

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА, КАТЕДРА „АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ“

Д-Р НИКОЛА КАЛИНОВ ПОПОВСКИ

**Промени в нивата на циркулиращите биомаркери и
ехографски критерии при хипертензивни състояния по
време на бременност**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН 'ДОКТОР'

ПЛЕВЕН
2021

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-ПЛЕВЕН
КАТЕДРА „АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ“

Д-Р НИКОЛА КАЛИНОВ ПОПОВСКИ

**Промени в нивата на циркулиращите биомаркери и
ехографски критерии при хипертензивни състояния по
време на бременност**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН 'ДОКТОР' ПО
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р ЙОРДАН ПОПОВ ДМ
НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р АСПАРУХ НИКОЛОВ ДМ

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ

Проф. Д-р.....

Проф. Д-р.....

ПЛЕВЕН
2021

Изследванията по дисертацията са извършени в Клиника по Акушерство и Гинекология, УМБАЛ „Д-р Г.Странски“- Плевен, и Катедра "Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология", Сектор "Клинична имунология и алергология" към Медицински Университет-Плевен.

Дисертационният труд съдържа 136 машинописни страници, 9 таблици и 23 фигури. Литературната справка включва 334 заглавия от които на 14 на кирилица и 320 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Катедра “Акушерство и гинекология“, Факултет медицина, Медицински Университет-Плевен.

Дисертантът работи като асистент в катедра „Акушерство и гинекология“, на Медицински Университет-Плевен в Клиника по Акушерство и гинекология „УМБАЛ- Д-р Георги Странски“ ЕАД гр. Плевен.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на от часа в зала „.....“ МУ Плевен ул. „Св. Климент Охридски“ 1

Материалите по защитата са на разположение на сайта на МУ-Плевен www.mu-pleven.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение.....	8
II. Цел и задачи.....	14
III. Материал.....	15
IV. Методи на изследване.....	18
IV. 1. Клиничен метод-анамнеза и физикален статус.....	18
IV. 2. Документален и социологически	18
IV. 3. Лабораторни изследвания	18
IV. 4. Имунологични изследвания	19
IV. 5. Неинвазивни методи за изследване на сърцето, съдовете и бременността... 19	
IV. 5.1 Измерване на артериално налягане.....	19
IV. 5.2 ЕКГ.....	19
IV. 5.3 Ехокардиография.....	19
IV. 5.4 Трансабдоминална ехография за определяне на Доплеров РІ на умбиликална и утеринна артерия.....	20
IV.6. Статистически методи.....	22
V. Резултати.....	25
V.1. Резултати от Доплеровото измерване на среден пулсативен индекс на умбиликална и утеринна артерия при пreeклампсия.....	25
V.2. Резултати от определянето на среден пулсативен индекс на а.утерина и а.умбиликалис според времето на манифестацията на пreeклампсията	26
2.1 Определяне на среден пулсативен индекс на а.утерина при ранна и късна пreeклампсия.....	26
2.2 Определяне на среден пулсативен индекс на а.умбиликалис при ранна и късна пreeклампсия.....	27
V.3. Резултати от определянето на среден пулсативен индекс на а.утерина и а.умбиликалис според тежестта на пreeклампсията.....	28
3.1 Определяне на среден пулсативен индекс на а.утерина при лека и тежка форма на пreeклампсия.....	28
3.2 Определяне на среден пулсативен индекс на а.умбиликалис при лека и тежка форма на пreeклампсия.....	29
V.4. Резултати от Ехокардиографското изследване при пreeклампсия.....	30
V.5. Резултати от определянето на колагеназите MMP-8, -13 при пreeклампсия.....	31
V.6. Резултати от определянето на желатиназите MMP-2, -9 при пreeклампсия.....	33
V.7. Резултати от определянето на TIMP-1, -2 при пreeклампсия.....	35
V.8. Резултати от определянето на серумен подокаликсин при пreeклампсия	37
VI. Обсъждане.....	42
VII. Изводи.....	55
VIII. Приноси.....	57
IX. Публикации във връзка с дисертационния труд.....	59
X. Научни съобщения във връзка с дисертационният труд.....	60
XI. Цитати.....	61

Използвани съкращения

1. **ELISA**- ензим-свързана имуносорбентна проба
2. **СЗО**- световна здравна организация
3. **Г.с.**- Гестационна седмица
4. **ЕЦМ**- екстрацелуларен матрикс
5. **ГХ**- гестационна хипертония
6. **ПЕ**- прееклампсия
7. **BMI**- Индекс на телесната маса
8. **MMPs**- матриксни металопроотеинази
9. **TIMPs**- тъканни инхибитори на металопроотеинази
10. **ADAMs и ADAMTSs**- дизинтегрин-металопроотеиназите
11. **MT-MMPs**- membranno-bound MMPs
12. **EOPE**- ранна поява на прееклампсия
13. **LOPE**- късна поява на прееклампсия
14. **PIH**- хипертония индуцирана по време на бременността
15. **NGAL**- неутрофилна желатиназа В-асоциран липокалин
16. **IL**- интерлевкин
17. **TNF**- тумор некрозис фактор
18. **sFLT-1**- fms-подобна тирозин киназа-1
19. **PIGF**- плацентарен растежен фактор
20. **sEng**- разтворим ендоглин
21. **ХСБ**- хипертензивни състояния на бременността
22. **pro-MMP**- про-пептид домен MMP
23. **Norm-Preg**- нормална бременност
24. **HTN-Preg**- хипертонична бременност
25. **RUPP**- понижено налягане на перфузия на матката
26. **VEGF**- съдов ендотелен растежен фактор
27. **COL**- колаген
28. **IUGR**- интраутеринна фетална растежна ретардация
29. **PP-13**- плацентен протеин 13
30. **PAPP-A**- плазменият протеин А, свързан с бременността
31. **IGF**- инсулиноподобния растежен фактор

32. **UmA**- умбиликална артерия
33. **UtA**- утеринната артерия
34. **PI**- пулсативен индекс
35. **RI**- индекс на резистентност
36. **PCX**- подокаликсин
37. **САН**- Средно артериално налягане
38. **ПН**- пулсово налягане
39. **ACOG**- American College of Obstetricians and Gynaecologists
40. **ISSHP**- International Society for Study of Hypertension in Pregnancy
41. **IDO**- индолеамин 2,3 диоксигеназа

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Хипертензивните състояния на бременността (ХСБ) са най-често срещаните медицински усложнения, засягащи 5-10% от бременностите в глобален мащаб. Тяхното ранно откриване е критично важно за стратификацията на риска и предотвратяването на по-нататъшните компликации. Прееклампсията (ПЕ) усложнява около 2-8% от бременностите по целия свят [1a]. Тя се характеризира с новопоявили се хипертония ($\geq 140/90$ mmHg) и протеинурия (0,3 g в проба от 24 часова урина) или крайна органна дисфункция, след 20 гестационна седмица. ПЕ е основна причина за майчина и перинатална заболеваемост и смъртност. Това е едно от най-често срещаните хипертензивни нарушения на бременността. Над 2/3 от хипертензивните усложнения на бременността се класифицират като ПЕ [16]. ПЕ е най-честото усложнение на бременността и е сред основните причини за майчина смъртност в България [1в,1г]. Установено е, че приблизително половината от случаите на бременните жени със суперпонирана ПЕ имат анамнеза за артериална хипертония преди бременността [1д]. Въпреки този факт, ПЕ все още не е напълно проучена. Все повече данни съществуват за участието на биомаркерите от групата на матриксните metalloпротеинази и техните инхибитори в патофизиологията на прееклампсията [2].

Последните проучвания в областта на хипертензивните състояния на бременността показват, че екстрацелуларният матрикс (ЕЦМ) играе много важна роля в тяхната патогенеза. От огромно значение е равновесието между процесите на синтеза и деградацията на неговите основни компоненти- колаген тип I, III и IV, базалната мембрана и протеогликаните [3]. Протеините от семейството на матриксните metalloпротеинази (MMPs) участват както в прецизно регулираното разграждане на екстрацелуларния матрикс при физиологични процеси като ембрионално развитие, репродукция и ремоделиране на тъканите, така и при патологични процеси. Тези абнормални състояния са свързани с нарушена регулация на деградацията на ЕЦМ. Матриксните metalloпротеинази играят ключова роля в процесите на разграждане на голяма част от тези компоненти на ЕЦМ, докато регулацията на активността на MMP се осъществява посредством тъканните инхибитори на матриксните metalloпротеинази (TIMPs). Колагеназите (MMP-8 и MMP-13) разграждат колаген тип I и III- основни структурни компоненти на маточната стена, докато желатиназите (MMP-2 и MMP-9) са важни регулатори на утерното съдово ремоделиране при нормална бременност, чрез разграждането на колаген тип IV [4].

Нормалната бременност е свързана с изразени хемодинамични и маточни промени, които позволяват адекватен утероплацентарен кръвен ток и разширяване на матката за растящия плод. Съобщава се, че извънклетъчният матрикс може да

модулира трофобластната инвазия и да играе ключова роля в ремоделирането на децидуата на майчиния фетален интерфейс. Има доказателства, че по време на нормална бременност настъпва обилна плацентация и обширно преустройство на спиралните артерии в decidua basalis. Екстравилозните трофобласти навлизат в децидуата и се простират в стените на спиралните артерии, замествайки ендотела и мускулната стена и създават разширени съдове с ниско съпротивление, които поддържат достатъчен кръвоток и снабдяване с хранителни вещества за развиващия се плод. Тези промени, свързани с бременността включват значително ремоделиране на маточно-плацентарната и съдова структура. Следователно може да се заключи, че извънклетъчният матрикс на матката, плацентата и васкулатурата се реконструира по време на физиологична бременност.

Матриксните металопроотеинази и техните инхибитори играят важна роля както при нормална, така и при патологична бременност. Нормалната бременност е свързана с изразени промени в хемодинамиката и структурата на матката, които позволяват адекватен утероплацентарен кръвоток и разширяване на матката за растящия плод. [5]. Матриксните металопроотеинази и тъканните инхибитори на матриксните металопроотеинази са важни регулатори на съдовото и утероплацентарното ремоделиране при нормална бременност. При хипертензивните състояния на бременността отпада регулацията между MMPs и TIMPs, MMP експресията/активността е абнормална и се нарушава както нормалното колагеново ремоделиране на маточният ЕЦМ, така и на спиралните артерии. Горепозначените процеси благоприятстват генерализирана съдова увреда, утероплацентарна хипоперфузия и развитие на прееклампсия [6,7]. Тези механизми са свързани с абнормална вазодилатация, плацентация и нарушена MMP/TIMP експресия/активност [8,9]. Абнормалната експресия на утероплацентални интегрини, цитокини и MMPs се свързва с апоптоза на инвазивни трофобластни клетки, нарушено ремоделиране на спирални артерии и редуцирано утеринно перфузионно налягане (RUPP).

MMPs и TIMPs активността е в състояние да бъде нарушена от ендогенни фактори, като това въздействие може да промени съотношението MMP/TIMP и да резултира в развитието на патологични процеси. Ето защо, разбирането на ролята на MMPs и TIMPs в утероплацентарното и съдовото ремоделиране и функция може да помогне за разработването на нови подходи за прогнозиране и лечение на хипертензивните състояния на бременността [113].

При ПЕ неминуемо настъпват нарушения в бъбречната функция, поради генерализираната съдова увреда. Добре известно е, че при прееклампсия се наблюдава подоцитна и гломеруларна ендотелна увреда и дисфункция. Установено е,

че измененията в бъбречната перфузия корелират с тежестта на ПЕ [5]. Екскрецията на РСХ в урината е повишена при абнормални условия в резултат на подоцитна увреда, но РСХ нива в майчината циркулация при прееклампсия са все още недостатъчно проучени. Подокаликсинът представлява индикатор за гломерулна увреда и също така се експресира върху повърхността на ендотелните клетки на много органи като: сърце, бели дробове и бъбреци [289, 290]. В последствие е доказано, че подокаликсинът се експресира широко върху ендотелната повърхност в целия организъм и е повдигната тезата, че РСХ вероятно се освобождава в кръвообращението и по време на бременност във връзка с ремоделирането на съдовете [6а,6б]. При ПЕ неизбежно настъпват промени в бъбречната структура и/или функция поради подоцитна увреда и засягане на гломеруларният ендотел [285, 286]. Тъй като ПЕ е системно заболяване с генерализирана ендотелна увреда и мулти органно засягане, съществуват все повече хипотези за участието на подокаликсин в патофизиологията на прееклампсията по отношение на абнормалното органно и съдово ремоделиране [7,8]. Ето защо подокаликсин може да бъде иновативен биомаркер, и обещаващ кандидат за ранен индикатор за ендотелна увреда и риска от развитие на ПЕ.

Неинвазивните ехографски методи са полезни за изследване промените в структурата и функцията на сърцето, съдовете и оценка на бременността. **Трансторакалната ехокардиография** е безопасна, неинвазивна техника за оценка на сърдечната структура и функция при бременност [266]. Съвременните ултразвукови технологии могат да демонстрират дискретни промени в сърдечната геометрия и функция [267]. Използването на ехокардиография позволява да се направи оценка на миокарда, без да се излага бременната пациентка на сърдечна катетеризация или ангиография или експониране на рентгеново облъчване [268]. Това е единствената техника, която може да бъде използвана с пълна безопасност, може да се повтори на чести интервали и е изцяло без дискомфорт за пациента [269]. Ехокардиографията може да предостави точна информация за структурни и функционални абнормалности и допринася за разбиране патофизиологията на сърдечните промени и хемодинамичните последици при патологична бременност.

Доплеровият ултразвук е важен метод както в оценката на феталното и плацентарното кръвообращение, така и в прогнозирането на състоянието на плода и изхода от бременността [300,301]. Добре известно е, че Доплеровият ултразвук е безценен инструмент в проследяването на високорисковите бременности. Доплеровият образ позволява неинвазивна оценка на утеро-плацентарната

циркуляция. Клиничната стойност на Доплеровата велосиметрия на утеринна артерия **UtA Doppler** е важна при прогнозиране на неблагоприятни резултати при жени с висок риск за развитие на прееклампсия [302, 303, 304].

Доплеровите признаци на повишена плацентарна съдова резистентност са често свързани с ограничен растеж на плода и признаци на предстояща асфиксия (3). Доплеровата велосиметрия на умбиликална артерия **UmA Doppler** понастоящем е рутинна част от наблюдението на плода при високорискова бременност. След първоначалните технически затруднения, Доплеровата велосиметрия на утеринната артерия (UtA) е доказала своята стойност при прогнозиране на изхода от високорискова бременност, а през последните години се съобщава, че тя е сравнима с доплерография на UmA в това отношение [305]. В късна бременност, анормален UtA доплер и намален венозен обем на умбиликалният кръвен поток се считат за индикатори на намалена плацентарна перфузия [306]. UtA Доплер скринингът през първия триместър и средата на бременността също е доказал своята стойност при прогнозиране на неблагоприятен изход при високорисковите бременности [307а,307б]. Увеличен среден пулсативен индекс от двете маточни артерии над 95ти перцентил при Доплерово изследване на бременни с ретардация на плода е свързано с раждане на плод с тегло под 10ти перцентил [308]. Плацентарният съдов импеданс обикновено се изразява чрез пулсативен индекс (PI), индекс на резистентност и систолично/диастолично отношение на UmA и UtA.

За да се намалят случаите с ПЕ е важно да бъдат идентифицирани жените с висок риск с цел ранно детектиране на ПЕ и прилагане на своевременна терапия. Въпреки интензивното търсене на индикатори за ранно откриване и прогнозиране на ПЕ, клиничната ефикасност на тези показатели е показала ниска прогностична стойност в практиката. Съществуват многобройни потенциални биомаркери за прееклампсия-еклампсия, но тяхната ефикасност е незадоволителна и сравненията са трудни поради хетерогенността между различните изследвания. Налице е спешна необходимост от висококачествени, широкомащабни изследвания на маркери за ПЕ, за да се подобри диагнозата, прогнозата и терапията на жените с висок риск.

