

## DIAGNOSE AV PREEKLAMPSI

### Oppfinnelsens gyldighetsområde

Den foreliggende oppfinnelsen dreier seg om biomarkører for preeklampsi.

- 5 Nærmere bestemt dreier oppfinnelsen seg om framgangsmåter for å påvise eller bidra til å påvise av preeklampsi hos et drektig hunnpattedyr ved å registrere forhøyet konsentrasjon av bestemte forbindelser. Dette legger til rette for og muliggjør tidlig diagnose og klinisk intervensjon ved funn av preeklamtisk lidelse.

### 10 Bakgrunnen for oppfinnelsen

- Preeklampsi (PE), proteinurisk hypertensjon under svangerskap (svangerskapsforgiftning), er en komplikasjon ved 3–7 % av alle svangerskap, og kan beskrives som en multisystemisk maternell sykdom. Årlig rapporteres det 8 500 000 tilfeller globalt, deriblant 5000 i Sverige. Den er i dag den vanligste dødsårsaken for både  
15 mor og barn under svangerskapet.

- PE har vært omtalt som teorienes sykdom [Roberts, 2001] og ble beskrevet så tidlig som for 3000 år siden av de gamle egypterne [Stevens, 1975]. PE er ennå en av de dominerende obstetriske komplikasjonene som fører til  
20 perinatal og maternell morbiditet og dødelighet. De kliniske manifestasjonene, altså høyt blodtrykk og proteinuri, opptrer fra og med 20. uke av svangerskapet, men de underliggende mekanismene kan begynne så tidlig som implanterings-  
tidspunktet. Etter hvert som sykdommen skrider fram, kan angiospasmer i hjernen og hjerneødem føre til alvorlige epileptiske anfall – eklampsi [Lipstein et al., 2003].

25

Etiologien for PE er ennå ukjent, men nyere data tyder på at sykdommen utvikler seg i to stadier:

1. stadium. Under morkakedanningen er det påvist defekt invasjon av morkakecellene, trofoblastene, i muskellagene til spiralarteriene [Brosens et al.,  
30 2002; Page, 1939]. Det er stadig mer belegg for at oksidativt stress (se nedenfor) forverrer blodårefunksjonen i morkaken ytterligere [Roberts, 1999], noe som i sin tur [Shennan et al., 2001] gir dårligere blodperfusjon [Hung et al., 2002]. En konsekvens er vasokonstriksjon og økt motstand mot blodstrømmen. Vi har en

rekke resultater som viser at gener er involvert både i redoksreguleringen og inflammasjonen [Hansson et al., 2005].

2. stadium. Lavere morkakeperfusjon kombinert med oksidativt stress fører til allmenne endotelcelleskader i morkaken. I siste del av 2. stadium skader endotelinflammasjonen også det maternelle blodåresystemet, særlig er det et typisk histologisk funn i nyrene [Roberts et al., 1989; de Groot og Taylor, 1993; Granger et al., 2001; Stevens et al., 2003]. Bindeleddet mellom 1. og 2. stadium har vært ukjent inntil i dag.

10

Preeklampsi opptrer til vanlig under det første svangerskapet til en kvinne, og er vanligst blant tenåringsmødre og mødre over 35 år. Kvinner med underliggende sykdommer som disponerer dem for høyt blodtrykk, har også høyere risiko for å utvikle denne lidelsen. Preeklampsi er en utbredt årsak til maternell dødelig og morbiditet. Den er årsak til 12–18 % av alle maternelle dødsfall som kan forbindes med svangerskap (rundt 70 maternelle dødsfall i USA og anslagsvis 50 000 i året globalt). Den er også forbundet med høy perinatal dødelighet og morbiditet, først og fremst på grunn av iatrogen tidligfødsel. Ved preeklampsi er nevrologiske manifestasjoner vanlig, blant annet hodepine, synsforstyrrelser eller alvorligere manifestasjoner som kramper, hjerneslag eller kortikal blindhet. Den eneste behandlingen som kan kurere preeklampsi er å forløse fosteret og fjerne morkaken – noe som har ført til den allment aksepterte teorien at morkakepatologi er viktig for utviklingen av preeklampsi. Tross intens forskning er etiologien til preeklampsi fortsatt stort sett ukjent.

25

Som nevnt antas det at utilstrekkelig morkakedanning, som fører til svekket morkakeperfusjon, er et tidlig stadium ved utvikling av PE. Svekket perfusjon sammen med økt blodåremotstand kan registreres med dopplerultral lyd, og kvinner med tegn på økt motstand i livmorpulsårene tidlig i svangerskapet («notch») har høyere risiko for å få PE enn kvinner som ikke har slike tegn. Etter hvert som PE utvikler seg, påvirkes blodåresystemet, og man ser allmenn endotelinflammasjon. Det later til at dårlig morkakeperfusjon fører til en kaskade av patologiske forandringer: lavere oksygentilførsel, oksidativt stress, produksjon av reaktive oksygenforbindelser, endotelskader, økt blodårepermeabilitet og

30

inflammasjon (se figur 1). Symptomene på preeklampsi opptrer vanligvis i tredje trimester av svangerskapet og registreres vanligvis ved rutinemessig måling av blodtrykk og urinprøver. Disse registreringsmetodene er imidlertid ineffektive for diagnose av syndromet i et tidlig stadium. Tidlig diagnose kan redusere

- 5 faremomenter for pasienten og fosteret og pasienter med høy risiko kan følges opp mer spesifikt. Dessuten ville det vært ideelt med en effektiv behandling, som vi ennå ikke har i dag, i kombinasjon med tidlig diagnose.

- Noen diagnosemetoder er beskrevet fra før, men ingen av disse har  
10 ennå blitt brukt klinisk i større skala. Nevnes kan for eksempel: US 5,079,171 og US 5,108,898, som bekjentgjør at preeklampsi, svangerskapshypertensjon og eklampsi kan påvises ved å identifisere nærvær av en endotelcellemarkør, fibronektin, i en blod-, plasma- eller serumprøve fra en gravid kvinne, for eksempel ved en sandwich- eller konkurranseimmunanalyse. Det cellulære fibronektinet  
15 stammer fra endotelceller som sprekker eller forstyrres under sykdomsprosessen. US 5,238,819 bekjentgjør diagnose av preeklampsi med en analyse som måler en mitogen faktor i blodet. Den mitogene faktoren er en proteinforbindelse på omkring 160 kDa som kan stimulere til mitose i fibroblastene. Nærværet av den registreres ved å registrere opptak av radioaktivt merket tymidin i celler som er aktivert med  
20 serum eller plasma fra en preeklampsipasient. Denne markøren opptrer etter at skader på det maternelle blodåresystemet allerede er oppstått, altså sent i sykdomsprogresjonen.

- WO 05/093413 (Yale-universitetet og Brigham og Women's Hospital)  
25 bekjentgjør en framgangsmåte for å påvise alvorlig preeklampsi hos gravide kvinner som innbefatter å måle konsentrasjonen av fritt hemoglobin i en prøve av cerebrospinalvæsken.

- I dag er det ikke noen kjent kur for preeklampsi. Preeklampsi kan  
30 variere i alvorlighet fra mild til livstruende. En mild form for preeklampsi kan forbli mild hvis pasienten ligger til sengs og har hyppig tilsyn. For moderate til alvorlige tilfeller er innlegging nødvendig, og det foreskrives legemidler mot høyt blodtrykk og kramper. Hvis tilstanden blir livstruende for mor eller barn, er den eneste utveien å avslutte svangerskapet, noe som ofte medfører en for tidlig fødsel.

Fordi det ikke finnes noen kur for preeklampsi og lenge har vært umulig å påvise den før sykdommen har utviklet seg til en mer alvorlig form, er det naturlig nok et behov for nye tilnærminger for diagnose og behandling av preeklampsi, som er et vesentlig folkehelseproblem.

### Beskrivelse av oppfinnelsen

Altså er det behov for å identifisere biomarkører som pålitelig kan identifisere i) gravide pasienter som står i fare for å utvikle preeklampsi, ii) gravide pasienter som lider av preeklampsi i tidlig stadium og/eller iii) gravide pasienter som har preeklampsi (uansett om den er påvist eller ikke). Dessuten er det behov for å utvikle behandlingsregimer for gravide kvinner i alle de ovennevnte gruppene, i)–iii).

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en slik biomarkør, nemlig fosterhemoglobin, som er påvist å kunne gå inn i det maternelle kretsløpssystemet hos gravide kvinner med preeklampsi.

Den foreliggende oppfinnelsen bygger på oppfinnernes kunnskap og erkjennelse av at økt konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin hos gravide kvinner er forbundet med økt risiko for preeklampsi. Derfor kan fritt fosterhemoglobin brukes som biomarkør for diagnose av preeklampsi, og det er også en mål-kandidat for behandling av preeklampsi.

Med denne biomarkøren kan det registreres økt risiko for å utvikle preeklampsi på et tidlig stadium, noe som gir mer håp om meningsfull behandling. Med framgangsmåtene for diagnose av preeklampsi i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan man også unngå unødig innlegging av gravide kvinner som ikke er i risikogruppen. Dessuten kan framgangsmåten for å følge progresjonen eller regresjonen til preeklampsien bidra til planlegging av fosterforløsningen og redusere risikoen for tidligfødsel.

Preeklampsi er beskrevet kort ovenfor. Hos kvinner er den uteroplacental blodstrømmen etablert allerede etter 12 uker av svangerskapet. Morkake-

barrieren holder fosterblodsirkulasjonen godt atskilt fra den maternelle (se figur 2). De minste funksjonelle enhetene av morkaken, tottene, gir fosteret næring og oksygen som transporteres gjennom barrieren. Ved PE gir redusert morkakeperfusjon imidlertid mindre oksygenert blod til morkaken. Oksygenmangelen og den ujevne blodperfusjonen fører til oksidativt stress i morkaken. Det oksidative stresset gir apoptose i morkakecellene, som så fører til inflammasjon og allmenne endotelcelleskader i morkaken (se figur 3). Når morkakebarrieren er skadd, kan fosterceller komme over i morens blodsirkulasjon. Denne overføringen av fosterceller til morens blodsirkulasjon har vært kjent i omtrent ti år, men ingen har hittil sett på fritt hemoglobin (dvs. hemoglobin utenfor cellene, f.eks. i plasma, og altså ikke bundet i cellene). Det er mest fritt foster-DNA som har vært undersøkt.

Med støtte fra funnene som rapporteres i den eksperimentelle delen av dette dokumentet har de foreliggende oppfinnerne funnet forhøyet konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin (eller av underenhetene av fosterhemoglobin, alfa- og/eller gammakjeden) hos pasienter med PE. Hos kvinner som ikke har PE, skal konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin være rundt 0,038 µg/ml [Turpeinen et al., 1992], mens resultatene våre tyder på en 20-dobbelte økning til konsentrasjoner rundt 1 µg/ml eller mer avhengig av alvorlighetsgraden.

20

Selv om det har vært indikasjoner på at kvinner med PE har forhøyet total hemoglobin, er det hittil ingen rapporter som har vist at fritt fosterhemoglobin er en pålitelig indikator. Dessuten gir måling av en gradvis økning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i stedet for en gradvis økning i total hemoglobin mye sikrere og mer pålitelige resultater. Årsaken er at den normale konsentrasjonen av totalt hemoglobin er mye høyere enn av fosterhemoglobin. Hvis konsentrasjonen av fosterhemoglobin i plasma hos en normal gravid kvinne er 0,05 µg/ml og hos en PE-pasient 1 µg/ml, er økningen  $(1 - 0,05)/0,05 \times 100 = 2000 \%$  (eller 21-dobbelte). Til sammenlikning er konsentrasjonen av totalhemoglobin hos normale og PE-pasienter henholdsvis 3 µg og 4,5 µg (se eksempel 5.1), som svarer til en økning på  $(4,5 - 3) / 3 \times 100 = 50 \%$  (eller 1,5-dobbelte).

30

Som vist på figur 1 tyder resultatene som rapporteres i eksemplene her på at fosterhemoglobin (Hb-F) er bindeleddet mellom 1. og 2. stadium. Et morkaketoksin har i mange år vært en hypotese som indikator for PE. Det er kjent at 1. stadium foregår i morkaken som en følge av hypoksi, som igjen skyldes  
5 forandret perfusjon. Morkakereaksjonen påvirker så det maternelle systemet, men det er ikke identifisert noen spesifikk faktor. Ut fra resultatene som presenteres i den eksperimentelle delen, foreslår de foreliggende oppfinnerne at denne faktoren er foster-Hb, i samsvar med de ovennevnte mekanismene. Tidlig diagnose kan bidra til å følge opp kvinner som er utsatt for å utvikle PE – tidlig innsats. Kvinner  
10 med kliniske tegn på PE kan følges opp poliklinisk hvis man går ut fra at progresjonen kan følges spesifikt, altså ved å følge opp konsentrasjonen av foster-Hb og/eller forholdet foster-Hb/total-Hb. Behovet for en ny behandling er åpenbart, og fordelene ved denne ville vært store.

15 Konsentrasjonen av fosterhemoglobin kan brukes alene til å evaluere om en pasient står i fare for å utvikle eller allerede har utviklet preeklampsi, men den kan også brukes i kombinasjon med den totale hemoglobinkonsentrasjonen eller konsentrasjonen av voksenhemoglobin i den spesifikke kroppsprøven som indikator på sykdomsprogresjonen.

20

I henhold til den foreliggende oppfinnelsen er det overraskende funnet at økte konsentrasjoner av fritt hemoglobin, spesielt fosterhemoglobin, hos en gravid kvinne er forbundet med økt risiko for å utvikle preeklampsi. Derfor kan fosterhemoglobin brukes som biomarkør for diagnose av preeklampsi, og den er  
25 også en målkandidat for behandling av preeklampsi.

Ut fra denne observasjonen dreier den foreliggende oppfinnelsen seg om følgende:

- i) en framgangsmåte for diagnose av PE
- 30 ii) en framgangsmåte for å evaluere progresjonen eller regresjonen av PE
- iii) en framgangsmåte for å vurdere effektiviteten av en behandling mot PE.

Det bekjentgjøres også:

- iv) et kit til bruk i en av de ovennevnte framgangsmåtene
- v) stoffer og sammensetninger til bruk ved behandling av PE
- vi) humant leukocyttantigen DPA1 (HLA-DPA1) som biomarkør.

5                    Definisjoner

I denne spesifikasjonen står «en», «ei» eller «et» for «1 eller flere» hvis det ikke er spesifisert noe annet.

Slik den brukes i denne spesifikasjonen defineres betegnelsen  
10 «preeklampsi» i henhold til kriterier som er lagt til grunn av terminologikomiteen til American College of Obstetrics and Gynecology, altså høyt blodtrykk pluss proteinuri, åpenbart ødem, eller begge. For eksempel kan preeklampsi defineres som blodtrykk >140/90 mmHg og proteinuri >0,3 g/l.

15                    Det finnes forskjellige former for hemoglobin. Voksenhemoglobin (hemoglobin A) består av to alfa- og to betapolyeptidkjeder (Hb $\alpha$ , Hb $\beta$ ), som begge inneholder en ikke-peptidisk hemgruppe som binder et enkelt oksygenmolekyl reversibelt. Hemoglobin A2, en annen voksenhemoglobinkomponent, består av to alfakjeder og to deltakjeder (Hb $\alpha$ , Hb $\delta$ ). Fosterhemoglobin (hemo-  
20 globin F) er hovedkomponenten i hemoglobin hos fosteret. Dette hemoglobinet har to alfa- og to gammapolyeptidkjeder (Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$ ).

Betegnelsen «fritt hemoglobin» står i denne spesifikasjonen for fritt hemoglobin i sin alminnelighet og omfatter totalt fritt hemoglobin, fritt hemoglobin  
25 A, fritt hemoglobin A2, fritt hemoglobin F, alle frie underenheter av hemoglobin (f.eks. en Hb $\alpha$ -, Hb $\beta$ -, Hb $\delta$ - eller Hb $\gamma$ -kjede) eller enhver kombinasjon av disse. Den omfatter også disse hemoglobinenhetene enten i polypeptid- (protein) eller nukleotidform (RNA), unntatt når den brukes som mål for behandlingen. Betegnelsen «fritt fosterhemoglobin» står for fritt hemoglobin F eller enhver underenhet  
30 av hemoglobin F, og omfatter hemoglobin F-enheter i polypeptid- (protein) eller nukleotidform (RNA), unntatt når den brukes som mål for behandlingen.

I denne spesifikasjonen brukes betegnelsen «fri» blant annet i uttrykkene «fritt hemoglobin», «fritt fosterhemoglobin» eller «frie underenheter av

hemoglobin (f.eks. Hb $\alpha$ -, Hb $\beta$ -, Hb $\delta$ - eller Hb $\gamma$ -kjeder)», og står for hemoglobin, fosterhemoglobin eller underenheter av hemoglobin som sirkulerer fritt i en kroppsvæske, i motsetning til cellulært hemoglobin, som står for molekyler inne i celler. Betegnelsen «fri» i denne sammenhengen brukes altså hovedsakelig for å skille mellom fritt hemoglobin og hemoglobinet i intakte erytrocytter.

Betegnelsene «markør» eller «biomarkør» står i denne spesifikasjonen for et biomolekyl, fortrinnsvis et polypeptid eller protein, som er til stede i en prøve tatt fra en kvinne med preeklampsi eller en kvinne med forhøyet risiko for å utvikle preeklampsi i andre mengder enn i en sammenliknbar prøve fra en kvinne, omtalt som en «normal» kvinne/pasient som ikke har preeklampsi eller har noen forhøyet risiko for å utvikle preeklampsi.

Betegnelsen «biologisk prøve fra drektig hunnpattedyr» eller tilsvarende skal stå for en prøve fra pattedyret selv, altså er ikke prøven f.eks. fra fosteret eller fostervannet.

#### Ang. i) framgangsmåte for diagnose av PE

I henhold til et første aspekt av den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes det en framgangsmåte for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi, som innbefatter følgende trinn: (a) ta en biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr, (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den nevnte biologiske prøven, og (c) sammenlikne konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i prøven med en referanseverdi eller sammenlikne forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøven med en referanseverdi for å bestemme om det nevnte drektige hunndyret har eller ikke har preeklampsi eller står eller ikke står i fare for å utvikle preeklampsi.

30

Trinnet å ta en biologisk prøve fra det nevnte drektige hunnpattedyret omfatter prosessen med å få skaffet til veie en biologisk prøve som er tatt med velkjente standardmetoder.

Den biologiske prøven kan for eksempel være blod, blodserum, plasma, urin, vaginasekreter, tårer, vev, serum, avføring, spytt, fostervann og cerebrospinalvæske. I spesifikke realiseringer er den biologiske prøven blod, urin, fostervann eller morkakevev.

5

I visse realiseringer er den biologiske prøven blod, plasma, urin eller morkakevev.

Størrelsen på den biologiske prøven kan varieres etter individuelle behov og følsomhet. Mengden som tas kan varieres mye, med hvilken type analyse som brukes, hvor prøven tas, og med mulighetene for bivirkninger for mor eller foster. I en bestemt realisering ligger størrelsen på en blodprøve i intervallet fra omtrent 5 til omtrent 75 ml, fortrinnsvis fra omtrent 20 til omtrent 40 ml.

Det tas i betraktning at framgangsmåtene i henhold til denne oppfinnelsen kan brukes på alle dyr som er et «placentalt» dyr, dvs. et som gir næring til et ufødt foster gjennom en morkake. Slike dyr omfatter blant annet mennesker, andre primater og pattedyr som brukes i matproduksjonen. Et foretrukket dyr for diagnosen er et menneske eller et økonomisk verdifullt dyr eller bue.

20

I en foretrukket realisering er pattedyret et menneske.

I en viss realisering tas det prøver fra gravide kvinner. Den gravide kvinnen kan være et individ som er påvist å ha høy risiko for preeklampsi på grunn av sin personlige eller familiens sykehistorie. Andre pasienter er blant annet gravide kvinner som behandles for kjent preeklampsi og avgir prøver for å bestemme effektiviteten av behandlingen. Også friske gravide kvinner som avgir prøver som del av rutineundersøkelser kan høre inn under dette.

30

Hvis man ønsker det kan prøven prepareres for å gjøre det lettere å detektere fritt fosterhemoglobin. Prøveprepareringen involverer typisk å fraksjonere prøven og samle fraksjoner som er påvist å inneholde fritt hemoglobin. Framgangsmåter for prefraksjonering omfatter for eksempel sentrifugering,

RNA/DNA-ekstrahering, størrelsesekskluderingskromatografi, ionebytter-kromatografi, gelelektroforese og væskekromatografi.

Trinnet å måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin kan utføres for eksempel ved en immunologisk analyse (f.eks. en ELISA eller andre faststoff-baserte immunanalyser som SPRIA eller forsterket ELISA, såkalt IMRAMP), en proteinbrikkeanalyse, kvantitativ PCR-forsterkning i sanntid, overflateforbedret laserdesorpsjon/-ionisering (SELDI), høytrykksvæskekromatografi (HPLC), massespektrometri, in situ-hybridisering, immunohistokjemi, kjemiluminiscens, nefelometri/turbometri, lateralstrøm eller ren eller polarisert fluorescens eller elektroforese. Men det vil være klart for en fagperson at denne listen av metoder ikke er komplett og at disse metodene ikke er de eneste framgangsmåtene som kan brukes i den foreliggende oppfinnelsen til å måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin.

15

Stoffet som detekteres og/eller måles i framgangsmåtene i henhold til oppfinnelsen omfatter totalt hemoglobin, hemoglobin A, hemoglobin A2, hemoglobin F, alle hemoglobinkjedene ( $Hb\alpha$ ,  $Hb\beta$ ,  $Hb\delta$  og  $Hb\gamma$ ), og enhver kombinasjon av disse. I en bestemt realisering av oppfinnelsen detekteres og/eller måles gammakjeden ( $Hb\gamma$ ) av hemoglobin i framgangsmåten i henhold til oppfinnelsen. Det er klart at hemoglobin F og underenhetene av dette er de viktigste siden resultatene bygger på økt konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin og hvordan det påvirker utviklingen av PE. Som omtalt i dette dokumentet indikerer gammakjeden fosterhemoglobin, mens f.eks. beta- og deltakjeden indikerer voksenhemoglobin. Ut fra det som bekjentgjøres her vil en fagperson vite hvilke(n) hemoglobinkjede(r) som skal måles.

En immunologisk analyse (immunanalyse) kan i henhold til den foreliggende oppfinnelsen brukes til å måle konsentrasjonen av fritt hemoglobin. En immunanalyse er en analyse der det brukes et antistoff til å binde et antigen (f.eks. hemoglobin) spesifikt. Immunanalysen karakteriseres ved at det brukes spesifikke bindingsegenskaper ved et bestemt antistoff til å isolere, målsøke og/eller kvantifisere antigenet. Under angitte immunanalyseforhold bindes de spesifiserte antistoffene til et bestemt protein i minst dobbelt så høy grad som

bakgrunnen og bindes ikke i noen vesentlig grad til andre proteiner i prøven. Ved å bruke de rensede markørene eller nukleinsyresekvensene deres kan det lages antistoffer som bindes spesifikt til en markør (f.eks. hemoglobin) ved alle egnede kjente framgangsmåter [se f.eks. Coligan, 1991].

5

I en viss realisering av det første aspektet måles konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin f.eks. ved en immunologisk analyse. Nærmere bestemt er den immunologiske analysen en ELISA. Men som vist i eksemplene her kan det også brukes western blotting.

10

I en viss realisering av det første aspektet bestemmes konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin ved å måle RNA for fritt fosterhemoglobin. Nærmere bestemt måles RNA for fritt fosterhemoglobin ved sanntids PCR. I tilfeller der man også bestemmer total hemoglobinkonsentrasjon kan denne konsentrasjonen også bestemmes ved å måle RNA for alfakjeden av hemoglobin, f.eks. ved sanntids PCR.

