

## **OBRAZLOŽENJE TEME**

### **Prediktivni značaj plazma proteina A vezanog za trudnoću i slobodnog humanog horionskog gonadotropina za tok i ishod trudnoće**

#### **UVOD**

U svakom savremenom i civilizovanom društvu zaštita majke i djeteta mora se temeljiti na opšte priznatim pravilima „biti zdravo rođen“ i „biti zdravo podignut“.

Biohemijska analiza seruma trudnice u svrhu dijagnostike Down-ovog sindroma i oštećenja neuralne cijevi postala je sastavni dio svake moderno organizovane prenatalne brige. Primjena ovog neinvazivnog testa počela je još ranih devedesetih godina i osim nesumnjive koristi u detekciji pomenutih poremećaja, sve više se čini da je korisna u kliničkoj procjeni ugroženosti ploda i trudnice.

Širok spektar hormonskih promjena doprinosi fiziološkoj adaptaciji majke u toku gestacije. Ravnoteža tečnosti, krvnog pritiska, varenja, disanja, metabolizma energije i minerala, imunološkog odgovora, i nekoliko bihevioralnih funkcija su reprogramirane u toku trudnoće i modulirane hormonskim promjenama, od vrlo rane gestacije do porođaja kao i nakon toga (Taylor et al., 1997, Gagnon et al., 2008, Fialova et al., 2002, Goetzinger et al., 2010). Ove hormonske promjene se razlikuju u patološkim trudnoćama i mogu biti nadgledane radi dijagnoze ili predviđanja rizika od gestacijskih bolesti, uzimajući u obzir i hormonske nivoe i prethodne faktore rizika kod majke.

Intrauterusna tkiva (placenta, amnion, horion, decidua) sintetiziraju hormone i citokine (Karagiannis et al., 2011, Mahmud et Mazza, 2010, Berghella et al., 2010) koji igraju odlučujuću ulogu u fiziološkom odnosu između fetusa i majke, u reprogramiranju endokrinog sistema majke, i u mehanizmima za signalizaciju koji određuju vrijeme parturicije, tj. porođaja (Grammatopoulos et al., 1999, Akolekar et al., 2011, Odibo et al., 2011, Spencer et al., 2005, Urdzik et al., 2007). Nivo informacija u vezi sa placentalnim hormonima se povećao zadnjih nekoliko godina i imao je veliki uticaj na prepoznavanje sistema gestacijskih poremećaja. Istovremeno, najnovije analize su sada postale dostupne i dozvolile su preciznu provjeru nekoliko placentalnih hormona u cirkulaciji majke i fetusa, kao i u amnionskoj tečnosti. Kao prirodna posljedica ovih dostignuća, placentalni hormoni su ispitivani kao biohemijski znakovi (markeri) gestacijskih bolesti.

Pretjerano oslobađanje nekih placentalnih hormona u vezi sa gestacijskim bolestima može biti dio adaptivne reakcije placente i fetalnih membrana na nepovoljne uslove u okolini, kao što su hipertenzija, hipoksija i infekcija, ili malformacije fetusa i placente. Visoke koncentracije ovih hormona u perifernoj krvi majke, u krvi fetusa (vrpca), i u amnionskoj tečnosti, klinički su dostupni znaci povećane hormonske sinteze. Neurohormoni i steroidi imaju više endokrinih osobina i mjerljivi su u serumu, pljuvački ili urinu majke, dok su faktori rasta i citokini više izmijenjeni u vrpčanom serumu i amnionskoj tečnosti, vjerovatno zbog adaptivne reakcije fetusa / membrane. Ove hormonske promjene su vjerovatno nespecifični funkcionalni pratioci strukturalnih promjena kao što su proliferacija trofoblastnih ćelija i povećana istaknutost stroma resica (Petraglia et al., 1996 Nasrin et al., 2010, Huang et al., 2010).

Potencijalni problem u izvođenju zaključaka iz rezultata epidemioloških studija i njihovoj primjeni na kliničku praksu je da „normalne“ hormonske koncentracije mogu da

se mijenjaju od jedne populacije do druge i takođe iz nedelje u nedelju gestacije. Ovaj problem je srećom prevaziđen uvođenjem multipli medijana (MoM) zdravih osoba, kao jedinice za konvertovanje hormonskih koncentracija i računanje devijacija više i manje u odnosu na normalnu medijanu.

Neinvazivni program prenatalnog izbora za Daunov sindrom započinje 1970. godine mjerenjem alfa-fetoproteina (AFP) u serumu trudnica. Već je tada uočeno da su povećane vrijednosti MS-AFP povezane sa oštećenjem neuralne cijevi kao i malformacijama gastrointestinalnog trakta fetusa. Uočeno je takođe da se uz povišene vrijednosti MS-AFP češće dijagnosticiraju intrauterin zastoj u rastu, prevremeni porodaj i fetalna i neonatalna smrt (Bačić, 2004). Kasnih osamdesetih i ranih devedesetih godina započinje izbor za trizomiju 21 i ostale hromozomske abnormalnosti odredjivanjem vrijednosti humanog horionskog gonadotropina (hCG) ili slobodnog  $\beta$ -hCG (Dugoff et al., 2004).

Već u ranom periodu primjene perinatalnog izbora publikovane su mnoge studije o povezanosti povišenih vrijednosti hCG i slobodnog  $\beta$ -hCG i prenatalne ugroženosti kakva se već opažala kod povišenih vrijednosti AFP u majčinom serumu (Pagano et al., 1994, Spencer et al., 2005).

Današnja nastojanja idu u smislu „pomjeranja“ prenatalnog biohemijskog izbora za Down-ov sindrom iz drugog u prvo tromjesečje trudnoće. Tako je 1997. godine grupa autora s *Royal College of Obstetricians and Gynaecologist* preporučila prenatalni biohemijski test izbora za Down-ov sindrom između 9. i 13. nedjelje gestacije (Laml et al., 2001). Kao vrlo koristan serumski marker prvog tromjesječja navodi se *pregnancy associated plasma protein-A* (PAPP-A) odnosno za trudnoću vezan plazma protein -A, a ističe se i važnost njegovog mjerenja u kombinaciji sa slobodnim  $\beta$ -hCG (Singh et al., 2001). Uočeno je da pomenuta kombinacija serumskih markera ima jednaku dijagnostičku pouzdanost kao i prenatalni biohemijski izbor u drugom tromjesečju (Barros et al., 2001). Prednost je naravno, u ranijem dobijanju nalaza što omogućava raniju primjenu invazivnih dijagnostičkih postupaka i prekid trudnoće u slučajevima lošeg nalaza. Posebno se, zadnjih godina, u svrhu detekcije trizomije 21 tokom prvog tromjesječja, uz serumske markere kao što su PAPP-A i slobodni  $\beta$ -hCG, mjeri i nugalni nabor za koga se smatra da je najbolji ultrazvučni marker trizomije 21 (Reis et al., 2002).

Prema nekim radovima, prenatalni test izbora za Down-ov sindrom i oštećenje neuralne cijevi, osim što ukazuje na rizik za aneuploidiju i određene malformacije ploda, potencijalni je pretskazatelj kasnijih komplikacija trudnoće (Challis et al., 2000). Zadnjih nekoliko godina zapaženo je da uz povećane vrijednosti hCG ili slobodnog  $\beta$ -hCG u drugom tromjesečju trudnoće češće dolazi do ugroženosti ploda u smislu spontanog pobačaja, prevremenog obilježavanja posteljice, hipertenzije/preeklampsije (Knight et al., 2000). Da bi pomenuti biohemijski markeri imali veću prognostičku vrijednost u navedenom smislu, potrebno je tačno odrediti gestaciju, te isključiti višeploidnu trudnoću, hromozomopatije i dijabetes (Barros et al., 2001).

## **RADNA HIPOTEZA**

1. Povećane vrijednosti hCG-a ili slobodnog  $\beta$ -hCG-a u prvom i drugom tromjesječju trudnoće ukazuju na ugroženost ploda u smislu spontanog pobačaja,

- prevremenog oblublivanja posteljice to jeste prevremenog porodjaja, kao i na hipertenziju/preeklampsiju i intrauterin zastoј rasta.
2. Povezanost sniženih vrijednosti  $\beta$ hCG-a u prva dva tromjesečja trudnoće su u korelaciji sa pojavom gestacijskog dijabetesa.
  3. Postoji pozitivna korelacija između povišenih nivoa PAPP-A u prva dva tromjesečja trudnoće i krajnje težine pri rođenju posle 38-41 nedjelje gestacije, kao i pozitivna korelacija sa trudnoćom izazvanom hipertenzijom.
  4. Niže koncentracije PAPP-A u toku prva dva tromjesečja trudnoće povezane su sa ranijim započinjanjem spontanog porodjaja u terminu za porodjaj, kao i sa intrauterinom retardacijom rasta i gestacijskim dijabetesom.

## CILJEVI ISTRAŽIVANA

Ovo istraživanje ima za cilj da utvrdi da li su odstupanja referentnih vrijednosti nekih biohemijskih parametara (slobodni  $\beta$ hCG i PAPP-A) u korelaciji sa komplikacijama u trudnoći, to jeste, sa intrauterinom retardacijom rasta, trudnoćom izazvanom hipertenzijom, gestacijskim dijabetesom, kao i sa malom porođajnom težinom i prevremenim porođajem.

U svrhu procjene validnosti ovih biohemijskih parametara u predikciji komplikacija u trudnoći neophodno je analizirati i statistički obraditi sledeće:

1. Koncentracije PAPP-A u kontrolnoj i ispitivanoj grupi ( da li ima statističke značajnosti u njihovoj razlici)

Koncentracije PAPP-A kod starosnih grupa (do 25 godina starosti, 25-35, više od 35)

Koncentracije PAPP-A kod grupe sa abortusima i grupe bez abortusa

Koncentracije PAPP-A kod grupa po broju prethodnih porođaja

Koncentracije PAPP-A kod grupe koja je imala IUGR u odnosu na grupu bez IUGR

Koncentracije PAPP-A kod grupe sa gestacijskim dijabetesom u odnosu na grupu bez gestacijskog dijabetesa

Koncentracije PAPP-A kod PIH u odnosu na grupu bez PIH

Koncentracije PAPP-A kod grupe prevremenih porođaja u odnosu na terminske porođaje

Koncentracije PAPP-A kod različitih porođajnih težina (grupe: do 2500g, 2500-3000, 3000-4000, više od 4000)

Uporediti da li je medju ovim grupama bilo statistički značajne razlike u vrijednostima PAPP-A (npr. kod grupe sa IUGR u odnosu na grupu sa PIH...)

2. FreehCG- ispitati isto sto i za prethodni parametar, odnosno PAPP-A
3. Ispitati da li su prethodni abortusi (tj njihovo prisustvo odnosno odsustvo) uticali na porođajne težine ili ne, kao i na termin porođaja (prevremeni ili ne)

Ispitati da li su prethodni abortusi uticali na pojavu (odnosno bili povezani sa pojavom) IUGR-a, gestacijskog dijabetesa, PIH

4. Ispitati iste relacije kao u tački 3 i za broj prethodnih porođaja po datim grupama (bez predhodnih porođaja, 1 predhodni porođaj, 2 predhodna porođaja i više od 2 predhodna porođaja)
5. Ispitati isto što i u tačkama 3 i 4 za godine starosti majke po grupama do 25 godina, 25-35, više od 35
6. Ispitati da li je grupa koja je imala IUGR bila povezana sa preterminskim porođajima
7. Isto što smo ispitivali u tački 6 za IUGR ispitati i za parametar gestacijski diabetes
8. Isto što smo ispitivali u tačkama 6 i 7 ispitati i za parametar PIH tj trudnoćom izazvanu hipertenziju
9. Kontrolnu grupu (fiziološki zdrave trudnice) treba naravno uporediti sa svim ispitivanim grupama

Imajući ovo u vidu, glavni cilj rada je da se na osnovu dobijenih rezultata ispita da li negativan test za Down-ov sindrom može u kasnijem toku trudnoće upućivati na pojavu pomenutih komplikacija (IUGR, PIH, gestacijski dijabetes), kao i na pojavu lošeg perinatalnog ishoda, odnosno male porođajne težine i prevremenog porođaja.

## **MATERIJAL I METODE**

Preliminarno istraživanje je uradjeno na Odjeljenju Ginekologije, Perinatologije i Opstetricije Poliklinike Umberto I Univerziteta «La Sapienza» u Rimu. Obuhvatilo je 200 trudnica između desete i trinaeste nedjelje trudnoće. Kao sastavni dio skrininga trizomije 21, ispitanicama su određivane vrijednosti plazma proteina-A vezanog za trudnoću (PAPP-A) i beta-humanog horionskog gonadotropina ( $\beta$ HCG), u kombinaciji sa nuhalnom translucencom (NT).

Podaci o trudnoći pacijentkinja se dobijaju popunjavanjem odgovarajućeg upitnika.

Ispitanice čiji su fetusi pokazivali hromozomske ili strukturne promjene, kao i trudnice koje su bolovale od hroničnih patologija, to jeste od hronične hipertenzije i insulin-vezanog dijabetesa, su isključene.

Nakon ovog istraživanja javila se ideja o ispitivanju pomenutih biohemijskih parametara kao eventualnih pretskazatelja nastanka eventualnih komplikacija u trudnoći. Shodno tome ispitivanje bi obuhvatilo 500 trudnica u Kliničkom centru Crne Gore, pa bi konačna studija imala 700 trudnica.

Analiza će obuhvatiti obradu baze podataka koju sačinjavaju: anamneza, demografski podaci, sonografski nalazi (NT) i biohemijski rezultati (free-βhCG, PAPP-A).

Komplikacije koje bi se pojavile u toku trudnoće praćenih ispitanica i koje bi bile od interesa za ovu analizu bile bi sledeće:

- spontani pobačaj
- intrauterina retardacija rasta
- hipertenzija kao posledica trudnoće (PIH) sa i bez proteinurija
- gestacijski dijabetes
- uginuće ploda u materici
- prijevremeno pucanje vodenjaka
- prevremeni porodaj
- mala težina novorodjenčeta na porodjaju i makrosomija

Biohemijska analiza za PAPP-A će biti uradjena korišćenjem testa na imunofluorescentnost (Wallac DELFIA Xpress). Za free hCGβ će se koristiti kit na imunofluorescentnost (Wellac DELFIA Xpress). Rezultati bi bili izraženi kao multipla mediana (MoM) specifičnih gestacijskih doba (EG). Mjerenje Crown-Rump Length-a (CRL) i nuhalne translucence (NT) će se vršiti endovaginalnom sondom. Rizik za sindrom Down će se procenjivati korišćenjem LifeCycle software (verzija 2.2.4 PerkinElmer Life Sciences, Wallac Oy). Pacijentkinje koje bi se pokazale pozitivne na screening, svrstaće se u kategoriju realnog rizika sindroma Down i to u razmjeri većoj od 1:380, u saglasnosti sa indikativnim reperima, i istima će se savjetovati da pristupe analizi hromozoma, kako putem vilocenteze (CVS) tako i amniocenteze (A).

U ovom istraživanju posebno ćemo analizirati, pored biohemijskih markera (slobodnog humanog horionskog gonadotropina i za trudnoću vezanog proteina plazme A), uticaj broja prethodnih trudnoća, broja abortusa, broja porodjaja (paritet) i starosnu dob trudnice kako bi se utvrdili mogući „ograničavajući faktori“ (engl. confounding factors) važni za analizu podataka.

Kod euplodnih fetusa, uvažavajući rezultate vezane za „ograničavajuće faktore“ koji utiču na vrijednosti serumskih markera, kao i neke od komplikacija koje bi se pojavile u toku trudnoće, a koje bi bile u fokusu našeg istraživanja (IUGR, PIH, gestacijski dijabetes,), kao i porodjajnu težinu i vrijeme porodjaja, formiraćemo uskladjene grupe ispitanica i kontrolnu grupu za našu analizu (fiziološki zdrave trudnice).

Koeficijent korelacije Pearson-a koristiće se za korelaciju izmedju promjenljivih (PAPP-A-free HCGβ) i svakog suprotnog ishoda. Statistička analiza će se raditi

korišćenjem Microsoft Excel ND Sigmastat verzija 3.1. Statistički će se uzeti u obzir vrijednost p-value manje od 0.05.

## **PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU**

S obzirom da je već ranije evaluiran rad o uspješnosti testa izbora za Down-ov sindrom i oštećenje neuralne cijevi, čini se logičnim nastaviti ispitivanja o mogućoj daljnjoj kliničkoj primjeni ovog testa.

Naime, zanimljivom se čini grupa trudnoća s negativnim nalazom biohemijskog testa izbora za Down-ov sindrom, za koju postoje u literaturi kontradiktorni podaci o eventualnoj ugroženosti s različitim patološkim zbivanjima u kasnijoj trudnoći (Barros et al., 2000, Kirkegard et al., 2010.). Naravno, neizostavan izazov za posebno praćenje predstavljaju trudnoće s lažno pozitivnim pomenutim testom. No, kako je izvjesnije da će se ovakve trudnoće pratiti sa intenzivnijim i budnijim nadzorom, ostaje nam grupa sa negativnim nalazom ovog testa. A kako na umu moramo imati da ne postoje trudnoće bez rizika, već samo one sa visokim i nižim rizikom, smatrali smo grupu trudnica sa negativnim nalazom ovog testa izazovnom za dalje praćenje, što se i pokazalo opravdanim u brojnom radovima (Singh et al., 2001, Challis et al., 2000, Knight et al., 2000, Spencer et al., 2008, Stoikova et al., 2010 ).

Iako je o toj problematici već objavljeno dosta radova, dobijeni rezultati često su oprečni, konfuzni, nesistematični te stoga teško uporedivi. Jedan od glavnih razloga takvom stanju je različit pristup istraživanju, odnosno izbor ispitivane i kontrolne grupe (Laml et al., 2001, Spencer et al., 2005, Canini et al., 2007, Poon et al., 2011).

Ukoliko bi se ovim radom potvrdile hipoteze bio bi to značajan doprinos predikciji pomenutih komplikacija u trudnoći kao i maloj porodjajnoj težini i prevremenoj parturiciji.

## **LITERATURA**

Taylor RN, Martin MC. The endocrinology of pregnancy. In: Greenspan FS, Strewler GJ, eds. Basic and Clinical Endocrinology. 1997; 20(1):548-574.

Gagnon A, Wilson RD, Audibert F, Allen VM, Blight C, Brock JA, Désilets VA, Johnson JA, Langlois S, Summers A, Wyatt P. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. J Obstet Gynaecol Can. 2008; 30(10):918-49.

Fialova L, Malbohan IM. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): theoretical and clinical aspects. Bratisl Lek Listy. 2002; 103(6):194-205.

Goetzinger KR, Singla A, Gerkowicz S, Dicke JM, Gray DL, Odibo AO. Predicting the risk of pre-eclampsia between 11 and 13 weeks' gestation by combining maternal

characteristics and serum analytes, PAPP-A and free  $\beta$ -hCG. *Prenat Diagn.* 2010; 30(12-13):1138-42.

Karagiannis G, Akolekar R, Sarquis R, Wright D, Nicolaides KH. Prediction of Small-for-Gestation Neonates from Biophysical and Biochemical Markers at 11-13 Weeks. *Fetal Diagn Therapy* 2011; 29(2):148-54

Mahmud M, Mazza D. Preconception care of women with diabetes: a review of current guideline recommendations. *BMC Womens Health* 2010;10:5-9

Berghella V, Buchanan E, Pereira L, Baxter JK. Preconception care. *Obstet Gynecol Surv.* 2010; 65(2):119-31.

Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotrophin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 1999; 354:1546-1549.

Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011; 31(1):66-74.

Odibo AO, Zhong Y, Longtine M, Tuuli M, Odibo L, Cahill AG, Macones GA, Nelson DM. First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta* 201; 32(4):333-8

Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat Diagn.* 2005; 25(10):949-53

Urdzík P, Dankovcík R, Ostró A, Lazár I. Prediction of intrauterine growth retardation using the integrated test markers. *Ceska Gynekol.* 2007; 72(4):268-79.

Nasrin B, Fatema N, Jebunnessa F, Shamim S, Chowdhury SB, Ali L. Early pregnancy maternal serum PAPP-A and urinary protein-creatinine ratio as predictive markers of pregnancy induced hypertension. *Mymensingh Med J.* 2010; 19(2):267-74.

Huang T, Hoffman B, Meschino W, Kingdom J, Okun N. Prediction of adverse pregnancy outcomes by combinations of first and second trimester biochemistry markers used in the routine prenatal screening of Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2010; 30(5):471-7.

Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, Hankins G, Berkowitz RL, Merkatz I, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Vidaver J, D'Alton ME. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191(4):1446-51

Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat Diagn.* 2005; 25(10):949-53

Laml T, Hartmann BW, Ruecklinger E, Preyer O, Soeregi G, Wagenbichler P. Maternal serum leptin concentration do not correlate with cord blood leptin concentration in normal pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8:43-47

Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A. Endothelin-1 in feto-placental tissue from normotensive pregnant women and women with pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001; 80:99-103.

Barros FC, Victora CG, Vaughan JP, Tomasi E, Horta BI, Cesar JA, Menezes MB, Halpern R, Post CI, del Mar GM. The epidemiological transition in maternal and child health in a Brazilian city, 1982-93: a comparison of two population-based cohorts. *Pediatr Perinat Epidemiol.* 2001; 15:4-11

Reis MF, D'Antona D, Petraglia F. Predictive Value of Hormone Measurements in Maternal and Fetal Complications of Pregnancy. *Endocrine Reviews* 2002; 23(2):230-257

Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 2000; 21:514-550

Knight M, Duley I, Henderson-Smith DJ, King JF. Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. 2000 Cochrane Database Syst Rev CD000492

Kirkegaard I, Uldbjerg N, Oxvig C. Biology of pregnancy-associated plasma protein-A in relation to prenatal diagnostics: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010; 89(9):1118-25

Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A. Endothelin-1 in feto-placental tissue from normotensive pregnant women and women with pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001; 80:99-103.

Spencer CA, Allen VM, Flowerdew G, Dooley K, Dodds L. Low levels of maternal serum PAPP-A in early pregnancy and the risk of adverse outcomes. *Prenat Diagn.* 2008; 28(11):1029-36.

Stoikova V, Ivanov S. Prediction of adverse pregnancy outcome by first-trimester maternal serum PAPP-A. *Akush Ginekolog.* 2010;49(1):40-3.

Laml T, Hartmann BW, Ruecklinger E, Preyer O, Soeregi G, Wagenbichler P. Maternal serum leptin concentration do not correlate with cord blood leptin concentration in normal pregnancy. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8:43-47



Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat Diagn.* 2005; 25(10):949-53

Canini S, Prefumo F, Pastorino D, Crocetti L, Afflitto CG, Venturini PL, De Biasio P. Association between birth weight and first-trimester free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Fertil Steril.* 2008; 89(1):174-8.

Poon LC, Karagiannis G, Staboulidou I, Shafiei A, Nicolaides KH. Reference range of birth weight with gestation and first-trimester prediction of small-for-gestation neonates. *Prenat Diagn.* 201; 31(1):58-65.