



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

Катедра Акушерство и Гинекология

**ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА ПЛАЦЕНТАРНИ ФАКТОРИ И
ДОПЛЕР НА МАТОЧНИ АРТЕРИИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА
ПРЕЕКЛАМПСИЯ**

Д-р Красимира Ивайлова Чалова Златанова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност

Акушерство и гинекология

Пловдив

2020

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

Катедра Акушерство и Гинекология

(Ръководител: проф. д-р Екатерина Учикова, дм)

**ПРЕДИКТИВНА СТОЙНОСТ НА ПЛАЦЕНТАРНИ ФАКТОРИ И
ДОПЛЕР НА МАТОЧНИ АРТЕРИИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА
ПРЕЕКЛАМПСИЯ**

Д-р Красимира Ивайлова Чалова Златанова

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност

Акушерство и гинекология

Научен ръководител:

Проф. д-р Благовест Пехливанов, дмн

Рецензенти:

Пловдив

2020

Дисертационният труд съдържа 139 стандартни печатни страници, 15 таблици, 18 фигури, 5 приложения. Библиографията включва 134 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на . .2020 г. от : часа в Аудиторен комплекс при Медицински университет – Пловдив, бул. Васил Априлов №15А.

Съдържание

Въведение.....	6
Цел и задачи.....	9
Материал.....	10
Методи.....	12
Собствени резултати.....	15
Обсъждане.....	26
Изводи.....	38
Приноси на дисертационния труд.....	39
Публикации и участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд.....	40

Съкращения

ПЕ - прееклампсия

PI-UA - пулсативен индекс при Доплер на маточните артерии

ИУРП - интраутеринна ретардация на плода

IUGR (intrauterine growth restriction) - интраутеринна ретардация на плода

sFlt-1 - серумна fms-подобна тирозин киназа-1

sEndoglin - разтворим Endoglin

PAPP-A - асоцииран с бременността плацентарен протеин А

PP-13 - плацентарен протеин 13

ANP - атриален натриуретичен пептид

VEGF - васкуларен ендотелен растежен фактор

ELISA - ензимно свързан имуносорбентен анализ

г.с. - гестационна седмица

АН - артериално налягане

САН - систолно артериално налягане

ДАН - диастолно артериално налягане

NT - нухална транслуценция

CRL - кранио-рострална дължина на плода

FHR - сърдечна честота на плода

ДИК синдром - синдром на дисеминираната интравазална коагулопатия

HELLP синдром – хемолиза, повишени чернодробни ензими, тромбоцитопения синдром

OICC-orifitium internum canalis cervicalis

TI (thermal index) - термален индекс

MI (mechanical index) - механичен индекс

AFP (alpha fetoprotein) - алфа фетопротеин

TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) - туморен некротичен фактор α

CRP- С-реактивен протеин

APGAR score – АПГАР скор

SGA (small for gestational age) – малки за гестационната възраст новородени

Въведение

Прееклампсията е мултисистемно комплексно заболяване, което усложнява 2% до 8% от всички бременности в световен мащаб и е причина за значителна заболеваемост и смъртност както за майката, така и за плода. Според СЗО хипертензивните състояния, свързани с бременността, са причина за майчина смъртност в 16% от случаите в индустриалните страни и в до 25% в развиващите се страни. Прееклампсията е специфично за бременността заболяване, чиято изява е след 20 гестационна седмица. Патогномонични симптоми са хипертония (над 140 mmHg систолно артериално налягане и/или над 90 mmHg диастолно артериално налягане) и протеинурия над 300mg/24h на майката след 20 г.с. Според първата изява на симптомите ПЕ се разделя на ранно проявила се и късно проявила се. Независимо късната изява на симптомите е известно от мултикомплексната патогенеза на ПЕ, че патологичните изменения в плацентата и организма на майката в последствие, възникват много преди първите симптоми. Патологичните промени в плацентарното ложе водят до редуция на плацентарния ток, като резултат след различен период от време може да се развие ретардация, олигохидрамнион, фетално страдание и дори вътреутробна смърт. При ПЕ плодът винаги бива засегнат в определен момент и често като резултат се налага ятрогенно преждевременно раждане. Независимо от богатите познания до момента за патогенетичните механизми при разгръщане на ПЕ и нейните усложнения, все още не е известно етиологично лечение, а само симптоматична терапия. Тя единствено цели стабилизиране състоянието на майката и удължаване времето на вътреутробно развитие на плода, тъй като единственото дефинитивно лечение на прееклампсията е родоразрешението и по-точно раждането на плацентата.

Неизвестната етиология и липсата на успешно лечение на ПЕ насочва усилията на клиницисти и научни изследователи последните няколко десетилетия в посока предикция - ранно откриване сред бременните жени на тези, които имат повишен риск от развитие на ПЕ. На тях се прилага профилактика с Аспирин още от началото на втори триместър и/или по-често и по-осторожно наблюдение на бременността с цел ранна диагноза, започване на симптоматично лечение и отлагане максимално близо до термин родоразрешението.

Множестовото проучвания до момента върху предиктивни фактори за ПЕ не са успяват да предложат единен и общоприет скринингов модел. Методите подложени на оценка за предикция на ПЕ са:

- анамнестичени
- инструментални (измерване средно артериално налягане; Доплер- на маточните артерии, на артерия офталмика; васкуларизация на плацентата).
- серумни маркери (плацентарни протеини и деривати, инфламаторни, имунни, васкуларни растежни протеини, хормонални, свободна фетална ДНК-cell free DNA)

В по-ранен етап на изследователските проучвания се е наблягало на изследване на бременните около и след 20 г.с., което към днешна дата знаем, че е твърде късен етап за Аспиринова профилактика. По-съвременните проучвания залагат на изследване на бременните и оценка на риска от ПЕ още в края на първи, началото на втори триместър. Те обаче дават ниска предиктивна стойност при използването на самостоятелен маркер и насочват вниманието към изработването на комбиниран скрининг, обединяващ множество маркери за по-висока предиктивност и надеждност. Това от своя страна е много скъпо, трудоемко за изпълнение и за интегриране в ежедневната практика.

Търсенето на надежден начин за предсказване на развитието на ПЕ е с особено голям научен и приложен интерес. Преекламписята е хетерогенно заболяване, резултат от неадекватна трофобластна инвазия и последващ оксидативен стрес, които започват дискретното си развитие още в първия триместър на бременността, много преди появата на симптомите на ПЕ. Неадекватната плацентация има за резултат промяна на концентрациите в майчиния серум на редица плацентарни фактори (Corin, PP13), част от които са модулатори на ангиогенезата (sEndoglin, sFlt-1). Наблюдава се и повишаване на пулсативния индекс при доплерова велосиметрия на маточните артерии (PI-UA).

Малко вероятно е изследването на един самостоятелен биомаркер да е достатъчно при изчисляване на риска за развитие на прееклампися. Анализирайки данните от литературата, като най-обещаващ модел за предсказване на риска от развитие на прееклампися е комбинираният

модел, който едновременно отчита майчини фактори, биохимични маркери и Доплерова велосиметрия.

Анализирайки данните от литературата и липсата на проучвания у нас относно ранното предсказване на развитието на ПЕ, в този научен труд сме направили опит с проведените изследвания да добавим малко повече яснота по тази така актуална за акушеро-гинекологичната практика тема.

Цел и задачи

Анализирайки данните от литературата и липсата на проучвания у нас относно предсказването на развитието на ПЕ си поставихме следната цел:

ЦЕЛ на проучването

Да се изследва възможността за предсказване развитието на ПЕ чрез комбинация от плацентарни фактори и ехографски промени.

ЗАДАЧИ на проучването

За изпълнението на поставената цел си поставихме следните задачи:

Задача 1.: Да се изследват концентрациите на Corin, s-Flt-1 , sEndoglin и PP-13 в серума на бременните жени през първата половина на бременността (двукратно - в 11-13⁺⁶ г.с. и в 20-22 г.с.).

Задача 2.: Да се направи анализи на динамиката в концентрациите на ангиогенни и неангиогенни биомаркери в първата половина на бременността.

Задача 3.: Да се измери чрез Доплер на маточните артерии усредненият PI от лява и дясна мат. артерия на бременните жени в първата половина на бременността (двукратно - в 11-13⁺⁶ г.с. и в 20-22 г.с.).

Задача 4.: Да се определи предиктивната стойност на комбинацията от биомаркери и велосиметрия по отношение бъдещото развитие на ПЕ.

Задача 5.: Да се определи има ли корелация между промените в изследваните показатели и интраутеринното изоставане в развитието на плода (ИУРП).

Това проспективно, наблюдателно проучването се проведе за срок от 3 години (от 2012 до 2015 година) на територията на Клиниката по Акушерство и гинекология към УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД. В това проспективно наблюдателно проучване бяха включени 58 бременни българки, явяващи се доброволно за провеждане на комбиниран скрининг за анеуплоидии в 11-13⁺⁶г.с.

