Streszczenie pracy doktorskiej lek. Małgorzaty Zembali-Szczerby

Promotor: prof. dr hab. Hubert Huras

Temat pracy doktorskiej: *„Rola wolnych krążących płodowych kwasów nukleinowych w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego w ciąży oraz stanu przedrzucawkowego i ich potencjał diagnostyczny”* – monografia

Nadciśnienie tętnicze w ciąży obejmuje grupę chorób, wśród których wyróżnia się odmienne zaburzenia kliniczne, w tym nadciśnienie przewlekłe, nadciśnienie indukowane ciążą, stan przedrzucawkowy i rzucawkę. Spektrum kliniczne tych zaburzeń jest szerokie, co wynika z różnej patofizjologii i przebiegu naturalnego, a tym samym odmiennych interwencji i prowadzonej terapii. Ocenia się, że to jedna z najczęściej towarzyszących ciąży chorób (5-10% ciąż) i jednocześnie stanowi podłoże około 14% wszystkich zgonów ciężarnych, będąc tym samym drugą przyczyną zgonów w ciąży. Choroba związana jest z podwyższonym ryzykiem powikłań wczesnych i odległych, zarówno matczynych, jak i płodowych. Ocenia się, że istnieje możliwość uniknięcia lub zmniejszenia ryzyka wystąpienia poważnych powikłań, dzięki zapewnieniu wczesnej diagnostyki oraz optymalizacji opieki nad kobietami z wykrytą chorobą.

Wśród czynników wysokiego ryzyka wymienia się nadciśnienie w poprzedniej ciąży, przewlekłą chorobę nerek, toczeń układowy, zespół antyfosfolipidowy, cukrzycę typu 1 lub 2, nadciśnienie tętnicze przewlekłe. Czynniki umiarkowanego ryzyka to ciąża u pierwiastki, wiek powyżej 40 roku życia, duży odstęp między ciążami (>10lat), BMI sprzed ciąży >35kg/m^2, stan przedrzucawkowy u matki pacjentki, ciąża wielopłodowa.

Nadciśnienie tętnicze w ciąży jest uważane za chorobę wieloczynnikową z dużą zmiennością fenotypową. U podłoża choroby leży złożona interakcja między czynnikami genetycznymi, immunologicznymi i środowiskowymi. Mimo dekad badań nad etiologią występowania nadciśnienia w ciąży, wciąż nie ma hipotezy, która jednoznacznie tłumaczyłaby występowanie choroby. Główną rolę w procesie wydaje się mieć łożysko, jako element stanowiący swoistą ścieżkę komunikacji między matką a płodem. W rozwoju ciąży o przebiegu fizjologicznym, jednym z najważniejszych etapów wydaje się być inwazja trofoblastu, która opiera się na swoistej równowadze między procesami angiogenezy i apoptozy, a jej zaburzenie może prowadzić do nieprawidłowej funkcji kosmówki, a później łożyska.

W obecnej dobie coraz większy nacisk kładzie się na określenie biologicznej roli krążących wolnych kwasów nukleinowych (cfNAs). Wydają się być wartościowym i obiecującym markerem wielu chorób, także o podłożu genetycznym. Stosunkowo niedawno wykazano, że zwiększenie poziomu krążącej płodowej frakcji cff-DNA można powiązać we krwi matki z powikłaniami ciąży, w tym jej wczesną utratą, stanem przedrzucawkowym, ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu oraz w zagrażającym porodzie

przedwczesnym. Doniesienia te stały się przyczynkiem do prób wykorzystania stężeń cff-DNA jako biomarkera powikłań ciąży.

