

lek. Aleksandra Saletra-Bielińska

Biomarkery w predykcji powikłań perinatalnych w ciąży bliźniaczej

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska, prof. CMKP

I Klinika Położnictwa i Ginekologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021 r.

Katarzyna Kosińska-Kaczyńska¹

Słowa kluczowe: ciąża bliźniacza; poród przedwczesny; ciążowe białko osoczowe A; elafina; wydzielniczy inhibitor proteinazy leukocytarnej; wyniki perinatalne; wewnątrzmaciczne obumarcie płodu;

Keywords: twin pregnancy; preterm delivery; pregnancy associated plasma protein; elafin; secretory leukocyte peptidase inhibitor; perinatal outcome; intrauterine fetal demise

Podziękowania

Ogromnie dziękuję Pani Promotor, **Profesor Katarzynie Kosińskiej-Kaczyńskiej** za uznanie mnie za przypadek rokujący, za pomoc przy powstawaniu każdego etapu niniejszej pracy, zrozumienie, akceptację moich niedoskonałości, nieustające wsparcie, inspirację oraz cierpliwość. Dziękuję za zaszczepienie we mnie miłości do perinatologii. Bardzo dziękuję Pani **Docent Iwonię Szymusik** – opiekunowi Studiów Doktoranckich – za wprowadzenie do tajników położnictwa i ginekologii, przyjaźń, bycie moim 'kołem ratunkowym' od początku drogi zawodowej. Dziękuję Panu **Profesorowi Mirosławowi Wielgosiowi** – Kierownikowi I Katedry i Kliniki Położnictwa i Ginekologii WUM - za przyjęcie mnie do Zespołu, możliwość uczenia się od najlepszych. **Mamo, Tato**, dziękuję Wam za wsparcie na każdym etapie mojego życia, stworzenie możliwości do realizacji marzeń oraz niekończące się pokłady wiary we mnie. „Spojrzenie z różnych perspektyw uczy dojrzałości życiowej” **Adrianie**, dziękuję za możliwość patrzenia na świat z innej perspektywy.

Nataniel, Tobie dedykuję tę pracę, żebyś wiedział, że warto być sobą i robić to co jest dla Ciebie ważne.

Rozprawę doktorską stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach ujętych w wykazie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

1. Saletra-Bielińska A, Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, Kaczyński B, Brawura-Biskupski-Samaha R, Kozłowski S, Jarmużek P, Walasik I, Wielgoś M. **Both Low and High PAPP-A Concentrations in the First Trimester of Pregnancy Are Associated with Increased Risk of Delivery before 32 Weeks in Twin Gestation.** J Clin Med. 2020 Jul 3;9(7):2099. doi: 10.3390/jcm9072099. PMID: 32635314; PMCID: PMC7408854. Impact factor 4.241; punktacja MNiSW 140
2. Saletra-Bielińska A, Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, Niderla-Bielińska J, Malejczyk J, Wielgoś M. **Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study.** JMS [Internet]. 2021;90(1):e490. punktacja MNiSW 20

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	6
2. Streszczenie w języku polskim.....	7
3. Streszczenie w języku angielskim	9
4. Wstęp.....	11
5. Założenia i cel pracy.....	15
6. Kopie opublikowanych prac.....	16
7. Podsumowanie i wnioski.....	31
8. Bibliografia	35
9. Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej.....	38
10. Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji określające indywidualny wkład (udział merytoryczny i procentowy) każdego z nich w ich powstanie.	40

1. Wykaz stosowanych skrótów

Skrót	Pełna nazwa w języku angielskim	Pełna nazwa w języku polskim
CI	confidence interval	przedział ufności
HCG	human chorionic gonadotropin	gonadotropina kosmówkowa
IL-8	interleukin-8	interleukina 8
LR-	negative likelihood ratio	iloraz wiarygodności wyniku ujemnego
LR+	positive likelihood ratio	iloraz wiarygodności wyniku dodatniego
MoM	multiples of median	wielokrotności mediany
mRNA	messenger ribonucleic acid	matrycowy kwas rybonukleinowy
OR	odds ratio	iloraz szans
PAMG-1	placental alpha microglobulin-1	łożyskowa alfa-mikroglobulina -1
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein A	ciężowe białko osoczowe A
phIGFBP-1	phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1	fosforylowane białko łączące typu 1 insulinopodobnego czynnika wzrostu
RR	relative risk	ryzyko względne
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	wydzielniczy inhibitor proteiny leukocytarnej
USA	United States of America	Stany Zjednoczone Ameryki

2. Streszczenie w języku polskim

Ciąże wielopłodowe niosą ze sobą wysokie ryzyko występowania poważnych powikłań ciąży. Najczęstszym z nich jest poród przedwczesny. Według danych z piśmiennictwa odsetek porodów przedwczesnych w ciążach bliźniaczych sięga około 60%. W związku z tym jednym z najważniejszych celów perinatologii jest obniżenie odsetka porodów przedwczesnych oraz opracowanie skutecznych metod jego predykcji w populacji ciąż wielopłodowych.

Celem dysertacji była ocena trzech biomarkerów: ciążowego białka osocznego A, elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej w predykcji powikłań perinatalnych w ciąży bliźniaczej.

Hipotezy badawcze:

- ryzyko powikłań ciąży bliźniaczej jest zależne od stężenia ciążowego białka osocznego A w pierwszym trymestrze ciąży;
- niskie (poniżej 10. percentyla dla danego wieku ciążowego), jak i wysokie stężenie ciążowego białka osocznego A (powyżej 90. percentyla dla danego wieku ciążowego) jest czynnikiem predykcyjnym powikłań ciąży, takich jak poród przedwczesny, przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego, niewydolność szyjki macicy, cukrzyca ciążowa, nadciśnienie ciążowe, stan przedrzucawkowy, zgon wewnątrzmaciczny płodu, niska masa urodzeniowa noworodka czy dysproporcja wzrastania płodów w ciąży bliźniaczej;
- obecność elafiny lub SLPI w wydzielinie szyjkowo-pochwowej bezobjawowych kobiet pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży bliźniaczej jest czynnikiem predykcyjnym porodu przedwczesnego przed 37. lub przed 34. tygodniem ciąży.

Dysertację stanowią dwie prace oryginalne. W pracy zatytułowanej „**Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study**” przedstawiono skuteczność oceny obecności elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej w wydzielinie szyjkowo-pochwowej w predykcji porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. W próbkach wydzieliny, pobranych pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży u bezobjawowych pacjentek w ciążach bliźniaczych, oznaczono mRNA elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej. Ekspresja elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej nie korelowała z czasem trwania ciąży, występowaniem porodu przedwczesnego przed 37. lub 34. tygodniem, występowaniem samoistnego porodu przedwczesnego, ani długością kanału szyjki macicy, ocenioną w badaniu ultrasonograficznym. Oba biomarkery charakteryzowały się niską czułością (54,6 vs. 60,6%), swoistością (50%), niskim ilorazem wiarygodności wyniku dodatniego (1,09 vs. 1,21) i wysokim ilorazem wiarygodności wyniku ujemnego (0,91 vs. 0,79).

W pracy zatytułowanej „**Both low and high PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy are associated with increased risk of delivery before 32 weeks in twin gestation**” przeprowadzono retrospektywną analizę danych 304 kobiet w ciążach bliźniaczych, u których oznaczono stężenie ciążowego białka osocznego A w osoczu pomiędzy 11+0 a 13+6

tygodniem ciąży. Zaobserwowano, zarówno stężenie ciążowego białka osocznego A poniżej 10. percentyla, jak i powyżej 90. percentyla dla danego wieku ciążowego wiązało się z podwyższonym ryzykiem ukończenia ciąży przed 34. tygodniem (RR 2,25; 95% CI 1,1–4,6; RR 3,46; 95% CI 1,6–7,5) i przed 32. tygodniem ciąży (RR 2,72; 95% CI 1,3–5,5; RR 2,48; 95% CI 1,1–5,3). U pacjentek z niskim stężeniem ciążowego białka osocznego A istotnie częściej występowała samoistna czynność skurczowa macicy, skutkująca porodem (RR 2,05; 95% CI 1–4,2) oraz cukrzyca ciążowa (RR 3,5; 95% CI 1,7–6,9), natomiast wysokie stężenie ciążowego białka osocznego A współwystępowało z niemal dziewięciokrotnie wyższym ryzykiem obumarcia wewnątrzmacicznego płodu (RR 8,9; 95% CI 3,1–11,5). Przeprowadzono analizę uogólnionego modelowania addytywnego, wizualizując go w postaci funkcji sklepanych. W przypadku porodu przed 34. i przed 32. tygodniem ciąży zaobserwowano podwójną zmienną U-kształtną relację – zarówno liniową, jak i nieliniową, pomiędzy ryzykiem porodu i stężeniem ciążowego białka osocznego A.

Wnioski:

1. Ekspresja elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej nie koreluje z ryzykiem porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej.
2. Elafina i wydzielniczy inhibitor proteiny leukocytarnej nie są skutecznymi czynnikami predykcyjnymi porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej.
3. Ryzyko powikłań ciąży bliźniaczej jest zależne od stężenia białka PAPP-A w osoczu kobiet w ciąży bliźniaczej pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży.
4. Zależność pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a powikłaniami ciąży wykazuje inne niż liniowe relacje.
5. Istotne jest poszukiwanie skutecznego czynnika predykcyjnego powikłań ciąży bliźniaczej, biorąc pod uwagę możliwe liniowe i nieliniowe zależności pomiędzy biomarkerem a analizowanymi powikłaniami.
6. Oznaczenie stężenia białka PAPP-A jest stosowane w rutynowej diagnostyce aneuploidii w pierwszym trymestrze ciąży, wydaje się więc, że mógłby to być efektywny biomarker predykcyjny porodu przedwczesnego oraz wewnątrzmacicznego obumarcia płodu stosowany w praktyce klinicznej.

3. Streszczenie w języku angielskim

Biomarkers in the prediction of perinatal complications in twin gestation.

Multifetal gestations carry a high risk of developing serious pregnancy complications with the most common one being premature delivery. According to the literature, the percentage of premature deliveries reaches about 60% in twin gestations. Therefore, the reduction of the percentage of premature deliveries and development of the effective methods of their prediction in the population of multifetal pregnancies is one of the most important aims of perinatology.

The dissertation aimed at the assessment of three biomarkers: pregnancy-associated plasma protein A, elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor in the prediction of perinatal complications in twin pregnancy.

Research hypotheses:

- the risk of twin pregnancy complications depends on the concentrations of pregnancy-associated plasma protein A in the first trimester of pregnancy;
- low (below the 10th percentile for gestational age) and high (above the 90th percentile for gestational age) concentrations of pregnancy-associated plasma protein A are the predictive factors of pregnancy complications, such as premature delivery, preterm premature rupture of membranes, cervical insufficiency, gestational diabetes, gestational hypertension, preeclampsia, intrauterine fetal demise, low birth weight of a newborn, or intertwin birth weight discordance;
- the presence of elafin or SLPI in the cervicovaginal fluid of asymptomatic women between 20 and 24 weeks of twin gestation is a predictive factor of premature delivery before 37 or 34 weeks of gestation.

The dissertation includes two original papers. The paper entitled „**Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study**” presented the effectiveness of the assessment of the presence of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor in the cervicovaginal fluid in the prediction of premature delivery in twin gestations. The mRNA of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor was measured in the samples of the fluid collected between 20 and 24 weeks of gestation in asymptomatic patients with twin pregnancies. The expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor did not correlate with the duration of gestation, the occurrence of premature delivery before 37 or 34 weeks of gestation, the occurrence of spontaneous premature delivery, or sonographically assessed length of the cervical canal. Both biomarkers were characterized by low sensitivity (54.6 vs. 60.6%), specificity (50%), low positive likelihood ratio (1.09 vs. 1.21) and high negative likelihood ratio (0.91 vs. 0.79).

The paper entitled „**Both low and high PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy are associated with increased risk of delivery before 32 weeks in twin gestation**” presented the retrospective analysis of data obtained from 304 women with twin gestations

in whom the concentration of pregnancy-associated plasma protein A was measured between 11+0 and 13+6 gestational weeks. It was observed that both the concentration of pregnancy-associated plasma protein A below the 10th percentile and above the 90th percentile for gestational age were associated with an increased risk of delivery below 34 weeks (RR 2.25; 95% CI 1.1–4.6; RR 3.46; 95% CI 1.6–7.5) and below 32 gestational weeks (RR 2.72; 95% CI 1.3–5.5; RR 2.48; 95% CI 1.1–5.3). Spontaneous uterine contractions resulting in a delivery (RR 2.05; 95% CI 1–4.2) and gestational diabetes (RR 3.5; 95% CI 1.7–6.9) occurred significantly more commonly in patients with low concentrations of pregnancy-associated plasma protein A, while its high concentrations were associated with almost 10-fold higher risk of intrauterine fetal demise (RR 8.9; 95% CI 3.1–11.5). The analysis was performed with generalized additive models visualized with the use of splines. In case of delivery before 34 and 32 weeks of gestation a double significant U-shaped correlation, both linear and non-linear, was observed between the risk of delivery and the concentration of pregnancy-associated plasma protein A.

Conclusions:

1. The expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not correlate with the risk of premature delivery in twin gestations.
2. Elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor are not effective predictive factors of premature delivery in twin gestations.
3. The risk of twin pregnancy complications depends on the plasma concentrations of PAPP-A in women with twin gestations between 11 and 13+6 gestational weeks.
4. The correlation between the concentrations of PAPP-A protein and pregnancy complications is non-linear.
5. It is important to search for an effective predictive factor of twin gestation complications considering possible linear and non-linear correlations between the biomarker and the analyzed complications.
6. The measurement of PAPP-A concentrations is used in routine diagnostics of aneuploidy in the first trimester of pregnancy. Therefore, it seems to be a potentially effective biomarker to predict premature delivery and intrauterine fetal demise used in clinical practice.

4. Wstęp

Od kilkudziesięciu lat w Polsce, a także na świecie, obserwuje się wzrost liczby ciąż wielopłodowych. W Stanach Zjednoczonych Ameryki (USA) liczba porodów wielopłodowych zwiększyła się o 70% od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku [1]. W 2019 roku w USA odsetek porodów wielopłodowych wyniósł 33 na 1000 żywych urodzeń [2]. W Polsce w 2020 roku rodziło się 8947 bliźniąt oraz 165 trojaczków, co stanowi 2,56% wszystkich urodzeń [3].