За целите на настоящото проучване след щателна анамнеза на всяка пациентка, която отговаряше на включващите критерии, бяха извършени както следва:

- Доплер на двете маточни артерии с автоматично измерване на PI-UA в 11-13⁺⁶г.с. и в 20-22г.с. (на всяка бременна)
- вземане на серумна проба в 11-13⁺⁶г.с. и в 20-22г.с. и замразяването ѝ до края на проучването до -80°C (на всяка бременна включена в *Експерименталната група* и в *Контролна група I*)

Критериите за включване на пациентките в проучването:

- ✓ бременност в срок 11-13⁺⁶г.с.
- ✓ възраст над 18 години и под 40 години
- ✓ едноплодна бременност
- ✓ нормално АН в момента на първата ехография и пробовземане
- ✓ липса на структурни аномалии
- ✓ нисък комбиниран риск (< от 1 на 1000) за анеуплоидии при провеждане на ранния комбиниран скрининг в 11-13⁺⁶г.с.
- ✓ липса на анамнеза за предходна артериална хипертония или прееклампсия при предходна бременност
- ✓ ВМІ между 20 и 30

Разпределяне на изследваните пациентки в контролна или експериментална група беше направено според PI-UA при Доплеровото изследване в 11-13⁺⁶г.с., както следва:

- ✓ **Контролна група 1** - с нормален Доплер на маточните артерии (нормален усреднен PI-UA) , 20 бременни.
- ✓ **Контролна група 2** - с нормален Доплер на маточните артерии (нормален усреднен PI-UA), 20 бременни.
- ✓ **Експериментална група** – с абнормен Доплер на маточните артерии (повишен усреднен PI-UA над 2), 18 бременни.

Анамнестични данни

При подбора на пациентките за включване в проучването беше използвана анкетна карта с цел да се изследват само бременни без известни рискови фактори за развитие на ПЕ (предходна ПЕ, АХ, ЗД, бъбречни заболявания или затлъстяване), с едноплодна бременност, явили се в срок 11-13⁺⁶г.с., с нормални стойности на артериалното налягане от бяла етническа раса, българско гражданство.

Ултразвуково изследване

Метод на физикално изследване, част от проучването беше УЗ изследване - Доплерова велосиметрия на маточните артерии. В настоящото проучване бяха спазени всички общоприети правила за измерване на Доплер на маточните артерии чрез трансабдоминална ехография. Измерванията бяха придобити от всяка бременна двукратно през бременността- веднъж в 11-13⁺⁶г.с. и втори път в 20-22г.с. Най-надеждните индекси при Доплерово измерване на кръвотока на маточните артерии са индексът на резистентност-resistance index (RI) и пулсативният индекс-pulsatility index (PI-UA). Патологични стойности се приемат над 1.6 за PI-UA през втория триместър. В настоящото проучване измервахме двустранно PI-UA на всяка жена двукратно през бременността и използвахме по-висока cut off стойности за патологичен PI-UA (над 2) като критерии за включване на бременните в *Експерименталната група*, а тези с PI от двете маточни артерии под 2 в *Контролната група 1* и *Контролната група 2*.

Серумни плацентарни маркери

Сред изследваните десетки биомаркери в серума на бременната жена, които показват промяна в концентрациите си седмици или месеци преди тя да развие ПЕ, за целите на настоящото проучване избрахме 4 протеина:

- **Corin** – корин

- **sFlt-1** - серумна fms-подобна тирозин киназа-1
- **sEndoglin** - разтворим Endoglin (CD105)
- **PP-13** – плацентарен протеин 13

В опит да обхванем комплексната патогенеза на ПЕ избрахме за целта на проучването протеини, участващи в различни патогенетични звена- Корин като новата серинова протеза, конвертираща proANP в активен ANP, ангиогенни фактори (sFlt-1, sEndoglin) и плацентарен протеин (PP-13).

Серумните нива на Corin, s-Flt-1, sEndoglin, PP-13 бяха изследвани двукратно по време на бременността на всяка жена включена в Експерименталната група и в Контролна група 1 (веднъж в 11-13⁺⁶ г.с и втори път в 20-22 г.с.) чрез ELISA (ензимно свързан имуносорбентен анализ) в Катедра Микробиология и имунология към Фармацевтичен факултет на МУ Пловдив.

Закупуването на китове за s-Flt-1, sEndoglin, PP-13 и Corin бе финансирано от Вътреуниверситетски проект № 12 / 2014 към МУ Пловдив.

Статистически методи

Систематизирането, обработката и анализа на първичните данни под формата на количествени и качествени променливи е реализирано със статистическия пакет на софтуера за социални науки IBM SPSS Statistics v. 22. За всички тестове е възприето ниво на значимост $p < 0.05$. Бяха използвани следните статистически методи:

1. Дескриптивен анализ за описание на структурата на изследваните променливи:

- вариационен анализ на количествени променливи
- еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA за сравнени на средна стойност (\bar{x}) \pm стандартно отклонение (SD) между три групи
- честотен анализ на качествени променливи – абсолютни и относителни честоти. Представени съответно като обикновени числови стойности (n) и като относителен дял (%) \pm средна грешка (Sp).

2. Проверка на статистически хипотези:

- параметричен анализ:

- за доказване разлика между две независими или зависими променливи Т-тест на Стюдънт;
- ANOVA с повторни измервания с корекция на Greenhouse-Geisser и post hoc тестове, използващи корекция на Bonferroni)

- непараметричен анализ:

- Хи-квадрат (χ^2) Критерий на Пирсън;
- Коефициент (r_{xy}) на Пирсън за линейна корелация;
- Регресионен анализ

Собствени резултати

Включени в проучването бяха общо 58 изследвани субекта (бременни пациентки) разпределени както следва:

- **Контролна група 1** - с нормален Доплер на маточните артерии (нормален усреднен PI-UA), 20 бременни.
- **Контролна група 2** - с нормален Доплер на маточните артерии (нормален усреднен PI-UA), 20 бременни.
- **Експериментална група** – с абнормен Доплер на маточните артерии (повишен усреднен PI-UA над 2), 18 бременни.

Не бяха установени статистически значими различия в параметрите използвани за подбор на пациентките в нито една от изследваните групи, което ги прави съпоставими по изследваните параметри. Клиничните характеристики и разпределението им в групите са представени на *Табл.1*.

Три от пациентките в Експерименталната група развиха ПЕ в средна гестационна възраст при поставяне на диагнозата 35 г.с. (една в 37^{ма}, втора в 32^{ра} и трета в 35^{та} г.с.), а три други пациентки родиха плодове с ретардация (чиста ИУРП без ПЕ), т.е. фетално тегло при раждане под 10^{ти} перцентил за гестационната възраст. Нито една пациентка не разви ПЕ, усложнена с ИУРП. При диагностициране на ПЕ средната стойност на артериалното им налягане беше 145.00 ± 2.24 за систолно и 95.00 ± 2.24 за диастолно. При съпоставяне по гестационна възраст при раждането само между Експериментална и Контролна група 1 чрез t-Тест се установи сигнификантно по-ранна гестационна възраст на родоразрешение в Експерименталната спрямо Контролна група 1 ($t=2.166$, $p=0.037$). Този факт може да се обясни с ятрогенния прематуритет при развитие на ПЕ, особено при ранната ПЕ, тежката ПЕ и усложнената форма на ПЕ.

Проследявайки ги до края на бременността, нито една от жените в Контролна група 1 и Контролна група 2 не разви ПЕ, гестационна хипертония или интраутеринна ретардация на плода.

Сигнификантна разлика между сравнените три групи показаха стойностите на систолното АН при включване в проучването ($p=0.041$), на APGAR скората на 1' ($p=0.000$) и APGAR скората на 5' ($p=0.039$).

Показател	Експериментална група (N=18)		Контролна група 1 (N=20)		Контролна група 2 (N=20)		p	f
	брой	ср.ар. ± SE	брой	ср.ар. ± SE	брой	ср.ар. ± SE		
Възраст	18	29.61±1.37	20	31.30±1.01	20	30.26±1.31	NS	2.354
Паритет	18	1.67±0.29	20	2.35±0.31	20	2.21±0.26	NS	1.529
BMI	18	22.62±0.91	20	23.26±0.82	20	22.57±0.60	NS	0.217
Систолично АН	18	103.89±2.27	20	111.25±1.74	20	107.89±2.00	0.041	3.392
Диастолично АН	18	71.67±1.72	20	73.75±1.70	20	72.37±1.89	NS	0.362
CRL в 13 г.с. (см.)	18	5.73±0.29	20	6.47±0.19	20	6.50±0.27	NS	2.936
FHR	18	161.17±2.19	20	159.30±1.50	20	160.26±2.40	NS	0.212
NT (мм)	18	1.09±0.10	20	1.16±0.08	20	1.18±0.10	NS	0.275
Развитие на ПЕ	3	0.18±0.10	20	-	0	-	0.031	3.695
Поява на ПЕ (г.с.)	3	35.00±1.53	-	-	-	-	-	
ПЕ (Сист. АН)*	3	145.00±2.24	-	-	-	-	-	
ПЕ (Диаст. АН)**	3	95.00±2.24	-	-	-	-	-	
Раждане (г.с.)	18	37.86±0.49	20	38.80±0.22	20	37.89±0.37	NS	2.209
APGAR скор 1 ^с	18	8.67±0.14	20	8.50±0.12	20	7.37±0.23	0.000	17.275
APGAR скор 5 ^с	18	9.67±0.28	20	10.00±0.00	20	9.37±0.14	0.039	3.457
Тегло при раждане (кг.)	18	3089.44±142.86	20	3179.47±93.27	20	3081.58±113.03	NS	0.304
Дължина на плода (см.)	18	49.00±0.72	20	49.85±0.47	20	49.37±0.38	NS	0.562
IUGR (ИУРП)	3	0.17±0.09	0	-	0	-	-	1.712

Таблица 1. Дескриптивен анализ на изследваните групи- Експериментална, Контролна група 1 и Контролна група 2.