15

I allmennhet kan en prøve fra en pasient bringes i kontakt med antistoffet som bindes spesifikt til markøren. Alternativt kan antistoffet festet på et fast underlag for å gjøre det lettere å vaske og deretter isolere komplekset før antistoffet bringes i kontakt med en prøve. Eksempler på faste underlag er glass eller plast for eksempel i form av en mikrotiterplate, en stav, en kule eller en mikrokule.

20

Etter at prøven er inkubert med antistoff, vaskes blandingen, og så kan man detektere antistoff-markør-komplekset som dannes. Dette kan gjøres ved å inkubere den vaskede blandingen med en detekteringsreagens. Denne detekteringsreagensen kan f.eks. være et annet antistoff som er merket med en detekterbar merking. Eksempler på detekterbare merkinger er blant annet magnetiske kuler, fluorescerende fargestoff, radioaktiv merking, enzymer (f.eks. pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase eller andre som er vanlige å bruke i ELISA), og kolorimetrisk merking som kolloidalt gull eller farget glass eller plastkuler.

25

30

Alternativt kan markøren i prøven detekteres med indirekte analyse, der for eksempel et andre merket antistoff brukes til å detektere bundne markør-spesifikke antistoffer, og/eller i en konkurranse- eller hemmeanalyse der man for eksempel samtidig med blandingen inkuberer et monoklonalt antistoff som bindes  
5 til en distinkt epitope av markøren.

Framgangsmåter for å måle mengden eller nærværet av et antistoff-markør-kompleks omfatter for eksempel å detektere fluorescens, luminescens, kjemiluminescens, absorbans, reflektans, transmittans, brytningsindeks (f.eks.  
10 overflateplasmonresonans, ellipsometri, en resonerende speil-metode, en metode med gitterbryter for bølgeleder (engelsk «grating-coupled waveguide») eller interferometri) eller radioaktivitet. Optiske metoder omfatter mikroskopi (både konfokal og ikke-konfokal), bildedanningsmetoder og ikke-bildedannende metoder. Elektrokjemiske metoder omfatter voltametri og amperometri. Radiofrekvens-  
15 metoder omfatter multipolar resonansspektroskopi.

Det er kjent nyttige analyser, blant annet for eksempel en enzym-immunanalyse (EIA), for eksempel enzymbundet immunsorbentanalyse (ELISA), radioimmunanalyser som RIA og SPRIA, en western blot-analyse eller en slot blot-  
20 analyse.

I en bestemt realisering er en ELISA den foretrukne metoden for å måle konsentrasjonen av fritt hemoglobin.

25 Trinnet å måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan også gjøres ved å detektere og måle fritt RNA som koder for hemoglobinpolyptider i prøven, f.eks. detektere RNA-sekvenser som koder for hemoglobin gamma-kjeden (Hby) eller fragmenter av denne i blodplasma.

30

I henhold til en spesifikk realisering kvantifiseres fritt hemoglobin-RNA ved sanntids PCR.

I trinnet å sammenlikne konsentrasjonen av fritt hemoglobin i prøven med en referanseverdi eller å sammenlikne forholdet mellom konsentrasjonen av den frie underenheten av hemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøven med en referanseverdi, står betegnelsen «referanseverdi» i forhold til den foreliggende oppfinnelsen i henhold til en realisering for en etablert grunnlinje- eller gjennomsnittskonsentrasjon av fritt hemoglobin, altså samme slags fritt hemoglobin som måles i trinn (b), eller forholdet mellom konsentrasjonen av den frie underenheten av hemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøver fra en kontrollgruppe. Det foretrekkes at kontrollgruppen innbefatter drekthige hunnpattedyr som ikke har påvist preeklampsi.

Når man bruker en kontrollgruppe, bestemmes referanseverdien for det frie fosterhemoglobinet med kjente standard analysemetoder. Verdien vil selvfølgelig variere for eksempel med hvilken type analyse som brukes, formen av fritt hemoglobin som det måles på, hva slags biologisk prøve som brukes og med pasientgruppen. For eksempel ligger den gjennomsnittlige blodkonsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin målt med en ELISA hos en gruppe gravide kvinner som ikke har påvist preeklampsi, normalt i intervallet 2,5 til 3,5 µg/ml, men selvsagt kan den variere med alder, vekt, antall tidligere svangerskap osv.

20

I tilfellet der den nevnte referanseverdien er konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøver fra en kontrollgruppe, tyder høyere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin eller høyere verdi for det nevnte forholdet i prøven enn referanseverdien, på at den nevnte gravide kvinnen har preeklampsi eller forhøyet risiko for å utvikle preeklampsi.

I en bestemt realisering av det første aspektet er referanseverdien konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøver fra en kontrollgruppe, der høyere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin eller høyere verdi av det nevnte forholdet i prøven enn referanseverdien tyder på at den nevnte gravide kvinnen har preeklampsi eller forhøyet risiko for å utvikle preeklampsi. Foreløpige resultater, med en western blot-metode for å bestemme fritt foster-

hemoglobin, tyder på at kvinner med plasmakonsentrasjon på omtrent 5 µg/ml eller mer, eller alternativt urinkonsentrasjon på 1 µg/ml eller mer, er utsatt for PE eller for å utvikle PE. Disse verdiene ventes imidlertid å kunne identifiseres bedre med en mer følsom metode, som f.eks. ELISA. I litteraturen er det rapportert en

5 normal plasmakonsentrasjon av fosterhemoglobin på omtrent 0,3–76 µg/l, dvs. 0,0003–0,076 µg/ml (se Turpeinen et al., 1992) med en gjennomsnittsverdi på 0,038 µg/ml. Altså ser man en markert forhøyet konsentrasjon av fosterhemo-

globin hos kvinner som utvikler PE eller allerede lider av PE. Altså tas det i betraktning at kvinner med plasmakonsentrasjon av fosterhemoglobin på 5–10

10 ganger den normale konsentrasjonen (dvs. 0,3 µg/ml eller mer) har risiko for å utvikle PE. Denne verdien ventes også imidlertid å kunne identifiseres bedre med en mer følsom metode, som f.eks. ELISA. I spesifikke realiseringer tas det i betraktning at hvis plasmakonsentrasjonen av fosterhemoglobin er omtrent 20

ganger eller mer, omtrent 50 ganger eller mer, omtrent 75 ganger eller mer eller

15 omtrent 100 ganger eller mer, har kvinnen enten risiko for å utvikle PE eller lider av PE enten i 1. eller 2. stadium. Fra en annen synsvinkel og under forutsetning at det ovennevnte normale intervallet er gyldig, har en kvinne risiko for eller lider av PE hvis plasmakonsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin er omtrent 0,5 µg/ml eller

mer, for eksempel omtrent 0,75 µg/ml eller mer, omtrent 1 µg/ml eller mer, omtrent

20 1,25 µg/ml eller mer, omtrent 1,5 µg/ml eller mer, omtrent 1,75 µg/ml eller mer, omtrent 2 µg/ml eller mer, omtrent 2,5 µg/ml eller mer, omtrent 3 µg/ml eller mer, omtrent 3,5 µg/ml eller mer, omtrent 4 µg/ml eller mer, omtrent 4,5 µg/ml eller mer eller omtrent 5 µg/ml. Det tas i betraktning at jo lavere konsentrasjon av foster-

hemoglobin som foreligger jo mindre alvorlig er sykdommen i det aktuelle trinnet.

25 Progresjonen (eller regresjonen) av sykdommen kan så følges ved å måle konsentrasjonen av fosterhemoglobin hos den samme kvinnen.

Resultatene fra eksemplene her støtter betraktningene ovenfor. Med western blot-metoden hadde omtrent 20 % av kvinnene i gruppe II (dvs. gruppen

30 som allerede led av PE) plasmakonsentrasjon på 5 µg/ml eller mer. I urinprøvene hadde omtrent 20 % av kvinnene som led av PE 1 µg/ml foster-Hb eller mer (se eksempel 5.2). Det ser altså ut til at urinkonsentrasjonen er noe lavere enn plasmakonsentrasjonen, og derfor gjelder alle de ovennevnte konsentrasjonene for plasma, men konsentrasjonene senkes til omtrent 0,06 µg/ml eller mer, omtrent

0,1 µg/ml eller mer, omtrent 0,2 µg/ml eller mer, omtrent 0,4 µg/ml eller mer osv. i urin.

En annen måte enn å se på den eksakte plasma- eller urinkonsentrasjonen av fosterhemoglobin for å vurdere om en kvinne har risiko for eller allerede har indikasjon på PE, er å se på standardavviket for den utførte analysen når man bestemmer plasma- eller urinkonsentrasjonen (eller egentlig konsentrasjonen i enhver annen egnet kroppsvæske). En relevant parameter regnes her for å være en økning fra den normale konsentrasjonen (f.eks. i plasma eller urin osv.) på 5 ganger standardavviket eller mer, for eksempel 10 ganger standardavviket eller mer, 25 ganger standardavviket eller mer, 50 ganger standardavviket eller mer eller 100 ganger standardavviket eller mer.

Når det gjelder måling av forholdet (R) mellom fritt foster-Hb (Hb F) og fritt totalt Hb (total Hb), er forholdet til en normal kvinne (dvs. som ikke lider av PE) omtrent  $0,038 \mu\text{g/ml} / 3 \mu\text{g/ml} = 0,012$  når de to parameterne måles ved en tids-oppløst immunfluorimetrisk analyse som beskrevet av Turpeinen et al., og ELISA som beskrevet nedenfor (eksempel 5). Altså tas det i betraktning at et forhold R på 0,12 eller mer tyder på at kvinnen har risiko for eller allerede har PE i et visst stadium. I visse realiseringer er PE-risiko eller -sykdom i et visst stadium indikert hvis R er 0,15 eller mer, for eksempel 0,2 eller mer, 0,3 eller mer, 0,4 eller mer, 0,5 eller mer eller 0,6 eller mer. Teoretisk er  $R = 1$  når alt (100 %) av det frie totale Hb er foster-Hb. Dette er altså den øvre grensen.

Den foreliggende oppfinnelsen tar også i betraktning bruk av framgangsmåtene som beskrives her i kombinasjon med andre diagnosemetoder. Diagnosemetoder som kan brukes i kombinasjon med framgangsmåtene i henhold til oppfinnelsen omfatter dagens metoder for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi som er kjente for helsepersonell. Som eksempler på slike metoder kan det nevnes å måle konsentrasjonen av urat eller konsentrasjonen av cystatin C i serum. En biologisk prøve kan først analyseres med framgangsmåtene som beskrives her. Den biologiske prøven kan så analyseres ved andre metoder for å underbygge observasjonen. Dermed kan nøyaktigheten ved den diagnostiske

framgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelsen forbedres ved å kombinere den med andre diagnosemetoder.

Ang. ii) evaluering av progresjonen/regresjonen av PE

5 I andre realiseringer av oppfinnelsen kan fritt fosterhemoglobin, f.eks. frie underenheter av fosterhemoglobin, brukes til å bestemme preeklampsistatusen (f.eks. alvorlig preeklampsi) eller til prognose, dvs. å forutsi utviklingen av sykdommen, for pasienten. For eksempel korrelerer konsentrasjonen av fritt hemoglobin med alvorligheten av preeklampsi (f.eks. mild eller alvorlig preeklampsi). Det er kjent at  
10 nevrologiske manifestasjoner, som anfall eller koma (eklampsi), hjerneslag, hypertensiv encefalopati, hodepine og synsforstyrrelser (skotomer, dobbeltsyn, amaurose, homonym hemianopsi) er vanlig ved alvorlig preeklampsi [Douglas og Redman, 1994].

15 I henhold til det andre aspektet av den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes det altså en framgangsmåte for å følge progresjonen eller regresjonen av preeklampsi, som innbefatter å: (a) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første biologisk prøve isolert fra et  
20 drektig hunnpattedyr, (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre biologisk prøve isolert fra det nevnte drektige hunnpattedyret på et senere tidspunkt, og (c) sammenlikne verdiene som ble målt i trinn (a) og (b), der en økning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den andre prøven over  
25 konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller en økning av forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven over forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den første prøven viser progresjon av preeklampsi, mens en senkning i konsentrasjonen av  
30 fritt fosterhemoglobin i den andre prøven under konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller en senkning av forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven under forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og

konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den første prøven viser regresjon av preeklampsi.

- Vi utførte feltdelen av studien vår ved Muhimbili Hospital i Dar es Salaam, Tanzanias største by (se eksempel 5). Muhimbili Hospital er et henvissingssenter på tredje nivå, som mottar pasienter hovedsakelig fra sykehusene i kommunen. Muhimbili University of Health and Allied Sciences (MUHAS) er det eneste offentlige universitetet i landet som tilbyr høyere utdanning i medisinske fag. Dette var et egnet miljø for studien vår på grunn av det høye antallet svangerskap som kompliseres av PE og eklampsi i Tanzania. Ved Muhimbili-sykehuset ble det funnet PE hos 16 % av kvinnene i svangerskapsklinikken. Den sykehusbaserte insidensen av eklampsi var 200/10 000 forløsninger ifølge en studie i 1999–2000. Dette kan sammenliknes med insidensen på 5/10 000 materniteter i Europa. Ti pasienter med alvorlig PE eller eklampsi og ti tilsvarende kontroller ble innlemmet i studien (se tabellen nedenfor).

Tabell 1: kliniske karaktertrekk ved forløsning av pasienter som deltok i denne studien.

|                                            | <b>PE</b>     | <b>Kontroll</b> |
|--------------------------------------------|---------------|-----------------|
| Antall <sup>a</sup>                        | 10            | 10              |
| Alder (år)                                 | 28,5 (19–40)  | 21,5 (18–30)    |
| Paritet                                    | 1,6 ±2,3      | 0,6 ±1,4        |
| Fosteralders(dager)                        | 256 (217–266) | 280 (231–287)   |
| Systolisk blodtrykk (mmHg) <sup>***</sup>  | 191 ±34       | 115 ±9          |
| Diastolisk blodtrykk (mmHg) <sup>***</sup> | 124 ±18       | 74±7            |
| Proteinuri (g/l) <sup>***, b</sup>         | 2,6 ±0,8      | 0,3 ±1,0        |
| Fødselsvekt (g)                            | 2005 ±717     | 3040 ±398       |
| Morkakevekt (g)                            | 335 ±120      | 506 ±68         |
| Keisersnitt (n)                            | 6             | 4               |
| Dødfødsler (n)                             | 5             | 0               |
| Eklampsi (n)                               | 4             | 0               |

- 20 PE = preeklampsi

Enveis ANOVA med post-hoc bonferronitest ble brukt til å evaluere forskjellene mellom gruppene statistisk. En p-verdi  $<0,05$  ble regnet som statistisk signifikant.

\*\*\* Testen viste en signifikant forskjell mellom PE og kontroll ( $p < 0,001$ ).

<sup>a</sup> En av pasientene døde innen 24 timer etter forløsningen i PE-gruppen.

- 5 <sup>b</sup> Verdiene for proteinuri er ikke eksakte på grunn av metodebegrensninger. Den høyeste målbare verdien var 3 g/l.

- Pasientene ble valgt gjennom en seksukers periode, september– oktober 2007, ved avdelingen for gynekologi og obstetrikk på Muhimbili Hospital.
- 10 Den preeklampiske gruppen ble valgt fra den eklampiske intensivavdelingen, der det gjennomsnittlig ble lagt inn to PE-pasienter om dagen. Innlemmingskriterene var enten alvorlig PE (diastolisk blodtrykk  $\geq 110$  mmHg to ganger) eller eklampsi. Alle pasienter med dokumentert kronisk høyt blodtrykk før svangerskapet ble utelukket fra studien. Pasientene ble intervjuet ved hjelp av et spørsmålsark
- 15 oversatt til swahili. For hver deltakerpasient ble journaldiagrammet studert for å få tilleggsopplysninger. Kvinner som ble innlemmet i studien hadde vedvarende forhøyning av blodtrykket de første 24 timene av sykehusoppholdet og proteinuri  $\geq 1$  g/l. Alder, paritet, antall visitter før fødselen, forløsningsmåte, tid mellom innlegging og forløsning, utgang for mor og barn ble notert. Urinprøver som ble tatt
- 20 før forløsningen viste statistisk signifikant forskjell mellom konsentrasjonene av totalt hemoglobin i PE- og kontrollgruppen (figur 21). Det ble gjort statistiske beregninger ved en ikke-parametrisk Mann-Whitney U-test, som viste p-verdi 0,0093. Medianverdien for den preeklampiske gruppen var 31,0  $\mu\text{g/ml}$ , sammenliknet med 2,5  $\mu\text{g/ml}$  i kontrollgruppen. Den høye verdien i kontrollgruppen skyldes
- 25 mest sannsynlig høy forekomst av malaria. Urinprøver tatt etter forløsningen ble også analysert.

- I spesifikke realiseringer tas det i betraktning at en økning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin som svarer til to standardavvik eller mer, f.eks. 3
- 30 eller mer, 4 eller mer, 5 eller mer, 7 eller mer eller 10 standardavvik eller mer, tyder på økt risiko for å utvikle PE og/eller progresjon av sykdommen. På tilsvarende måte tyder en senkning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin som svarer til to standardavvik eller mer, f.eks. 3 eller mer, 4 eller mer, 5 eller mer,

7 eller mer eller 10 standardavvik eller mer på lavere risiko for å utvikle PE og/eller regresjon av sykdommen. Et annet mål kan være forholdet ( $R_1$ ) mellom Hb F ved tiden  $t_2$  og Hb F ved tiden  $t_1$ , der  $t_1$  er når den første prøven ble tatt og  $t_2$  er når den andre prøven ble tatt. Økt  $R_1$  tyder på progresjon av sykdommen og senket  $R_1$  tyder på regresjon av sykdommen. Siden individuelle variasjoner ventes å være minimale på grunn av at det er den samme kvinnen som testes, antas det at også små økninger eller senkninger er gode indikatorer. En  $R_1$ -verdi på 1,1 eller mer ventes å være en indikasjon på progresjon av sykdommen mens en  $R_1$ -verdi på 0,9 eller mindre tyder på regresjon av sykdommen.

10

Hvis forholdet R (dvs. forholdet mellom Hb F og totalt Hb) brukes, er målet i disse tilfellene vanligvis forholdet mellom R ( $R_2$ ) på et andre tidspunkt og R på et første tidspunkt ( $R_1$ ). Økt  $R_2/R_1$  tyder på progresjon av sykdommen og senket  $R_2/R_1$  tyder på regresjon av sykdommen. Siden det ventes at den individuelle variasjonen er minimal på grunn av at det er den samme kvinnen som testes, antas det at også små økninger eller senkninger er gode indikatorer. En verdi på 1,1 eller mer for  $R_2/R_1$ -forholdet ventes å være en indikasjon på progresjon av sykdommen mens en verdi på 0,9 eller mindre for  $R_2/R_1$ -forholdet tyder på regresjon av sykdommen.

20

Opplysningene som er nevnt under det første aspektet gjelder også dette og de følgende aspektene.

Ang. iii) en framgangsmåte for å vurdere effektiviteten til en bestemt behandling av PE

I henhold til det tredje aspektet av oppfinnelsen tilveiebringes det en framgangsmåte for å evaluere effektiviteten til en behandling mot preeklampsi, som innbefatter følgende trinn: (a) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første prøve tatt fra et drektig hunnpattedyr før behandlingen, (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre prøve

tatt fra det samme drektige hunnpattedyret etter behandlingen og (c) sammenlikne konsentrasjonen eller konsentrasjonene som bestemmes i (a) med konsentrasjonen eller konsentrasjonene som bestemmes i (b), der høyere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin i den andre prøven enn konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller lavere forhold mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven enn forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den første prøven tyder på at behandlingen er effektiv mot preeklampsi.

I bestemte realiseringer tas det i betraktning at effektiviteten til behandlingen kan vurderes ved å bestemme eventuell senkning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin. Hvis senkningen svarer til to standardavvik eller mer, f.eks. 3 eller mer, 4 eller mer, 5 eller mer, 7 eller mer eller 10 standardavvik eller mer, tyder det på at behandlingen effektivt reduserer progresjonen av PE og/eller behandler sykdommen og/eller lindrer symptomene som er forbundet med sykdommen. Tilsvarende tyder en økning i konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin som svarer til to standardavvik eller mer, f.eks. 3 eller mer, 4 eller mer, 5 eller mer, 7 eller mer eller 10 standardavvik eller mer, på at behandlingen ikke er effektiv. Et annet mål kan være forholdet ( $R_1$ ) mellom Hb F ved tiden  $t_2$  og Hb F ved tiden  $t_1$ , der  $t_1$  er når den første prøven ble tatt og  $t_2$  er når den andre prøven ble tatt. Økt  $R_1$  tyder på progresjon av sykdommen, altså at behandlingen ikke strekker til, mens senket  $R_1$  tyder på regresjon av sykdommen og på effektiv behandling. Siden den individuelle variasjonen er minimal på grunn av at det er den samme kvinnen som testes, antas det at også små økninger eller senkninger er gode indikatorer. En verdi på 1,1 eller mer for  $R_2/R_1$ -forholdet ventes å være en indikasjon på progresjon av sykdommen, mens en verdi på 0,9 eller mindre for  $R_2/R_1$ -forholdet tyder på regresjon av sykdommen.

Hvis forholdet R (dvs. forholdet mellom Hb F og totalt Hb) brukes, er målet i disse tilfellene vanligvis forholdet mellom R ( $R_2$ ) på et andre tidspunkt og R på et første tidspunkt ( $R_1$ ). Økt  $R_2/R_1$  tyder på progresjon av sykdommen, altså at behandlingen ikke later til å strekke til, og senket  $R_2/R_1$  tyder på regresjon av sykdommen, altså at behandlingen later til å ha den ønskede virkningen. Siden det ventes at den individuelle variasjonen er minimal på grunn av at det er den samme

kvinnen som testes, antas det at også små økninger eller senkninger er gode indikatorer. En verdi på 1,1 eller mer for  $R_2/R_1$ -forholdet ventes å være en indikasjon på progresjon av sykdommen, mens en verdi på 0,9 eller mindre for  $R_2/R_1$ -forholdet tyder på regresjon av sykdommen.

5                    Ang. iv) diagnostisk kit

Det bekjentgjøres også i henhold til den foreliggende oppfinnelsen et analysekit for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi, som innbefatter organ for å måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i en biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr og instruksjoner for å bruke de nevnte måleorganene.

- 10                    Det bekjentgjøres kit for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi. Kitene brukes til å detektere eller utføre utvalgsundersøkelser av nærvær av fritt hemoglobin som finnes i varierende mengder i prøver fra pasienter med preeklampsi.

- 15                    Kitet innbefatter organ for å detektere fritt hemoglobin (f.eks. alfakjeden av hemoglobin (Hb $\alpha$ ), betakjeden av hemoglobin (Hb $\beta$ ), deltakjeden av hemoglobin (Hb $\delta$ ), gammakjeden av hemoglobin (Hb $\gamma$ ) og totalt fritt hemoglobin) enten aleine eller i kombinasjon med andre detekteringsorganer og instruksjoner for å bruke nevnte detekteringsorgan. Alternativt eller i tillegg innbefatter kitet organ for å måle mRNA for foster-Hb.

- 20                    Kitet innbefatter organ for å detektere konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin, f.eks. organ for å måle konsentrasjonen av gammakjeden av hemoglobin (Hb $\gamma$ ) i en prøve. I en annen realisering innbefatter det også organ for å detektere konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin.

- 25                    Detekteringsorganet innbefatter antistoffer mot hemoglobin, fortrinnsvis mot fosterhemoglobin (f.eks. et antistoff mot humant Hb $\gamma$ ).

- 30                    De nevnte instruksjonene innbefatter egnede driftsparametere i form av en etikett eller separat innlegg. For eksempel kan instruksjonene informere en forbruker om hvordan prøven skal tas og hvordan sonden skal vaskes. Man må være spesielt nøye med å redusere hemolyse av blodprøver til et minimum for å unngå falske verdier for totalt Hb.

