseba, ki ima negativen testni izvid, resnično ne bila bolna. Izražamo jo v odstotkih, pove pa nam odstotek pravilnih negativnih rezultatov (36, 37).

Pražna vrednost je najnižja smiselna koncentracija, ki še ima klinični pomen (36). Predstavlja mejo med količino analita, ki je z določeno metodo zaznaven pri zdravi populaciji, in značilno povišano oz. znižano ravno analita pri bolnikih. Določitev pražne vrednosti je ključnega pomena pri predstavitvi rezultatov testiranja vzorcev. Določimo jo na osnovi kontrolne skupine. Rezultate testiranja obdelamo z ustrežno statistično metodo, s katero določimo pražno vrednost. Če so vrednosti kontrolne skupine porazdeljene normalno, lahko pražno vrednost določimo na podlagi srednje vrednosti \pm poljubno število SD, sicer pa skušamo najti prag pri vrednostih, ki še imajo klinični pomen (npr. 1. oz. 99. percentil ipd.).

1.3.5. Referenčne vrednosti PIGF in sFlt-1

Referenčne vrednosti PIGF in sFlt-1 so bile določene z metodo imunoelektrokemiluminiscence (ECLIA) na analizatorju Elecsys (Preglednica 3, Preglednica 4) (33).

Preglednica 3: Referenčne vrednosti PIGF po tednih nosečnosti (33, 38).

Tedni nosečnosti	PIGF [ng/L] srednja vrednost	PIGF [ng/L] od 5 do 95 percentil
10. – 14.	62,8	29,4 - 183
15. – 19.	135	65,7 - 203
20. – 23.	265	125 - 541
24. – 28.	412	130 - 1.108
29. – 33.	439	73,3 - 1.108
34. – 36.	232	62,7 - 972
37. - rojstvo	161	52,3 - 138

Preglednica 4: Referenčne vrednosti sFlt-1 po tednih nosečnosti (33, 38)

Tedni nosečnosti	sFlt-1 [ng/L] srednja vrednost	sFlt-1 [ng/L] od 5 do 95 percentil
10. – 14.	1.445	555 - 2.361
15. – 19.	1.459	470 - 2.785
20. – 23.	1.576	649 - 2.944
24. – 28.	1.449	630 - 3.890
29. – 33.	1.934	707 - 6.688
34. – 36.	2.972	978 - 9.921
37. - rojstvo	4.400	1.671 - 11.324

2. NAMEN DELA

V prvem delu našega raziskovalnega dela bomo 88 nosečnicam izmerili koncentracije placentalnega ravnega dejavnika z dvema različnima testoma, **Quantikine** in **DRG PIGF ELISA**. Naš namen je primerjati obe izvedbi encimsko imunske metode za določanje PIGF. Najprej bomo primerjali analitske značilnosti obeh testov. Pri vsakem testu bomo izračunali povprečno vrednost in standardni odklon ter ju primerjali. Pogledali bomo, kakšna je porazdelitev vrednosti pri obeh testih. Na podlagi statistične analize želimo ugotoviti, kakšna je moč povezave med testoma. S kritično oceno želimo ugotoviti, kateri test bi bil analitsko primernejši za uporabo.

V drugem delu bomo izvedli statistično analizo 527 vzorcev nosečnic, ki jim je bila odvzeta kri tekom študije. Vsem vzorcem je bil določen PIGF v serumu med 12.–14. tednom nosečnosti s testom **Quantikine**. Iz pridobljenih kliničnih podatkov o pojavu preeklampsije pri nosečnicah bomo izračunali diagnostično specifičnost, diagnostično občutljivost ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti. Na osnovi teh podatkov bomo ovrednotili klinično uporabnost rezultatov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Skupina preiskovank

V raziskavo je bilo vključenih 88 naključno izbranih nosečnic, ki so jim odvzeli kri v okviru presejalnega testiranja na Downov sindrom ter so podpisale izjavo, da se strinjajo, da jim določimo tudi PIGF v serumu. Raziskava je potekala kot del študije, ki jo je odobrila Komisija republike Slovenije za medicinsko etiko.

V drugem delu naše raziskave smo za statistično analizo uporabili rezultate študije, ki že poteka, in sicer 527 serumskih vzorcev preiskovank, ki jim je bil določen PIGF s testom Quantikine.

Vsi vzorci so bili zbrani na Ginekološki kliniki v Ljubljani. Vsem preiskovankam je bila kri odvzeta med 12. in 14. tednom nosečnosti. Starost preiskovank je bila od 21 do 44 let.

Z vsemi vzorci tekom analiz smo ravnali kot s potencialno kužnim materialom v skladu z dobro laboratorijsko prakso.

3.2. Določanje koncentracije PIGF s testom Quantikine®

Za določanje koncentracije PIGF smo uporabili test Quantikine®, Human PIGF Immunoassay, proizvajalca R&D Systems. Test se uporablja za kvantitativno določanje placentalnega ravnega dejavnika v supernatantu celične kulture, serumu, plazmi ali urinu. Test je namenjen izključno za raziskovalne namene (39).

3.2.1. Princip metode

Test temelji na encimsko imunski »sendvič« tehniki, kjer je osnova reakcija vezave antigena in protitelesa. Specifična monoklonska protitelesa, ki so vezana na mikrotitrsko ploščico, vežejo PIGF iz vzorca. Dodamo poliklonska protitelesa, označena z encimom, nato speremo, da se odstranijo nevezane komponente. Dodamo substrat, ki da z encimom obarvan produkt, ter merimo intenziteto barve, ki je premosorazmerna koncentraciji PIGF v vzorcu (39).

3.2.2. Reagenti in materiali

Test Quantikine, Human PIGF Immunoassay vsebuje:

1. mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami, prevlečenimi z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti PIGF,
2. PIGF konjugat: poliklonska protitelesa proti PIGF konjugirana s hrenovo peroksidazo,
3. PIGF standard: rekombinantni humani PIGF, liofiliziran,
4. assay diluent RD1-22: puferska raztopina proteinov,
5. kalibrator diluent RD5K: puferska raztopina proteinov, za supernatante celičnih kultur,
6. kalibrator diluent RD6-11: puferska raztopina proteinov, za serum, plazmo in urin,
7. koncentrirani pufer za spiranje,
8. barvni reagent A: stabiliziran vodikov peroksid,
9. barvni reagent B: stabiliziran kromogen (tetrametilbenzidin),
10. stop reagent: 2 N žveplova kislina,
11. lepljivi trakovi.

Ostala oprema:

- analizator Personal Lab (ADALTIS),
- kalibrirane pipete (*Eppendorf*) z nastavki,
- redestilirana voda,
- merilni valj,
- epruvete za redčenje standardnih raztopin.

3.2.3. Izbira ter ravnanje z vzorci

Proizvajalec navaja, da lahko za določanje PIGF s to metodo uporabimo supernatant celične kulture, serum, plazmo ali prvi jutranji vzorec urina. Vse vzorce moramo po centrifugiranju takoj zamrzniti na -20°C . Pri vzorcu plazme lahko kot antikoagulant uporabimo EDTA, heparin ali citrat. Ponovnemu zamrzovanju vzorcev se moramo izogniti. Za analizo potrebujemo najmanj 100 μL vzorca. Močno hemolizirani ali hiperlipemični vzorci niso primerni za analizo.

Prostovoljkam smo odvzeli vensko kri v epruvete za serum (brez dodanega antikoagulant). Vzorce smo od odvzema do centrifugiranja pustili 30 minut, da so koagulirali, nato pa jih centrifugirali ter ločili serum od preostalega strdka krvnih celic. Serum smo shranili v plastično epruveto in ga takoj zamrznili na -20°C .

3.2.4. Postopek določanja PIGF

Priprava reagentov

Pufer za spiranje: Razredčili smo 20 mL koncentriranega pufru za spiranje z redestilirano vodo do skupnega volumna 500 mL.

Raztopina substrata: Barvni reagent A in barvni reagent B smo zmešali skupaj v enakih volumnih 15 minut pred uporabo ter ga hranili zaščitene pred svetlobo.

PIGF standardne raztopine: V stekleničko z liofiliziranim PIGF standardom smo dodali 1,0 mL kalibrator diluenta RD6-11 in ga raztapljali 15 minut tako, da smo ga ves čas rahlo stresali. Odpipetirali smo 500 μL kalibrator diluenta RD6-11 v 6 epruvet. 500 μL raztopljenega PIGF standarda smo prenesli v prvo epruveto ter dobro premešali, nato smo 500 μL te raztopine prenesli v naslednjo epruveto ter postopek ponavljali do konca. Pripravili smo standardne raztopine s koncentracijami 1.000 ng/L, 500 ng/L, 250 ng/L, 125 ng/L, 62,5 ng/L, 31,2 ng/L, 15,6 ng/L. Za ničelni standard smo uporabili pripravljen kalibrator diluent RD6-11.

Postopek ELISA testa

1. Pripravili smo reagente.
2. Na mikrotitrsko ploščico smo v vsako testno luknjico pipetirali 100 μL Assay diluent RD1-22.
3. V luknjice smo pipetirali 100 μL standardov, kontrol ali vzorcev.
4. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili z lepilnim trakom in inkubirali 2 uri na sobni temperaturi.
5. Odstranili smo vsebino vdolbinic ter mikrotitrsko ploščico 4-krat sprali z 250 μL pufru za spiranje. Nato smo ploščico posušili tako, da smo jo obrnili na vpojni papir.
6. V luknjice smo dodali 200 μL PIGF konjugata.
7. Sledila je inkubacija, kot pri točki 4.

8. Ploščico smo ponovno sprali, kot pri točki 5.
9. V luknjice smo pipetirali 200 μL raztopine substrata.
10. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 30 minut, zaščiteno pred svetlobo.
11. Reakcijo smo ustavili tako, da smo v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici pipetirali 50 μL stop reagenta ter ploščico rahlo premešali. Izmerili smo optično gostoto pri 450 nm.

Ob delu z reagenti in analizatorjem smo ves čas analize upoštevali varnostna navodila proizvajalca (39).

Izračun rezultatov

Analizator nam na osnovi povprečnih vrednosti za vsak standard izriše krivuljo odnosa med absorbanco in koncentracijo ter nam na podlagi le-te poda rezultate PIGF v ng/L.

3.2.5. Značilnosti metode

Natančnost

Evaluacija znotraj analize je bila narejena iz 60 vzorcev. KV znaša od 3,6-7,0%.

Medanalizno ponovljivost so naredili iz 120 vzorcev pri treh različnih koncentracijah PIGF. KV je od 10,9-11,8%.

Meja zaznavanja

Meja zaznavanje je 7 ng/L.

Test ponovne pridobitve z razredčevanjem

Vzorci z visokimi koncentracijami PIGF so bili razredčeni. Ujemanje pričakovane koncentracije z izmerjeno je bilo po navedbah proizvajalca med 88% in 118%.

