



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”,

НА ТЕМА:

**„КОРЕЛАЦИЯ МЕЖДУ УЛТРАЗВУКОВАТА
ДИАГНОСТИКА И ИМУНОХИСТОХИМИЯТА
ПРИ РАННИ И КЪСНИ СПОНТАННИ АБОРТИ“**

Д-р Цветомир Евгениев Къчовски

Научна специалност 03.01.45. „Акушерство и гинекология“
Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1. Медицина
Научна специалност: „Акушерство и гинекология” (03.01.45)

Научни ръководители:

Проф.Д-р Емил Ковачев, д.м.н

Проф. Д-р Антон Тончев, д.м.н

Варна, 2023 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1. Исторически преглед на проблема	9
2. Анатомия на кръвоносните съдове на матката и промените им по време на бременност	10
3. Имплантация, трофобластна инвазия и плацентация на концептуса	13
4. Иммунология на плацентата	18
5. Спонтанен аборт – определение, класификация и етиопатогенеза	21
5.1. Определение	21
5.2. Класификация	22
5.3. Етиопатогенеза	23
6. Диагноза, лечение и скрининг на спонтанните аборти	26
6.1. Диагноза	26
6.2. Клинична картина	27
6.3. Образни методи за диагностика	30
6.4. Диференциална диагноза:	30
6.5. Лечение	31
6.6. Скрининг	31
7. Ултразвуковата диагностика на ранни и късни спонтанни аборти	32
7.1. Определяне на гестационната възраст	33
7.2. Missed abortion	35
7.3. Заплашващ Аборт	37
7.4. Прогресиентен Аборт	38
7.5. Инкомплетен аборт	39
7.6. Комплетен аборт	39
7.7. Blighted ovum – анембрионална бременност	39
8. Доплеровата велосиметрия в акушерската практика при спонтанни аборти	40
8.1. Доплерова велосиметрия в акушерската практика	40
8.2. Методика на Доплерово изследване на маточните артерии	42
8.3. Изследване на кръвотока на маточните артерии	43
9. Имунохистохимията като диагностичен метод в акушерството	45
III. ЦЕЛ	50
IV. ЗАДАЧИ	50
V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	51

1.	Диагностични методи	52
1.1.	Анамнеза	52
1.2.	Физикален преглед.....	53
1.3.	Методи за образна диагностика.....	54
1.4.	Доплерова велосиметрия на маточните артерии.....	59
1.5.	Методи за получаване на хистологиченият материал	61
2.	Обработка на хистологичния материал.....	63
3.	Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	64
4.	Имухистохимия с Ki67	65
5.	Имухистохимия с CD56+.....	67
6.	Статистически методи	68
6.1.	Корелационен анализ.....	69
6.2.	Регресионен анализ	70
VI.	РЕЗУЛТАТИ.....	71
1.	Демографски показатели	72
1.1.	Разпределение по възраст.....	72
1.2.	Гестационна възраст на абортите	73
1.3.	Разпределение на спонтанни аборти по възраст на бременните	74
1.4.	Начин на предходно родоразрешение.....	75
2.	Експресия на CD56+ клетки.....	76
2.1.	Разпределение според възрастта на пациентките	76
2.2.	Разпределение според гестационната възраст на абортите.....	77
2.3.	Разпределение според вида на аборта в първи триместър	79
2.4.	Разпределение според срока на аборта и Ri и Pi на маточните артерии в подгрупите на положителни клетки CD56+.....	80
3.	Експресия на Ki67 пролиферативен маркер	85
3.1.	Разпределение според възрастта на пациентките	85
3.2.	Разпределение според гестационната възраст на абортите.....	86
3.3.	Разпределение според вида на аборта	87
3.4.	Разпределение според вида на раждането	88
3.5.	Разпределение според срока на аборта и Ri и Pi на маточните артерии в подгрупите според интензитета на Ki67.....	89
4.	Статистическа обработка на получените резултати	93
4.1.	Корелационен анализ.....	93
4.2.	Регресионен анализ	98
VII.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	111
1.	Демографска характеристика.....	111
2.	CD56+ положителни клетки.....	113
3.	Ki67.....	116

