



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Adriana Bokulić

**KONCENTRACIJA KROMOGRANINA A I  
KATESTATINA TIJEKOM VAGINALNOG  
POROĐAJA U TRUDNICA S  
GESTACIJSKOM HIPERTENZIJOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori(i):

izv. prof. dr. sc. Marija Grdić Rajković

doc. dr. sc. Dražan Butorac

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Adriana Bokulić

**CONCENTRATION OF CHROMOGRANIN  
A AND CATESTATIN DURING VAGINAL  
DELIVERY IN WOMEN WITH  
GESTATIONAL HYPERTENSION**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor(s):

Assoc. Prof. Marija Grdić Rajković, PhD

Assist. Prof. Dražan Butorac, PhD

Zagreb, 2026

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marije Grdić Rajković i doc. dr. sc. Dražana Butorca, u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.



## SAŽETAK

Hipertenzivni poremećaji trudnoće predstavljaju značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta majki i novorođenčadi. Kromogranin A je neuroendokrini protein koji proteolitičkim cijepanjem stvara brojne aktivne peptide, uključujući katestatin, koji inhibira oslobađanje katekolamina i pokazuje vazodilatacijska svojstva.

Cilj je bio istražiti dinamiku promjena koncentracija kromogranina A i katestatina tijekom porođaja, moguće razlike u koncentracijama kod gestacijske hipertenzije te njihovu povezanost s ishodima trudnoće budući da kromogranin A i katestatin pokazuju dijagnostički potencijal u hipertenzivnim poremećajima trudnoće.

Ovo prospektivno istraživanje provedeno je na Zavodu za porodništvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Uključivalo je 40 trudnica: 20 s gestacijskom hipertenzijom liječenih metildopom i 20 zdravih kontrola. Uzorci krvi prikupljeni su prije (prije početka trudnova) i poslije (2 sata nakon) porođaja. Iz uzorka prije porođaja izmjerene su koncentracije općih biokemijskih i endokrinoloških parametara. U obje vremenske točke izmjerene su koncentracije kromogranina A i katestatina. Zabilježene su kliničke i antropometrijske karakteristike trudnica i novorođenčadi.

Koncentracija kromogranina A značajno se smanjila nakon porođaja u obje skupine, dok koncentracije katestatina nisu pokazale statistički značajnu promjenu. Nisu pronađene razlike u koncentracijama kromogranina A i katestatina između skupina ni prije ni poslije porođaja. Kod trudnica s fetusima ženskog spola izmjerene su niže koncentracije katestatina u skupini s gestacijskom hipertenzijom. Nije pronađena povezanost s Apgarovim indeksom ni s percentilima porođajne mase novorođenčadi. Samo u kontrolnoj skupini koncentracija katestatina bila je povezana s vrijednostima krvnog tlaka. Regresijska analiza pokazala je da indeks tjelesne mase predstavlja najvažniji prediktor gestacijske hipertenzije i povišenog krvnog tlaka, dok kromogranin A i katestatin nemaju kliničku vrijednost.

Rezultati ovog istraživanja upućuju da kromogranin A i katestatin trenutačno nemaju kliničku vrijednost u predviđanju gestacijske hipertenzije. Indeks tjelesne mase ostaje ključni prediktor, što naglašava važnost savjetovanja o tjelesnoj masi prije i tijekom trudnoće.

Ključne riječi: kromogranin A, katestatin, gestacijska hipertenzija, trudnoća

## SUMMARY

**Background:** Hypertensive disorders in pregnancy represent one of the leading causes of maternal and neonatal morbidity and mortality worldwide, affecting approximately 5–10 % of all pregnancies. Gestational hypertension, defined as new-onset hypertension after 20 weeks of gestation without proteinuria, poses substantial risks to both maternal and foetal health. Chromogranin A is an acidic glycoprotein belonging to the granin family, stored in secretory granules of neuroendocrine cells throughout the body, including the adrenal medulla, sympathetic nervous system, and placental tissues. Chromogranin A contributes to the regulation of catecholamine storage and release. It also acts as a precursor for bioactive peptides with multiple functions, including catestatin. Catestatin acts as an endogenous nicotinic cholinergic antagonist, inhibiting catecholamine release. Apart from modulating sympathetic activity, catestatin exhibits direct vasodilatory properties through nitric oxide-dependent and independent mechanisms, suggesting involvement in blood pressure regulation. The placenta is an important source of chromogranin A and its related peptides. In complicated pregnancies, these levels may be altered, potentially contributing to or reflecting the processes behind hypertensive disorders.

**Aim:** The primary hypothesis of this study was that pregnant women with gestational hypertension exhibit higher chromogranin A and lower catestatin concentrations before delivery compared to the postpartum period. The study's aims were to investigate longitudinal changes in these markers, compare concentrations between women with gestational hypertension and healthy controls, assess associations with clinical parameters and neonatal outcomes, and evaluate their predictive value.

**Participants and Methods:** This prospective cohort study enrolled 40 pregnant women: 20 with gestational hypertension treated with methyldopa and 20 healthy controls. Venous blood was collected before delivery and postpartum (2 hours after delivery). Clinical and anthropometric data were collected, including age, parity, height, pre-delivery weight, and body mass index (BMI). Blood pressure was measured using standardised protocols. Neonatal outcomes included birth weight, length, sex, Apgar scores, and birth weight centiles. Statistical analyses employed non-parametric tests due to the small sample size. Continuous variables were presented as median with interquartile range. Spearman's rank correlation analysis was used to assess relationships between biomarkers and clinical parameters. Logistic regression

evaluated predictors of gestational hypertension, and multiple linear regression examined associations with blood pressure. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results:** Chromogranin A concentrations before delivery showed a median of 58.7 ng/mL (47.0–67.8) in controls, decreasing significantly to 42.1 ng/mL (35.8–53.4) after delivery ( $P < 0.001$ ). In the gestational hypertension group, pre-delivery chromogranin A measured 46.1 ng/mL (40.0–65.1), decreasing significantly to 35.2 ng/mL (30.5–45.5) postpartum ( $P < 0.001$ ). This represented a 23 % reduction in both groups, indicating a consistent physiological response independent of hypertensive status. Catestatin concentrations remained stable in both groups, with median values of 4.5 (3.7–6.1) ng/mL before and 5.2 (3.9–6.7) ng/mL after delivery in controls, and 3.9 (3.2–5.1) ng/mL before and 3.9 (3.3–5.7) ng/mL after delivery in the gestational hypertension group (both  $P > 0.05$ ). Comparisons between groups revealed no statistically significant differences in chromogranin A or catestatin concentrations at either time point. In gestational hypertension, catestatin showed significant sex-dependent patterns. Women with gestational hypertension carrying female fetuses had significantly lower catestatin than control women carrying female fetuses ( $P = 0.046$ ), whereas no difference existed for male fetuses. Chromogranin A and catestatin showed no significant correlation with each other in either group. In controls, catestatin demonstrated significant positive correlations with systolic blood pressure ( $\rho = 0.536$ ,  $P = 0.015$ ) and diastolic blood pressure ( $\rho = 0.470$ ,  $P = 0.036$ ). These correlations between catestatin and blood pressure were absent in gestational hypertension. Chromogranin A showed no significant correlations with blood pressure in either group. Neither biomarker demonstrated significant associations with neonatal birth weight centiles. Methyldopa dose showed no significant correlations with chromogranin A, catestatin, or blood pressure values. Logistic regression analysis revealed that the overall model was statistically significant ( $P = 0.001$ ) and explained approximately 49.5 % of the variance. BMI was the only statistically significant predictor with an odds ratio of 1.458 ( $P = 0.007$ ). Neither chromogranin A nor catestatin showed significant predictive value. Multiple linear regression for systolic blood pressure showed that only BMI was significant ( $P = 0.038$ ), with each unit increase associated with a 1.444 mmHg increase. Chromogranin A and catestatin showed no significant associations. For diastolic blood pressure, the overall model was not statistically significant, and none of the predictors showed a significant association.

**Conclusions:** This study investigated chromogranin A and catestatin as potential biomarkers in gestational hypertension, yielding results that partially support the hypothesis. Chromogranin A concentrations decreased significantly following delivery in both groups, confirming the first part of the hypothesis. However, catestatin levels remained stable throughout the peripartum period, contradicting the hypothesis of decreased postpartum concentrations. The consistent decrease in chromogranin A following delivery in both normotensive and hypertensive women suggests a physiological response regardless of hypertensive status, possibly reflecting the removal of placental sources. Catestatin stability despite marked chromogranin A changes indicates distinct regulatory mechanisms, potentially involving differences in production, degradation, or clearance. The absence of significant differences in chromogranin A or catestatin between gestational hypertension and controls indicates that neither biomarker provides diagnostic utility for identifying gestational hypertension. The sex-specific catestatin finding, with significantly lower levels in women with gestational hypertension carrying female foetuses, suggests foetal sex may modulate peptide production or metabolism in hypertensive pregnancy, aligning with evidence that foetal sex influences pregnancy physiology and pathology. The loss of catestatin-blood pressure correlation in gestational hypertension, despite significant positive correlations in controls, represents an important finding. In a healthy pregnancy, this correlation may reflect a compensatory mechanism whereby higher blood pressure stimulates increased catestatin production to limit further elevation. Disruption in gestational hypertension could indicate exhausted compensatory mechanisms or methyldopa effects. Regression analyses identified BMI as the most important predictor of gestational hypertension, explaining nearly 50 % of the variance. This reinforces the well-established relationship between maternal obesity and hypertensive disorders. Neither chromogranin A nor catestatin demonstrated predictive value when clinical factors were considered. In conclusion, although chromogranin A undergoes significant peripartum changes and catestatin exhibits sex-specific patterns, neither biomarker currently provides clinical utility for the diagnosis, prediction, or monitoring of gestational hypertension. BMI remains a significant risk factor, underscoring the continued need for weight counselling in prenatal care. The loss of catestatin-blood pressure correlation and sex-specific findings warrant further investigation.

**Keywords:** chromogranin A, catestatin, gestational hypertension, pregnancy

## SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Fiziološke promjene u trudnoći.....	1
1.1.1	Kardiovaskularne prilagodbe.....	1
1.1.2	Bubrežne prilagodbe .....	2
1.1.3	Promjene u sustavu koagulacije.....	2
1.1.4	Promjene u metabolizmu glukoze i masti.....	3
1.1.5	Promjene u endokrinološkom sustavu .....	3
1.1.6	Utjecaj promjena na krvni tlak .....	3
1.2	Trudnoća i porođaj .....	5
1.3	Hipertenzivni poremećaji u trudnoći .....	6
1.3.1	Podjela hipertenzivnih poremećaja u trudnoći.....	7
1.3.2	Etiologija novonastale hipertenzije u trudnoći .....	8
1.3.3	Rizični čimbenici za razvoj hipertenzije .....	10
1.3.4	Liječenje hipertenzije u trudnoći .....	11
1.4	Kromogranin A .....	12
1.4.1	Fragmenti kromogranina .....	16
1.4.2	Dijagnostička uloga kromogranina A i katestatina.....	19
1.5	Kromogranin A i katestatin u hipertenziji .....	19
1.5.1	Kromogranin A i katestatin u hipertenzivnim poremećajima trudnoće .	21
2	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	23
2.1	Hipoteza istraživanja .....	23
2.2	Specifični ciljevi istraživanja .....	23
3	ISPITANICI I METODE .....	24
3.1	Ispitanici .....	24
3.2	Etičko odobrenje.....	25

3.3	Klinički i antropometrijski parametri .....	25
3.4	Uzorci .....	27
3.5	Metode .....	28
3.5.1	Biokemijski parametri .....	28
3.5.2	Endokrinološki parametri.....	30
3.5.3	Određivanje koncentracije kromogranina A i katestatina .....	32
3.6	Statistička analiza i prikaz podataka.....	34
4	REZULTATI .....	36
4.1	Demografske i kliničke karakteristike trudnica i novorođenčadi.....	36
4.2	Biokemijske i endokrinološke pretrage .....	38
4.3	Longitudinalna promjena koncentracije kromogranina A i katestatina .....	39
4.3.1	Razlike u apsolutnim i relativnim promjenama koncentracije .....	41
4.4	Usporedba koncentracija kromogranina A i katestatina između skupina prije porođaja .....	43
4.5	Usporedba koncentracija kromogranina A i katestatina između skupina poslije porođaja .....	43
4.6	Utjecaj spola fetusa na koncentracije kromogranina A i katestatina.....	43
4.7	Korelacijska analiza kromogranina A i katestatina s kliničkim parametrima	45
4.8	Predviđanje gestacijske hipertenzije .....	47
4.9	Povezanost kromogranina A i katestatina s krvnim tlakom .....	48
5	RASPRAVA .....	50
5.1	Biokemijski i klinički parametri .....	50
5.2	Kromogranin A i katestatin u gestacijskoj hipertenziji.....	51
5.3	Longitudinalne promjene kromogranina A i katestatina tijekom porođaja...	54
5.4	Utjecaj spola fetusa na kromogranin A i katestatin.....	55
5.5	Povezanost kromogranina A i katestatina s krvnim tlakom .....	56
5.6	Povezanost s neonatalnim ishodima .....	58

5.7	Utjecaj doze metildope .....	59
5.8	Prediktori gestacijske hipertenzije .....	60
5.9	Ograničenja istraživanja .....	61
6	ZAKLJUČAK .....	63
7	POPIS LITERATURE.....	65
8	POPIS KRATICA.....	78
9	ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	81
9.1	Životopis.....	81
9.2	Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja.....	82

## **1 UVOD**

### **1.1 Fiziološke promjene u trudnoći**

Trudnoća predstavlja razdoblje brojnih promjena s ciljem prilagodbe na novonastalo stanje (1,2). Cilj prilagodbe jest osigurati dovoljan protok krvi kroz posteljicu potreban za razvoj ploda te pripremu majčinog tijela za porođaj (3,4). Gotovo svi organski sustavi zahvaćeni su ovom prilagodbom, pri čemu se javljaju fiziološke promjene u funkciji kardiovaskularnog sustava, bubrega, metabolizma ugljikohidrata i masti, promjene u sustavu koagulacije te brojne endokrinološke promjene (1,2).

#### **1.1.1 Kardiovaskularne prilagodbe**

Kardiovaskularne promjene tijekom trudnoće dovode do povećanja minutnog volumena srca i preraspodjele protoka krvi prema maternici, uz regulaciju porasta arterijskog tlaka (3,5). Navedene promjene započinju rano u trudnoći, a dosežu vrhunac u sredini i kasnoj trudnoći (2,5).

Dolazi do značajnog povećanja ukupnog volumena krvi, pri čemu se volumen plazme povećava za približno 40 – 50 % iznad razina prije trudnoće (6). Povećanje volumena plazme proporcionalno je veće od povećanja mase eritrocita, što rezultira fiziološkom anemijom (5). Povećanje volumena krvi osigurava potrebnu perfuziju i oksigenaciju maternice, posteljice, ploda i ostalih majčinih tkiva te se na taj način dopremaju nužni nutrijenti za razvoj samog ploda. Također, trudnica se štiti od hipovolemičnih epizoda tijekom porođaja (1,5).

Minutni volumen srca tijekom trudnoće povećava se za približno 30 – 50 % iznad vrijednosti prije trudnoće (4,5). Povećanje minutnog volumena rezultat je kombinacije povećanog udarnog volumena i povećane frekvencije srca (5). Promjene su posredovane neurohormonalnim signalima, uključujući aktivaciju simpatičkog živčanog sustava i utjecaj hormona posteljice kao što su estrogen i progesteron (2,5).

Usporedno s povećanjem minutnog volumena, dolazi do smanjenja sistemskog vaskularnog otpora, koje započinje u ranoj trudnoći i nastavlja se tijekom cijele trudnoće (2,5). Vazodilatacija je posredovana različitim čimbenicima, uključujući povećanu proizvodnju dušikovog oksida, promjene u vaskularnom tonusu posredovane progesteronom, te vazodilatatorima koje proizvodi posteljica. Smanjeni

vaskularni otpor olakšava povećani protok krvi prema posteljici i omogućuje optimalnu razmjenu hranjivih tvari i kisika između majke i fetusa (5,7).

### **1.1.2 Bubrežne prilagodbe**

Bubrežni sustav doživljava promjene kako bi podržao povećani metabolički klirens te retenciju natrija i vode potrebnu za povećanje volumena krvi (1,2). Jedna od najizraženijih bubrežnih prilagodbi je povećanje bubrežnog protoka krvi i brzine glomerularne filtracije (GFR). GFR se povećava za približno 40 – 50 % iznad bazalnih vrijednosti (5). Kao rezultat povećanog GFR-a, serumske koncentracije kreatinina i ureje niže su u trudnoći nego prije trudnoće (1,2).

Renin-angiotenzin-aldosteron sustav (RAAS) aktivira se tijekom trudnoće, s povećanim koncentracijama renina, angiotenzina II i aldosterona (1,5). Ova je aktivacija bitna u regulaciji volumena krvi i elektrolita tijekom trudnoće (2). Povećana aktivnost RAAS-a potiče retenciju natrija i vode u bubrezima, što doprinosi povećanju volumena plazme (1,6). Unatoč povećanim koncentracijama angiotenzina II, trudnice obično ne razvijaju hipertenziju zbog smanjene vaskularne osjetljivosti na angiotenzin II, što je posredovano različitim mehanizmima uključujući povećanu proizvodnju vazodilatacijskih prostaglandina i dušikovog oksida (5).

### **1.1.3 Promjene u sustavu koagulacije**

Tijekom trudnoće, ravnoteža sustava koagulacije (hemostaze) pomaknuta je u smjeru hiperkoagulabilnog stanja kao rezultat pojačane aktivacije sustava zgrušavanja i smanjenja fibrinolitičke aktivnosti (2). Glavni cilj promjena je zaštita majke od krvarenja tijekom porođaja (8). Međutim, ove promjene također povećavaju rizik od tromboembolijskih događaja tijekom trudnoće i postporođajnog razdoblja (5). Dolazi do značajnog povećanja koncentracija većine čimbenika zgrušavanja i fibrinogena. Navedene promjene započinju u ranom drugom tromjesečju i progresivno se povećavaju tijekom trudnoće i dosežu vrhunac neposredno pred porođaj. Usporedno s povećanjem prokoagulantnih čimbenika, dolazi do fiziološkog smanjenja inhibitora koagulacije proteina S i smanjene fibrinolitičke aktivnosti. Broj trombocita blago pada zbog povećane potrošnje i razrjeđenja uslijed povećanja volumena plazme, ali obično ostaje u referentnom rasponu. Međutim, trombociti pokazuju povećanu aktivnost i sposobnost agregacije, što dodatno doprinosi prokoagulantnom stanju (2).

#### **1.1.4 Promjene u metabolizmu glukoze i masti**

Glavni energetska izvor fetusa je glukoza, dok se metabolizam majke preusmjerava na korištenje masti i proteina (9,10). U prvom tromjesečju počinje stimulacija i hipertrofija  $\beta$ -stanica gušterače, koja se dodatno potiče u drugom i trećem tromjesečju zbog fiziološke inzulinske rezistencije (11,12). Svrha je održati optimalnu koncentraciju glukoze u krvi majke i osigurati dovoljnu opskrbu fetusa glukozom (13,14). Koncentracije triglicerida se značajno povećavaju i dosežu vrhunac u trećem tromjesečju. Ukupni kolesterol i lipoprotein niske gustoće (LDL-kolesterol, engl. *low density lipoprotein*) također rastu, dok lipoprotein visoke gustoće (HDL-kolesterol, engl. *high density lipoprotein*) blago pada (15,16). Ove promjene omogućuju pohranu majčinih masnih zaliha u ranoj trudnoći i pružaju alternativne energetske izvore u kasnoj trudnoći te čuvaju glukozu za potrebe fetusa (17,18).

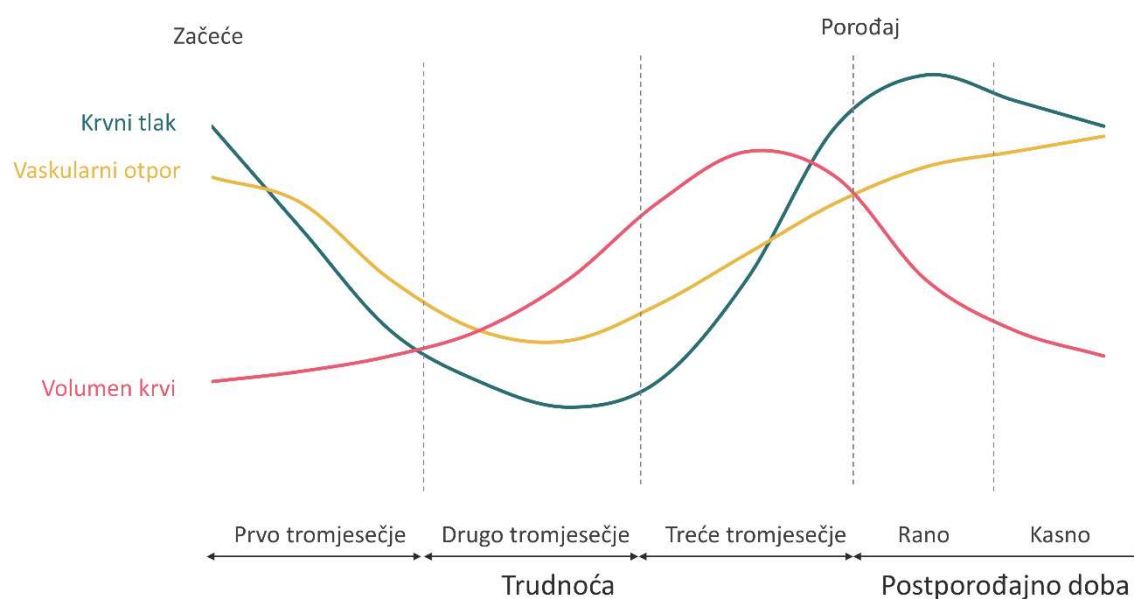
#### **1.1.5 Promjene u endokrinološkom sustavu**

Posteljica djeluje kao glavna endokrina žlijezda tijekom trudnoće te proizvodi brojne hormone koji utječu na majčin metabolizam (19,20). Humani placentalni laktogen (hPL, engl. *human placental lactogen*) potiče inzulinsku rezistenciju, lipolizu i glukoneogenezu čime preusmjerava majčine metaboličke supstrate prema fetusu (21,22). Humani korionski gonadotropin (hCG, engl. *human chorionic gonadotropin*), estrogen, progesteron, relaksin i placentalni čimbenik rasta također doprinose metaboličkim prilagodbama (23–25). Dolazi do promjene brojnih drugih hormona, a sama promjena ovisi o tjednu trudnoće (19). Oko 10. tjedna trudnoće javlja se vršna koncentracija hCG-a koja, zbog strukturne homologije s tireotropnim hormonom, dovodi do blagog smanjenja koncentracije tog hormona (26). Koncentracija prolaktina kontinuirano raste tijekom trudnoće kao priprema za laktaciju (27). Svrha svih tih promjena je održavanje trudnoće, prilagodba metabolizma majke i priprema za porođajno i postporođajno doba (19,23).

#### **1.1.6 Utjecaj promjena na krvni tlak**

Vrijednosti arterijskog tlaka mijenjaju se tijekom trudnoće kao rezultat postupnih promjena u kardiovaskularnom, bubrežnom i endokrinološkom sustavu (Slika 1). U prvom tromjesečju dolazi do pada krvnog tlaka, što je osobito vidljivo u vrijednostima dijastoličkog krvnog tlaka (28). Navedeni pad je rezultat sistemske vazodilatacije

uzrokovane hormonalnim promjenama, uključujući povećanje koncentracija estrogena, progesterona i relaksina, koji posreduju u otpuštanju dušikovog oksida (24,29). Između 20. i 24. tjedna trudnoće vrijednosti krvnog tlaka dosežu najniže vrijednosti (30). Prosječno smanjenje srednjeg arterijskog tlaka može iznositi oko 8 mmHg u odnosu na početne vrijednosti (31). U trećem tromjesečju sistolički i dijastolički krvni tlak postupno rastu, u prosjeku za oko 8 mmHg, sve do porođaja (32,33). Neposredno nakon porođaja krvni tlak pada, a zatim ponovno raste, uz vršne vrijednosti sistoličkog tlaka između 3. i 5. dana te dijastoličkog tlaka između 5. i 7. dana nakon porođaja. Porast krvnog tlaka odmah nakon porođaja i uklanjanja posteljice posljedica je smanjene koncentracije vazodilatacijskih hormona podrijetlom iz posteljice. Dodatno, dolazi do nagle preraspodjele tjelesnih tekućina. Krvni tlak se obično normalizira unutar dva tjedna nakon porođaja (34).



**Slika 1.** Promjene krvnog tlaka tijekom trudnoće.

*Slika prikazuje fiziološke promjene krvnog tlaka, sistemskog vaskularnog otpora i volumena krvi po tromjesečjima trudnoće te u ranom (do 2 tjedna poslije porođaja) i kasnom (2 do 12 tjedana poslije porođaja) postporođajnom dobu. Prilagođeno prema Countouris i suradnici (32).*

## 1.2 Trudnoća i porođaj

Trudnoća prosječno traje 40 tjedana računajući od prvog dana posljednje menstruacije (35). Dijeli se na tromjesečja (trimestra) koja predstavljaju različite faze fetalnog razvoja i majčine prilagodbe. Prvo tromjesečje obuhvaća razdoblje od začeća do kraja 13. tjedna trudnoće, u kojem se stvaraju svi glavni organski sustavi fetusa. U drugom tromjesečju (14. – 27. tjedan trudnoće) nastavlja se ubrzani rast fetusa. U trećem tromjesečju (od 28. tjedna trudnoće do porođaja) usporava se fetalni rast, dovršava se sazrijevanje organa, a majčin organizam se priprema za porođaj putem hormonalnih i strukturnih promjena maternice i vrata maternice (cerviksa) (36).

Pojam terminski porođaj odnosi se na porođaj koji se odvija između 37+0 i 41+6 tjedana trudnoće. Terminski porođaj se dodatno dijeli na rani (37+0 – 38+6 tjedana), puni (39+0 – 40+6 tjedana) i kasni termin (41+0 – 41+6 tjedana). Porođaji u punom terminu (39. – 40. tjedan) povezani su s najboljim ishodima za majku i dijete (35). Normalan porođaj je koordinirani fiziološki proces kojim se fetus izbacuje iz maternice uz redovite kontrakcije maternice, a završava izbacivanjem posteljice i postupnom involucijom maternice (37,38). Porođaj je složen proces koji zahtijeva usklađenu koordinaciju između majke, fetusa i posteljice, uz brojne hormonalne, mehaničke i imunološke signale (37).

Porođaj može biti vaginalni ili završen kirurškim zahvatom (carskim rezom) (38). Vaginalni porođaj može započeti spontano ili indukcijom (37). Indukcija porođaja je medicinski postupak kojim se umjetno pokreću kontrakcije maternice. Postoje farmakološke i mehaničke metode indukcije porođaja (39). Farmakološke metode uključuju primjenu prostaglandina, oksitocina ili njihovu kombinaciju. Prostaglandini su hormoni koji potiču sazrijevanje vrata maternice i kontrakcije maternice te se primjenjuju lokalno ili sistemski. Oksitocin se primjenjuje intravenskom infuzijom uz postupno povećanje doze do postizanja adekvatnih kontrakcija (39,40). Mehaničke metode uključuju postupke koji fizički potiču otvaranje vrata maternice i oslobađanje endogenih prostaglandina (39). Najčešća mehanička metoda je amniotomija, odnosno umjetna ruptura plodovih ovojnica (vodenjaka), koja potiče oslobađanje prostaglandina i pojačava kontrakcije maternice. Kombinacija farmakoloških i mehaničkih metoda skraćuje vrijeme od indukcije do porođaja te povećava vjerojatnost vaginalnog porođaja unutar 24 sata u usporedbi s primjenom pojedinačnih metoda.

Vaginalni porođaj se tradicionalno dijeli na četiri faze, pri čemu prve tri obuhvaćaju sam proces rađanja djeteta i posteljice, dok se četvrta faza odnosi na rano postporođajno razdoblje i neposredni oporavak majke (41–43).

**Prva faza porođaja** (otvaranje) počinje s pojavom redovitih i progresivnih kontrakcija maternice i završava kada je vrat maternice potpuno dilatiran oko 10 cm.

**Druga faza porođaja** (izgon ploda) počinje potpunom dilatacijom vrata maternice (10 cm) i završava rođenjem djeteta.

**Treća faza porođaja** (izgon posteljice) počinje odmah nakon rođenja djeteta i završava izbacivanjem posteljice i ovoja posteljice. Kontrakcije maternice se nastavljaju kako bi se posteljica odvojila od stijenke maternice i izbacila, najčešće unutar 5 do 15 minuta nakon rođenja djeteta.

**Četvrta faza porođaja** počinje neposredno nakon izbacivanja posteljice i obično traje do dva sata. U ovom razdoblju majka se intenzivno nadzire zbog mogućih pojava komplikacija, osobito postporođajnog krvarenja. Glavni cilj je stabilizacija majčinog stanja i osiguranje dobrobiti majke i novorođenčeta nakon porođaja.

### **1.3 Hipertenzivni poremećaji u trudnoći**

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći predstavljaju ozbiljan javnozdravstveni problem (44). Na svjetskoj razini, ubrajaju se među tri glavna uzroka majčinskog morbiditeta i mortaliteta. Navedeni poremećaji zahvaćaju približno 5 – 10 % svih trudnoća, iako se procjene u različitim populacijama kreću i do 10 – 22 % (45–47). Između 1990. i 2021. godine, globalna incidencija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći porasla je za 15,24 %, dok se prevalencija povećala gotovo šest puta (46).

Hipertenzivni poremećaji značajno doprinose majčinskom i perinatalnom morbiditetu i mortalitetu. Hipertenzija, ovisno o stupnju i tipu, može biti povezana s intrauternim zastojem rasta (IUGR, engl. *intrauterine growth restriction*) i prijevremenim porođajem, a može dovesti i do smrti majke i novorođenčeta (44). Žene koje su razvile hipertenzivne poremećaje u trudnoći imaju povećan rizik od razvoja kronične hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i metaboličkih poremećaja nakon trudnoće. Djeca rođena iz takvih trudnoća također mogu imati veći rizik od kardiovaskularnih bolesti i metaboličkih poremećaja u odrasloj dobi (35,48).

Dijagnostički kriteriji za hipertenziju u trudnoći temelje se na sistoličkom krvnom tlaku  $\geq 140$  mmHg i/ili dijastoličkom krvnom tlaku  $\geq 90$  mmHg. Povišene vrijednosti moraju biti potvrđene u najmanje dva mjerenja u razmaku od najmanje četiri sata. Prema težini, hipertenzija se dijeli na blagu do srednje tešku (sistolički tlak 140 – 159 mmHg i/ili dijastolički 90 – 109 mmHg) i tešku hipertenziju (sistolički tlak  $\geq 160$  mmHg i/ili dijastolički tlak  $\geq 110$  mmHg) (35).

### **1.3.1 Podjela hipertenzivnih poremećaja u trudnoći**

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći dijele se na četiri glavne kategorije i uključuju gestacijsku hipertenziju, preeklampsiju, kroničnu hipertenziju i kroničnu hipertenziju sa superponiranom preeklampsijom (35).

**Gestacijska hipertenzija** definira se kao novonastala hipertenzija koja se razvija nakon 20. tjedna trudnoće, bez prisutnosti proteinurije ili drugih znakova oštećenja organa (35).

**Preeklampsija** je multisistemiški poremećaj karakteriziran novonastalom hipertenzijom nakon 20. tjedna trudnoće, uz prisutnost proteinurije ili, u odsutnosti proteinurije, s drugim znakovima oštećenja ciljnih organa. Proteinurija se definira kao izlučivanje  $\geq 300$  mg proteina u 24-satnom uzorku mokraće, omjer protein/kreatinin  $\geq 30$  mg/mmol ili omjer albumin/kreatinin  $\geq 8$  mg/mmol. Ako kvantitativno određivanje proteina u mokraći nije dostupno, proteinurija se dokazuje očitanjem na test-trakici od 2+ ili više. U odsutnosti proteinurije, dijagnoza preeklampsije može se postaviti u prisutnosti novonastale hipertenzije udružene s trombocitopenijom, oštećenjem jetrene funkcije, bubrežnom insuficijencijom, plućnim edemom te pojavom terapijski rezistentne glavobolje koja se ne može objasniti drugim uzrocima ili prisutnošću vizualnih simptoma (35,44). **Eklampsija** se definira kao pojava novih, generaliziranih toničko-kloničkih napadaja u trudnice koja ima preeklampsiju, a u odsutnosti drugih stanja poput epilepsije, moždane ishemije, intrakranijalnog krvarenja ili zlouporabe droga (35).

**Kronična hipertenzija** definira se kao arterijska hipertenzija prisutna prije trudnoće ili dijagnosticirana prije 20. tjedna gestacije ili ako se zadržava dulje od 12 tjedana postporođajno (35).

**Kronična hipertenzija sa superponiranom preeklampsijom** odnosi se na razvoj preeklampsije u trudnice s prethodno dijagnosticiranom kroničnom hipertenzijom. Dijagnostički kriteriji uključuju pogoršanje prethodno prisutne hipertenzije, pojavu novonastale proteinurije ili nagli porast prethodne proteinurije te razvoj znakova oštećenja funkcije ciljnih organa karakterističnih za preeklampsiju (trombocitopenija, oštećenje jetrene funkcije, bubrežna insuficijencija, plućni edem i glavobolja koja ne reagira na primijenjenu terapiju i ne može se objasniti drugim uzrocima ili je praćena vizualnim simptomima) (35).

**HELLP sindrom** (engl. *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*) se može pojaviti i bez prisutnosti hipertenzije ili proteinurije, što su uobičajeni znakovi preeklampsije. Karakteriziran je hemolizom, povišenim jetrenim enzimima i trombocitopenijom. Dijagnoza se postavlja na temelju sljedećih kriterija: koncentracija laktat-dehidrogenaze (LDH)  $\geq 600$  IU/L, aktivnost aspartat-aminotransferaze (AST) i alanin-aminotransferaze (ALT) više od dvostruko iznad gornje granice normale te broj trombocita  $< 100 \times 10^9/L$ . Do 15 % trudnica s HELLP sindromom ne pokazuje klasične znakove hipertenzije ili proteinurije. Klinički se može manifestirati i simptomima teške preeklampsije, uključujući nagli porast krvnog tlaka (sistolički  $\geq 160$  mmHg ili dijastolički  $\geq 110$  mmHg), bubrežnu insuficijenciju, plućni edem, jaku glavobolju te vizualne poremećaje (35).

### **1.3.2 Etiologija novonastale hipertenzije u trudnoći**

Patofiziologija gestacijske hipertenzije je složena i dalje nije u potpunosti razjašnjena, a brojne postavljene hipoteze obuhvaćaju gotovo sve majčine i fetalne organe (49,50). Mnogi mehanizmi gestacijske hipertenzije preklapaju se s onima kod preeklampsije (48,51). Postojeći majčini komorbiditeti, reproduktivna povijest te genetski i imunološki čimbenici značajno povećavaju rizik od razvoja hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (46,52).

Ključnu ulogu u patogenezi imaju poremećaji u razvoju posteljice (53). U normalnoj trudnoći, dolazi do invazije trofoblasta posteljice u spiralne arterije maternice tijekom prvog i ranog drugog tromjesečja, čime se transformiraju iz uskih žila visokog otpora u široke žile niskog otpora, sposobne za velik protok (54). Ova fiziološka pregradnja spiralnih arterija osigurava odgovarajuću perfuziju maternice i posteljice nužnu za razvoj fetusa (4,55). Kod gestacijske hipertenzije i preeklampsije, invazija

trofoblasta je neadekvatna, što dovodi do nedovoljne pregradnje spiralnih arterija (54,56). Zbog toga te arterije ostaju uske i s visokim otporom. Kao posljedica, javlja se hipoperfuzija posteljice, koja pokreće kaskadu događaja (57,58). Mehanizmi koji dovode do neadekvatne invazije trofoblasta nisu u potpunosti razjašnjeni, ali mogu uključivati imunološke čimbenike, genetske predispozicije, upalne procese i već postojeće vaskularne bolesti majke (59).

Nastala ishemija i hipoksija posteljice dovode do oksidacijskog stresa što za posljedicu ima oslobađanje različitih čimbenika u majčinu cirkulaciju, uključujući proupalne citokine, antiangiogene čimbenike, slobodne radikale i druge vazoaktivne supstance (60,61). Ishemična posteljica proizvodi povećane koncentracije antiangiogenih čimbenika. Jedan takav čimbenik je topljivi fms-slični tirozin-kinazni receptor 1 (sFlt-1, engl. *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) koji veže endotelni čimbenik vaskularnog rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) i placentalni čimbenik rasta (PlGF, engl. *placental growth factor*), čime ih sprječava da se vežu na svoje endotelne receptore i obavljaju svoje angiogene i vazoprotekcijske funkcije (62). Istodobno dolazi do smanjenja koncentracije angiogenih čimbenika poput VEGF-a i PlGF-a (63). Nastala neravnoteža između proangiogenih i antiangiogenih čimbenika pridonosi ukupnoj disfunkciji endotela (64). Endotelna disfunkcija dovodi do ekstravaskularnog nakupljanja tekućine (edema), proteinurije, smanjene proizvodnje vazodilatacijskih čimbenika, povećane proizvodnje vazokonstriktorskih čimbenika, aktivacije sustava zgrušavanja i oslobađanja proupalnih citokina (5,65). Konačno, disfunkcija endotela dovodi do sistemskih manifestacija, uključujući hipertenziju te potencijalno oštećenje ciljnih organa. Gestacijska hipertenzija je u nekim aspektima odvojena od preeklampsije, ali zajednički patofiziološki putevi i rizik od progresije iz jedne u drugu čine etiologiju ovih stanja usko povezanom (5,48).

Klinička slika gestacijske hipertenzije i preeklampsije često se preklapa (51). Oko 10 – 50 % žena s gestacijskom hipertenzijom u konačnici razvije preeklampsiju (35). Iz tog razloga, gestacijska hipertenzija često se smatra privremenom dijagnozom kod trudnica s hipertenzijom koje još ne ispunjavaju sve dijagnostičke kriterije za preeklampsiju (5). Unatoč čestom povoljnom ishodu kod blaže gestacijske hipertenzije, oba poremećaja mogu dovesti do nepovoljnih ishoda trudnoće te dugoročnih komplikacija, uključujući razvoj kronične hipertenzije (5,48). Gestacijska hipertenzija značajno povećava rizik od neželjenih ishoda za majku i novorođenče, uključujući

prijevremeni porođaj, novorođenčad s malom porođajnom masom te prerano odvajanje (abrupciju) posteljice (66).