Етиологията и патогенезата на прееклампсията са непълно изяснени. Ето защо вниманието на изследователите и клиницистите трябва да бъде насочено както към проучвания на нови биомаркери за диагноза и прогноза на ПЕ и ехографски изследвания, така и към изясняване патогенезата на ПЕ. Разбирането на ролята на MMPs, TIMPs и подокаликсин в утеро-плацентарното и съдовото ремоделиране и функция при ПЕ може да допринесе за изясняване патогенезата на ПЕ. Предвид високата перинатална майчина и детска заболяемост и смъртност и рисковете за

плода и бременната, са необходими и по-детайлни проучвания върху тези маркери за подобряване на диагнозата и прогнозата на жените с висок риск за развитие на прееклампсия.

Обекти на настоящият дисертационен труд са ролята в патогенезата на прееклампсията на серумни матриксни металопроотеинази, тъканни инхибитори на матриксни металопроотеинази, подокаликсин и майчини ехографски параметри, както и възможностите за диагноза и прогноза на заболяването посредством изследването на тези показатели.

Изводи, мотивиращи целта и задачите:

1. Преeklampсията е основна причина за майчина и перинатална заболеваемост и смъртност и усложнява около 2-8% от бременностите по целия свят. Въпреки това, ПЕ все още не е напълно проучена.
2. Ранното откриване на преeklampсията е критично важно за стратификацията на риска и за поведението. Използването на подходящи индикатори би позволило ранно детектиране на ПЕ и прилагане на своевременна терапия.
3. За да се намалят случаите с ПЕ е важно да бъдат идентифицирани жените с висок риск. Поради тази причина клиницистите се нуждаят от по-точни изследвания за прогнозиране на ПЕ.
4. Екстрацелуларният матрикс играе много важна роля в патофизиологията на преeklampсията посредством процесите на синтеза и деградация на негови основни компоненти- колаген тип I, III и IV, базалната мембрана и протеогликаните, регулирани главно от матриксните металопроотеинази (MMPs) и техните тъканни инхибитори (TIMPs).
5. Все повече литературни данни са налице относно участието на MMPs и TIMPs в патогенетичните механизми на преeklampсията.
6. Подокаликсинът е индикатор за гломерулна увреда. Този маркер има не само ренална изява, но също така се експресира и по повърхността на ендотелните клетки на много органи, освен бъбреците. Тъй като преeklampсията е системно заболяване характеризиращо се с генерализирана ендотелна увреда/дисфункция и засягане на множество органи, са необходими по-детайлни проучвания върху ролята на серумният РСХ в патогенезата на преeklampсията по отношение на абнормалното органно и съдово ремоделиране и възможността той да бъде използван като индикатор за диагноза и прогноза на ПЕ.
7. Необходими са по-детайлни изследвания на биомаркерите на ЕЦМ и ехографските показатели при преeklampсия.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО: Проучване ролята в патогенезата на прееклампсията на серумни матриксни металлопротеинази, тъканни инхибитори на матриксни металлопротеинази, подокаликсин и майчини ехографски параметри, както и оценка възможностите за диагноза и прогноза на заболяването посредством изследването на тези индикатори.

ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО:

1. Определяне на среден пулсативен индекс на утеринна и на умбиликална артерия при прееклампсия и нормална бременност
2. Определяне на среден пулсативен индекс на утеринна и на умбиликална артерия според времето на манифестацията на прееклампсията
3. Определяне на среден пулсативен индекс на утеринна и на умбиликална артерия според тежестта на прееклампсията
4. Изследване на майчините ехокардиографски параметри при прееклампсия
5. Определяне на серумните нива на колагеназите MMP-8, -13 при прееклампсия
6. Определяне на серумните нива на желатиназите MMP-2, -9 при прееклампсия
7. Изследване на серумните нива на TIMP-1, -2 при прееклампсия
8. Проучване ролята на серумният подокализин в патогенезата на прееклампсията и определяне възможностите му като маркер за ранна диагноза и прогноза на прееклампсия

III. МАТЕРИАЛ

- **Клиничен контингент**

Пациенти

Всички пациентки от проучването бяха от Клиника по „Акушерство и Гинекология“, УМБАЛ „Д-р Г.Странски“- Плевен, Катедра „Акушерство и гинекология“- Медицински Университет, Плевен. Спазени бяха всички процедури в съответствие с етичните стандарти на Комисията по човешки изследвания (институционални и регионални), както и Декларацията от Хелзинки от 1975 г., преработена през 2000г. Проучването е одобрено от Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет- Плевен. Проучването обхваща периода от Юли 2020 до Август 2021г. Доброволното участие на всички изследвани лица е удостоверено с писмено информирано съгласие и от всеки участник беше взет серум. Изследваната група включваше 55 пациентки с преeklampсия на средната възраст 24.9 ± 6 години; и контролна група от 35 здрави жени с нормална бременност на възраст 24.7 ± 5.4 години (Таблица 1). Подбраните лица от основната група спазват следните включващи и изключващи критерии:

Критериите за включване в проучването бяха следните: бременни жени между 20 и 42 г.с. с клинични симптоми и лабораторни критерии за преeklampсия; възраст над 18 години и под 40 години, поддържане на текущата диета и физическа активност по време на проучването; подписване на информирано съгласие за участие в проучването; параметри на хипертонията (степен, стадий, усложнения); наличие/липса на рискови фактори; наличие/отсъствие на хипертензивно медирана органа увреда (мозък, бъбреци, сърдечни, очни, периферни).

Критериите за изключване от проучването бяха следните: метаболитен синдром, захарен диабет, бъбречни и сърдечни заболявания, признаци на хориоамнионит, наличие на плод с хромозомна аномалия, отказ да подпише информирано съгласие. Критерии за подбора на контролната група: здрави жени с нормална бременност между 20 и 42 г.с. на възраст над 18 години и под 40 години, подписали информирано съгласие.

- **Използвани класификации**

Използвана е общоприетата за клиничната практика и изследователски цели класификация на American College of Obstetricians and Gynecologists 2019 [309] като са приложени следните диагностични критерии:

Артериално налягане

- Систолично артериално налягане ≥ 140 или диастолично артериално налягане ≥ 90 mmHg при две отделни измервания в разстояние на най-малко на 4ч. след 20 г.с. при жени с предишно нормално АН.
- Систолично артериално налягане ≥ 160 или диастолично артериално налягане ≥ 110 mmHg.

и

Протеинурия

- ≥ 300 mg в 24ч. урина или това количество екстраполирано от събраната урина за определен интервал от време или
- Протеин/креатинин отношение от 0.3 mg/dL или повече или
- Тест лента 2+ (използвана само ако други количествени методи не са налични)

ИЛИ ПРИ ОТСЪСТВИЕ НА ПРОТЕИНУРИЯ, НОВОПОЯВИЛА СЕ ХИПЕРТОНИЯ С НОВОПОЯВИЛО СЕ ЕДНО ОТ СЛЕДНИТЕ СЪСТОЯНИЯ:

- Тромбоцитопения (брой на тромбоцити по-малко от $100\ 000 \times 10^9/L$).
- Нарушена чернодробна функция, проявена чрез повишени кръвни концентрации на чернодробни ензими (двойно повече от горната граница на нормалната концентрация).
- Бъбречна недостатъчност (серумна концентрация на креатинин повече от 1,1 mg/dL или удвояване на серумна концентрация на креатинин при липса на други бъбречни заболявания).
- Белодробен оток
- Новопоявило се главоболие, което не се повлиява от медикаменти и не може да се обясни с друга диагноза или зрителни смущения.

Според критериите на American College of Obstetricians and Gynecologists 2013 [310] и The International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy 2014 [311] в зависимост от времевия диапазон, прееклампсията се класифицира като

пreekламписия с ранно начало (EОPE), която изисква родоразрешение преди 34 г.с., и пreekламписия с късно начало (LOPE), с родоразрешение на или след 34 г.с.

Съгласно дефиницията на American College of Obstetricians and Gynecologists 2019 [309], пreekламсията се класифицира като ПЕ с тежки характеристики, при САН \geq 160 mmHg или ДАН \geq 110 mmHg или една от следните тежки характеристики, повишаващи рискът от заболяваемост и смъртност:

- Тромбоцитопения (брой на тромбоцити по-малко от $100\ 000 \times 10^9/L$).
- Нарушена чернодробна функция, проявена чрез повишени кръвни концентрации на чернодробни ензими (двойно повече от горната граница на нормалната концентрация) и тежка персистираща епигастрална болка или болка в десен горен коремен квадрант неотговаряща на медикаментозно лечение и необяснима с друга диагноза.
- Бъбречна недостатъчност (серумна концентрация на креатинин повече от 1,1 mg/dL или удвояване на серумна концентрация на креатинин при липса на други бъбречни заболявания).
- Белодробен оток
- Новопоявило се главоболие, което не се повлиява от медикаменти и не може да се обясни с друга диагноза или зрителни смущения.

IV. МЕТОДИ

IV. 1 Клиничен метод-анамнеза и физикален статус

- **Анамнеза**- Паспортни данни, Anamnesis morbi (сегашно заболяване), Anamnesis vitae (Анамнеза на живота), Социална анамнеза, Вредни навици, Anamnesis familiae (фамилна анамнеза), Преглед на оплакванията по системи (системен разпит). Оценка наличието на субективни оплаквания, сърдечно-съдови рискови фактори, придружаващи заболявания и терапия.
- **Физикален статус**- оглед, палпация, перкусия, аускултация. Измерване на ръста с ръстомер и измерване на теглото с медицинска теглилка.
- **Акушерска анамнеза и акушерски статус**
- **Клиничен метод/ Антропометрични методи** – измерване на ръст, тегло, регистриране на теглото преди бременността, изчисляване на ИТМ (ИТМ=кг./кв.м.)

IV. 2 Документален и социологически

- Анализ на документи – история на заболяването, епикризи от болнични пролежавания, фишове с резултати от проведени изследвания на болните.

IV. 3 Лабораторни изследвания:

Пълна кръвна картина, Електролити, Биохимия- кр.захар, урея, креатинин, пикочна киселина, общ холестерол, триглицериди, HDL, LDL, ASAT, ALAT, LDH, СРК, СК-МВ, общ белтък, албумин. Лабораторните изследвания се осъществиха в Централната Клинична Лаборатория на УМБАЛ „Д-р Георги Странски” Плевен. Взета беше венозна кръв в сутрешните часове между 8 и 10 ч в стерилни охладени вакутейнери, центрофугирана на около 1500 оборота и полученият серум и съхранявана при минус 20°С до момента на осъществяване на анализа с цел осигуряване на сравнимост на резултатите.

IV. 4 Имунологични изследвания

Анализът на маркерите обект на дисертационният труд се осъществи чрез имуноензимен количествен ELISA метод. Спазени бяха всички изисквания и процедури, определени от съответния производител. Серумните нива на MMP-2,-9,-8,-13 и TIMP-1 и -2 бяха изследвани със следните ELISA китове: Human Total MMP-8 Quantikine ELISA Kit, Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit, Human MMP-9 Quantikine ELISA Kit, Human TIMP-1 Quantikine ELISA kit, Human TIMP-2 Quantikine ELISA kit- R&D Systems и Human MMP-13 ELISA kit Reagent Genie; докато за подокаликсин- RJ-HUF100795 Human Podocalyxin ELISA kit (Reagent Genie). Имунологичните изследвания бяха осъществени в Катедра "Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология", Сектор "Клинична имунология и алергология".

IV.5 Неинвазивни методи за изследване на сърцето, съдовете и бременността

IV. 5.1 Измерване на артериално налягане- Измерване на артериално налягане според препоръките на СЗО: след десетминутен покой в седнало положение с маншет на мишницата. Използван е стандартен ръчен сфигмоманометър с разлика до 2mmHg. Осъществяват се 3 измервания с 2 минутен интервал между тях. За референтна се приема средната стойност. Измерванията се правят на двете ръце, като за референтна се приема по-високата стойност.

IV. 5.2 ЕКГ- стандартна 12-канална ЕКГ. Стандартната ЕКГ включва 12 отвеждания – 6 периферни от крайниците и 6 от прекордиалната област. Периферните отвеждания от крайниците са:

- Три двуполюстни (биполярни) отвеждания- I, II и III и са известни като стандартни или отвеждания на Айтнхофен. Три еднополюсни (униполярни) отвеждания – регистрират електрически потенциал (потенциалната разлика) между една точка от тялото, съответно от един крайник и сумата от останалите електроди. Те се отбелязват с три букви: aVR – отвеждане от дясна ръка (R- от right – дясно), aVL – отвеждане от лява ръка (L- от left – ляво), aVF – отвеждане от левия крак (F- от foot –
- Прекордиалните (гръдни) отвеждания са еднополюстни отвеждания и се отбелязват с буквата V и арабските цифри от 1 до 6 (V1; V2; V3; V4; V5 и V6).

IV. 5.3 Ехокардиография

Осъществяване на трансторакална ехокардиография с апарат Philips с 4 MHz трансдюсер от един и същ ехографист. Всички измервания бяха направени съгласно „European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI)” и „The American Society of

Echocardiography (ASE) criteria for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography” [312]. Бяха използвани едноразмерна ЕхоКГ- М-тип (едноразмерна ЕхоКГ), Двуразмерна ехокардиография (В-тип), М-мод, Доплер пулсова-вълна. Стойностите на всички ехокардиографски параметри бяха измерени като средна от 3 последователни сърдечни цикли. Оценката на глобалната ЛК функция е извършена чрез показателя фракция на изтласкване, изчислена чрез модифицираната формула на Simpson. Левокамерните крайни ситолични и диастолични размери и обеми бяха измерени чрез директен 2D достъп. Скоростите на митралния кръвоток бяха измерени от апикален 4-кухинен срез. Диастолната функция беше оценена като трансмитралните ранни диастолични (Е-вълна) и атриални (А-вълна) скорости бяха измерени, и отношението Е/А беше изчислено. Използвайки тъканен Доплер, ранни (e') и късни (a') диастолични митрални ануларни скорости бяха измерени от септалната страна на митралният анулус при апикален 4-кухинен срез с приравнено септално ануларно движение. *Доплер ехокардиография*- проследяване на движението на кръвта през сърдечните кухини и големите съдове. Определяне сърдечния дебит, както и структурата, дебелината и функционирането на сърдечните клапи.