* ПЕ (Сист. АН)= систолно артериално налягане във времето на поява на ПЕ;

**ПЕ (Диаст. АН)=диастолично артериално налягане във времето на поява на ПЕ;

След прилагане на Post Hoc Tests се установи, че статистическа значима разлика в систолното АН, измерено при включване на жените в проучването в 13 г.с. се установява при сравнение между Експерименталната група (103.89±2.27) и Контролна група 1 (111.25±1.74) с $p=0.036$. Независимо от тази статистическа разлика и в двете групи пациентките бяха с нормално артериално налягане.

Първата задача, която си поставихме, бе да измерим средните концентрации в майчиния серум на четири протеина, всеки един потенциално ангажиран по различен начин в патофизиологичния път за развитие на ПЕ – Corin, sFlt-1, sEndoglin и PP13.

Статистически значима разлика се установи единствено в концентрациите на Corin, сравнено между 13 г.с. и 20 г.с. в Експерименталната група ($p=0.005$) и между 13 г.с. и 20 г.с. в Контролна група 1 ($p=0.004$). Статистически значима разлика се отчете и в стойностите на mean PI-UA в 13 г.с. сравнен между Експерименталната и Контролна група 1 ($p=0.005$), което може да се обясни с факта, че включващ критерии на пациентките в Експерименталната група бе именно повишеният усреднен PI от двете маточни артерии над 2. Резултатите, които получихме са представени в Таблица 2.

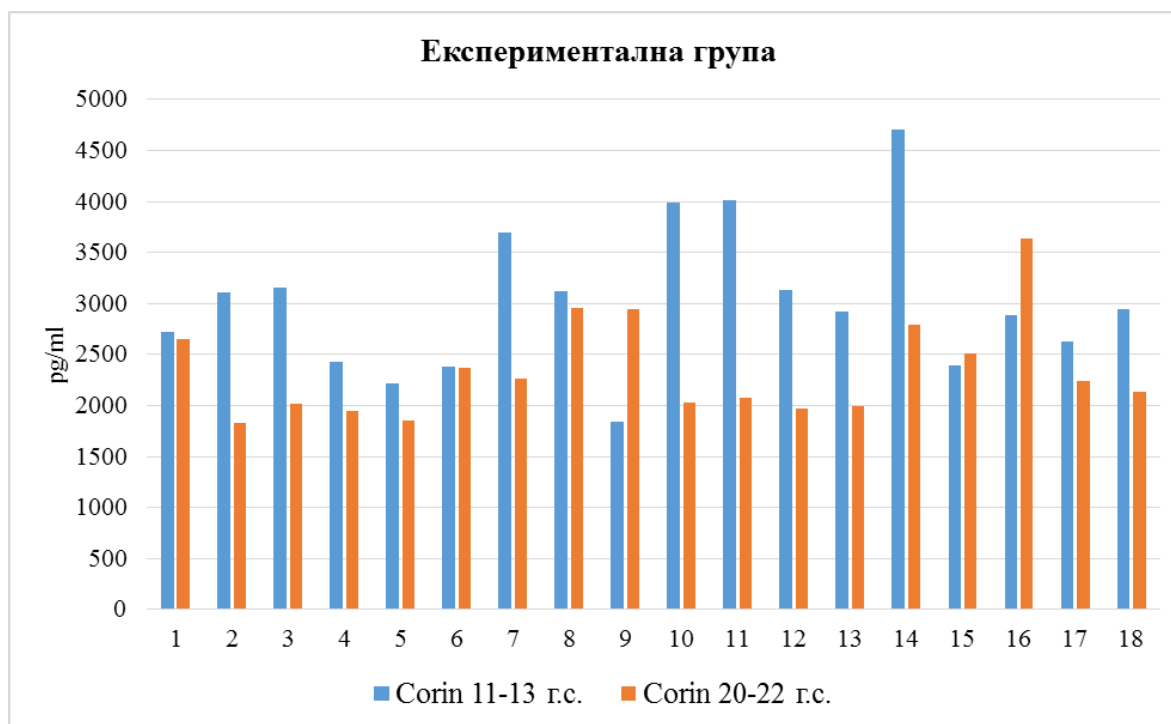
	<i>Експериментална група (N=18)</i>		<i>Контролна група 1 (N=20)</i>	
	<i>11-13⁺⁶г.с.</i>	<i>20-22 г.с.</i>	<i>11-13⁺⁶г.с.</i>	<i>20-22 г.с.</i>
Corin (pg/ml)	3016.87±168.66*	2344.88±114.12*	2656.14±133.39**	2289.53±68.98**
sFlt1 (ng/ml)	1.99 ± 0.31	1.74 ± 0.14	2.42 ± 0.37	1.78 ± 0.14
sEND (pg/ml)	6737.83 ±248.82	6593.06 ± 291.10	7140.55±1050.88	6829.90 ± 646.97
PP13 (pg/ml)	112.10 ± 17.01	93.81 ± 11.14	120.27 ± 16.60	87.67 ± 10.19
Mean PI-UA	2.13±0.08***	1.12±0.07	1.27±0.08***	0.97±0.06

Таблица 2. Средни концентрации на Corin, sFlt, sEndoglin, PP13 и mean PI-UA (среден PI от лява и дясна маточни артерии) в двете изследвани групи. Статистически значими разлики: * ($p=0.005$); **($p=0.004$); *** ($p=0.000$);

Втората задача, която си поставихме, беше да анализираме динамиката между 11-13⁺⁶ г.с. и 20-22 г.с. на изчислените концентрации на Corin, sFlt-1, sEndoglin и PP13. Не открихме статистически значима разлика в средните концентрации на sEndoglin, sFlt-1 и PP13 между 11-13⁺⁶г.с. и 20-22г.с. сравнено в Контролна група 1 и Експерименталната група. Статистически значима разлика установихме единствено в средните концентрации на Corin между 11-13⁺⁶г.с. и 20-22г.с. и в двете изследвани групи:

- Експериментална група ($t=3.22$; $p=0.005$)
- Контролна група 1 ($t=3.27$; $p=0.004$).

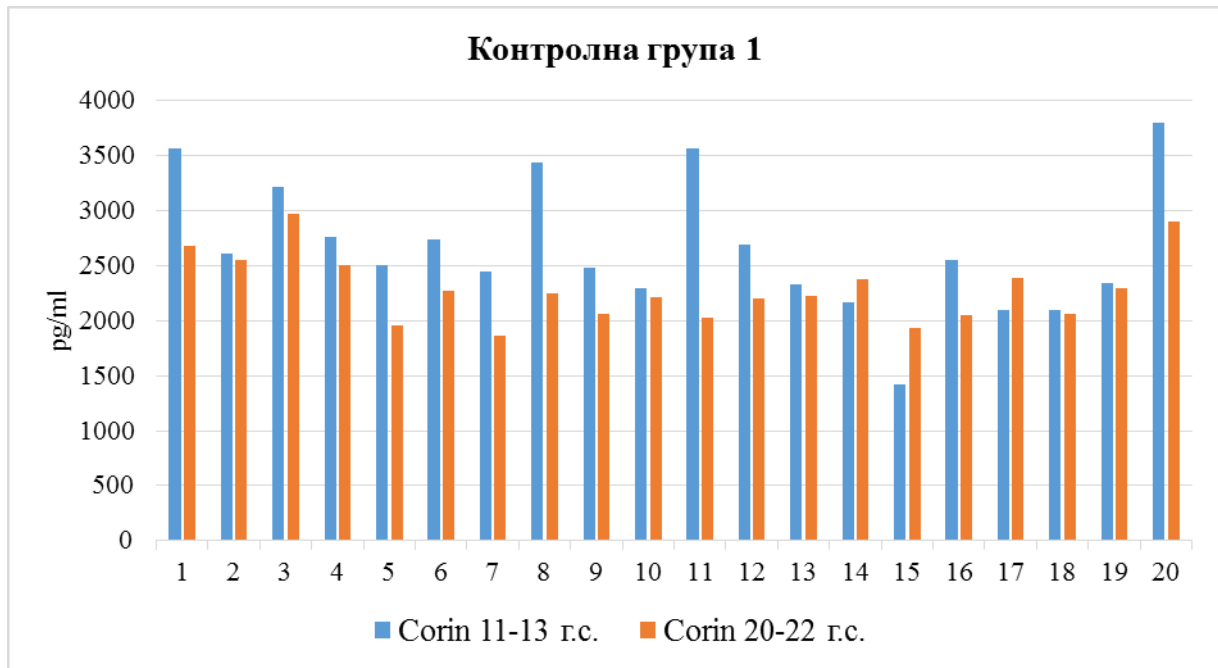
Графичен израз на получените резултати за концентрациите на Corin са представени на *Фиг.1* за Експерименталната група и на *Фиг.2* за Контролна група 1.



