

lek. Anna Roztocka-Kuc

**Znaczenie stresu oksydacyjnego w krwawieniach z dróg rodnych w 1. połowie ciąży oraz
ich wpływ na dalszy przebieg ciąży i porodu**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz H. Bręborowicz



Klinika Perinatologii i Ginekologii

Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Składam serdeczne podziękowania

*Promotorowi – Panu Prof. dr hab. Grzegorzowi H. Bręborowiczowi
za inspirację, cenne uwagi merytoryczne
i mobilizację do pracy na każdym jej etapie.*

*Mojemu Mężowi oraz Mamie i Tacie za wiarę we mnie
i nieustające wsparcie i pomoc,
bez której nie powstałaby ta praca.*

Wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy.

*Rozprawę doktorską dedykuję
moim córkom – Natalii i Ninie.*

Spis treści

1.	Wstęp	12
1.1	Krwawienie z dróg rodnych w ciąży i poronienie.....	12
1.1.1	Epidemiologia	13
1.1.2.	Klasyfikacja i etiopatogeneza.....	15
1.1.3	Krwiak podkosmówkowy (SCH – <i>subchorionic hematoma</i>).....	19
1.2	Stres oksydacyjny i jego wpływ na rozwój trofoblastu.....	21
1.2.1	Dialdehyd malonowy (MDA)	26
1.3	Antyoksydanty	27
1.3.1	Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).....	28
1.3.2	Peroksydaza glutationowa (GPx).....	28
1.3.3	Glutation (GSH)	30
1.3.4	Reduktaza glutationowa (GR).....	30
1.4	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (<i>vascular endothelial growth factor</i> – VEGF).....	32
2.	Cel pracy	35
3.	Material	36
3.1	Grupy pacjentek	36
3.1.1.	Grupa badana.....	36
3.1.2.	Grupa kontrolna.....	37
4.	Metodyka	38
4.1.	Badanie podmiotowe	38
4.2.	Objawy zagrażającego poronienia w ocenie pacjentki.....	38
4.3.	Badanie przedmiotowe	39
4.4.	Badanie ultrasonograficzne	40
4.5.	Oznaczenie stężeń dialdehydu malonowego, glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu, reduktazy glutationu oraz całkowitego statusu antyoksydacyjnego i czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego w surowicy krwi	40
4.6.	Kontrola po zakończeniu ciąży (follow-up).....	42
4.7.	Analiza statystyczna	42
5.	Wyniki	43

5.1.	Charakterystyka grup – informacje ogólne	43
5.2.	Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe pacjentek – porównanie grupy badanej i kontrolnej.....	43
5.3.	Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe – porównanie grupy pacjentek z poronieniem zagrażającym, które poroniły i grupy pacjentek z poronieniem zagrażającym, których ciąża zakończyła się porodem.	46
5.4.	Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na wystąpienie poronienia, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne, poród oraz stan noworodka.....	49
5.4.1.	Ocena wpływu krwawienia na dalszy przebieg ciąży – poronienie, czas trwania cięży i powikłania perinatalne	49
5.4.2.	Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na poród.....	51
5.4.3.	Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na stan noworodka	52
5.5.	Ocena parametrów stresu oksydacyjnego	53
5.5.1.	Analiza stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie i w ciąży zakończonej poronieniem.....	53
5.5.2.	Analiza stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych i całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej w pierwszej połowie krwawieniem z dróg rodnych i ciąży zakończonej poronieniem	54
5.6.	Analiza stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyńowego (VEGF).....	56
5.7.	Analiza zależności między obecnością i rozmiarami krwaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych a wystąpieniem poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – rozwojem powikłań perinatalnych, czasem i sposobem zakończenia ciąży i stanem noworodka oraz zależności między lokalizacją krwaka a poronieniem	58
5.7.1.	Częstość występowania krwaka podkosmówkowego oraz wpływ jego obecności na poronienie, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne i poród.....	58
5.7.2.	Wpływ obecności krwaka podkosmówkowego na stan noworodka.....	60
5.7.3.	Wpływ wymiarów krwaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych na wystąpienie poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – na rozwój powikłań perinatalnych, czas i sposób zakończenia ciąży oraz stan noworodka.....	61
5.7.4.	Wpływ lokalizacji krwaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym na wystąpienie poronienia	65
6.	Dyskusja	67
6.1.	Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe pacjentek z grupy badanej i kontrolnej	67
6.1.1.	Badanie podmiotowe	67
6.1.2.	Badanie przedmiotowe	68

6.2.	Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe ciężarnych z krwawieniem z dróg rodnych – porównanie grup pacjentek, których ciąża zakończyła się poronieniem i porodem	69
6.2.1.	Badanie podmiotowe	69
6.2.2.	Badanie przedmiotowe	70
6.3.	Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszych 21. tygodniach ciąży na wystąpienie poronienia, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne, poród oraz stan noworodka	71
6.3.1.	Wpływ krwawienia na wystąpienie poronienia i czas trwania ciąży	71
6.3.2.	Wpływ krwawienia na wystąpienie powikłań perinatalnych	72
6.3.3.	Wpływ krwawienia na poród	75
6.3.4.	Wpływ krwawienia na stan noworodka	78
6.4.	Analiza stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej krwawieniem z dróg rodnych i ciąży zakończonej poronieniem	78
6.5.	Analiza stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych (dysmutazy ponadtlencowej, peroksydazy glutationu i reduktazy glutationu), glutationu i całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej w pierwszej połowie krwawieniem z dróg rodnych	80
6.5.1.	Dysmutaza ponadtlencowa (SOD)	81
6.5.2.	Peroksydaza glutationowa (GPx)	83
6.5.3.	Glutation (GSH)	84
6.5.4.	Reduktaza glutationowa (GR)	85
6.5.5.	Całkowity status antyoksydacyjny (TAS)	86
6.6.	Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka – VEGF	87
6.7.	Analiza zależności między obecnością i rozmiarami krwaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym a wystąpieniem poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – na rozwój powikłań perinatalnych, czas i sposób zakończenia ciąży oraz stan noworodka oraz zależności między lokalizacją krwaka a poronieniem ciąży	89
6.7.1.	Wpływ obecności krwaka podkosmówkowego na czas trwania ciąży oraz wystąpienie poronienia i powikłań perinatalnych	90
6.7.2.	Wpływ obecności krwaka podkosmówkowego na sposób ukończenia ciąży	93
6.7.3.	Wpływ obecności krwaka na stan noworodka	94
6.7.4.	Znaczenie rozmiarów krwaka podkosmówkowego w kontekście wystąpienia poronienia, powikłań perinatalnych oraz wpływ na masę noworodka	95
6.7.5.	Znaczenie lokalizacji krwaka podkosmówkowego w kontekście poronienia	96
7.	Wnioski	99
8.	Streszczenie	101
9.	Summary	105

10.	Piśmiennictwo	109
-----	----------------------------	-----

Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka ogólna grupy badanej i kontrolnej

Tabela 2. Wywiad położniczy pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Tabela 3. Informacje uzyskane w badaniu podmiotowym pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Tabela 4. Wyniki badania ultrasonograficznego pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Tabela 5. Porównanie grupy ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w aspekcie sposobu zakończenia ciąży – poronienie lub poród

Tabela 6. Porównanie badania przedmiotowego pacjentek z poronieniem zagrażającym, które poroniły i które nie poroniły

Tabela 7. Porównanie danych dotyczących dalszego przebiegu ciąży w grupie badanej i kontrolnej

Tabela 8. Porównanie danych dotyczących porodu w grupie badanej i kontrolnej

Tabela 9. Porównanie danych dotyczących noworodków pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Tabela 10. Porównanie stężenia MDA pomiędzy grupą badaną i kontrolną

Tabela 11. Porównanie stężenia MDA pomiędzy grupą TM poronienie i TM poród

Tabela 12. Porównanie stężeń GSH, SOD, GPx, GR oraz TAS pomiędzy grupą badaną a kontrolną

Tabela 13. Porównanie stężeń GSH, SOD, GPx, GR oraz TAS pomiędzy grupą TM poronienie i TM poród

Tabela 14. Wyniki oznaczenia VEGF u pacjentek w grupie badanej i kontrolnej

Tabela 15. Wyniki oznaczenia VEGF u krwawiących pacjentek zależnie od sposobu zakończenia ciąży (poronienie lub poród)

Tabela 16. Porównanie częstości występowania krwaka podkosmówkowego u pacjentek w grupie badanej i kontrolnej

Tabela 17. Porównanie częstości występowania krwaka podkosmówkowego u krwawiących pacjentek zależnie od sposobu ukończenia ciąży

Tabela 18. Porównanie czasu trwania oraz sposobu zakończenia ciąży u krwawiących pacjentek zależnie od obecności krwaka podkosmówkowego

Tabela 19. Porównanie częstości występowania powikłań perinatalnych u krwawiących pacjentek zależnie od występowania krwaka podkosmówkowego

Tabela 20. Porównanie stanu noworodka po porodzie u pacjentek krwawiących zależnie od występowania krwiaka podkosmówkowego

Tabela 21. Porównanie wymiarów oraz objętości krwiaka pomiędzy pacjentkami krwawiącymi zależnie od sposobu zakończenia ciąży (poronienie vs poród)

Tabela 22. Porównanie wymiarów krwiaka w grupie z PPRM i bez PPRM

Tabela 23. Porównanie wymiarów krwiaka w zależności od sposobu ukończenia ciąży

Tabela 24. Porównanie lokalizacji krwiaka w grupie pacjentek krwawiących, które poroniły i krwawiących ciężarnych, których ciąża zakończyła się porodem

Wykaz rycin

Rycina 1. Poglądowy schemat przedstawiający efektywność ludzkiej reprodukcji – od zapłodnienia do żywych urodzeń - tzw. “Góra Lodowa Utrat Ciąży”

Rycina 2. Obrazy ultrasonograficzne krwaka podkosmówkowego (strzałki) o różnym kształcie, echogenności i wielkości

Rycina 3. Schemat przedstawiający proces inwazji trofoblastu przed 6. tygodniem ciąży

Rycina 4. Schemat przedstawiający proces inwazji trofoblastu oraz charakterystykę i morfologię tętnic spiralnych po 20. tygodniu w ciąży fizjologicznej (strona lewa) oraz ciąży powikłanej preeklampsją (strona prawa)

Rycina 5. Schemat przedstawiający poziom zakrwawienia wkładki higienicznej lub bielizny, do którego pacjentki odnosiły swoje krwawienie (1 – mierne krwawienie/plamienie, zabrudzenie mniej niż 30% wkładki, 2- łagodne krwawienie, zabrudzenie około 30 % wkładki, 3- średnioobfite krwawienie, zabrudzenie około 50% wkładki, 4- obfite krwawienie, zabrudzenie całej wkładki, przesiąknięta wkładka)

Rycina 6. Porównanie czasu trwania ciąży w grupie badanej i kontrolnej

Rycina 7. Stężenie GSH w surowicy u pacjentek, które nie poroniły (0) i pacjentek, które poroniły (1)

Rycina 8. Stężenie VEGF w surowicy u pacjentek, które nie poroniły (0) i pacjentek, które poroniły (1)

Rycina 9. Objętość krwaka u pacjentek z krwawieniem, które nie poroniły (0) i u kobiet z krwawieniem, które poroniły (1)

Rycina 10. Zależność (czy korelacja?) między masą ciała noworodka a długością krwaka podkosmówkowego

Rycina 11. Zależność (?) między masą ciała noworodka a wysokością krwaka podkosmówkowego

Wykaz skrótów

- ACOG - Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (*American College of Obstetricians and Gynecologists*)
- ART - techniki wspomaganego rozrodu – (ang. *assisted reproductive techniques*)
- CAT – katalaza (ang. *catalase*)
- EBM – medycyna oparta na dowodach (ang. *evidence based medicine*)
- ELBW - ekstremalnie mała masa urodzeniowa (ang. *extremely low birth weight*)
- ESHRE - Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (*European Society for Human Reproduction and Embryology*)
- FGR - ograniczenie wzrastania płodu (ang. *fetal growth restriction*)
- FHR – czynność serca płodu (ang. *fetal heart rate*)
- GPx – peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)
- GR – reduktaza glutationowa (ang. *glutathione reductase*)
- GSH – zredukowany glutation
- GSSG – utleniona forma glutationu
- GS - pęcherzyk ciążowy (ang. *gestational sac*)
- LBW - mała masa urodzeniowa (ang. *low birth weight*)
- LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*)
- NICE - Narodowy Instytut Zdrowia i Doskonałości Opieki (*National Institute for Health and Care Excellence*)
- PIH - nadciśnienie indukowane ciążą (ang. *pregnancy induced hypertension*)
- PPROM - przedwczesne przedporodowe pęknięcie błon płodowych (ang. *preterm prelabor rupture of membranes*)
- PUFA - wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *polyunsaturated fatty acids*)
- RCOG - Królewskie Stowarzyszenie Położników i Ginekologów (*Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*)
- ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
- SCH - krwiak podkosmówkowy (ang. *subchorionic hematoma*)
- SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)
- TM - poronienie zagrożające (ang. *threatened miscarriage*)
- WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)
- VEGF - czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)
- VLBW - bardzo mała masa urodzeniowa (ang. *very low birth weight*)

1. Wstęp

1.1 Krwawienie z dróg rodnych w ciąży i poronienie

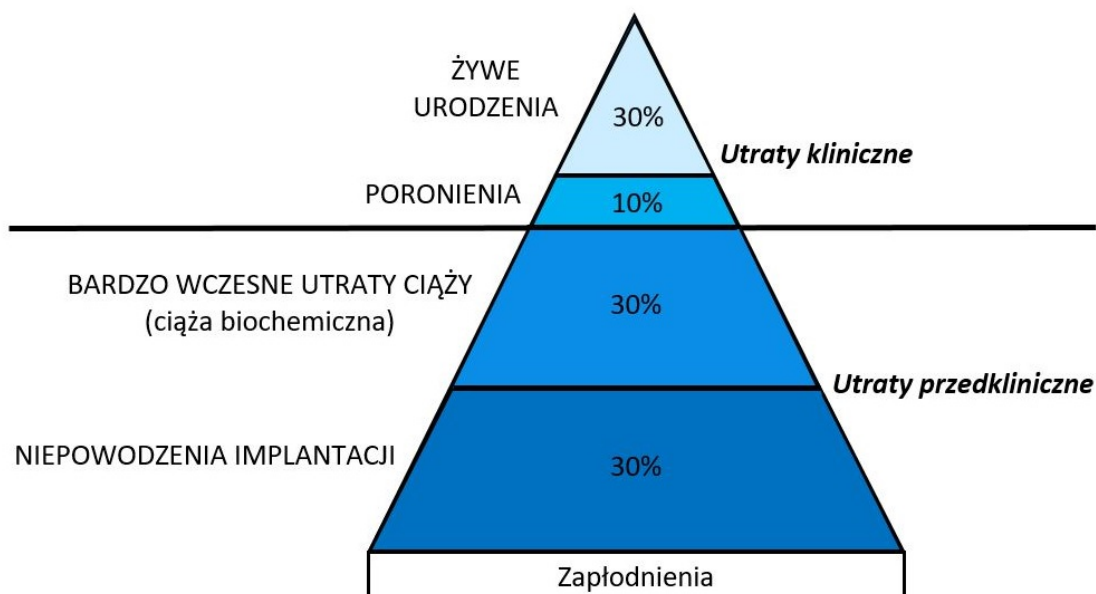
Już w czasach starożytnych krwawienie u ciężarnej wiązano ze zmniejszeniem szansy na prawidłowy przebieg ciąży i poszukiwano sposobów zapobiegania poronieniu. Stosowano rozmaite kuracje ziołowe, rytuały i odmawiano specjalne modlitwy mające pomóc w utrzymaniu ciąży. Na przestrzeni wieków ludzie odprawiali przeróżne ceremonie pożegnania płodu i przeżywali żałobę po utracie ciąży (1). Powszechnie znanym i stosowanym przez wieki amuletem mającym zapobiegać poronieniu i przedwczesnemu porodowi był kamień orli (łac. *aetites*). Minerale ten zalecano nosić blisko brzucha przez całą ciążę i ściągnąć dopiero przed porodem (2). Soranus z Efezu, prekursor położnictwa i ginekologii, w swoim dziele pt. „*Ginekologia*” pisał tak: „Po zapłodnieniu należy unikać jakiegokolwiek wysiłku i zmian, zarówno dla ciała, jak i psychiki. Nasienie może zostać ewakuowane w wyniku strachu, smutku, naglej radości i poważnych zaburzeń psychicznych; w wyniku nadmiernej aktywności, przymusowego zatrzymania oddechu, kaszlu, kichania, uderzenia i upadku, szczególnie na biodra... Wszystko, co wywołuje mocne poruszenie może prowadzić do poronienia” (3). Z dzieła Hipokratesa pt. „*Choroby kobiece*” dowiadujemy się, że przyczyną poronienia może być nieprawidłowe odżywianie (niedożywienie, ale także przejedzenie, zjedzenie ostrego czy gorzkiego posiłku), przemoc fizyczna, podskakiwanie, dźwiganie, omdlenie, choroba, osłabienie i strach. Hipokrates zwraca też uwagę na fakt, że niektóre poronienia dokonują się bez uchwytnej przyczyny (4). Ostatnie zdanie, choć napisane wieki temu, nadal jest aktualne. Ten fakt był dla mnie inspiracją do podjęcia badań na temat krwawienia z dróg rodnych i poronienia.

Każdego roku na świecie u milionów kobiet dochodzi do poronienia. Wiele z nich ma ograniczony dostęp do opieki medycznej, co naraża je na powikłania, czasami zagrażające życiu. W niektórych kulturach poronienie wiąże się ze stygmatyzacją, porzuceniem przez partnera, jest traktowane jako kara od Boga czy efekt czarnej magii. W krajach wysoko rozwiniętych, z dobrym dostępem do opieki medycznej, kobiety również przeżywają ból, stres i lęk związany z utratą ciąży. Pomimo ogromnego postępu w medycynie na przestrzeni wieków, nadal nie znaleziono metody zapobiegania poronieniu. Z drugiej strony, postępujące

zmiany klimatyczne i zanieczyszczenie środowiska prawdopodobnie istotnie przyczyniają się do spadku płodności gatunku ludzkiego.

1.1.1 Epidemiologia

Efektywność procesu rozmnażania człowieka jest niska, szczególnie w porównaniu do innych gatunków. Szansa na zapłodnienie przy regularnym współżyciu bez antykoncepcji wynosi maksymalnie 30% na cykl. Szacunkowy odsetek żywych urodzeń po zapłodnieniu to około 30% (5). Spośród uzyskanych ciąż nawet 70% ulega poronieniu. Ocenia się, że w 30% przypadków po zapłodnieniu nie dochodzi do implantacji, kolejne 30% ulega utracie po zagnieżdżeniu, ale przed terminem spodziewanej miesiączki (tzw. przedkliniczne utraty ciąż) (5). Szacowane ryzyko utraty ciąży po terminie spodziewanej miesiączki wynosi 15% i maleje wraz z upływem czasu (5,28,35,36,59). Szczególnie widoczny spadek odsetka poronień obserwuje się po uwidocznieniu w badaniu USG czynności serca płodu (5-7,35).



Rycina 1. Poglądowy schemat przedstawiający efektywność ludzkiej reprodukcji – od zapłodnienia do żywych urodzeń - tzw. "Góra Lodowa Utrat Cięży". Modyfikacja własna na podstawie (51).

Krwawienie z dróg rodnych jest najczęstszym powikłaniem ciąży i może wystąpić na każdym jej etapie. Dotyczy ono, zależnie od źródeł, od 14% do aż 40% kobiet i w większości przypadków ma miejsce we wczesnym pierwszym trymestrze ciąży (6,36,53,54,59,177). Zjawisko to jest dla kobiety powodem stresu i niepewności co do dalszych losów ciąży. Szacuje się, że u połowy kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszych 22 tygodniach ciąży dochodzi do poronienia (6,53).

Poronienie może nieść za sobą niepożądane skutki medyczne (również zagrażające życiu), takie jak zakażenie, krwotok, zatorowość, powikłania zabiegu wyłyżeczkowania jamy macicy i znieczulenia, a także skutki psychologiczne jak depresja i zaburzenia lękowe (8,9).

Co więcej, w wielu badaniach na grupach ciężarnych z krwawieniem w pierwszej połowie ciąży wykazano wyższy odsetek powikłań, także rozwijających się w późniejszym czasie. Istnieją doniesienia, że kobiety, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszych 20-22 tygodniach ciąży częściej rozwijają takie powikłania jak poród przedwczesny przed 34 t.c., przedwczesne pęknięcie błon płodowych, przedwczesne oddzielenie łożyska, preeklampsja, ograniczenie wzrastania płodu (10,11,39,40,45,52). Niektórzy Autorzy opisują też wyższe odsetki interwencji chirurgicznych, jak cięcie cesarskie czy ręczne oddzielenie łożyska (52,57,122,206). Wymienione powikłania oraz procedury zabiegowe mogą wpływać na pogorszenie stanu noworodków. Istnieją doniesienia, że dzieci pacjentek z wywiadem krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży mają mniejszą masę urodzeniową i gorszą punktację w skali Apgar (11,129). Niektóre badania wykazały nawet niekorzystny wpływ krwawienia na przebieg kolejnej ciąży (10-12, 38-40). Z powyższych powodów, wielu Autorów zaleca włączenie pacjentek, które krwawiły w pierwszej połowie ciąży do grupy ciąż wysokiego ryzyka.

Na dzień dzisiejszy nie istnieją udowodnione, skuteczne metody zapobiegające poronieniu w przypadku wystąpienia krwawienia z dróg rodnych (27). Pacjentkom zaleca się najczęściej ograniczenie aktywności lub reżim łóżkowy oraz doustne i/lub dopochwowe preparaty progesteronu. Niektórzy lekarze skłaniają się ku postępowaniu wyczekującemu. Na świecie prowadzonych jest wiele badań klinicznych, a także stosowane są eksperymentalne i alternatywne terapie poronienia zagrażającego – z zastosowaniem gonadotropiny kosmówkowej, tokolityków, inhibitorów cyklooksygenazy, dużych dawek witamin, akupunktury, medycyny chińskiej. Pacjentkom z niewyjaśnionymi, nawracającymi poronieniami proponuje się immunoterapię przy użyciu komórek partnera czy leukocytów dawcy. Skuteczność oraz zasadność wszystkich opisanych metod, łącznie z reżimem łóżkowym i zastosowaniem progesteronu jest dyskusyjna (22).

Brak wystarczających dowodów na skuteczność jakiegokolwiek terapii poronienia zagrażającego skutkuje brakiem jednolitych rekomendacji. Mimo wielu badań naukowych i ciągłego poszukiwania metod leczenia, odsetek poronień od lat pozostaje bez zmian – na poziomie około 15% (12-22). Obecne zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organisation*, WHO) dotyczące sposobów zapobiegania poronieniom ograniczają się do prowadzenia zdrowego trybu życia: prawidłowej diety, aktywności fizycznej, utrzymywania prawidłowej masy ciała, ograniczenia stresu oraz unikania tytoniu, alkoholu, kofeiny i substancji psychoaktywnych oraz suplementacji kwasu foliowego i żelaza. Podkreślane jest ponadto znaczenie wczesnego rozpoznawania i leczenia chorób przewlekłych i związanych z ciążą, wczesna identyfikacja pacjentek z grupy podwyższonego ryzyka i wzmożony nadzór położniczy nad nimi (55).

1.1.2. Klasyfikacja i etiopatogeneza

Na chwilę obecną na świecie nie ma jednolitej definicji i klasyfikacji poronień i krwawień u ciężarnych. Według definicji polskiej i polskiego prawa poronienie to wydalenie jaja płodowego z jamy macicy przed ukończeniem 22. tygodnia ciąży, objawiające się krwawieniem z dróg rodnych i bólem podbrzusza (21). Światowa Organizacja Zdrowia za poronienie uznaje wydalenie z macicy zarodka/płodu przed ukończeniem 22. tygodnia ciąży lub o wadze mniejszej niż 500 g, według Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, ACOG) przedział czasowy dla poronienia to pierwsze 20 tygodni, zaś wytyczne Królewskiego Stowarzyszenia Położników i Ginekologów (*Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*, RCOG) podają w definicji pierwsze 24 tygodnie ciąży (100).

W 2015 roku specjalna grupa dedykowana wczesnej ciąży (*Special Interest Group for Early Pregnancy*), działająca przy Europejskim Towarzystwie Rozrodu Człowieka i Embriologii (*European Society for Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) opracowała nowe wytyczne dotyczące klasyfikacji i nomenklatury poronień. Powstały one celem ujednolicenia i unowocześnienia terminologii, zwrócono szczególną uwagę na fakt, że niektóre stosowane terminy mogą wpływać niekorzystnie na stan psychiczny i samoocenę pacjentki. ESHRE rekomenduje zastąpienie terminów „aborcja”, „niepowodzenie ciąży”, czy angielskich słów „*abortion*” i „*miscarriage*” diagnozą „*pregnancy loss*” lub „*fetal loss*” (utrata ciąży/utrata płodu). Konsensus ESHRE, opierając się na dokładnej analizie procesów

embrio- i organogenezy, zaleca podział na wczesne utraty ciąży (*early pregnancy loss*) - przed 10 t.c. i utraty płodu (*fetal loss*) po 10. t.c. (25). Według ACOG i Narodowego Instytutu Zdrowia i Doskonałości Opieki (*National Institute for Health and Care Excellence, NICE*) granicę między wczesną i późną utratą ciąży stanowi ukończony 13. tydzień ciąży (26,27).

W mojej rozprawie stosuję polską terminologię i definicję krwawienia z dróg rodnych w ciąży i poronienia.

Krwawienie z dróg rodnych w czasie pierwszych 22 tygodni ciąży klasyfikujemy zależnie od stanu klinicznego pacjentki oraz żywotności zarodka lub płodu:

- W przypadku, kiedy w przeprowadzonych badaniach kanał szyjki macicy jest uformowany i zamknięty, a w USG w jamie macicy uwidaczniamy żywy zarodek lub płód (w bardzo wczesnej ciąży - prawidłowo zlokalizowany pęcherzyk ciążowy), należy postawić diagnozę poronienia zagrażającego (ang. *threatened miscarriage, TM*).
- Kiedy kanał szyjki macicy jest skrócony i rozwarty, rozpoznajemy samoistne poronienie w toku, niezależnie od żywotności zarodka lub płodu. Pacjentka często poza krwawieniem doświadcza bolesnych skurczy macicy, w badaniu wzornikiem ginekologicznym i USG elementy kosmówki i jaja płodowego mogą być widoczne w pochwie i kanale szyjki macicy.
- Poronienie zatrzymane (ang. *missed abortion*) ma miejsce w sytuacji, gdy mimo obumarcia zarodka lub płodu nie dochodzi do jego wydalenia z jamy macicy przez okres 8 tygodni. Niektórzy Autorzy sugerują używanie w takich przypadkach terminu „ciąża obumarła” (21,25).

Coraz więcej kobiet wykonuje próbę ciążową (badanie stężenia ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej) z moczu lub krwi na bardzo wczesnym etapie ciąży (przed dniem spodziewanej miesiączki), kiedy niemożliwe jest jej potwierdzenie w badaniu ultrasonograficznym. Aktualne wytyczne ESHRE zalecają rozpoznanie tzw. „utraty niewidocznionej ciąży” u pacjentki, która miała przynajmniej dwa, następujące po sobie, dodatnie wyniki próby ciążowej z krwi lub moczu. W Polsce w takiej sytuacji klinicznej używa się najczęściej określenia „ciąża biochemiczna”. W przypadku uwidocznienia w jamie macicy pęcherzyka ciążowego (ang. *gestational sac, GS*) o odpowiednich wymiarach, ale bez echa zarodka, rozpoznaje się tzw. puste jajo płodowe (ang. *empty sac*). Ważne, aby w każdym przypadku krwawienia z dróg rodnych u pacjentki z dodatnim wynikiem beta-hCG różnicować poronienie zagrażające z ciążą pozamaciczną (25,26).

Należy zaznaczyć, że badanie ginekologiczne ciężarnej z krwawieniem może ujawnić inne źródło jego pochodzenia niż jama macicy. Krwawienie może być niezwiązane z ciążą, spowodowane przez zmiany na szyjce macicy, zarówno łagodne (zapalenie, polip, mięśniak) jak i złośliwe - rak szyjki macicy współistniejący z ciążą. Również patologie w pochwie – stany zapalne, urazy mechaniczne, zmiany nowotworowe mogą objawiać się krwawieniem z dróg rodnych.

Zarówno w przypadku poronienia, jak i poronienia zagrażającego, krwawienie pochodzi z uszkodzonych naczyń oddzielającego się od doczesnej maczynnej trofoblastu, czyli rozwijającego się łożyska. Akumulacja krwi w tej okolicy zmniejsza powierzchnię funkcjonalną jednostki maczyno-płodowej, co ogranicza zarodkowi lub płodowi dostęp do tlenu i substancji odżywczych. W wielu przypadkach prowadzi to do obumarcia ciąży i poronienia. Ponadto, wynaczynienie krwi prowadzi do zwiększenia stężenia tlenu i wolnego żelaza w trofoblaście, co skutkuje lokalnym wzrostem ilości reaktywnych form tlenu, w tym silnie uszkadzającego wolnego rodnika hydroksylowego (39). Przyczyna uszkodzenia tych naczyń pozostaje nieznana.

Krwawienie z dróg rodnych w ciąży może mieć różny charakter, obfitość i czas trwania. Istnieją doniesienia, że nawet jeden epizod krwawienia zwiększa ryzyko niepowodzenia ciąży (38), które według niektórych badaczy rośnie wraz z wzrastającą obfitością i czasem trwania (35).

Istnieje szereg poznanych przyczyn poronienia. Bezsprzecznie najczęstszą stanowią nieprawidłowości genetyczne - w znaczącej większości aberracje chromosomowe. Trisomie, poliploidie, monosomie X, translokacje nie zrównoważone stanowią przyczynę 50-60% poronień w 1. trymestrze ciąży (21,23,24). Zjawisko to jest uważane za fizjologiczny mechanizm zahamowania rozwoju zarodków o nieprawidłowym genomie. W badaniu przeprowadzonym przez Philippa i wsp. na 233 obumarłych zarodkach i płodach, u 75% wykazano nieprawidłowy kariotyp, u 18% nieprawidłowości morfologiczne przy prawidłowym kariotypie, a tylko 7% miało prawidłowy kariotyp i morfologię (61).

Czynniki anatomiczne uniemożliwiające lub znacznie utrudniające donoszenie ciąży to patologie macicy wrodzone (macica jednorożna, dwurożna, przegrodzona) oraz nabyte (mięśniaki macicy, polipy endometrialne, zrosty wewnątrzmaciczne), a także niewydolność szyjki macicy i endometrioza miednicy mniejszej (21).

Przyczyną poronienia może być uraz mechaniczny, w tym bardzo rzadko jatrogenny, spowodowany inwazyjną diagnostyką prenatalną (biopsja kosmówki, amniopunkcja).

Śród kolejnych znanych przyczyn utraty ciąży należy wymienić zespół antyfosfolipidowy oraz dziedziczne trombofilie. Czynniki hormonalne, takie jak choroba tarczycy, zespół policystycznych jajników, hiperprolaktynemia czy niewydolność fazy lutealnej mogą przyczyniać się zarówno do niepłodności jak i do poronień (21).

Nie bez znaczenia dla przebiegu ciąży pozostaje środowisko oraz styl życia ciężarnej. Ekspozycja na zanieczyszczenia i toksyny, promieniowanie jonizujące, palenie tytoniu, środki psychoaktywne, alkohol zwiększają istotnie ryzyko utraty ciąży (12,24,32). Patologie metaboliczne, takie jak niekontrolowana cukrzyca, otyłość, niedożywienie stanowią zagrożenie dla prawidłowego rozwoju ciąży na każdym etapie (12).

Wykazano, że w około 15% przypadków poronień wczesnych i w prawie 70% przypadków poronień w 2. tryestrze ciąży występuje zakażenie (64,65). Waginoza bakteryjna oraz zakażenia takimi patogenami jak *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, wirusy różyczki, cytomegalii, opryszczki, grypy i HIV mają związek z poronieniami (21,24,32,64).

Przedmiotem coraz większego zainteresowania badaczy są czynniki alloimmunologiczne oraz zaburzenia funkcji i receptywności endometrium leżące prawdopodobnie u podstaw wielu wczesnych utrat ciąż (24). Coraz szerzej opisywanymi czynnikami wywołującymi wczesne poronienia są polimorfizmy genów odpowiedzialnych za produkcję gonadotropiny kosmówkowej i przyczyny epigenetyczne (62,63).

Jedynymi badaniami dającymi pewną odpowiedź na temat przyczyny poronienia są badania genetyczne zarodka/płodu, w przypadku występowania nieprawidłowości w tym zakresie. Standardowo przeprowadzane badania histopatologiczne materiałów z poronień nie dostarczają informacji o ich etiologii (49).

Najistotniejszym czynnikiem ryzyka poronienia jest wiek pacjentki przekraczający 35 lat (29). Wynika to z następnego wraz z wiekiem wzrostu częstości nieprawidłowości genetycznych zarodka pod postacią aneuploidii (23). Ryzyko aberracji chromosomowych u potomstwa wzrasta istotnie po 30. roku życia, a po ukończeniu 45. roku życia sięga, zależnie od źródeł, 53-75% (29,30). Wiek ojca powyżej 35 lat, z uwagi na postępującą z wiekiem aneuploidię nasienia i fragmentację DNA, także ma wpływ na częstość poronień, szczególnie w 1 tryestrze ciąży (24, 31).