IV. 5.4 Трансабдоминална ехография за определяне на Доплеров РІ на умбиликална и утеринна артерия

о Доплер РІ на маточните артерии- Доплеровото изследване е неинвазивен метод за изследване на утероплацентарната циркулация. Позитивират се три последователни вълнови криви и се измерва РІ на двете утеринни артерии и се изчислява средната стойност на двете. Настоящото изследване се състоя в осъществяване на абдоминална ехография чрез ултразвуков апарат от висок клас Philips Affiniti 70G с обемен 4-6 MHz трансдюсер. Изполва се средната стойност на пулсативния индекс на двете маточни артерии чрез Доплерова велосиметрия и се осъществи цветно и пулсово картиране. Вълновите криви на скоростта на кръвотока се регистрираха с 3.5 MHz и 5 MHz чрез трансабдоминален конвексен трансдюсер с 3.2 MHz доплерова честота. Използва се трансабдоминален достъп с поставяне на сондата в двете ингвинални области. Бяха спазени всички методични препоръки: “Доплеровото изследване да се извършва в легнало положение на бременната по гръб. Трансдюсерът се поставя успоредно на предна маточна стена в нейната истмична част така, че да се проследи а. ііаса comunis до мястото на бифуркацията ѝ. След това трансдюсерът се насочва медиално в същия план, при което се появява изображението на маточната артерия. Инсонационният прозорец се поставя приблизително на 1 см медиално от мястото, в което маточната артерия пресича а.

iliaca externa. След идентифицирането на всяка УТА се поставя пулсативен 'pulse wave' доплер с акустичен прозорец от 2 мм ширина, за да покрие целия съд. Специално внимание се обръща на ъгълът на инсонация, който трябва да е под 30 градуса. Максималното систолно налягане в съда трябва да бъде не по-малко и повече от 60 cm/s, за да може акуратно да се оцени точния съд, а не негово разклонение. Регулира се дълбочината така, че акустичния прозорец да попадне в лумена на съда. Ширината му се променя в зависимост от диаметъра на лумена на изследвания съд. В този момент, започва регистрирането на вълнови криви и звукови сигнали с типична за маточните артерии характеристика. Високата пулсативност се наблюдава при съдове с висока резистентност. Освен чрез измерване на индекси, вълновите криви на скоростта на кръвотока могат да се категоризират и по качествени критерии – липса на краен диастолен кръвоток, пост-систолна инцизура и др. Патологични нахоки в маточната артерия се наблюдават при усложнени бременности, с хипертония, прееклампсия, интраутеринно изоставане на растежа на плода, вродена тромбофилия и др." [280].

о Доплер PI на умбиликална артерия- Извършва се оценка по време на фетален покой. Ако е възможно се поддържа $PI < 0.5$ или поне < 1 чрез намаляване на акустичната изходна мощност. Определя се свободна примка от пълната връв на цветен доплер. Използва се високоцветен PRF, за избегване на алайзинг и консервативен гейн. Трансдюсерът се поставя в частта на пълна връв, прокаран успоредно на доплеровия лъч. Избягва се доплеровият лъч да е насочен към очите на плода. Оптимизира се спектралната доплерова базова линия, PRF и скоростта на размах, за получаване на голяма форма на вълната. Ако EDV е близо до базовата линия, филтърът трябва да е достатъчно нисък, за да покаже EDV. Тестът се интерпретира като абнормален при > 95 -ти персентил [313].

IV. 6 Статистически методи

Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS; SPSS и EXCEL for Windows. Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови показатели за структура, честота, средни стойности, корелационни коефициенти и др. Значимите резултати, изводи и заключения са определяни при $p < 0,05$. Приложени са следните статистически методи за анализ:

1. Описание на качествени променливи величини
2. Описание на количествени променливи величини

За измерването на централната тенденция са използвани два основни вида средни величини – алгебрични средни величини /средна аритмична/ и позиционни средни величини /медиана, мода, квантили, персентили/. Тестовите, използвани за проверка нормалността на разпределението и равенството на отклоненията, са Stnd. Skewness и Stnd. Kurtosis. За намиране значими разлики между групите, бе използван t-тест на Student и ANOVA със средна \pm SD в случаите с нормално разпределение (LSD, Tukey HSD, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan) и K-W H-тест с медиана (M) в случаите с различно от нормалното разпределение, заедно с първия и третия квантил Q1 и Q3; (двадесет и пети и седемдесет и пети персентил P25 и 75P).

3. Вариационен анализ

За измерване на варирането са използвани следните описателни числови характеристики: размах /обсег/ на вариационния ред - разликата между екстремалните стойности /максималната и минималната/; стандартно отклонение - средното отклонение на резултатите от средната аритмична и интерквантилен обхват.

4. Параметрични методи за проверка на хипотези – приложими само при количествени величини при нормално или близко до нормалното разпределение.

- t-критерий на Стюдент – използван е за сравняване на средни величини, коефициенти и пропорции.
- Дисперсионен анализ – еднофакторен и многофакторен дисперсионен анализ е използван за изучаване на значимите различия между резултатите в групите чрез метода на проверка F-критерий на Fisher.

5. Непараметрични методи за проверка на хипотези – приложими при количествени и качествени променливи независимо от формата на разпределението. Използвани са критерият на Пирсон /хи-квадрат/ и критерият на Kruskal-Wallis.

6. Корелационен анализ е използван за изучаване на връзката между измененията в зависимата променлива и съответните изменения в проучваните фактори. При наличие на

действителна връзка, тя е представена чрез коефициента на корелация r , който има числена стойност и знак $+/$ или $-/$. Числената стойност характеризира силата на корелационната зависимост, а знакът пред числото показва направлението на връзката – при знак $+/$ е налице положителна корелационна зависимост, а при знак $-/$ - отрицателна. При качествени алтернативни е използван коефициентът на корелация на Пирсон и специален критерий за факторно влияние като мярка за силата на връзката между един фактор и прогнозата на ПЕ, наречен отношение на шансовете $/OR - odds ratio/$. Отношението на шансовете се използва като приблизителна мярка на рисковото отношение за изход от заболяването в зависимост от определен рисков фактор или определена група рискови фактори. При количествени променливи величини е използван коефициентът на Пирсон, а при категорийни променливи, представени в ординална скала, количествени променливи и при една количествена и една качествена променлива, е използван ранговият коефициент на корелация на Спирман.

7. Регресионен анализ

Чрез приложението на логистичен регресионен анализ за описание на зависимостта между една зависима променлива и една или повече независими променливи се установява индивидуалното действие на всеки фактор. Посредством логистичния регресионен анализ се разработва пестелив биомедицински приемлив прогностичен модел, какъвто и създаден за болните с ПЕ. Този модел описва връзката между изхода от заболяването и едно множество от независими променливи фактори. Логистичният регресионен анализ е използван, за да се определи минимално множество от фактори $/$ модел $/$, чрез които може да се прогнозира вероятността един пациент да попадне в групата със събитие или в групата без събитие. Прилага се методът на Kaplan and Meier и се създава непараметричен модел на преживяемостта. Болните, които не са достигнали нито една от крайните цели за периода на проследяването са отстранени $/$ сензорирани $/$.

8. Тест χ^2 и тест на Фишер за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.

9. Бинарен логистичен регресионен анализ – за количествена оценка на факторите при дихотомен изход и изчисляване вероятностите за тези изходи.

10. Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA с post hoc tests Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan) – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

Таблица 1. Клинични данни на пациентките и контролите

	Нормална бременност	Прееклампсия	P
Възраст	24.7±5.4	24.9±6	p>0.05
ВМІ	26.7±4.2	34±7.3*	p<0.001*
Бременност	2(2) **	2(2)**	
Паритет	1(2) **	1(2) **	
САН (mmHg)	116.1±9.55	157.8±22*	p<0.001*
ДАН (mmHg)	75.3±7.76	100.5±10*	p<0.001*
Анамнеза за ПЕ	0/35	23/55	
Анамнеза за АХ	1/35	26/55	
АХ преди бременността	0/35	15/55	
ПН	40.8±7.32	57.3±16.1*	p<0.001*
Средно АН	88.8±7.69	119.7±13.1*	p<0.001*
Урея	2.96±0.78	3.75±1.63*	p=0.01*
Креатинин	75.78±14.45	73.33±15.33	p>0.05
Пикочна киселина	205.6±40.2	326.8±105.93*	p<0.001*
Общ белтък	68.89±3.16	58.71±8.78*	p<0.01*
Албумин	37.31±2.78	31.67±4.98*	p<0.01*
ASAT	8.43±2.33	20.67±7.82*	p<0.01*
ALAT	9.83±2.50	27.76±8.25*	p<0.01*
LDH	369±70.78	435.25±80.74*	P=0.04*
PLT	237.26±61.12	228.74±88.53	p>0.05
СРК	83.1±23.77	130.5±46.8*	P<0.05*
СК-МВ	15.3±3.3	24.3±7.9*	P<0.05*
Брой	(n=35)	(n=55)	

ВМІ- индекс на телесната маса; САН- систолично артериално налягане; ДАН- диастолично артериално налягане; ПЕ-прееклампсия; АХ-артериална хипертония; ПН- pulse pressure; ASAT- аспартат аминотрансфераза; ALAT- аланин аминотрансфераза; LDH- лактат дехидрогеназа; PLT- тромбоцити; СРК- креатин фосфокиназа; СК-МВ- изоензимна МВ креатин фосфокиназа. Данните са представени като средна±SD; *p<0.05; **Данните са представени чрез медиана (първи и трети квартил Q1 и Q3; двадесет и пети и седемдесет и пети персентил P25 и 75P

V. РЕЗУЛТАТИ

V.1. РЕЗУЛТАТИ ОТ ДОПЛЕРОВОТО ИЗМЕРВАНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА УМБИЛИКАЛНА И УТЕРИННА АРТЕРИЯ ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

При анализиране разпределението на пациентките от изследваната група с преекламписия ($n=55$) в зависимост от времето на манифестацията и тежестта на заболяването се получиха следните резултати: 41 случая с ранна vs. 14 случая с късна преекламписия и 29 случая с лека vs. 26 случая с тежка преекламписия. Средният пулсативен индекс на артерия утерина и средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис са сигнификантно по-високи при преекламписия спрямо нормална бременност, съответно 1.19 ± 0.44 vs. 0.79 ± 0.12 ($F=28.15$; $p=0.0001$) и 1.24 ± 0.35 vs. 1.09 ± 0.14 ($F=5.87$; $p=0.02$) (Таблица 2).

Таблица 2. Среден пулсативен индекс на артерия утерина и среден пулсативен индекс на артерия умбиликалис при преекламписия спрямо нормална бременност

	Нормална бременност	Преекламписия	P
Umbilical artery mean PI (UmA)	1.09 ± 0.14	1.24 ± 0.35	$P=0.02^*$
Uterine artery mean PI (UtA)	0.79 ± 0.12	1.19 ± 0.44	$P=0.0001^*$

UtA- среден пулсативен индекс на артерия утерина, UmA- среден пулсативен индекс на артерия умбиликалис. Стойностите са средна $\pm SD$

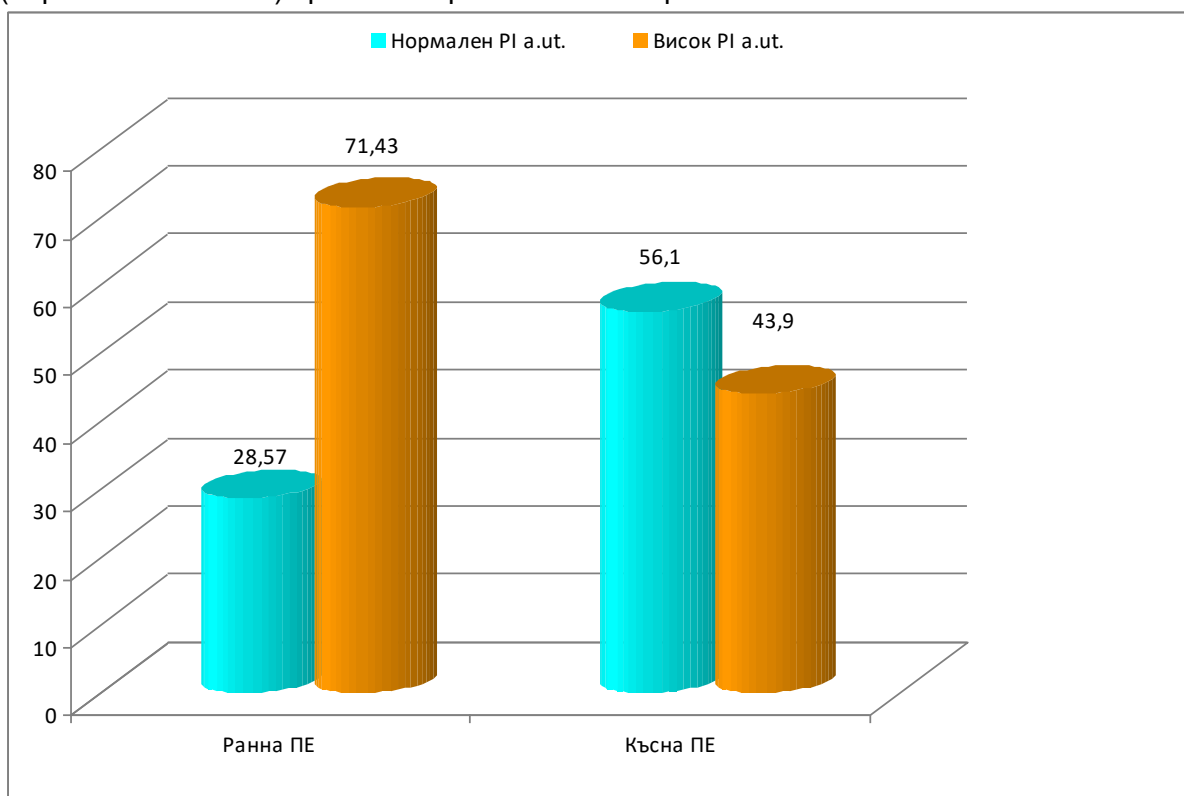
V.2. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА И А.УМБИЛИКАЛИС СПОРЕД ВРЕМЕТО НА МАНИФЕСТАЦИЯТА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯТА

2.1 ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА ПРИ РАННА И КЪСНА ПРЕЕКЛАМПСИЯ

При ранна преекламписия в 71.43% от случаите се открива висок UtA PI, докато 28.57% са с нормален индекс ($\chi^2=3.16$; $p=0.04$).

При късна преекламписия в 43.9% от случаите се открива висок UtA PI, докато 56.1% са с нормален индекс (**Фигура 1**).

Фигура 1. Процентно съотношение на среден пулсативен индекс на а.утерина (нормален vs. висок) при жени с ранна и късна преекламписия

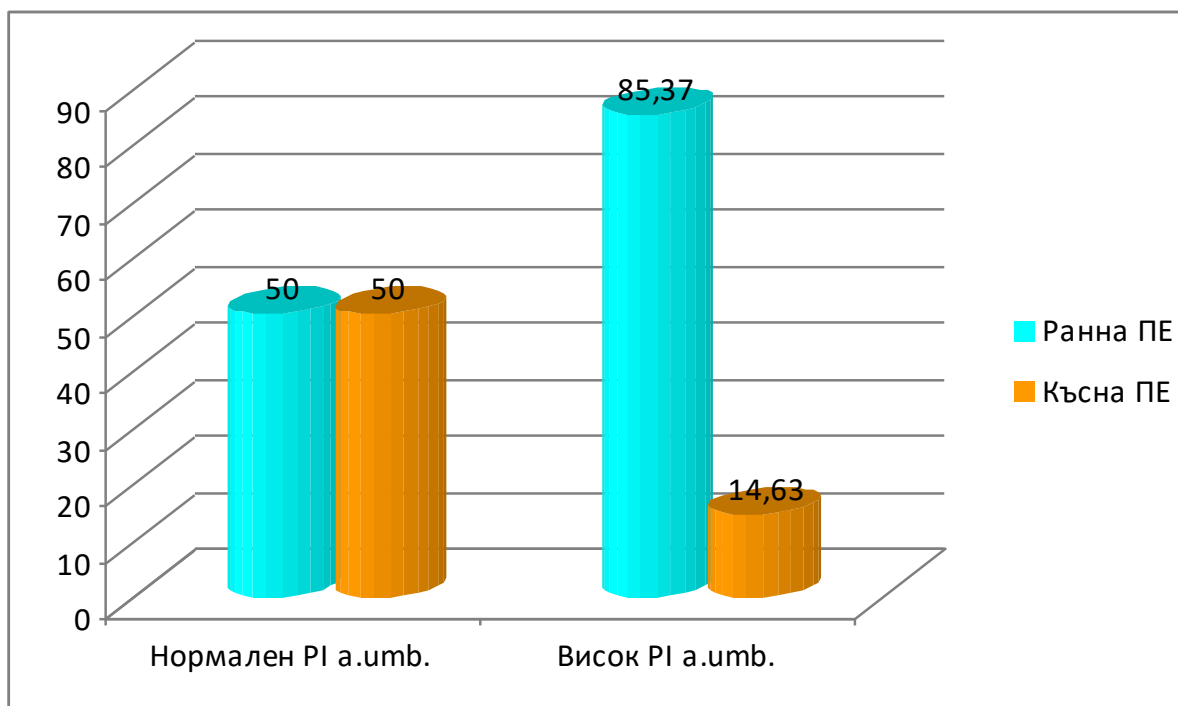


2.2 ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УМБИЛИКАЛИС ПРИ РАННА И КЪСНА ПРЕЕКЛАМПСИЯ

При ранна преекламписия в 50% от случаите се открива висок UmA PI и 50% са с нормален индекс.