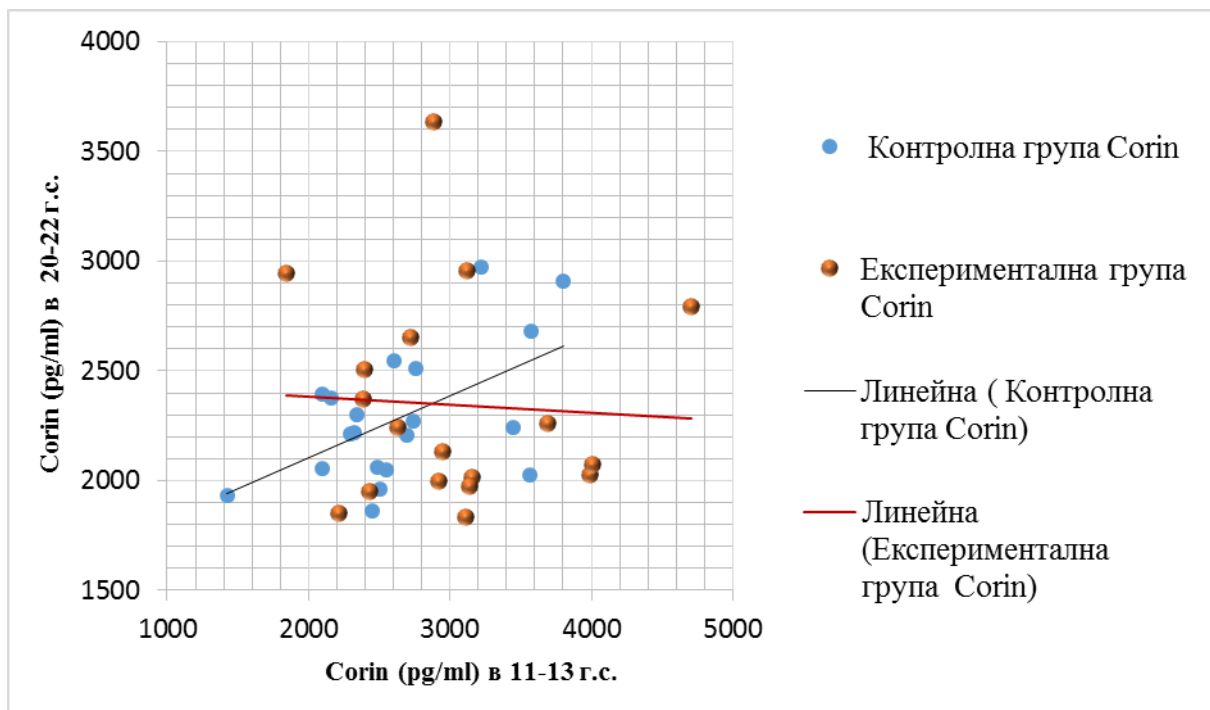
Фигура.1. Концентрации на Corin (pg/ml) в Експерименталната група ($t=3.22$; $p=0.005$).

Освен статистически значима разлика в концентрациите на Corin открихме и в двете групи тенденция за понижаване нивата на Corin с напредване на бременността, по-значителна в Експерименталната група. Нагледно по-изразената тенденция за намаляване на нивата на Corin с

напредване на бременността в Експерименталната спрямо Контролна група 1 е представено на Фиг.3 и Фиг.4.



Фигура.2. Концентрации на Corin (pg/ml) в Контролна група 1 ($t=3.27$; $p=0.004$).



Фигура.3. Тенденция за спад в концентрацията на Corin (pg/ml) с напредване на бременността и графично представяне на по-значителното спадане в Експерименталната група спрямо Контролна група 1.

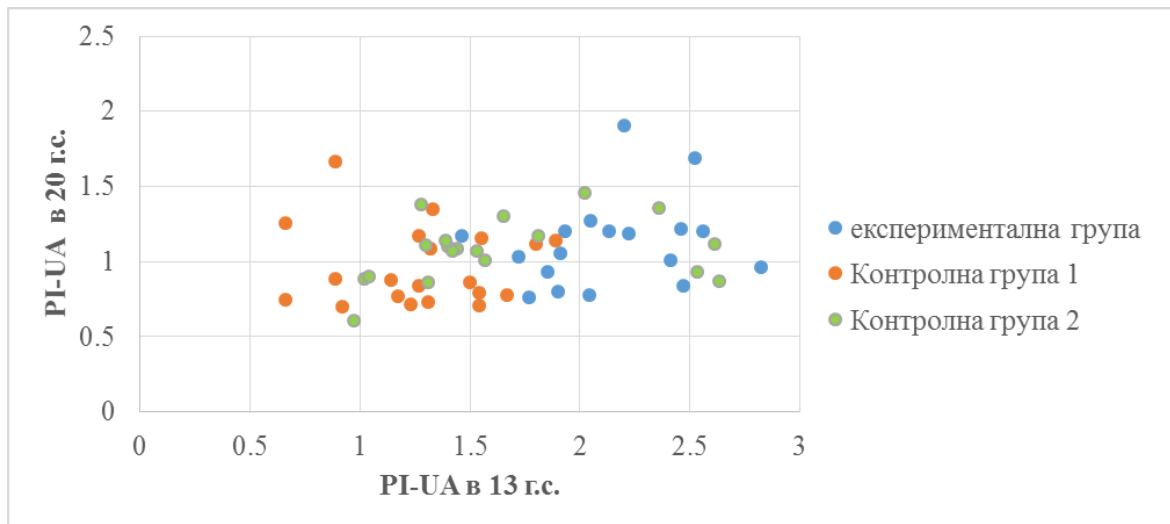
Не открихме статистически значима разлика в средните концентрации на sEndoglin, sFlt-1 и PP-13 между 11-13⁺⁶г.с. и 20-22г.с. сравнено в Контролна група 1 и Експерименталната група. Прави впечатление, че при всяка от изследваните бременни и в двете групи се отчита покачване в концентрациите на sFlt-1 с напредване на бременността. Отчете се и покачването в концентрациите на специфичния плацентарен протеин PP-13 с напредване на бременността във всеки от изследваните случаи. Това може да се обясни с повишаващия се обем на плацентарната тъкан.

Нашата трета задача бе измерването на усреднения от лява и дясна маточна артерия PI (mean PI-UA) чрез Доплерова ехография в 11-13⁺⁶г.с. и повторно в 20-22г.с. на всички включени в проучването бременни (и в трите изследвани групи). Искане да установим ако има разлика между изследваните групи и да потвърдим динамиката в PI-UA с напредване на бременността във всяка от групите. И в трите изследвани групи доказахме статистически значимо намаляване на mean PI-UA с напредване на бременността (Табл.3):

	Експериментална група	Контролна Група 1	Контролна група 2	f	p
Mean PI-UA 11-13 г.с.	2.13±0.08	1.27±0.08	1.64±0.12	19.64	0.000
Mean PI-UA 20-22 г.с.	1.12±0.07	0.97±0.06	1.07±0.05	1.75	0.183

Таблица.3. Усреднен PI на лява и дясна маточна артерия (PI-UA), измерен в 13г.с. и в 20 г.с.(средна стойност ± стандартна грешка).

Тенденцията за понижаване на PI-UA с напредване на бременността съпоставено между трите изследвани групи е представено на Фиг.4. Ясно се подчертават по-високите начални стойности на PI-UA при Експерименталната група и по-стръмното снижаване на PI-UA с напредването на бременността в Експерименталната, за разлика от двете контролни групи. Нашите данни подкрепят общоприетото мнение, че PI намалява с напредване на гестационната възраст в права пропорционалност с нарастващия утероплацентарен кръвоток.



Фигура.4. Понижаване на PI-UA с напредване на бременността, съпоставено между Експерименталната, Контролна група 1 и Контролна група 2.

Четвъртата задача, която си поставихме беше да се определи предиктивната стойност по отношение бъдещото развитие на ПЕ, както поотделно на биомаркери и велосиметрия, така и на комбинацията от тях. За целта използвахме анализ ANOVA с повторни измервания и двустъпкова (2 блока) йерархична множествена регресия.

ANOVA с повторни измервания с корекция на Greenhouse-Geisser показва, че средната концентрация на Corin (pg/ml), измерена при пациентките в Контролна група 1 се различава статистически значимо между времевите точки и се понижава от 11-13⁺⁶г.с. до 20-22 седмица. ANOVA с повторни измервания с корекция на Greenhouse-Geisser показва, че средните концентрация на PP-13, sFlt-1 и sEndoglin, измерена при пациентките в Контролна група 1 не се различават статистически значимо между времевите точки. ANOVA с повторни измервания с корекция на Greenhouse-Geisser показва, че средната концентрация на Corin (pg/ml), измерена при пациентките в Експерименталната група се различава статистически значимо между времевите точки (11-13⁺⁶г.с. и 20-22 г.с.) и се понижава от 11-13⁺⁶г.с. до 20-22 г.с. ANOVA с повторни измервания с корекция на Greenhouse-Geisser показва, че средните концентрация на PP-13, sFlt-1 и sEndoglin, измерена при пациентките в Експерименталната група не се различават статистически значимо между времевите точки (11-13⁺⁶г.с. и 20-22 г.с.).

В опит да отговорим на последната задача, подложихме бременните в Експерименталната група на допълнително разделение:

- подгрупа 1 : бременни, развили ПЕ (n=3),
- подгрупа 2 : бременни, родили плодове с ретардация- ИУРП (n=3),
- подгрупа 3 : останалите бременни в групата (n=12).

Разлика се установи в средните концентрации на Corin (11-13⁺⁶г.с.) между жените развили ПЕ и подгрупа 3 (бременни без ПЕ, бременни без ИУРП) – $t=2.332$, $p=0.046$. Нивата на Corin бяха сигнификантно по-ниски в подгрупа 1 (бременни развили ПЕ) – 2590.62 ± 307.22 срещу 3235.18 ± 734.07 .

ANOVA с повторни измервания и Post hoc тестове приложени за усреднения PI-UA в Контролна група 1 показаха, че средната стойност на PI-UA се понижава статистически значимо от 11-13⁺⁶г.с. до 20-22г.с. ($p=0.007$). Същото се доказва и за mean PI-UA в Експерименталната група ($p=0.000$).