Ciąże wielopłodowe niosą ze sobą wysokie ryzyko występowania poważnych powikłań ciąży [4, 5]. Najczęstszym z nich pozostaje poród przedwczesny. Według danych z piśmiennictwa odsetek porodów przedwczesnych w ciążach bliźniaczych sięga około 60% [6, 7]. W badaniu Preterm Prediction Study 54,4% bliźniąt urodziło się przed 37. tygodniem, natomiast 8,8% przed 32. tygodniem ciąży [8]. W USA 57% bliźniąt rodzi się przedwcześnie [9]. Według danych jedynego wieloośrodkowego badania przeprowadzonego w Polsce, 66,5% wszystkich kobiet w ciążach bliźniaczych rodzi przed 37. tygodniem [10]. Najistotniejsze pod względem długoterminowych konsekwencji zdrowotnych wcześniactwa są jednak porody przed ukończonym 32. tygodniem. W populacji ciąż bliźniaczych dotyczą one 11,2%. 4,1% bliźniąt rodzi się przed 28. tygodniem [10]. Zaobserwowano także zależność pomiędzy ryzykiem porodu przedwczesnego a kosmówkowością ciąży. Według danych prezentowanych przez Burgess i współ. 60% bliźniąt z ciąż dwukosmówkowych i 65% z ciąż jednokosmówkowych rodzi się przedwcześnie [11]. Także w Polskich danych odnotowano analogiczną zależność. Bliźnięta jednokosmówkowe rodziły się istotnie częściej przed ukończeniem 37. tygodnia ciąży niż dwukosmówkowe (78% vs. 62,9%; $p=0,004$). Szczególnie duża różnica została zaobserwowana w przypadku porodu przed 32. tygodniem – 22,9% ciąż jednokosmówkowych i 7,6% ciąż dwukosmówkowych ($p<0,001$) [10]. Powyższe dane podkreślają, jak wielkim problemem jest poród przedwczesny w grupie ciąż bliźniaczych.

Podkreślić należy także różnice w ilości obserwowanych powikłań wśród noworodków urodzonych z ciąż pojedynczych i bliźniaczych, w tym urodzonych przedwcześnie. Odmienność fizjologii wzrastania wewnątrzmacicznego bliźniąt wiąże się z osiąganiem przez nie mniejszej masy urodzeniowej. Po 30. – 32. tygodniu ciąży dochodzi do swoistego ograniczenia wzrastania płodów w ciąży bliźniaczej [12]. W związku z tym nie tylko częściej rodzą się one przedwcześnie, ale również z niższą masą urodzeniową. Według Ribicic i współ. bliźnięta urodzone w 34. tygodniu ciąży są średnio o 200 g mniejsze niż noworodki z ciąż pojedynczych [13]. Według piśmiennictwa także częstość występowania powikłań wśród noworodków urodzonych przedwcześnie z ciąż bliźniaczych jest wyższa niż wśród noworodków z ciąż pojedynczych, zwłaszcza w przypadku porodów skrajnie przedwczesnych. Według Papiernik i współ. bliźnięta urodzone przed 28. tygodniem ciąży mają znacznie wyższe ryzyko wylewów do ośrodkowego układu nerwowego (iloraz szans (OR) 1,5, 95% przedział ufności (CI) 1,0–2,1) oraz wyższą śmiertelność okołoporodową (OR 1,5, 95% CI 1,1–2,2) niż noworodki z ciąż pojedynczych [14].

Ciąża bliźniacza niesie za sobą także wyższe ryzyko innych powikłań, takich jak nadciśnienie ciążowe, stan przedrzucawkowy, cukrzyca ciążowa czy wewnątrzmacicowa

cholestaza ciężarnych. Ryzyko wystąpienia nadciśnienia w ciąży jest dwukrotnie wyższe w ciąży bliźniaczej niż pojedynczej (ryzyko względne (RR) 2,04, 95% CI 1,6-2,59) [15], a stanu przedrzucawkowego niemal trzykrotnie wyższe (RR 2,93, 95% CI 2,04-4,21) [16]. Ryzyko rozwoju cukrzycy ciążowej jest około dwukrotnie wyższe w ciąży bliźniaczej (OR 2,2, 95% CI 1,4-3,6) [17], a wystąpienia wewnątrzwątrobowej cholestazy ciężarnych około 5-krotnie wyższe (20.9% vs. 4.7%, $p < 0.001$) [18]. Powyższe komplikacje niosą ze sobą również wyższe ryzyko konieczności wcześniejszego ukończenia ciąży i porodu przedwczesnego.

W związku z tym jednym z najważniejszych celów współczesnej perinatologii jest obniżenie odsetka porodów przedwczesnych oraz opracowanie skutecznych metod jego predykcji, również w populacji ciąż wielopłodowych. Identyfikacja pacjentek z grupy wysokiego ryzyka porodu przedwczesnego mogłaby pozwolić na wdrożenie u nich metod profilaktyki i ograniczenie powikłań noworodków związanych z wcześniactwem. W piśmiennictwie światowym istnieje szereg publikacji, w których poddano analizie skuteczność poszczególnych czynników biofizycznych i biochemicznych w predykcji porodu przedwczesnego. Odrębnej analizie poddano markery w grupie kobiet z objawami zagrażającego porodu przedwczesnego i bezobjawowych, w pierwszym, drugim i trzecim trymestrze ciąży.

Analizowane czynniki predykcyjne można podzielić na biofizyczne i biochemiczne. Spośród czynników biofizycznych najistotniejszym jest ultrasonograficzny pomiar długości szyjki macicy. W 2010 roku opublikowano wyniki metaanalizy 21 badań, dotyczących skuteczności pojedynczego pomiaru długości kanału szyjki macicy w predykcji porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. Długość kanału szyjki ≤ 20 mm pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży charakteryzowała się 29% czułością i 97% swoistością w predykcji porodu przed 34. tygodniem. Iloraz wiarygodności wyniku dodatniego (LR+) wyniósł 9,0, a ujemnego (LR-) 0,7 [19]. Analizowano także skuteczność wykonywania seryjnych pomiarów długości szyjki. Metoda ta charakteryzowała się czułością rzędu 15 - 75% i swoistością 70 - 90% [20, 21]. W powyższych badaniach nie wykazano, by wykonywanie seryjnych pomiarów długości szyjki macicy wiązało się z większą skutecznością predykcji porodu przedwczesnego. W ciąży bliźniaczej nie jest to więc użyteczny marker predykcyjny porodu przedwczesnego.

W piśmiennictwie światowym opublikowano szereg badań, w których oceniano skuteczność wielu czynników biochemicznych, analogicznych do używanych w predykcji porodu przedwczesnego w ciążach pojedynczych. W praktyce klinicznej w ciąży pojedynczej, do oszacowania ryzyka porodu można zastosować test na obecność w wydzielinie szyjkowo-pochwowej fibronektyny płodowej, fosforylowanego białka łączącego typu 1 insulinopodobnego czynnika wzrostu (pHIGFBP-1) lub łożyskowej alfa-mikroglobuliny-1 (PAMG-1). Użyteczność powyższych biomarkerów została poddana analizie w populacji kobiet w ciążach bliźniaczych. Według metaanalizy autorstwa Conde-Agudelo i współ. stwierdzenie obecności fibronektyny płodowej w wydzielinie szyjkowo-pochwowej charakteryzowało się 33 - 39% czułością i 80 - 94% swoistością w predykcji porodu przed 34. tygodniem ciąży [22, 23]. LR+ wyniósł zaledwie 2,0, a LR- 0,8 [19]. Podobnie plasowała się skuteczność wykorzystania pozostałych cząsteczek. Obecność IGFBP-1 w wydzielinie szyjkowo-pochwowej

charakteryzowała się niską czułością (5 - 36%) w predykcji porodu przed 34. tygodniem w ciąży bliźniaczej (swoistość 89 - 96%, LR+ 2,3, LR- 0,9) [19, 24]. Barinov i współ. ocenili efektywność IGFBP-1 i PAMG-1 w predykcji porodu w ciągu 14 dni od wykonania testu u pacjentek z objawami zagrażającego porodu przedwczesnego. Oba biomarkery charakteryzowały się niską czułością (33,3%) oraz zbliżoną swoistością (93,3% vs. 96%) [25]. Żaden nie okazał się być skutecznym w populacji ciąż bliźniaczych. Przeprowadzono również analizę efektywności zastosowania biomarkerów aneuploidii w predykcji porodu przedwczesnego. Stężenie wolnej podjednostki β gonadotropiny kosmówkowej (HCG) powyżej 75. lub 90. percentyla w 11+0 – 13+6 tygodniu ciąży okazało się mieć niską wartość w predykcji porodu przed 32., 34. czy 37. tygodniem ciąży (czułość 7 - 24%, swoistość 75 - 97%, LR+ 0,9-1,2, LR- 1,0) [19]. Także niskie stężenie ciążowego białka osocznego A (PAPP-A) charakteryzowało się niską wartością przewidywania wystąpienia porodu przedwczesnego (czułość 5 - 56%, swoistość 78 - 95%, LR+ 1 - 2,9, LR- 0,6 - 1) [19].

Jednym z kluczowych czynników etiologicznych porodu przedwczesnego w ciąży pojedynczej jest infekcja wewnątrzmaciczna [26]. Wykazano, iż stężenie interleukin i chemokin w osoczu, wydzielinie szyjkowo-pochwowej i płynie owodniowym może być skutecznym czynnikiem predykcji porodu przedwczesnego w ciąży pojedynczej [27]. Rode i współ. przeprowadzili analizę 24 markerów stanu zapalnego we krwi ciężarnych pomiędzy 18. a 24. tygodniem ciąży bliźniaczej i wykryli istotną korelację jedynie pomiędzy stężeniem interleukiny 8 (IL-8) a wystąpieniem porodu przed 34. tygodniem ciąży [28]. IL-8 jako czynnik predykcyjny porodu przedwczesnego charakteryzowała się niskim LR+ (1,5) i LR- (0,5) [19].

Idealny test predykcyjny powinien charakteryzować się szeregiem cech: powinien być prosty i szybki w wykonaniu, tani, nieinwazyjny i powtarzalny. Powinien mieć wysoki LR+ i niski LR-. Spośród powyższych biomarkerów biochemicznych żaden nie okazał się być czułym i skutecznym czynnikiem prognostycznym porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. Pomiar długości kanału szyjki macicy charakteryzuje się częścią wymaganych cech i może być stosowany w predykcji porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. W związku z tym nadal istnieje potrzeba poszukiwania cząsteczki, która mogłaby wypełnić lukę w diagnostyce i predykcji porodu przedwczesnego w ciążach wielopłodowych. Poszukiwania te można kierunkować dwutorowo: testując kolejne nowe biomarkery lub zmieniając klasyczne podejście do badania ich obecności w wymiarze dichotomicznym (wynik testu dodatni/ujemny) na rzecz przeprowadzenia pełnej analizy korelacji występowania i stężenia danej cząsteczki a ryzyka porodu przedwczesnego w ciąży wielopłodowej.

Niniejsza dysertacja stanowi zbiór dwóch oryginalnych publikacji naukowych, dotyczących analizy trzech biomarkerów biochemicznych (białka PAPP-A, elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej) i ryzyka powikłań ciąży bliźniaczej. Obie prace są powiązane tematycznie i stanowią ważny głos w dyskusji, odnoszącej się do poszukiwania skutecznych czynników predykcji powikłań w ciąży bliźniaczej. Pierwsza z prac przedstawia analizę relacji pomiędzy stężeniem białka PAPP-A w osoczu kobiety ciężarnej w pierwszym trymestrze ciąży z wynikami perinatalnym ciąży bliźniaczej, w tym porodem przed 32. tygodniem („**Both low and high PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy**

are associated with increased risk of delivery before 32 weeks in twin gestation”). W analizie wykazano, iż zarówno niskie (poniżej 10. percentyla dla danego wieku ciążowego), jak i wysokie (powyżej 90. percentyla dla danego wieku ciążowego) stężenie białka PAPP-A wiąże się z wysokim ryzykiem porodu przed 32. tygodniem ciąży. Biomarker ten wykazuje więc nieliniową zależność z analizowanym powikłaniem ciąży. Druga praca obejmuje analizę skuteczności oznaczenia występowania elafiny i wydzielniczego inhibitora proteinazy leukocytarnej (SLPI) w wydzielinie szyjkowo-pochwowej kobiet pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży bliźniaczej w predykcji porodu przedwczesnego (**“Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study”**). Wykazano w niej, iż oba analizowane biomarkery nie są skutecznymi czynnikami predykcyjnymi w grupie ciąż bliźniaczych.

5. Założenia i cele pracy

Celem pracy była ocena trzech biomarkerów: PAPP-A, elafiny i SLPI w predykcji powikłań perinatalnych w ciąży bliźniaczej.

Pierwsza praca w cyklu pod tytułem „**Both low and high PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy are associated with increased risk of delivery before 32 weeks in twin gestation**” miała na celu weryfikację hipotezy badawczej, zakładającej, iż stężenie białka PAPP-A pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży koreluje w wynikami perinatalnymi w ciąży bliźniaczej. Założono, iż zarówno niskie (poniżej 10. percentyla dla danego wieku ciążowego), jak i wysokie stężenie białka PAPP-A (powyżej 90. percentyla dla danego wieku ciążowego) może być czynnikiem predykcyjnym powikłań ciąży, takich jak poród przedwczesny, przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego, niewydolność szyjki macicy, cukrzyca ciążowa, nadciśnienie ciążowe, stan przedrzucawkowy, zgon wewnątrzmaciczny płodu, niska masa urodzeniowa noworodka czy dysproporcja wzrastania płodów w ciąży bliźniaczej. Do oceny relacji pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a ryzykiem porodu przedwczesnego użyto nowatorskiej metody uogólnionego modelowania addytywnego.

Druga praca w cyklu pod tytułem „**Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study**” miała na celu weryfikację hipotezy zakładającej, iż obecność elafiny lub SLPI w wydzielinie szyjkowo-pochwowej bezobjawowych kobiet pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży bliźniaczej jest skutecznym czynnikiem predykcyjnym porodu przedwczesnego przed 37. lub przed 34. tygodniem ciąży.