При късна преекламписия в 85.37% от случаите се открива висок UmA PI, докато 14.63% са с нормален индекс ($\chi^2=7.23$; $p=0.003$) (Фигура 2).

Фигура 2. Процентно съотношение на среден пулсативен индекс на а.умбиликалис (нормален vs. висок) при жени с ранна и късна преекламписия



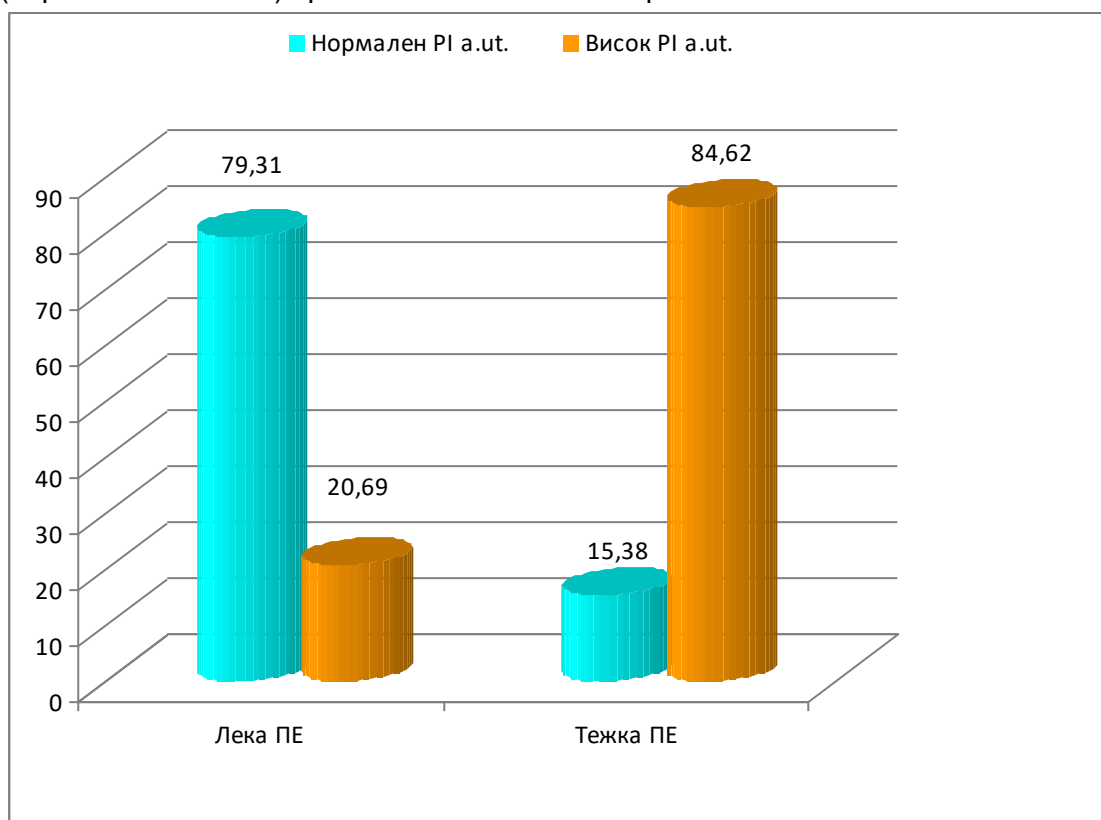
V.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА И А.УМБИЛИКАЛИС СПОРЕД ТЕЖЕСТТА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯТА

3.1 ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА ПРИ ЛЕКА И ТЕЖКА ФОРМА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯ

При лека преекламписия в 20.69% от случаите се открива висок UtA PI, докато 79.31% са с нормален индекс .

При тежка преекламписия в 84.62% от случаите се открива висок UtA PI, докато 15.38% са с нормален индекс ($\chi^2=22.42$; $p=0.0001$) (Фигура 3).

Фигура 3. Процентно съотношение на среден пулсативен индекс на а.утерина (нормален vs. висок) при жени с лека и тежка преекламписия

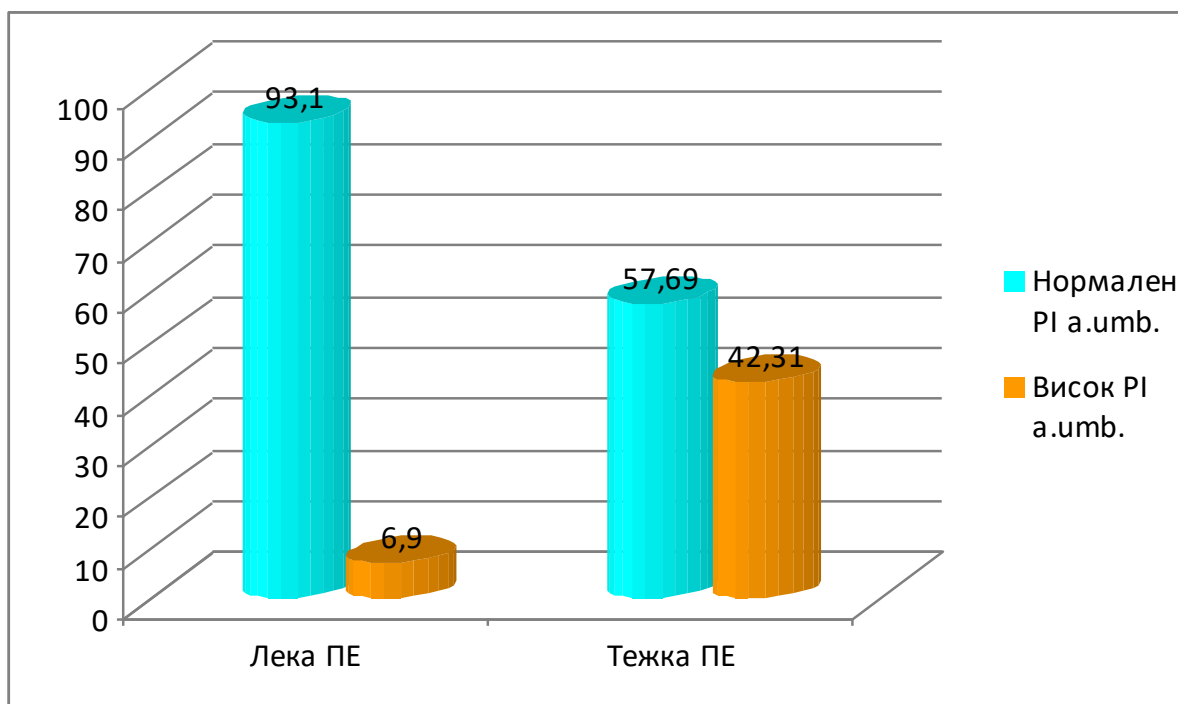


3.2 ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УМБИЛИКАЛИС ПРИ ЛЕКА И ТЕЖКА ФОРМА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯ

При лека преекламписия в 6.9% от случаите се открива висок UmA PI, докато 93.1% са с нормален индекс ($\chi^2=7.66$; $p=0.006$).

При тежка преекламписия в 42.31% от случаите се открива висок UmA PI, докато 57.69% са с нормален индекс (Фигура 4).

Фигура 4. Процентно съотношение на среден пулсативен индекс на а.умбиликалис (нормален vs. висок) при жени с лека и тежка преекламписия



V.4. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЕХОКАРДИОГРАФСКОТО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

LVEDD, LVESV, IVS, LVPWD, EF%, E/e' параметрите са сигнификантно по-високи при преекламписия спрямо нормална бременност ($p < 0.05$) (Таблица 3).

Таблица 3. Ехокардиографски показатели на жените с преекламписия и нормална бременност

	Нормална бременност	Преекламписия	P
LVEDD	46.06±1.51	47.67±2.83*	p=0.003*
LVESD	28.23±1.48	29.84±2.43*	p=0.0007*
IVS	9.47±0.86	10.74±0.93*	p<0.01*
LVPWD	9.03±1.04	10.4±1.31*	p<0.001*
EF%	68.28±1.98	64.69±5.14*	p=0.0002*
E/e'	9.64±1.02	11.76±0.77*	p<0.001*
Брой	35	55	

LVEDD- левокамерен краен диастоличен диаметър, LVESD- левокамерен краен систоличен диаметър, IVS- дебелина на междукамерният септум, LVPWD- дебелина на задната стена на лявата камера, EF%- фракция на изтласкване на лява камера, * $p < 0.05$, Стойностите са средна \pm SD

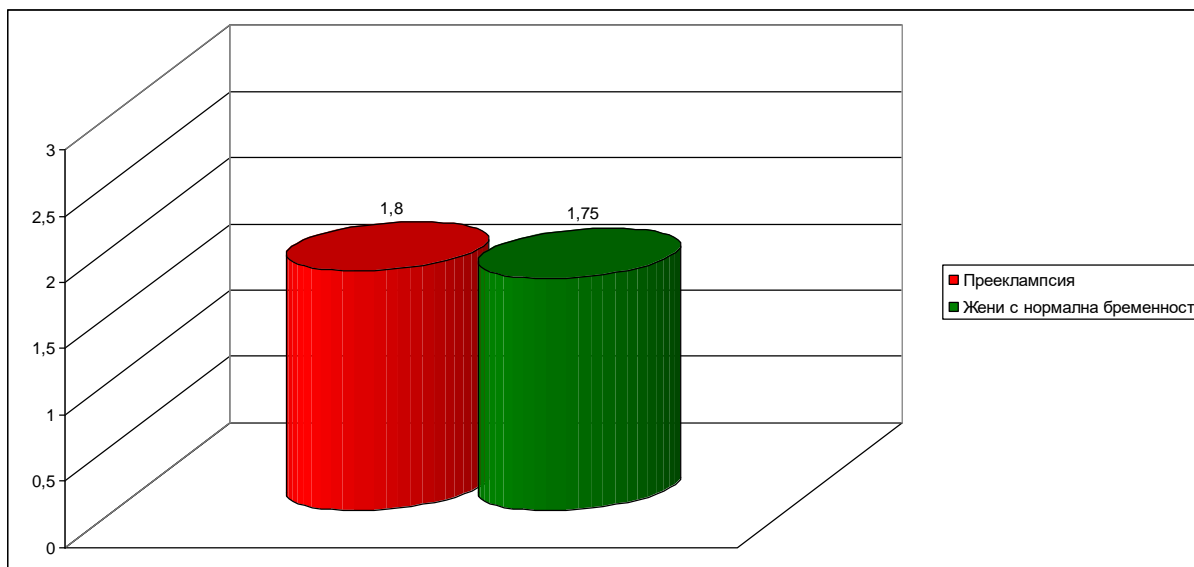
V.5. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА КОЛАГЕНАЗИТЕ MMP-8, -13 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Проведените изследвания показват, че серумните нива на MMP-8 при жени с нормална бременност са по-ниски спрямо пациентки с преекламписия 1,75 (1,36÷3,2) vs. 1,8 (1,26÷3,0), като тези стойности не са значими ($p>0,05$) (Таблица 4; Фиг. 5). MMP-13 нивата при пациентки с преекламписия са по-високи спрямо тези на жени с нормална бременност 0,18 (0,16÷0,2) vs. 0,17 (0,15÷0,2), като тези стойности не са значими ($p>0,05$) (Таблица 4; Фиг. 6).

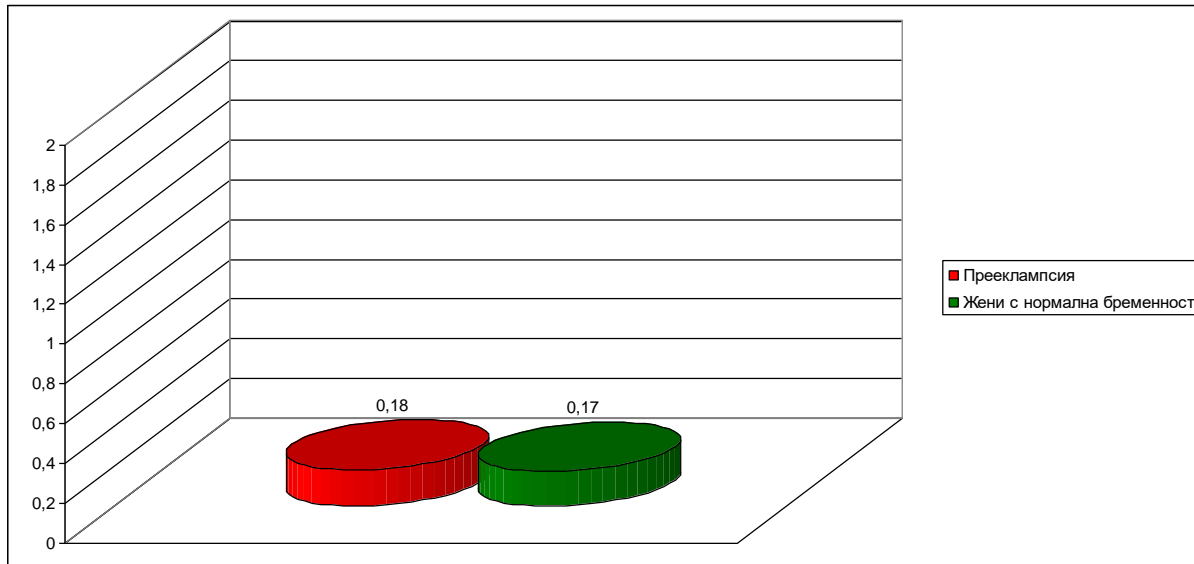
Таблица 4. Стойности на серумни MMP-8, -13 при жени с нормална бременност и при пациентки с преекламписия

	Жени с нормална бременност	Преекламписия	P
MMP-8 (ng/ml)	1.75 (1.36÷3.2)	1.8 (1.26÷3.0)	$p>0.05$
MMP-13 (ng/ml)	0.17 (0.15÷0.2)	0.18 (0.16÷0.2)	$p>0.05$

Стойностите са представени като медиана (M), заедно с първи и трети квартил Q1 и Q3 (двадесет и пети и седемдесет и пети персентил P25 и 75P).