В опит да установим кои от изследване серумни показатели оказват влияние или корелират с усреднения пулсативен индекс на маточните артерии (mean PI-UA) като маркер за степента на плацентация и риск от ПЕ и ИУРП, използвахме двустъпкова йерархична множествена регресия. На първи етап извършихме двустъпкова (2 блока) йерархична множествена регресия с усреднения PI от лява и дясна маточна артерия в 13 г.с. (mean PI-UA в 13 г.с.) като зависима променлива за Експерименталната и Контролна група 1. Блок 1 – в този блок включихме потенциалните предиктори (sFlt-1, sEndoglin, Corin, PP-13 в 13г.с.), които очакваме да прогнозира промяна в mean PI-UA в 13 г.с. като белег за неадекватна плацентация и вероятно развитие на ПЕ. В следващите блокове включихме обяснителните предикторни променливи (стъпков (stepwise) метод на включване), които не очакваме непременно да повлияят mean PI-UA в 13 г.с. – възраст и тютюнопушене.

Така конструираният модел даде следните резултати за Експерименталната група, представени на *Таблица.4*. В Експерименталната група усреднения PI-UA в 13 г.с. не се влияе сигнификантно от sEndoglin, Corin, PP-13 и sFlt-1 в 13г.с. Възрастта и тютюнопушенето са изключени от анализа при използвания стъпков метод на въвеждане на променливи, тъй като не достигат до p -стойност <0.05 .

Променлива	b	SE	β	t	P-стойност	R	R ²	коригиран R ²	ΔR^2
mean PI-UA в 13 г.с.									
Модел 1 (първа стъпка)									
F (14, 3)=0.72; p=0.559						0.36	0.13	-0.05	0.13
константа	2.440	0.782		3.12	0.008				
PP-13 в 13 г.с.	0.000009	0.000	0.104	0.51	0.456				
Corin в 13 г.с.	0.000096	0.000	-0.196	0.62	0.543				
sEndoglin в 13 г.с.	0.000043	0.000	-0.129	0.42	0.679				
sFlt-1 в 13 г.с.	0.137	0.100	0.507	1.37	0.193				

Таблица.4. Обобщени резултати от йерархичния регресионен анализ в Експерименталната група за предикторни променливи на усреднения PI на маточните артерии в 13 г.с.

Прилагането на йерархичната множествена регресия За Контролна група 1 разкрива, че първият модел, който включва само предикторните променливи от блок 1 (метод на въвеждане enter), не е сигнификантен F (16, 3)=1.09; p=0.383. Вторият модел въвежда (stepwise) предикторните променливи от блок 2 – възраст и тютюнопушене. Модел 2 вече е сигнификантен – F (15, 4)=3.09; p=0.048, с три променливи, които са сигнификантни за модела: sFlt-1 и sEndoglin в 13 г.с. и тютюнопушенето. Моделът е адекватен и сигнификантен и обяснява 45% от вариацията на стойностите на усреднения PI-UA в 13 г.с. Регресионният коефициент $b_0=1.403$ (константа) е статистически значим (t=4.60, p=0.000), както и тези пред факторните променливи:

- (1) sFlt-1 в 13 г.с. – $b_1=-0.103$ (t=2.31, p=0.035);
- (2) sEndoglin в 13 г.с. – $b_2=-0.430$ (t=2.78, p=0.014);
- (3) тютюнопушене – $b_3=4.60$ (t=2.78, p=0.000).

От абсолютните стойностите на стандартизирания регресионен коефициент β за sFlt-1 в 13 г.с. ($\beta=-0.482$) и sEndoglin в 13 г.с. ($\beta=0.549$) можем да заключим, че те имат най-голяма и сходна корелация с усреднения PI-UA в 13 г.с., следвани от тютюнопушенето ($\beta=0.155$) в Контролна група 1. Резултатите са представени в Таблица.5.

Променлива	b	SE	β	t	Р-стойност	R	R ²	коригиран R ²	ΔR^2
mean PI-UA в 13 г.с.									
Модел 2 (втора стъпка).									
F (15, 4)=3.09; p=0.048						0.67	0.45	0.31	0.28
константа	1.403	0.305		4.60	0.000				
PP-13 в 13 г.с.	0.000009	0.000	0.119	0.59	0.565				
Corin в 13 г.с.	0.000014	0.000	-0.033	0.16	0.879				
sFlt-1 в 13 г.с.	-0.103	0.044	-0.482	2.32	0.035				
sEndoglin в 13 г.с.	0.430	0.155	0.549	2.78	0.014				
тютюнопушене	1.403	0.305	0.155	4.60	0.000				

Таблица.5. Обобщени резултати от йерархичния регресионен анализ в Контролна група 1 за предикторните променливи на усреднения PI на маточните артерии в 13 г.с.

На втори етап повторихме анализа с усреднения PI от лява и дясна маточна артерия в 20 г.с. (mean PI-UA в 20 г.с.) като зависима променлива за Експерименталната и Контролна група 1. В Експерименталната група усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. се влияе сигнификантно само от нивата на sEndoglin в 20 г.с. – $b_1=0.000$ ($t=2.57$, $p=0.020$). Моделът е адекватен и сигнификантен и обяснява близо 30% от вариацията на стойностите на mean PI-UA в 20 г.с. Всички останали потенциални предикторни променливи са изключени от анализа тъй като не достигат до р-стойност <0.05 . Така конструирания модел даде следните резултати за Експерименталната група, представени в *Таблица.6.*

Променлива	b	SE	β	t	Р-стойност	R	R ²	коригиран R ²	ΔR^2
mean PI-UA в 20 г.с.									
Модел 1 (първа стъпка)									
F (16, 1)=6.61; p=0.020						0.54	0.29	0.25	0.29
константа	1.953	.330		5.93	0.000				
sEndoglin в 20 г.с.	0.000	0.000	-0.541	2.57	0.020				

Таблица.6. Обобщени резултати от йерархичния регресионен анализ за предикторните променливи на усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. в Експерименталната група.

В Контролна група 1 усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. се влияе сигнификантно само от възрастта – $b_1=-0.035$ ($t=3.22$, $p=0.005$). Моделът е адекватен и сигнификантен и обяснява 37% от вариацията на стойностите на mean PI-UA в 20 г.с. Всички останали потенциални предикторни променливи са изключени от анализа, тъй като не достигат до p -стойност <0.05 . Резултатите са представени в Таблица.7.

Променлива	b	SE	β	t	p-стойност	R	R ²	коригиран R ²	ΔR^2
mean PI-UA в 20 г.с.									
Модел 1 (първа стъпка)									
F (18, 1)=10.39; p=0.005						0.61	0.37	0.33	0.37
константа	2.079	0.348		5.972	0.000				
Възраст	-0.035	0.011	-0.605	3.223	0.005				

Таблица.7. Обобщени резултати от йерархичния регресионен анализ за предикторните променливи на усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. в Контролна група 1.

Последната задача, която си поставихме бе да потърсим корелация между промените в изследваните показатели (серумни, биофизикални) и интраутеринното изоставане в развитието на плода (ИУРП). Не се откри статистически значима разлика в концентрациите на изследваните серумни маркери (sEndoglin, Corin, sFlt-1 и PP13) в подгрупа 2 (бременни с ИУРП) спрямо всички останали бременни, включени в проучването. Доказа се статистически значима разлика в стойностите на PI-UA при бременностите, усложнени с ИУРП спрямо всички изследвани жени, както в 11-13⁺⁶ г.с. ($t=5.04$; $p=0.007$), така и в 20-22 г.с. ($t=3.90$; $p=0.017$). Получените резултати са показани нагледно в Таблица.8.

		N = брой	Средна стойност	Стандартно отклонение
Mean PI-UI 13 г.с.	Без ИУРП	53	1.63	0.55
	ИУРП	5	2.04	0.40
Mean PI-UI 20 г.с.	Без ИУРП	53	1.02	0.22
	ИУРП	5	1.38	0.46

Таблица.8. PI-UA при развилите ИУРП спрямо всички изследвани бременни.

ПЕ и ИУРП, като главни причини за майчина и перинатална болестност и смъртност, са обект на съществен научен интерес. При ПЕ се засяга както моментното здраве на бременната и плода, така могат да останат последствия за майката (в краткосрочен и дългосрочен план) и за новороденото. Липсата на дефинитивно лечение, поради неизяснената етиология, насочва повечето по-ранни проучвания към търсенето на поне ефективно симптоматично (патогенетично) такова. Единственото познато до днес дефинитивно решение на проблема с ПЕ при настоящата бременност е родоразрешението, което най-често е предтерминно и води във себе си всички последствия от ятрогенния прематуритет на плода. Целта е да се отложи максимално близо до термин родоразрешението при добро общо състояние на майката и преди да са настъпили необратими последствия за нея и плода. Следваща насока в по-съвременните проучвания в областта на ПЕ и ИУРП е опитът за предсказване развитието на тези състояния, преди появата на първите симптоми. Това се оказва комплексна задача, подари неясната етиология на ПЕ и множеството патогенетични механизми на увреда, които превалят в различна степен при всяка отделна пациентка. Първоначалният научен интерес е насочен основно към плацентарния кръвоток и в частност към кръвотока в маточните артерии, като най-лесен метод за стандартизирано измерване. Ниската предиктивна стойност обаче на този единствен показател пренасочва изследователите в посока търсене на допълнителни маркери в кръвта на майката, като предиктори за бъдещо развитие на ПЕ. Изследвани са до момента в различни по мащаб и дизайн проучвания стотици потенциално предиктивни маркери за ПЕ, но нито един самостоятелно не е показал качества на добър и ефективен предиктор. Изследвани са и самостоятелно, и в комбинация ангиогенни, антиангиогенни фактори, ендокринни, имунологични, фактори на възпалението, растежни фактори и дори свободната фракция на fetal-DNA и fetal-RNA.