Article

Both Low and High PAPP-A Concentrations in the First Trimester of Pregnancy Are Associated with Increased Risk of Delivery before 32 Weeks in Twin Gestation

Aleksandra Saletra-Bielińska ¹, Katarzyna Kosińska-Kaczyńska ^{1,2,*}, Iwona Szymusik ¹, Bartosz Kaczyński ³, Robert Brawura-Biskupski-Samaha ¹ , Szymon Kozłowski ⁴ , Patrycja Jarmużek ¹, Izabela Walasik ⁵  and Mirosław Wielgoś ¹

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; asaleta@wum.edu.pl (A.S.-B.); iwona.szymusik@wum.edu.pl (I.S.); robertsamaha@gmail.com (R.B.-S.); jarmuzek.patrycja@gmail.com (P.J.); mirosław.wielgos@wum.edu.pl (M.W.)

² Department of Obstetrics and Gynecology, Center of Postgraduate Medical Education, 01-809 Warsaw, Poland

³ Department of Medical Informatics and Telemedicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; bartosz.kaczynski@wum.edu.pl

⁴ University Center for Woman and Newborn Health of the Medical University of Warsaw, 02-015 Warsaw, Poland; Kozlowski1979@go2.pl

⁵ Students Scientific Association at the 1st Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Warsaw, 02-015 Warsaw, Poland; drzewica@wp.pl

* Correspondence: katarzyna.kosinska-kaczynska@cmkp.edu.pl

Received: 13 April 2020; Accepted: 30 June 2020; Published: 3 July 2020



Abstract: In twin gestation, the relationship between pregnancy associated plasma protein (PAPP-A) and perinatal outcome is unclear. The aim of the study was to determine if low and high concentrations of PAPP-A in the first trimester are related to perinatal outcome in twins. A retrospective study was conducted. Medical data of women in twin pregnancies who delivered between 2013 and 2018 were analyzed. PAPP-A concentrations were measured between 10 + 0 and 13 + 6 weeks. The associations between low (<10th percentile) and high (>90th percentile) values of PAPP-A and pregnancy complications were analyzed. A total of 304 patients were included. PAPP-A <10th percentile was associated with a high risk of preterm delivery (OR 6.14; 95% CI 2.1–18), delivery <34 weeks (OR 2.39; 95% CI 1.1–5.1) or <32 weeks (OR 3.06; 95% CI 1.4–6.8). Significant relations between PAPP-A >90th percentile and delivery <34 weeks (OR 4.09; 95% CI 1.8–9.1) or <32 weeks (OR 2.83; 95% CI 1.2–6.6) were found. PAPP-A >90th percentile was related to high risk of intrauterine fetal demise (OR 10; 95% CI 2.4–42.5). Both low and high PAPP-A concentrations seem to be related to pregnancy outcome. Further research is needed to investigate evaluation of risk of pregnancy complications according to PAPP-A concentrations as a continuous variable.

Keywords: preterm delivery; twin pregnancy; pregnancy associated plasma protein; perinatal outcome; intrauterine fetal demise

1. Introduction

Twins have a three to seven-fold higher risk of perinatal morbidity and mortality than singletons [1,2]. It is mainly due to preterm birth, which affects up to 66% of all twins [3]. Several factors have been found to be effective in predicting preterm delivery (PTD) in singletons, allowing to estimate the risk in the first, as well as in the second trimester of pregnancy. They include low

concentration of pregnancy associated plasma protein (PAPP-A) in the first trimester, or sonographic measurement of cervical length in the second trimester of pregnancy [4]. PAPP-A is a glycoprotein produced by placental syncytiotrophoblast and decidua. It shows proteolytic activity for insulin-like binding proteins (IGFBP) 4 and 5, which play a role in the inhibition of insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2. The IGF family has pleiotropic actions. It promotes cellular proliferation, differentiation and metabolism and therefore takes part in the control of placental and fetal growth [5]. PAPP-A increases the bioavailability of IGF 1 and 2, and is therefore involved in biological pathways promoting trophoblast invasion and vascularization of the placenta [4]. IGF 2 enables trophoblast invasion into the maternal decidua and glucose and amino acids transport into the villous cytotrophoblast [6].

In singletons, low concentration of PAPP-A in the first trimester is associated with an increased risk of small for gestational age (SGA), intrauterine demise (IUD), PTD or preeclampsia (PE) [4,7]. In twin gestations, the relationship between PAPP-A and perinatal outcome is not well established. The literature data are contradictory—there are both outcomes similar to singletons [8,9], as well as results showing no relationship between PAPP-A and perinatal outcome [10–12]. The aim of the study was to determine if low and high concentrations of PAPP-A in the first trimester of pregnancy are related to perinatal outcome in twins.

2. Materials and Methods

A retrospective study was conducted at the 1st Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Warsaw, upon receiving the approval from the local ethic committee. Medical data of all women in twin pregnancies who received prenatal care at the outpatient clinic of the Department between 2013 and 2018 were analyzed. The inclusion criteria comprised of: diamniotic pregnancy, first trimester screening with PAPP-A level and nuchal translucency (NT) performed for all fetuses with a crown-rump length of 45 to 84 mm, and available information regarding the course of pregnancy, delivery and neonatal outcome. Both outpatient and hospital records were reviewed, in order to gain complete medical data. Monoamniotic pregnancies or those complicated by twin-to-twin transfusion syndrome, major anatomical anomalies of any of the fetuses, aneuploidy or lost to follow up gestations were excluded from the study.

Gestational age was calculated on the basis of the first day of the last menstrual period, or the transfer day in assisted reproduction techniques procedures and verified by the crown-rump length (CRL) measured in the first trimester (in case of CRL discordance, the measurement was taken from the larger twin). Women smoking cigarettes 5 years before the pregnancy and during pregnancy, regardless of the smoking cessation, were considered addicted to nicotine. PTD was defined as the delivery occurring before completed 37 weeks and very preterm delivery (VPTD) as one occurring before completed 32 weeks of gestation. Preterm premature rupture of membranes (PPROM) was defined as amniotic fluid leakage before 37 weeks of gestation, without spontaneous uterine contractions. Cervical insufficiency is defined as asymptomatic cervical shortening and dilatation with the absence of detectable uterine contractions. SGA newborn was a baby born with weight below the 10th percentile for gestational age, according to chorionicity [13]. Discordant twin growth was defined as twin birthweight difference exceeding 25% of the larger twin in each twin pair. Gestational hypertension (GH) and PE were diagnosed according to American College of Obstetricians and Gynecologists recommendations [14], whereas gestational diabetes mellitus (GDM), according to the Polish Society of Obstetricians and Gynecologists recommendations [15]. IUD was diagnosed by the death of a fetus after completed 22 weeks of gestation. The primary outcome of the study was VPTD, while secondary outcomes included the above-mentioned pregnancy complications (delivery below 37, 34 and 28 weeks GH, PE, GDM, IUD, SGA, discordant twin growth).

All the patients were scheduled for sonographic examination at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation. PAPP-A concentrations were measured between 10 + 0 and 13 + 6 weeks. Kryptor (Brams AG) analyzer was used for biochemical measurements. Serum analytes were converted into multiples of median (MoM) and adjusted for gestational age, maternal weight and ethnicity. The associations between

low and high biochemical values of PAPP-A MoMs (<10th percentile or >90th percentile) and study outcomes were analyzed.

Performed power analysis (Chi-squared test, proportions between two independent groups, Beta = 20%, alpha = 0.05) indicated that required sample size is 294. The expected VPTD in the group of 10–90th percentile PAPP-A was 11%, as previously published [3]. Variables were described as means with standard deviation or percentages. The Mann-Whitney test for continuous variables and Fisher's exact test for qualitative data were used for statistical analysis. Odds ratios were estimated to study the association between biochemical values and study outcomes. The linearity of the associations was estimated using generalized additive models and visualized as spline functions. GAM R package (R 4.0.1 software) was used to create unrestricted spline functions. The best fitting of the smoothing spline was done using AIC criterion—knots position and numbers were automatically fitted to get best optimized curve (knots for presented spline functions are presented in Supplementary Table S1). General additive model using Cubic regression splines was used. *p* values <0.05 were considered significant. Data were analyzed using Statistica (version 13.3) and R software (R 3.5.2).

3. Results

A total of 304 patients met the inclusion criteria. The basic characteristics of the study population are shown in Table 1. A total of 46.7% of pregnancies were monochorionic. The mean gestational age at the time of the first trimester scan was 12 + 3 weeks. The percentages of abnormal analytes included 10.2% of cases with PAPP-A below the 10th percentile (0.49 MoM) and 9.2% with PAPP-A above the 90th percentile (1.84 MoM).

Table 1. Basic characteristics of the study group.

	Study Group <i>n</i> = 304	PAPP-A <10th pc <i>n</i> = 31	PAPP-A 10–90th pc <i>n</i> = 245	<i>p</i>	PAPP-A >90th pc <i>n</i> = 28	<i>p</i>
	Means ± SD / <i>n</i> (%)	Means ± SD / <i>n</i> (%)	Means ± SD / <i>n</i> (%)		Means ± SD / <i>n</i> (%)	
age (years) *	34.02 ± 3.06	33.51 ± 4.1	34.12 ± 3.41	0.6	30.91 ± 3.89	0.08
Primiparity **	168 (55.3)	18 (58.1)	136 (55.51)	0.8	14 (50)	0.7
Monochorionicity **	142 (46.7)	16 (51.62)	108 (44.08)	0.4	18 (64.28)	0.047
BMI (kg/m ²) *	22.94 ± 2.56	23.7 ± 1.62	22.97 ± 1.98	0.7	22.01 ± 2.25	0.8
Smoker **	17 (5.6)	3 (9.7)	14 (5.71)	0.4	0	0.3
ART **	50 (16.4)	2 (6.5)	46 (18.78)	0.1	2 (7.14)	0.2
gestational age at delivery (weeks) *	34.98 ± 3.08	32.65 ± 1.37	35.12 ± 3.23	0.03	32.82 ± 1.57	0.04
1st twin birtweight (g) *	2383 ± 582	2309 ± 378	2415 ± 498	0.1	2366 ± 404	0.2
2nd twin birtweight (g) *	2289 ± 538	2345 ± 214	2278 ± 642	0.3	2054 ± 225	0.08
1st twin SGA **	19 (6.3)	2 (6.5)	17 (6.94)	1	0	0.3
2nd twin SGA **	25 (8.2)	6 (19.35)	17 (6.94)	0.03	2 (7.14)	1

PTD—preterm delivery; VPTD—very preterm delivery; ART—assisted reproduction techniques; BMI—body mass index; SGA—small for gestational age newborn; *—Mann-Whitney test; **—Fisher's exact test.

The relationships between PAPP-A concentrations and study outcomes are presented in Table 2. PAPP-A below the 10th percentile was associated with a significantly higher risk of PTD (RR 2.47; 95% CI 1.1–5.3), delivery <34 weeks (RR 2.25; 95% CI 1.1–4.6) and VPTD (RR 2.72; 95% CI 1.3–5.5). PAPP-A above the 90th percentile was also related to increased risk of delivery below 34 weeks (RR 3.46; 95% CI 1.6–7.5), 32 weeks (RR 2.48; 95% CI 1.1–5.3) and 28 weeks of gestation (RR 2.18; 95% CI 1.1–4.2). Both high and low PAPP-A increased the risk of VPTD over two-fold. No differences between the rates of cervical insufficiency or PPROM were noted between the groups. Spontaneous uterine contractions resulting in a delivery occurred significantly more often in the group of low PAPP-A (RR 2.05; 95% CI 1–4.2).

Table 2. Relationships between study outcomes and pregnancy associated plasma protein (PAPP-A) concentrations.

	PAPP-A <10th pc n (%)	PAPP-A 10–90th pc n (%)	p	OR (95% CI)	RR (95% CI)	PAPP-A >90th pc n (%)	p	OR (95% CI)	RR (95% CI)
Delivery < 37 weeks	28 (87.5)	130 (53.3)	<0.001	3.14 (2.1–18)	2.47 (1.1–5.3)	20 (71.4)	0.07	2.19 (0.9–5.2)	2.05 (0.9–4.9)
Delivery < 34 weeks	14 (43.8)	60 (24.6)	0.2	2.39 (1.1–5.1)	2.25 (1.1–4.6)	16 (57.1)	0.001	4.09 (1.8–9.1)	3.46 (1.6–7.5)
Delivery < 32 weeks	12 (37.5)	40 (16.4)	0.005	3.06 (1.4–6.8)	2.72 (1.3–5.5)	10 (35.7)	0.02	2.83 (1.2–6.6)	2.48 (1.1–5.3)
Delivery < 28 weeks	4 (12.5)	26 (10.7)	0.7	1.2 (0.4–3.7)	1.22 (0.4–3.3)	8 (28.6)	0.01	3.35 (1.3–8.4)	2.18 (1.1–4.2)
PPROM	5 (16.1)	26 (10.6)	0.4	1.6 (0.6–4.6)	1.52 (0.5–3.7)	4 (14.3)	0.7	0.6 (0.1–2.9)	1.35 (0.4–3.6)
Spontaneous uterine contractions resulting in delivery	10 (32.3)	42 (17.1)	0.049	2.3 (1–5.2)	2.05 (1–4.2)	7 (25%)	0.3	1.6 (0.6–4)	1.5 (0.6–3.5)
Cervix insufficiency	0 (0)	3 (1)	0.8	0.1 (0.1–4.2)	0.21 (0–6.4)	0 (0)	0.9	0.23 (0.1–3.1)	0.2 (0–3.8)
GDM	12 (37.5)	30 (12.3)	0.001	4.28 (1.9–9.6)	3.5 (1.7–6.9)	6 (21.4)	0.2	1.9 (0.7–5.2)	1.79 (0.6–4.2)
GH and PE	8 (25)	36 (14.7)	0.2	1.93 (0.8–4.6)	1.84 (0.6–3.9)	2 (7.1)	0.4	1.44 (0.1–1.9)	3.52 (1.7–6.9)
IUD	0	4 (1.6)	1	-	0 (0–8.6)	4 (14.3)	0.005	10 (2.4–42.5)	8.9 (3.1–11.5)
SGA	8 (25)	34 (13.9)	0.1	2.1 (0.9–4.9)	1.91 (0.8–4.1)	2 (7.1)	0.5	0.47 (0.1–2.1)	0.51 (0.1–2)
>25% BW	6 (18.8)	24 (9.8)	0.1	2.11 (0.8–5.7)	1.91 (0.7–4.4)	4 (14.3)	0.5	1.53 (0.5–4.8)	1.46 (0.4–3.9)

All Fisher's exact test analyses; pc—percentile; PPRM—preterm premature rupture of membranes; GDM—gestational diabetes mellitus; GH—gestational hypertension; PE—preeclampsia; IUD—intrauterine fetal demise; SGA—small for gestational age newborn; >25% BW—intertwin birthweight discordance > 25%; OR—odds ratio; 95% CI—95% confidence interval.