Mimo długiej listy udowodnionych czynników mogących prowadzić do poronienia, nadal przyczyna około 40% z nich pozostaje nieznana. Czy tym utratom ciąż można by było zapobiec? Najpierw konieczne wydaje się poznanie ich etiopatogenezy. Coraz większa liczba

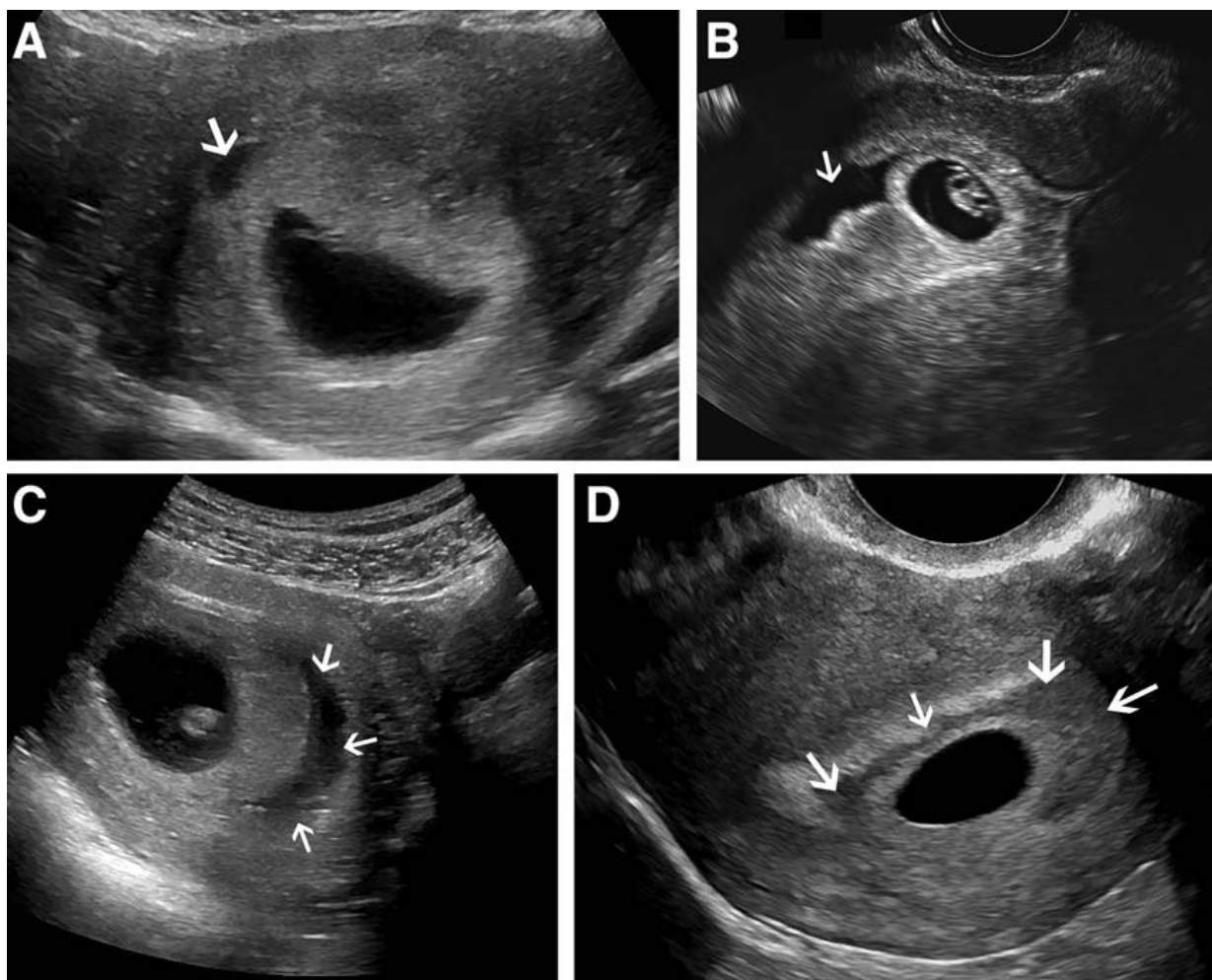
Autorów twierdzi, iż u podłoża wielu poronień leży nieprawidłowy proces placentacji (powstawania łożyska) i uszkodzenia wywołane przez stres oksydacyjny (40,45,49,50).

1.1.3 Krwiak podkosmówkowy (SCH – *subchorionic hematoma*)

Krwiak podkosmówkowy powstaje w wyniku wynaczynienia i akumulacji krwi pomiędzy doczesną a trofoblastem (kosmówką). Powiększając się, stopniowo oddziela kosmówkę i jajo płodowe od błony doczesnowej, ograniczając powierzchnię wymiany między matką a zarodkiem/płodem. W efekcie może dojść do obumarcia ciąży i poronienia.

Wielu autorów traktuje SCH jako trzeci objaw poronienia zagrażającego (po krwawieniu z dróg rodnych i bólu podbrzusza), należy jednak zaznaczyć, że nie każda krwawiąca pacjentka ma krwiaka podkosmówkowego, a także nie każdy krwiak współistnieje z krwawieniem z dróg rodnych (33,35). Opisywaną prawdopodobną przyczyną krwawienia podkosmówkowego jest nieprawidłowa, zbyt płytka inwazja trofoblastu i patologiczna angiogeneza, na skutek której powstają podatne na uszkodzenia naczynia krwionośne (37,45).

Krwiak podkosmówkowy jest możliwy do zdiagnozowania w badaniu ultrasonograficznym, najkorzystniejszy jego obraz uzyskuje się przy użyciu głowicy transwaginalnej. Jest strukturą o innej echogeniczności niż kosmówka, półksiężycowatym, owalnym lub okrągłym kształcie, znajdującą się pomiędzy jajem płodowym a doczesną. Obraz krwiaka zmienia się wraz z upływem czasu, zatem w badaniu USG echogeniczność zmiany może być różna: zbliżona do kosmówki (izoechogenna), zmniejszona – hipoechogenna i zwiększona – hiperechogenna. Krwiak podkosmówkowy może być zlokalizowany w dowolnym miejscu jamy macicy (ściana przednia, tylna, dno oraz nadszyjkowo). Niektórzy Autorzy stosują dodatkowo podział uzależniony od pozycji krwiaka względem kosmówki/łożyska. Jeśli krwiak znajduje się pomiędzy błonami płodowymi a ścianą macicy, opisują go jako podkosmówkowy, zaś w przypadku pozycji pomiędzy strukturami trofoblastu a ścianą macicy – jako założyskowy (52,57). W niniejszej pracy przyjęto stosowanie terminu krwiak podkosmówkowy dla każdego krwiaka znajdującego się w jamie macicy.



Rycina 2. Obrazy ultrasonograficzne krwiaka podkosmówkowego (strzałki) o różnym kształcie, echogenności i wielkości (131).

U krwawiących ciężarnych SCH jest częstym zjawiskiem – występuje, zależnie od źródła, u 4-22% pacjentek. Co ciekawe, krwiaki podkosmówkowe obserwuje się również u 2-4% ciężarnych bez objawów poronienia zagrażającego – tzw. „ciche krwiaki” (ang. *silent SCH*) (35). Znamienita większość – nawet 70% SCH – ustępuje samoistnie wraz z końcem 1. trymestru ciąży (36). Mimo wielu przeprowadzonych badań naukowych nadal trwa dyskusja na temat znaczenia SCH w kontekście poronienia ciąży, a także wartości prognostycznej jego wielkości i lokalizacji (38,56,57). Wielu Autorów twierdzi, że krwiak podkosmówkowy w jamie macicy zwiększa ryzyko utraty ciąży, zarówno wczesnej jak i późnej (33,37,52,58,187). Niektórzy badacze donoszą, że ryzyko poronienia jest proporcjonalne do wielkości krwiaka, zaś u pacjentek krwawiących - do objętości krwawienia (35,57,58,191). Ciekawych obserwacji dostarczają badania nad obecnością SCH w macicy u asymptomatycznych pacjentek. W niektórych z nich zaobserwowano zwiększony odsetek poronień, ale także

powikłań perinatalnych, takich jak ograniczenie wzrastania płodu (*fetal growth restriction*, FGR), nadciśnienie indukowane ciążą (*pregnancy induced hypertension*, PIH), stan przedrzucawkowy, przedwczesne oddzielenie łożyska, poród przedwczesny, przedwczesne przedporodowe pęknięcie błon płodowych (*preterm prelabor rupture of membranes*, PPRM) oraz wewnątrzmaciczne obumarcie płodu. Ponadto, istnieją doniesienia, że u kobiet, które miały SCH, częściej rozwiązuje się ciążę cięciem cesarskim (33-37,52).

Mechanizm, w jakim obecność SCH miałyby powodować powyższe powikłania nie jest znany. Przeprowadzone badania histopatologiczne wykazały, że w miejscu krwiaka powstaje struktura łącznotkankowa o charakterze blizny, co prawdopodobnie wpływa na funkcję trofoblastu (a później łożyska), a także osłabia jego połączenie z doczesną (33,37). Głównym postulowanym mechanizmem jest jednak uszkodzenie trofoblastu przez warunki stresu oksydacyjnego, wywołane wynaczynieniem bogato utlenowanej krwi matczynej do przestrzeni międzykosmkowej (45).

1.2 Stres oksydacyjny i jego wpływ na rozwój trofoblastu

Życie na Ziemi nie powstałoby bez akumulacji ogromnej ilości wolnego tlenu. Zjawisko to doprowadziło między innymi do powstania ochronnej warstwy ozonu w atmosferze. Zabezpieczenie przed promieniowaniem UV umożliwiło organizmom wyjście z wody na ląd. Dzięki wysokiej reaktywności tlenu zaszły liczne reakcje biochemiczne w szlakach metabolicznych procesu ewolucji organizmów. Metabolizm tlenowy, a dokładnie proces fosforylacji oksydacyjnej umożliwia uzyskanie dużej ilości energii gromadzonej w postaci adenozynotrifosforanu (ATP) (43). Mimo, iż nasze życie nie byłoby możliwe bez tlenu, w wysokich stężeniach jest on gazem toksycznym dla wszystkich żyjących organizmów.

Reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) to formy posiadające niesparowany elektron, mające zdolność do uszkodzania cząstek biologicznych – białek, tłuszczów i DNA, a co za tym idzie - komórek, tkanek i narządów całego organizmu. Płuca pobierają z powietrza tlen znajdujący się w stanie podstawowym, tzw. tlen trypletowy ($^3\text{O}_2^{\bullet\bullet}$). Reaktywne formy tlenu powstają w wyniku redukcji tlenu trypletowego. Jednoelektronowa redukcja powoduje powstanie anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$), najpowszechniej występującego wolnego rodnika tlenowego, prekursora pozostałych ROS. Kolejna reakcja jednoelektronowej redukcji w tym łańcuchu prowadzi do powstania nadtlenu wodoru (H_2O_2). Następnie, w reakcjach redukcji Fentona i Habera-Weissa, z

nadtlenku wodoru powstaje najbardziej reaktywny ROS – rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$). Dalsze przemiany w tym łańcuchu reakcji, katalizowane przez oksydazę cytochromową, prowadzą do powstania wody.

Szacunkowo 1-4% cząsteczek tlenu wydostaje się z tego cyklu reakcji i nie ulega przemianie w H_2O . Z cyklu wydostają się także elektrony zdolne do redukcji tlenu, co stanowi główne źródło wolnych rodników tlenowych (69,72,91). Celem obrony organizmu przed ROS powstały enzymatyczne i nieenzymatyczne metody detoksykacji reaktywnych form tlenu. Substancje posiadające takie zdolności nazywamy antyoksydantami.

Zaburzenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu a zdolnością ochrony przed ich działaniem, czyli homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, w kierunku prooksydacyjnym nazywamy stresem oksydacyjnym (44). Organizm ludzki jest pod ciągłym atakiem reaktywnych form tlenu, a homeostaza utrzymywana jest dzięki prawidłowemu działaniu antyoksydantów. Stres oksydacyjny zachodzi w przypadku powstawania zwiększonej ilości ROS lub upośledzenia zdolności antyoksydacyjnych. Nadprodukcja ROS może nastąpić w sytuacji narażenia na wyższe stężenia tlenu, ale także w reakcji na niedotlenienie, w mechanizmie ischemii-reperfuzji, w stanie zapalnym, pod wpływem promieniowania czy działania toksyn egzogennych (43,72).

Reaktywne formy tlenu uszkadzają komórki przez utlenienie ich składników, a uszkodzenia te mogą być nieodwracalne (42). Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów uszkadzających jest peroksydacja lipidów, która powoduje m.in. upośledzenie transportu przez błonowego i uszkodzenie błon komórkowych, umożliwiające destrukcję składników komórki (68-72). Reaktywne formy tlenu mają zdolność uszkadzania struktury białek, co upośledza ich funkcjonowanie, a nawet może prowadzić do denaturacji. Uszkodzenia DNA wywołane przez ROS przyczyniają się do powstawania mutacji, sprzyjają proliferacji komórek i hamowaniu apoptozy, co może skutkować rozwojem nowotworów (72). Jednocześnie, obecność reaktywnych form tlenu jest niezbędna do zaistnienia w organizmie wielu istotnych reakcji chemicznych. ROS pełnią rolę przekaźników i regulatorów w wielu istotnych procesach komórkowych, regulują działanie tlenu azotu, transport dokomórkowy glukozy oraz procesy proliferacji, różnicowania i zaprogramowanej śmierci komórki. Prawidłowe krzepnięcie krwi oraz synteza niektórych hormonów, np. tyroksyny są zależne od obecności ROS (91). W wyższych stężeniach, reaktywne formy tlenu odpowiadają za działanie antybakteryjne, antypierwotniakowe i antymutagenne makrofagów, neutrofilów, monocytów i eozynofili (91). Bez ROS nie byłyby możliwe inicjacja i prawidłowy przebieg

procesu zapalnego. Reaktywne formy tlenu przyczyniają się do ekspresji niektórych genów kodujących białka ostrej fazy, aktywują limfocyty T i ułatwiają ich przenikanie do miejsca reakcji zapalnej (70).

Stresu oksydacyjny jest jednym z głównych mechanizmów starzenia się organizmów i jego poziom zwiększa się z wiekiem (70). Coraz więcej publikacji donosi o jego znaczącej roli w patomechanizmie wielu chorób, także powikłań ciąży. Udowodniono, że reaktywne formy tlenu mają istotny udział w etiologii choroby wieńcowej (głównie poprzez peroksydację LDL w blaszkach miażdżycowych), pełnią kluczową rolę w uszkodzeniu komórek w mechanizmie reperfuzji niedokrwionego narządu, uczestniczą w kancerogenezie, rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, chorób układu oddechowego, a także cukrzycy (68-72). W ginekologii opisano potencjalną rolę stresu oksydacyjnego w patogenezie mięśniaków macicy, raka jajnika, przerostu i raka endometrium, torbieli endometrialnych, zespołu policystycznych jajników i niepłodności (73-76).

Ciąża jest uważana za stan zaburzenia homeostazy w kierunku prooksydacyjnym. Badania wykazały, że kobiety w ciąży mają mniejsze zdolności antyoksydacyjne oraz zwiększone stężenia utlenionych lipoprotein niskiej gęstości (*low density lipoproteins*, LDL), co świadczy o zwiększonej peroksydacji lipidów (48). Wynika to prawdopodobnie z faktu, iż ciąża wiąże się z systemową odpowiedzią zapalną, która powoduje aktywację obwodowych granulocytów, monocytów i limfocytów produkujących ROS (44). Stan stresu oksydacyjnego powoduje dalsze wydzielanie do krążenia matczynego czynników prozapalnych, co skutkuje zwiększeniem produkcji reaktywnych form tlenu (44). Ponadto, w czasie ciąży metabolizm mitochondriów łożyskowych oraz aktywność łożyskowej oksydazy NADPH skutkuje produkcją dużych ilości ROS (106).

Znaczenie stresu oksydacyjnego w ciąży jest wciąż intensywnie badane. Wiele doniesień naukowych wskazuje, że może on pełnić rolę w patofizjologii poronienia oraz powikłań takich jak m.in. preeklampsja, ograniczenie wzrastania płodu, przedwczesne pęknięcie błon płodowych i cukrzyca ciążowa (40,46,88,130).

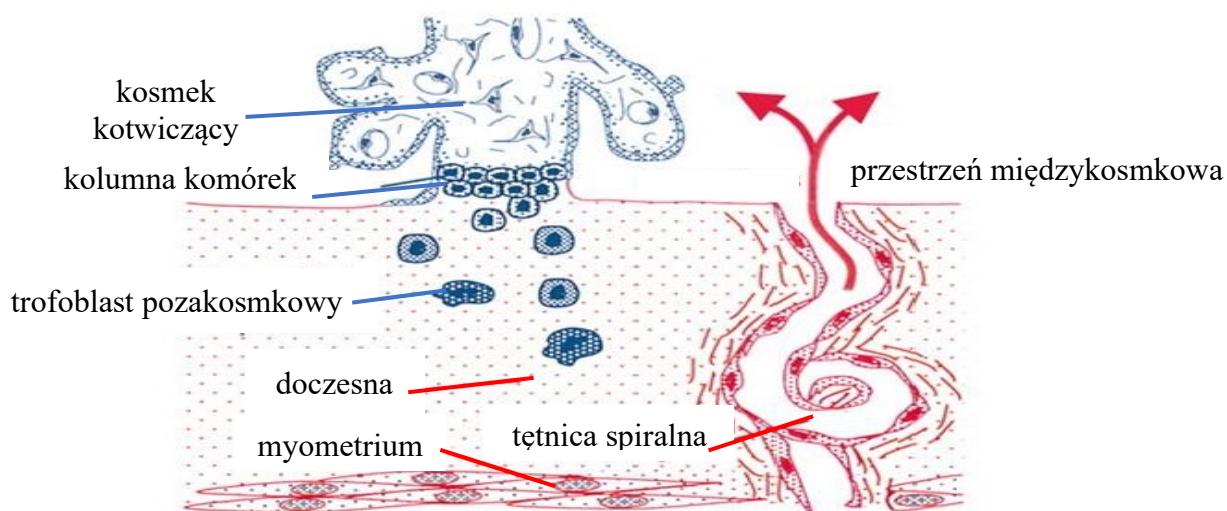
Kluczem do fizjologicznego przebiegu ciąży i urodzenia zdrowego noworodka jest prawidłowa wymiana matczyno-płodowa w czasie ciąży i porodu. Dla jej osiągnięcia niezbędne są dwa procesy, które zachodzą na początku ciąży – prawidłowa inwazja trofoblastu w doczesną i transformacja tętnic spiralnych. Bardzo istotny jest również odpowiedni moment inicjacji przepływu krwi od matki do jaja płodowego (43,45). Trofoblast jest delikatną strukturą narażoną na duże wahania stężenia tlenu. Prawidłowo, proces inwazji trofoblastu i remodelingu tętnic spiralnych zachodzi w warunkach niskiego stężenia tlenu. Ma

to na celu ochronę dzielących się komórek zarodka oraz powstającego łożyska przed ROS, ponieważ aktywność antyoksydantów w tej okolicy w okresie zarodkowym jest niska (43). W tym szczególnym czasie to gruczoły endometrium i pęcherzyk żółtkowy dostarczają zarodkowi potrzebnych składników odżywczych. Kontakt z krwią matki nie jest kluczowy dla jego przetrwania, a wręcz może być niebezpieczny (44). Cytotrofoblast pozakosmkowy chroni delikatną przestrzeń wewnątrzkosmkową powstającego łożyska przed zbyt wczesnym kontaktem z bogatą w tlen krwią tętniczą matki. Dokładny mechanizm tego zjawiska polega na zamknięciu światła dystalnych odcinków tętnic spiralnych przez agregaty komórek cytotrofoblastu, co uniemożliwia napływanie krwi maczyny do tej okolicy (45). Maczynne krążenie przekosmkowe rozpoczyna się w momencie rekanalizacji tętnic spiralnych, fizjologicznie powinno się to odbywać stopniowo od zewnętrznej warstwy kosmówki do kosmków trofoblastu (40,45).

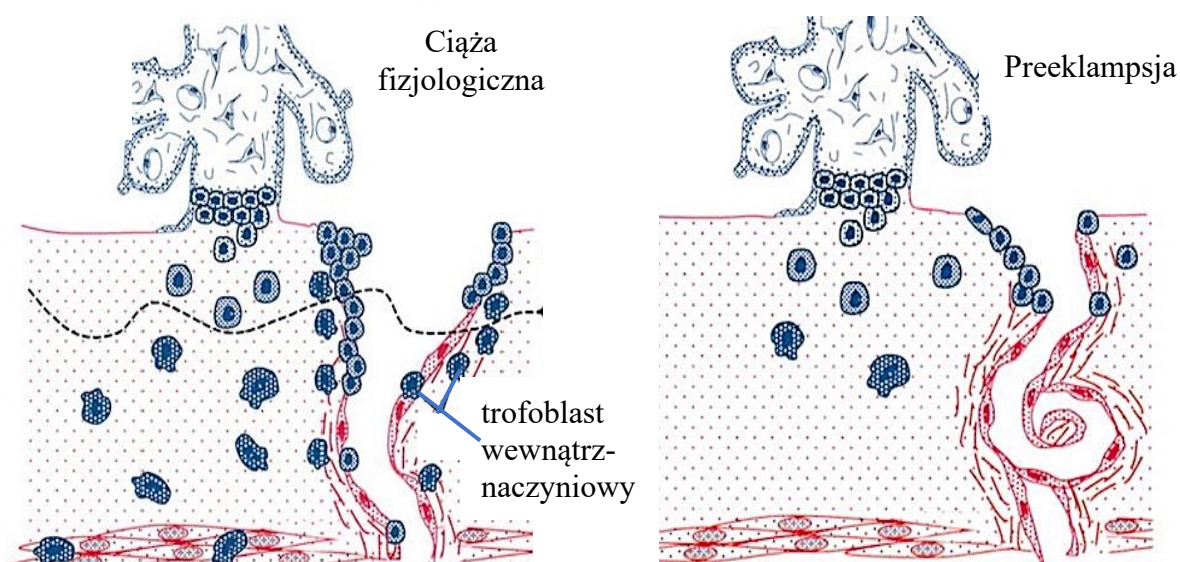
Jauniaux i wsp. zbadali *in vivo*, że w okresie zarodkowym w przestrzeni międzykosmkowej ciśnienie parcjalne tlenu kształtuje się na poziomie poniżej 20 mmHg, zaś w doczesnej - 60 mmHg (43). Pomiędzy 11. a 14. tygodniem ciąży następuje rekanalizacja tętnic spiralnych i rozpoczyna się przepływ krwi maczyny przez kosmówkę, co skutkuje wzrostem ciśnienia parcjalnego tlenu do wartości 50 mmHg. Krwawienie podkosmkowe oznacza przedwczesny kontakt trofoblastu z krwią tętniczą matki. Powoduje ono wzrost ciśnienia parcjalnego tlenu w trofoblaście do wartości przekraczających 50 mmHg (40). Następstwem tego zjawiska jest stres oksydacyjny w rozwijającym się łożysku. W badaniach *in vitro* wykazano, że w ciągu kilku minut od ekspozycji trofoblastu na tlen w stężeniu 21% pojawiają się w nim ROS, natomiast powyżej 4 godzin w takich warunkach skutkuje nieodwracalnym uszkodzeniem immunohistochemicznym (40,41). W 2. i 3. trymestrze ciąży, kiedy trwa już aktywna wymiana maczyno-płodowa, stężenie antyoksydantów w łożysku rośnie (40,44).

Drugim z warunków prawidłowego rozwoju powierzchni wymiany maczyno-płodowej jest remodeling tętnic spiralnych. Zmiany adaptacyjne w tętnicach maciczo-łożyskowych mają miejsce w pierwszych 20. tygodniach ciąży (40). Celem inwazji trofoblastu w śródbłonek i mięśniówkę tętnic spiralnych jest pozbawienie ich ściany elastyczności, rozszerzenie na stałe światła oraz utrata maczynnej kontroli wazomotorycznej. Te zmiany adaptacyjne mają na celu zapewnienie ciągłego, niskooporowego przepływu krwi od matki do płodu (40,107).

Wykazano odmienności w budowie i funkcjonowaniu tętnic spiralnych w ciążach powikłanych stanem przedrzucawkowym i wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu, wynikające najpewniej z nieprawidłowości procesów inwazji trofoblastu i remodelingu (107). Tętnice te nadal podlegają matczynej kontroli regulacji szerokości ściany, w związku z czym charakteryzuje je wyższy opór. Ponadto, ich mięśniówka kurczy wraz ze skurczem macicy. Prowadzi to do przerw w przepływie krwi, po których następuje jej szybki napływ pod dużym ciśnieniem. W efekcie może regularnie dochodzić do uszkodzeń łożyska w przypominających te opisywane w mechanizmie niedokrwienia i reperfuzji (98).



Rycina 3. Schemat przedstawiający proces inwazji trofoblastu przed 6. tygodniem ciąży. Z: (107).



Rycina 4. Schemat przedstawiający proces inwazji trofoblastu oraz charakterystykę i morfologię tętnic spiralnych po 20. tygodniu w ciąży fizjologicznej (strona lewa) oraz ciąży powikłanej preeklampsją (strona prawa). Z: (107).

Spośród wszystkich powikłań perinatalnych, najsilniej udowodniony związek ze stresem oksydacyjnym ma preeklampsja (40,43,88,89). Rola reaktywnych form tlenu w etiopatogenezie krwawienia z dróg rodnych w ciąży i poronienia jest wciąż niejasna i intensywnie badana. Niektórzy badacze donoszą, że w ciążach zakończonych poronieniem początek krążenia maczyno-płodowego jest przedwczesny i odbywa się w sposób przypadkowy i niezorganizowany (45,46). Wykazano, że w 70% przypadków wczesnej utraty ciąży inwazja trofoblastu pozakosmkowego w światło tętnic spiralnych jest zbyt powierzchowna, czego efektem jest jego przedwczesny kontakt z krwią maczyną. Umożliwia to uszkodzenie trofoblastu przez reaktywne formy tlenu. Wydaje się, iż wyrazem destrukcji rozwijającego się łożyska przez ROS jest znacznie wyższy wskaźnik apoptozy i degeneracji oraz zwiększona peroksydacja lipidów (49,99). Ponadto, stres oksydacyjny w trofoblaście i łożysku prowadzi do zwiększenia wydzielania cytokin prozapalnych i czynników antyangiogennych, co skutkuje maczyną reakcją zapalną i dysfunkcją śródbłonna (99). U pacjentek, które poroniły, niektórzy badacze wykazali zmniejszony status antyoksydacyjny oraz uszkodzenia DNA zarodków wywołane reakcjami utleniania (44,47).

1.2.1 Dialdehyd malonowy (MDA)

Bezpośredni pomiar stężenia reaktywnych form tlenu w tkankach jest bardzo trudny z uwagi na ich krótki czas półtrwania, niestabilność, wysoką reaktywność oraz wzrost stężenia odbywający się lokalnie. Pośrednim sposobem na zmierzenie natężenia stresu oksydacyjnego jest pomiar stężenia substratów reakcji, w których biorą udział reaktywne formy tlenu. Najlepiej przebadanym z nich jest dialdehyd malonowy, powszechnie uznawany za marker *in vivo* stresu oksydacyjnego (138). Dialdehyd malonowy jest produktem peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), które stanowią podstawowy składnik błon biologicznych. Proces peroksydacji PUFA jest niekorzystnym biologicznym efektem działania reaktywnych form tlenu. Zniszczenie błon komórkowych umożliwia uszkodzenie składników komórki, mogące prowadzić do jej śmierci. W efekcie tych procesów destrukcji powstaje dialdehyd malonowy. Wzrost jego stężenia prowadzi do dalszych uszkodzeń, szczególnie cząsteczek białek i kwasów nukleinowych. Dialdehyd malonowy wykazuje działanie cytotoksyczne, aterogenne, mutagenne i kancerogenne (138).

1.3 Antyoksydanty

Metabolizm tlenowy jest konieczny do życia dla większości organizmów, a zjawiskiem nieuniknionym podczas tego procesu jest powstawanie reaktywnych form tlenu. W związku z tym, aby utrzymać warunki homeostazy, organizmy posiadają mechanizmy obrony przed ROS – zdolności antyoksydacyjne (50).

Antyoksydanty są heterogenną grupą substancji o zróżnicowanej budowie i właściwościach, tworzącą sprawnie działający system. Łączy je jedna cecha – zdolność kontroli poziomu stresu oksydacyjnego. Odbywa się ona na różnych etapach i w różnych mechanizmach. Antyoksydanty mogą zapobiegać inicjacji łańcucha reakcji prowadzących do powstania wolnych rodników, hamować reakcje utleniania, przerywać łańcuch powstawania ROS. Co więcej, niektóre z nich posiadają zdolność neutralizacji wolnych rodników tlenowych, a nawet naprawy spowodowanych utlenianiem uszkodzeń (68-70). Wiele doniesień naukowych przypisuje antyoksydantom działanie zapobiegające starzeniu się organizmów oraz rozwojowi niektórych chorób (67-70).

Istnieje wiele podziałów antyoksydantów - ze względu na ich formę, budowę i inne właściwości. Można je podzielić na egzogenne i endogenne, syntetyczne i naturalne, hydrofilne i lipofilne. Najczęściej stosowany jest podział na przeciwutleniacze enzymatyczne i nieenzymatyczne.

Do nieenzymatycznych substancji o działaniu antyoksydacyjnym należą:

- witaminy (witamina A, C, E, B3, B6, B12, ryboflawina, niacyna);
- glutation w zredukowanej formie (GSH);
- wielonienasycone kwasy tłuszczowe (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA);
- aminokwasy (m.in. tauryna, glutamina, L-arginina);
- białka i peptydy (wspomniane wyżej glutation, albumina, tioredoksyna, laktoferyna, transferyna, bilirubina, ceruloplazmina);
- minerały (cynk, żelazo, miedź, selen);
- przeciwutleniacze roślinne (fenole, polifenole, flawonoidy, karotenoidy);
- enzymy (koenzym Q, kwas moczowy) (66).

Do antyoksydantów enzymatycznych, mających największe znaczenie dla ochrony organizmu przed stresem oksydacyjnym zaliczamy:

- dysmutazę ponadtlenkową (SOD);

- peroksydazę glutationową (GPx);
- reduktazę glutationową (GR);
- katalazę (CAT);
- enzymy wspomagające działanie powyższych poprzez dostarczanie fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoaninowego (NADPH) transportowanie i eliminowanie form aktywnych (m.in. S-transferaza glutationowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa) (68,70).

Substancje wykazujące działanie antyoksydacyjne mogą znajdować się w różnych miejscach komórki – np. w cytoplazmie, mitochondriach, a także pozakomórkowo. Istotne jest aby były zlokalizowane blisko miejsc, gdzie powstają reaktywne formy tlenu.

1.3.1 Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Dysmutaza ponadtlenkowa jest enzymem antyoksydacyjnym z grupy metaloproteinaz. Swoje działanie antyoksydacyjne wykazuje poprzez katalizowanie dysmutacji jednego z najsilniejszych ROS - anionorodnika ponadtlenkowego. W wyniku tej reakcji powstaje tlen cząstkowy i nadtlenek wodoru, przekształcany dalej przy udziale katalazy bądź peroksydazy glutationu do cząsteczki wody.

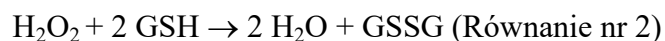


W organizmach ludzkich występują trzy izoformy SOD, każda z nich zawiera część białkową oraz znajdujący się w centrum atom metalu (miedzi, żelaza, cynku lub manganu):

- znajdującą się głównie w cytoplazmie i jądrze komórek Cu/Zn SOD (SOD1)
- zawartą w mitochondriach Mn SOD (SOD2)
- EC SOD, postać wydzielana na zewnątrz komórek, zawierająca Cu i Zn (SOD3) (67,69).

1.3.2 Peroksydaza glutationowa (GPx)

Peroksydaza glutationowa jest enzymem antyoksydacyjnym odpowiedzialnym za redukcję nadtlenku wodoru do wody, co hamuje proces peroksydacji lipidów. Reakcja ta odbywa się przy udziale zredukowanego glutationu, z którego GPx czerpie elektrony przyłączane do nadtlenku wodoru.



Peroksydaza glutationowa posiada także zdolność redukowania wodoronadtlenków lipidowych. Największą aktywność GPx wykazuje w tkance wątrobowej, płucnej i we krwi. W swoim centrum aktywnym peroksydaza glutationowa zawiera selenocysteinę i jej prawidłowe działanie jest uzależnione od biodostępności selenu.

Peroksydaza glutationowa, ściśle współpracując z glutationem i jego reduktazą tworzy tzw. układ enzymatyczny związany z glutationem. W wyniku reakcji redukcji H_2O_2 , katalizowanej przez GPx, dla której efektywnego przebiegu konieczna jest obecność zredukowanego glutationu (GSH), powstaje utleniona forma glutationu (GS-GS). Zredukowany glutation jest następnie odzyskiwany przez reduktazę glutationu (GR) przy udziale fosforanu dinukleotydu nikotynoaminoadeninowego (NADPH).