Toczący się proces zapalny, występujący zarówno u matki, jak i u płodu ma udowodniony niekorzystny wpływ na przebieg ciąży, stanowiąc przyczynę występowania powikłań ciążowych i gorszych wyników okołoperinatalnych. Obecnie postuluje się hipotezę o prozapalnej roli cząsteczki wolnego DNA płodowego. Określono dwie prawdopodobne ścieżki, za pośrednictwem których cząsteczka DNA może mediować występowanie stanu zapalnego, w tym poprzez receptor toll-podobny (TLR) oraz poprzez aktywację białka stymulującego geny interferonu (STING). Wnioskuje się, że wolne DNA płodowe może być nie tylko efektem nieprawidłowych procesów zachodzących w obrębie łożyska, ale samo w sobie może nasilać proces zapalny, podtrzymując kaskadę niekorzystnych zmian. Niemniej jednak w dalszym ciągu dokładny patomechanizm tego zjawiska pozostaje nieznany.

Jak dotąd, nie opublikowano wystandaryzowanych oznaczeń ilościowych i wartości referencyjnych dla wolnego DNA płodowego dla populacji chorych z nadciśnieniem tętniczym w przebiegu ciąży. Nie ustalono także jednoznacznie roli wolnego DNA płodu w predykcji zarówno wczesnej, jak i późnej postaci stanu przedrzucawkowego. Dotychczasowe badania dają sprzeczne wyniki.

Głównym celem niniejszej pracy jest ustalenie roli wolnego DNA płodowego w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego i stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych, a także określenie czy podwyższony poziom wolnego DNA płodowego w ciążach powikłanych jest wynikiem pojawienia się tej patologii czy też leży u jej podstaw. Aby zweryfikować hipotezy badawcze, wykonano pomiary w próbkach krwi pobranych od pacjentek z rozpoznanym nadciśnieniem tętniczym w ciąży i porównaniu wartości z próbkami pozyskanymi od ciężarnych bez powikłań. Z zabezpieczonego materiału biologicznego wyizolowano krążące wolne kwasy nukleinowe, a następnie poddano je analizie ilościowej. Ponadto oznaczono aktywność DNAazy w obu grupach, a na końcowym etapie przeanalizowano zależności obserwowanych zmian na poziomie molekularnym z nasileniem objawów choroby. Badaniem zostały objęte pacjentki ciężarne, hospitalizowane Klinice Położnictwa i Perinatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2017-2020. Do grupy zostały włączone 121 pacjentki, w tym 43 pacjentki do grupy badanej i 78 pacjentek do grupy kontrolnej.

W niniejszym badaniu wykazano zróżnicowanie poziomu cfDNA i frakcji płodowej w grupach badanej i kontrolnej oraz dodatnią korelację z wystąpieniem powikłań ciążowych. Stwierdzono średnio wyższe wartości poziomu cfDNA w grupie pacjentek, u których stwierdzono wystąpienie stanu przedrzucawkowego w porównaniu do grupy pacjentek z

izolowanym nadciśnieniem tętniczym, a zależność ta była silniejsza w grupie pacjentek z nadciśnieniem ciążowym niż przewlekłym. Wykazano istotnie wyższe wartości poziomu cfDNA w grupie pacjentek ze stanem przedrzucawkowym o wczesnym niż o późnym początku. Stwierdzono ujemną korelację poziomu cfDNA z aktywnością DNAzy.

Przedstawione badanie stanowi punkt wyjścia do opracowania dodatkowych markerów wykorzystywanych w diagnostyce nadciśnienia tętniczego w przebiegu ciąży, a z drugiej strony potencjalnie otwiera nowe możliwości leczenia tej choroby.

Summary

Hypertension in pregnancy is a group of disorders, including chronic hypertension, pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and eclampsia. The clinical spectrum of these disorders is broad due to the different pathophysiology and natural course, and thus different interventions and therapy provided. It is estimated to be one of the most common pregnancy-associated disorders (5-10% of pregnancies) and also underlies about 14% of all maternal deaths, thus being the second cause of death in pregnancy. The disease is associated with an increased risk of early and distant complications, both maternal and fetal. It is estimated that it is possible to avoid or reduce the risk of serious complications by ensuring early diagnosis and optimizing care for women with detected disease.