PAPP-A concentrations below the 10th percentile were associated with a more than three-fold increased risk of GDM (RR 3.5; 95% CI 1.7–6.9), while those above the 90th percentile were related to a significantly higher risk of IUD (RR 8.9; 95% CI 3.1–11.5). There were eight cases of IUD in the study group. Six of them occurred in monochorionic pregnancies, due to severe selective intrauterine growth restriction of one fetus, and two cases in dichorionic pregnancies: one due to intrauterine growth restriction and one of unknown etiology. No significant associations between PAPP-A concentrations and GH or PE, SGA or intertwin weight discordance were found.

Information on preterm delivery in monochorionic and dichorionic twins is presented in Table 3.

Table 3. Relationships between preterm delivery and PAPP-A concentrations in monochorionic and dichorionic twins.

	Monochorionic n = 142					Dichorionic n = 162			
	PAPP-A <10th pc n = 15	PAPP-A 10–90th pc n = 114	PAPP-A >90th pc n = 13	PAPP-A <10th pc n = 16	p *	PAPP-A 10–90th pc n = 131	p **	PAPP-A >90th pc n = 15	p ***
delivery < 37 weeks	13 (86.67)	68 (59.65)	8 (61.54)	15 (93.75)	0.5	62 (47.33)	0.06	12 (80)	0.3
delivery < 34 weeks	7 (46.67)	31 (27.19)	7 (53.85)	7 (43.75)	0.8	29 (22.14)	0.4	9 (60)	1
delivery < 32 weeks	5 (33.33)	21 (18.42)	4 (30.8)	7 (43.75)	0.7	19 (14.5)	0.5	6 (40)	0.7
delivery < 28 weeks	2 (13.33)	12 (10.53)	4 (30.77)	2 (12.5)	0.8	14 (10.69)	0.8	4 (26.67)	0.6

*—PAPP-A <10th pc monochorionic vs. dichorionic; **—PAPP-A 10–90th pc monochorionic vs. dichorionic; ***—PAPP-A >90th pc monochorionic vs. dichorionic.

Linear associations between study outcomes and PAPP-A concentrations were assessed using generalized additive models. A linear association between PTD and PAPP-A values was observed (linear effect $p < 0.001$; non-linear effect $p = 0.08$) and presented in Figure 1.

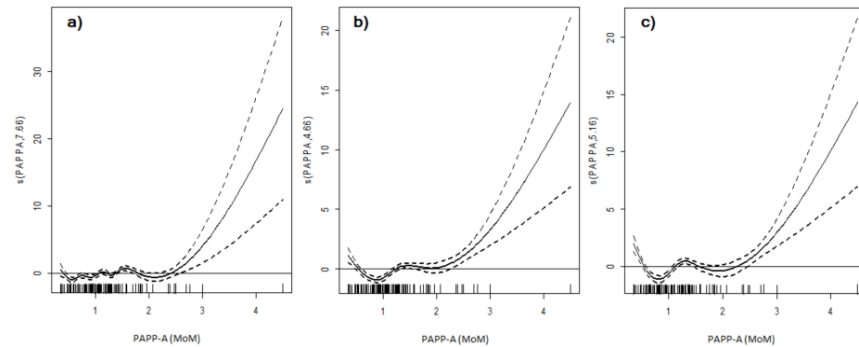


Figure 1. Generalized additive models of associations between PAPP-A concentration and preterm delivery (PTD) (a), delivery before 34 weeks (b) and delivery before 32 weeks of gestation (c) visualized as spline functions. (a): linear effect $p < 0.001$, non-linear effect $p = 0.08$; (b): linear effect $p < 0.001$, non-linear effect $p < 0.001$; (c): linear effect $p < 0.001$, non-linear effect $p < 0.001$. Vertical axis shows response values of logit (binomial) smooth spline function (“s” with name of the covariate, degrees of value). The bars in the bottoms of the figures present number of samples at each PAPP-A multiples of median (MoM) value.

Generally, the incidence of PTD increased in line with PAPP-A concentration. The spline function of the relation between PAPP-A MoMs and PTD was initially horizontal, and after a PAPP-A MoM value of about 2 was raised (knot 2.01). The general tendency was linear, and described by a significant linear effect of $p < 0.001$, and no non-linear effect was observed. Therefore, the spline function shows that generally there is a positive linear relation between PAPP-A MoMs and PTD, however, it is especially visible for values of PAPP-A MoM above 2. The spline function of the relation between PAPP-A MoMs and delivery before 34 weeks of gestation was linear as well (linear effect $p < 0.001$). However, another significant relation of a non-linear nature was also observed (non-linear affect $p < 0.001$). Therefore, the spline function of delivery before 34 weeks was U-shaped, meaning initially the risk of delivery below 34 weeks decreased with increasing values of PAPP-A (to PAPP-A 0.92 MoM value) and afterwards it increased with increasing values of PAPP-A (above PAPP-A value of 2.01). Both low and high values of PAPP-A MoMs were related to increased risk of delivery below 34 weeks of gestation. Analogous non-linear U-shaped spline function was observed for relation between PAPP-A values and VPTD (linear effect $p < 0.001$, non-linear effect $p < 0.001$; knots 0.92 and 2.07, respectively). The risk of delivery below 34 and 32 weeks decreased as the PAPP-A value increased (to 0.92 PAPP-A MoM), and afterwards increased again (above 2 PAPP-A MoM). Patients with PAPP-A around 0.92 MoM had the lowest risk of delivery before 34 (2/14—14.3%) and 32 weeks of gestation (1/14—7.1%).

4. Discussion

In our study, we found a significant relation between PAPP-A <10th percentile and a risk of preterm delivery (RR 2.47; 95% CI 1.1–5.3), delivery <34 weeks (RR 2.25; 95% CI 1.1–4.6) or <32 weeks (RR 2.72; 95% CI 1.3–5.5). On the other hand, another significant relation between PAPP-A >90th percentile and delivery <34 weeks (RR 3.46; 95% CI 1.6–7.5) or <32 weeks (RR 2.48; 95% CI 1.1–5.3) was observed. PAPP-A >90th percentile was also related to high risk of intrauterine fetal demise (RR 8.9; 95% CI 3.1–11.5). Both low and high PAPP-A concentrations were associated with a high risk of delivery before 34 and 32 weeks.

The association between the first trimester aneuploidy biochemical markers and perinatal outcome in twins has been assessed by several authors and the reported results are confusing. We found a significant relation between PAPP-A concentrations and PTD, GDM and IUD risk. Iskender et al. analyzed perinatal outcome of 104 patients in twin gestation, and found no association between

PAPP-A below the 10th percentile and SGA, PTD, GH or GDM, however, their study group was much smaller than ours [10]. A higher incidence of PTD in twin gestations with low PAPP-A (defined as below 0.42 MoM) was reported by Rosner et al. They analyzed the outcome of 340 patients, and found a significantly higher risk of PTD (RR 5.56; 95% CI 1.5–20.1) in women with low first trimester PAPP-A concentrations [8]. In another study by Laughon et al., the delivery prior to 32 weeks of gestation was almost three-fold more often in women with PAPP-A concentrations below the 25th percentile, though their results did not reach significance [9]. It is worth noticing that the study group in the research of Laughon et al. was also small (70 patients were included in the analysis). No association between low PAPP-A concentrations and PTD was reported by other authors either [11,12]. The performance of PAPP-A in prediction of PTD in twin gestation in several studies was assessed by Conde-Agudelo and Romero. Authors found the overall predictive ability of low serum levels of PAPP-A (defined as $\leq$ 25th percentile, $<$ 10th percentile, or $<$ 5th percentile) for preterm birth at $<$ 32, $<$ 34, $<$ 35, and $<$ 37 weeks of gestation to be minimal (sensitivities ranging from 5–56%, specificities from 78–95% and positive and negative likelihood ratios from 1.0–2.9 and 0.6–1.0, respectively) [16].

The above discrepancies may be related to the true complexity of relations between the risk of preterm delivery and PAPP-A concentrations. As the value of PAPP-A is a continuous variable, both linear and non-linear associations between perinatal outcomes and PAPP-A are possible. In the presented study, the associations between both low and high PAPP-A concentrations and delivery prior to 34 and 32 weeks of gestation were observed. A further analysis of relations between PAPP-A and preterm deliveries was conducted with the use of generalized additive models and both linear and non-linear relations were observed. A significant U-shaped association between PAPP-A concentration and the risk of delivery prior to 34 and 32 weeks was found. Therefore, researchers in future work should not focus on trying to identify single cut-off values of PAPP-A for determination of preterm delivery risk, as the relation between the two is both linear and non-linear in twin gestations.

Low concentrations of PAPP-A were found to be associated with abnormal placental function, SGA, IUD and PTD in singletons [4]. A correlation between PAPP-A concentration and trophoblast volume were observed [17]. As PAPP-A plays a significant role in regulation of IGF, and therefore takes part in the control of placental and fetal growth, and is related to placental function [5]. Observational studies suggested that the decrease in maternal serum PAPP-A concentrations in trisomic pregnancies is due to its posttranslational alteration. It may be related to impaired PAPP-A releasing mechanisms or reduced stability of the secreted protein [18]. Independently from the etiology of the decreased concentration, low PAPP-A causes downregulation of IGF 2 availability, which can lead to an impaired invasion of the trophoblast into maternal decidua, abnormal placentation in early pregnancy and impaired glucose and amino acids transport [19]. The above mechanisms may lead to spontaneous abortion or adverse perinatal outcome [6]. PAPP-A below the 5th percentile is related to increased risk of preterm delivery, fetal intrauterine growth restriction and preeclampsia [20]. According to Pelaez et al., placental lesions associated with placental malperfusion were seen more often in patients with twin gestation and low first trimester PAPP-A concentration [21]. The impairment of placentation and placental ischemia induced by the lower IGF bioavailability in early gestation may have an impact on the occurrence of PTD, although the true mechanism is not clear yet [5,19]. We found low PAPP-A concentration to be related to the risk of VPTD in twin gestation. On the other hand, we found high concentrations of PAPP-A to also be related to higher risk of delivery before 34 and 32 weeks. The mechanism of this relations is not known. As PAPP-A has a proteolytic activity on IGFBP, its elevated concentrations could lead to the decrease in IGFBP bioavailability. Wang et al. found significantly lower concentrations of maternal serum IGFBP 3 in women delivering singletons prior to 32 weeks of gestation, which may be due to high concentrations of PAPP-A [22]. It can be hypothesized that the elevated concentration of PAPP-A may have a similar effect on implantation and placentation as the decreased one. The desensitization of IGF receptors in the environment of excessive IGF release might be the possible mechanism; however, further studies are needed to confirm such theory. Another explanation may be that relatively bigger placental mass produce increased amount of PAPP-A. High PAPP-A may be related to fetal overgrowth,

polyhydramnios and higher incidence of preterm delivery due to uterine overextension. In our study, no information on polyhydramnios or placental mass were available, while no differences between mean birthweight of the newborns or the occurrence of SGA between the groups of PAPP-A 10–90th percentile and >90th percentile were observed. Further studies evaluating the possible mechanisms of the relation between high PAPP-A and preterm delivery are needed.

We found significant association of elevated PAPP-A and the risk of IUD. No such relation had been described earlier in twins. Fathian et al. analyzed adverse outcomes in pregnancies with PAPP-A above 95th percentile and found no associations [11]. Our study is the first one reporting higher incidence of IUD in women with elevated first trimester PAPP-A. It can be assumed that the analogous mechanism as in preterm deliveries may be related to IUD in twin gestations with high PAPP-A concentrations.

The strength of the study is a numerous group of patients from a single clinic center. All patients were counselled according to the same local policy, and provided with the same medical standards. Clear definitions of prenatal complications were used for the whole group. A novel and unique analysis of the relationship between PAPP-A concentrations as a continuous variable and perinatal outcome was conducted. The presented study was the first one to estimate the association between the risk of IUD and PAPP-A concentration in twin gestation. The weakness of the study is its retrospective observational design. As both monochorionic and dichorionic pregnancies were included the study group may be inhomogeneous. It could bring additional information if a separate analysis could be made for iatrogenic and spontaneous PTD, however, this information was lacking.