Et kit som skal brukes i framgangsmåten i henhold til oppfinnelsen, kan også innbefatte analyttstandarder, reagenser m.m.

Det bekjentgjøres også at konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin kan bestemmes ved å måle konsentrasjonen av gammakjeden av hemoglobin (Hby).

- 5                   Analysekitet innbefatter også organ for å detektere konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin, f.eks. for å bestemme forholdet mellom totalt Hb og foster-Hb og/eller totalt Hb og mRNA for foster-Hb.

- Nærmere bestemt kan et diagnosekit for eksempel innbefatte alle komponenter (bortsett fra vann) som trengs for å utføre en ELISA utformet for å  
10   måle fosterhemoglobinkonsentrasjonen i en prøve eller to ELISA utformet for å måle både fosterhemoglobinkonsentrasjonen og den totale hemoglobin-konsentrasjonen i en prøve. En foretrukket måte å måle konsentrasjonene av fosterhemoglobin på er konkurransevarianten av ELISA som beskrives her:

- Hemoglobin F fortynnet til 1–5 µg/ml i vannløsning overtrekkes på 96-  
15   brønners mikrotiterplater ved inkubering over natten. Det vil finnes forhånds-overtrukne plater klare til bruk i kitet. Brønnene på mikrotiterplaten inkuberes på klinikken med en blanding som inneholder 50 µl leporint antihemoglobin F, fortynnet 1000–10000 ganger med vannløsning A (for eksempel 0,9 % NaCl med 0,1 % detergens, for eksempel Tween 20, og 0,1 % kalveserumalbumin), pluss  
20   enten 50 µl av en serie av standard oksyhemoglobin F-prøver, fortynnet med vannløsning A til konsentrasjoner på 1–10000 ng/ml, eller 50 µl av pasientprøvene (fortynnet 100–10000 ganger med vannløsning A). Denne blandingen skal ligge på brønnene i mikrotiterplaten i mellom 30 minutter og 3 timer ved romtemperatur. Platene skal så vaskes 3 ganger med vannløsning A og hver brønn inkuberes i 30  
25   minutter med 100 µl porkint antileporint IgG-alkalifosfatase (ALP), fortynnet 1000–10000 ganger i vannløsning A. Platene skal så vaskes 3 ganger med vannløsning A og til slutt inkuberes med et substrat som ALP kan reagere spesifikt med og omdannes til et farget produkt. Substratløsningen kan for eksempel være 1 mg/ml *p*-nitrofenylfosfat i 1 M dietanolamin + 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8. Konsentrasjonen av  
30   produktet (= fargeintensiteten) i en brønn er da proporsjonal med mengden av antihemoglobin F i den brønnen, og mengden av antistoff er i sin tur omvendt

proporsjonal med mengden av hemoglobin F i pasient- eller kontrollprøven. Fargeintensiteten kan bestemmes eksakt med en mikrotiterplateleser av lysabsorbanstypen eller til og med estimeres visuelt.

For fagfolk er heller enzymet pepperrotperoksidase (HRP) enn ALP det  
5 opplagte valget for enzymbinding til de sekundære antistoffene. Men i denne sammenhengen kan ikke HRP brukes fordi hemoglobin, som vil være tilstede i de samme mikrotiterplatebrønnene, også er et peroksidaseenzym og vil gi falske høye verdier for det fargede produktet.

Etter det vi kjenner til er det hittil ikke brukt en konkurranse-ELISA med  
10 polyklonalt kaninantiserum kombinert med ALP til å måle fosterhemoglobin.

Med kitet vil det følge en håndbok som inneholder instruksjoner om prosedyre, eksakte volumer, fortynninger, konsentrasjoner, inkuberingstider og temperaturer for hvert trinn og hver reagens. Det vil også følge med forhånds-  
overtrukne mikrotiterplater, løsninger av oksyhemoglobin F eller «totalt» oksy-  
15 hemoglobin for overtrekking og en standard fortynningsserie, en løsning av leporint antihemoglobin F eller leporint anti-totalhemoglobin, en løsning av porkint anti-leporint IgG-ALP, en løsning av ALP-substrat og vannløsning A.

Oksyhemoglobin F og «totalt» oksyhemoglobin vil bli framstilt på laboratoriene våre som følger: Røde blodlegemer fra 50 ml humant navlestreng-  
20 blod (preparering av Hb-F) eller voksent blod (preparering av totalt Hb) isoleres ved sentrifugering (1200 G, 10 minutter) og vaskes 4 ganger med 10 volum fosfatbufret saltløsning (PBS, 10 mM fosfat, pH 7,4; 120 mM NaCl og 3 mM KCl). Blodlegemene ble lysert ved å resuspendere dem i hypoton buffer (20 volum H<sub>2</sub>O:1 volum PBS) på is. Membranene separeres fra cytosolen ved sentrifugering  
25 (14000 G, 20 minutter) og supernatanten dialysert 3 ganger mot 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 i 4 °C. Tohundre ml DEAE-sefarose (GE Healthcare) pakkes i en kolonne og den dialyserte supernatanten påføres gelen og separeres med gradient av 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 og 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 0,2 M NaCl. Det samles fraksjoner og absorbansen måles ved 280 nm, 577 nm og 630 nm for å identifisere  
30 og bestemme konsentrasjonen av oksyhemoglobin F eller totalt oksyhemoglobin

[Winterbourn, 1990]. Overtrekkingsløsningen og standardserien framstilles ved fortynning i vannløsning A.

Leporint anti-totalhemoglobin kjøpes fra Dako, Danmark, og leporint anti-hemoglobin F framstilles ved immunisering av kaniner med rensset  $\gamma$ -kjede av hemoglobin (Hb- $\gamma$ ) og årelate kaninene etter standardprotokoller. Immuniseringen og årelatingen gjøres ved et kommersielt institutt («tjenesteutsetting»). Hb- $\gamma$  separeres fra Hb-F ved laboratoriet vårt ved å dissosiere og separere  $\alpha$ - og  $\gamma$ -kjedene, hovedsakelig etter protokollene til Kajita et al. [1969] og Noble [1971]. 10 ml av en 3 g/ml løsning av hemoglobin F tilsettes kaliumfosfat (0,1 ml 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) og natriumklorid (0,2 ml 2 M NaCl). Femti mg *p*-merkuribenzoat løses i 0,2 ml 1 M NaOH og løsningen tilsettes 1 ml vann. Disse to løsningene blandes, titreres nøye med 1 M eddiksyre til pH 4,5 og settes kaldt til sakte omrøring over natten. Neste morgen justeres pH til 7 med 1 M NaOH og blandingen sentrifugeres (5000 G, 10 minutter, 10 °C). Pelleten kastes og supernatanten dialyseres mot 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Den dialyserte prøven føres så gjennom en 10 ml DEAE-sefarosekolonne (GE Healthcare), som var forhåndskalibrert med 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Etter at prøven er ført inn, skylles kolonnen først med 50 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 og så med en saltbuffergradient som består av 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 og 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 0,2 M NaCl. Prøveinnføringen, vaskingen og gradientelueringen gjøres med en gjennomstrømming på 40 ml/time, og det samles 3 ml fraksjoner. Konsentrasjonene av  $\alpha$ - og  $\gamma$ -kjeden for hver av de eluerte fraksjonene blir så evaluert ved lysabsorbans ved 415 nm, SDS-PAGE, ublandet PAGE og aminoterminal aminosyresekvensering. Fraksjoner som inneholder ren  $\gamma$ -kjede slås sammen, tilsettes 2-merkaptoetanol opp til 50 mM for å dissosiere *p*-merkuribenzoatet fra halvcysteinene. Så fjernes *p*-merkuribenzoatet fra proteinet ved avsalting på en Sephadex G-25-kolonne (PD-10, GE Healthcare) eluert med 0,1 M natriumfosfat, pH 7,5 + 50 mM 2-merkaptoetanol. Endelig blir de eluerte proteinfraksjonene dialysert mot 0,1 M natriumfosfat, pH 7,5.

Porkint anti-leporint IgG-ALP kjøpes fra Sigma, mens substratløsningen og vannløsning A lages til ved laboratoriet vårt av kjemikalier som fås i handelen.

Alternativt kan fosterhemoglobin-ELISA være en ELISA av sandwich-typen med et monoklonalt eller polyklonalt antistoff mot Hb- $\gamma$  for å overtrekke den kliniske prøven med passende fortykning eller en standard fosterhemoglobinserie i inkubasjonstrinn 1 og en leporin antihemoglobin-ALP i det andre

5 inkuberingstrinnet.

Alternativt kan det brukes en proteinbrikke overtrukket med et monoklonalt antistoff mot Hb- $\gamma$  i diagnosekitet som organ for å måle konsentrasjonen av fosterhemoglobin i de kliniske prøvene.

Ang. v) stoffer og sammensetninger til bruk ved forebygging og/eller  
10 behandling av PE

I henhold til funnene som rapporteres her, at fritt fosterhemoglobin er en indikator på PE og at en senkning i Hb F-konsentrasjonen (eller Hb-konsentrasjonen i allmennhet) sannsynligvis reduserer eventuell progresjon av sykdommen, tas det i betraktning at alle stoffer som har i) evnen til å hemme produksjon av fritt Hb (fritt  
15 Hb F eller ethvert annet Hb), ii) evnen til å binde fritt Hb (fritt Hb F eller ethvert annet Hb) eller iii) evnen til å redusere konsentrasjonen av sirkulerende fritt Hb (fritt Hb F eller ethvert annet Hb), ville være et potensielt stoff for effektiv behandling og/eller forebygging av PE. Derfor tilveiebringes det i et annet aspekt av oppfinnelsen bruk av minst ett medlem valgt fra gruppen som består av  
20 hemoglobinbindende midler, hembindende/-nedbrytende midler, jernbindende midler, midler som stimulerer hemoglobinnedbrytning, hemnedbrytning og/eller jernsekvestrering, og/eller midler som hemmer hematopoese i morkaken, for å behandle PE. Dessuten tilveiebringes det bruk av et slikt stoff til å produsere et farmasøytisk preparat for behandling eller forebygging av preeklampsi.

25 Uttrykket «behandling eller forebygging» med forskjellige grammatiske variasjoner står i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen for å forebygge, helbrede, reversere, tynne ut, lindre, hemme, minimalisere, undertrykke eller stoppe (1) skadevirkningene av preeklampsi, (2) sykdomsprogressjonen, eller (3) årsaksagensen for sykdommen.

30 Hemoglobin er avgjørende viktig for oksygeneringen, men fritt hemoglobin i blodsirkulasjonen er giftig for vevet fordi det forandrer den vaskulære redoksbalansen under selvoksidasjonen av hem fra jern(II)-tilstanden til jern(III)

[Motterlini et al., 1995] og kanskje ved at de innfører frie radikaler med globinsenter [Svistunenko et al., 1997].

Søkerne foreslår at økt konsentrasjon av fritt hemoglobin i blodet til kvinner med preeklampsi ikke bare fungerer som markør for sykdommen, det er  
5 også ansvarlig eller delansvarlig for sykdomsmanifestasjonene man ser til vanlig hos disse pasientene. Derfor er fritt hemoglobin også en målkandidat for behandling av preeklampsi. Selv om fritt fosterhemoglobin regnes som markør for PE, tas det i betraktning at reduksjon av fritt hemoglobin i allmennhet (dvs. både fosterhemoglobin og mindre spesifikk hemoglobin som f.eks. voksent hemoglobin)  
10 vil redusere progresjonen til et minimum eller behandle PE.

I en bestemt realisering av dette aspektet er det hemoglobinbindende midlet og/eller hembindende midlet alfa-1-mikroglobulin. Nedenfor omtales dette midlet som alfa-1-mikroglobulin eller  $\alpha_1$ -mikroglobulin, med forkortelsen  $\alpha_1$ m. Andre navn på dette stoffet som er brukt i den vitenskapelige litteraturen er protein  
15 HC (engelsk: «heterogenous in charge» eller «human complex-forming»), AMBP-protein og alfa-1-mikroglykoprotein, og disse navnene er synonyme med  $\alpha_1$ m.

I en bestemt realisering av dette aspektet er det hemoglobinbindende midlet og/eller hembindende midlet et antistoff mot hemoglobin og/eller hem.

Altså tilveiebringes også en framgangsmåte for å behandle eller  
20 forebygge preeklampsi, som innbefatter å gi en pasient som trenger slik behandling eller forebygging en effektiv mengde av ett eller flere slike midler som er nevnt ovenfor, inkludert minst ett medlem valgt fra gruppen som består av hemoglobinbindende midler og/eller hembindende midler og/eller jernbindende midler, midler som stimulerer hemoglobinnedbryting og/eller hemnedbrytning  
25 og/eller jernsekvestrering, og midler som hemmer hematopoese i morkaken. Midlet kan gjerne gis i form av en farmasøytisk sammensetning som innbefatter virkestoffet i kombinasjon med ett eller flere farmasøytisk aksepterbare hjelpestoffer.

Dessuten tilveiebringes det bruk av minst ett medlem valgt fra gruppen  
30 som består av hemoglobinbindende midler og/eller hembindende eller hemnedbrytende midler, midler som stimulerer hemoglobinnedbryting og/eller hemned-

brytning og/eller jernsekvestrering, og midler som hemmer hematopoese i morkaken, til å produsere en farmasøytisk sammensetning for å behandle eller forebygge preeklampsi, og en framgangsmåte for å behandle eller forebygge preeklampsi som innbefatter å gi en pasient som trenger slik behandling eller  
5 forebygging en effektiv mengde av en farmasøytisk sammensetning som innbefatter minst ett medlem valgt fra gruppen som består av hemoglobinbindende midler og/eller hembindende eller hemnedbrytende midler, midler som stimulerer hemoglobinnedbryting og/eller hemnedbrytning og/eller jernsekvestrering, midler som stimulerer hemoglobinnedbryting og/eller hemnedbrytning og/eller jern-  
10 sekvestrering, og midler som hemmer hematopoese i morkaken. I disse aspektene er målet å senke mengden av fritt hemoglobin og hemoglobins nedbrytningsprodukt hem, for eksempel i maternelt blod, for å forebygge vevsskader og videre progresjon av sykdommen.

De hemoglobinbindende midlene og/eller hembindende/-nedbrytende  
15 midlene er forbindelser som viser hemoglobin- og/eller hembindende/-nedbrytende egenskaper. De jernsekvestrerende midlene er forbindelser som binder fritt jern og hindrer at det deltar i redoksreaksjoner.

I en realisering er det hemoglobinbindende og/eller hembindende/-nedbrytende midlet  $\alpha_1m$ . Dette lille plasma- og vevsprotein er en hembinder  
20 [Allhorn et al., 2002, Larsson et al., 2004] og radikalfjerner [Åkerström et al., 2007] og en hemnedbrytende form,  $t\text{-}\alpha_1m$ , dannes ved proteolytisk fjerning av et C-terminalt tetrapeptid, LIPR, når  $\alpha_1m$  blandes med fritt hemoglobin [Allhorn et al., 2002]. Det kan også bindes til hemoglobin i morkaker (se nedenfor). Fritt hemoglobin og reaktive oksygenforbindelser fører til økt produksjon av  $\alpha_1m$  i leverceller  
25 og blodlegemer [Olsson et al., 2007]. Derfor er  $\alpha_1m$  en potensiell hem- og hemoglobinantagonist som kan beskytte mot hem- og hemoglobinskader på celler og vevskomponenter. Eksempel 5.4–5.7 gir mer belegg for dette. Eksempel 5.4 viser at preeklampsiske pasienter reagerer på sykdommen ved å øke konsentrasjonen av  $\alpha_1m$ , eksempel 5.5 viser at  $\alpha_1m$  hemmer og reparerer oksidative skader på  
30 celler og vev som skyldes hem, eksempel 5.6 beskriver en in vitro-modell av morkaken der tester av terapeutika kan gjøres ett skritt nærmere in vivo-tester, mens eksempel 5.7 viser at hemoglobin bindes av  $\alpha_1m$  i morkakevev.

Andre agenser som overveies å være potensielle virkestoffer for behandling eller forebygging av PE er følgende:

### **Hemoglobinbindere:**

#### *Antistoffer*

- 5 Det kan utvikles monoklonale antistoffer med sterk binding av hemoglobin og blokkering av den enzymatiske redoksaktiviteten til hemoglobin. Antistoffene kan produseres ved immunisering in vivo eller in vitro eller velges fra bibliotek som eksisterer på forhånd. Antistoffene kan velges for spesifikk aktivitet mot alfa-, beta-, delta- eller gammaglobinkjeder eller mot vanlige deler av disse globin-
- 10 kjedene. Antistoffene kan modifiseres for å gjøre dem egnet for behandling av mennesker, dvs. forsynes med en human immunoglobulinramme. Alle deler av antistoffene kan brukes: Fv- eller Fab-fragmenter eller hele immunoglobuliner.

#### *Haptoglobulin*

- Haptoglobulin er et glykoprotein som finnes i blodplasma. Det eksisterer tre former
- 15 av haptoglobin, Hp1-1, Hp2-1 og Hp2-2. Alle formene bindes til hemoglobin slik at det dannes et Hp-Hb-kompleks. Hb-Hp-komplekset har svakere enzymatisk redoksaktivitet enn fritt hemoglobin og gir derfor mindre oksidativ skade. Binding til Hb hindrer for eksempel tap av jern fra hemgruppen.

#### *CD163*

- 20 CD163 er en utplukkingsreseptor som finnes på makrofager, monocytter og det retikuloendoteliale systemet på innsiden av blodårene. Reseptoren kjenner igjen Hp-Hb-komplekset og formidler endocytose og levering av komplekset til lysosomene, nedbryting ved HO-1 (se nedenfor) og sekvestrering av fritt jern med cellulært ferritin. CD163 bidrar derfor til å eliminere oksidativt stress som skyldes
- 25 hemoglobin.

### **Hembindende/-nedbrytende midler:**

#### *Hemopeksin*

- Hemopeksin er et glykoprotein (60 kDa) som finnes i humant blodplasma og som eliminerer fritt hem fra blodplasma ved å binde det sterk ( $K_d$  ca. 1 pmol/l) og
- 30 transportere hemet til leveren for nedbryting i det retikuloendoteliale systemet.

### *Hem-oksygenase*

Hemoksygenase er et cellulært hembindende og hemnedbrytende kompleks som omdanner hem til biliverdin, karbonmonoksid og fritt jern. Jernet sekvestreres av cellulært ferritin og biliverdin reduseres av biliverdinreduktase til bilirubin som til  
5 slutt skilles ut i urinen. Det er beskrevet tre former av hemoksygenasegener, med svært forskjellig struktur, HO-1, HO-2 og HO-3. HO-1 er det viktigste. Dette genet oppreguleres av hemoglobin, fritt hem, hypoksi, frie radikaler, ROS (reaktive oksygenforbindelser) og mange forskjellige inflammasjonssignaler i nesten alle cellene i kroppen. HO-1 er en sterk antioksidant fordi det eliminerer oksidasjons-  
10 midlene hem og jern, men også fordi det produserer bilirubin, som har antioksid-erende virkninger mot noen oksidasjonsmidler.

### *Albumin*

Albumin er et protein på 66 kDa i humant blodplasma som kan binde hem. Det er ingen belegg for at albumin-hem-komplekset tas opp og brytes ned i cellene, og  
15 virkningen av albumin er trolig at det fungerer som det depot for hem og dermed hindrer at det får tilgang til endotelcellemembraner, basalmembraner i blodårene m.m.

### **Jernbindere:**

#### *Transferrin*

20 Transferrin er den viktigste jerntransportøren i blodet. Transferrin-jern-komplekset gjenkjennes og bindes av cellereseptorer som tar inn og dissosierer komplekset.

#### *Ferritin*

Dette multimere proteinet, som består av 24 underenheter av to typer, er det viktigste intracellulære depotet for fritt jern. Det har høy lagringskapasitet for jern,  
25 4500 jernatomer/ferritinmolekyl. Når det er bundet til ferritin er jernet stort sett forhindret fra å delta i oksidasjons- og reduksjonsreaksjoner, og dermed fra å forårsake oksidative skader.

I en annen realisering er det hemoglobinbindende midlet et antistoff mot hemoglobin og/eller hem.

I spesifikke realiseringer innbefatter det farmasøytiske preparatet en kombinasjon av hemoglobinbindende midler og/eller hembindende midler og/eller jernsekvestrerende midler.

Midler som stimulerer nedbryting av hemoglobin og/eller hem omfatter,  
5 men er ikke begrenset til, proteiner som haptoglobin, hemopreksin og hem-  
oksygenase.

De farmasøytiske preparatene kan gis til et «placentalt» pattedyr, som et menneske, andre primater eller pattedyr som brukes i matproduksjonen. Et foretrukket dyr å gi dem til er et menneske eller et økonomisk verdifullt dyr eller  
10 bufe.

Medisineringen kan utføres på forskjellige måter som er avhengige av hvilket dyr som skal behandles, av tilstanden til dyret som trenger den nevnte behandlingen og den spesifikke indikasjonen som skal behandles. Preparatene kan gis oralt, rektalt, parenteralt eller gjennom en nasogastrisk sonde. Eksempler  
15 på parenteral medisinering er intravenøs, intraperitoneal, intramuskulær eller subkutan injeksjon.

Formulering av det farmasøytiske preparatet må velges ikke bare ut fra farmakologiske egenskaper ved virkestoffet men også ut fra de fysisk-kjemiske egenskapene og medisineringsmåten. Fagfolk er godt kjent med forskjellige  
20 framgangsmåter for å formulere farmasøytiske preparater.

For parenterale sammensetninger foretrekkes flytende sammensetninger eller faste sammensetninger som utformes for å rekonstitueres f.eks. med et vandig medium før bruk. Egnede hjelpestoffer omfatter: løsningsmidler (f.eks. vann, vandig medium, alkoholer, vegetabilske oljer, lipider, organiske  
25 løsningsmidler som propylenglykol eller liknende), midler som justerer det osmotiske trykket (f.eks. natriumklorid, mannitol eller liknende), midler som øker løseligheten, pH-justerende midler, konserveringsmidler (hvis aktuelt), midler som øker opptaket osv.

Orale sammensetninger kan være i fast, halvfast eller flytende form.  
30 Egnede sammensetninger omfatter faste doseringsformer (f.eks. tabletter,

inkludert alle slags tabletter, poser og kapsler), pulver, korn, pellets, perler, sirup, miksturer, suspensjoner, emulsjoner eller liknende.

Egnede hjelpestoffer omfatter f.eks. fyllstoffer, bindemidler, nedbrytningsmidler, smøremidler osv. (for faste doseringsformer eller sammensetninger i fast form), løsningsmidler som f.eks. vann, organiske løsningsmidler, vegetabiliske oljer osv. for flytende eller halvfaste former. Dessuten kan det brukes andre tilsetninger som pH-justerende midler, smaksmaskerende midler, smaksstoffer, stabilisatorer osv.

Dessuten kan det brukes spesifikke bærere for å dirigere virkestoffet til en spesifikk del av kroppen. For eksempel et antistoff-  $\alpha_1\text{m}$ -kompleks der antistoffet søker til morkaken («målsøkende») fordi det er spesifikt for en morkake-epitope, en stamcelle eller en rekombinant celle med morkakemålsøkende egenskaper, f.eks. integrinreseptorer som er spesifikke for morkaken og med kunstig eller naturlig evne til å skille ut store mengder  $\alpha_1\text{m}$ . Behandlingen vil være mer effektiv hvis legemidlet konsentreres i morkaken.