Analična specifičnost in navzkrižna reaktivnost

Opazili so navzkrižno reaktivnost pri naslednjih faktorjih:

- Humani PlGF/VEGF heterodimer 5%
- Humani PlGF-2 50%

Za rekombinantno humano VEGF R1/Flt-1/Fc himero so opazili interference pri koncentracijah višjih od 2.000 ng/L.

Referenčne vrednosti

Pri testiranju 95 zdravih prostovoljcev so določili povprečno koncentracijo PlGF 18 ng/L (39).

3.3. Določanje koncentracije PlGF s testom DRG PlGF ELISA

Za določanje koncentracije PlGF smo uporabil test DRG PlGF ELISA proizvajalca DRG International Inc USA, ki je namenjen za zgodnje odkrivanje preeklampsije. S testom lahko kvantitativno določamo PlGF v vzorcih seruma. Test je namenjen za *in vitro* diagnostične namene (40).

3.3.1. Princip metode

Osnova je streptavidin-biotin ELISA, ki temelji na »sendvič« principu. Mikrotitrna ploščica je prevlečena z monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za določeno antigensko mesto na PlGF molekuli. Po inkubaciji se PlGF iz vzorca veže na mikrotitrsko ploščico. S spiranjem se odstranijo nevezane komponente. Poliklonalna z biotinom označena protitelesa se vežejo na molekulo PlGF. Ponovno inkubiramo in spiramo ter dodamo hrenovo peroksidazo s streptavidinom, ki tvori streptavidin-biotin kompleks. Zopet inkubiramo in spiramo ter dodamo substrat (TMB), ki z encimom tvori obarvan produkt. Reakcijo ustavimo z žveplovo kislino, ki tudi stabilizira oksidirano obliko kromofora. Pri ustreznih valovnih dolžini izmerimo absorbanco.

3.3.2. Reagenti in materiali

Test DRG PIGF ELISA vsebuje:

1. mikrotitrna ploščica s 96 vdolbinicami, prevlečenimi z anti-PIGF monoklonskimi protitelesi,
2. negativna standardna raztopina,
3. standardne raztopine s koncentracijami 25, 50, 125, 500 in 1.000 ng/L,
4. kontrolni vzorec, katerega koncentracija je navedena na viali,
5. pripravljen testni pufer (diluent),
6. encimski konjugat: z biotinom označena kozja anti-humana PIGF protitelesa,
7. encimski kompleks: streptavidin hrenova peroksidaza,
8. raztopina substrata: tetrametilbenzidin (TMB),
9. stop reagent: 0,5 M H₂SO₄,
10. raztopina za spiranje: 40-krat koncentrirana.

Ostala oprema:

- analizator Personal Lab (ADALTIS),
- kalibrirane pipete (*Eppendorf*) z nastavki,
- redestilirana voda,
- merilni valj.

3.3.3. Izbira ter ravnanje z vzorci

Proizvajalec navaja, da lahko s testom DRG PIGF ELISA določamo PIGF le v vzorcih seruma, ki ne smejo biti hemolizirani, ikterični ali lipemični. Serume lahko za 24 ur shranimo v hladilniku na 2-8°C. Če vzorcev ne bomo analizirali v 24 urah, jih moramo zamrzniti na -20°C. Vzorce lahko zamrznemo le enkrat.

Če izmerimo koncentracijo višjo kot je najvišji standard, lahko vzorec razredčimo s testnim pufrom v razmerju 1:10 ali 1:100.

3.3.4. Postopek določanja PIGF

Priprava reagentov

Raztopina za spiranje: 30 ml koncentrirane raztopine za spiranje smo razredčili s 1.170 mL redestilirane vode do skupnega volumna 1.200 mL. Tako pripravljena raztopina je obstojna 2 tedna pri sobni temperaturi.

Vsi ostali reagenti so že pripravljeni za uporabo.

Postopek ELISA testa

1. Reagente smo segreli na sobno temperaturo in pripravili raztopino za spiranje.
2. V luknjice na mikrotitrski ploščici smo pipetirali 25 μL standardne raztopine, kontrol in vzorcev.
3. V vsako luknjico smo pipetirali 250 μL diluenta.
4. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi.
5. Odstranili smo vsebino vdolbinic ter mikrotitrsko ploščico 3-krat sprali s 400 μL pufru za spiranje. Nato smo ploščico posušili tako, da smo jo obrnili na vpojni papir.
6. V vsako testno luknjico smo dodali 100 μL encimskega konjugata.
7. Sledila je 60 minutna inkubacija na sobni temperaturi.
8. Ploščico smo ponovno sprali, kot pri točki 5.
9. V vsako testno luknjico smo dodali 100 μL encimskega kompleksa.
10. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi.
11. Ploščico smo ponovno sprali, kot pri točki 5.
12. V luknjice smo pipetirali 100 μL raztopine substrata.
13. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi.
14. Encimsko reakcijo smo ustavili tako, da smo v vsako luknjico na mikrotitrski ploščici pipetirali 100 μL stop reagenta ter ploščico rahlo premešali. Izmerili smo optično gostoto pri 450 nm, znotraj 10 minut po dodatku stop reagenta.

Izračun rezultatov

Analizator nam na osnovi povprečnih vrednosti posameznega standarda izriše standardno krivuljo ter nam na podlagi le-te poda rezultate PIGF v ng/L. Vzorce, katerih koncentracija

je višja kot koncentracija najvišjega standarda (1.000 ng/L), moramo redčiti z diluentom in pri izračunu upoštevati faktor redčenja (40).

3.3.5. Značilnosti metode

Natančnost (ponovljivost)

- znotraj analize KV 1,68-2,83%
- med analizami KV 4,10-7,00%

Meja zaznavanja

- 1,062 ng/L

Test ponovne pridobitve z dodajanjem PIGF

Ujemanje pričakovane koncentracije z izmerjeno je bilo po navedbah proizvajalca med 88,4% in 105,5%. Ujemanje so določali pri treh različnih koncentracijah.

Analitična specifičnost in navzkrižna reaktivnost

Opazili so <20% navzkrižno reaktivnost z rekombinantnim humanim VEGF/PIGF ter <0,07% navzkrižno reaktivnost z rekombinantnim humanim Flt, PIGF-2, PDGF (trombocitni rastni dejavnik) in VEGF.

Proizvajalec opozarja, da je vrednosti PIGF potrebno vedno interpretirati s celotno klinično sliko. Sam rezultat testa ne sme biti edini dejavnik za uvedbo terapije.

3.3.6. Referenčne vrednosti

V študiji so na različnih populacijah določili vrednosti PIGF z DRG testom med 5. in 95. percentilom (Preglednica 5) (40).

Preglednica 5: Referenčne vrednosti PlGF z DRG testom

Populacija	Število preiskovancev	PlGF [ng/L]
Odrasle nenoseče ženske	65	20,3 - 85,3
Moški	99	16,7 - 63,1
Zdrave nosečnice	59	33 – 918
Zdrave nosečnice (27. – 32. teden)	17	161 – 950
Nosečnice z gestoza*	34	12 – 139
Nosečnice z gestoza (27. – 32. teden)	13	14 – 268

*splošni pojem za boleznimi v nosečnosti, večinoma povezanih z zvišanim krvnim tlakom

Proizvajalec priporoča, da je za oceno verjetnosti preeklampsije potrebno določiti vrednosti PlGF med 15. - 18. tednom nosečnosti.

Če je koncentracija med 15. - 18. tednom nosečnosti <42 ng/L in med 20. - 22. tednom nosečnosti <100 ng/L, obstaja v tej nosečnosti zvišano tveganje za razvoj preeklampsije (40).

3.4. Statistične metode in orodja

Podatke smo statistično obdelali s standardnimi statističnimi metodami s pomočjo programov Microsoft Excel 2010 in SPSS 20. Obdelave so zajemale potrebne izračune statističnih vrednosti na vrednostih vzorcev (srednje vrednosti, standardne odklone, koeficiente korelacije...), testiranja porazdelitev (Kolmogorov-Smirnov test), grafične prikaze itd.. Dobljeni statistični rezultati in naši sklepi na osnovi le-teh so v skladu z uveljavljenimi statističnimi prijemi sproti narekovali naše nadaljnje korake v raziskavi vse do končnih sklepov in ugotovitev.

4. REZULTATI

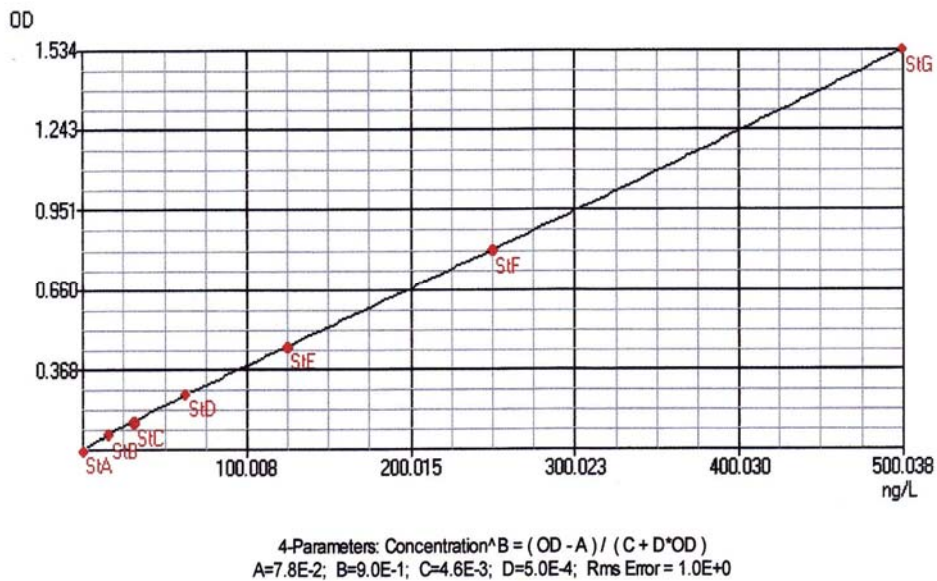
4.1. Potek analize

V prvem delu smo analizirali 88 vzorcev z dvema različnima testoma. Vsakemu smo določili PIGF s testom Quantikine in testom DRG PIGF ELISA. Primerjali smo analitske značilnosti obeh testov, povprečni vrednosti in standardna odklona. Ugotovili smo porazdelitev vrednosti pri obeh testih in moč povezave med testoma.

V drugem delu smo 527 vzorcem določili PIGF s testom Quantikine. Na širšem vzorcu smo s pomočjo kliničnih podatkov ugotavljali, kakšna je diagnostična občutljivost, specifičnost in napovedne vrednosti, ter ju primerjali s podatki iz literature za DRG PIGF ELISA test.