Wyróżniamy kilka izoform GPx:

- występującą w cytozolu cGPx
- występującą w cytozolu i związaną z błonami biologicznymi phGPx, która metabolizuje wodoronadtlenki fosfolipidowe
- pozakomórkowa eGPx
- giGPx – peroksydaza żołądkowo-jelitowa (154).

Peroksydaza glutationu jest jednym z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych u człowieka (154). Do tej pory wykazano, że jej niedobór jest związany z dysfunkcją śródbłonna, nieprawidłową angiogenezą, powstawaniem blaszki miażdżycowej i kancerogenezą (153, 155, 156).

1.3.3 Glutation (GSH)

Glutation jest tripeptydem o istotnym działaniu detoksykacyjnym i antyoksydacyjnym, powszechnie występującym w komórkach roślin i zwierząt. Syntetyzowany jest w wątrobie z egzogenego glutaminianu, cysteiny i metioniny.

Zredukowana forma glutationu (GSH) chroni przed oksydacją oraz odtwarza utlenione grupy tiolowe w białkach. Jest także niezbędnym koenzymem dla reakcji peroksydazy glutationowej, o czym wspomniano już wyżej. Poza udziałem w reakcji redukcji nadtlenu wodoru, GSH redukuje nadtlarki organiczne powstające w wyniku peroksydacji lipidów i bierze udział w metabolizmie rodników hydroksylowych (162,164).

Wykazano, że wraz z wiekiem oraz w warunkach stresu oksydacyjnego poziom GSH w komórkach spada. Silne zaburzenie homeostazy w kierunku prooksydacyjnym prowadzi do powstania dużych ilości utlenionej formy glutationu (GSSG), zdolnej do uszkodzania białek. Obniżone stężenia GSH wykazano w przebiegu wielu chorób – cukrzycy, AIDS, chorób neurodegeneracyjnych i w alkoholizmie (162,209).

Z uwagi na doniesienia o podwyższonym stężeniu GSH w komórkach nowotworowych, do którego dochodzi prawdopodobnie w wyniku stresu oksydacyjnego i które skutkuje większą odpornością na apoptozę, glutation jest przedmiotem wielu badań w onkologii (162). Istnieją doniesienia, że zredukowany glutation, który wewnątrz komórek działa przeciwutleniająco, zewnątrzkomórkowo może wykazywać działanie mutagenne (162). Badania nad obniżeniem stężenia GSH w chorobach neurodegeneracyjnych wykazały, że w komórkach nerwowych prowadzi ono do stresu oksydacyjnego, powodującego uszkodzenie składników komórki przez produkty peroksydacji, napływ jonów wapnia i ostatecznie śmierć (209,210). Li i wsp. donoszą, że głównym mechanizmem uszkodzenia neuronów związanym ze spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia GSH jest aktywacja 12-lipooksygenazy, która skutkuje akumulacją produktów peroksydacji (209). Także WuEllner i wsp. zaobserwowali w swoim badaniu wzrost stężenia reaktywnych form tlenu po obniżeniu poziomu glutationu (210).

1.3.4 Reduktaza glutationowa (GR)

Reduktaza glutationowa jest oksydoreduktazą występującą w cytozolu i mitochondriach. Stanowi składową zależnego od glutationu antyoksydacyjnego układu enzymatycznego, a jej główną rolą jest utrzymywanie prawidłowego poziomu GSH.

Odpowiada za redukcję utlenionej formy glutationu (GSSG), co odbywa się przy obecności NADPH (164).



Rola GR jest szczególnie ważna w erytrocytach, które chroni przed hemolizą m. in. przez utrzymywanie prawidłowego stosunku GSH do GSSG. Aktywność GR jest zależna od obecności ryboflawiny (vit. B12) (164). Badania na modelu zwierzęcym pokazały, że w warunkach stresu oksydacyjnego ekspresja mRNA reduktazy glutationu rośnie (170).

Antyoksydanty, szczególnie enzymatyczne, chronią struktury rozwijającego się jaja płodowego przed uszkadzającym działaniem ROS. Wykazano ich obecność zarówno w zarodkach, jak i oocytach, choć na wczesnym etapie ciąży ich aktywność jest niska (50). Wyniki niektórych badań wskazują, że w ciążach fizjologicznych status antyoksydacyjny jest wyższy niż w ciążach zakończonych poronieniem (50). Podwyższone parametry stresu oksydacyjnego zaobserwowano w ciążach powikłanych przedwczesnym przedporodowym pęknięciem błon płodowych (39).

Z uwagi na uznane pozytywne działanie substancji o działaniu przeciwutleniającym na organizmy, od dawna pokładane są nadzieje w badaniach klinicznych dotyczących ich potencjalnych zdolności terapeutycznych, również w jednostkach wikłających ciążę. Istnieją doniesienia o korzystnym efekcie zastosowania witaminy C w niepłodności, pod postacią zwiększenia odsetka owulacji i polepszenia jakości nasienia (77-79). Jedni badacze donoszą o korzyściach z zastosowania antyoksydantów w wewnątrzmacicznym ograniczeniu wzrastania płodu i preeklampsji, inni zaś opisują brak jakiegokolwiek efektów (80-83).

Jak wspomniano już wyżej, reaktywne formy tlenu w warunkach homeostazy pełnią istotne pozytywne funkcje w organizmach. Zwiększone spożycie antyoksydantów może znacznie obniżyć stężenie ROS, co mogłoby zaburzyć m.in. przekazywanie komórkowe (44). Xu i wsp. w badaniu na dużej grupie kobiet zaobserwowali nie tylko brak zmiany odsetka nadciśnienia indukowanego ciążą i preeklampsji, ale także zwiększenie częstości PPRM i utraty ciąży po zastosowaniu codziennej suplementacji witamin C i E (97).

Z uwagi na brak jednoznacznych dowodów na korzyści płynące z przyjmowania antyoksydantów oraz doniesienia o ich szkodliwym wpływie, aktualnie nie zaleca się ich stosowania przez kobiety w ciąży (84,85).

1.4 Czynniki wzrostu śródbłonnka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)

Czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego jest białkiem pełniącym kluczową rolę w procesie powstawania naczyń – warunkuje prawidłowy wzrost, różnicowanie i dojrzewanie tętnic, żył i naczyń limfatycznych. Wyróżniamy kilka jego izoform, tworzących tzw. rodzinę VEGF (VEGF-A, oznaczany najczęściej jako VEGF, VEGF-B, C, D i E), a także czynnik wzrostu łożyska PlGF (86). Wydzielany jest przez endotelium, mięśniówkę naczyń, endometrium i łożysko. Najważniejszymi receptorami dla VEGF są kinazy tyrozynowe Flt-1 (VEGFR-1) i Flk-1/KDR (VEGFR-2) (86). Główna aktywność VEGF jest skierowana wobec śródbłonnka i polega na promowaniu mitozy, migracji oraz regulacji jego funkcji.

Śródbłonek naczyniowy odpowiada za kontrolę wazomotoryczną, prawidłowy proces krzepnięcia i fibrynolizy, regulację przepuszczalności ścian naczyń oraz bierze udział w reakcji zapalnej organizmu. VEGF promuje wzrost przepuszczalności oraz rozszerzenie ścian naczyń, wykazuje działanie hematopoetyczne a także zapobiega apoptozie komórek śródbłonnka (28,86). Uszkodzenie endotelium leży u podstawy wielu chorób, spośród których do najlepiej poznanych i opisanych należy miażdżycy (28).

Fizjologicznie, aktywność czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego zwiększa się w odpowiedzi na warunki niedotlenienia, VEGF odpowiada także za angiogenezę w czasie choroby. Jest głównym stymulatorem neowaskularyzacji w chorobach nowotworowych i występuje w podwyższonych stężeniach w większości nowotworów. Badacze są zgodni, że duża ilość VEGF w tkance nowotworu wiąże się z większym ryzykiem powstawania przerzutów i gorszym rokowaniem. Farmakologiczne obniżenie stężenia VEGF stanowi intensywnie badaną, potencjalną metodę leczenia raka (86,96).

Prawidłowa angiogeneza i funkcjonowanie endotelium są konieczne dla powstania doczesnej i fizjologicznego rozwoju łożyska, zarodka i płodu (186). Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonnka wraz z łożyskowym czynnikiem wzrostu (PlGF) biorą udział w powstawaniu i transformacji naczyń podczas inwazji trofoblastu (185,186).

Kluczowe znaczenie w procesie placentacji oraz regulacji funkcji naczyniowej łożyska mają VEGF-A i PlGF oraz dedykowane im receptory – VEGF-1 (Flt-1/sFlt-1) i VEGF-2 (Flk-1/KDR), wykrywane w łożysku i wydzielane do krwi przez cały okres ciąży (132,186).

Wyniki badań wskazują, że dysfunkcja VEGF może prowadzić do rozwoju poważnych embriopatii i powikłań ciąży związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem

łożyska (101,102). W badaniu przeprowadzonym przez Pauliego i wsp. na modelu zwierzęcym, inhibicja VEGFR-2 poprzez podanie swoistego przeciwciała powodowała oddzielenie komórek śródbłónka w naczyniach ciała żółtego. Skutkowało to nagłym spadkiem stężenia progesteronu i zahamowaniem rozwoju ciąży. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników widzą potencjalną rolę terapeutyczną inhibitorów VEGFR-2 w leczeniu ciąży pozamaciczej, nieprawidłowo rozwijającej się ciąży w macicy, a także zastosowanie w antykoncepcji postkoitalnej (101).

Śród powikłań ciąży związanych z nieprawidłową placentacją najlepiej opisany jest związek między VEGF i jego receptorami a preeklampsją. Badanie aktywności PlGF, VEGF oraz receptora sFlt-1 jest obecnie proponowaną metodą biochemicznej oceny funkcjonowania łożyska w stanie przedrzucawkowym (86,92-95). Co więcej, Luttun i Carmeliet w swojej pracy przypisują sFlt-1 rolę potencjalnego markera prognostycznego preeklampsji (94).

Głównym czynnikiem stymulującym powstawanie VEGF jest hipoksja, przeprowadzono natomiast niewiele badań dotyczących jego znaczenia i sposobu działania w warunkach stresu oksydacyjnego. Wykazano, że w sytuacji zwiększenia stężenia reaktywnych form tlenu, VEGF stymuluje śródbłonek łożyska do produkcji tlenu azotu. Wiąże się to z korzystnym efektem rozszerzenia ścian naczyń, należy jednak zauważyć, że z tlenu azotu powstaje nadtlenoazotyn (reaktywna forma azotu), co skutkuje zwiększeniem stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego (90). Opisano również, że w warunkach stresu oksydacyjnego VEGF promuje powstawanie w komórkach śródbłónka mitochondrialnej manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), enzymu o silnym działaniu antyoksydacyjnym. W związku z tym wydaje się, że VEGF może pełnić funkcję regulatora stresu oksydacyjnego w endotelium, a także w neutrocytach i wielu innych rodzajach komórek, szczególnie tych o wysokim metabolizmie tlenowym (87,102,104).

Najlepiej poznaną izoformą jest VEGF-A, która odpowiada za angiogenezę. Rola odkrytego w 1996 r. VEGF-B długo pozostawała nieznana (103). Obecnie wiadomo, że VEGF-B ma niewielkie właściwości angiogenne, zaś istotne działanie antyoksydacyjne. Mechanizm tego działania opiera się na regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję anty- i prooksydantów. Przełomowych dowodów na ten temat dostarczyli w 2018 roku Arjunan i wsp. W badaniu przez nich przeprowadzonym podanie myszom VEGF-B spowodowało wzrost ekspresji m.in. genów *Gpx1*, *Gpx5*, *Sod1*, *Sod2* i *Prdx5*, odpowiedzialnych za produkcję odpowiednio: peroksydazy glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksyredoksyny 5. Wszystkie te substancje wykazują silne działanie

antyoksydacyjne. Co więcej, zaobserwowano także inhibicję ekspresji genów odpowiedzialnych za powstawanie substancji o działaniu prooksydacyjnym (102).

Trwa wiele badań nad potencjalnym terapeutycznym zastosowaniem VEGF-B w chorobach związanych ze stresem oksydacyjnym, szczególnie w dziedzinie okulistyki, a ich wyniki są obiecujące (102,104). Zależności pomiędzy PlGF, VEGF i stresem oksydacyjnym w krwawieniu z dróg rodnych i poronieniu są w dużej mierze niezbadane (87, 102, 104).

2. Cel pracy

Głównym celem pracy była analiza występowania stresu oksydacyjnego w populacji ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Celem badań było jednocześnie określenie wpływu wystąpienia krwawienia z dróg rodnych oraz krwiaka podkosmówkowego na przebieg ciąży, poród i stan noworodka.

Cele pracy były realizowane poprzez:

1. Ocenę stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu i reduktazy glutationu), glutationu i całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej poronieniem zagrażającym.
2. Ocenę stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej poronieniem zagrażającym.
3. Analizę stężenia VEGF w grupie pacjentek z poronieniem zagrażającym.
4. Analizę częstości poronienia i powikłań perinatalnych, czasu i sposobu zakończenia ciąży oraz stanu noworodka w grupie kobiet, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży
5. Ocenę zależności między obecnością, rozmiarem i lokalizacją krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym a wystąpieniem poronienia, a jeśli ciąża była kontynuowana – rozwojem powikłań perinatalnych, czasem i sposobem zakończenia ciąży oraz stanem noworodka.

3. Materiał

Badaniami objęto 81 ciężarnych hospitalizowanych bądź konsultowanych w latach 2015-2017 w Klinice Perinatologii i Ginekologii oraz Izbie Przyjęć Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. U wszystkich 81 kobiet przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe - położnicze, badanie ultrasonograficzne oraz pobrano materiał do badań. Materiał stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły zgięcia łokciowego.

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań (Uchwała nr 152/15).

Wszystkim pacjentkom udzielono wyczerpującej informacji na temat badań oraz odpowiadano na zadane pytania. Wszystkie kobiety podpisały świadomą zgodę na pobranie materiału, przeprowadzenie badań oraz późniejszy kontakt telefoniczny.

Badania zostały sfinansowane ze środków statutowych Kliniki Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Oznaczenia wykonano w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.1 Grupy pacjentek

3.1.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiły 42 ciężarne, które zgłosiły się w trybie nagłym do Izby Przyjęć Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z powodu krwawienia z dróg rodnych. Z każdą z badanych przeprowadzono wywiad i wypełniono ankietę na temat przeszłości położniczej oraz dotychczasowego przebiegu ciąży, w której pacjentka dokonała subiektywnej oceny obfitości krwawienia i nasilenia bólu. U wszystkich kobiet na podstawie przeprowadzonego badania położniczego oraz ultrasonograficznego rozpoznano żywą ciążę powikłaną krwawieniem z dróg rodnych. W badaniu ultrasonograficznym oceniono czynność serca płodu, długość ciemieniowo-siedzeniową lub szacowaną masę płodu (zależnie od tygodnia ciąży) oraz ewentualną obecność krwiaka podkosmówkowego, jego wymiary i lokalizację.

Wszystkie pacjentki były w ciąży pojedynczej, pomiędzy 6. a 19. tygodniem ciąży według ostatniej miesiączki (nie stwierdzono przypadku niezgodności czasu trwania ciąży z datą OM wymagającego weryfikacji badaniem USG z 1. trymestru ciąży).

Po uzyskaniu wszystkich danych na temat dalszego przebiegu ciąży, sposobu jej zakończenia i stanu noworodka, celem analizy wpływu konkretnych zmiennych na przebieg ciąży, w grupie badanej dokonano podziału pod względem obecności krwiaka podkosmówkowego w jamie macicy oraz pod względem sposobu zakończenia ciąży (poronienie vs poród).

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiły zdrowe ciężarne odpowiadające pod względem wieku oraz wieku ciążowego pacjentkom z grupy badanej. Wszystkie 39 kobiet było hospitalizowanych lub konsultowanych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Z każdą ciężarną przeprowadzono wywiad i wypełniono ankietę na temat przeszłości położniczej oraz dotychczasowego przebiegu ciąży, wykonano badanie położnicze oraz ultrasonograficzne z oceną czynności serca płodu, długości ciemieniowo-siedzeniowej lub szacowanej masy płodu (zależnie od tygodnia ciąży) oraz ewentualnej obecności krwiaka podkosmówkowego, jego wymiarów i lokalizacji.

Wszystkie kobiety były w ciąży pojedynczej, pomiędzy 6. a 18. tygodniem ciąży według ostatniej miesiączki (nie stwierdzono przypadku niezgodności z datą OM wymagającego weryfikacji z badaniem USG z 1. trymestru ciąży).

W obu grupach zastosowano następujące kryteria wykluczenia: zaburzenia krzepnięcia krwi i przyjmowanie leków wpływających na krzepliwość, infekcja lub gorączka, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroby neurologiczne, choroby sercowo-naczyniowe, choroby autoimmunologiczne, patologie macicy (wrodzone bądź nabyte), nikotynizm, przyjmowanie środków psychoaktywnych i picie alkoholu, a także stosowanie specjalistycznej diety.

4. Metodyka

4.1. Badanie podmiotowe

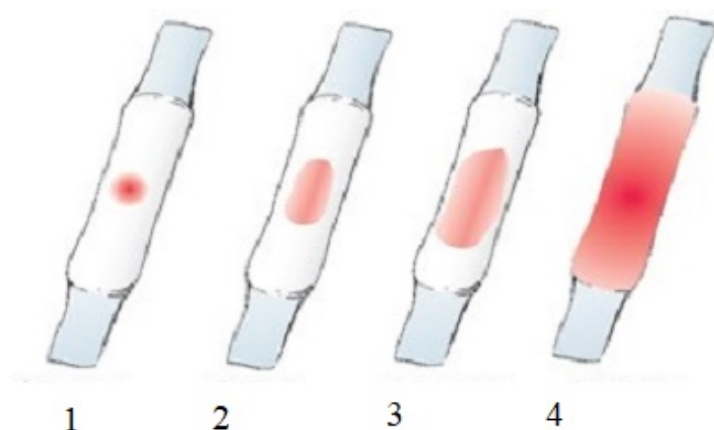
Z każdą pacjentką z grupy badanej i kontrolnej przeprowadzono dokładny wywiad, w którym uwzględniono:

- przebieg krwawienia z dróg rodnych – objętość i kolor krwi, kiedy się rozpoczęło, czy doszło wcześniej do urazu brzucha lub pacjentka współżyła;
- historię położniczą - liczbę przebytych ciąż, liczbę poronień, ciąż pozamacicznych, porodów przedwczesnych i porodów o czasie, liczbę cięć cesarskich, przebieg poprzednich ciąż;
- przebieg obecnej ciąży - wiek ciąży w dniu badania, dotychczasowe dolegliwości i powikłania, ze szczególnym uwzględnieniem plamień i krwawień, ewentualne zastosowanie technik wspomaganego rozrodu, przyjmowane leki i suplementy dla ciężarnych, palenie tytoniu, picie alkoholu, używanie środków psychoaktywnych;
- historię ginekologiczną - menarche, długość i regularność cyklu miesięczkowego, występowanie bardzo obfitych miesiączek, schorzenia ginekologiczne, przebyte operacje i zabiegi ginekologiczne;
- wywiad ogólnolekarski – inne (poza krwawieniem) dolegliwości, choroby przewlekłe, operacje, przyjmowane leki, obciążenia dziedziczne;
- skłonność do siniaczenia skóry, krwawień z nosa, przedłużone krwawienie z ran.

4.2. Objawy zagrażającego poronienia w ocenie pacjentki

Z uwagi na fakt, że krwawienie rozpoczynało się poza szpitalem (najczęściej w domu), a po przyjeździe do Izby Przyjęć było mniej lub bardziej nasilone, każdą ciężarną poproszono o określenie ilości utraconej krwi w skali 1-5, gdzie 1 oznacza mierne krwawienie, 5 odpowiada bardzo obfitemu krwawieniu. Celem obiektywizacji oceny objętości krwawienia pacjentki

wskazywały najbardziej zbliżony poziom zakrwawienia wkładki higienicznej lub bielizny do przedstawionego na Rycinie 3. Każdą pacjentkę zapytano także o występowanie bólu podczas krwawienia i ocenę jego nasilenia w skali 0-3 (0 – brak bólu, 3 – silny ból). Ponadto, pytano o kolor krwi na wkładce (jasnoczerwony, brunatny, brązowy) i ilość epizodów krwawienia, jakie wystąpiły tego dnia.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający poziom zakrwawienia wkładki higienicznej lub bielizny, do którego pacjentki odnosiły swoje krwawienie (1 – mierne krwawienie/plamienie, zabrudzenie mniej niż 30% wkładki, 2- łagodne krwawienie, zabrudzenie około 30 % wkładki, 3- średnioobfite krwawienie, zabrudzenie około 50% wkładki, 4- obfite krwawienie, zabrudzenie całej wkładki, przesiąknięta wkładka)

4.3. Badanie przedmiotowe

U wszystkich pacjentek oceniono parametry stanu ogólnego (temperatura ciała, ciśnienie, tętno) oraz obliczono wskaźnik BMI. Każda ciężarna została zbadana przy użyciu wziernika ginekologicznego oraz palpacyjnie w badaniu dwuręcznym zestawionym. Po wprowadzeniu wziernika do pochwy potwierdzano pochodzenie krwawienia z macicy oraz odnotowywano jego objętość (w skali 0-5, gdzie 0 oznacza brak krwawienia, 5 odpowiada bardzo obfitemu krwawieniu), kolor (jasnoczerwony, brunatny, brązowy) i obecność skrzepów. W badaniu dwuręcznym oceniano szyjkę macicy – jej długość, konsystencję i rozwarcie, wielkość oraz napięcie macicy, a także odnotowywano występowanie bólu podbrzusza w trakcie badania (w skali 0-3, gdzie 0 to brak bólu a 3 – silny ból).

4.4. Badanie ultrasonograficzne

Każdej pacjentce wykonano badanie ultrasonograficzne. Kobiety w 1. trymestrze ciąży były badane sondą transwaginalną, zaś kobiety w 2. trymestrze – sondą przezbrzuszną i transwaginalną. W badaniu USG oceniano:

- Czynność serca płodu (*fetal heart rate*, FHR) i zaznaczano ewentualne odchylenia od normy (bradykardia i tachykardia). Normy FHR odniesiono do siatek centylowych dla danego tygodnia ciąży (105).
- Wzrastanie płodu - w ciążach do 15 t.c.+ 6 dni poprzez pomiar długości ciemieniowo-siedzeniowej (CRL), a w ciążach starszych niż 16+0 tygodni - szacowaną masę płodu (EFW). Obliczenia szacowanej masy płodu wykonywano przy użyciu wzoru Hadlocka i odnoszono do wartości referencyjnych wg Hadlocka (108). Weryfikowano, czy szacowana długość lub masa płodu odpowiada tygodniowi ciąży liczonemu według daty ostatniej miesiączki (OM). W grupie badanej i kontrolnej nie było pacjentki, u której wykazano różnicę wzrastania płodu w stosunku do daty OM.
- Kosmówkę lub łożysko (zależnie od tygodnia ciąży) pod kątem występowania krwaka podkosmówkowego. W przypadku stwierdzenia obecności krwaka dokonano jego pomiarów w trzech wymiarach (długość, szerokość, wysokość) oraz obliczono objętość na podstawie wzoru:

$$V = \text{długość [cm]} \times \text{wysokość [cm]} \times \text{szerokość [cm]} \times 0,5233$$

Opisano także lokalizację krwaka (ściana przednia macicy, ściana tylna macicy, dno macicy, okolica nad ujściem wewnętrznym szyjki macicy).

Wszystkie badania USG zostały wykonane przez autorkę na aparacie Voluson E8 firmy GE Healthcare.

4.5. Oznaczenie stężeń dialdehydu malonowego, glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu, reduktazy glutationu oraz całkowitego statusu antyoksydacyjnego i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego w surowicy krwi

Krew obwodową żylną w ilości 7,5 ml pobrano ze zgięcia łokciowego do probówki na skrzep. Wszystkim pacjentkom z grupy badanej krew pobrano w pierwszej dobie krwawienia. Materiał pozostawiano do wykrzepienia na 20 minut, po czym po upływie maksymalnie 30

minut od pobrania odwirowano. Proces odwirowania trwał 20 minut, przy prędkości 2-3 tysięcy obrotów na minutę. Odwirowaną surowicę zbierano do probówek typu Eppendorf i zamrażano w temperaturze -80 stopni Celsjusza.

Wszystkie oznaczenia wykonano jednocześnie w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producentów.

Zestawy do oznaczeń dialdehydu malonowego, glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu, reduktazy glutationu i czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego pochodziły z firmy Sun Red Biocompany, a zestaw do oznaczenia całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) z firmy Randox.

Oznaczenie MDA, GSH, SOD, GPx, GR i VEGF wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA (metoda podwójnej kanapki, ang. *double antibody sandwich technique*).

Oznaczenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) wykonano przy użyciu testu kolorymetrycznego, na aparacie COBAS firmy Roche. Metoda opiera się na trzyetapowej reakcji. W pierwszym etapie w wyniku inkubacji metmyoglobiny [HX-Fe^{III}] z nadtlaniem wodoru powstaje ferryłmyoglobina X-[Fe^{IV}=O], związek o silnych właściwościach utleniających. Drugi etap polega na dodaniu 2,2'-azyno-di-siarczanu 3-etylbentziazoliny (ABTS[®]) i inkubacji mieszaniny z peroksydazą, co prowadzi do utlenienia ABTS[®] do jego reaktywnej formy ABTS^{®*+} oraz redukcji ferryłmyoglobiny X-[Fe^{IV}=O] do metmyoglobiny [HX-Fe^{III}]. W trzecim etapie reakcji do mieszaniny dodawana jest surowica krwi. Zawartość substancji o działaniu antyoksydacyjnym w badanej surowicy powoduje inhibicję wytwarzania zielono-niebieskiego zabarwienia. Zabarwiony na zielono-niebieski kolor kation ABTS^{®*+} cechuje się maksymalną absorbancją przy fali długości 600 nm. Poziom zabarwienia jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia przeciwutleniaczy w badanym materiale. Pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm pozwala na analizę całkowitego statusu antyoksydacyjnego w badanym materiale.

Wszystkie pacjentki z grupy badanej otrzymały identyczne zalecenia: ograniczenie aktywności ruchowej, zakaz współżycia i doustna terapia dydrogesteronem w dawce 3x10 mg do 21. tygodnia ciąży.

4.6. Kontrola po zakończeniu ciąży (*follow-up*)

W przypadku każdej pacjentki, po porodzie lub poronieniu przeprowadzono analizę dokumentacji medycznej oraz rozmowę telefoniczną. Z dokumentacji medycznej uzyskano dane na temat momentu zakończenia ciąży (tydzień ciąży), jeśli nie doszło do poronienia – na temat drogi porodu (poród siłami natury, poród pochwowy operacyjny – kleszczowy lub przy użyciu wyciągacza próżniowego, cięcie cesarskie) i wystąpienia powikłań takich jak:

- nadciśnienie (rozróżnione na nadciśnienie tętnicze przewlekłe, nadciśnienie indukowane ciążą, stan przedrzucawkowy);
- przedwczesne przedporodowe pęknięcie błon płodowych;
- łożysko przodujące;
- przedwczesne oddzielenie łożyska.

Uwzględniono także wystąpienie krwotoku okołoporodowego, definiowanego jako utrata krwi podczas porodu (łącznie z IV okresem porodu) większa niż 500 ml. Uzyskano również dane dotyczące noworodka. Uwzględniono jego masę, płeć, punktację wg skali Apgar w 1. i 5. minucie życia, choroby lub ewentualny zgon.

4.7. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej użyto programu Statistica w wersji 13.3 firmy TIBCO Software Inc. Do oceny normalności rozkładu badanych zmiennych użyto testu Shapiro-Wilka. W przypadku normalności rozkładu badanej zmiennej w porównywanych grupach do oceny istotności różnic, dla zmiennych mających równe wariancje użyto testu t-Studenta, zaś dla zmiennych niemających równych wariancji – testu Cochran-Coxa. Do oceny istotności różnic w przypadku braku normalności rozkładu zmiennej w skali interwałowej oraz zmiennych mierzonych w skali porządkowej użyto testu Manna-Whitneya lub testu Kruskala-Wallisa. Do oceny istotności różnic zmiennych mierzonych w skali nominalnej użyto testu Chi-kwadrat, zaś w przypadku częstości oczekiwanych poniżej 5 test dokładny Fishera lub test Fishera-Freemana-Haltona. Do oceny korelacji zmiennych wykorzystano test korelacji rangowej Spearmana. Za granicę istotności statystycznej przyjęto wartość 0,05. Istotność statystyczną powyżej wartości 0,05 oznaczono jako (-), wartości poniżej 0,05 jako (+), poniżej 0,01 - (++), poniżej 0,001 - (+++).

5. Wyniki

5.1. Charakterystyka grup – informacje ogólne

Charakterystykę analizowanych grup przedstawiono w Tabeli 1. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wieku, wzrostu i wskaźnika BMI, a także wieku ciążowego w momencie badania pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

Tabela 1. Charakterystyka ogólna grupy badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Wzrost [m] <i>[Średnia ± SD]</i>	1,65 ± 0,04	1,65 ± 0,04	(-)
BMI [kg/m ²] <i>[Średnia ± SD]</i>	23,9 ± 3,24	23,5 ± 3,04	(-)
Wiek pacjentki <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	30 (18-40)	29 (20-42)	(-)
Wiek ciąży w momencie badania [t.c.] <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	10 (6-19)	14 (6-18)	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.2. Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe pacjentek – porównanie grupy badanej i kontrolnej

Pacjentki z grupy badanej i kontrolnej nie różniły się pod względem liczby przebytych ciąż, poronień ani rodności. Grupy nie różniły się także pod względem sposobu zajścia w ciążę (zapłodnienie naturalne vs zastosowanie technik wspomaganego rozrodu – ang. ART. – *assisted reproductive techniques*). Nie wykazano różnic między grupami pod względem przebiegu ciąży pozamaciczej oraz operacji cięcia cesarskiego (Tabela 2).

Tabela 2. Wywiad położniczy pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Ilość ciąż (łącznie z obecną) [Mediana (Min-Max)]	2 (1-7)	1 (1-6)	(-)
Ilość ciąż donoszonych w wywiadzie [Mediana (Min-Max)]	0 (0-6)	0 (0-4)	(-)
Ilość przebytych poronień [Mediana (Min-Max)]	0 (0-5)	0 (0-4)	(-)
Przebycie ciąży pozamacicznej [%]	0,0	2,6	(-)
Przebycie cięcia cesarskiego [%]			
- jednego	19,0	12,8	(-)
- dwóch	7,1	0,0	
Ciąża w wyniku zastosowania ART [%]			
- stymulacja owulacji	4,8	0,0	(-)
- zapłodnienie pozaustrojowe	7,1	5,1	
- ogółem	11,9	5,1	

(-) oznacza $p \geq 0,05$ (+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$ (++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$ (+++) oznacza $p < 0,001$

Nie wykazano różnic pomiędzy grupami w częstości podawanej skłonności pacjentek do siniaczenia i krwawień czy stosowania suplementów witaminowych dla kobiet ciężarnych. Dwukrotnie więcej kobiet z grupy badanej przyjmowało w pierwszym trymestrze gestageny (62% vs 31% w grupie kontrolnej), istotną różnicę wykazano dla doustnego preparatu

dydrogesteronu (zażywało go 36% w grupie pacjentek krwawiących, a tylko 13% w grupie pacjentek zdrowych) (Tabela 3).

Tabela 3. Informacje uzyskane w badaniu podmiotowym pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Skłonność do powstawania siniaków, krwawień [%]	28,6	20,5	(-)
Stosowanie progestagenów/progesteronu w 1. trymestrze ciąży [%]	61,9	30,8	(++)
Stosowany preparat progesteronu [%]			
- progesteron p.o.	7,1	0,0	(-)
- progesteron p.v.			(-)
- dydrogesteron p.o.	35,7	20,5	
	35,7	12,8	(+)
Przyjmowanie suplementów witaminowych dla kobiet ciężarnych [%]	78,0	69,2	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

U pacjentek z grupy badanej częściej diagnozowano tachykardię oraz bradykardię u płodu w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio 11,9% vs 5,1% dla tachykardii oraz 2,4% vs 0% dla bradykardii). Różnice te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej ($p=0,43$).

Krwiaka podkosmówkowego w badaniu USG rozpoznano u znacznie większej liczby kobiet w grupie badanej niż kontrolnej (71,4% vs 5,1%, $p<0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4. Wyniki badania ultrasonograficznego pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Czynność serca płodu w USG [%]			
- prawidłowa	85,7	94,9	(-)
- bradykardia	2,4	0,0	
- tachykardia	11,9	5,1	
Obecność krwiaka podkosmówkowego [%]	71,4	5,1	(+++)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.3. Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe – porównanie grupy pacjentek z poronieniem zagrażającym, które poroniły i grupy pacjentek z poronieniem zagrażającym, których ciąża zakończyła się porodem.