Uttrykket «effektiv mengde» står i den foreliggende oppfinnelsen for en mengde som gir terapeutisk effekt for en gitt sykdom og medisineringsregime. Dette er en forhåndsbestemt mengde av virkestoff som er beregnet å gi en ønsket terapeutisk effekt sammen med de nødvendige tilsetningene og fortynningsmidlene, dvs. en bærer, eller medisineringshjelpemiddel. Dessuten er det meningen at det skal bety en mengde som er tilstrekkelig til å redusere og helst forebygge en klinisk signifikant mangel i aktiviteten og responsen til verten. Alternativt er en terapeutisk effektiv mengde tilstrekkelig til å gi en forbedring i en klinisk signifikant tilstand hos en vert. Det vil være klart for fagfolk at mengden av en forbindelse kan variere med den spesifikke aktiviteten. Egnede doseringsmengder kan inneholde en forhåndsbestemt mengde av den aktive sammensetningen som er beregnet å gi den ønskede terapeutiske effekten sammen med de nødvendige fortynningsmidlene, altså bærer eller tilsetningsstoff. Dessuten vil dosen som gis variere med det aktive prinsippet eller prinsippene som brukes, alderen, vekten osv. til pasienten som skal behandles, men vil vanligvis ligge i intervallet fra 0,001 til 1000 mg/kg kroppsvekt/dag. Dessuten er dosen avhengig av medisineringsmåten.

Ang. vi) HLA-DPA1 som biomarkør

En annen bekjentgjørelse dreier seg om observasjonen av at fosterceller kan utløse morens immunrespons, siden de er forskjellige. Rollen til HLA-genfamilien er å presentere fremmede antigener til morens immunsystem. Kvinner som  
5 uttrykker HLA-DPA1-genet kan «se» fostercellene på et tidlig stadium, og dette kan bidra til å beskytte dem mot ytterligere skader. (I studiene som rapporteres her har vi sett at kvinner med notch som ikke utvikler PE, uttrykker HLA-DPA1.)

Altså kan HLA-DPA1 brukes som indirekte indikator for fosterhemo-  
globin og/eller for PE. I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen  
10 tilveiebringes det dermed en framgangsmåte for prognose av preeklampsi som innbefatter følgende trinn: (a) ta en biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr, (b) måle konsentrasjonen av humant leukocyttantigen DPA1 (HLA-DPA1) i den nevnte biologiske prøven, og (c) sammenlikne konsentrasjonen av HLA-DPA1 i  
15 prøven med en referanseverdi. Det overveies at hvis de ovennevnte HLA-sammensetningene er til stede, har kvinnen sannsynligvis mindre risiko for å utvikle PE (med eller uten fritt foster-Hb), mens hvis kvinnen ikke har dette beskyttende HLA-et, har hun høyere risiko, spesielt hvis konsentrasjonen av fritt foster-Hb også stiger.

I en viss realisering av dette aspektet utføres trinnene (a) til (c) for å  
20 bestemme om det nevnte drektige hunndyret har økt risiko for å utvikle preeklampsi eller ikke, eller har økt risiko for å utvikle en alvorlig form for preeklampsi eller ikke.

I en viss realisering av dette aspektet indikerer høy uttrykking av HLA-DPA1 bedre prognose enn ingen uttrykking av HLA-DPA1.

25 Det bekjentgjøres et analysekit for prognose eller bidrag til prognose av preeklampsi i henhold til framgangsmåten for prognose av preeklampsi i henhold til oppfinnelsen, som innbefatter organ for å detektere konsentrasjonen av HLA-DPA1 i en biologisk prøve fra en drektig hunnpattedyr og instruksjoner for bruk av nevnte detekteringsorgan.

30 Den foreliggende oppfinnelsen beskrives i mer detalj nedenfor.

### KORT BESKRIVELSE AV ILLUSTRASJONENE

Figur 1 viser en utvidet modell av utviklingen av preeklampsi, ut fra funn av Hb-F og Hb-A i morens blodplasma, og understreker framkomsten av Hb-F og Hb-A og mulig bruk av dem som markører for forskjellige stadier av sykdommen.

5                    Figur 2 A viser morkaken tidlig i svangerskapet (ultralud), B viser sirkulasjonen av fosterblod i morkaketottene, som går ned i det intervilløse rommet som er fylt med morens blod og C viser den minste funksjonelle enheten – totter med fosterblodsirkulasjon.

10                    Figur 3 A viser fosterblodsirkulasjonen i morkaketottene som går ned i det intervilløse rommet som er fylt med det mindre oksygenerte blodet til moren (mørkere), B viser apoptose (ovale prikker) i morkakeceller-trofoblaster, som skyldes reaktive oksiderende forbindelser (ROS), og C viser at blod/morkakebarrieren er skadd.

15                    Figur 4 viser resultater fra sanntids PCR-kvantifisering av mRNA for Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$ , Hb $\beta$  og HLA-DPA1 i morkaken.

Figur 5 viser bilder av hybridiseringer på stedet i prøver fra humane morkaker og morkakesetet.

Figur 6 er et representativt bilde av Hb $\gamma$ -proteinuttrykking i morkaken.

20                    Figur 7 viser et spredningsplott for konsentrasjonen av mRNA for Hb $\gamma$  i maternelt plasma tatt før forløsningen fra kvinner med PE, kvantifisert ved sanntids PCR. Plottet viser Ct-verdien på aksene til venstre og gir et estimat av størrelsen på konsentrasjonen av mRNA for Hb $\gamma$  i prøven.

25                    Figur 8 viser representative gelbilder for Hb $\delta$ . A) PE-prøve der Hb $\delta$ -flekken er klart synlig (pilen). B) Gel fra en kontrollprøve der Hb $\delta$ -flekken mangler (sirkelen).

Figur 9 viser verdier for mRNA for Hb $\delta$  i morkaker kvantifisert ved qPCR vist i et spredningsplott.

Figur 10 viser bilder tatt lokalt av en preeklamptisk morkake som uttrykker mRNA for Hb $\delta$ .

Figur 11. Lokal hybridisering fra prøver av morkaken og morkakesetet (bildet til venstre). Mørkfeltbilde av uttrykkingen av hemoglobin-mRNA i en representativ preeklamptisk morkakeprøve og kontroll. Uttrykkingen av hemo-  
globin-mRNA ble sett spesielt i og rundt blodårene (pilhodene). Ved PE ser man flere spredte celler i det intervilløse rommet. Immunhistokjemien (bildet til høyre) viser oppsamling av fritt fosterhemoglobin (pilen) inne i (lu) morkakeblodårene.

Figur 12. Totale hemoglobinkonsentrasjoner i plasma fra kvinner med preeklamptiske (n = 30) og normale svangerskap (n = 30). Konsentrasjonene ble målt ved ELISA med antistoffer mot voksent hemoglobin (Hb-A) og plasmaet ble fortynnet 1000 ganger.

Figur 13. Bestemmelse av Hb-F ved western blotting i plasma fra to pasienter med preeklampsi (PE 1 og 2) og to kontrollindivider med normale svangerskap (kontroll 1 og 2). Plasmaprøvene ble behandlet med albumin-ekstraksjonskuler som beskrevet og så brukt (15  $\mu$ l) ufortynnet i SDS-PAGE/-western blotting. For å kunne estimere konsentrasjonene i  $\mu$ g/ml brukte man 0,1  $\mu$ g rensset Hb-F i en separat bane («renset Hb-F»).

Figur 14. Fosterblodsirkulasjonen med hemoglobinproduserende celler (hvite ovaler med svart prikk). På grunn av skader på morkakebarrieren lekker fosterceller inn i det intervilløse rommet og dermed inn i blodsirkulasjonen til moren.

Figur 15. Totale  $\alpha_1$ m-konsentrasjoner i plasma fra kvinner med preeklamptiske svangerskap (n = 30) og normale svangerskap (n = 30). Konsentrasjonene ble målt ved RIA med plasma fortynnet 500 ganger.

Figur 16. A. Cellebeskyttende egenskaper ved  $\alpha_1$ m mot hem- og ROS-oksidasjon. K562-celler ble merket med den oksidasjonsfølsomme proben H2DCFDA, vasket og inkubert med  $\alpha_1$ m (2, 5 eller 10  $\mu$ M), AGP (2, 5 eller 10  $\mu$ M) eller askorbat (10  $\mu$ M) og så tilsatt 10  $\mu$ M hem. Cellene ble inkubert i 2 timer og analysert ved FACS. B. K562-celler ble dyrket med  $\alpha_1$ m (2, 5 eller 10  $\mu$ M) eller et

kontrollprotein ( $\alpha_1$ -surt glykoprotein, AGP) (10  $\mu$ M) og så tilsatt 200  $\mu$ M hem og dyrket i 4 timer. Cellesuspensjonen ble tatt vare på, blandet med propidiumjodid og analysert ved FACS.

Figur 17. Reduksjon av karbonylgrupper på oksidert kollagen med  $\alpha_1$ m.

- 5 Kollagen, overtrukket på mikrotiterplater, ble oksidert ved inkubering med 50  $\mu$ M hem i 17 timer. Etter vasking ble det tilsatt 0,1, 0,3 eller 1  $\mu$ M  $\alpha_1$ m, ovalbumin eller askorbat, med påfølgende inkubering i 2 timer. Karbonylgruppene ble analysert ved ELISA. Hver kolonne representerer gjennomsnittet av triplikater  $\pm$  SE.

Figur 18. Fjerning av cellehem med  $\alpha_1$ m. Humane erytroleukemiske

- 10 celler (K562) ble dyrket enten med buffer eller 10  $\mu$ M hem i 30 minutter, vasket og resuspendert i friskt dyrkingsmedium. A: Cellene ble så inkubert med  $\alpha_1$ m (2 eller 10  $\mu$ M) i 2 timer og så ble dyrkingsmediet tatt vare på. Cellene ble vasket og løseliggjort ved å suspendere dem i en buffer som inneholdt 1 % NP-40. Dyrkingsmediet og celsuspensjonen ble så analysert spektrofotometrisk ved å  
15 lese absorbansspektrene (300–700 nm). B: De forskjellige kulturene ble også analysert visuelt. Cellene ble inkubert enten med buffer eller 10  $\mu$ M hem i 30 minutter (trinn 1), vasket også inkubert med buffer, 10  $\mu$ M  $\alpha_1$ m eller 10  $\mu$ M AGP i 2 timer (trinn 2), vasket og løseliggjort som beskrevet ovenfor.

Figur 19 viser in vitro-perfusjon av en «frisk» morkake i 120 minutter

- 20 med en Hb-A-løsning (2 mg/ml) på fostersiden (tomme symboler) og bare buffer på morssiden (fylte symboler) («1. perfusjon») og i 120 minutter på begge sider med bare buffer («2. perfusjon»). Det ble tatt prøver regelmessig og konsentrasjonene av Hb-A målt med ELISA (diagrammet til venstre), av  $\alpha_1$ m med RIA (diagrammet til høyre) og av foster-Hb-A med western blotting (bildet til høyre).

Figur 20 viser SDS-PAGE og western-blotting av et hemoglobin-  $\alpha_1$ m-

- 25 kompleks isolert fra morkakevev. En morkake fra en frisk donor ble homogenisert og sentrifugert ved 100 000 G i 60 minutter. Supernatanten ble ført inn i en anti- $\alpha_1$ m Affigel-kolonne som ble gjennomskylt og eluert med 0,1 M glycin-HCl, pH 2,3. Eluatet ble separert ved SDS-PAGE, som enten ble farget med Coomassie (de  
30 to banene til venstre) eller overført til PVDF-membraner og blottet med anti- $\alpha_1$ m eller anti-Hb-A.

Figur 21 viser resultatet fra Tanzania-studien. Figuren viser totalt hemoglobin ( $\mu\text{g/ml}$ ) i urin før forløsning.

Formålet med de følgende eksemplene er å illustrere den foreliggende oppfinnelsen. Det må imidlertid være klart at det ikke er meningen å innskrenke  
5 oppfinnelsen til de spesifikke forholdene og detaljene som beskrives i disse eksemplene.

### **Eksempel 1**

#### **Detektering av Hb-RNA og protein i morkaken**

Det ble utført kvantitativ RT-PCR, lokal hybridisering og immunhistokjemi for å  
10 analysere mRNA for Hb $\alpha$ , Hb $\beta$  og Hb $\gamma$  og proteinuttrykking i morkakeprøver fra PE-pasienter og kontroll.

#### *Prøvetaking*

Placentavevet ble samlet ved Avdelning för obstetrik och gynekologi, Skåne Universitetssjukhus i Lund. Prøvetakingen, som ble gjort med skriftlig samtykke,  
15 ble godkjent av gjennomgangsstyret til den etiske komiteen for studier på menneskelige forsøkspersoner. Morkakevev fra 10 preeklampiske og 15 normale svangerskap, 5 pasienter med tosidig notch og 5 pasienter med både tosidig notch og preeklampsi ble tatt med i studien. Det ble også tatt prøver av morkakesetet (se nedenfor) fra 5 av pasientene med PE og 5 av kontrollene. Preeklampsi ble  
20 definert som blodtrykk  $>140/90$  mmHg og proteinuri  $>0,3$  g/l. Pasienter med essensielt høyt blodtrykk eller andre systemiske sykdommer ble utelukket. Morkakeprøvene ble tatt ved fødselen, frosset ned straks og oppbevart ved  $-80$  °C.

#### *Vevsprøver og håndtering av disse*

25 Det ble tatt morkakeprøver straks etter forløsningen. Det ble fjernet en  $10 \times 10 \times 10$  mm terning av tottvev fra den sentrale delen av morkaken, mens makroskopiske nekrose- og infarktomer ble unngått.  $10 \times 10 \times 10$  mm terninger av myometriumvev ble tatt fra kvinner som fikk keisersnitt. Prøvene ble straks frosset ned på tørris og oppbevart ved  $-80$  °C inntil det ble tatt ut RNA. Vevet ble ikke tint  
30 før RNA-uttaket eller snittskjæringen for å sikre mest mulig intakt RNA.

### *Uttak av RNA*

Totalt RNA ble tatt ut fra frosset vev ved hjelp av Trizol® (Invitrogen) i henhold til produsentens instruksjoner. Proteoglykan og polysakkarid ble fjernet ved å utføre en felling med høy saltkonsentrasjon ved hjelp av 0,8 M natriumsitrat og 1,2 M natriumklorid. Integriteten til RNA-et ble bekreftet ved å denaturerende 1 % agarosegelelektroforese med 6,7 % formalin og 1X MOPS-buffer. Prøvene ble oppbevart i RNAase-fritt vann ved -80 °C inntil de skulle brukes. Før bruk ble prøvene felt igjen og vasket med 70 % etanol for å fjerne Trizol-rester.

### *Sanntids PCR-forsterking*

cDNA ble framstilt med omvendt transkriptase etter protokoller fra Applied Biosystems. Det ble brukt en 50 µl reaksjonsblanding som inneholdt 0,5 µg totalt RNA, 1X TaqMan RT-buffer, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM dNTP-er, 2,5 µM tilfeldige heksamerer, 0,4 U/µl RNAase-hemmer og 1,25 U/µl MultiScribe omvendt transkriptase. Reaksjonsblandingene ble inkubert ved 25 °C i 10 minutter, ved 48 °C i 30 minutter og til slutt 5 minutter ved 95 °C. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C inntil analysen.

Gentranskriptene ble analysert ved sanntids PCR med ABI PRISM® 7000 sekvensdetekteringssystem (Applied Biosystems). Primere og sonder ble utformet ved hjelp av Primer Express®-programmet eller bestilt fra Assays on-Design/-Demand™ (Applied Biosystems). Primerne var spesifikke for forskjellige eksoner av de aktuelle genene for å unngå å forsterke forurensende genomisk DNA. Reaksjonene ble utført i et 25 µl endelig volum som inneholdt: 1 Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,25 µmol/l sonde, 0,9 µmol/l av hver av forover- og bakoverprimerne og 1 µl av 10 ng/µl av en DNA-porsjon. De termiske sirkuleringsforholdene ble startet ved UNG-aktivering ved 50 °C i 2 minutter og en første denaturering ved 95 °C i 10 minutter. Så ble det kjørt 40 sykluser: 95 °C i 15 sekunder, 60 °C i 1 minutt. To negative kontroller uten mal ble tatt med i alle settene av forsterkninger. Som referanse for å normalisere signalet fra prøven ble det brukt β-aktin. Kvantifiseringen ble oppnådd ved å lage en kalibreringskurve ved hjelp av seriell 4 gangers fortykning av DNA-malen (0,08–80 ng). Resultatene er uttrykt som forholdstall med β-aktin som nevneren.

### *Lokal hybridisering (ISHH)*

Hybridiseringene ble utført som beskrevet tidligere i [Hansson et al., 2005].

Kryostatsnitt ble montert for tining på sialiniserte preparatglass som ble oppbevart ved  $-80^{\circ}\text{C}$  til de skulle brukes. Ferskt frossent vev ble brukt for maksimal mRNA-detektering. Snittene ble fiksert, dehydrert, delipidert og hybridisert som beskrevet tidligere [Bradley et al., 1992]. Hybridiseringene ble utført i 20–24 timer ved  $55^{\circ}\text{C}$  med  $2 \times 10^6$  cpm av denaturert 35S-cRNA-sonde per 80  $\mu\text{l}$  hybridiseringsbuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0), 300 mM NaCl, 50 % formamid, 10 % dekstransulfat, 1 Denhardts 25 mg/ml gjærceelle-tRNA, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lakseseed-DNA, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  totalt gjærceelle-RNA (fraksjon XI, Sigma), 150 mM ditiotreitol (DTT), 0,15 % natriumtiosulfat (NTS) og 0,15 % natriumdodekylsulfat (SDS). Etter vaskingene ble preparatglassene satt på Kodak Hyperfilm Biomax MR i 2 dager og så overtrukket med kjernesporeremulsjon (NTB-3, Kodak). Preparatglassene ble eksponert i henholdsvis 3 (Hb $\alpha$ 2, Hb $\gamma$ 2) og 4 (Hb $\beta$ ) uker ved  $4^{\circ}\text{C}$  og så framkalt i Dektol (Kodak), fiksert og kontrafarget med Giemsa-farge.

### *Immunhistokjemi*

14  $\mu\text{m}$  tykke ferske frosne snitt av morkakeprøvene ble fiksert ved å senke dem ned i 4 % bufret formaldehyd i 10 minutter ved romtemperatur. Snittene ble så inkubert i en blokkeringsløsning (Powerblock, Zymed) i 30 minutter ved romtemperatur. Etter PBS-vaskingene ble snittene overført til en 1:500 fortynning av et antistoff mot humant foster-Hb (Bethyl Laboratories) som ble drevet fram i sauer. Etter en times inkubering ved romtemperatur ble snittene skylt og overført til en 1:1000 fortynning av et antistoff mot ovint CY3 drevet fram i esler (Jackson Laboratories) i en time ved romtemperatur. Snittene ble så skylt, lagt under dekkglass med 0,1 M Tris og studert under et Leica DMA 6000 omvendt fluorescensmikroskop. Det ble tatt bilder ved hjelp av Volocity-program.

### *Resultater*

Figur 4 viser sanntids PCR-kvantifisering av Hb $\alpha$ , Hb $\gamma$  og Hb $\beta$  i morkaken. Alle verdier er normalisert mot mengden av  $\beta$ -aktin og presentert i form av spredningsplott. (A) Uttrykking av mRNA for Hb $\alpha$  i morkaken. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom PE og kontroller ( $p = 0,004$ ) og mellom PE/notch (PE med notch) og kontroller ( $p = 0,003$ ). (B) Hb $\gamma$  i forhold til mRNA-verdier som viser vesentlige forandringer mellom PE og kontroll ( $p = 0,003$ ) og mellom PE/notch mot

kontroller ( $p = 0,03$ ). (C) Hb $\beta$  viste signifikant overuttrykking ved PE sammenliknet med kontroller ( $p = 0,02$ ) og ved PE/notch sammenliknet med kontroller ( $p = 0,04$ ).

Alt i alt ble konsentrasjonen av mRNA for Hb $\alpha$  ( $p = 0,004$ ), Hb $\gamma$  ( $p = 0,003$ ) og Hb $\beta$  ( $p = 0,02$ ) funnet å være signifikant høyere i PE-prøver enn i kontrollene (figur 4 A, B, C) og også i prøver fra PE med notch sammenliknet med kontrollene (Hb $\alpha$   $p = 0,02$ , Hb $\gamma$   $p = 0,03$  og Hb $\beta$   $p = 0,04$ ). (Hb $\beta$  er ikke representert i rekken, men ble undersøkt på grunn av registrerte endringer i Hb $\alpha$  og Hb $\gamma$ .)

Figur 5 viser resultater fra lokale hybridiseringer i prøver fra morkake og morkakesetet. Den viser bilder av den menneskelige morkaken som viser den vililøse delen (V) av morkaken og nedenfor et snitt av morkakesetet (M) med spiralarterier (S) mellom. (A) Et lysfeltbilde av uttrykkingen av mRNA for Hb $\alpha$  i en representativ preeklamptisk morkakeprøve. Hb $\alpha$ -uttrykkingen ble sett spesielt i og omkring blodårene. Men det ble også sett flere spredte celler i det interviliøse rommet. (B) Mørkfeltbilde av det samme snittet. (C) Et mørkfeltbilde av uttrykkingen av mRNA for Hb $\alpha$  fra en representativ kontrollmorkake. Sammenliknet med PE-morkakene viser kontrollmorkakene færre celler som uttrykker Hb $\alpha$  i det interviliøse rommet. (D) Lysfeltbilde fra en representativ myometriell prøve fra en PE-pasient. Hb $\alpha$ -uttrykkingen vises bare i spiralarteriene, og det er ingen uttrykking i det myometrielle vevet. (E) Det samme myometrielle snittet i mørkt felt. (F) Et myometrielt snitt fra en kontrollmorkake. Uttrykkingen av mRNA for Hb $\alpha$  likner uttrykkingen som man ser i PE-myometriet.

Alt i alt avslørte den lokale hybridiseringen celler med kjerne som uttrykker Hb $\alpha$  og Hb $\gamma$  spredt gjennom hele det interviliøse rommet både i PE- og kontrollprøvene. Morkaker fra PE-pasienter lot til å ha flere Hb-holdige celler enn kontrollprøvene (foster-Hb), og signalene per celle lot til å være sterkere enn i kontrollene. I flere av de undersøkte prøvene var Hb-positive celler forbundet med veggene til blodårene, med flere celler frie i karhulrommet. Mange enkeltceller ble funnet i det intraviliøse rommet. Morfologien, plasseringen og fordelingen deres tyder på at de ikke er trofoblaster.

Figur 6 er et representativt bilde av Hby-proteinuttrykkingen i morkaken. Proteinuttrykkingen vises med en rød fluorescerende markør. I PE-morkaken er det sterk uttrykking av Hby i blodårehulrommet (lu), men Hby uttrykkes også i blodåreendotelet (pilen) (A). Morkaken fra normotensive kontroller viste imidlertid ingen uttrykking av Hby i blodårehulrommet (B), men Hby (dvs. fritt fosterhemoglobin) uttrykkes i blodåreendotelet (pilen). Skalastolpene i bildet er 25  $\mu\text{m}$ .

Alt i alt ble Hby-uttrykkingen detektert spesielt inne i blodårene i morkaken i PE-morkakeprøver, men også nær endotelcellene i blodåreveggene. Kontrollmorkakeprøvene viste Hby-uttrykking i blodåreendotelet, men ingen uttrykking i blodårehulrommet.

### *Diskusjon*

Kvantitativ RT-PCR viste økt uttrykking av mRNA for Hb $\alpha$  og Hby hos PE sammenliknet med kontroll. Lokal hybridisering viste flere celler som uttrykte Hb i morkakeprøver fra PE-personer enn fra kontrollpersoner. At Hb-uttrykkende celler var lokalisert sammen med karvegger kan enten tyde på at cellene inn i eller ut av blodårene eller at det er bindingssteder på åreveggene for disse cellene. At myometriumårer har færre kjerneceller som uttrykker mRNA for Hb enn morkakeblodårer, som har mange av dem, tyder på at disse cellene kan ha ikke-maternelt opphav. Oppdagelsen vår at mRNA for (foster-)Hby finnes både i Hb-positive celler i morkaken og i de færre cellene som uttrykker Hb i hulrommet av myometriumårene, tyder på at det er fosterceller som er ansvarlige for den økte Hb-uttrykkingen man ser i PE-morkaker og i blodet.