4.2. Standardni krivulji obeh testov

Pri vsaki analizi nam analizator pri testu Quantikine izriše umeritveno krivuljo iz uporabljenih standardov. Najvišji standard s koncentracijo 1.000 ng/L PIGF je bil izključen, ker analizator tako visoke koncentracije ni mogel izmeriti. Vse koncentracije vzorcev so bile odčitane iz umeritvene krivulje, saj je najvišja koncentracija znašala 104,2 ng/L in nobenega vzorca ni bilo potrebno redčiti (Slika 5).

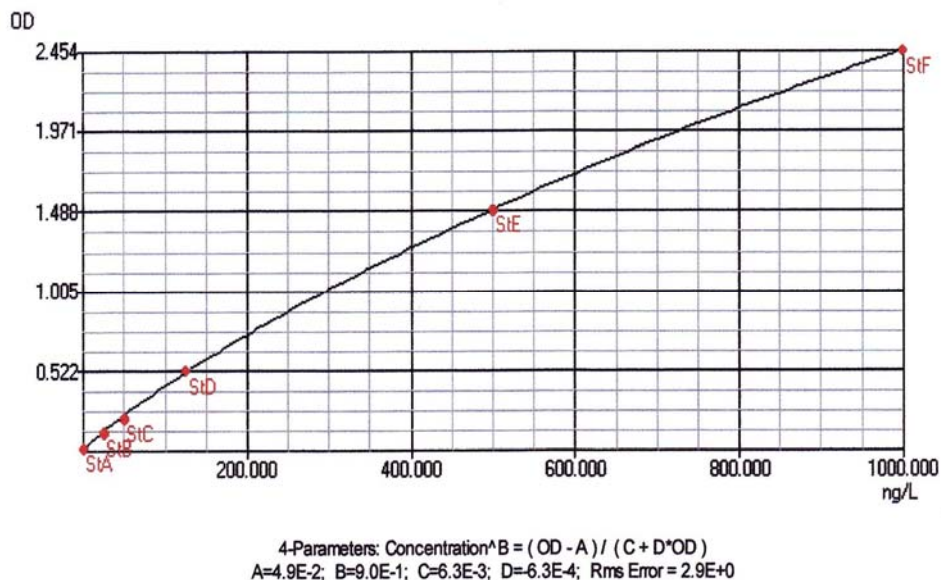


*OD pomeni izmerjena absorbanca

*Na x osi so koncentracije PIGF v ng/L

Slika 5: Umeritvena krivulja PIGF pri testu Quantikine

Pri testu DRG PIGF ELISA nam analizator izriše umeritveno krivuljo iz petih standardov z najvišjo koncentracijo 1.000 ng/L. Maksimalna izmerjena koncentracija vzorca je znašala 945,5 ng/L (Slika 6).



Slika 6: Umeritvena krivulja pri testu DRG PIGF ELISA

4.3. Primerjava analitskih značilnosti obeh testov

Za oba testa smo naredili primerjavo med natančnostjo, mejo zaznavanja analita ter vrednostmi recovery testa (Preglednica 6).

Meji zaznavanja se pri testih razlikujeta. Občutljivejši je DRG PLGF ELISA test, ki zazna koncentracijo 1,06 ng/L PIGF. Test Quantikine (R&D) je nekoliko manj občutljiv, njegova meja zaznavanja je 7,0 ng/L.

Natančnost so pri testu Quantikine (R&D) določili z analizo 20 vzorcev (serum, plazma, urin) z nizkimi, srednjimi in visokimi vrednostmi ter izrazili natančnost s koeficientom variacije (KV). Proizvajalec nam posebej podaja tudi KV za supernatante celičnih kultur. Pri testu Quantikine je KV za serum, plazmo ali urin znotraj analize v razponu 3,6% - 7,0% ter med serijami v razponu 10,9% - 11,8%, kar pomeni, da je test zelo dobro ponovljiv. Test DRG PLGF ELISA, ki je občutljivejši, kaže tudi na večjo natančnost tako znotraj kot zunaj analize v primerjavi s testom Quantikine (Preglednica 6).

Recovery test (test pridobitve dodatka) določa točnost metode. Izveden je bil z dodatkom znanih koncentracij PIGF vzorcu. Ujemanje izmerjenih vrednosti s pričakovanimi je pri testu Quantikine od 88% - 118% ter pri testu DRG PLGF ELISA od 87,0% - 105,5%.

Preglednica 6: Primerjava analitskih značilnosti obeh testov (39, 40).

	Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA
Meja zaznavanja	7,0 ng/L	1,06 ng/L
Natančnost		
- KV znotraj analize	3,6 - 7,0 %	1,68 - 2,83 %
- KV zunaj analize	10,9 - 11,8 %	4,10 - 7,00 %
Recovery test*	88 - 118 %	87,0 - 105,5 %

*Test pridobitve dodatka

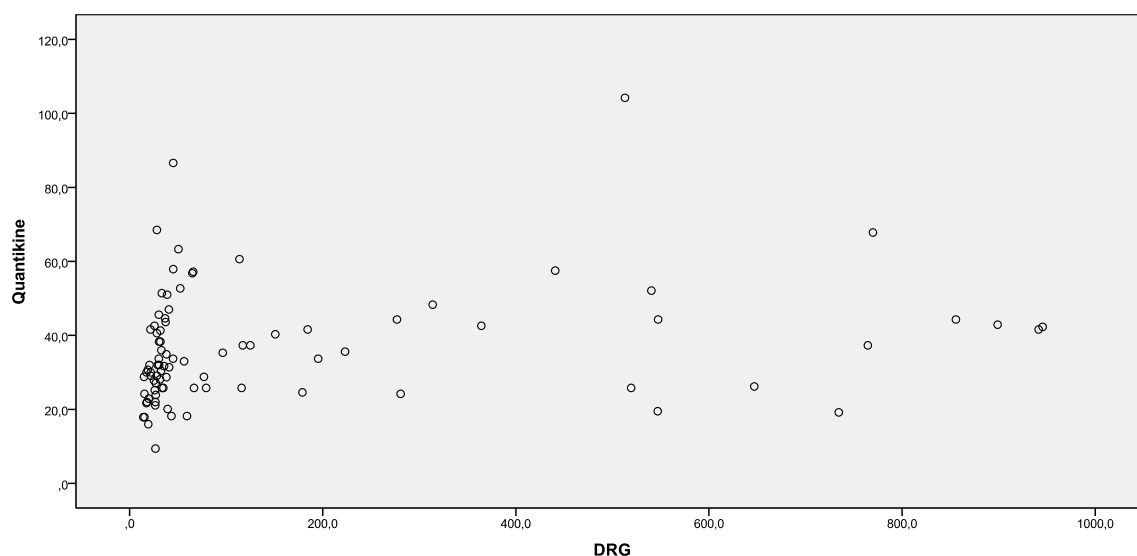
4.4. Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov

Povprečna vrednost za test Quantikine znaša 36,5 ng/L ter za test DRG 164,4 ng/L. Povprečni vrednosti in standardna odklona (SD) se pri obeh testih močno razlikujeta.

Glavni vzrok so očitni močni posamični odkloni izmerjenih vrednosti PIGF pri posameznem testu, kar se jasno vidi tudi pri grafičnih predstavitvah vzorcev (Graf 1). Največja gostota vrednosti je med 20 in 40 ng/L, pri DRG PIGF ELISA testu pa je najvišja izmerjena koncentracija vzorca kar 945,5 ng/L in SD 249,3 (Preglednica 7).

Preglednica 7: Srednji vrednosti in standardna odklona, izračunani iz vseh vrednosti

		Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA
Povprečna vrednost	[ng/L]	36,5	164,4
Maksimum	[ng/L]	104,2	945,5
Minimum	[ng/L]	9,4	14,2
SD		15,5	249,3



Graf 1: Grafična primerjava rezultatov obeh testov

Takšna močna odstopanja osamelcev (Graf 1) popolnoma izkrivijo statistični pomen rezultatov in onemogočajo statistično primerjavo obeh testov. Čeprav pričakujemo normalno porazdelitev pri obeh testih, smo npr. pri testiranju s Klotogorov-Smirnovim testom ugotovili, da pri opazovanju vseh vrednosti pri obeh testih na celotnem vzorcu le-te niso normalno porazdeljene, vrednost Sig. je v obeh primerih manjša od stopnje tveganja α ($\alpha=0,05$) (Preglednica 8).

Preglednica 8: Testiranje normalne porazdelitve vseh vzorcev pri obeh testih

Test	Kolmogorov-Smirnov		
	Stat.	df	Sig.
Quantikine	0,106	88	0,016
DRG PIGF ELISA	0,315	88	0,000

Odločili smo se izločiti osamele vrednosti ter nadaljevati s statistično analizo.

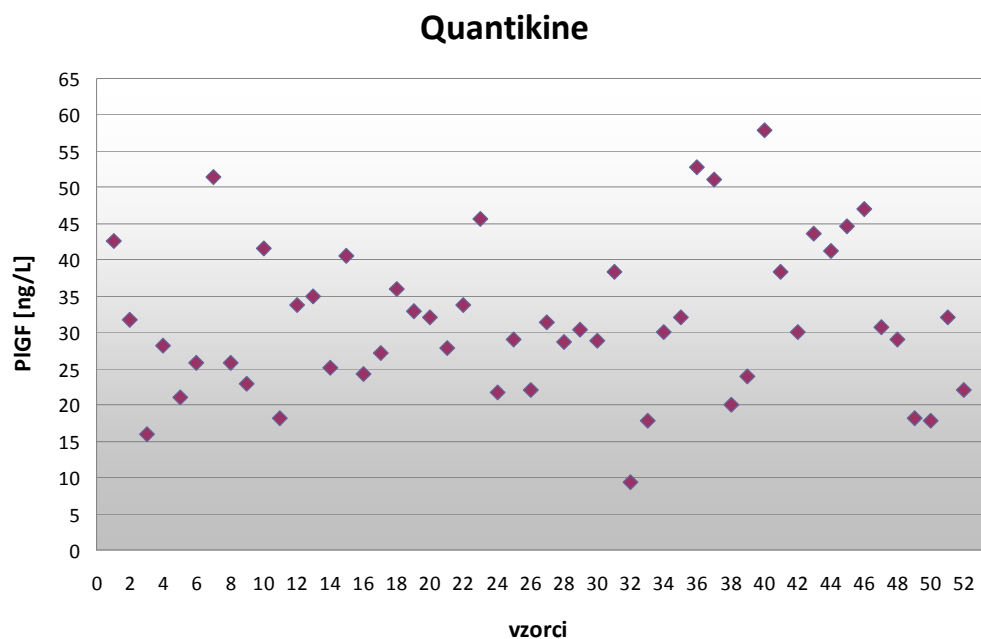
4.5. Izločitev osamelih vrednosti

Pri DRG PIGF ELISA testu je osamelcev nekaj več, skoraj tretjina celotnega vzorca, s čimer močno vplivajo na izračun srednje vrednosti in standardnega odklona, čeprav je razvidno (Graf 3), da so vrednosti najbolj skoncentrirane okrog vrednosti 30 ng/L.