4. Доплер и спонтанни аборти	119
VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
IX. ИЗВОДИ	128
X. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	129
Оригинални научно-приложни приноси	129
Приноси с потвърдителен характер.....	129
XI. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	130
XII. ДОКЛАДИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	131
XIII. ПРИЛОЖЕНИЯ.....	132
XIV. БИБЛИОГРАФИЯ	136

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

БДАГ	–	Българско дружество по акушерство и гинекология
ВТР	–	Вероятен термин на раждане
Г.с.	–	Гестационна седмица
ИБ	–	Извънматочна бременност
ПРМ	–	Последна редовна менструация
ПОС	–	Пикочо-отделителната система
УЗД	–	Ултразвукова диагностика
АС	–	Обиколка на корема
Ang1	–	Ангиопоетин-1
Ang1 2	–	Ангиопоетин 2
ВРД	–	Бипариетален диаметър
<i>b-hCG</i>	–	Човешкият хорионгонадотропин - бета
САMs	–	Клетъчни адхезионни молекули
CD56	–	Повърхностен маркер CD56
CRL	–	Парието-сакрален размер
CXCL10	–	Интерферон гама-индуциран протеин 10
CXCL11	–	Интерферон гама-индуциран протеин 11
dNK клетки	–	Децидуални НК клетки
DSCs	–	Децидуални стромални клетки
D&C	–	Дилатация и кюретаж
D&E	–	Дилатация и евакуация
EGF	–	Епидермален растежен фактор
ESCs	–	Ендометриални стромални клетки
EVTs	–	Екстравилозен трофобласт
HA	–	Хиалуронан
HC	–	Обиколка на главата
HL	–	Дължината на раменната кост
HLA	–	Човешки левкоцитен антиген
HLA-G	–	Човешки левкоцитен антиген-Г
HMWHA	–	Хиалуронова киселина с високо молекулно тегло
HYAL2	–	Хиалуронидаза 2
ICH	–	Имунохистохимия
IDO	–	Индоламин 2,3-диоксигеназа
IGFBP-1	–	Инсулиноподобен растежен фактор, свързващ протеин-1
IL-6	–	Интерлевкин 6
IL-8	–	Интерлевкин 8
IL-11	–	Интерлевкин 11
IL-15	–	Интерлевкин 15
IL-25	–	Интерлевкин 25
INF- γ	–	Интерферон гама γ
IP10	–	Интерферон гама-индуциран протеин 10

FL	– Дължина на бедрена кост
KIR2DL4	– Имуноглобулин подобен рецептор на клетки убийци, два Ig домена и дълга цитоплазмена опашка 4
Ki67	– Пролиферативен нуклеарен антиген
LH+3	– Пик на лутеинизиращият хормон + 3 дни
MHC	– Основен комплекс на хистосъвместимост
MMPs	– Матриксни металопроотеази
MMP-9	– Матрична металопептидаза 9
MSD	– Среден диаметър на гестационния сак
OECC	– Външен отвор на цервикалния канал
OICC	– Вътрешен отвор на цервикалния канал
NK клетки	– Клетки естествени убийци
PRL	– Пролактин
RhoGAM	– Rho (D) човешки имунен глобулин
RIF	– Повтарящата се неуспешна имплантация
Sas	– Спирални артерии
ST	– Стромални клетки
TGF- β	– Трансформираният растежен фактор бета
TNF- α	– Тумор некротизиращ фактор алфа
TVUS	– Трансвагиналенултразвук
VEGF-C	– Съдово-ендотелен растежен фактор C
VSMCs	– Васкуларни гладкомускулни клетки
V&A	– Вакуум-аспирация

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Научният проблем, който се разглежда – спонтанните аборти, може да бъде определен като актуален, медицински и социално значим в световен мащаб. По данни на Световната Здравна Организация всяка четвърта бременност в света завършва с аборт.