### **1.3.3 Rizični čimbenici za razvoj hipertenzije**

Rizični čimbenici za novonastale hipertenzivne poremećaje u trudnoći uključuju demografska, zdravstvena i anamnestička obilježja majke. Ovi čimbenici pomažu u ranom prepoznavanju trudnica s povećanim rizikom i omogućuju pravovremene preventivne mjere uz pojačan nadzor tijekom trudnoće.

**Visok indeks tjelesne mase (ITM)** smatra se važnim rizičnim čimbenikom jer višak masnog tkiva potiče kroničnu upalu i razvoj inzulinske rezistencije. Takvo metaboličko okruženje postupno narušava funkciju endotela, što otežava njihovu prilagodbu na povećane zahtjeve u trudnoći (67,68).

**Starija dob majke** ( $\geq 40$  godina) također povećava rizik. S godinama krvne žile postaju manje elastične, izraženiji je oksidacijski stres, a sposobnost krvožilnog sustava da se prilagodi fiziološkim promjenama u trudnoći slabi (69,70).

Kod **prvorotkinja** ili žena kod kojih je razmak između dviju trudnoća dulji od 10 godina, veća učestalost poremećaja povezuje se s imunološkim čimbenicima. Organizam majke prvi put (ili nakon dugog razdoblja) dolazi u kontakt s fetalnim i očinskim antigenima, što može rezultirati neadekvatnom invazijom trofoblasta i nepotpunom pregradnjom spiralnih arterija u posteljici (69,71).

Slični obrasci oštećenja krvnih žila prisutni su i kod kroničnih bolesti. **Dijabetes** dovodi do oštećenja malih krvnih žila, čime se smanjuje protok krvi kroz posteljicu (69,71). **Prethodna preeklampsija**, bilo u osobnoj ili obiteljskoj anamnezi, upućuje na genetsku sklonost ili na trajno narušenu funkciju endotela koja se ponovno očituje u sljedećoj trudnoći (69,71).

**Potpomognuta oplodnja** također je povezana s povećanim rizikom, djelomično zbog primjene hormona u postupcima oplodnje koji mogu utjecati na ranu fazu razvoja posteljice, ali i zbog češće prisutnih komorbiditeta kod žena koje se podvrgavaju tim postupcima (72,73).

**Autoimune bolesti**, osobito antifosfolipidni sindrom, stvaraju protrombotičko okruženje i kronični upalni odgovor, što dodatno oštećuje krvne žile posteljice i povećava vjerojatnost razvoja težih oblika hipertenzije (69,74).

### **1.3.4 Liječenje hipertenzije u trudnoći**

Liječenje hipertenzije u trudnoći uključuje nefarmakološke mjere i farmakološku terapiju, s ciljem kontrole krvnog tlaka i sprječavanja komplikacija za majku i fetus (75). Nefarmakološke preporuke obuhvaćaju savjetovanje o zdravoj prehrani, održavanje optimalnog ITM-a, prestanak pušenja i redovitu tjelesnu aktivnost (44). Cilj farmakološkog liječenja je održavanje krvnog tlaka unutar sigurnog raspona. Izbor antihipertenziva u trudnoći je ograničen zbog potencijalnih negativnih učinaka na fetus. Antihipertenzivi koji se koriste u trudnoći uključuju labetalol (beta-blokator), nifedipin (blokator kalcijevih kanala) i metildopu (agonist  $\alpha$ -2 adrenoreceptora) (5,35,44). U žena s visokim rizikom za razvoj preeklampsije primjenjuje se niska doza acetilsalicilne kiseline (aspirin), a za prevenciju eklampsije propisuje se magnezijev sulfat (35,75–77).

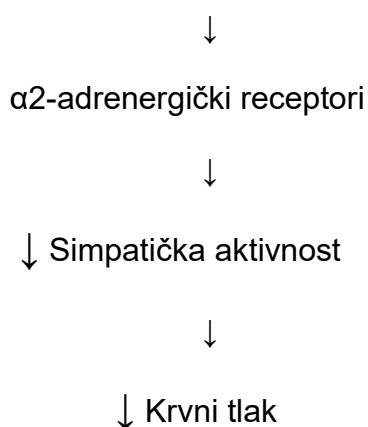
Porodaj je najučinkovitiji način za razrješenje hipertenzivnih poremećaja u trudnoći i uklanjanje negativnih posljedica za majku i dijete. Optimalno vrijeme porođaja određuje se na temelju gestacijske dobi, težine stanja i procjene rizika. Kod gestacijske hipertenzije ili preeklampsije bez teških značajki, porodaj se preporučuje nakon 37. tjedna gestacije. U tom slučaju, indukcija porođaja nakon 37. tjedna povezana je s povoljnijom prognozom. Kod težih oblika poremećaja, porodaj se provodi u ranijim tjednima gestacije prema preporukama (35,44,75,77).

#### **1.3.4.1 Metildopa u liječenju hipertenzije u trudnoći**

Metildopa ( $\alpha$ -metildopa) je centralno djelujući antihipertenziv koji se metabolizira u  $\alpha$ -metilnoradrenalin, agonist  $\alpha$ 2-adrenergičkih receptora u moždanom deblu (78). Djeluje aktivacijom  $\alpha$ 2-receptora u rostralnom ventrolateralnom medularnom području tako što smanjuje aktivnost simpatikusa, što dovodi do smanjenja otpuštanja noradrenalina iz završetaka simpatičkih živaca (79). Posljedično dolazi do smanjenja perifernog vaskularnog otpora i krvnog tlaka te smanjenja stimulacije nadbubrežne žlijezde i simpatikusa.

Metabolički put metildope:

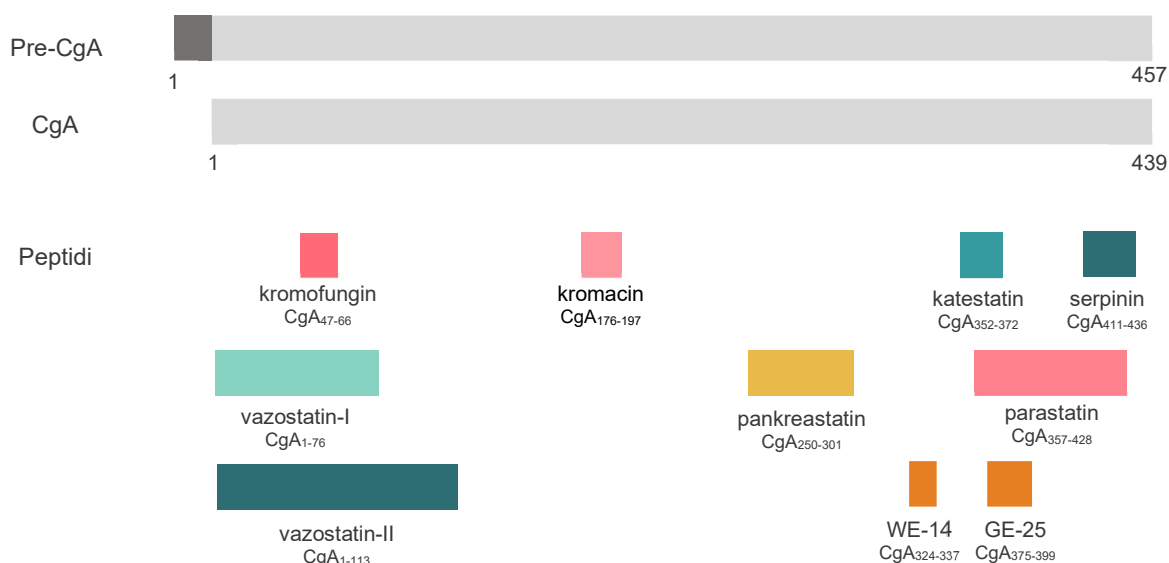
Metildopa →  $\alpha$ -metildopamin →  $\alpha$ -metilnoradrenalin



Metildopa se koristi od 60-ih godina prošlog stoljeća u liječenju svih oblika hipertenzivnih poremećaja (5,30). Farmakološkim napretkom smanjena je učestalost njezina propisivanja, budući da noviji antihipertenzivi s alternativnim mehanizmima djelovanja učinkovitije reguliraju krvni tlak uz manje nuspojave (30,32). No, u trudnoći je izbor lijekova ograničen zbog potencijalnih negativnih učinaka na fetus (80). Smjernice međunarodnih stručnih društava navode različite antihipertenzive kao lijekove prvog izbora u liječenju hipertenzije u trudnoći (75). Iako pojedine smjernice navode labetalol kao lijek prvog izbora, metildopa i dalje ostaje često preporučivan i propisivan lijek zbog dugogodišnje primjene i dokazane sigurnosti u trudnoći. Propisuje se u početnoj dozi od 250 mg oralno dvaput dnevno, uz povećanje prema potrebi do maksimalno 3000 mg/dan (48).

#### **1.4 Kromogranin A**

Kromogranin A je kiseli, hidrofilni glikoprotein iz obitelji granina. Gen za kromogranin A kodira prekursorski protein od 457 aminokiselina, iz kojeg odcjepljenjem signalnog peptida nastaje zreli protein od 439 aminokiselina molekulske mase 48 kDa (81,82). Kromogranin A dijeli strukturne karakteristike s drugim pripadnicima obitelji granina, ali se izdvaja svojom raširenom ekspresijom u neuroendokrinom sustavu i složenom proteolitičkom obradom kojom nastaje niz biološki aktivnih peptida (Slika 2) (82,83).



**Slika 2.** Kromogranin A (CgA) i biološki aktivni peptidni fragmenti

Sintetizira se u hrapavom endoplazmatskom retikulumu neuroendokrinih stanica, a potom se prenosi u Golgijev aparat gdje se odvijaju post-translacijske modifikacije koje utječu na njegovu stabilnost i funkcionalnost (84,85). Kromogranin A se pohranjuje u nezrele sekrecijske granule zajedno s različitim hormonima, neuropeptidima te enzimima odgovornima za njihovu obradu (83,84). Unutar granula kromogranin A tvori komplekse s katekolaminima, adenozin trifosfatom (ATP) i dvovalentnim kationima čime nastaje izotonična otopina visoke koncentracije koja omogućuje učinkovito skladištenje i sinkronizirano oslobađanje (84,86).

Najveće koncentracije kromogranina A se nalaze u kromafinim stanicama srži nadbubrežne žlijezde, gdje se skladišti i otpušta zajedno s katekolaminima (adrenalinom i noradrenalinom) (84). U simpatičkim živcima, pohranjuje se u vezikulama s gustom jezgrom zajedno s noradrenalinom i ATP-om (84). U endokrinom sustavu prisutan je u hipofizi, štitnjači (u parafolikularnim C-stanicama zajedno s kalcitoninom), paratireoidnoj žlijezdi (u glavnim stanicama zajedno s paratireoidnim hormonom) i gušterači (u stanicama Langerhansovih otočića gdje se pohranjuje s inzulinom, glukagonom i somatostatinom) (84,87). Enteroendokrine stanice probavnog sustava proizvode kromogranin A, koji se ondje otpušta zajedno s različitim gastrointestinalnim hormonima (gastrin, sekretin, kolecistokinin, serotonin) (84).

Srčane mišićne i endotelne stanice također proizvode kromogranin A, pri čemu njegovi fragmenti sudjeluju u lokalnoj regulaciji srčane funkcije i vaskularnog tonusa (81,88). U trudnoći trofoblastne stanice posteljice proizvode znatne količine kromogranina A (89,90).

Otpuštanje kromogranina A iz neuroendokrinih stanica odvija se putem egzocitoze (84,91). Male količine kontinuirano se oslobađaju bez specifične stimulacije, dok se većina oslobađa kao odgovor na specifične podražaje putem kalcij-ovisne egzocitoze (91). Kada stanica primi signal, dolazi do porasta unutarstanične koncentracije kalcija što signalizira sekrecijskim granulama da se spoje sa staničnom membranom i izbace sadržaj u vanstanični prostor ili krvotok (91). Kromogranin A se oslobađa zajedno s hormonima ili neurotransmiterima specifičnim za stanicu, zbog čega služi kao biljeg aktivnosti neuroendokrinog sustava (84). Kromogranin A se može proteolitički cijepati već unutar granula prije samog oslobađanja, ali i vanstanično nakon oslobađanja (84,92).

Kromogranin A ima brojne unutarstanične i vanstanične funkcije (81,83). Unutar stanice, ključan je za stvaranje i sazrijevanje nezrelih sekrecijskih granula jer pomaže u agregaciji i sortiranju peptida i neurotransmitera (84,91,93). Sudjeluje u skladištenju hormona, neuropeptida i neurotransmitera i omogućuje njihovo zajedničko otpuštanje (84). Osim toga, stabilizira sekrecijske granule i veže kalcij, čime regulira protok kalcija unutar stanice i utječe na sazrijevanje i otpuštanje granula (84). Sudjeluje u organizaciji različitih sekrecijskih produkata i omogućuje koagregaciju, što rezultira koordiniranim oslobađanjem kompleksnih signalnih kombinacija (91). Van stanice, intaktni kromogranin A može inhibirati rast tumora i angiogenezu te može poboljšati funkciju endotelne barijere i smanjiti vaskularnu propusnost (82,83). Zajedno s pojedinim fragmentima, pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv bakterija, gljivica i kvasaca (94).

Međutim, peptidi nastali proteolitičkim cijepanjem imaju vlastite autokrine, endokrine i parakrine funkcije (Slika 3) (81,83). Navedeni peptidi utječu na (i) kardiovaskularnu funkciju modulirajući srčanu kontraktilnost, vaskularni tonus i krvni tlak; (ii) neuroendokrinu sekreciju regulirajući oslobađanje katekolamina, inzulina, glukagona i drugih hormona; (iii) metabolizam glukoze, inzulinsku osjetljivost, lipolizu i adipogenezu; (iv) imunološku funkciju modulirajući upalne procese te (v) angiogenezu inhibirajući ili stimulirajući vaskularni rast (82,85).

	Kardiovaskularna funkcija	Neuroendokrina sekrecija	Metabolizam	Imunološka funkcija	Angiogeneza
Vazostatin-1	↗	↘		↗	↘
Vazostatin-2	↗				
Kromofungin	↗			↗	
Pankreastatin		↘↘	↘	↗	
Katestatin	↗↘	↘	↗	↘	↗
WE-14				↗	
Serpinin	↗	↔			

↗ stimulacijski učinak      ↘ inhibicijski učinak      ↔ dvosmjerni učinak

**Slika 3.** Prikaz učinaka fragmenata kromogranina A

Kromogranin A je prohormon jer služi kao prekursor za niz biološki aktivnih peptida (Slika 2) (81,83). Njegova struktura sadrži brojna potencijalna mjesta za proteolitičku obradu endoproteazama (82). Proteoliza se odvija unutarstanično unutar sekrecijskih granula putem prohormonskih konvertaza (85,95). Proces započinje tijekom sazrijevanja granula i nastavlja se do egzocitoze, prilikom čega se stvaraju primarni fragmenti kromogranina A (81,92). Nakon oslobađanja, kromogranin A i njegovi primarni fragmenti mogu biti dodatno razgrađeni vanstaničnim tkivno-specifičnim proteazama poput plazmina, trombina i katepsina (92,96). Vrsta i količina nastalih peptida ovise o vrsti i aktivnosti endoproteaza prisutnih u stanici i tkivu (84).

---

### **1.4.1 Fragmenti kromogranina**

#### **1.4.1.1 Vazostatin-1 (CgA<sub>1-76</sub>)**

Vazostatin-1 je N-terminalni fragment kromogranina A te predstavlja jedan od prvih identificiranih bioaktivnih fragmenata (81,85). Vazostatin-1 ima vazodilatacijsko djelovanje i suprotstavlja se vazokonstriktornom djelovanju katekolamina i endotelina-1. Smanjuje kontraktilnost i relaksaciju srca, osobito tijekom simpatičke hiperstimulacije. Također pokazuje izražene antiadrenergičke učinke inhibicijom  $\beta$ -adrenergične stimulacije srca (81,96). Vazostatin-1 ima antiangiogena i antiproliferativna svojstva jer inhibira proliferaciju endotelnih stanica, angiogenezu i rast tumora putem modulacije VEGF signalizacije (88,97). Dodatno, pokazuje protuupalne i antiaterogene učinke smanjenjem ekspresije adhezijskih molekula VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) i ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) te inhibira nastanak pjenastih stanica (95). Sudjeluje u imunomodulaciji poticanjem aktivnosti neutrofila i pokazuje antimikrobno djelovanje (81,94). Također, inhibira lučenje paratiroidnog hormona i sudjeluje u regulaciji homeostaze kalcija (98).

#### **1.4.1.2 Vazostatin-2 (CgA<sub>1-113</sub>)**

Vazostatin-2 je dulji N-terminalni fragment kromogranina A koji uključuje vazostatin-1 i još dodatnih 37 aminokiselina. Vazostatin-2 posjeduje vazorelaksacijska i kardiosupresivna svojstva (81). Doprinosi prevenciji ateroskleroze (95). U modelima ishemije i reperfuzije vazostatin-2 pokazuje kardioprotektivna djelovanja (95).

#### **1.4.1.3 Kromofungin (CgA<sub>47-66</sub>)**

Kromofungin je kratki peptid od 20 aminokiselina. Pokazuje snažno antimikrobno djelovanje protiv širokog spektra bakterija, gljivica i kvasaca (81,85,99). Njegov antimikrobni mehanizam temelji se na narušavanju integriteta mikrobne membrane (99). U modelima ishemije-reperfuzije miokarda kromofungin djeluje kardioprotektivno smanjenjem oksidacijskog stresa i apoptoze srčanih mišićnih stanica (100). Također modulira aktivnost neutrofila i drugih stanica prirodene imunosti (81,96).

#### **1.4.1.4 Kromostatin (CgA<sub>124-143</sub>)**

Kromostatin je peptid od 20 aminokiselina koji nastaje cijepanjem središnjeg dijela molekule kromogranina A (81). U gušterači sudjeluje u regulaciji funkcije  $\beta$ -stanica moduliranjem lučenja inzulina. Pretpostavlja se da kromostatin sudjeluje u regulaciji metabolizma glukoze i energetske homeostaze, ali su za potpuno razumijevanje tih učinaka potrebna dodatna istraživanja (81,101).

#### **1.4.1.5 Pankreastatin (CgA<sub>250-301</sub>)**

Pankreastatin je peptid od 52 aminokiseline koji nastaje iz C-terminalnog dijela kromogranina A i jedan je od najbolje proučenih fragmenata (81,83). Inhibira lučenje inzulina stimulirano glukozom modulacijom unutarstaničnih signalnih putova i smanjenjem ulaska kalcija u  $\beta$ -stanice gušterače. Posljedično, pankreastatin ima hiperglikemijski učinak jer smanjuje periferno preuzimanje glukoze i potiče jetrenu glikogenolizu. Također stimulira lučenje glukagona iz  $\alpha$ -stanica gušterače. Utječe i na lipidni metabolizam smanjujući preuzimanje glukoze u adipocitima i regulirajući lipolizu (101,102). Osim toga, pankreastatin potiče proupalne procese u metaboličkim tkivima (102). Povišene koncentracije zabilježene su u bolesnika s dijabetesom tipa 2 i metaboličkim sindromom. Također inhibira lučenje paratiroidnog hormona (81).

#### **1.4.1.6 WE-14 (CgA<sub>324-337</sub>)**

WE-14 je peptid od 14 aminokiselina smješten u C-terminalnom dijelu kromogranina A, neposredno prije katestatina. Djeluje kao antigen za CD4<sup>+</sup> T limfocite. Njegove posttranslacijske modifikacije povećavaju imunogenost. Sudjeluje u patogenezi autoimunog dijabetesa tipa 1 jer modificirani oblici ovog peptida potiču autoreaktivne T stanice i razaranje  $\beta$ -stanica gušterače (85).

#### **1.4.1.7 GE-25 (CgA<sub>375-399</sub>)**

Aktivnost peptida GE-25 još uvijek nije u potpunosti određena, ali poznato je da se izražava u hipofizi, crijevima i gušterači (81). Istraživanja su također ispitivala prisutnost i distribuciju GE-25 u očima štakora (103).

#### **1.4.1.8 Serpinin (CgA<sub>402-439</sub>)**

Serpinin je C-terminalni fragment kromogranina A koji obuhvaća 38 aminokiselina (81). Djeluje kao  $\beta$ -agonist miokarda i povećava kontraktilnost srca. Ovaj učinak sličan je djelovanju  $\beta$ -adrenergičkih agonista (83,88). Povećava snagu srčane kontrakcije, što može imati važnu ulogu u kompenzatornim mehanizmima kod srčanog zatajenja. Osim toga, serpinin sudjeluje u regulaciji stvaranja sekrecijskih granula kao dio autokrine i parakrine povratne sprege. U kombinaciji s ostalim fragmentima, serpinin doprinosi regulaciji kardiovaskularne funkcije (81,83,88).

#### **1.4.1.9 Katestatin (CgA<sub>352-372</sub>)**

Katestatin je peptid od 21 aminokiseline i jedan od funkcionalno najvažnijih fragmenata kromogranina A, sa širokim rasponom djelovanja koji obuhvaća neuroendokrinu, kardiovaskularnu, metaboličku i imunološku regulaciju (81,82,104). Zbog svoje strukture katestatin se učinkovito veže na lipidnim membranama i receptorima (82).

Djeluje kao endogeni inhibitor simpatičkog živčanog sustava blokirajući nikotinske kolinergičke receptore i smanjujući lučenje katekolamina. Time štiti kardiovaskularni sustav od posljedica kronične simpatičke hiperstimulacije (82,104).

Njegovi vazodilatacijski učinci, posredovani dušikovim oksidom i histaminom, doprinose regulaciji krvnog tlaka (82,104,105). U miokardu katestatin smanjuje kontraktilnost i istodobno pruža zaštitu od oštećenja izazvanog ishemijom i reperfuzijom (104).

Na metaboličkoj razini katestatin smanjuje adipozitet, poboljšava inzulinsku osjetljivost i inhibira lipolizu i oksidaciju masnih kiselina u masnom tkivu (102,104).

Dodatno, katestatin ima izražena imunomodulatorna i protuupalna svojstva. Inhibira aktivaciju i infiltraciju makrofaga u srce i nadbubrežnu žlijezdu, smanjuje proizvodnju proupalnih citokina i kemokina te doprinosi smanjenju kronične upale povezane s hipertenzijom i aterosklerozom. Pokazuje i antimikrobnu aktivnost protiv različitih patogena (85,104).

### **1.4.2 Dijagnostička uloga kromogranina A i katestatina**

Glavna dijagnostička uloga kromogranina A je u dijagnozi, prognozi i praćenju neuroendokrinih tumora (NET). Povišene koncentracije mogu biti prisutne kod gotovo svih oblika neuroendokrinih tumora gastrointestinalnog i plućnog sustava, feokromocitoma, medularnog karcinoma štitnjače (81,106). Najviša osjetljivost zabilježena je kod gastrinoma, glukagonoma i neuroendokrinih tumora tankog crijeva (107). Ipak, povišene koncentracije kromogranina A mogu se pojaviti i u drugim fiziološkim i patološkim stanjima.

Povišene koncentracije javljaju se u kardiovaskularnim i bubrežnim bolestima, upalnim bolestima crijeva i jetrenoj cirozi. Inhibitori protonske pumpe smanjuju želučanu kiselost, što dovodi do kompenzatorne hiperplazije enterokromafinih stanica i povećanog lučenja kromogranina A. Fizički i psihološki stres mogu privremeno povećati kromogranin A putem aktivacije simpatoadrenalnog sustava (81,96). Fragmenti kromogranina A još nisu u kliničkoj primjeni, iako se ulaže velik trud u istraživanja njihovih složenih funkcija i međusobnih interakcija.

### **1.5 Kromogranin A i katestatin u hipertenziji**

Regulacija arterijskog krvnog tlaka usko je povezana s aktivnošću simpatičkog živčanog sustava koji modulira srčanu funkciju, vaskularni tonus i bubrežnu funkciju. Osnovna kontrola simpatičke aktivnosti povezane s kardiovaskularnom funkcijom odvija se u rostralnom ventrolateralnom dijelu produljene moždine, odakle se signali prenose do simpatičkih preganglijskih neurona u leđnoj moždini. Preganglijski neuroni potom otpuštaju acetilkolin koji aktivira nikotinske receptore na postganglijskim neuronima i kromafinim stanicama nadbubrežne žlijezde. Postganglijski neuroni i kromafine stanice stvaraju katekolamine adrenalin i noradrenalin koji su pohranjeni u granulama zajedno s kromograninom A i ATP-om (108,109). Stimulacija nikotinskih receptora dovodi do ulaska kalcija i egzocitoze sadržaja granule, što rezultira otpuštanjem katekolamina, kromogranina A i njegovih fragmenata.

Katekolamini ostvaruju svoje učinke vezanjem na  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergičke receptore, pri čemu njihovo djelovanje ovisi o podtipu receptora i mjestu na kojem se nalaze. U glatkim mišićima krvnih žila prevladavaju  $\alpha_1$ -adrenergički receptori, čija aktivacija dovodi do suženja krvnih žila. U srcu dominiraju  $\beta_1$ -receptori, a njihova stimulacija

---

povećava snagu srčane kontrakcije i frekvenciju rada srca.  $\alpha_2$ -receptori pretežno su smješteni u središnjem živčanom sustavu, gdje njihova aktivacija rezultira snižavanjem arterijskog krvnog tlaka (110).

Najveće koncentracije kromogranina A nalaze se u kromafinim stanicama nadbubrežne žlijezde i simpatičkim živčanim završecima unutar sekrecijskih granula (84). Kromogranin A ima funkcionalnu ulogu jer stvara izotoničnu otopinu visoke koncentracije koja omogućuje skladištenje visokih koncentracija katekolamina bez osmotskog oštećenja vezikule (84). Kromogranin A također veže katekolamine, što pomaže njihovom skladištenju (93).

Budući da se kromogranin A oslobađa zajedno s katekolaminima, povišene koncentracije kromogranina A u cirkulaciji koreliraju s povećanim otpuštanjem katekolamina, što rezultira nereguliranom simpatičkom aktivnošću i posljedično razvojem hipertenzije (84). Međutim, potpuni nedostatak kromogranina A također dovodi do povećanog stvaranja i oslobađanja katekolamina i posljedično povišenog krvnog tlaka (111). Ova je povezanost složena jer proteolitički fragmenti kromogranina A imaju suprotne učinke, poput katestatina, koji inhibira lučenje katekolamina i snižava krvni tlak (96).

Katestatin ostvaruje svoje učinke na krvni tlak izravnim i posrednim mehanizmima. Primarni mehanizam djelovanja katestatina je inhibicija nikotinskih kolinergičkih receptora (nAChR) na kromafinim stanicama nadbubrežne žlijezde i simpatičkim živčanim završecima (81,104,112). Vezanjem na ili blizu nikotinskog receptora, katestatin inhibira kalcij-ovisnu egzocitozu katekolamina, smanjujući njihovo oslobađanje kao odgovor na acetilkolin (91,113). Ovaj mehanizam predstavlja autokrinu i parakrinu povratnu spregu jer oslobođeni katestatin inhibira daljnje oslobađanje katekolamina iz iste ili susjednih stanica, sprječavajući prekomjernu simpatičku aktivaciju.

Na razini vaskularnog sustava katestatin inducira vazodilataciju (81,96,105). Iako pokazuje afinitet za  $\beta_2$ -adrenergičke receptore, na njima djeluje antagonistički (88,112). Neovisno o tome, katestatin je povezan s vazodilatacijom ovisnom o dušikovom oksidu (88). Uz to, potiče oslobađanje histamina iz mastocita (88,104). Svi ovi mehanizmi dovode do vazorelaksacije i sniženja krvnog tlaka (104,112). Katestatin

također inhibira aktivnosti posredovane endotelinom-1, uključujući endotelinom-1 potaknuto povećanje snage srčane kontrakcije (pozitivnu inotropiju) te suženje koronarnih arterija (112,114).

U srcu, katestatin smanjuje snagu srčane kontrakcije (negativni inotropni učinak) i usporava brzinu relaksacije (negativni lusitropni učinak), posebno u uvjetima prekomjerne simpatičke stimulacije (82,88,96,112). Osim toga, katestatin pokazuje snažna kardioprotektivna svojstva. Ovi su učinci ovisni o dušikovom oksidu i dovode do smanjenja nekroze i apoptoze srčanih mišićnih stanica te poboljšanja funkcionalnog oporavka srca.

Nadalje, katestatin djeluje i na središnji živčani sustav, gdje poboljšava barorefleksnu osjetljivost i povećava varijabilnost srčane frekvencije (104).

Esencijalna hipertenzija je heterogeno stanje i koncentracije kromogranina A i katestatina mogu varirati ovisno o dominantnom patogenetskom mehanizmu. Pretpostavlja se da su koncentracije katestatina snižene u fazi prehipertenzije (113). S napredovanjem hipertenzije raste aktivnost simpatičkog živčanog sustava, što može dovesti do kompenzacijskog porasta katestatina (115). Hipertenzija se potom razvija u trenutku kada ni povišene razine katestatina više ne mogu učinkovito inhibirati prekomjerno lučenje katekolamina. Dodatno, različita aktivnost proteaza može dovesti do smanjene konverzije kromogranina A u katestatin. Genetski polimorfizmi u genu za kromogranin A mogu utjecati na ekspresiju kromogranina A i učinkovitost proteolitičke obrade (104,113,116).

### **1.5.1 Kromogranin A i katestatin u hipertenzivnim poremećajima trudnoće**

Posteljica kao aktivni endokrini organ sudjeluje u proizvodnji i oslobađanju kromogranina A i katestatina. Osim posteljice, i druga intrauterina tkiva sintetiziraju glasničku ribonukleinsku kiselinu (mRNA, engl. *messenger ribonucleic acid*) i protein kromogranina A, doprinoseći tako njegovoj prisutnosti u biološkim tekućinama trudnice (45,89). Studija Syversen i suradnika iz 1996. godine predstavlja prvo istraživanje koje je mjerilo koncentracije kromogranina A kod trudnica i pružilo dokaze o njegovoj prisutnosti u trudnoći (90). Pokazalo se da je posteljica izvor kromogranina A te da se nalazi u istim dijelovima stanice kao i hormoni hCG i hPL (90).

Na temelju objavljenih studija na životinjskim i ljudskim eksperimentalnim modelima te kliničkim studijama na ispitanicima s hipertenzijom u općoj populaciji, može se pretpostaviti da kromogranin A, a posebice katestatin, utječu na regulaciju krvnog tlaka u trudnoći. Kromogranin A i katestatin mogu utjecati na vazodilataciju i vazokonstrikciju. Jedan od ključnih mehanizama je inhibicija otpuštanja katekolamina iz kromafinih stanica i neurona. Katestatin izravno blokira nikotinske kolinergičke receptore i sprječava lučenje katekolamina (82). Iako trudnoća dovodi do povećane simpatičke aktivnosti, krvni tlak obično ostaje stabilan, a katestatin može doprinijeti ovom kompenzatornom mehanizmu.

Kromogranin A i katestatin također utječu na oksidacijski stres i upalne procese u tijelu (81,82). S obzirom na to da je trudnoća upalno stanje, imunomodulatorna svojstva kromogranina A i katestatina mogu dodatno pogoršati upalu u hipertenzivnim poremećajima (117). Postojanje ovih novih izvora kromogranina A i katestatina u trudnoći znači da promjene u njihovoj koncentraciji mogu imati izravan utjecaj na vrijednosti krvnog tlaka (117). Kromogranin A i katestatin imaju potencijal kao biljezi za rano otkrivanje hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (118,119). S obzirom na njihovu ulogu u regulaciji krvnog tlaka i upalnih procesa, kromogranin A i katestatin mogu predstavljati ciljne mete za liječenje kako bi se spriječili neželjeni ishodi.

Unatoč ovim dokazima i pretpostavkama, specifična uloga i mehanizmi djelovanja kromogranina A i katestatina u normalnoj trudnoći te u razvoju i progresiji hipertenzivnih poremećaja još su uvijek predmet intenzivnih istraživanja.

## **2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

### **2.1 Hipoteza istraživanja**

Trudnice s gestacijskom hipertenzijom imaju više koncentracije kromogranina A i niže koncentracije katestatina prije porođaja u odnosu na razdoblje nakon porođaja.

### **2.2 Specifični ciljevi istraživanja**

1. Ispitati postoji li razlika u koncentraciji kromogranina A i katestatina prije i nakon porođaja u trudnica s gestacijskom hipertenzijom.
2. Ispitati postoji li razlika u koncentraciji kromogranina A i katestatina prije i nakon porođaja u kontrolnoj skupini trudnica.
3. Ispitati imaju li trudnice s gestacijskom hipertenzijom više koncentracije kromogranina A prije porođaja u odnosu na kontrolnu skupinu.
4. Ispitati imaju li trudnice s gestacijskom hipertenzijom niže koncentracije kromogranina A i katestatina prije porođaja u odnosu na kontrolnu skupinu.
5. Ustanoviti povezanost koncentracije kromogranina A i katestatina s Apgarovim indeksom vitalnosti i percentilima porođajne mase.

### 3 ISPITANICI I METODE

#### 3.1 Ispitanici

Istraživanje je provedeno na Zavodu za porodništvo, Klinike za ženske bolesti i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Hrvatska u razdoblju od 2023. – 2025. godine. Obuhvatilo je ukupno 40 trudnica: 20 trudnica s gestacijskom hipertenzijom liječenih metildopom te 20 zdravih trudnica koje predstavljaju kontrolnu skupinu. S obzirom na to da nema poznatih podataka o koncentraciji kromogranina A i katestatina u skupini s gestacijskom hipertenzijom, veličina uzorka procijenjena je prema koncentraciji kromogranina A u zdravih trudnica prije početka i 2 sata nakon porođaja prema *High levels of human chromogranin a in umbilical cord plasma and amniotic fluid at parturition* (120). Prema statističkom programu MedCalc, za postizanje snage testa od 80 % ( $\beta = 0,2$ ) uz 5 % razinu značajnosti ( $\alpha = 0,05$ ) potrebno je najmanje 19 trudnica po skupini. U ovom istraživanju prilagođeni broj je 20 u svakoj ispitivanoj skupini, tj. ukupni broj trudnica u istraživanju je 40.

Kriteriji isključivanja za obje skupine obuhvaćaju prvotkinje, trudnice s višeplođnom trudnoćom, prisutnost trudova prilikom hospitalizacije, kronične upalne ili autoimune bolesti, koronarne bolesti, bubrežnu insuficijenciju, tumore, primjena inhibitora protonske pumpe ili lijekova koji utječu na krvni tlak (osim metildope), poznate fetalne anomalije i IUGR. Kako bi se isključio HELLP sindrom, isključene su trudnice s koncentracijama kreatinina  $> 100 \mu\text{mol/L}$ , mokraćne kiseline (urata)  $> 310 \mu\text{mol/L}$ , aktivnosti aspartat-aminotransferaze i alanin-aminotransferaze  $> 70 \text{ IU/L}$ , laktat-dehidrogenaze  $> 600 \text{ IU/L}$  i brojem trombocita  $< 100 \times 10^9/\text{L}$ .

Gestacijska hipertenzija definirana je prema kriterijima Američkog društva opstetričara i ginekologa (ACOG, engl. *American College of Obstetricians and Gynecologists*) kao sistolički tlak  $\geq 140 \text{ mmHg}$  i/ili dijastolički tlak  $\geq 90 \text{ mmHg}$  u dva odvojena navrata s razmakom od najmanje 4 sata, nakon 20. tjedna gestacije kod žena s prethodno normalnim krvnim tlakom (35). Trudnice s gestacijskom hipertenzijom bile su liječene metildopom, primjenjivanom dva ili tri puta dnevno, u minimalnoj dozi 500 mg na dan.

Istraživanje je uključilo višerotkinje s jednoplođnim trudnoćama uz urednu količinu plodove vode koje su zaprimljene bez trudova između 39. i 41. tjedna trudnoće,

gdje je porođaj dovršen vaginalnim putem bez korištenja epiduralne analgezije. Kod svih trudnica indukcija porođaja provedena je kombinacijom umjetne rupture vodenjaka (amniotomije) i postupne titracije intravenski primijenjenog oksitocina. Amniotomija je izvedena nakon postizanja odgovarajućeg stupnja dilatacije vrata maternice. Nakon toga započeta je kontinuirana intravenska infuzija oksitocina, uz postupno povećanje doze u pravilnim intervalima od 15 minuta, sve do uspostave adekvatnih i redovitih kontrakcija maternice. Početna brzina infuzije iznosila je 24 mL/h (~4 mIU/min) te se prema potrebi postupno povećavala do maksimalno 90 mL/h (~15 mIU/min).

### **3.2 Etičko odobrenje**

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (Klasa: 003-06/20-03/004; Ur. broj 251-29-11-20-01-1 od 13. veljače 2020. godine) i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (Klasa: 643-02/20-01/02; Ur. broj: 251-62-03-20-24 od 4. srpnja 2023. godine).

Trudnice su u potpunosti upoznate s ispitivanjem te su pristanak potvrdile potpisivanjem Informiranog pristanka. Informirani pristanak sadrži informacije o ciljevima istraživanja, zdravstvenim rizicima i dobrobitima te ostalim korisnim aspektima sudjelovanja uz opis cjelokupnog ispitivanja.

### **3.3 Klinički i antropometrijski parametri**

Zabilježene su kliničke i antropometrijske karakteristike majke i novorođenčadi:

- i. dob, krvni tlak, visina, masa, dobitak tjelesne mase tijekom trudnoće, ITM, pušački status, broj prethodnih porođaja i trudnoća potpomognutom oplodnjom
- ii. tjedan gestacije pri porođaju, porođajna masa i duljina, spol novorođenčeta, percentili porođajne mase i Apgar indeks vitalnosti

Mjerenje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka provedeno je u sjedećem položaju, s rukom poduprtom u razini srca korištenjem tlakomjera (boso nova S, BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG, Jungingen, Njemačka). Mjerenje je obavljeno dva puta zaredom, s razmakom od 1 do 2 minute. Zabilježen je prosjek dobivenih

vrijednosti, a ako je razlika između prva dva mjerenja bila veća od 10 mmHg, obavljeno je treće mjerenje te se računao prosjek svih triju mjerenja.

Dobitak tjelesne mase tijekom trudnoće izračunat je kao razlika tjelesne mase na kraju trudnoće i tjelesne mase prije trudnoće. ITM izračunat je prema formuli:

$$ITM (kg/m^2) = \frac{tjelesna\ masa\ (kg)}{visina\ (m)^2}$$

Za mjerenje mase novorođenčeta odmah nakon porođaja korištena je vaga za dojenčad (Sauter, Bizerba-Wien, Austrija). Duljina se mjerila pomoću mjerne ploče, postavljanjem novorođenčeta u ležeći položaj s glavom uz fiksirani oslonac i ispruženim nogama (Emplex, Lopatinec, Hrvatska).