Hvis de cellene vi har beskrevet som produserer foster-Hb har rask omsetning, kan du frigjøre høye konsentrasjoner av hem i det ekstraviliøse rommet og morkakeblodårene. Og immunhistokjemien vår viser også høye konsentrasjoner av hemoglobin i hulrommene til blodårene i PE-morkaker. Kontrollmorkakene viste derimot ingen frigjøring av hemoglobin i blodårene. I tillegg kan hemolyse i nekrotiske og trombotiske områder av PE-morkaken tilfører mer fritt hem der.

Fritt hem er et potensielt redoksmiddel som kan føre til store skader ved å danne reaktive oksygenforbindelser (ROS). Hem oksiderer flere lipider, blant annet lette lipoproteiner (LDL) og omdanner dem til cytotoksiske peroksider som skader endotelet. Hem kan også direkte skade cellemembraner ved å bryte dem opp og oksidere membranproteiner med mer gjennomtrengelige membraner og cytolyse som resultat.

Infiltrering av morkaken med mange Hb-positive celler (dvs. fosterceller) er altså et bekymringsfullt tegn. Hem som frigjøres fra disse cellene kan være ganske skadelig og kan være ansvarlig for mye av morkakepatologien som er forbundet med PE.

Som konklusjon, uten at vi ønsker å være bundet av en teori, antas det at funnene våre tyder på at Hb-gener er overuttrykt i en underpopulasjon av celler i den preeklampiske morkaken. Morkakecellers produksjon av midler som stimulerer hematopoese som respons på lavere perfusjon og kanskje lokal hypoksi kan bidra til dannelsen, rekrutteringen og fordelingen av cellene. Selv om de later til å være til stede i morkaken til personer med normale svangerskap, er økningen av dem i morkaker fra PE-pasienter bekymringsverdig. Hvis de omsettes raskt og frigjør for mye av Hb-et sitt (og hemet), kan de skade nabostrukturer, blant annet det vaskulære endotelet.

## Eksempel 2

### Detektering av foster-Hb i maternelt blod

Det ble utført kvantitativ RT-PCR for å analysere mRNA for Hby i blodprøver fra PE-pasienter.

#### *Sanntids PCR*

Det ble trukket ut RNA ved QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) etter produsentens instruksjoner. Kort fortalt ble 3,6 ml AVL-buffer blandet med 36 µl bærer-RNA (Qiagen) ved å vende røret 10 ganger. 1 ml av plasmaprøven ble rotert ved 1150 g i 10 minutter. AVL-bufferløsningen ble tilsatt 900 µl av plasmaet og 3,6 µl 99 % etanol. Omtrent 650 µl av løsningen ble tilført til en QIAamp-kolonne og rotert ved 6000 G i 1 minutt. Dette ble gjentatt inntil hele plasmavolumet var tilført til kolonnen. Kolonnen ble vasket en gang med AW1-buffer og så rotert ved

6000 G i 1 minutt før den ble vasket med AW2-buffer og så rotert ved 20 000 G i 3 minutter. RNA-et ble eluert med 50 µl RNAase-fritt vann.

RNA for foster-Hb ble kvantifisert ved sanntids PCR.

### *Resultater*

- 5 Figur 7 viser et spredningsplott for konsentrasjonen av mRNA for foster-Hby i maternelt plasma tatt før forløsningen fra kvinner med PE, kvantifisert ved sanntids PCR. Plottet viser Ct-verdien på venstre akse og gir et estimat på konsentrasjonen av mRNA for Hby i prøven. Dette viser at det ikke bare er mulig å måle proteinkonsentrasjonen av hemoglobin γ i maternelle blodprøver, men også  
10 mRNA-mengdene.

### **Eksempel 3**

#### **Profilering av proteinuttrykkingen i preeklampatisk morkake ved 2d-gelelektroforese**

- For å gjøre en utsilingsundersøkelse for proteiner som uttrykkes annerledes i PE-  
15 morkaken enn i kontrollmorkaker tok vi morkakeprøver ved forløsningen fra kvinner med PE (n = 30) og friske kontroller (n = 30). Ved proteomisk teknikk (2-dimensjonal gelelektroforese) sammenliknet vi uttrykkningsnivået av hemoglobin delta (Hbδ) i de forskjellige morkakeprøvene.

### *Pasienter og prøvetaking*

- 20 60 kvinner innlagt ved Avdelning för obstetrik och gynekologi ved Skåne Universitetssjukhus i Lund ble innlemmet og tilordnet to grupper: PE (n = 30) og kontroll (n = 30) (tabell 2). PE ble definert som blodtrykk >140/90 og proteinuri >0,3 g/l eller blodtrykksstigning over 20 mmHg fra første trimester av svangerskapet. Det ble tatt en 10x10x10 mm terning av morkakevev like etter  
25 fjerning av morkaken. Prøvene ble straks frosset på tørris og oppbevart ved -80 °C. Pasienter med andre systemiske lidelser ble utelukket fra studien. Studiene ble godkjent av forsøksstyret til den etiske komiteen for studier på menneskelige forsøkspersoner, og alle kvinnene ga skriftlig informert samtykke.

Tabell 2

|                             | Kontroll     | PE              |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| n                           | 30           | 30ns            |
| Mors alder (år)             | 31,7 ±5,2    | 30,9 ±5,3 ns    |
| Fosterets alder (dager)     | 271,3 ±10,8  | 266,6 ±11,2 ns  |
| Systolisk blodtrykk (mmHg)  | 116,3 ±11,3  | 149,8 ±12,1†    |
| Diastolisk blodtrykk (mmHg) | 67,3 ±4,4    | 103,3 ±7,9†     |
| Proteinuri (g/l)            | ND           | 1,4 ±2,0†       |
| Morkakevekt (g)             | 686,8 ±144,8 | 630,9 ±128,0 ns |

PE = preeklampsi

ND = ikke registrert

ns – ingen signifikant forskjell mellom gruppene

- 5 <sup>1</sup>Mann-Whitney-test viste signifikans på  $p < 0,0001$  mellom gruppene.

#### *Proteinuttrekk*

- Det ble trukket ut protein ved hjelp av Trizol® (Invitrogen) etter produsentens instruksjoner. Kort fortalt ble morkakevevet homogenisert i Trizol på is og så sentrifugert ved 12 000 G i 10 minutter ved 4 °C. Proteinfraksjonen ble separert med kloroform og felt med 2-propanol. Proteinpelleten ble vasket tre ganger i 10 1,5 ml 0,3 M guanidinhydroklorid og en gang i 1,5 ml 75 % etanol. Pelletene ble løst i 0,8 M urea og 2 % CHAPS, og proteinkonsentrasjonen ble målt med en spektrofotometrisk framgangsmåte. Proteinene ble oppbevart ved –20 °C før bruk.

#### *Proteinfelling*

- 15 Før den isoelektriske fokuseringen (IEF) ble prøvene felt med aceton for å inaktivere proteolytiske enzymer, fjerne salt og forstyrrende stoffer. Uttrukket protein fra hver morkake, 400 µg, ble blandet med iskald aceton til en sluttkonsentrasjon på 80 % aceton. Prøvene ble inkubert i 1 time ved –20 °C og så sentrifugert ved 9000 G i 2 minutter. Acetonet ble fjernet og proteinpelletene ble 20 satt til å tørke i luft.

#### *Todimensjonal gelelektroforese*

Immobiline Dry-strips (180 x 3 x 0,5 mm, pH 3–10 NL, GE Healthcare Life Sciences) ble rehydrert i 350 µl av den løseliggjørende løsningen som inneholdt

8 M urea, 2 % CHAPS, 10 mM ditiotreititol (DTT) og 2 % IPS 3–10-buffer sammen med 400 eller 800 µg prøver i romtemperatur over natten. IEF-trinnet ble utført ved 20 °C ved hjelp av en Multphor II og kjørt etter følgende plan: (1) 150 V i 1 time, (2) 300 V i 3 timer og (3) 3000 V inntil omtrent 60 000 volttimer. Stripsene ble lagt i en løsning som inneholdt 65 mM DTT, 6 M urea, 30 g/ml glyserol, 2 g/ml natriumdodekylsulfat (SDS) og 50 mM Tris-HCl pH 8,8 i 10 minutter for å oppnå likevekt. Et andre likevektstrinn ble også utført i 10 minutter i samme løsning bortsett fra DTT, som ble erstattet med 259 mM jodacetamid. Stripsene ble gjennomtrukket med elektroforesebuffer (24 mM Tris-base, 0,2 M glycin og 0,1 % SDS) like før den andre dimensjonen. Stripsene ble påført 12,5 % homogen Duracryl plategel (240 x 190 x 1 mm, eller 290 x 245 x 1 mm). Oppå stripsene ble det lagt en løsning av 1 % agarose i elektroforesebuffer (holdt i 60 °C). Elektroforesen ble utført enten med et Hoefer DALT gelapparat (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA) ved 20 °C og konstant 80 V i 19 timer eller med et gelapparat som hadde samme elektroforesebuffer som ovenfor og kjøres ved 20 °C ved 18 mA inntil fargestofffronten når bunnen av gelen. Kjøretiden var omtrent 17 timer.

#### *Gelfarging*

Gelene ble farget med sølv og etter fargingene ble gelene tørket med en geltørker (Slab gel Dryer SGD2000, Savant)

#### *Flekkanalyse*

Gelene ble skannet med en CanoScan 9950F (Canon). Flekkanalysen ble utført med et PDQUEST (versjon 7.1.0) todimensjonalt gelanalysesystem (Bio-Rad discovery-serien, Bio-Rad Laboratories, Sundbyberg, Sverige).

#### *Massespektrometrisk identifisering*

De interessante flekkene ble vasket med 0,5 ml Milli-Q-vann i 1 time og så fire ganger med 0,5 ml 40 % acetonitril (ACN) i 25 mM ammoniumbikarbonat i 30 minutter hver. Gelbitene ble så tørket i en SpeedVac konsentrator før proteinene ble nedbrutt til karakteristiske fragmenter med trypsin (sekvenseringskvalitet, Promega) i 25 mM ammoniumbikarbonat over natten ved 37 °C. Digereringen ble terminert ved å tilsette 20 µl 2 % trifluoreddiksyre (TFA), noe som også ekstraherte peptidene fra gelen. Etter 2 timer ved romtemperatur ble peptidene rensset fra

digereringsbufferen med C18 Ziptips (Millipore). Kort fortalt ble den faste fasen kondisjonert med 2 x 10 µl 50 % ACN, 0,1 % TFA i Milli-Q-vann. Det organiske løsningsmidlet ble vasket bort ved to vaskinger på 10 µl 0,1 % TFA. Prøvene ble aspirert og dispensert flere ganger og så vasket to ganger med 0,1 % TFA for å  
5 fjerne salter og ubundet materiale. De rensede peptidene ble eluert direkte på prøvemålet (Anchorchip-mål, Bruker Daltonik) som var tilsatt 0,7 µl matriks, 2,5-dihydroksybenzosyre (3 mg/ml i 30 % ACN). Det ble registrert massespektra av positivt ladde ioner på et Bruker Reflex III-instrument (Bruker Daltonik) som ble kjørt i reflektor-modus. Totalt 160–210 enkeltbildespektre ble samlet fra hver  
10 prøve. Programpakken XMASS 5.0 og MS Biotoools fra produsentene ble brukt til databehandling. Kjente autoproteolyseprodukter fra trypsinet ble bruk til intern kalibrering.

### *MS/MS-analyse*

Fra hvert av peptidekstraktene ble 0,5 µl lagt ut direkte på et MALDI-mål av rustfritt  
15 stål og satt til tørking. 0,5 µl av en matriksløsning som inneholdt 5 mg/ml α-cyano-4-hydroksykanelnsyre, 50 % acetonitril, 0,1 % TFA og 50 mM sitronsyre ble tilsatt og satt til tørking. Det ble tatt MALDI-TOF-MS og MS/MS-spektre med en 4700 Proteomics Analyser-massespektrometer (Applied Biosystems, Framingsham, CA, USA) i positiv reflektormodus. De resulterende MS-spektrene ble kalibrert internt  
20 med to trypsinautoproteolysepeptider som hadde m/z-verdiene 842,51 og 2211,097. Proteinene ble identifisert med programmet GPS Explorer, ved hjelp av en lokal Mascot søkemotor (Matrix Science, London, Storbritannia) {Perkins, 1999 #132} som søkte gjennom den ikke-redundante NCBI-databasen. Parameterne som ble spesifisert i søket var: gruppe: Mammalia, manglende spaltninger: 1,  
25 peptidmassetoleranse: ±30 ppm, massetoleranse for fragmentioner: ±0,15 Da, variabelmodifikasjoner: ingen.

### *Databasesøk*

For proteinidentifisering ble humane proteinsekvenser i NCBI-databasen søkt ved hjelp av ProFound Peptid Mapping (versjon 4.10.5, The Rockefeller University  
30 Edition) og Mascot Software (Matrix Science Ltd).

### *Western blot*

Western blot ble kjørt på 12 % Bis-Tris-geler (Invitrogen, USA) etter produsentens

instruksjoner. Kort fortalt ble 20 µg protein med 2,5 ml LDS-prøvebuffer (Invitrogen, USA) lagt på gelen og kjørt i 50 minutter på 200 V i 1 x MOPS gelelektroforesebuffer. Etter elektroforesen ble gelen blottet på en PDVF-membran (Bio-Rad, USA) i 1 time ved 30 V, deretter ble membranen inkubert med Tris-  
5 bufret saltløsning (TBS) som inneholdt 0,1 % Tween20® (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) og 2 % tørrmelk (Bio-Rad, USA) over natten ved 4 °C.

Blottet ble inkubert med primært monoklonalt murint IgG1-antistoff (mot humant Hby) (fortynnet 1:8000 i TBS-T med 2 % tørrmelk) (Nordic Biosite AB, Sverige) i 1 time, og så ble membranen vasket en gang i 15 minutter i TBS-T og 3 x 5 minutter  
10 i TBS-T. Etter vaskingene ble blottet inkubert med kaprint antimurint IgG1-HRP sekundært antistoff (fortynnet 1:5000 i TBS-T) (SDS Santa Cruz Biotechnology, USA) i 1 time, og så ble membranen vasket som ovenfor. Deretter ble membranen eksponert for forbedret kjemiluminescens (ECL+) (GE Healthcare Biosciences, UK) i 3 minutter. Det ble brukt autoradiografisk film (Hyperfilm ECL, Amersham,  
15 USA) på blottet i 1 minutt for å oppnå tilfredsstillende eksponering.

#### *RNA-uttrekk*

Totalt RNA ble trukket ut etter produsentens instruksjoner med RNEasy (Qiagen) fra 10 PE-prøver og 10 kontrollprøver fra samme pasienter som ovenfor. Kort fortalt ble morkakeprøvene homogenisert med TissueLyzer i en RNEasy  
20 lysisbuffer (RLTbuffert og β-merkapttoetanol) (Qiagen). Prøvene ble felt i 70 % etanol og så separert med RNEasy minikolonner etter produsentens protokoll. Prøvene ble eluert i 50 µl RNAase-fritt H<sub>2</sub>O.

#### *Sanntids PCR (samme som ovenfor)*

cDNA ble framstilt med omvendt transkriptase etter produsentens protokoll  
25 (Applied Biosystems). Kort fortalt ble det brukt en 50 µl reaksjonsblanding (0,5 µg totalt RNA, 1 x TaqMan RT-buffer, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM dNTP-er, 2,5 µM tilfeldige heksamerer, 0,4 U/µl RNAase-hemmer og 1,25 U/µl MultiScribe omvendt transkriptase). Reaksjonsblandingene ble inkubert ved 25 °C (10 minutter), 48 °C (30 minutter) og til slutt 95 °C (5 minutter). Prøvene ble oppbevart ved -20 °C  
30 inntil analysen.

De resulterende gentranskriptene ble kvantifisert ved kvantitativ RT-PCR med et ABI PRISM® sekvensdetekteringssystem (Applied Biosystems). Primere og prober for TF (analyse-ID: Hs00169070\_m1) og Hbδ (analyse-ID: Hs00426283\_m1) ble bestilt fra Assays-on Demand™ (Applied Biosystems).

- 5 Primerne dekte minst én eksongrense for å unngå at forurensende genomisk DNA ble forsterket. Reaksjonene ble utført i et 25 µl sluttvolum som inneholdt sluttkonsentrasjonene: 1x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 µl/l probe, 0,9 µmol/l av hver av for- og bakoverprimerne og 2,2 µl DNA-porsjon. Oppvarmingskretsløpet ble startet ved UNG-aktivering ved 50 °C i 2
- 10 minutter og en første denaturering ved 95 °C i 10 minutter. Etter denatureringen ble det kjørt 40 kretsløp: 95 °C i 15 sekunder, 60 °C i 1 minutt. To negative kontroller som ikke inneholdt mal ble tatt med i hvert sett av forsterkinger. β-aktin ble brukt som referanse for å normalisere signalet fra prøven. Kvantifiseringen ble oppnådd ved å lage en kalibreringskurve med serielle 4-gangers fortynnninger av
- 15 mal-DNA-et (0,08–80 ng). Resultatene er uttrykt som forholdstall med β-aktin som nevner.

#### *Lokal hybridisering (samme som ovenfor)*

- Det ble gjort lokal hybridisering på 18 PE-prøver og 19 kontrollprøver. Kryostatsnitt ble montert for tining på sialiniserte preparatglass som ble oppbevart ved –80 °C
- 20 til de skulle brukes. Ferskt frossent vev ble brukt for maksimal mRNA-detektering. Snittene ble fiksert, dehydrert, avlipidert og hybridisert. Hybridiseringen foregikk i 20–24 timer ved 55 °C med 2 x 10<sup>6</sup> cpm denaturert 35S-cRNA-probe per 80 µl hybridiseringsbuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0), 300 mM NaCl, 50 % formamid, 10 % dekstransulfat, 1x Denhardts 25 mg/ml gjærcele-
- 25 tRNA, 100 µg/ml laksesæd-DNA, 250 µg/ml totalt gjærcele-RNA (fraksjon XI, Sigma), 150 mM ditiotreitol (DTT), 0,15 % natriumtiosulfat (NTS) og 0,15 % natriumdodekylsulfat (SDS). Etter vaskingene ble preparatglassene satt på Kodak Hyperfilm Biomax MR i 2 dager og så overtrukket med kjernesporeremulsjon (NTB, Kodak). Preparatglassene ble eksponert i 4 uker ved 4 °C og så framkalt i Dektol
- 30 (Kodak), fiksert og kontrafarget med Giemsa-farge.

#### *Resultater*

De uttrukne morkakeproteinene ble separert ved 2D-PAGE for å studere forskjeller i proteinuttrykking mellom pasienter med PE og friske kontroller. I det første

- eksperimentelle oppsettet ble 400 µg av prøvene lagt på IPG-stripen og den andre dimensjonen ble kjørt med Hoefer DALT gelapparatet. Bare en av flekkene ble vist vesentlig forskjellig mellom de to gruppene. For å identifisere flekken ble 800 µg av prøvene lagt på gelene og det ble kjørt totalt fire prøver, to PE- og to kontroll-  
5 prøver. Den andre dimensjonen ble kjørt for kvalitativ analyse. Dermed ble det med det blotte øyet registrert en annen flekk som uttrykte seg forskjellig i PE-prøvene (figur 8). De to interessante proteinflekkene ble kuttet ut fra gelene, digerert enzymatisk og identifisert ved MALDI-TOF massespektrometri. Det første proteinet ble identifisert som transferrin og det andre som hemoglobin.
- 10 Det var ikke mulig å bestemme underklassen til hemoglobinet med MALDI-dataene. Derfor ble denne flekken også sekvensanalysert ved MS/MS-analyse. MS/MS-dataene viste at sekvensene hørte til deltakjeden til hemoglobin (Hbδ). Akkurat som proteinanalysen viste også sanntids PCR en signifikant høyere genuttrykking for Hbδ i PE-morkakene ( $p = 0,04$ ) enn i kontrollene (figur 9).
- 15 Den lokale hybridiseringen viste at enkeltceller uttrykte mRNA for Hbδ gjennom hele det intraviliøse rommet. Det ble særlig sett celler som uttrykker mRNA for Hbδ i og rundt morkakeblodårene. PE-morkaker lot til å ha flere spredde celler utenfor årene som uttrykte mRNA for Hbδ enn kontrollene. Det ble ikke registrert signaler i trofoblastcellene. Cellemorfologien til de Hbδ-uttrykkende cellene ble  
20 skjult av sølvkornene som lå over de positive cellene (figur 10).

### *Diskusjon*

De siste funnene våre gir belegg for hematopoese i morkaken ved PE, både på grunn av den økte uttrykkingen av Hbδ-protein som demonstreres her og den tilsvarende genuttrykkingen.

- 25 I morkaken oversettes økte konsentrasjoner av mRNA for Hbδ til protein samles i PE-morkaken ifølge disse resultatene våre. Men det er ikke sikkert at Hb-kjedene som produseres arrangeres til funksjonelle Hb-molekyler som har bundet porfyrinringer og Fe-ion. Transport og celleopptak av jern tilrettelegges av transferrin (TF). Disse 2d-gelene våre viser også at PE-morkaken kan gjenspeile  
30 en dårligere jerntransport inn i cellepopulasjonen som uttrykker Hbδ. Altså kan celler som produserer Hb ha dårligere jerntilførsel slik at det samles opp Hb-kjeder

og/eller dysfunksjonelle Hb-molekyler i PE-morkaken. Det er interessant at det ikke samlet seg hemoglobin i kontrollmorkakene selv om den lokale hybridisering ikke viste uttrykking av mRNA for Hb $\delta$ . Den friske morkaken kan derimot være i stand til å regulere produksjonen av Hb enten ved å regulere mRNA-  
5 oversettingen eller proteinnedbrytingen, eller rett og slett fordi den er et ekstra-medullært sete for hematopoese. Produksjon av defekt Hb kan gi defekte erytroblaster, som vil være mindre motstandsdyktige og falle lettere fra hverandre, noe som så gir mer fritt Hb.

#### **Eksempel 4**

##### 10 **Detektere uttrykking av RNA for HLA-DPA1**

Det ble gjort kvantitativ RT-PCR for å analysere uttrykkingen av RNA for HLA-DPA1

Prøvetakingen, vevsprøver og håndtering, RNA-uttrekk og sanntids PCR-forsterking ble utført som beskrevet i eksempel 1 med de nødvendige  
15 modifikasjonene.

#### *Resultater*

Histokompatibilitetskomplekset, klasse II, DP-alfa 1 (HLA-DPA1) var signifikant oppregulert i gruppen med notch enn alle andre grupper ( $p = 0,01$  mot PE uten notch,  $p = 0,02$  mot PE med notch og  $p = 0,01$  mot kontroll) (se figur 4 D).

##### 20 **Diskusjon**

Kvinner med påvist notch har høyere risiko for å utvikle PE siden i svangerskapet. Men siden ikke alle kvinner med notch utvikler PE, kan det hende at de uttrykker gener som beskytter dem mot eller undertrykker gener som skader dem. Både mikroarray og qPCR viste økt uttrykking av HLA-DPA1 i notchgruppen enn i noen  
25 av de andre gruppene. HLA-DPA1 er en del av histokompatibilitetskompleksfamilien (MHC) klasse II, der medlemmene er ansvarlige for å presentere fremmede antigener som del av den adaptive immunresponsen. Bare MHC-molekyler av klasse I, HLA-typene G og E, uttrykkes på trofoblastceller. De antas å forandre den maternelle immunresponsen på mor-fostergrensen slik at fosteret  
30 beskyttes mot morens immunrespons. Det kan altså tenkes at HLA-DPA1, et MHC

klasse II-molekyl, ikke produseres av trofoblastene. I stedet kan de være morens reaksjon på nærværet av fosterceller i morkaken.