Pomiędzy pacjentkami z grupy badanej, których ciąża zakończyła się poronieniem, a kobietami z grupy badanej, które nie poroniły nie wykazano różnic pod względem wieku, rodności, BMI, przebycia wcześniej poronienia bądź cięcia cesarskiego. Grupy nie różniły się także sposobem zajścia w ciążę (zapłodnienie naturalne vs zastosowanie ART). Zgłaszana skłonność do siniaczenia czy nieprawidłowych krwawień oraz suplementacja witamin prenatalnych była zbliżona w obu grupach. Co ciekawe, pomiędzy grupami nie wykazano istotnych różnic w częstości przyjmowania gestagenów.

Ciąże pacjentek z poronieniem zakończyły się średnio w 15. tygodniu, a w grupie porodów – w 38. tygodniu. Wykazano istotną statystycznie różnicę w ilości epizodów krwawienia z dróg rodnych na przestrzeni całej ciąży – kobiety, które poroniły miały ich więcej, zaś wszystkie krwawiące pacjentki, u których do poronienia nie doszło, doświadczyły jednorazowego krwawienia z dróg rodnych (Tabela 5).

Tabela 5. Porównanie grupy ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w aspekcie sposobu zakończenia ciąży – poronienie lub poród

Parametr	Poronienie	Poród	Istotność statystyczna
Wiek pacjentki (l) [Średnia $\pm$ SD]	31,6 $\pm$ 1,9	29,3 $\pm$ 5,4	(-)
BMI [Średnia $\pm$ SD]	24,2 $\pm$ 3,1	23,9 $\pm$ 3,3	(-)
Zakończenie ciąży (t.c.) [Mediana (Min-Max)] [Średnia $\pm$ SD]	16 (8-21) 14,7 $\pm$ 4,8	39 (24-41) 37,9 $\pm$ 3,2	(+++)
Ciąża donoszona w wywiadzie [Mediana (Min-Max)]	1 (0-6)	0 (0-2)	(-)
Poronienie w wywiadzie [Mediana (Min-Max)]	0 (0-3)	0 (0-5)	(-)
Przebyte cięcia cesarskie [%] • Jedno • Dwa	42,9 0,0	14,3 8,6	(-)
Epizody krwawienia [Mediana (Min-Max)]	2 (1-6)	1 (1-2)	(++)
Ciąża po ART [%]: • Stymulacja owulacji • IVF	14,3 0,0	2,9 8,6	(-)
Skłonność do siniaków, krwawień [%]	31,4	14,3	(-)
Witaminy prenatalne [%]	71,4	79,4	(-)
Stosowanie preparatów progesteronu w 1. trymestrze ciąży [%]: - ogółem - progesteron p.o. - progesteron p.v. - dydrogesteron p.o.	85,7 28,6 28,6 42,9	57,1 2,9 37,1 34,3	(-) (-) (-) (-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Pacjentki, które poroniły, częściej zgłaszały bardzo obfite krwawienie ze skrzepami (57% vs 29% w grupie bez poronienia), różnica ta nie osiągnęła jednak istotności statystycznej ($p=0,36$). Nie wykazano różnic pomiędzy grupami w kolorze traconej krwi ani nasileniu bólu występującego w czasie krwawienia i podczas badania ginekologicznego. Nie zaobserwowano także różnic w czynności serca płodu pomiędzy grupami (Tabela 6).

Tabela 6. Porównanie badania przedmiotowego pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych zależnie od sposobu ukończenia ciąży (poronienie vs poród).

Parametr	Poronienie	Poród	Istotność statystyczna
Objętość krwawienia [%] • 0 • 1 • 2 • 3 • 4 • 5	• 0,0 • 14,3 • 0,0 • 28,6 • 0,0 • 57,1	• 0,0 • 8,6 • 14,3 • 22,9 • 25,7 • 28,5	(-)
Kolor krwi [Mediana (Min-Max)]	3 (1-3)	2 (1-3)	(-)
Kolor krwi [%] • brązowy • brunatny • jasnoczerwony	• 14,3 • 42,9 • 42,9	• 11,4 • 25,7 • 62,9	(-)
Ból • W czasie krwawienia [Mediana (Min-Max)] • W czasie badania [Mediana (Min-Max)]	• 0 (0-2) • 0 (0-3)	• 1 (0-3) • 1 (0-3)	 (-) (-)
Czynność serca płodu [%]			

• prawidłowa • bradykardia • tachykardia	• 90,9 • 0,0 • 9,1	• 90 • 1,4 • 8,6	(-)
--	--	--	-----

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++)

5.4. Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na wystąpienie poronienia, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne, poród oraz stan noworodka.

5.4.1. Ocena wpływu krwawienia na dalszy przebieg ciąży – poronienie, czas trwania ciąży i powikłania perinatalne

Ciąże pacjentek z grupy badanej trwały statystycznie krócej niż kobiet z grupy kontrolnej (odpowiednio mediana dla grupy badanej i kontrolnej wyniosła 38 i 39 tygodni, średnia – 34,0 vs 36,7 tygodni). Nie wykazano jednak istotnej statystycznie różnicy w częstoci poronienia, zarówno wczesnego, jak i późnego pomiędzy grupami – spośród pacjentek z krwawieniem w pierwszej połowie ciąży poroniło 16,7% vs 10,3% ciężarnych, które nie doświadczyły krwawienia.

Należy w tym miejscu wspomnieć, że tylko dwie spośród kobiet, które poroniły, wykonały badanie genetyczne materiału z poronienia. Jedna pacjentka otrzymała wynik prawidłowy, a u drugiej badanie wykazało trisomię 16. pary chromosomów u płodu.

W grupie badanej więcej kobiet urodziło przedwcześnie (14,3% vs 5,1% w grupie kontrolnej), różnica ta jednak nie była istotna statystycznie ($p=0,27$).

Częstość rozwoju nadciśnienia indukowanego ciążą i stanu przedrzucawkowego była zbliżona w obu grupach. Z uwagi na zbyt małą częstość pojawienia się u pacjentek takich powikłań, jak przedwczesne pęknięcie błon płodowych, łożysko przodujące i przedwczesne oddzielenie łożyska, nie porównano ich częstości (Tabela 7).

Tabela 7. Porównanie danych dotyczących dalszego przebiegu ciąży w grupie badanej i kontrolnej

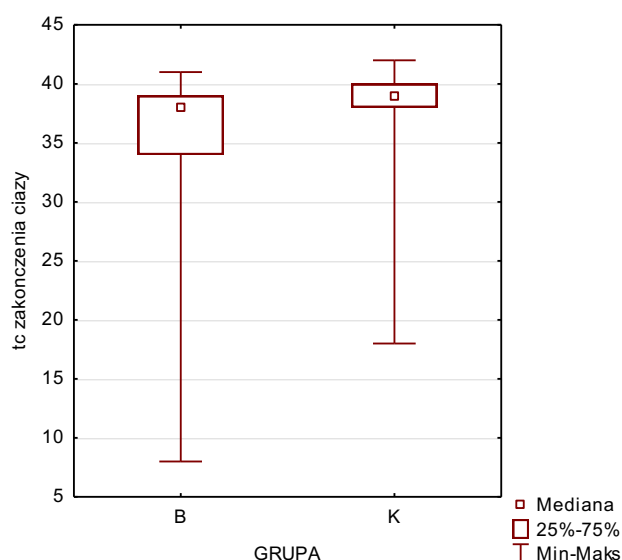
Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Czas trwania ciąży <i>[Mediana (Min-Max)]</i> <i>[Średnia $\pm$ SD]- nie powinnam</i>	38 (8-41) 34,0 $\pm$ 9,4	39 (18-42) 36,7 $\pm$ 6,7	(+)
Krwawienie w II. połowie ciąży [%]	42,9	18,0	(+)
Poronienie ciąży [%]	16,7	10,3	(-)
Poronienie w ciągu 48 h od badania [%]	2,4	0,0	(++)
Poronienie wczesne – do 12. t.c. [%]	7,1	0,0	(-)
Poronienie późne - po 12. t.c. [%]	9,5	10,3	(-)
Poród przedwczesny [%]	14,3	5,1	(-)
Stan przedrzucawkowy [%]	2,4	0,0	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$



Ryc. 6. Porównanie czasu trwania ciąży w grupie badanej i kontrolnej.

5.4.2. Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na poród

W grupie badanej 23,8% kobiet urodziło siłami natury w porównaniu z 46,2% w grupie kontrolnej (różnica nieistotna statystycznie, $p=0,15$). Wykazano różnicę w częstości zakończenia ciąży cięciem cesarskim – operację wykonano częściej u kobiet z grupy badanej (54,8%) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (33,3%). Częstości porodu operacyjnego drogą pochwową były zbliżone w obu grupach.

Wykazano istotnie większą częstość wystąpienia krwotoku okołoporodowego u pacjentek, które krwawiły w pierwszej połowie ciąży (35,7% vs 7,7% w grupie kontrolnej (Tabela 8).

Tabela 8. Porównanie danych dotyczących porodu w grupie badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Poród siłami natury [%]	23,8	46,2	(-)
Cięcie cesarskie [%]	54,8	33,3	(+)
Poród operacyjny drogą pochwową [%]	4,8	7,7	(-)
Krwotok okołoporodowy [%]	35,7	7,7	(++)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.4.3. Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na stan noworodka

Noworodki kobiet z grupy badanej i kontrolnej urodziły się ze zbliżoną masą oraz w podobnym stanie (zbliżona punktacja w skali Apgar). Nie wykazano różnic w częstości urodzenia dzieci z małą (mała masa urodzeniowa ang. *low birth weight* - LBW), bardzo małą (bardzo mała masa urodzeniowa ang. *very low birth weight* – VLBW) czy ekstremalnie małą (ekstremalnie mała masa urodzeniowa ang. *extremely low birth weight* – ELBW) masą ciała pomiędzy grupami. Nie wykazano różnic w zachorowalności czy częstości zgonów noworodków. Nie zaobserwowano też zależności pomiędzy wystąpieniem krwawienia a płcią urodzonego dziecka (Tabela 9).

Tabela 9. Porównanie danych dotyczących noworodków pacjentek z grupy badanej i kontrolnej.

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Masa noworodka (g) <i>[Mediana (Min-Max)]</i> <i>[Średnia $\pm$ SD]</i>	3380 (620-4620) 3209,1 $\pm$ 737,55	3380 (800-4620) 3334,1 $\pm$ 646,1	(-)
Noworodek eutroficzny [%]	88,6	94,3	(-)
Noworodek LBW [%]	8,6	2,9	(-)
Noworodek VLBW [%]	0,0	0,0	(-)
Noworodek ELBW [%]	2,9	2,9	(-)
Apgar w 1. Minucie	10 (1-10)	10 (0-10)	(-)
Apgar w 5. Minucie	10 (0-10)	10 (7-10)	(-)
Zgon dziecka po porodzie [%]	0,0	2,8	(-)

Zachorowalność noworodków [%]	5,7	5,7	(-)
Płeć [%]			
• Żeńska	35,9	50,0	(-)
• Męska	59,0	47,2	
• Niemożliwa do określenia	5,1	2,8	

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.5. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego

5.5.1. Analiza stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie i w ciąży zakończonej poronieniem

Stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi w grupie badanej i kontrolnej były zbliżone (Tabela 10).

Tabela 10. Porównanie stężenia MDA pomiędzy grupą badaną i kontrolną

Stężenie	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
MDA (nmol/L)	137,7 (12,6-1094,1)	131,6 (13,4-1173,0)	(-)
<i>[Mediana (Min-Max)]</i>			

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Stężenie MDA w surowicy krwi u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych, które poroniły było niższe niż u pacjentek, które rodziły (Tabela 11).

Tabela 11. Porównanie stężenia MDA zależnie od sposobu zakończenia ciąży (poronienie vs poród)

Stężenie	Poronienie n=7	Poród n=35	Istotność statystyczna
MDA (nmol/L) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	47,0 (12,6-151,2)	158,5 (16,9-1094,1)	(+)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.5.2. Analiza stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych i całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej w pierwszej połowie krwawieniem z dróg rodnych i ciąży zakończonej poronieniem

Stężenia glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu i reduktazy glutationu oraz całkowity status antyoksydacyjny były zbliżone w grupie badanej i grupie kontrolnej (Tabela 12).

Tabela 12. Porównanie stężeń GSH, SOD, GPx, GR oraz TAS pomiędzy grupą badaną a kontrolną

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
GSH (Umol/L) <i>[Średnia $\pm$ SD]</i>	22,0 $\pm$ 7,1	20,6 $\pm$ 7,2	(-)
SOD (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	77,6 (18,0-106,7)	72,4 (23,6-109,7)	(-)
GSPX (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	60,1 (0,3-119,5)	80,2 (12,3-118,8)	(-)
GR (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	78,4 (29,5-133,3)	70,7 (28,3-147,8)	(-)

TAS mmol/l <i>[Średnia ± SD]</i>	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	(-)
-------------------------------------	-----------	-----------	-----

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++)

Stężenie glutationu (GSH) było istotnie niższe w surowicy krwi pacjentek z poronieniem zagrażającym, które poroniły w porównaniu z tymi, które urodziły (mediana dla GSH wyniosła 13,5 dla pacjentek z poronieniem i 24,0 dla pacjentek z porodem, $p < 0,05$).

Poziom reduktazy glutationu (GR) w surowicy krwi był niższy w grupie z poronieniem (mediana 43,5) w porównaniu z grupą pacjentek, które kontynuowały ciążę (mediana 81,0) ($p < 0,05$).

Stężenia dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationu (GSPX) były niższe u kobiet z poronieniem, różnice te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej.

Całkowity status antyoksydacyjny (TAS) był zbliżony w obu grupach – u pacjentek, które poroniły średnia wartość TAS wniosła 1,57 ($\pm 0,13$), zaś w grupie TM poród - 1,54 ($\pm 0,10$), $p = 0,43$. Wyniki podsumowano w Tabeli 13.

Tabela 13. Porównanie stężeń GSH, SOD, GPx, GR oraz TAS pomiędzy grupą TM poronienie i TM poród

Parametr	Grupa TM poronienie	Grupa TM poród	Istotność statystyczna
GSH (Umol/L) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	13,5 (10,6-32,7)	24,1 (9,0-35,7)	(+)
SOD (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	53,1 (41,3-106,7)	77,8 (18,0-104,8)	(-)
GSPX (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	21,2 (17,8-119,1)	65,0 (0,3-119,5)	(-)
GR (ng/ml) <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	43,5 (29,5-109,8)	81,0 (31,5-133,2)	(+)

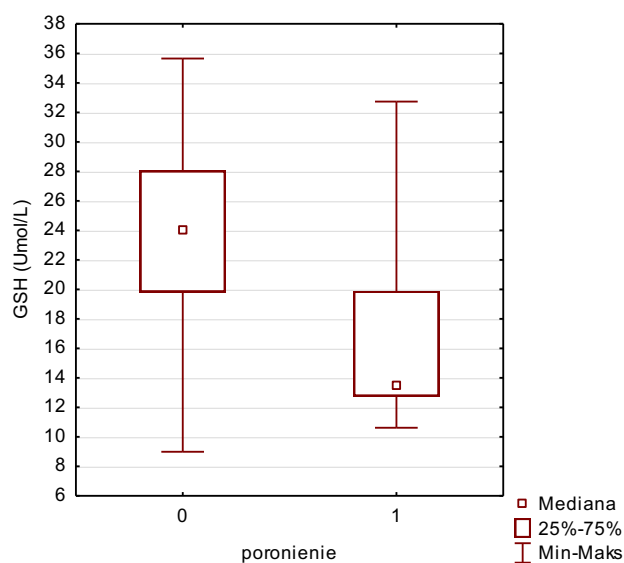
TAS mmol/l	1,57 ± 0,13	1,54 ± 0,10	(-)
<i>[Średnia ± SD]</i>			

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$



Ryc. 7. Stężenie GSH w surowicy u pacjentek, które nie poroniły (0) i pacjentek, które poroniły (1).

5.6. Analiza stężenia czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF)

Stężenia VEGF w surowicy krwi pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych i zdrowych, niekrwawiących ciężarnych były zbliżone (Tabela 14).

Tabela 14. Wyniki oznaczenia VEGF u pacjentek w grupie badanej i kontrolnej

Stężenie	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
VEGF (ng/L)	3847,6	4116,5	(-)
<i>[Mediana (Min-Max)]</i>	(1006,2-9296,5)	(1021,2-9451,1)	

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Wykazano istotną różnicę stężeń naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka w surowicy krwi pomiędzy grupą pacjentek, które poroniły a grupą kobiet, które urodziły dzieci. Kobiety z poronieniem miały znacznie niższe poziomy VEGF w surowicy krwi (mediana 1455,9) w porównaniu do kobiet, które urodziły (mediana 4207,2), $p < 0,001$ (Tabela 15).

Tabela 15. Wyniki oznaczenia VEGF u krwawiących pacjentek zależnie od sposobu zakończenia ciąży (poronienie lub poród)

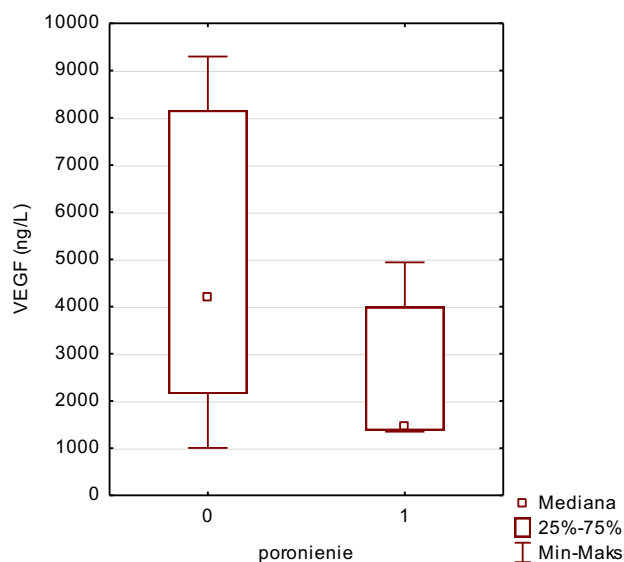
Stężenie	Poronienie	Poród	Istotność statystyczna
VEGF (ng/L)	1455,9	4207,2	(++)
[Mediana (Min-Max)]	(1349,3-4938,1)	(1006,2-9296,5)	

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$



Ryc. 8. Stężenie VEGF w surowicy u pacjentek, które nie poroniły (0) i pacjentek, które poroniły (1)

5.7. Analiza zależności między obecnością i rozmiarami krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych a wystąpieniem poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – rozwojem powikłań perinatalnych, czasem i sposobem zakończenia ciąży i stanem noworodka oraz zależności między lokalizacją krwiaka a poronieniem

5.7.1. Częstość występowania krwiaka podkosmówkowego oraz wpływ jego obecności na poronienie, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne i poród

Częstość występowania krwiaka podkosmówkowego była znacząco wyższa w grupie badanej – wyniosła 71%, a w grupie kontrolnej 5% ($p < 0,0001$) (Tabela 16). Wszystkie pacjentki, które poroniły miały krwiaka podkosmówkowego, był on ponadto zdiagnozowany u 66% kobiet, które kontynuowały ciążę mimo krwawienia (Tabela 17).

Tabela 16. Porównanie częstości występowania krwiaka podkosmówkowego u pacjentek w grupie badanej i kontrolnej

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	Istotność statystyczna
Obecność krwiaka podkosmówkowego [%]	71,4	5,1	(+++)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++)

Tabela 17. Porównanie częstości występowania krwiaka podkosmówkowego u krwawiących pacjentek zależnie od sposobu zakończenia ciąży

Parametr	Poronienie	Poród	Istotność statystyczna
Obecność krwiaka w USG [%]	100,0	65,7	(+)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++)

Ciąże pacjentek z poronieniem zagrażającym i krwakiem podkosmówkowym trwały istotnie krócej niż ciążę kobiet z poronieniem zagrażającym bez krwaka (średnia 32,1 vs 38,3 tygodni, $p < 0,05$). W grupie z krwakiem podkosmówkowym poroniło istotnie więcej kobiet (27% vs 0).

Nie stwierdzono różnic w drodze porodu pomiędzy grupą krwawiących kobiet z i bez krwaka (Tabela 18).

Tabela 18. Porównanie czasu trwania oraz sposobu zakończenia ciąży u krwawiących pacjentek zależnie od obecności krwaka podkosmówkowego

Parametr	Krwak obecny	Krwak nieobecny	Istotność statystyczna
Czas trwania ciąży [t.c.] <i>[Średnia ± SD]</i>	32,1 ± 10,5	38,8 ± 2,3	(+)
Poronienie [%]	26,7	0,0	(+)
Droga porodu [%]			
• Poród siłami natury	• 20,0	• 33,3	(-)
• Cięcie cesarskie	• 50,0	• 58,3	(-)
• Poród pochwowy operacyjny – VE	• 3,3	• 8,4	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy obecnością krwaka podkosmówkowego a pojawieniem się w ciąży powikłań takich jak przedwczesne pęknięcie błon płodowych, nadciśnienie tętnicze (ciążowe i stan przedrzucawkowy) oraz przedwczesne oddzielenie łożyska (Tabela 19).

Tabela 19. Porównanie częstości występowania powikłań perinatalnych u krwawiących pacjentek zależnie od występowania krwiaka podkosmówkowego

Parametr	Krwiak obecny	Krwiak nieobecny	Istotność statystyczna
PPROM [%]	13,3	0,0	(-)
Nadciśnienie tętnicze [%] • NIC • preeklampsja	• 0,0 • 0,0	• 8,3 • 8,3	(-)
Przedwczesne oddzielenie łożyska [%]	• 3,3	• 0,0	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.7.2. Wpływ obecności krwiaka podkosmówkowego na stan noworodka

Noworodki kobiet z krwakiem podkosmówkowym otrzymały po urodzeniu zbliżoną punktację Apgar w 1. i 5. minucie do noworodków kobiet bez krwiaka. Nie wykazano różnic pomiędzy grupami w urodzeniowej masie ciała. Zachorowalność noworodków z obu grup była zbliżona (Tabela 20).

Tabela 20. Porównanie stanu noworodka po porodzie u pacjentek krwawiących zależnie od występowania krwiaka podkosmówkowego

Parametr	Krwiak obecny	Krwiak nieobecny	Istotność statystyczna
Punktacja Apgar [Mediana (Min-Max)]			
• 1. Minuta	• 10 (1-10)	• 10 (6-10)	(-)
• 5. Minuta	• 10 (0-10)	• 10 (7-10)	(-)

Masa ciała [g] <i>[Mediana (Min-Max)]</i> <i>Średnia ± SD</i>	3300 (620-4620) 3076,5 +- 814,4	3520 (2530-4350) 3463,3 +- 497,5	(-)
Masa ciała w przedziałach [%] • EBW • LBW • VLBW • ELBW	• 82,6 • 13,0 • 0,0 • 4,4	• 100,0 • 0,0 • 0,0 • 0,0	(-)
Zachorowalność noworodków [%]	12,5	8,33	(-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

5.7.3. Wpływ wymiarów krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych na wystąpienie poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – na rozwój powikłań perinatalnych, czas i sposób zakończenia ciąży oraz stan noworodka

Nie wykazano istotnej różnicy w żadnym z trzech wymiarów krwiaka podkosmówkowego (długość, szerokość, wysokość) pomiędzy grupą z poronieniem a grupą bez poronienia. Z uwagi na małą liczbę pacjentek, które miały SCH i nie krwawiły ($n=2$), nie porównywano tych parametrów pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Krwiaki podkosmówkowe u kobiet z krwawieniem z dróg rodnych, które poroniły ciążę, miały istotnie większą objętość niż kobiety z krwawieniem z dróg rodnych, których ciąża zakończyła się porodem (Tabela 21, Rycina 9).

Tabela 21. Porównanie wymiarów oraz objętości krwiaka pomiędzy pacjentkami krwawiącymi zależnie od sposobu zakończenia ciąży (poronienie vs poród)

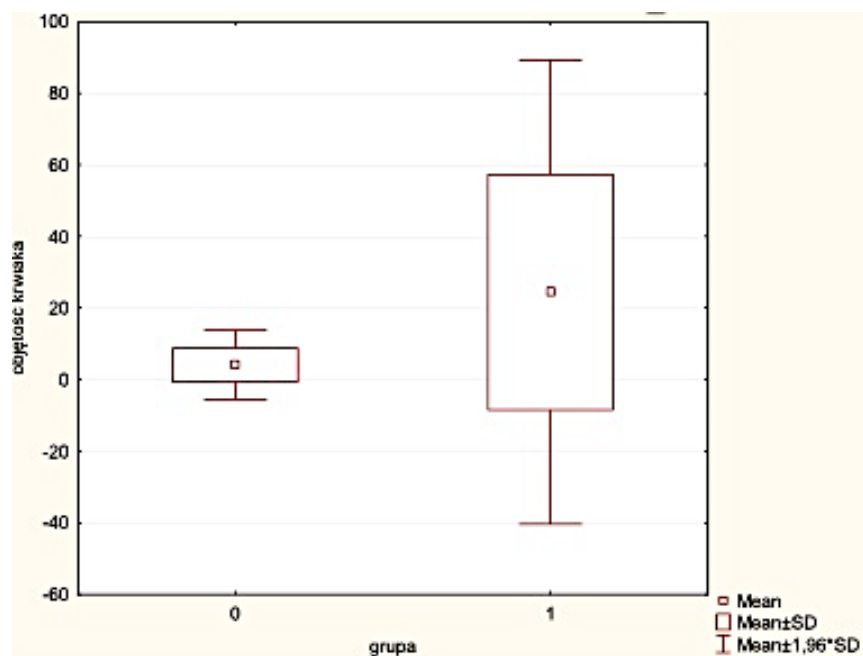
Parametr	Poronienie	Poród	Istotność statystyczna
Wymiary krwiaka [mm]:			
• Długość [Średnia $\pm$ SD]	24,1 $\pm$ 19,2	16,1 $\pm$ 8,4	(-)
• Wysokość [Średnia $\pm$ SD]	25,1 $\pm$ 16,3	15,7 $\pm$ 7,3	(-)
• Szerokość [Średnia $\pm$ SD]	38 $\pm$ 25,7	20,65 $\pm$ 11,1	(-)
Objętość krwiaka (V) [mL] [Średnia $\pm$ SD]	24,4 $\pm$ 33,1	4,1 $\pm$ 4,9	(++)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$



Ryc. 9. Objętość krwiaka u pacjentek z krwawieniem, które nie poroniły (0) i u kobiet z krwawieniem, które poroniły (1)

Nie stwierdzono zależności pomiędzy wymiarami krwiaka podkosmówkowego (szerokość, długość, wysokość) a przedwczesnym przedporodowym pęknięciem błon płodowych (Tabela 22). W przypadku pozostałych uwzględnianych powikłań (nadciśnienie tętnicze, preeklampsja, łożysko przodujące, przedwczesne oddzielenie łożyska) nie można było wykonać obliczeń z uwagi na zbyt małą ilość pacjentek z tymi rozpoznaniem.

Nie można było dokonać oceny zależności między wymiarami krwiaka a zachorowalnością noworodka z powodu zbyt małej ilości zachorowań dzieci w grupie matek z SCH (n=3).

Tabela 22. Porównanie wymiarów krwiaka w grupie z PPRM i bez PPRM

Parametr	Grupa PPRM	Grupa bez PPRM	Istotność statystyczna
Wymiary krwiaka [mm]: <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	- Szerokość 24,5 (10-32) - Długość 20 (12-29) - Wysokość 19 (10-26)	- Szerokość 21 (6-77) - Długość 17 (2-62) - Wysokość 16 (4-50)	(-) (-) (-)

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Nie stwierdzono zależności pomiędzy żadnym z trzech wymiarów krwiaka a sposobem zakończenia ciąży (poronienie, poród siłami natury, cięcie cesarskie) (Tabela 23).

Tabela 23. Porównanie wymiarów krwiaka w zależności od sposobu ukończenia ciąży

Parametr	Poronienie	PSN	CC	Istotność statystyczna
Szerokość SCH [mm] <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	32,5 (7-77)	22,5 (11-29)	20,0 (6-48)	(-)
Długość SCH [mm] <i>[Mediana (Min-Max)]</i>	15,5 (7-62)	13,5 (7-29)	19,0 (2-30)	(-)

Wysokość SCH [mm] [Mediana (Min- Max)]	22,0 (5-50)	15,0 (8-26)	18,0 (4-30)	(-)
---	-------------	-------------	-------------	-----

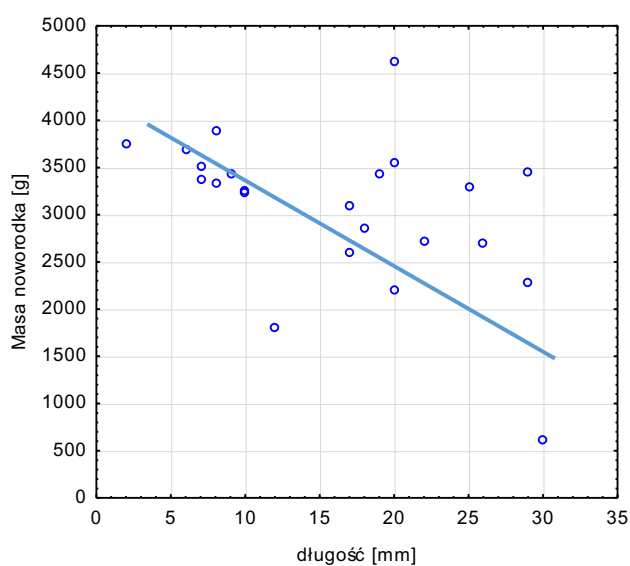
(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

Wykazano ujemną korelację pomiędzy długością i wysokością krwika a masą urodzeniową noworodka. Im większe były te wymiary, tym mniejsza masa ciała noworodka ($p=0,0182$ dla długości oraz $p=0,0374$ dla wysokości). Nie było związku pomiędzy szerokością SCH a masą noworodka.

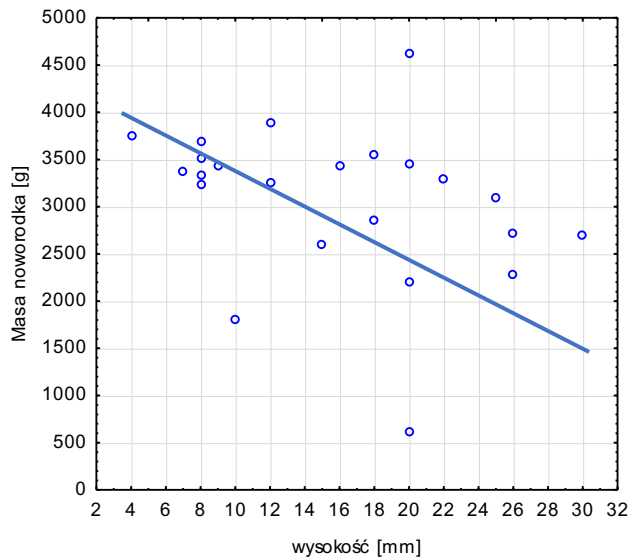


$n = 23$

$r = -0,49$

$p (+)$

Ryc. 10. Zależność (?) między masą ciała noworodka a długością krwika podkosmówkowego



n= 23

r= -0,44

p (+)

Ryc. 11. Zależność (?) między masą ciała noworodka a wysokością krwaka podkosmówkowego

5.7.4. Wpływ lokalizacji krwaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym na wystąpienie poronienia

Wykazano istotną zależność pomiędzy lokalizacją krwaka a poronieniem ($p < 0,05$). Pacjentki, które poroniły miały częściej krwaka podkosmówkowego w dnie i na ścianie tylnej macicy, rzadziej natomiast był on umiejscowiony nad ujściem wewnętrznym szyjki macicy.

Lokalizacja na ścianie przedniej macicy miała zbliżoną częstość występowania w obu grupach pacjentek (Tabela 24).

Tabela 24. Porównanie lokalizacji krwaka w grupie pacjentek krwawiących, które poroniły i krwawiących ciężarnych, których ciąża zakończyła się porodem

Parametr	Grupa TM poronienie	Grupa TM poród	Istotność statystyczna
Lokalizacja krwaka w USG:			
• Dno macicy	28,6	0,0	(+)
• Ściana przednia	28,6	26,1	
• Ściana tylna	14,2	4,3	
• Nad ujściem wew. szyjki macicy	28,6	69,6	

(-) oznacza $p \geq 0,05$

(+) oznacza $p < 0,05$ i $\geq 0,01$

(++) oznacza $p < 0,01$ i $\geq 0,001$

(+++) oznacza $p < 0,001$

6. Dyskusja

Krwawienie z dróg rodnych oraz poronienie stanowią najczęstsze powikłania pierwszej połowy ciąży. Pomimo to, etiopatogeneza oraz znaczenie prognostyczne większości przypadków poronienia zagrażającego pozostaje nieznana. Opublikowane doniesienia na temat wpływu krwawienia z dróg rodnych na dalszy przebieg ciąży oraz skuteczności wdrażanych farmakologicznych i nefarmakologicznych metod leczenia dostarczają bardzo rozbieżnych informacji, co skutkuje m.in. trudnością w opracowaniu jednolitych, opartych na dowodach (EBM- *Evidence Based Medicine*) rekomendacji. Krwawieniu z dróg rodnych w ciąży oraz poronieniu często towarzyszy krwiak podkosmówkowy. Jego patogeneza i potencjalne znaczenie dla przebiegu ciąży są przedmiotem badań od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku i nadal pozostają kontrowersyjne.