С напредването на една нормална бременност кръвотокът в маточните артерии намалява по резистентност, а хистопатологични изследвания доказват, че това се дължи на трофобластната инвазия на спиралните артерии. Това обезпечава нормалното развитие и растеж на плода и плацентата. Неуспешната трофобластна инвазия се асоциира с усложнения от утероплацентарна инсуфициенция като например ПЕ, ИУРП, ПЕ с

ИУРП, олигохидрамнион до втреутробно загиване на плода. Най-честата причина за ИУРП е именно плацентарната инсуфициенция. Когато е на лице компрометиран кръвоток настъпват адаптационни промени, които водят до асиметрична ИУРП. Няколко проучвания върху скрининга с Доплерово изследване, две във втори триместър и по-скорошни в първи триместър на бременността, показват асоциацията между повишения импеданс в кръвотока на маточните артерии и последващото развитие на ПЕ и ИУРП. Наличието на ранен диастоличен пик (notch) във велосиметричната крива и запазването на високо съпротивление в кръвотока на едната и/или и двете маточните артерии (висок PI над 2) е индиректно доказателство за абнормна плацентация, а лошата плацентация се смята за основен патогенетичен механизъм за развитие на ПЕ. Rampello и колектив доказват, че във високо рискова популация абнормният Доплер на маточните артерии и двустранният notch, измерени в края на първи триместър са индикатор за риск от ИУРП и SGA. Нашите резултати потвърдиха това твърдение и при не рискова популация. Резултатите ни показаха, че бременните, които ще развият ИУРП имат сигнификантно повишен PI-UA спрямо всички изследвани, както в края на първи, така и в средата на втори триместър. Вероятно смущенията в кръвотока в плацентата водят до последващо забавяне на темпа и растеж и резултират в ИУРП. Повишеният пулсативен индекс на кръвотока на маточните артерии се наблюдава месеци преди настъпването на ретардацията на плода, което може да се използва за предикция на такъв тип усложнения на бременността. В първи триместър освен повишен PI в Доплера на маточните артерии може да се наблюдава и notching – пик в диастоличната част на кривата на кръвотока. Важно е да се отбележи, че notching винаги предсказва повишен риск от прееклампсия. В обобщение Доплеровата велосиметрия на маточните артерии може да покаже повишен риск за развитие на ПЕ и/или ИУРП, но предиктивността е по-висока при измерване в 20-24г.с, отколкото в края на първи триместър (11-13⁺⁶г.с.); по-висока при предикция на ранна ПЕ в сравнение с късна. Обяснение за тази разлика в предиктивността на PI-UA е, че развитието на късната ПЕ по-често е резултат на подлежаща майчина микроваскуларна патология или на предразположение към такова, отколкото на неадекватна трофобластна инвазия. Поради неубедителните резултати за предиктивността на самостоятелно използвания показател- Доплер на маточни артерии в 13 г.с. се търсят други подходи. С напредване на бременността кръвотокът в

маточните артерии преминава от такъв с висока резистентност към кръвоток с ниска такава (намален PI). Така PI на маточните артерии, измерен в 13 г.с. и после в 20-24 г.с., описва крива с декливен ход. Отчитането на стръмността на тази кривата показва висока предиктивност за ранна ПЕ (90%), но недостатъчна за късна прееклампсия (31%). Тези резултати са от проучване, извършвано на над 3000 бременности, което показва, че намаляването на PI на маточните артерии между 11-13⁺г.с. и 21-24г.с. е по-стръмно при нормално развиваща се бременност, отколкото при такива с прееклампсия. В нашето проучване тези резултати се потвърдиха. Независимо от множеството проучвания използването на Доплерова велосиметрия на маточните артерии не се утвърждава като самостоятелен метод за предикция на усложнения свързани с лоша плацентация - ПЕ и/или ИУРП, поради ниската си предиктивна стойност.

Следващ етап в провеждането на научни опити да се изработи панел за предикция на ПЕ е комбинирането на Доплер на маточните артерии с биохимични показатели, заемащи различна роля в патогенезата или патофизиологията на ПЕ. Сред тях са ангиогенни (свободен VEGF, PLGF), антиангиогенни (sEndoglin, sFlt-1), инфламаторни (Pentraxin 3, CRP, TNF α), трофобластни (PAPP-A, PP-13), ендокринни (Activin A, Inhibin A , Inhibin B, Leptin, AFP, Corin, Copeptin), свободна фракция на фетална DNA и RNA и други фактори. Като повечето от тях са изследвани в комбинация с майчини характеристики и Доплер на маточните артерии или в комбинация помежду си като панел. Независимо от множеството проучвания нито един такъв панел не е доказал абсолютната си предиктивност и не се използва повсеместно. Причина за това е и етническата разлика в изследваните популации, тъй като е доказано, че има популации от жени, които са a priori с повишен риск за ПЕ.

Няколко ангиогенни, антиангиогенни, инфламаторни, клинични (средно артериално налягане) и биофизикални (Доплер на маточните артерии) биомаркери, самостоятелно и в комбинация, са предлагани като най-обещаващи за предикция на ПЕ, но отчетената им ниска предиктивна стойност възпрепятства клиничната им употреба. Не на последно място трябва да се отчете и финансовата целесъобразност на предлаганите скринингови панели. Докато включването на анамнестични и биофизикални маркери е относително изгодно, добавянето на няколко биохимични маркера прави панелът скъп и невъзможен за масово

приложение. Независимо от това изследването на такива многокомпонентни панели продължава да е от голям научен и изследователски интерес. Нашата клинична хипотеза бе, че комбинирането на един биофизикален (Доплер) и няколко биохимични фактори ще е по-ефективно в предсказването на ПЕ за нашата популация от бременни. Първоначалните ни данни обаче не успяха да потвърдят категорично тази хипотеза. Ограниченията в проучването ни бяха основно от невъзможността за изследване биохимичните фактори при повече бременни поради високата стойност на китовете. Три от изследваните от нас четири серумни маркера (sEndoglin, sFlt-1 и PP-13) не показаха статистически значима промяна при бременните развили ПЕ и ИУПР, нито дори статистически различни концентрации в Експерименталната спрямо Контролна група 1.

sFlt-1 и sEndoglin са антиангиогенни фактори с различен механизъм на действие по време на бременност (sFlt-1 - чрез адхеренция към рецептор-свързващите домейни на PlGF и VEGF, а sEndoglin - инхибира TGF- β 1 сигнализацията във васкуларната мрежа). Предположението, че концентрациите на sFlt-1 и sEndoglin ще са сигнификантно повишени при развитие на ПЕ със/без ИУРП е отдавна доказано, което насочва интереса на изследователите към динамиката на техните концентрации седмици и дори месеци преди появата на симптомокомплекса ПЕ. Изказва се предположение за ролята им като етиологични фактори. В едно проучване над плъхове чрез аденовирусно-медираната свръхекспресия едновременно на sFlt1 и sEndoglin се наблюдава тежко съдово увреждане, нефротична протеинурия, тежка хипертония, състояние подобно на HELLP syndrome и IUGR. Тези опити показват, че разтворимите Endoglin и sFlt1, два антиангиогенни протеина с различен механизъм на действие, може би действат в комбинация, причинявайки ендотелна дисфункция и тежка прееклампсия. За sFlt-1 се предполага произход почти изцяло от плацентата. И двата протеина (sFlt-1 и sEndoglin) показват повишени нива в майчината плазма при бременност с прееклампсия в сравнение с нормална бременност. Тази промяна в циркулиращите ангиогенни протеини (увеличаване на антиангиогенните sFlt-1 и sEndoglin, намаляване на проангиогенните PlGF и VEGF) се наблюдава преди появата на симптомите и корелира с времето на клинична изява на ПЕ, с тежестта на заболяването и с раждането на SGA плод. Според едни автори промяната в концентрациите на sFlt-1 и sEndoglin настъпва от 5 до 11 и от 5 до 9 седмици

преди появата на симптоми на ПЕ, а според други промяната в концентрациите на sFlt-1 и sEndoglin е съответно 6 седмици и 2 до 3 месеца преди диагностицирането на ПЕ. При ранно проявилата се преекламписия нивата на sFlt-1 са по-високи. Относно късна ПЕ не е установена сигнификантна разлика също и в серумните нива на sEndoglin. Това показва потенциалната предиктивна стойност на sFlt-1 и sEndoglin само за ранна ПЕ, но ги прави слабо показателни за късна ПЕ, а в нашето проучване само 1 пациентка разви като усложнение ранна ПЕ. Според някои автори ефективен скрининг за ПЕ е възможен само при изследване на няколко серумни маркера. Foidart и колектив например доказват, че в 11–13 г.с. са завишени серумните нива на sEndoglin и PI на маточните артерии при жени, които ще развият ранна преекламписия. Нашата хипотеза също беше, че комбинирането на няколко серумни маркера с PI на маточните артерии би бил добър предиктивен панел за ПЕ с/без ИУПР. В нашето проучване изследваните sFlt-1 и sEndoglin не показаха статистически значима промяна при бременните развили ПЕ и ИУПР, нито дори статистически различни концентрации в Експерименталната спрямо Контролна група 1. Единствено бе отчетено, че при всички бременни серумните нива на sFlt-1 и sEndoglin се покачват с напредване на бременността. Липсата на статистически значима разлика в концентрациите на sFlt-1 и sEndoglin при развилите ПЕ и/или ИУПР спрямо Контролите си обясняваме с няколко факта – изследваните серумни маркери в проведени до момента проучвания показват предиктивност за ранна, но не и за късна ПЕ, а в нашето проучване само една бременна в Експерименталната група разви ранна ПЕ. Малкият брой пациентки, включени в проучването, ограничава получаването на статистически достоверни данни. Тенденцията за покачване на серумните нива на sFlt-1 и sEndoglin с напредване на бременността (от 13 г.с. до 22 г.с.) при всички жени в проучването можем да обясним с нарастващата плацентарна маса и опитът на тялото на бременната да ограничи плацентарната инвазия чрез антиангиогенни фактори.