Фигура 5. Серумни нива на MMP-8 при жени с преeklampсия и нормална бременност



Фигура 6. Серумни нива на MMP-13 при жени с преeklampсия и нормална бременност

V.6. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ЖЕЛАТИНАЗИТЕ MMP-2, -9 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

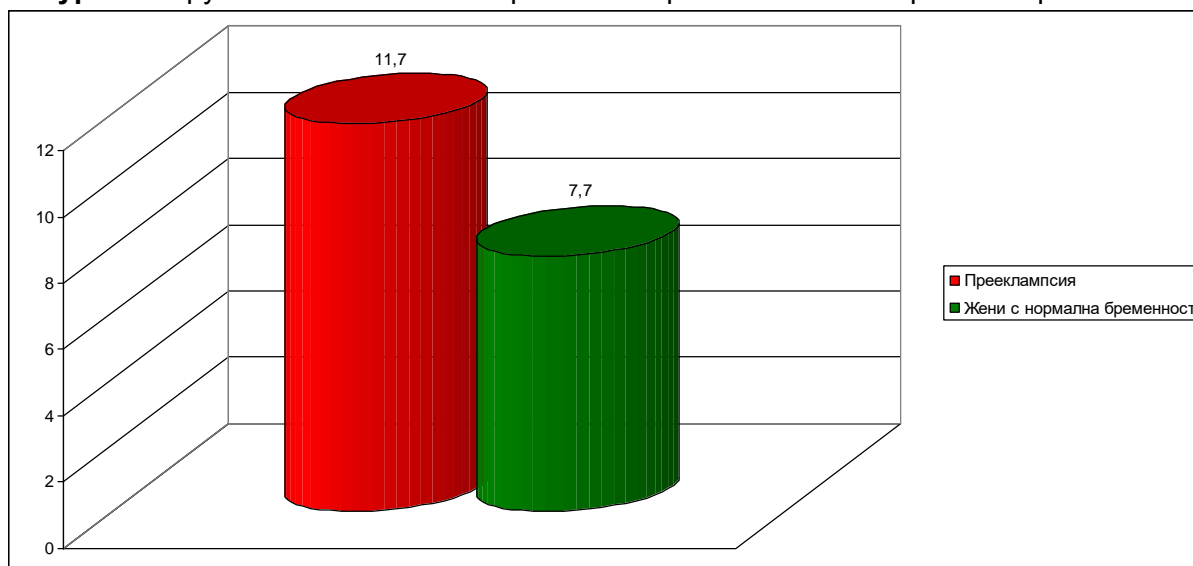
Проведените изследвания показват, че серумните нива на MMP-2 при пациентки с преекламписия са статистически значимо по-високи в сравнение с жени с нормална бременност 11.7 (9.1÷15.5) vs. 7.7 (6.5÷13.4), (KW=5.78; P=0.02) (Таблица 5; Фиг. 7). MMP-9 нивата при жени с нормална бременност са по-високи спрямо пациентки с преекламписия 4.54 (3.47÷6.57) vs. 3.95 (3÷7.06), като тези стойности не са значими ($p>0,05$) (Таблица 5; Фиг. 9).

Таблица 5. Стойности на серумни MMP-2, -9 при жени с нормална бременност и при пациентки с преекламписия

	Жени с нормална бременност	Преекламписия	P
MMP-2 (ng/ml)	7.7 (6.5÷13.4)	11.7 (9.1÷15.5)*	$p=0.02^*$
MMP-9 (ng/ml)	4.54 (3.47÷6.57)	3.95 (3÷7.06)	$p>0.05$

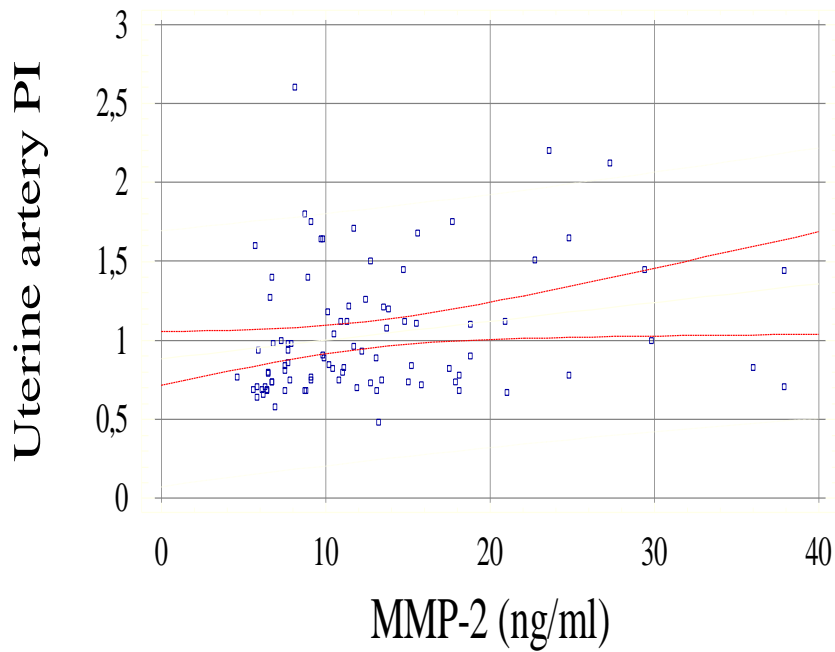
Стойностите са представени като медиана (M), заедно с първи и трети кватил Q1 и Q3 (двадесет и пети и седемдесет и пети персентил P25 и 75P).

Фигура 7. Серумни нива на MMP-2 при жени с преекламписия и нормална бременност

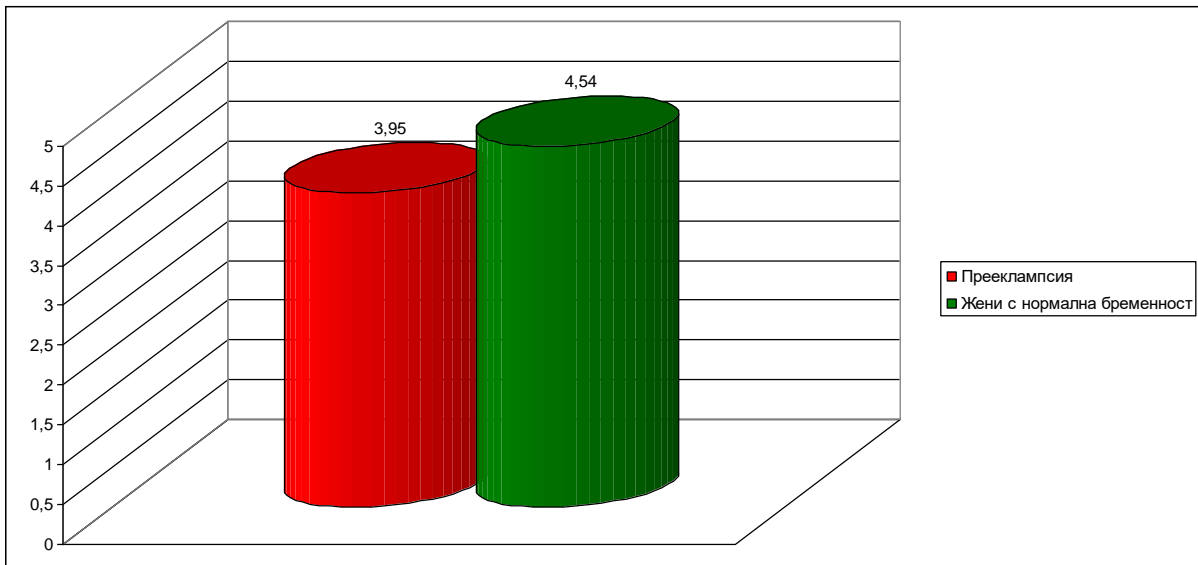


MMP-2 показва корелация със средният пулсативен индекс на артерия утерина (UtA) ($r=0.21$; $p=0.04$) (Фиг. 8).

Фигура 8. Линеарен регресионен анализ, описващ връзката между MMP-2 и UtA PI



Съществува статистически значима връзка между MMP-2 и UtA PI на доверително ниво 95% ($r=0.21$; $p=0.04$)



Фигура 9. Серумни нива на MMP-9 при жени с преeklampсия и нормална бременност

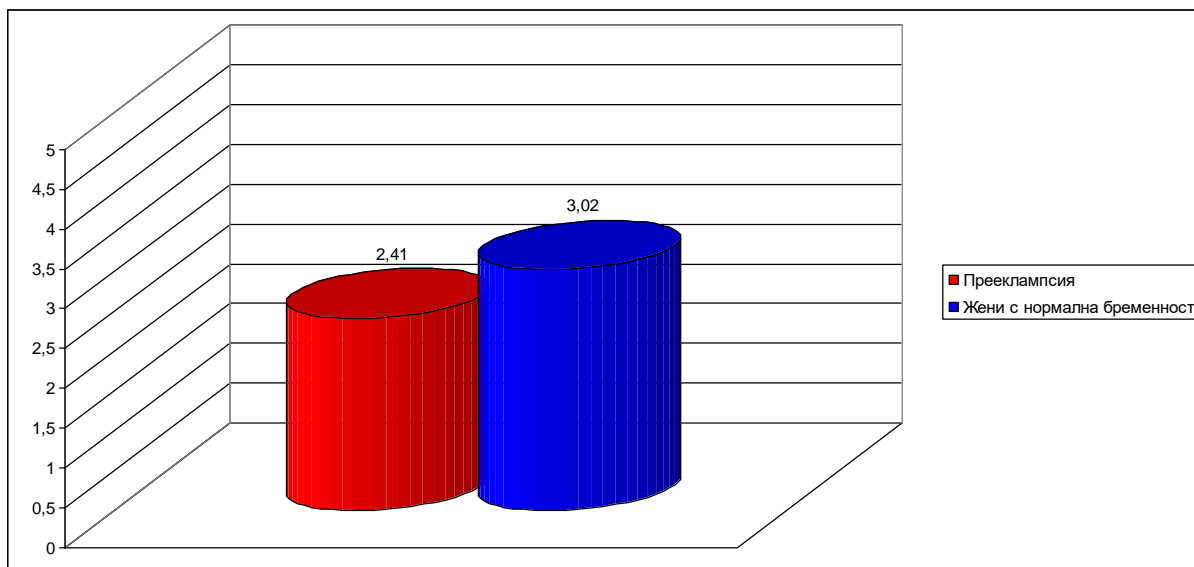
V.7. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА TIMP-1, -2 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Проведените изследвания показват, че серумните нива на TIMP-1 при жени с нормална бременност са по-високи спрямо пациентки с преекламписия 3.02 (1.28÷3.58) vs. 2.41 (1.01÷4), като тези стойности не са значими ($p>0,05$) (Таблица 6; Фиг. 10). TIMP-2 нивата при жени с нормална бременност са по-ниски спрямо пациентки с преекламписия 0.69 (0.41÷1.08) vs. 0.86 (0.45÷1.51), като тези стойности не са значими ($p>0,05$) (Таблица 6; Фиг. 11).

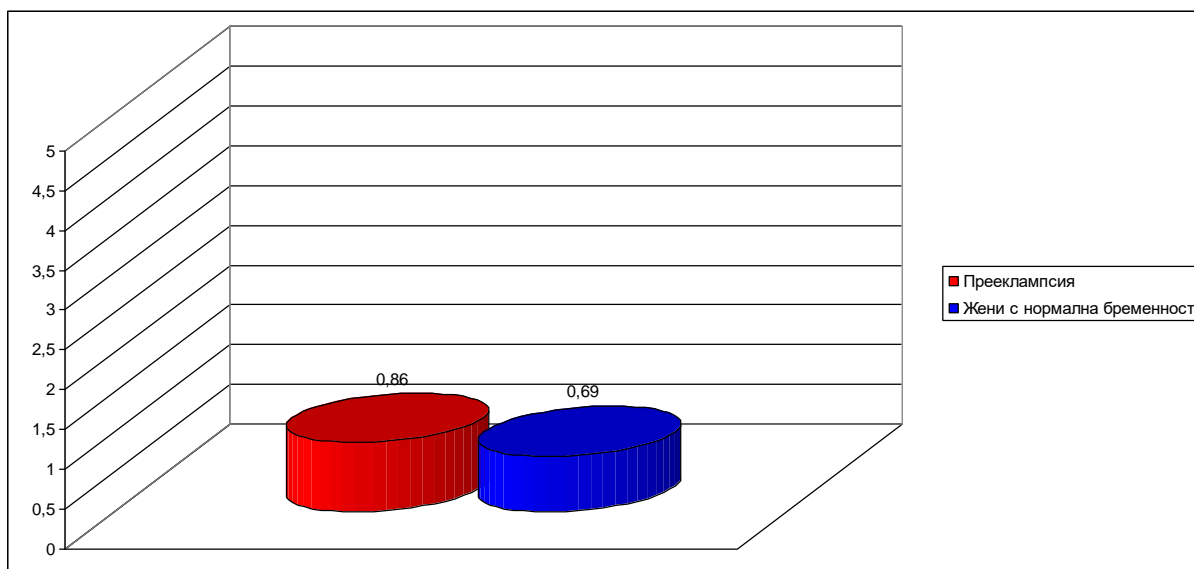
Таблица 6. Стойности на серумни TIMP-1, -2 при жени с нормална бременност и при пациентки с преекламписия

	Жени с нормална бременност	Преекламписия	P
TIMP-1 (ng/ml)	3.02 (1.28÷3.58)	2.41 (1.01÷4)	$p>0.05$
TIMP-2 (ng/ml)	0.69 (0.41÷1.08)	0.86 (0.45÷1.51)	$p>0.05$

Стойностите са представени като медиана (M), заедно с първи и трети квантил Q1 и Q3 (двадесет и пети и седемдесет и пети персентил P25 и 75P).



Фигура 10. Серумни нива на TIMP-1 при жени с преeklampсия и нормална бременност



Фигура 11. Серумни нива на TIMP-2 при жени с преeklampсия и нормална бременност

V.8. РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА СЕРУМЕН ПОДОКАЛИКСИН ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

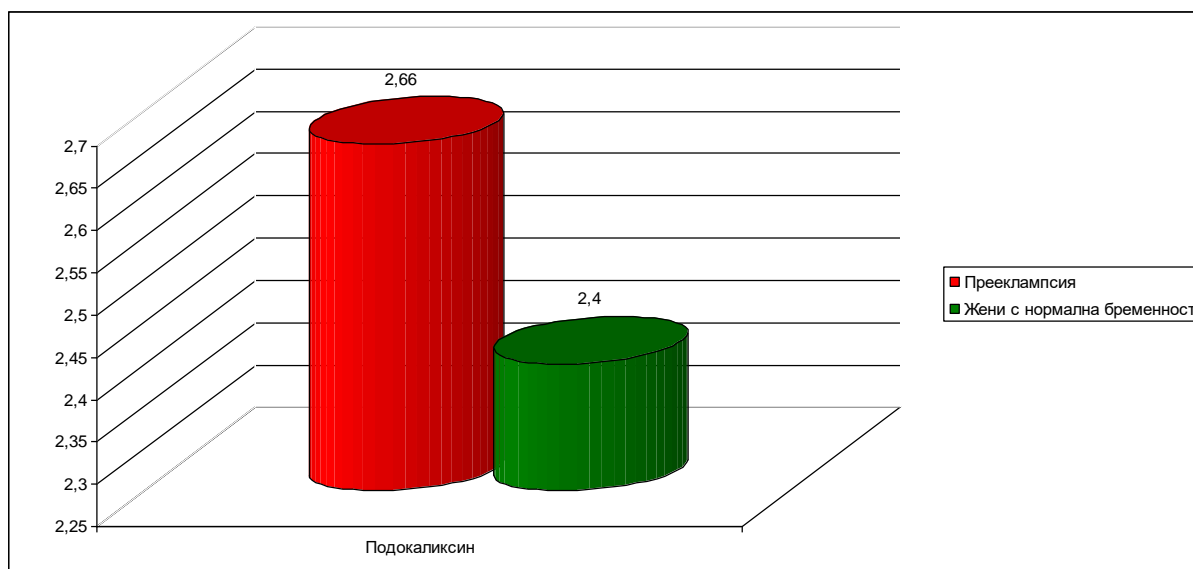
Проведените изследвания показват, че серумните нива на Подокаликсин при пациентки с прееклампися са сигнификантно завишени спрямо жени с нормална бременност 2.66 ± 0.67 vs. 2.40 ± 0.33 , ($F=4.59$; $P=0.03$) (Таблица 7; Фиг. 12).