Nie do końca poznany jest wpływ reaktywnych form tlenu i antyoksydantów na ciążę, a coraz więcej Autorów opisuje związek pomiędzy stresem oksydacyjnym i krwawieniem podkosmówkowym, krwawieniem z dróg rodnych oraz poronieniem, a także rozwojem powikłań położniczych takich jak nadciśnienie indukowane ciążą, stan przedrzucawkowy, FGR, PPRM i przedwczesne oddzielenie łożyska (33-37,40,45,49,52).

Doniesienia, postulujące, że prawdopodobnie wielu przyczynom poronień (niezwiązanych z nieprawidłowościami genetycznymi) można by zapobiec, rosnąca wiedza na temat potencjalnej roli stresu oksydacyjnego w poronieniu zagrażającym i poronieniu oraz badania nad korzyściami zastosowania antyoksydantów w wielu jednostkach chorobowych były dla mnie inspiracją do przeprowadzenia tego badania.

6.1. Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe pacjentek z grupy badanej i kontrolnej

6.1.1. Badanie podmiotowe

W moim badaniu pacjentki nie różniły się pod względem większości informacji uzyskanych w badaniu podmiotowym (wywiad położniczy, zastosowanie ART, suplementacja witamin, skłonności do siniaczenia i krwawień). Sądzę, że podobna częstość suplementacji witamin dla kobiet ciężarnych w obu grupach oraz negowanie palenia tytoniu, picia alkoholu i przyjmowania środków odurzających pozwala wnioskować o zbliżonym poziomie opieki, edukacji oraz dbałości pacjentki o ciążę. Podczas gdy znaczenie suplementacji kwasu

foliowego w okresie przedkoncepcyjnym i w ciąży jest powszechnie uznane, stosowanie pozostałych witamin pozostaje przedmiotem kontrowersji w świecie naukowym.

W uzyskanych przeze mnie wynikach zwraca uwagę dość duża częstość przyjmowania progesteronu i jego pochodnych przez kobiety z obu grup (stosowane przez 62% pacjentek krwawiących i aż 31% pacjentek zdrowych). Istnieje bardzo dużo publikacji na temat korzyści z zastosowania gestagenów w ciąży, a ich pozytywny efekt nadal jest dyskusyjny, nawet w przypadku poronienia zagrażającego. Coomarasamy i wsp. przeprowadzili dwa duże, wieloośrodkowe randomizowane badania kontrolowane placebo (the PROMISE – dotyczące kobiet z nawracającymi poronieniami [PROgesterone in recurrent MIScarriage] trial oraz the PRISM [PROgesterone In Spontaneous Miscarriage] - dotyczące kobiet z krwawieniem we wczesnej ciąży), na podstawie których stwierdzili, że progesteron działa korzystnie u kobiet z krwawieniem w pierwszych 21 tygodniach ciąży oraz z przynajmniej jednym poronieniem w wywiadzie. Autorzy podkreślają, że nie ma przesłanek do stosowania preparatów progesteronu u zdrowych ciężarnych w ciążach naturalnych bez obciążonego wywiadu położniczego (117).

6.1.2. Badanie przedmiotowe

W badaniu ultrasonograficznym zaobserwowałam niewielkie i nieistotne statystycznie różnice w częstości występowania tachykardii i bradykardii u płodu pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Pillai i wsp., na podstawie przeglądu literatury i metaanalizy na grupie 5500 kobiet, twierdzą, że bradykardia płodu jest najlepszym dostępnym markerem ultrasonograficznym w przewidywaniu poronienia (o wyższej specyficzności i czułości niż obecność krwiaka podkosmówkowego, CRL niekorespondujący z wiekiem ciążowym i nieprawidłowy pęcherzyk żółtkowy) (111). Również Varelas i wsp. oraz Maged i Mostafa podkreślają znaczenie zbyt wolnej czynności serca u płodu jako czynnika prognostycznego utraty ciąży w pierwszym trymestrze (112, 113). Należy jednak podkreślić, że powyższe wyniki mogą wynikać z faktu, iż bradykardia w 1. trymestrze ciąży występuje u wielu zarodków i płodów z aneuploidią - najczęstszą przyczyną poronień (114).

Znacznie mniej jest doniesień na temat zbyt szybkiej czynności serca u płodu we wczesnej ciąży. Tachykardia u płodu, tak samo jak bradykardia, często świadczy o nieprawidłowościach chromosomowych, mogących prowadzić do utraty ciąży (115). Jednak zdaniem Doubileta i wsp., którzy w swojej publikacji przedstawiają brak związku tachykardii

z poronieniem i wystąpieniem wad wrodzonych, zbyt szybka czynność serca płodu nie stanowi czynnika ryzyka nieprawidłowego przebiegu ciąży (116).

W przeprowadzonym badaniu USG stwierdzono obecność krwiaka podkosmówkowego u przeważającej części krwawiących pacjentek, do czego odniosę się w podrozdziale o krwiaku podkosmówkowym.

6.2. Wywiad położniczy oraz badanie podmiotowe i przedmiotowe ciężarnych z krwawieniem z dróg rodnych – porównanie grup pacjentek, których ciąża zakończyła się poronieniem i porodem

6.2.1. Badanie podmiotowe

Porównanie historii położniczej, częstości suplementacji witamin oraz sposobu zajścia w ciążę w grupie pacjentek krwawiących, które poroniły i pacjentek, które urodziły nie wykazało różnic, co w mojej ocenie korzystnie wpływa na jakość przeprowadzonego badania. W wynikach dotyczących porównania badania podmiotowego pomiędzy grupami zwraca uwagę różnica w zgłaszanej częstości przyjmowania doustnego preparatu progesteronu. Mimo, że wynik jest na granicy istotności statystycznej ($p=0,067$), zaskoczył mnie fakt, iż pacjentki, które poroniły, prawie 10 razy częściej stosowały ten lek niż kobiety, które urodziły (odpowiednio 28,6% vs 2,9%). Należy podkreślić, że przyjmowane leki raportowano na podstawie wywiadu, zatem pacjentki przyjmowały je już przed zgłoszeniem się do szpitala. Progesteron jest hormonem produkowanym przez ciało żółte i łożysko, niezbędnym dla utrzymania ciąży, szczególnie przez pierwsze 10-14 dni jej trwania. Jego działanie na czynność wydzielniczą błony śluzowej macicy oraz efekt immunomodulujący wspomagają prawidłową implantację i przeciwdziałają odrzuceniu zarodka przez organizm matki. Progesteron wpływa również na wyciszenie czynności skurczowej macicy (118). Dowiedzione korzystne efekty działania endogenego progesteronu oraz niewielka częstość raportowanych działań niepożądanych podczas jego przyjmowania wpływają na popularność terapii poronienia zagrażającego progesteronem i jego pochodnymi. Czy jednak leki te działają tak samo korzystnie jak endogenny hormon? Uzyskane przeze mnie wyniki nie osiągnęły istotności statystycznej, nie mogę zatem wnioskować o skuteczności stosowania egzogennych gestagenów w poronieniu zagrażającym. W świecie naukowym ten temat nadal jest przedmiotem dyskusji. W swoich publikacjach zarówno Dante i wsp., jak i Coomarasamy i wsp. piszą o braku wystarczających dowodów na skuteczność terapii progesteronem w

poronieniu zagrażającym (118,119). Z kolei Carp wykazał istotne zmniejszenie ryzyka poronienia u pacjentek z poronieniem zagrażającym po wdrożeniu terapii doustnym dydrogesteronem w porównaniu z placebo (120). Także Lee i wsp., na podstawie dużej metaanalizy wnioskują, że preparaty progesteronu, szczególnie doustny dydrogesteron są efektywne w leczeniu poronienia zagrażającego (121).

6.2.2. Badanie przedmiotowe

Elementem mojego badania była ocena krwawienia pod względem jego objętości, koloru, obecności skrzepów oraz występowania bólu. Nie zaobserwowałam różnic w objętości ani kolorze utraconej krwi pomiędzy pacjentkami, które poroniły, a pacjentkami, które urodziły dzieci. Kobiety, których ciąża zakończyła się poronieniem częściej zgłaszały obfite krwawienie ze skrzepami, różnica ta nie osiągnęła jednak istotności statystycznej. Również nasilenie bólu, zarówno podczas krwawienia, jak i w trakcie badania ginekologicznego było zbliżone w obu grupach. Moje wyniki świadczą o małej wartości oceny objętości, koloru i nasilenia bólu, dokonywanej zarówno przez pacjentkę, jak i przez lekarza ją badającego, w kontekście przewidywania poronienia. Podobne wnioski opublikował Stabile, którego zdaniem nasilenie krwawienia, czas jego trwania ani nasilenie dolegliwości bólowych nie stanowią wiarygodnych i miarodajnych przesłanek do oceny ryzyka poronienia (198). Analizę objawów poronienia na dużej grupie pacjentek przeprowadzili Wieringa-de Waard i wsp., którzy donoszą, że jedynym symptomem pozwalającym na zakwalifikowanie pacjentki do grupy wysokiego ryzyka poronienia jest nasilenie się krwawienia z czasem. Autorzy nie zaobserwowali związku pomiędzy objętością krwawienia w momencie jego rozpoczęcia ani nasileniem bólu a ryzykiem poronienia (199). Do odmiennego wniosku doszli Hasan i wsp., którzy na podstawie badania kohortowego na grupie ponad 4000 pacjentek, spośród których 1200 krwawiło w pierwszym trymestrze ciąży, donoszą, że ryzyko poronienia rośnie wraz z nasileniem krwawienia z dróg rodnych oraz bólu podbrzusza (177).

6.3. Ocena wpływu krwawienia z dróg rodnych w pierwszych 21. tygodniach ciąży na wystąpienie poronienia, czas trwania ciąży, powikłania perinatalne, poród oraz stan noworodka

6.3.1. Wpływ krwawienia na wystąpienie poronienia i czas trwania ciąży

Większość badaczy jest zgodna, że wystąpienie krwawienia z dróg rodnych stanowi czynnik ryzyka poronienia (10,33,38,58,122,196). W moim badaniu zaobserwowałam istotną statystycznie różnicę w czasie trwania ciąży pomiędzy grupą badaną a kontrolną – ciążę pacjentek z poronieniem zagrażającym trwały krócej. Jednak uzyskana różnica w częstości poronień pomiędzy grupami była nieistotna statystycznie (16,7% w grupie badanej vs 10,3% w grupie kontrolnej, $p=0,4$). W wynikach badania zwraca uwagę niski odsetek poronień u krwawiących pacjentek (16,7%) w porównaniu do raportowanego w piśmiennictwie blisko 50-procentowego ryzyka utraty ciąży w przypadku wystąpienia krwawienia z dróg rodnych (5-7). Częstość poronień była stosunkowo niska także w grupie kontrolnej (10,3%). Jedną z przyczyn takich wyników może być fakt, że do obu grup zakwalifikowałam pacjentki w odpowiednio wysokiej ciąży, aby można było potwierdzić ultrasonograficznie żywotność zarodka lub płodu (od 6. tygodnia ciąży). Jak wiadomo, częstość poronień spada wraz z wiekiem ciąży, a po stwierdzeniu echa zarodka z czynnością serca w badaniu USG spadek ten jest znaczny (5-7,21,35,200).

Uzyskane przeze mnie wyniki mogę porównać z dużą liczbą publikacji o wpływie krwawienia z dróg rodnych na utratę ciąży, spośród których większość donosi o zwiększonym ryzyku poronienia (19,33,38,58,200). Inne wnioski wypływają z pracy Hasana i wsp., którzy w dużym badaniu kohortowym wykazali, że ryzyko poronienia zależy od nasilenia dolegliwości bólowych i krwawienia i u pacjentek, które doświadczają łagodnego i krótkiego (1-2 dni) krwawienia, ryzyko poronienia nie jest podwyższone (177). W opublikowanej rok później pracy Hasan i wsp. donoszą o bardzo zbliżonej częstości poronienia u kobiet, które doświadczły krwawienia i u tych bez tego objawu. Wyniosło ono, odpowiednio 12% w grupie z krwawieniem i 13% w grupie bez krwawienia (201). Autorzy, na podstawie analiz wyników swoich badań podkreślają znaczenie oceny nasilenia, czasu trwania i bolesności krwawienia i wysnuwają hipotezę, że zupełnie odmienne przyczyny leżą u podstaw obfitego, bolesnego krwawienia i łagodnego krwawienia bądź plamienia. Autorzy większości publikacji skupiają się na samej obecności objawów poronienia zagrażającego, nie oceniając charakteru krwawienia. Uważam, że moje wyniki oraz powyższe doniesienia, szczególnie

prace opublikowane przez Hasana i wsp., stanowią podstawę do stwierdzenia, że potrzeba więcej badań poszukujących związku pomiędzy krwawieniem z dróg rodnych, jego charakterem a poronieniem.

6.3.2. Wpływ krwawienia na wystąpienie powikłań perinatalnych

Coraz więcej badaczy donosi o związku pomiędzy poronieniem zagrażającym a rozwojem powikłań w późniejszej ciąży. Większość z tych powikłań wynika z nieprawidłowego funkcjonowania łożyska i może wystąpić dopiero w 3. trymestrze ciąży, zatem czas pomiędzy wystąpieniem krwawienia z dróg rodnych a powikłaniami jest stosunkowo długi.

Poszukiwania przyczyny obserwowanego powiązania krwawienia z dróg rodnych i powikłań perinatalnych nadal trwają. Coraz szersza wiedza na temat procesu powstawania łożyska i znaczenia kontaktu trofoblastu z bogato utlenowaną krwią w tym szczególnym okresie jest powodem rosnącej liczby badań i publikacji dotyczących tego zagadnienia. O pogorszeniu rezultatu położniczego przez wystąpienie krwawienia z dróg rodnych donoszą m.in. Johns i Nagy (38,39,52). Według analiz Johns i wsp., 17% kobiet, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży, rozwinie w późniejszej ciąży powikłania pogarszające rezultat położniczy (39). Jednak różnorodność doniesień na temat stopnia istotności krwawienia w pierwszej połowie ciąży dla jej przebiegu powoduje, że kwestia włączenia tych pacjentek do grupy ciąż wysokiego ryzyka pozostaje kontrowersyjna.

6.2.1.1 Poród przedwczesny i przedwczesne, przedporodowe pęknięcie błon płodowych

Szacuje się, że 5-18% porodów na świecie odbywa się przedwcześnie. Poród przedwczesny stanowi główną przyczynę zachorowalności i śmiertelności noworodków na świecie (134,202). Leczenie objawów porodu przedwczesnego, przewidywanie ryzyka oraz zapobieganie jego wystąpieniu stanowi jedno z największych wyzwań współczesnego położnictwa. Przedwczesne, przedporodowe pęknięcie błon płodowych dotyczy szacunkowo 3% ciąż i stanowi jedną z przyczyn przedwczesnego porodu. Jego konsekwencją może być również zakażenie wewnątrzmaciczne stanowiące zagrożenie nie tylko dla noworodka, ale też dla ciężarnej (203). Według niektórych Autorów związek pomiędzy poronieniem zagrażającym a porodem przedwczesnym i PPRM jest wystarczająco udowodniony, aby zaliczać takie pacjentki do grupy wysokiego ryzyka wystąpienia tych powikłań (10,39).

W moim badaniu krwawienie z dróg rodnych skróciło istotnie czas trwania ciąży. Prawie trzykrotnie więcej pacjentek z grupy badanej urodziło przedwcześnie (14,3% vs 5,1%) (różnica ta nie osiągnęła jednak istotności statystycznej). Nie mogłam dokonać porównania częstości PPRom pomiędzy grupami, ponieważ wystąpiło ono u badanych kobiet zbyt rzadko.

Uzyskane przeze mnie wyniki mogę odnieść do wniosków Dadkhaha i wsp., którzy wykazali ponad dwukrotnie większą częstość porodów przedwczesnych i PPRom w grupie pacjentek, które krwawiły w pierwszych 21. tygodniach ciąży (11). Lykke i wsp., na podstawie retrospektywnego badania na grupie ponad miliona kobiet dowiedli, że krwawienie w pierwszych 12 tygodniach ciąży zwiększa ryzyko przedwczesnego porodu i PPRom (10). Johns i Jauniaux, oceniając prospektywnie wynik położniczy u pacjentek z krwawieniem w pierwszym trymestrze ciąży, zaobserwowali w tej grupie dwukrotnie większą częstość porodów przedwczesnych. W ich pracy zwraca też uwagę znacznie większa częstość PPRom u pacjentek z grupy z poronieniem zagrażającym (7% vs 1,9% w grupie kontrolnej). Zdaniem Autorów, fakt wystąpienia krwawienia w 1. trymestrze ciąży powinien być powodem do zwiększonego nadzoru nad pacjentką przez całą ciążę (39).

Infekcja i wynikająca z niej aktywacja kaskady zapalnej jest uznanym czynnikiem etiologicznym zarówno PPRom, jak i porodu przedwczesnego. Do inicjacji procesów zapalnych może przyczyniać się wynaczynienie krwi do przestrzeni podkosmówkowej i przerwanie ciągłości między kosmówką a błonami płodowymi. Jednak zdaniem wielu Autorów, reakcja zapalna przyczynia się do maksymalnie 30-40% przedwczesnych urodzeń (133-135). Nie od dziś wiadomo, że przedwczesny poród jest zjawiskiem o złożonym i wieloczynnikowym podłożu. U większości kobiet z porodem przedwczesnym i bez wykładników zapalenia, badanie histopatologiczne popłodu wykazuje obecność patologii naczyniowych: nieprawidłowego obrazu tętnic spiralnych (wynikającego z braku transformacji), miażdżycy i zakrzepicy tętnic spiralnych oraz zmniejszonej ilości tętniczek w kosmkach łożyska (134). Wspomniane nieprawidłowości naczyniowe wywołują niedokrwienie, które może skutkować rozwinięciem objawów porodu przedwczesnego (134,135). Zdaniem Lettieri i wsp. odsetek porodów przedwczesnych spowodowanych skutkami nieprawidłowej placentacji jest nawet większy niż spowodowanych reakcją zapalną (133). W badaniu Ariasa i wsp. nieprawidłowości naczyń doczesnej zaobserwowano u 34% kobiet z porodem przedwczesnym i zachowanymi błonami płodowymi, u 35% kobiet z PPRom oraz u 12% pacjentek w grupie donoszonych ciąż fizjologicznych, zaś zmiany zapalne odpowiednio u 38%, 23% i 18% (135). Również Kim i wsp. zaobserwowali wyższy

odsetek obrazów nieprawidłowej transformacji tętnic spiralnych u kobiet z PPROM i porodem przedwczesnym (136,137).

Mechanizmy, w jakich niedokrwienie powoduje przedwczesny poród są przedmiotem wielu spekulacji i badań. Opisywana jest między innymi rola układu renina-angiotensyna oraz aktywacja trombiny jako skutek krwawienia podkosmówkowego (135-137). Powyższe doniesienia wskazują na potencjalnie dużą rolę zjawisk zachodzących we wczesnej ciąży w etiopatogenezie przedwczesnego porodu i PPROM. Fakt ten oraz uzyskane przeze mnie wyniki świadczą o potrzebie dalszego poszukiwania czynników etiologicznych przedwczesnego porodu, PPROM oraz ich związku z poronieniem zagrażającym.

6.2.1.2 Nadciśnienie indukowane ciążą i preeklampsja

Zaburzenia ze spektrum nadciśnienia tętniczego wikłają około 10% ciąż, z czego 3% stanowią przypadki preeklampsji (204). Wystąpienie tych powikłań prowadzi do istotnego zwiększenia odsetka zachorowalności i śmiertelności ciężarnych i noworodków na całym świecie, stanowi również jedną z przyczyn m.in. ograniczenia wzrastania płodu, niedotlenienia płodu oraz jatrogeennego porodu przedwczesnego (204). Spośród wszystkich powikłań perinatalnych, preeklampsja ma najlepiej udowodniony związek z nieprawidłową placentacją. Również duża liczba publikacji dotyczących stresu oksydacyjnego, krwawienia i krwiaka podkosmówkowego opisuje związek tych zjawisk z preeklampsją (40,45,85,152). Nie wszyscy Autorzy zgadzają się jednak z istnieniem powiązania między poronieniem zagrażającym a stanem przedrzucawkowym (11,39,123).

W moim badaniu częstość NIC i preeklampsji w grupie badanej i kontrolnej była zbliżona. Odsetek wyniósł 2,4% dla obu tych powikłań w grupie badanej oraz nie odnotowano żadnego przypadku w grupie kontrolnej, co prawdopodobnie wynika z małej liczebności obu grup. Johns i Jauniaux również nie zaobserwowali wpływu krwawienia w 1. trymestrze ciąży, a Dadkhah - krwawienia w pierwszych 21. tygodniach ciąży, na częstość wystąpienia preeklampsji (11,39). W pracy Lykke i wsp. różnica w odsetku stanu przedrzucawkowego pomiędzy pacjentkami z TM a grupą kontrolną nie osiągnęła istotności statystycznej (10). Z kolei Weiss i Nagy w swoich publikacjach donoszą o istotnie zwiększonym ryzyku preeklampsji u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży (52,122). Co ciekawe, odwrotną zależność znaleźli Eskild i Vatten – w ich badaniu, przeprowadzonym na grupie ponad 300 tysięcy kobiet, istotnie mniej pacjentek, które krwawiły w 1. trymestrze ciąży rozwinęło później preeklampsję (123). Na podstawie

tych obserwacji Autorzy wysunęli nawet hipotezę stojącą w opozycji do dotychczas przyjętej – że krwawienie z dróg rodnych we wczesnej ciąży jest skutkiem lepszej placentacji i waskularyzacji.

6.2.1.3 Przedwczesne oddzielenie łożyska

Przedwczesne oddzielenie łożyska jest nagłą sytuacją położniczą wiążącą się z zagrożeniem życia płodu i koniecznością pilnego rozwiązania ciąży, zatem oczywiste jest, że przyczynia się do zwiększenia zachorowalności i śmiertelności noworodków oraz ich matek. Głównym objawem przedwczesnego oddzielenia łożyska jest krwawienie z dróg rodnych, do którego dochodzi zwykle w 3. trymestrze ciąży. Częstość tego powikłania szacuje się na ok. 1% ciąż (205). Mimo rosnącej wiedzy o czynnikach ryzyka, nadal większość przypadków przedwczesnego oddzielenia łożyska jest niemożliwa do przewidzenia.

U podstaw tego powikłania może leżeć nieprawidłowa placentacja i angiogeneza. Niektórzy Autorzy badający wpływ krwawienia na rezultat położniczy zaobserwowali zwiększone ryzyko przedwczesnego oddzielenia łożyska u pacjentek z poronieniem zagrażającym (10,11,39,122,129). W mojej pracy niestety nie mogłam dokonać podobnej oceny z uwagi na zbyt małą częstość tego powikłania w grupie badanej i kontrolnej.

6.3.3. Wpływ krwawienia na poród

Poza przebiegiem ciąży, stan zdrowia dziecka i matki jest w dużym stopniu determinowany przez drogę i przebieg porodu. Doniesienia o wpływie wystąpienia krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży na zwiększenie częstości objawów zagrożenia płodu w trakcie porodu, odsetka cięć cesarskich i krwotoków okołoporodowych oraz pogorszenie stanu noworodka skłoniły mnie do analizy porodów badanych przeze mnie pacjentek (52,122,206).

6.3.3.1. Sposób zakończenia ciąży

W moim badaniu zaobserwowałam, że ciążę pacjentek, które doświadczyły poronienia zagrażającego częściej były rozwiązywane cięciem cesarskim. W grupie badanej ponad połowa kobiet (54,8%) miała cięcie cesarskie, w porównaniu z 33,3% pacjentek w grupie

kontrolnej. Moje wyniki są zbieżne z opublikowanymi przez Weissa i wsp. oraz Wijesiriwardana i wsp., którzy donoszą, że krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży zwiększa ryzyko cięcia cesarskiego (122,206). Z kolei Dadkhah i wsp. w swojej publikacji opisują brak wpływu krwawienia w pierwszej połowie ciąży na sposób jej zakończenia (poród operacyjny vs poród siłami natury) (11).

Ostatni opublikowany przez Główny Urząd Statystyczny odsetek cięć cesarskich w Polsce dotyczy 2019 roku (dane opublikowane w 02.2021). Wyniósł on 44,8%, co stanowi wartość wyższą niż odnotowana w moim badaniu w grupie zdrowych ciężarnych, a niższą niż u pacjentek z grupy badanej (124).

Na większą częstość cięć cesarskich u pacjentek, które krwawiły w pierwszej połowie ciąży może mieć wpływ raportowane przez niektórych badaczy częstsze występowanie wymienianych już powikłań – preeklampsji czy przedwczesnego oddzielenia łożyska. W moim badaniu nie zaobserwowałam jednak zwiększonej częstości tych powikłań, co może świadczyć o tym, że występują inne, niepoznane czynniki potęgujące ryzyko porodu operacyjnego u pacjentek z wywiadem krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży.

6.3.3.2. Krwotok okołoporodowy

W moich obserwacjach dotyczących porodów badanych pacjentek zwraca uwagę istotnie większa okołoporodowa utrata krwi u kobiet, które doświadczyły krwawienia w pierwszej połowie ciąży. Utratę krwi większą niż 500 ml zakwalifikowałam jako krwotok okołoporodowy. Doszło do niego u 35,7% kobiet z grupy badanej w porównaniu z 7,7% w grupie kontrolnej ($p=0,02$).

Uzyskane przeze mnie wyniki są zbieżne z doniesieniami Nwafora i wsp., którzy na podstawie badania retrospektywnego na grupie 21 tysięcy kobiet donoszą o ponad dwukrotnym zwiększeniu ryzyka krwotoku okołoporodowego u pacjentek z krwawieniem w pierwszych 12 tygodniach ciąży (129).

Utrata krwi podczas porodów operacyjnych jest większa niż w przy PSN, szczególnie dotyczy to cięć cesarskich wykonywanych ze wskazań nagłych (125,126). W związku z tym, na wynik badania może mieć wpływ większy odsetek cięć cesarskich odnotowany w grupie badanej. Chang i wsp. raportują prawie dwukrotnie większą średnią utratę krwi w trakcie pilnych cięć cesarskich (938 ml) w porównaniu z porodem siłami natury (557 ml) (125).

Podobnie, 2x większą częstość wystąpienia krwotoku okołoporodowego u pacjentek po cesarskim cięciu vs PSN opisują Bodner i wsp. (126).

Biorąc pod uwagę wyniki badania Dadkhaha i wsp., którzy opisują istotnie większe ryzyko wystąpienia krwotoku, także przedporodowego, u pacjentek z wywiadem krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży, można przypuszczać, że droga porodu nie jest jedyną determinantą zwiększonej częstości krwotoków u pacjentek, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży (11).

Poza porodami operacyjnymi, na zwiększony odsetek krwotoków okołoporodowych może wpływać obserwowana przez innych Autorów większa częstość przedwczesnego oddzielenia łożyska, łożyska przodu i trudności w oddzieleniu łożyska w 3. okresie porodu u ciężarnych z poronieniem zagrażającym w wywiadzie (52,57). Patologie te mogą wynikać ze zmian histologicznych w łożysku, powstających pod wpływem kontaktu trofoblastu z wynaczynioną krwią na wczesnym etapie ciąży. Najczęściej te zmiany są opisywane jako zapalenie z późniejszym bliznowaceniem w tej okolicy (129,196).

Przyczyną zarówno zwiększonej utraty krwi przy porodzie, jak i krwawienia z dróg rodnych w ciąży mogą być również zaburzenia hematologiczne i przyjmowane przez pacjentki leki wpływające na krzepliwość krwi. W moim badaniu choroby hematologiczne oraz przyjmowanie ww. leków stanowiły kryterium wykluczenia, będąc jednak świadoma dość dużego odsetka nierozpoznanych zaburzeń krzepnięcia w naszej populacji, w trakcie badania podmiotowego pytałam pacjentki o typowe objawy budzące takie podejrzenie (krwawienia z nosa, przedłużone krwawienie z ran, bardzo obfite miesiączki, łatwe siniaczenie skóry). Grupy badana i kontrolna były zbliżone pod kątem częstości występowania tych objawów.

Zwiększony stres oksydacyjny u pacjentek z krwawieniem macicznym w pierwszej połowie ciąży hipotetycznie również może wpływać na większą okołoporodową utratę krwi, ze względu na opisywane u nich upośledzenie funkcji śródbłonna oraz zwiększenie sztywności naczyń (130). Te zmiany mogą potencjalnie skutkować łatwiejszym przerywaniem ciągłości ściany naczyń. Nieprawidłowo przebiegający proces placentacji i angiogenezy oraz opisywane wcześniej patologie naczyniowe odkryte w łożyskach pacjentek z porodem przedwczesnym również mogą mieć wpływ na zwiększoną utratę krwi podczas porodu kobiet, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży.

6.3.4. Wpływ krwawienia na stan noworodka

Wszystkie opisane powyżej powikłania, a także fakt operacyjnego ukończenia porodu mogą mieć negatywny wpływ na stan zdrowia noworodka. Ponadto, poród przedwczesny (spontaniczny, związany z PPRM a także jatrogeny, podyktowany wystąpieniem wskazań do ukończenia ciąży) oraz powikłania związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem łożyska (NIC, preeklampsja, SGA, FGR) mogą skutkować mniejszą masą urodzeniową.

W moim badaniu nie zaobserwowałam wpływu wystąpienia w pierwszej połowie ciąży krwawienia z dróg rodnych na stan noworodka po porodzie. Masy urodzeniowe noworodków z obu grup były zbliżone (taka sama mediana, wynosząca 3380 g dla grupy badanej i kontrolnej), nie wykazano także różnic w zachorowalności noworodków.

Odnotowane przeze mnie wyniki mogę porównać z doniesieniami Johns i Jauniaux, którzy również raportują brak różnic w urodzeniowej masie noworodków między pacjentkami zdrowymi, a tymi, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży (39). Z kolei Nwafor i wsp. opisują w swojej publikacji zwiększoną częstość małej masy urodzeniowej i wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu w grupie pacjentek z krwawieniem, przy braku wpływu na punktację Apgar, częstość hospitalizacji w Oddziale Intensywnej Terapii Noworodka oraz śmiertelność (129). Dadkhah i wsp. donoszą o istotnej różnicy w masie urodzeniowej noworodków, mimo zbliżonej częstości FGR u płodu. Na opublikowane przez Dadkhaha i wsp. wyniki może mieć wpływ dużo większa częstość porodów przedwczesnych u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży (11).

Z uwagi na mnogość czynników wpływających zarówno na masę, jak i stan noworodka – rozwój powikłań w ciąży, poród przedwczesny, droga porodu i ich powiązanie ze zjawiskiem krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży, zasadne wydaje się przeprowadzenie większej ilości badań na dużych grupach ciężarnych i ich dzieci, analizujących nie tylko masę i stan zdrowia po porodzie, ale także potencjalne przyczyny obserwowanych odchyleń.

6.4. Analiza stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej krwawieniem z dróg rodnych i ciąży zakończonej poronieniem

Dialdehyd malonowy (MDA) jest produktem peroksydacji lipidów uznanym za najlepszy dostępny pomiarowi marker stresu oksydacyjnego (138). Doniesienia naukowe na temat

związku między poziomem stresu oksydacyjnego, zwiększonym stężeniem MDA i krwawieniem z dróg rodnych w ciąży oraz poronieniem są dość nieliczne i niejednorodne.

W badanym materiale, wbrew oczekiwaniom, stwierdziłam zbliżone stężenia MDA w grupie badanej i kontrolnej, zaś u pacjentek, które poroniły, stężenie MDA było niższe niż u kobiet, których ciąży zakończyły się porodem. Stanowi to dość zaskakujący wynik, sugerujący, że poronienie wiąże się z niższym poziomem stresu oksydacyjnego. Sutama i Surya, na podstawie analizy pomiarów MDA w surowicy krwi 30 kobiet z krwawieniem z dróg rodnych i 30 zdrowych ciężarnych donoszą o jego znacząco wyższym stężeniu u ciężarnych z krwawieniem z dróg rodnych. Autorzy, po ustaleniu wartości odcięcia (wynoszącej 1,12 nmol/ml) dla uznania stężenia MDA za podwyższone, wyliczyli, że pacjentki z podwyższonym MDA mają prawie 30-krotnie wyższe ryzyko wystąpienia poronienia zagrażającego (146). Należy zwrócić uwagę, że w badaniu Sutamy i Suri, tak samo jak w moim, pomiar MDA przeprowadzono w momencie wystąpienia objawów poronienia zagrażającego. Autorzy mogą zatem wnioskować o wyższym stresie oksydacyjnym w czasie wystąpienia krwawienia, nie mogą jednak ocenić wartości prognostycznej takiego pomiaru MDA pod kątem poronienia, gdyż nie przeprowadzili żadnej oceny *follow-up* tych pacjentek (146). Sane i wsp., badając stężenia MDA w grupie ciąż fizjologicznych, poronień zatrzymanych i poronień spontanicznych wykazali ich istotny wzrost u kobiet z poronieniem, zarówno indukowanym jak i spontanicznym (143). Z kolei Daglar i wsp. na podstawie swoich badań donoszą o zbliżonych stężeniach MDA u kobiet z wczesną utratą ciąży i zdrowych pacjentek w ciąży niepowikłanej (139). Również Ramino-Cortijo i wsp. nie wykazali związku między stężeniem MDA w surowicy w 1. trymestrze ciąży a poronieniem i rozwojem powikłań w późniejszej ciąży (145). Interesujących wyników dostarczyła praca Sugino i wsp., którzy przeanalizowali poziomy MDA w tkance doczesnej w pierwszym trymestrze ciąż fizjologicznych poddawanych terminacji oraz ciąż, w których doszło do poronienia spontanicznego i zatrzymanego. W tym badaniu, stężenie MDA w doczesnej było znacznie wyższe w grupie z poronieniem spontanicznym w porównaniu z poronieniem zatrzymanym i zdrowymi ciążami (144). Wyniki Sugino i wsp. pozwalają podejrzewać, że stężenie MDA, a zatem nasilenie stresu oksydacyjnego, wykazuje związek z krwawieniem z dróg rodnych. Nie wiadomo jednak, czy do wzrostu stężenia dialdehydu malonowego dochodzi przed wystąpieniem krwawienia, czy też w efekcie wynaczynienia krwi i przerwania ciągłości między doczesną a trofoblastem.