Percentili porođajne mase izračunavaju se na temelju velikih populacijskih studija koje prikupljaju podatke o masi novorođenčadi pri rođenju u odnosu na gestacijsku dob i spol kako bi se dobila reprezentativna distribucija porođajnih masa unutar određene populacije (percentilne krivulje). Percentilne krivulje porođajne mase osmišljene su tako da se masa novorođenčeta uspoređuje s referentnom populacijom iste gestacijske dobi i spola. Drugim riječima, one normaliziraju masu novorođenčeta za gestacijsku dob, tj. pomažu u standardiziranoj procjeni veličine novorođenčeta pri rođenju i omogućuju usporedbu. Za izračun percentila porođajne mase u ovom ispitivanju korišteni su populacijski podaci prema Nicolaidesu i suradnicima pomoću prikupljenih podataka o spolu i porođajnoj masi novorođenčadi korištenjem *The Fetal Medicine Foundation* online kalkulatora (121,122).

Apgar indeks (Apgar ocjena, Apgar test ili Apgar score) je brza i jednostavna metoda za procjenu vitalnosti novorođenčeta neposredno nakon rođenja. Služi za standardiziranu procjenu stanja novorođenčeta u svrhu procjene prilagodbe na izvanmaternični život i potrebe za hitnom medicinskom intervencijom. Sastoji se od pet kliničkih znakova, a svaki se ocjenjuje s 0, 1 ili 2 boda uz maksimalni mogući zbroj 10 (Tablica 1). Rezultat se tumači u tri kategorije:

- i. 0 – 3: značajno smanjena vitalnost, potrebna hitna reanimacija,
- ii. 4 – 6: blago smanjena vitalnost, može zahtijevati potporu,
- iii. 7 – 10: normalno stanje, dobra prilagodba na život izvan maternice.

Provodi se u prvoj i petoj minuti nakon porođaja. Ako je rezultat u 5. minuti manji od 7, procjena se ponavlja svakih 5 minuta do 20. minute (123).

Tablica 1. Komponente i bodovanje Apgar indeksa

Pokazatelj	Broj bodova		
	2	1	0
<b>Boja kože</b>	ružičasta	trup ružičast, okrajine modre	modra ili blijeda
<b>Disanje</b>	pravilno, snažan plač	grčevito hvatanje zraka ili slab plač	ne diše, ne plače
<b>Napetost mišića</b>	dobra, vrlo živahno se miče	oslabljena, spori i rijetki pokreti	mlohavo, ne miče se
<b>Odgovor na podražaj</b>	plač, pokret, brani se	blaga grimasa, slab pokret, slaba obrana	bez odgovora na podražaj
<b>Puls</b>	više od 100 otkucaja u minuti	manje od 100 otkucaja u minuti	nema pulsa, ne čuje se srčana akcija

### 3.4 Uzorci

Uzorci su dobiveni venepunkcijom iz površinske antekubitalne vene u epruvete s mikroniziranim silikatnim aktivatorom zgrušavanja (6 mL Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austrija) (124). Odmah nakon vađenja, uzorci su dopremljeni u Klinički zavod za kemiju KBC Sestre milosrdnice. Nakon zgrušavanja, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri  $2200 \times g$ , serum je odvojen u višekratne alikvote te pohranjen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

Uzorci krvi prikupljeni su u dvije vremenske točke:

- prije početka trudova (prije porođaja)
- dva sata nakon porođaja (poslije porođaja)

Iz uzorka *prije porođaja* određene su:

- opće biokemijske i endokrinološke pretrage
- koncentracije kromogranina A i katestatina

Iz uzorka *poslije porođaja* određene su:

- koncentracije kromogranina A i katestatina

Biokemijski parametri obuhvaćaju određivanje koncentracije glukoze, C-reaktivnog proteina (CRP-a), triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola. Endokrinološki parametri obuhvaćaju sljedeće analize: tireotropni hormon, slobodni tiroksin, inzulin, hormon rasta, kortizol i prolaktin.

### 3.5 Metode

#### 3.5.1 Biokemijski parametri

Koncentracije biokemijskih analita određene su pomoću Abbott Alinity c8000 analizatora (Abbott Laboratories, Chicago, SAD) korištenjem originalnih Abbott reagensa prema specifikacijama proizvođača. Tijekom mjerenja poštivani su uobičajeni postupci kontrole kvalitete koji se primjenjuju u rutinskom laboratorijskom radu.

Reagensi korišteni u skladu s katalogom proizvođača:

<b>Analit</b>	<b>Naziv reagensa</b>	<b>Kataloški broj reagensa</b>
• glukoza	Abbott Alinity c Glucose	REF 07P5530;
• C-reaktivni protein	Abbott Alinity c CRP	REF 07P5620;
• trigliceridi	Abbott Alinity c Trig2	REF 04U0620;
• ukupni kolesterol	Abbott Alinity c Chol2	REF 04T8830;
• HDL-kolesterol	Abbott Alinity c Ultra HDL	REF 07P7530;
• LDL-kolesterol	Abbott Alinity c Direct LDL	REF 07P7120.

Koncentracija **glukoze** određena je enzimatskom metodom korištenjem heksokinaze. Glukoza iz uzorka fosforilirana je djelovanjem heksokinaze, pri čemu nastaje glukoza-6-fosfat koji se potom oksidira djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze uz stvaranje reduciranog koenzima NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Porast apsorbancije pri 340 nm, koji odgovara nastanku NADH, proporcionalan je koncentraciji glukoze u uzorku. Kalibracija glukoze je sljediva prema NIST SRM 965 standardu koristeći ID-GC/MS referentnu metodu. Mjerni raspon metode za serum iznosi 0,12 – 44,4 mmol/L.

Određivanje **CRP-a** temelji se na imunoturbidimetrijskoj metodi. Uzorak se miješa s reagensom koji sadrži čestice lateksa s adsorbiranim anti-CRP protutijelima, pri čemu dolazi do aglutinacije i promjene apsorbancije pri 572 nm. Brzina i intenzitet

promjene apsorbancije proporcionalni su koncentraciji CRP-a u uzorku. Određivanje CRP-a je sljedivo prema međunarodnom referentnom materijalu ERM-DA472/IFCC. Mjerni raspon metode iznosi 1,0 – 480,0 mg/L.

Određivanje **triglicerida** započinje enzimskom hidrolizom djelovanjem lipaze uz nastanak glicerola i slobodnih masnih kiselina. Glicerol sudjeluje u nizu enzimski kataliziranih reakcija koje dovode do stvaranja obojenog produkta. Apsorbancija nastalog produkta, mjerena pri 604 nm, proporcionalna je koncentraciji triglicerida. Metoda je kalibrirana pomoću ACS Grade Glycerol standarda. Mjerni raspon metode iznosi 0,02 – 17,01 mmol/L.

Određivanje **ukupnog kolesterola** temelji se na enzimskoj metodi gdje se esteri kolesterola hidroliziraju kolesterol-esterazom do slobodnog kolesterola i masnih kiselina. Slobodni kolesterol se zatim oksidira kolesterol-oksidazom uz stvaranje vodikova peroksida koji sudjeluje u daljnjim enzimskim reakcijama koje rezultiraju obojenim produktom. Apsorbancija produkta pri 604 nm proporcionalna je koncentraciji ukupnog kolesterola. Metoda je sljediva do Nacionalnog referentnog sustava za kolesterol, u skladu s Abell-Kendall referentnom metodom, u okviru *CDC-Certified Cholesterol Reference Method Laboratory Network*. Mjerni raspon metode iznosi 0,1 – 77 mmol/L.

Metoda za određivanje **HDL-kolesterola** temelji se na homogenoj enzimskoj dvokomponentnoj metodi bez prethodne separacije lipoproteina. U prvoj fazi reakcije dodatkom reagensa R1 dolazi do selektivnog otapanja i enzimске razgradnje ne-HDL lipoproteina, pri čemu nastaje bezbojni produkt. U drugoj fazi reakcije dodatkom reagensa R2 određuje se HDL-kolesterol selektivnim otapanjem pomoću specifičnog deterdženta i nastankom obojenog produkta. Apsorbancija nastalog obojenog produkta proporcionalna je koncentraciji HDL-kolesterola u uzorku. Reagens je sljediv do HDL-kolesterola prema NCEP-određenoj usporednoj metodi, u okviru *CDC-Certified Cholesterol Reference Method Laboratory Network*. Mjerni raspon metode iznosi 0,13 – 4,66 mmol/L.

Za uzorke s koncentracijom triglicerida < 4,2 mmol/L, **LDL-kolesterol** se izračunava prema Friedewaldovoj jednadžbi:

$$LDL\text{-kolesterol} \left( \frac{mmol}{L} \right) = ukupni\ kolesterol \left( \frac{mmol}{L} \right) - HDL\text{-kolesterol} \left( \frac{mmol}{L} \right) - \frac{trigliceridi \left( \frac{mmol}{L} \right)}{2,2}$$

Za uzorke s trigliceridima  $\geq 4,2$  mmol/L primjenjuje se direktna homogena metoda. U prvoj fazi reakcije dodatkom reagensa R1 dolazi do selektivnog otapanja ne-LDL lipoproteina, koji zatim reagiraju s kolesterol-esterazom i kolesterol-oksidadom uz nastanak bezbojnog produkta. U drugoj fazi dodatkom reagensa R2 LDL-kolesterol se selektivno otapa pomoću specifičnog deterdženta te u enzimskoj reakciji nastaje obojeni produkt. Apsorbancija nastalog obojenog produkta proporcionalna je koncentraciji LDL-kolesterola u uzorku. Kalibracija LDL-kolesterola je sljediva prema CDC Abell-Kendall referentnoj metodi, u okviru Certified Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN). Mjerni raspon metode iznosi 0,03 – 76,97 mmol/L.

### 3.5.2 Endokrinološki parametri

Mjerenja su provedena na automatiziranim imunokemijskim analizatorima Roche cobas e801 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) primjenom elektrokemiluminiscentne metode (ECLIA, engl. *electrochemiluminescence immunoassay*) te na sustavu IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Ujedinjeno Kraljevstvo) primjenom kemiluminiscentne metode (CLIA, engl. *chemiluminescence immunoassay*). Tijekom svih mjerenja primjenjivani su standardni postupci unutarnje kontrole kvalitete koji se rutinski provode u laboratoriju.

Reagensi su korišteni u skladu s uputama i katalozima proizvođača:

<b>Analit</b>	<b>Naziv reagensa</b>	<b>Kataloški broj reagensa</b>
• tireotropni hormon	Elecsys TSH	8443432190;
• slobodni tiroksin	Elecsys FT4 IV	9043284190;
• prolaktin	Elecsys Prolactin II	09755764190;
• kortizol	Elecsys Cortisol II	07027150190;
• inzulin	Elecsys Insulin	07027559190;
• hormon rasta	IDS hGH	IDS IS-3700.

Prilikom određivanja koncentracije analita ECLIA metodom primijenjena su dva analitička principa: *sandwich* i kompetitivni.

U ECLIA *sandwich* metodi, u prvoj inkubaciji dolazi do stvaranja imunokompleksa između ispitivanog analita i dvaju monoklonskih protutijela specifičnih za taj analit, usmjerenih na različite epitope, od kojih je jedno obilježeno rutenijevim kompleksom, a drugo biotinom. U drugoj inkubaciji, nastali kompleks veže se putem biotina za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Primjenom električnog napona na površini elektrode inducira se elektrokemiluminiscentna reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Intenzitet emitirane svjetlosti izravno je proporcionalan koncentraciji analita u uzorku, a koncentracija se automatski izračunava na temelju kalibracije i unaprijed definirane *master* krivulje.

U kompetitivnoj ECLIA metodi, u prvoj inkubaciji dolazi do kompeticije između analita iz uzorka i analognog derivata obilježenog rutenijevim kompleksom za vezanje na ograničeni broj biotinom obilježenih protutijela. Nakon vezanja na paramagnetske čestice obložene streptavidinom i magnetske separacije, primjenom napona inducira se elektrokemiluminiscentna reakcija. Intenzitet emitirane svjetlosti obrnuto je proporcionalan koncentraciji analita u uzorku, a rezultat se automatski izračunava primjenom kalibracije i *master* krivulje.

Prilikom određivanja koncentracije analita CLIA metodom korišten je *sandwich* princip. Uzorak se inkubira s biotinom obilježenim primarnim protutijelom i paramagnetskim česticama obloženima streptavidinom, čime se formira imunokompleks. Nakon magnetske separacije i ispiranja dodaje se sekundarno protutijelo obilježeno akridinijevim esterom. Nakon dodatne inkubacije i ispiranja, dodaju se reagensi koji induciraju kemiluminiscentnu reakciju. Intenzitet emitirane svjetlosti izravno je proporcionalan koncentraciji hormona rasta u uzorku, a rezultat se automatski izračunava na temelju provedene kalibracije.

Koncentracija **tireotropnog hormona** određena je automatiziranom ECLIA *sandwich* metodom. Metoda koristi dva monoklonska protutijela specifična za različite epitope molekule tireotropnog hormona. Kalibracija metode sljediva je prema drugom međunarodnom referentnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO IRP 80/558). Mjerni raspon metode iznosi 0,005 – 100 mIU/L.

Koncentracija **prolaktina** određena je automatiziranom ECLIA *sandwich* metodom. Metoda koristi dva monoklonska protutijela usmjerena na različite epitope molekule prolaktina. Metoda je sljediva prema trećem međunarodnom referentnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO IRP 84/500). Mjerni raspon metode iznosi 1 – 10 000 mIU/L.

Koncentracija **inzulina** određena je automatiziranom ECLIA *sandwich* metodom. Analiza koristi specifična monoklonska protutijela usmjerena na različite epitope molekule inzulina. Metoda je standardizirana prema prvom međunarodnom referentnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO IRP 66/304, NIBSC). Mjerni raspon metode iznosi 7 – 6945 pmol/L.

Koncentracija **kortizola** određena je kompetitivnom ECLIA metodom, pri čemu se kortizol iz uzorka natječe s obilježenim analogom za vezanje na specifična protutijela. Metoda je sljediva prema IRMM/IFCC-451, temeljenom na referentnoj metodi ID-GC/MS (engl. *isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry*). Mjerni raspon metode iznosi 3 – 1750 nmol/L.

Koncentracija **slobodnog tiroksina** određena je kompetitivnom ECLIA metodom. Metoda koristi specifična protutijela za tiroksin, a dobiveni rezultat odražava koncentraciju biološki aktivne, nevezane frakcije hormona. Metoda je sljediva do metode Enzymun Test FT4, standardizirane metodom ravnotežne dijalize (engl. *equilibrium dialysis*). Mjerni raspon metode iznosi 1,3 – 100 pmol/L.

Određivanje koncentracije **hormona rasta** provedeno je CLIA *sandwich* metodom. Metoda je standardizirana prema međunarodnom referentnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO IS 98/574, NIBSC). Mjerni raspon metode iznosi 0,05 – 100 µg/L.

### **3.5.3 Određivanje koncentracije kromogranina A i katestatina**

U svim uzorcima prije i poslije porođaja, određene su koncentracije kromogranina A i katestatina enzimskim imunoadsorpcijskim testom (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Koncentracije **kromogranina A** određene su korištenjem komercijalnog Chromogranin A ELISA kita (kataloški broj TM E-9000, LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn, Njemačka) temeljenog na *sandwich* principu. U prvom

koraku dodaje se 50  $\mu$ L razrijeđenog uzorka seruma (omjer 1:21 s puferom), te 50  $\mu$ L kontrola i standarda pri čemu se kromogranin A veže na fiksirana kromogranin A-specifična protutijela na mikrotitarskoj pločici. Nakon inkubacije od jednog sata na sobnoj temperaturi uz miješanje na 600 rpm i ispiranja četiri puta po 300  $\mu$ L dodaje se 50  $\mu$ L konjugata koji sadrži kromogranin A-specifična protutijela obilježena peroksidazom. Slijedi još jedna inkubacija od jednog sata na sobnoj temperaturi, također uz miješanje na 600 rpm, i ponovno ispiranje četiri puta po 300  $\mu$ L. Nakon toga dodaje se 100  $\mu$ L TMB supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin i vodikov peroksid) te se smjesa inkubira 20 minuta uz miješanje na 600 rpm, što dovodi do razvoja boje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji kromogranina A u uzorku. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100  $\mu$ L sumporne kiseline, a apsorbancija se mjeri na 450 nm uz korištenje korekcijskog filtera od 650 nm.

Za izradu kalibracijske krivulje korišteni su standardi u koncentracijama od 0, 30, 110, 450 i 900 ng/mL sljedivi do B·R·A·H·M·S Kryptor Cga II uz proširenu mjerenu nesigurnost od 16,5 %. Svaki je kalibrator testiran u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem srednje vrijednosti kalibratora na y-os, koncentracije standarda na x-os, a za njihov odnos korištena je 4-parametrijska logistička krivulja.

Kontrola kvalitete osigurana je analizom dva kontrolna uzorka poznatih koncentracija, čije su izmjerene vrijednosti bile unutar dozvoljenih raspona ciljnih koncentracija  $80 \pm 16,4$  i  $660 \pm 132$  ng/mL. Mjerni raspon metode iznosi 2,3 – 900 ng/mL, s koeficijentom varijacije unutar serije (engl. *intra-assay coefficient of variability*) manjim od 6,3 % i koeficijentom varijacije između serija (engl. *inter-assay coefficient of variability*) manjim od 5,3 %.

Koncentracije **katestatina** određene su korištenjem komercijalno dostupnog kita za humani katestatin (kataloški broj EK-053-27CE, EIA kit, extraction free, CE Mark Certified, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, SAD). Metoda se temelji na kompeticiji između katestatina i biotinom obilježenog katestatina za specifična protutijela fiksirana na mikrotitarskoj pločici. U prvom koraku dodaje se 50  $\mu$ L uzorka seruma, kontrole i standarda te se u svaku jažicu dodaje 50  $\mu$ L biotinom obilježenog katestatina. Nakon inkubacije od dva sata na sobnoj temperaturi uz miješanje na 400 rpm i ispiranja četiri puta po 350  $\mu$ L, dodaje se 100  $\mu$ L streptavidina obilježenog peroksidazom koji se veže na biotinom obilježeni katestatin na pločici. Slijedi još jedna inkubacija od jednog sata na sobnoj temperaturi uz miješanje na 400 rpm, nakon čega

se pločica ponovno ispire četiri puta po 350  $\mu\text{L}$ . Zatim se dodaje 100  $\mu\text{L}$  TMB supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin i vodikov peroksid) i inkubira se jedan sat na sobnoj temperaturi uz miješanje na 400 rpm. Razvija se boja čiji je intenzitet obrnuto proporcionalan koncentraciji katestatina u uzorku. Reakcija se zaustavlja dodatkom 100  $\mu\text{L}$  klorovodične kiseline, a apsorbancija se mjeri pri 450 nm uz korištenje korekcijskog filtera od 650 nm.

Za izradu kalibracijske krivulje korišten je originalni standard od 1000 ng/mL pomoću kojeg su uzastopnim razrjeđenjima dobiveni radni standardi u koncentracijama od 100, 10, 0,1 i 0,01 ng/mL. Svaki je kalibrator testiran u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem srednje vrijednosti kalibratora na y-os, koncentracije standarda na x-os, a za njihov odnos korištena je 4-parametrijska logistička krivulja.

Analiziran je komercijalni kontrolni uzorak čija je izmjerena koncentracija bila unutar dozvoljenog raspona vrijednosti (0,15 – 0,45 ng/mL). Mjerni raspon iznosi od 0 do 100 ng/mL uz limit detekcije od 0,5 ng/mL. Koeficijent varijacije unutar serije je manji od 10 %, a koeficijent varijacije između serija je manji od 15 %. Prema podacima proizvođača, križna reaktivnost s ljudskim katestatinom iznosi 100 %, a s kromograninom A 0 %.

### **3.6 Statistička analiza i prikaz podataka**

S obzirom na mali broj uzoraka po skupini u ovom istraživanju ( $N = 20$  u svakoj skupini), odabrani su neparametrijski statistički testovi (125). Mann–Whitney U test korišten je za usporedbu dviju nezavisnih skupina za kontinuirane ili ordinalne varijable, dok je Wilcoxonov parni test primijenjen za usporedbu dviju povezanih varijabli, primjerice kod usporedbe parametara dobivenih za istu ispitanicu prije i poslije porođaja. Rezultati Mann–Whitney U testa i Wilcoxonova testa prikazani su kao medijan s interkvartilnim rasponom. Fisherov egzaktni test primijenjen je za usporedbu kategorijskih varijabli u  $2 \times 2$  tablicama kontingencije, a rezultati su izraženi kao apsolutni broj ( $N$ ) i pripadajući postotak (%) u zagradi.

Spearmanova korelacija korištena je za procjenu jačine i smjera odnosa između dviju kontinuiranih ili ordinalnih varijabli. Rezultati su prikazani kao Spearmanov rho koeficijent s pripadajućim 95 % intervalom pouzdanosti. Ako je P-vrijednost pokazala statističku značajnost, Spearmanov rho koeficijent tumačen je prema Tablici 2 (126).

Logistička regresija korištena je za ispitivanje odnosa između zavisne varijable i jedne ili više nezavisnih varijabli. Rezultati su prikazani kao omjer izgleda (OR, engl. *odds ratio*) s pripadajućim 95 % intervalom pouzdanosti te P-vrijednostima. Omjer izgleda smatran je statistički značajnim ako je P-vrijednost  $< 0,05$  i interval pouzdanosti nije sadržavao broj 1 (127).

Za procjenu povezanosti sistoličkog i dijastoličkog tlaka s koncentracijama kromogranina A i katestatina provedena je višestruka linearna regresijska analiza. Sistolički i dijastolički tlak tretirani su kao kontinuirane zavisne varijable, dok su kromogranin A i katestatin uključeni kao nezavisne varijable. ITM i dob majke uključeni su kao zbunjujuće varijable (engl. *confounding*). Rezultati su prikazani uz nestandardizirane koeficijente regresije (B) sa 95 % intervalom pouzdanosti, pripadajućim P-vrijednostima te mjerama prilagodbe modela, uključujući  $R^2$  i F-statistiku.

Za statističku analizu podataka i grafičke prikaze korišteni su programi MedCalc Statistical Software, verzija 23.3.7 (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgija) i RStudio (RStudio: Integrated Development Environment for R, Posit Software, PBC, Boston, SAD). Razina statističke značajnosti definirana je kao  $P < 0,05$ .

**Tablica 2.** Interpretacija koeficijenta korelacije

<b>Povezanost</b>	<b>Spearmanov rho koeficijent (apsolutni)</b>
Nema povezanosti	0 – 0,25
Slaba	0,26 – 0,50
Umjerena do dobra	0,50 – 0,75
Vrlo dobra do izvrsna	0,76 – 1,0

## 4 REZULTATI

### 4.1 Demografske i kliničke karakteristike trudnica i novorođenčadi

Analiza demografskih i kliničkih podataka trudnica i neonatalnih ishoda prikazana je u Tablici 3, te pokazuje razlike između kontrolne skupine i skupine trudnica s gestacijskom hipertenzijom (GH skupina).

Trudnice su u GH skupini ranije rodile (39. vs. 40. tjedan trudnoće,  $P < 0,001$ ), bile su značajno niže ( $P = 0,004$ ), imale su veću tjelesnu masu ( $P = 0,003$ ) i viši ITM ( $P < 0,001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Sukladno očekivanjima, sistolički (sBP) i dijastolički (dBP) krvni tlak bili su značajno viši u GH skupini (oba  $P < 0,001$ ), potvrđujući hipertenziju.

Nisu zabilježene značajne razlike u dobi te promjeni tjelesne mase tijekom trudnoće. Samo je kod jedne trudnice u kontrolnoj skupini zabilježeno pušenje. Sve su trudnoće ostvarene prirodnim putem bez primjene postupaka medicinski potpomognute oplodnje.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u porođajnoj masi ( $P = 0,163$ ), duljini ( $P = 0,351$ ) ili percentilima porođajne mase ( $P = 0,655$ ) novorođenčadi između dviju skupina. Apgar indeksi u prvoj minuti iznosili su 9 bodova za 2/20 novorođenčadi i maksimalnih 10 bodova za ostalih 18/20 novorođenčadi u kontrolnoj skupini te 10 bodova za 20/20 novorođenčadi u GH skupini. Apgar indeks u petoj minuti iznosio je maksimalnih 10 bodova za svu novorođenčad obje skupine. S obzirom na to da su svi rezultati u obje skupine za Apgar indeks u prvoj i petoj minuti bili u rasponu od 7 do 10, sva se novorođenčad dobro prilagodila na život izvan maternice.

Trudnice s gestacijskom hipertenzijom bile su liječene metildopom, primjenjivanom dva ili tri puta dnevno. Medijan ukupne dnevne doze iznosio je 625 mg uz interkvartilni raspon od 500 – 750 mg. Najniža primijenjena dnevna doza iznosila je 500 mg (250 + 250 mg), dok je najviša iznosila 1750 mg dnevno (1000 + 250 + 500 mg).

**Tablica 3.** Demografske i kliničke karakteristike trudnica i novorođenčadi

Parametar (jedinice)	Kontrola (N = 20)	GH (N = 20)	P
<b>Dob</b> (godine)	35 (30 – 38)	32 (30 – 38)	0,786
<b>Broj prethodnih porođaja</b>	2 (2 – 3)	2 (1 – 3)	0,242
<b>Visina</b> (cm)	170 (167 – 176)	165 (162 – 168)	0,004
<b>Tjelesna masa</b> (kg)	82 (76 – 88)	90 (84 – 100)	0,003
<b>Indeks tjelesne mase</b> (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 (26,4 – 28,2)	32,0 (29,7 – 37,4)	< 0,001
<b>Dobitak tjelesne mase u trudnoći</b> (kg)	13 (9 – 17)	12 (11 – 14)	0,693
<b>Sistolički tlak</b> (mmHg)	110 (110 – 120)	143 (135 – 158)	< 0,001
<b>Dijastolički tlak</b> (mmHg)	70 (65 – 80)	88 (80 – 90)	< 0,001
<b>Tjedan gestacije</b>	40 (39 – 41)	39 (39 – 39)	< 0,001
<b>Tjelesna masa novorođenčeta</b> (g)	3645 (3320 – 3990)	3375 (3210 – 3835)	0,163
<b>Duljina novorođenčeta</b> (cm)	51 (50 – 52)	50 (49 – 52)	0,351
<b>Spol novorođenčeta, M</b>	11 (55%)	12 (60%)	1,000
<b>Percentili porođajne mase</b>	69 (48 – 88)	72 (52 – 92)	0,655

Za usporedbu kontinuiranih varijabli između dvije skupine korišten je neparametrijski Mann–Whitney U test te su vrijednosti prikazane kao medijan (interkvartilni raspon). Za usporedbu kategorijskih varijabli korišten je Fisherov egzaktni test te su vrijednosti prikazane kao broj i pripadajući postotak. Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom.

## 4.2 Biokemijske i endokrinološke pretrage

Provedena je usporedba općih biokemijskih i endokrinoloških pretraga. Rezultati usporedbe kontrolne i GH skupine navedeni su u Tablici 4. Većina biokemijskih pretraga pokazuje da nema razlike u koncentracijama između kontrole i GH skupine. Iznimke su niže koncentracije glukoze u GH skupini ( $P = 0,039$ ), te više koncentracije triglicerida ( $P = 0,033$ ). Također, većina endokrinoloških pretraga ne razlikuje se između skupina, osim hormona rasta koji je pokazao statistički značajno nižu koncentraciju u GH skupini ( $P < 0,001$ ).

**Tablica 4.** Usporedba biokemijskih i endokrinoloških pretraga između kontrolne skupine i skupine s gestacijskom hipertenzijom prije porođaja

Analit (jedinice)	Kontrola (N = 20)	GH (N = 20)	P
<b>Glukoza</b> (mmol/L)	4,4 (4,0 – 4,8)	3,7 (3,3 – 4,6)	0,039
<b>C-reaktivni protein</b> (mg/L)	3,8 (2,0 – 8,4)	5,0 (2,0 – 8,2)	0,481
<b>Kolesterol</b> (mmol/L)	7,1 (6,3 – 7,6)	6,7 (6,0 – 8,2)	0,828
<b>HDL-kolesterol</b> (mmol/L)	1,8 (1,6 – 2,2)	1,6 (1,2 – 2,1)	0,103
<b>LDL-kolesterol</b> (mmol/L)	3,8 (3,5 – 4,4)	4,2 (2,8 – 4,9)	0,578
<b>Trigliceridi</b> (mmol/L)	2,4 (2,1 – 3,6)	3,3 (2,5 – 4,4)	0,033
<b>Tireotropni hormon</b> (mIU/L)	1,286 (0,848 – 1,907)	1,373 (0,946 – 2,251)	0,583
<b>Tiroksin, slobodni</b> (pmol/L)	11,3 (10,5 – 12,2)	11,5 (10,1 – 12,1)	0,645
<b>Prolaktin</b> (mIU/L)	5205 (3542 – 6578)	5965 (4209 – 6957)	0,429
<b>Kortizol</b> (nmol/L)	860 (736 – 1164)	788 (612 – 1124)	0,413
<b>Inzulin</b> (pmol/L)	78 (61 – 168)	101 (52 – 143)	0,946
<b>Hormon rasta</b> ( $\mu\text{g/L}$ )	0,30 (0,24 – 0,56)	0,11 (0,01 – 0,20)	< 0,001

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Za usporedbu je korišten neparametrijski Mann–Whitney U test. Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom; **HDL-kolesterol** – lipoprotein visoke gustoće; **LDL-kolesterol** – lipoprotein niske gustoće.

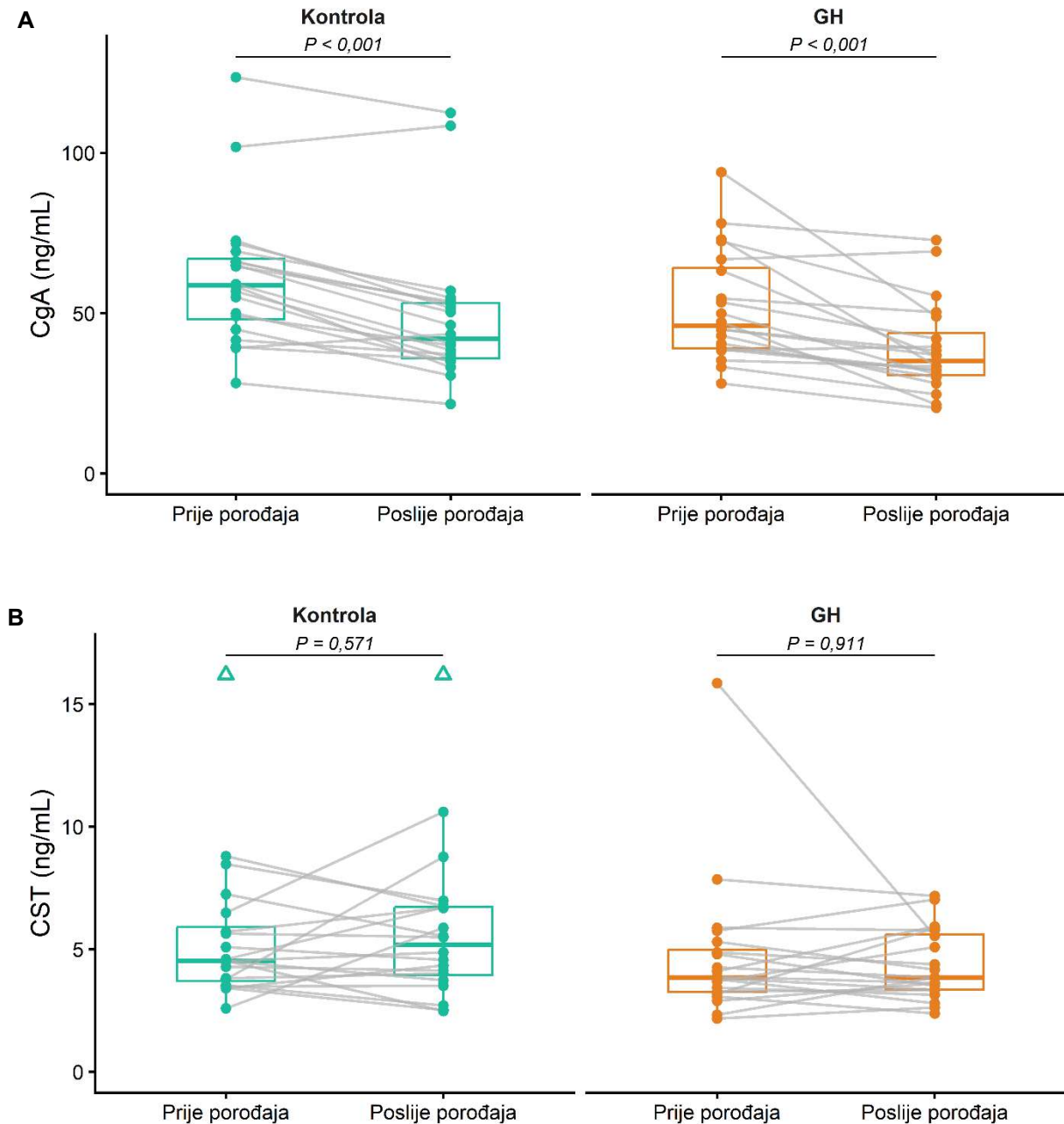
### 4.3 Longitudinalna promjena koncentracije kromogranina A i katestatina

Koncentracije kromogranina A i katestatina prije i poslije porođaja prikazane su u Tablici 5 i na Slici 4. Koncentracija kromogranina A statistički se značajno smanjila nakon porođaja u obje skupine uz  $P < 0,001$ . Koncentracije katestatina nisu pokazale statistički značajnu promjenu prije i poslije porođaja unutar kontrolne ( $P = 0,571$ ) i GH skupine ( $P = 0,911$ ).

**Tablica 5.** Koncentracija kromogranina A i katestatina prije i poslije porođaja

Analit (jedinice)		Prije porođaja	Poslije porođaja	P <sup>1</sup> Prije vs. Poslije
<b>CgA</b> (ng/mL)	<b>Kontrola</b> (N = 20)	58,7 (47,0 – 67,8)	42,1 (35,8 – 53,4)	< 0,001
	<b>GH</b> (N = 20)	46,1 (40,0 – 65,1)	35,2 (30,5 – 45,5)	< 0,001
	<b>P<sup>2</sup> Kontrola vs. GH</b>	0,126	0,056	-
<b>CST</b> (ng/mL)	<b>Kontrola</b> (N = 20)	4,5 (3,7 – 6,1)	5,2 (3,9 – 6,7)	0,571
	<b>GH</b> (N = 20)	3,9 (3,2 – 5,1)	3,9 (3,3 – 5,7)	0,911
	<b>P<sup>2</sup> Kontrola vs. GH</b>	0,168	0,127	-

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom; **P<sup>1</sup>** – Wilcoxonov test (Prije vs. Poslije porođaja unutar iste skupine); **P<sup>2</sup>** – Mann–Whitney U test (Kontrola vs. GH unutar iste točke).



**Slika 4.** Koncentracije kromogranina A i katestatina prije i poslije porođaja.

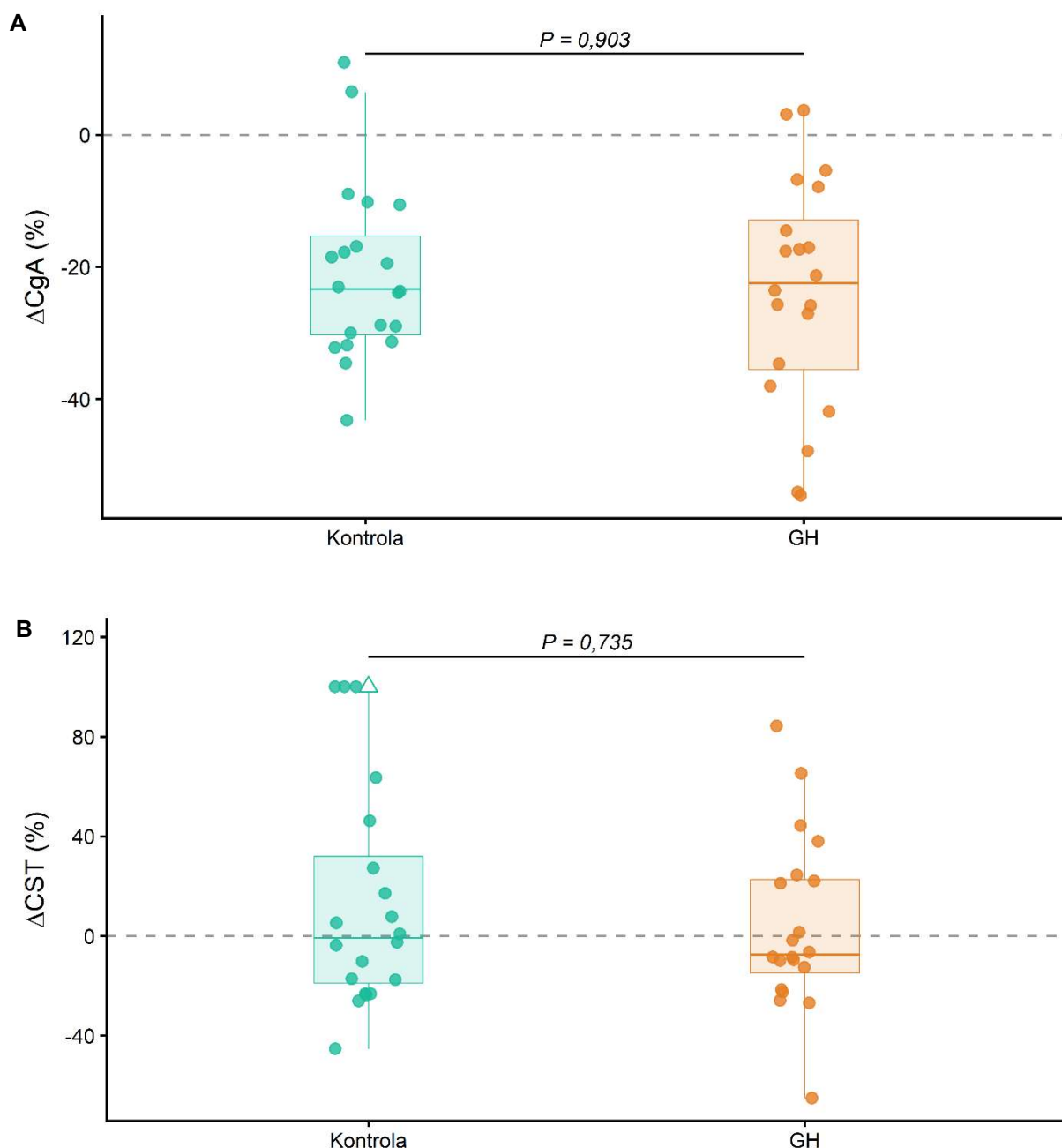
Koncentracije kromogranina A (A) i katestatina (B) prije i poslije porođaja za kontrolnu skupinu (tirkizna boja) i skupinu s gestacijskom hipertenzijom (narančasta boja). Kutijasti dijagram (engl. boxplot) prikazuje medijan i interkvartilni raspon. Ručice (engl. whiskers) označavaju granice podataka unutar  $1,5 \times$  interkvartilnog raspona, dok su vrijednosti izvan tog raspona prikazane pojedinačno. Sive linije predstavljaju koncentraciju prije i poslije porođaja za jednu trudnicu. Trokut predstavlja vrijednost van slikovnog prikaza. Za usporedbu je korišten Wilcoxonov test uz statističku značajnost  $P < 0,05$ . Broj uzoraka po skupini  $N = 20$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom

### **4.3.1 Razlike u apsolutnim i relativnim promjenama koncentracije**

Mann–Whitney U testom ispitana je razlika u apsolutnim i relativnim promjenama koncentracija kromogranina A i katestatina između dviju točaka vađenja. Apsolutna je razlika izračunata kao razlika koncentracija poslije porođaja i koncentracija prije porođaja te izražena kao ng/mL. Relativna je razlika izračunata kao (koncentracija poslije porođaja - koncentracija prije porođaja)/koncentracija prije porođaja te je izražena u postocima.