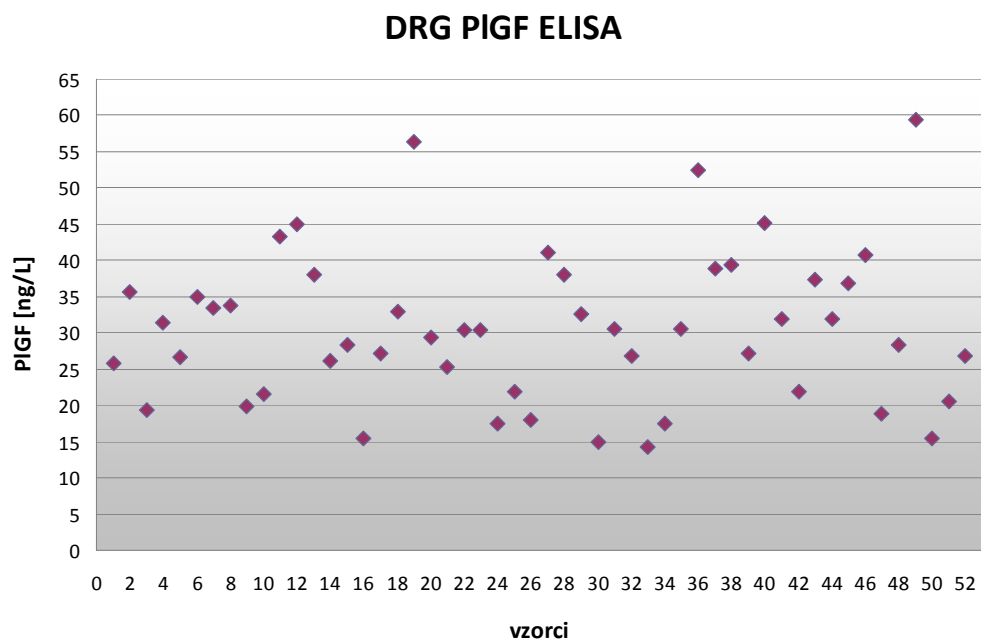
Podoben sklep smo naredili tudi pri Quantikine testu, kjer pa je takih osamelcev manj (Graf 2).

Kriterij za določanje osamelih vrednosti smo nastavili pri približno trikratnem standardnem odklonu od povprečne vrednosti okrnjenega vzorca po kateremkoli od obeh testov (PIGF 63 ng/L), s čimer smo zajeli glavnino normalno porazdeljenega vzorca pri obeh testih.

Zaradi nadaljnjega primerjanja obeh testov smo v primeru osamelca pri določenem testu eliminirali tudi rezultat drugega testa.



Graf 2: Grafični prikaz porazdelitve vzorcev brez osamelcev pri testu Quantikine



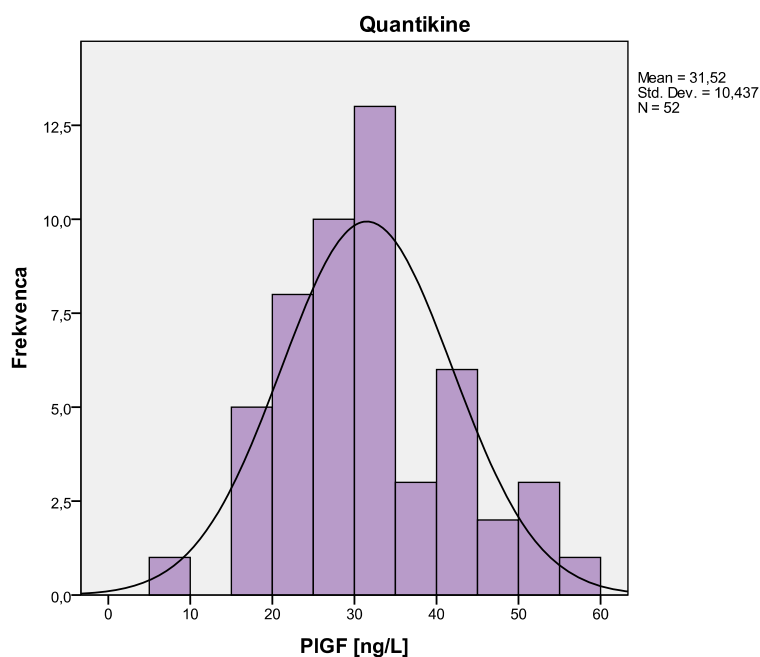
Graf 3: Grafični prikaz porazdelitve vzorcev brez osamelcev pri testu DRG PIGF ELISA

Preglednica 9: Srednji vrednosti in standardna odklona na vzorcu brez osamelcev

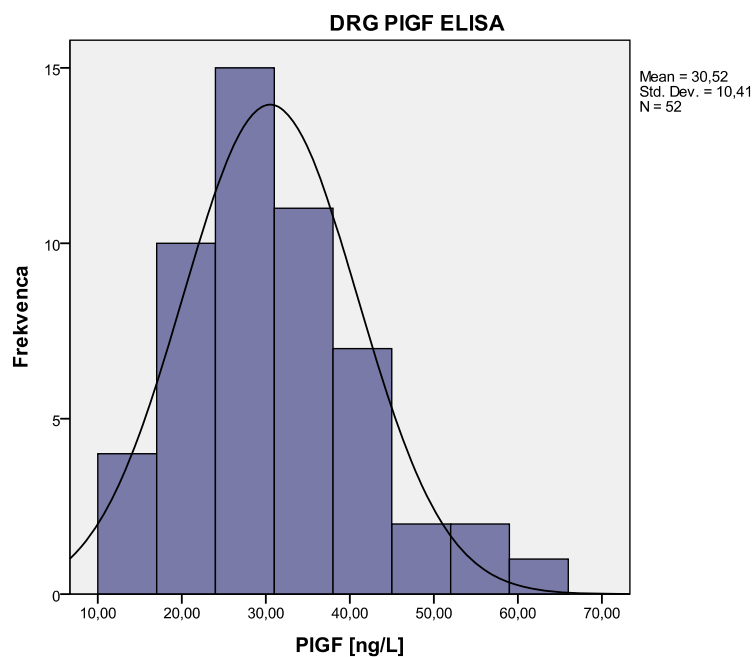
		Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA
Št. vzorcev		52	52
Povprečna vrednost	[ng/L]	31,9	30,9
Maksimum	[ng/L]	57,9	59,4
Minimum	[ng/L]	9,4	14,2
SD		10,6	10,6

4.6. Normalnost porazdelitve obeh vzorcev

S Kolmogorov-Smirnovim testom smo ugotavljali, ali so vrednosti rezultatov z izločenimi osamelci normalno porazdeljene. Upoštevali smo stopnjo tveganja $\alpha=0,05$. Vrednost Sig. je bila v obeh primerih večja od α . Privzeli smo ničelno hipotezo testa, da je porazdelitev obeh vzorcev normalna (Graf 4, Graf 5).



Graf 4: Normalna porazdelitev pri testu Quantikine



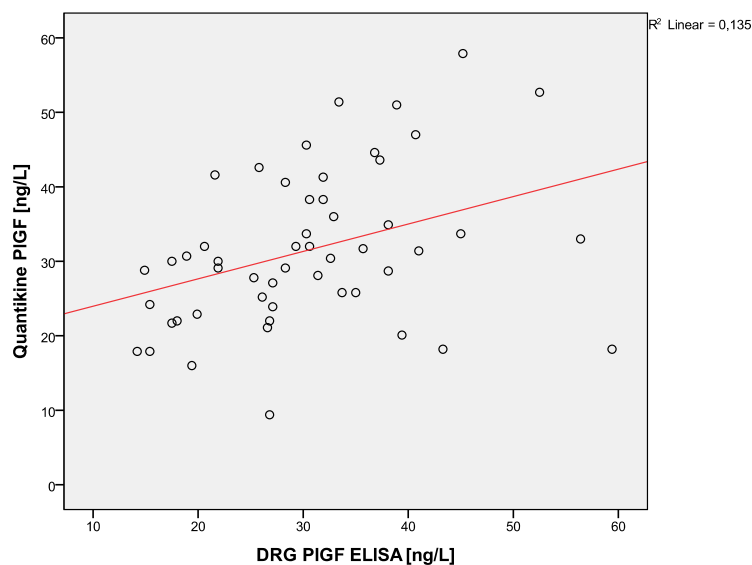
Graf 5: Normalna porazdelitev pri testu DRG PIGF ELISA

Preglednica 10: Testiranje normalne porazdelitve pri obeh testih

Test	Kolmogorov-Smirnov		
	Stat.	df	Sig.
Quantikine	0,116	52	0,077
DRG PIGF ELISA	0,072	52	0,200

4.7. Moč povezave med testoma

Mero povezanosti med testoma lahko določimo s Pearsonovim koeficientom korelacije. Ob upoštevanju vseh vzorcev obeh testov znaša koeficient 0,222, kar pomeni, da je povezanost neznatna. Na vzorcu z izločenimi osamelci (Graf 6) je korelacija nekaj višja, korelacijski koeficient znaša 0,367 ($p < \alpha$).