Честотата на спонтанните аборти през първи триместър е между 15-20%. Ако към клиничните аборти добавим и предклиничните (доказани с позитивиране на *b-hCG*), честотата на абортите достига до 50% от бременностите (7).

Проучване от Дания, което включва 1 221 546 бременности при 634 272 жени, между 1978 и 1992 г., установява, че общата честота на спонтанните аборти е 13,5% (44). Само 50-60% от всички концепции успяват да надхвърлят 20-та гестационна седмица. В нашата страна структурата на абортите по данни на Националния център по общественото здраве и анализи за периода 2019-2022г. е: общо аборти 78,207, спонтанни аборти 23,561; терапевтични аборти 54,634 (29).

До преди няколко десетилетия спонтанните аборти се свързваха основно с вредни влияния от околната среда, генетични аномалии и анатомични дефекти. В днешно време с развитието на генетиката, имунологията, имунохистохимията, микробиологията и ехографската образна диагностика е възможно етиологията на абортите да бъде проучена много по-детайлно. Въпреки многобройните анализи и проучвания на редица изследователи, в голям процент от случаите причините остават неизяснени.

През последните години нараства броя на публикации, свързани с изследването на причините за спонтанните аборти и на ролята на децидуални НКклетки (dNK) при тях. Различни проучвания откриват, че dNK клетки са източник на цитокини и растежни фактори. Предполага се, че dNK клетките участват в ангиогенезата по време на децидуализацията регулирането на инвазията на трофобласта и ремоделирането на спиралните артерии (140,255). Известно е, че нарушенията на тези процеси са причина за голям брой патологии в акушерството: преждевременни раждания, прееклампсии, плацента акрета и повтарящи се спонтанни аборти (40). Според гайдлайна от 2016г. на „Royal College of Obstetricians and Gynaecologists“ в световен мащаб все още не е уточнено понятието „високи“ и „ниски“ нива на dNK клетки (248).

Предишно проучване, изследващо пролиферацията на dNK клетките, използвайки имунохистохимично оцветяване, установява, че 40% от CD56 позитивните dNK клетки в края на секреторната фаза на ендометриума експресират антиген Ki67. Пролиферативните маркери Ki67 са с най-висока експресия във вилозния синцитиотрофобласт на плацентата през първия триместър на нормално протекли бременности. Наблюдава се значително намаление в пролиферативната скорост на вилозния цитотрофобласт оценен чрез Ki67 в децидуата при спонтанни и повтарящи се спонтанни аборти (164).

Нарушената ангиогенеза по време на децидуализацията и ремоделирането на спиралните артерии повлиява утеро-плацентарния кръвоток. Нарушеният кръвоток на маточните артерии може да бъде диагностициран чрез Доплерова велосиметрия (118). Доплеровото изследване е неинвазивен ехографски метод. Чрез него се оценява утеро-плацентарната циркулация. Доплерът в акушерството се използва като средство за скрининг, диагностика, контрол на прилаганата терапия и като инструмент за научно-изследователска дейност (5). Няма изградена програма за скрининг при следваща бременност и ранна превенция на спонтанните аборти. До момента никога не е проучвана българската популация бременни жени със спонтанни аборти чрез Доплерова велосиметрия в комбинация с имунохистохимичния анализ.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Исторически преглед на проблема

Спонтанни аборти са се случвали през цялата човешка история. Древните цивилизации са разпознавали появата на загуба на бременност и са документирали различни признаци и симптоми, свързани със спонтанните аборти.

Историческите данни за диагностицирането на спонтанен аборт са ограничени, тъй като ранната медицинска документация се фокусира повече върху живородените, отколкото върху загубата на бременност.