Nie uzyskując oczekiwanych różnic w stężeniach MDA pomiędzy grupą badaną i kontrolną oraz odnotowując wynik odwrotny od oczekiwanego w grupie poronień,

postanowiłam przeanalizować doniesienia na temat stężeń dialdehydu malonowego w ciąży fizjologicznej. Do tej pory ustalono, że poziom peroksydacji lipidów jest wyższy u ciężarnych niż u kobiet niebędących w ciąży (140-142,147). Doniesienia o zmianach poziomu peroksydacji lipidów oraz stężenia MDA w trakcie ciąży dostarczają natomiast dość różnorodnych informacji. Mihailović i wsp. wykazali, że peroksydacja lipidów i stężenie MDA są wyższe w pierwszym trymestrze niż w późniejszej ciąży i podczas porodu (141). Z kolei Patil, na podstawie analizy stężeń dialdehydu malonowego w grupie zdrowych nieciężarnych i ciężarnych w każdym trymestrze ciąży donosi, że MDA w surowicy jest najniższe poza ciążą, a w ciąży rośnie wraz z jej biegiem i najwyższe jest w 3. trymestrze (147). Arian i wsp. opisują znaczny wzrost stężenia MDA w trakcie porodu, który koreluje z poziomem MDA u noworodka (142).

Biorąc pod uwagę wyniki badania Mihailovića i wsp., brak różnic między grupą badaną i kontrolną w mojej pracy można tłumaczyć faktem podwyższenia poziomu MDA także w ciążach fizjologicznych, co przy niezbyt dużej liczbie grup może skutkować brakiem różnic (141). Nie potrafię natomiast wyjaśnić przyczyny uzyskanego w moim badaniu niższego stężenia dialdehydu malonowego u kobiet, które poroniły. Uważam, że sprzeczne doniesienia na temat zmian stężenia MDA i poziomu peroksydacji lipidów w trakcie ciąży oraz różne wyniki analiz ich związku z poronieniem zagrażającym i utratą ciąży świadczą o tym, że należy wykonać więcej badań, na większej grupie kobiet, które pozwolą przybliżyć wiedzę na temat stresu oksydacyjnego w ciąży.

6.5. Analiza stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu i reduktazy glutationu), glutationu i całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej w pierwszej połowie krwawieniem z dróg rodnych

Interpretacja badań nad aktywnością mechanizmów obrony organizmu przed działaniem stresu oksydacyjnego może nastroczać wielu trudności, szczególnie w obliczu uzyskanych przeze mnie wyników stężeń dialdehydu malonowego, wskazujących na niewystępowanie warunków podwyższonego stresu oksydacyjnego u pacjentek z poronieniem zagrażającym i poronieniem dokonanym. Należy zaznaczyć, że stres oksydacyjny może być efektem obniżonej ochrony antyoksydacyjnej i jednocześnie może dostępne mechanizmy tej ochrony uszkadzać. Fizjologicznie, w warunkach stresu oksydacyjnego aktywność substancji o działaniu przeciwutleniającym rośnie, jednak należy pamiętać, że po pewnym

czasie zaczyna spadać, w związku z ich zużyciem i uszkodzeniem przez reaktywne formy tlenu. Czas od wzrostu aktywności antyoksydantów do początku ich wyczerpywania się oraz zdolność organizmu do nadążenia z ich odnawianiem może być zmienny osobniczo oraz zależny od wielu czynników. Czy zatem na podstawie stężeń antyoksydantów można wnioskować o poziomie stresu oksydacyjnego?

W mojej pracy przyjąłem, że o zaburzeniu równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku procesów utleniania świadczy poziom MDA, zaś substancje o działaniu antyoksydacyjnym odzwierciedlają zdolności organizmu do obrony przed działaniem reaktywnych form tlenu. Zamysłem pracy w kontekście badania antyoksydantów była próba odpowiedzi na pytanie czy krwawienie z dróg rodnych w ciąży i poronienie wiążą się ze zmianami aktywności przeciwutleniaczy i całkowitego statusu antyoksydacyjnego.

6.5.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

W mojej pracy, tak jak większość innych badaczy, oceniałem stężenia w surowicy całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (total-SOD), bez podziału na izoformy. Stężenia SOD w grupie badanej i kontrolnej były zbliżone. Kobiety, które poroniły, miały niższe stężenia SOD w porównaniu z tymi, których ciąża zakończyła się porodem, różnica ta jednak nie była istotna statystycznie.

Patil i wsp., porównując stężenia SOD u ciężarnych w 1., 2. i 3. trymestrze oraz u kobiet niebędących w ciąży zanotowali najwyższe stężenia tego enzymu u nieciężarnych oraz sukcesywny jego spadek następujący wraz z biegiem ciąży. Uzyskane przede mnie wyniki mogę porównać z badaniem Ozkay i wsp., którzy wykazali zmniejszoną aktywność SOD w erytrocytach u pacjentek z poronieniem spontanicznym w porównaniu z kobietami w ciąży fizjologicznej (140). Również Jenkins i wsp. donoszą o wyższym stężeniu SOD w surowicy w 1. trymestrze u kobiet, które donosiły ciążę w porównaniu z tymi, które poroniły (150).

Wiele publikacji na temat dysmutazy ponadtlenkowej w ciąży zawdzięczamy japońskiej grupie badawczej pod przewodnictwem Norihiro Sugino. Badacze ci donoszą o wzroście ekspresji Cu/ZnSOD i MnSOD następującym zaraz po zapłodnieniu, który ma na celu ochronę zagnieżdżającego się zarodka przed reaktywnymi formami tlenu i prawdopodobnie jest jednym z efektów działania gonadotropiny kosmówkowej (149). Sugino i wsp. porównali stężenia SOD w tkance doczesnej terminowanych ciąż niepowikłanych oraz ciąż powikłanych poronieniem spontanicznym i zatrzymanym u pacjentek w 1. trymestrze ciąży. Wykazali

znacząco niższy poziom całkowitej SOD (total-SOD) oraz Cu/ZnSOD oraz istotnie wyższy poziom MnSOD w grupie spontanicznego poronienia. W tym badaniu przeprowadzono także analizę stężenia prostaglandyny 2 α , której produkcja jest stymulowana przez RFT i peroksydację lipidów. Poziom prostaglandyny 2 α był wyższy u pacjentek z poronieniem spontanicznym niż w grupie z poronieniem zatrzymanym i w prawidłowej ciąży (144). Doniesienia te mogą świadczyć o istotnym znaczeniu stresu oksydacyjnego w poronieniu spontanicznym, chociażby poprzez jego wpływ na produkcję PGF-2 α , m.in. stymulującej skurcze macicy, które prowadzą do oddzielania trofoblastu i krwawienia z dróg rodnych. Nadal nie wiemy dlaczego w poronieniu zatrzymanym nie dochodzi samoistnie do oddzielania struktur jaja płodowego od doczesnej, skutkującego krwawieniem z dróg rodnych. Być może wynika to z mniejszego poziomu stresu oksydacyjnego, niewystarczającego do stymulacji produkcji prostaglandyny 2 α . Sugino i wsp., na podstawie swoich obserwacji uważają, że Cu/Zn SOD, poprzez inhibicję peroksydacji lipidów, a przez to produkcji PGF-2 α , pełni rolę podtrzymującą ciążę. Autorzy wysnuwają hipotezę, że zmniejszone stężenie Cu/Zn SOD u kobiet z poronieniem spontanicznym może wynikać ze zmniejszonego przepływu krwi przez doczesną, będącego powodem obumarcia ciąży.

W swojej pracy Patil i wsp. zauważają, że metabolizowanie anionorodnika ponadtlenkowego przez SOD przedłuża biologiczny okres półtrwania tlenku azotu, który promuje rozluźnienie mięśni gładkich, w tym mięśnia macicy (148). Stanowi to kolejny korzystny mechanizm, w którym dysmutaza ponadtlenkowa mogłaby wykazywać działanie podtrzymujące ciążę.

Odmienne od przytoczonych powyżej wyniki badań przedstawiają Popović i wsp., którzy analizowali stężenia SOD w surowicy w 1. trymestrze w grupie zdrowych ciąż, kobiet z poronieniem zatrzymanym i poronieniem spontanicznym. Autorzy donoszą o niższych stężeniach SOD w u kobiet w prawidłowych ciążach w porównaniu z pacjentkami z poronieniem spontanicznym oraz braku różnic pomiędzy grupą ciąż fizjologicznych i poronień zatrzymanych. Co ciekawe, Popović i wsp. wykazali także niższe poziomy peroksydacji lipidów w ciążach zdrowych w porównaniu z powikłanymi poronieniem (151).

Watson i wsp., analizując zmiany ekspresji Cu/ZnSOD w kosmkach trofoblastu na przestrzeni całej ciąży wykazali, że do 8 tygodnia ciąży enzym ten jest właściwie nieoznaczalny. Poziom Cu/ZnSOD w syncytiotrofoblaście zwiększa się stopniowo od 8. do 14. tygodnia ciąży, kiedy to osiąga stężenie porównywalne do obserwowanego w komórkach cytotrofoblastu i zbliżone do badanego w donoszonej ciąży. Przytoczone wyniki świadczą o

niskim stężeniu tlenu w przestrzeni międzykosmkowej w 1. trymestrze ciąży są zgodne z doniesieniami Jauniauxa i wsp., że w prawidłowej ciąży efektywne krążenie maczyno-płodowe rozpoczyna się wraz z początkiem drugiego trymestru (45,152).

W mojej ocenie, dotychczas udowodnione różnice w stężeniach tlenu w przestrzeni międzykosmkowej na przebiegu ciąży i idąca za tym mniejsza potrzeba obrony przed stresem oksydacyjnym w ciążach fizjologicznych następująca wraz z początkiem 2. trymestru mogły wpłynąć na wystąpienie zbliżonych stężeń SOD u moich pacjentek, ponieważ badałam poziom tego enzymu u pacjentek między 6. a 19. tygodniem ciąży.

6.5.2. Peroksydaza glutationowa (GPx)

Peroksydaza glutationu nie tylko zapobiega akumulacji H_2O prowadzącej do uszkodzenia komórek, ale również, poprzez hamowanie inaktywacji tlenu azotu, pomaga utrzymać homeostazę naczyniową (154). Niewielu badaczy podjęło się analizy aktywności tego enzymu w ciąży. W badaniu Patila i wsp. wykazano, że w ciąży poziom GPx jest niższy niż poza ciążą i wraz z jej biegiem sukcesywnie spada (147). Z kolei Behne i wsp. nie wykazali różnic w aktywności GPx między ciężarnymi i nieciężnymi oraz, analogicznie jak u Patila, poziom tego enzymu spadał wraz z dojrzewaniem ciąży (158). Odwrotne wnioski przedstawili w swojej publikacji Butler i wsp., w których badaniu w fizjologicznej ciąży stężenie GPx rosło z czasem (159).

Doniesienia na temat stężenia GPx u kobiet roniących są nieliczne i rozbieżne. W moim badaniu stężenie GPx u kobiet krwawiących było niższe niż w grupie kontrolnej, także pacjentki, które poroniły miały niższe stężenia GPx w stosunku do tych, które urodziły dzieci. W obu przypadkach różnice nie osiągnęły jednak istotności statystycznej.

Zachara i wsp. przeanalizowali aktywność tego enzymu w erytrocytach oraz w osoczu u kobiet nieciężnych, u kobiet w ciąży fizjologicznej oraz u pacjentek, które zgłosiły się do szpitala z poronieniem. Stężenia peroksydazy glutationowej, zarówno w erytrocytach jak i w osoczu były znacząco niższe u kobiet z poronieniem w stosunku do obu pozostałych grup. Autorzy postulują, że niższa aktywność GPx wynika ze zwiększenia aktywności glutationu w procesie neutralizacji RFT u kobiet z poronieniem (157).

Zbieżne z moimi wyniki przedstawił natomiast Ozkaya i wsp., którzy nie stwierdzili istotnych różnic w stężeniach GPx pomiędzy pacjentkami z poronieniem spontanicznym i w ciąży fizjologicznej (140). Simsek i wsp. zaobserwowali zaś większy poziom peroksydacji lipidów u kobiet z poronieniami nawracającymi, nie wpłynęło to jednak na zmiany w stężeniu

GPx w surowicy krwi u tych pacjentek (161). Omeljaniuk i wsp. donoszą natomiast o wyższej aktywności GPx w surowicy krwi u kobiet, które poroniły w porównaniu do pacjentek, które donosiły ciążę (160).

Zależność peroksydazy glutationowej od selenu była podstawą badań nad związkiem między niską podażą i stężeniami tego pierwiastka w organizmie a poronieniami, większość badań nie potwierdza jednak takiej korelacji (207,208).

6.5.3. Glutation (GSH)

W mojej pracy zaobserwowałam bardzo zbliżone stężenia GSH w grupie badanej i kontrolnej, natomiast porównanie stężeń tej substancji pomiędzy grupą z poronieniem a ciążami zakończonymi porodem wykazało istotną statystycznie różnicę. Kobiety, które poroniły miały niższe poziomy GSH w surowicy krwi.

W bazie Pub Med jest bardzo mało doniesień na temat glutationu w ciąży. Większość badaczy skupiła się na badaniach aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w tym związanych z glutationem – reduktazy i peroksydazy. Na podstawie badania przeprowadzonego przez Zacharę i wsp. można wnioskować, że poziom GSH w ciąży jest stały i wzrasta tylko bezpośrednio przed porodem (163). W innej swojej publikacji, Zachara i wsp. donoszą, że stężenia GSH u pacjentek z poronieniem są wyższe w porównaniu z kobietami w ciąży fizjologicznej i nieciążarnymi, odmiennie od wyników uzyskanych w moim badaniu (157). W badaniu Miller i wsp., przeprowadzonym na grupie 11 ciężarnych z historią nawracających poronień również stwierdzono wyższe stężenia GSH w surowicy u kobiet, które później poroniły w stosunku do pacjentek, którym udało się donosić ciążę. Autorka i wsp. upatrują przyczyny takiego wyniku w zjawisku stymulowania przez GSH produkcji limfocytów typu Th1, które produkują cytokiny o udowodnionym niekorzystnym działaniu na wczesną ciążę, takie jak IL-12, IFN γ i TNF α (167,168). Także Eric Jauniaux, prekursor badań nad stresem oksydacyjnym w ciąży i poronieniu, analizował wraz ze współnikami stężenia enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx i katalazy) oraz glutationu w trofoblaście, odnosząc je do pomiarów ciśnienia parcjalnego tlenu w przestrzeni międzykosmkowej. Zaobserwował wzrost aktywności badanych enzymów wraz ze wzrostem ciśnienia parcjalnego tlenu, zaś poziom glutationu nie zmienił się istotnie (45).

W badaniu na modelu zwierzęcym przeprowadzonym przez Nicol i wsp. wykazano, że ciężarne myszy z niedoborem dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej, która jest enzymem odpowiedzialnym m.in. za utrzymywanie wewnątrzkomórkowej biodostępności GSH, miały

wyższy stopień oksydacji DNA oraz odsetek zgonów wewnątrzmacicznych i poporodowych (166). Wyniki zbliżone do moich przedstawili w swojej pracy Issa i wsp., którzy analizowali stężenia GSH i MDA u ciężarnych w pierwszej połowie ciąży porównując grupę kobiet suplementujących i niesuplementujących preparaty żelaza. We wspomnianym badaniu pacjentki przyjmujące żelazo, które poroniły miały istotnie niższe poziomy GSH a wyższe MDA w surowicy w porównaniu do kobiet zażywających Fe, które donosiły ciążę (169). Vural i wsp. donoszą o niższej aktywności GSH w erytrocytach u pacjentek z nawracającymi utratami ciąży, co ich zdaniem jest bezpośrednim dowodem na zwiększony stres oksydacyjny w tej grupie kobiet (132). Obniżone stężenie GSH w surowicy krwi w ciążach powikłanych preeklampsją i cukrzycą opisali Kharb i wsp. Ich zdaniem świadczy to o obniżonych zdolnościach antyoksydacyjnych lub zmniejszonej detoksykacji zależnej od glutationu w ciążach obciążonych tymi powikłaniami (165).

W świetle przedstawionych wyników badań i wyniku uzyskanego przeze mnie można podejrzewać istnienie związku pomiędzy obniżeniem stężenia glutationu a nieprawidłowościami procesu placentacji mogącymi skutkować poronieniem ciąży czy też rozwojem preeklampsji.

6.5.4. Reduktaza glutationowa (GR)

Badań i publikacji na temat aktywności reduktazy glutationowej w ciąży jest niewiele. Oceny stężenia tego enzymu w trakcie ciąży podjął się Patil i wsp., wykazując, że jest ono niższe w ciąży niż u kobiet nieciężarnych oraz, że wraz z czasem trwania ciąży aktywność GR spada (148).

W bazie Pub Med nie znalazłam publikacji dotyczącej badania aktywności reduktazy glutationowej u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych lub poronieniem. Dostępne, nieliczne prace o zbliżonej tematyce dotyczą oceny stężeń GR u pacjentek z poronieniami nawracającymi. Ghneim i wsp. wykazali obniżenie poziomu tego enzymu w osoczu oraz łożyskach kobiet z nawracającymi utratami ciąży, przy jednoczesnym obniżeniu stężenia GSH i wzroście GSSG (172). Także Al-Sheikh i wsp. donoszą o znacznie niższym stężeniu GR w osoczu oraz niższej ekspresji mRNA genu kodującego GR w łożyskach kobiet z poronieniami nawracającymi. Zdaniem Autorów stanowi to dowód na działanie stresu oksydacyjnego, którego efektem jest hamowanie syntezy reduktazy glutationowej (173). Zaobserwowano także obniżenie aktywności GR w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym i rzucawką (171).

W moim badaniu stężenie GR nie różniło się pomiędzy grupą badaną a kontrolną, natomiast u pacjentek, które poroniły było niższe niż u tych, które urodziły dzieci (mediana 43,5 vs 81,0). Uzyskany wynik, zbieżny z doniesieniami Autorów zajmujących się GR w kontekście poronień nawracających (172,173), w połączeniu z wykazaniem przeze mnie niższym poziomem GSH u pacjentek z poronieniem świadczy o istotnych zmianach w układzie antyoksydacyjnym zależnym od glutationu u pacjentek, które poroniły.

6.5.5. Całkowity status antyoksydacyjny (TAS)

Oznaczenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego dostarcza informacji o ilościowej aktywności substancji o działaniu przeciwutleniającym w badanym materiale. Całkowity status antyoksydacyjny odzwierciedla zdolność obrony organizmu przed reaktywnymi formami tlenu oraz, w sposób pośredni, informuje o poziomie stresu oksydacyjnego.

Wykazano, że czasie ciąży TAS jest najwyższy w 1. trymestrze i wraz z jej trwaniem maleje, mimo, iż wzrasta poziom peroksydacji lipidów (48).

W moim badaniu uzyskane wyniki TAS były bardzo zbliżone, zarówno między grupą kontrolną i badaną, jak i w grupach poronienie i poród. Deveer i wsp. przeanalizowali wpływ krwawienia z dróg rodnych w pierwszych 10 tygodniach ciąży na całkowity potencjał antyoksydacyjny (mierzony podobną do TAS metodą TAC – total antioxidant capacity) i całkowity status oksydacyjny (TOS - total oxidative status). W Ich badaniu całkowity potencjał antyoksydacyjny był istotnie niższy przy wyższym TOS u kobiet z poronieniem zagrażającym (176). Analogiczną do użytej w moim badaniu metodykę oceny TAS zastosowali Omeljaniuk i Łagód wraz ze współnikami. Obie publikacje donoszą o obniżonym poziomie TAS w poronieniu (160,174).

Odwrotne wnioski wynikają z badania Grujića i wsp., w którym pacjentki z poronieniem spontanicznym w 1. trymestrze ciąży miały wyższe stężenia TAS w porównaniu do zdrowych ciężarnych, przy jednocześnie wyższym poziomie peroksydacji lipidów (175).

Autorzy, którzy wykazali obniżenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek z krwawieniem i poronieniem twierdzą, że jest to dowód na działanie stresu oksydacyjnego, w wyniku którego wyczerpują się mechanizmy antyoksydacyjne.

Jakie wnioski wyciągnąć można na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników oraz doniesień Grujića i wsp. o wyższym TAS u pacjentek, które poroniły? W mojej ocenie, poziomy TAS mogą ulegać istotnym zmianom w czasie, co być może jest kwestią zmienną osobniczo oraz zależną od nasilenia reakcji utleniania i czasu trwania stresu oksydacyjnego.

Być może początkowo, w warunkach zaburzenia homeostazy w kierunku prooksydacyjnym dochodzi do dużej mobilizacji antyoksydacyjnej, znajdującej odzwierciedlenie we wzroście TAS, następnie wraz z wyczerpywaniem się mechanizmów przeciwutleniających następuje faza plateau i spadek kiedy organizm przestaje nadążać z procesami produkcji i odzyskiwania antyoksydantów. W związku z tą hipotezą, ciekawym i wnoszącym nową wiedzę badaniem byłaby ocena kilku, przeprowadzonych w określonym odstępie czasowym, pomiarów TAS, u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży.

6.6. Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka – VEGF

Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka jest specyficznym dla śródbłónka białkiem pełniącym rolę modulatora waskulogenezy i angiogenezy. Obecność VEGF jest konieczna dla powstania prawidłowego łożyska oraz rozwoju krążenia maczyno-płodowego (185,186). W procesie placentacji VEGF pełni istotną rolę w proliferacji, inwazji trofoblastu oraz remodelingu tętnic spiralnych (185, 186).

Spośród powikłań położniczych, najlepiej udowodniony jest związek pomiędzy zaburzeniami funkcji VEGF, PlGF i ich receptorów a rozwojem preeklampsji. W 2003 roku Maynard i wsp. przedstawili wyniki badań na modelu zwierzęcym potwierdzające hipotezę, że sFlt-1, poprzez inhibicję VEGF-A i PlGF, wywołuje objawy stanu przedrzucawkowego (132). Obecnie niektórzy badacze są przekonani, że sFlt-1, VEGF-A i PlGF mają wystarczająco silną wartość predykcyjną, aby uznać je za markery preeklampsji o wczesnym początku (ang. *early-onset preeclampsia*) (94,186). Powyższe doniesienia stanowią inspirację do badań nad znaczeniem rodziny VEGF w innych powikłaniach ciąży związanych z nieprawidłową placentacją, w tym w poronieniach (181,186).

Muttukrishna i wsp. porównali stężenia sFlt-1 i PlGF w surowicy pacjentek niebędących w ciąży, zdrowych ciężarnych oraz ciężarnych z poronieniem zagrażającym (TM). Wykazali, że w prawidłowej, wczesnej ciąży (6-10 tydzień) stężenia sFlt-1 oraz PlGF wykazują tendencję wzrostową. Połowa pacjentek z TM włączonych do badania poroniła, a połowa donosiła ciążę. Kobiety, u których doszło do poronienia miały znacząco niższe poziomy sFlt-1 i PlGF w surowicy krwi, natomiast u pacjentek z TM, które donosiły ciążę stężenia tych substancji były zbliżone do grupy zdrowych ciężarnych. Na podstawie tej obserwacji Muttukrishna i wsp. twierdzą, że sFlt-1 i PlGF stanowią potencjalne markery biochemiczne poronienia u kobiet z objawami TM. Zdaniem Autorów, obniżenie PlGF jest prawdopodobnie efektem upośledzonej funkcji trofoblastu, zaś niższe stężenia sFlt-1 mogą być reakcją na

zwiększone wydzielanie VEGF przez łożysko lub wręcz przeciwnie – jego mniejszą sekrecję, wynikającą z nieprawidłowego funkcjonowania trofoblastu (181).

Wyniki badania Muttukrishny i wsp. sugerują, że sam fakt krwawienia podkosmówkowego nie wpływa na zmianę aktywności VEGF, zmiana ta jest jednak uchwytana w przypadku poronienia. Może to oznaczać, że nie są one wywołane krwawieniem, ale istniały wcześniej i leżą u podłoża utraty ciąży. Zwiększenie aktywności sFlt-1 u kobiet z preeklampsją a obniżenie w poronieniu sugeruje odmienności w mechanizmie rozwoju tych powikłań.

W moim badaniu pacjentki, które poroniły miały istotnie niższe stężenia VEGF niż te, których ciąża zakończyła się porodem. Aktywność VEGF w grupie z TM i bezobjawowych ciężarnych była natomiast zbliżona. Uzyskany wynik potwierdza hipotezę Muttukrishny i wsp. o zmniejszonej produkcji VEGF przez nieprawidłowo funkcjonujący trofoblast u roniących kobiet, świadczy też o tym, że możliwą przyczyną tych poronień była upośledzona angiogeneza. Analizy aktywności VEGF i jego receptorów w doczesnej i łożysku ciężarnych z wywiadem nawracających poronień dokonali Vuorela i wsp. U pacjentek, które ponownie poroniły ciążę zaobserwowano zmniejszoną immunoreaktywność VEGF w trofoblaście i zmniejszoną immunoreaktywność receptorów sFlt-1 i KDR w śródbłonku doczesnej (178). Istotnie niższe poziomy VEGF w surowicy krwi u pacjentek z nawracającymi poronieniami opisał Almawi i wsp. (179). Col-Madendag i wsp. wykazali, że u pacjentek, które zgłosiły się do szpitala z poronieniem (zarówno spontanicznym jak i zatrzymanym) aktywność VEGF w trofoblaście jest niższa w porównaniu z kosmówką zdrowych ciąż terminowanych z powodów psychosocjalnych (180).

Jeśli proces powstawania łożyska jest upośledzony, wydziela ono do krążenia matczynego zmienione ilości VEGF i PlGF (184). Krwawienie podkosmówkowe, które stanowi hipotetyczny objaw nieprawidłowej placentacji, działa destrukcyjnie na kosmki trofoblastu. Efektem tego uszkodzenia może być postępujące obniżanie produkcji i wydzielania czynników z rodziny VEGF, przekładające się na ich coraz niższe stężenia w surowicy krwi (181,206). Zdaniem Wijesiriwardany i wsp. główną przyczyną tych zjawisk jest przedwczesny kontakt syncytiotrofoblastu z krwią matczyną, skutkujący lokalnym stresem oksydacyjnym (206). Muttukrishna i wsp. w swojej publikacji zwracają uwagę na związek pomiędzy zmniejszoną aktywnością sFlt-1 w surowicy a podwyższeniem stężenia tlenu w trofoblaście u pacjentek roniących ciążę (181). Singh i wsp. twierdzą, że bez wątpliwości zwiększenie ciśnienia parcjalnego tlenu w trofoblaście wpływa na lokalną sekrecję czynników wzrostu (183).

Pamiętając, iż krwawienie podkosmówkowe nie zawsze objawia się krwawieniem z dróg rodnych, w kontekście powyższych doniesień ciekawym badaniem byłaby ocena VEGF u pacjentek z bezobjawowym krwiakiem podkosmówkowym. Pracę o zbliżonej tematyce opublikowali Singh i wsp., donosząc o istotnie obniżonym stężeniu VEGF u kobiet z poronieniem zagrażającym, które miały krwiaka podkosmówkowego w porównaniu z tymi z TM i bez krwiaka (183).

Izoforma typu B naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka wykazuje działanie antyoksydacyjne poprzez regulację w górę (ang. *up-regulation*) ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę antyoksydantów (m.in. GPx i SOD) oraz regulację w dół (ang. *down-regulation*) ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój warunków stresu oksydacyjnego (102). Nie znalazłam jednak w bazie Pub Med publikacji, która przedstawiałaby wyniki badania aktywności VEGF-B u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych czy z poronieniem. Może to wynikać z faktu, iż doniesienia o działaniu antyoksydacyjnym VEGF-B są stosunkowo nowe i nie opracowano jeszcze godnej zaufania metody oznaczania tej izoformy naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników oraz przedstawionych doniesień innych Autorów można dopatrzeć się istotnego związku między działaniem czynników z rodziny VEGF a poronieniem.

6.7. Analiza zależności między obecnością i rozmiarami krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym a wystąpieniem poronienia, a jeśli do poronienia nie doszło – na rozwój powikłań perinatalnych, czas i sposób zakończenia ciąży oraz stan noworodka oraz zależności między lokalizacją krwiaka a poronieniem ciąży

Krwiaki podkosmówkowe (SCH) są dość często diagnozowane w badaniu ultrasonograficznym, szczególnie w pierwszym trymestrze ciąży. Mogą występować zarówno u pacjentek bezobjawowych, jak i u kobiet z poronieniem zagrażającym. Z dostępnej literatury wiadomo, że SCH powstaje w następstwie oddzielenia się trofoblastu od doczesnej i akumulacji krwi w tej okolicy. Prawdopodobnie oddzielanie się wspomnianych struktur jest spowodowane krwawieniem w tej okolicy, którego przyczyna nie jest poznana. Najczęściej wymienianymi potencjalnymi przyczynami są upośledzona inwazja trofoblastu, nieprawidłowa angiogeneza oraz reakcja zapalna w doczesnej (45,187,196). Nieprawidłowa,

płytką inwazją oraz zaburzona angiogeneza rozwijającego się trofoblastu skutkują powstaniem naczyń o kruchej, podatnej na uszkodzenia ścianie, co może predysponować do powstania krwaka, krwawienia z dróg rodnych i poronienia. O nieprawidłowościach procesu powstawania naczyń w trofoblaście może świadczyć odkryte przez Singha i wsp. niższe stężenie VEGF u pacjentek z poronieniem zagrażającym, u których zdiagnozowano krwaka podkosmówkowego (183).

Samo powstanie SCH prowadzi do osłabienia połączenia jaja płodowego z macicą oraz ograniczenia powierzchni wymiany matczyno-płodowej. Ponadto, kontakt z wynaczynioną, utlenowaną krwią uszkadza kosmki trofoblastu w dwojaki sposób - mechanicznie przez tworzące się między nimi skrzepy oraz na drodze stresu oksydacyjnego (37,45,46,183). Co więcej, w obrębie SCH dochodzi do kolonizacji bakteryjnej, co skutkuje zapaleniem (56). Przewlekła reakcja zapalna rozwijająca się na podłożu krwaka może prowadzić do osłabienia błon płodowych oraz przedwczesnej aktywności skurczowej macicy (181).

Pomimo, że większość krwaków podkosmówkowych ulega samoistnej resorpcji, według wielu Autorów ich wystąpienie może wiązać się ze zwiększeniem ryzyka powikłań w późniejszej ciąży (37,45,181,183). Zdaniem niektórych badaczy SCH, jako objaw nieprawidłowej placentacji koreluje z pojawieniem się w późniejszej ciąży powikłań związanych z niewydolnością łożyska, takich jak ograniczenie wzrastania płodu, preeklampsja, przedwczesne oddzielenie łożyska, PPRM, poród przedwczesny (37,52,122). Inni Autorzy sugerują, że wynaczynienie krwi skutkujące powstaniem SCH nie jest objawem, a przyczyną uszkodzenia trofoblastu w mechanizmie stresu oksydacyjnego i reakcji zapalnej (45,191).

Badacze są raczej zgodni, że obecność SCH zwiększa ryzyko poronienia, jednak nadal, mimo wielu badań, jego znaczenie prognostyczne pozostaje kwestią dyskusyjną, szczególnie w kontekście rozwoju powikłań perinatalnych, wpływu na poród, stan noworodka oraz u pacjentek bezobjawowych (37,58,187,188).

5.7.1. Wpływ obecności krwaka podkosmówkowego na czas trwania ciąży oraz wystąpienie poronienia i powikłań perinatalnych

W moim badaniu zwraca uwagę duża częstość SCH w grupie badanej, która wyniosła 71,4 %. W grupie kontrolnej SCH wykryto u 5,1% pacjentek. Aktualnie używane aparaty ultrasonograficzne mają coraz lepsze parametry, co umożliwia dokładniejsze uwidocznienie

struktur znajdujących się w jamie macicy niż 10, 20 czy 30 lat temu. Bardziej szczegółowa wizualizacja kosmówki i łożyska niewątpliwie wpływa na większą częstość rozpoznawania SCH.

Wielu Autorów podkreśla, że ocena znaczenia obecności krwaka podkosmówkowego dla przebiegu ciąży jest trudna z uwagi na fakt, że SCH często współwystępuje z krwawieniem z dróg rodnych, które *per se* jest uważane za czynnik ryzyka poronienia i, potencjalnie, powikłań w ciąży. Z uwagi na to oraz na fakt, że w grupie kontrolnej tylko kilka kobiet miało SCH, w mojej pracy skupiłam się na analizie wartości prognostycznej krwaka podkosmówkowego wyłącznie u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych.