5. Conclusions

PAPP-A concentrations seem to be related with pregnancy outcome. Both low and high concentrations are associated with increased risk of delivery before 34 and 32 weeks of gestation. PAPP-A is routinely assessed in first trimester screening for aneuploidies and, therefore, it would be cost-effective as a prognostic tool in PTD and IUD risk assessment as well. Identifying women at a high risk of PTD or delivery before 32 weeks could help guide proper management and possible interventions. Further research is needed to investigate the exact mechanism of association between PAPP-A and PTD or IUD and novel evaluation of risk of pregnancy complications, according to PAPP-A concentrations as a continuous variable.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/7/2099/s1>, Table S1: Knots for spline functions presented in the paper.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.-B. and K.K.-K.; methodology, K.K.-K. and B.K.; software, B.K.; formal analysis, B.K.; investigation, A.S.-B., R.B.-B.-S., S.K. and P.J.; data curation, A.S.-B. and I.W.; writing—original draft preparation, A.S.-B. and K.K.-K.; writing—review and editing, I.S.; visualization, B.K.; supervision, M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lopriore, E.; Stroeken, H.; Sueters, M.; Meerman, R.J.; Walther, F.; Vandenbussche, F. Term perinatal mortality and morbidity in monochorionic and dichorionic twin pregnancies: A retrospective study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2008**, *87*, 541–545. [[CrossRef](#)]
2. Hack, K.E.; Derks, J.B.; Elias, S.G.; Franx, A.; Roos, E.J.; Voerman, S.K.; Bode, C.L.; Koopman-Esseboom, C.; Visser, G.H. Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: Clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG* **2008**, *115*, 58–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kosińska-Kaczyńska, K.; Szymusik, I.; Bomba-Opoń, D.; Olejek, A.; Ślowska, H.; Zimmer, M.; Pomorski, M.; Bręborowicz, G.; Drews, K.; Seremak-Mrozikiewicz, A.; et al. Perinatal outcome according to chorionicity in twins—A Polish multicenter study. *Ginekol. Pol.* **2016**, *87*, 384–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Gagnon, A.; Wilson, R.D. SOCIETY OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS OF CANADA GENETICS COMMITTEE. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **2008**, *30*, 918–932. [\[CrossRef\]](#)
5. Shin, J.E.; Shin, J.C.; Kim, S.J.; Lee, Y.; Park, I.Y.; Lee, S. Early midtrimester serum insulin-like factors and cervical length to predict preterm delivery. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *55*, 45–49. [\[CrossRef\]](#)
6. Santolaya-Forgas, J.; De Leon, J.A.; Cullen Hopkins, R.; Castracane, V.D.; Kauffman, R.P.; Sifuentes, G.A. Low pregnancy-associated plasma protein-a at 10(+1) to 14(+6) weeks of gestation and a possible mechanism leading to miscarriage. *Fetal Diagn. Ther.* **2004**, *19*, 456–461. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Turner, J.M.; Kumar, S. Low First Trimester Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Levels Are Not Associated with an Increased Risk of Intrapartum Fetal Compromise or Adverse Neonatal Outcomes: A Retrospective Cohort Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1108. [\[CrossRef\]](#)
8. Rosner, J.Y.; Fox, N.S.; Saltzman, D.; Klauser, C.K.; Rebarber, A.; Gupta, S. Abnormal Biochemical Analytes Used for Aneuploidy Screening and Adverse Pregnancy Outcomes in Twin Gestations. *Am. J. Perinatol.* **2015**, *32*, 1331–1335.
9. Laughon, S.K.; Rebarber, A.; Rolnitzky, L.; Fink, L.; Saltzman, D.H. Decreased first-trimester maternal serum free-beta subunit human chorionic gonadotropin and preterm birth in twin gestations. *Am. J. Perinatol.* **2009**, *26*, 491–494. [\[CrossRef\]](#)
10. Iskender, C.; Tarım, E.; Çök, T.; Yalcinkaya, C.; Kalaycı, H.; Yanık, F.B. Obstetrical complications associated with first-trimester screening markers in twin pregnancies. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2013**, *39*, 1495–1499. [\[CrossRef\]](#)
11. Fathian, A.; Miller, R.; Wolf, E. Analysis of first trimester markers, PAPP-A and free-βhCG, and adverse outcomes in twin pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2014**, *214*, S135. [\[CrossRef\]](#)
12. Chasen, S.T.; Martinucci, S.; Perni, S.C.; Kalish, R.B. First-trimester biochemistry and outcomes in twin pregnancy. *J. Reprod. Med.* **2009**, *54*, 312–314.
13. Ghi, T.; Prefumo, F.; Fichera, A.; Lanna, M.; Periti, E.; Persico, N.; Viora, E.; Rizzo, G.; Società Italiana di Ecografia Ostetrica e Ginecologica Working Group on Fetal Biometric Charts. Development of customized fetal growth charts in twins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2017**, *216*, e1–e17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **2019**, *133*, e1–e25. [\[CrossRef\]](#)
15. Wender-Ozegowska, E.; Bomba-Opoń, D.; Brazert, J.; Celewicz, Z.; Czajkowski, K.; Gutaj, P.; Malinowska-Polubiec, A.; Zawiejska, A.; Wielgoś, M. Standards of Polish Society of Gynecologists and Obstetricians in management of women with diabetes. *Ginekol. Pol.* **2018**, *89*, 341–350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Conde-Agudelo, A.; Romero, R. Prediction of preterm birth in twin gestations using biophysical and biochemical tests. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2014**, *211*, 583–595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Mesdaghi-Nia, E.; Behrashi, M.; Saeidi, A.; Abedzadeh Kalahroodi, M.; Sehat, M. Association between PAPP-A and placental thickness. *Int. J. Reprod. Biomed.* **2016**, *14*, 421–426. [\[CrossRef\]](#)
18. Brizot, M.L.; Hyett, J.A.; Mckie, A.T.; Bersinger, N.A.; Farzaneh, F.; Nicolaides, K.H. Gene expression of human pregnancy-associated plasma protein-A in placenta from trisomic pregnancies. *Placenta* **1996**, *17*, 33–36. [\[CrossRef\]](#)
19. Pummara, P.; Tongsong, T.; Wanapirak, C.; Sirichotiyakul, S.; Luewan, S. Association of first-trimester pregnancy-associated plasma protein A levels and idiopathic preterm delivery: A population-based screening study. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *55*, 72–75. [\[CrossRef\]](#)
20. Morris, R.K.; Bilagi, A.; Devani, P.; Kilby, M.D. Association of Serum PAPP-A Levels in First Trimester with Small for Gestational Age and Adverse Pregnancy Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis. *Prenat. Diagn.* **2017**, *37*, 253–265. [\[CrossRef\]](#)
21. Paelez, L.; Chasen, S.; Baergen, R. Relationship between first trimester maternal serum PAPP-A levels and placental lesions in twin gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2008**, *6*, S95. [\[CrossRef\]](#)
22. Wang, H.S.; Perry, L.A.; Kanisius, J.; Iles, R.K.; Holly, J.M.; Chard, T. Purification and assay of insulin-like growth factor-binding protein-1: Measurement of circulating levels throughout pregnancy. *J. Endocrinol.* **1991**, *128*, 161–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study

Aleksandra Saletra-Bielińska

1st Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<https://orcid.org/0000-0003-1802-3334>

Katarzyna Kosińska-Kaczyńska

Second Department of Obstetrics and Gynecology, The Center of Postgraduate Medical Education

<https://orcid.org/0000-0001-5461-273X>

Corresponding author:

katarzyna.kosinska-kaczynska@cmkp.edu.pl

Iwona Szymusik

1st Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<https://orcid.org/0000-0001-8106-5428>

Justyna Niderla-Bielińska

Department of Histology and Embryology, Center for Biostructure, Medical University of Warsaw

<https://orcid.org/0000-0002-9295-480X>

Jacek Malejczyk

Department of Histology and Embryology, Center for Biostructure, Medical University of Warsaw

<https://orcid.org/0000-0002-5371-8476>

Mirosław Wielgoś

1st Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

<https://orcid.org/0000-0003-2581-3668>

DOI: <https://doi.org/10.20883/medical.e490>

Keywords: twin pregnancy, elafin, secretory leukocyte peptidase inhibitor, preterm delivery

Published: 2021-03-30

How to Cite: Saletra-Bielińska A, Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, Niderla-Bielińska J, Malejczyk J, Wielgoś M. Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study. JMS [Internet]. 2021 Feb 24;90(1):e490. doi:10.20883/medical.408



© 2021 by the author(s). This is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license. Published by Poznan University of Medical Sciences

ABSTRACT

Introduction. Elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor may serve as the predictors of cervical shortening and preterm delivery in twin gestation.

Material and Methods. A prospective observational study was conducted between September 2016 and March 2017. Cervicovaginal swabs collected from 40 women with twin gestation were analysed and the mRNA expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) correlated with preterm delivery.

Results. The mean gestational age at delivery was 35.6 ± 5.8 weeks, with 23 women delivering before 37 weeks (57.5%), 7 before 34 weeks (17.5%) and 3 before 32 weeks of gestation (7.5%). The mRNA expression of elafin and SLPI was not dependent on chorionicity and did not correlate with gestational age at delivery.

Conclusions. Elafin and SLPI are not appropriate predictors of preterm delivery in twins.

Introduction

Elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) are the members of the antimicrobial peptide

family, playing an important role in the modulation of the immune system. They are major protease inhibitors secreted at mucosal surfaces and the first line of defence against foreign antigens. They

are expressed throughout the female genital tract, inhibiting bacterial, viral and fungal activity and present anti-protease activity on proteases induced by infection and inflammation on the epithelial surfaces [1]. They belong to the whey acidic protein (WAP) family, as SLPI has two WAP domains and elafin has one WAP domain, which serve as neutrophil elastase inhibitors. Elafin, also known as peptidase inhibitor 3 (PI3), is a 9.9 kDa protein which is the C-terminal region of trappin-2. It inhibits neutrophil elastase and proteinase 3. Elafin expression was reported to be elevated in fetal membranes of preterm prelabour rupture of membranes (PPROM) [2] and the cervicovaginal fluid of women delivering preterm in singleton gestation [3]. The PI3 gene produces a complex protein (12.3 kDa) which is split intracellularly into the mature form (9.9 kDa) and secreted into the extracellular matrix and transformed into soluble elafin [3]. Its production is stimulated by lipopolysaccharide and inflammatory cytokines and decreased by oestradiol [3]. SLPI is an 11.9 kDa protein and an anti-inflammatory mediator [4]. Its N-terminal domain presents activity against both gram-positive and gram-negative organisms. The C-terminal domain is a strong inhibitor of neutrophil elastase, cathepsin G, trypsin, chymotrypsin, tryptase, and chymase. SLPI negatively regulates proinflammatory signalling mediated by nuclear factor-kappa B (NF-kB) [4].

According to Romero, preterm delivery is a common symptom of various processes and causes [5], with infection being the etiologic factor in 30% of preterm deliveries in singleton pregnancies [5]. During gestation, the uterine cervix and its mucus play an important role in the protection from pathogens present in the vagina. If the barrier is insufficient, infection and inflammation trigger cervical remodelling and shortening which leads to delivery. Macrophages and neutrophils infiltrate the cervix and the local production of proteases begins tissue remodelling and cervical opening. Preterm delivery affects two-thirds of all twin pregnancies and contributes to 50% of all neonatal twin deaths [6]. In the Preterm Prediction Study, 54.4% of all twins were born before 37 weeks, 32% before 35 weeks and 8.8% before completing 32 weeks of gestation [7]. It is a major problem associated with multiples, so finding an efficient predictor of preterm delivery in twin gestation is of great importance. It was hypothesised that elafin and SLPI may serve

as the predictors of cervical shortening and preterm delivery in twin gestation.

Materials and Methods

For this pilot study of biomarkers in the prediction of preterm delivery in twins, a prospective observational study was conducted in the 1st Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical University of Warsaw between September 2016 and March 2017. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical University of Warsaw and was conducted according to the Declaration of Helsinki.

The inclusion criteria were a twin pregnancy beyond 22+0 weeks of gestation, chorionicity established and documented on the 1st trimester sonographic scan (two gestational sacs or the lambda sign for a dichorionic pregnancy; a single gestational sac or T sign for a monochorionic pregnancy), verified gestational age (GA), known GA at delivery, newborns birth weight (BW) and complete medical data on the pregnancy outcome and neonatal outcome. Pregnancies complicated by one or two foetal demises, genetic or major anatomical abnormalities, twin to twin transfusion syndrome (TTTS), twin anaemia-polycythaemia sequence (TAPS), twin reversed arterial perfusion syndrome (TRAP), as well as monochorionic monoamniotic ones, were excluded from the study. GA was calculated based on the first day of the last menstrual period or a transfer day in assisted reproductive technique procedures and verified by the crown-rump length (CRL) measured on the first trimester scan (if estimated due dates were inconsistent and the difference was over 5 days, the ultrasound measurement was of primary importance; in case of CRL discordance, the measurement from the larger twin was chosen). Body mass index (BMI) was defined as the body mass divided by the square of the body height. Preterm delivery was defined as the delivery occurring before completed 37 weeks. PPRM was defined as amniotic fluid leakage before 37 weeks of gestation, without spontaneous uterine contractions. Gestational hypertension (GH) and preeclampsia (PE) were diagnosed according to American College of Obstetricians and Gynaecologists recommendations [8], whereas gestational diabetes mellitus (GDM) was according to the Polish Society of Obstetricians and Gynaecologists recommendations [9].

Women with dichorionic pregnancies were routinely counselled once every 4 weeks and in monochorionic pregnancies once every 2 weeks, including an ultrasound scan. In cases with no pregnancy complications, both monochorionic diamniotic and dichorionic twins were delivered beyond 37 weeks of gestation according to the local policy. All the women were counselled between 20 and 24 weeks of gestation. A routine ultrasound scan assessing foetal biometry and anatomy was performed during that period as well as an ultrasound measurement of the length of the cervical canal. This was measured according to the Foetal Medicine Foundation recommendations – a transvaginal probe was placed in the anterior fornix of the vagina with an empty bladder and the linear distance between callipers placed at the internal and external cervical os was taken. Also, cervicovaginal swab samples were collected with a special kit between 20 and 24 gestational weeks.

The primary outcome of the study was delivery occurring before the completion of 37 weeks of gestation. Secondary outcomes included deliveries before 34 weeks of gestation.

The RNA was isolated with a PureLink™ RNA Micro Scale Kit (ThermoFisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The quality and concentration of RNA were assessed with a NanoDrop spectrophotometer and reverse transcription was performed with a High Capacity RNA-to-cDNA Kit according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Gene expression was analysed by relative quantitation (RQ) using a comparative CT assay. Explants stimulated with the proangiogenic cocktail for PE stimulation and cells from the control group no. 1 for C199 stimulation were used as calibrators. Real-time PCR was performed on an Abi Prism 7500 (Applied Biosystems) in 96-well optical plates, with each sample run in triplicate and supplied with an endogenous control (human GAPDH no. Hs02786624_g1). The TaqMan Expression Assays (Applied Biosystems) SLPI: Hs00268204_m1 and elafin (PI3): Hs00964384_g1 were used and all probes were stained with FAM. Reactions were run in a 20 µl volume with TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), appropriate primer set, MGB probe and 5 ng of cDNA template and universal thermal conditions were used, i.e. 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Data analysis was performed with sequence

detection software version 1.2 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, MA, USA).