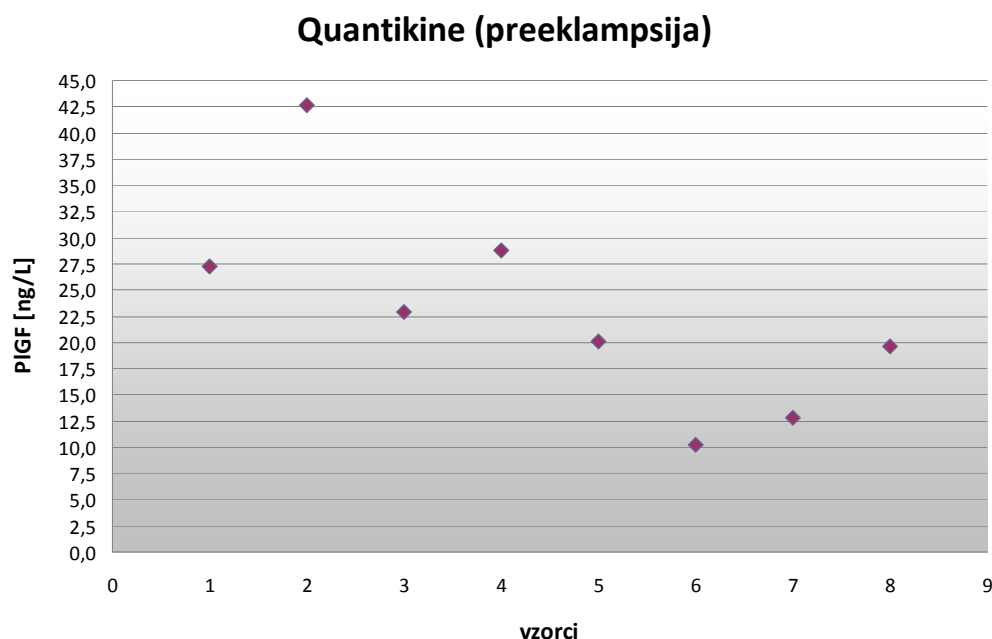
Graf 6: Razsevni diagram rezultatov obeh testov z regresijsko premico

4.8. Diagnostična občutljivost in specifičnost

Diagnostično občutljivost in specifičnost za test Quantikine smo izračunali iz 527 vzorcev, katerim je bila določena koncentracija PIGF s Quantikine (R&D) testom. S sodelovanjem z Ginekološko kliniko smo v okviru študije pridobili klinične podatke o nosečnicah, ki so razvile preeklampsijo. Vzorcev z boleznijo je bilo 8. Povprečna koncentracija PIGF pri bolnicah je znašala 23,0 ng/L. Zdrave nosečnice smo uvrstili v kontrolno skupino (Preglednica 11). Iz preglednice lahko razberemo, da so bile povprečne vrednosti PIGF pri nosečnicah s preeklampsijo značilno nižje kot v kontrolni skupini 519 vzorcev.

Preglednica 11: Razširjen vzorec in klinični podatki

	Vsi vzorci	Preeklampsija	Kontrolna skupina
Št. vzorcev	527	8	519
Povprečna vrednost [ng/L]	55,4	23,0	55,9
Maksimum [ng/L]	205,1	42,7	205,1
Minimum [ng/L]	4,9	10,2	4,9
SD	32,4	10,2	32,4



Graf 7: Razsevni diagram vzorcev s preeklampsijo

Vzorec z najvišjo koncentracijo 42,7 ng/L odstopa (Graf 7). Na podlagi do sedaj znanih referenčnih vrednosti za PIGF, ki so bile določene z DRG PIGF ELISA testom v 15. - 18. tednu nosečnosti, smo najvišjo vrednost vključili med lažno negativne rezultate, saj je študija navajala, da obstaja v nosečnosti zvišano tveganje za razvoj preeklampsije, če so koncentracije PIGF med 15. - 18. tednom nosečnosti < 42 ng/L.

Vzorci kontrolne skupine 519 nosečnic smo testirali na normalno porazdelitev s Kolmogorov-Smirnovovim testom in ugotovili, da se ne porazdeljujejo normalno ($p < \alpha$). Pražne vrednosti tako nismo mogli določiti na osnovi standardnega odklona od srednje vrednosti.

Metoda določanja pražne vrednosti na 99 percentilu (oz. 1 percentilu) prav tako ni smiselna, saj opazujemo vzorec pri znižanih koncentracijah, ki pa so, kot kažejo rezultati, v območju, kjer je tudi precej vzorcev nosečnic, ki niso razvile preeklampsije. Pri analizi se je smiselno torej osredotočati ne toliko na pravilno pozitivne, ampak predvsem na pravilno negativne rezultate, kar je bilo naše vodilo za določanje smiselne pražne vrednosti, ki še ima klinični pomen.

Iz grafa 7 je razvidno, da je med najvišjo vrednostjo vzorca bolnic s preeklampsijo, ki smo jo že vključili med lažno negativne rezultate, ter ostalimi vrednostmi vzorca precejšnja

vrzel. Ker je vzorec številčno precej omejen in ga zato statistično ni smiselno podrobneje analizirati, smo določili prazno vrednosti sredi te vrzeli, to je pri 35,7 ng/L.

Na osnovi zgornjih kriterijev smo rezultate razvrstili med lažno pozitivne in pravilno negativne (Preglednica 12).

Preglednica 12: Klinični podatki o preeklampsiji in testih analize

		TEST ANALIZE	
		pozitiven	negativen
PREEKLAMPSIJA	prisotna	PP 7	LN 1
	odsotna	LP 159	PN 360

*Pravilno pozitivni rezultati (PP) pomenijo pozitiven test pri pozitivnem izidu bolezni.

*Pravilno negativni rezultati (PN) pomenijo negativen test pri osebah, ki nimajo bolezni.

*Lažno negativni rezultati (LN) pomenijo negativen test pri pozitivnem izidu bolezni.

*Lažno pozitivni rezultati (LP) pomenijo pozitiven rezultat testa pri osebah, ki nimajo bolezni.

Diagnostično občutljivost in specifičnost testa Quantikine smo izračunali po enačbah:

$$\text{Diagnostična občutljivost (DO) [\%]} = \frac{PP \cdot 100}{PP + LN}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost (DS) [\%]} = \frac{PN \cdot 100}{PN + LP}$$

Diagnostično občutljivost in specifičnost testa Quantikine smo primerjali z diagnostično občutljivostjo in specifičnostjo testa DRG PIGF ELISA, podano iz literature (Preglednica 13).

Preglednica 13: Diagnostična občutljivost in specifičnost za Quantikine in DRG PIGF ELISA test

	Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA*
Diagnostična občutljivost	87,5 %	85,7 %
Diagnostična specifičnost	69,4 %	83,3 %

*DO in DS pri DRG PIGF ELISA testu je podal proizvajalec testa (40)

4.9. Pozitivne in negativne napovedne vrednosti

Izračun napovednih vrednosti po metodi kontingenčnih tabel

Napovedne vrednosti smo najprej izračunali po metodi kontingenčnih tabel, kjer se upošteva le opazovan vzorec brez prevalence, in sicer po enačbah:

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost (PNV) [\%]} = \frac{PP \cdot 100}{PP + LP}$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost (NNV) [\%]} = \frac{PN \cdot 100}{PN + LN}$$

Po pričakovanjih je negativna napovedna vrednost zelo visoka, medtem ko je pozitivna napovedna vrednost precej nizka. Izračunane vrednosti testa Quantikine smo primerjali z vrednostmi testa DRG PIGF ELISA iz literature (Preglednica 14).

Izračun napovednih vrednosti z Bayesovo formulo

Bayesova formula uporablja za izračun napovednih vrednosti prevalenco (P). Podatka za Slovenijo v literaturi nismo zasledili, zato smo se oprli na vrednosti različnih evropskih študij. Vrednosti se največkrat gibajo med 2,5% in 3,5%, variirajo po različnih državah in celo po geografskih območjih znotraj držav. Za izračun napovednih vrednosti v naši študiji smo zato izbrali njihovo grobo povprečje 3%. V slabše razvitem in nerazvitem svetu literatura navaja tudi nekajkrat višje vrednosti, 10% in več.

$$PNV [\%] = \frac{DO \cdot P}{DO \cdot P + (1 - DS) \cdot (1 - P)}$$

$$NNV [\%] = \frac{DS \cdot (1 - P)}{DS \cdot (1 - P) + (1 - DO) \cdot P}$$

Preglednica 14: Pozitivne in negativne napovedne vrednosti za Quantikine in DRG PIGF ELISA test

	Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA*
PNV	4,2 % oz. 8,0% _(Bayes)	4,0 %
NNV	99,7 % oz. 99,4% _(Bayes)	97,8 %

*PNV in NNV DRG PIGF ELISA je podal proizvajalec testa (40)

4.10. Razmerje verjetja

Izračunali smo pozitivno in negativno razmerje verjetja (positive/negative likelihood ratio) za Quantikine test.

Pozitivno razmerje verjetja (LR+) je količnik verjetnosti oz. razmerje verjetja, da bomo dobili pozitiven rezultat testa, če oseba resnično ima bolezen.

$$\text{Pozitivno razmerje verjetja (LR+)} = \text{občutljivost} / (1 - \text{specifičnost})$$

Negativno razmerje verjetja (LR-) je količnik verjetnosti, da bomo dobili negativen rezultat testa, če oseba resnično nima bolezni.

$$\text{Negativno razmerje verjetja (LR-)} = \text{specifičnost} / (1 - \text{občutljivost})$$

Če nosečnica ima preeklampsijo, se za 2,9-krat povečajo obeti, da bo rezultat testa pozitiven. Če nosečnica nima oz. ne bo razvila bolezni, se za 5,7-krat povečajo obeti, da bo test pri nosečnici negativen (Preglednica 15).

Preglednica 15: Primerjava razmerij verjetja med testoma

	Quantikine (R&D)	DRG PIGF ELISA*
LR+	2,9	5,1
LR-	5,7	5,8

*Pozitivno in negativno razmerje verjetja za test DRG PIGF ELISA je podal proizvajalec testa (40)

5. RAZPRAVA

5.1. Vrednotenje metode

Za kvalitetno delo moramo pripraviti ustrezne delovne pogoje, zagotoviti ustrezno kalibrirane instrumente ter natančno in točno izvesti analize.

Umeritveni standardni krivulji obeh testov sta bili v območju vrednosti absorbanč, ki jih navaja proizvajalec. Na podlagi tega smo ocenili, da so analize ustrezno opravljene. Nato smo proučili parametre vrednotenja metode.

Oba testa kažeta na ustrezno **ponovljivost** rezultatov tako znotraj analize kot med analizami. Koeficienti variacije so bili nekoliko boljši pri testu DRG PIGF ELISA (v območju 1,68%-2,83% znotraj analize in v območju 4,10%-7,00% med analizami), kar je za ELISA teste ustrezno (priporočila NCCLS).

Analitska občutljivost je pri obeh testih precej visoka. ELISA testi so na splošno zelo občutljivi, saj nam novejše izvedbe testov z biotinom in streptavidinom omogočijo močno ojačanje signala. Pri testu Quantikine gre za princip indirektno »sendvič« ELISA izvedbe, kjer morata biti na antigenu znana najmanj dva epitopa, občutljivost je 7,0 ng/L. Pri testu DRG PIGF ELISA, ki temelji na principu streptavidin-biotin ELISA, opazimo višjo občutljivost (1,06 ng/L). Biotin je majhna molekula, ki je vezana na sekundarno protitelo, streptavidin je konjugiran z encimom. Zaradi močnih interakcij biotina in streptavidina nastanejo obstojne vezi v kompleksu, signal je močno ojačen, zato je tudi občutljivost testa višja.

Ocenjujemo, da sta oba testa za zgodnje odkrivanje razvoja preeklampsije v 12. - 14. tednu nosečnosti dovolj občutljiva, saj se klinično pomembne vrednosti nahajajo že v območju pod 40 ng/L PIGF.