Det er kjent at fosterceller kommer inn i morens blodsirkulasjon under svangerskapet, og konsentrasjonen av dem øker i løpet av et normalt svangerskap, slik at  
5 man kan gå ut fra at det er en stadig strøm av fosterceller gjennom morkakebarrieren og inn i morsystemet. Ved PE er antall fosterceller i morens blodsirkulasjon høyere enn i normotensive svangerskap. Som nevnt kan den økte uttrykkingen av HLA-DPA1 i notch-gruppen tyde på at morens immunsystem reagerer på «fremmede» antigener i morkaken, nærmere bestemt fostercellene  
10 der. Altså kan HLA-DPA1 bidra til å bygge en immunologisk barriere som hindrer fostercellene i å komme inn i morsystemene ved å identifisere cellene og merke dem for eliminering. Hvis de Hb-uttrykkende cellene vi har sett i forsøkene våre skulle stamme fra fosteret, kan det også være at HLA-DPA1 hindrer disse cellene i å lekke inn i morkaken og dermed beskytter morkaken mot for høy produksjon av  
15 hemoglobin og fritt hem.

### **Eksempel 5**

#### **Hemoglobin- og $\alpha_1$ -mikroglobulinkonsentrasjoner i plasma og urin, antioksidering med $\alpha_1$ -mikroglobulin og morkakeperfusjon in vitro**

##### Materiell og metoder

##### 20 Hemoglobin

Hemoglobin ble kjøpt inn fra Sigma. Oksyhemoglobin A ble framstilt ved laboratoriet vårt som følger. Røde blodlegemer fra 50 ml humant blod ble isolert ved sentrifugering (1200 G, 10 minutter) og vasket 4 ganger med 10 volum av fosfatbufret saltløsning (PBS, 10 mM fosfat, pH 7,4, 120 mM NaCl og 3 mM KCl).  
25 Blodlegemene ble så lysert ved å resuspendere dem i hypoton buffer (20 volum H<sub>2</sub>O:1 volum PBS) på is. Membranene ble separert fra cytosolen ved sentrifugering (14 000 G, 20 minutter) og supernatanten ble dialysert 3 ganger mot 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 ved 4 °C. To hundre ml DEAE-Sephadex A-50 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sverige) ble pakket i en kolonne og den  
30 dialyserte supernatanten ble påført gelen og separert med en gradient som besto av 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 og 15 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 0,2 M NaCl. Fraksjonene ble tatt vare på og absorbansen ble målt ved 280 nm, 577 nm og 630 nm for å

identifisere og bestemme konsentrasjonen av oksyhemoglobin A. Oksyhemoglobin F ble framstilt fra humant navlestrengblod etter samme protokoll.

### Proteiner og antistoffer

Rekombinant humant  $\alpha_1$ -mikroglobulin ( $\alpha_1$ m) ble uttrykt i *E.coli*, rensset og refoldet  
5 som beskrevet i [Kwasek et al., 2007]. Leporint antimurint immunoglobulin, leporint antihemoglobin og porkin antileporin immunoglobulin-alkalisk fosfatase (ALP) ble kjøpt fra Dako (Danmark). Murint monoklonalt antistoff mot gammakjeden av hemoglobin ble kjøpt fra Santa Cruz Biotechnologies Inc (kat. nr. sc-21756). Leporint antihumant  $\alpha_1$ m og kaprint antileporint immunoglobulin ble framstilt som  
10 beskrevet i [Elbashir et al., 1990, Björk et al., 1997]. Monoklonale murine antistoffer mot humant  $\alpha_1$ m (BN11.10) ble framstilt som beskrevet i [Babiker-Mohamed et al., 1991].

### Merking med jod

Proteinene ble merket med  $^{125}\text{I}$  (Bio-Nuclear AB, Stockholm, Sweden) med  
15 kloramin T-metoden [Greenwood et al., 1963]. De merkede proteinene ble separert fra fritt jod ved gelfiltrering på Sephadex G-25-kolonne (PD-10, GE Healthcare). De spesifikke aktivitetene var omtrent 0,3 MBq per  $\mu\text{g}$  protein for  $\alpha_1$ m og 0,5 MBq per  $\mu\text{g}$  protein for immunoglobuliner.

### Pasienter og prøvetaking

20 Morkake- og blodprøver ble tatt fra kvinner innlagt på universitetssykehuset i Lund (30 kontroller, 30 PE). Prøvene ble tatt med skriftlig samtykke og ble godkjent av den svenske etiske komiteens gjennomgangsstyre. Preeklampsi ble definert som blodtrykk over 140/90 mmHg og proteinuri over 0,3 g/l (Milne, 2005 #89). Det ble bare tatt prøver fra pasienter med tosidig notch for gruppen med notch uten PE.  
25 Etter forløsningen ble det fjernet en 10x10x10 mm terning av tottevev, som straks ble lagt på tørris. Prøvene ble oppbevart ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  før bruk. Blodprøvene ble tatt før forløsningen og oppbevart med Paxgene Blood RNA System (Qiagen, Valencia, USA) ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  før bruk. Forskjellige parametere fra disse gruppene er beskrevet i tabell 2, side 37–38. Dessuten ble prøver fra 10 pasienter og 10  
30 kontrollpersoner i Tanzania-studien undersøkt i eksempel 5 (se tabell 1, side 14–15).

## ELISA

Hemoglobin A-konsentrasjonene ble målt med konkurrerende enzymbundet immunsorbentanalyse (ELISA) som beskrevet for radioimmunanalyse i fast fase (SPRIA) og med buffere, vaskeprosedyrer og inkuberingstider som beskrevet i [Nilson et al., 1986]. Hemoglobin (Sigma) ble overtrukket med 4 µg/ml, platene ble vasket og inkubert med en blanding av leporint antihemoglobin og enten standard oksyhemoglobin A eller ukjente prøver, vasket, inkubert med porkint antileporint IgG-ALP (Dako), vasket og til slutt inkubert med substrat. Passende fortynninger for hvert trinn og reagens ble titrert separat. Absorbansen ble avlest ved 415 nm (Bio-Rad Model 550, mikroplateleser). Volumet som ble brukt til hvert inkuberings-trinn var 100 µl. Alle forsøkene ble gjort i triplikat.

## RIA

$\alpha_1$ m-konsentrasjonene ble bestemt ved radioimmunanalyse (RIA) som beskrevet i [Plesner et al., 1975, Åkerström, 1985]. Geiteantiserum mot humant  $\alpha_1$ m (0,2 ml, fort. 1:6000) ble blandet med  $^{125}$ I-merket  $\alpha_1$ m (0,1 ml, ca. 0,05 pg/ml) og ukjente prøver eller standard  $\alpha_1$ m-konsentrasjoner (0,2 ml). Fortyningene ble gjort i 0,1 M natriumfosfat, pH 7,5 + 0,1 % BSA (RIA-buffer). Etter inkubering over natten ved romtemperatur ble antistoffbundet  $\alpha_1$ m felt ved å tilsette 0,3 ml bovint serum og 1,6 ml 15 % polyetylglykol i RIA-buffer, sentrifugere ved 1500 G i 40 minutter og analysere  $^{125}$ I-aktiviteten til pelletene i en Wallac Wizard 1470 gammateller (Perkin Elmer Life Sciences).

## Bestemmelse av Hb F-konsentrasjonene

Plasmakonsentrasjonene av hemoglobin F ble bestemt ved western blotting etter at plasmaalbumin var fjernet med Montage Albumin Deplete Kit (kat. nr. LSKAD0024, Millipore). Kort fortalt ble kulene fra ti kolonner slått sammen i én porsjon, vasket med PBS og skilt ut i 50 identiske porsjoner. Etter sentrifugering ble supernatanten fra hver porsjon kastet, 40 µl plasma (fortynnet 1:1 med PBS) ble tilsatt og blandingen ble inkubert to ganger i 1 time ved romtemperatur. Rørene ble sentrifugert, supernatanten ble tatt vare på og kulene vasket først med 1 ml 0,1 M glycine-HCl, pH 2,3 og så 1 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8. Etter sentrifugering og fjerning av supernatanten ble det tilsatt plasma og inkubert igjen i 1 time ved romtemperatur. Etter sentrifugering og kasting av pelleten, ble 10 µl av plasmaet som dermed var gjort albuminfattig separert ved SDS-PAGE (T = 13,5 %, C =

3,3 %) og blottet med murint antihumant Hb-F/ $\gamma$ -kjede, fortynnet 600 ganger, og så leporint antimurint Ig (1  $\mu$ g/ml) og det  $^{125}$ I-merkede kaprine antileporine IgG som beskrevet nedenfor. Kvantifiseringen av hemoglobin F ble gjort ved densitometri av de positive båndene ved hjelp av programmet Image Gauge V4.0 (Fuji, Tokyo, Japan) og standard hemoglobin F (15 og 75 ng/brønn). Urinkonsentrasjonene av hemoglobin F ble bestemt etter samme protokoll, men uten trinnene med Montage Albumin Deplete Kit.

#### Western blotting

SDS-PAGE (T = 12 %, C = 3,3 %) ble gjort som beskrevet i [Laemmli, 1970]. Gelene ble kjørt under reduserende forhold med høy molekylvektstandard (Rainbow markers, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). De separerte proteinene ble overført til polyvinylidendifluoridmembraner (PVDF) (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) som beskrevet i [Matsudaira, 1987]. Membranene ble så inkubert med de aktuelle antistoffene og western blot utført med  $^{125}$ I-merkede sekundære kaprine antileporine immunoglobuliner som beskrevet før av Wester et al. [1997], og bildene ble framkalt på membranene med Fuji FLA 3000 fosfobildedanningsystem (Fujifilm Sweden AB, Stockholm, Sverige).

#### Uttak av morkakevev og framstilling av $\alpha_1$ m-molekyler

Molekyler som inneholdt  $\alpha_1$ m ble rensert fra morkakevev som beskrevet i [Berggård et al., 1999]. Omtrent 200 g av en tilsynelatende normal human morkake ved termin, tatt innen 3 timer etter forløsningen, ble homogenisert i 200 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,25 M sukrose, 2 mM EDTA, pepstatin, 1 mg/l, antipain, 5 mg/l og leupeptin, 10 mg/l ved hjelp av et Potter-Elvehjem-apparat med tettsittende teflonstøter. Homogenatet ble sentrifugert ved 10 000 G i 10 minutter. Denne pelleten ble vasket ved å suspendere den gjentatte ganger 1:1 i homogeniseringsbufferen og sentrifugere igjen ved 10 000 G i 10 minutter. Supernatanten ble sentrifugert ved 100 000 G i 90 minutter. Denne pelleten, som inneholdt morkakemembranene og membranbundne proteiner, ble løst i 40 ml homogeniseringsbuffer som også inneholdt 0,5 mg/l Nonidet P-40 (BDH Chemicals) og sentrifugert ved 20 000 G i 30 minutter for å fjerne partikkelmateriale. Alle trinnene ble utført på is ved 4 °C. Det ble gjort immunsorbentaffinitetskromatografi med

monoklonalt murint anti-  $\alpha_1$ m, BN11.10, immobilisert på Affigel Hz (20 mg/ml) etter produsentens instruksjoner (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

#### Morkakeperfusjon in vitro

Det har inntil i dag ikke eksistert noen tilfredsstillende dyremodeller for PE. For å  
5 studere virkningene av fritt hemoglobin, setter vi opp den doble morkake-  
perfusjonsmodellen i samarbeid med Henning Schneider, Greifswald, Tyskland.  
Perfusjonen med dobbelt morkake er en veletablert modell for å studere  
morkakeblodstrømmen in vitro [Schneider et al., 1985]. Nylig ble modellen brukt til  
å etterlikne PE ved å innføre ROS-danning med xantin og xantinoksidase [Di  
10 Santo et al., 2007]. De nyeste dataene våre tyder på at morkaker perfusert med  
xantin har en genprofil som likner genprofilen til PE-morkakene.

Den menneskelige morkaken perfuseres kunstig med et oksygenert medium.  
Både den maternelle blodsirkulasjonen og fostersirkulasjonen er perfusert (altså  
«dobbel») ved hjelp av peristaltiske pumper. Mediet fra de to atskilte kretsene  
15 overvåkes for lekkasjer. Mediet og morkakevevet analyseres med den ovennevnte  
teknikken.

#### **Eksempel 5.1**

##### **Hemoglobin A forhøyet i preeklamptisk plasma**

##### **Resultater**

20 Resultatene er framstilt på figur 11–12. ELISA-bestemmelse av de totale hemo-  
globinkonsentrasjonene i plasma fra 30 pasienter med preeklampsi og 30 kontroll-  
svangerskap viste nesten en fordobling i preeklampsi-gruppen. Gjennomsnitts-  
verdien  $\pm$ SD hos pasientene var  $3,01 \pm 0,39$   $\mu$ g/ml og i kontrollgruppen  $4,44 \pm 1,0$ .  
Denne forskjellen er signifikant ( $p < 0,05$ ).

#### 25 **Eksempel 5.2**

##### **Hemoglobin F forhøyet i preeklamptisk plasma og urin**

Med western blotting ble fosterhemoglobin i plasma og urin sett som et 15 kDa-  
bånd som reagerte med anti-gammakjede. Figur 13 viser et eksempel på western  
blotting-metoden brukt på plasma fra to pasienter (PE 1 og 2) og to kontroll-  
30 personer (kontroll 1 og 2). Deteksjonsgrensen til metoden var omtrent 5  $\mu$ g/ml i  
plasma og 1  $\mu$ g/ml i urin. Konsentrasjonene av Hb-F ble estimert ved densitometri

og tabell 1 viser frekvensene av Hb-F i plasma- og urinprøvene fra PE- og kontrollgruppene. Båndet ble sett i plasmaet fra 9 pasienter, mens ingen av kontrollindividene var positive. 9 pasienter og ingen kontrollkvinner hadde altså mer enn 5 µg/ml fosterhemoglobin i plasma. Hvis vi antar at plasmakonsentrasjonen hos kontrollkvinnene var 0,04 µg/ml som studien til Turpeinen et al. [1992] tyder på, dvs. den normale plasmakonsentrasjonen, viser resultatene våre en 125-dobling av fosterhemoglobinkonsentrasjonen hos 20 % av pasientene med PE. Urinen til 8 av pasientene inneholdt båndet og 2 av kontrollene (tabell 3). Disse to kontrollindividene ble funnet blant Tanzania-kvinnene, med høy forekomst av malariainfeksjoner. Et svakt positivt bånd ved 67 kDa, som mest sannsynlig representerer albumin, ble sett med samme intensitet i alle prøvene.

Tabell 3. Hyppighet av individer med >5 µg/ml Hb-F i plasma og >1 µg/ml i urin.

| Plasma      |          | Urin        |          |
|-------------|----------|-------------|----------|
| Preeklampsi | Kontroll | Preeklampsi | Kontroll |
| %           | %        | %           | %        |
| 19,6        | 0        | 20          | 5        |
| (9/46)      | (0/39)   | (8/40)      | (2/39)   |

### Eksempel 5.3

#### 15 Tidsavhengighet for plasmahemoglobin A og F

En mulig tidlig patogen faktor for preeklampsi er hypoksi, som for eksempel kan skyldes sviktende perfusjon, unormal implantering eller sult. Hypoksi kan oppregulere Hb F-uttrykking både i fosterets og morens hematopoetiske stam- og progenitorceller [Narayan et al., 2005]. Sammen med skader på de fysiske barrierene til morkaken kan dette føre til lekkasje av fosterceller og til fritt Hb F i morens blodsirkulasjon mellom stadium 1 og 2 (se figur 15). Etter hvert som sykdommen skrider fram vil antallet øke, og dette kan overvåkes som økt konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin. Når morens blodårevegger skades av fritt fosterhemoglobin vil morens blodlegemer også begynne å dø. Dette vil føre til

høyere konsentrasjon av fritt morhemoglobin, som driver den negative sykdoms-spiralen videre. Hypotesen er at Hb F kommer før totalt Hb.

#### Eksempel 5.4

##### $\alpha_1$ m er høyere i preeklampatisk plasma og urin

- 5 Det lille plasma- og vevsprotein  $\alpha_1$ -mikroglobulin ( $\alpha_1$ m) er en hembinder [Allhorn et al., 2002, Larsson et al., 2004] og passiviserer radikaler [Åkerström et al., 2007], og en hemnedbrytende form, t-  $\alpha_1$ m dannes ved proteolytisk fjerning av et C-terminalt tetrapeptid, LIPR, når  $\alpha_1$ m blandes med fritt hemoglobin [Allhorn et al., 2002]. Fritt hemoglobin og reaktive oksygenforbindelser gir økt produksjon av  $\alpha_1$ m
- 10 i leverceller og blodlegemer [Allhorn et al., 2002]. Derfor er  $\alpha_1$ m en potensiell hem- og hemoglobinantagonist som kan beskytte celler og vevskomponenter mot hem- og hemoglobinskader.

- Som støtte for denne hypotesen har vi funnet at konsentrasjonene av  $\alpha_1$ m er høyere i plasma og urin fra pasienter med preeklampsi enn i kontrollsvangerskap
- 15 med signifikans på  $p < 0,01$  både i plasma og urin (figur 15). Den gjennomsnittlige  $\alpha_1$ m-konsentrasjonen i plasma ( $\pm$ SD) hos pasientene var 19,1 ( $\pm$ 5,5)  $\mu$ g/ml, og hos kontrollene 16,1 ( $\pm$ 3,7)  $\mu$ g/ml. Den gjennomsnittlige  $\alpha_1$ m-konsentrasjonen i urin ( $\pm$ SD) hos pasientene var 9,4 ( $\pm$ 5,5)  $\mu$ g/ml og hos kontrollene 5,3 ( $\pm$ 4,6)  $\mu$ g/ml. Disse resultatene tyder på 1) at kroppen reagerer på den preeklampiske
- 20 fornærmelsen ved å øke produksjonen av  $\alpha_1$ m og dermed øke plasmakonsentrasjonen, og 2) at hemoglobin, hem, jern og/eller ROS er komponenter av fornærmelsen siden  $\alpha_1$ m oppreguleres i celler ved økt konsentrasjon av hemoglobin, hem, jern og/eller ROS. Derfor er  $\alpha_1$ m sannsynligvis en forsvarsreaksjon i kroppen mot den preeklampiske fornærmelsen. Derfor burde en økning av  $\alpha_1$ m-
- 25 konsentrasjonen til enda høyere nivå, for eksempel 32  $\mu$ g/ml, altså det dobbelte av den normale konsentrasjonen, ha antipreeklampisk effekt, og  $\alpha_1$ m er dermed et potensielt legemiddel for å behandle sykdommen.

#### Eksempel 5.5

- $\alpha_1$ m beskytter celler og vevskomponenter ved antioksidasjon og binding av hem
- 30 De antioksiderende egenskapene til  $\alpha_1$ m illustreres i fig. 16 og 17. For det første er det påvist at ekstracellulært tilsatt  $\alpha_1$ m kan redusere redoksladningen i celleytosolen og for tiolgrupper i cytosolproteinene, og hemme oksidasjon av disse

- komponentene med hem og ROS. Ekstracellulært tilsatt  $\alpha_1\text{m}$  hemmer også cellelysis (altså celledød) som skyldes hem (figur 16). Oksidativ modifisering av kollagen og lette lipoproteiner (LDL) er involvert i patogenesen ved mange sykdommer, og kan også være mål for Hb-oksidasjon ved preeklampsi.  $\alpha_1\text{m}$
- 5 hemmet hem- og ROS-oksidasjon av kollagen, LDL, membranlipider og hele celler.  $\alpha_1\text{m}$  fjernet også oksidasjonsprodukter på kollagen og LDL som var dannet fra før (figur 17). En mulig mekanisme for disse virkningene kan være reduktase-egenskapene til  $\alpha_1\text{m}$ , som reduserer oksidasjonsmidlene, oksidasjonsmodifikasjonene eller begge.
- 10 For å studere mekanismene bak den cellebeskyttende virkningen til  $\alpha_1\text{m}$ , utførte vi en serie forsøk der vi prøvde å analysere interaksjonene mellom proteinet og cellebundet hem. Først ble cellene inkubert med 10  $\mu\text{M}$  hem i 30 minutter, overskudd av hem ble vasket av og  $\alpha_1\text{m}$  eller kontrollprotein ble tilsatt til en konsentrasjon på 2 eller 10  $\mu\text{M}$  før ny inkubering på 2 timer. Dyrkingsmediet ble
- 15 berget, cellene vasket og løseliggjort, og både medium og løseliggjorte celler ble analysert ved spektrofotometri (figur 18A) og visuelt (figur 18B). Hem ble sett som en sterk brunfarging av cellene og det typiske absorbansspekteret med indistinkt topp rundt 400 nm. Når  $\alpha_1\text{m}$  ble tilsatt, forsvant hemet nesten fullstendig fra cellene og ble funnet i mediet i stedet. Kontrollen lipokalin AGP hadde ikke noen
- 20 virkning på det cellebundne hemet. Vi forventer at konsentrasjonen av fritt hem ved preeklampsi kan nå 10  $\mu\text{M}$  eller mer, i det minste lokale, og at cellene som ble påvirket av giftvirkningen til fritt hem omfatter endotelceller på innsiden av blodårene.

- Som beskrevet flere steder ovenfor antas det at oksidativ fornærmelse ved fritt
- 25 hemoglobin, fritt hem og ROS dannet ved autooksidasjon av hemoglobin og hem utgjør viktige patologiske faktorer i progresjonen av preeklampsi. Kollagen og endotelcellemembraner og cytosoler er selvsagt viktige mål for oksidative fornærmelser. Ut fra resultatene i dette eksempelet virker det sannsynlig at  $\alpha_1\text{m}$  kan hemme og reparere skadene som skyldes fritt hemoglobin, hem og ROS også
- 30 in vivo, og at det derfor kan fungere som terapeutisk middel mot preeklampsi.

### Eksempel 5.6

#### Perfusjon med hemoglobin in vitro gir morkakelekkasje og oppregulering av

**$\alpha_1m$** 

Preeklampsi ble studert in vitro ved hjelp av en morkakeperfusjonsmodell med to separate sirkulasjonssystemer, henholdsvis på fosterets og morens side. Begge sirkulasjonssystemene ble først gjennomskylt. Morkaken ble så perfusert i 120  
5 minutter med Hb A-løsning (2 mg/ml) på fostersiden og bare buffer på morssiden («1. perfusjon») og i 120 minutter på begge sider med bare buffer («2. perfusjon»). Det ble tatt små porsjoner regelmessig fra begge sirkulasjonene og konsentrasjonene av Hb A, Hb F og  $\alpha_1m$  ble målt. Som vist på figur 19 (venstre side) kom Hb A raskt til syne på morssiden under 1. perfusjon og i mindre grad under 2.  
10 perfusjon. Dette kan skyldes lekkasje eller endogen produksjon av Hb A i morkakevevet, eller begge.  $\alpha_1m$  dukket også opp på morssiden i begge perfusjonsperiodene – figur 19 (høyre side). Dette tyder på at  $\alpha_1m$  produseres i morkakevevet på grunn av hemoglobinperfusjonen. Endelig dukket Hb F opp i morsirkulasjonen på slutten av 1. perfusjon (120 min), sannsynligvis på grunn av  
15 produksjon i morkaken og lekkasje til morsirkulasjonen.

In vitro-perfusjonsmodellen kan altså brukes til å studere virkningen av fritt hemoglobin i fostersirkulasjonen på funksjonen av morkakebarrierer, de beskyttende virkningene av  $\alpha_1m$  og den beskyttende celleresponsen til vevet.

**Eksempel 5.7****20 Et nytt molekyl i morkaken som består av  $\alpha_1m$  og hemoglobin bundet til hverandre**

Det er påvist tidligere at  $\alpha_1m$  kan «stjele» hemgruppen fra hemoglobin når de to molekylerne blandes i løsning [Allhorn et al., 2002, Larsson et al., 2004]. For å oppnå dette in vivo må hemoglobin- og  $\alpha_1m$ -molekylet bindes til hverandre. Belegg  
25 for et slikt  $\alpha_1m$ -hemoglobinmolekyl ble sett i morkakeekstrakter etter isolering av  $\alpha_1m$ -holdige molekyler som så ble analysert ved anti-Hb-blotting (figur 20). Et 43 kDa proteinbånd reagerte med antistoff mot både  $\alpha_1m$  og Hb A. Det ble påvist ved Maldi-massespektroskopisk peptidkartlegging at båndet inneholdt  $\alpha_1m$  og både alfa- og betaglobinkjeder (ikke framstilt på figuren). Størrelsen til molekylet tyder  
30 på at hvert molekyl består av en kjede av  $\alpha_1m$  og en annen kjede som kan være enten Hb $\alpha$  eller Hb $\gamma$ . Båndet var ikke å se etter at det var tilsatt merkaptoetanol, noe som tyder på at kjedene holdes sammen med en disulfidbinding.