Data are presented as the mean ($\pm$ SD), median or percentage. The Mann-Whitney test and Fisher's exact test were used for statistical analysis and a P-value < 0.05 was considered significant. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and positive and negative likelihood ratio with 95% confidence intervals were calculated to test the predictive value for preterm delivery (before 34 and 37 weeks of gestation). The data were analysed using Statistica version 13.1. Test performance was described for the prediction of delivery before 37- and 34-weeks using receiver operating characteristic (ROC) curves, sensitivity, specificity and predictive values. Areas under the ROC curve (AUC) were calculated and compared. Correlations between biomarkers and the cervical length were assessed by the Spearman rank correlation test.

Results

This pilot study involved 48 women. One case of an intrauterine foetal demise was diagnosed and one premature rupture of membranes occurred at 21 weeks of gestation; they were excluded from further analysis. Six patients were lost to follow-up, finally, 40 patients were deemed eligible for analysis.

The cervicovaginal swabs collected from 40 women with twin gestation were analysed and their basic characteristics are presented in **Table 1**. A cervical length below 25 mm between 20 and 24 weeks of gestation was diagnosed in three women and they were administered progesterone vaginally (200 mg per day). No vaginal pessary or cervical cerclage were administered.

The median GA at delivery was 36 weeks (interquartile range 35–37), with 23 women delivering before 37 weeks (57.5%), 7 before 34 weeks (17.5%) and 3 before 32 weeks of gestation (7.5%). All patients gave birth beyond 30 weeks. Preterm delivery was spontaneous due to PPRM or regular uterine contractions in 16 women (11 monochorionic diamniotic vs. 5 dichorionic pregnancies; $p=0.7$) and 82.5% of women had a caesarean delivery. The indications for caesarean section were malpresentation of the first foetus (6 monochorionic vs. 3 dichorionic twins), inter-

twin growth discordance (2 vs. 1 respectively), PE (1 vs. 0 respectively) and maternal indications (2 vs. 1 respectively).

SLPI and elafin mRNA were detected in the cervical epithelial cells in all women and mRNA expression was not dependent on chorionicity (**Table 1**). There was no correlation between GA at delivery and the mRNA expression of SLPI or elafin. A separate analysis for the subgroup of women with spontaneous preterm delivery was performed, showing no relationship with biomarker expression [delta Ct SLP median 4.3, interquartile range (IQR) 3–4.9 in spontaneous preterm delivery groups vs. 3.4, 2.7–3.6, $p=0.2$; delta Ct PI3 2.6, 1.8–3.5 vs. 3.0, 2.3–3.5, respectively, $p=0.5$]. Women delivering beyond 37 weeks had a significantly longer cervix assessed by ultrasound. No significant correlation between cervical length and biomarker expression was observed (delta Ct SLP: Spearman rank correlation coefficient -0.08 , $p=0.6$; delta Ct PI3: Spearman rank correlation coefficient -0.07 , $p=0.7$).

The cut-off points for PI3 and SLPI mRNA were designated based on the ROC curves and are presented in **Figures 1A–D**. The AUC for both elafin and SLPI was similar ranging from 0.53 to 0.602. SLPI and PI3 had moderate sensitivity with low specificity in predicting preterm delivery before 37 and 34 weeks of gestation. The ROC curve was used to establish the cut-off point for cervical length in the prediction of preterm delivery, with a cervical length of 39 mm having sensitivity 561 (95% CI 32.2–.81.3), specificity 86.4 (95% CI 56.8–97.2), positive likelihood ratio 3.94 (95% CI 1.3–12.2) and negative likelihood ratio 0.51 (95% CI 0.29–0.91). There were no significant differences in the expression of SLPI mRNA (median 4.2, IQR 3.1–5.1 vs. 3.3, 2.4–4.4 respectively; $p=0.3$) or expression of PI3 mRNA (3.1, 1.6–3.8 vs. 2.8, 2.5–3.2; $p=0.9$) between women who had cervical length below or above 39 mm. The sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios for delivery before 34 and 37 weeks, as well as cervical length less than 39 mm, are shown in **Table 2**.

Discussion

This is the first study of elafin and SLPI expression in the cervicovaginal fluid in twin gestation, demonstrating no significant differences in elafin and

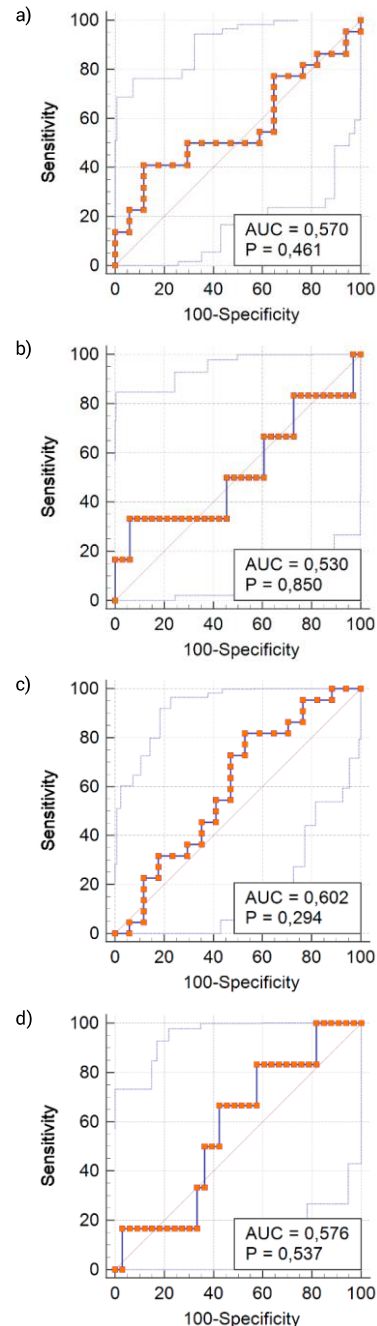


Figure 1. ROC curves demonstrating the ability of elafin and SLPI cervicovaginal fluid to predict delivery before 37 and 34 weeks of gestation in twins. a) elafin in delivery prediction <37 weeks; b) elafin in delivery prediction <34 weeks; c) SLPI in delivery prediction <37 weeks; d) SLPI in delivery prediction <34 weeks

Journal of Medical Science 2021;90(1) 95

3MI: body mass index, ART: assisted reproductive technology, DM: diabetes mellitus, PIH: pregnancy-induced hypertension, PE: preeclampsia, PROM: preterm premature rupture of membranes

	Cut-off	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Positive likelihood ratio (95% CI)	Negative likelihood ratio (95% CI)
Delivery <37 weeks	Delta SLPI	58.8 (32.9–81.6)	59 (36.4–79.3)	1.18 (0.6–2.3)	0.82 (0.5–1.6)
	Delta P3	70.6 (44–89.7)	50 (28.2–71.8)	1.41 (0.8–2.4)	0.59 (0.3–1.4)
Delivery <34 weeks	Delta SLPI	60.6 (42.1–77.1)	50 (11.8–88.2)	1.21 (0.5–2.8)	0.79 (0.3–1.9)
	Delta P3	54.6 (36.4–71.9)	50 (11.8–88.2)	1.09 (0.5–2.6)	0.91 (0.4–2.2)
Cervical length <39 mm	Delta SLPI	62.5 (43.7–78.9)	71.4 (29–96.3)	2.18 (0.6–7.3)	0.52 (0.3–1)
	Delta P3	50 (31.9–68.1)	85.7 (42.1–99.6)	3.5 (0.5–22.2)	0.58 (0.3–0.9)

SLPI mRNA expression in the cervical fluid collected in mid-pregnancy between term and preterm deliveries. Elafin and SLPI had low specificity and moderate sensitivity in the prediction of delivery before 37 and 34 weeks, which is in line with other studies conducted in singleton pregnancies. Manning et al. detected no differences in elafin concentration in the cervicovaginal fluid of women delivering prior to or beyond 37 weeks in a study of 135 women with a history of preterm delivery (PTD) or cervical surgery [10]. Hezelgrave et al. observed 405 women with a singleton pregnancy at a high risk of PTD and 214 women at low risk of PTD, showing that elafin was not increased in high risk women who developed cervical shortening and delivered prematurely. The AUC for the prediction of delivery before 37 weeks was 0.52 (0.44–0.59) and before 34 weeks was 0.64 (0.58–0.71) [11]. Another observational study of 104 singleton high risk pregnancies by Bastek et al. reported that elafin measured in the cervicovaginal fluid in mid-gestation was not a predictor of PTD [12].

Conversely, studies have confirmed a correlation between elafin expression and PTD. Itaoka et al. compared the mRNA expression of elafin in cervical swabs collected at 29 weeks of gestation in women at low and high risk of PTD, finding that the cervical mRNA expression of elafin was significantly higher in high risk women delivering preterm compared with high risk women delivering at term and low risk controls [13]. Similarly, Abbott et al. analysed the cervicovaginal fluid samples collected between 13 and 30 weeks of gestation of 74 asymptomatic women with a singleton gestation, showing that women who developed a short cervix had elafin concentrations 2.71 times higher than those who did not (CI 1.94–3.79, $p = 0.0005$). Elafin concentrations were 3-fold higher than in the controls when cervical shortening was first detected. Elafin in the cervicovaginal fluid collected before 24 weeks of gestation was significantly higher in women who had a spontaneous PTD (OR 1.79; CI: 1.05–3.05, $p = 0.034$) and elafin measured between 14+0 – 14+6 weeks of pregnancy was predictive of subsequent development of a short cervix (AUC 1.00, $p = 0.008$) within 8 weeks [3].

Similar findings concerning SLPI were published by Itaoka et al, who reported that the mRNA expression of SLPI in the cervicovaginal fluid was significantly higher in high risk women who delivered preterm than in low risk women, as well as in

high risk women who delivered at term [13]. Conversely, Samejima et al. found no differences in SLPI concentrations between women delivering before and beyond 37 weeks gestation. However, they reported a significant correlation between cervical mucus SLPI concentration and inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-8, which play an important role in preterm delivery [4].

In the present study, elafin and SLPI mRNA were detected in all collected samples. Itaoka et al. detected elafin and SLPI mRNA throughout the gestation and postpartum period, with the elafin concentration unchanged throughout pregnancy, while higher levels were detected after delivery [13]. In contrast, the expression of SLPI mRNA was the lowest in the first trimester, increasing in the second and third trimester [13]. Elafin and SLPI were also detected in the cervicovaginal secretion by other authors [14,15]. Differences in elafin and SLP production are probably controlled by hormones, especially progesterone. It was demonstrated that progesterone exposure increased SLPI but not elafin mRNA expression in a breast epithelial cell line [16], which may explain the differences in the observed expression of these antimicrobial peptides during pregnancy.

As uncomplicated twin pregnancies delivery was scheduled beyond 37 weeks in both dichorionic and monochorionic diamniotic gestation according to our local policy, it is assumed that the comparison of preterm deliveries between both groups is reliable. There was no correlation between elafin or SLPI and preterm delivery in twin gestation, which may be due to the small study group size, as this was a pilot study of potential biomarkers in the prediction of preterm delivery in twins. However, the aetiology of preterm delivery in twin gestation is complex and may differ from that in a singleton pregnancy. In twins, the overdistension of the uterus plays a major role and maybe a triggering factor for preterm delivery, even in the absence of infection and inflammation. The larger uterine cavity in the case of multiple pregnancies causes overdistension, which increases the expression of gap junctions in the myometrium and oxytocin receptors, as well as increased prostaglandin production [17]. As the aetiology of preterm delivery may be different from a singleton delivery, elafin and SLPI may not play a significant role in preterm delivery in multiple gestation.

The elafin and SLPI production were assessed in this study by examining the expression of their mRNA rather than protein, as neutrophil elastase can interfere with the secretion of SLPI by forming a positively charged molecular complex with SLPI [13], thereby influences the measurement of protein concentration and induce bias. Hence, we considered mRNA expression to be more independent and objectively reflects protein production.

In conclusion, elafin and SLPI expression in the cervicovaginal fluid is not related to the risk of preterm delivery and not appropriate for the prediction of preterm delivery in twins.

Acknowledgements

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Funding sources

There are no sources of funding to declare.

References

1. Sallenave J. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Elafin/Trappin-2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2010 Jun;42(6):635-643. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0095rt>
2. Tromp G, Kuivaniemi H, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim YM, Kim MR, Maymon E, Edwin S. Genome-wide expression profiling of fetal membranes reveals a deficient expression of proteinase inhibitor 3 in premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004 Oct;191(4):1331-1338. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.07.010>
3. Abbott DS, Chin-Smith EC, Seed PT, Chandiramani M, Shennan AH, Tribe RM. Raised Trappin2/elafin Protein in Cervico-Vaginal Fluid Is a Potential Predictor of Cervical Shortening and Spontaneous Preterm Birth. Landay A. *PLoS ONE*. 2014 Jul 30;9(7):e100771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100771>
4. Samejima T, Nagamatsu T, Akiba N, Fujii T, Sayama S, Kawana K, Taguchi A, Kumasawa K, Iriyama T, Osuga Y, Fujii T. Secretory leukocyte protease inhibitor and progranulin as possible regulators of cervical remodeling in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2021 Feb;143:103241. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103241>
5. Romero R, Espinoza J, Gonçalves L, Kusanovic J, Friel L, Hassan S. The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2007 Jan;25(1):21-39. <https://doi.org/10.1055/s-2006-956773>
6. Tarter JG, Khoury A, Barton JR, Jacques DL, Sibai BM. Demographic and obstetric factors influencing pregnancy outcome in twin gestations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002 May;186(5):910-912. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.123989>
7. Goldenberg RL, Iams JD, Miodovnik M, Van Dorsten J, Thurnau G, Bottoms S, Mercer BM, Meis PJ, Moawad AH, Das A, Caritis SN, McNellis D. The preterm prediction study: Risk factors in twin gestations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1996 Oct;175(4):1047-1053. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(96\)80051-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(96)80051-2)
8. ACOG. *Obstetrics & Gynecology*. 2019 Jan;133(1):1-1. <https://doi.org/10.1097/aog.0000000000003018>
9. Wender-Ożegowska E, Bomba-Opoń D, Brązert J, Celewicz Z, Czajkowski K, Gutaj P, Malinowska-Polubiec A, Zawiejska A, Wielgoś M. Standards of Polish Society of Gynecologists and Obstetricians in management of women with diabetes. *Ginekolog Pol*. 2018;89(6):341-50. <https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0059> PMID 30010185
10. Manning R, James CP, Smith MC, Innes BA, Stamp E, Peebles D, Bajaj-Elliott M, Klein N, Bulmer JN, Robson SC, Lash GE. Predictive value of cervical cytokine, antimicrobial and microflora levels for pre-term birth in high-risk women. *Scientific Reports*. 2019 Aug 2;9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47756-7>
11. Hezelgrave NL, Seed PT, Chin-Smith EC, Ridout AE, Shennan AH, Tribe RM. Cervicovaginal natural antimicrobial expression in pregnancy and association with spontaneous preterm birth. *Scientific Reports*. 2020 Jul 21;10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68329-z>
12. Bastek JA, Hirshberg A, Chandrasekaran S, Owen CM, Heiser LM, Araujo BA, McShea MA, Ryan ME, Elovitz MA. Biomarkers and Cervical Length to Predict Spontaneous Preterm Birth in Asymptomatic High-Risk Women. *Obstetrics & Gynecology*. 2013 Aug;122(2):283-289. <https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31829ab714>
13. Itaoka N, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, Kawana K, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T. Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015 Jan 5;73(6):536-544. <https://doi.org/10.1111/aji.12354>
14. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) Is Produced by the Cervix in Pregnancy and Cervicovaginal Levels Are Diminished in Bacterial Vaginosis. *Reproductive Sciences*. 2009 Sep;16(12):1125-1134. <https://doi.org/10.1177/1933719109341998>
15. Helmig R, Ulbjerg N, Ohlsson K. Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1995 Mar;59(1):95-101. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(94\)02023-8](https://doi.org/10.1016/0028-2243(94)02023-8)
16. King AE, Morgan K, Sallenave J, Kelly RW. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003 Oct;310(2):594-599. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.151>
17. Stock S, Norman J. Preterm and term labour in multiple pregnancies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2010 Dec;15(6):336-341. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.06.006>