Recovery test (test pridobitve dodatka) določa točnost metode. Ujemanje izmerjenih vrednosti s pričakovanimi je boljše pri DRG PLGF ELISA testu (87,0% - 105,5%), kar pomeni, da je ta test nekoliko točnejši od testa Quantikine (88% - 118%).

Oba testa sta za zgodnje odkrivanje preeklampsije dovolj občutljiva, natančna in točna. Pri testu DRG PIGF ELISA so bile izmerjene vrednosti pri nekaterih nosečnicah za razliko od

testa Quantikine (R&D) zelo visoke, kar smo morali upoštevati pri naši statistični raziskavi pri primerjavi obeh testov, a klinično ta razlika med testoma za samo zgodnejše odkrivanje preeklampsije ni pomembna, saj opazujemo predvsem znižane vrednosti. Morda bi se ta razlika med testoma pokazala za klinično pomembno pri drugih vrstah obolenj, kjer so vrednosti značilno zvišane (npr. maligna obolenja).

5.2. Primerjava dveh metod

Primerjava vrednosti

Rezultati koncentracij PIGF v 88 vzorcih z dvema imunokemijskima metodama, ki obe temeljita na ELISA tehniki, so dali dokaj različne rezultate. Povprečna vrednost koncentracij PIGF, določenih s testom Quantikine, je bila znatno nižja od povprečne vrednosti pri testu DRG PIGF ELISA. Srednja vrednost je bila pri testu DRG PIGF ELISA kar 4,5-krat višja. Vzrok temu so bile visoke osamele vrednosti, ki jih je bilo precej predvsem pri DRG PIGF ELISA. Pri obeh testih vrednosti na celotnem vzorcu niso bile normalno porazdeljene, zato statistični izračuni srednjih vrednosti in standardnih deviacij niso smiselni. Vzrok tako visokih osamelih vrednostih pri DRG PIGF ELISA testu bi lahko pripisali visoki občutljivosti samega testa. Oba proizvajalca uporabljata specifična primarna monoklonska protitelesa (Ab). Obstaja razlika v sami konjugaciji protiteles med obema testoma (39,40). Pri Quantikine imamo poliklonska Ab konjugirana s hrenovo peroksidazo, medtem ko so pri DRG PIGF ELISA testu poliklonska Ab označena z biotinom, encimski kompleks konjugiran s streptavidinom dodamo na mikrotitrsko ploščico naknadno. Ravno biotin - streptavidin kompleks, kjer nastane ena najmočnejših nekovalentnih bioloških interakcij, nam povzročita močno ojačanje signala in večjo občutljivost, kar se verjetno pri že zvišanih vrednostih še dodatno eksponira. Najvišja vrednost pri analizi z DRG PIGF ELISA testom je bila 945,5 ng/L in je v primerjavi z referenčnimi vrednostmi z ECLIA metodo (Preglednica 3) kar 5-krat nad zgornjo referenčno mejo. Zaradi teh odstopanj predvsem pri enem testu so bile vrednosti medsebojno statistično težko primerljive.

Izločitev osamelcev

Zaradi lažje primerljivosti obeh testov ter dejstva, da zelo visoke vrednosti PIGF za zgodnje odkrivanje preklampsije diagnostično niso pomembne, smo se odločili izločiti visoke osamele vrednosti pri obeh testih ter nadaljevati s statistično analizo posamičnega testa in njune povezanosti. Izločili smo vse vzorce, kjer je bila vrednost vsaj enega od testov nad 63 ng/L (območje v približno 3-kratni SD od povprečja). Vrednosti obeh vzorcev so bile zdaj normalno porazdeljene, s čimer je bila omogočena lažja medsebojna statistična primerjava.

Korelacija

Moč povezave med obema spremenljivkama na celotnem vzorcu je bila 0,222, kar kaže na neznatno pozitivno povezanost. Domnevali smo, da so bile vzrok temu nekatere močno izstopajoče vrednosti. Pearsonov koeficient korelacije izračunan na vzorcu z izločenimi osamelci je bil 0,367, kar kaže na nekoliko večjo povezanost, vendar je povezava med testoma tudi v tem območju normalne porazdelitve pri obeh testih nizka (šibka). Iz teh podatkov lahko zaključimo, da dajeta testa kljub temu, da oba temeljita na osnovnem principu ELISA, dokaj različne rezultate. Očitno je, da obstajajo razlike med primarnimi in sekundarnimi protitelesi ter ojačitvijo signala, ki imajo vpliv na same rezultate.

Čeprav vrednosti obeh testov niso v močnejši korelaciji, pa bi vsak test zase lahko dajal dobre rezultate tako, da bi za vsak test posebej izračunali orientacijske referenčne vrednosti na zdravi populaciji nosečnic v tistem obdobju, v katerem želimo spremljati vrednosti PIGF pri preeklampsiji. Prav tako bi bilo potrebno pri vsakem testu posebej določiti prazne vrednosti.

Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti za PIGF podajajo v literaturi po tednih nosečnosti, ker PIGF do 33. tedna nosečnosti strmo narašča, nato pa prične padati. Vrednosti so podane v razponu od 3 do 5 tednov (Preglednica 3). Zaradi močne dinamike koncentracij PIGF v krvi nosečnice skozi čas je v posamezni referenčni meji precej velik razpon od najnižje do najvišje koncentracije PIGF (npr. v 10. - 14. tednu nosečnosti 29,4-183 ng/L, študija je narejena z metodo ECLIA). Zaradi tako velikega razpona vrednosti bi morali imeti za primerjavo metod mnogo večji vzorec ali pa referenčne vrednosti, podane po tednih nosečnosti.

Proizvajalec testa Quantikine referenčnih vrednosti ne navaja po tednih nosečnosti, temveč navaja le srednjo vrednost PIGF 18 ng/L, ki so jo pridobili s testiranjem prostovoljcev. Ni navedeno, ali so bili v skupino prostovoljcev vključeni tudi moški, za katere je značilno, da imajo v povprečju nižje vrednosti kot ženske. Poleg tega ta test še ni namenjen za diagnostiko preeklampsije, temveč le za študijske namene, saj lahko PIGF določamo tudi pri drugih boleznih (npr. onkološki bolniki itd.). Na to orientacijsko referenčno vrednost se v primeru diagnostike preeklampsije zato ne moremo opreti.

Test DRG PIGF ELISA je namenjen za diagnostiko preeklampsije pri nosečnicah. Proizvajalec nam podaja referenčne vrednosti za zdrave nenoseče ženske 20,3-85,3 ng/L ter zdrave nosečnice 33-918 ng/L. Za nosečnice z gestoza so vrednosti značilno nižje, od 12-139 ng/L. Gestoza je splošni pojem za bolezni v nosečnosti, v večini primerov so te povezane z zvišanim krvnim tlakom. Referenčne vrednosti za obdobje med 12. in 14. tednom niso podane, pač pa so določili mejo, kjer obstaja zvišano tveganje za razvoj preeklampsije med 15. in 18. tednom nosečnosti <42 ng/L in med 20. in 22. tednom nosečnosti <100 ng/L. Te vrednosti smo delno upoštevali tudi v naši raziskavi, ko smo iskali mejo med pravilno pozitivnimi in lažno pozitivnimi rezultati.

PIGF molekula se nahaja v organizmu v štirih oblikah, ki so si med seboj zelo podobne. Oba proizvajalca testov navajata možnost navzkrižne reaktivnosti s PIGF-2 ter PIGF/VEGF hetrodimerom, kar pomeni, da še niso razvili visoko specifičnih protiteles za točno določeno molekulo PIGF, ki bi jo želeli določiti.

5.3. Klinična uporabnost obeh testov

S pomočjo kliničnih podatkov v okviru potekajoče študije na Ginekološki kliniki smo izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti. Vsem 527 vzorcem je bil določen PIGF s Quantikine testom, od tega je 8 nosečnic razvilo preeklampsijo. Nosečnice iz celotnega vzorca, ki niso zbolele, smo uvrstili v kontrolno skupino. Ugotovili smo, da so srednje vrednosti PIGF obolelih in nebolelih značilno različne. Vrednosti pri nosečnicah s preeklampsijo so v povprečju pod polovico povprečja v kontrolni skupini, po čemer lahko tudi na našem vzorcu sklepamo, da so pri preeklampsiji vrednosti v povprečju precej nižje.

Pražno vrednost smo postavili pri koncentraciji 35,7 ng/L ter na podlagi tega opredelili lažno pozitivne in lažno negativne v skupini zdravih nosečnic. Izračunali smo diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost testa Quantikine. Diagnostična občutljivost obeh testov je dokaj primerljiva. Nekoliko višja kot pri DRG PIGF ELISA (85,7%) je bila pri testu Quantikine (87,5%), kar pomeni, da je pri testu Quantikine ob upoštevanju prazne vrednosti, ki smo jo določili, večja verjetnost, da bo test pozitiven, če je bolezen prisotna oz. s tem testom dobimo manj lažno negativnih rezultatov. Diagnostična specifičnost pri testu Quantikine (69,4%) je precej slabša kot pri DRG PIGF ELISA (83,3%), kar kaže na to, da je pri Quantikine več lažno pozitivnih rezultatov kot pri testu DRG PIGF ELISA.

Gornjo prazno vrednost smo določili na osnovi zelo malega vzorca, kar niti statistično niti praktično ni ustrezno. S tega vidika bi bilo potrebno prazno vrednosti določiti na bistveno večjem vzorcu. Ob iskanju optimalnega praga smo pri tem, da nismo zajeli vseh vzorcev s preeklampsijo kot pravilno pozitivne, tudi zanemarili pomemben etični vidik namena testiranja odkriti čim več primerov bolezni. Zato smo analizirali vzorec tudi z višjo prazno vrednostjo (42,7 ng/L), ki je zajela vse primere preeklampsije, torej brez lažno negativnih vrednosti oz. s 100% diagnostično občutljivostjo. S tem bi v skupino potencialno obolelih zajeli precej večje število nosečnic. Po drugi strani pa bi zaradi višjega števila lažno pozitivnih primerov dosegli precej nižjo diagnostično specifičnost (56,6%) in s tem zmanjšali klinično uporabnost samega testa (precej več preventivnih pregledov nosečnic, višji stroški ipd.).

Zavedati se moramo, da so napovedne vrednosti v veliki meri odvisne od pojavnosti bolezni v populaciji oz. v našem primeru od velikosti vzorca nosečnic s potrjeno preeklampsijo, in manj od postavljene prazne vrednosti. Poleg tega nizke vrednosti PIGF najdemo tako pri zdravih nosečnicah kot pri nosečnicah s preeklampsijo, medtem ko so srednje in višje vrednosti samo pri zdravih. Napovedne vrednosti, tako pozitivne kot negativne, so pri obeh testih primerljive. PNV je tako pri obeh testih zelo nizka (pri Quantikine 4,2% oz. 8,0% z upoštevanjem predpostavljene prevalence, pri DRG PIGF ELISA 4,0%), ker imamo relativno visoko število lažno pozitivnih rezultatov. Verjetnost, da imamo pozitiven rezultat testa in bo nosečnica res razvila preeklampsijo, je torej nizka. Pri obeh testih imamo zelo visoke NNV (Quantikine preko 99% in DRG PIGF ELISA 97,8%), torej obstaja visoka verjetnost, da v primeru negativnega rezultata nosečnica ne bo razvila preeklampsije.