Древни медицински текстове от цивилизации като древен Египет, Месопотамия и Гърция описват разпознаването на загубата на бременност въз основа на симптоми като вагинално кървене, коремна болка и изхвърляне от бременната на тъкани. Древноегипетски папируси на Еберс, датиращи от 1550 г. пр. н. е., правят препратки към загуба на бременност и гениталното кървене. Гърция и Рим се е смятало, че спонтанните аборти са причинени от различни фактори. Гръцкият лекар Хипократ, често смятан за бащата на медицината, признава, че някои заболявания или наранявания могат да доведат до спонтанен аборт. Гръцкият лекар Соран от Ефес, практикувал през 2 век от н.е., документира медицински техники за лечение на усложнения на бременността, включително и на спонтанни аборти (193, 239).

През периодите на Средновековието и Ренесанса разбирането за репродуктивното здраве и причините за спонтанните аборти са повлияни от религиозни и културни вярвания. Спонтанните аборти често се разглеждат като резултат от божествена воля или наказания, а медицинските обяснения са ограничени (93).

В периода 17-ти до 19-ти век научните изследвания свързани с ембриологията и човешката репродукция започват да напредват. Лекарите и акушерките от този период разчитат на клинични наблюдения и история на пациента, за да диагностицират спонтанни аборти. Симптоми като вагинално кървене, коремна болка и изхвърляне на бременна тъкан са разпознати като признаци на спонтанен аборт. Религиозните и културни вярвания продължават да

влият на отношението към спонтанните аборти. В някои общества спонтанните аборти все още се смятат за действие на Бог или божествена воля. Възприемането на спонтанния аборт като следствие от морални прегрешения се запазило до известна степен (56,93).

Значителния напредък в медицинските познания, технологии и здравни практики през 20-ти век, повлияха на разбирането, диагностиката и управлението на спонтанните аборти. Медицинските специалисти придобиха по-задълбочено разбиране за ембриологията, развитието на плода и факторите, които могат да допринесат за спонтанни аборти. Това знание доведе до по-точни диагнози и подобрени подходи за лечение. Въвеждането и широкото използване на ултразвуковата технология направи революция в диагностиката на спонтанните аборти. През 20-ти век се насочват значителни изследователски усилия, насочени към разбирането на причините и рисковите фактори, свързани със спонтанните аборти. Проучванията изследват генетични фактори, хормонален дисбаланс, аномалии на матката, инфекции и други потенциални фактори, като причина за спонтанни аборти. Тези изследвания доведоха до по-задълбочено разбиране на проблема и разработването на стратегии за превенция и лечение.

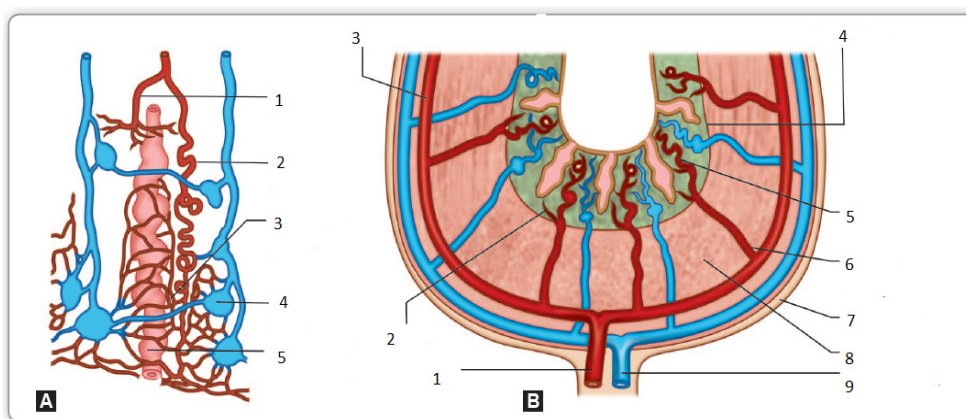
2. Анатомия на кръвоносните съдове на матката и промените им по време на бременност

Кръвоснабдяването на матката по време на нормално протичаща бременност се увеличава многократно, за да може да задоволи покачващите се метаболитни нужди на растящата матка, на плода и плацентата. То се осъществява от три чифта кръвоносни съдове: маточните артерии, овариалните артерии и клонове на *a. vesicalis*. От най-голямо значение за бременната матка са маточните артерии (31).

