

Lek. Joanna Ksel-Hryciów

Ocena stężenia białka szoku termicznego HSP70 w odniesieniu do markera stanu zapalnego oraz czynników angiogennych w ciążach przebiegających z SGA, ciążach powikłanych wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrastania płodów z późnym początkiem oraz w ciążach z późnym stanem przedrzucawkowym.

Wstęp

Zahamowanie wzrastania płodu, określane mianem hipotrofii, podobnie jak stan przedrzucawkowy, są przedmiotem wieloletnich badań i obserwacji. Pomimo to nadal nie udało się jednoznacznie ustalić powodów powstawania powyższych jednostek chorobowych. Powstało wiele hipotez dotyczących wieloczynnikowej etiologii tych schorzeń, z których kluczową rolę w ich rozwoju ma dysfunkcja łożyska. Obecnie coraz częściej postuluje się o rozpatrywanie powikłań ciąży, takich jak PE i FGR w aspekcie wspólnej patogenezy i traktowanie ich, jako jednej grupy zaburzeń określanych wspólną nazwą zespołów łożyskowych. Preeclampsia podobnie jak FGR dzielona jest aktualnie na dwie kategorie zaburzeń w zależności od wieku ciążowego. Zdecydowana większość przypadków dotyczy późnych typów zaburzeń. Ze względu na późną manifestację objawów powyższych chorób niezwykle trudna wydaje się diagnostyka i postawienie jak najszybciej rozpoznania. Poznanie nowych biomarkerów związanych z niewydolnością jednostki maciczno-łożyskowej pozwoli w przyszłości na lepsze zrozumienie powyższych patologii ciąży, a opracowane wyniki badań przyczynią się do udoskonalenia diagnostyki PE i FGR, umożliwią wcześniejsze rozpoczęcie leczenia, będą zapobiegać występowaniu powikłań i zwiększą przeżywalność noworodków i matek.

1.2 Cel pracy

Celem rozprawy była ocena potencjalnej roli HSP70 oraz HsCRP w patogenezie zaburzeń należących do spektrum niewydolności łożyska oraz próba wykazania związku pomiędzy powyższymi białkami a markerami angiogenezy.

1.3 Materiał i metodyka

Materiał badawczy stanowiły 172 pacjentki hospitalizowane w Klinice Położnictwa i Ginekologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie w latach 2018-2022. Badaniem objęte zostały pacjentki po 34 tygodniu ciąży, u których w badaniu USG stwierdzono

przewidywaną niską masę urodzeniową płodu, oraz pacjentki z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego. Pacjentki te zostały podzielone na cztery grupy.

- pierwsza grupa - 39 kobiet z stwierdzonym u płodów SGA.
- druga grupa - 47 pacjentek z ciążą powikłaną FGR.
- trzecia grupa - 38 ciężarnych ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym.
- czwarta grupa - 48 zdrowych pacjentek o prawidłowym przebiegu ciąży, które stanowiły grupę kontrolną.

Badanie obejmowało następujące procedury: pobranie krwi żyłnej na surowicę od pacjentek, pobranie świeżej próbki moczu od pacjentek, pobranie krwi pępowinowej z żyły pępowinowej po porodzie oraz ocena ultrasonograficzna wewnątrzmacicznego stanu płodu.

Określenie stężeń biomarkerów (HsCRP oraz HSP70) zostało wykonane przy użyciu testów immunoenzymatycznych (ELISA). Pomiar stężenia białka szoku termicznego HSP70 wykonany został wysokoczułą ELISA (Abcam- nr. AB133061, Cambridge, Wielka Brytania). Stężenie białka C-reaktywnego także oznaczono metodą ELISA (Abcam- nr. AB260058, Cambridge, Wielka Brytania). Do ilościowego oznaczenia stężenia sFlt-1 wykorzystano test ECLIA sFlt-1 (Roche Diagnostics). Do ilościowego oznaczenia stężenia PlGF wykorzystano test ECLIA PlGF (Roche Diagnostics). Oznaczenia przeprowadzono metodą automatyczną za pomocą analizatora immunochemicznego Cobas 8000B (INFINITY). Do oceny jakościowej obecności białkomoczu jako jednego z kryteriów rozpoznania stanu przedrzucawkowego użyto aparatu Cobas u6500. Badanie ultrasonograficzne mające na celu określenie masy płodu i ocenę wzrastania płodu przeprowadzono, analizując parametry biometryczne oraz oceniając przepływy dopplerowskie przez tętnicę pępowinową, tętnicę środkową mózgu oraz tętnice maciczne.