Kada se promjena izražava kao apsolutna razlika u ng/mL, uočeno je prosječno smanjenje kromogranina A od  $-13,6$  ng/mL ( $-18,4 - -7,8$  ng/mL) u kontrolnoj skupini i  $-8,3$  ng/mL ( $-18,1 - -5,9$  ng/mL) u GH skupini. Nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ( $P = 0,570$ ). Samo 4 para uzoraka (2/20 u svakoj skupini) pokazala su porast koncentracije nakon porođaja u rasponu od 1,2 do 6,6 ng/mL. U kontrolnoj skupini uočeno je smanjenje od  $-0,1$  ng/mL ( $-0,9 - +1,6$  ng/mL), a u GH skupini smanjenje od  $-0,3$  ng/mL ( $-0,7 - +1,0$  ng/mL) koncentracije katestatina. Ni za promjenu koncentracije katestatina nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ( $P = 0,766$ ).

Kada se promjena izražava kao postotna promjena, kromogranin A je pokazao smanjenje od  $-23$  % ( $-31 - -14$  %) u kontrolnoj skupini i slično smanjenje od  $-23$  % ( $-36 - -11$  %) u GH skupini. Postotna promjena katestatina iznosila je  $-1$  % ( $-20 - +37$  %) u kontrolnoj skupini i  $-8$  % ( $-17 - +23$  %) u GH skupini. Nisu zabilježene statistički značajne razlike u relativnoj promjeni koncentracija za kromogranin A ( $P = 0,903$ ) i katestatin ( $P = 0,735$ ). Delta vrijednosti prikazane su grafički na Slici 5.



**Slika 5.** Relativna promjena koncentracije kromogranina A i katestatina prije i poslije porođaja

Relativna promjena koncentracija kromogranina A (A) i katestatina (B) prije i poslije porođaja za kontrolnu skupinu (tirkizna boja) i skupinu s gestacijskom hipertenzijom (narančasta boja). Y-os predstavlja razliku u izmjerenoj koncentraciji analita prema formuli  $\Delta = (\text{koncentracija poslije porođaja} - \text{koncentracija prije porođaja}) / \text{koncentracija prije porođaja}$ . Svaka točka predstavlja razliku za jedan par mjerenja. Kutijasti dijagram (engl. boxplot) prikazuje medijan i interkvartilni raspon. Ručice (engl. whiskers) označavaju granice podataka unutar  $1,5 \times$  interkvartilnog raspona, dok su vrijednosti izvan tog raspona prikazane trokutom. Za usporedbu je korišten Mann–Whitney U test uz statističku značajnost  $P < 0,05$ . Broj uzoraka po skupini  $N = 20$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom.

#### **4.4 Usporedba koncentracija kromogranina A i katestatina između skupina prije porođaja**

Koncentracije kromogranina A i katestatina u uzorku prije porođaja u kontrolnoj i GH skupini prikazane su u Tablici 5. Usporedbom između skupina nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama kromogranina A (kontrola: 58,7 (47,0 – 67,8) ng/mL vs. GH: 46,1 (40,0 – 65,1) ng/mL;  $P = 0,126$ ) i katestatina (kontrola: 4,5 (3,7 – 6,1) ng/mL vs. GH: 3,9 (3,2 – 5,1) ng/mL;  $P = 0,168$ ).

#### **4.5 Usporedba koncentracija kromogranina A i katestatina između skupina poslije porođaja**

Koncentracije kromogranina A i katestatina poslije porođaja u kontrolnoj i GH skupini prikazane su u Tablici 5. Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne i GH skupine u koncentracijama kromogranina A (kontrola: 42,1 (35,8 – 53,4) ng/mL vs. GH: 35,2 (30,5 – 45,5) ng/mL;  $P = 0,056$ ) i katestatina (kontrola: 5,2 (3,9 – 6,7) ng/mL vs. GH: 3,9 (3,3 – 5,7) ng/mL;  $P = 0,127$ ).

#### **4.6 Utjecaj spola fetusa na koncentracije kromogranina A i katestatina**

Koncentracije kromogranina A i katestatina u uzorcima prije porođaja uspoređene su uz dodatnu stratifikaciju prema spolu fetusa (muški i ženski; Tablica 6).

Utvrđeno je da ni u kontrolnoj skupini ( $P = 0,370$ ) ni u GH skupini ( $P = 0,054$ ) nema statistički značajne razlike u koncentracijama kromogranina A ovisno o spolu fetusa. Usporedba koncentracija kromogranina A između kontrolne i GH skupine, unutar iste podskupine po spolu, pokazala je da nema statistički značajnih razlika ni za muške ( $P = 0,853$ ) ni za ženske fetuse ( $P = 0,075$ ).

Što se tiče koncentracija katestatina, u kontrolnoj skupini nije bilo statistički značajne razlike između muških i ženskih fetusa ( $P = 0,648$ ). U GH skupini također nije pronađena statistički značajna razlika ovisno o spolu ( $P = 0,083$ ). Međutim, usporedbom koncentracija katestatina između kontrolne i GH skupine unutar istog spola fetusa, nije bilo statistički značajne razlike za muške fetuse ( $P = 0,976$ ), ali je utvrđena statistički značajna razlika za ženske fetuse ( $P = 0,046$ ).

**Tablica 6.** Utjecaj spola fetusa na koncentraciju kromogranina A i katestatina

Analit (jedinice)		Muški	Ženski	P <sup>1</sup> Muški vs. Ženski
<b>CgA</b> (ng/mL)	<b>Kontrola</b> (N = 11/9)	55,0 (40,9 – 65,7)	59,1 (55,1 – 69,9)	0,370
	<b>GH</b> (N = 12/8)	51,7 (44,9 – 65,1)	38,8 (34,3 – 56,5)	0,054
	<b>P<sup>2</sup> Kontrola vs. GH</b>	0,853	0,075	-
<b>CST</b> (ng/mL)	<b>Kontrola</b> (N = 11/9)	4,5 (3,8 – 5,6)	4,6 (3,5 – 7,6)	0,648
	<b>GH</b> (N = 12/8)	4,0 (3,7 – 5,8)	3,3 (2,6 – 4,6)	0,083
	<b>P<sup>2</sup> Kontrola vs. GH</b>	0,976	0,046	-

Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom; **P<sup>1</sup>** – Mann–Whitney U test (Muški vs. Ženski spol unutar iste skupine); **P<sup>2</sup>** – Mann–Whitney U test (Kontrola vs. GH unutar istog spola).

#### **4.7 Korelacijska analiza kromogranina A i katestatina s kliničkim parametrima**

Provedena je korelacijska analiza kako bi se procijenile povezanosti između koncentracija kromogranina A i katestatina prije porođaja s kliničkim parametrima odvojeno za kontrolnu i GH skupinu. Za GH skupinu dodatno je ispitana korelacija doze metildope s koncentracijama biljega i krvnim tlakom (Tablica 7).

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da ne postoji statistički značajna korelacija između kromogranina A i katestatina ni u kontrolnoj ni u GH skupini.

U kontrolnoj skupini zabilježene su statistički značajne umjerene pozitivne korelacije katestatina sa sistoličkim krvnim tlakom ( $\rho = 0,536$ ,  $P = 0,015$ ) i dijastoličkim krvnim tlakom ( $\rho = 0,470$ ,  $P = 0,036$ ). U obje skupine, kromogranin A nije pokazao statistički značajne korelacije ni s jednim od ispitivanih kliničkih parametara. Također, nijedan od testiranih biljega nije pokazao značajnu korelaciju s percentilima porođajne mase niti u jednoj ispitivanoj skupini. Korelacija s Apgar indeksom u prvoj i petoj minuti nije provedena s obzirom na to da su svi rezultati u obje skupine unutar raspona 7 – 10 što se klasificira kao normalno stanje novorođenčadi (dobra prilagodba na život izvan maternice).

Dodatno, u GH skupini ispitana je korelacija dnevne doze metildope s koncentracijama biljega i krvnim tlakom. Nije utvrđena statistički značajna korelacija doze metildope s koncentracijama kromogranina A, katestatina, sistoličkim ili dijastoličkim tlakom.

**Tablica 7.** Spearmanova korelacija u kontrolnoj skupini i skupini s gestacijskom hipertenzijom prije porođaja

Korelacije	Kontrola (N = 20)	P	GH (N = 20)	P
	Spearman rho (95%CI)		Spearman rho (95%CI)	
CgA vs. CST	0,184 (-0,282 – 0,579)	0,439	-0,210 (-0,597 – 0,256)	0,375
CgA vs. sBP	-0,183 (-0,579 – 0,283)	0,440	0,051 (-0,400 – 0,483)	0,830
CgA vs. dBP	-0,349 (-0,686 – 0,111)	0,132	0,317 (-0,146 – 0,666)	0,173
CgA vs. percentili	-0,074 (-0,500 – 0,381)	0,757	-0,186 (-0,581 – 0,280)	0,433
CST vs. sBP	0,536 (0,122 – 0,791)	0,015	0,090 (-0,367 – 0,512)	0,705
CST vs. dBP	0,470 (0,035 – 0,756)	0,036	0,306 (-0,158 – 0,659)	0,190
CST vs. percentili	-0,010 (-0,451 – 0,434)	0,966	0,301 (-0,163 – 0,656)	0,197
Doza vs. CgA	-	-	-0,132 (-0,543 – 0,330)	0,580
Doza vs. CST	-	-	0,066 (-0,388 – 0,494)	0,783
Doza vs. sBP	-	-	0,013 (-0,432 – 0,453)	0,958
Doza vs. dBP	-	-	-0,153 (-0,557 – 0,311)	0,521

Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **GH** – trudnice s gestacijskom hipertenzijom; **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **sBP** – sistolički krvni tlak; **dBP** – dijastolički krvni tlak; **Doza** – dnevna doza metildope; **Spearman rho** – Spearmanov koeficijent korelacije; **95%CI** – 95 % interval pouzdanosti.

#### 4.8 Predviđanje gestacijske hipertenzije

Logističkom regresijom ispitani su kromogranin A i katestatin prije porođaja kao potencijalni prediktori gestacijske hipertenzije. Klinički čimbenici, ITM i dob, uzeti su kao zbunjujuće varijable. Rezultati su prikazani u Tablici 8. Model logističke regresije za predviđanje gestacijske hipertenzije bio je statistički značajan ( $P = 0,001$ ), što ukazuje na to da prediktori, promatrani zajedno, značajno doprinose predviđanju rizika. Model objašnjava približno 49,5 % varijance u ishodu gestacijske hipertenzije, na temelju Nagelkerke  $R^2 = 0,495$ . Jedini statistički značajan prediktor je ITM ( $OR = 1,458$ ,  $P = 0,007$ ). Koncentracije kromogranina A, katestatina i dob majke nisu pokazale statistički značajan utjecaj na izgled za razvoj gestacijske hipertenzije. Njihove  $P$ -vrijednosti su veće od 0,05, a intervali pouzdanosti za OR uključuju 1, što ukazuje na nedostatak statističke značajnosti.

**Tablica 8.** Rezultati logističke regresije za koncentracije kromogranina A i katestatina u predikciji gestacijske hipertenzije

	Varijable (N = 40)	OR	95%CI	B	SE	P
<b>Prediktori</b>	CgA	0,985	0,942 – 1,029	-0,015	0,022	0,496
	CST	0,776	0,492 – 1,224	-0,254	0,232	0,275
<b>Zbunjujuće varijable</b>	ITM	1,458	1,111 – 1,912	0,377	0,138	0,007
	Dob majke	0,976	0,828 – 1,150	-0,025	0,084	0,767
<b>Model Fit</b>	P					0,001
	Nagelkerke $R^2$					0,495

Rezultati su prikazani kao omjer izgleda uz 95 % interval pouzdanosti, koeficijent regresije i njegovu standardnu pogrešku. Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **ITM** – indeks tjelesne mase; **OR** – omjer izgleda; **95%CI** – 95 % interval pouzdanosti; **B** – koeficijent regresije; **SE** – standardna pogreška.

#### **4.9 Povezanost kromogranina A i katestatina s krvnim tlakom**

Višestruka linearna regresijska analiza provedena je kako bi se istražila povezanost sistoličkog i dijastoličkog tlaka s koncentracijama kromogranina A i katestatina, uz ITM i dob majke kao zbunjujuće varijable. Rezultati regresijskih modela prikazani su u Tablici 9.

Ukupni model za sistolički krvni tlak nije bio statistički značajan ( $F = 1,449$ ,  $P = 0,239$ ). Model objašnjava 14,2 % varijance ( $R^2 = 0,142$ ,  $R^2$  prilagođeni = 0,044). Od svih prediktora, samo je ITM bio statistički značajan ( $B = 1,444$ ,  $P = 0,038$ ), što znači da povećanje ITM-a za jednu jedinicu predviđa porast sistoličkog krvnog tlaka za 1,444 mmHg, pri čemu su ostale varijable kontrolirane. Koncentracije kromogranina A, katestatina i dob majke nisu pokazale statistički značajan utjecaj na sistolički krvni tlak.

Ukupni model za dijastolički krvni tlak također nije bio statistički značajan ( $F = 1,107$ ,  $P = 0,369$ ). Model objašnjava 11,2 % varijance ( $R^2 = 0,112$ ,  $R^2$  prilagođeni = 0,011). Nijedan od prediktora (kromogranin A, katestatin, ITM i dob majke) nije imao statistički značajan utjecaj na dijastolički krvni tlak u ovom modelu.

**Tablica 9.** Rezultati višestruke linearne regresije za koncentracije kromogranina A i katestatina u predikciji sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka

Varijabla (N = 40)	sBP			dBP		
	B	95%CI	P	B	95%CI	P
<b>Prediktori</b>						
CgA	-0,112	-0,465 – 0,242	0,525	-0,028	-0,240 – 0,185	0,796
CST	-0,089	-0,947 – 0,769	0,834	0,281	-0,235 – 0,797	0,276
<b>Zbunjujuće</b>						
<b>ITM</b>	1,444	0,084 – 2,803	0,038	0,602	-0,215 – 1,419	0,144
<b>varijable</b>						
Dob majke	0,059	-1,284 – 1,402	0,929	-0,357	-1,164 – 0,450	0,375
<b>Model Fit</b>						
F-statistika	1,449		0,239	1,107		0,369
R <sup>2</sup>	0,142			0,112		
Prilagođeni R <sup>2</sup>	0,044			0,011		

Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ . **CgA** – kromogranin A; **CST** – katestatin; **ITM** – indeks tjelesne mase; **sBP** – sistolički krvni tlak; **dBP** – dijastolički krvni tlak; **B** – koeficijent regresije; **95%CI** – 95 % interval pouzdanosti.

## 5 RASPRAVA

U radu se ispitivala razlika u koncentracijama kromogranina A i katestatina kod trudnica s gestacijskom hipertenzijom koje su liječene metildopom, u usporedbi sa zdravim kontrolama, s posebnim naglaskom na promjene tijekom porođaja i moguće korelacije s neonatalnim ishodima trudnoće. U skladu s glavnom hipotezom, trudnice s gestacijskom hipertenzijom imale su statistički značajno više koncentracije kromogranina A prije porođaja u usporedbi s razdobljem nakon porođaja ( $P < 0,001$ ). Međutim, koncentracije katestatina prije porođaja nisu bile niže ( $P = 0,911$ ) što je u suprotnosti s glavnom hipotezom.

### 5.1 Biokemijski i klinički parametri

Analiza demografskih i kliničkih karakteristika otkrila je značajne razlike između kontrolne skupine i GH skupine koje potvrđuju kliničku sliku gestacijske hipertenzije već opisane u literaturi.

Najistaknutija razlika prisutna je u indeksu tjelesne mase, gdje GH skupina pokazuje značajno više vrijednosti u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P < 0,001$ ). To je u skladu s opsežnim dosadašnjim istraživanjima koja navode pretilost kao jedan od najjačih rizičnih čimbenika za razvoj hipertenzivnih poremećaja u trudnoći. Osim višeg ITM-a, trudnice u GH skupini bile su značajno teže ( $P = 0,003$ ) i značajno niže ( $P = 0,004$ ). Iako je manja visina pridonijela višem ITM-u u GH skupini, razlika u masi ostaje zabilježena i nakon prilagodbe za visinu putem ITM-a. Dobitak tjelesne mase u trudnoći nije se razlikovao između skupina ( $P = 0,693$ ), što sugerira da je ITM prije trudnoće bitniji za razvoj GH nego dobitak tijekom same trudnoće. Očekivano, sistolički i dijastolički tlak bili su značajno viši u GH skupini ( $P < 0,001$  za oba), definirajući patofiziološku osnovu gestacijske hipertenzije i potvrđujući ispravnu stratifikaciju trudnica prema kliničkim kriterijima. Gestacijska dob pri porođaju bila je značajno niža u GH skupini ( $P < 0,001$ ). Budući da su sve trudnice bile u punom terminu (između 38. i 41. tjedna trudnoće), ova se razlika ne smatra klinički značajnom. Neonatalni ishodi nisu pokazali statistički značajne razlike između skupina. Porođajna masa, duljina, percentili porođajne mase i Apgarov indeks novorođenčadi bili su slični u obje skupine. Suprotno tome, prethodna istraživanja o preeklampsiji često navode nižu porođajnu masu i veću učestalost novorođenčadi manjih za gestacijsku dob (SGA, engl. *small for*

*gestational age*) (128). GH skupina u ovom istraživanju predstavlja blaže oblike hipertenzivnih poremećaja bez proteinurije, pri čemu je IUGR bio kriterij isključenja, što može objasniti očuvanje fetalnog rasta u usporedbi s preeklampsijom. Sveukupno, karakteristike trudnica u istraživanju potvrđuju povezanost pretilosti i gestacijske hipertenzije, uz očuvanje fetalnog rasta, što sugerira da ispitivana GH skupina predstavlja blaže oblike hipertenzije s manjim utjecajem na neonatalne ishode.

Analiza biokemijskih i endokrinoloških pretraga ukazala je na povišene koncentracije triglicerida u GH skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P = 0,033$ ), što je u skladu s literaturom koja identificira hipertrigliceridemiju kao sastavnicu patogeneze hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (129). Značajna opažanja su niža koncentracija glukoze ( $P = 0,039$ ) te hormona rasta u GH skupini ( $P < 0,001$ ). Ostali lipoproteini (kolesterol, HDL-kolesterol i LDL-kolesterol), CRP i većina endokrinoloških pretraga (tireotropni hormon, slobodni tiroksin, prolaktin, kortizol, inzulin) nisu pokazali značajne razlike između skupina. Međutim, uzorci prikupljeni prije početka porođaja uzorkovani su neovisno o vremenu posljednjeg obroka. Za određene analite poželjno je uzorkovanje natašte, kako bi se rezultati mogli usporediti s referentnim intervalima i graničnim vrijednostima te kako bi se smanjio utjecaj hrane na koncentracije. U idealnim uvjetima, standardizirano vrijeme vađenja krvi omogućilo bi bolju usporedivost rezultata. S obzirom na dizajn ovog istraživanja, uzorkovanje je provedeno unutar klinički definiranog raspona, odnosno prije početka trudova i porođaja.

## **5.2 Kromogranin A i katestatin u gestacijskoj hipertenziji**

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da trudnice s gestacijskom hipertenzijom nemaju statistički značajno različite koncentracije kromogranina A i katestatina u odnosu na zdrave kontrole prije porođaja. Iako je uočen trend nižih koncentracija kromogranina A ( $P = 0,126$ ) i katestatina ( $P = 0,168$ ) u GH skupini, navedene razlike nisu dosegnule statističku značajnost. Sličan obrazac zabilježen je i u uzorcima nakon porođaja, pri čemu su koncentracije kromogranina A ( $P = 0,056$ ) i katestatina ( $P = 0,127$ ) također bile niže u GH skupini, bez postizanja statističke značajnosti.

Unatoč potencijalnoj važnosti kromogranina A kao biljega i regulatora krvnog tlaka, dostupni su ograničeni podaci o njegovim koncentracijama u trudnica s hipertenzivnim poremećajima. Samo jedna studija otkrila je značajno veću ekspresiju

gena za kromogranin A u posteljicama žena oboljelih od preeklampsije, u usporedbi sa zdravim kontrolama. Iako je ekspresija gena za kromogranin A bila povišena, koncentracije proteina u posteljici nisu značajno varirale (89). S obzirom na to da u relevantnoj literaturi nedostaju podaci o koncentracijama kromogranina A u serumu trudnica s dijagnosticiranom preeklampsijom ili gestacijskom hipertenzijom, otežana je usporedba dobivenih rezultata s prethodnim istraživanjima.

Studije s fokusom na katestatin u gestacijskoj hipertenziji su oskudne. Jedna takva studija, autora Günzel i suradnika, ispitala je razliku u koncentraciji katestatina između normotenzivnih i hipertenzivnih trudnica u različitim tjednima trudnoće. Zaključno, više koncentracije katestatina zabilježene su u hipertenzivnoj skupini (31,61 vs. 48,46 pg/mL) (130). Većina objavljenih studija bila je usmjerena na preeklampsiju, a ne na gestacijsku hipertenziju, no rezultati ispitivanja daju oprečne rezultate. Tüten i suradnici izvijestili su o značajno povišenim koncentracijama serumskog katestatina u trudnoćama s preeklampsijom u usporedbi s gestacijski usklađenim kontrolama (290,7 vs. 182,8 pg/mL) (119). Suprotno tome, Palmrich i suradnici pronašli su značajno niže koncentracije katestatina u preeklampsiji (3,03 vs. 4,82 ng/mL), sugerirajući da smanjeni katestatin može biti povezan s prisutnošću preeklampsije (128). Bralewska i suradnici također su izvijestili o nižim koncentracijama katestatina u posteljicama s preeklampsijom, unatoč povišenoj genskoj ekspresiji kromogranina A, predlažući da smanjeni katestatin u posteljici može pridonijeti hipertenziji u preeklampsiji (89). Slično, AlGhazali i suradnici izvijestili su o nižim koncentracijama katestatina u teškoj preeklampsiji u usporedbi s kontrolama (29,01 vs. 59,96 ng/mL) (131). Ipak, dvije studije nisu izvijestile o značajnoj razlici između preeklampsije i kontrola: Ozalp i suradnici (5,20 vs. 5,23 ng/mL) te Owolabi i suradnici (3,9 vs. 3,3 ng/mL) (132,133).

Studije koje su uključivale blagu i tešku preeklampsiju često nisu pronalazile razlike u koncentraciji katestatina između ovih podskupina, sugerirajući da težina hipertenzije sama po sebi vjerojatno nije glavna osnova promjena koncentracija katestatina (119,131). Oprečno, Owolabi i suradnici ukazali su na značajno više koncentracije katestatina u teškoj u odnosu na blagu preeklampsiju (4,5 vs. 3,3 ng/mL) (134).

Nekoliko čimbenika može objasniti razlike u dobivenim rezultatima između objavljenih studija. Većina prethodnih istraživanja koja su pokazala različite koncentracije kromogranina A i katestatina provedena su u populaciji trudnica s

preeklampsijom, a ne gestacijskom hipertenzijom. Preeklampsija i gestacijska hipertenzija, iako se obje ubrajaju u hipertenzivne poremećaje trudnoće, predstavljaju različite kliničke entitete s moguće različitim patofiziološkim mehanizmima (135). Preeklampsija se karakterizira sistemskom endotelnom disfunkcijom, ishemijom posteljice, povećanim stvaranjem antiangiogenih čimbenika te izraženom aktivacijom upalnih i oksidativnih mehanizama (136). S druge strane, gestacijska hipertenzija predstavlja blaži oblik hipertenzivnog poremećaja, bez proteinurije i bez sistemske endotelne disfunkcije. Stoga je moguće da neuroendokrini profil gestacijske hipertenzije bitno odstupa od preeklampsije, i da kromogranin A i katestatin nisu uključeni u patogenezu gestacijske hipertenzije na isti način kao u preeklampsiji.

Nadalje, sve trudnice s gestacijskom hipertenzijom bile su liječene metildopom, centralnim  $\alpha$ 2-adrenergičkim agonistom koji smanjuje aktivnost simpatičkog živčanog sustava (137). Moguće je da terapija metildopom dovodi do normalizacije koncentracija kromogranina A i katestatina u GH skupini, prikrivajući razlike koje bi se inače očitovale. U kliničkim studijama koje su ispitivale moguću povezanost katestatina i preeklampsije, primjena antihipertenzivne terapije nije bila detaljno navedena (119,128,131,132). S obzirom na to da se lijekovi poput metildope, labetalola i nifedipina standardno koriste za liječenje hipertenzije u trudnoći, moguće je da su trudnice u skupinama s preeklampsijom primale terapiju. Međutim, bez definiranog tipa lijeka i doze u publikacijama, nije moguće izravno procijeniti potencijalan učinak lijeka na koncentracije kromogranina A i katestatina, što otežava usporedbu rezultata. Iznimka je studija Owolabi i suradnika koja kao isključni kriterij navodi antihipertenzivnu terapiju u obje skupine, a čiji rezultati ukazuju da nema razlike u koncentracijama katestatina između skupina (133).

Uočava se i heterogenost u rasponu rezultata i jedinicama izvještavanja (pg/mL vs. ng/mL) što dodatno otežava izravne usporedbe između studija. Heterogenost rezultata može biti posljedica primjene nestandardiziranih ELISA metoda za mjerenje kromogranina A i katestatina. Kromogranin A je prekursorski protein koji se proteolitički cijepa u brojne fragmente, uključujući katestatin. ELISA reagensi mogu mjeriti intaktni kromogranin A, ukupni kromogranin A (intaktni zajedno s fragmentima) ili specifične fragmente. Nedostatak standardizacije između metoda može objasniti zašto različite studije izvještavaju o različitim apsolutnim vrijednostima pa čak i suprotnim smjerovima koncentracijskih promjena (89,119,128,133). Corti i suradnici naglasili su važnost

standardizacije metoda mjerenja i potrebu za razvojem referentnih materijala za kromogranin A i njegove fragmente (96).

Rezultati istraživanja upućuju da kromogranin A i katestatin vjerojatno nemaju primarnu vrijednost kao biljezi za razlikovanje gestacijske hipertenzije od zdrave trudnoće, barem u kontekstu liječenih trudnica. Nedostatak razlika može odražavati blažu patofiziologiju gestacijske hipertenzije u usporedbi s preeklampsijom, potencijalni modulatorni učinak antihipertenzivne terapije ili kombinaciju oba čimbenika.

### **5.3 Longitudinalne promjene kromogranina A i katestatina tijekom porođaja**

Jedan od značajnih rezultata ovog istraživanja jest različit obrazac promjena kromogranina A i katestatina tijekom porođaja. Kromogranin A je pokazao značajan i jednak pad od 23 % tijekom porođaja u obje skupine (oba  $P < 0,001$ ), dok je katestatin ostao stabilan bez značajnih promjena u kontrolnoj ( $P = 0,571$ ) i GH skupini ( $P = 0,911$ ). Razlika u promjenama koncentracija kromogranina A i katestatina mogla bi se objasniti različitim izvorima sinteze, razlikama u kinetici otpuštanja ili različitim poluživotom u cirkulaciji.

Još prije tridesetak godina, Syversen i suradnici ustanovili su da je medijan koncentracije kromogranina A u uzorcima pupkovine bio značajno viši nego u serumu trudnice, uz dodatno visoke vrijednosti u plodovoj vodi (90). Florio i suradnici također su izvijestili o visokim koncentracijama kromogranina A u uzorcima pupkovine i plodove vode, s koncentracijama značajno višim u novorođenčadi nego u majke. Dodatno, ukazali su na pad kromogranina A tijekom porođaja (120). Novija istraživanja potvrđuju prisutnost kromogranina A i katestatina u tkivu posteljice te prikazuju značajno više koncentracije katestatina u trudnih žena u odnosu na ne-trudne kontrole (89,118). Ovi rezultati podupiru teoriju da se kromogranin A stvara u posteljici i fetusu tijekom trudnoće te da porođaj uklanja glavni izvor kromogranina A.

Nasuprot tome, stabilnost katestatina tijekom porođaja sugerira različitu kinetiku u odnosu na kromogranin A. Katestatin može imati duži poluživot u cirkulaciji nego intaktni kromogranin A, što bi usporilo njegove promjene tijekom porođaja. Proteolitička razgradnja kromogranina A u katestatin može biti različito regulirana u majčinoj i fetalnoj cirkulaciji, što dovodi do različitih obrazaca promjena. Moguće je da su odabrane vremenske točke uzorkovanja u ovom istraživanju (prije porođaja i 2 sata

nakon porođaja) bile nedovoljne za detektiranje promjena katestatina ako je njegov poluživot duži od kromogranina A.

Pad kromogranina A koji je opažen tijekom porođaja u ovom istraživanju, vjerojatno je posljedica uklanjanja posteljice koja je njegov značajan izvor tijekom trudnoće. Dodatno, moguće je da hemodinamske promjene tijekom porođaja, uključujući smanjenje volumena krvi i redistribuciju protoka krvi, utječu na koncentracije kromogranina A. Nedostatak korelacije između kromogranina A i katestatina u obje skupine u uzorcima prije porođaja (kontrola  $\rho = 0,183$ ,  $P = 0,438$ ; GH  $\rho = -0,209$ ,  $P = 0,374$ ) dodatno podupire teoriju da ove molekule imaju različite izvore stvaranja ili različite obrasce kinetike. Navedeni rezultati u skladu su s rezultatima Bralewske i suradnika koji također nisu otkrili statistički značajnu korelaciju između kromogranina A i katestatina u uzorcima posteljice, ni u skupini s preeklampsijom ni u kontrolnoj skupini (89). Iako je katestatin derivat kromogranina A, omjer između prekursora i fragmenta može varirati ovisno o tkivno-specifičnoj proteolitičkoj razgradnji, brzini otpuštanja i brzini klirensa (81,96).

#### **5.4 Utjecaj spola fetusa na kromogranin A i katestatin**

Provedeno istraživanje upućuje da spol fetusa ne utječe značajno na koncentracije kromogranina A unutar skupine (muški vs. ženski spol) niti između (kontrola vs. GH) skupina, unatoč primjetno nižoj koncentraciji u skupini trudnica s ženskim fetusom i gestacijskom hipertenzijom. Kod katestatina, primjećuje se niža koncentracija kod fetusa ženskog spola iz GH skupine u usporedbi s fetusima muškog spola, ali bez statističke značajnosti ( $P = 0,083$ ). Međutim, unutar skupine fetusa ženskog spola, GH skupina ima statistički značajno niže koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,046$ ). Navedeni rezultati mogu ukazivati na specifične razlike u biljezima povezanim s gestacijskom hipertenzijom između spolova.

Prema studiji Bralewska i suradnika, spol fetusa utječe na razinu kromogranina A i katestatina u stanicama posteljice kod preeklampsije. U trudnoćama opterećenim preeklampsijom s fetusima ženskog spola, koncentracije katestatina bile su značajno smanjene, dok je ekspresija gena za kromogranin A bila povišena u usporedbi s kontrolnim skupinama (89). Prema pretpostavci autora, katestatin je zaštitni peptid kod trudnica s preeklampsijom koji se otpušta u manjim količinama u majčinsku cirkulaciju. Rezultati ovog istraživanja izravno potvrđuju tu hipotezu, pokazujući statistički

značajno niže koncentracije katestatina kod trudnica s gestacijskom hipertenzijom koje nose ženske fetuse. Također, Bralewska i suradnici nisu pronašli povezanost između koncentracije katestatina i ekspresije gena za kromogranin A kod trudnica koje nose fetuse muškog spola (89). Navedeno je u skladu s opažanjem ovog istraživanja, budući da kod fetusa muškog spola nema statistički značajnih razlika u koncentracijama kromogranina A i katestatina između kontrolne i GH skupine.

Unatoč tome što su rezultati ovog istraživanja u skladu s objavljenom studijom, mali broj uzoraka u podskupinama po spolu ograničava pouzdanu interpretaciju. Rezultati naglašavaju smjernice za buduća istraživanja, ukazujući da se mehanizmi hipertenzivnih poremećaja mogu razlikovati ovisno o spolu fetusa, pri čemu kromogranin A i katestatin imaju potencijalnu ulogu.

### **5.5 Povezanost kromogranina A i katestatina s krvnim tlakom**

Istraživanje nije pronašlo korelaciju između krvnog tlaka i koncentracije kromogranina A u kontrolnoj i GH skupini. Međutim, pokazalo je prisutnost pozitivne korelacije između katestatina i krvnog tlaka u kontrolnoj skupini (sistolčki krvni tlak  $\rho = 0,536$ ,  $P = 0,015$ ; dijastolički krvni tlak  $\rho = 0,470$ ,  $P = 0,036$ ), ali izostanak ove korelacije u GH skupini (sistolčki krvni tlak  $\rho = 0,090$ ,  $P = 0,705$ ; dijastolički krvni tlak  $\rho = 0,306$ ,  $P = 0,190$ ). Ovaj rezultat sugerira da je normalna fiziološka povezanost između katestatina i regulacije krvnog tlaka poremećena u gestacijskoj hipertenziji ili modificirana antihipertenzivnom terapijom.

Početna istraživanja, usmjerena na ispitivanje koncentracija kromogranina A i katestatina u eksperimentalnim modelima te kod bolesnika s hipertenzijom u općoj (ne-trudnoj) populaciji, predstavljaju važnu osnovu za razumijevanje patofizioloških mehanizama bolesti u trudnica. Miševi s knock-out genom za kromogranin A i katestatin razvili su teški oblik hipertenzije, koji se normalizirao nakon primjene egzogenog katestatina (138,139). Studije koje su uspoređivale koncentracije u normotenzivnih i hipertenzivnih osoba prikazale su neujednačene rezultate. O'Connor i suradnici pokazali su da normotenzivni potomci bolesnika s hipertenzijom imaju značajno niže koncentracije katestatina u krvi u usporedbi s normotenzivnim osobama bez obiteljske anamneze hipertenzije. Međutim, u istoj studiji, nisu utvrđene značajne razlike u koncentracijama katestatina između normotenzivnih i hipertenzivnih ispitanika (113). U kasnijoj, opsežnijoj studiji O'Connor i suradnici utvrdili su da su kod bolesnika

s esencijalnom hipertenzijom koncentracije kromogranina A bile povišene, dok su koncentracije katestatina bile snižene. Dodatno, uočen je snižen odnos kromogranina A i katestatina u hipertenzivnih bolesnika (116). Nasuprot tome, Meng i suradnici zabilježili su više koncentracije katestatina u bolesnika s esencijalnom hipertenzijom, iako nisu pronašli povezanost između razine katestatina i stupnja hipertenzije (115). Durakoglugil i suradnici nisu pronašli značajne razlike u koncentracijama katestatina između neliječenih hipertenzivnih bolesnika i zdravih kontrola nakon prilagodbe za dob, spol, visinu i tjelesnu masu ukazujući na potencijalnu važnost prilagodbe za zbunjujuće čimbenike pri interpretaciji rezultata (140).

Iako se uloga ovih biljega u regulaciji krvnog tlaka još uvijek intenzivno istražuje, novija istraživanja usmjerena na hipertenzivne poremećaje u trudnoći nastoje definirati njihovu specifičnu važnost u gestaciji. Upravo u tom kontekstu, pozitivna korelacija između katestatina i krvnog tlaka u našoj kontrolnoj skupini u skladu je s nalazima Lovrić i suradnika, koji su izvijestili o pozitivnoj korelaciji između sistoličkog tlaka i katestatina u ne-trudnih žena ( $r = 0,335$ ,  $P = 0,011$ ), ali ne i u trudnica u prvom tromjesečju (118). Navedeni autori sugeriraju da trudnoća potencijalno modulira odnos između katestatina i krvnog tlaka, vjerojatno zbog hemodinamskih prilagodbi trudnoće ili promjena u simpatičkoj aktivnosti. Rezultati ovog ispitivanja proširuju navedeno opažanje pokazujući da je korelacija prisutna u zdravih trudnica u terminskoj trudnoći, ali odsutna u trudnica s gestacijskom hipertenzijom. Tüten i suradnici izvijestili su o pozitivnim korelacijama između serumskog katestatina te sistoličkog i dijastoličkog tlaka u trudnica s preeklampsijom, što je u suprotnosti s izostankom korelacije u gestacijskoj hipertenziji pronađenoj u ovom istraživanju (119). Ova diskrepancija može odražavati osnovne patofiziološke razlike između preeklampsije i gestacijske hipertenzije, ili može biti posljedica antihipertenzivne terapije u ispitivanoj skupini.

Moguće objašnjenje jest da pozitivna korelacija između katestatina i krvnog tlaka u kontrolnoj skupini odražava kompenzatorni mehanizam. Visok krvni tlak može stimulirati povećano stvaranje katestatina kao zaštitni mehanizam. Katestatin potom ograničava daljnji porast tlaka inhibicijom otpuštanja katekolamina i vazodilatacijom. U gestacijskoj hipertenziji, ovaj kompenzatorni mehanizam može biti iscrpljen ili poremećen, što dovodi do gubitka korelacije. Ova je hipoteza u skladu s rezultatima Bralewska i suradnika koji su pokazali da preeklamptično okruženje u posteljici smanjuje stvaranje katestatina u trofoblastima. To upućuje na oštećenu sposobnost

posteljice u hipertenzivnim poremećajima trudnoće da proizvodi katestatin kao odgovor na stres (89,141).