В проучването ни бе изследвана също концентрацията на PP-13, като специфичен плацентарен маркер, която също не показва статистически значима промяна при бременните развили ПЕ и ИУПР, нито дори статистически различни концентрации в Експерименталната спрямо Контролна група 1. Единствено бе отчетено нарастване на концентрацията на PP-13 с напредване на бременността (от 13 г.с. до 22 г.с.) при всички жени, включени в проучването, което може да се обясни с нарастващата

плацентарна маса. Няколко други проучвания върху концентрацията на PP-13 показват, че нивата му в първи триместър са понижени при бременни, които в последствие развиват прееклампсия. Към момента PP-13 е един от най-обещаващите биомаркери за предсказване на риска за ПЕ в първи триместър. Необходими са обаче повече проучвания за доказване на тази хипотеза. Ромеги и сътрудници заключават, че PP13 е удачен биохимичен маркер за ранно проявила се прееклампсия, но е слабо предиктивен за такава, развила се на термин. Друга работна група достига дори до по-обнадеждаващи резултати. Те посочват 80% предиктивност на PP-13 като самостоятелен маркер за ранно проявила се ПЕ и 90% при комбинирането му с PI чрез Доплерова ехография. Противоположни резултати посочват Stamatoroulou и сътрудници, които не намират сигнификантна разлика в нивата на PP-13 между контролната група и групата, развила в последствие хипертензивни усложнения на бременността. Малкият брой пациентки, включени в нашето проучване, ограничава получаването на статистически достоверни данни с подкрепа на някоя от тези хипотези.

Единственият биохимичен показател в нашето проучване, който показва промяна в концентрациите си при пациентките в Експерименталната група и при тези, развили ПЕ, беше Коринът. Коринът е трансмембранна сърдечна протеаза, ангажирана в натриевата хомеостаза и регулацията на артериалното налягане. Коринът активира pro-ANP в активен ANP (атриален натриуретичен пептид). Биологичната му функция е разцепване на pro-ANP по време на освобождаването му от кардиомиоцитите, както при възрастни, така и във феталните кардиомиоцити. ANP е сърдечен хормон, който осъществява физиологичните си ефекти (натриуреза, диуреза, вазодилатация, намаляване на кръвното налягане) едва след конвертиране в активната си форма от Корин. Това подчертава важната роля на Корина в регулацията на кръвното налягане. Доказано е, че нивата на разтворимия Корин са редуцирани при пациенти със сърдечна недостатъчност. Кориновата недостатъчност се свързва и с повишено кръвно налягане. Експресия на Корин е установена в децидуата на бременна матка, което индикира ролята му в трофобластната инвазия и ремоделирането на маточните артерии. Тези открития навеждат на хипотезата за участието на Корина в етиопатогенезата на ПЕ. Cui Y и колектив идентифицират Коринова генна мутация в пациентки с ПЕ, която намалява Кориновата активност за трансформация на pro-ANP. Техните резултати индикират, че Коринът и ANP са есенциални за физиологичните промени в майчино-

феталната взаимовръзка, и предполагат, че дефект в Кориновата функция и тази на ANP може да водят до ПЕ. Данните в литературата за плазмените нива на Корин при ПЕ са противоречиви. Khalil и колектив описват потенциалната роля на майчините плазмени нива на Корин за ранна предикция на ПЕ. Те наблюдават значително намаление в нивата на майчиния плазмен Корин до 20 г.с. в групата с предтерминна ПЕ сравнено с нормотензивната група и заключават, че плазмените Коринови концентрации могат потенциално да се използват за ранен предиктивен маркер за предтерминна ПЕ.

Противно на описаните резултати са тези на Miyazaki J и колектив, които откриват повишени серумни нива на Корин при жени с ПЕ и също при случаи с необяснима рестрикция във феталния растеж (fetal growth restriction – FGR) без хипертензия. Те също отбелязват повишена имунореактивност на Корина в майчината децидуа при ПЕ и при FGR без хипертензия, което може да е потенциалният източник на повишените серумни нива на секреторния Корин. Нашите резултати подкрепят получените от тази работна група резултати относно Корина, но не и относно чистата ИУРП (ИУРП без ПЕ). Ние също установихме статистически значими по-високи серумни концентрации на Корин в групата с по-затруднен кръвоток в маточните артерии (Експерименталната) спрямо групата с нормален кръвоток на маточните артерии (Контролна група 1), но само в 13 гестационна седмица. Такава разлика в 20 г.с. не се установи. Тези противоречиви резултати ни подтикнаха да подразделим жените в Експерименталната група на такива развили ПЕ и такива с бременност без хипертензивни усложнения и да съпоставим в тези подгрупи резултатите от Кориновата серумна концентрация. Установихме, че пациентките развили ПЕ в последствие имат сигнификантно по-ниски нива на серумен Корин сравнено с останалите бременни, както в 13 г.с, така и в 20 г.с. В нашето проучване също се установи тенденция за намаляване концентрациите на серумния Корин с напредване на бременността (между 13 г.с. и 20-22 г.с.) при всички изследвани бременни. Тази тенденция за понижение на серумния Корин е значително по-изразена при бременните с намален кръвоток в маточните артерии (Експерименталната група) спрямо бременните с нормален кръвоток. Тази тенденция е още по-силно изразена при пациентки, които ще развият ПЕ. Естеството на проведеното от нас изследване не може да даде отговор кое е първопричината и кое следствието. Остава загадка дали повишените в 13 г.с. серумни

концентрации на Корин водят до нарушен кръвоток в маточните артерии или обратно- повишената резистентност в маточния кръвоток води до прекомерно освобождаване на Корин от децидуата и/или кардиомиоцитите на бременната жена. Възможно е повишените нива на Корин при бременни с влошен кръвоток в маточните артерии да е резултат от предразположение към хипертензивното състояние и опит на тялото на жената за адаптация. Екипът на Miyazaki също предполага, че наличието на друг секреторен орган на Корин, различен от утероплацентарния, а именно кардиачните миоцити, прави опитите за интерпретация на серумните концентрации и на свободния Корин по време на бременност много трудни. Понижените нива на Корин при пациентките, развили ПЕ в нашето проучване спрямо останалите бременни, може да се обясни като причина за възникналото в последствие хипертензивно състояние- понижените нива на Корин водят до по-ниска активност на секретирания pro-ANP, намалена натриуреза и диуреза и повишено артериално налягане в последствие. За да се докаже обаче това логично обяснение на получените от нас резултати, е необходимо последващо измерване на Кориновите серумни нива до развитие на ПЕ и след това, за да се потвърди тенденцията за намаляване.

Плазмените нива на Корин може би не отразяват адекватно локално активния Корин в маточната тъкан, заключават Jadli A и колектив, което според тях превръща серумният Корин в незначителен фактор за предикция на ПЕ. По тяхно мнение трябва с по-големи проучвания да бъдат анализирани заедно маточно-специфичния Корин с периферно циркулиращия Корин, за да се установи тяхната сензитивност и специфична предиктивност като биомаркери за ПЕ и други усложнения на бременността. Получените от нашето проучване резултати също подкрепят тази хипотеза, защото еднократно взетите серумни проби за нивата на корин не дават достатъчна информация за риска от развитие на ПЕ. Необходимо е според нашите данни дву-, а защо не и трикратно измерване на серумния Корин, защото именно динамиката с концентрациите му в комбинация с mean PI-UA показва коя бременна е по-застрашена да развие ПЕ.

Различията в получените резултати от независими работни групи може да се обясни освен с генна мутация в гена за Корин и за активацията му, но и с различия в начина на взимане и съхранение на серумните проби. При използване на хепарин като антикоагулант в обработваните проби не

се отчита промяна в нивата на Корин, но при използване на цитрат и EDTA се отчита леко повишение в Кориновите концентрации. За това при съпоставяне на резултатите от различни проучвания е желателно да се обръща внимание на методиката на вземане на пробите. Не е отчетено влияние върху получените концентрации при съхранение на пробите замразени до една година и също до три цикъла на замразяване и размразяване. Независимо от различията в резултатите до момента, изследването на серумните нива на Корин за предикция на ПЕ изглежда да има потенциална стойност като маркер за повишен риск от развитие на ранна ПЕ. Въпрос на време е да се уточни с каква методика да се вземат и обработват пробите, в коя гестационна седмица и колко пъти по време на бременност, за да има добра предиктивна стойност изследването на серумния Корин за предикция на хипертензивни усложнения по време на бременност.