Таблица 7. Стойности на серумен Подокаликсин при жени с нормална бременност и при пациентки с прееклампися

	Жени с нормална бременност	Прееклампися	P
Подокаликсин	2.40 ± 0.33	$2.66 \pm 0.67^*$	$P=0.03^*$

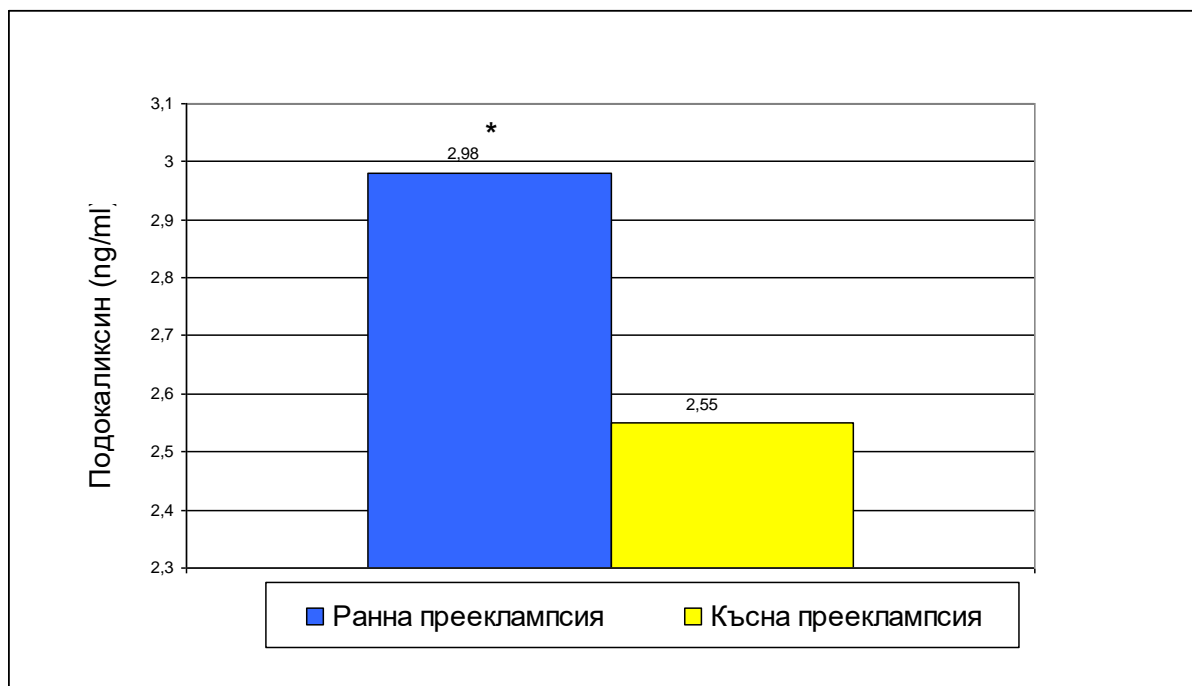
Стойностите са представени като средна \pm SD

Фигура 12. Стойности на серумен Подокаликсин при жени с нормална бременност и при пациентки с прееклампися



Серумните Подокаликсинивни нива при жените с ранна прееклампися статистически сигнификантно по-високи от тези при жените с късна прееклампися: 2.98 ± 1.06 vs. 2.55 ± 0.43 ng/ml ($p=0.03$) (Фигура 13).

Фигура 13. Серумни Подокаликсинови нива при жени с ранна и късна прееклампися



Беше дефинирана прагова стойност от 3ng/ml за серумен подокаликсин, която разграничава прееклампися от нормална бременност.

Логистичният регресионен модел показва статистическа значимост: OR=3.226; (95% CI=1.084÷9.599); (p=0.019). Конструираният прогностичен модел показва, че завишените серумни подокаликсинови нива индицират 3 пъти по-висока вероятност за развитие на прееклампися, спрямо здрави бременни жени без повишени нива (Таблица 8).

Таблица 8. Логистичен регресионен модел за оценка връзката между подокаликсин и развитието на прееклампися

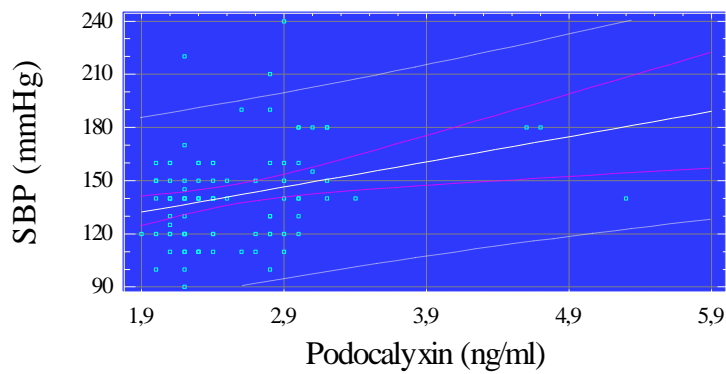
Променлива	β	SE	df	Sig.	Exp (β)	95% CI for Exp (β)	p
Подокаликсин	1.171	0.556	1	0.035	3.226	1.084÷9.599	0.019*

*p<0.05

Подокаликсинът показва корелация със систоличното артериално налягане ($r=0.30$; $p=0.004$), диастоличното артериално налягане ($r=0.35$; $p=0.0007$), пикочната киселина ($r=0.32$; $p=0.002$), СРК ($r=0.22$; $p=0.03$) и СК-МВ ($r=0.21$; $p=0.04$), средният пулсативен индекс на артерия утерина ($r=0.30$; $p=0.004$), средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис ($r=0.21$; $p=0.047$), дебелината на междукамерният септум ($r=0.32$; $p=0.002$) и дебелината на задната стена на лявата камера ($r=0.28$; $p=0.007$).

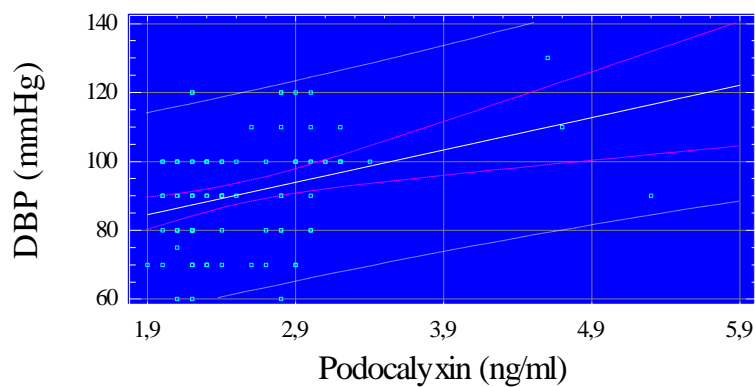
Съществува статистически значима връзка между Подокаликсин и САН на доверително ниво 99% ($r=0.30$; $p=0.004$) (Фигура 14).

Фигура 14. Линеарен регресионен анализ, описващ връзката между Подокаликсин и САН



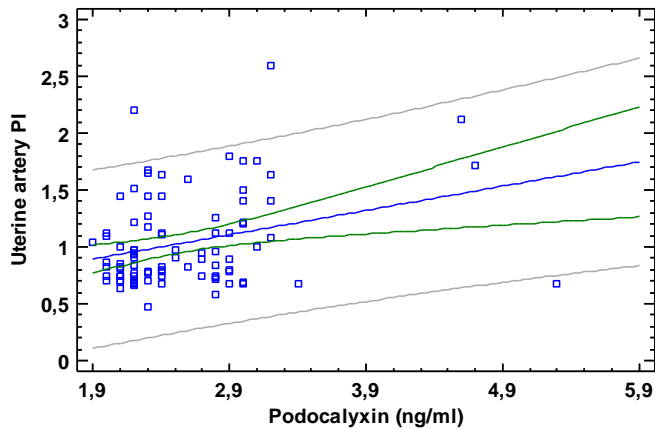
Съществува статистически значима връзка между Подокаликсин и ДАН на доверително ниво 99% ($r=0.35$; $p=0.0007$) (Фигура 15).

Фигура 15. Линеарен регресионен анализ, описващ връзката между Подокаликсин и ДАН



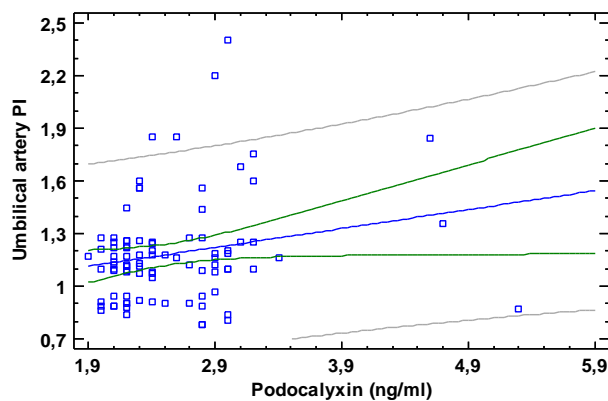
Съществува статистически значима връзка между Подокаликсин и средният пулсативен индекс на артерия утерина на доверително ниво 99% ($r=0.30$; $p=0.004$) (Фигура 16).

Фигура 16. Линеарен регресионен анализ, описващ връзката между Подокаликсин и средният пулсативен индекс на артерия утерина



Съществува статистически значима връзка между Подокаликсин и средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис на доверително ниво 99% ($r=0.21$; $p=0.047$) (Фигура 17).

Фигура 17. Линеарен регресионен анализ, описващ връзката между Подокаликсин и средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис



VI. ОБСЪЖДАНЕ

MMPs и техните инхибитори TIMPs са важни медиатори на съдовата реактивност. Все повече изследвания демонстрират, че промените в тяхната активност играят важна роля в патофизиологията на прееклампсията.

Абнормалната промяна в съотношението MMP/TIMP при прееклампсия показва, че ЕЦМ обмяна е нарушена. При нормална бременност нарастването на отношението MMP/TIMP индуцира металопроотеиназната активност и благоприятства ЕЦМ деградация. Това е важно при осъществяване инвазията на маточната стена от цитотрофобласта. Значителният спад в горе-споменатото съотношение предполага среда, която действа срещу миометриалната инвазия. Последващо нарушение на плацентарната перфузия може да доведе до относителна или абсолютна фетална хипоксия и абнормална функция на плацентата и хипертония по време на бремеността, която може да резултира в прееклампсия.

В настоящето проучване, проследихме ролята в патогенезата и възможностите за диагноза и прогноза на прееклампсията на серумни матриксни металопроотеинази, техните инхибитори, подокаликсин и майчини ехографски параметри.

Получените резултати дават основание да се смята, че определени MMP играят важна роля в процеса на съдовото ремоделиране, развитието и прогресията на прееклампсията. Тези данни могат да бъдат използвани, за да разяснят абнормалитета в структурата и функцията на съдовата стена, отговорен за съдовото ремоделиране.

Нашето изследване повдига перспективата, че неинвазивният серологичен маркер подокаликсин е свързан с нарушенията в структурата и функцията на утеринни и умбиликална артерии, и е възможно да играе роля в патологичното съдово ремоделиране при прееклампсия. Това се потвърждава и от корелацията между серумните стойности на подокаликсин с Доплеровите ултразвукови показатели среден пулсативен индекс на утеринна и умбиликална артерия.

Беше установено, че прагова стойност на серумен подокаликсин, разграничава прееклампсия от нормална бременност. Нещо повече, завишените серумни подокаликсинови нива индицират 3 пъти по-висока вероятност за развитие на прееклампсия, спрямо здрави бременни жени без повишени нива. Определянето на серумният подокаликсин може да представи важна информация с диагностична и прогностична цел при пациентките с прееклампсия.

1. ИЗМЕРВАНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА УМБИЛИКАЛНА И УТЕРИННА АРТЕРИЯ ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Доплеровият UtA PI оценява скоростта на кръвния ток в утеринните артерии и по този начин може да идентифицира жени с повишен риск за развитие на усложнена бременност свързана с утероплацентарна недостатъчност (предимно във втори триместър) преди клиничната изява [313]. Повишените Доплерови UtA PI са свързани с развитие на ПЕ и неблагоприятни събития по време на бременността [314]. Използването на UtA PI за предиктиране на ПЕ е широко проучвано във II и I триместър на бременността. Абнормалната плацентарна функция, която характеризира ПЕ е свързана с повишена резистентност на кръвния ток на утероплацентарната циркулация. Това се доказва ултрасонографски с повишен UtA PI. Известно е, че тази процедура има по-голяма диагностична и предиктивна стойност при използването ѝ във II отколкото в I триместър на бременността и играе голяма роля в предиктирането на тежка или ранна ПЕ в ниско-рискова популация [315]. Проучванията показват, че повишеният UtA PI има чувствителност 78% и специфичност 95% за предказването на тежка ПЕ при приложение във II триместър [316].

Доплеровият UmA PI е маркер за състоянието на плода и може да бъде полезен за феталното проследяване във високо-рискови бременности. Той оценява импеданса във фето-плацентарната циркулция и индиректно измерва кръвотока в плацентарната васкулатура [317,318,319]. Повишеният UmA PI е показател за абнормален кръвен ток в умбиликалната артерия, плацентарна недостатъчност и последващ интраутеринен забавен разтеж на плода или за суспектна ПЕ. Определянето на UmA PI намалява перинаталната заболяемост и смъртност във високо-рисковите акушерски ситуации [320,321,322,323].

При анализиране разпределението на пациентките от изследваната група с преекламписия (n=55) в зависимост от времето на манифестацията и тежестта на заболяването се получиха следните резултати: 41 случая с ранна vs. 14 случая с късна преекламписия и 29 случая с лека vs. 26 случая с тежка преекламписия. Средният пулсативен индекс на артерия утерина и средният

пулсативен индекс на артерия умбиликалис са сигнификантно по-високи при прееклампсия спрямо нормална бременност.

2. АНАЛИЗ НА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА И А.УМБИЛИКАЛИС СПОРЕД ВРЕМЕТО НА МАНИФЕСТАЦИЯТА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯТА

Плацентата играе ключова роля в етиологията на прееклампсията. Въпреки че, патогенеза ѝ е все още неясна, прееклампсията се определя клинично от първичното плацентарно увреждане [324,40]. Ранната прееклампсия „плацентарна ПЕ“ е резултат от нарушена трофобластна инвазия в спиралните артерии, причинявайки плацентарна исхемия и оксидативен стрес. Плацентарната хистология при ранна ПЕ или забавен разтеж на плода често демонстрира абнормални промени във вилозните разклонения, подкрепяйки тази теория [325]. Ранната ПЕ се наблюдава по рядко (0.4-1%), отколкото късната ПЕ, но е отговорна за по-тежкото протичане на заболяването поради преждевременост и забавен разтеж на плода [326,327,328]. Освен това се наблюдава и повишена майчина сърдечно-съдова заболяемост в дългосрочен план. Късната прееклампсия „майчина ПЕ“ е вторична на сърдечно-съдово и метаболитно предразположение на майката към генерализирана ендотелна дисфункция и има подобни рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания както при възрастните- АХ, обезитет, НГТ и дислипидемия [329]. Плацентата в такива случаи може да изглежда нормална или да има минимални хистологични промени. Следователно, UtA PI може да остане в нормални стойности. Една от основните патогенетични разлики между ранна и късна ПЕ е, че ранната ПЕ е определено свързана с увреждане на плацентата, докато при късна ПЕ плацентата обикновено е нормална при клинично-патологично изследване. Следователно и ранната и късната ПЕ са резултат от един и същ фактор- малперфузия, който има много различни причини.

Нашите данни показват, че при ранна прееклампсия в 71.43% от случаите се открива висок UtA PI. Тези резултати потвърждават нарушената

трофобластна инвазия в спиралните артерии, причинявайки плацентарна исхемия и оксидативен стрес. Въпреки, че ранната ПЕ се наблюдава по рядко отколкото късната ПЕ, тя е отговорна за по-тежкото протичане на заболяването поради преждевременост и забавен разтеж на плода. Освен това се наблюдава и повишена майчина сърдечно-съдова заболяемост в дългосрочен план.