Izostanak korelacije katestatina i tlaka u GH skupini može predstavljati i indirektan dokaz učinka metildope. Metildopa djeluje na razini središnjeg živčanog sustava smanjujući simpatičku aktivnost, što može prekinuti normalnu povratnu spregu između katestatina (koji inhibira otpuštanje katekolamina) i krvnog tlaka (142). Ako metildopa već suprimira simpatičku aktivnost, dodatni učinci katestatina na otpuštanje katekolamina mogu biti maskirani ili smanjenog značaja. Dodatno, moguće je da su razine katestatina u GH skupini već bile modificirane bolešću ili terapijom na način da je narušena normalna fiziološka povezanost s krvnim tlakom.

Iako nisu pronađene izravne razlike u koncentracijama kromogranina A ili katestatina između kontrolne i GH skupine, promjena u njihovoj povezanosti s krvnim tlakom sugerira promijenjen funkcionalni odnos između ovih biljega i kardiovaskularnog sustava. Ovo naglašava važnost ne samo određivanja koncentracija biljega, već i analize njihove funkcionalne povezanosti s kliničkim parametrima.

### **5.6 Povezanost s neonatalnim ishodima**

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći mogu biti povezani s lošim ishodom za novorođenčad (136). U ovom istraživanju nisu pronađene značajne razlike u neonatalnim ishodima između GH i kontrolne skupine. Percentili porođajne mase i vrijednosti Apgarova indeksa bili su usporedivi između skupina, sugerirajući da je gestacijska hipertenzija liječena metildopom bila dobro kontrolirana i nije negativno utjecala na fetalni rast ili neonatalnu adaptaciju.

Dodatno, nije pronađena korelacija između kromogranina A ili katestatina i percentila porođajne mase u obje skupine. Izgledno je da koncentracija ovih neuroendokrinih biljega ne odražava fetalni rast ili dobrobit u ispitivanim skupinama. Normalan Apgar indeks u obje skupine isključio je mogućnost statističkog testiranja korelacije kromogranina A i katestatina. Rezultati autora Vanli Tonyali i suradnika također su pokazali nedostatak značajne povezanosti između neonatalnih ishoda i varijabli kao što su porođajna masa ili katestatin (143). Izostanak povezanosti kromogranina A i katestatina s neonatalnim ishodima dodatno podupire zaključak da

nisu korisni biljezi u gestacijskoj hipertenziji i ne pružaju dodatne informacije o fetalnoj dobrobiti ili prognozi u odnosu na standardne kliničke parametre.

Međutim, ovo istraživanje nije uključilo detaljna neonatalna mjerenja i ispitivanja poput arterijskih krvnih plinova, koncentracije laktata ili dugotrajnog praćenja neurološkog razvoja. Dodatno, isključili smo trudnoće s IUGR-om i fetalnim anomalijama, što ograničava primjenjivost rezultata na klinički teže slučajeve gestacijske hipertenzije.

### **5.7 Utjecaj doze metildope**

Sve trudnice s gestacijskom hipertenzijom u ovom istraživanju bile su liječene metildopom, centralnim  $\alpha$ 2-adrenergičkim agonistom koji je lijek prvog izbora za liječenje hipertenzije u trudnoći zbog dokazanog sigurnosnog profila za majku i fetus (142). Međutim, trenutačno ne postoje objavljene studije koje su specifično ispitale učinak metildope na koncentracije kromogranina A i katestatina u trudnoći, što ograničava interpretaciju nalaza u kontekstu terapije.

U ovom istraživanju, ispitana je povezanost doze metildope s koncentracijama kromogranina A, katestatina i krvnim tlakom unutar GH skupine primjenom Spearmanove korelacijske analize. Rezultati su pokazali da doza metildope značajno ne korelira s koncentracijama kromogranina A ( $P = 0,580$ ), katestatina ( $P = 0,783$ ), sistoličkim tlakom ( $P = 0,958$ ) ili dijastoličkim tlakom ( $P = 0,521$ ). Sukladno rezultatima, pretpostavka je da u trenutku uzorkovanja prije porođaja, doza metildope ne odražava trenutne razine neuroendokrinih biljega niti krvnog tlaka.

Teoretski, metildopa bi mogla utjecati na koncentracije kromogranina A i katestatina smanjujući stimulaciju kromafinih stanica nadbubrežne srži i posljedično smanjujući otpuštanje kromogranina A (142). Dodatno, smanjenje simpatičke aktivnosti moglo bi smanjiti stres-inducirano otpuštanje kromogranina A iz različitih izvora, uključujući posteljicu i nadbubrežne žlijezde fetusa.

Izostanak korelacije između doze metildope i koncentracija kromogranina A i katestatina može se objasniti s nekoliko čimbenika. Sve trudnice u GH skupini bile su na dugotrajnoj terapiji i vjerojatno su postigle stabilno stanje u kojem su koncentracije biljega već bile modificirane terapijom. Nadalje, stvaranje značajnih koncentracija kromogranina A i katestatina u posteljici može prikriti učinke različitih doza metildope

na majčinsku komponentu ovih biljega. Moguće je da metildopa, neovisno o dozi, ima maksimalni učinak na aktivnost simpatičkog sustava koji je već postignut pri najnižim dozama, te da povećanje doze ne dovodi do dodatne supresije simpatičke aktivnosti ili promjena u koncentracijama kromogranina A i katestatina.

Ispitivanje na općoj populaciji s primarnom hipertenzijom, Kumrić i suradnika, otkrilo je da su neliječeni pacijenti imali značajno više koncentracije katestatina u usporedbi s pacijentima koji su bili na antihipertenzivnoj terapiji s ACE inhibitorima i kontrolnom skupinom (41,61 vs. 24,77 vs. 5,83 ng/mL) (144). Studija Meng i suradnika nije utvrdila razliku u koncentracijama katestatina između neliječene hipertenzivne skupine i onih na terapiji blokatorima kalcijevih kanala i/ili diureticima (115). To sugerira da različiti tipovi antihipertenziva mogu imati različite učinke na koncentracije katestatina te da osim potencijalnog utjecaja metildope kao  $\alpha_2$ -adrenergičkog agonista, i ACE inhibitori imaju učinke na aktivnost simpatičkog živčanog sustava.

### **5.8 Prediktori gestacijske hipertenzije**

Ispitana je povezanost laboratorijskih biljega (kromogranina A i katestatina) i kliničkih varijabli (ITM i dob majke) s razvojem gestacijske hipertenzije na dvije razine: (i) rizik za razvoj gestacijske hipertenzije pomoću logističke regresije i (ii) vrijednosti krvnog tlaka pomoću višestruke linearne regresije. Logistička i linearna regresija odgovaraju na različita istraživačka pitanja. Logistička regresija ispituje koji čimbenici predviđaju binarni ishod (razvoj gestacijske hipertenzije), dok višestruka linearna regresija istražuje koji su čimbenici povezani s kontinuiranim ishodom (vrijednostima krvnog tlaka).

Zajednički rezultat dviju regresijskih analiza jest potvrda ITM-a kao značajnog prediktora. U logističkom modelu, ITM je bio jedini statistički značajan prediktor rizika za razvoj GH (OR = 1,458, P = 0,007), pri čemu je svaka jedinica povećanja ITM-a povećavala vjerojatnost razvoja GH za 45,8 %. Ovaj je rezultat u skladu s opsežnim prethodnim istraživanjima koja dosljedno pokazuju da je visoki ITM snažan rizični čimbenik za preeklampsiju i gestacijsku hipertenziju (129,145). Studije su dokumentirale kako povećanje ITM-a za 4 jedinice povećava rizik od preeklampsije za 1,7 puta, dok povećanje za 8 jedinica povećava rizik za 2,9 puta (129). U višestrukoj linearnoj regresiji za sistolički krvni tlak, ITM je također bio jedini statistički značajan prediktor (B = 1,444, P = 0,038), sugerirajući da osim što povećava rizik za razvoj

gestacijske hipertenzije, također utječe na stvarne vrijednosti krvnog tlaka, posebice na sistoličku komponentu. Ova dvostruka uloga ITM-a potvrđuje ga kao značajni čimbenik u patogenezi hipertenzivnih poremećaja u trudnoći. Zanimljivo, u modelu za dijastolički krvni tlak, ITM nije postigao granicu statističke značajnosti ( $P = 0,144$ ), upućujući da njegov učinak može biti izraženiji na sistoličku komponentu tlaka. Prethodna istraživanja povezala su pretilost s kroničnom upalom, inzulinskom rezistencijom, endotelnom disfunkcijom i povećanom simpatičkom aktivnošću, dakle svim čimbenicima koji mogu pridonijeti razvoju gestacijske hipertenzije (146). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju važnost ITM-a kao kliničkog prediktora i sugeriraju da tradicionalni rizični čimbenici ostaju relevantniji od novih biljega poput kromogranina A i katestatina u otkrivanju trudnica s rizikom od gestacijske hipertenzije.

Istraživanje nije utvrdilo statističku značajnost laboratorijskih biljega u oba regresijska modela. Niti kromogranin A, niti katestatin nisu pokazali statistički značajan utjecaj na rizik razvoja gestacijske hipertenzije u logističkom modelu, niti na vrijednosti sistoličkog ili dijastoličkog krvnog tlaka u linearnim modelima. Izostanak prediktivne vrijednosti sugerira da kromogranin A i katestatin nisu korisni biljezi u ranom otkrivanju ili stratifikaciji rizika. Ovo je u skladu s heterogenim literaturnim zaključcima o preeklampsiji, gdje različite studije izvješćuju o različitim smjerovima promjena katestatina (89,119,128,133).

### **5.9 Ograničenja istraživanja**

Relativno mali uzorak ( $N = 20$  ispitanica po skupini) ograničava sposobnost identificiranja manjih razlika između skupina, podskupina i u multivarijantnim analizama. Iako je veličina uzorka bila procijenjena na temelju očekivanih promjena kromogranina A tijekom porođaja, moguće je da su propuštene značajne razlike u koncentracijama katestatina ili drugih parametara zbog nedovoljne statističke snage.

Uzorci su vađeni prije početka trudova bez obzira na vrijeme zadnjeg obroka. Uzorkovanje natašte u usporedbi s postprandijalnim stanjem može značajno utjecati na koncentracije analita, jer unos hrane mijenja metabolizam, apsorpciju i raspodjelu biljega u krvi. Nedostatak standardizacije vremena vađenja uvodi potencijalnu varijabilnost u rezultate ispitivanih biljega.

Sve trudnice s gestacijskom hipertenzijom bile su na terapiji metildopom, što ograničava sposobnost razlikovanja učinaka bolesti od učinaka terapije. Idealno,

istraživanje bi trebalo uključiti tri skupine: zdrave kontrole, neliječene trudnice s gestacijskom hipertenzijom i trudnice liječene metildopom. Alternativno, usporedba različitih antihipertenziva (npr. metildopa vs. labetalol vs. nifedipin) mogla bi pružiti jasniji uvid u specifične učinke metildope na koncentracije kromogranina A i katestatina.

## 6 ZAKLJUČAK

Postavljena hipoteza istraživanja djelomično je potvrđena. Naime, koncentracije kromogranina A bilježe pad nakon porođaja u GH skupini, ali koncentracije katestatina ostaju stabilne.

- Kromogranin A opada za 23 % u kontrolnoj i GH skupini, što ne prati promjena koncentracije katestatina. Različiti obrasci promjena kromogranina A (smanjenje) i katestatina (stabilnost) tijekom porođaja sugeriraju da navedeni biljezi odražavaju različite aspekte neuroendokrine regulacije i/ili imaju različit poluživot.
- Nisu pronađene razlike u koncentracijama kromogranina A i katestatina između GH i kontrolne skupine u obje točke vađenja (prije i poslije porođaja) ukazujući da navedeni biljezi nisu korisni u razlikovanju hipertenzivnih od normotenzivnih trudnica.
- U trudnica s ženskim fetusima izmjerene su niže koncentracije katestatina u GH skupini u odnosu na kontrolnu skupinu što može ukazivati na specifične spolne razlike u gestacijskoj hipertenziji. Međutim, zbog malog broja uzoraka u podskupinama, rezultati se moraju tumačiti s oprezom te potvrditi na većem broju ispitanika.
- Koncentracije kromogranina A i katestatina ne odražavaju fetalni rast ili dobrobit u ispitivanim skupinama budući da nije pronađena korelacija između njihovih koncentracija i neonatalnih ishoda, tj. Apgarova indeksa vitalnosti i percentila porođajne mase.
- Izostanak korelacije između katestatina i krvnog tlaka u skupini s gestacijskom hipertenzijom može odražavati kompenzatorni mehanizam u hipertenzivnim poremećajima ili može biti posljedica antihipertenzivne terapije u ispitivanoj skupini.
- Prema rezultatima regresijske analize, kromogranin A i katestatin trenutno nemaju kliničku vrijednost u predviđanju gestacijske hipertenzije ili povišenih vrijednosti krvnog tlaka.
- ITM je najvažniji prediktor gestacijske hipertenzije, naglašavajući važnost savjetovanja o tjelesnoj masi prije i tijekom trudnoće. Žene s povišenim ITM-om trebale bi se smatrati visokorizičnima za razvoj gestacijske hipertenzije i biti pažljivo praćene tijekom trudnoće.

- Iako postoji hipotetska mogućnost utjecaja metildope na koncentracije kromogranina A, a time i katestatina, nije pronađena povezanost dnevne doze metildope s koncentracijama kromogranina A, katestatina te sistoličkim i dijastoličkim krvnim tlakom.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja upućuju da kromogranin A i katestatin trenutno nemaju kliničku vrijednost u dijagnozi, predviđanju i praćenju gestacijske hipertenzije, pri čemu tradicionalni klinički parametri ostaju temelj kliničkog odlučivanja. Unatoč tome, istraživanje pruža važan uvid u neuroendokrinu regulaciju svojstvenu gestacijskoj hipertenziji i dodatne učinke antihipertenzivne terapije, što ga čini vrijednim za buduća istraživanja u ovom području.

---

**7 POPIS LITERATURE**

1. Vinturache A, Khalil A. Maternal Physiological Changes in Pregnancy. *Glob Libr Women Med*. 2021; DOI: 10.3843/glowm.411323
2. Costantine MM. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol. Frontiers Media*; 2014;5. DOI: 10.3389/fphar.2014.00065
3. Osol G, Ko NL, Mandalà M. Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy. *Annu Rev Physiol. Annual Reviews*; 2019;81(1):89–111. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114435
4. Fournier S, D'Errico JN, Stapleton PA. Uterine Vascular Control Preconception and During Pregnancy. *Compr Physiol. Wiley*; 2021;1871–93. DOI: 10.1002/cphy.c190015
5. Braunthal S, Brateanu A. Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment. *SAGE Open Med*. 2019;7:1–15. DOI: 10.1177/2050312119843700
6. Vricella LK. Emerging understanding and measurement of plasma volume expansion in pregnancy. *Am J Clin Nutr. Elsevier BV*; 2017;106. DOI: 10.3945/ajcn.117.155903
7. Darkwa EO, Djagbletey R, Sottie D, Owoo C, Vanderpuye NM, Essuman R, et al. Serum nitric oxide levels in healthy pregnant women: a case- control study in a tertiary facility in Ghana. *Matern Health Neonatol Perinatol. BioMed Central*; 2018;4(1). DOI: 10.1186/s40748-017-0072-y
8. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*. 2016;27(2):89–94. DOI: 10.5830/CVJA-2016-021
9. Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bung P, Ferré P, Gil Á, et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *Br J Nutr. Cambridge University Press*; 1998;80. DOI: 10.1079/bjn19980104
10. Singh P, Elhaj DAI, Ibrahim I, Abdullahi H, Khodor SA. Maternal microbiota and gestational diabetes: impact on infant health. *J Transl Med. BioMed Central*; 2023;21(1). DOI: 10.1186/s12967-023-04230-3
11. Zielińska-Maciulewska A, Krętowski A, Szelachowska M. Insulin resistance and adaptation of pancreatic beta cells during pregnancy. *Clin Diabetol. Via Medica*; 2018;7(5):222–9. DOI: 10.5603/dk.2018.0022
12. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Ra R, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia. Springer Science+Business Media*; 2010;53(10):2167–76. DOI: 10.1007/s00125-010-1809-6

13. Desoyé G, Nolan CJ. The fetal glucose steal: an underappreciated phenomenon in diabetic pregnancy. *Diabetologia*. Springer Science+Business Media; 2016;59(6):1089–94. DOI: 10.1007/s00125-016-3931-6
14. McGowan C, McAuliffe FM. The influence of maternal glycaemia and dietary glycaemic index on pregnancy outcome in healthy mothers. *Br J Nutr*. Cambridge University Press; 2010;104(2):153–9. DOI: 10.1017/s0007114510000425
15. Santos APC dos, Alcântara AC de, Soares MBP, Deus DF, Freitas FR, Couto FD, et al. Transfer Proteins, Lipoprotein Remodeling, and Antioxidant Action on Pregnant Women: Comparison from the First to the Third Trimester of Gestation. *Open Biomark J*. Bentham Science Publishers; 2023;13(1). DOI: 10.2174/0118753183266211231118141751
16. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids Health Dis*. BioMed Central; 2010;9(1):58–58. DOI: 10.1186/1476-511x-9-58
17. Parrettini S, Caroli A, Torlone E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. *Front Endocrinol*. Frontiers Media; 2020;11. DOI: 10.3389/fendo.2020.611929
18. Liu Y, Xia Y, Zhang T, Yang Y, Cannon RD, Mansell T, et al. Complex Interactions Between Circulating Fatty Acid Levels, Desaturase Activities, and the Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study. *Front Nutr*. Frontiers Media; 2022;9. DOI: 10.3389/fnut.2022.919357
19. Napso T, Yong HEJ, López-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol*. Frontiers Media; 2018;9:1091–1091. DOI: 10.3389/fphys.2018.01091
20. Stern C, Schwarz S, Moser G, Cvitic S, Jantscher-Krenn E, Gauster M, et al. Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *Int J Mol Sci*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021;22(23):12722–12722. DOI: 10.3390/ijms222312722
21. Nuzzo AM, Giuffrida D, Moretti L, Re P, Grassi G, Menato G, et al. Placental and maternal sFlt1/PlGF expression in gestational diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2021;11(1):2312. DOI: 10.1038/s41598-021-81785-5
22. Möllers LS, Yousuf EI, Hamatschek C, Morrison KM, Hermanussen M, Fusch C, et al. Metabolic-endocrine disruption due to preterm birth impacts growth, body composition, and neonatal outcome. *Pediatr Res*. Springer Nature; 2021;91(6):1350–60. DOI: 10.1038/s41390-021-01566-8
23. Neven ACH, Mousa A, Boyle J, Teede H. Endocrine and metabolic interactions in healthy pregnancies and hyperinsulinemic pregnancies affected by polycystic ovary syndrome, diabetes and obesity. *Front Endocrinol*. Frontiers Media; 2023;13:993619–993619. DOI: 10.3389/fendo.2022.993619

24. Kristiansson P, Wang JX. Reproductive hormones and blood pressure during pregnancy. *Hum Reprod.* 2001;16(1):13–7. DOI: 10.1093/humrep/16.1.13
25. Conrad KP. Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(2):R267–75. DOI: 10.1152/ajpregu.00156.2011
26. Estrada JM, Soldin D, Buckey TM, Burman KD, Soldin OP. Thyrotropin Isoforms: Implications for Thyrotropin Analysis and Clinical Practice. *Thyroid.* Mary Ann Liebert, Inc.; 2013;24(3):411–23. DOI: 10.1089/thy.2013.0119
27. Mathey LIP. Neuroendocrinology of Pregnancy: Participation of Sex Hormones. In: IntechOpen eBooks. IntechOpen; 2021. DOI: 10.5772/intechopen.95774
28. Hermida RC, Ayala DE, Mojón A, Fernández JR, Alonso I, Silva I, et al. Blood Pressure Patterns in Normal Pregnancy, Gestational Hypertension, and Preeclampsia. *Hypertension.* 2000;36(2):149–58. DOI: 10.1161/01.HYP.36.2.149
29. Kuate Defo A, Daskalopoulou SS. Alterations in Vessel Hemodynamics Across Uncomplicated Pregnancy. *Am J Hypertens.* 2023;36(4):183–91. DOI: 10.1093/ajh/hpac132
30. Cifková R. Hypertension in Pregnancy: A Diagnostic and Therapeutic Overview. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2023;30(4):289–303. DOI: 10.1007/s40292-023-00582-5
31. Green LJ, Kennedy SH, Mackillop L, Gerry S, Purwar M, Staines Urias E, et al. Persson LÅ, editor. International gestational age-specific centiles for blood pressure in pregnancy from the INTERGROWTH-21st Project in 8 countries: A longitudinal cohort study. *PLOS Med.* 2021;18(4):e1003611. DOI: 10.1371/journal.pmed.1003611
32. Countouris M, Mahmoud Z, Cohen JB, Crousillat D, Hameed AB, Harrington CM, et al. Hypertension in Pregnancy and Postpartum: Current Standards and Opportunities to Improve Care. *Circulation.* Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2025;151(7):490–507. DOI: 10.1161/circulationaha.124.073302
33. Zhang K, Wei X, Zhao H. Study on the regularity of blood pressure changes in pregnant women and its influencing factors. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2025;25(1):268. DOI: 10.1186/s12884-025-07306-8
34. Mukhtarova N, Hetzel SJ, Johnson HM, Hoppe KK. Longitudinal blood pressure patterns of women with hypertensive disorders of pregnancy: preconception through postpartum. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(25):9023–30. DOI: 10.1080/14767058.2021.2012650
35. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. *Obstet Gynecol.* 2020;135(6):e237–60. DOI: 10.1097/AOG.0000000000003891

36. Maelissa MM, Siddiq A, Islamy N, Puspitasari MK, Lumentut AM, Wirawan W. Endocrine Control of Fetal Growth, the Delivery Process, and the Physiology of Childbirth. *J Medihealthico*. 2025;6(2):300–14. DOI: 10.37899/journallamedihealthico.v6i2.1903
37. Hundley V, Downe S, Buckley SJ. The initiation of labour at term gestation: Physiology and practice implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2020;67:4–18. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2020.02.006
38. Kilpatrick S, Garrison E. Normal Labor and Delivery. In: *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*. Elsevier; 2007. DOI: 10.1016/B978-0-443-06930-7.50014-1
39. Sanchez-Ramos L, Levine LD, Sciscione AC, Mozurkewich EL, Ramsey PS, Adair CD, et al. Methods for the induction of labor: efficacy and safety. *Am J Obstet Gynecol*. 2024;230(3):S669–95. DOI: 10.1016/j.ajog.2023.02.009
40. Alfirevic Z, Keeney E, Dowswell T, Welton NJ, Dias S, Jones LV, et al. Labour induction with prostaglandins: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2015;350(feb05 10):h217–h217. DOI: 10.1136/bmj.h217
41. Hersh AR, Carroli G, Hofmeyr GJ, Garg B, Gülmezoglu M, Lumbiganon P, et al. Third stage of labor: evidence-based practice for prevention of adverse maternal and neonatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 2024;230(3):S1046-S1060.e1. DOI: 10.1016/j.ajog.2022.11.1298
42. Yulghunlu FA. Labor and Delivery Care: The Four Stages. In: *Labor and Delivery from a Public Health Perspective*. IntechOpen; 2025. DOI: 10.5772/intechopen.1007173
43. de Vries PLM, Veenstra E, Baud D, Legardeur H, Kallianidis AF, van den Akker T. Time to redefine prolonged third stage of labor? A systematic review and meta-analysis of the length of the third stage of labor and adverse maternal outcome after vaginal birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2025;232(1):26-41.e11. DOI: 10.1016/j.ajog.2024.07.019
44. National Guideline Alliance (Great Britain). *Hypertension in pregnancy: diagnosis and management*. Hypertens Pregnancy. 2023;
45. Bralewska M, Pietrucha T, Sakowicz A. The Role of Catestatin in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):2461. DOI: 10.3390/ijms25052461
46. Sun S, Li W, Zhang X, Aziz AUR, Zhang N. Trends in global and regional incidence and prevalence of hypertensive disorders in pregnancy (1990-2021): an age-period-cohort analysis. *Sci Rep*. 2025;15(1):1513. DOI: 10.1038/s41598-025-85819-0
47. Tang Z, Ma C, Liu J, Liu C. Global, regional, and national trends and burden of hypertensive disorders in pregnancy among women of childbearing age from 1990 to 2021. *Front Glob Womens Health*. 2025;6:1533843. DOI: 10.3389/fgwh.2025.1533843

48. Melamed N, Ray JG, Hladunewich M, Cox B, Kingdom JC. Gestational Hypertension and Preeclampsia: Are They the Same Disease? *J Obstet Gynaecol Can.* 2014;36(7):642–7. DOI: 10.1016/S1701-2163(15)30545-4
49. Phoswa WN, Khaliq OP. The Role of Oxidative Stress in Hypertensive Disorders of Pregnancy (Preeclampsia, Gestational Hypertension) and Metabolic Disorder of Pregnancy (Gestational Diabetes Mellitus). *Oxid Med Cell Longev.* Hindawi Publishing Corporation; 2021;2021(1). DOI: 10.1155/2021/5581570
50. Sharma N. Prediction of Maternal and Fetal Syndrome of Preeclampsia. *IntechOpen*; 2019 Apr 30. (IntechOpen eBooks). DOI: 10.5772/intechopen.78845
51. Shen M, Smith GN, Rodger M, White RR, Walker M, Wen SW. Comparison of risk factors and outcomes of gestational hypertension and pre-eclampsia. *PLoS ONE.* Public Library of Science; 2017;12(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0175914
52. Traub AM, Sharma A, Góngora MC. Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Literature Review – Pathophysiology, Current Management, Future Perspectives, and Healthcare Disparities. *US Cardiol Rev.* 2024;18. DOI: 10.15420/usc.2023.01
53. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res.* 2019;124(7):1094–112. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313276
54. Kanasaki K, Kalluri R. The biology of preeclampsia. *Kidney Int.* 2009;76(8):831–7. DOI: 10.1038/ki.2009.284
55. Hu X, Zhang L. Uteroplacental Circulation in Normal Pregnancy and Preeclampsia: Functional Adaptation and Maladaptation. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021;22(16):8622–8622. DOI: 10.3390/ijms22168622
56. Hong K, Kim SH, Hyun D, Park HJ. Defective Uteroplacental Vascular Remodeling in Preeclampsia: Key Molecular Factors Leading to Long Term Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021;22(20):11202–11202. DOI: 10.3390/ijms222011202
57. Pereira MM, Torrado J, Sosa C, Díaz A, Bia D, Zócalo Y. Center-To-Periphery Arterial Stiffness Gradient Is Attenuated and/or Reversed in Pregnancy-Associated Hypertension. *Front Cardiovasc Med.* *Frontiers Media*; 2021;8. DOI: 10.3389/fcvm.2021.766723
58. Zamir M, Nelson DM, Ginosar Y. Hemodynamic consequences of incomplete uterine spiral artery transformation in human pregnancy, with implications for placental dysfunction and preeclampsia. *J Appl Physiol.* American Physiological Society; 2020;130(2):457–65. DOI: 10.1152/jappphysiol.00504.2020
59. Michalczyk M, Celewicz A, Celewicz M, Woźniakowska-Gondek P, Rzepka R. Yi Y-S, editor. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:1–9. DOI: 10.1155/2020/3864941

60. Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol.* 2014;5. DOI: 10.3389/fphys.2014.00372
61. Walle M, Gelaw Y, Getu F, Asrie F, Getaneh Z. Preeclampsia has an association with both platelet count and mean platelet volume: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE. Public Library of Science;* 2022;17(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0274398
62. Shim SH, Jeon HJ, Ryu HJ, Ys K, Min SG, Kang MK, et al. Prenatal sFlt-1/PIGF value for prediction of adverse neonatal outcome of isolated ultrasonic small-for-gestational-age fetus in normotensive pregnant women: A prospective cohort study. *Res Sq Res Sq. Research Square (United States);* 2019; DOI: 10.21203/rs.2.12396/v1
63. Garovic VD, Dechend R, Easterling T, Karumanchi SA, McMurtry Baird S, Magee LA, et al. Hypertension in Pregnancy: Diagnosis, Blood Pressure Goals, and Pharmacotherapy: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension.* 2022;79(2). DOI: 10.1161/HYP.000000000000208
64. Santulli G, Kansakar U, Varzideh F. Epidemiology and Pathophysiology of Preeclampsia: New Mechanistic Insights. *Hypertens Logo. Lippincott Williams & Wilkins;* 2025;82(5):787–99. DOI: 10.1161/hypertensionaha.124.24117
65. Jung E, Romero R, Yeo L, Gomez-Lopez N, Chaemsaitong P, Jaovisidha A, et al. The etiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226(2):S844–66. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.11.1356
66. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *J Reprod Immunol. Elsevier BV;* 2019;1–10. DOI: 10.1016/j.jri.2019.07.004
67. Bilano VL, Ota E, Ganchimeg T, Mori R, Souza JP. Young RC, editor. Risk Factors of Pre-Eclampsia/Eclampsia and Its Adverse Outcomes in Low- and Middle-Income Countries: A WHO Secondary Analysis. *PLoS ONE.* 2014;9(3):e91198. DOI: 10.1371/journal.pone.0091198
68. Simko M, Totka A, Vondrova D, Samohyl M, Jurkovicova J, Trnka M, et al. Maternal Body Mass Index and Gestational Weight Gain and Their Association with Pregnancy Complications and Perinatal Conditions. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(10):1751. DOI: 10.3390/ijerph16101751
69. 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
70. Robillard P-Y, Dekker G, Scioscia M, Bonsante F, Iacobelli S, Boukerrou M, et al. Xie L, editor. Increased BMI has a linear association with late-onset preeclampsia: A population-based study. *PLOS ONE.* 2019;14(10):e0223888. DOI: 10.1371/journal.pone.0223888

71. Paré E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim K-H. Clinical Risk Factors for Preeclampsia in the 21st Century. *Obstet Gynecol.* 2014;124(4):763–70. DOI: 10.1097/AOG.0000000000000451
72. Wang X, Bai T, Liu S, Pan H, Wang B. Medeiros R, editor. Association between Thrombophilia Gene Polymorphisms and Preeclampsia: A Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e100789. DOI: 10.1371/journal.pone.0100789
73. Martino DDD, Sabattini E, Giardini V, Tinè G, Sterpi V, Lonardoni M, et al. Predictive Ability of The Sflt-1/Plgf Ratio for the Development of Perinatal Complications. In Review; 2022.
74. Singh M, Wambua S, Lee SI, Okoth K, Wang Z, Fazla F, et al. Autoimmune diseases and adverse pregnancy outcomes: an umbrella review. *The Lancet.* 2023;402:S84. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)02128-1
75. Sinkey RG, Battarbee AN, Bello NA, Ives CW, Oparil S, Tita ATN. Prevention, Diagnosis, and Management of Hypertensive Disorders of Pregnancy: a Comparison of International Guidelines. *Curr Hypertens Rep.* 2020;22(9):66. DOI: 10.1007/s11906-020-01082-w
76. Webster K, Fishburn S, Maresh M, Findlay SC, Chappell LC. Diagnosis and management of hypertension in pregnancy: summary of updated NICE guidance. *BMJ.* 2019;l5119. DOI: 10.1136/bmj.l5119
77. Bazzano AN, Keenan A, Woltz S, Subramanian A, Akpogheneta O, Coronado Daza J, et al. Quality and Content Concordance of International Clinical Guidelines on Hypertensive Disorders of Pregnancy Using the AGREE II Instrument: An Updated Systematic Review. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2023;10(7):295. DOI: 10.3390/jcdd10070295
78. van Zwieten PA. Central imidazoline (I1) receptors as targets of centrally acting antihypertensives: moxonidine and rilmenidine. *J Hypertens.* 1997;15(2):117–25. DOI: 10.1097/00004872-199715020-00001
79. Sica DA. Centrally Acting Antihypertensive Agents: An Update. *J Clin Hypertens.* 2007;9(5):399–405. DOI: 10.1111/j.1524-6175.2007.07161.x
80. Van De Vusse D, Mian P, Schoenmakers S, Flint RB, Visser W, Allegaert K, et al. Pharmacokinetics of the most commonly used antihypertensive drugs throughout pregnancy methyldopa, labetalol, and nifedipine: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2022;78(11):1763–76. DOI: 10.1007/s00228-022-03382-3
81. D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocr Connect.* 2014;3(2):R45–54. DOI: 10.1530/EC-14-0027
82. Mahata SK, Corti A. Chromogranin A and its fragments in cardiovascular, immunometabolic, and cancer regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1455(1):34–58. DOI: 10.1111/nyas.14249

83. Loh YP, Cheng Y, Mahata SK, Corti A, Tota B. Chromogranin A and Derived Peptides in Health and Disease. *J Mol Neurosci.* 2012;48(2):347–56. DOI: 10.1007/s12031-012-9728-2
84. Louthan O. Chromogranin A in Physiology and Oncology. *Folia Biologica (Praha)*; 2011;57:173–81.
85. Maj M, Hernik K, Tyszkiewicz K, Owe-Larsson M, Sztokfisz-Ignasiak A, Malejczyk J, et al. A complex role of chromogranin A and its peptides in inflammation, autoimmunity, and infections. *Front Immunol. Frontiers Media SA*; 2025;16. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1567874
86. Iacangelo A, Affolter H-U, Eiden LE, Herbert E, Grimes M. Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature.* 1986;323(6083):82–6. DOI: 10.1038/323082a0
87. Bílek R, Zelinka T, Vlček P, Dušková J, Michalský D, Novák K, et al. Radioimmunoassay of Chromogranin A and Free Metanephrines in Diagnosis of Pheochromocytoma. *Physiol Res.* 2017;S397–408. DOI: 10.33549/physiolres.933719
88. Tota B, Angelone T, Cerra MC. The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis. *Front Chem.* 2014;2. DOI: 10.3389/fchem.2014.00064
89. Bralewska M, Biesiada L, Grzesiak M, Rybak-Krzyszowska M, Huras H, Gach A, et al. Chromogranin A demonstrates higher expression in preeclamptic placentas than in normal pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021;21(1):680. DOI: 10.1186/s12884-021-04139-z
90. Syversen U, Opsjøn SL, Stridsberg M, Sandvik AK, Dimaline R, Tingulstad S, et al. Chromogranin A and pancreastatin-like immunoreactivity in normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(12):4470–5. DOI: 10.1210/jcem.81.12.8954061
91. Estevez-Herrera J, Pardo MR, Dominguez N, Pereda D, Machado JD, Borges R. The role of chromogranins in the secretory pathway. *bmc.* 2013;4(6):605–9. DOI: 10.1515/bmc-2013-0020
92. Herold Z, Doleschall M, Kovesdi A, Patocs A, Somogyi A. Chromogranin-A and its role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Endokrynol Pol.* 2018;69(5):598–610. DOI: 10.5603/EP.a2018.0052
93. Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim APS, Mahata M, Ray S, et al. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1942–52. DOI: 10.1172/JCI24354
94. Scavello F, Kharouf N, Lavallo P, Haikel Y, Schneider F, Metz-Boutigue M-H. The antimicrobial peptides secreted by the chromaffin cells of the adrenal medulla link the neuroendocrine and immune systems: From basic to clinical studies. *Front Immunol.* 2022;13:977175. DOI: 10.3389/fimmu.2022.977175

95. Watanabe T. The Emerging Roles of Chromogranins and Derived Polypeptides in Atherosclerosis, Diabetes, and Coronary Heart Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):6118. DOI: 10.3390/ijms22116118
96. Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2018;470(1):199–210. DOI: 10.1007/s00424-017-2030-y
97. Penna C, Tullio F, -G. Perrelli M, Mancardi D, Pagliaro P. Cardioprotection Against Ischemia/Reperfusion Injury and Chromogranin A Derived Peptides. *Curr Med Chem.* 2012;19(24):4074–85. DOI: 10.2174/092986712802429966
98. Helle KB. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. *Cardiovasc Res.* 2010;85(1):9–16. DOI: 10.1093/cvr/cvp266
99. Li R, Chen C, Zhang B, Jing H, Wang Z, Wu C, et al. The chromogranin A-derived antifungal peptide CGA-N9 induces apoptosis in *Candida tropicalis*. *Biochem J.* 2019;476(20):3069–80. DOI: 10.1042/BCJ20190483
100. Filice E, Pasqua T, Quintieri AM, Cantafio P, Scavello F, Amodio N, et al. Chromofungin, CgA47-66-derived peptide, produces basal cardiac effects and postconditioning cardioprotective action during ischemia/reperfusion injury. *Peptides.* 2015;71:40–8. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.06.013
101. Broedbaek K, Hilsted L. Chromogranin A as biomarker in diabetes. *Biomark Med.* 2016;10(11):1181–9. DOI: 10.2217/bmm-2016-0091
102. Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A Regulation of Obesity and Peripheral Insulin Sensitivity. *Front Endocrinol.* 2017;8(20). DOI: 10.3389/fendo.2017.00020
103. Lorenz K, Gramlich OW, Grus FH, Ehrlich D, Humpel C, Nogalo M, et al. GE-25-like immunoreactivity in the rat eye. *Peptides.* 2012;36(2):286–91. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.04.022
104. Zalewska E, Kmiec P, Sworzak K. Role of Catestatin in the Cardiovascular System and Metabolic Disorders. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:909480. DOI: 10.3389/fcvm.2022.909480
105. Fung MM, Salem RM, Mehtani P, Thomas B, Lu CF, Perez B, et al. Direct Vasoactive Effects of the Chromogranin A (CHGA) Peptide Catestatin in Humans *In Vivo*. *Clin Exp Hypertens.* 2010;32(5):278–87. DOI: 10.3109/10641960903265246
106. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, Ambrosio MR, Bondanelli M, Colao A, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(1):R11–29. DOI: 10.1530/ERC-17-0269
107. Kos-Kudła B, Foltyn W, Malczewska A, Bednarczuk T, Bolanowski M, Borowska M, et al. Update of the diagnostic and therapeutic guidelines for gastro-entero-