High risk factors include hypertension in a previous pregnancy, chronic kidney disease, systemic lupus, antiphospholipid syndrome, type 1 or 2 diabetes mellitus, and chronic hypertension. Moderate risk factors include pregnancy by a primiparous woman, age over 40 years, long interval between pregnancies (>10 years), pre-pregnancy BMI >35kg/m2, preeclampsia in the patient's mother, multiple gestation.

Hypertension in pregnancy is considered as a multifactorial disease with high phenotypic variability. A complex interaction between genetic, immunologic, and environmental factors underlies the disease. Despite decades of research on the etiology of hypertension in pregnancy, there is still no hypothesis that uniquely explains the occurrence of the disease. The main role in the process seems to be played by the placenta, as a specific pathway of communication between mother and fetus. In the development of a physiological pregnancy, one of the most important stages seems to be trophoblast invasion, which is based on a specific balance between the processes of angiogenesis and apoptosis. Its disruption may lead to abnormal function of the chorion and later the placenta.

In the current era, increasing emphasis is being placed on determining the biological role of circulating free nucleic acids (cfNAs). They appear to be a valuable and promising marker for many diseases, including those of genetic origin. It has been shown relatively recently that increased levels of circulating fetal cff-DNA fraction can be associated in maternal blood with complications of pregnancy, including early pregnancy loss, preeclampsia, reduced intrauterine growth of the fetus and in preterm delivery. These reports have given rise to attempts to use cff-DNA concentrations as a biomarker of pregnancy complications.

The ongoing inflammatory process in both the mother and the fetus has a proven adverse effect on the course of pregnancy, being the cause of pregnancy complications and worse perinatal outcomes. A pro-inflammatory role for the free fetal DNA molecule is now postulated.

Two likely pathways through which the DNA molecule may mediate the process of inflammation have been identified, including through toll-like receptor (TLR) and through the activation of interferon stimulating gene (STING) protein. It is concluded that free fetal DNA may not only be a result of abnormal processes occurring within the placenta, but may itself exacerbate the inflammatory process by sustaining a cascade of adverse changes. However, the exact pathomechanism of this phenomenon still remains unknown.

To date, no standardized quantification and reference values for free fetal DNA have been published for the population of patients with hypertension in pregnancy. The role of free fetal DNA in predicting both early and late forms of preeclampsia has also not been clearly established. Studies to date have reported conflicting results.

The main objective of this study is to determine the role of free fetal DNA in the etiopathogenesis of hypertension and preeclampsia in pregnant women, and to determine whether elevated levels of free fetal DNA in complicated pregnancies are a result of the onset of this pathology or underlie it. To verify the research hypotheses, measurements were made in blood samples collected from patients diagnosed with hypertension in pregnancy and the values compared with samples obtained from pregnant women without complications. Circulating free nucleic acids were isolated from the preserved biological material and then subjected to quantitative analysis. In addition, DNAase activity was determined in both groups, and at the final stage the relationship of the observed changes at the molecular level with the severity of the disease symptoms was analyzed. The study included pregnant patients hospitalized in the Department of Obstetrics and Perinatology of the University Hospital in Krakow in 2017-2020. 121 patients were included, 43 patients in the study group and 78 patients in the control group.

The present study showed differential cfDNA and cffDNA levels in the study and control groups and a positive correlation with the occurrence of pregnancy complications. On average, cffDNA levels were found to be higher in the group of patients who developed preeclampsia compared to the group of patients with isolated hypertension, and this correlation was stronger in the group of patients with gestational hypertension than chronic hypertension. Significantly higher cffDNA levels were found in the group of patients with early onset preeclampsia than in the group with late onset preeclampsia. There was a negative correlation of cffDNA level with DNAase activity.

This study provides a starting point for the development of additional markers used in the diagnosis of hypertension in pregnancy and, on the other hand, potentially opens possibilities for the novel treatment options of the disease.