Referanser

Åkerström B. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4839–4844.

Åkerström B, Mahgzal G, Winterbourn CC, Kettle AJ. *J Biol Chem.* 282 (2007) 31493–31503.

5 Allhorn M, Berggård T, Nordberg J, Olsson ML, Åkerström B. *Blood.* 99 (2002) 1894–1901.

Babiker-Mohamed H, Forsberg M, Olsson ML, Winqvist O, Nilson BHK, Lögdberg L., Åkerström B. *Scand J Immunol* 34 (1991) 655–666.

Berggård T, Enghild JJ, Badve S, Salafia CM, Lögdber L, Åkerström B.  
10 *Am J Repr Immunol* 41 (1999) 52–60.

Björck L, Cigen R, Berggård B, Löw B, Berggård I. *Scand J Immunol* 6 (1997) 1063–1069.

Bradley DJ et al. *J Neurosci* 12 (1992) 2288–2302.

J. J. Brosens, R. Pijnenborg, I. A. Brosens, *Am J Obstet Gynecol.* 187,  
15 1416 (2002).

Coligan JE. (red) *Current Protocols in Immunology*. Wiley Interscience.

C. J. M. de Groot, R. N. Taylor, *Annals of Medicine* 25, 243 (1993).

Di Santo S, Sager R, Andres AC, Guller S, Schneider H. *Placenta*  
(2007).

20 Douglas and Redman, *Br Med J* 309 (1994) 1395–1400.

Elbashir MI, Nilson B, Åkesson P, Björck L, Åkerström B. *J Immunol Methods* 135 (1990) 171–179.

J. P. Granger, B. T. Alexander, W. A. Bennett, R. A. Khalil. *Am J Hypertens.* 14, 178S (2001).

- Greenwood FC, Hunter WM, Glover J S. *Biochem. J*, 89 (1963) 114–123.
- S. R. Hansson et al., *Mol Human Reproduction* (2005).
- T. H. Hung, J. N., Skepper, D. S. Charnock-Jones, G. J. Burton, *Circ Res* 90, 1274 (28. jun 2002).
- Kajita A, Taniguchi K, Shukuya K. *Biochim Biophys Acta* 175 (1969) 41–48.
- Kwasek A, Osmark P, Allhorn M, Lindqvist A, Åkerström B, Wasylewski Z. *Protein Expr. Purif.* 53 (2007) 145–152.
- Laemmli UK. *Nature* 227 (1970) 680–685.
- Larsson J, Allhorn M, Åkerström B. *Arch Biochem. Biophys.* 432 (2004) 196–204.
- H, Lipstein, C. C. Lee, R. S. Crupi, *Am J Emerg Med.* 21, 223 (mai 2003).
- Matsudaira P. *J. Biol Chem.* 262 (1987) 10035–10038.
- Motterlinie et al., *Am J Physiol* 269 (1995) 648–655.
- Narayan AD, Ersek A, Campbell TA, Colón DM, Pixley JS, Zanjani ED. *Br J Haematol* 128 (2005) 562–570.
- Nilson B, Björck L og Åkerström B. *J Immunol Methods* 91 (1986) 275–281.
- Noble RW. *J Biol Chem* 246 (1971) 2972–2976.
- Olsson MG, Allhorn M, Olofsson T, Åkerström B. *Free Rad Biol Med* 42 (2007) 842–851.
- E. W. Page, *Am J Obstet Gynecol.* 37, 291 (1939).

Plesner T, Nørgaard-Pedersen B, Boenisch T, Scand J Clin Lab Invest  
35 (1975) 729–735.

J. M. Roberts et al., *Am J Obstet Gynecol* 161, 1200 (1989).

J. M. Roberts, C. A. Hubel, *Lancet* 354, 788 (4. sep 1999).

5 J. M. Roberts, D. W. Cooper, *Lancet* 357, 53 (2001).

Schneider H, Huch A. *Contrib Gynecol Obstet* 13 (1985) 40.

A. H. Shennan, L. Poston, L. C. Chappell, P. T. Seed. *Lancet* 357, 1534  
(2001.12.5, 2001).

J. M. Stevens. *Med J Aust.* 2, 949 (20.-27. des 1975).

10 H. Stevens et al., *Br J Obstet Gynaecol.* 110, 831 (sep 2003).

Svistunenko et al., *J Biol Chem* 272 (1997) 7114–7121.

Turpeinen U, Stenman U-H. Determination of fetal hemoglobin by time-  
resolved immunofluorometric assay. *Clin Chem* 38 (1992) 2013–2018.

15 Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.*  
186 (1990) 265–272.

---

## Realiseringer (spesifikke realiseringer av oppfinnelsen)

1. Framgangsmåte for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi, som innbefatter følgende trinn:
  - 5 (a) ta en biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr,
  - (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den nevnte biologiske prøven, og
  - (c) sammenlikne konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i prøven med en
  - 10 referanseverdi eller sammenlikne forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøven med en referanseverdi, for å bestemme om det nevnte drektige hunndyret har eller ikke har preeklampsi eller økt risiko for å utvikle preeklampsi.
- 15 2. Framgangsmåte i henhold til realisering 1, der den nevnte referanseverdien er konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i prøver fra en kontrollgruppe, der høyere konsentrasjon fritt fosterhemoglobin eller høyere verdi av det nevnte forholdet i en prøve i forhold til
- 20 referanseverdien tyder på at det nevnte drektige hunndyret har preeklampsi eller økt risiko for å utvikle preeklampsi.
3. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–2, der den nevnte biologiske prøven er blod.
- 25 4. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–2, der den nevnte biologiske prøven er urin.
5. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–2, der den nevnte
- 30 biologiske prøven er morkakevev.
6. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–5, der konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin måles ved å måle konsentrasjonen av gamma-kjeden til hemoglobin (Hb $\gamma$ ) i prøven.

7. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–6, der konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin bestemmes ved hjelp av en immunologisk analyse.
- 5
8. Framgangsmåte i henhold til realisering 7, der den immunologiske analysen er en ELISA.
9. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–6, der konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin bestemmes ved å måle fritt RNA for fosterhemoglobin.
- 10
10. Framgangsmåte i henhold til realisering 9, der fritt RNA for fosterhemoglobin måles ved sanntids PCR.
- 15
11. Framgangsmåte i henhold til en av realiseringene 1–10, der det nevnte pattedyret er et menneske.
12. Framgangsmåte for å følge progresjonen eller regresjonen av
- 20 preeklampsi, som innbefatter å:
- (a) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første biologisk prøve isolert fra et drektig hunnpattedyr,
- (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av
- 25 fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre biologisk prøve isolert fra det nevnte drektige pattedyret på et senere tidspunkt, og
- (c) sammenlikne verdiene målt i trinn (a) og (b), slik at høyere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin i den andre prøven enn konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller høyere forhold mellom konsentrasjonen av
- 30 fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven enn forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og totalt fritt hemoglobin i den første prøven tyder på progresjon av preeklampsien, mens lavere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin i den andre prøven enn konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller lavere forhold mellom

konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven enn forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og totalt fritt hemoglobin i den første prøven tyder på regresjon av preeklampsien.

5

13. Framgangsmåte for å vurdere effektiviteten til en behandling for preeklampsi som innbefatter følgende trinn:

- (a) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr før behandlingen,
- (b) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre biologisk prøve fra det samme drektige hunnpattedyret etter behandlingen,
- (c) sammenlikne konsentrasjonene eller konsentrasjonene som bestemmes i (a) med konsentrasjonen eller konsentrasjonene som bestemmes i (b), slik at lavere konsentrasjon av fritt fosterhemoglobin i den andre prøven enn konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i den første prøven eller lavere forhold mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i den andre prøven enn forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og totalt fritt hemoglobin i den første prøven tyder på at behandlingen er effektiv mot preeklampsi.

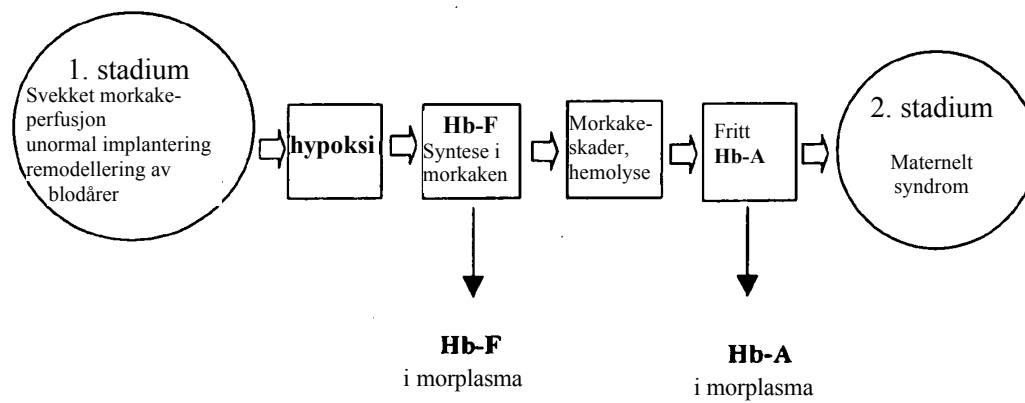
---

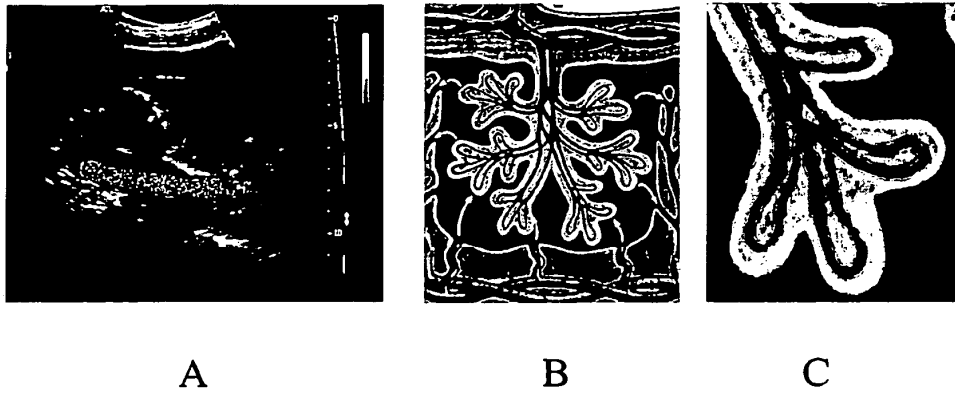
## PATENTKRAV

1.       Bruk av fosterhemoglobin som markør for preeklampsi.
- 5   2.       Bruk i henhold til krav 1, der fosterhemoglobinet bestemmes i en ikke-føtal biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr.
3.       Bruk i henhold til krav 2, der den ikke-føtale biologiske prøven er en blodprøve, en plasmaprøve, en urinprøve eller en prøve av morkakevev.
- 10   4.       Bruk i henhold til krav 2 eller 3 der det drektige hunnpattedyret har preeklampsi eller økt risiko for å utvikle preeklampsi hvis plasmakonsentrasjonen av fosterhemoglobin er omtrent 20 ganger eller mer høyere enn den normale konsentrasjonen av fosterhemoglobin i plasmaet.
- 15   5.       Bruk i henhold til noen av kravene 2–4, der det drektige hunnpattedyret har preeklampsi eller økt risiko for å utvikle preeklampsi hvis plasmakonsentrasjonen av fosterhemoglobin er omtrent 0,5 µg/ml eller mer, eller hvis urinkonsentrasjonen av fosterhemoglobin er omtrent 0,06 µg/ml eller mer.
- 20   6.       Bruk i henhold til noen av de foregående kravene i en eller flere av de følgende framgangsmåtene:
  - i) for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi,
  - ii) for å følge progresjonen eller regresjonen av preeklampsi,
  - 25   iii) for å vurdere effektiviteten til en behandling for preeklampsi.
7.       Framgangsmåte for å påvise eller bidra til å påvise preeklampsi som innbefatter å måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en  
30 ikke-føtal biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr, og eventuelt også innbefatter trinnet å
  - iii) sammenlikne konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin i prøven med en referanseverdi eller sammenlikne forholdet mellom konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og totalt fritt hemoglobin i prøven med en referanseverdi.

8. Framgangsmåte for å følge progresjonen eller regresjonen av preeklampsi som innbefatter trinnene å:
- i) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr,
  - ii) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre biologisk prøve fra det nevnte drektige hunnpattedyret på et senere tidspunkt, og eventuelt også inneholder trinnet å
  - iii) sammenlikne verdiene som måles i trinn i) og ii)
9. Framgangsmåte for å vurdere effektiviteten av en behandling av preeklampsi som innbefatter trinnene å
- i) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en første biologisk prøve fra et drektig hunnpattedyr før behandlingen eller ved et tidspunkt  $t_1$ ,
  - ii) måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin eller måle konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin og konsentrasjonen av totalt fritt hemoglobin i en andre biologisk prøve fra det samme drektige hunnpattedyret på et senere tidspunkt  $t_2$ , og eventuelt også inneholder trinnet å
  - iii) sammenlikne verdiene som måles i trinn i) og ii).
10. Framgangsmåte i henhold til noen av kravene 7–9, der den biologiske prøven er en blodprøve, en plasmaprøve, en urinprøve eller en prøve av morkakevev.
11. Framgangsmåte i henhold til noen av krav 7–10, der konsentrasjonen av fritt fosterhemoglobin måles ved å måle konsentrasjonen av gammakjeden av hemoglobin (H $\gamma$ ) i prøven.
12. Framgangsmåte i henhold til noen av kravene 7–11, der pattedyret er et menneske.

13. Framgangsmåte i henhold til noen av kravene 7–12, som også innbefatter å
- 5 i) måle konsentrasjonen av humant leukocyttantigen DPA1 (HLA-DPA1) i den nevnte biologiske prøven, og eventuelt også innbefatter å
- ii) sammenlikne konsentrasjonen av HLA-DPA1 i prøven med en referanseverdi.
-

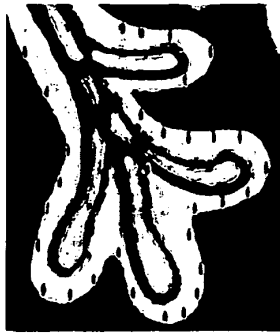
**Fig. 1**



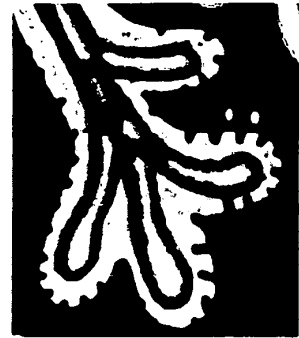
**Fig. 2**



A

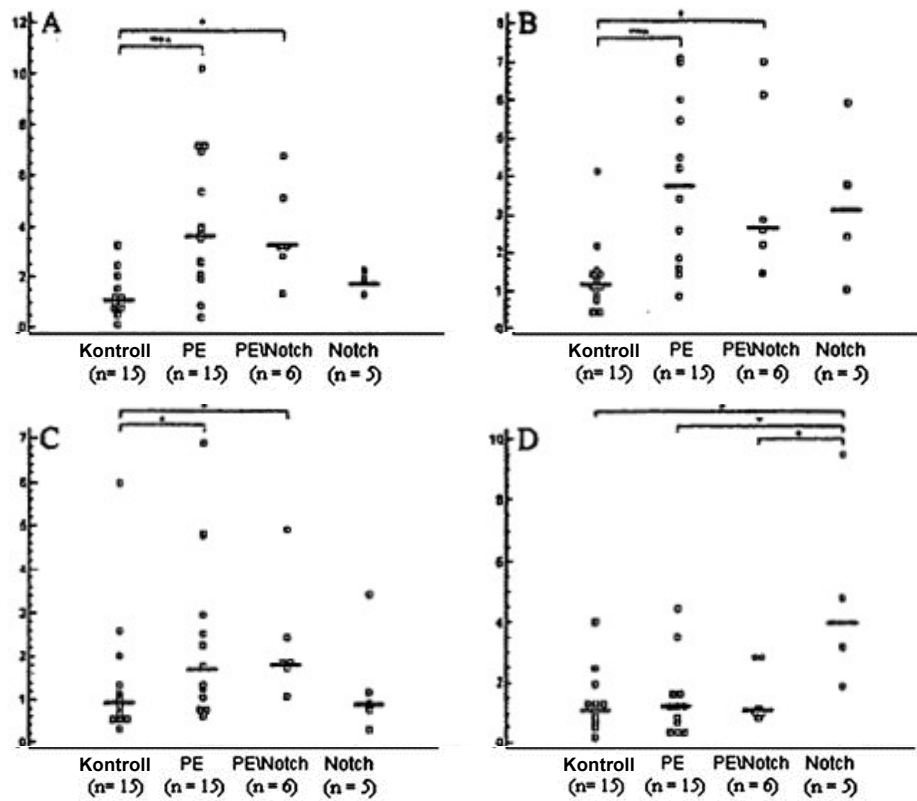


B



C

**Fig. 3**

**Fig. 4**

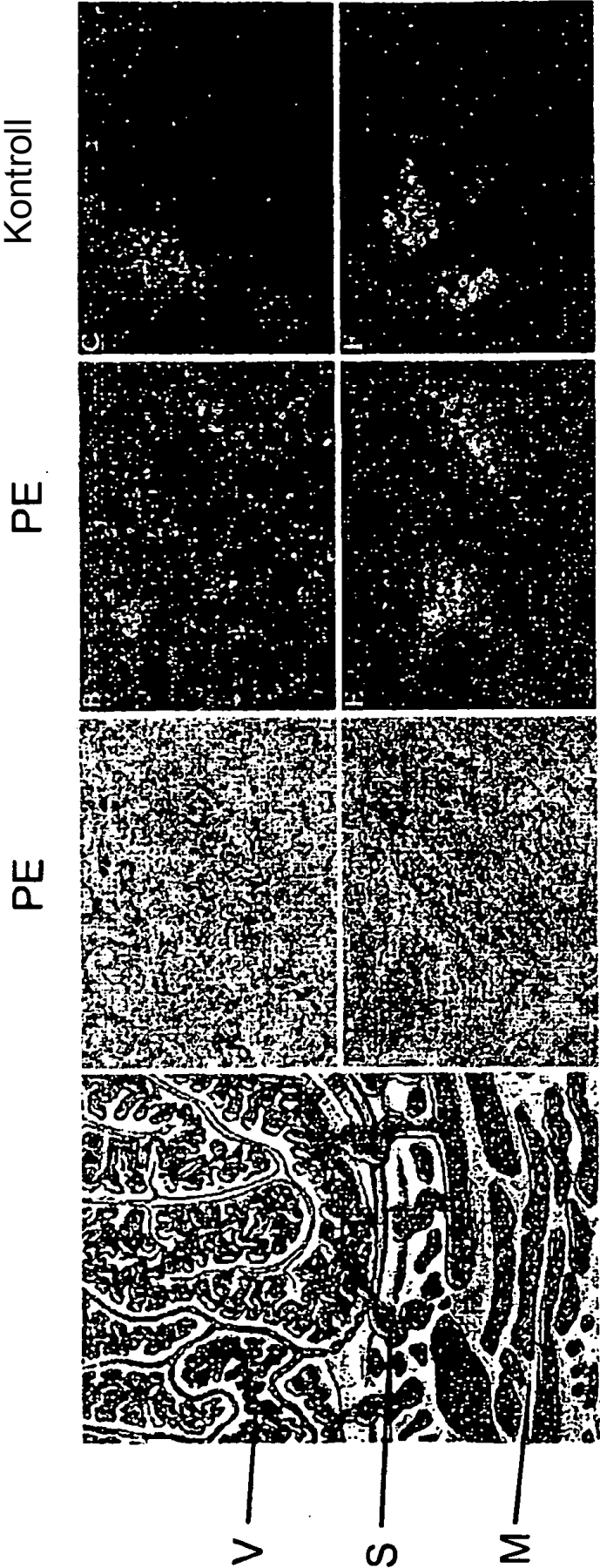
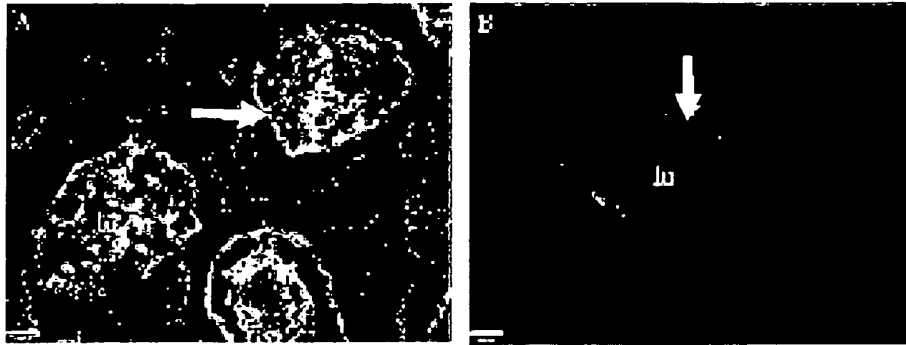
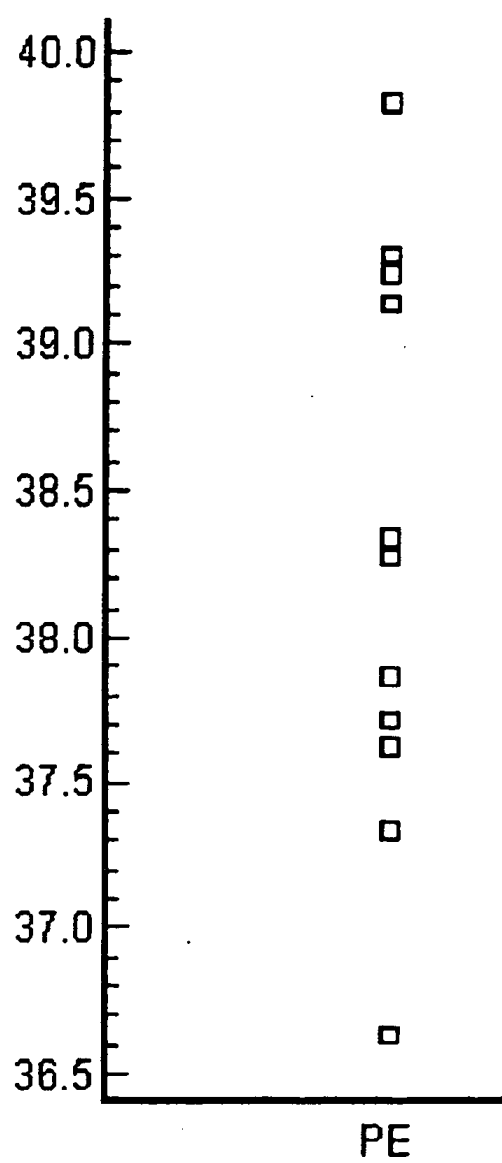