- pancreatic neuroendocrine neoplasms (recommended by the Polish Network of Neuroendocrine Tumours). *Endokrynol Pol.* 2022;73(3):387–454. DOI: 10.5603/EP.a2022.0049
108. Callingham BA. The Chromaffin Cell. *Nature.* 1965;208(5005):6–6. DOI: 10.1038/208006a0
109. Gaede AH, Pilowsky PM. Catestatin in rat RVLM is sympathoexcitatory, increases barosensitivity, and attenuates chemosensitivity and the somatosympathetic reflex. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(6):R1538–45. DOI: 10.1152/ajpregu.00335.2010
110. Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol.* 2021;82(3–4):193–7. DOI: 10.1016/j.ando.2020.03.012
111. Ton QV, Hammes SR. Recent Insights on Circulating Catecholamines in Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(12):498. DOI: 10.1007/s11906-014-0498-9
112. Angelone T, Mazza R, C. Cerra M. Chromogranin-A: A Multifaceted Cardiovascular Role in Health and Disease. *Curr Med Chem.* 2012;19(24):4042–50. DOI: 10.2174/092986712802430009
113. O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension.: *J Hypertens.* 2002;20(7):1335–45. DOI: 10.1097/00004872-200207000-00020
114. Mahata SK, Mahata M, Fung MM, O'Connor DT. Catestatin: A multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept.* 2010;162(1–3):33–43. DOI: 10.1016/j.regpep.2010.01.006
115. Meng L, Ye X, Ding W, Yang Y, Di B, Liu L, et al. Plasma catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in patients with essential hypertension: *J Cardiovasc Med.* 2011;12(9):643–7. DOI: 10.2459/JCM.0b013e328346c142
116. O'Connor DT, Zhu G, Rao F, Taupenot L, Fung MM, Das M, et al. Heritability and Genome-Wide Linkage in US and Australian Twins Identify Novel Genomic Regions Controlling Chromogranin A: Implications for Secretion and Blood Pressure. *Circulation.* 2008;118(3):247–57. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.709105
117. Bralewska M, Pietrucha T, Sakowicz A. Chromogranin A: An Endocrine Factor of Pregnancy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4986. DOI: 10.3390/ijms24054986
118. Sunjic Lovric Z, Resic Karara J, Mimica B, Kumric M, Supe-Domic D, Santic R, et al. Analysis of Circulating Catestatin in Early Pregnancy: A Preliminary Investigation. *Biomedicines.* 2024;12(11):2626. DOI: 10.3390/biomedicines12112626

119. Tüten N, Güralp O, Gök K, Hamzaoglu K, Oner YO, Makul M, et al. Serum catestatin level is increased in women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol.* 2022;42(1):55–60. DOI: 10.1080/01443615.2021.1873922
120. Florio P, Mezzesimi A, Turchetti V, Severi FM, Ticconi C, Forconi S, et al. High levels of human chromogranin A in umbilical cord plasma and amniotic fluid at parturition. *J Soc Gynecol Investig.* 2002;9(1):32–6. DOI: 10.1016/s1071-5576(01)00149-6
121. Nicolaidis KH, Wright D, Syngelaki A, Wright A, Akolekar R. Fetal Medicine Foundation fetal and neonatal population weight charts. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(1):44–51. DOI: 10.1002/uog.19073
122. The Fetal Medicine Foundation. Estimated fetal weight calculator. Internet. [citirano 1. ožujka 2025.]. Dostupno na: <https://fetalmedicine.org/research/assess/bw>.
123. Watterberg KL, Aucott S, Benitz WE, Cummings JJ, Eichenwald EC, Goldsmith J, et al. The Apgar Score. *Pediatrics.* 2015;136(4):819–22. DOI: 10.1542/peds.2015-2651
124. Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić A-M, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Medica.* 2013;242–54. DOI: 10.11613/BM.2013.031
125. Simundic A-M. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in *Biochemia Medica* journal. *Biochem Medica.* 2012;15–23. DOI: 10.11613/BM.2012.003
126. Udovicic M, Bazdaric K, Bilic-Zulle L, Petroveckii M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Medica.* 2007;10–5. DOI: 10.11613/BM.2007.002
127. McHugh M. The odds ratio: calculation, usage, and interpretation. *Biochem Medica.* 2009;120–6. DOI: 10.11613/BM.2009.011
128. Palmrich P, Schirwani-Hartl N, Haberl C, Haslinger P, Heinzl F, Zeisler H, et al. Catestatin—A Potential New Therapeutic Target for Women with Preeclampsia? An Analysis of Maternal Serum Catestatin Levels in Preeclamptic Pregnancies. *J Clin Med.* 2023;12(18):5931. DOI: 10.3390/jcm12185931
129. Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. The Risk of Preeclampsia Rises with Increasing Prepregnancy Body Mass Index. *Ann Epidemiol.* 2005;15(7):475–82. DOI: 10.1016/j.annepidem.2004.12.008
130. Günsel H, Oruç S, Taneli F, Sizer M, Kirteke K, Sunar N, et al. Comparison of serum neuropeptide-FF and catestatin levels in hypertensive pregnant women. *Ann Clin Anal Med.* 2024;15(07). DOI: 10.4328/ACAM.22174
131. Alghazali B, Tabarak K. Serum catestatin level in preeclampsia. *Scr Med (Brno).* 2024;55(5):547–55. DOI: 10.5937/scriptamed55-49730

132. Özalp M, Yaman H, Demir Ö, Aytekin Garip S, Aran T, Osmanağaoğlu MA. The role of maternal serum catestatin in the evaluation of preeclampsia and fetal cardiac functions. *J Turk Soc Obstet Gynecol.* 2021;18(4):272–8. DOI: 10.4274/tjod.galenos.2021.34946
133. Owolabi AO, Kasso T. Serum Catestatin Levels in Pre-eclampsia and Normotensive Pregnancy. *Niger J Med.* 2024;33(2):130–3. DOI: 10.4103/NJM.NJM\_141\_23
134. Owolabi AO, Kasso T, Emoekpere H, Amike I. Serum Catestatin and Severity of Preeclampsia at a Tertiary Hospital in Southern Nigeria. *Sch Int J Obstet Gynecol.* 2025;8(02):46–51. DOI: 10.36348/sijog.2025.v08i02.001
135. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension.* 2018;72(1):24–43. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10803
136. Steegers EA, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *The Lancet.* 2010;376(9741):631–44. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60279-6
137. Magee LA, Brown MA, Hall DR, Gupte S, Hennessy A, Karumanchi SA, et al. The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2022;27:148–69. DOI: 10.1016/j.preghy.2021.09.008
138. Gayen JR, Gu Y, O'Connor DT, Mahata SK. Global Disturbances in Autonomic Function Yield Cardiovascular Instability and Hypertension in the Chromogranin A Null Mouse. *Endocrinology.* 2009;150(11):5027–35. DOI: 10.1210/en.2009-0429
139. Ying W, Tang K, Avolio E, Schilling JM, Pasqua T, Liu MA, et al. The immunosuppression of macrophages underlies the cardioprotective effects of catestatin (CST). *Physiology;* 2020.
140. Durakoglugil ME, Ayaz T, Kocaman SA, Kirbas A, Durakoglugil T, Erdogan T, et al. The relationship of plasma catestatin concentrations with metabolic and vascular parameters in untreated hypertensive patients: Influence on high-density lipoprotein cholesterol. *Anatol J Cardiol.* 2015;15(7):577–85. DOI: 10.5152/akd.2014.5536
141. Bralewska M, Pietrucha T, Sakowicz A. Reduction in CgA-Derived CST Protein Level in HTR-8/SVneo and BeWo Trophoblastic Cell Lines Caused by the Preeclamptic Environment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7124. DOI: 10.3390/ijms24087124
142. Magee LA, Von Dadelszen P, Rey E, Ross S, Asztalos E, Murphy KE, et al. Less-Tight versus Tight Control of Hypertension in Pregnancy. *N Engl J Med.* 2015;372(5):407–17. DOI: 10.1056/NEJMoa1404595

143. Vanli Tonyali N, Karabay G, Arslan B, Aktemur G, Tokgoz Cakir B, Seyhanli Z, et al. Maternal Serum Catestatin Levels in Gestational Diabetes Mellitus: A Potential Biomarker for Risk Assessment and Diagnosis. *J Clin Med.* 2025;14(2):435. DOI: 10.3390/jcm14020435
144. Kumric M, Vrdoljak J, Dujic G, Supe-Domic D, Ticinovic Kurir T, Dujic Z, et al. Serum Catestatin Levels Correlate with Ambulatory Blood Pressure and Indices of Arterial Stiffness in Patients with Primary Hypertension. *Biomolecules.* 2022;12(9):1204. DOI: 10.3390/biom12091204
145. Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, Corvalán C, Uauy R, Herring S, et al. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(12):1025–36. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30217-0
146. Roberts JM, Hubel CA. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta.* 2009;30:32–7. DOI: 10.1016/j.placenta.2008.11.009

---

**8 POPIS KRATICA**

<b>Kratika</b>	<b>Puno ime</b>
ACOG	Američko društvo opstetričara i ginekologa (engl. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i> )
ALT	alanin-aminotransferaza
AMY	amilaza
AST	aspartat-aminotransferaza
ATP	adenozin trifosfat
CgA	kromogranin A
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CLIA	kemiluminiscentna metoda (engl. <i>chemiluminescence immunoassay</i> )
CRP	C-reaktivni protein
CST	katestatin
CV	koeficijent varijacije (engl. <i>coefficient of variation</i> )
dBp	dijastolički krvni tlak (engl. <i>diastolic blood pressure</i> )
ECLIA	elektrokemiluminiscentna metoda (engl. <i>electrochemiluminescence immunoassay</i> )
ELISA	enzimimunoanaliza (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FT4	slobodni tiroksin
GFR	brzina glomerularne filtracije (engl. <i>glomerular filtration rate</i> )
GH	gestacijska hipertenzija

---

hCG	humani korionski gonadotropin (engl. <i>human chorionic gonadotropin</i> )
HDL-kolesterol	lipoproteini visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i> )
HELLP	hemoliza, povišeni jetreni enzimi, niska razina trombocita (engl. <i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count</i> )
hPL	humani placentalni laktogen (engl. <i>human placental lactogen</i> )
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IGF-1	inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i> )
ITM	indeks tjelesne mase
IUGR	intrauterini zastoje rasta (engl. <i>intrauterine growth restriction</i> )
LDH	laktat-dehidrogenaza
LDL-kolesterol	lipoproteini niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i> )
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
nAChR	nikotinski kolinergički receptora
NO	dušikov oksid
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
PIGF	placentalni čimbenik rasta (engl. <i>placental growth factor</i> )
PTH	paratireoidni hormon
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteron sustav
sBP	sistolički krvni tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i> )

sFlt-1	topljivi fms-slični tirozin-kinazni receptor 1 (engl. <i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> )
SGA	novorođenče malo za gestacijsku dob (engl. <i>small for gestational age</i> )
TSH	tireotropni hormon
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	endotelni čimbenik vaskularnog rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## 9 ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

### 9.1 *Životopis*

Adriana Bokulić rođena je 10. travnja 1983. godine u Karlovcu gdje je pohađala Gimnaziju Karlovac. Godine 2002. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Diplomirala je 2008. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije.

Pripravnički staž odradila je u Općoj bolnici Karlovac. Zaposlila se 2010. godine u Endokrinološkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, koji je od 2022. godine u sklopu Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu.

Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položila je 2018. godine stekavši zvanje specijaliste medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Kao vanjski suradnik sudjeluje u nastavi kolegija na Medicinskom fakultetu Hrvatskog katoličkog sveučilišta u Zagrebu.

Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. Autor je i koautor 9 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Web of Science Core Collection, 2 znanstvena članka u ostalim časopisima, 17 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom te 4 poglavlja u knjigama i obrazovnim materijalima.

**9.2 Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja****Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u Current Contents (CC)**

1. Bokulic A, Butorac D, Djaković I, Čukelj M, Stasenko S, Grdić Rajković M. Peripartum Changes in Neuroendocrine, Angiogenic and Inflammatory Biomarkers in Gestational Hypertension. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2026;55(5):50841. DOI:10.31083/CEOG50841
2. Bokulić A, Butorac D, Djaković I, Čukelj M, Rajković MG. Investigating preeclampsia risk factors and angiogenic profiles in low-screening area. *Acta Pharm.* 2025;75(4):687–97. DOI: 10.2478/acph-2025-0040
3. Bokulić A, Zec I, Marijančević D, Siter Kuprešanin M, Goreta S, Đuras A, et al. National recommendations of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine: Thyroid function tests from the laboratory point of view. *Biochem Medica.* 2025;35(3):384–401. DOI: 10.11613/BM.2025.030505
4. Bokulić A, Zec I, Marijančević D, Goreta S. Androgens in women: Establishing reference intervals for dehydroepiandrosterone sulphate and androstenedione on the Roche Cobas. *Biochem Medica.* 2023;33(2):020706. DOI: 10.11613/BM.2023.020706
5. Bokulić A, Zec I, Goreta S, Nikolac Gabaj N, Kocijančić M, Serdar Hiršl T, et al. Laboratory policies and practices for thyroid function tests in Croatia: survey on behalf of Working Group for Laboratory Endocrinology of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Medica.* 2022;32(3):9. DOI: 10.11613/BM.2022.030702
6. Milevoj Kopčinović L, Juričić G, Bokulić A, Vukasović I, Čelap I, Čičak H, et al. Verification policies in Croatian medical biochemistry laboratories: a survey of the practice. *Biochem Medica.* 2022;32(2):020703. DOI: 10.11613/BM.2022.020703
7. Bokulić A, Zec I, Marijančević D, Goreta S, Požgaj Šepec M, La Grasta Sabolić L. Establishing paediatric reference intervals for thyroid function tests in Croatian population on the Abbott Architect i2000. *Biochem Medica.* 2021;31(3):439–46. DOI: 10.11613/BM.2021.030702

8. Šostarić M, Bokulić A, Marijančević D, Zec I. Optimizing laboratory defined macroprolactin algorithm. *Biochem Medica*. 2019;29(2):346–51. DOI: 10.11613/BM.2019.020706
9. Gulin T, Kruljac I, Kirigin L, Merc M, Pavić M, Trcin MT, et al. Advanced Age, High  $\beta$ -CTX Levels, and Impaired Renal Function are Independent Risk Factors for All-Cause One-Year Mortality in Hip Fracture Patients. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(1):67–75. DOI: 10.1007/s00223-015-0070-x

### **Znanstveni radovi u drugim časopisima**

1. Butorac D, Nemeth Blažić T, Meyra Potkonjak A, Bokulic A, Stojanović I. Colposcopy for diagnosis of premalignant and malignant cervical lesions. *Liječnički Vjesn*. 2021;143(11–12):463–9. DOI: 10.26800/LV-143-11-12-7
2. Marinković Radošević J, Kirigin L, Strinović M, Kruljac I, Perić B, Mirošević G, et al. Croatian guidelines for the management of hyperprolactinemia: a viewpoint from developing country. *Endocr Oncol Metab*. 2015;1(1):10–23. DOI: 10.21040/EOM/2016.1.1.1

### **Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom**

1. Bokulic A, Marijančević D, Zec I, Goreta S. Reevaluating reference intervals for androstenedione in reproductive-aged woman. In: Copenhagen, Denmark: Endocrine Abstracts; 2025. p. P1062.
2. Marijančević D, Bokulić A, Goreta S, Zec I. Optimizing laboratory defined macroprolactin algorithm for follow-up patients. In: Copenhagen, Denmark: Endocrine Abstracts; 2025. p. P936.
3. Blagec V, Bokulić A, Petek I, Marijančević D. The stability of parathyroid hormone (PTH), osteocalcin and C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX-I) in serum and plasma. In: Vodice, Croatia: Biochemia Medica; 2024. p. S122.
4. Bokulić A. Challenges in establishing indirect reference intervals. In: Vodice, Croatia: Biochemia Medica; 2024. p. S8.

5. Takač R, Zec I, Marijančević D, Bokulić A, Verbanec D, Goreta S. The stability study of thyroid function tests. In: Vodice, Croatia: Biochemia Medica; 2024. p. S84.
6. Goreta S, Zec I, Bokulić A, Marijančević D. Establishing LOQ for estradiol, LH, FSH and testosterone on Roche Cobas e801. In: Endocrine Abstracts. Istanbul, Turkey; 2023. p. P471.
7. Marijančević D, Bokulić A, Zec I, Goreta S. Biological variation data of anti-Mullerian hormone and androstenedione among women of reproductive age. In: Istanbul, Turkey: Endocrine Abstracts; 2023. p. P735.
8. Zec I, Bokulić A, Kruljac I. Urinary free cortisol – estimating the upper reference limit in Croatian population on the Abbott Architect i2000. In: Munich, Germany: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2021. p. s751.
9. Njegovan M, Bokulić A, Đerek L, Tešija Kuna A, Vukasović I, Vidranski V. Lipemia interference on nephelometry assays. In: Zagreb, Croatia: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2019. p. eA32.
10. Bokulić A, Zec I, Vidranski V, Bukovec-Megla Ž, Petek-Tarnik I, Petek I. Macroprolactin – to screen or not to screen? In: Rijeka, Croatia: Biochemia Medica; 2015. p. S67–S67.
11. Krtanjek S, Petek Tarnik I, Marijančević D, Bokulić A, Bukovec Megla Ž. When screening for Down syndrome do we think about the preanalytics? In: Amsterdam, Netherlands: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2017. p. eA40-41.
12. Čelap I, Bokulic A, Vukasović I, Vrkić N. Samples Delivery time analysis. Need for entry data improvements. In: Durban, South Africa: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2017. p. S1648.
13. Bokulić A, Krtanjek S, Marijančević D, Bukovec Megla Ž. Simplifying ACTH preanalytical procedure. In: Amsterdam, Netherlands: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2017. p. eA37.
14. Vidranski V, Željka Bukovec-Megla, Krleža JL, Bokulić A. Differences between capillary and venous blood values of alpha-fetoprotein in healthy adults. In: Porto, Portugal: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2015. p. eA31.






15. Bokulić A, Zec I, Krtanjek S, Bukovec-Megla Ž. The role of albumin in calculation of free testosterone. In: Zagreb, Croatia: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2015. p. eA236.
16. Vidranski V, Kožaj S, Bukovec-Megla Ž, Bokulić A. Double reference ranges for CEA smokers and non-smokers; true or false? In: Zagreb, Croatia: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; 2015. p. eA221.
17. Kalogjera L, Tomljenovic D, Baoduin T, Bokulić A, Bukovec Megla Ž. Nasal and ocular response to nasal challenge and irritants in patients with allergic rhinitis. In: Barcelona, Spain: John Wiley & Sons Ltd; 2015. p. 5.

### **Poglavlja u knjigama i obrazovnim materijalima**

1. Marijančević D, Bokulić A, Mirošević G, Bukovec Megla Ž. Endokrinološke i metaboličke bolesti. In: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Nikolac Gabaj N, Bach Rojecky L, editors. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2025. p. 167–94.
2. Bokulić A. Laboratorijska dijagnostika ženske neplodnosti. In: Marijančević D, editor. Planiranje i nadzor trudnoće-multidisciplinarni pristup. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 11–20.
3. Vrkljan M, Marinković Radošević J, Perić B, Mirošević G, Pećina IH, Pažanin L, et al. Prolaktinom. In: Vrkljan M, Kusić Z, editors. Endokrinološka onkologija. Zagreb: V. B. Z.; 2017. p. 25–30.
4. Bukovec-Megla Ž, Petek-Tarnik I, Bokulić A. Laboratorijska dijagnostika Cushingova sindroma. In: Gnjidić Ž, Kaštelan D, editors. Cushingov sindrom. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 51–63.

Original Research

# Peripartum Changes in Neuroendocrine, Angiogenic, and Inflammatory Biomarkers in Gestational Hypertension

Adriana Bokulić<sup>1,\*</sup>, Dražan Butorac<sup>2</sup>, Ivka Djaković<sup>3</sup>, Marijo Čukelj<sup>2</sup>,  
Sandra Stasenکو<sup>4</sup>, Marija Grdić Rajković<sup>5</sup><sup>1</sup>Department of Clinical Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, 10000 Zagreb, Croatia<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, 10000 Zagreb, Croatia<sup>3</sup>Department of Gynecology, Bethesda Hospital, 4052 Basel, Switzerland<sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Merkur University Hospital, 10000 Zagreb, Croatia<sup>5</sup>Department of Medical Biochemistry and Haematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia\*Correspondence: [adriana.bokulic@kbcsm.hr](mailto:adriana.bokulic@kbcsm.hr) (Adriana Bokulić)

Academic Editor: Paolo Ivo Cavoretto

Submitted: 9 February 2026 Revised: 12 March 2026 Accepted: 24 March 2026 Published: 21 May 2026

## Abstract

**Background:** Hypertensive disorders in pregnancy, such as gestational hypertension (GH), pose significant risks to maternal and fetal health, affecting a substantial proportion of pregnancies worldwide. Despite their prevalence, the dynamics of various biomarkers across the peripartum period remain poorly understood, limiting comprehensive insight into their pathophysiology. This study aimed to evaluate changes in neuroendocrine, angiogenic, and inflammatory biomarkers before and after delivery in women with GH and to compare these profiles with those of normotensive controls. **Methods:** This prospective study included women with singleton vaginal deliveries, assigned to GH and control groups ( $n = 20$  per group). Clinical data were collected, and blood samples (pre- and 2 hours post-delivery) were analyzed for chromogranin A (CgA), catestatin (CST), soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), placental growth factor (PlGF), interleukin-6 (IL-6), and C-reactive protein (CRP). Peripartum changes were evaluated using rank-based repeated-measures analysis. **Results:** CgA concentrations decreased significantly after delivery in both groups ( $p_{Time} < 0.001$ ), with comparable peripartum kinetics ( $p_{Group \times Time} = 0.718$ ; median difference [MD]: 2.3 ng/mL; 95% confidence interval [CI]: -5.4 to 7.8). PlGF concentrations were significantly lower in the GH group ( $p_{Group} = 0.002$ ) and declined after birth ( $p_{Time} < 0.001$ ), with a clinically meaningful trend toward a greater decline in the GH group (MD: 78 pg/mL; 95% CI: 30 to 220). IL-6 increased 10-fold after delivery ( $p_{Time} < 0.001$ ), with a comparable shift between groups ( $p_{Group \times Time} = 0.456$ ; MD: 6.9 pg/mL; 95% CI: -9.1 to 21.2). CRP concentrations increased after delivery ( $p_{Time} < 0.001$ ), with no difference in peripartum kinetics between groups ( $p_{Group \times Time} = 0.257$ ). Pre-delivery CgA and sFlt-1 were strongly correlated in the control group ( $r_s = 0.636$ ,  $p = 0.003$ ). Sex-stratified analyses revealed significantly lower IL-6 concentrations in female fetuses within the control group (1.9 vs. 3.6 pg/mL;  $p = 0.037$ ), and significantly lower PlGF concentrations in female fetuses within the GH group (73 vs. 153 pg/mL;  $p = 0.039$ ). **Conclusions:** Our results align with established patterns for angiogenic and inflammatory markers, but these novel neuroendocrine findings require validation in larger groups. Incorporating neuroendocrine regulation into models of GH is a key area for future study. **Study Registration:** The study has been registered on <https://zenodo.org/> (registration number: zenodo. 18958924; registration link: <https://zenodo.org/records/18958924>).

**Keywords:** gestational hypertension; peripartum changes; neuroendocrine biomarkers; angiogenic biomarkers; inflammatory biomarkers

## 1. Introduction

Hypertensive disorders in pregnancy represent a spectrum of conditions characterized by elevated blood pressure during pregnancy, including gestational hypertension (GH), preeclampsia, eclampsia, and chronic hypertension with superimposed preeclampsia. These disorders affect approximately 5–8% of pregnancies worldwide and are a significant cause of maternal and perinatal morbidity and mortality [1,2]. GH is the most common hypertensive disorder of pregnancy. Although its complications are generally less severe compared with preeclampsia, it is not without risk, as GH can progress to preeclampsia, and it is associated with adverse maternal and fetal outcomes. The sever-

ity of blood pressure elevation and the gestational age at presentation influence the risk of complications [1,2]. Despite extensive research, the precise etiology remains unclear, although placental dysfunction is widely recognized as a key pathogenic event, alongside angiogenic imbalance, systemic inflammation, and neuroendocrine dysregulation [3]. This complex interplay of factors contributes to the full clinical presentation of the disorder. Beyond hypertensive disorders, dysregulation of neuroendocrine, inflammatory, and angiogenic signaling pathways is frequently associated with other pregnancy complications, such as intrauterine growth restriction (IUGR), gestational diabetes mellitus (GDM), and premature membrane rupture (PROM) [4–6].



Neuroendocrine dysregulation also contributes to these disease pathogeneses, with evidence indicating changes in maternal autonomic function and increased sympathetic nervous system activity in hypertensive disorders of pregnancy [3]. Chromogranin A (CgA) is a glycoprotein widely expressed in neuroendocrine cells and serves as a precursor for multiple biologically active peptides. CgA and its peptides are involved in a range of biological processes, including the maintenance of cardiovascular homeostasis and the regulation of the immune system [7]. Catestatin (CST), a peptide derived from CgA, exhibits immunomodulatory properties and has been linked to various inflammatory conditions [8,9]. It displays vasodilatory and anti-adrenergic effects, reducing catecholamine release. Altered CST levels have been associated with blood pressure regulation in nonpregnant populations, with evidence suggesting a protective role against hypertension. Both CgA and CST are produced by the placenta and show promising theoretical potential based on their functions in vascular regulation. However, clinical evidence remains limited and inconsistent across studies [10].

Angiogenic factors, including soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF), provide the strongest clinical evidence for diagnosing and monitoring hypertensive disorders in pregnancy. An imbalance between the antiangiogenic factor sFlt-1 and the proangiogenic factor PlGF results in a higher sFlt-1/PlGF ratio in pregnancies with hypertension [2]. Elevated sFlt-1 enhances inflammation by increasing endothelial sensitivity to proinflammatory factors [11], whereas PlGF deficiency impairs immunomodulatory responses and angiogenesis, further exacerbating endothelial dysfunction [12, 13].

Inflammatory markers are consistently elevated in hypertensive pregnancies and correlate with disease severity. However, their nonspecific nature limits their diagnostic utility as standalone markers [14]. The proinflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6), produced by several cell types, including trophoblasts, mediates the acute-phase response and promotes endothelial activation [15]. C-reactive protein (CRP), an acute-phase protein synthesized by the liver, is a nonspecific marker of inflammation that may reflect systemic inflammation. This inflammatory condition contributes to widespread endothelial dysfunction throughout the maternal vasculature [14].

The process of labor and delivery induces significant physiological changes that influence circulating biomarker levels through mechanisms such as placental separation, tissue injury, and acute inflammation. Neuroendocrine markers are not well characterized during the peripartum period. Although CgA and CST have been examined in pregnancy complications data on their peripartum kinetics remain limited. Angiogenic markers change rapidly after delivery, with sFlt-1 decreasing sharply and PlGF declining more gradually [16]. Inflammatory markers also show notable

fluctuations during the peripartum period. IL-6 levels increase substantially with the onset and progression of labor [17], and CRP levels exhibit an early postpartum spike that correlates with labor duration, the number of vaginal examinations, and intrapartum interventions [18].

This study investigates six biomarkers representing distinct pathophysiological pathways: neuroendocrine markers (CgA, CST), angiogenic factors (sFlt-1, PlGF), and inflammatory markers (IL-6, CRP), along with their potential interconnections and temporal patterns before and after delivery in GH. The primary aim of this study was to compare the peripartum kinetic shifts of the neuroendocrine markers CgA and CST between normotensive pregnant women and those with GH. Secondary and exploratory objectives included assessing peripartum changes in angiogenic and inflammatory biomarkers, analyzing relationships among biomarkers, and investigating the potential influence of fetal sex on these profiles. To our knowledge, this is the first study to characterize the immediate peripartum kinetics of neuroendocrine markers in GH.

## 2. Materials and Methods

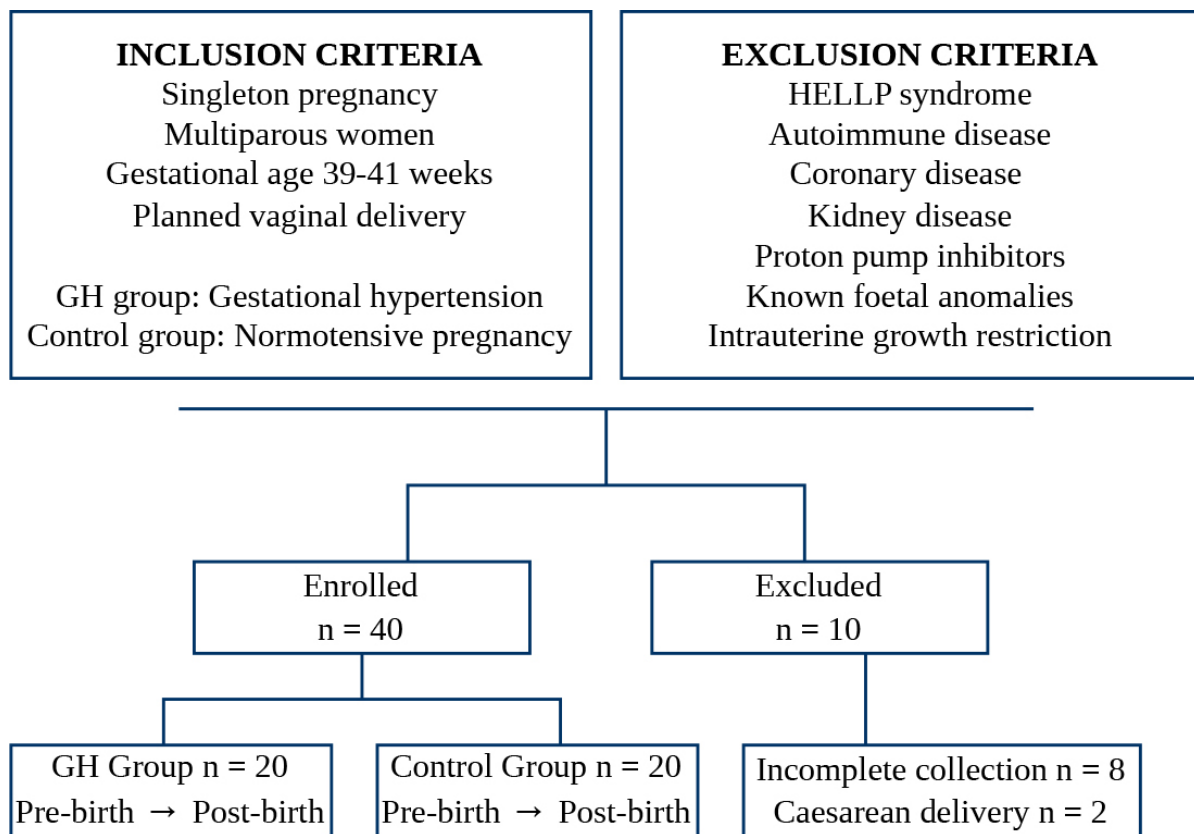
### 2.1 Subjects

The study was conducted at the Department of Gynecology and Obstetrics at Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia, from January 2023 to March 2025. The hospital's Ethics Review Board (ERB) approved the study. Written informed consent was obtained from all participants. The study included multiparous women with singleton pregnancies undergoing vaginal delivery. Exclusion criteria included preexisting autoimmune, coronary, and renal diseases; use of proton pump inhibitors; known fetal anomalies; and IUGR. To exclude Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets (HELLP) syndrome, pregnancies with creatinine levels  $>100 \mu\text{mol/L}$ , uric acid  $>310 \mu\text{mol/L}$ , aminotransferase levels  $>70 \text{ IU/L}$ , lactate dehydrogenase  $>600 \text{ IU/L}$ , and platelet counts  $<100 \times 10^9/\text{L}$  were not included. Labor was induced by amniotomy and oxytocin between 39 and 41 weeks of gestation without the use of epidural analgesia. Fig. 1 summarizes the study design.

Women were divided into either the GH group ( $n = 20$ ) or the control group ( $n = 20$ ). GH was defined according to the American College of Obstetricians and Gynecologists criteria [1] as systolic blood pressure (sBP)  $\geq 140 \text{ mmHg}$  and/or diastolic blood pressure (dBP)  $\geq 90 \text{ mmHg}$  on two separate occasions at least 4 hours apart after 20 weeks of gestation in a woman with previously normal blood pressure.

### 2.2 Clinical and Anthropometrical Assessments

Maternal, pregnancy, and neonatal characteristics were recorded, including age, blood pressure, height, weight, gestational weight gain, smoking status, gestational age at delivery, birth weight and length, and the neonatal sex. Birth weight centiles were calculated according to



**Fig. 1. Study flowchart showing initial inclusion and exclusion criteria, the number of participants enrolled with peripartum sample collection, and the number of participants subsequently excluded.** GH, gestational hypertension; HELLP, Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets.

Nicolaides *et al.* [19]. Body mass index (BMI) was calculated as body mass (kg) divided by the square of height ( $m^2$ ).

### 2.3 Laboratory Assessments

Blood samples were collected before labor (pre-birth) and 2 hours postpartum after expulsion of the placenta (post-birth). Samples were obtained by venipuncture into tubes containing a clot activator (7 mL Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Krefeld, Austria). After clot formation, samples were centrifuged at  $2200 \times g$  for 10 minutes, and the serum was stored at  $-80^\circ C$  until analysis.

In all samples, concentrations of CgA, CST, sFlt-1, PlGF, IL-6, and CRP were measured. CgA and CST concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The manufacturer of the CgA assay (cat. no. TM E-9000, LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn, Germany) reports a measurement range of 2.3–900 ng/mL, with an intra-assay coefficient of variation (CV)  $<6.3\%$  and an inter-assay CV  $<5.3\%$ . The manufacturer of the CST assay (cat. no. EK-053-27CE, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) reports a measurement range of 0–100 ng/mL, with an intra-assay CV  $<10\%$  and an inter-assay CV  $<15\%$ . Measurements for sFlt-1, PlGF, and

IL-6 were performed on a Roche cobas analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using an electrochemiluminescent immunoassay with the Elecsys sFlt-1, PlGF, and IL-6 reagents (cat. no. 07027818190, 07027648190, and 09015612190, respectively; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). CRP concentrations were measured with an Abbott Alinity analyzer (Alinity, Abbott, Chicago, IL, USA) using the Abbott CRP reagent kit (cat. no. 07P5620, Abbott, Chicago, IL, USA).

### 2.4 Statistics

Results were analyzed using MedCalc (v22.014, MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium) and RStudio (v2025.09.02, Posit Software, PBC, Boston, MA, USA). Sample size was determined based on peripartum CgA concentrations to achieve 80% statistical power ( $\beta = 0.2$ ) at a 5% significance level ( $\alpha = 0.05$ ) [20]. Due to the small sample size ( $n = 20$  per group), nonparametric statistical methods were applied without testing for normality. Continuous variables were expressed as medians with interquartile ranges (Q1; Q3), whereas categorical variables were presented as frequencies and percentages.

For baseline maternal and neonatal characteristics, as well as fetal sex effects, differences between independent groups were assessed using the Mann-Whitney U test, and

**Table 1. Maternal and neonatal characteristics.**

	Control	GH	MD (95% CI)	<i>p</i> -value
<b>Maternal characteristics</b>				
Age (years)	35 (30; 38)	32 (30; 38)	−1 (−4; 3)	0.786
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.1 (26.4; 28.2)	32.0 (29.7; 37.4)	4.9 (2.7; 8.5)	<0.001
Weight gain (kg)	13 (9; 17)	12 (11; 14)	−1 (−4; 2)	0.694
sBP (mmHg)	110 (110; 120)	143 (135; 157)	30 (25; 40)	<0.001
dBp (mmHg)	70 (65; 80)	88 (80; 90)	15 (10; 20)	<0.001
Smoking	1 (5%)	0 (0%)	–	1.000
<b>Neonatal characteristics</b>				
Sex (male)	11 (55%)	12 (60%)	–	1.000
Birth weight (g)	3645 (3320; 3990)	3375 (3210; 3835)	−190 (−460; 80)	0.164
Birth length (cm)	51 (50; 52)	50 (49; 52)	−1 (−2; 1)	0.352
Birth weight (centile)	69 (48; 88)	72 (52; 92)	2 (−15; 18)	0.655

The values presented as median (Q1; Q3) were tested using the Mann-Whitney U test, and the values presented as frequency (percentage) were tested using Fisher's exact test. Effect size is expressed as the Hodges-Lehmann MD for continuous variables with 95% CI. Effect size is not applicable for categorical variables. *n* = 20 per group. CI, confidence interval; BMI, body mass index; sBP, systolic blood pressure; dBp, diastolic blood pressure; MD, median difference.

categorical data were analyzed using Fisher's exact test. A *p*-value of 0.05 was considered statistically significant. To evaluate peripartum biomarker dynamics, a unified rank-based longitudinal model was applied using the Wald-type statistic to simultaneously assess the main effects of group (control *vs.* GH) and time (pre-birth *vs.* post-birth), as well as their interaction (Group × Time). Multiplicity control was maintained using the Bonferroni adjustment. For the primary neuroendocrine endpoints (CgA and CST), the primary comparison was the Group × Time interaction, with a Bonferroni-adjusted significance threshold of  $\alpha = 0.025$  (0.05/2). Secondary endpoints were analyzed as exploratory outcomes without a Bonferroni adjustment. Effect size was estimated by calculating the Hodges-Lehmann median difference (MD) with corresponding 95% confidence interval using the Mann-Whitney U test applied to measured values for group comparisons, and to per-subject peripartum changes ( $\Delta = \text{post} - \text{pre}$ ) for the Group × Time interaction effect.

To determine correlations between CgA and CST and clinical and laboratory variables, Spearman's rank correlation test was used. Bonferroni correction was applied separately for each neuroendocrine marker, with an adjusted significance threshold of  $\alpha = 0.007$  (0.05/7). Results were reported as the Spearman rank correlation coefficient (*r*<sub>s</sub>) and its 95% CI.