7. Podsumowanie wyników i wnioski

Ciąża wielopłodowa, w tym ciąża bliźniacza, jest obarczona wysokim ryzykiem występowania powikłań, zwłaszcza porodu przedwczesnego. Wykrycie biomarkera, który byłby skutecznym czynnikiem predykcyjnym powikłań perinatalnych w ciąży bliźniaczej pozwoliłoby na wyodrębnienie grupy pacjentek o wysokim ryzyku powikłań i zastosowanie w niej ścisłego nadzoru położniczego oraz dostępnych metod profilaktycznych. Dotychczas żaden z ocenianych biomarkerów biochemicznych, które mają zastosowanie w ocenie ryzyka powikłań w ciąży pojedynczej, nie okazał się być skutecznym w ciąży bliźniaczej.

Według koncepcji Romero infekcja wewnątrzmaciczna jest jednym z czynników etiologicznych porodu przedwczesnego, a poród przedwczesny jest najczęstszym powikłaniem ciąży wielopłodowej [26]. Wykazano korelację pomiędzy ekspresją interleukin prozapalnych a występowaniem porodu przedwczesnego i przedwczesnego odpływania płynu owodniowego w ciąży pojedynczej [29]. Elafina i SLPI są inhibitorami proteaz, wydzielanymi w błonach śluzowych, o działaniu immunomodulującym. Są produkowane w drogach rodnych kobiety i wykazują działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze oraz hamujące aktywność proteaz, indukowanych podczas infekcji i stanu zapalnego. Elafina, nazywana również inhibitorem peptydazy 3, jest kodowana przez gen PI3. Wykazuje działanie hamujące aktywność elastazy neutrofilowej. Wydzielanie elafiny jest stymulowane przez lipopolisacharydy i cytokiny prozapalne. Potwierdzono jej obecność w wydzielinie szyjkowo-pochwowej u kobiet rodzących przedwcześnie [30]. SLPI wykazuje aktywność przeciw Gram-ujemnym i Gram-dodatnim bakteriom oraz jest inhibitorem elastazy neutrofilowej, katepsyny G, trypsyny, chymotrypsyny i chymazy. SLPI hamuje drogi aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Udział elafiny i SLPI w odpowiedzi zapalnej w przypadku infekcji wstępującej drogą przezszyjkową do macicy odgrywa rolę w etiologii porodu przedwczesnego [31]. W pracy, stanowiącej część niniejszej dysertacji, pod tytułem „**Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study**” przedstawiono skuteczność oceny obecności elafiny i SLPI w wydzielinie szyjkowo-pochwowej w predykcji porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. W próbkach wydzieliny, pobranych pomiędzy 20. a 24. tygodniem ciąży u bezobjawowych pacjentek w ciążach bliźniaczych, oznaczono mRNA elafiny i SLPI. Ekspresja elafiny i SLPI nie korelowała z czasem trwania ciąży, występowaniem porodu przedwczesnego przed 37. lub 34. tygodniem, występowaniem samoistnego porodu przedwczesnego, ani długością kanału szyjki macicy, ocenioną w badaniu ultrasonograficznym. Oba biomarkery charakteryzowały się niską czułością (54,6 vs. 60,6%), swoistością (50%), niskim LR+ (1,09 vs. 1,21) i wysokim LR- (0,91 vs. 0,79). W omawianym badaniu wykazano, iż elafina i SLPI nie są skutecznymi czynnikami predykcyjnymi porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej. Jest to pierwsze opublikowane badanie, dotyczące oceny ekspresji powyższych biomarkerów w predykcji powikłań w ciąży bliźniaczej.

Kolejna praca z cyklu w niniejszej dysertacji, zatytułowana „**Both low and high PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy are associated with increased risk of**

delivery before 32 weeks in twin gestation” stanowi retrospektywną analizę danych 304 kobiet w ciąży bliźniaczych, u których oznaczono stężenie białka PAPP-A w osoczu pomiędzy 11+0 a 13+6 tygodniem ciąży. Zaobserwowano, iż stężenie PAPP-A poniżej 10. percentyla dla danego wieku ciążowego wiązało się z podwyższonym ryzykiem ukończenia ciąży przed 37. tygodniem (RR 2,47; 95% CI 1,1–5,3), przed 34. tygodniem (RR 2,25; 95% CI 1,1–4,6) i przed 32. tygodniem (RR 2,72; 95% CI 1,3–5,5). Również stężenie PAPP-A powyżej 90. percentyla wiązało się z podwyższonym ryzykiem porodu przed 34. tygodniem (RR 3,46; 95% CI 1,6–7,5), przed 32. tygodniem (RR 2,48; 95% CI 1,1–5,3) i przed 28. tygodniem ciąży (RR 2,18; 95% CI 1,1–4,2). U pacjentek z niskim stężeniem białka PAPP-A istotnie częściej występowała samoistna czynność skurczowa macicy, skutkująca porodem (RR 2,05; 95% CI 1–4,2). Zaobserwowano także znamienne relacje pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a innymi powikłaniami ciąży bliźniaczej. Niskie stężenie PAPP-A wiązało się z ryzykiem wystąpienia w ciąży cukrzycy (RR 3,5; 95% CI 1,7–6,9), natomiast wysokie stężenie PAPP-A współwystępowało z niemal dziewięciokrotnie wyższym ryzykiem obumarcia wewnątrzmacicznego płodu (RR 8,9; 95% CI 3,1–11,5).

Analizując powyższe wyniki zaobserwowano, iż zarówno niskie, jak i wysokie stężenie PAPP-A wiąże się z częstszym przedwczesnym ukończeniem ciąży. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, iż ryzyko porodu przedwczesnego może nie charakteryzować się liniową zależnością od stężenia białka PAPP-A w osoczu w pierwszym trymestrze ciąży. W związku z tym przeprowadzono analizę uogólnionego modelowania addytywnego, wizualizując go w postaci funkcji sklejanych. Wykazano istotną liniową zależność ryzyka ukończenia ciąży przed 37. tygodniem od stężenia białka PAPP-A. Natomiast w przypadku porodu przed 34. tygodniem ciąży zaobserwowano podwójną znamiennej relację – zarówno liniową, jak i nieliniową. Relacja ta, zobrażowana jako funkcja sklejana o kształcie podobnym do litery U wykazała, iż zarówno niskie, jak i wysokie stężenia białka PAPP-A wiązały się z podwyższonym ryzykiem ukończenia ciąży przed 34. tygodniem. Analogiczna relacja została wykazana dla stężenia PAPP-A i ryzyka porodu przed 32. tygodniem ciąży. Najniższe ryzyko porodu przed 34. i przed 32. tygodniem występowało w przypadku stwierdzenia w pierwszym trymestrze ciąży stężenia białka PAPP-A o wartości 0,92 wielokrotności mediany (MoM). Nie wykazano różnic pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a ryzykiem porodu przedwczesnego pomiędzy ciążami bliźniaczymi jedno- i dwukosmówkowymi.

W piśmiennictwie światowym istnieją rozbieżne dane na temat zależności porodu przedwczesnego od stężenia białka PAPP-A w pierwszym trymestrze ciąży. Rosner i współ. przeanalizowali wyniki 340 kobiet w ciąży bliźniaczych i oszacowali, iż niskie stężenie PAPP-A wiąże się z ponad pięciokrotnie wyższym ryzykiem ukończenia ciąży przed 37. tygodniem [32]. W badaniu autorstwa Laughon i współ. pacjentki, u których stwierdzono niskie stężenie białka PAPP-A, niemal trzykrotnie częściej rodziły przed 32. tygodniem ciąży, natomiast wynik ten nie uzyskał istotności statystycznej [33]. Także inni autorzy nie odnotowali powyższych korelacji [34–36]. Praca, stanowiąca część niniejszej dysertacji, może stanowić wytłumaczenie obserwowanych rozbieżności. Niespójność publikowanych wyników może być wynikiem różnic w metodologii przeprowadzanych badań oraz włączania do analizy mniej licznych

grup badanych. Niezmiernie istotna jest jednak złożoność zależności pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a ryzykiem porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej, co wykazała powyższa praca. Rozbieżność wyników badań, opublikowanych w piśmiennictwie, może wynikać ze stopnia złożoności prawdziwych korelacji. Jako że stężenie białka PAPP-A jest zmienną ciągłą, zarówno liniowe, jak i nieliniowe zależności mogą mieć miejsce. W niniejszej pracy doktorskiej udowodniono, iż związek tego biomarkera z ryzykiem porodu przedwczesnego przed 32. tygodniem ciąży jest U-kształtny, pociągając za sobą konieczność stosowania bardziej złożonych metod analizy statystycznej. W związku z tym niewykrywanie zależności pomiędzy występowaniem porodu przedwczesnego czy innych powikłań ciąży bliźniaczej w publikowanych pracach nie musi świadczyć o braku takich korelacji, a jedynie o stosowaniu nieadekwatnych metod analizy statystycznej do stopnia złożoności obserwowanych zależności.

W niniejszym badaniu wykazano również, iż wysokie stężenie białka PAPP-A w pierwszym trymestrze ciąży wiąże się z podwyższonym ryzykiem obumarcia wewnątrzmacicznego płodu w ciąży bliźniaczej. Było to pierwsze opublikowanie doniesienie na ten temat. Dotychczas przeprowadzono badania, poszukujące takich zależności jedynie w ciąży pojedynczej [35].

Bez wątplenia niniejsza dysertacja uwidacznia nadal istniejącą ogromną potrzebę prowadzenia kolejnych badań w zakresie poszukiwania skutecznych czynników predykcyjnych powikłań ciąży wielopłodowych. Istotne jest odnalezienie biomarkera, który charakteryzowałby się cechami idealnego czynnika predykcji w analizie statystycznej i mógłby zostać użyty w prostym technicznie, tanim i szybkim teście o wysokiej powtarzalności wyników. Jednakże niniejsza dysertacja i płynące z niej wnioski zwraca uwagę również na konieczność zmiany podejścia do oceny badanych substancji, które mogłyby być używane w predykcji powikłań ciąży. Biologia ludzkiej rozrodczości jest bardzo złożonym zagadnieniem, a poszczególne czynniki biochemiczne powiązane są ze sobą w wielowymiarową sieć współzależności. W związku z tym w przyszłości, planując kolejne badania naukowe, dotyczące poszukiwania korelacji pomiędzy poszczególnymi czynnikami a występowaniem powikłań ciąży, należy mieć na uwadze złożoność możliwych zależności i poszukiwać ich w innych wymiarach niż liniowe, stosując odpowiednio zaawansowane narzędzia statystyczne.

Wnioski:

1. Ekspresja elafiny i wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej nie koreluje z ryzykiem porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej.
2. Elafina i wydzielniczy inhibitor proteiny leukocytarnej nie są skutecznymi czynnikami predykcyjnymi porodu przedwczesnego w ciąży bliźniaczej.
3. Ryzyko powikłań ciąży bliźniaczej jest zależne od stężenia białka PAPP-A w osoczu kobiet w ciąży bliźniaczej pomiędzy 11 a 13+6 tygodniem ciąży.
4. Zależność pomiędzy stężeniem białka PAPP-A a powikłaniami ciąży wykazuje inne niż liniowe relacje.

5. Istotne jest poszukiwanie skutecznego czynnika predykcyjnego powikłań ciąży bliźniaczej, biorąc pod uwagę możliwe liniowe i nieliniowe zależności pomiędzy biomarkerem a analizowanymi powikłaniami.
6. Oznaczenie stężenia białka PAPP-A jest stosowane w rutynowej diagnostyce aneuploidii w pierwszym trymestrze ciąży, wydaje się więc, że mógłby to być efektywny biomarker predykcyjny porodu przedwczesnego oraz wewnątrzmacicznego obumarcia płodu stosowany w praktyce klinicznej.