W moim badaniu SCH był obecny u wszystkich pacjentek, które poroniły. Spośród pacjentek z objawami zagrażającego poronienia i krwakiem podkosmówkowym poroniło 23,3%, zaś z grupy krwawiących ciężarnych bez krwaka – żadna. Z mojego badania wynika, że obecność krwaka istotnie wpływa na ryzyko poronienia u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Wynik ten jest odmienny od uzyskanego przez Pedersena i Mantoniego, którzy analizując znaczenie prognostyczne SCH u ciężarnych z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie zaobserwowali zwiększonej częstości poronienia (189).

Również Johns i wsp., po przeprowadzeniu analizy retrospektywnej w grupie 144 pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w 1. trymestrze ciąży i 144 zdrowych ciężarnych donoszą o braku znaczenia obecności SCH w kontekście poronienia (38). Badanie przeprowadzone przez Tower i wsp. w grupie kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży oraz wywiadem nawracających poronień także nie wykazało wpływu krwaka podkosmówkowego na częstość poronienia (192).

W przeprowadzonym badaniu ciążę pacjentek z krwawieniem macicznym, które miały krwaka podkosmówkowego trwały istotnie krócej - średnio 32 tygodnie, a u kobiet z poronieniem zagrażającym bez SCH – 39 tygodni. Nie zaobserwowałam natomiast zależności pomiędzy zdiagnozowaniem krwaka podkosmówkowego a wystąpieniem powikłań perinatalnych w postaci NIC, preeklampsji, PPRM czy przedwczesnego oddzielenia łożyska. Należy jednak zaznaczyć, że taki wynik może wynikać z faktu, iż powikłania te wystąpiły u niewielkiej liczby pacjentek. W pracy opublikowanej przez Johns i wsp. częstość krwaka podkosmówkowego u kobiet z zagrażającym poronieniem sięgnęła 39,5% i, analogicznie jak w mojej pracy, nie zaobserwowano wpływu obecności SCH na wystąpienie powikłań takich jak NIC, ograniczenie wzrastania płodu, PPRM, przedwczesne oddzielenie łożyska, poród przedwczesny (38). Także Tower i wsp. nie wykazali w swoich badaniach

związku pomiędzy diagnozą krwaka podkosmówkowego a wystąpieniem NIC, preeklampsji, FGR i porodu przedwczesnego (192).

Większość Autorów uważa jednak, że rozpoznanie SCH zwiększa ryzyko poronienia oraz w różnym stopniu wpływa na rozwój wymienionych wyżej powikłań w późniejszej ciąży (33-37,52,58,182,183,194).

Tuuli i wsp., na podstawie dużej metaanalizy, donoszą o większym ryzyku utraty ciąży (wczesnej i późnej), PPRM i przedwczesnego oddzielenia łożyska u kobiet z SCH. Odmienność tego badania od mojego polega jednak na tym, że Tuuli i wsp. w swojej pracy porównuje grupę pacjentek z SCH i grupę bez SCH, nie biorąc pod uwagę występowania u nich objawów poronienia zagrażającego (37). Częstsze poronienia i porody przedwczesne, a także wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania, NIC, preeklampsję i przedwczesne oddzielenie łożyska u pacjentek z SCH zaobserwowali Nagy i wsp. Autorzy na podstawie wyników swoich badań uważają, że obecność SCH jest czynnikiem ryzyka nieprawidłowego przebiegu ciąży (52). Diagnozę poronienia zagrażającego wzięli pod uwagę w swoich analizach Bennet i wsp. oraz Janowicz-Grelewska i wsp., którzy donoszą o zwiększeniu ryzyka poronienia u pacjentek z SCH oraz krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży (58,33).

Bardzo podobne do mojego badanie przeprowadzili Sukur i wsp., którzy przeanalizowali wpływ SCH na poronienie i czas trwania ciąży u 242 pacjentek z poronieniem zagrażającym. Poronienie w grupie z krwakiem podkosmówkowym było częstsze (29,5% vs 12,5%), natomiast nie zaobserwowano wpływu SCH na czas trwania ciąży pacjentek, które nie poroniły (187). Borlum i wsp., analizując wpływ diagnozy krwaka podkosmówkowego na poronienie u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych zwrócili uwagę na istotnie zwiększoną częstość poronienia w grupie z SCH (22,1% vs 8%) oraz fakt, że zdiagnozowanie krwaka w drugim trymestrze ciąży wiąże się z większym ryzykiem porodu przedwczesnego. Zdaniem Autorów cięższe powikłane SCH powinny być uznawane za cięższe wysokiego ryzyka (194)

Należy zaznaczyć, że według dostępnej wiedzy zarówno krwaki podkosmówkowy, jak i poronienie zagrażające mogą wpływać na pojawienie się powikłań w późniejszej ciąży. Rozpoznanie te często współistnieją, kilku badaczy podjęło w związku z tym próbę analizy, która z patologii ma większy wpływ na przebieg ciąży. Johns i wsp. donoszą o dwukrotnie wyższym ryzyku poronienia w przypadku wystąpienia krwawienia z dróg rodnych oraz braku wpływu SCH na poronienie ciąży i wystąpienie powikłań położniczych. Zdaniem Autorów, wyniki te dowodzą nieporównywalnie większego znaczenia prognostycznego krwawienia z

dróg rodnych niż krwaka podkosmówkowego (38). Odwrotne stwierdzenie pada w pracy Nagy'ego i wsp., w którego badaniu obecność objawów poronienia zagrażającego nie miała wpływu na rezultat położniczy, w przeciwieństwie do diagnozy SCH (52). W mojej ocenie, największego i najlepiej skonstruowanego pod względem doboru grup badania w tym aspekcie podjęli się Ball i wsp. Przeanalizowali retrospektywnie ponad 24 tysiące przypadków, które podzielili na 3 grupy – kobiety z poronieniem zagrażającym i SCH, kobiety z SCH bez krwawienia z dróg rodnych oraz zdrowe ciężarne. Ryzyko poronienia w grupach pacjentek z TM i SCH a pacjentkami z izolowanym SCH było zbliżone (odpowiednio 7% i 5%), natomiast w grupie z izolowanym SCH odnotowano wyższy odsetek przedwczesnego oddzielenia łożyska, przedwczesnego porodu oraz martwych urodzeń (191).

Na podstawie mojego badania nie mogę ocenić, które z rozpoznań – poronienie zagrażające czy krwaka podkosmówkowy mają większy wpływ na czas trwania ciąży czy wystąpienie powikłań, ponieważ analizowałam znaczenie SCH tylko w grupie pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych. Obie diagnozy istotnie wpłynęły na czas trwania ciąży – sam fakt krwawienia skrócił czas ciąży z 37 do 34 tygodni (średnia w grupie kontrolnej vs w grupie badanej), zaś obecność krwaka podkosmówkowego u pacjentek z TM z 39 do 32 tygodni.

5.7.2. Wpływ obecności krwaka podkosmówkowego na sposób ukończenia ciąży

W moim badaniu wystąpienie poronienia zagrażającego wiązało się ze zwiększeniem odsetka cięć cesarskich. Nie zaobserwowałam natomiast różnic w sposobie zakończenia ciąży pomiędzy krwawiącymi pacjentkami z krwakiem podkosmówkowym i bez krwaka. Wyniki te są zbieżne z analizą przeprowadzoną w grupie ponad dwustu pacjentek z poronieniem zagrażającym przez Sukura i wsp., którzy donoszą o zbliżonej częstości cięcia cesarskiego w grupie z krwakiem i bez krwaka podkosmówkowego (187).

Z kolei Janowicz-Grelewska i wsp. oraz Fekete donoszą o zwiększonym odsetku cięć cesarskich u kobiet z krwawieniem z dróg rodnych, u których wykryto SCH (33,34). Nagy wykazał 1,4-krotnie zwiększone ryzyko cięcia cesarskiego u pacjentek z krwakiem podkosmówkowym, niezależnie od faktu wystąpienia objawów zagrażającego poronienia (52).

Ukończenie ciąży cięciem cesarskim jest uzależnione od wystąpienia wskazań do tej operacji. Niewątpliwie, powikłania uznane za związane z nieprawidłową placentacją

(ograniczenie wzrastania płodu, NIC, preeklampsja, przedwczesne oddzielenie łożyska) zwiększają ryzyko wystąpienia wskazań do porodu operacyjnego drogą brzuszną, zarówno elektywnego, jak i pilnego. Można zatem podejrzewać, że izolowana obecność krwiaka podkosmówkowego, który w zdecydowanej większości przypadków ulega rezolucji w 1. lub 2. trymestrze ciąży, nie wpływa bezpośrednio na częstość cięć cesarskich. Na operacyjną drogę porodu wpływać może natomiast fakt nieprawidłowego funkcjonowania łożyska, manifestujący się wystąpieniem wymienionych wyżej powikłań. Nadal jednak nie jest jednoznaczne, czy krwawienie z dróg rodnych oraz krwiak podkosmówkowy są przyczyną czy też objawem nieprawidłowości procesu powstawania i funkcjonowania łożyska.

W mojej ocenie, dokładne poznanie procesów i możliwych nieprawidłowości zachodzących podczas tworzenia się trofoblastu oraz zaznajomienie się z uszkodzeniami wywołanymi potencjalnym wpływem stresu oksydacyjnego, pozwala na wysunięcie hipotezy, że obie te patologie mogą, w różnym stopniu, stanowić zarówno przyczynę, jak i skutek nieprawidłowej placentacji.

5.7.3. Wpływ obecności krwiaka na stan noworodka

W moim badaniu nie wykazałam wpływu obecności SCH na masę urodzeniową i stan noworodka po porodzie, co może wynikać między innymi ze zbliżonej częstości powikłań perinatalnych. Nie oceniłam wpływu na zachorowalność noworodków z uwagi na zbyt małą grupę chorych dzieci.

Uzyskane wyniki są zbieżne z opublikowanymi przez Sukura i wsp., którzy donoszą o braku wpływu obecności SCH u pacjentek z krwawieniem macicznym na masę noworodka (187). Tuuli i wsp. również nie zaobserwowali różnic w masie urodzeniowej dzieci matek z krwiakiem podkosmówkowym w stosunku do grupy kontrolnej (37). W badaniu Balla i wsp. obecność krwiaka podkosmówkowego u kobiet z krwawieniem z dróg rodnych korelowała z mniejszą masą urodzeniową, co nie miało wpływu na śmiertelność noworodków (191). Nagy i wsp., porównując stan zdrowia płodów i noworodków pacjentek z SCH i zdrowych ciężarnych zaobserwowali zwiększony odsetek wystąpienia stanu zagrożenia płodu podczas porodu i ponad 5-krotnie częstsze hospitalizacje w Oddziale Intensywnej Terapii Noworodka dzieci matek z SCH, przy zbliżonej śmiertelności w obu grupach (52).

5.7.4. Znaczenie rozmiarów krwiaka podkosmówkowego w kontekście wystąpienia poronienia, powikłań perinatalnych oraz wpływ na masę noworodka

Opublikowane w bazie Pub Med prace na temat znaczenia klinicznego i prognostycznego rozmiarów krwiaka podkosmówkowego przedstawiają różnorodne wnioski. Kilku Autorów podjęło próbę zbadania wpływu wielkości SCH na przebieg ciąży i rezultat położniczy (52,189,193). Pomimo, iż można by uznać za logiczne, że większe krwaki, prowadząc do większego ograniczenia i uszkodzenia powierzchni wymiany między matką a płodem, częściej powodują poronienie i powikłania perinatalne, wyniki większości badań wskazują na brak związku pomiędzy rozmiarami krwiaka a rozwojem powikłań w ciąży czy stanem noworodka (193,194).

W moim badaniu nie wykazałam zależności pomiędzy wymiarami (długością, szerokością i wysokością) krwiaka podkosmówkowego a wystąpieniem poronienia. Natomiast po obliczeniu objętości SCH zaobserwowałam, że wraz z jej wzrostem częstość poronienia ciąży rośnie. W celu obliczenia objętości krwiaka użyłam wzoru zaproponowanego przez Campbella (195). Polega on na pomnożeniu maksymalnej długości, szerokości i wysokości SCH oraz stałej 0,52. Jest to tzw. formuła elipsoidalna, pozwalająca na skorygowanie błędu pomiaru wynikającego z różnorodności kształtu krwaków, stosowana także w pomiarach objętości jajnika i jego zmian.

Uzyskane przeze mnie wyniki mogę porównać z opublikowanymi przez Nagy'ego i wsp., którzy opisują brak wpływu wymiarów, ale także objętości krwiaka na utratę ciąży (52). Ben-Haroush i wsp. oraz Gupta także nie zaobserwowali związku pomiędzy wymiarami krwiaka a wystąpieniem poronienia (14,193). Stabile i wsp., którzy w swoim badaniu również przyjęli wzór na objętość krwiaka zaproponowany przez Campbella, nie wykazując związku pomiędzy jego objętością a poronieniem, twierdzą, że małe krwaki podkosmówkowe nie mają wpływu na prognozę przebiegu ciąży u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Należy jednak zauważyć, że w badaniu Stabile'a i wsp., przeprowadzonym na grupie ponad 400 kobiet z zagrażającym poronieniem, tylko 22 miało SCH i największy z krwaków miał 16 mL objętości (wartość odcięcia, którą Autorzy przyjęli dla uznania SCH za krwiaka małego rozmiaru). Ponadto, w tym badaniu żadna pacjentka z krwakiem nie poroniła (56). W moim badaniu średnia objętość krwiaka u pacjentek, które poroniły wyniosła 24,4 (+/- 33,1) mL.

Bennet i Ball wraz ze współnikami donoszą w swoich pracach o zwiększeniu ryzyka poronienia wraz ze wzrostem wymiarów krwaka podkosmówkowego (58,191). Odminną metodologię przyjęli w swoim badaniu Leite i wsp., którzy oceniali stosunek objętości SCH do objętości pęcherzyka ciążowego. Autorka i wsp. na tej podstawie wykazali, że krwaki stanowiące 50% i więcej objętości GS zwiększają ryzyko poronienia i przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Badanie to było jednak przeprowadzone na bardzo małej grupie pacjentek (n=24), ponadto nie podają oni w swojej pracy, w jaki sposób oceniano stosunek objętości krwaka do objętości pęcherzyka ciążowego – czy była to subiektywna ocena wzrokowa wykonującego USG, czy wykonywano pomiary i obliczenia (57).

W mojej pracy nie zaobserwowałam wpływu wymiarów krwaka na wystąpienie PPRM, pozostałe powikłania wystąpiły u moich pacjentek zbyt rzadko, by móc wykonać obliczenia statystyczne. Nie zaobserwowałam także różnic w stanie zdrowia noworodka pomiędzy grupą z SCH i bez SCH. Moje wyniki mogę porównać z niewieloma doniesieniami, gdyż większość badań skupia się na wpływie samej obecności SCH na powikłania położnicze, a nie jego rozmiarów. Jedyną taką pracą jest publikacja Nagy'ego i wsp., którzy donoszą o braku wpływu wymiarów krwaka podkosmówkowego na powikłania położnicze (52).

Ciekawym uzyskanym wynikiem jest ujemna korelacja pomiędzy dwoma z trzech badanych wymiarów krwaka (długością i wysokością) a masą urodzeniową noworodka. Może on wynikać z krótszego czasu trwania ciąży pacjentek z SCH, należy jednak zauważyć, że masy urodzeniowe dzieci pacjentek z krwakiem i bez krwaka podkosmówkowego były zbliżone (mediana dla grupy z SCH wyniosła 3300 g, zaś dla grupy bez SCH 3520 g, $p=0,1348$). Nie mogę porównać tego wyniku z innymi badaniami, ponieważ w bazie Pub Med nie ma takiej publikacji. Większość Autorów oceniała znaczenie wymiarów SCH w kontekście ryzyka poronienia. Ocena zależności pomiędzy masą noworodka i krwakiem podkosmówkowym była do tej pory badana jedynie w aspekcie obecności SCH, a nie jego wymiarów. Taką analizę opublikowali Nagy i wsp., wykazując istotną statystycznie różnicę w masie urodzeniowej pomiędzy dziećmi matek z SCH i bez SCH (odpowiednio 3272 g $\pm$ 769 g i 3740 g $\pm$ 528 g) (52).

5.7.5. Znaczenie lokalizacji krwaka podkosmówkowego w kontekście poronienia

Wpływ lokalizacji, tak samo jak rozmiarów krwiaka podkosmówkowego na poronienie i rezultat położniczy pozostaje kontrowersyjny.

W mojej pracy przyjąłem podział lokalizacji krwiaka na ścianę przednią, ścianę tylną, dno macicy oraz okolicę nad ujściem wewnętrznym kanału szyjki macicy (nadszyjkową). Wykazałam, że lokalizacja ma wpływ na częstość poronienia. W moim badaniu najwięcej pacjentek, które poroniły miało krwiaka w dnie i na ścianie tylnej macicy. Z kolei u kobiet, które nie poroniły SCH najczęściej był opisywany w okolicy nad ujściem wewnętrznym kanału szyjki. Różnice te były istotne statystycznie.

W wynikach opublikowanych przez Nagy'ego i wsp., którzy przyjęli analogiczny podział lokalizacji, najniższą częstość poronienia opisano również przy lokalizacji nadszyjkowej, natomiast najwyższą przy umiejscowieniu krwiaka na tylnej ścianie macicy (52). Nagy i wsp. zastosowali dodatkowo podział zależny od pozycji krwiaka względem łożyska – na krwiaka podkosmówkowego (pomiędzy błonami płodowymi a ścianą macicy) i założyskowego (pomiędzy łożyskiem a ścianą macicy). Autorzy zwracają uwagę, że dokonanie takiego podziału może być trudne i mylące we wczesnej ciąży. Częstość poronienia w grupie z krwakiem podkosmówkowym i założyskowym była zbliżona, natomiast krwiak założyskowy wiązał się z większym ryzykiem powikłań perinatalnych (preeklampsji, FGR i porodu przedwczesnego) oraz wystąpienia stanu zagrożenia płodu podczas porodu i konieczności przyjęcia noworodka do OIT (52).

Leite i wsp., którzy w swoim badaniu uwzględnili lokalizację (na ścianie przedniej i tylnej, w dnie macicy i nadszyjkowo) oraz pozycję (podkosmówkowy i założyskowy) wykazali brak wpływu obu tych zmiennych na poronienie i rezultat położniczy (57). Analogicznych podziałów dokonał w swoich oznaczeniach Gupta, również nie obserwując korelacji między lokalizacją SCH a rezultatem położniczym (193).

Korzyści z lokalizacji nadszyjkowej krwiaka, która okazała się najmniej groźna dla ciąży w obserwacjach moich oraz Nagy'ego, wynikają prawdopodobnie z możliwości łatwej ewakuacji krwi przez kanał szyjki macicy, bez postępującego oddzielania kosmówki i błon płodowych od doczesnej. Rozważając znaczenie lokalizacji krwiaka podkosmówkowego i łożyska nie można nie wspomnieć, że u każdej pacjentki lokalizacja samego łożyska może być odmienna – fizjologicznie może ono znajdować się na ścianie przedniej, tylnej i w dnie macicy, patologicznie - pokrywać ujście wewnętrzne szyjki (łożysko przodujące). Co więcej, wraz z trwaniem ciąży opisywana lokalizacja łożyska może się zmienić z uwagi na powiększanie się macicy. Dużą dokładność miałyby ocena lokalizacji krwiaka w stosunku do miejsca implantacji zarodka, czyli tam, gdzie rozpoczyna się proces powstawania trofoblastu.

Takie badanie byłoby jednak bardzo trudne do wykonania z uwagi na konieczność oceny ultrasonograficznej w bardzo wczesnej ciąży i późniejszych licznych kontroli. Nie znalazłam w bazie Pub Med takiej publikacji. Biorąc pod uwagę fakt, że we wczesnej ciąży kosmówka wypełnia całą jamę macicy lub znajduje się zarówno na ścianie przedniej, tylnej jak i w dnie, postanowiłam zastosować w moim badaniu standardowy opis lokalizacji krwaka.

Uważam, że uzyskane przeze mnie wyniki świadczą o tym, że w ocenie ultrasonograficznej ciąży warto zwracać uwagę na obecność, lokalizację i wymiary SCH oraz zachęcają do wykonania dalszych, optymalnie prospektywnych badań na dużych, odpowiednio dobranych grupach pacjentek. Badania takie pomogłyby przybliżyć znaczenie prognostyczne nie tylko obecności krwaka podkosmówkowego, na temat której mamy już dość dużą wiedzę, ale także oceny jego wielkości i lokalizacji.

7. Wnioski

1. Stres oksydacyjny nie jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za poronienie zagrażające w grupie ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Stężenia malondialdehydu, glutationu, reduktazy glutationu, peroksydazy glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka oraz całkowity status antyoksydacyjny u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie ulegają istotnej zmianie.
2. W przypadku poronienia w grupie kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży stężenie glutationu, reduktazy glutationu oraz malondialdehydu w surowicy krwi jest niższe.
3. Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie wiąże się ze zmianą stężenia naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka w surowicy krwi.
Obniżone stężenie VEGF w surowicy krwi u kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży wiąże się ze wzrostem częstości poronienia.
4. Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie wpływa istotnie na zwiększenie częstości poronienia, ale skraca czas trwania ciąży.
Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży wpływa na zwiększenie odsetka cięć cesarskich oraz krwotoków okołoporodowych.
5. Obecność krwiaka podkosmówkowego (SCH) u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży zwiększa częstość poronienia i skraca czas trwania ciąży.
6. Obecność krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie zwiększa odsetka porodów operacyjnych ani nie wpływa na masę, stan po porodzie i zachorowalność noworodka.
7. Objętość i lokalizacja krwiaka podkosmówkowego wpływają istotnie na częstość poronienia. Im większa objętość SCH tym większa częstość poronień. Krwiaki

podkosmówkowe zlokalizowane w okolicy dna i na tylnej ścianie macicy wiążą się z największym odsetkiem poronień.

8. Streszczenie

Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży jest objawem zagrażającego poronienia i stanowi najczęstsze powikłanie ciąży. Przyczyna wystąpienia krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży oraz jego wpływ na dalsze losy ciąży, w tym poronienie, nie są jednoznaczne. U znacznego odsetka ciężarnych krwawiących, ale także u bezobjawowych w badaniu ultrasonograficznym rozpoznaje się krwiaki podkosmówkowe (*subchorionic hematoma*, SCH). Istnieją doniesienia, że w ciążach powikłanych w pierwszej połowie krwawieniem z dróg rodnych i/lub krwiakiem podkosmówkowym, częściej obserwuje się powikłania perinatalne takie jak nadciśnienie indukowane ciążą, preeklampsja, ograniczenie wzrastania płodu, PPRM, poród przedwczesny, przedwczesne oddzielenie łożyska oraz porody operacyjne i krwotoki okołoporodowe, co może istotnie wpływać na stan zdrowia, a także śmiertelność okołoporodową matek i noworodków. Z tego powodu niektórzy Autorzy uważają za zasadne włączenie takich ciąż do grupy ciąż wysokiego ryzyka.

Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży oraz krwiak podkosmówkowy prawdopodobnie są związane z nieprawidłowo przebiegającym procesem placentacji. Wydaje się, że mogą one stanowić skutek wystąpienia nieprawidłowości na tym etapie, ale także być przyczyną uszkodzenia rozwijającego się łożyska. Dokładny mechanizm zarówno inicjacji krwawienia z dróg rodnych i krwawienia podkosmówkowego, jak i obserwowanych w tych przypadkach uszkodzeń trofoblastu nie jest znany.

Prawdopodobnie istotną rolę w etiopatogenezie poronienia zagrażającego oraz w uszkodzeniu łożyska pełni stres oksydacyjny. Ciąża uważana jest za stan zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku prooksydacyjnym, jednak na jej wczesnym etapie istnieją mechanizmy chroniące rozwijający się zarodek/płód i łożysko przed wysokimi stężeniami tlenu. Szczegółowy wpływ zwiększonego stresu oksydacyjnego na ciążę pozostaje nieznany.

Głównym celem pracy była analiza występowania stresu oksydacyjnego w populacji ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Celem badań było jednocześnie określenie wpływu wystąpienia krwawienia z dróg rodnych oraz krwiaka podkosmówkowego na przebieg ciąży, poród i stan noworodka. Cele pracy były realizowane poprzez:

1. Ocenę stężenia najważniejszych antyoksydantów enzymatycznych (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationu i reduktazy glutationu), glutationu i

- całkowitego statusu antyoksydacyjnego u pacjentek w ciąży powikłanej poronieniem zagrażającym.
2. Ocenę stężenia dialdehydu malonowego w surowicy krwi u pacjentek w ciąży powikłanej poronieniem zagrażającym.
 3. Analizę stężenia VEGF w grupie pacjentek z poronieniem zagrażającym.
 4. Analizę częstości poronienia i powikłań perinatalnych, czasu i sposobu zakończenia ciąży oraz stanu noworodka w grupie kobiet, które doświadczyły krwawienia z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży.
 5. Ocenę zależności między obecnością, rozmiarem i lokalizacją krwaka podkosmówkowego u pacjentek z poronieniem zagrażającym a wystąpieniem poronienia, a jeśli ciąża była kontynuowana – rozwojem powikłań perinatalnych, czasem i sposobem zakończenia ciąży oraz stanem noworodka.

Badaniami objęto 81 kobiet hospitalizowanych lub konsultowanych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2015-2017. Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pozytywnie zaopiniowała wniosek o zgodę na przeprowadzenie badań. Grupę badaną stanowiły 42 kobiety w 6.-19. tygodniu ciąży pojedynczej, z widoczną czynnością serca płodu w badaniu USG, u których rozpoznano krwawienie maciczne. Grupę kontrolną stanowiło 39 kobiet w 6.-18. tygodniu ciąży pojedynczej niepowikłanej, z widoczną czynnością serca płodu w badaniu USG. Retrospektywnie dokonano podziału grupy badanej w zależności od obecności krwaka podkosmówkowego oraz sposobu zakończenia ciąży (poronienie vs poród).

Grupy nie różniły się pod względem wieku, wzrostu, BMI, historii położniczej ani pod względem wieku ciążowego w momencie badania. Zastosowano następujące kryteria wykluczenia z udziału w badaniu: zaburzenia krzepnięcia krwi i przyjmowanie leków wpływających na krzepliwość, infekcja lub gorączka, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroby neurologiczne, choroby sercowo-naczyniowe, choroby autoimmunologiczne, patologie macicy (wrodzone bądź nabyte), nikotynizm, przyjmowanie środków psychoaktywnych i picie alkoholu, a także stosowanie specjalistycznej diety.

Wszystkie oznaczenia wykonano jednocześnie z krwi żyłnej pobranej w pierwszej dobie krwawienia. Oznaczenia stężeń MDA, glutationu, GPx, GR, SOD i VEGF wykonano metodą ELISA, zaś badanie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) przy użyciu testu kolorymetrycznego, na aparacie COBAS firmy *Roche*. Ponadto, wszystkie pacjentki zostały poddane badaniu położniczemu oraz ultrasonograficznemu, w którym oceniono czynność

serca i wzrastanie zarodka lub płodu oraz kosmówkę pod kątem występowania, wymiarów i lokalizacji krwaka podkosmówkowego. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica w wersji 13.3 firmy TIBCO Software Inc.

Wykazano istotnie niższe stężenia glutationu, reduktazy glutationu, VEGF oraz malondialdehydu w surowicy krwi kobiet z grupy badanej, których ciąża zakończyła się poronieniem. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic w poziomach malondialdehydu, glutationu, GPx, GR, SOD, VEGF ani TAS w surowicy krwi pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Nie zaobserwowano istotnej różnicy w częstości poronienia pomiędzy pacjentkami z i bez krwawienia macicznego, natomiast ciążę kobiet z grupy badanej trwały krócej. Odnotowano istotnie wyższą częstość krwotoków okołoporodowych oraz cięć cesarskich w grupie ciężarnych z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Ponadto, wykazano większą częstość poronień oraz krótszy czas trwania ciąży w grupie pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych, które miały krwaka podkosmówkowego. Zaobserwowano istotny wpływ objętości i lokalizacji krwaka na poronienie – większe oraz zlokalizowane w okolicy dna i tylnej ściany macicy SCH wiązały się z większym odsetkiem poronień. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Stres oksydacyjny nie jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za poronienie zagrażające w grupie ciężarnych, u których wystąpiło krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży. Stężenia malondialdehydu, glutationu, reduktazy glutationu, peroksydazy glutationu, dysmutazy ponadtlenkowej, naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka oraz całkowity status antyoksydacyjny u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie ulegają istotnej zmianie.
2. W przypadku poronienia w grupie kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży stężenie glutationu, reduktazy glutationu oraz malondialdehydu w surowicy krwi jest niższe.
3. Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie wiąże się ze zmianą stężenia naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka w surowicy krwi. Obniżone stężenie VEGF w surowicy krwi u kobiet z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży wiąże się ze wzrostem częstości poronienia.

4. Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie wpływa istotnie na zwiększenie częstości poronienia, ale skraca czas trwania ciąży.
Krwawienie z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży wpływa na zwiększenie odsetka cięć cesarskich oraz krwotoków okołoporodowych.
5. Obecność krwiaka podkosmówkowego (SCH) u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży zwiększa częstość poronienia i skraca czas trwania ciąży.
6. Obecność krwiaka podkosmówkowego u pacjentek z krwawieniem z dróg rodnych w pierwszej połowie ciąży nie zwiększa odsetka porodów operacyjnych ani nie wpływa na masę, stan po porodzie i zachorowalność noworodka.
7. Objętość i lokalizacja krwiaka podkosmówkowego wpływają istotnie na częstość poronienia. Im większa objętość SCH tym większa częstość poronień. Krwiaki podkosmówkowe zlokalizowane w okolicy dna i na tylnej ścianie macicy wiążą się z największym odsetkiem poronień.

9. Summary

Uterine bleeding during the first half of pregnancy, a symptom of threatened abortion, is the most common complication of pregnancy. Its etiopathogenesis and impact on developing complications, including miscarriage in an ongoing pregnancy is ambiguous. A significant percentage of pregnant women with uterine bleeding, but also some part of asymptomatic patients, are diagnosed with subchorionic hematoma (SCH). Some Authors report higher incidence of perinatal complications such as: pregnancy induced hypertension, preeclampsia, fetal growth restriction, PPROM, preterm labor, placental abruption and also postpartum haemorrhage and operative deliveries among pregnant patients who were diagnosed with uterine bleeding and/or a subchorionic hematoma during the first half of their pregnancy. Those events may have a relevant impact on maternal and neonatal morbidity and mortality. Hence, some Authors claim that pregnancies complicated by uterine bleeding and/or SCH should be considered as high risk pregnancies.

Presumably, there is a link between uterine and subchorionic bleeding during the first half of pregnancy and impaired placentation. Both types of bleeding may contribute as a consequence of impaired placentation, but also a virtual cause of placental (trophoblastic) damage. The exact mechanism of both: initiation of bleeding and damage observed in the trophoblast remains unknown.

Oxidative stress may have an important role in etiopathogenesis of threatened abortion and impairment of trophoblast. Pregnancy is considered a prooxidative state, however in its early stage there are mechanisms dedicated to protect the developing embryo/fetus and placenta from high concentration of oxygen. The detailed impact of oxidative stress on pregnancy is unclear.

The primary aim of this study was to evaluate the occurrence of oxidative stress in the population of pregnant women who experienced uterine bleeding during the first half of their pregnancy. Simultaneously, the aim of this study was to analyze the impact of uterine bleeding and SCH on the course of pregnancy, labor and neonatal state. The aims of the study were carried out by:

1. Evaluating serum levels of most important enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase), glutathione and total

antioxidative status in pregnant individuals who experienced uterine bleeding during the first half of pregnancy.

2. Determining serum concentration of malondialdehyde in pregnant individuals who experienced uterine bleeding during the first half of pregnancy.
3. Analysis of serum VEGF concentration in pregnant individuals who experienced uterine bleeding during the first half of pregnancy.
4. Determining the incidence of pregnancy loss and perinatal complications, time and mode of delivery and clinical status of the neonate in the group of pregnant women, who experienced uterine bleeding during the first half of pregnancy.
5. Evaluating the relationship between the occurrence, size and location of subchorionic hematoma in the population with uterine bleeding and the incidence of pregnancy loss or - if the pregnancy continued – the incidence of perinatal complications, time and mode of delivery and clinical status of the neonate.

The study and control group consisted of 81 patients hospitalized or consulted between 2015 and 2017 in Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny of Poznan University of Medical Sciences. Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences agreed to carry out the study. The study group consisted of 42 patients between 6 and 19 weeks of a singleton pregnancy, with a visible fetal heartbeat on ultrasound, diagnosed with uterine bleeding. The control group consisted of 39 patients between 6 and 18 weeks of a singleton and uncomplicated pregnancy, with a visible fetal heartbeat on ultrasound. Retrospectively, the study group was divided depending on the presence of SCH and whether the pregnancy resulted in miscarriage or continued to labor. There were no significant differences according to patient's age, height, BMI, obstetrical history and week of pregnancy at examination between the groups. The following criteria of exclusion were implemented: blood coagulation disorders and use of drugs that could affect coagulation, infection or fever, diabetes, hypertension, neurological disorders, cardiovascular diseases, autoimmune diseases, uterine pathologies (congenital or developmental), nicotynism, psychoactive substances and alcohol use, special diet.