Маточната артерия (*a. uterina*) е чифтна артерия, която произхожда най-често от *a. iliaca interna dextra et sinistra* с дебелина на лумена от 3 мм. Спуска се по страничната тазова стена и се насочва косо – напред и медиално. Тя върви успоредно с уретера, насочва се към срединната линия, на нивото на истмуса и приблизително на 2 см от маточната шийка тя го прекръстосва, като минава пред

и над него (26). На нивото на маточната шийка, маточната артерия се разделя на възходящ (асцендентен) клон – за тялото на матката, маточната тръба и яйчника, и низходящ клон (десцендентен) клон – за маточната шийка и влагалището. Асцендентната артерия е по-големият клон, върви краниално и достига маточното дъно, където лявата и дясната маточна артерия анастомозират помежду си. По своето протежение артерията дава множество разклонения за кръвоснабдяване на предната и задната маточна стена, без самата тя да навлиза в матката.

Напречните артериални съдове от асцендентния клон на маточната артерия, които достигат и кръвоснабдяват средната трета от маточната стена се наричат аркуатни артерии. Аркуатните съдове се разделят на по-малки съдове - радиални артерии, които вървят в перпендикулярна посока към ендометриума и остават в пределите на миометриума. От радиалните артерии се отделят базалните артерии. Базалните артерии кръвоснабдяват базалния и функционалния слой на ендометриума. Във функционалния слой, базалните артерии се разклоняват на спирални артерии (Sas) – Фиг.1. Спиралните артерии са многократно по-дълги от базалните артерии и кръвоснабдяват функционалния слой на ендометриума, а по време на бременност плацентата (12).



Фиг. 1. А. 1.Базални артерии 2. Спирални артерии 3.Капилярни плексуси 4.Венозни езерца 5.Жлези; В. 1.Маточна артерия 2.Базална артерия 3.Аркуатна артерия 4.Ендометриум 5.Спирална артерия 6.Радиална артерия 7.Периметриум 8.Миометриум 9.Маточна вена

Бременността е физиологичен процес, който протича с завишени изисквания към майчиния организъм. Един от адаптивните процеси е намаляването на периферната резистентност на съдовете. Проникващите в децидуата и

миоетруима трофобластни клетки се разрастват и водят до разпадане и разтваряне на отговарящите за вазоконстрикцията мускулоеластичи. Този процес засяга основно спиралните артерии, в по-малка степен и радиалните артерии, и завършва напълно в края на 2-рия триместър. Изследване на проби от плацентарното ложе след цезарова хистеректомия, установява, че лумена на спиралните артерии натермин варира от 0,5 до 1 квадратен сантиметър (115). Brosens и сътрудници, съобщават, че отворите на спиралните артерии са топографски съседни на плацентарните прегради и 96% от спиралните артерии от нормална бременност имат находки за физиологична трансформация (64).

След инплантация на концептуса спиралните артерии, които се намират в плацентарното ложе, претърпяват съществени анатомични и функционални промени поради трофобластната инвазия и се определят като утеро-плацентарни артерии. Те се преобразуват в широки дилатирани съдове, а съдовата им стена преминава през значителна структурна реорганизация. Основните анатомични и физиологични промени, които протичат в спиралните съдове са разширяване на лумена на съдовете, чрез загуба на васкуларни гладкомускулни клетки (VSMCs) и част от слоя на ендотелните клетки (271). Децидуалните NK клетки - dNK клетки, се инфилтрират близо до SAs, експресират широк спектър от матриксни металлопротеази- MMPs, които могат да инициират ранно разграждане на извънклетъчната матрица на SAs в отсъствието на екстравилозен трофобласт - EVTс (82). Дестабилизирането на съдовата структура и SA трансформация се контролира от фактори, секретирани от dNK клетки - хемокини, цитокини и вазоактивни фактори, като IL-8, TGF- β , ангиопоедин-1/2 (Ang1/2) и VEGF-C (186,261).