В опит да оценим предиктивната стойност на някои биомаркери за ПЕ, ние ги обединихме в панел, комбиниращ Доплер на маточни артерии и антиангиогенни маркери (sFlt-1, sEndoglin) от една страна, плацентарен протеин (PP-13) и Корин от друга. Малкият брой бременни, на които изследвахме серумните проби, според нас ограничи получаването да потвърдителни резултати. Не се установи предиктивна стойност за ПЕ и/или ИУРП на комбинацията от четирите протеин (sFlt-1, sEndoglin, PP-13, Corin) с Доплер на маточните артерии, нито на всеки един от тях поотделно с изключение на Корина. За това направихме опит да установим кои от изследваните серумни показатели оказват влияние или корелират с усреднения пулсативен индекс на маточните артерии (mean PI-UA) като маркер за степента на плацентация и риск от ПЕ и ИУРП. Използвахме двустъпкова йерархична множествена регресия първо за Контролна група 1 – бременни с нормално протичаща бременност без рискови фактори за ПЕ и с нормален Доплер на маточните артерии в 11-13 г.с. (mean PI-UA под 2). Заключихме, че в 13 г.с. sFlt-1 и sEndoglin имат най-голяма и сходна корелация с усреднения PI-UA в Контролна група 1, следвани от тютюнопушенето. Което означава, че при по-високи нива на антиангиогенните протеини sFlt-1 и sEndoglin при една и съща бременна се наблюдава по-висок усреднен PI при Доплер на маточните артерии, т.е. по-висока резистентност на кръвотока към плацентата и по-висок риск от ПЕ и ИУРП. Относно тютюнопушенето резултатите, които получихме противоречат на общо приетото становище, че този вреден навик е

протективен фактор за развитие на ПЕ, тъй като е доказано, че пушачките по време на бременност по-рядко развиват хипертензивни усложнения на бременността и съответно ПЕ.

Използвахме същата двустъпкова йерархична множествена регресия за Експерименталната група в 13 г.с. - бременни с нормално протичаща бременност без рискови фактори за ПЕ, но с абнормен Доплер на маточните артерии в 11-13 г.с. (mean PI-UA над 2). Установихме обаче, че в Експерименталната група усреднения PI-UA в 13 г.с. не се влияе сигнификантно от sEndoglin, Corin, PP-13 и sFlt-1 в 13 г.с. Възрастта и тютюнопушенето също са изключени от анализа при използвания стъпков метод. Т.е. противно на очакванията ни в Експерименталната група в 13 г.с. не открихме корелация между нивата на изследваните от нас серумни маркери и пулсативния индекс на маточните артерии. Това може да си обясним с факта, че в тези ранни за бременността гестационни седмици би трябвало да настъпват промени първо и основно в плацентата, за което е белег повишения PI-UA. Малко по-късно, при невъзможност за корекция и адаптация от страна на майчиния организъм, би трябвало да се наблюдава промяната в серумните концентрации на изследваните от нас протеини.

Същият анализ повторихме с усреднения PI от лява и дясна маточна артерия в 20 г.с. (mean PI-UA в 20 г.с.) като зависима променлива за Експерименталната и Контролна група 1. В Контролна група 1 - бременни с нормално протичаща бременност без рискови фактори за ПЕ и с нормален Доплер на маточните артерии в 11-13 г.с. (mean PI-UA под 2), усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. се влияе сигнификантно само от възрастта. Моделът е адекватен и сигнификантен и обяснява 37% от вариацията на стойностите на mean PI-UA в 20 г.с. Независимо от хомогенността на жените по възраст в групата, моделът отчита повишаване на mean PI-UA с по-високата възраст на бременните. Това може да се обясни с възрастовата алтерация, която настъпва в микроциркулацията на всеки човек с напредване на възрастта.

В Експерименталната група усреднения PI на маточните артерии в 20 г.с. се влияе сигнификантно само от нивата на sEndoglin в 20 г.с. Моделът е адекватен и сигнификантен и обяснява близо 30% от вариацията на стойностите на mean PI-UA в 20 г.с. Всички останали потенциални предикторни променливи са изключени от анализа, тъй като не достигат до р-стойност <0.05 . Т.е. в Експерименталната група - бременни с нормално

протичаща бременност без рискови фактори за ПЕ, но с абнормен Доплер на маточните артерии в 11-13 г.с. (mean PI-UA над 2), mean PI-UA в 20 г.с. се влияе сигнификантно от sEndoglin. Тези резултати си обясняваме с факта, че разтворимият Endoglin е антиангиогенен фактор, повишаващ нивата си седмици до месеци преди появата си симптомите на плацентарна инсуфициенция и/или ПЕ. Получените от нас резултати са обещаващи, особено що се отнася до предиктивността на Corin и sEndoglin в комбинация с mean PI-UA, но са необходими по-мощни проучвания, включващи повече бременни, а също не и допълнително изследване на серумните маркери по-късно през бременността, за да се потвърдят резултатите ни.

Съвременните проучвания доказват, че майчините клинични характеристики като ВМІ и средно артериално налягане също могат да бъдат включени като параметри в модела за предсказване на ПЕ. Наднорменото тегло е добре известен рисков фактор за ПЕ, особено за късната и форма. Счита се, че риска от развитие на ПЕ се увеличава с 10% за всеки 1 kg/m² над 24 kg/m². Няколко проучвания показват негативното въздействие на обезитета върху перинаталния и майчин изход по отношение на ПЕ. Въпреки това, не всички обезни жени развиват ПЕ. Причината вероятно се крие в някои метаболитни аномалии като повишеното ниво на циркулиращия лептин, глюкоза, инсулин и липиди, които биха повишили риска от развитие на ПЕ при тези жени. Освен това изглежда, че техният ефект е кумулативен и че те могат да потенцират ангиогенни и проинфламаторни механизми от индуцираната от плацентарната исхемия васкуларна дисфункция и по този начин да доведат до повишаване честотата на ПЕ.

В обобщение може да кажем, че опитите за предсказване развитието на ПЕ в ниско рискова популация остават в сферата на научните хипотези. Сложната и многофакторна патогенеза стои, според нас, в основата на разнородните резултати, които получават различните работни групи, изследващи един и същ фактор или едни и същи фактори. Безспорна корелация се наблюдава в повишената резистентност на кръвотока на маточните артерии в първата половина на бременността и развитието на лоша плацентация във втората половина на бременността, но не корелира непременно с развитие на ПЕ. Поради това оставаме на хипотезата, че към този най-надежден биофизикален маркер (mean PI-UA в 13 и/или 20 г.с.) трябва да се добавят серумни маркери, показващи недостатъчна

плацентация и/или микроваскуларна алтерация. Така би могло да се стигне до работещ панел за предикция на ПЕ в първи и/или ранен втори триместър.

- 1) Концентрациите на серумния Корин са сигнификантно по-ниски при бременни, които ще развият в последствие ПЕ, като това се наблюдава месеци преди появата на симптомите.
- 2) Концентрациите на серумния Корин имат тенденция да намалят с напредване на бременността, по-изразено при бременни, които ще развият ранна ПЕ.
- 3) Не се променят сигнификантно стойностите s-Flt-1, Corin, PP-13 и sEndoglin с напредване на бременността в изследваните групи.
- 4) PI-UA намалява статистически значимо с напредване на бременността (между 11-13⁺⁶г.с. и 20-22 г.с.). Темпът на намаляване на PI-UA е по-значителен при бременности, усложнени в последствие с ПЕ и/или ИУРП, а по-слабо изразен при нормално развиващи се бременности.
- 5) Усредненият пулсативен индекс от двете маточни артерии в 13 г.с. корелира в с нивата sEndoglin в популация от ниско рискови бременни.
- 6) Комбинацията от Доплерова ехография на маточните артерии (PI-UA) и концентрациите на няколко серумни маркера (s-Flt-1, Corin, PP-13, sEndoglin), изследвани в 11-13⁺⁶г.с. и 20-22 г.с. са със слаба предиктивна стойност за късно развилата се ПЕ (след 32г.с.)

С научно-теоретичен характер:

1. За първи път у нас се прави опит за предсказване развитието на ПЕ чрез комбиниране на биомаркери и ехографско изследване.
2. За първи път у нас се определят концентрациите на серумния Корин в популация от бременни жени в ключови моменти от бременността им, а именно в 11-13+6г.с. и в 20-22 г.с.

С научно-приложен характер:

1. Потвърди се прогресивното снижение на PI-UA с напредване на бременността, като белег за адекватна трофобластна инвазия, при нормално протичаща и усложнена бременност.
2. Доказа се, че понижаването на PI-UA е значително по-слабо при бременни, които ще развият ПЕ и/или ИУРП.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Чалова К, Пехливанов Б.** Ехографски и биохимични маркери в първи триместър и предиктивната им стойност за развитие на прееклампсия. *Акуш Гин 2015;54(4):46-51.*
Chalova K, Pehlivanov B. Ultrasound and biochemical markers in first trimester and their predictive value in preeclampsia prediction. *Akush Ginekol (Sofia).* 2015;54(4):46-51.
Bulgarian PMID:26410947
2. **Чалова К, Пехливанов Б.** Корин-нова надежда за предсказване на прееклампсията. *Akush Ginekol (Sofia).* 2016;55(4):42-45.
Chalova K, Pehlivanov B. Corin- new hope in preeclampsia prediction. *Akush Ginekol (Sofia).* 2016;55(4):42-45.
3. **Chalova KI, Pehlivanov BK, Amaliev IG, Amaliev GI, Raycheva RD, Ivanovska MV.** Maternal serum concentrations of Corin, endoglin, PP13 and sFlt-1 and their changing with advancement of pregnancy and correlation with Doppler of uterine arteries. *Folia Med (Plovdiv)* 2018;60(4).
4. **Чалова К, Захариева П, Амалиев Г.** Doppler на маточни артерии в I и II триместър като предиктор на патологични състояния на бременността. *Наука и младост – сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2016.* 2016; 226-227.

Участие в научни конгреси, свързани с дисертационния труд

- Наука и младост 2016 година МУ Пловдив
- Национален конгрес по акушерство и гинекология , Пловдив 2017