При късна преекламписия в 43.9% от случаите се открива висок UtA PI, което показва, че сърдечно-съдовото и метаболитно предразположение на майката към ендотелна дисфункция играе по-голяма роля в патогенезата на късна ПЕ.

При късна преекламписия в 85.37% от случаите в изследваната популация се открива висок UmA PI, показвайки значимо нарушение на фетоплацентарната циркулация. При ранна преекламписия в 50% от случаите се открива висок UmA PI, което потвърждава доказателствата, че определянето на UmA PI намалява перинаталната заболяемост и смъртност във високо-рисковите акушерски ситуации.

3. АНАЛИЗ НА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СРЕДЕН ПУЛСАТИВЕН ИНДЕКС НА А.УТЕРИНА И А.УМБИЛИКАЛИС СПОРЕД ТЕЖЕСТТА НА ПРЕЕКЛАМПСИЯТА

При тежка преекламписия в 84.62% от случаите на изследваните пациентки се открива висок UtA PI. Тези резултати потвърждават, че определянето на Доплеровият UtA PI може да идентифицира жени с повишен риск за развитие на усложнена бременност свързана с утероплацентарна недостатъчност [330,273,274]. Установените закономерности предполагат, че с увеличаване на тежестта на ПЕ се наблюдава нарушаване на утероплацентарната циркулация водеща до плацентарна исхемия, намалено маточно перфузионно налягане, абнормално ЕЦМ съдово и маточно ремоделиране. Големият процент случаи (84.62%) с тежка ПЕ, при които се открива висок UtA PI са аргумент в полза на тази хипотеза.

При лека прееклампися, 93.1% от случаите са с нормален UmA PI. Това до голяма степен не показва значимо нарушение на фетоплацентарната циркулация и интраутеринен забавен разтеж на плода. Така се потвърждават и данните от множество проучвания, че определянето на UmA PI намалява перинаталната заболяемост и смъртност във високо-рисковите акушерски ситуации.

4. ЕХОКАРДИОГРАФСКО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Резултатите от трансторакалната ехокардиография при прееклампися показват наличие на диастолна дисфункция, повишени левокамерен краен диастоличен диаметър, левокамерен краен систоличен диаметър, дебелина на междукамерният септум и дебелина на задната стена на лявата камера спрямо контролите. Въпреки че, стойностите на тези параметри попадат в референтните граници, изброените ехокардиографски показатели бяха сигнификантно по-високи при прееклампися спрямо жени с нормална бременност. Нещо повече, дебелина на междукамерният септум и дебелина на задната стена на лявата камера показаха корелация с подокаликсиновите нива.

В голям брой проучвания се съобщава, че ехокардиографската оценка на пациенти с прееклампися показва находка като: повишена камерна маса, хипертрофия на лявата камера, уголемяване на лявото предсърдие и диастолна дисфункция [275,276,331, 277,278,322,333].

В настоящето изследване беше намерена връзка между РСХ и специфични ехокардиографски показатели като дебелина на междукамерният септум и дебелина на задната стена на лявата камера. Тези резултати предполагат възможно взаимодействие между РСХ и определени сърдечни структури. Въпреки това, за да бъдат открити конкретните структурни изменения, са нужни по-специфични методи като имунохистохимия или имуноцитохимия с анализ на тъканни проби и оценка на подокаликсиновата експресия в тях. Това би помогнало да се оцени точно кои тъкани отделят подокаликсин в серума при прееклампися.

Гореспоменатите фактори участват в централните пътища на развитието и прогресията на прееклампсията. **Намерените данни в нашето изследване предполагат, че взаимодействие между РСХ и специфични сърдечни структури може да допринесе за патологични сърдечно-съдови промени, развитие на хипертония по време на бременност и последваща прееклампсия.**

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОЛАГЕНАЗИ MMP-8, -13 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

В нашето проучване за първи път бяха изследвани нивата на серумна MMP-8 при прееклампсия. Пациентките показаха по-високи нива на MMP-8, като разликите спрямо жените с нормална бременност не бяха значими.

Колагеназата MMP-8 отговаря главно за деградацията на интерстициалните колагени тип I, II и III. Настоящите резултати предполагат, че липсата на значими промени в концентрацията на тази металопротеиназа са свързани с нейна понижена активност (индицираща и забавена обмяна на този тип колагени). **Взети заедно, тези данни повдигат перспективата, че MMP-8 не участва активно в патогенезата на прееклампсията.**

Що се отнася до MMP-13, беше установено, че нейните нива при пациентки с прееклампсия са по-високи спрямо жени с нормална бременност, като тези стойности не са значими. Подобни са и резултатите на М.Ласковска [146], която през 2017г. установява статистически незначимо повишени MMP-13 нива както при ранна, така и при късна ПЕ спрямо контролна група с неусложнена бременност.

6. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЖЕЛАТИНАЗИ MMP-2, -9 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Изследвайки MMP-2 при ПЕ установихме, че серумните нива на MMP-2 при жените с преекламписия бяха статистически значимо по-високи отколкото при жените с нормална бременност. В допълнение на това, MMP-2 показва корелация със средният пулсативен индекс на артерия утерина. Тези резултати говорят за нарушена колагенова тип IV обмяна при пациентките с преекламписия и абнормално съдовото ремоделиране. Следните автори установяват завишени MMP-2 стойности чрез ELISA: Ласковска 2017 (в серуми) [146], Палей (в плазма) [153], Монтеграна (в серуми) [156], Нарумия 2001 (в плазма) [232].

Повишените стойности на MMP-2 при ПЕ могат да допринасят за активация на ендотелните клетки, повишена съдова MMP-2 експресия, отцепване на ендотелин-1 и вазоконстрикция с повишаване на трансмуралното налягане. В резултат на това са нарушени васкуларната реактивност и съдовото ремоделиране. В подкрепа на тази хипотеза са и завишените нива на TIMP-2. Повишените стойности на MMP-2 при ПЕ показват засилена колагенова тип IV деградация на съдовата базална мембрана- процес, който не би трябвало да се наблюдава на този етап от бременността. В резултат на това се наблюдава намалена вазодилатация, повишена вазоконстрикция и развитие на хипертония през бременността, усложняваща се с преекламписия. Нещо повече, завишените MMP-2 нива са свързани и с повишение на UtA PI, което свидетелства за благоприятстване вазоконстрикцията, повишената съдова резистентност, плацентарна исхемия, развитие на хипертония и преекламписия. Повишените MMP-2 нива могат да допринасят за съдовата дисфункция, вторична на свързания с хипертензията механичен стрес върху съдовата стена. Следователно, нарушената регулация на комплексът MMP-2/TIMP-2 играе основна роля не само в ремоделирането на спиралните артерии, контролирайки цитотрофобластната инвазия, но също така оказва влияние върху структурата/функцията на утеринните артерии и след 20 г.с.

Желатиназата MMP-2 отговаря за разграждането на колаген тип I и предимно тип IV, докато MMP-9 не може директно да лизира колаген тип I и

разгражда колаген тип IV. MMP-2 е важен регулатор на съдовото ремоделиране по време на бременност. Дисрегулацията на MMP-2 е свързана с абнормална вазодилатация, плацентация и разширяване на матката при прееклампися. Следователно повишените нива на MMP-2 в нашето проучване са свързани предимно с патологично повишена деградация на колаген тип IV, главен структурен компонент изграждащ базалната мембрана. Тъй като активираната MMP-2 може да повиши нивата на вазоконстрикторите и да намали нивата на вазодилататорите, свързваме настоящите резултати с нарушено ремоделиране на утеринните артерии, повишено перфузионно налягане, плацентарна исхемия и развитие на хипертония на бременността, която усложнена с прееклампися. Тази хипотеза се подкрепя и от намерената корелация между MMP-2 и повишените стойности на средният пулсативен индекс на артерия утерина, демонстриращ повишена съдова резистентност.

Ремоделирането на маточните спирални артерии е важно за нормалното протичане на бременността. В това отношение балансът между MMPs и TIMPs играе важна роля за поддържане на съдовата вазодилатация. При прееклампися се наблюдава нарушена обмяна на колаген тип IV и MMP-2 дисфункция със засягане на структурата както на матката, така и на утеринните артерии. Въпреки че, патогенезата на преекламписята не е напълно изяснена, абнормалната плацентарна перфузия водеща до редуцирано утеринно перфузионно налягане е патогенетичен път, който има важно значение за развитието на майчината ендотелна дисфункция. Как обаче нарушеният MMP-2/TIMP-2 баланс води до абнормално утероплацентарно ремоделиране и вазоконстрикция, свързани с плацентарна исхемия и прееклампися и какви са механизмите на нарушената MMP-2 регулация са въпроси от голямо значение. Това налага необходимостта от по-големи и лонгитудинални изследвания с по-специфични методи и серийни измервания на тези показатели в различни времеви точки което би позволило по-точното определяне на връзката на гореспоменатите показатели с появата на прееклампися. По този начин би се изяснило не само участието на MMP-2 в развитието на преекламписята, но и възможността за MMP-2 като бъдеща потенциална терапевтична цел.

Следните проучвания [146,151,153,162,233] също предполагат, че MMP-2 може да бъде активирана от различни фактори при прееклампсия. Повишените нива на MMPs в плазмата могат да доведат до модификация на вазоактивни пептиди. Активираната MMP-2 е в състояние да повиши нивата на вазоконстрикторите и да намали нивата на вазодилаторите.

Нашето проучване повдига перспективата, че MMP-2 има отношение към патологично повишената съдова резистентност на утеринните артерии при прееклампсия.

Резултатите по отношение на MMP-9 показват, че нивата ѝ при жени с прееклампсия са по-ниски в равнение с тези при жени с нормална бременност, като тези стойности не са значими. По отношение на MMP-9 не съществуват еднозначни резултати в литературата. Изследователите Луизон и съавт. 2014 [233] изследват плазма на жени с ПЕ и ГХ чрез ELISA и намират понижени MMP-9 нива. Подобни са резултатите и на Тайбджи и сътр. 2005 [234] при ГХ (в плазма), както и от проучването SCOPE 2014 (в плазма) [236] при ПЕ, както и на Монтеграна (в серуми) [156] при ПЕ. Противоположни са резултатите на Палей и сътр., [153] изследващи плазма на жени с ГХ и ПЕ, показвайки повишена активност на MMP-9 при ГХ. Аб Хамид и съавт. 2012 [235] посредством ELISA изледват серуми от жени с ГХ и утновяват повишени MMP-9 нива. Подобни са и резултатите на Менг и сътр. 2016 [238], но те включват пациентки с ПЕ и намират с ELISA повишени серумни MMP-9 нива.

MMP-9 генотипите и хаплотипите са свързани с промени в плазмените MMP-9 и TIMP-1 плазмените концентрации при прееклампсия. Доказано е, че MMP-9 генетичните полиморфизми (g.-1562C>T и g.-90(CA)13-25 могат да модифицират плазмената MMP-9 и TIMP-1 нива и отговорът към антихипертензивната терапия при пациенти с прееклампсия и гестационна хипертония [153]. Плазмените MMP-9 концентрации не се повлияват от g.-1562C>T генотипи или хаплотипи при ГХ и ПЕ, с изключение на случаите с полиморфизъм g.-90(CA)13-25: пациентите с ГХ и LH генотип за този

полиморфизъм имат по-високи MMP-9 нива отколкото тези с други генотипове. Освен това, T алелът за g. 1562C>T полиморфизмът и H4 хаплотипът (комбинирайки T и H алели) са свързани с ГХ и липса на отговор към антихипертензивна терапия при ГХ. H2 хаплотипът (комбинирайки C и H алели) е свързан с липса на отговор към антихипертензивна терапия при ПЕ, но не и при ГХ. Резултатите от настоящото проучване по отношение на по-ниските серумни MMP-9 при пациентите спрямо контролите съвпадат с тези на Луизон и съавт. 2014 (изследват плазма на жени с ПЕ и ГХ) и от проучването SCOPE 2014 (в плазма при ПЕ) [233, 236] при ПЕ, както и на Монтегрена (в серуми при ПЕ) [156]. Възможно обяснение за отсъствието на статистическа значимост в нашето проучване е, предположението, че при изследваната популация от пациентки с преeklampсия преваляра MMP-9 генотипът g.-1562C>T, при който MMP-9 нивата не се повишават значимо. Това поставя и нови хоризонти за бъдещи изследвания на генетичните полиморфизми на MMP-9 при жени с преeklampсия в България, които включват освен количествено измерване на показателя, така и генетичен анализ.

7. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА TIMP-1, -2 ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Тъканният инхибитор на матриксна металопроотеиназа (TIMP-1) е главен ендогенен инхибитор на MMP-9. Резултатите от определянето на TIMP-1 в настоящето проучване показаха по-ниски серумни TIMP-1 нива при преeklampсия спрямо жени с нормална бременност, без сигнификантна разлика. Установените TIMP-1 стойности са в противовес със съобщенията на изследователите Луизон и сътр. 2014 [233] изследвайки плазма на жени с ПЕ и гестационна хипертония (ГХ) чрез ELISA установяващи завишени TIMP-1 нива при пациентките с преeklampсия с TG-генотип, докато Гупта и сътр. 2016 [147] изследват серуми на жени с ПЕ с ELISA и не установяват разлики във втори и трети триместър по отношение на TIMP-1. Монтегрена и сътр. 2009 [15], както и Палей и съавтори 2008, 2012 [152, 153] изследват съответно серум и плазма от пациентки с ПЕ и намират повишени TIMP-1 нива. Нашите резултати са в съответствие с тези на Гупта и сътр. 2016. По-ниските серумни нива на TIMP-1 при преeklampсия, макар и незначимо, могат да се дължат на фактът, че TIMP-

1 полиморфизма (g.-9830T>G, rs2070584) модифицира плазмените MMP-9 и TIMP-1 нива и отговорът към антихипертензивната терапия при ПЕ и ГХ. Пациентите с прееклампсия и TG генотип имат по-високи TIMP-1 нива, отколкото тези с TT генотип. G алелът и GG генотипът са свързани с ПЕ и отговорът към антихипертензивна терапия при ПЕ, но не и при ГХ. Възможно обяснение за липсата на значима разлика на TIMP-1 при пациентите спрямо контролите в изследваната популация с прееклампсия е вероятната преобладаваща на TT генотип, при който TIMP-1 нивата не се повишават значимо [153]. В допълнение на това, съществува и опция за известна разлика по отношение на гестационната възраст на пациентите в точката от време на взимане на пробата в различните проучвания.

Известно е, че TIMP-2 инхибира главно MMP-2. Нашите данни представят повишени стойности на TIMP-2 при прееклампсия, в сравнение с нормална бременност, без значима разлика. Тези резултати потвърждават установените TIMP-2 стойности при прееклампсия в предишни проучвания. Повишени TIMP-2 нива са установени с ELISA и от авторите Палей (в плазма при ГХ и ПЕ), Монтеграна (в серум при ПЕ). Любопитно е, че дори без знаимо повишение на TIMP-2, съотношението MMP-2/TIMP-2 е променено, благоприятствайки експресията на MMP-2. Възможно е активността на MMP-2 в случая да бъде модулирана от взаимодействието между азотен оксид и реактивни кислородни радикали или от друг тъканен инхибитор, което поставя въпросът дали MMP-2 при прееклампсия се регулира само от TIMP-2 или този баланс се осъществява и по други пътища, например в комбинация с TIMP-3 или TIMP-4 или от непознати до този момент инхибитори.