### 3. Results

#### 3.1 General Characteristics of the Study Population

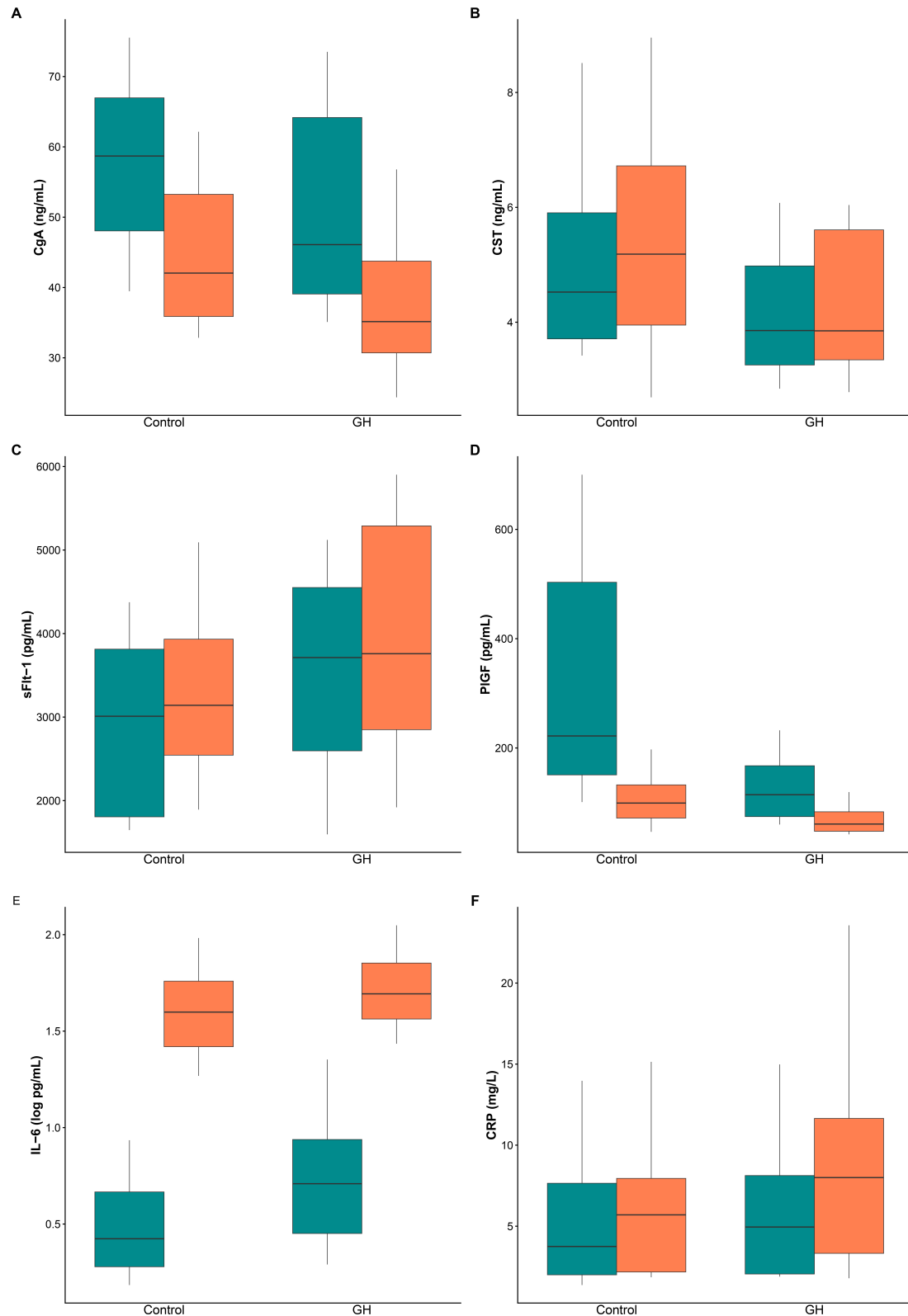
The study included 20 pregnant women in the control group and 20 in the GH group, all with full-term deliveries between 39 and 41 weeks of gestation. Maternal and neonatal characteristics are summarized in Table 1. The GH group demonstrated significantly higher sBP and dBp,

as expected by the study design (both *p* < 0.001). Furthermore, women in the GH group had a significantly higher BMI, with a MD of 4.9 kg/m<sup>2</sup> (95% CI: 2.7 to 8.5). Gestational weight gain did not differ between groups, with a MD of −1 kg (95% CI: −4 to 2), suggesting that BMI differences preceded pregnancy. No other maternal characteristics, such as age and smoking status, differed significantly between groups. Similarly, neonatal outcomes, including birth length, birth weight, and birth weight centiles, showed no significant differences between the groups.

#### 3.2 Peripartum Changes and Interaction Analysis

Fig. 2 presents box plots for CgA (A), CST (B), sFlt-1 (C), PIGF (D), IL-6 (E), and CRP (F) in the control and GH groups before and after birth. Table 2 presents medians with interquartile ranges for each biomarker at the pre- and post-birth time points for both groups, as well as the results for the main effects and time-by-group interaction. To evaluate peripartum changes in biomarkers, an integrated rank-based longitudinal model was employed to assess the main effects of group (*p*<sub>Group</sub>) and time (*p*<sub>Time</sub>), as well as their interaction (*p*<sub>Group×Time</sub>), using Wald-type statistics. The interaction effect size is expressed as the Hodges-Lehmann MD in peripartum changes between the GH and control groups, with 95% CIs.

For the primary neuroendocrine endpoints, CgA and CST, trends toward lower concentrations in the GH group were observed (CgA *p*<sub>Group</sub> = 0.072; CST *p*<sub>Group</sub> = 0.088), but these did not reach statistical significance. A significant main effect of group was identified for PIGF (*p*<sub>Group</sub> = 0.002), with markedly lower concentrations in the GH group at both pre- and post-birth time points compared with controls. A highly significant main effect of time was observed for most biomarkers (*p*<sub>Time</sub> < 0.001), including CgA,



**Fig. 2. Biomarker levels before and after birth in control and GH groups.** Box plots display the median (central line), the interquartile range (box), and whiskers that extend to the 10th and 90th percentiles. (A) CgA. (B) CST. (C) sFlt-1. (D) PIGF. (E) IL-6 (log scale). (F) CRP. Pre-birth results are shown in green, while post-birth samples are in orange. n = 20 per group. CgA, chromogranin A; CST, catestatin; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase-1; PIGF, placental growth factor; IL-6, interleukin-6; CRP, C-reactive protein.

PIGF, IL-6, and CRP. Specifically, CgA and PIGF concentrations declined significantly from pre-birth to 2 h post-birth, whereas inflammatory markers IL-6 and CRP exhibited a substantial increase in both groups.

No significant interaction effects ( $p_{Group \times Time}$ ) were detected for any of the analyzed biomarkers, indicating that peripartum changes were similar between the control and GH groups. For PIGF, although the interaction was not statistically significant ( $p_{Group \times Time} = 0.312$ ), the GH group showed a greater peripartum decline than controls (MD: 78 pg/mL; 95% CI: 30 to 220).

### 3.3 Biomarker Correlation Analyses

Due to multiple comparisons, Bonferroni correction was applied, with an adjusted significance threshold of  $p < 0.007$  ( $0.05/7$ ; 7 pairwise correlations per marker within each group). All results are presented in **Supplementary Table 1**. Since CgA and CST are less well characterized, we examined the relationship between their pre-birth concentrations and sFlt-1, PIGF, IL-6, and CRP. No correlation was found between CgA and CST in either group. A strong positive correlation was identified in the control group between CgA and sFlt-1 ( $r_s = 0.636$ , 95% CI: 0.269 to 0.842;  $p = 0.003$ ). No other statistically significant associations were found between CgA or CST and the remaining biomarkers.

Additionally, pre-birth neuroendocrine markers were tested in relation to sBP and dBP. In the control group, CST was positively correlated with both sBP ( $r_s = 0.536$ , 95% CI: 0.122 to 0.791;  $p = 0.015$ ) and dBP ( $r_s = 0.470$ , 95% CI: 0.035 to 0.756;  $p = 0.036$ ). However, these associations did not remain statistically significant after Bonferroni corrections for multiple comparisons. No other correlations were found in the GH group, nor for CgA in either group.

### 3.4 Influence of Fetal Sex

As some studies suggest that fetal sex may influence concentrations, we analyzed potential sex-related variations within each group in pre-birth samples. Sex-stratified analyses were conducted using Mann-Whitney U tests within each group, and the results are presented in Table 3, together with Hodges-Lehmann MDs and 95% CIs. In the control group, IL-6 concentrations were significantly lower in women carrying female fetuses (MD:  $-1.2$  pg/mL; 95% CI:  $-4.96$  to  $-0.02$ ;  $p = 0.037$ ), whereas PIGF concentrations showed a trend toward higher levels in the female subgroup (MD: 246 pg/mL; 95% CI:  $-9$  to 542;  $p = 0.067$ ). In the GH group, PIGF concentrations were significantly lower in cases with female fetuses (MD:  $-63$  pg/mL; 95% CI:  $-112$  to  $-11$ ;  $p = 0.039$ ). Furthermore, trends toward lower neuroendocrine marker concentrations in female fetuses were observed within the GH group for CgA (MD:  $-11.6$  ng/mL; 95% CI:  $-25.3$  to  $0.5$ ;  $p = 0.054$ ) and CST (MD:  $-1.0$  ng/mL; 95% CI:  $-2.7$  to  $0.2$ ;  $p = 0.083$ ). No other sex-related differences were observed for the remaining

biomarkers in either the control or GH groups. Given the limited sample size of these subgroups and the exploratory nature of this analysis, these findings are reported at the nominal significance level ( $p < 0.05$ ) and should be interpreted as hypothesis-generating.

## 4. Discussion

This study offers insights into the interrelationships among biomarkers across various pathophysiological pathways in GH. Our analysis of six biomarkers representing neuroendocrine, angiogenic, and inflammatory pathways demonstrated distinct patterns of expression and regulation in GH pregnancies compared with normotensive pregnancies, both before and after delivery. The current findings align with existing literature in some areas while also providing new information, especially regarding neuroendocrine markers and their relationships with other biomarker systems. To our knowledge, this is the first study to characterize immediate peripartum changes of neuroendocrine markers (CgA and CST) in GH, as well as to examine their potential interactions with angiogenic and inflammatory factors. While previous research has documented altered CgA and CST concentrations in preeclampsia [10,21,22], the acute peripartum changes of these markers in GH, and their relationship with angiogenic dysregulation, have not yet been investigated.

### 4.1 Neuroendocrine Markers

The similar decrease in CgA observed in both groups suggests that this decline reflects universal physiological changes during delivery. As the placenta is a major contributor to CgA production, a sharp decline in CgA following placental expulsion likely reflects the removal of this primary source [22]. The consistent magnitude of decline in both groups suggests that placental CgA production is not differentially affected by GH, despite other aspects of placental dysfunction. The literature on peripartum CgA kinetics in hypertensive disorders remains limited, making direct comparisons challenging.

Recent literature has begun to establish the relevance of CST in preeclampsia, with some studies reporting reduced [21,23] and others reporting increased concentrations [24]. Our finding of unchanged CST in GH, with no significant interaction between group and time, does not clarify these discrepancies. However, CST concentrations may differ across hypertensive phenotypes, potentially reflecting disease severity or the timing of sample collection. The lack of significant CST changes during birth in either group suggests that CST concentrations are relatively stable across the peripartum transition, at least within the 2-hour timeframe examined. Current literature provides insufficient data on CST half-life and clearance mechanisms; therefore, the similar postpartum concentrations observed may reflect insufficient time for clearance to reach non-pregnant values.

**Table 2. Biomarker changes between control and GH group with interaction across time.**

	Control		GH		Main effect			Interaction
	Pre-birth	Post-birth	Pre-birth	Post-birth	<i>P</i> <sub>Group</sub>	<i>P</i> <sub>Time</sub>	<i>P</i> <sub>Group × Time</sub>	MD (95% CI)
CgA (ng/mL)	58.7 (47.0; 67.8)	42.1 (35.8; 53.4)	46.1 (40.0; 65.1)	35.2 (30.5; 45.5)	0.072	<0.001	0.718 <sup>1</sup>	2.3 (−5.4; 7.8)
CST (ng/mL)	4.5 (3.7; 6.1)	5.2 (3.9; 6.7)	3.9 (3.2; 5.1)	3.9 (3.3; 5.7)	0.088	0.560	0.815 <sup>1</sup>	−0.2 (−1.3; 0.8)
sFlt-1 (pg/mL)	3010 (1804; 3840)	3142 (2450; 4101)	3713 (2412; 4565)	3758 (2675; 5381)	0.106	0.077	0.672	−139 (−755; 402)
PlGF (pg/mL)	222 (146; 507)	99 (70; 136)	115 (73; 171)	61 (48; 85)	0.002	<0.001	0.312	78 (30; 220)
IL-6 (pg/mL)	2.6 (1.9; 5.3)	39.7 (24.4; 57.6)	5.1 (2.8; 8.8)	49.4 (36.0; 72.6)	0.091	<0.001	0.456	6.9 (−9.1; 21.2)
CRP (mg/L)	3.8 (2.0; 8.4)	5.7 (2.2; 8.5)	5.0 (2.0; 8.2)	8.0 (3.0; 11.7)	0.330	<0.001	0.257	0.7 (−0.8; 2.8)

Data for pre- and post-birth groups are presented as median (Q1; Q3). *p*-values for main effects (Group and Time) and the interaction (Group × Time) were derived from a rank-based longitudinal model using the Wald-type statistic. Interaction effect size is expressed as the Hodges-Lehmann MD with 95% CI, using the Mann-Whitney U test applied to per-subject peripartum changes ( $\Delta = \text{post} - \text{pre}$ ). <sup>1</sup>Primary endpoints (Group × Time interaction for CgA and CST) evaluated with Bonferroni-adjusted  $\alpha = 0.025$  (0.05/2). All other main effects and interactions are exploratory and not adjusted for multiple comparisons ( $p < 0.05$ ). *n* = 20 per group.

**Table 3. Pre-birth results based on fetal sex.**

	Control				GH			
	Male	Female	MD (95% CI)	<i>p</i> -values	Male	Female	MD (95% CI)	<i>p</i> -values
CgA (ng/mL)	55.0 (40.9; 65.7)	59.1 (55.1; 69.9)	5.1 (−14.6; 19.9)	0.370	51.7 (44.9; 65.1)	38.8 (34.3; 56.5)	−11.6 (−25.3; 0.5)	0.054
CST (ng/mL)	4.5 (3.8; 5.6)	4.6 (3.5; 7.6)	0.6 (−1.1; 3.1)	0.648	4.0 (3.7; 5.8)	3.3 (2.6; 4.6)	−1.0 (−2.7; 0.2)	0.083
sFlt-1 (pg/mL)	3038 (2329; 3897)	2458 (1673; 3227)	−691 (−1545; 470)	0.261	3345 (1763; 4763)	3891 (3316; 4514)	658 (−840; 2224)	0.427
PlGF (pg/mL)	185 (127; 289)	500 (218; 751)	246 (−9; 542)	0.067	153 (106; 180)	73 (65; 113)	−63 (−112; −11)	0.039
IL-6 (pg/mL)	3.6 (2.1; 7.2)	1.9 (1.5; 2.6)	−1.24 (−4.96; −0.02)	0.037	4.5 (2.3; 7.3)	7.7 (3; 16)	2.6 (−1.7; 11.4)	0.231
CRP (mg/L)	4.0 (2.3; 12.0)	2.1 (1.6; 6.7)	−1.8 (−6.5; 1.5)	0.223	3.7 (2.0; 7.6)	7.9 (3.1; 8.7)	−1.1 (−3.8; 6.0)	0.354

Data presented as median (Q1; Q3). *p*-values were derived using the Mann-Whitney and were not adjusted for multiple comparisons (exploratory analysis). Effect size is expressed as the Hodges-Lehmann MD with 95% CI. Control group (male: *n* = 11, female: *n* = 9); GH group (male: *n* = 12, female: *n* = 8).

In summary, the absence of significant differences in CgA and CST between the control and GH groups at either time point suggests that these markers are not specific for distinguishing GH from normal pregnancy in our cohort.

#### 4.2 Angiogenic Biomarkers

The absence of elevated sFlt-1 in GH aligns with established literature indicating that this disorder represents a milder placental dysfunction compared with preeclampsia [25,26]. Severe preeclampsia is characterized by marked elevations in sFlt-1 and markedly elevated sFlt-1/PIGF ratios that predict adverse outcomes [27,28], whereas GH typically shows minimal or absent sFlt-1 elevation [25,26,29,30]. This distinction reflects fundamental differences in placental pathology between these conditions.

Our finding of significantly lower PIGF concentrations in the GH group at both time points supports PIGF as a marker of placental dysfunction in GH. This is consistent with extensive literature establishing PIGF as a key biomarker in hypertensive disorders of pregnancy [27]. Lower PIGF concentrations observed are consistent with studies across the spectrum of hypertensive pregnancy disorders, although the reductions are typically more pronounced in severe preeclampsia than in GH. These variations in biomarker concentrations likely indicate a generalized placental response that is not exclusive to a single hypertensive condition, aligning with the evidence that specific signaling pathways are fundamental for maintaining overall placental function and health throughout gestation [31].

Literature reports an sFlt-1 half-life of approximately 1.4 days, with concentrations falling to less than 1% of pre-delivery values within the first week, while PIGF has a longer half-life of approximately 3.7 days and stabilizes at approximately 30% of pre-delivery values within the first week [16]. Our sampling at 2 hours post-birth likely captures only the earliest phase of this clearance. For sFlt-1, this timeframe may be too early to detect a significant decline, as initial release from the separating placenta may maintain circulating concentrations before clearance mechanisms predominate, resulting in no significant difference in peripartum kinetics between groups. In contrast, our measurements at the 2-hour time point captured the early decline in PIGF concentrations, with substantially lower levels in the GH group. Although the Group  $\times$  Time interaction for PIGF did not reach statistical significance, the MD suggests a clinically meaningful trend toward a greater decline in PIGF in the GH group.

In clinical practice, the sFlt-1/PIGF ratio is used as a diagnostic tool for short-term prediction of preeclampsia after 20 weeks of gestation [27,28]. However, the present analysis focused on behavior of individual biomarkers during the peripartum period to characterize their specific kinetic patterns and responses to delivery without introducing additional analytical complexity.

#### 4.3 Inflammatory Markers

The higher pre-birth IL-6 concentrations in the GH group suggest chronic low-grade inflammatory activation in GH, consistent with extensive literature linking proinflammatory cytokines to hypertensive pregnancy disorders [14]. Although the group effect did not reach statistical significance, the magnitude of baseline difference suggests that systemic inflammation is an intrinsic feature of the pathophysiology of GH, rather than simply a consequence of clinical complications or interventions. The pre-existing elevation of IL-6 may contribute to the hypertensive phenotype through IL-6-mediated endothelial activation and vascular dysfunction [14,15].

The marked post-birth increase in IL-6 in both groups (approximately 10-fold) likely reflects the combined inflammatory stimuli of delivery, tissue injury, and placental separation [17,32]. The absence of a between-group difference in the magnitude of this increase suggests that the labor and delivery process produces a stimulus that overrides baseline differences between groups, resulting in a parallel inflammatory response in both normotensive and GH pregnancies.

The non-significant differences in CRP between groups are consistent with the literature reporting heterogeneous CRP responses across hypertensive disorder phenotypes. Although CRP is often elevated in preeclampsia, variability across studies likely reflects differences in disease severity, timing, and cohort characteristics [14]. The modest post-delivery CRP increase aligns with the literature, which shows that CRP typically peaks at 24 hours postpartum [18]. Our 2-hour sampling precedes this peak, explaining the modest magnitude of change compared with IL-6. As a downstream acute-phase reactant produced in response to IL-6 stimulation, CRP response is delayed, and this pattern appears unaffected by GH during the immediate peripartum period.

#### 4.4 Relationships Among Biomarkers

The absence of a correlation between CgA and CST at any time point or across groups is a significant negative finding. Since CST is a cleavage product of CgA, a correlation between their concentrations might be expected. The lack of correlation suggests that CST levels are not solely determined by CgA availability but may instead depend on specific proteolytic processing, clearance rates, or tissue-specific regulation. Bralewska *et al.* [21] similarly reported no correlation between CgA and CST in both control and preeclamptic placentas.

The strong positive correlation between CgA and sFlt-1 in the control group, which was absent in the GH group, represents a novel and potentially important finding. CgA and its derived peptides are involved in cardiovascular homeostasis and have been linked to blood pressure regulation [7], whereas sFlt-1 modulates angiogenic balance and

vascular permeability [27]. The positive correlation, which remained significant after Bonferroni correction for multiple comparisons, suggests that in normal pregnancy these systems may work together to maintain appropriate vascular adaptation and placental function. While CgA and sFlt-1 showed a positive association in the control group, the GH group exhibited a contrasting pattern, with lower CgA and higher sFlt-1 concentrations, although these differences did not reach statistical significance. As shared regulatory pathways between CgA and sFlt-1 remain unknown, this dissociation likely reflects a disruption of a previously synchronized physiological state rather than a direct influence of one marker on the other.

Although diminished CST concentrations have been linked to hypertension, data on the relationship between CST and blood pressure in pregnancy remain limited. Recent studies in nonpregnant populations have shown a negative correlation between CST and blood pressure [33,34], consistent with CST's vasodilatory properties and its proposed protective role against hypertension [35]. However, other studies report opposite findings, indicating a positive correlation between CST and blood pressure [24,36,37]. Our analysis identified positive correlations between CST and both sBP and dBp in the control group only, although these associations did not remain significant after Bonferroni correction for multiple comparisons. Further, larger studies are needed to clarify these inconsistencies in both the published literature and our findings.

#### 4.5 Influence of Fetal Sex

Fetal sex may influence the concentrations of both CgA and CST in preeclamptic placental cells. CST protein concentrations were significantly lower, while *CHGA* gene expression was higher in preeclamptic pregnancies with female fetuses compared with controls [21]. In the general population, healthy female subjects typically exhibit higher CST concentrations than males, which may reflect enhanced CgA processing into CST. On the other hand, males generally have higher plasma CgA concentrations [35]. Our results showed a downward trend in both maternal CgA and CST concentrations in the GH group in pregnancies with female fetuses. However, data on sex-related differences in neuroendocrine markers remain limited.

Fetal sex also appears to influence concentrations of angiogenic markers. Male fetal sex has been associated with lower sFlt-1 concentrations [38]. In our study, no such differences were observed, consistent with Rahman *et al.* [39]. Women carrying male infants exhibit higher PIGF concentrations than those carrying female infants [39,40]. Our results show sex-specific differences in PIGF, with a trend toward higher concentrations in pregnancies with female fetuses within the control group and significantly lower concentrations in the GH group. This opposing pattern suggests that fetal sex may differently modulate mater-

nal angiogenic balance in normal versus pathological pregnancies.

Current evidence suggests that fetal sex influences the maternal immune response, although data remain inconsistent and limited [40–42]. One study indicates that pregnant women carrying a female fetus exhibit greater stimulated cytokine production throughout pregnancy [41], whereas another shows that carrying a male fetus is associated with higher concentrations of inflammatory cytokines during pregnancy, with these differences subsiding postpartum [40]. Our study shows a lower IL-6 concentration in pregnancies with female fetuses, albeit only in the control group. This difference was not maintained in the GH group, suggesting that the systemic inflammation characteristic of GH may override baseline sex-specific immune profiles.

However, given the small subgroup sizes and the exploratory nature of sex-stratified analyses, all findings related to fetal sex should be interpreted with caution. While these findings suggest potentially relevant maternal-fetal interactions, they should be considered preliminary. Larger studies are needed to confirm these patterns before drawing definitive conclusions about how fetal sex influences the biology of hypertensive disorders.

#### 4.6 Limitations

This mechanistic study was designed as a hypothesis-generating investigation to explore potential biomarker interactions in GH. Several limitations should be acknowledged when interpreting these findings. The sample size ( $n = 20$  per group), while sufficient for the primary neuroendocrine endpoints, restricts the statistical power to detect subtle effects in secondary and exploratory analyses. Therefore, findings related to angiogenic and inflammatory markers, biomarker correlations, and sex-stratified analyses should be considered exploratory and hypothesis-generating rather than confirmatory. These observations regarding peripartum biomarker dynamics require external validation in larger, preferably multicenter, and adequately powered cohorts. The timing of postpartum sampling (2 hours after placental expulsion) captures acute peripartum changes but may not reflect longer-term recovery patterns.

## 5. Conclusions

This study demonstrates that the neuroendocrine marker CgA and inflammatory markers (IL-6, CRP) showed consistent peripartum changes, whereas CST concentrations remained stable, regardless of hypertensive status. Although no significant Group  $\times$  Time interactions were detected for any biomarker, the angiogenic marker PIGF showed significantly lower concentrations in GH at both time points, consistent with impaired placental function. The loss of correlation between CgA and sFlt-1 in GH, which was observed in normotensive controls, suggests disrupted synchronization between neuroendocrine and angio-

genic systems. Sex-stratified analyses revealed patterns requiring validation in larger cohorts.

These findings highlight the potential importance of neuroendocrine pathways in the pathophysiology of hypertensive pregnancy disorders. Future research should integrate neuroendocrine regulation into comprehensive models of GH, alongside established angiogenic and inflammatory mechanisms.

## Availability of Data and Materials

The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request and have been publicly deposited in Zenodo (<https://zenodo.org/records/18958924>).

## Author Contributions

AB: Methodology, writing—original draft, writing—review & editing, visualisation; DB: Methodology, writing—original draft, writing—review & editing; ID: Writing—original draft, writing—review & editing, analysis; MČ: Writing—original draft, writing—review & editing, acquisition of data; SS: Writing—original draft, writing—review & editing, acquisition of data; MGR: Writing—original draft, writing—review & editing, analysis, supervision. All authors contributed to editorial changes in the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. All authors have participated sufficiently in the work and agreed to be accountable for all aspects of the work.

## Ethics Approval and Consent to Participate

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The research protocol was approved by the Ethics Committee of Sestre Milosrdnice University Hospital Center (Ethics Approval Number: 003-06/20-03/004), and all of the participants provided signed informed consent.

## Acknowledgment

We would like to thank all the patients who participated in the study as everyone who contributes to making this work possible.

## Funding

The study was carried out on equipment purchased through the grant KK.01.1.1.02-0014 of the European Regional Development Fund.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Declaration of AI and AI-Assisted Technologies in the Writing Process

During the preparation of this work the authors used Grammarly v 1.2 in order to check spell and grammar. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and takes full responsibility for the content of the publication.

## Supplementary Material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.31083/CEOG50841>.

## References






- [1] Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. *Obstetrics and Gynecology*. 2020; 135: e237–e260. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003891>.
- [2] Melamed N, Ray JG, Hladunewich M, Cox B, Kingdom JC. Gestational hypertension and preeclampsia: are they the same disease? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2014; 36: 642–647. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30545-4](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30545-4).
- [3] Yousif D, Bellos I, Penzlin AI, Hijazi MM, Illigens BMW, Pinter A, *et al.* Autonomic Dysfunction in Preeclampsia: A Systematic Review. *Frontiers in Neurology*. 2019; 10: 816. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00816>.
- [4] Pala Ş, Atılgan R, Çim B, Açıkgözoğlu MK, Can MD, Oğlak SC, *et al.* Investigation of Fractalkine and MIP-1 $\beta$  Levels as Markers in Premature Membrane Rupture Cases: A Prospective Cohort Study. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*. 2023; 50: 155. <https://doi.org/10.31083/j.ceog5007155>.
- [5] Lara-Barea A, Sánchez-Lechuga B, Campos-Caro A, Córdoba-Doña JA, de la Varga-Martínez R, Arroba AI, *et al.* Angiogenic Imbalance and Inflammatory Biomarkers in the Prediction of Hypertension as Well as Obstetric and Perinatal Complications in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11: 1514. <https://doi.org/10.3390/jcm11061514>.
- [6] Vanli Tonyali N, Karabay G, Arslan B, Aktemur G, Tokgoz Cakir B, Seyhanli Z, *et al.* Maternal Serum Catestatin Levels in Gestational Diabetes Mellitus: A Potential Biomarker for Risk Assessment and Diagnosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2025; 14: 435. <https://doi.org/10.3390/jcm14020435>.
- [7] Tota B, Angelone T, Cerra MC. The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis. *Frontiers in Chemistry*. 2014; 2: 64. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00064>.
- [8] Maj M, Hernik K, Tyszkiewicz K, Owe-Larsson M, Sztokfisz-Ignasiak A, Malejczyk J, *et al.* A complex role of chromogranin A and its peptides in inflammation, autoimmunity, and infections. *Frontiers in Immunology*. 2025; 16: 1567874. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1567874>.
- [9] Helle KB. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. *Cardiovascular Research*. 2010; 85: 9–16. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp266>.
- [10] Kulpa J, Paduch J, Szczepanik M, Gorący-Rosik A, Rosik J, Tchórz M, *et al.* Catestatin in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26: 2417. <https://doi.org/10.3390/ijms26062417>.
- [11] Cindrova-Davies T, Sanders DA, Burton GJ, Charnock-Jones DS. Soluble FLT1 sensitizes endothelial cells to inflammatory cytokines by antagonizing VEGF receptor-mediated signalling. *Cardiovascular Research*. 2011; 89: 671–679. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp266>.

1093/cvr/cvq346.

- [12] Kim S, Shim S, Kwon J, Ryoo S, Byeon J, Hong J, *et al.* Alleviation of preeclampsia-like symptoms through PIGF and eNOS regulation by hypoxia- and NF- $\kappa$ B-responsive miR-214-3p deletion. *Experimental & Molecular Medicine*. 2024; 56: 1388–1400. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01237-8>.
- [13] Albonici L, Benvenuto M, Focaccetti C, Cifaldi L, Miele MT, Limana F, *et al.* PIGF Immunological Impact during Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 8714. <https://doi.org/10.3390/ijms21228714>.
- [14] Guan X, Fu Y, Liu Y, Cui M, Zhang C, Zhang Q, *et al.* The role of inflammatory biomarkers in the development and progression of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology*. 2023; 14: 1156039. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1156039>.
- [15] Michalczyk M, Celewicz A, Celewicz M, Woźniakowska-Gondek P, Rzepka R. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Mediators of Inflammation*. 2020; 2020: 3864941. <https://doi.org/10.1155/2020/3864941>.
- [16] Saleh L, van den Meiracker AH, Geensen R, Kaya A, Roeters van Lennep JE, Duvekot JJ, *et al.* Soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor kinetics during and after pregnancy in women with suspected or confirmed preeclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2018; 51: 751–757. <https://doi.org/10.1002/uog.17547>.
- [17] Signorelli P, Avagliano L, Reforgiato MR, Toppi N, Casas J, Fabriàs G, *et al.* De novo ceramide synthesis is involved in acute inflammation during labor. *Biological Chemistry*. 2016; 397: 147–155. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0213>.
- [18] Siriwardhana DS, Lanerolle S. Normal value and changes in CRP values on maternal and fetal umbilical cord blood with the labor and intrapartum interventions. *Sri Lanka Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2023; 45: 130–137. <https://doi.org/10.4038/sljog.v45i3.8101>.
- [19] Nicolaides KH, Wright D, Syngelaki A, Wright A, Akolekar R. Fetal Medicine Foundation fetal and neonatal population weight charts. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2018; 52: 44–51. <https://doi.org/10.1002/uog.19073>.
- [20] Florio P, Mezzesimi A, Turchetti V, Severi FM, Ticconi C, Forconi S, *et al.* High levels of human chorionin A in umbilical cord plasma and amniotic fluid at parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002; 9: 32–36. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(01\)00149-6](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(01)00149-6).
- [21] Bralewska M, Biesiada L, Grzesiak M, Rybak-Krzyszowska M, Huras H, Gach A, *et al.* Chromogranin A demonstrates higher expression in preeclamptic placentas than in normal pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2021; 21: 680. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04139-z>.
- [22] Bralewska M, Pietrucha T, Sakowicz A. The Role of Catestatin in Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25: 2461. <https://doi.org/10.3390/ijms25052461>.
- [23] Palmrich P, Schirwani-Hartl N, Haberl C, Haslinger P, Heinzl F, Zeisler H, *et al.* Catestatin-A Potential New Therapeutic Target for Women with Preeclampsia? An Analysis of Maternal Serum Catestatin Levels in Preeclamptic Pregnancies. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12: 5931. <https://doi.org/10.3390/jcm12185931>.
- [24] Tüten N, Güralp O, Gök K, Hamzaoglu K, Oner YO, Makul M, *et al.* Serum catestatin level is increased in women with preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2022; 42: 55–60. <https://doi.org/10.1080/01443615.2021.1873922>.
- [25] Leañós-Miranda A, Méndez-Aguilar F, Ramírez-Valenzuela KL, Serrano-Rodríguez M, Berumen-Lechuga G, Molina-Pérez CJ, *et al.* Circulating angiogenic factors are related to the severity of gestational hypertension and preeclampsia, and their adverse outcomes. *Medicine*. 2017; 96: e6005. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006005>.
- [26] Stepan H, Hund M, Andruczek T. Combining Biomarkers to Predict Pregnancy Complications and Redefine Preeclampsia: The Angiogenic-Placental Syndrome. *Hypertension*. 2020; 75: 918–926. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13763>.
- [27] Verlohren S, Brennecke SP, Galindo A, Karumanchi SA, Mirkovic LB, Schlembach D, *et al.* Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PIGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*. 2022; 27: 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.12.003>.
- [28] Yang H, Guo F, Guo Q, Wang Y, He P, Zhang H, *et al.* The clinical value of PIGF and the sFlt1/PIGF ratio in the management of hypertensive pregnancy disorders: A retrospective real-world study in China. *Clinica Chimica Acta*. 2022; 528: 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.01.021>.
- [29] Lou WZ, Jiang F, Hu J, Chen XX, Song YN, Zhou XY, *et al.* Maternal Serum Angiogenic Factor sFlt-1 to PIGF Ratio in Preeclampsia: A Useful Marker for Differential Diagnosis and Prognosis Evaluation in Chinese Women. *Disease Markers*. 2019; 2019: 6270187. <https://doi.org/10.1155/2019/6270187>.
- [30] Turpin CA, Sakyi SA, Owiredu WKBA, Ephraim RKD, Anto EO. Association between adverse pregnancy outcome and imbalance in angiogenic regulators and oxidative stress biomarkers in gestational hypertension and preeclampsia. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2015; 15: 189. <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0624-y>.
- [31] Szukiewicz D. Fractalkine (Chemokine CX3CL1) Signaling During Placentation and Placental Function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2026; 27: 1172. <https://doi.org/10.3390/ijms27031172>.
- [32] Jarmund AH, Giskeødegård GF, Ryssdal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madssen TS, *et al.* Cytokine Patterns in Maternal Serum From First Trimester to Term and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 752660. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752660>.
- [33] Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, Paradzik M, Bozic J, *et al.* Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents. *Pediatric Diabetes*. 2019; 20: 549–555. <https://doi.org/10.1111/ pedi.12825>.
- [34] Pankova O, Korzh O. Plasma catestatin levels are related to metabolic parameters in patients with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Heart and Vessels*. 2024; 39: 144–159. <https://doi.org/10.1007/s00380-023-02318-w>.
- [35] Fung MM, Salem RM, Mehtani P, Thomas B, Lu CF, Perez B, *et al.* Direct vasoactive effects of the chromogranin A (CHGA) peptide catestatin in humans in vivo. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2010; 32: 278–287. <https://doi.org/10.3109/10641960903265246>.
- [36] Sunjic Lovric Z, Resic Karara J, Mimica B, Kumric M, Supe-Domic D, Santic R, *et al.* Analysis of Circulating Catestatin in Early Pregnancy: A Preliminary Investigation. *Biomedicine*. 2024; 12: 2626. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112626>.
- [37] Kumric M, Vrdoljak J, Dujic G, Supe-Domic D, Ticinovic Kurir T, Dujic Z, *et al.* Serum Catestatin Levels Correlate with Ambulatory Blood Pressure and Indices of Arterial Stiffness in Patients with Primary Hypertension. *Biomolecules*. 2022; 12: 1204. <https://doi.org/10.3390/biom12091204>.
- [38] Andersen LB, Jørgensen JS, Herse F, Andersen MS, Christesen HT, Dechend R. The association between angiogenic markers and fetal sex: Implications for preeclampsia research. *Journal of Reproductive Immunology*. 2016; 117: 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.05.005>.
- [39] Rahman S, Islam MS, Roy AK, Hasan T, Chowdhury NH,

- Ahmed S, *et al.* Maternal serum biomarkers of placental insufficiency at 24-28 weeks of pregnancy in relation to the risk of delivering small-for-gestational-age infant in Sylhet, Bangladesh: a prospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2024; 24: 418. <https://doi.org/10.1186/s12884-024-06588-8>.
- [40] Enninga EAL, Nevala WK, Creedon DJ, Markovic SN, Holtan SG. Fetal sex-based differences in maternal hormones, angiogenic factors, and immune mediators during pregnancy and the postpartum period. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015; 73: 251–262. <https://doi.org/10.1111/aji.12303>.
- [41] Mitchell AM, Palettas M, Christian LM. Fetal sex is associated with maternal stimulated cytokine production, but not serum cytokine levels, in human pregnancy. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017; 60: 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.015>.
- [42] Taylor BD, Ness RB, Klebanoff MA, Tang G, Roberts JM, Hougaard DM, *et al.* The impact of female fetal sex on preeclampsia and the maternal immune milieu. *Pregnancy Hypertension*. 2018; 12: 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.02.009>.

## Investigating preeclampsia risk factors and angiogenic profiles in low-screening area

ADRIANA BOKULIĆ<sup>1,\*</sup>   
DRAŽAN BUTORAC<sup>2</sup>   
IVKA DJAKOVIĆ<sup>3</sup>   
MARIJO ČUKELJ<sup>2</sup>   
MARIJA GRDIĆ RAJKOVIĆ<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Sestre Milosrdnice University  
Hospital Center, Department of  
Clinical Chemistry, 10000 Zagreb  
Croatia

<sup>2</sup> Sestre Milosrdnice University  
Hospital Center, Clinic of  
Gynaecology and Obstetrics  
10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Bethesda Hospital, Clinic for  
Gynaecology, 4052 Basel, Switzerland

<sup>4</sup> University of Zagreb Faculty of  
Pharmacy and Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry  
and Haematology, 10000 Zagreb  
Croatia

Accepted December 9, 2025  
Published online December 10, 2025

### ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a complex pregnancy disorder that may cause adverse outcomes for mother and baby. Combining risk factors with clinical, laboratory, and ultrasonographic data can help identify women at risk. This study investigated the relationship between maternal risk factors, soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), placental growth factor (PlGF), their ratio, and pregnancy outcomes, involving 68 women with PE risk factors and 21 controls. There were no significant differences in the frequency of adverse outcomes (PE, foetal death, and infants with abnormal birth weight), sFlt-1, PlGF, the sFlt-1/PlGF ratio, or birth weight centiles between the PE-risk and control groups. The most frequently recorded high-risk factor was gestational diabetes mellitus, whereas moderate risk was a pre-pregnancy body mass index of over 30 kg m<sup>-2</sup>. The most prominent difference was observed in the subgroups with gestational hypertension and first-time pregnant women as risk factors, with significantly higher sFlt-1/PlGF ratios compared to the control group. Combining multiple risk factors increased the sFlt-1/PlGF ratio compared to both the control group and the group with only one risk factor. The study documented PE risk factors and outcomes at a Croatian hospital where angiogenic markers are not routinely used in screening. Findings highlighted the importance of integrating PE screening into standard practice.