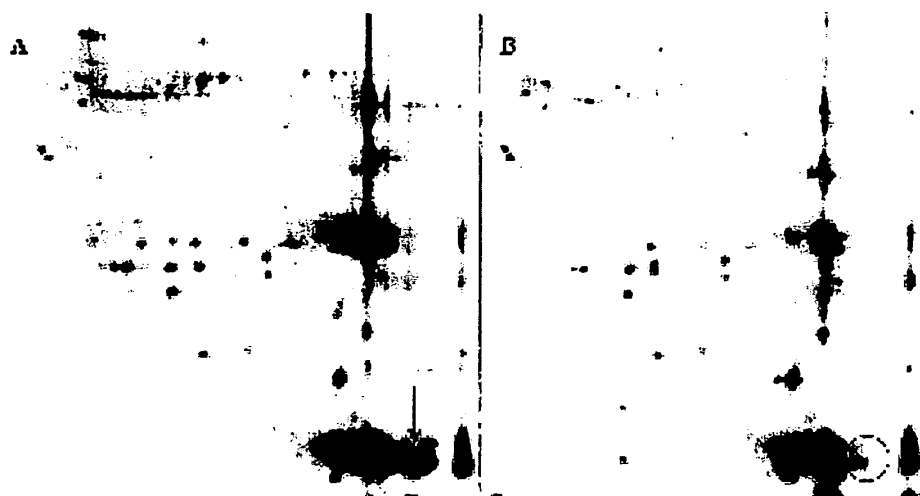
Fig. 5

Preeklampsi

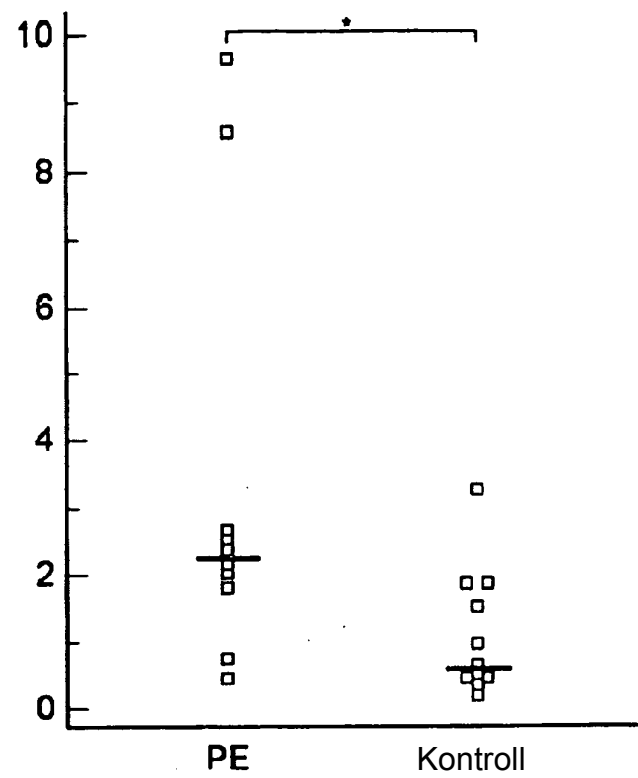
Kontroll

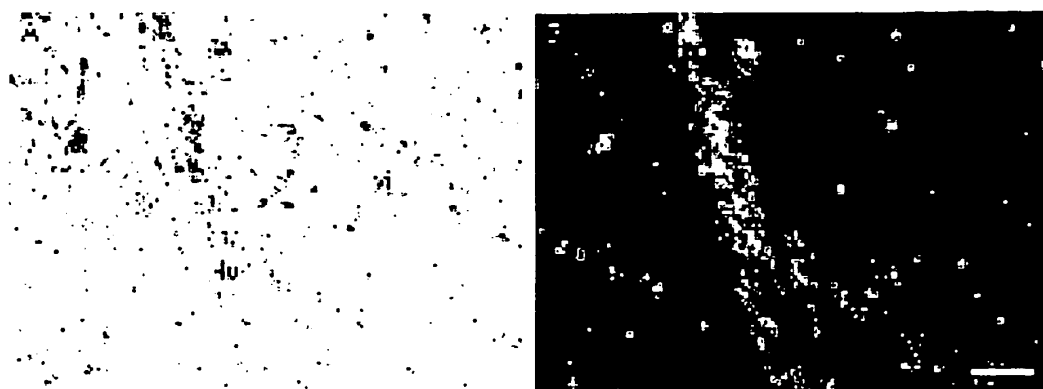
**Fig. 6**

**Fig. 7**

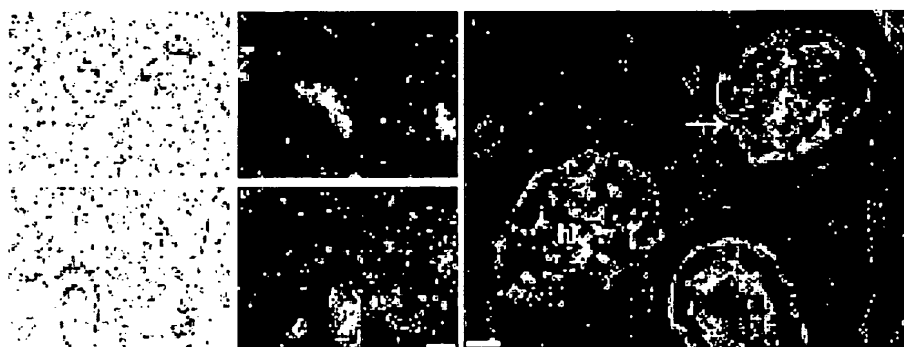


**Fig. 8**

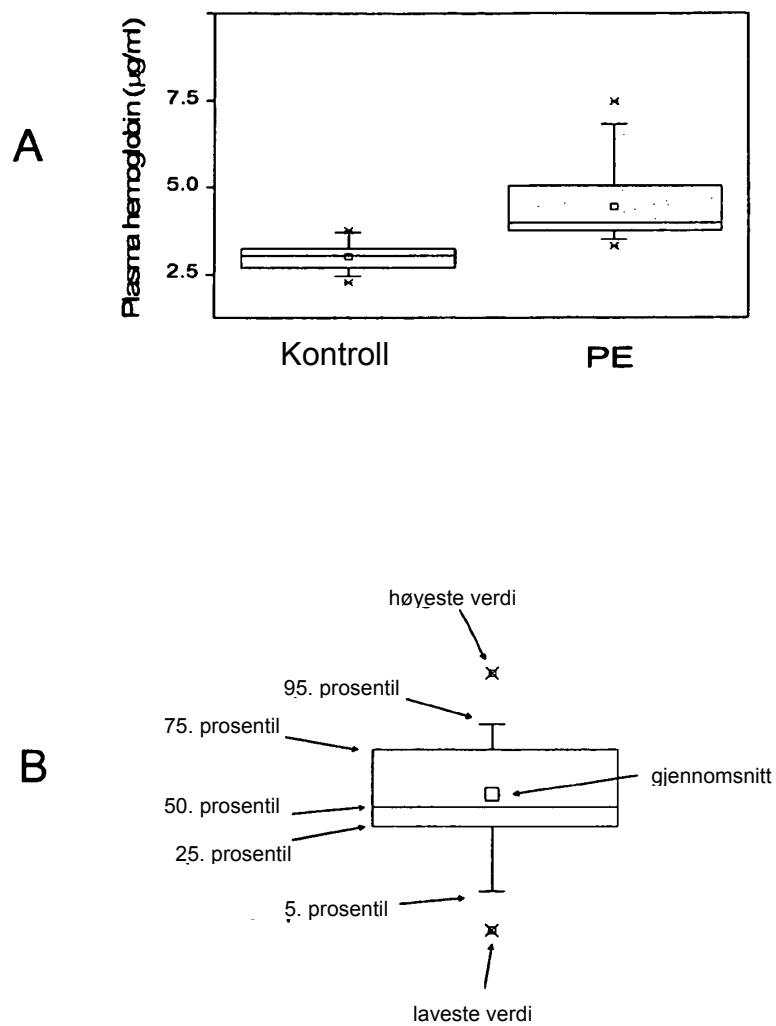
**Fig. 9**

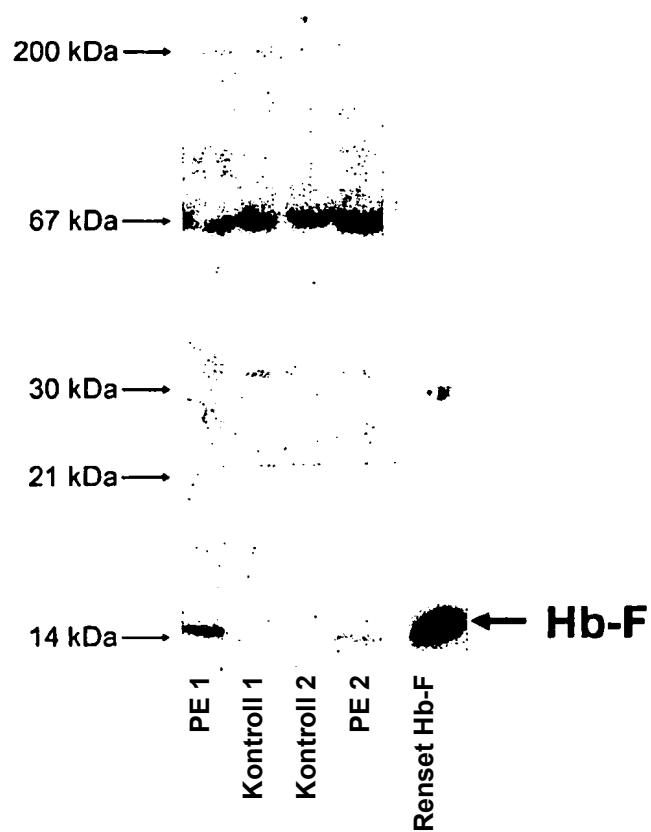


**Fig. 10**



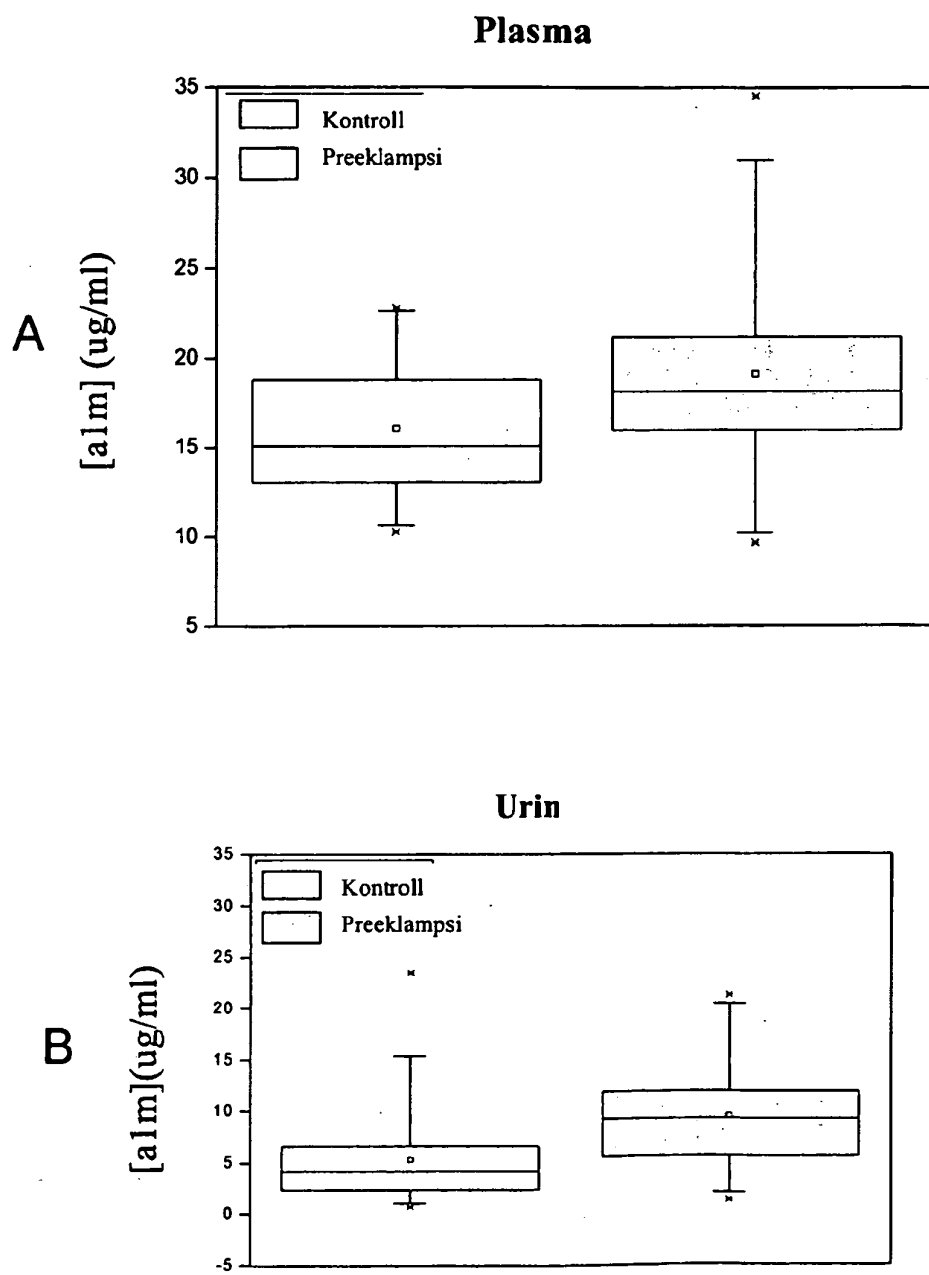
**Fig. 11**

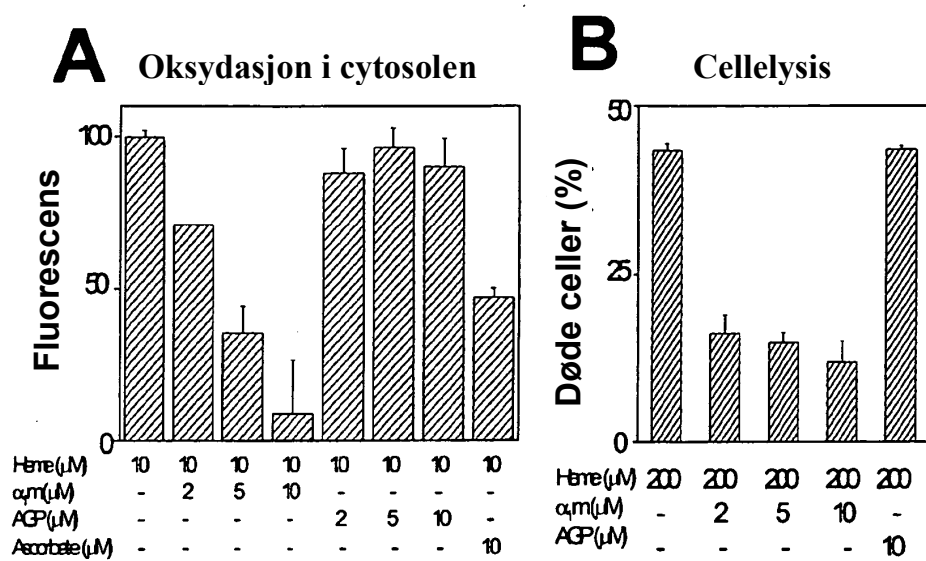
**Fig. 12**

**Fig. 13**

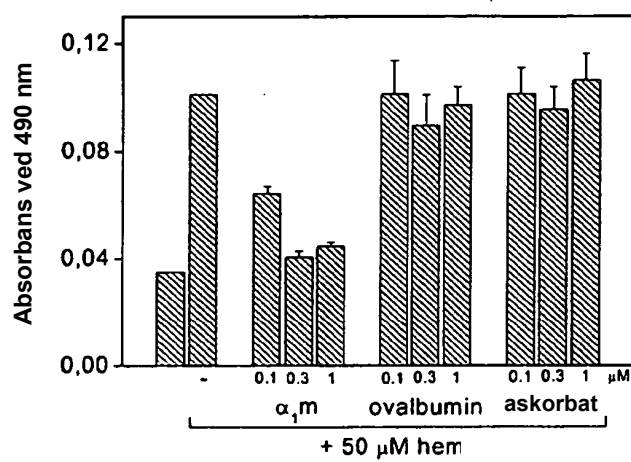


**Fig. 14**

**Fig. 15**



**Fig. 16**

**Fig. 17**

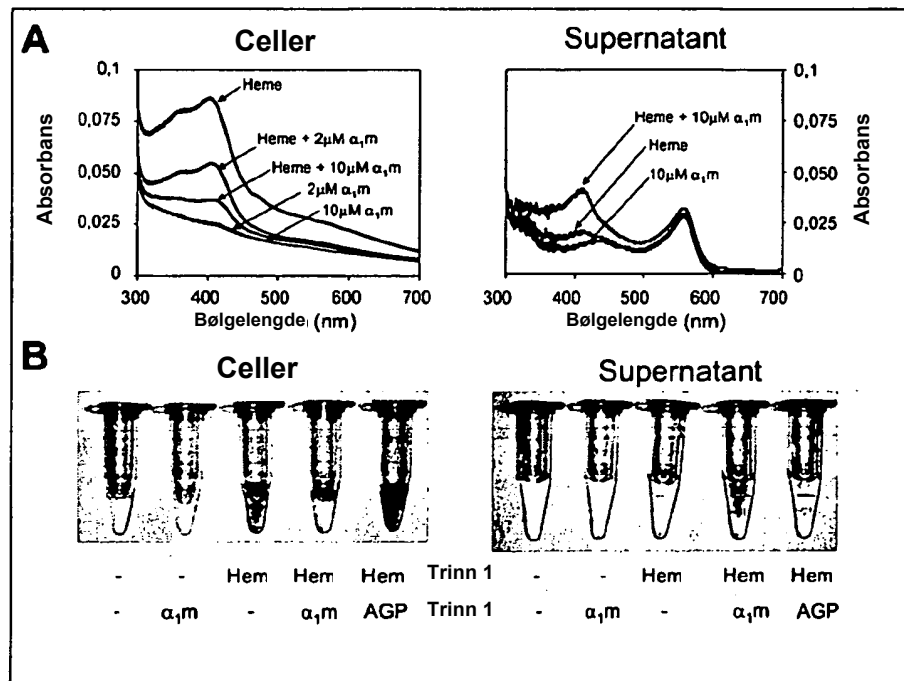
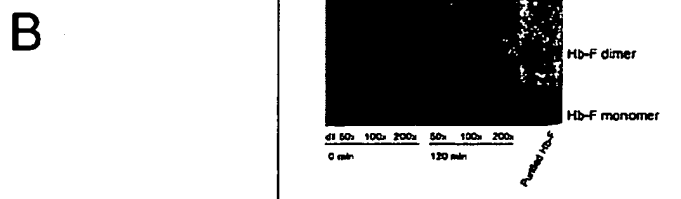
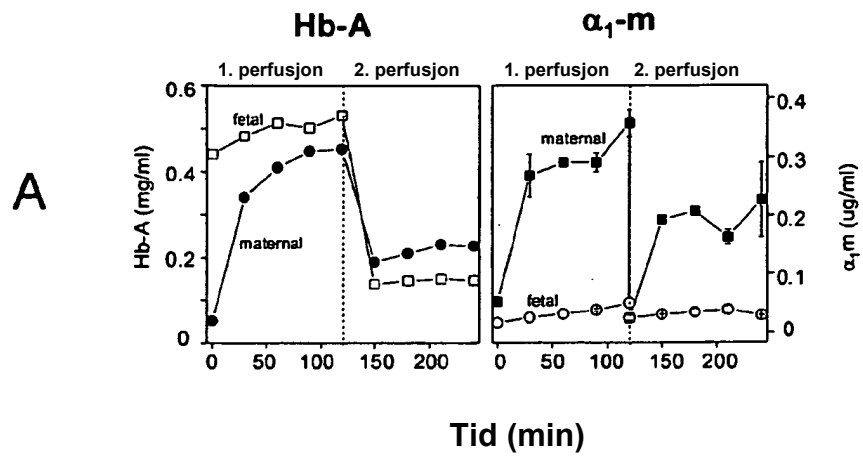
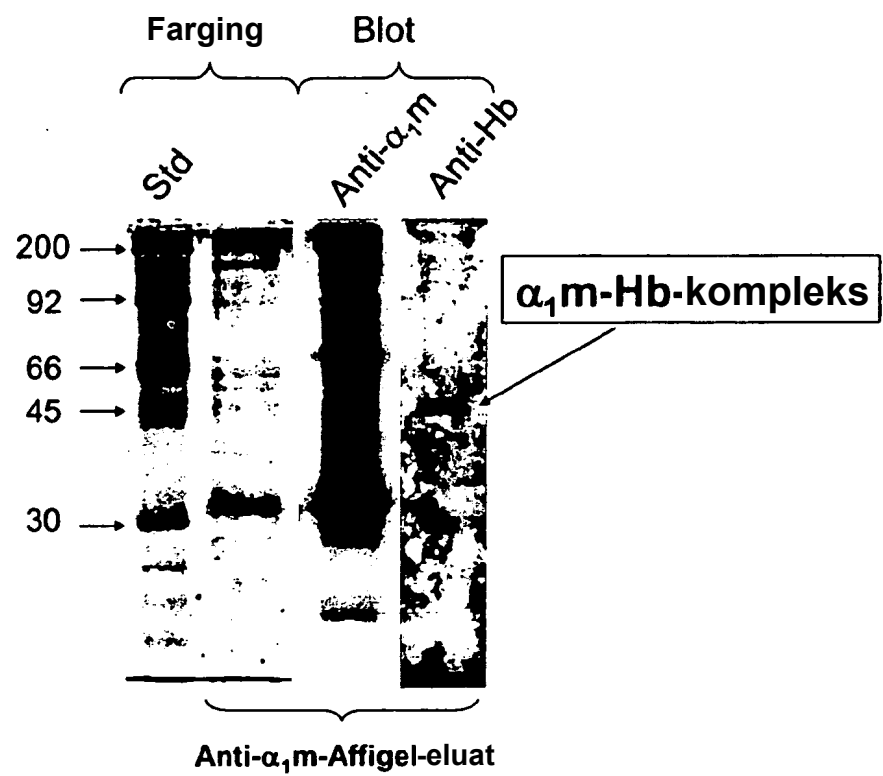
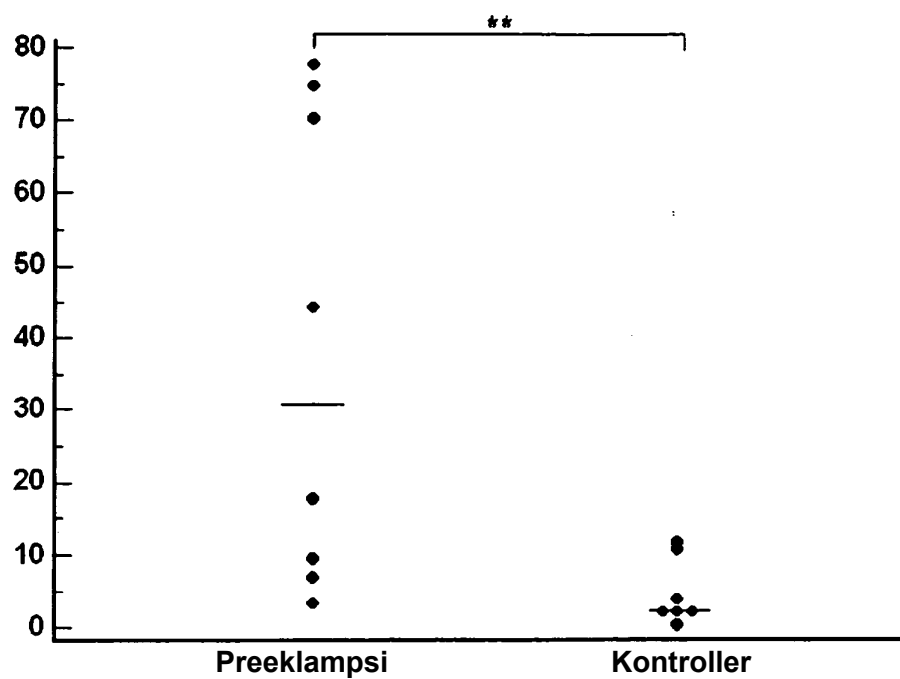


Fig. 18

**Fig. 19**

**Fig. 20**

**Fig. 21**