8. ПРОУЧВАНЕ НА СЕРУМЕН ПОДОКАЛИКСИН ПРИ ПРЕЕКЛАМПСИЯ

Нашето изследване представлява едно от малкото такива, които оценяват подокаликсин при прееклампсия. Резултатите от настоящето проучване са в съответствие с предшестващи доклади, които демонстрират, че определянето на серумните подокаликсинови (PCX) нива може да допринесе в диагностичния процес на ПЕ, като това важи в голяма степен за определянето на ранна прееклампсия [264,265,296,334].

Нашите данни обаче, показват **за първи път, че прагова стойност на серумният подокаликсин, може да разграничи преeklampсия от нормална бременност.**

В настоящето проучване е установено, че жени с нормална бременност, при които подокаликсиновите нива са над 3ng/ml са с по-висок риск за развитие на преeklampсия. Повишените РСХ нива индицират 3 пъти по-висока вероятност за развитие на преeklampсия, спрямо здрави бременни жени без повишени нива.

В допълнение на това е намерена корелация на Подокаликсин със систоличното и диастоличното артериално налягане, **разкриваща възможно участие на РСХ в патофизиологията на хипертонията по време на бременността и развитието на преeklampсия.** Завишените подокаликсинови нива могат да играят **важна роля в процеса на повишаване на артериалното налягане по време на бременност, като по този начин допринасят за развитието на преeklampсия.**

Корелацията между майчините ехокардиографски параметри дебелина на междукламерният септум, дебелина на задната стена на лявата камера и подокаликсин показва **взаимодействие между подокаликсина и тези сърдечни структури.** Подокаликсинът може да благоприятства промени в специфични **сърдечни структури, водещи до хипертония по време на бременност, която да резултира в преeklampсия.** Подокаликсин е свързан с нарушенията в структурата и функцията на утеринни и умбиликална артерии и е възможно **да играе роля в патологичното съдово ремоделиране при преeklampсия.** Това се потвърждава и от корелацията между серумните стойности на подокаликсин с Доплеровите ултразвукови показатели среден пулсативен индекс на утеринна и умбиликална артерия.

Настоящото изследване показва важни резултати. Това е първото проучване, отчитащо значима връзка между нивата на РСХ и стойностите на кръвното налягане. Нашите данни показват, че подокаликсинът може да играе важна роля за повишаване на кръвното налягане по време на бременност. Всички

гореспоменати фактори участват в централните пътища на развитието и прогресията на прееклампсията. Като се има предвид това, предполагаме, че **подокаликсинът може да участва в патогенетичните механизми на хипертонията по време на бременност и представлява обещаващ маркер за диагноза и прогноза на прееклампсия.**

VII. И З В О Д И

1. Определени са среден пулсативен индекс на утеринна и на умбиликална артерия посредством Доплер при прееклампсия и нормална бременност. Средният пулсативен индекс на артерия утерина и средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис са сигнификантно по-високи при прееклампсия спрямо нормална бременност.

2. При ранна прееклампсия в 71.43% от случаите се открива висок среден пулсативен индекс на утеринна артерия, докато 28.57% са с нормален индекс. Тези резултати потвърждават нарушената трофобластна инвазия в спиралните артерии при ранна прееклампсия. При късна прееклампсия в 85.37% от случаите се открива висок среден пулсативен индекс на умбиликална артерия, докато 14.63% са с нормален индекс, показвайки значимо нарушение на фетоплацентарната циркулация при късна прееклампсия .

3. При тежка прееклампсия в 84.62% от случаите се открива висок среден пулсативен индекс на утеринна артерия, докато 15.38% са с нормален индекс. Тези резултати предполагат, че с увеличаване на тежестта на ПЕ се наблюдава нарушаване на утероплацентарната циркулация водеща до плацентарна исхемия, намалено маточно перфузионно налягане, абнормално ЕЦМ съдово и маточно ремоделиране. При лека прееклампсия в 6.9% от случаите се открива висок среден пулсативен индекс на умбиликална артерия, докато 93.1% са с нормален индекс, потвърждавайки, че определянето на UmA PI намалява перинаталната заболяемост и смъртност във високо-рисквите акушерски ситуации.

4. Посредством трансторакална ехокардиография са оценени хемодинамичните промени при прееклампсия. Намерени са: диастолна дисфункция, повишени левокамерен краен диастоличен диаметър, левокамерен краен систоличен диаметър, дебелина на междукамерният септум и дебелина на задната стена на лявата камера. Въпреки че, стойностите на тези параметри попадат в референтните граници, изброените ехокардиографски показатели бяха сигнификантно по-високи при прееклампсия спрямо жени с нормална бременност.

5. Определени са серумните нива на колагеназите MMP-8, -13 при прееклампсия. Проведените изследвания показват, че серумите нива на MMP-8, -13 не показват статистически значима разлика при прееклампсия спрямо нормална бременност.

6. Определени са серумните нива на желатиназите MMP-2, -9 при прееклампсия. MMP-9 нивата при жени с нормална бременност са по-високи спрямо пациентки с прееклампсия, като тези стойности не са значими. Серумните нива на MMP-2 при пациентки с прееклампсия са статистически значимо по-високи в сравнение с жени с нормална бременност. Намерена е и връзка между промените в серумните нива MMP-2 и средният пулсативен индекс на артерия утерина. MMP-2 има отношение към патогенетичните механизми в развитието на прееклампсията.

7. Изследвани са TIMP-1, -2. Проведените изследвания показват, че серумите нива на TIMP-1, -2 не се различават сигнификантно при прееклампсия спрямо нормална бременност.

8. Серумните нива на Подокаликсин при пациентки с прееклампсия са сигнификантно завишени спрямо жени с нормална бременност. Дефинирана е прагова стойност от 3ng/ml за серумен подокаликсин, която разграничава прееклампсия от нормална бременност. Конструираният логистичен регресионен модел показва, че завишените серумни подокаликсинови нива индицират 3 пъти по-висока вероятност за развитие на прееклампсия, спрямо здрави бременни жени без повишени нива. РСХ участва в патофизиологията на хипертонията по време на бременността и развитието на прееклампсия. Връзките между Доплеровите ултразвукови показатели- среден пулсативен индекс на утеринна и умбиликална артерия и подокаликсин разкриват васкуларни промени свързани с патологично ремоделиране на тези артерии при прееклампсия.

VIII. П Р И Н О С И

Приноси с оригинален характер

1. Анализирано е честотното разпределение на средният пулсативен индекс на утеринна и на умбиликална артерия според времето на манифестацията на прееклампсията и според тежестта ѝ.

2. Извършено е проучване на подокаликсина при пациентки с прееклампсия. За първи път е дефинирана прагова стойност от 3ng/ml за серумен подокаликсин, която разграничава прееклампсия от нормална бременност. Конструиран е логистичен регресионен модел показващ, че завишените серумни подокаликсинови нива индицират 3 пъти по-висока вероятност за развитие на прееклампсия, спрямо здрави бременни жени без повишени нива. Базирайки се на тези резултати, настоящето проучване дава основания да се счита, че серумният подокаликсин може да бъде използван като индикатор за диагноза и прогноза на прееклампсия.

3. За първи път е открито, че промените в подокаликсиновите нива играят определена роля в процеса на повишаване на артериалното налягане по време на бременност, като по този начин са свързани с патогенезата на прееклампсията. За това свидетелства намерена корелация на Подокаликсин със систоличното и диастоличното артериално налягане.

4. За първи път е показано взаимодействие между РСХ и специфични сърдечни структури, основаващо се на откритата корелация между майчините ехокардиографски параметри дебелина на междукамерният септум и дебелина на задната стена на лявата камера и подокаликсин. Намерена е и връзка между Доплеровите ултразвукови показатели среден пулсативен индекс на утеринна и умбиликална артерия и подокаликсин, която отразява съдови изменения асоциирани с развитието на абнормалното ремоделиране на тези артерии при прееклампсия.

5. За първи път в България са определени серумните нива на желатиназите MMP-2, -9; колагеназите MMP-8, -13 и тъканните им инхибитори: TIMP-1, -2 при прееклампсия.

6. За първи път е установена взаимовръзка между промените в серумните нива MMP-2 и средният пулсативен индекс на артерия утерина. Констатирано е отношение на MMP-2 към патологично повишената васкуларна резистентност при прееклампсия, съдовото ремоделиране, развитието и прогресията на прееклампсията, като горе-споменатата металлопротеиназа играе важна роля в патогенетичните механизми за развитието на това хипертензивно състояние на бременността.

7. За първи път е изследвана MMP-8 при прееклампсия. Извършеният анализ разкрива, че нивата на серумна MMP-8 не показват статистически значима разлика при прееклампсия спрямо нормална бременност. Установено е, че MMP-8 не участва директно в патогенезата на прееклампсията.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е, че средният пулсативен индекс на артерия утерина и средният пулсативен индекс на артерия умбиликалис са сигнификантно по-високи при прееклампсия спрямо нормална бременност.

2. Изследвани са майчините ехокардиографските параметри при прееклампсия. Въпреки че, стойностите на тези параметри попадат в референтните граници, проучените ехокардиографски показатели са сигнификантно по-високи при прееклампсия спрямо жени с нормална бременност.

3. Потвърдено е, че серумните нива на Подокаликсин при пациентки с прееклампсия се завишават сигнификантно спрямо жени с нормална бременност, като подокаликсинивите нива при жените с ранна прееклампсия са статистически значимо по-високи от тези при жените с късна прееклампсия.

IX. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Popovski N**, Nikolov A. Biomarkers for Early Detection of Hypertensive Disorders in Pregnancy: Current Applications and Future Directions- The Role of Extracellular Matrix. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research 2019;16 (2): 1-3 ISSN:2574-1241
2. Nikolov AG, **Popovski NK**, Hristova IP. Collagenases mmp-1, mmp-13, and tissue inhibitors timp-1, timp-2: Their role in healthy and complicated pregnancy and potential as preeclampsia biomarkers—a brief review. Applied Sciences-Basel, 2020, 10(21), pp. 1-137, (ISSN 2076-3417; CODEN: ASPCC7) **(IF- 2.474)**
3. **Popovski NK**, NikolovAG, Popov YD, Blazheva S. Relationship between elevated maternal serum podocalyxin concentrations with blood pressure values and routine laboratory parameters in preeclampsia. Journal of Biomedical and Clinical Research. брой 2, том 14, 2021, **(Под печат)** (ISSN: 1313-9053)
4. **Поповски Н**, Николов А, Попов Й, Блажева С. Сравнение на серумните нива на MMP-2,-9,-8,-13 и техните инхибитори: TIMP-1 и -2 при жени с преекламписия и нормална бременност. Акушерство и гинекология, Том 60, Брой 2, 2021; 17-23 ISSN: 0324-0959
5. **Поповски НК**, Попов Й., Николов АГ. Атипичен случай на хирургично коригиран комбиниран междупредсърден дефект с персистиращ ляво-десен шънт при пациентка с преекламписия. Акушерство и гинекология 2020; 59(1): 37-39 ISSN: 0324-0959
6. **Nikolov AG**, Popovski NK, Blazhev AB, Blazheva S. Comparison of Serum Levels of Collagen Type I Turnover Markers in Early-onset Preeclampsia and Healthy Pregnant Women. Folia Medica 2021; ISSN 1314-2143 (online) | ISSN 0204-8043 (print) **(SJR- 0.245)**

X. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Popovski N**, Nikolov A. Fulminant severe HELLP syndrome in early onset preeclampsia: A case report. Pregnancy Hypertension, Volume 17, Supplement 1, Pages S23-S24 (IF-1.992) ISSN: 2210- 7789. EuroSSH Conference 2019, Lund, Sweden, October 2, 2019 - October 4, 2019
2. **Popovski N**, Nikolov A. Gestational Hypertension: Current Immunological Markers and Future Trends. Journal of Biomedical and Clinical Research. Vol.12 Number 1, Supplement 2, 2019, 25 (ISSN: 1313-9053) Jubilee Scientific Conference "45 years Medical University – Pleven", 31 October - 2 November, 2019, Pleven
3. **Поповски Н**, Николов А. Прогностична стойност на биомаркерите за хипертензивни нарушения на бременността- настоящо приложение и нови тенденции. Абстракти от XXXVII Национална Акушерска Конференция 20-23 Юни 2019 "Ривиера", Акушерство и гинекология 2019 Suppl. 9, ISSN 0324-0959
4. **Nikola K. Popovski**, Asparuh G. Nikolov. Diminished serum TIMP-2 levels are associated with severe preeclampsia: a cross sectional study. Proceedings of BAFA's Annual International Scientific Conference, 08 Oct 2021, 365-371 ISSN 2738-716X

Участия в университетски научни проекти

1. Проект N1/2019- Промени в серумните маркери на сърдечния екстрацелуларен матреикс (кардиална колагенова обмяна) и миокардно ремоделиране при болни с есенциална хипертония и сърдечна недостатъчност с гранично потисната фракция на изтласкване, Ръководител: Доц. Аспарух Николов
2. Проект №1/2020- Промени в нивата на циркулиращи колаген тип I, III деградационни биомаркери, копептин, подокаликсин и ехографски критерии при хипертензивни състояния по време на бременност. Ръководител: Доц. Аспарух Николов

XI. ЦИТИРАНИЯ

1. Alka C. Bapat, Rupesh Kashikar, Shashi R. Goyal. Role of dual biomarkers and uterine artery doppler study in predicting PIH and IUGR in antenatal patients registered in a tertiary care centre. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2021 Mar;10(3):982-987

Popovski N, Nikolov A. Biomarkers for Early Detection of Hypertensive Disorders in Pregnancy: Current Applications and Future Directions-The Role of Extracellular Matrix. *Biomedical J Scient Technic Res*. 2019;16(2):1-3.

2. Pankiewicz K, Szczerba E, Fijalkowska A, Szamotulska K, Szewczyk G, Issat T, Maciejewski TM. The association between serum galectin-3 level and its placental production in patients with preeclampsia. *J Physiol Pharmacol*. 2020 Dec;71(6).

Nikolov A, **Popovski N**, Blazhev A. Serum galectin-3 levels are unlikely to be a useful predictive marker for early-onset preeclampsia development. *Prague Med Rep* 2020; 121: 172-180.

3. Na, J., Zheng, L., Wang, L. et al. Phenytoin Regulates Migration and Osteogenic Differentiation by MAPK Pathway in Human Periodontal Ligament Cells. *Cel. Mol. Bioeng.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s12195-021-00700-0>

Nikolov, A., **N. Popovski**, and I. Hristova. Collagenases MMP-1, MMP-13, and tissue inhibitors TIMP-1, TIMP-2: their role in healthy and complicated pregnancy and potential as preeclampsia biomarkers—a brief review. *Appl. Sci.* 10:7731, 2020.

4. Heusler M, Einenkel R, Ehrhardt J, Muzzio DO and Zygmunt M (2021) Low Abundance *Fusobacterium Nucleatum* Supports Early Pregnancy Development – An In Vitro Study. *Front. Immunol.* 12:698045. doi: 10.3389/fimmu.2021.698045

5. Li, C.-H.; Hsu, T.-I.; Chang, Y.-C.; Chan, M.-H.; Lu, P.-J.; Hsiao, M. Stationed or Relocating: The Seesawing EMT/MET Determinants from Embryonic Development to Cancer Metastasis. *Biomedicines* 2021, 9, 1265. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091265>

6. Usman M. Ashraf, Dalton L. Hall, Adam Z. Rawls, Barbara T. Alexander; Epigenetic processes during preeclampsia and effects on fetal development and chronic health. *Clin Sci (Lond)* 14 October 2021; 135 (19): 2307–2327. doi: <https://doi.org/10.1042/CS20190070>

Nikolov A, **Popovski N**. Role of Gelatinases MMP-2 and MMP-9 in Healthy and Complicated Pregnancy and Their Future Potential as Preeclampsia Biomarkers. *Diag (Basel)* (2021) 11(3):480. doi: 10.3390/diagnostics11030480