8. Bibliografia

1. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Mathews TJ, Kirmeyer S, Osterman MJ. Births: final data for 2007. *Natl Vital Stat Rep.* 2010;58(24):1-85. PMID: 21254725.
2. <https://www.statista.com/statistics/276022/us-multiple-birth-rate/>
3. Główny Urząd Statystyczny. Rocznik demograficzny 2020. GUS, 2021.
4. Lopriore E, Stroecken H, Sueters M, Meerman RJ, Walther F, Vandenbussche F. Term perinatal mortality and morbidity in monochorionic and dichorionic twin pregnancies: a retrospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(5):541-5. DOI: 10.1080/00016340802050668. PMID: 18446538.
5. Hack KE, Derks JB, Elias SG, Franx A, Roos EJ, Voerman SK, Bode CL, Koopman-Esseboom C, Visser GH. Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG.* 2008;115(1):58-67. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2007.01556.x.
6. Garabedian C, Poulain C, Duhamel A, Subtil D, Houfflin-Debarge V, Deruelle P. Intrapartum management of twin pregnancies: are uncomplicated monochorionic pregnancies more at risk of complications than dichorionic pregnancies? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015;94(3):301-7. DOI: 10.1111/aogs.12558.
7. Tarter JG, Khoury A, Barton JR, Jacques DL, Sibai BM. Demographic and obstetric factors influencing pregnancy outcome in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(5):910-2. DOI: 10.1067/mob.2002.123989. PMID: 12015510.
8. Goldenberg RL, Iams JD, Miodovnik M, Van Dorsten JP, Thurnau G, Bottoms S, Mercer BM, Meis PJ, Moawad AH, Das A, Caritis SN, McNellis D. The preterm prediction study: risk factors in twin gestations. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(4 Pt 1):1047-53. DOI: 10.1016/s0002-9378(96)80051-2. PMID: 8885774.
9. Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Osterman MJ, Mathews TJ. Births: final data for 2011. *Natl Vital Stat Rep.* 2013;62:169.
10. Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, Bomba-Opoń D, Olejek A, Sławska H, Zimmer M, Pomorski M, Bręborowicz G, Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Szymankiewicz M, Pikuła T, Oleszczuk J, Patro-Małyśza J, Marciniak B, Wielgoś M. Perinatal outcome according to chorionicity in twins - a Polish multicenter study. *Ginekol Pol.* 2016;87(5):384-9. DOI: 10.5603/GP.2016.0009. PMID: 27304656.
11. Burgess JL, Unal ER, Nietert PJ, Newman RB. Risk of late-preterm stillbirth and neonatal morbidity for monochorionic and dichorionic twins. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;210(6):578.e1-9. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.03.003. PMID: 24607757; PMCID: PMC4176937.
12. Blickstein I. Is it normal for multiples to be smaller than singletons? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(4):613-23. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2004.04.008. PMID: 15279820.
13. Ribicic R, Kranjcec I, Borosak J, Tumbri J, Mihovilovic Prajz L, Ribicic T. Perinatal outcome of singleton versus twin late preterm infants: do twins mature faster than singletons? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(9):1520-4. DOI: 10.3109/14767058.2015.1053449.

14. Papiernik E, Zeitlin J, Delmas D, Blondel B, Künzel W, Cuttini M, Weber T, Petrou S, Gortner L, Kollée L, Draper ES; MOSAIC Group. Differences in outcome between twins and singletons born very preterm: results from a population-based European cohort. *Hum Reprod.* 2010;25(4):1035-43. DOI: 10.1093/humrep/dep430. PMID: 20118116.
15. Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M, Roberts J, McNellis D. Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(4):938-42. doi: 10.1016/s0002-9378(00)70350-4. PMID: 10764477.
16. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005;330(7491):565. DOI: 10.1136/bmj.38380.674340.E0. PMID: 15743856; PMCID: PMC554027.
17. Rauh-Hain JA, Rana S, Tamez H, Wang A, Cohen B, Cohen A, Brown F, Ecker JL, Karumanchi SA, Thadhani R. Risk for developing gestational diabetes in women with twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(4):293-9. DOI: 10.1080/14767050802663194. PMID: 19340713.
18. Gonzalez MC, Reyes H, Arrese M, Figueroa D, Lorca B, Andresen M, Segovia N, Molina C, Arce S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol.* 1989;9(1):84-90. DOI: 10.1016/0168-8278(89)90079-2. PMID: 2768798.
19. Conde-Agudelo A, Romero R. Prediction of preterm birth in twin gestations using biophysical and biochemical tests. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(6):583-595. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.07.047
20. Gibson JL, Macara LM, Owen P, Young D, Macauley J, Mackenzie F. Prediction of preterm delivery in twin pregnancy: a prospective, observational study of cervical length and fetal fibronectin testing. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;23(6):561-6. DOI: 10.1002/uog.1048. PMID: 15170796.
21. Hofmeister C, Brizot Mde L, Liao A, Francisco RP, Zugaib M. Two-stage transvaginal cervical length screening for preterm birth in twin pregnancies. *J Perinat Med.* 2010;38(5):479-84. DOI: 10.1515/jpm.2010.088. PMID: 20629488.
22. Conde-Agudelo A, Romero R, Hassan SS, Yeo L. Transvaginal sonographic cervical length for the prediction of spontaneous preterm birth in twin pregnancies: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(2):128.e1-12. DOI: 10.1016/j.ajog.2010.02.064. PMID: 20576253; PMCID: PMC3147231.
23. Conde-Agudelo A, Romero R. Cervicovaginal fetal fibronectin for the prediction of spontaneous preterm birth in multiple pregnancies: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Dec;23(12):1365-76. doi: 10.3109/14767058.2010.499484. PMID: 21067303; PMCID: PMC3418880.
24. Conde-Agudelo A, Romero R. Cervical phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 test for the prediction of preterm birth: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(1):57-73. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.06.060
25. Barinov SV, Di Renzo GC, Belinina AA, Koliado OV, Remneva OV. Clinical and biochemical markers of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021;24:1-6. DOI: 10.1080/14767058.2021.1892064. PMID: 33627033.

26. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science. 2014;345(6198):760-5. DOI: 10.1126/science.1251816. PMID: 25124429
27. Hagberg H, Mallard C, Jacobsson B. Role of cytokines in preterm labour and brain injury. BJOG. 2005;112 Suppl 1:16-8. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2005.00578.x. PMID: 15715588.
28. Rode L, Klein K, Larsen H, Holmskov A, Andreassen KR, Uldbjerg N, Ramb J, Bødker B, Skibsted L, Sperling L, Hinterberger S, Krebs L, Zingenberg H, Weiss EC, Strobl I, Laursen L, Christensen JT, Skogstrand K, Hougaard DM, Krampfl-Bettelheim E, Rosthøj S, Vogel I, Tabor A. Cytokines and the risk of preterm delivery in twin pregnancies. Obstet Gynecol. 2012;120(1):60-8. DOI: 10.1097/AOG.0b013e31825bc3cd. PMID: 22914392.
29. Gilman-Sachs A, Dambaeva S, Salazar Garcia MD, Hussein Y, Kwak-Kim J, Beaman K. Inflammation induced preterm labor and birth. J Reprod Immunol. 2018;129:53-58. DOI: 10.1016/j.jri.2018.06.029. PMID: 30025845.
30. Abbott DS, Chin-Smith EC, Seed PT, Chandiramani M, 3. Shennan AH, Tribe RM. Raised Trappin2/elafin Protein in Cervico-Vaginal Fluid Is a Potential Predictor of Cervical Shortening and Spontaneous Preterm Birth. Landay A. PLoS ONE. 2014;9(7):e100771. DOI: org/10.1371/journal.pone.0100771
31. Itaoka N, Nagamatsu T, Schust DJ, Ichikawa M, Sayama S, Iwasawa-Kawai Y, Kawana K, Yamashita T, Osuga Y, Fujii T. Cervical Expression of Elafin and SLPI in Pregnancy and Their Association With Preterm Labor. Am J Reprod Immunol. 2015;73(6):536-44. DOI: 10.1111/aji.12354. PMID: 25559229.
32. Rosner JY, Fox NS, Saltzman D, Klauser CK, Rebarber A, Gupta S. Abnormal Biochemical Analytes Used for Aneuploidy Screening and Adverse Pregnancy Outcomes in Twin Gestations. Am J Perinatol. 2015;32(14):1331-5. DOI: 10.1055/s-0035-1564428. PMID: 26375045.
33. Laughon SK, Rebarber A, Rolnitzky L, Fink L, Saltzman DH. Decreased first-trimester maternal serum free-beta subunit human chorionic gonadotropin and preterm birth in twin gestations. Am J Perinatol. 2009;26(7):491-4. DOI: 10.1055/s-0029-1214250. PMID: 19288397.
34. Iskender C, Tarım E, Çok T, Yalcinkaya C, Kalaycı H, Yanık FB. Obstetrical complications associated with first-trimester screening markers in twin pregnancies. J Obstet Gynaecol Res. 2013;39(11):1495-9. DOI: 10.1111/jog.12091. PMID: 23855638.
35. Fathian A, Miller R, Wolf E. Analysis of first trimester markers, PAPP-A and free-hCG, and adverse outcomes in twin pregnancies. Am J Obstet Gynecol. 2014;214:S135.
36. Chasen ST, Martinucci S, Perni SC, Kalish RB. First-trimester biochemistry and outcomes in twin pregnancy. J Reprod Med. 2009;54(5):312-4. PMID: 19517696.

9. Opinia Komisji Bioetycznej



**Komisja Bioetyczna
przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym**

Tel.: 022/ 57 - 20 -303

Fax: 022/ 57 - 20 -165

**ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa**

**e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl**

Warszawa, dnia 11 marca 2019 r

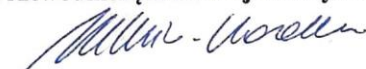
AKBE/100 / 2019

**Dr hab. n.med. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska,
I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii
Pl. Starynkiewicza 1/3,
02-015 Warszawa**

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 11 marca 2019r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt.: „Ocena zależności pomiędzy wartościami PAPP-A i wolnej podjednostki β HCG w pierwszym tryestrze a wynikami położniczymi w ciążach bliźniaczych ”. Przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz.U. z 2018 r. poz. 617) i nie wymaga uzyskania opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust. 1 ww. ustawy.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...../2016

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

w dniu 12 kwietnia 2016 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

dr n. med. Iwona Szymusik
I Katedra Położnictwa i Ginekologii
ul. Pl. Starynkiewicza 1/3. 02-015 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt. „Ocena przydatności klinicznej elafiny i inhibitora sekrecyjnej proteazy leukocytowej (SLPI) w wydzielinie z kanału szyjki macicy w szacowaniu ryzyka porodu przedwczesnego w ciążach bliźniaczych”,

wyraża następującą
opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*

Uwagi Komisji – *verte*

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOŚ z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Wierzbicki

*niepotrzebne skreślić

10. Oświadczenia współautorów publikacji

Wkład merytoryczny i procentowy poszczególnych autorów:

Saletra-Bielińska A, Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, et al. Both Low and High PAPP-A Concentrations in the First Trimester of Pregnancy Are Associated with Increased Risk of Delivery before 32 Weeks in Twin Gestation. *J Clin Med.* 2020 : 9, (7), [1-8], [Article number: E2099] Published 2020 Jul 3. doi:10.3390/jcm9072099

Aleksandra Saletra-Bielińska - zbieranie danych - zbieranie materiałów - przegląd literatury - przygotowanie manuskryptu	55 % Aleksandra Saletra-Bielińska LEK 3301712
Katarzyna Kosińska-Kaczyńska - przygotowanie koncepcji i założeń pracy - nadzór merytoryczny nad pracą - przygotowanie manuskryptu - modyfikacja i udoskonalenie ostatecznej wersji manuskryptu	10% prof. CMKP dr hab. n. med. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska specjalista ginekologii, położnictwa i perinatologii 1988735
Iwona Szymusik - przygotowanie koncepcji i założeń pracy - nadzór merytoryczny nad pracą	5% Dr hab. n. med. Iwona Szymusik specjalista położnictwa i ginekologii, endokrynologii i ginekologicznej rozrodczości 1884110
Bartosz Kaczyński - analiza statystyczna danych	5% Bartosz Kaczyński
Robert Brawura-Biskupski-Samaha - zbieranie danych	5% dr n. med. i n. o zdr. Robert Brawura Biskupski Samaha Specjalista Położnictwa i Ginekologii PERINATOLOG Diploma FMF 2359181
Szymon Kozłowski - zbieranie danych	5% SZYMON KOZŁOWSKI SPECJALISTA POŁOŻNICTWA I GINEKOLOGII PERINATOLOG 2165038 FMF 80329

Patrycja Jarmużek - zbieranie danych	5% <i>Drn. med. Patrycja Jarmużek-Orska</i> specjalista położnictwa i ginekologii 2582358
Izabela Walasik - zbieranie danych	5% Izabela Walasik lekarz 3786814
Mirosław Wielgoś - akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu	5% Prof. dr hab. n. med MIROSLAW WIELGOŚ Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii UM Warszawa, Pl. Szczęśliwicza 1/3 9565329

Saletra-Bielińska A, Kosińska-Kaczyńska K, Szymusik I, Niderla-Bielińska J, Malejczyk J, Wielgoś M. Cervical expression of elafin and secretory leukocyte peptidase inhibitor does not predict preterm delivery in twin pregnancy – results from a pilot study. JMS [Internet]. 2021 Feb. 24 [cited 2021 Jun. 30];90(1):e490. Available from: <http://www.jms.ump.edu.pl/index.php/JMS/article/view/490>

Aleksandra Saletra-Bielińska - zbieranie danych - zbieranie materiałów - przegląd literatury - przygotowanie manuskryptu	60% Aleksandra Saletra-Bielińska LEKARZ 33 4 2
Katarzyna Kosińska-Kaczyńska - przygotowanie koncepcji i założeń pracy - nadzór merytoryczny nad pracą - przygotowanie manuskryptu - modyfikacja i udoskonalenie ostatecznej wersji manuskryptu	10% prof. CMKP dr hab. n. med. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska specjalista ginekologii, położnictwa i perinatologii 1988735
Iwona Szymusik - zbieranie danych - nadzór merytoryczny nad pracą	10% Dr hab. n. med. Iwona Szymusik specjalista położnictwa i ginekologii, endokrynologii i ginekologicznej rozrodczości 1884110
Justyna Niderla-Bielińska - wykonanie i opracowanie badań laboratoryjnych - konsultacje merytoryczne w zakresie manuskryptu	10% J. Niderla
Jacek Malejczyk - akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu	5% KIEROWNIK Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Mirosław Wielgoś - akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu	5% Prof. dr hab. n. med. MIROSŁAW WIELGOŚ Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii WZ/UM Warszawa, Pl. Starożytności 13 0565328