Za test Quantikine smo izračunali pozitivno in negativno razmerje verjetja (likelihood ratio). LR+ je bil pri testu Quantikine precej nižji kot pri testu DRG PIGF ELISA. Če nosečnica ima preeklampsijo, se za 2,9-krat povečajo obeti, da bo rezultat testa pozitiven, medtem ko se pri DRG obeti povečajo za 5,1-krat. Izračunana količnika LR- sta pri obeh testih dokaj podobna (pri DRG PIGF ELISA testu 5,8, pri Quantikine pa 5,7).

Za Quantikine test je obetavna potrditev dejstva tudi na našem vzorcu in po naši analizi, da so vrednosti PIGF pri nosečnicah, ki smo jih testirali s testom Quantikine in so razvile preeklampsijo, značilno nižje od povprečja. Kljub temu, da smo zaradi velike razpršenosti pri višjih vrednostih pri testu DRG PIGF ELISA na prvi pogled pričakovali slabše parametre vrednotenja metode, pa se je ta test pokazal za klinično uporabnejšega kot Quantikine test na našem vzorcu. Trditev bi bilo vsekakor potrebno preveriti na bistveno večjem vzorcu.

Glede na nizko PNV bi bilo smiselno postaviti diagnostični algoritem, po katerem bi se ravnali kliniki, ki bi poleg določanja PIGF vključeval še ostale biokemične označevalce (poleg PIGF npr. še VEGF, sFlt-1, sEng... z navedenimi kritičnimi mejami), ter rezultate interpretirati z vsemi podatki hkrati.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Na osnovi primerjave analitskih značilnosti obeh testov smo ugotovili, da sta oba ustrezno natančna, občutljiva in točna.
- Za statistično primerjavo obeh testov je potrebno vzorec ustrezno prilagoditi zaradi nekaterih zelo visokih vrednosti, predvsem pri testu DRG PIGF ELISA, ki pa za zgodnje ugotavljanje preeklampsije klinično niso pomembne.
- Moč povezave med obema testoma je v območju klinično pomembnih vrednosti šibko pozitivna.
- Zaradi šibke korelacije med testoma bi bilo smiselno določiti prazne vrednosti za vsak test posebej, na statistično ustrezno velikem vzorcu in v določenem času nosečnosti.
- Za Quantikine test je obetavno, da so vrednosti PIGF pri nosečnicah, ki smo jih testirali s testom Quantikine in so razvile preeklampsijo, značilno nižje od povprečja.
- Quantikine test ima višjo diagnostično občutljivost in nižjo diagnostično specifičnost kot test DRG PIGF ELISA.
- PNV in NNV, ki smo jih izračunali pri Quantikine, sta primerljivi z vrednostmi pri DRG PIGF ELISA, ki jih je podal proizvajalec.
- Pozitivno razmerje verjetja je višje pri testu DRG PIGF ELISA, negativno pa je pri obeh testih skoraj enako.

7. LITERATURA

1. Wang A, Rana S, Karumanchi SA: *Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis. Physiology* 2009; 24: 147-158.
2. Guyton in Hall. *Textbook of Medical Physiology. 9th edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1996: 1401-1420.*
3. Cör A, Legan M: *Posteljica. Medicinski razgledi* 2006; 45:391-401.
4. Golob N: *Nepravilni trofoblastni vdor v patogenezi preeklampsije. Medicinski razgledi* 2010; 3/03.
5. Petrovič D: *Normalen razvoj človeškega zarodka in nepravilnosti v njegovem razvoju. Medicinski razgledi* 2003; 42:183-201.
6. Leila D: *Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. British Medical Bulletin* 2003; 67: 161-176.
7. Stephen P. Emery: *Hypertensive disorders of pregnancy: Overdiagnosis is appropriate. Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2005; 72(4): 345-352.
8. Wald N, Leck I: *Antenatal and neonatal screening, 2nd edition, Oxford University Press* 2000, 201-224.
9. *Preeclampsia, julij 2011,*
<http://www.aacc.org/publications/cln/2010/February/Pages/series0210.aspx>.
10. Glistrap L, Rmin S: *ACOG Committee on Practice Bulletins: Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. ACOG Practice Bulletin Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists* 2002; 33: 1-9.
11. Redman CWG, Sargent IL: *Preeclampsia and the Systemic Inflammatory Response. Seminars in Nephrology* 2004; 24: 565-570.
12. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP: *Preeclampsia: A renal perspective. Kidney International* 2005; 67: 2101-2113.

13. *Chanprapaph P: Update in Pre-eclampsia. J Med Assoc Thai 2004; 87 (Suppl 3): S104-112.*
14. *Duckitt D, Harrington D: Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. BMJ 2005; 330: 576-580.*
15. *Bdolah Y, Karumanchi SA, Sachs BP: Recent Advances in Understanding of Preeclampsia. Croatian Medical Journal 2005; 46(5):728-736.*
16. *Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Masse J, Dastugue B, Forest J-C: Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. Clinical Biochemistry 2003; 36:323-331.*
17. *Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft F. C: New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia. Journal of the American Society of Nephrology 2004; 15: 2440-2448.*
18. *Metz J, Cincotta R, Francis M, DeRosa L, Balloch A: Screening for consumptive coagulopathy in preeclampsia. Int J Gynaecol Obstet 1994 Jul; 46(1): 3-9.*
19. *Slaghekke F, Dekker G, Jeffries B: Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: A review. The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine 2006; 19: 447-452.*
20. *Myatt L, Webster RP: Vascular Biology of Preeclampsia. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2008; 7: 375-384.*
21. *Noris M, Perico N, Remuzzi G: Mechanisms of Disease: Preeclampsia. Nature clinical practice Nephrology 2005; 1(2): 98-114.*
22. *Šajina Stritar B: Testi za napovedovanje preeklampsije, Medicinski razgledi 2003; 42: 1-10.*
23. *Sibai BM: Diagnosis Prevention and Management of Eclampsia. The American College of Obstetricians and Gynecologists 2005; 105(2): 402-410.*
24. *Kavčič S: Nujna stanja: priručnik. 4. izdaja. Združenje za splošno/družinsko medicino Slovenskega zdravniškega društva, Ljubljana 2000; 4: 101-112.*

25. *Levine R J, Yu K F, Sibai B M, Thadhani R: Soluble Endoglin and Other Circulating Angiogenic Factors in Preeclampsia. The New England Journal of Medicine 2006; 355: 992-1005.*
26. *Chen Y: Novel Angiogenic Factors for Predicting Preeclampsia: sFlt-1, PlGF, and Soluble Endoglin. The Open Clinical Chemistry Journal 2009; 2: 1-6.*
27. *Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Meglione D, Battisti M, Tucci M, Persico M G, Acharya KR: The Crystal Structure of Human Placenta Growth Factor-1 (PlGF-1), an Angiogenic Protein, at 2.0 Å Resolution. The Journal of Biological Chemistry 2001; 15:12153-12161.*
28. *Urinary PlGF predicts early-onset preeclampsia, julij 2011*
http://findarticles.com/p/articles/mi_m0CYD/is_3_40/ai_n11832029/.
29. *Luft FC, Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. Nephrology Dialysis Transplantation 2006; 21: 3052-3054.*
30. *Muy-Rivera M, Vadachkoria S, Woelk GB, Qui C, Mahomed K, Williams MA: Maternal Plasma VEGF, sVEGF-R1 and PlGF Concentrations in Preeclamptic and Normotensive Pregnant Zimbabwean Women. Physiological Research 2005, 54: 611-622.*
31. *Carty DM, Delles C, Dominiczak AF: Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia. Trends in Cardiovascular Medicine 2008; 18 (5-24): 186-194.*
32. *Vozelj M. Temelji imunologije. Ljubljana: DZS, 2000, 47-120.*
33. *PlGF, Elecsys and cobas e analyzers, julij 2011,*
http://www.rochecanada.com/fmfiles/re7234008/package_inserts/PLGF-05144671190-ENGLISH-V3-CAN.pdf
34. *PlGF Alere, julij 2011, <http://www.alerehealth.nl/products/4ed.html>*
35. *PlGF Alere , julij 2011, <http://www.alerehealth.nl/products/4ka.html>*

36. *Kotnik V: Imunološki priročnik, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 122-127, 139*
37. *Saah AJ, Hoover DR: "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. Ann Intern Med. 1997; 126: 91-94.*
38. *Human placental growth factor (PlGF), julij 2011, www.labo.lu/nc/activities/overview-tests.html?tx...tx...306...*
39. *PlGF Quantikine® , julij 2011, <http://www.rndsystems.com/pdf/dpg00.pdf>*
40. *DRG PlGF ELISA EIA-4529, julij 2011, www.narootech.co.kr/download.php?table=bd_news&uid=45*

PRILOGA

1. Rezultati meritev PIGF 88 vzorcev z obema testoma

Zap. št.	Letnik	Quantikine (R&D) [ng/L]	DRG PIGF ELISA [ng/L]
1	1982	42,6	25,8
2	1976	31,7	35,7
3	1967	44,3	276,9
4	1980	37,3	117,2
5	1982	57,5	440,8
6	1979	16,0	19,4
7	1982	44,3	547,3
8	1977	28,1	31,4
9	1972	21,1	26,6
10	1983	28,8	77,0
11	1981	25,8	35,0
12	1974	51,4	33,4
13	1982	25,8	33,7
14	1980	35,6	223,2
15	1983	37,3	125,0
16	1979	22,9	19,9
17	1978	41,6	21,6
18	1981	57,2	65,9
19	1978	18,2	43,3
20	1981	25,8	66,7
21	1978	86,6	45,2
22	1979	33,7	45,0
23	1984	34,9	38,1
24	1979	19,2	734,4
25	1990	25,2	26,1
26	1984	44,3	855,7
27	1983	41,6	184,4
28	1981	25,8	519,4
29	1985	40,6	28,3
30	1978	24,2	15,4
31	1981	48,3	313,9
32	1972	27,1	27,1
33	1975	36,0	32,9
34	1982	33,0	56,4
35	1982	67,8	769,8
36	1980	32,0	29,3
37	1983	27,8	25,3
38	1981	33,7	30,3
39	1983	45,6	30,3
40	1980	41,6	941,4
41	1978	19,5	546,9
42	1984	21,7	17,5
43	1984	42,9	898,9
44	1982	29,1	21,9
45	1976	63,3	50,6
46	1983	22,0	18,0

Zap. št.	Letnik	Quantikine (R&D) [ng/L]	DRG PIGF ELISA [ng/L]
47	1982	56,8	65,0
48	1981	37,3	764,5
49	1978	52,1	540,4
50	1980	31,4	41,0
51	1979	28,7	38,1
52	1981	35,3	96,5
53	1976	30,4	32,6
54	1975	42,6	364,3
55	1978	28,8	14,9
56	1980	38,3	30,6
57	4977	25,8	79,3
58	1986	33,7	195,3
59	1983	9,4	26,8
60	1980	17,9	14,2
61	1979	30,0	17,5
62	1978	104,2	513,0
63	1981	32,0	30,6
64	1982	52,7	52,5
65	1983	24,6	179,0
66	1978	51,0	38,9
67	1986	20,1	39,4
68	1973	24,2	280,7
69	1979	23,9	27,1
70	1978	57,9	45,2
71	1971	38,3	31,9
72	1979	30,0	21,9
73	1982	26,2	646,9
74	1976	43,6	37,3
75	1974	41,3	31,9
76	1974	44,6	36,8
77	1967	60,6	113,8
78	1980	47,0	40,7
79	1983	30,7	18,9
80	1977	42,3	945,5
81	1976	29,1	28,3
82	1983	25,8	116
83	1978	18,2	59,4
84	1972	17,9	15,4
85	1980	68,5	28,3
86	1986	32,0	20,6
87	1979	40,3	150,9
88	1980	22,0	26,8

2. Rezultati meritev PIGF 527 vzorcev s testom Quantikine R&D

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
1	34,9	
2	51,1	
3	72,3	
4	87,0	
5	79,8	
6	58,3	
7	46,5	
8	57,4	
9	61,8	
10	39,0	
11	70,6	
12	76,6	
13	27,2	DA
14	63,6	
15	44,7	
16	88,8	
17	72,5	
18	55,4	
19	46,5	
20	38,4	
21	74,7	
22	38,6	
23	44,1	
24	53,7	
25	44,3	
26	87,8	
27	35,8	
28	42,9	
29	70,8	
30	55,6	
31	88,4	
32	23,3	
33	51,1	
34	76,2	
35	46,5	
36	58,7	
37	43,1	
38	20,4	
39	57,4	
40	27,2	
41	51,9	
42	37,4	
43	66,5	
44	35,4	
45	65,9	
46	26,2	
47	26,8	
48	63,0	
49	47,4	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
50	44,5	
51	63,6	
52	58,3	
53	53,7	
54	42,9	
55	49,4	
56	70,0	
57	82,1	
58	25,4	
59	60,1	
60	56,6	
61	57,4	
62	45,7	
63	41,4	
64	24,4	
65	60,1	
66	81,1	
67	205,1	
68	76,2	
69	91,9	
70	42,7	DA
71	61,7	
72	78,0	
73	45,3	
74	71,8	
75	60,3	
76	31,4	
77	68,9	
78	80,5	
79	59,5	
80	64,4	
81	70,0	
82	49,6	
83	60,7	
84	73,9	
85	48,2	
86	28,0	
87	42,3	
88	118,6	
89	41,6	
90	37,4	
91	61,1	
92	60,9	
93	51,0	
94	40,3	
95	39,0	
96	42,7	
97	28,3	
98	31,1	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
99	79,0	
100	72,3	
101	102,2	
102	81,7	
103	51,7	
104	54,1	
105	48,9	
106	41,8	
107	44,5	
108	67,0	
109	73,6	
110	99,9	
111	87,6	
112	51,2	
113	70,4	
114	60,2	
115	74,8	
116	118,6	
117	41,7	
118	41,6	
119	54,7	
120	55,8	
121	65,1	
122	33,8	
123	89,1	
124	69,8	
125	100,1	
126	61,7	
127	52,5	
128	72,9	
129	56,8	
130	82,2	
131	79,2	
132	186,5	
133	63,6	
134	103,3	
135	173,7	
136	118,4	
137	196,8	
138	67,2	
139	114,8	
140	135,5	
141	93,0	
142	61,1	
143	50,8	
144	117,9	
145	163,8	
146	102,9	
147	73,8	
148	128,5	
149	106,6	
150	101,4	
151	94,1	
152	79,0	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
153	93,7	
154	57,5	
155	60,0	
156	86,1	
157	69,8	
158	78,6	
159	104,7	
160	69,1	
161	67,7	
162	60,9	
163	69,8	
164	105,2	
165	116,7	
166	93,2	
167	109,3	
168	76,3	
169	74,4	
170	62,8	
171	85,1	
172	136,7	
173	76,5	
174	111,0	
175	124,7	
176	135,0	
177	70,8	
178	37,4	
179	61,1	
180	60,9	
181	51,0	
182	40,3	
183	39,0	
184	42,7	
185	28,3	
186	31,1	
187	79,0	
188	72,3	
189	102,2	
190	81,7	
191	51,7	
192	54,1	
193	48,9	
194	41,9	
195	44,5	
196	67,0	
197	73,6	
198	99,9	
199	87,6	
200	51,2	
201	70,4	
202	60,2	
203	74,8	
204	118,6	
205	41,6	
206	41,6	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
207	54,7	
208	55,8	
209	65,1	
210	33,8	
211	89,1	
212	69,8	
213	100,1	
214	61,7	
215	52,5	
216	72,9	
217	56,8	
218	82,2	
219	79,2	
220	186,5	
221	63,6	
222	103,3	
223	173,7	
224	118,4	
225	196,8	
226	67,2	
227	114,8	
228	135,5	
229	93,0	
230	61,1	
231	50,8	
232	163,8	
233	102,9	
234	73,8	
235	128,5	
236	106,6	
237	101,4	
238	94,1	
239	79,0	
240	93,7	
241	57,5	
242	60,0	
243	86,1	
244	69,8	
245	78,6	
246	104,7	
247	69,1	
248	67,7	
249	60,9	
250	69,8	
251	105,1	
252	116,7	
253	93,2	
254	109,3	
255	76,3	
256	74,4	
257	62,8	
258	85,1	
259	136,7	
260	76,5	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
261	111,0	
262	124,7	
263	135,0	
264	70,8	
265	42,6	
266	31,7	
267	44,3	
268	37,3	
269	57,5	
270	16,0	
271	44,3	
272	28,1	
273	21,1	
274	28,8	
275	25,8	
276	51,4	
277	25,8	
278	35,6	
279	37,3	
280	22,9	DA
281	41,6	
282	57,2	
283	18,2	
284	25,8	
285	86,6	
286	33,7	
287	34,9	
288	19,2	
289	25,2	
290	44,3	
291	41,6	
292	25,8	
293	40,6	
294	24,2	
295	48,3	
296	27,1	
297	36,0	
298	33,0	
299	67,8	
300	32,0	
301	27,8	
302	33,7	
303	45,6	
304	41,6	
305	19,5	
306	21,7	
307	42,9	
308	29,1	
309	63,3	
310	22,0	
311	56,8	
312	37,3	
313	52,1	
314	31,4	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
315	28,7	
316	35,3	
317	30,4	
318	42,6	
319	28,8	DA
320	38,3	
321	25,8	
322	33,7	
323	9,4	
324	17,9	
325	30,0	
326	104,2	
327	32,0	
328	52,7	
329	24,6	
330	51,0	
331	20,1	DA
332	24,2	
333	23,9	
334	57,9	
335	38,3	
336	30,0	
337	26,2	
338	43,6	
339	41,3	
340	44,6	
341	60,6	
342	47,0	
343	30,7	
344	42,3	
345	29,1	
346	25,8	
347	18,2	
348	17,9	
349	68,5	
350	32,0	
351	40,3	
352	22,0	
353	49,8	
354	40,5	
355	30,1	
356	39,7	
357	25,0	
358	26,1	
359	59,3	
360	43,0	
361	41,9	
362	55,0	
363	28,2	
364	34,4	
365	55,8	
366	30,6	
367	43,0	
368	39,4	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
369	55,2	
370	104,3	
371	40,2	
372	26,1	
373	29,3	
374	28,8	
375	21,7	
376	24,3	
377	32,0	
378	65,4	
379	26,1	
380	24,3	
381	24,0	
382	24,3	
383	24,8	
384	27,4	
385	24,8	
386	26,6	
387	13,0	
388	39,1	
389	101,7	
390	23,7	
391	44,4	
392	25,1	
393	23,0	
394	26,9	
395	24,0	
396	36,9	
397	48,4	
398	41,1	
399	29,6	
400	21,7	
401	10,2	DA
402	8,7	
403	29,6	
404	20,4	
405	16,2	
406	41,1	
407	15,9	
408	24,0	
409	18,6	
410	19,9	
411	20,9	
412	51,8	
413	46,4	
414	13,3	
415	12,8	DA
416	67,4	
417	17,2	
418	14,5	
419	27,2	
420	47,8	
421	18,6	
422	25,1	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
423	30,6	
424	41,6	
425	32,8	
426	4,9	
427	23,5	
428	32,8	
429	46,9	
430	25,9	
431	91,6	
432	23,0	
433	32,8	
434	34,2	
435	63,6	
436	50,4	
437	27,4	
438	22,7	
439	27,4	
440	29,9	
441	21,3	
442	74,5	
443	41,6	
444	28,9	
445	37,7	
446	36,6	
447	30,7	
448	54,2	
449	30,3	
450	42,4	
451	66,3	
452	34,9	
453	53,1	
454	38,0	
455	35,2	
456	43,8	
457	71,7	
458	50,1	
459	24,6	
460	43,5	
461	39,1	
462	37,3	
463	32,4	
464	32,8	
465	47,9	
466	39,5	
467	37,7	
468	27,3	
469	40,6	
470	53,1	
471	39,1	
472	45,7	
473	42,4	
474	66,3	
475	47,1	
476	35,6	

Zap. št.	Quantikine	Preeklampsija
477	24,9	
478	38,1	
479	53,4	
480	20,3	
481	26,2	
482	22,6	
483	57,9	
484	45,7	
485	37,7	
486	35,6	
487	20,9	
488	19,6	DA
489	38,8	
490	34,9	
491	33,8	
492	52,3	
493	42,4	
494	32,4	
495	78,4	
496	49,3	
497	27,9	
498	30,3	
499	162,0	
500	94,2	
501	16,8	
502	21,9	
503	35,9	
504	22,9	
505	64,8	
506	35,6	
507	34,5	
508	31,4	
509	38,8	
510	18,7	
511	33,1	
512	43,8	
513	39,5	
514	31,4	
515	34,9	
516	32,1	
517	32,4	
518	65,2	
519	25,6	
520	46,0	
521	53,8	
522	17,4	
523	28,3	
524	26,2	
525	24,0	
526	149,7	
527	102,9	