All tests were performed simultaneously in venous blood collected in the first 24 hours of bleeding. The evaluation of malondialdehyde, glutathione, GPx, GR, SOD and VEGF levels were performed using ELISA technique and the evaluation of TAS was performed by colorimetric test using COBAS (*Roche*) apparatus. Furthermore, all of the patients had an obstetrical and ultrasonographic examination. On ultrasound, FHR, the size of an embryo or

fetus and the size and location of potential subchorionic hematoma were assessed. Statistica 13.3 by TIBCO Software Inc. was used for statistical analysis.

Significantly lower serum concentrations of glutathione, glutathione reductase, VEGF and malondialdehyde were found in patients from the study group who eventually miscarried. There were no differences in serum levels of malondialdehyde, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, VEGF and TAS between the study and control group. The incidence of pregnancy loss was similar between study and controls, however, the pregnancies of patients with uterine bleeding were significantly shorter. Higher incidence of postpartum haemorrhage and cesarean deliveries was observed in the study group. Patients from the study group who also had an SCH had higher rate of miscarriages and shorter pregnancies. Significant relevance of SCH's volume and location on the incidence of pregnancy loss was noted – bigger and located in the uterine fundus or posterior uterine wall hematomas were linked with higher rate of pregnancy loss.

The following conclusions were drawn upon this research:

1. Oxidative stress is not the major mechanism responsible for threatened abortion in the group of patients who experienced uterine bleeding during the first half of pregnancy. The serum concentrations of malondialdehyde, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, VEGF and TAS are not significantly changed in patients with uterine bleeding during the first half of pregnancy.
2. In case of pregnancy loss among patients with uterine bleeding during first half of pregnancy, serum concentrations of glutathione, glutathione reductase and malondialdehyde are lower.
3. Uterine bleeding in the first half of pregnancy is not linked with alternation of serum VEGF. Reduced serum VEGF in patients with uterine bleeding in the first half of pregnancy is connected with higher incidence of pregnancy loss.
4. Uterine bleeding in the first half of pregnancy does not influence the incidence of pregnancy loss, however, it shortens the duration of pregnancy.
Uterine bleeding in the first half of pregnancy affects the rate of cesarean deliveries and postpartum haemorrhage.
5. The diagnosis of subchorionic hematoma (SCH) in patients with uterine bleeding in the first half of pregnancy increases the incidence of pregnancy loss and shortens the duration of pregnancy.

6. The diagnosis of subchorionic hematoma in patients with uterine bleeding in the first half of pregnancy does not alter the rate of operative deliveries, nor the weight, clinical status and morbidity of the neonate.
7. The volume and location of subchorionic hematoma have a significant influence on pregnancy loss. Bigger and located in the fundus or the posterior wall of the uterus SCH are connected with higher incidence of pregnancy loss.

10. Piśmiennictwo

1. Kuller JA, Katz VL. Miscarriage: A Historical Perspective. *Birth Issues in Perinatal Care*. 1994; 21(4): 227-228.
2. Bell R. The Oxford Handbook of Childhood and Education in the Classical World. 2013. *Oxford University Press*, USA.
3. Eastman, NJ. (Ed.). *Soranus' gynecology*. 1991. *JHU Press*.
4. Hippocrates. Diseases of Women 1–2. Edited and translated by Paul Potter. Loeb Classical Library 538. 2018. *Cambridge, MA: Harvard University Press*.
5. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the ‘black box’ of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002; 8: 333-343.
6. Wittels KA, Pelletier AJ, Brown DF, Camargo CA Jr. United States Emergency Department Visits for vaginal bleeding during early pregnancy, 1993-2003. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198: 523.e1-6.
7. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000; 320: 1708.
8. Saraiya M, Green CA, Berg CJ, Hopkins FW et al. Spontaneous abortion-related deaths among women in the United States - 1981-1991. *Obstetrics & Gynecology*. 1999; 94:172-6.
9. Nanda K, Lopez LM, Grimes DA, Pelligia A, Nanda G. Expectant care versus surgical treatment for miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 3: CD003518.
10. Lykke JA, Dideriksen KL, Lidegaard O, Langhoff-Roos J. First-trimester vaginal bleeding and complications later in pregnancy. *Obstet. Gynecol*. 2010; 115: 935.
11. Dadkhah F, Kashanian M, Eliasi G. A comparison between the pregnancy outcome in women both with or without threatened abortion. *Early Human Development*. 2010; 86(3): 193-196.
12. Kanmaz AG, Inan AH, Beyan E, Budak A. The effects of threatened abortions on pregnancy outcomes. *Ginek. Pol*. 2019; 90(4):195-200.
13. Aleman A., Althabe F., Belizan J., Bergel E. (2005). Bed rest during pregnancy for preventing miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2005: CD003576.

14. Ben-Haroush A, Yogev Y, Mashiach R, Meizner I. Pregnancy outcome of threatened abortion with subchorionic hematoma: possible benefit of bed-rest? *Isr. Med. Assoc. J.* 2003; 5(6): 422-4.
15. Wahabi HA, Fayed AA, Esmaeil SA, Bahkali K. Progestogen for treating threatened miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018; (8): CD005943.
16. Devaseelan P, Fogarty PP, Regan L. Human chorionic gonadotrophin for threatened miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2010; (5): CD007422.
17. Li L, Dou L, Leung PC, Wang CC. Chinese herbal medicines for threatened miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2012; (5): CD008510.
18. Lede RL, Duley L. Uterine muscle relaxant drugs for threatened miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2005; (3): CD002857.
19. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Makrydimas G. Threatened miscarriage: evaluation and management. *BMJ.* 2004; 329(7458): 152–155.
20. Shute EV. Should spontaneous abortion be prevented? Vitamin E in its management. *Can Med Assoc J.* 1960; 82(2): 72–76.
21. Skrzypczak J. Poronienie. W: Położnictwo i ginekologia (tom I). Pod red.: Bręborowicz GH. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.* 2015: 85-91.
22. Wong LF, Porter TF, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014; (10): CD000112.
23. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod.* 2002; 17: 446–51.
24. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril.* 2012; 98: 1103-11.
25. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S et al., on behalf of the ESHRE Special Interest Group, Early Pregnancy, Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Human Reproduction.* 2015; 30(3): 495-498.
26. National Institute for Health and Clinical Excellence. Ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management. NICE; 2019. Clinical Guideline 126. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng126>

27. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. *Obstet Gynecol.* 2018; 132(5): 197-207.
28. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation.* 1998; 98(20): 2108-2116.
29. Magnus MC, Wilcox AJ, Morken NH, Weinberg CR, Håberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ.* 2019; 364: 1869.
30. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 2000; 320(7251): 1708.
31. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L et al. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 2005; 161(9): 816.
32. Frazier T, Hogue CJR, Bonney EA, Yount KM, Pearce BD. Weathering the storm; a review of pre-pregnancy stress and risk of spontaneous abortion. *Psychoneuroendocrinology.* 2018; 92: 142.
33. Janowicz-Grelewska A, Sieroszewski P. Znaczenie prognostyczne ultrasonograficznego rozpoznania krwiaka podkosmówkowego dla przebiegu ciąży. *Ginekol Pol.* 2013; 84: 944-49.
34. Fekete T. Ultrasound imaging of early extraembryonic structures. *Ultrasound Rev Obstet Gynecol.* 2003; 4: 240-243.
35. Graham GM. Ultrasound Evaluation of Pregnancy in the First Trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010; 4: 17-28.
36. Laing FC, Frates MC. Ultrasound Evaluation During the First Trimester of Pregnancy. In: *Callen PW (ed): Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology (4th ed)*, Philadelphia: WB Saunders 2000; 105-45.
37. Tuuli MG, Norman SM, Odibo AO, Macones, GA et al. Perinatal outcomes in women with subchorionic hematoma: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2011; 117(5): 1205-1212.
38. Johns J, Hyett J, Jauniaux E. Obstetric outcome after threatened miscarriage with and without a hematoma on ultrasound. *Obstet. Gynecol.* 2003; 102: 483-7.

39. Johns J, Jauniaux E. Threatened miscarriage as a predictor of obstetric outcome. *Obstet. Gynecol.* 2006; 107(4): 845-850.
40. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2004; 11(6): 342-52.
41. Palmer ME, Watson AL, Burton GJ. Morphological analysis of degeneration and regeneration of syncytiotrophoblast in first trimester villi during organ culture. *Hum Reprod* 1997; 12: 379-82.
42. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2015. *Oxford University Press, USA.*
43. Burton, GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of Anatomy.* 2009; 215: 27-35.
44. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2011; 25(3): 287-299.
45. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP et al. Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000; 157: 2111-2122.
46. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol.* 2003; 162(1): 115-125.
47. Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta.* 1990; 11: 477-486.
48. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EMB et al. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis.* 2004; 177(2): 391-399
49. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Human Pathology.* 2003; 34(12): 1265-1275.
50. Gupta, S, Agarwal, A, Banerjee, J, Alvarez, JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey.* 2007; 62(5): 335-347.
51. Chard T. Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles. *Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology.* 1991; 5(1), 179-189.

52. Nagy S, Bush M, Stone J, Lapinski RH et al. Clinical significance of subchorionic and retroplacental hematomas detected in the first trimester of pregnancy. *Orv Hetil.* 2005; 146: 2157-2161.
53. Everett C. Incidence and outcome of bleeding before the 20th week of pregnancy: prospective study from general practice. *BMJ.* 1997; 315:32.
54. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1988; 319(4):189-94.
55. WHO Recommendations on Antenatal Care for a Positive Pregnancy Experience. Geneva: World Health Organization, 2016. Available from: https://www.who.int/reproductivehealth/publications/maternal_perinatal_health/anc-positive-pregnancy-experience/en/
56. Stabile I, Campbell S, Grudzinskas JG. Threatened miscarriage and intrauterine hematomas. Sonographic and biochemical studies. *J Ultrasound Med.* 1989; 8:289-92.
57. Leite, J, Ross, P, Rossi, AC, Jeanty, P. Prognosis of Very Large First-Trimester Hematomas. *Journal of Ultrasound in Medicine.* 2006; 25: 1441-1445.
58. Bennett GL, Bromley B, Lieberman E, Benacerraf BR. Subchorionic hemorrhage in first-trimester pregnancies: prediction of pregnancy outcome with sonography. *Radiology.* 1996; 200(3): 803-6.
59. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 1996. Mar; 65(3): 503-9.
60. Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003; 361: 983-988.
61. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1724-1732.
62. Rull K, Laan M. Expression of β -subunit of HCG genes during normal and failed pregnancy. *Hum Reprod.* 2005; 20: 3360-3368.
63. Yin LJ, Zhang Y, Lv PP, He WH et al. Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development. *BMC Med.* 2012; 10: 26.

64. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Cuschieri K, Entrican G et al. The role of infection in miscarriage. *Human Reproduction Update*. 2016; 22(1): 116–133.
65. Sindhu K, Srinivas YM, Sammel MD, Chou D et al. Placental inflammation and viral infection are implicated in second trimester pregnancy loss. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2006; 195(3): 797-802.
66. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*. 2004; 10(14): 1677-1694.
67. Packer, L (ed). *Oxidants and Antioxidants, Part B*. San Diego: Academic Press, 1999.
68. Panglossi HV (ed). *Antioxidants: New Research*. New York, Nova Publishers, 2006.
69. Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka L, Tarasiewicz M. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2010; 43(1): 9-14.
70. Zabłocka A, Janusz M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych The two faces of reactive oxygen species. *Postępy Hig Med Dosw.(online)*. 2008; 62: 118-124.
71. Hensley K, Robinson KA, Gabbita S, Salsman S et al. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1456–1462.
72. Wolski T, Kalisz O, Gerkowicz M, Smorawski M. Rola i znaczenie antyoksydantów w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem chorób oczu. *Borgis - Postępy Fitoterapii*. 2007; 2: 82-90.
73. Valluru L, Subramanyam D, Wudayagiri R. Role of free radicals and antioxidants in gynecological cancers: current status and future prospects. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. 2014; 3(1): 15-26.
74. Santulli P, Borghese B, Lemaréchal H, Leconte M et al. Increased serum oxidative stress markers in women with uterine leiomyoma. *PloS One*, 2013; 8(8): e72069.
75. Tamura, H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi, K et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 2008; 44: 280-287.
76. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas Jr AJ. et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and sterility*. 2000; 73(3): 459-464.

77. Ruder EH, Hartman TJ, Reindollar RH, Goldman MB. Female dietary antioxidant intake and time to pregnancy among couples treated for unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 2014; 101(3): 759-766.
78. Majzoub A, Agarwal A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. *Arab Journal of Urology*. 2018; 16(1): 113-124.
79. Crha I, Hrubá D, Ventruba P et al. Ascorbic acid and infertility treatment. *Central European Journal of Public Health*. 2003; 11(2): 63-67.
80. Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, Bueno NB et al. Oral antioxidant therapy for prevention and treatment of preeclampsia: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2018; 28(9): 865-876.
81. Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ et al. Vitamin, C. and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006; 367: 1145–1154.
82. Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA et al. Vitamins, C. and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N. Engl. J. Med*. 2006; 354: 1796–1806.
83. Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA et al. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ*. 2011; 342: d2901.
84. Salles AMR, Galvao TF, Silva, MT, Motta, LCD et al. Antioxidants for preventing preeclampsia: a systematic review. *The Scientific World Journal* 2012. 2012
85. Spinnato JA, Freire S, e Silva JLP, Rudge MVC et al. Antioxidant therapy to prevent preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstetrics & Gynecology*. 2007; 110(6): 1311-1318.
86. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004; 25(4): 581-611.
87. Abid MR, Tsai JC, Spokes KC, Deshpande SS et al. Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. *The FASEB journal*. 2001; 15(13): 2548-2550.

88. Bowen RS, Moodley J, Dutton MF, Theron AJ. Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2001; 80(8): 719-725.
89. Kharb S. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2000; 93(1): 37-39.
90. Bosco C, Buffet C, Diaz E, Rodrigo R et al. VEGF in the muscular layer of placental blood vessels: Immuno-expression in preeclampsia and intrauterine growth restriction and its association with the antioxidant status. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, 2010; 8(2): 87-95.
91. Murawska-Ciałowicz E. Stres oksydacyjny i antyoksydacyjna obrona w fizjologicznych i patologicznych stanach organizmu. W: *Aktywność ruchowa w świetle badań fizjologicznych i promocji zdrowia*. 1998. Red. Nauk. Marek Zatoń i Zbigniew Jethon.
92. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GSJ, Trew AJ et al. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta*. 1999; 20(8): 661-667.
93. Bills VL, Hamdollah-Zadeh M, Soothill PW, Harper SJ et al. The role of VEGF-A 165 b in trophoblast survival. *BMC pregnancy and childbirth*. 2014; 14(1): 278.
94. Luttun A, Carmeliet P. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered?. *The Journal of clinical investigation*, 2003; 111(5): 600-602.
95. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL et al. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *Journal of Endocrinology*, 1998; 159(3): 459-468.
96. Barańska P, Jerczyńska H, Pawłowska Z. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń-budowa i funkcje. *Postępy Biochem*, 2005; 51: 13-21.
97. Xu H, Perez-Cuevas R, Xiong X, Reyes H et al. An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP). *American journal of obstetrics and gynecology*, 2010; 202(3): 239-e1.
98. Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S. Current topic: in vivo investigation of the placental circulations by Doppler echography. *Placenta* 1995; 16: 323–331.
99. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308: 1592–1594.

100. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL et al. (eds.) "6. *First-Trimester Abortion*". W: Williams Gynecology (1 ed.). McGraw-Hill Medical, 2008.
101. Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P et al. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF Receptor 2 Pathway Is Critical for Blood Vessel Survival in Corpora Lutea of Pregnancy in the Rodent. *Endocrinology*. 2005; 146(3): 1301–1311.
102. Arjunan P, Lin X, Tang Z, Du Y et al. VEGF-B is a potent antioxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018; 115(41): 10351-10356.
103. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93(6): 2576–2581.
104. Chen R, Lee C, Lin X, Zhao C et al. Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. *Pharmacological research*. 2019; 143: 33-39
105. Araujo Júnior E, Costa RS, Fonseca BC, Martins WP et al. Reference intervals of embryos/fetuses heart rate between 6 and 14 weeks of pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2014; 27(13): 1385-1388.
106. Cui XL, Brockman D, Campos B, Myatt L. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta*, 2006; 27(4-5): 422-431.
107. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*. 2003; 69(1): 1–7.
108. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL et al. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements—a prospective study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1985; 151(3): 333-337.
109. Hasan R., Olshan AF, Herring AH, Savitz, DA et al. Self-reported vitamin supplementation in early pregnancy and risk of miscarriage. *American journal of epidemiology*, 2009; 169(11): 1312-1318.
110. Rumbold A, Middleton P, Pan N, Crowther CA. Vitamin supplementation for preventing miscarriage. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011;1. CD004073.
111. Pillai RN, Konje JC, Richardson M, Tincello DG, Potdar, N. Prediction of miscarriage in women with viable intrauterine pregnancy—A systematic review and diagnostic

- accuracy meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2018; 220: 122-131.
- 112.Varelas FK, Prapas NM, Liang RI, Prapas IM, Makedos GA. Yolk sac size and embryonic heart rate as prognostic factors of first trimester pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2008; 138(1): 10-13.
 - 113.Maged AM, Mostafa WA. Biochemical and ultrasonographic predictors of outcome in threatened abortion. *Middle East Fertility Society Journal*, 2013; 18(3): 177-181.
 - 114.Martinez JM, Comas C, Ojuel J, Borrell A et al. Fetal heart rate patterns in pregnancies with chromosomal disorders or subsequent fetal loss. *Obstetrics & Gynecology*, 1996; 87(1): 118-121.
 - 115.Espinoza AF, Lee W, Belfort MA, Shamshirsaz AA et al. Fetal Tachycardia Is an Independent Risk Factor for Chromosomal Anomalies in First-Trimester Genetic Screening. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2019; 38(5): 1327-1331.
 - 116.Doubilet PM, Benson CB, Chow JS. Outcome of pregnancies with rapid embryonic heart rates in the early first trimester. *American Journal of Roentgenology*, 2000; 175(1): 67-69.
 - 117.Coomarasamy A, Devall AJ, Brosens JJ, Quenby S et al. Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020; 223(2): 167-176.
 - 118.Dante G, Vaccaro V, Facchinetti F. Use of progestagens during early pregnancy. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 2013; 5(1): 66.
 - 119.Coomarasamy A, Devall AJ, Cheed V, Harb H et al. A randomized trial of progesterone in women with bleeding in early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 2019; 380(19): 1815-1824.
 - 120.Carp HA. Progestogens in the prevention of miscarriage, *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2016; 27(2): 55-62.
 - 121.Lee HJ, Park TC, Kim JH., Norwitz E, Lee B. The influence of oral dydrogesterone and vaginal progesterone on threatened abortion: a systematic review and meta-analysis. *BioMed Research International*, 2017. Vol. 2017, Article ID 3616875, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/3616875>

122. Weiss, JL, Malone FD, Vidaver J, Ball RH et al. Threatened abortion: a risk factor for poor pregnancy outcome, a population-based screening study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2004; 190(3): 745-750.
123. Eskild A, Vatten LJ. Abnormal bleeding associated with preeclampsia: a population study of 315,085 pregnancies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 2009; 88(2): 154-158.
124. Wydział Statystyki Zdrowia, Ośrodek Statystyki Zdrowia i Ochrony Zdrowia, Główny Urząd Statystyczny, Departament Badań Społecznych, Urząd Statystyczny w Krakowie pod kierunkiem Wozniak Sz, Żyra M. Zdrowie i ochrona zdrowia w 2019 r. Warszawa, Kraków 2020 r. ISSN 2084-0470 Publikacja dostępna na stronie internetowej stat.gov.pl
125. Chang D, Papalia N, Cooper, S. Obstetrical blood loss by mode of delivery utilizing qualitative methods: Redefining normal. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 2020; 42(5): 671.
126. Bodner K, Wierrani F, Grünberger W, Bodner-Adler B Influence of the mode of delivery on maternal and neonatal outcomes: a comparison between elective cesarean section and planned vaginal delivery in a low-risk obstetric population. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2011; 283(6): 1193-1198.
127. Stafford I, Dildy GA, Clark SL, Belfort MA. Visually estimated and calculated blood loss in vaginal and cesarean delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2008; 199(5): 519-e1.
128. Doctorvaladan SV, Jelks AT, Hsieh EW, Thurer RL et al. Accuracy of blood loss measurement during cesarean delivery. *AJP reports*, 2017; 7(2): e93.
129. Nwafor JI, Onuchukwu VJU, Obi VO, Ugoji DPC et al. A comparative study of pregnancy outcomes among women with and without threatened miscarriage in the first trimester in Abakaliki Southeast Nigeria. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*, 2019; 8: 3639-43.
130. Mannaerts D, Faes E, Cos P et al. Oxidative stress in healthy pregnancy and preeclampsia is linked to chronic inflammation, iron status and vascular function. *PLoS One*. 2018;13(9):e0202919.

- 131.Heller HT, Asch EA, Durfee SM, Goldenson RP et al. Subchorionic hematoma: correlation of grading techniques with first-trimester pregnancy outcome. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2018; 37(7): 1725-1732.
- 132.Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 111(5): 649-658.
- 133.Lettieri L, Vintzileos AM, Rodis JF, Albin SM, Salafia CM. Does “idiopathic” preterm labor resulting in preterm birth exist?. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1993; 168(5):1480-1485.
- 134.Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2006; 113: 17-42.
- 135.Arias F, Rodriguez L, Rayne SC, Kraus FT. Maternal placental vasculopathy and infection: two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:585–91.
- 136.Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1137–42.
- 137.Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, Gomez R et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1063–9.
- 138.Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005; 15(4): 316-328.
- 139.Daglar K, Biberoglu E, Kirbas A, Dirican AO et al. The cellular immunity and oxidative stress markers in early pregnancy loss. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016; 29(11): 1840-1843.
- 140.Ozkaya O, Sezik M, Kaya H. Serum malondialdehyde, erythrocyte glutathione peroxidase, and erythrocyte superoxide dismutase levels in women with early spontaneous abortions accompanied by vaginal bleeding. *Medical Science Monitor*, 2008; 14(1): CR47-CR51.

141. Mihailović M, Cvetković M, Ljubić A, Kosanović M et al. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biological Trace Element Research*, 2000; 73(1): 47-54.
142. Arıkan S, Konukoğlu D, Arıkan Ç, Akçay T, Davas I. Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2001; 51(3): 145-149.
143. Sane AS, Chokshi SA, Mishra VV, Barad DP et al. Serum lipoperoxides in induced and spontaneous abortions. *Gynecologic and obstetric investigation*, 1991; 31(3): 172-175.
144. Sugino N, Nakata M, Kashida S, Karube A et al. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F2 α in the decidua of failed pregnancy. *Molecular human reproduction*, 2000; 6(7): 642-647.
145. Ramiro-Cortijo D, Herrera T, Rodríguez-Rodríguez P, De Pablo ÁLL et al. Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications. *Placenta*, 2016; 47: 37-45.
146. Utama GN, Surya IGP. Serum Malondialdehyde Level as a Risk Factor for Threatened Abortion. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015; 11-14.
147. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2007; 22(1): 135-137.
148. Telfer JF, Thomson AJ, Cameron IT, Greer IA, Norman JE. Expression of superoxide dismutase and xanthine oxidase in myometrium, fetal membranes and placenta during normal human pregnancy and parturition. *Human reproduction (Oxford, England)*, 1997; 12(10): 2306-2312.
149. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction*, 1996; 11(5): 1073-1078.
150. Jenkins C, Wilson R, Roberts J, Miller H et al. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2000; 2(3): 623-628.
151. Popovic JK, Grujic Z, Grujic I, Bogavac M et al. Prostaglandin E2, trace elements and levels of oxidative processes in spontaneous miscarriages. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016; 20(22): 4786-4790.

152. Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E, Burton GJ. Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta*, 1997; 18(4): 295-299.
153. Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2002; 282(4): H1255-H1261
154. Sarıkaya E, Doğan S. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. In: Glutathione Peroxidase in Health and Disease. *IntechOpen*, 2020.
155. Lubos E, Kelly NJ, Oldebeken SR, Leopold JA et al. Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(41): 35407-35417
156. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 2011; 15(7): 1957-1997.
157. Zachara BA, Dobrzyński W, Trafikowska U, Szymański W. Blood selenium and glutathione peroxidases in miscarriage. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2001; 108(3): 244-247.
158. Behne D, Wolters W. Selenium content and glutathione peroxidase activity in the plasma and erythrocytes of non-pregnant and pregnant women. *J Clin Chem Clin Biochem* 1979; 17:133–135.
159. Butler JA, Whanger PD. Metabolism of selenium by pregnant women. *J Trace Elem Exp Med* 1992; 5: 175–188.
160. Omeljaniuk WJ, Socha K, Borawska MH, Charkiewicz AE et al. Antioxidant status in women who have had a miscarriage. *Advances in medical sciences*, 2015; 60(2): 329-334.
161. Şimşek M, Nazıroğlu M, Şimşek H, Cay M et al. Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 1998; 16(4): 227-231.
162. Bukowska, B. Glutathione: Biosynthesis, factors inducing and concentration in selected units of diseases. *Medycyna Pracy*, 2004; 55: 501-509.

163. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W, Maciag A, Marchaluk E. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 1993; 35(1): 12-17.
164. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(5): 3217–3266.
165. Kharb S. Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia and diabetes. *Clinica chimica acta*, 2000; 294(1-2): 179-183.
166. Nicol CJ, Zielenski J, Tsui LC, Wells PG. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J.* 2000 Jan; 14(1):111-27.
167. Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean SJ, Walker JJ. Evidence of a TH 1 type response being associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2000; 73(6): 1206-1208.
168. Miller H, Wilson R, Jenkins C, MacLean MA et al. Glutathione levels and miscarriage. *Fertility and sterility*, 2000; 74(6): 1257-1258.
169. Issa MM, Hassan BG, Gatea AK. Miscarriage and Oxidative Stress of Iron Supplementation during Pregnancy. *Global Journal of Medical Research: B Pharma, Drug Discovery, Toxicology & Medicine*, 2016; 16: 8-17.
170. Rogers LK, Tamura T, Rogers BJ, Welty SE et al. Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicological Sciences*, 2004; 82(2): 367-373.
171. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth M. Lipid peroxidation and antioxidant activity in complicated pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2009; 36(2): 110-112.
172. Ghneim HK, Alshebly MM. Biochemical markers of oxidative stress in Saudi women with recurrent miscarriage. *Journal of Korean medical science*, 2016; 31(1): 98-105.
173. Al-Sheikh YA, Ghneim HK, Alharbi AF, Alshebly MM et al. Molecular and biochemical investigations of key antioxidant/oxidant molecules in Saudi patients with recurrent miscarriage. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019; 18(6): 4450-4460.
174. Łagód L, Paszkowski T, Sikorski R, Rola R. The antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion. *Ginekologia polska*, 2001; 72(12): 1073-1078.

- 175.Grujić Z, Grujić I, Bogavac M, Nikolić A et al.. Disturbance of oxidative balance in the first trimester of spontaneous abortions. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73(11):1038-1043.
- 176.Deveer R, Deveer M, Engin-Üstün Y, Akbaba E et al. Role of Oxidative Stress on Vaginal Bleeding during The First Trimester of Pregnant Women. *International journal of fertility & sterility*, 2014; 7(4): 271–274.
- 177.Hasan R, Baird DD, Herring AH, Olshan AF et al. Association between first-trimester vaginal bleeding and miscarriage. *Obstet Gynecol.* 2009; 114(4): 860-7.
- 178.Vuorela P, Carpén O, Tulppala M, Halmesmäki E. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Molecular human reproduction*, 2000; 6(3): 276-282.
- 179.Almawi WY, Saldanha FL, Mahmood NA, Al-Zaman I et al. Relationship between VEGFA polymorphisms and serum VEGF protein levels and recurrent spontaneous miscarriage. *Human Reproduction*, 2013; 28(10): 2628-2635.
- 180.Çöl-Madendag I, Madendag Y, Altinkaya SÖ, Bayramoglu H, Danisman N. The role of VEGF and its receptors in the etiology of early pregnancy loss. *Gynecological Endocrinology*, 2014; 30(2): 153-156.
- 181.Muttukrishna S, Swer M, Suri S, Jamil A et al. Soluble Flt-1 and PlGF: new markers of early pregnancy loss?. *PLoS One*, 2011; (3): e18041.
- 182.Poulose T, Richardson R, Ewings P, Fox R. Probability of early pregnancy loss in women with vaginal bleeding and a singleton live fetus at ultrasound scan. *Journal of obstetrics and gynaecology*, 2006; 26(8): 782-784.
- 183.Singh A, Dev S, Banerjee BD. Assessment of Maternal Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Placental Growth Factor in Threatened Abortion: A Case Control Study. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 2020; 14(1)
- 184.Elkholi DGEY, Nagy HM. Maternal serum concentrations of angiogenic and antiangiogenic factors in threatened miscarriage at 7–12 weeks' gestation and the risk of adverse pregnancy outcomes. *Middle East Fertility Society Journal*, 2013; 18(3): 208-213.
- 185.Plaisier M, Dennert I, Rost E, Koolwijk P et al. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Human reproduction*, 2009; 24(1): 185-19.
- 186.Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human reproduction update*, 2012; 18(4): 436-457.

- 187.Şükür YE, Göç G, Köse O, Açmaz G et al. The effects of subchorionic hematoma on pregnancy outcome in patients with threatened abortion. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 2014; 15(4): 239.
- 188.Pearlstone M, Baxi L. Subchorionic hematoma: a review. *Obstetrical & gynecological survey*, 1993; 48(2): 65-68.
- 189.Pedersen JF, Mantoni M. Large intrauterine haematomata in threatened miscarriage: frequency and clinical consequences. *BJOG*. 1990; 97: 75–7.
- 190.Ott J, Pecnik P, Promberger R, Pils S et al. Intra-versus retroplacental hematomas: a retrospective case-control study on pregnancy outcomes. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2017; 17(1): 366.
- 191.Ball RH, Ade CM, Schoenborn JA, Crane JP. The clinical significance of ultrasonographically detected subchorionic hemorrhages. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174(3): 996-1002
- 192.Tower CL, Regan L. Intrauterine haematomas in a recurrent miscarriage population. *Human Reproduction*, 2001; 16(9): 2005-2007.
- 193.Gupta, N. A Prospective Study done to Delineate the Parameters of Sub Chorionic Hematoma (Ultrasound detected) which Correlate with Favourable Pregnancy Outcome. do IVF pregnancies show a higher incidence of Subchorionic hematoma? *Journal of Medical Science and Clinical Research* 2018; 06(10): 1356-1364.
- 194.Børllum, KG, Thomsen A, Clausen I, Eriksen G. Long-term prognosis of pregnancies in women with intrauterine hematomas. *Obstetrics and gynecology*, 1989; 74(2): 231-233.
- 195.Campbell S, Goswamy R, Goessens L et al: Real time ultrasonography for determination of ovarian morphology and volume: Possible early screening test for ovarian cancer? *Lancet* 1982; 319(8269): 425-6.
- 196.Strobino BA, Pantel-Silverman J. First-trimester vaginal bleeding and the loss of chromosomally normal and abnormal conceptions. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1987; 157(5): 1150-1154.
- 197.Cramer DW, Wise LA. The epidemiology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000; 18(4):331–339.
- 198.Stabile I, Grudzinskas, JG, Chard T. (Eds.). *Spontaneous abortion: diagnosis and treatment*. Springer Science & Business Media, 2012.

199. Wieringa-de Waard M, Ankum WM, Bonse GJ, Vos J et al. The natural course of spontaneous miscarriage: analysis of signs and symptoms in 188 expectantly managed women. *British Journal of General Practice*, 2003; 53(494): 704-708.
200. Makrydimas G, Sebire NJ, Lolis D, Vlassis N, Nicolaides KH. Fetal loss following ultrasound diagnosis of a live fetus at 6–10 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 2003; 22(4): 368-372.
201. Hasan R, Baird DD, Herring AH, Olshan AF et al. Patterns and predictors of vaginal bleeding in the first trimester of pregnancy. *Annals of epidemiology*, 2010; 20(7): 524-531.
202. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 2012; 379(9832): 2151-2161.
203. Noor S, Nazar AF, Bashir R, Sultana R. Prevalance of PPRM and its outcome. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 2007; 19(4): 14-17.
204. Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2011; 25(4): 391-403.
205. Oyelese Y, Ananth CV. Placental abruption. *Obstetrics & Gynecology*, 2006; 108(4): 1005-1016.
206. Wijesiriwardana A, Bhattacharya S, Shetty A, Smith N, Bhattacharya S. Obstetric outcome in women with threatened miscarriage in the first trimester. *Obstetrics & Gynecology*, 2006; 107(3): 557-562.
207. Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol*, 1996; 103:130-132
208. Nicoll AE, Norman J, Macpherson A, Acharya U. Association of reduced selenium status in the aetiology of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*, 1999; 106:1188-1191
209. Li Y, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron*, 1997; 19(2): 453-463.
210. WuÈllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S et al. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res*. 1999; 826: 53-62.