1.4 Wyniki

W analizie statystycznej wykazano, że wartości stężeń badanych czynników wykazują korelację z obecnością patologii łożyska, która objawia się pod postacią zahamowania wzrastania płodu bądź stanu przedrzucawkowego. Mediana dla stężeń HsCRP w grupie kontrolnej wynosiła 1.44 mg/l i odpowiednio w grupie SGA, FGR i PE przyjmowała poziomy: 4.55 mg/l, 14.4 mg/l, 14.7 mg/l. Podobną zależność uzyskano dla wartości środkowych HSP70. W przypadku tego ocenianego białka mediana dla grupy kontrolnej, SGA, FGR i PE odpowiednio wynosiła: 0.44 ng/ml, 0.54 ng/ml, 0.63 ng/ml i 0.78ng/ml. Ponieważ uzyskane wartości analizowanych, potencjalnych markerów okazały się istotne statystycznie względem

grupy kontrolnej, przeprowadzono ocenę zdolności tych substancji w diagnozowaniu stanów patologicznych w przebiegu ciąży. Do tego celu zastosowano krzywe ROC. Wyznaczono wartości progowe badanych zmiennych, oraz wyliczono dla nich poziomy czułości i swoistości testowanych białek oraz indeksu sFlt-1/PlGF. Dla przyjętych wartości granicznych HsCRP w grupie pacjentek z SGA, FGR i PE uzyskano swoistość i czułość odpowiednio na poziomach: 68.75% i 94.87%, 93.75% i 97.87% oraz 85.41% i 100%. W przypadku drugiej analizowanej nowej metody diagnostycznej, czyli testu ELISA HSP70 ryzyko dla wystąpienia FGR, przy wartości progowej równej 0,497984 oszacowano odpowiednio poprzez wyliczenie czułości i swoistości na poziomie 100% i 95.83%. Podobnie postąpiono celem oceny zdolności testu HSP70 dla pojawienia się stanu przedrzucawkowego. W tej grupie pacjentek analogicznie uzyskano czułość i swoistość testu na poziomie 97.36% i 93.75%. Kolejnym etapem przeprowadzanego badania była analiza użyteczności indeksu sFlt-1/PlGF do potwierdzenia niewydolności łożyska, w późnych typach powikłań, oraz odniesienie wartości współczynnika do uzyskanych wyników stężeń dwóch analizowanych białek. Mediana wskaźnika w przypadku PE wynosiła 81,8. Wartości średnie dla tej zmiennej w grupie pacjentek z FGR i SGA wyniosły odpowiednio 62 i 18, natomiast w grupie kontrolnej mediana wskaźnika była równa 13,6. Podobnie jak w przypadku HsCRP oraz HSP70, tak i wartości wskaźnika wykazują tendencję wzrostową w charakterystycznej kolejności: grupa kontrolna, SGA, FGR, PE. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawiono istotne dodatnie korelacje pomiędzy stężeniami HsCRP, oraz indeksem sFlt-1/PlGF w grupie pacjentek z FGR, oraz pacjentek z PE. Współczynnik korelacji obydwu zmiennych u kobiet z zahamowaniem wzrastania płodu wynosił $r = 0,47$, co świadczy o umiarkowanej sile zależności, oraz $r = 0,83$ w grupie pacjentek z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym. Ponadto dodatnie korelacje stwierdzono także w grupie pacjentek ze stanem przedrzucawkowym pomiędzy HSP70 a indeksem sFlt-1/PlGF, oraz pomiędzy HsCRP a stężeniami HSP70. Odpowiednio współczynniki Spearmana w tej grupie kobiet dla analizowanych parametrów wynosiły odpowiednio $r = 0,4$ i $r = 0,38$. Uzyskane wyniki wskazują także na istotną ujemną korelację w całej badanej populacji, udowadniając jednocześnie, że wzrost wartości badanych białek i wskaźnika sFlt-1/PlGF ma wpływ na skrócenie trwania ciąży. Istotną korelację uzyskano również analizując grupę FGR. W tej populacji stwierdzono związek pomiędzy masą płodu a wartością białka HSP70 przy $p = 0,00252$ i $r = 0,37$.

1.5 Wnioski

Stężenia HsCRP we krwi matek były wyższe w ciążach powikłanych FGR i PE, co potwierdza udział procesów zapalnych w mechanizmie powstawania obydwu patologii. Wyższe stężenia białka HSP70 w krwi pępowinowej były związane z ciążami przebiegającymi z dysfunkcją łożyska, a uzyskane wyniki potwierdzają rolę stresu oksydacyjnego w ich etiopatogenezie. Otrzymane znaczące różnice w stężeniach białka HSP70 u pacjentek z płodami SGA oraz płodami FGR pozwalają uznać to białko za potencjalny marker przydatny w diagnostyce różnicowej. Wyższe wartości wskaźnika markerów angiogenezy łożyskowej sFlt-1/PIGF potwierdzają jego znaczącą rolę w rozpoznawaniu patologii ciąży związanych z niewydolnością łożyska. Oceniane w badaniu trzy parametry (HsCRP, HSP70, wskaźnik sFlt-1/PIGF) miały tendencję do występowania w coraz wyższych wartościach w kolejności kontrola, SGA, FGR, PE, co wskazuje na najsilniejszą korelację powyższych parametrów ze stanem przedrzucawkowym. Potwierdzone zależności mogą być podstawą do opracowania nowych metod profilaktyki i nowych algorytmów diagnostycznych w analizowanych w badaniu patologiach ciąży.