**Keywords:** preeclampsia, risk factors, screening

### INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is a major complication of pregnancy characterised by *de novo* hypertension occurring after 20 weeks of gestation (1). PE affects between 2 and 4 % of pregnancies, resulting in a significant number of adverse maternal outcomes, including maternal hypertension, proteinuria, cerebral oedema and liver dysfunction, and a range of adverse foetal outcomes, including foetal growth restriction, preterm delivery and stillbirth (2). Various studies and clinical practice guidelines have identified multiple maternal

---

\* Correspondence; e-mail: adriana.bokulic@kbcsm.hr

risk factors associated with high and moderate risks of developing preeclampsia, which can be used to identify pregnant women likely to develop PE and take proactive measures. However, guidelines may vary in how they define risk factors. A personal or family history of preeclampsia, hypertension, diabetes mellitus, multifetal pregnancy, chronic kidney disease, autoimmune diseases with potential vascular complications, nulliparity, and obesity are among the most common risk factors associated with a higher risk of developing PE (3–5).

There is currently no treatment for PE, and delivery remains the only intervention that initiates the resolution of this disorder (7). Although there is no cure, screening, predicting, diagnosing, and monitoring the development of PE enable the implementation of preventive clinical management strategies. Current best practice remains the use of preventative therapy, the management of hypertension and other organ manifestations, and the identification of women at risk (7). PE is a complex disorder characterised by poor placental function and maternal endothelial dysfunction, with altered concentrations of angiogenic factors. Biochemical markers, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), and placental growth factor (PlGF), provide the strongest clinical evidence for diagnosing and monitoring hypertensive disorders in pregnancy. Measuring the concentrations of the anti-angiogenic factor sFlt-1 and the pro-angiogenic PlGF can help identify women at an increased risk of developing PE. Prediction of adverse outcomes may be further improved by combining angiogenic markers with other clinical, laboratory, and ultrasonographic data (8).

This study examined the relationship between risk factors for PE, the biochemical markers sFlt-1 and PlGF, and pregnancy outcomes at a tertiary-care hospital centre without general preeclampsia screening.

## EXPERIMENTAL

### *Study design*

The study was carried out on patients visiting the Department of Gynaecology and Obstetrics at Sestre Milosrdnice University Hospital Centre, Zagreb, Croatia. The hospital's Ethics Review Board approved the study. Women with singleton pregnancies were recruited during regular check-ups after the 20th week of pregnancy and who were expected to deliver in our institution. Women were divided into two groups: the PE-risk group and the control group. The inclusion criteria for the PE-risk group were at least one of the high-risk factors: chronic (CH) or gestational hypertension (GH), autoimmune disease (lupus or antiphospholipid syndrome), gestational diabetes mellitus (GDM), renal disease, or a history of PE. Any additional moderate risk factors were recorded, including nulliparity, age 40 years or older, prior placental abruption, prior stillbirth, prior foetal growth restriction, pre-pregnancy obesity (body mass index greater than 30 kg m<sup>-2</sup>), family history of preeclampsia, pregnancy interval of more than 10 years, assisted reproductive technology (ART), and thrombophilia. The inclusion criteria for the control group were the absence of any high- or moderate-risk factors. The choice of inclusion criteria was defined as the most suitable for our local clinical practice, while keeping in mind the most frequent risk factors outlined in the international guidelines.

### *Recorded and measured data*

For both groups, we recorded basic features (maternal age, blood pressure, pre-pregnancy body mass index (BMI), pregnancy weight gain and smoking) and additional information about pregnancy (gestational week, number of previous pregnancies and births). We recorded gestational age at birth, mode of delivery, birth weight and length, calculated centile (according to Nicolaides *et al.*), sex of the newborn and adverse outcomes (PE, foetal death, birth weight  $\leq 5^{\text{th}}$  and  $\geq 95^{\text{th}}$  percentile) (9). A blood sample was taken to measure the concentration of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio. Samples were collected in a fasting state by venipuncture into test tubes containing clot activator (4 mL Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Austria). After clotting, the blood samples were centrifuged at  $2200 \times g$  for 10 minutes. Measurements were carried out on a Roche cobas e801 analyser (Roche Diagnostics GmbH, Germany) using an electrochemiluminescent immunoassay with dedicated Roche Elecsys sFlt-1 and PlGF reagent kits. As the concentrations of sFlt-1 and PlGF change during pregnancy, and the study involved sampling from various stages, to compare concentrations of sFlt-1, PlGF, and the sFlt-1/PlGF ratio, each result was transformed to a multiple of the median (MoM) by dividing each patient's result by the median of the population result according to Verlohren *et al.* (10). The median values published by Verlohren *et al.* are based on samples from multiple European perinatal centres and were analysed using a Roche electrochemiluminescent immunoassay (10).

### *Definitions*

The diagnosis of GDM was based on the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group criteria, as any glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy (11). GH and PE were defined according to the American College of Obstetricians and Gynaecologists criteria (3). GH was defined as systolic pressure  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic pressure  $\geq 90$  mmHg on two separate occasions at least 4 hours apart after 20 weeks of gestation in a woman with previously normal blood pressure. PE was defined as GH with proteinuria or GH without proteinuria, accompanied by organ dysfunction. If hypertension was recognised before pregnancy or before the 20th week of gestation, it was classified as chronic hypertension.

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using MedCalc software (MedCalc Software Ltd., Belgium). Nonparametric tests were employed due to the small sample size. For comparisons of quantitative variables between two groups, the Mann-Whitney U test was used. When multiple comparisons on the same dataset were made, Bonferroni correction was applied, and the adjusted significance level was set at  $p < 0.05/n$ , where  $n$  indicates the number of comparisons. Results are presented as medians with interquartile ranges in brackets. For comparisons of categorical variables between two groups, Fisher's exact test was utilised. Results are expressed as frequencies with percentages in brackets. For comparisons among three groups, the Kruskal-Wallis test was used. If the overall  $p$ -value was  $< 0.05$ , post hoc pairwise comparisons were carried out using the Conover test. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant for all tests.

## RESULTS AND DISCUSSION

The study included 21 pregnant women in the control group and 68 in the PE-risk group. Maternal and neonatal characteristics for both groups are presented in Table I. The most common high-risk factors were GDM ( $n = 46$ ), followed by GH ( $n = 25$ ), a personal history of PE ( $n = 8$ ), and autoimmune disease (antiphospholipid syndrome) ( $n = 1$ ). None had renal disease or chronic hypertension. The majority of subjects (57/68) had only one high-risk factor, while 11 had two or more. The most common moderate risk factor was pre-pregnancy BMI  $\geq 30$  kg m<sup>-2</sup> ( $n = 20$ ), nulliparity ( $n = 10$ ), age  $\geq 40$  years ( $n = 7$ ), pregnancy interval  $\geq 10$  years ( $n = 5$ ), thrombophilia ( $n = 4$ ), ART ( $n = 3$ ), prior stillbirth ( $n = 2$ ) and prior foetal growth restriction ( $n = 1$ ). None had a family history of PE or a previous history of placental abruption. Around half of patients (33/68) had no moderate risk factors, 22 had 1, and 13 had 2 or more. Recorded high-risk factors included GH (4/6), previous PE (2/6), and GDM (2/6), along with moderate-risk factors nulliparity (3/6) and high BMI (3/6).

PE was diagnosed in 6/68 women, with one pregnancy ending with foetal death. There was no PE or foetal death in the control group. Small gestational-age infants (birth

Table I. Maternal and neonatal characteristics for the control and PE-risk group

	Control group ( $n = 21$ )	PE-risk group ( $n = 68$ )	<i>p</i> -value
Maternal characteristics			
Age (years)	33 (29–36)	33 (30–37)	0.877
Prepregnancy BMI (kg m <sup>-2</sup> )	22.1 (20.7–24.1)	26.9 (22.9.0–30.3)	< 0.001
Pregnancy weight gain (kg)	13 (10–15)	11 (8–15)	0.129
sBP (mmHg)	110 (110–116)	120 (110–130)	0.014
dBp (mmHg)	70 (60–70)	73 (70–80)	0.032
Smoking, number	1 (5 %)	8 (12 %)	0.680
Induced labour	9 (43 %)	41 (60 %)	0.210
Epidural anaesthesia	7 (33 %)	21 (31 %)	1.000
Caesarean delivery	1 (5 %)	13 (19 %)	0.173
Neonatal characteristics			
Gestation week at delivery	40 (39–41)	39 (38–39)	0.004
Preterm delivery < 37	1 (5 %)	2 (3 %)	0.559
Sex, male	12 (57 %)	27 (40 %)	0.210
Birth weight (g)	3800 (3460–4075)	3420 (3170–3763)	0.010
Birth length (cm)	51 (50–52)	50 (48–51)	0.003

The values presented as median (interquartile range) were analysed using the Mann-Whitney U test, and the values shown as number (percentage) were analysed with Fisher's exact test. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . PE, preeclampsia; BMI, body mass index; sBP, systolic blood pressure; dBp, diastolic blood pressure.

weight  $\leq$  5th percentile) were born in two deliveries in the PE-risk group, whereas none were born in the control group. Macrosomia (defined as birth weight  $\geq$  95<sup>th</sup> percentile) was recorded in 5 cases in the PE-risk group and 3 in the control group. However, Fisher's exact test showed no statistically significant differences in the frequency of adverse outcomes, including PE, foetal death, and birth weight  $\leq$  5<sup>th</sup> and  $\geq$  95<sup>th</sup> percentile between the control and total PE-risk group.

The median gestation week for blood sampling was 40 for the control group and 39 for the PE-risk group, with interquartile ranges of 39–41 and 34–39, respectively. There were no statistically significant differences between the control and total PE-risk groups in sFlt-1 MoM, PlGF MoM, sFlt-1/PlGF ratio MoM and birth weight centiles. Since the PE-risk group is heterogeneous, we investigated whether there are differences in sFlt-1 MoM, PlGF MoM, sFlt-1/PlGF ratio MoM, and birth weight centiles for each risk factor individually. Due to the multiple comparisons ( $n = 10$ ), the Bonferroni correction was applied, and  $p$ -values  $< 0.005$  were considered statistically significant ( $0.05/10$ ). The results are shown in Table II.

Additionally, all patients were divided into three groups based on the number of high-risk factors: group 0 (control group,  $n = 21$ ), group 1 (one high-risk factor,  $n = 57$ ), and group 2 (two or more high-risk factors,  $n = 11$ ). The Kruskal-Wallis test showed no differences between these groups in sFlt-1 MoM ( $p = 0.196$ ) and birth weight centiles ( $p = 0.214$ ). However, there were statistically significant differences between groups for PlGF MoM ( $p = 0.007$ ) and sFlt-1/PlGF ratio MoM ( $p = 0.024$ ), with post-hoc analysis showing differences between both group 0 and 1 compared to group 2. Box-plot diagrams are presented in Fig. 1.

### Main findings

This study gives an overview of the most common risk factors for PE in a tertiary-care hospital centre and their relationship to sFlt-1 and PlGF concentrations and pregnancy outcomes. Overall, the PE-risk group showed no differences in sFlt-1 MoM, PlGF MoM, sFlt-1/PlGF ratio MoM and birth weight centile of the newborns. However, differences were notable in several PE subgroups based on risk factors, with the most significant differences in groups with GH and nulliparity as risk factors.

### Influence of high-risk factors on sFlt-1 PlGF and ratio

Both GDM and PE are characterised by endothelial dysfunction, and women with GDM are at higher risk of developing PE. Nuzzo *et al.* found slightly lower concentrations of both sFlt-1 and PlGF in GDM compared to healthy pregnant women, but with no statistically significant difference in concentration or their ratio (12). Researchers found that the ratio of sFlt-1/PlGF in women with PE was significantly higher compared to the group with PE in the background of GDM (GDM-PE). They hypothesised that sFlt-1 overproduction in GDM-PE patients increases the risk of preeclampsia, but due to a less pronounced decrease in PlGF, it resulted in less severe endothelial dysfunction and a lower sFlt-1/PlGF ratio compared to the PE group. Like Nuzzo *et al.*, we found no difference in ratio when comparing the GDM and control groups ( $0.71$  vs.  $0.77$ ). As our study recorded only 2 out of 6 women who developed PE in a background of GDM, the data were too limited to analyse potential differences between PE and GDM-PE groups.

Table II. Comparison of the control group with total and individual PE-risk groups

	<i>n</i>	sFlt-1 MoM	PlGF MoM	sFlt-1/PlGF ratio MoM	Birth weight centile
Control	21	0.87 (0.70–1.11)	1.07 (0.84–2.03)	0.77 (0.26–1.27)	78 (63–90)
Control vs. total PE-risk group					
Total PE-risk	68	0.78 (0.54–1.26)	0.79 (0.51–1.80)	0.93 (0.32–2.05)	64 (33–85) <sup>a</sup>
		<i>p</i> = 0.575	<i>p</i> = 0.091	<i>p</i> = 0.320	<i>p</i> = 0.080
Control vs. PE-risk group with high risk factors					
GDM	46	0.70 (0.50–1.18)	1.09 (0.55–2.27)	0.71 (0.26–1.62)	65 (34–90) <sup>a</sup>
		<i>p</i> = 0.152	<i>p</i> = 0.552	<i>p</i> = 0.957	<i>p</i> = 0.218
GH	25	1.13 (0.84–1.51)	0.54 (0.36–0.78)	1.75 (1.03–3.63)	58 (31–77) <sup>a</sup>
		<i>p</i> = 0.086	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> = 0.001	<i>p</i> = 0.029
Previous PE	8	0.81 (0.69–1.06)	0.76 (0.51–0.90)	1.18 (0.77–2.04)	63 (52–80)
		<i>p</i> = 0.661	<i>p</i> = 0.019	<i>p</i> = 0.143	<i>p</i> = 0.272
Control vs. PE-risk group with moderate risk factors					
BMI ≥ 30 kg m <sup>-2</sup>	20	1.00 (0.61–1.48)	0.47 (0.35–0.77)	2.05 (0.75–3.68)	72 (36–88)
		<i>p</i> = 0.676	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> = 0.011	<i>p</i> = 0.489
Nulliparity	10	1.53 (1.13–1.79)	0.43 (0.30–0.52)	3.01 (2.06–4.70)	45 (20–70) <sup>a</sup>
		<i>p</i> = 0.002	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> = 0.024
Age ≥ 40 y	7	0.90 (0.42–1.20)	0.76 (0.62–1.30)	0.81 (0.52–1.60)	83 (47–87)
		<i>p</i> = 0.770	<i>p</i> = 0.185	<i>p</i> = 0.614	<i>p</i> = 0.937
Interval ≥ 10 y	5	0.80 (0.64–1.29)	0.78 (0.31–1.86)	0.86 (0.42–3.19)	70 (48–90)
		<i>p</i> = 0.820	<i>p</i> = 0.346	<i>p</i> = 0.537	<i>p</i> = 0.754
Thrombophilia	4	0.58 (0.44–1.24)	1.12 (0.98–1.30)	0.51 (0.33–1.29)	36 (17–57)
		<i>p</i> = 0.182	<i>p</i> = 1.00	<i>p</i> = 0.824	<i>p</i> = 0.024
ART	3	1.17 (0.88–1.26)	0.46 (0.41–0.51)	2.30 (2.10–2.30)	73 (26–84)
		<i>p</i> = 0.206	<i>p</i> = 0.013	<i>p</i> = 0.033	<i>p</i> = 0.432

Each *p*-value represents a comparison between the control group and the PE-risk groups: total PE-risk group, high-risk PE groups (GDM, GH, and previous PE), and moderate-risk PE groups (BMI ≥ 30, nulliparity, age ≥ 40 years, between-interval pregnancy ≥ 10 years, thrombophilia, and ART).

The values are presented as median (interquartile range Q1–Q3) and tested using the Mann-Whitney U-test. Due to the small sample size, ART data are presented as medians (with minimum and maximum values). Due to the multiple comparisons (*n* = 10), the Bonferroni correction was applied, and *p*-values < 0.005 were considered statistically significant (0.05/10).

<sup>a</sup> Number of data for the birth weight centile is adjusted for one pregnancy with foetal death as an outcome. PE, preeclampsia; GDM, gestational diabetes mellitus; GH, gestational hypertension; BMI, body mass index; ART, assisted reproductive technology; MoM, multiple of the median; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; PlGF, placental growth factor

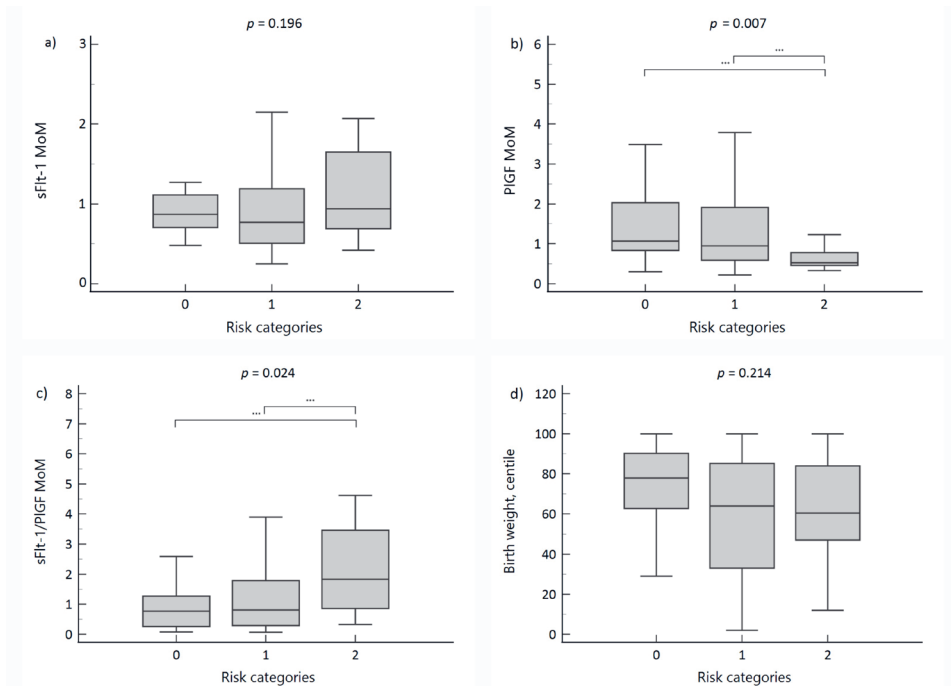


Fig. 1. Differences between risk groups. Box and whiskers plot comparing: a) sFlt-1MoM; b) PlGF MoM; c) sFlt-1/PlGF MoM and d) birth weight centile among different risk groups: group 0 (control group), group 1 (one high-risk factor), and group 2 ( $\geq$  two high-risk factors). Results were compared using the Kruskal-Wallis test followed by Conover post-hoc analyses, with statistically significant differences marked with an asterisk (\*\*\*). MoM, multiple of the median; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; PlGF, placental growth factor.

GH is a key factor and criteria in preeclampsia. GH was defined as a high-risk factor when recruiting women for the study, although there is no quality evidence to confirm that GH is a risk factor for PE (13). On the other hand, chronic hypertension is strongly associated with a high risk of developing PE factor, but no women with CHT were included in the study (14). GH and concordantly higher sFlt-1/PlGF ratio were a result of PE pathophysiology, rather than a cause of it. In our study, women with GH had a higher sFlt-1/PlGF ratio, resulting from increased sFlt-1 and decreased PlGF concentrations.

PE during the first pregnancy increases the risk of developing PE in the second pregnancy by 7 times (15). After nulliparity and high pre-pregnancy BMI, prior PE is the third most common risk factor with an attributable fraction of 22.8 % (16). The studied group with a history of PE showed a higher sFlt-1/PlGF ratio due to lower PlGF MoM than the control group, but these differences were not statistically significant after Bonferroni correction.

#### *Influence of moderate risk factors on sFlt-1, PlGF and ratio*

Obesity is defined as a BMI  $\geq 30 \text{ kg m}^{-2}$  and it has been on the rise over the past several years in pregnant women. Maternal obesity increases the risk of preeclampsia by three to

four times when compared to normal-weight mothers (17). Weight gain during pregnancy has also been linked to PE, and the combined effect of maternal obesity and gestational weight gain further heightens the risk (18). High sFlt-1/PIGF ratio in the second trimester occurred 3 times more frequently in pregnant obese women than in pregnant women with normal weight (19). As high prepregnancy BMI was one of the inclusion criteria, it is not surprising that the total PE-risk group had a higher BMI compared to the control group (26.9 *vs.* 22.1 kg m<sup>-2</sup>), but there was no difference in gestational weight gain (11 *vs.* 13 kg). The sFlt-1/PIGF ratio was 3 times higher in the obese women subgroup due to a decrease in PIGF rather than an increase in sFlt-1 concentration. These results are in line with those of Beck *et al.*, who demonstrated that ratios above 38 were attributed to a lower-than-expected PIGF concentration. However, they are opposite to those of Karge *et al.*, who found only a lower sFlt-1 concentration in obese women (19, 20).

First-time pregnant women are the largest population with attributable risk factors for preeclampsia. Researchers are proposing a link to immunological interactions related to minimal exposure to paternal antigen prior to conception. Preeclampsia was diagnosed more often in nulliparous women than in women with subsequent pregnancies (21). It is suggested that the maternal immune response and adaptations to pregnancy may differ in nulliparous women compared to multiparous women (22). Besides nulliparity, each pregnancy with a different partner is considered a risk factor, which supports the theory of an immunological mechanism of PE development. Nulliparous women in our study had significantly higher sFlt-1/PIGF ratios (3.45 *vs.* 0.77), similar to previously published studies (23). The nulliparity group had the highest sFlt-1 (1.53) and lowest PIGF MoM (0.43) of all risk factors included in this study. Also, 3 of 6 women who developed PE in this study were nulliparous. Although nulliparity was considered a moderate risk factor, the findings demonstrate that it significantly influences the sFlt-1/PIGF ratio and may contribute to adverse pregnancy outcomes.

ART increases the incidence of obstetric problems compared to spontaneously conceived pregnancies. Since the *in vitro* fertilisation (IVF) procedure frequently leads to pregnancies with corpus luteum defect, women who conceive by IVF may have pathophysiological changes in the placenta. Compared to spontaneous pregnancies, IVF-conceived pregnancies had higher levels of sFlt-1 and lower levels of PIGF in the second and third trimesters (24). We only had three pregnancies conceived with ART, with a higher ratio compared to the control group, but with no statistically significant differences. Pregnancies at advanced maternal age (> 35) and very advanced maternal age (> 40) have become more prevalent over the last few decades. The mechanism by which maternal age contributes to an increased risk of preeclampsia is not fully understood, but it is independent of maternal comorbidities. Although advanced maternal age and IVF are independent risk factors for PE, they are often found together as advancements in assisted reproductive technologies have contributed to an increase in the incidence of advanced maternal age. Our study found no difference in sFlt-1 and the sFlt-1/PIGF ratio, with a slight decrease in PIGF MoM in pregnant women over 40.

Only two guidelines listed thrombophilia as a risk factor (25), and it is considered a moderate risk factor for PE, although the quality of evidence for this is low (13). In our study, there were no significant differences in MoM values between the control group and women with thrombophilia. However, this may be due to the study's low prevalence of thrombophilia.

### *Influence of high and moderate risk factors on birth weight centile*

Birth weight is an important indicator of the nutrition and growth progress of the fetus during pregnancy. Poor or overnutrition can lead to small (SGA) or large infants for gestational age. Although PE is associated with SGA, we found no difference in frequency between the total PE-risk and the control group. However, we recorded more cases of macrosomia, but this outcome is probably due to the high number of pregnancies with gestational diabetes and obesity as risk factors. The whole PE-risk group had lower birth weight than the control group: 3420 *vs.* 3800 g and 64th *vs.* 78th birth weight centiles. Although not statistically significant, all risk factor groups, except women over 40, showed lower birth weight centiles than the control group, with more pronounced differences in subgroups with GH (58th percentile), nulliparity (45th percentile), and thrombophilia (36th percentile). Interestingly, pregnant women in the small risk group with thrombophilia ( $n = 4$ ) delivered infants with the most considerable difference compared to the control group (36th *vs.* 78th).

### *Multiple risk factors*

Multiple maternal risk factors can have a synergistic effect on sFlt-1 and PlGF concentrations, increasing sFlt-1/PlGF ratio and the risk for developing PE (26). Our data showed that women with multiple risk factors had a higher sFlt-1/PlGF ratio than both the control group and the group with only one risk factor, confirming that multiple risk factors strongly influence the sFlt-1/PlGF ratio. The higher ratio was primarily due to a significantly lower PlGF MoM, while there was no difference in sFlt-1 MoM between the groups.

## CONCLUSIONS

As PE is a major pregnancy disorder with possible adverse outcomes for both the mother and baby, recognising women at risk is crucial for timely detection and treatment. This study recorded PE risk factors in conjunction with angiogenic markers and pregnancy outcomes in a Croatian hospital centre. Although the studied group was not large, the results confirmed previous studies and emphasised the need to introduce PE screening into routine practice.

*Ethical approval.* – Ethical approval for this study was obtained from the Ethics Committee of Sestre Milosrdnice University Hospital Centre. Participants were free to decline participation at any point during the study. Data were collected and stored under specific codes, with guarantees of anonymity and confidentiality. All procedures were conducted in accordance with relevant guidelines and regulations.

*Consent to participate.* – Informed consent for participation was obtained from all subjects before data collection.

*Availability of data and materials.* – The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

*Conflict of interest.* – The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial relationships that could be perceived as a potential conflict of interest.

*Funding.* – This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

*Authors contributions.* – Conceptualisation, A.B; methodology, A.B. and D.B; analysis, A.B. and M.G.R; writing, original draft, A.B., M.Č., and I.D.; writing, review and editing, D.B. and M.G.R; supervision, D.B. and M.G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## REFERENCES

1. B. Sibai, G. Dekker and M. Kupferminc, Pre-eclampsia, *The Lancet* **365**(9461) (2005) 785–799; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17987-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2)
2. L. C. Poon, A. Shennan, J. A. Hyett, A. Kapur, E. Hadar, H. Divakar, F. McAuliffe, F. Silva Costa, P. Dadelszen, H. D. McIntyre, A. B. Kihara, G. C. Di Renzo, R. Romero, M. D’Alton, V. Berghella, K. H. Nicolaides and M. Hod, The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention, *Int. J. Gynecol. Obstet.* **145**(S1) (2019) 1–33; <https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>
3. Gestational Hypertension and Preeclampsia ACOG Practice Bulletin, Number 222, *Obstet. Gynecol.* **135**(6) (2020) e237–e260; <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003891>
4. National Guideline Alliance (Great Britain), Hypertension in pregnancy: Diagnosis and management, NICE Guideline 2023; <https://doi.org/www.nice.org.uk/guidance/ng133>.
5. L. A. Magee, M. A. Brown, D. R. Hall, S. Gupte, A. Hennessy, S. A. Karumanchi, L. C. Kenny, F. McCarthy, J. Myers, L. C. Poon, S. Rana, S. Saito, A. C. Staff, E. Tsigas and P. von Dadelszen, The 2021 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy classification, diagnosis & management recommendations for international practice, *Pregnancy Hypertension* **27** (2022) 148–169; <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2021.09.008>
6. E. Dimitriadis, D. L. Rolnik, W. Zhou, G. Estrada-Gutierrez, K. Koga, R. P. V. Francisco, C. Whitehead, J. Hyett, F. Da Silva Costa, K. Nicolaides and E. Menkhorst, Pre-eclampsia, *Nat. Rev. Dis. Primers* **9**(1) (2023) Article ID 8 (22 pages); <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00417-6>
7. C. W. Ives, R. Sinkey, I. Rajapreyar, A. T. N. Tita and S. Oparil, Preeclampsia – pathophysiology and clinical presentations, *J. Am. College Cardiol.* **76**(14) (2020) 1690–1702; <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014>
8. H. Stepan, M. Hund and T. Andrzejczak, Combining biomarkers to predict pregnancy complications and redefine preeclampsia: The angiogenic-placental syndrome, *Hypertension* **75**(4) (2020) 918–926; <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13763>
9. K. H. Nicolaides, D. Wright, A. Syngelaki, A. Wright and R. Akolekar, Fetal Medicine Foundation fetal and neonatal population weight charts, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **52**(1) (2018) 44–51; <https://doi.org/10.1002/uog.19073>
10. S. Verlohren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk and H. Stepan, New gestational phase-specific cut-off values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/Placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia, *Hypertension* **63**(2) (2014) 346–352; <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>
11. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy, *Diabetes Care* **33**(3) (2010) 676–682; <https://doi.org/10.2337/dc09-1848>
12. A. M. Nuzzo, D. Giuffrida, L. Moretti, P. Re, G. Grassi, G. Menato and A. Rolfo, Placental and maternal sFlt1/PlGF expression in gestational diabetes mellitus, *Sci. Rep.* **11**(1) (2021) Article ID 2312 (10 pages); <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81785-5>

13. T. Elawad, G. Scott, J. N. Bone, H. Elwell, C. E. Lopez, V. Filippi, M. Green, A. Khalil, M. W. Kinshella, H. D. Mistry, K. Pickerill, R. Shanmugam, J. Singer, R. Townsend, E. Z. Tsigas, M. Vidler, M. L. Volvert, P. von Dadelszen and L. A. Magee, Risk factors for pre-eclampsia in clinical practice guidelines: Comparison with the evidence, *BJOG* (2022) 46–62; <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17320>
14. R. Townsend, A. Khalil, Y. Premakumar, J. Allotey, K. I. E. Snell, C. Chan, L. C. Chappell, R. Hooper, M. Green, B. W. Mol, B. Thilaganathan, S. Thangaratinam, and on behalf of the IPPIC Network, Prediction of pre-eclampsia: Review of reviews, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **54**(1) (2019) 16–27; <https://doi.org/10.1002/uog.20117>
15. K. Duckitt and D. Harrington, Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies, *BMJ* **330**(7491) (2005) Article ID 565 (7 pages); <https://doi.org/10.1136/bmj.38380.674340.E0>
16. E. Bartsch, K. E. Medcalf, A. L. Park and J. G. Ray, Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies, *BMJ* (2016) Article ID i1753 (10 pages); <https://doi.org/10.1136/bmj.i1753>
17. T. Abraham and A. M. P. Romani, The relationship between obesity and pre-eclampsia: Incidental risks and identification of potential biomarkers for pre-eclampsia, *Cells* **11**(9) (2022) Article ID 1548 (24 pages); <https://doi.org/10.3390/cells11091548>
18. X. Gong, J. Li, Y. Jiang, P. Yuan, L. Chen, Y. Yang, Y. Li, M. Sun, Y. Zhao, H. Shi and Y. Wei, Risk of preeclampsia by gestational weight gain in women with varied prepregnancy BMI: A retrospective cohort study, *Front. Endocrinol.* **13** (2022) Article ID 967102 (9 pages); <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.967102>
19. C. Beck, A. Allshouse, R. M. Silver, W. A. Grobman, H. Simhan, D. Haas, U. M. Reddy and N. R. Blue, High early pregnancy body mass index is associated with alterations in first- and second-trimester angiogenic biomarkers, *Am. J. Obstet. Gynecol. MFM* **4**(3) (2022) Article ID 100614 (10 pages); <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2022.100614>
20. A. Karge, L. Desing, B. Haller, J. U. Ortiz, S. M. Lobmaier, B. Kuschel and O. Graupner, Performance of sFlt-1/PIGF ratio for the prediction of perinatal outcome in obese pre-eclamptic women, *JCM* **11**(11) (2022) Article ID 3023 (13 pages); <https://doi.org/10.3390/jcm11113023>
21. G. Dekker and B. Sibai, Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia, *The Lancet* **357**(9251) (2001) 209–215; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03599-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03599-6)
22. R. Skjærven, A. J. Wilcox and R. T. Lie, The interval between pregnancies and the risk of pre-eclampsia, *N. Engl. J. Med.* **346**(1) (2002) 33–38; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011379>
23. Y. Bdolah, U. Elchalal, S. Natanson-Yaron, H. Yechiam, T. Bdolah-Abram, C. Greenfield, D. Goldman-Wohl, A. Milwidsky, S. Rana, S. A. Karumanchi, S. Yagel and D. Hochner-Celnikier, Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1, *Hypertension in Pregnancy* **33**(2) (2014) 250–259; <https://doi.org/10.3109/10641955.2013.858745>
24. M. S. Lee, D. Cantonwine, S. E. Little, T. F. McElrath, S. I. Parry, K.-H. Lim and L. E. Wilkins-Haug, Angiogenic markers in pregnancies conceived through in vitro fertilization, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **213**(2) (2015) 212.e1-212.e8; <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.03.032>
25. G. Scott, T. E. Gillon, A. Pels, P. Von Dadelszen and L. A. Magee, Guidelines – similarities and dissimilarities: A systematic review of international clinical practice guidelines for pregnancy hypertension, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **226**(2) (2022) S1222–S1236; <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.08.018>
26. G. Chen, Y. Chen, Y. Shi, Z. Mao, J. Lou and J. Ma, A dynamic prediction model for preeclampsia using the sFlt-1/PLGF ratio combined with multiple factors, *BMC Pregnancy Childbirth* **24**(1) (2024) Article ID 443 (10 pages); <https://doi.org/10.1186/s12884-024-06627-4>

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

## KONCENTRACIJA KROMOGRANINA A I KATESTATINA TIJEKOM VAGINALNOG POROĐAJA U TRUDNICA S GESTACIJSKOM HIPERTENZIJOM

**Adriana Bokulić**

Hipertenzivni poremećaji trudnoće predstavljaju značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta majki i novorođenčadi. Kromogranin A je neuroendokrini protein koji proteolitičkim cijepanjem stvara brojne aktivne peptide, uključujući katestatin, koji inhibira oslobađanje katekolamina i pokazuje vazodilatacijska svojstva. Cilj je bio istražiti dinamiku promjena koncentracija kromogranina A i katestatina tijekom porođaja, moguće razlike u koncentracijama kod gestacijske hipertenzije te njihovu povezanost s ishodima trudnoće budući da kromogranin A i katestatin pokazuju dijagnostički potencijal u hipertenzivnim poremećajima trudnoće. Ovo prospektivno istraživanje provedeno je na Zavodu za porodništvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Uključivala je 40 trudnica: 20 s gestacijskom hipertenzijom liječenih metildopom i 20 zdravih kontrola. Uzorci krvi uzeti su prije (prije početka trudova) i poslije (2 sata nakon) porođaja. U točki prije porođaja izmjerene su koncentracije općih biokemijskih i endokrinoloških parametara. U obje vremenske točke izmjerene su koncentracije kromogranina A i katestatina. Zabilježene su kliničke i antropometrijske karakteristike trudnice i novorođenčadi. Koncentracija kromogranina A značajno se smanjila nakon porođaja u obje skupine, dok koncentracije katestatina nisu pokazale statistički značajnu promjenu. Nisu pronađene razlike u koncentracijama kromogranina A i katestatina između skupina u točkama ni prije ni poslije porođaja. Kod trudnica s fetusima ženskog spola izmjerene su niže koncentracije katestatina u skupini s gestacijskom hipertenzijom. Nije pronađena povezanost s Apgarovim indeksom niti percentilima porođajne mase novorođenčadi. Samo u kontrolnoj skupini koncentracija katestatina bila je povezana s vrijednostima krvnog tlaka. Regresijska analiza pokazala je da indeks tjelesne mase predstavlja najvažniji prediktor gestacijske hipertenzije i povišenog krvnog tlaka, dok kromogranin A i katestatin nemaju kliničku vrijednost. Rezultati ovog istraživanja upućuju da kromogranin A i katestatin trenutačno nemaju kliničku vrijednost u predviđaju gestacijske hipertenzije. Indeks tjelesne mase ostaje ključni prediktor, naglašavajući važnost savjetovanja o tjelesnoj masi prije i tijekom trudnoće.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 85 stranica, 5 grafičkih prikaza, 9 tablica i 146 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kromogranin A, katestatin, gestacijska hipertenzija, trudnoća

Mentori: **Dr.sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Dr.sc. Dražan Butorac**, docent Sveučilišta u Rijeci Medicinskog fakulteta

Ocjenjivači: Dr. sc. Ime i Prezime, docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ime i Prezime, docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ime i Prezime, docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### CONCENTRATION OF CHROMOGRANIN A AND CATESTATIN DURING VAGINAL DELIVERY IN WOMEN WITH GESTATIONAL HYPERTENSION

**Adriana Bokulić**

Hypertensive disorders in pregnancy represent a significant cause of maternal and neonatal morbidity and mortality. Chromogranin A is a neuroendocrine protein that is proteolytically cleaved into multiple bioactive peptides, including catestatin, which inhibits catecholamine release and exhibits vasodilatory properties. The aim was to investigate the dynamics of changes in chromogranin A and catestatin concentrations during delivery, potential differences in their concentrations in gestational hypertension, and their association with pregnancy outcomes, given that chromogranin A and catestatin have shown diagnostic potential in hypertensive disorders in pregnancy. This prospective study was conducted at the Department of Obstetrics, University Hospital Centre Sestre milosrdnice. It included 40 pregnant women: 20 with gestational hypertension treated with methyldopa and 20 healthy controls. Blood samples were collected before (prior to the onset of labour) and after (2 hours following) delivery. Concentrations of general biochemical and endocrinological parameters were measured before delivery. Chromogranin A and catestatin concentrations were measured at both time points. Clinical and anthropometric characteristics of the pregnant women and newborns were recorded. Chromogranin A concentrations significantly decreased after delivery in both groups, whereas catestatin concentrations showed no statistically significant change. No differences in chromogranin A or catestatin concentrations were found between the groups at either time point, before or after delivery. In women carrying female fetuses, lower catestatin concentrations were observed in the gestational hypertension group. No association was found with the Apgar score or birth weight percentiles. Catestatin concentrations were associated with blood pressure values only in the control group. Regression analysis showed that body mass index was the strongest predictor of gestational hypertension and elevated blood pressure, while chromogranin A and catestatin had no clinical value. The results of this study suggest that chromogranin A and catestatin currently have no clinical value in predicting gestational hypertension. Body mass index remains the key predictor, highlighting the importance of weight counselling before and during pregnancy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 85 pages, 5 figures, 9 tables and 146 references. Original is in Croatian language.

Keywords: chromogranin A, catestatin, gestational hypertension, pregnancy

Mentors: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dražan Butorac, Ph.D.** Assistant Professor, The Faculty of Medicine of the University of Rijeka

Reviewers: Ime i Prezime, Ph.D. /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Ime i Prezime, Ph.D. /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Ime i Prezime, Ph.D. /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: