МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Акушерство и гинекология”

Д-Р ИЛИАНА МИХАЙЛОВА КОЛЕВА-КОРКЕЛИА

„РОЛЯТА НА ОКСИДАТИВНИТЕ НАРУШЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОТО РАЖДАНЕ”

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН

Д О К Т О Р

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ “АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
доц. д-р Мария Ангелова Ангелова, дм

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:
доц. д-р Миролюба Здравкова Тодорова-Калайджиева, дм

НАУЧНО ЖУРИ:
Проф. д-р Емил Георгиев Ковачев, дмн
Проф. д-р Петър Христов Петров, дмн
Доц. д-р Кремен Цветанов Цветков, дм
Доц. д-р Юлиан Руменов Ананиев, дм
Доц. д-р Христо Николов Мумджиев, дм

Стара Загора
2022

Дисертационният труд е написан на 173 стандартни машинописни страници и е онагледен с фигури, таблици и приложения. Книгописът включва 283 заглавия - 27 на кирилица и 256 на латиница, основната част от които от последните 10 години.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и предложен за публична защита пред научно жури на разширен катедрен съвет на катедра „Акушерство и гинекология" при Медицински факултет на Тракийски университет гр.Стара Загора на 13.04.2022 г., определен със заповед 59/30.03.2022 г. на Декана на Медицински факултет. Докторантът е отчислен със заповед на Ректора на Тракийски университет Стара Загора.

Публичната защита ще се състои на 13.07.2022 г. от 11 часа в Академичната зала на МФ на ТУ Стара Загора, ул. „Армейска"11.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински факултет Стара Загора, ул. „Армейска"11, Деканат, ет.2, стая 18.

Благодарности

Бих искала да отправя думи на благодарност към всички, без които този труд не би могъл да се реализира.

Бих искала да изкажа огромната си благодарност към научния си ръководител –
доц. д-р Мария Ангелова Ангелова, дм
и към научния си консултант –
доц. д-р Миролюба Здравкова Тодорова – Калайджиева, дм
за съдействието и помощта при разработването и подготовката на настоящия дисертационен труд.

Искрени благодарности на **доц. Янка Димитрова Карамалакова, дх** и **доц. Галина Димитрова Николова, дх** от ЕПР център на Тракийски университет - Стара Загора, които ми помогнаха в експерименталната работа с пациентите.

Бих искала също да изкажа благодарността си и на всички мои колеги, които ми помогнаха в цялостната работа и при дискутирането на проблемите, засегнати в дисертационния труд.

Благодаря ви!!!

Съдържание

Използвани съкращения …… 5
Въведение **……7**
I. Литературен обзор ……8
I.1. Биомеханизъм на родовата дейност ……9
I.2. Етиопатогенеза на преждевременното раждане ……9
I.2.1. Фактори, заболявания и състояния, предшестващи настоящта бременност ……..10
I.2.2. Фактори, свързани с настоящата бременност ……12
I.3. Свободни радикали. Видове. Образуване. ROS и RNS. Оксидативни промени, настъпващи през бременността ……15
I.4. Бременност – оксидативни промени и маркери на оксидативен стрес ……..20
II. Цел и задачи……21
III. Клиничен материал. Клинични, параклинични и биохимични методи. Характеристика на изследваните групи пациенти……21
III.1. Клиничен материал ……...21
III.1.1. Пациенти ……21
III.1.2. Критерии за включване в проучването ……22
III.1.3. Разделяне на пациентите в групите по характеристики ……22
III.2. Методи за определяне на рисковите фактори, оценка и проследяване на родовия процес, състоянието на бременната и плода ……22
III.2.1. Клинични методи ……...22
III.2.2. Апаратни методи ……23
III.2.3. Параклинични методи ……23
IV. Биохимичен материал и методи за определяне на свободно-радикалови и оксидативни нарушения ……23
IV.1. Биологичен материал ……23
IV.2. Биохимични методи ……...23
IV.3. ЕПР методи за определяне свободно-радикалови оксидативни нарушения ……23
IV.4. Имуно-ензимни методи ……..24
V. Статистически методи за обработка на резултатите ……24
VI. Характеристика на изследваните групи бременни жени, родилки и небременни контроли ……....25
VII. Резултати ……....26
VII.1. Характеристика на групите ……27
VII.2. Резултати свободно-радикалови и оксидативни стрес нарушения ……33
VII.2.1. Собствено проучване върху подбрани показатели на оксидативен стрес и антиоксидантния статус при нормална бременност и преждевременно раждане ……..33
VII.2.2. Проучване влиянието на оксидативните нарушения върху подбрани показатели на ендогенната антиоксидантна система: супероксид дисмутаза(SOD), каталаза (CAT), глутатион и глутатион пероксидаза. Тотален антиоксидантен капацитет ……....37
VII.3. Електрон парамагнитен резонанс (EPR) изследване на свободно радикаловите нива при подбрани показатели на оксидативен стрес: аскорбатни радикали, NO• радикали и ROS продукти ……43
VIII.Обсъждане на резултатите ……47
IX. Изводи ……..59
X.Приноси ……....60
XI.Приложения ……....62
XII.Публикации във връзка с дисертационния труд ……....65
XIII.Участие в научни форуми……..66
XIV.Проекти към Тракийски университет ……66

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

ПР – преждевременно раждане

зПР – заплашващо преждевременно раждане

сПР – спонтанно преждевременно раждане

РТ – раждане на термин

ВТР – вероятен термин на раждане

ИПР – ндекс на преждевременното раждане

ОС – оксидативен стрес

АОЗ – антиоксидантна защита

АОС – антиоксидантна система

АКФ – активни кислородни форми

ПОМ – пукнат околоплоден мехур

ППОМ – преждевремнно пукнат околоплоден мехур

ПОС – пикочо-отделителна система

ИЦИ – истмико-цервикална инсуфициенция

ЖК – женска консултация

СЗО – световна здравна организация

На латиница:

SOD - супероксиддисмутаза

CAT - каталаза

GSH - глутатион

GPx1- глутатионпероксидаза

GST - глутатионтрансфераза

CP - церулоплазмин

TAC – тотален антиоксидантен капацитет MDA - малондиалдехид

CRP – С-реактивен протеин

8-OHdG – 8-хидрокси-д-гуанозин

PCC – протеинкарбонилно съдържание

PG - простагландини

IL - интерлевкини

ROS – реактивни кислородни видове

RNS – реактивни азотни видове

EPR – елактрон парамагнитен резонанс

BMI – индекс на телесната маса

IUGR – интраутеринна ретардация на плода

SD – стандартно отклонение

•O_2 – супероксиден анион радикал

H_2O_2 – водороден пероксид

•OH – хидроксилен радикал

ROOH - хидропероксид

ROO• - перокси-радикал

NO• - азотен оксид

Asc• - аскорбатен радикал

ВЪВЕДЕНИЕ

Преждевременното (**предтерминно**) раждане (ПР) в световен мащаб остава проблем с клинична и социална значимост. В зависимост от причината за настъпването си тези случаи се разделят на два основни типа:

- ***Идиопатични, спонтанни преждевременни раждания***

- ***Изкуствено предизвикани, елективни преждевременни раждания.***

Етиологичните фактори на спонтанното ПР са многобройни и различни по характер и трудно се класифицират.Удачно те се разделят на:

Фактори, състояния и заболявания, предшестващи бременността (в по-голямата си част те не могат да бъдат избегнати, коригирани или лекувани в хода на бременността) и

Фактори, състояния и усложнения на настоящата бременност, които в комбинация с факторите, предшестващи бременността, могат да доведат до настъпване на преждевременно раждане.

ПР започва в резултат на сигнали, които активират трите елемента на родовата дейност:***маточни контракции, скъсяване и разширяване на маточната шийка, пукане на околоплодния мехур, като не е задължително това активиране да започне и протече едновременно***. В някои случаи превалира повишената маточна активност с болезнени маточни контракции, в други – структурните промени в маточната шийка, а в трети е налично преждевременно пукане на околоплодния мехур.

Всички тези промени се установяват при акушерското изследване и са белег на ПР – заплашващо или в ход, но никоя от тях не дава отговор на въпроса: „***Защо е започнало преждевременното раждане***?”. Засега единственият механизъм, който доказано води до ПР, са възпалителните процеси - ***стерилно възпаление, субклинична интраутеринна инфекция или разгърнат хориоамнионит***. При ПР доказано се намесва инфекциозното възпаление, но може би има и други механизми на тъканни увреждания, които могат да го причинят.

Развитието на бременността у жената е неразривно свързано със свободно-радикалово окисление и оксидативен стрес (ОС). Свободно-радикаловите оксидативни увреждания са изследвани при дезоксирибонуклеиновите киселини (DNA), където те водят до мутации в ключови гени,при липидите, както и при други компоненти на клетката, които водят до развитието на ракови образувания.

В клетката ниските нива на реактивни кислородни (ROS) и азотни (RNS) видове са необходими за протичането на нормалните физиологични процеси и модулирането на клетъчната функция. Обратно, високите ROS/RNS нива или неадекватното им

отстраняване от антиоксидантните механизми води до ОС, който опосредства и нарушения в клетъчната функция

Към свободно-радикаловите реакции се отнасят и повечето биохимични окислително-редукционни процеси. Повишената ROS-сигнализация може да бъде фактор в процеса на стареене, което се свързва с повишен ОС. Свръхпродукцията на ROS може да доведе до ред биохимични нарушения в плода и до масивни и тежки клетъчни увреждания в майчиния организъм чрез въздействие върху протеините, липидите и ДНК. *In vitro* и *in vivo* изследвания демонстрират, че при ПР има дисбаланс между про- и антиоксидантите в майчиния организъм. Този дисбаланс – ОС, е патофизиологичен механизъм на ПР, като най-вероятно се проявява хетерогенност в отговора на майчиния организъм на ОС.

Използването на електронния парамагнитен резонанс (EPR) като директен и надежден метод за откриване на свободни радикали, както в нормалните им нива на циркулация по време на бременност на термин, така и при свръхпроизводството им, може да окачести оксидативния дисбаланс между про- и антиоксидантните системи в майчиния организъм и да даде отговори за патогенетичните процеси при преждевременно раждане (ПР).

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Преждевременното раждане (ПР) остава глобален проблем. От неговия резултат – раждане на недоносено дете, не е пощадена нито една страна в света. Всяка година в света се раждат около 15 млн недоносени деца. В Европа те са около 500 000. Процентът на ПР е различен за различните страни. По данни на СЗО той се движи между 5% и 18%.

България също спада към групата страни в Европа със сравнително висока честота на ПР. Този процент за последните години е 9,5-10,5 %. Причините за този сравнително висок процент на ПР у нас са много:

- ***повишаващ се брой на жени, необхванати в ЖК (предимно поради социално-икономически причини);***
- ***повишаващ се брой на in vitro процедури;***
- ***повишаващ се брой на раждания от жени >35 години и др.***

ПР възниква по много причини. То може да бъде разделено на два основни типа:

- ***Идиопатично, спонтанно преждевременно раждане*** (70-80% от преждевременните раждания) със спонтанно започнали маточни контракции при запазена цялост на околоплодните мембрани (40-50%) или раждане след преждевременно пукане на околоплодния мехур без декларирана родова дейност (25-40 %).

- ***Изкуствено предизвикано преждевременно раждане*** (20-30 % от всички преждевременни раждания) чрез индукция на родовата дейност или чрез цезарово сечение по индикации от страна на майката или на плода преди края на 37 г.с.

I.1. БИОМЕХАНИЗЪМ НА РОДОВАТА ДЕЙНОСТ

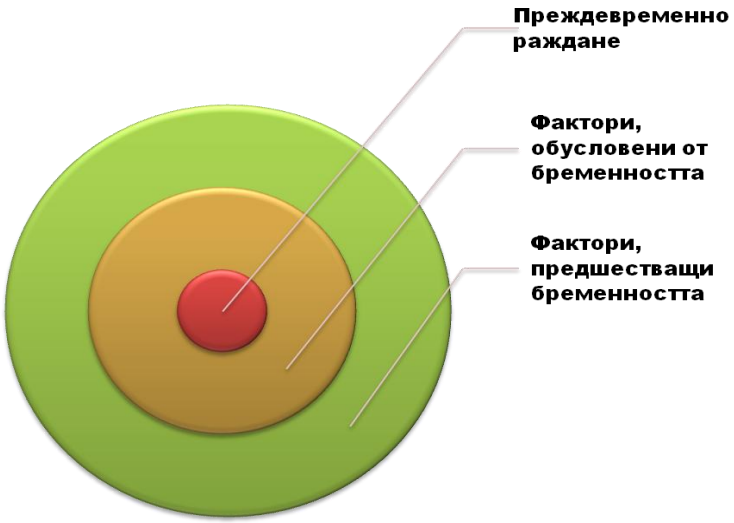
Причините за спонтанното започване на раждането, на „отключването" на родовата дейност и до днес не са напълно изяснени.

Понастоящем се приема, че раждането започва под въздействието на биохимични и механични стимули, генерирани от майката и плода. Най-голяма роля за започването на раждането имат плацентата и феталните мембрани. Плодът може да модулира точния момент на това започване.

I.2. ЕТИОПАТОГЕНЕЗА НА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОТО РАЖДАНЕ

Етиологичните фактори на преждевременното раждане са твърде многобройни и разновидни. Това прави трудно тяхното систематизиране и представяне в стройна класификация. Удачно е разделянето им на:

- ✓ ***Фактори, състояния и заболявания, предшестващи бременността и***
- ✓ ***Фактори, състояния и заболявания, усложняващи настоящата бременност***, чиято взаимна свързаност е представена на ***Фигура 1.***



Фигура 1. *Взаимодействие на факторите на преждевременното раждане – върху предшестващите бременността фактори се наслагват факторите, обусловени от нея и ПР настъпва под влияние на тяхното комбинирано действие*

Факторите, състоянията и заболяванията, предшестващи настоящата бременност, в по-голямата си част не могат да бъдат избегнати, коригирани или лекувани в нейния ход. Т.е. тяхното въздействие остава константно през цялата бременност.

Факторите, състоянията и усложненията на настоящата бременност в комбинация с факторите, предшестващи бременността, могат да доведат до настъпване на преждевременно раждане.

I.2.1. ФАКТОРИ, СЪСТОЯНИЯ И ЗАБОЛЯВАНИЯ, ПРЕДШЕСТВАЩИ НАСТОЯЩАТА БРЕМЕННОСТ

I.2.1.1. Възраст

Редица проучвания отчитат връзката на възрастта на майката с ПР, но като самостоятелен фактор тя е недостатъчно проучена.

Като рисков фактор за ПР се приема ***адолесцентната възраст***.Същевременно в световен мащаб все повече жени раждат във ***възрастта след 40 години***. Най-застрашени са жени на възраст под 14 години. След това рискът намалява и отново започва да се увеличава към 34-годишна възраст, след което прогресивно нараства до 44-та година от живота на жената.

I.2.1.2. Етническа принадлежност

Наблюдават се големи разлики в честотата на ПР между отделните етнически групи. С най-висок риск са жените с африканско потекло, с най-нисък риск - жените от кавказката група.

I.2.1.3. Аномалии на матката

Маточните прегради, едно- и двурогата матка, двойната матка са отдавна известни причини за ПР. Рискът за спонтанно ПР при жени с аномалии на матката е значително по-висок, отколкото при жени с нормална анатомия на половата система.

I.2.1.4. Истмико-цервикална инсуфициенция (ИЦИ)

Истмико-цервикалната инсуфициенция е самостоятелен фактор за ПР. Тя може да бъде ***вродена*** (при непълноценно развитие на мускулатурата й, при невроендокринни причини) и ***придобита*** (след увреждане при хирургични операции върху нея, след дилатации при инструментални интервенции в маточната кухина, след оперативни раждания).

I.2.1.5. Преждевременни раждания в анамнезата.

Наличието на ПР обременява следващите бременности с риск от ново. Колкото повече са ПР в миналото, толкова по-висок е рискът от следващо такова.

I.2.1.6. Предшестващи вътрематочни манипулации

Значение имат предшестващите изкуствени аборти, направени по класическия хирургичен начин и кюртажите на матката по повод на заболявания, несвързани с

настоящата бременност. Основно значение при тях имат цервикалната травма и вътрематочната инфекция.

I.2.1.7. Тютюнопушене, алкохол, наркотици

Жените-пушачи са по-застрашени от ПР.

Употребата на алкохол по време на бременността повишава риска от ПР, интраутеринна ретардация на плода и раждане на дете с ниско тегло, като значение има и количеството изпит за денонощие алкохол.

Употребата на наркотици повишава риска от много и тежки усложнения на бременността – най-вече ПР и ниско тегло на плода при раждането, а също така преекламсия и абрупцио на плацентата

I.2.1.8. Пародонтоза

Пародонтозата е огнище на инфекция в организма на бременната жена. От нея могат да се разпространяват възпалителни цитокини по хематогенен път. Счита се, че лечението й може да намали случаите на ПР. Други проучвания не подкрепят тази теза.

I.2.1.9. Генетични фактори

Продължителността на бременността при човека е под много фин контрол от страна на гените на майката и на плода.

В генома на майката са установени 6 генни локуса, които са непосредствено свързани с продължителността на бременността и ПР.

Геномни асоциативни проучвания са правени и при плодовете. В техния геном е идентифициран локус, свързан с продължителността на бременността.

Тези идентифицирани хромозомни локус и към момента нямат клинично-диагностична стойност при прогнозирането на ПР. Но те са едно ново биологично постижение, което има за цел да идентифицира генетични варианти, които са свързани с продължителността на бременността и риска от ПР.

I.2.1.10. Наследственост

Жени, които са родени преждевременно или имат братя и сестри, родени недоносени, имат с 60% по-висок риск да родят първото си дете недоносено. По-голямата част от генетичния риск за ПР се предава по женска линия, като по този начин се предполага ролята на митохондриалното унаследяване.

I.2.1.11. Имунологични фактори

Бременността по своята същност е един временен полуалотрансплантат, който се възприема от имунната система на майката без последната да бъде потисната. Напротив – налице е активен имунен толеранс, в който централно място заема трофобластът, който изгражда едновременно няколко системи на толеранс, в които участват едни и същи имунни фактори. Към вероятния термин на раждане на мястото на бъдещото разкъсване на околоплодните ципи се активират NK-клетките и изчезват макрофагите тип М2, което много наподобява отхвърлянето на трансплантат. Това предшества реакцията на възпаление.

I.2.1.12. Социално-икономически фактори

На тях се обръща особено голямо внимание – характер на професията, условия на труд, начин на хранене. Големи разлики съществуват между страните с висок и нисък индекс на човешкото развитие. Но с изключение на ниското образование, което традиционно се свързва с по-висок риск за ПР, другите социално-икономически фактори имат слабо или никакво влияние върху ПР.

I.2.1.13. Хранене

Начинът на хранене има своето самостоятелно значение като фактор за идиопатичното ПР. Особено значение има непълноценното хранене и хроничното недохранване на жените. С най-тежки последствия за бременността са белтъчният и витаминният недоимък в храната. В резултат у майката се установява дефицит и на макро-, и на микроелементи. Нарушава се нормалният растеж на плода.

I.2.1.14. Трудова заетост и психоемоционален стрес

Проучванията за връзката между трудовата заетост на бременната и повишения риск от ПР дават доста противоречиви резултати. . В някои проучвания работещите жени са с по-нисък риск от ПР в сравнение с неработещите. Но някои от условията на труд достоверно повишават този риск.

Психо-емоционалният стрес води до повишена секреция на катехоламини, което може да причини маточни контракции, а също и повишаване на биологичните маркери на възпалението.

I.2.1.15. Замърсяване на околната среда

Множество проучвания показват, че замърсяването на въздуха повишава риска от ПР. Някои специфични замърсители биха могли да бъдат причина за това – напр. амониев нитрат, бензен и фини прахови частици.

I.2.1.16. Индекс на телесната маса (BMI)

Бременността у жени с наднормено тегло преди забременяването се счита за рискова. Някои от авторите не намират корелация между висок BMI на майката и повишен риск на спонтанно преждевременно раждане.При жените с III степен на затлъстяване рискът от преждевременно ПОМ е повишен поради по-голямото количество циркулиращи про-възпалителни фактори в кръвта. Отдава се значение и на ниското тегло. Жени с крайно нисък BMI преди забременяването, особено допълнително изложени на психично пренапрежение, имат значително по-висок риск от спонтанно ПР.

I.2.2 ФАКТОРИ, СВЪРЗАНИ С НАСТОЯЩАТА БРЕМЕННОСТ

I.2.2.1 Интервал между бременностите

По-късите от 18 месеца и по-дългите от 60 месеца интервали между бременностите крият по-висок риск от ПР.

I.2.2.2 Многоплодна бременност

Поради преразтегнатата матка жените с многоплодна бременност са с по-висок риск за ПР в сравнение с тези с едноплодна. Почти 60% от жените с многоплодна бременност раждат недоносени деца.

I.2.2.3 Бременност след асистирани репродуктивни технологии

Асистираните репродуктивни технологии предполагат по-голяма честота на многоплодните бременности. Промяната в техните процедури води до намаляване на броя на трансферираните зародиши и съответно на честотата на ПР.

I.2.2.4 Хидрамнион

Увеличеното количество на околоплодните води може да бъде причина за ПР. Маточните стени задържат плода до предела на своето разтягане, след което организмът на майката се опитва да се избави от него – декларират се маточни контракции. В около 25% от случаите се касае за преждевременно пукане на околоплодния мехур.

I.2.2.5 Предлежаща плацента

През последния триместър на бременността долният утеринен сегмент води до „разместване" между плоскостта на плацентата и маточната стена. В последното десетилетие се наблюдава повишаване на честотата на плацента превия, което се свързва с повишената честота на родоразрешение чрез цезарово сечение, широкото навлизане на асистираните методи на репродукция и по-късната възраст, в която раждат жените.

I.2.2.6 Абрупцио на плацентата и ретроплацентарен хематом

Абрупциото на плацентата традиционно се определя като преждевременно отслояване на плацентата от плацентарното място преди раждането на плода. В 2/3 от случаите на абрупцио на плацентата има усложнения за плода, свързани с ПР.

I.2.2.7. Екстрагенитални заболявания – артериална хипертония, хипер- и хипотиреоидизъм, сърдечни заболявания, анемии, тромбофилии, антифосфолипиден синдром и др.

Всички те могат да повлияят върху протичането на бременността, да станат причина за повишена маточна активност и спонтанно ПР.

I.2.2.8 Заболявания на ПОС, наличие на условно патогенна и патогенна флора в гениталната система

Многобройни са изследванията, доказващи връзката между преждевременното раждане и бактериалната инфекция на гениталния тракт у жената. Около 40% от тези жени показват белези на ПР. Възпалението води до маточни контракции и разкъсване на околоплодните мембрани.Освобождават се ред разграждащи ензими – колагенази, еластази, муцинази, сиалидази, фосфолипази и др., които водят до ред промени. Фосфолипазите А2 се покачват под влияние на интерлевкините 1-6 и тумор некротизиращия фактор.

I.2.2.9 Бактериална вагиноза

При бактериалната вагиноза лактобацилите във влагалището се изместват от Gardnerella vaginalis, Mobiluncus, Bacteroides spp. и Mycoplasma hominis. Бактериалната вагиноза е свързана с повишен риск от ПР – тя удвоява риска от спонтанно преждевременно раждане при жени с едноплодна бременност.

I.2.2.10 Rh-изоимунизация

Хемолитичната болест е рисков фактор за ПР, докато интраутеринната трансфузия е сравнително нискорискова за него.

I.2.2.11 Остър хиругичен корем по време на бременността

Острият хирургичен корем усложнява около 0,2% от всички бременности. 90% от тези случаи се падат на острия апендицит. По-чест е през I-то и II-то тримесечие на бременността. През III-то тримесечие на бременността той е по-рядък, но в 7,5% от случаите води до ПР.

I.2.2.12 Заплаха от прекъсване на настоящата бременност. Хориоамнионит и преждевременно пукане на околоплодния мехур (ППОМ)

За основна етиологична причина на ПР понастоящем се приема възходящата бактериална инфекция на околоплодните ципи, околоплодните води, плацентата, пъпната връв и плода. За нейното възникване основно значение имат намаленият локален имунитет във влагалището и цервикалния канал на маточната шийка на бременната жена и намалените бактерицидни свойства на околоплодната течност, която е своеобразна биологична бариера между плода и екстрафеталните структури. За водеща причина за ПР се сочи преждевременното пукане на околоплодния мехур, което основно се причинява от възходяща инфекция на околоплодните ципи.

Възможно е и „стерилно” възпаление на околоплодните ципи и води, пъпната връв и плацентата, където се установява неутрофилна инфилтрация, но не се изолират патогенни микроорганизми. Такова възпаление може да бъде намерено при жени с интактни околоплодни мембрани при ПР и то е израз на неспецифичния механизъм на защита при клетъчен стрес и клетъчна смърт.

В ОКОЛО 50% ОТ СЛУЧАИТЕ НИКАКВА ПАТОЛОГИЯ И РИСКОВИ ФАКТОРИ НЕ ОБЯСНЯВАТ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОТО РАЖДАНЕ.

I.3. СВОБОДНИ РАДИКАЛИ. ВИДОВЕ. ОБРАЗУВАНЕ. ROS и RNS. ОКСИДАТИВНИ ПРОМЕНИ, НАСТЪПВАЩИ ПРЕЗ БРЕМЕННОСТТА

I.3.1.Оксидативни промени, настъпващи през бременността

Засега единственият механизъм, който доказано води до ПР, е възпалението- ***Фигура 2.***

Фигура 2. *Взаимовръзка между възпалението и преждевременното раждане*

При ПР доказано се намесва инфекциозното възпаление, но може би има и други механизми на тъканни увреждания, които могат да го причинят. Голяма част от спонтанните идиопатични ПР са причинени от неинфекциозно възпаление. Възпалителният процес в започването на преждевременната родова дейност е примамлив обект на изследване с цел профилактика и лечение на прематуритета, тъй като възпалението генерира утеротонични сигнали, които са по-силни от сигналите за фетална зрялост.

I.3.2. Оксидативен дисбаланс. Свободни радикали

Концепцията за оксидативния стрес/ дисбаланс датира от 1985 г. и е на немския учен Helmut Sies. При аеробните процеси в организма се генерират свободно радикалови структури *in vivo* - реактивни кислородни (ROS) и азотни видове (RNS) (**прооксиданти**), които непрекъснато се балансират от антиоксидантната защитна система. Балансът

между генерирането на свободни радикали и антиоксидантната защитна система определя редокс-статуса на организма. Обичайно свободните радикали се елиминират от антиоксидантната система на организма – съществува редокс баланс – ***Фигура 3***. Дисбалансът между прооксиданти и антиоксиданти води до невъзможност да се елиминират ROS и RNS и да се възстановят нанесените от тях клетъчни увреждания

Фигура 3. *Редокс-баланс в организма – баланс между прооксиданти и антиоксиданти*

Когато биологичната система *in vivo* не може да детоксикира ROS и RNS структури, се развива оксидативен стрес (ОС), а при невъзможност да се поправят ROS и RNS-нанесените вреди, се говори за оксидативни нарушения. На ***Фигура 4*** е представен дисбалансът между прооксиданти и антиоксиданти при ОС.

Фигура 4. *Оксидативен стрес – дисбаланс между про- и антиоксиданти*

Понастоящем в много експериментални и клинични проучвания се доказва ролята на ОС в патогенезата на някои невровегетативни (болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон), възпалителни, сърдечно-съдови (атеросклероза), обменни (захарен диабет) и ракови заболявания.Свободните радикали: парамагнитни частици, молекули, атоми или йони са резултат от окислително-редукционните реакции, протичащи в организма.Много от свободните радикали са силно реактивоспособни и с много силна тенденция да преминават в сдвоено състояние. Участвайки в безброй биологични реакции те приемат електрони от подходящ донор или отдават електрони на подходящ акцептор, които на свой ред се превръщат във ***вторични свободни радикали***. Така се отключват верижни самоподдържащи се реакции, при които се образуват нови радикали, чието количество нараства лавинообразно и води в повечето случаи до необратими биологични увреждания или деструктивно действие.

В клетката ниските ROS концентрации са необходими за протичането на нормалните физиологични процеси и модулиране на клетъчните функции. Обратно, високите ROS нива или неадекватното им отстраняване от антиоксидантните механизми води до ОС, който опосредства и нарушения в клетъчната функция.

I.3.3. Реактивни кислородни видове. Реактивни азотни видове. Значение на свободните радикали

I.3.3.1. Реактивни кислородни видове (ROS)

В редица случаи кислородните молекули при последователни свободно-радикалови реакции могат да проявяват токсично действие и имат силно мутагенен ефект в организма чрез производство на реактивни кислородни видове (ROS), включващи:

- ***супероксиден анион радикал (.O2-),***
- ***водороден пероксид (H2O2),***
- ***хидроксилен радикал (.OH),***
- ***хидропероксид (ROOH),***
- ***перокси-радикал (ROO.),***
- ***азотен оксид (NO.) - категоризира се като ROS, но реагира с други ROS радикали – супероксиден анион радикал (.O2-), при което се образува пероксинитрит (ONOO-) – вид RNS.***

В организма при свободнорадикаловата оксидация се образуват и различни реактивни азотни видове (RNS), които също имат токсично въздействие.

I.3.3.2.Реактивни азотни видове (RNS) -Азотен оксид (NO•)

Азотен оксид радикалът е с голяма дифузионна способност и заедно с $•O_2$- участва в производството на пероксинитрит ($ONOO^-$), който изцяло може да промени клетъчните функции, да причини липидно перокисление и ДНК- увреждане.

Други RNS радикали нитрират необратимо или добавят азотна молекула към структурата, с което причиняват клетъчни увреждания, сравними с причинените от процеса на окисление.

I.3.3.3. Значение на свободните радикали. Оксидативен стрес. Нива на антиоксидантна защита в организма

Отслабените защитни клетъчни механизми и свръхпроизводството на ROS водят до ОС, който допринася за увреждане на клетъчните липиди и мембрани, увреждане на протеини и дезорганизиране на ДНК участъци. Тези процеси от своя страна водят до натрупване на свободни радикали, редокс дисбаланс, нарушения в клетъчната сигнализация и клетъчно стареене. Повишената ROS-сигнализация може да бъде фактор в процеса на стареене, което се свързва с повишен ***оксидативен стрес.***

За човешкия организъм са неблагоприятни всички окислителни процеси, които структурно изменят биомакромолекулите, а в последствие и нормалните им функции. Образуването на свободни радикали и реактивни кислородни метаболити еволюционно е свързано с развитието на защитни процеси в живите организми, които ги предпазват в различна степен от неконтролируемо разгръщане на радикални окислителни процеси. Всички фактори, които могат да забавят или предотвратят окислителните увреждания на биомолекулите, се определят като ***антиоксиданти***, т.е. формира се защитна антиоксидантна система.

Антиоксидантът (редуциращият агент), може да се представи като агент, който предотвратява процеса на про-окисление или биологичното окислително увреждане, а също влияе върху физиологичните и патологичните процеси.

В организма антиоксидантната биологична защита срещу свободно-радикалови процеси се разделя на три последователни нива.

Първо ниво - фактори, намаляващи до възможния минимум ендогенното образуване на свободни радикали.

Клетките са отделени с мембрани от извънклетъчната среда. Вътре клетките се разделят на подпространства – компартменти. Така във времето и мястото се разделят компоненти, чието взаимодействие би имало прооксидантни последствия. Пренасяният от кръвта кислород е изолиран в молекулите на оксихемоглобина, които са ограничени в еритроцитите. По подобен начин действат „***превантивните***” антиоксиданти.

Второ ниво на антиоксидантната защита е обезвреждането на вече образуваните ROS. Това се реализира главно от ***ензимните и неензимните*** антиоксиданти, които действат съвместно.

Трето ниво на антиоксидантната защита са ензими, които частично възстановяват увреждания, причинени от извънмитохондриални ROS източници. Такива са фосфолипаза А2 (PLA2) и протеолитичните ензими (*метионинсулфоксидредуктаза, ред ендо- и екзонуклеази, ДНК-лигаза, ДНК-полимераза, някои гликозилази*). Те избирателно разрушават оксидативно променени протеини, предотвратявайки тяхната акумулация в клетките.

I.3.3.3.1. Ензимни антиоксиданти

Възстановяването на нормалното редокс-състояние след временни оксидативни нарушения в клетката, водещи до повишаване концентрациите на ROS или RNS се благоприятства от ензиманата антиоксидантна защита, т.е. нивата на **Супероксиддисмутазата (SOD); Каталаза (CAT); Глутатионпероксидазата (Gpx);глутатион-S-трансферазите (GST).**

Супероксиддисмутаза (SOD)

SOD е антиоксидантен ензим, катализиращ превръщането на реактиво способния супероксиден анион-радикал ($\bullet O2^-$) до слабо реактиво способни радикалови видове катокислороднимолекули и вода. SOD е първата стъпка на антиоксидантната защита срещу оксидативния стрес на организма.

Каталаза (CAT)

Този вътреклетъчен ензим (*хемопротеин*;*тетрамер*) предпазва клетките от образувания в тях реактивен водороден пероксид, като го обезвреждa до H_2O и O_2. Тази си функция **CAT** поделя с глутатионпероксидазите.

Глутатионпероксидазата (GSH; Gpx)

Биологичната функция на глутатионпероксидазата е намаляване на липидните хидропероксиди (LOOH) до съответните им алкохоли (R-OH), а също и превръщане на свободния H_2O_2 до $2H_2O$.Показателно е, че GPx се конкурира с CAT за субстратното улавянето на H_2O_2. При сравняване нивата GPx при ПР и при раждане на термин, антиоксидантната защитна система след ПР изглежда изцяло изхабена.

Глутатион-S-трансфераза (GST)

При клетъчната детоксикация и допълнителното обезвреждане на ROS участват и глутатион-S-трансферазите (GST). Плацентарните GST значително допринасят за феталния капацитет на детоксикация.

Церулоплазминът (CP)

Този извънклетъчен протеин се разглежда като антиоксидант, катализиращ окисляването на двувалентното желязо до тривалентно. Счита се, че CP инактивира екстрацелуларните супероксидни-анион радикали. Церулоплазминът, а също и албуминът, феритинът и лактоферинът допринасят за поддържане на антиоксидантния статус

I.3.3.3.2.Неензимни антиоксидантни системи

Неензимните антиоксидантни защитни системи срещу ROS представляват втората линия на защита срещу ROS и включват съединения с ниско молекулно тегло, като витамини C и E, α-токоферол, β-каротин, липоева киселина, убихинон, каротеноиди, пикочна киселина и глутатион. Витамините са известни с антиоксидантните си свойства. С цел подобряване на перинаталните резултати на бременните жени се дават множество комбинирани витаминни добавки.

I.4. БРЕМЕННОСТ – ОКСИДАТИВНИ ПРОМЕНИ И МАРКЕРИ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

I.4.1. Оксидативни промени при нормална и протичаща с усложнения бременност

Развитието на бременността у жената е неразривно свързано със свободно-радикалово окисление и ОС.

Така през първия триместър на бременността първоначално тоталният антиоксидантен капацитет (ТАС) се намалява и след това прогресивно се увеличава като достига нормални стойности през пуерпериума. Липидните хидропероксиди също значително се увеличават в края на бременността. ОС става патологичен фактор, когато образуването на ROS надвиши антиоксидантния капацитет на плацентата. Това води до апоптоза на трофобласта и влошаване на всички плацентарни функции. Такива изменения се откриват в плацентите при някои ***спонтанни аборти***, при бременности, усложнени с ***прееклампсия***, с ***интраутеринна ретардация на плода***.

Изучаването на ОС-промените при ***преждевременно раждане*** има за цел да се разбере по-добре неговата патофизилогия. Проучванията по този проблем в световен мащаб са сравнително малко, при което се използват различни методи и измервания.Установява се, че при ПР в сравнение с РТ, ROS нивата са по-високи, а нивата на антиоксидантите са статичтически занижени. Налага се изводът, че при ПР има дисбаланс между про- и антиоксидантите в майчиния организъм.

I.4.2. Маркери на оксидативен стрес

I.4.2.1 Липидната пероксидация като маркер за оксидативен стрес

Липидите в клетъчните мембрани са най-податливи на перокисление. Най-често за нивото на увреждане в организма, причинено от ROS, се изследва малондиалдехид (MDA), образуван при липидно перокисление на ненаситените мастни киселини и F2-изопростаните.Резултатите от изследванията на продуктите на липидната пероксидация при ПР са разнопосочни и неубедителни. Възможно е да съществуват различни пътища и механизми на нарушения в оксидативния статус при ПР в зависимост от състоянието на околоплодните мембрани – запазени или преждевременно разкъсани, локалната редокс среда и срока на бременността.

I.4.2.2. Тоталният антиоксидативен капацитет (ТАС) като маркер за оксидативен стрес

Тоталният антиоксидативен капацитет (ТАС) също се използва като маркер за нивото на оксидативните промени в организма на жената. При ПР се установява по-нисък ТАС в майчината кръв в сравнение с жени, родили на термин.

I.4.2.3. Тоталният оксидативен статус (TOS) като маркер за оксидативен стрес

В някои проучвания се установява по-висок тотален оксидативен статус (TOS) в майчината кръв при ПР в сравнение с РТ. Но остава неуточнено кои ROS са в основата на нарушената регулация на оксидативно-антиоксидантния статус на родилките с ПР.

Обобщено може да се каже, че дисбалансът между прооксиданти и антиоксиданти (оксидативният стрес) има връзка с ПР. Остава труден отговорът на въпроса дали нарушенията в оксидативно-антиоксидантния статус на майката при ПР е резултат от самото ПР или те са част от неговата етиопатогенеза. Необходими са по-комплекси изследвания по въпроса с усъвършенствани методи. Анализите на антиоксидантната защита и ОС-увреждания при ПР са в известна степен неопределени поради факта, че най-често системите на прооксиданти и антиоксиданти се изследват поотделно, а не в съвкупност. Всички рискови фактори за ПР могат да доведат до дисбаланс в редокс-системата на бременната жена.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

На базата на теоретични и експериментални знания, натрупани в резултат на интензивни изследвания на редица наши и чужди автори през последните години и актуалността на направените от нас обобщения си поставихме следната цел и конкретни задачи:

Цел на дисертационния труд е да се изследват промените в оксидативния статус в организма на жени с ПР и да се проучи значението на тези промени и на оксидативните нарушения в патогенезата на преждевременното раждане.

Задачи:

- Подбор на групи жени с идиопатично ПР, със заплашващо ПР и родили на термин в съответствие с изработени критерии за включване в проучването (виж глава „Клиничен материал и параклинични методи”).
- Изследване и анализ на промените в редокс-статуса в организма при жените, включени в гореизброените групи.
- Сравняване на резултатите от изследванията на трите групи помежду им и съпоставяне с показателите на редокс-статуса при здрави, небременни жени – контролна група.
- Сравняване на показателите на редокс-статуса на изследваните жени в зависимост от приеманите по време на бременността витамини и антиоксиданти.
- Анализ на връзката между показателите на редокс-статуса на организма и изхода от бременността.

III. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ. КЛИНИЧНИ, ПАРАКЛИНИЧНИ И БИОХИМИЧНИ МЕТОДИ. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ

III.1. Клиничен материал

III.1.1. Пациенти

Проучването по дисертационния труд е проспективно и обхваща периода м. април 2017 г. – м. август 2020г. В него са включени 326 пациентки на Клиниката по Акушерство и гинекология към УМБАЛ „Проф. д-р Стоян Киркович” Стара Загора, обособени в следните групи:

Заплашващо преждевременно раждане – 60 случая на жени, бременни в срок 26 г.с. – 36^{+6} г.с., чиито бременности са усложнени със заплашващо преждевременно раждане, без наличие на друга акушерска патология

Преждевременно раждане – 101 случая на раждания в срок 26 г.с. – 36+6 г.с. от жени, отговарящи на изработените за включване в проучването критерии.

Раждания на термин на живи, доносени деца - 105 раждания в 38-39^{+9} г.с. на жени без изявена патология на бременността.

Контроли - 60 небременни жени на възраст 18-40 години, без хронични заболявания, непушачки.

Информирано съгласие за провеждане на изследванията беше взето от всички пациенти.

III.1.2. Критерии за включване в проучването

С цел да се обхванат бременни със спонтанни, идиопатични преждевременни раждания бяха изработени следните **критерии:**

- **Едноплодна бременност, жив плод;**
- **Запазен околоплоден мехур;**
- **Срок на бременността 26 - 36+6 гестационна седмица;**
- **Липса на ултразвукови и лабораторни данни за аномалии на плода;**
- **Липса на заболявания, усложняващи бременността: предшестващи я или предизвикани/новопоявили се от/през нея.**

Не бяха включени бременни с преждевременно пукнат околоплоден мехур, хорионамнионит, мъртъв плод, многоплодна бременност, прееклампсия, диабет (предшестващ бременността и гестационен диабет), анемия и възпалителни заболявания.

III.1.3. Във всяка група жените бяха подразделени по следните характеристики:

Разделяне на бременните жени в групите според възрастта - в зависимост на ролята на последната като етиологичен фактор на преждевременното раждане:

Във всяка група жените се подразделят според **поредността на настоящата бременност и изхода от предишните бременности**

Дородови грижи за бременността.

Според **срока на бременността**

Желана ли е бременноста

Начин на хранене

Вредни навици

III.2. Методи за определяне на рисковите фактори, оценка и проследяване на родовия процес, състоянието на бременната и плода

III.2.1. Клинични методи - анамнестични данни, акушерско изследване, цервикален скор по Bishop, индекс на преждевременното раждане, индекс на Papiernik,

III.2.2. Апаратни методи

Образно УЗИ - използвани са апарати Aloka prosound alpha 6–IPF–1503 и Philips Clear Vue 650.

Кардиотокография - използвани са апарати Smart 1 Medical Econect.

Антропометрия

Пулс и артериално налягане

III.2.3. Параклинични методи

Лабораторни изследвания - ПКК, биохимични изследвания, С-реактивен протеин (CRP), урина.

Микробиологични изследвания - влагалищен и цервикален секрет и/или урина (урокултура) на жените със заплашващо преждевременно раждане.

IV. БИОХИМИЧЕН МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДНО-РАДИКАЛОВИ И ОКСИДАТИВНИ НАРУШЕНИЯ

IV.1. Биологичен материал - на всички бременни жени и родилки и небременни жени-контроли, включени в изследването, беше взета по 5 ml периферна кръв чрез пункция на v.cubitalis.

Кръвните проби от различните групи бяха събирани и доставяни в 5 ml контейнери с антикоагулант EDTA- за отделяне на плазма и еритроцити за:

- **Спектрофотометрични методи** за изследване на антиоксидантни ензими и липидно перокисление: супероксиддисмутазна активност, каталазна активност и малондиалдехид;
- **EPR спектроскопските изследвания за проследяване нивата на**: аскорбатни радикали, •NO радикали и ROS продукти;
- **Имуно-ензимни ELISA методи** – за определяне съдържанието на протеин карбонил и количеството 8-OHdG.

IV.2. Биохимични методи

Изследванията бяха извършени в лабораториите по “Оксидативен стрес” и “ЕПР спектроскопия” в катедра “Химия и биохимия” на Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

IV.3. ЕПР МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ СВОБОДНО-РАДИКАЛОВИ/ ОКСИДАТИВНИ НАРУШЕНИЯ

IV.3.1. Ex vivo EPR метод за изследване нивото на аскорбатни радикали като маркери за оксидативен стрес в плазма

За изследването на аскорбатни радикали е използван методът на Baileyetal. 2004.

IV.3.2. Определяне нивото на ROS продукти в плазма чрез ex vivo EPR спин улавяща техника

За доказване на протичаща липидна пероксидация бяха определяни нивата на ROSпродукти в плазма чрез ex vivo EPR спин улавяща техника по метод на Shi et al., 2005 и модифициран от Zheleva et al., 2011, Карамалакова, 2014.

IV.3.3. Определяне нивото на •NO радикали в плазма чрез ex vivo EPR **спин улавяща техника -** на базата на методите на Yoshioka et al., 1996 и Yokoyama et al., 2004, беше определено нивото на •NO радикали в плазма.

IV.3.4. Обработване на получените EPR спектри и изчисления

Всички EPR спектри бяха обработвани със специалните програми Sim-phonia и WINEPR, Bruker, EMX^{micro}, използвана за провеждане на EPR експериментите.

Количествена оценка на показателите на оксидативен стрес в безразмерни единици (arb. units) се правеше чрез двойно интегриране на площта под EPR спектрите.

IV.4. ИМУНО-ЕНЗИМНИ МЕТОДИ

IV.4.1. Определяне протеин-карбонилно съдържание (PCC)

Използва се Oxi Select TM Protein Carbonyl ELISA Kit. Протеин карбонилното съдържание в пробите се определя по стандартна крива и се пресмята в nmol/mg.

IV.4.2. Количествено определяне на 8-OHdG

Китът за ДНК увреждане се използва за количествено определяне на 8-OHdG. Съдържанието на 8-OHdGng/mL се определя по предварително построената стандартна крива на база различните концентрации на 8-OHdG стандарт.

IV.4.3. Определяне на общ глутатион (GSH) и глутатион пероксидазна активност (GPx1) в еритроцитен лизат.

Оценен чрез анализиране на общото ниво на ендо- и екзогенни антиоксиданти съгласно инструкциите на ELISA kit- производителя.

IV.4.4. Тотален антиоксидантен капацитет (TAC)

Оценен чрез анализиране на общото ниво на ендо- и екзогенни антиоксиданти съгласно инструкциите на ELISA kit- производителя.

V. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ ЗА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните са статистически анализирани, използвайки пакета от статистически програми за Windows 7, STATISTICA версия 7 (StatSoft, Inc.). Дескриптивните статистически величини на вариационните променливи: средна аритметична стойност и стандартно отклонение (SD) бяха изчислявани съобразно стандартните методи. Разликата между средните стойности на количествени променливи на две независими групи бе оценявана с помощта на:

- Student T-тест за проверка на хипотези за различие между средните аритметични на две независими групи (Indipendent Samples T-test);
- LSD post hoc тест за различаване на групите една спрямо друга;
- Корелацията между количествените променливи са анализирани с корелационен анализ. При всички анализи, разликите с ниво на значимост $p<0.05$ са считани за статистически значими.

VI. Характеристика на изследваните групи бременни жени, родилки и небременни контроли

VI.1. Бременни жени с клинична картина на заплашващо преждевременно раждане (n = 60)

Възраст - 65% от жените от тази група попадат в най-ниско рисковата възраст (18–33 г.) по отношение на настъпването на преждевременно рждане.

Поредността на бременността и изход от предишните бременности - 68 жени – 97% от включените в проучването пациентки от тази група са с нисък риск за настъпване на преждевременно раждане – бременни за първи път са 30 жени, с анамнеза за едно предшестващо раждане на термин са 11 жени, с един маточен кюртаж са 2 жени и с раждане на термин и един маточен кюртаж са 15 жени от изследваните.

Срок на бременността - най-голяма е групата на жените с клинична картина на заплашващо ПР в срока 28 – 32^{+6} г.с. – 50%.

Дородови грижи - в около 1/5 от случаите (18,3%) бременността не е наблюдавана в ЖК. Жените, които са посещавали ЖК, са приемали различни витаминни препарати, назначени от наблюдаващия бременността акушер-гинеколог.

Bishop-скор при хоспитализацията - всички бременни, включени в проучването, при хоспитализацията са били с Bishop-скор 5-8.

Индекс на преждевременното раждане (ИПР) - в основната си част (93,3%) жените са с ИПР в границите 7-15 и с класическа клинична картина на зПР, което е наложило хоспитализацията им. При останалите 4 бременни ИПР е в границите 1-6.

Индекс на Papiernik - в 80% от случаите бременните от тази група са без риск или с нисък риск от настъпване на ПР. При останалите 20% рискът е висок и се обуславя от фактори, касаещи миналите бременности и раждания, социално-икономическото ниво, дородовите грижи за бременността.

VI.2. Родилки с преждевременно раждане (n=101)

Възраст - основната част от жените (73 на брой – 72,3%) са в най-ниско рисковата възраст по отношение на прематуритета.

Поредност на бременността и изход от предишни бременности - най-малко „застрашени" от ПР са жени, бременни за първи път или имали вече раждане/я на термин на доносено дете/ца. В основната си част жените от тази група (64,4%) са с нисък риск от настъпване на преждевременно раждане. Около 1/3 (34 жени) по този показател са с повишен риск от ПР. Всички те са със сложна репродуктивна анамнеза, в основната си част не са посещавали ЖК. При хоспитализацията не се установяват усложнения на бременността, които биха могли да бъдат етиологичен фактор за преждевременното раждане

Срок на бременността - 26 – 36^{+6} г.с.

Дородови грижи - повече от 1/3 (35,6%) от жените с преждевременно раждане не са посещавали ЖК, т.е. бременността не е наблюдавана системно, никой и никъде не е провеждал профилактика и ранна диагноза на евентуалните й усложнения

Индекс на Papiernik - в основната си част (54 на брой – 53,5% от всички случаи на ПР) са с нисък риск от настъпването му. Още 25 – 24,8%, по тези критерии нямат риск от усложняване на бременността с ПР. При 22 от родилите преждевременно жени – 21,7%, рискът е висок. При тях рисковите фактори са свързани основно с миналите

бременности – предшестващи преждевременни раждания, предшестващи маточни кюртажи, кратък срок след предшестващата бременност, недостатъчни дородови грижи, ниско и много ниско социално-икономическо ниво. Т.е. касае се за фактори, които практически е невъзможно да бъдат избегнати и преодолени по време на настоящата бременност. Следователно в около 79% от случаите жените, родили преждевременно, попадат в групите с нисък риск или без риск по отношение на преждевременното раждане.

VI.3. Жени с бременност, протекла без усложнения и родили на термин живо, доносено дете (n=105)

. Изследваните пациентки са родили на термин (в $38–39^{+6}$ г.с.)

Възраст - отново основната част от изследваните жени – 80, попадат във възрастта, която е най-ниско рискова по отношение на преждевременното раждане.

Поредност на бременността и изход от предишни бременности – по-голямата част от пациентките – 79 на брой (75% от включените в проучването) са с нисък риск по отношение на евентуално усложняване на бременността с ПР – касае се за първа бременност или в миналото жената има раждания само на термин или само един маточен кюртаж.

Дородови грижи - наблюдавани са по-системно в ЖК в сравнение с родилите преждевременно – 92% от изследваните жени системно са посещавали ЖК.

Лекарствена терапия и профилактика през бременността – около 2/3 (63%) са приемали различни поливитаминни препарати през различните срокове на бременността с профилактична цел.

VI.4. Контролна група - 60 небременни жени с/без предишни бременности (n=60) - клинично здрави, нормотензивни, без анамнестични данни за хронични заболявания, непушачки.

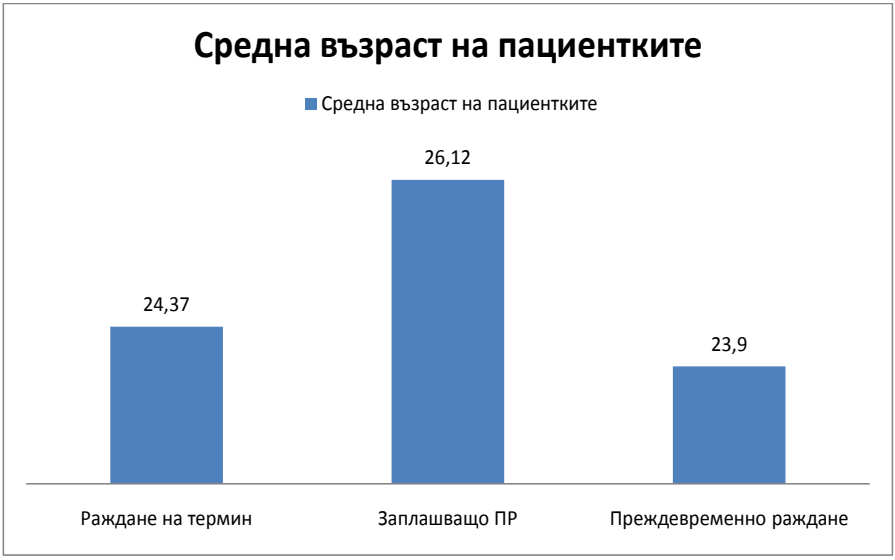
VII. РЕЗУЛТАТИ

Изследвания са направени на 60бременни жени със заплашващо ПР, 101 жени, родили преждевременно и 105 жени с нормално раждане на термин на живо, доносено дете. Всички те отговарят на изработените критерии за включване в проучването.

VII.1. Характеристика на групите

VII.1.1. Възрастова характеристика на групите

Обхванатите в проучването жени са предимно от възрастовата група 18 – 33 години, която е най-ниско рискова за ПР – ***Фигура 5.***

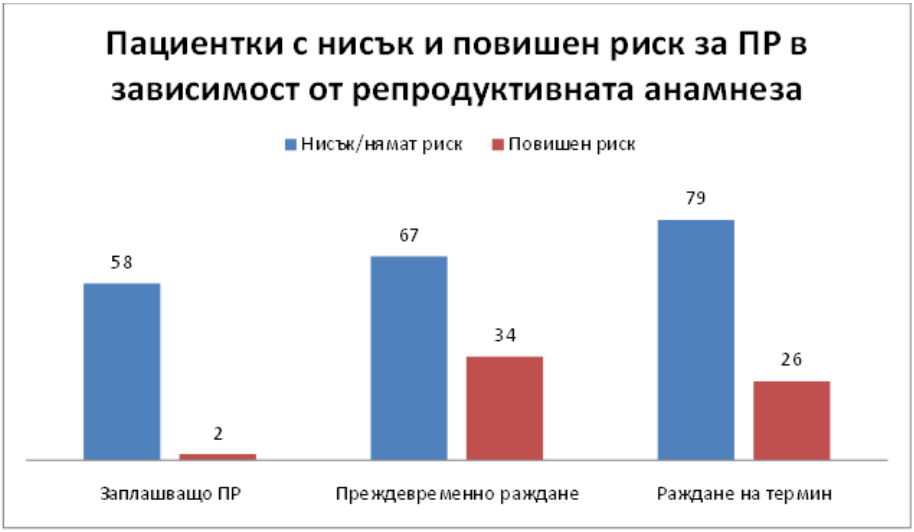


Фигура 5. *Разпределение на пациентките с раждане на термин, заплашващо ПР и преждевременно раждане по възраст*

VII.1.2. Поредност на бременността и изход от предишните бременности

Според този, предшестващ настоящата бременност фактор, включените в проучването жени са с различен риск за ПР.

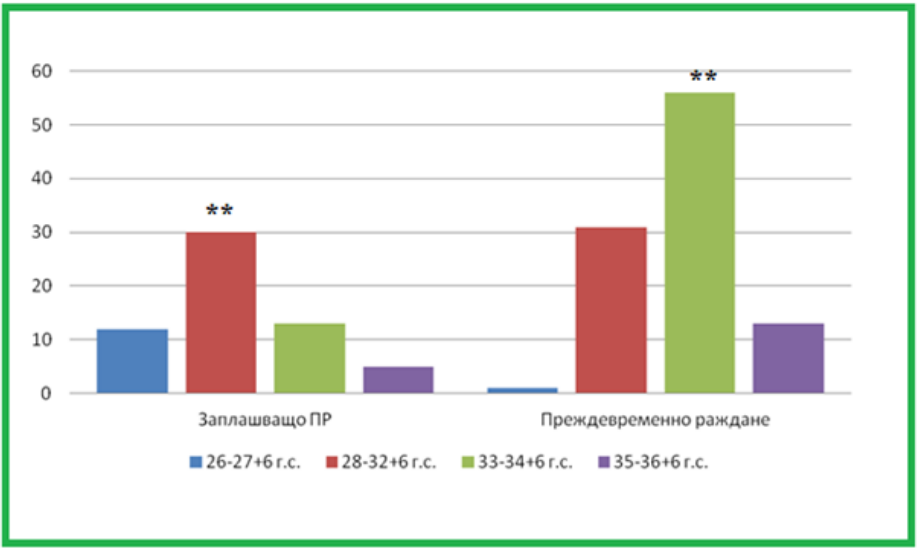
Групата със заплашващо ПР е с най-нисък риск от ПР, последвана от групата жени, родили на термин и с най-висок риск е групата на жените с преждевременно раждане – ***Фигура 6.*** Последните са с най-сложна и многопластова репродуктивна анамнеза, което е от основно значение.



Фигура 6. *Риск от преждевременно раждане при групите пациентки със заплашващо ПР, преждевременно раждане и раждане на термин*

VII.1.3.Срок на бременността

Основната част от жените със заплашващо ПР попадат в групата на ранното ПР, а случаите с ПР са основно в групата на умерено ранното ПР- ***Фигура 7.***



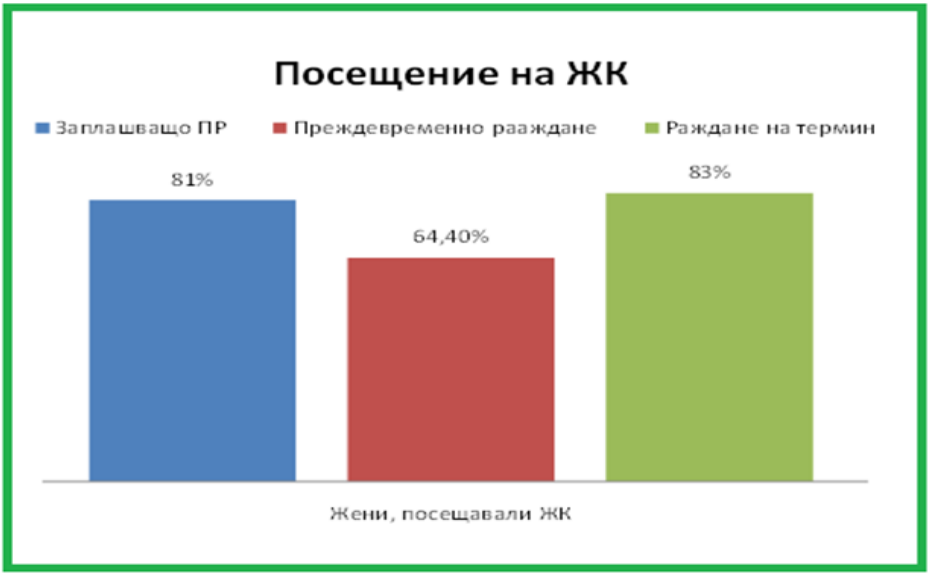
Фигура 7. *Разпределение на пациентките със заплашващо ПР и родили преждевременно включени в изследването, според срока на бременността*

Срокът на ПР е от основно значение за преживяемостта и постпарталните усложнения за плода, за неговото по-нататъшно физическо и психическо развитие. Поради това стремежът ни винаги е да удължим вътреутробното развитие на плода.

VII.1.4. Дородови грижи

Разпределението на жените в групите спрямо дородовите грижи (посещение и наблюдение на бременността в ЖК) е представено на Фигура 8.

Жените с ПР не са с достатъчно добро наблюдение на бременността и грижи през нея – по-често те не са посещавали ЖК.



Фигура 8. *Дородови грижи (посещение на ЖК) за групите пациентки със заплашващо ПР, родили преждевременно и родили на термин живи, доносени деца*

Около 2/3 от жените с преждевременно раждане по време на бременността не са имали назначена терапия, която би могла да профилактира преждевременното раждане.

При жените със заплашващо ПР и раждане на термин съотношението е обратното – 2/3 са имали назначена терапия с токолитици и поливитаминни препарати.

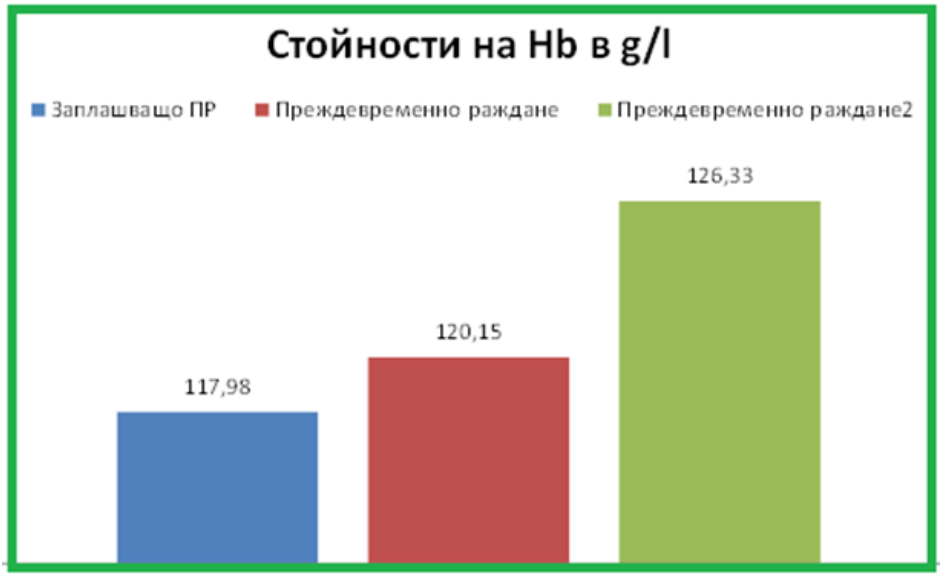
VII.1.5. Индекс на Papiernik

Този индекс дава възможност да се отчетат факторите за настъпването на преждевременното раждане във всеки конкретен случай, като при него акцентът е върху факторите за ПР, които предшестват бременността и тези, свързани с клиниката на заплашващото ПР.

По получената скорова оценка по Papiernik по-голямата част от бременните със заплашващо ПР и родилите преждевременно жени, включени в проучването, са с нисък риск от настъпването на преждевременно раждане или изобщо нямат риск.

VII.1.6.Хемоглобин

С цел да се избегне влиянието на налична анемия върху резултатите от изследванията на оксидативния статус, в съответствие с изработените критерии, в проучването не бяха включвани бременни и родилки с данни за анемия. При изследваните пациентки няма данни за анемия по време на бременността. Между трите групи жени няма статистическа разлика.



Фигура 9. *Стойности на хемоглобин в g/l при бременните със заплашващо ПР, ПР и родилите на термин.*

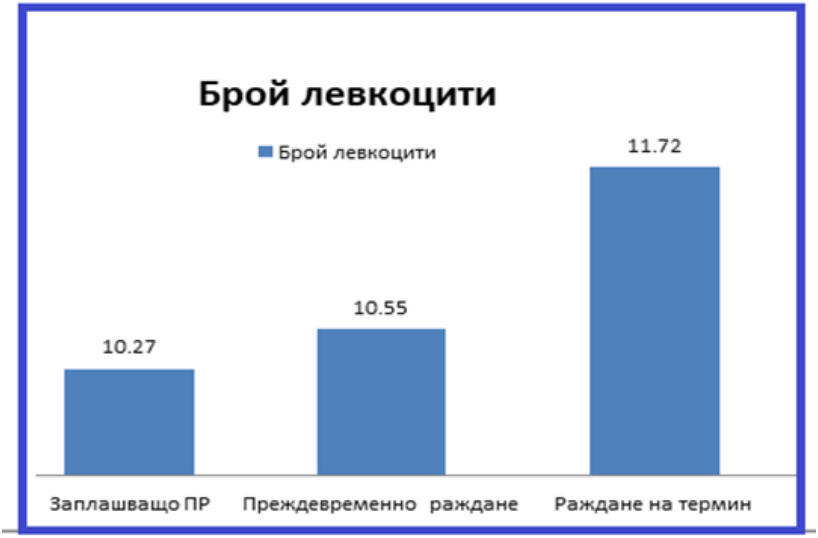
VII.1.7. Левкоцити и С-реактивен протеин (CRP) – параклинични показатели за оценка на налични възпалителни промени

VII.1.7.1. Левкоцити

При статистическата обработка на стойностите на Leuc при трите групи пациентки се получиха следните средни резултати:

- ✓ Най-високи са стойностите на Leuc в случаите на раждане на термин.
- ✓ Следващи по величина са стойностите на Leuc при преждевременно раждане.
- ✓ Най-ниски са стойностите на Leuc при заплашващото ПР.

Стойностите за групите пациенти са отразени и сравнени на ***Фигура 10.***



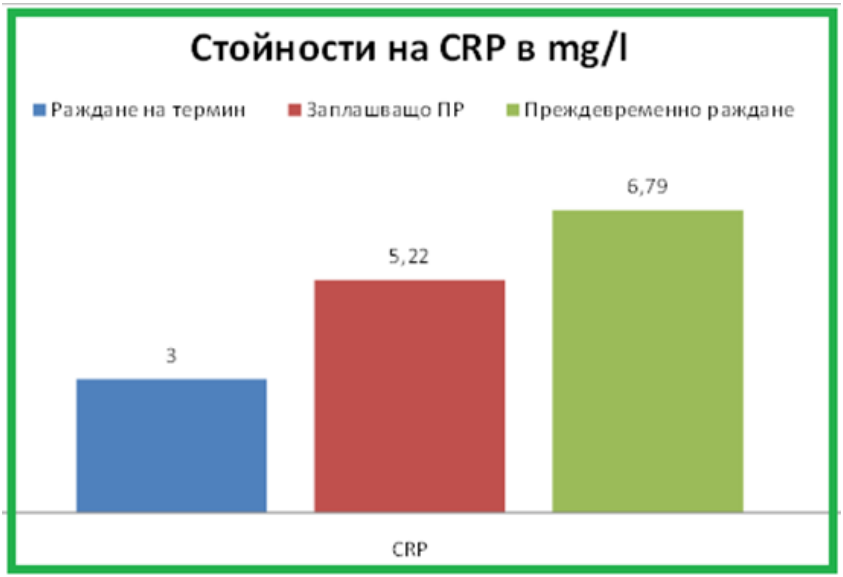
Фигура 10. *Брой левкоцити при трите групи – бременни със заплашващо ПР, родили преждевременно и родили на термин живи, доносени деца*

В случаите със заплашващо ПР и ПР се установява левкоцитоза в рамките на физиологичната за бременността и сравнима с тази при раждане на термин. Не се установяват стойности на левкоцитите, които предполагат наличието на възходяща бактериална инфекция, която може бъде патогенетичен фактор за преждевременното раждане.

VII.1.7.2. С-реактивен протеин (CRP)

До момента CRP остава основен патогенетичен и диагностичен фактор на острата фаза на възпалението. Като патогенетичен фактор той се отличава с изразена функционална плейотропия. При включените в проучването пациентки с ПР и заплашващо ПР беше установено покачване на CRP – ***Фигура 11:***

- По-значително е покачването на CRP при родилите преждевременно жени – средна стойност 6,79 mg/l, но тя не излиза извън граничните му стойности.
- При заплашващото ПР CRP също се покачва леко над горната граница на нормата – 5,22 mg/l. Т.е. при тях няма данни за изразено системно остро възпаление.



Фигура 11. *Стойности на CRP в mg/l в групите на бременни със заплашващо ПР, родилите преждевременно и родилите на термин*

Ефектът от завишените плазмени нива на CRP за групата жени с ПР е представен на Таблица 1. В 81% от случаите с ПР е налице статистически значимо повишение на тези нива (≤0.002), сравнени с групата жени, родили на термин (65%). Статистически значимо повишение в нивата на CRP и налично системно възпаление бяха установени в 17% от случаите с ПР (≤0.05 CRP (норма) за РТ). Тук е налице значима корелация между повишените нива на CRP в случаите с ПР, сравнени с групата с РТ, въпреки че повишението на CRP е в гранични стойности 5-10 mg/l. 17% от родилите преждевременно жени са със сигнификантно завишени стойности на нивата на CRP (>11mg/l, p< 0.05, t-test).

Таблица 1. *Сравнение на стойностите на CRP в групите на родили на термин и с преждевременно раждане*

Групи според стойности на CRP	**Раждане на термин (n=105) 37-39^{+6} г.с.**			**Преждевременно раждане (n=101) 26-36^{+6} г.с.**			**Всичко**	**p**
	Възраст (год.)		**CRP mg/l**	**Възраст (год.)**		**CRP mg/l**		
CRP≤5mg/l	14-30	1.01±0.03	3.01±0.13	14-30	3.20±1.01	4.64±1.09	54	
	>=30		2.00±0.10	>=30	1.24±0.08			0.002
CRP =5-7-10 mg/l	14-30	4.05±0.29	6.05±0.49	14-30	8.77±3.91	8.77±3.91	133	
	>=30		2.00±0.19	>=30	8.77±3.91			0.002
CRP>11 mg/l	14-30	-	-	14-30	7.20±3.00	12.44±6.22	19	
	>=30			>=30	5.24±3.22			0.02[a]
								0.03[b]

В случаите със заплашващо ПР и преждевременно раждане се установява покачване на стойностите на CRP. При това покачване CRP се задържа в рамките на граничните си стойности. Стойности на CRP над 4,9 mg/l, въпреки неналичието на клинични и параклинични данни за вътрематочна инфекция, са сигнални за повишен риск от ПР.

VII.2. РЕЗУЛТАТИ СВОБОДНО-РАДИКАЛОВИ И ОКСИДАТИВЕН СТРЕС- НАРУШЕНИЯ

VII.2.1. СОБСТВЕНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ПОДБРАНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС И АНТИОКСИДАНТНИЯ СТАТУС ПРИ НОРМАЛНА БРЕМЕННОСТ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РАЖДАНЕ.

При всички пациентки от обособените групи

- бременни с клинична картина на заплашващо преждевременно раждане;
- родилки с преждевременно раждане;
- родили на термин живи, доносени деца;
- небременни жени–контролна група,

бяха определени три важни показателя на оксидативен стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини. Това са: плазмените нива на липидно перокисление (MDA), нивото на плазмените модифицирани протеини и количеството на 8-OHdG за ДНК-увреждане чрез имуно-ензимния метод – ELISA. На всички пациенти беше определен антиоксидантния статус спрямо нивата на вътреклетъчния общ глутатион (GSH), на три важни ендогенни ензима супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx1) и на тоталния антиоксидантен капацитет (TAC) в еритроцитен лизат.

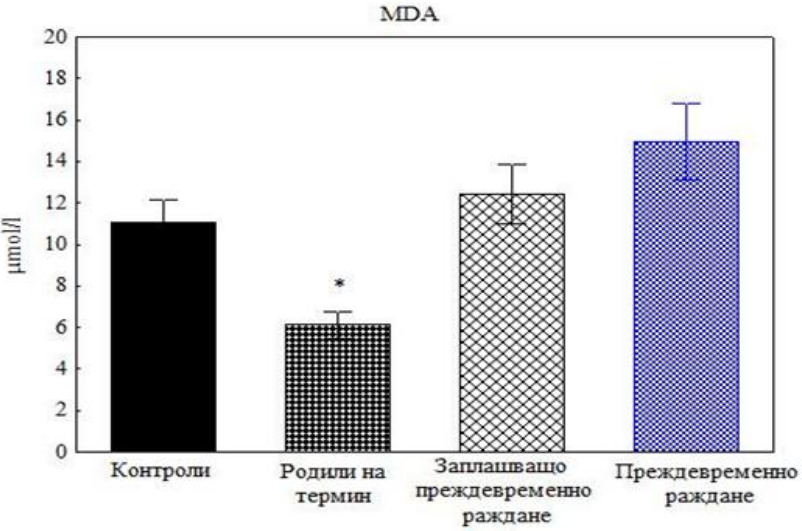
С цел проучване и изясняване на свободно-радикаловите механизми на преждевременното раждане бяха определени аскорбатни и •NO радикали, а също и ROS продуктите в кръвна плазма, които показват моментния оксидативен статус/ нарушения- т.н. показатели в реално време. Всички определени показатели бяха сравнени с физически здравите контроли.

С цел проучване и изясняване на свободно-радикаловите механизми на преждевременното раждане бяха определени аскорбатни и •NO радикали, а също и ROS продуктите в кръвна плазма, които показват моментния оксидативен статус/ нарушения- т.н. показатели в реално време. Всички определени показатели бяха сравнени с физически здравите контроли.

VII.2.1.1. ПРОУЧВАНЕ НА ВЛИЯНИЕТО НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ВЪРХУ КРАЙНИТЕ ПРОДУКТИ НА ОКИСЛЕНИЕ НА ЛИПИДИ, ПРОТЕИНИ И НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ

VII.2.1.1.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВОТО НА ПРОДУКТИТЕ НА ЛИПИДНО ПЕРОКИСЛЕНИЕ(MDA)

MDA е основен in vivo индикатор на липидното перокисление и се предполага, че увеличената липидна пероксидация е рисков фактор за наличие на оксидативен стрес при П



Фигура 12. *Плазмени нива на MDA при контроли;при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (++)-статистическа значимост спрямо родили на термин живи, доносени деца*

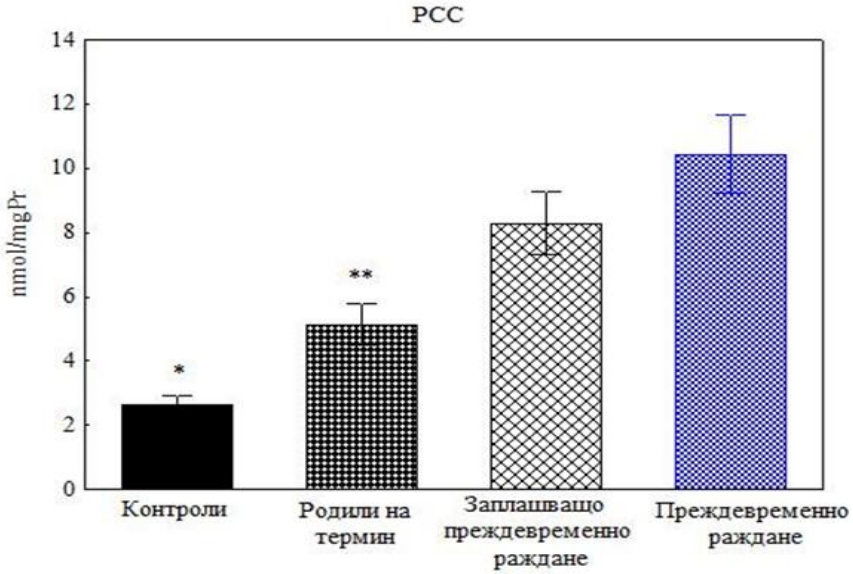
В представените плазмени нива на MDA (Фигура 12.) не се наблюдава статистически значима разлика в стойностите при бременни пациентки с клинична картина на заплашващо ПР и контролата (средно 12.44±0.04nmol/l, спрямо 11.099±0.1nmol/l, p<0.38, t-test), но има статистически значимо повишение в липидната пероксидация при бременните пациентки с клинична картина на заплашващо ПР и родилите на термин (средно 12.44±0.04 nmol/l спрямо 6.12±0.02 nmol/l, p<0.00, t-test).

Статистически значимо, почти двукратно е повишението на MDA, измерено в групата пациенти с ПР спрямо родилите на термин(средно 14.95±0.11 nmol/l,спрямо средно 6.12±0.02 nmol/l,p<0.02, t-test) и спрямо небременните контроли (средно 14.95±0.11 nmol/l, спрямо 11.099±0.1nmol/l, p<0.2, t-test)

Следователно резултатите от проведеното изследване показват, че при групата пациентки с ПР регистрираме повишен оксидативен стрес поради значително повишаване на нивата на липидна пероксидация.

VII.2.1.1.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОТЕИН КАРБОНИЛНО СЪДЪРЖАНИЕ (PCC)

Най-честата оксидативна промяна е необратимата окислителна модификация, засягаща протеините, т.е. протеин карбонилирането. Свръхпроизводството на ROS и RNS причинява допълнително окисляване на протеиновите структури. За нашите резултати е използван протеин карбонилният метод, проведен с ELISA.

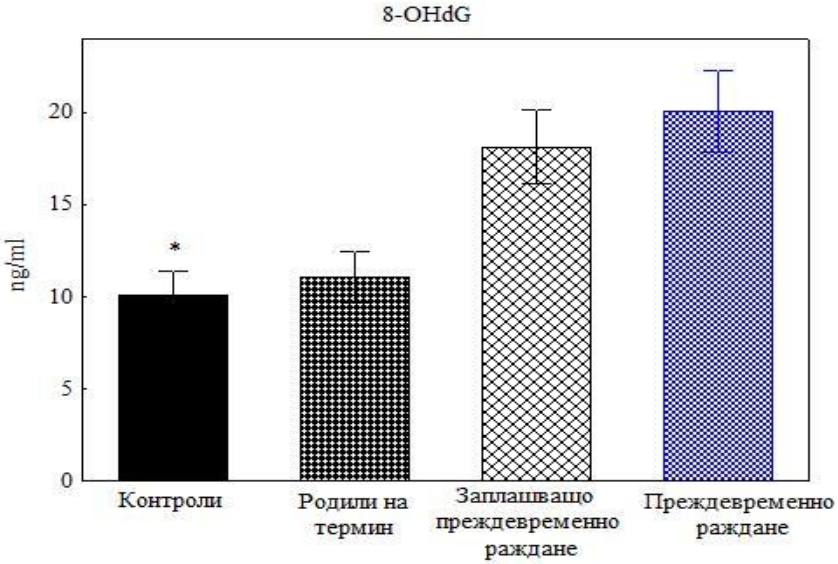


Фигура 13. *Протеин карбонилно съдържание (PCC) при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин.*

От направените от нас изследвания (Фигура 13) става ясно, че при родилки с ПР РСС е двукратно, статистически значимо по-високо в сравнение с проби, взети от родили на термин (средно 10.43±0.3nmol/mg, спрямо средно 5.13±0.2nmol/mg, p=0.01, t-test) и спрямо небременни контроли (средно 10.43±0.3 nmol/mg, спрямо средно 2.65±0.2nmol/mg, p=0.00, t-test). При сравняване на бременни с клинична картина на заплашващо ПР с проби, взети от родили на термин (средно 8.29±0.4 nmol/mg, спрямо средно 5.13±0.2nmol/mg, p=0.02, t-test) и контроли (средно 8.29±0.4 nmol/mg, спрямо средно 2.65±0.2 nmol/mg, p<0.00, t-test) също има регистрирано статистически значимо повишение в РСС. Статистически значимо повишение в нивото на РСС се наблюдава при родилки с ПР спрямо заплашващо ПР (средно 10.43±0.3 nmol/mg, спрямо средно 8.29±0.4 nmol/mg, p=0.01, t-test).

VII.2.1.1.3. ПРОДУКТИ НА ОКИСЛИТЕЛНО ДНК УВРЕЖДАНЕ, ИЗМЕРЕНО КАТО КОЛИЧЕСТВО 8-OHdG

Реактивните кислородни и азотни видове (ROS/RNS) предизвикват структурни лезии в ДНК веригите, които причиняват мутации, делеции и други генетични дефекти. резултатите от ДНК увреждането в проби от четирите изследвани групи за оценка на ДНК увреждането бе измерено количеството 8-OHdG ng/mL чрез ELISA метода – ***Фигура 14.***



Фигура 14. *ДНК увреждане, измерено вмитохондриалното ниво на 8-OHdG (ng/mL) при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин.*

Отчетено е статистически значимо повишение в митохондриалното количество 8-OHdG при бременни с клинична картина на заплашващо ПР в сравнение с контролите (средно 18.14±0.2ng/mL спрямо 10.12± 0.1ng/mL,средно p<0.01, t-test)и в сравнение с нормална бременност (средно 18.14±0.2ng/mL спрямо 11.06±0.4ng/mL,средно p<0.02, t-test). А при пациентки с ПР двукратно, статистически значимо повишение беше регистрирано спрямо небременните контроли (средно 20.08±0.3ng/mL спрямо средно 10.12±0.1ng/mL, p<0.5, t-test).

Статистически значимо повишение се наблюдава в количеството на 8-OHdG измерено пациентки с ПР спрямо бременни с клинична картина на заплашващо ПР(средно 20.08± 0.3 ng/mL спрямо средно 18.14± 0.1ng/mL, p<0.05, t-test).

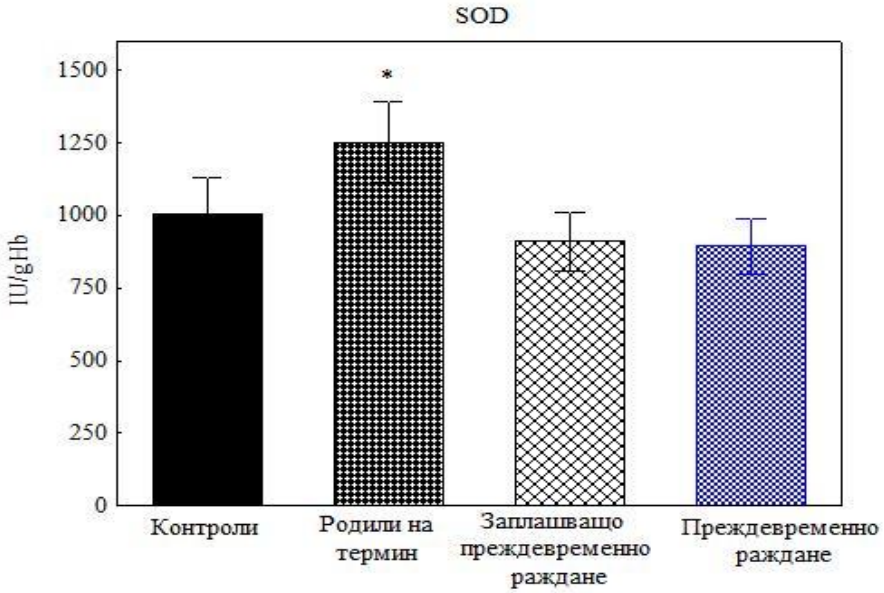
Резултатите от нашето проучване върху подбрани показатели на оксидативния стрес показват, че при пациентки с ПР са налице повишени оксидативни нива на радикало-образуване, доказани чрез повишените нива на крайните продукти на липидноперокисление (MDA), протеини (PCC) и нуклеинови киселини (8-OHdG). Окислените протеинови продукти са надеждни *invivo*биомаркери за степента на увреждане на протеините и нива на остъчен оксидативен стрес.

VII.2.2. ПРОУЧВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ОКСИДАТИВНИТЕ НАРУШЕНИЯ ВЪРХУ ПОДБРАНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ЕНДОГЕННАТА АНТИОКСИДАНТНА СИСИТЕМА: ЕНЗИМИТЕ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА, КАТАЛАЗА, ГЛУТАТИОН И ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗА. ТОТАЛЕН АНТИОКСИДАНТЕН КАПАЦИТЕТ

VII.2.2.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ АКТИВНОСТТА НА АНТИОКСИДАНТНИЯ ЕНЗИМ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА (SOD)

Антиоксидантните ензимите супероксид дисмутаза (SOD); каталаза (CAT), глутатион (GSH)/глутатион пероксидаза(GPx1) са основната вътреклетъчна ензимна защита срещу вредните окислителни увреждания на ROS/RNS в клетките.

Еритроцитната SOD активност (***Фигура 15***) беше статистически значимо понижена при родилки с ПР (средно 899.07±12.1 IU/gHb спрямо 1006.3±23.5 IU/gHb, p<0.000, t-test) в сравнение с небременни контроли. Статистически значимо изчерпване на еритроцитната SOD се наблюдава и между бременните с клинична картина на заплашващо ПР спрямо контролите(средно 911.09±17.1 IU/gHb спрямо 1006.3±23.5 IU/gHb, p<0.000, t-test).

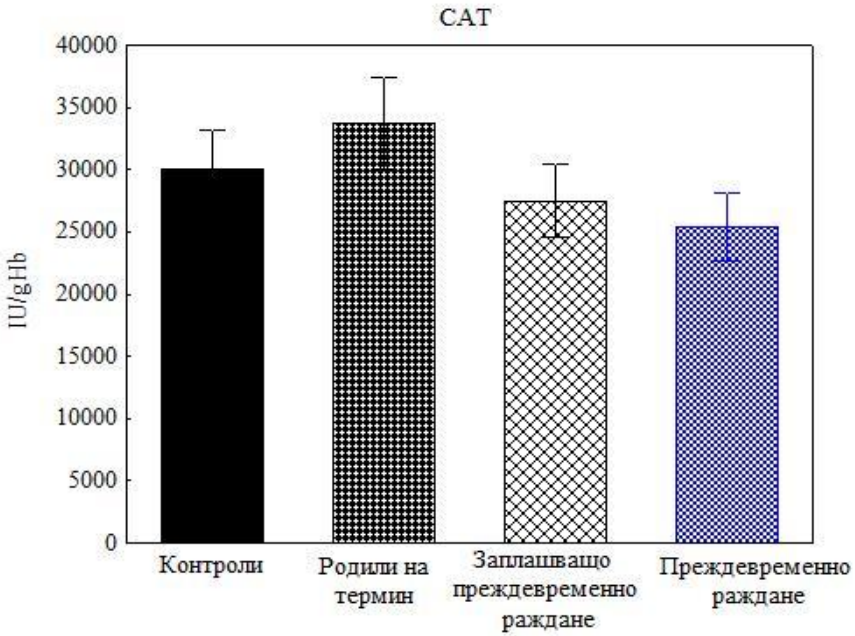


Фигура 15. *Активност на SOD при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин*

При родилите на термин живи, доносени деца нивата на еритроцитната SOD активност са статистически значимо по-високи в сравнение с контролите (средно 1253±9.34UI/gHb спрямо 1006.3±23.5IU/gHb, p=0.00, t-test), в сравнение с родилките с ПР (средно 1253±9.34UI/gHb спрямо 899.07±12.1 IU/gHb, p<0.002, t-test) и с бременните с клинична картина на заплашващо ПР (средно средно 1253±9.34UI/gHb спрямо911.09±17.1IU/gHb, p<0.004, t-test).

VII.2.2.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КАТАЛАЗНА (CAT) АКТИВНОСТ

Статистически значимо понижение в нивата на плазмената каталаза бяха отчетени при пациентките с ПР спрямо спрямо небременните контроли (средно 25408,66±236,6IU/gHb спрямо средно 29923,12±554,3IU/gHb, p<0.03, t-test); спрямо групата нормотензивни бременни (средно 25408,66±236,6 IU/gHb спрямо средно 33755,81±456,6 IU/gHb, p<0.03, t-test) и спрямо групата бременни със заплашващо ПР (средно 25408,66±236,6 IU/gHb спрямо средно 27500,17±634,3 IU/gHb, p<0.05, t-test) – ***Фигура 16***.



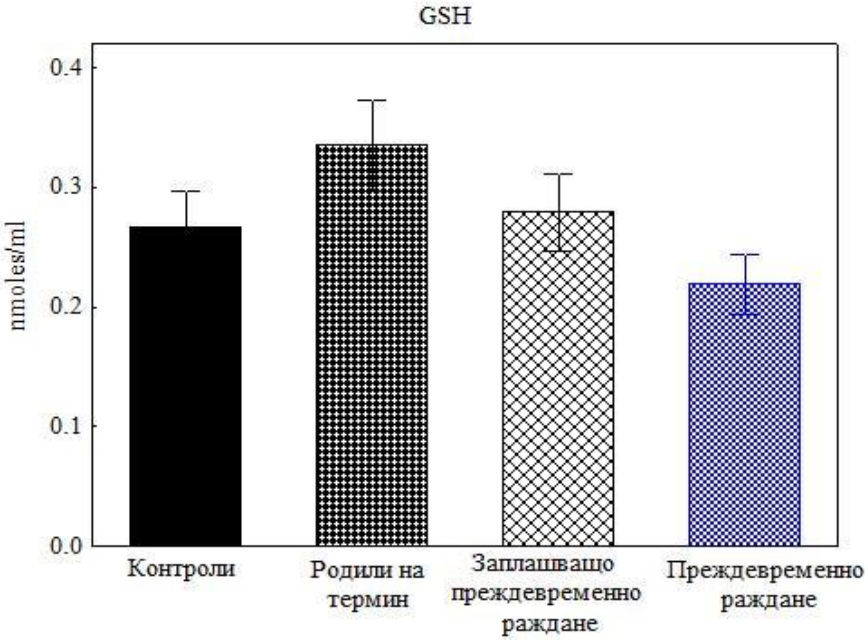
Фигура 16. *Активност на еритроцитната CAT при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин.*

Наблюдава се статистически значимо увеличение в нивата на плазмената каталазна активност между пациентки, родили на термин доносени деца и контроли (средно 33755,81±456,6 IU/gHb спрямо средно 29923,12±554,3 IU/gHb, p<0.03, t- test).
Проследеният антиоксидантен статус показва, че оксидативният стрес, установен при групата бременни със заплашващо ПР и пациентките с настъпило ПР е придружен със

силен редокс дисбаланс в нивата на ендогенните антиоксидантни ензими – намалени нива на SOD и CAT.

VII.2.2.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪТРЕКЛЕТЪЧНА ГЛУТАТИОН (GSH) АКТИВНОСТ

Основна част от ендогенните защитни антиоксиданти се заема от вътреклетъчния глутатион (GSH) и глутатион-свързаните ензими.



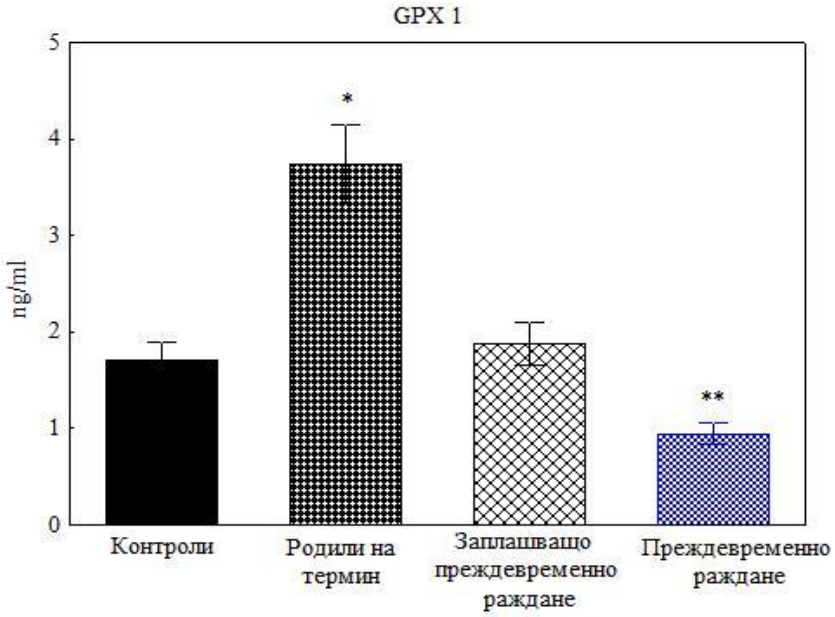
Фигура17. *Активност на вътреклетъчния глутатион (GSH) определена при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин.*

Резултатите от изследването нанивата на вътреклетъчния глутатион (GSH) - (***Фигура17***) отчетоха статистически значимо понижение при пациентки с ПР спрямо небременни контроли (средно 0.219±0.007nmol/mlспрямо средно 0.266±0.01 nmol/ml, p<0.05, t-test); спрямо групата нормотензивни бременни (средно 0.219±0.007nmol/mlспрямо средно 0.335±0.02nmol/ml, p<0.003, t-test) и спрямо групата бременни със заплашващо ПР (средно 0.219±0.007nmol/mlспрямо средно 0.279±0.03nmol/ml, p<0.05, t-test).

Статистически значимо увеличение в нивата на вътреклетъчния глутатион (GSH) беше установено при пациентките, родили на термин доносени деца спрямо контролите (средно 0.335±0.02 nmol/ml спрямо средно 0.266±0.01 nmol/ml, p<0.03, t- test).

VII.2.2.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪТРЕКЛЕТЪЧНА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗНА (GP_X1) АКТИВНОСТ

Селеногенният антиоксидантен ензим глутатион пероксидазата (GPx1) каталитичното се конкурира с CAT при детоксификацията на H_2O_2 и интрацелуларните хидропероксидии редуцира нивата на оксидативни нарушения.



Фигура 18.*Активност на вътреклетъчната глутатион пероксидаза (GPx1) определена при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин*

Резултатите от проведените изследвания (***Фигура 18***) отчетоха статистически значимо двукратно понижение на вътреклетъчната глутатион пероксидаза (GPx1) при пациентки с ПР спрямо небременни контроли (средно 0.94±0.07 ng/ml спрямо средно 1.71 ±0.022ng/ml, p<0.05, t-test)и спрямо групата бременни със заплашващо ПР (средно 0.94±0.07 ng/ml спрямо средно 1.88±0.08 ng/ml, p<0.01, t-test). Статистически значимочетирикратно понижение на GPx1 регистрирахме спрямо групата нормотензивни бременни (средно 0.94±0.07 ng/ml спрямо средно 3.74±0.01 ng/ml, p<0.02, t-test).

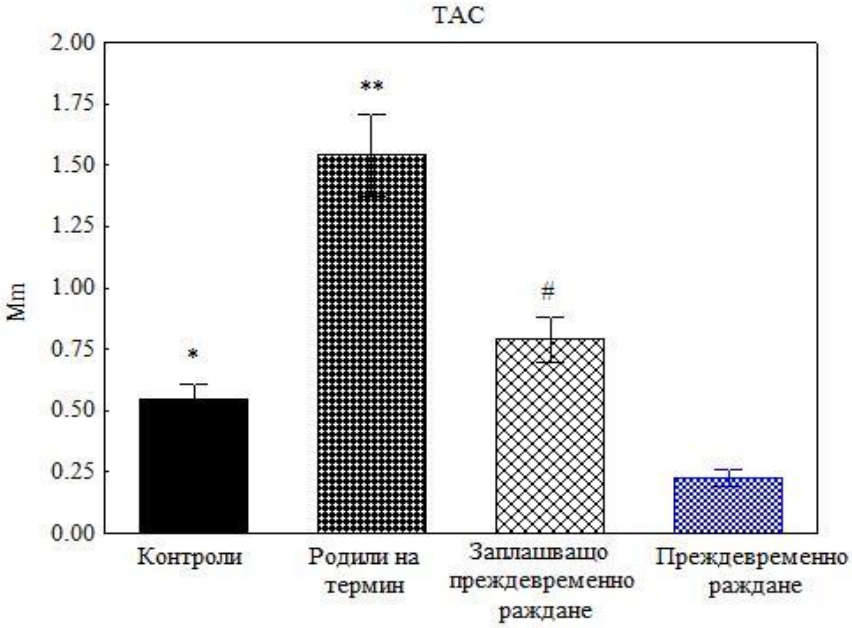
Статистическо увеличение в нивата на вътреклетъчната глутатион пероксидаза (GPx1) беше установено при пациентките, родили на термин доносени деца и при контролите (средно 3.74±0.01 ng/ml спрямо средно 1.71 ±0.022 ng/ml, p<0.003, t- test).

VII.2.2.5.ТОТАЛЕН АНТИОКСИДАНТЕН КАПАЦИТЕТ

Комбинираното действие на ендогенните и екзогенните антиоксидантни системи предотвратява адекватно оксидативния стрес.Тоталният антиоксидантен капацитет (TAC) е надежден диагностичен тест за определяне нанивото на антиоксидантите и степента на оксидативните нарушения в организма на бременната жена.

При TAC анализа (***Фигура 19***) се отчете статистически значимо понижение на вътреклетъчните антиоксиданти при пациентки с ПР спрямо небременни контроли (средно 0.227±0.07mM спрямо средно 0.56±0.003mM, p<0.001, t-test) и спрямо групата бременни със заплашващо ПР (средно 0.227±0.07mM спрямо средно 0.56±0.003mM, p<0.004, t-test). Статистически значимо отново четирикратно понижение на TAC регистрирахме спрямо групата нормотензивни бременни, родили на термин (средно 0.227±0.07mMспрямо средно 1.54±0.06 mM, p<0.05, t-test).

Статистическо трикратно увеличение на антиоксидантните нива и възстановени ендо- и екзогенна защитна система беше установено при пациентките, родили на термин доносени деца и небременните контроли (средно 1.54±0.06 mM спрямо средно 0.56±0.003mM, p<0.05, t- test).



Фигура 19. *Активност на тоталният антиоксидантен капацитет (TAC) определена при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (++)-статистическа значимост спрямо родили на термин.*

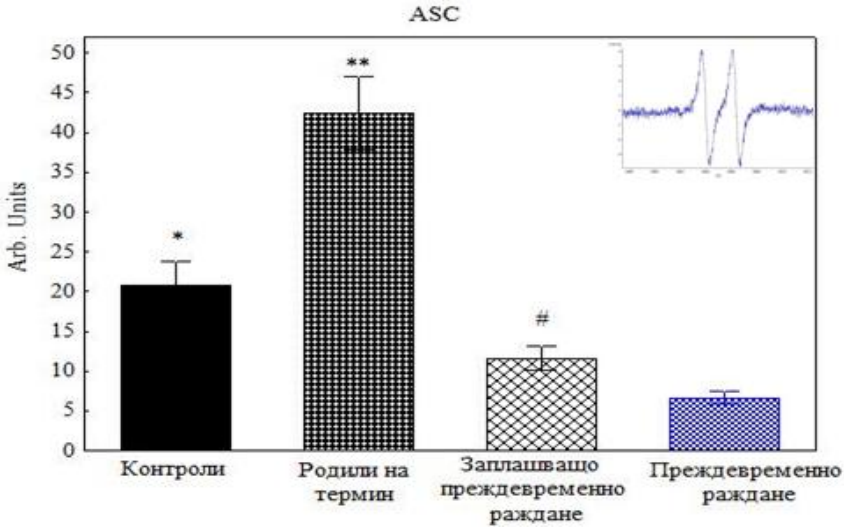
VII.3. ЕЛЕКТРОН ПАРАМАГНИТЕН РЕЗОНАНС (EPR) ПРОУЧВАНЕ НА СВОБОДНО-РАДИКАЛОВИТЕ НИВА ПРИ ПОДБРАНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС: АСКОРБАТНИ РАДИКАЛИ, •NO РАДИКАЛИ И ROS ПРОДУКТИ

VI1.3.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВАТА НА АСКОРБАТНИ РАДИКАЛИ (Asc•)

EPR спектроскопията е аналитична техника, която директно или индиректно улавя и доказ варадикалови структури. Нивата на Asc• радикали са представени на ***Фигура 20.***

Нивата на Asc• радикали при пациентки, родили на термин, са статистически значимо двукратно повишени в сравнение с небременните контроли (средно 42.4±0.01Arb. Unuts спрямо средно 20.7± 0.24 Arb.Unuts, p<0.001, t-test).

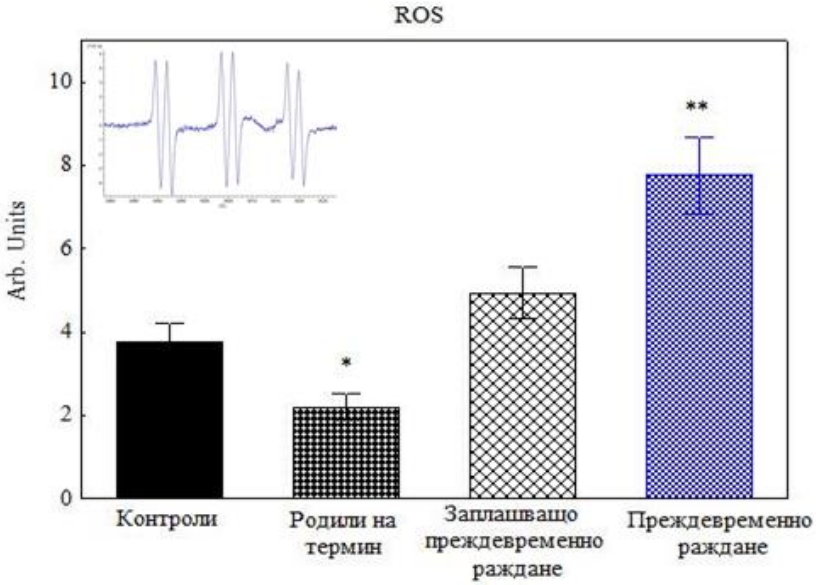
Статистически значимо осемкратно понижение беше регистрирано между нивата на Asc• радикали, измерени при пациентки с ПР спрямо тези с нормотензивна бременност, родили на термин (средно 6.62±0.065 Arb Unuts спрямо средно 42.4±0.01 Arb.Unuts, p<0.04, t-test). Четирикратно статистически значимо е понижението спрямо контролите (средно 6.62±0.065 Arb. Unuts, спрямо средно 20.7± 0.24 Arb. Unuts, p<0.003, t-test). Подобни резултати бяха отчетени и при групата пациентки със заплашващо ПР: статистически значимо понижение спрямо пациентките с нормотензивна бременност, родили на термин (средно 11.6±0.02 Arb. Unuts, спрямо средно 42.4±0.01 Arb.Unuts, p<0.04, t-test) и статистически значимо е понижение спрямо контролите (средно 11.6±0.02 Arb. Unuts, спрямо средно 20.7±0.24 Arb.Unuts, p<0.003, t-test).



Фигура 20. *Нива на Asc• радикали, измерени в безразмерни единици, в кръвна плазма при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин*

VII.3.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВАТА НА ROS ПРОДУКТИ

Статистически значимо повишаване на нивата на ROS продуктите (***Фигура 21***) бяха измерени при бременните с клинична картина на заплашващо ПР (средно 4.93±0.4 Arb. Unuts спрямо средно 3.75±0.4 Arb. Unuts, p<0.001, t-test) и при родилките с ПР (средно 7.75±0.2 Arb. Unuts спрямо средно 3.75±0.4 Arb. Unuts, p<0.00, t-test) в сравнение с контролите. При проби, взети от пациентки, родили на термин живи, доносени деца в сравнение с контролите се установи статистически значимо понижение (средно 2.19±0.4 Arb. Unuts спрямо средно 3.75±0.4 Arb. Unuts, p<0.5, t-test).

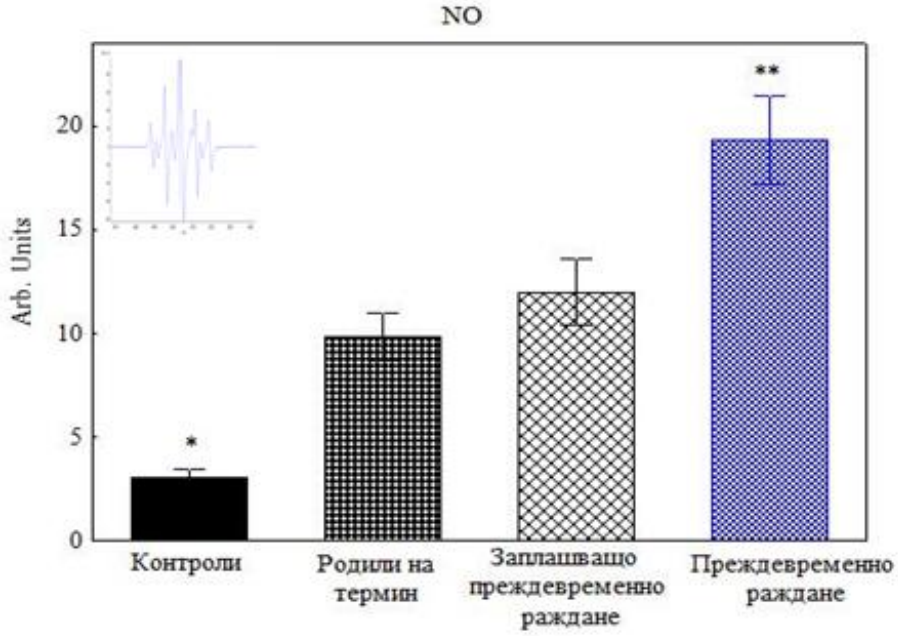


Фигура 21. *Нива на ROS продукти, измерени в безразмерни единици. в кръвна плазма при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин*

Като цяло от представените от нас резултати на ***Фигура 21*** се отчитат по-ниски нива на ROS продуктите, измерени в групата от пациенти със заплашващо ПР, спрямо родилките с ПР (средно 4.93±0.4 Arb. Unuts спрямо средно 7.75±0.2 Arb. Unuts, p<0.05, t-test).

VII.3.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВАТА НА •NO РАДИКАЛИ

Плазмените нива на уловените •NO радикали са илюстрирани на ***Фигура 22.*** Статистически значим, повишен ендогенен метаболизъм на •NO радикали беше измеренпри пациентките с ПР спрямо бременните, родили на термин (средно 19.33±3,51 Arb. Unuts спрямо средно 9.83±2.11 Arb. Unuts, p<0,003, t-test). Статистически значимо повишаване на •NO нивата бяха измерени и при бременните с клинична картина на заплашващо ПР спрямо контролите(средно 12.03±2.04 Arb. Unuts спрямо средно 3.07±0.8 Arb. Unuts, p<0.003, t-test) и спрямо родилите на термин (средно 12.03±2.04 Arb. Unuts спрямо средно 9.83±2.11 Arb. Unuts, p<0.00, t-test). При проби, взети от пациентките, родили на термин живи, доносени деца в сравнение с контролите се установистатистически значимо повишение (средно 9.83±2.11 Arb. Unuts спрямо средно 3.07±0.8 Arb. Unuts, p<0.05, t-test).



Фигура 22. *Нива на •NO изразени в кръвна плазма при контроли; при родили на термин живи, доносени деца; при бременни с клинична картина на заплашващо ПР; и при родилки с ПР. Резултатите са представени като средни стойности ± S.E. p<0.05. (*)-статистическа значимост спрямо контролата; (**)-статистическа значимост спрямо родили на термин*

Като цяло в представените от нас разултати се отчита шест-кратно повишение в нивата на ROS/RNS продуктите, измерени в групата от пациентки с ПР спрямо

небремените контроли (средно 19.33±3,51 Arb. Unutscпрямо средно 3.07±0.8 Arb. Unuts, p<0.003, t-test). статистически значимо повишение на ROS продукти и повишен ендогенен метаболизъм на •NO радикали.

ИЗВОДИ от така представените резултати:

1. Представените резултатите от проучването на показателите на оксидативен стрес потвърждават концепцията, че оксидативните/ нитрозативни нарушения/ увреждания се повишават при пациентки с ПР чрез:

- повишените плазмени нива на MDA, модифицираните протеини – PCC и количеството на 8-OHdG;
- променените активности на антиоксидантните ензими - понижената активност на еритроцитната SOD и неадаптивно понижение на еритроцитната CAT;
- променените активности на антиоксидантните ензими –значително понижената активност на еритроцитните GSH и GPx1;
- статистически значимо понижение на тоталния антиоксидантен капацитет; статистически значимо повишение на ROSпродукти и повишен ендогенен метаболизъм на •NO радикали.
- статистически значимо понижение на аскорбатни радикали и вероятно оксидативно изчерпване на аскорбинова киселина;

2. Очевидно е, че оксидативният/ нитрозативният стрес може да доведе до допълнителна прогресия на свободно-радикаловите увреждания и понеоксидантни механизми до увреждане на утеро-плацентарния кръвоток при ПР чрез доказаните в настоящия дисертационен труд от нас:

- повишени плазмени нива на MDA и статистически значимо повишение в модифицираните протеини PCCи количеството на 8-OHdG;
- слабо и недостатъчно компенсиране на радикаловия дисбаланс в активностите на ендогенните антиоксидантни ензими – еритроцитните SOD, CAT, GSH и GPx1;
- недостатъчно лимитирани процеси на липидна пероксидация, доказани чрез напълно редуцираните нива на аскорбатни радикали и ROSпродукти и генериране на RNS продукти, демонстрирано чрез значително повишените нива на •NO радикали в плазма при пациентки с ПР.

3. Използването на **ДОПЪЛНИТЕЛНА** витаминна терапия, включваща природни или синтетични антиоксиданти се явява вероятен и необходим подход при бременни с клинична картина на заплашващо ПР и бременни с ПР.

През последните години нарастват проучванията относно ефекта на прилаганите при лечението на редица заболявания комбинации между лекарствени препарати и различни радикалоуловители,подпомагащи процесите на възстановяване на антиоксидантния статус на организма. Използването на подходящи антиоксидантни вещества води до намаляване нивото на оксидативен/ нитрозативен стрес и повишаване активността на ендогенната и екзогенна антиоксидантната ензимна защитна система и като краен резултат намаляване на негативните последствия от оксидативните увреждания.

VIII. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

VIII.1. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАРАКЛИНИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ

До провеждане на настоящото изследване съществуваха ограничен брой проучвания в България, свързани с вероятния оксидативен механизъм на ПР. Изследваните показатели - параклинични и на оксидативния стрес, са подходящи и достатъчни за пълно анализиране на антиоксидантно-прооксидантните (*редокс-модулиращи*) процеси и системата на АОЗ при изследваните групи пациенти. Включването в проучването в съответствие с изработените критерии позволява съпоставянето между отделните групи пациенти да е максимално обективно и да бъде оценен „*чистия*" ефект на ПР върху оксидативния статус.

Понастоящем за водещи причини за ПР са приети инфекциозното възпаление, ППОМ, като при това състояние е известна тясната взаимовръзка с възпалителните процеси при хориоамнионит и ИЦИ.

Около 30 - 40% от ПР са причинени от наличен възпалителен процес. Възходящата инфекция е доказана причина за ПР. Хориоамнионитът е бактериална инфекция – клинически изразена или безсимптомна, на плацентата, околоплодните води и феталните мембрани. Инфектираните тъкани отделят медиатори на възпалението – простагландини (PG) и интерлевкини (IL), които медиират маточни контракции и местен възпалителен процес, водещ до ППОМ. Възможно е и „стерилно" възпаление на аднексите на плода, каквото се установява при спонтанно ПР със запазена цялост на околоплодните мембрани. „Стерилното" възпаление е израз на неспецифичен защитен механизъм при клетъчен стрес, клетъчна смърт и дори може да бъде причина за перинатална смърт на плода

Предвид изработените критерии за работа при включените в проучването бременни жени и родилки не са установени клинични и параклинични данни за инфекциозно възпаление и хориоамнионит. Установената левкоцитоза е в границите на физиологичната, характерна за третия триместър на бременността.

В нашето изследване при никоя от жените със сПР нямаше клинични признаци на хориоамнионит. Въпреки това в тези случаи е възможна субклинична вътрематочна инфекция.

Най-често и рутинно използваният параклиничен показател за оценка на наличието на инфекциозни и възпалителни усложнения при жени с ПР е CRP. статистически по-ниски стойности на реактивните протеини се регистрират в групите

пациенти с ПР и зПР. Този резултат се очакваше, тъй като протеиновото окисление рязко се увеличава след индуцирането на оксидативни промени в майчиния организъм. Оценихме значението на промените в нивата на плазмените маркери на възпалителните процеси, протичащи в майката, като се вземат предвид няколко съпоставими показателя: CRP-нива и корелация спрямо пушачи-непушачи, CRP-нива и корелация спрямо редовен прием на витамини, CRP-нива и корелация спрямо майчина възраст. Посредством корелационен анализ и логистичен регресионен подход (ROC) (*експлоатационна характеристика на кривата за определяне на най-добрата точка на отрязване на плазмената CRP*), оценихме зависимостта между плазмените CRP-концентрации при майката и вероятността за спонтанно ПР. Корелационните съпоставки и 95% доверителен интервал отечетоха точен интервал от 4.9 mg/l CRP-стойност като рисков фактор за спонтанно ПР.

В корелационно отношение проследяването на CRP-нивата спрямо пушачи-непушачи и редовен прием на витамини беше регистриран незадоволителен доверителен интервал в рамките на съответно 39% и 41,3%. Установената ниска корелационна зависимост е абсолютно оправдана. Очевидно е, че по-голямата част (97.7%) от изследваните пациенти са непушачи, занимаващи се със сравнително тежък физически труд, принадлежащи към ниски социално-икономически групи от населението. По време на своята бременност пациентите вероятно не са приемали редовно фолиева киселина, поливитаминни препарати или магнезий.

Таблица 2. *Корелационен анализ и взаимовръзка между нивото на CRP, възрастта на родилката и риска от сПР*

Променлива	**ПР спрямо РТ**	**OR(95% CI:) P**	**Коефициент на вероятност**	**Гранична стойност**
CRP ≤ 5 mg/l спрямо CRP > 5 mg/l	Чувствителност - 86,9 % (0,8686) Специфичност - 53,7 % (0,537)	OR=7.679 (3.875; 15.217) P < 0.0001	260.755	CRP = 4,9 mg/l **Положителен риск**
CRP 5-10 mg/l спрямо CRP > 11 mg/l	Чувствителност - 16,3 % Специфичност - 1	Точност=49,3% P < 0.0001	-	CRP > 11 mg/l **Положителен риск**
Възраст ≤ 19 г. спрямо Възраст > 19 г.	Чувствителност - 59,1 % Специфичност - 1	OR=2.035 (1.095; 3.781) P = 0.025	297.646	Възраст≤19 г. **Положителен риск**
CRP > 5 mg/l спрямо Възраст ≤ 19 г.	Чувствителност – 68,6 % Специфичност - 1	OR=8.122 (4.033; 16.358) OR=2354 (1.163; 1.749) P < 0.001	254.811	CRP>4,9 mg/l спрямо Възраст ≤ 19 г **Положителен риск**

В корелационно отношение (***Таблица 2***) проследяването нивата на реактивните протеини спрямо възрастта на родилката беше в задоволителен доверителен интервал в рамките на 88%. Установи се висока корелационна зависимост спрямо двата фактора 68.6%, като се има предвид определената CRP стойност >4.9mg/l спрямо майчина възраст ≤19 години, РОС анализа отчете позитивен риск.

Регистрираната от нас максимална CRP-стойност >4.9 mg/l спрямо възраст на майката ≤ 19 години и отчетен позитивен риск е доказателство, че CRP е определящ фактор за повишен риск от сПР, особено в срок на бременността 32 -≤34^{+6} г.с. В допълнение можем да твърдим, че завишените плазмени концентрации на CRP в съчетание с много млада възраст на майката предполагат завишен риск от сПР.

Рутинно в практиката при оценка на наличието на данни за възпалителни усложнения на бременността се разчита и на данните от ПКК, в частност отчитане стойността на левкоцитите. Получените от нас резултати относно нивата на левкоцитите при жените, родили на термин и при сПР бяха в границите на физиологичната левкоцитоза, характерна за третия триместър на бременността. Установените 85% статистически значимо по-ниски нива на левкоцити ($14.31 \pm 2.66\times10^9$/ L; r = 0.953) към момента на раждане при ПР в сравнение с жените, родили на термин, регистрираха и положителна корелационна зависимост ($p<0.0005$) и бяха съизмерими с максималната физиологична левкоцитоза, характерна за третия триместър.

Установихме повишение в броя на левкоцитите и при двете изследвани групи - РТ и ПР. Към момента въз основа на данните от ПКК и броя на левкоцитите в нея не е възможно да се прогнозира евентуално предстоящо ПР. Необходими са допълнителни проучвания, за да се изясни може ли броят на левкоцитите да служи като маркер за прогноза и ранна диагноза на ПР. От друга страна, повишеният брой левкоцити е маркер за биохимични и оксидативни изменения в майчиния организъм, които могат да бъдат в основата на преждевременната маточна активност и ПР.

Позовавайки се на нашите открития, може да се предположи наличието на асептично възпаление в организма на жените с ПР, но без клинични и параклинични данни за развит хориоамнионит. Поради това в тези случаи нараства значението на маркерите на острата фаза на възпалението, какъвто е CRP. CRP в комбинация със специфични провъзпалителни цитокини, стимулира освобождаването на простагландини и матриксни металопротеинази, водещи до повишен маточен контрактилитет и последващи структурни промени в маточната шийка.

VIII.2. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА ДИСБАЛАНС МЕЖДУ ПРООКСИДАНТИТЕ И АНТИОКСИДАНТНАТА СИСТЕМА В ОРГАНИЗМА НА БРЕМЕННАТА ЖЕНА, РАЗВИТИЕТО НА ОС И ПОСЛЕДВАЩИ ОКСИДАТИВНИ НАРУШЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА ПР

Важен аспект за решаването на проблема за патогенезата на ПР е търсенето на неспецифични закономерни реакции в организма на бременната жена, които дават начален тласък на процеса на прекъсване на бременността. В настоящата работа си поставихме за цел да изясним ролята на продукцията на активни кислородни и азотни форми в резултат на дисбаланс между прооксидантите и антиоксидантната система в организма на бременната жена и развитието на ОС и последващи оксидативни нарушения

в патогенезата на ПР. Прекомерното ROS производство пълно или непълно инактивира клетъчните антиоксидани защитни механизми и води до макромолекулно увреждане, т.е. нарушения в структурата или функцията на ДНК, протеини и липиди/ мембранни фосфолипиди.

VIII.2.1. Обсъждане резултатите от изследване нивата на липидно перокисление (MDA) при ПР

Липидното перокисление, измерено чрез количеството MDA /малондиалдехид/ като междинно съединение, е основен индикатор за степента на промяна в липидната структура и играе ролята на надежден оксидативен маркер в организма на бременната жена. Високите MDA нива определят високо прооксидантно увреждане на липидните биомолекули и са индиректен белег за повишени нива на АКФ в организма. В нашето проучване нивата на MDA се повишават при ПР, докато при раждане на термин те намаляват спрямо стойностите от преди забременяването (контролна група). Повишаването на нивата на MDA при ПР е синхронно с понижаване на концентрацията на полиненаситените мастни киселини в кръвта. Тези завишени нива на MDA са индикатор за засилена липидна пероксидация при ПР, докато при раждане на термин липидната пероксидация намалява своя интензитет.

В изследванията на настоящия труд нивата на плазмения MDA при ПР са почти два пъти по–високи в сравнение с родилите на термин. MDA-нивата са най-високи при умерено до късно преждевременно раждане. При заплашващото ПР разликата между MDA-нивата с тези при контролите не е статистически значима.

Следователно проведеното от нас изследване потвърждава, че в групата на родилите преждевременно се регистрира повишен оксидативен стрес поради значително повишаване на нивата на липидна пероксидация. Прекомерното ROS/RNS производство акумулира липидно клетъчно увреждане, като надхвърля способността на биологичната система на организма на бременната жена да ги детоксикира. Балансирането на оксидативните нарушения може да се постигне чрез активиране на антиоксидантната ензимна/неензимна система и клетъчно инхибиране на протеиновото карбонилиране.

VIII.2.2. Обсъждане резултатите от изследване нивата na протеин карбонилно съдържание (PCC) при ПР

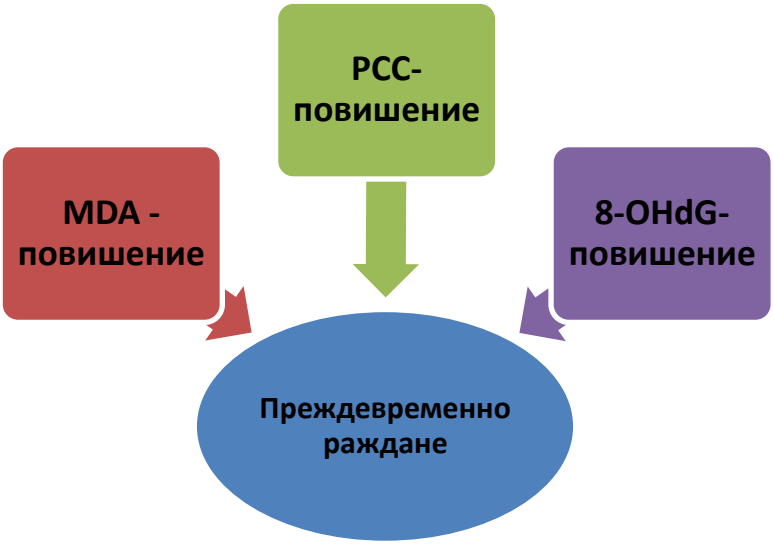
ОС и натрупването на ROS/RNS води до повишаване на риска от ПР. ОС причинява каскада от клетъчни увреждания от сорта на клетъчна дисфункционалналност, преждевременно узряване на маточната шийка и активиране на p38 митоген-активирани протеин кинази за насърчаване на клетъчната пролиферация. В настоящото проучване установяваме повишени нива на PCC и в трите изследвани групи пациенти - със заплашващо ПР, родили преждевременно и родили на термин спрямо контролната група небременни жени. Нивата на карбонилирани протеини са повишени в случаите с ПР, като те са статистически значимо двукратно повишени в сравнение с PCC-нивата при родилите на термин и при заплашващо ПР. Статистически значимо по-високо е нивото на протеинова оксидация при родилките с ПР спрямо случаите със заплашващо ПР, т.е. спонтанното и заплашващото ПР индуцират оксидативни нарушения.

Процесите на засилена пероксидация при ПР обхващат белтъчните макромолекули и създават възможност за ДНК-увреждания в организма на жената.

VIII.2.3. Обсъждане резултатите от изследване нивата на ДНК-увреждания (8-OHdG) при ПР

Ние установихме оксидативни нарушения и ДНК-увреждане чрез проследяване и оценяване нивата на 8-OHdG. При бременните с клинична картина на заплашващо ПР митохондриалното количество 8-OHdG беше статистически значимо по-високо в сравнение с контролите и в сравнение с раждането на термин. При ПР се регистрира двукратно, статистически значимо повишение спрямо небременните контроли. Статистически значимо повишение се отчита в количеството на 8-OHdG при родилките с ПР спрямо бременните с клинична картина на заплашващо ПР.

В заключение, въз основа на казаното дотук, можем да направим извода, че при родилки с ПР са налице повишени оксидативни нива на ROS, доказани чрез повишените нива на крайните продукти на перокисление на липиди (MDA), протеини (PCC) и нуклеинови киселини (8-OHdG). Засилени са прооксидативните процеси в организма на бременните със заплашващо ПР и родилите преждевременно (***Фигура 23***).



Фигура 23. *Нивата на липидно перокисление, карбонилиране на протеини, ДНК нарушения и настъпилите оксидативен стрес нарушения като патофизиологичен механизъм на спонтаното преждевременно раждане, постерно представяне* (I. Koleva-Korkelia, M. Angelova, G. Nikolova and Y. Karamalakova. Oxidative stress as a pathophysiological mechanism of spontaneous idiopathic preterm birth. *3rd International Symposium on Lipid Oxidation and Antioxidants 23 – 24 November 2020*, Spain, POST-007, pp. 39)

VIII.2.4. Обсъждане резултатите от изследване нивата на защита от антиоксидантната ензимна и неенизимна система чрез проследяване нивата на супероксид дисмутаза (SOD); каталаза (CAT); глутатион (GSH); вътреклетъчна глутатион пероксидаза (GPx1)) при ПР

Ензимната и неензимната антиоксидантни системи са ключови протектори срещу клетъчни изменения при ROS и повишен ОС и също могат да бъдат причислени към допълнителните биомаркери на оксидативни нарушения. неспособността за отреагиране на антиоксидантната система води до неинфекциозни клетъчни атрофии, дължащи се единствено на ОС или ОС-индуцирано стареене, което от своя страна причинява стерилно възпаление, което може да генерира имунокомпрометирана вътрематочна среда и да доведе до ПР.

През последното тримесечие на бременността антиоксидантната система на бременната жена търпи пренагласа към установяване на физиологично по-високи нива на ензимните антиоксиданти. През същия период неензимните антиоксиданти преминават през плацентата в нарастващи концентрации. Тези промени осигуряват прехода от вътрематочното развитие на плода в условията на относителна хипоксия към развитие в по-богатата на кислород извънматочна среда. На засилените процеси на пероксидация човешкият организъм реагира със засилено действие на своята АОС – ензимна и неензимна.

В настоящия дисертационен труд за оценка на състоянието на системата на АОЗ бяха изследвани нивата GSH и основните вътреклетъчни антиоксидантни ензими SOD, CAT и GPx1, т.е. бяха проследени степените на каталитично разлагане на високо реактивен супероксид анион и детоксикацията на H_2O_2.

При родилките с ПР и при бременните с клинична картина на заплашващо ПР се установява статистически значимо понижение на еритроцитната SOD-активност в сравнение с небременните жени от контролната група.

Отчита се статистически значимо понижение и в нивата на плазмената каталаза при родилките с ПР спрямо родилите на термин и спрямо небременните контроли. Отчитаме значимо повишение в нивата на плазмената каталазна активност спрямо контролната група, което е потвърждение на постановката, че към термина на бременността CAT-нивата физиологично се покачват.

GSH е най-добрият неензимен буфер на АКФ на системно и клетъчно ниво. Неговите ниски нива са важен показател за развитието на оксидативнен стрес и оксидативни нарушения в организма. Нивата на вътреклетъчния глутатион (GSH) са статистически значимо по-ниски при пациентките с ПР спрямо небременните контроли, спрямо групата нормотензивни жени, родили на термин и спрямо групата бременни със заплашващо ПР.

При засилени оксидативни увреждания се очаква повишаване на активността на GPx1 в организма с цел запазване на баланс в оксидативния статус. Понижаването на GPx1-активност е белег за нарушен баланс между прооксидантни и антиоксидантни процеси. В настоящото проучване беше установено статистически значимо понижение в активността на вътреклетъчната GPx1 при пациентките с ПР - двукратно спрямо небременните контроли и спрямо групата бременни със заплашващо ПР и четири пъти по-ниско спрямо групата нормотензивни бременни, родили на термин

Статистическо увеличение в нивата на вътреклетъчната глутатион пероксидаза (GPx1) спрямо контролната група беше установено при пациентките, родили на термин доносени деца. Намаляването на GPx1-активност в случаите с ПР е белег за нарушен баланс в АОС. Тя е предпоставка за доминиране на прооксидантните процеси над АОЗ.

При изследванията в настоящата работа се установява статистически значимо:

- ✓ повишение в нивата на ендогенните антиоксиданти при раждащи на термин жени;
- ✓ понижение в нивата на ендогенните антиоксиданти при преждевременно раждане – ***Фигура 24***.

Фигура 24. *Понижението в нивата на SOD, CAT, GSH и GPx1 като част от патофизиологичните механизми при преждевременно раждане*

В нашето проучване, за пръв път проведено за региона на южна България, се установява една от големите разлики в системата прооксиданти-антиоксиданти при раждане на термин и при ПР. Засилването на прооксидантните процеси към ВТР налага компенсаторно активиране на защитната АОС. Отчитаме възстановяване и запазване на редокс/оксидативния баланс в организма на жената. Освен това, при ПР е налична активна прооксидация на фона на намалени нива на основните ензимни и неензимни антиоксиданти.

VIII.2.5. Обсъждане резултатите от изследване нивата на тоталния антиоксидантен капацитет (ТАС) при ПР

Тоталният антиоксидантен капацитет (ТАС) отчита общото количество на антиоксиданти в организма и отразява повишената токсичност и нивата на натрупване на ROS и RNS в клетката.

След анализиране на нивата на ТАС се отчете статистически значимо понижение на вътреклетъчните антиоксиданти при пациентите с ПР спрямо небременните контроли и спрямо групата бременни със заплашващо ПР. Отново

статистически значимо, четирикратно понижение на ТАС регистрирахме спрямо групата нормотензивни жени, родили на термин живи, доносени деца. Най-значително е повишаването на ТАС към момента на започване на спонтанна родова дейност около ВТР. При заплашващо ПР ТАС също се повишава, но със статистически незначим резултат. При ПР, ТАС намалява спрямо състоянието на организма извън бременността.
Спектрофотометричните и ELISA методите са най-често използвани за идентифициране на връзката на оксидативните нарушения с ПР. Те са лесно достъпни, но получените резултати са неспецифични и изключително трудни за интерпретиране. Още повече, тези методи не идентифицират включените в процесите специфични ROS, RNS или типичната антиоксидантна защита за интерпретация в конкретен момент от изследването. Най-подходяща техника за доказване на нестабилните ROS/RNS крайни продукти като генерирани аскорбатни, липидни и азотен оксид радикали се явява ЕПР и ‘‘real time’’ спин-улавяща спектроскопия.

VIII.2.6. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА ROS/RNS - ФОРМИРАНЕТО И ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС ПРИ ПР ЧРЕЗ ДИРЕКТНА ЕПР СПЕКТРОСКОПИЯ

Доста изследвания използват спин-адуктивната EPR спектроскопия като «златен стандарт» за измерване на нивото, специфичничността на свободните радикали и техните взаимодействия.
Една от конкретните задачи на настоящия дисертационен труд беше да бъдат проучени и сравнени оксидативните нарушения, породени от RONS, при жени с ПР спрямо жените, родили на термин и тези със заплашващо ПР и да се оцени оксидативния им статус в реално време. За да направим комплексна оценка на нивата на Asc•, •NO, ROS продукти и оксидативното състояние на изследваните групи, използвахме три различни спин-уловителя.

VIII.2.6.1. Обсъждане резултатите от изследване нивата на Asc• радикали при ПР

Аскорбатните радикали са неензимни антиоксиданти, които понижават нивата на оксидативен стрес в организма. Те имат необичайна активност – реагират с други радикали, но са неактивни спрямо нерадикалови видове.

В нашето проучване установяваме, че при раждане на живо, доносено дете към ВТР нивата на Asc• радикали в кръвния серум на жената двукратно се повишават спрямо състоянието преди забременяването. При ПР и при заплашващо ПР нивата на Asc• радикали са значително по-ниски спрямо състоянието преди забременяване. системната дисрегулация на неензимните антиоксидантни микроелементи е предпоставка за натрупване на междинни ROS-съединения и може да бъде пряко свързана със сериозен риск от ПР, опосредстван от остри оксидативни нарушения в организма на бременната жена. В допълнение, здравата бременност, завършила с раждане на термин, се характеризира със стабилен баланс между ROS и антиоксиданти в организма на бременната жена.

Неензимният Asc• редокс-дисбаланс е основна патологична характеристика на много *оксидативни усложнения и ПР* поради неспособност на организма да се справи с

увреждането на колагеновата матрица и абнормалната консумация на антиоксидантните защитни системи. Всички упоменати събития могат да предизвикат маточни контракции, водещи до ПР.

VIII.2.6.2. Обсъждане резултатите от изследване нивата на •NO радикалово разпределение и активиране/деактивиране на клетъчните NOS-системи

В настоящото проучване за първи път в България чрез EPR спектроскопия беше измерена продукцията на •NO по време на бременност – завършила с ПР, усложнена със заплашващо ПР и завършила с раждане на термин на живо, доносено дете. При това изследване се установи засилен ендогенен метаболизъм и повишено производство на •NO радикали при пациентките с ПР спрямо родилите на термин. Статистически значимо повишаване на •NO нивата беше измерено и при бременните с клинична картина на заплашващо ПР спрямо небременните контроли и спрямо родилите на термин. При пациентките, родили на термин живи, доносени деца в сравнение с контролите се установи статистически значимо повишение в •NO нивата спрямо контролната група небременни жени.

При раждане на термин се установяват трикратно повишени нива на •NO в сравнение със състоянието на организма извън бременност. При ПР това •NO радикалово отлагане е повече от шест пъти по-високо.

VIII.2.6.3. Обсъждане резултатите от изследване нивата на ROS продукти

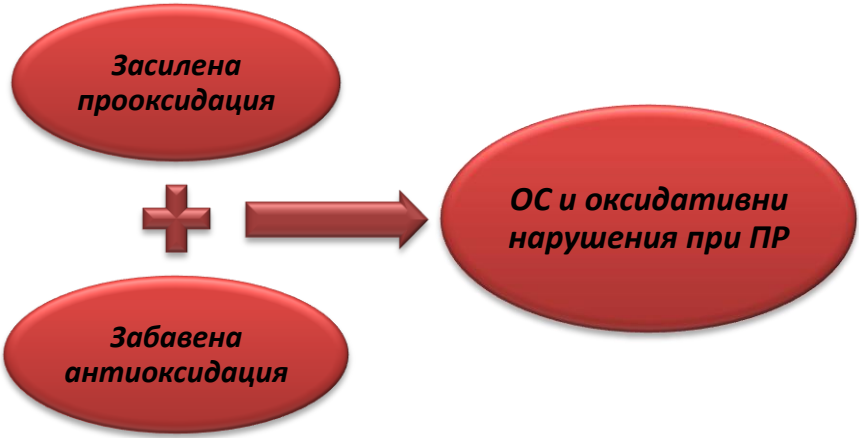
Понижените митохондриални SOD-нива заедно с повишената остатъчна липидна пероксидация, измерена чрез ROS-продуцирането в плазмата при жени със спонтанно ПР, вероятно допринасят за патогенезата на това усложнение на бременността. Измерено е статистически значимо ~1,64 пъти плазмено повишение в MDA-концентрацията и ~2,89 пъти плазмено повишение на ROS-продукцията в групата с ПР в сравнение с родилите на термин, обвързано и с положителна корелация (ROS vs MDA, $r = 0.91$, $p < 0.002$).

Предполагаме, че при ПР поради изчерпване на антиоксидантната защитна система, фазата на прекратяване на липидното перокисление не настъпва или отчита клетъчно забавяне, защото конюгирането на два радикала L• и/или LOO• е невъзможно, поради невъзможност за реагиране с антиоксидант, прекъсващ веригата

При нормално протичаща бременност оксидативните процеси се засилват към ВТР. Повишават се нивата на ROS и RNS, които са необходими за поддържането на нормалните клетъчни функции на вътреутробно развиващия се нов организъм, но едновременно с това се покачват нивата на ендогенните антиоксиданти, в подкрепа на което е и повишеният ТАС към ВТР. Така, при повишени нива на прооксиданти и антиоксиданти, се установява качествено нов, характерен за бременността, *редокс баланс* в организма на бременната жена (***Фигура 25***).

Фигура 25. *При раждане на термин в организма на жената при променени нива на прооксиданти и антиоксиданти се установява качествено нов баланс в редукционния статус*

Обобщеният анализ на получените резултати прави възможно изграждането на по-пълна представа за *оксидативния статус при жени, чиято бременност е усложнена с ПР*. Промените в изследваните показатели са значими за ПР. В резултат на засилени процеси на окисление при силно занижени антиоксидантни процеси се развива ОС. При това промените в антиоксидантната система са комплексни и засягат и ензимните, и неензимните й компоненти (***Фигура 26).***



Фигура 26. *Поради засилена прооксидация и забавена антиоксидация в организма на жените с ПР се развива ОС и в резултат оксидативни нарушения*

Промените в изследваните показатели са основание да приемем с висока вероятност, че оксидативните нарушения в организма играят съществена роля в патогенезата на ПР. Така към възпалението като основен патогенетичен фактор се добавят оксидативният стрес и оксидативните нарушения в организма на бременната жена. Оформя се тройната взаимовръзка възпаление –оксидативен стрес и оксидативни нарушения – преждевременно раждане. (***Фигура 27***)

Фигура 27. *В патогенезата на преждевременното раждане е налична стабилна тройна взаимовръзка оксидативен стрес-възпаление-преждевременно раждане*

Особен интерес представлява групата пациенти със заплашващо ПР. В изследването се установява едновременното наличие на засилени оксидативни процеси и занижена защита от страна на АОС. Това налага паралелно терапевтично повлияване на двете групи процеси с токолитици и антиоксиданти. Съвременните токолитични медикаменти в известен процент от случаите имат незадоволителен успех при лечението на заплашващо ПР. Причина за това е и липсата на патогенетично повлияване на преждевременното отключване на родова дейност. В тази връзка перспективно е приложението на медикаменти с антиоксидантно действие. Резултати при подобна работа не биха могли да се очакват много бързо. Използваните към момента антиоксиданти, които са част от прилаганите по време на бременност поливитаминни препарати, имат един и същи механизъм на действие. Те инхибират източниците на АКФ или директно елиминират тези АКФ. Най-вече, съвсем емпирично, се разчита на ефекта от въздействието на витамините С, Е, А. Есенциалните микронутриенти също имат изразени антиоксидантни свойства. Такива са селенът, цинкът, медта и манганът, които

са част от състава на поливитаминните препарати, използвани през бременността. Добавянето на антиоксиданти – витамини и микронутриенти към медикацията на бременните жени може да доведе до снижаване на честота на някои от усложненията на бременността – ПР, прееклампсия, IUGR.

Използваните към момента токолитици нямат доказан антиоксидантен ефект. Необходими са антиоксидантни препарати, които имат по-комплексно действие и директно стимулират системата за антиоксидантна защита в организма на бременната жена. Включването на нови такива изисква дългосрочни и задълбочени проучвания върху тяхната ефективност и безвредност за бременната жена, плода и новороденото.

Алфа-липоевата киселина (ALA) има мощни противовъзпалителни, антиоксидантни и имуномодулиращи свойства и е безопасна за човешкия организъм и във високи дози. В акушерството е част от лечението на субхориалните хематоми при заплашващ аборт в първия триместър на бременността. Възможно е включването на ALA в терапевтичния подход при ПР.

На тази база можем да направим няколко предположения:

1)Предполагаме, че повишените ROS-видове могат да служат като предшественик за възпалителни реакции, които могат да инициират ПР и да доведат до увреждане на цервикалната строма и колагена във феталните мембрани.

2) Повишените ROS водят до промени във функциите на плацентата при ПР.

3) Балансирането на редокс имбаланса, минимизирането на оксидативните нарушения и поддържането на нормално протичаща бременност, може да се постигне чрез активиране на ендо-/екзогенната антиоксидантна защитна система.

В заключение, можем да направим обобщението, че системата антиоксиданти-прооксиданти при ПР има специфична характеристика, обусловена от развиващия се оксидативен стрес и последващите оксидативни нарушения в организма на бременната жена.

Представените изследвания и констатации в настоящия дисертационен труд ни дават сериозно основание да предположим, че оксидативните нарушения в организма на бременната жена са тясно свързани с иницииращите патогенетични механизми на преждевременно започващата родова дейност.

Същевременно се налага и необходимост да се обмисли нов подход в токолитичната терапия, базиран на включването и на антиоксидантни средства, имащи като ефект понижаване нивата на АКФ и стимулиране на АОЗ-система.

IX. ИЗВОДИ

1. Настоящото проучване показва значими промени и нарушения в оксидативния статус на организма на жената при ПР. Те са основание да допуснем тясната им взаимна връзка с патогенетичните механизми на ПР.
2. Около ВТР при повишени нива на прооксиданти и антиоксиданти се установява качествено нов, характерен за бременността, редокс баланс в организма. Засилването на прооксидантните процеси към ВТР налага компенсаторно активиране на защитната АОС.
3. Рисковият профил на жените, застрашени от ПР се допълва с оксидативните нарушения, повишаващи риска от ПР. При ПР е налична активна прооксидация на фона на намалени нива на основните ензимни и неензимни антиоксиданти.
4. Съчетанието на възраст на майката под 19 години и стойности на CRP в гранични стойности над 4,9 mg/l, особено в срок на бременността 32-34^{+6} г.с. е рисков фактор за преждевременно раждане.
5. Практиката и резултатите от научните изследвания налагат нови терапевтични търсения в профилактиката и лечението на заплашващото ПР. Антиоксидантната медикация се налага като неразделна част от профилактиката и лечението на ПР.
6. Необходими са проучвания с цел разработка и употребата на нови, по-широки групи антиоксиданти за профилактика и лечение на ПР, което може да бъде осъществено от интердисциплинарни колективи, работещи синхронно по проблема.

X. ПРИНОСИ

X.1. Приноси с оригинален характер

Установени са промени в **нивата на Asc• радикали** към момента на раждане:

- При РТ се повишават двукратно спрямо състоянието преди забременяване.
- При ПР и при зПР са значително по-ниски спрямо състоянието преди забременяване.

Установено е **повишение в нивата на •NO радикали** и засилен ендогенен метаболизъм:

- При РТ те са трикратно повишени в сравнение със състоянието на организма извън бременност.
- При ПР • NO радикаловото отлагане е повече от шест пъти по-високо.

Установена е **промяна в процесите на липидно перокисление**:

- При РТ то намалява спрямо небременното състоянието на организма
- При ПР то е засилено, което е белег на развит ОС.

Установена е **промяна в нивата на показателите на ендогенната ензимна антиоксидантна система – SOD, CAT, GSH, GPx**:

- При РТ те се повишават спрямо състоянието преди забременяване.
- При ПР те значимо намаляват.

Установена е **промяна в нивата на ТАС**:

- При РТ ТАС се повишава около ВТР.
- При ПР ТАС значимо намалява.

X.2. Приноси с потвърдителен характер

- За бременността е характерна физиологична левкоцитоза.
- Нивата на CRP през третия триместър на бременността могат да се повишат както при налично инфекциозно възпаление, така и под въздействието на други, оксидативни фактори.
- Развитието на бременността е придружено от оксидативни промени.
- Особено значение има пълното обхващане на бременните жени в системата за дородово наблюдение. При това е необходимо е да се използва и прилага пълният обем от диагностични (вкл. трансвагинална ултразвукова цервикометрия) и терапевтични методи и подходи, вкл. антиоксидантна профилактика на бременността и успоредна на токолитичната, антиоксидантна терапия на ПР.

X.3. Принос с практическо приложение

- Стойности на CRP в границите 4,9-7 mg/l при възраст на жената ≤19 год, въпреки неналичието на клинични и параклинични данни за вътрематочна инфекция, са сигнални за повишен риск от ПР.

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Карта за включване в проучване

Име	ЕГН	ЛК

Адрес:

Обхваната в условията на: ЖК АГ-ЛКК Стационарно лечение: ИЗ N

Бременност-поредност ПРМ: ВТР:

Желана: Да Не

Наблюдавана в ЖК: Да Не

Социално-икономически условия: Добри Лоши

Пълноценност на храненето: Пълноценно Непълноценно

Вредни навици: Алкохол Тютюнопушене Наркотици Няма

Данни за минали бременности- завършили с: Раждане на живо, доносено дете

Раждане на живо, недоносено дете

Мъртвораждане

Спонтанен аборт в г.с.

Аборт по медицински показания

Приемани лекарства през настоящата бременност: Спазмолитици и токолитици

Витамини

Антиоксиданти

Други

Придружаващи заболявания:

Усложнения на бременността:

Приложение 2. Информирано съгласие

И Н Ф О Р М И Р А Н О С Ъ Г Л А С И Е

за включване в научно проучване на тема

„Оксидативни нарушения и антиоксидантна защита при бременности, усложнени с преждевременно раждане”

Долуподписаната……
ЕГН ……, ЛК …….. изразявам съгласие за участие в научното проучване на тема „Ролята на оксидативните нарушения в патогенезата на преждевременното раждане”.

Настоящото информирано съгласие изразявам след проведена дискусия с провеждащия проучването лекар – д-р Илиана Михайлова Колева-Коркелиа.

Въз основа на своите законоустановени задължения, добрата медицинска практика и етично-моралните правила, на достъпен и разбираем език, в достатъчен обем ми бяха обяснени характера, целите и начина на провеждане на проучването, възможните рискове и ползи от него.

Давам съгласие за:

1.Вземане на венозна кръв, която ще бъде изследвана за целите на проучването в катедра „Медицинска химия и биохимия” на МФ-ТУ Стара Загора.

2.Данните за протичането на настоящата и миналите ми бременности и раждания да се използват за целите на проучването.

3.Личните ми данни да се използват само за целите на проучването.

Декларатор: Лекар:

Дата:
Стара Загора

Приложение 3. Индекс на Papiernik

Скор за преждевременно раждане (CRAP) по PAPIERNIK

На ……

Точки				
1	-Отглеждане на две и повече деца без помощ в семейството -Ниско социално-икономическо ниво	-1 кюртаж -Кратък интервал след предшестващата бременност	-Работа на открито	-Прекомерна умора -Ексцесивно надаване на тегло
2	-Недостатъчна дородова помощ -Възраст под 20 год. -Възраст над 40 год.	-2 кюртажа	-Качване на повече от 3 етажа без асансьор -Повече от 10 цигари дневно	-Наддаване на по-малко от 5 кг през бременността -Албуминурия -Хипертония САН над 130 -Хипотония САН под 80
3	-Много ниско социално-икономическо ниво -Ръст под 150 см -Тегло под 45 кг			-Намаляване на теглото спрямо предходния месец -Ниско стояща глава на плода -Сформиран долен утеринен сегмент -Седалищно предлежание на плода в м.л.VII
4	-Възраст под 18 години			-Пиелонефрит -Маточни кръвотечения през втория триместър -Скъсена маточна шийка -Тазширение на СС -Маточни контракции
5		-Малформации на матката -1 късен аборт -1 преждевременно раждане		-Многоплодна бременност -Плацента превиа -Хидрамнион
Всичко				

Скор <5 – няма риск
Скор 5-10 – нисък риск
Скор >10 – висок риск
Коефициент на риска от преждевременно раждане по Papiernik

Дата……. **Д-р Колева……**

XII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Koleva, I. M., Karamalakova, Y. D., Nikolova, G. D., & Gadjeva, V. G. (2019). Nitric oxide radical production increase during normal pregnancy and pregnancy complicated by preterm labor in a Bulgarian women population. *Bulg Chem Communic*, 51(A): 41 – 46, (**$IF_{5\text{-}Year}$ = 0.322, SCOPUS, Q4**)

2. Koleva, I. M., (2021). C-reactive protein levels - indicator for prognosis of spontaneous preterm birth in bulgarian woman. *CBU INTERNATIONAL CONFERENCE ON INNOVATIONS IN SCIENCE AND EDUCATION, CBU Research Institute s.r.o. 27/4 11000, Praha - Staré Město Czech Republic, N=2103010005/6 (**WbS indexation- article full text**)*

3.Koleva, I. M., (2021). Maternal leukocytosis as diagnostic markers in spontaneously declared preterm birth. *CBU INTERNATIONAL CONFERENCE ON INNOVATIONS IN SCIENCE AND EDUCATION, CBU Research Institute s.r.o. 27/4 11000, Praha - Staré Město Czech Republic*, N=*2103010005 (**WbS indexation- article full text**)*

4.Колева- Коркелиа И., Ангелова М., 2021. Оксидативният стрес-патофизиологичен механизъм на усложненията на бременността. Акушерство и гинекология, 3/2021

XIII. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Changes in plasmatic lipid peroxidation metabolism during normal pregnancy. I. M. Koleva, Y. D. Karamalakova, G. D. Nikolova, V.G. Gadjeva; *3rd International conference on BIO- ANTIOXIDANTS (BIO-ANTIOXIDANTS 2019)*, 17-21 September, Nesebar, Bulgaria, pp. 51, **A-YPP2, poster**

2. Ex vivo oxidative DNA damage, protein and lipid peroxidation biomarkers in pregnancy complicated by preterm birth. I. Koleva, Y. Karamalakova, G.Nikolova, M. Angelova, V. Gadjeva; *3rd International conference on BIO- ANTIOXIDANTS (BIO-ANTIOXIDANTS 2019)*, 17-21 September, Nesebar, Bulgaria, pp. 47, **A-YPP1, poster**

XIV. ПРОЕКТИ КЪМ ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ СТАРА ЗАГОРА

1. **2020**г - **Участник в проект** 1/ 2020 „ Оксидативни нарушения и антиоксидантна защита при нормална бременност и бременност, усложнена с преждевременно раждане“ с ръководител Доц. Мария Ангелова, дм

Summary: The preterm birth (PTB) is a global problem of clinical and social importance. It is divided into two main types: idiopathic, spontaneous PTB and elective, artificially induced PTB.

The etiological factors of the PTB are numerous and difficult to classify. They are appropriately divided into: ***factors, conditions and diseases preceding pregnancy*** and ***factors, conditions and complications of current pregnancy***, that combination may lead to the onset of preterm birth.

The pathogenesis of the PTB is not fully clarified. For now, the only mechanism that has been shown to lead to PTB is inflammation - infectious inflammation, subclinical intrauterine infection or deployed chorioamnionitis. Infectious inflammation has been shown to interfere with the PTB, but perhaps there are other mechanisms of tissue damage that can cause it.

The development of pregnancy in a woman is inextricably associated with free-radical oxidation and stress oxidative (SO). Studies on the attitude of free-radical processes in the pregnant woman's organism are launched – from both a physiological and pathophysiological point of view. This dissertation presents the results of selected, according to established criteria, groups of patients from the SO indicator studies and changes in the antioxidant system in the woman's body – at birth of a term, in preterm birth and in the case of threatening premature birth. Three SO indicators have been identified – lipid oxidation products (MDA), proteins (PCC) and nucleic acids (8-OHdG). The antioxidant status has been determined relative to intracellular total glutathione levels (GSH), to three endogenous enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx1) and total antioxidant capacity (TAC).

Has been determined ascorbaths Asc• and •NO radicals, as well as ROS products in blood plasma, which show the current oxidative status / disorders - real-time indicators. All indicators were compared with physically healthy controls. In mothers with PTB and pregnant women with threatening PTB, peroxidation processes were strengthened against the background of delayed antioxidation – characteristics of the SO. There have been increased ros levels, demonstrated by increased levels of lipid peroxide endpoints (MDA), proteins (PCC) and nucleic acids (8-OHdG). At the same time, a decrease in total antioxidant capacity levels was recorded (TAC), total glutathione (GSH) and endogens antioxidants SOD, CAT and GPx1 in preterm birth. Levels of Asc• radicals were significantly lower relative to the pre-pregnancy condition. The increase in •NO levels, compared to the control group of non-pregnant women, was sixfold. In the PTB, due to depletion of the antioxidant protective system, the phase of discontinuation of lipid peroxide does not occur or detect cellular delay. At the birth of a term, prooxidant processes are intensified to the probable term of birth, which requires compensatory activation of the antioxidant protection. We take into account the restoration and preservation of redox/oxidative balance in the woman's body in quality new, characteristic of pregnancy, pro- and antioxidant levels. Asc• radicals in the blood serum are increasing. The increase in •NO levels compared to the control group of non-pregnant women was threefold. The levels of ROS and RNS that are necessary to maintain the normal cellular functions of the intrauteronial developing new organism are increased. At the same time, the levels of endogenous antioxidants are rising, in support of which is the increased TAC to the term of birth. Thus, with increased levels of prooxidants and antioxidants, a qualitatively new,

characteristic of pregnancy, *redox balance* in the body of the pregnant woman is established.

The changes in the test indicators are grounds to assume with a high probability that oxidative disorders in the body play an essential role in the pathogenesis of the PTB. Thus, oxidative stress and oxidative disorders in the body of the pregnant woman are added to the inflammation as the main pathogenetic factor. The triple interconnection inflammation – oxidative stress and oxidative disorders – premature birth is formed.

In threatening PTB both enhanced oxidative processes and understated antioxidant protection are available. This requires a parallel therapeutic response to both groups of processes with tocolytics and antioxidants. Currently used tocolytics do not have a proven antioxidant effect. The addition of antioxidants – vitamins and micronutrients to the medication of pregnant women can lead to a decrease in the frequency of some of the complications of pregnancy – PTB, preeclampsia, IUGR. Alpha-lipoic acid (ALA) has powerful anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulating properties and is safe for the human body and in high doses. In obstetrics, it is part of the treatment of subchorial hematomas in threatening abortion in the first trimester of pregnancy. It is possible to include ALA in the therapeutic approach of the PTB.