VEGF е хомодимерен, хепариносвързан гликопротеин, участващ като важен медиатор в ангиогенезата и стимулатор на съдовия пермеабилитет. Той е важен фактор в патогенезата на овариалния хиперстимулационен синдром след IVF процедури. Неговата секреция се повишава от въздействието на екзогенния и ендогенен ЧХГ, индуцира екстравазацията на плазмата и последваща хемоконцентрация и хиповолемия (15).

Миграцията на ендоваскуларния трофобласт в спиралните артерии протича на две отделни вълни. Първата вълна започва през 2-рия месец от бременността и

продължава около 10 седмици. През този етап на инвазия има промени в спиралните артерии до границата между базалния слой на децидуата и миометриума. Втората вълна започва между 14-та и 16-та седмица на бременност и продължава 4-6 седмици. Тази вълна включва сегмента на спиралните артерии в миометриума, точно до дисталните сегменти на радиалните артерии (137). По този начин се намалява утероплацентарното съдово съпротивление, а периферното съдово съпротивление е намалено с 40%, в сравнение с небременно състояние (12). Тези процеси могат да се наблюдават при серийни изследвания с Doppler ехография, при които се установява намаление на индекса на съпротивление и изчезване на постсистоличната инцизура (Notch) в профила на маточната артерия към края на 23 г.с. (4,13).

Смисълът на преустройството в съдовете е осигуряване на максимална доставка на артериална кръв в интервилозните пространства (4,13). Модификацията на тези артерии е от съществено значение за образуването на човешката плацента и протичането на безпроблемна бременност. Тя позволява необходимия трансфер на хранителни вещества между майката и плода (221,237).

Непълната трофобластна инвазия на спиралните артерии предизвиква плацентарна хипоперфузия (намаление на кръвотока към плацентата) с последващо освобождаване на медиатори, водещи до ендотелна дисфункция, вазоконстрикция на съдовете, капилярна пропускливост, тромбоцитна дисфункция и хиперкоагулация (17,230).

Провала във физиологичната трансформация на спиралните артерии в първи и втори триместър намалява притока на кръв в утероплацентарната единица (19,21,50). Това клинично може да се изяви в ранна бременност като загуба на плода – спонтанен аборт, а в късна бременност като прееклампсия, бременност с IUGR и/или смърт на плода.

3. Имплантация, трофобластна инвазия и плацентация на концептуса

Правилната имплантация и плацентация са от съществена важност за успешното и нормално развитие на ембриона и протичане на бременността.

Нарушения в процеса на имплантация и плацентация могат да доведат както до спонтанен аборт, така и до усложнения във втората половина на бременността, като преждевременно раждане или прееклампсия.

Имплантацията е процес, при който бластоциста се прикрепя към определена зона на вътрематочната стена. Имплантацията включва следните процеси: ориентиране на бластоциста в матката, разпадане на zona pellucida, прикрепване и миграция на бластоциста през ендометриалния епител и образуване на трофобластни лакуни. Процесът на имплантация започва на шестия или седмия ден след оплождането и е с продължителност от 40 часа (298).

Оплодената яйцеклетка навлиза от маточната тръба в маточната кухина във фаза на морула. Морула се нарича стадият, в който ембрионът има 20-25 клетки и е заобиколен от zona pellucida. След попадането в маточната кухина zona pellucida дегенерира и отпада, а в морулата се образува пространство с имбибирана течност. Морулата преминава в стадий бластула (бластоцист), на който стадий от развитието става имплантацията. По време на имплантацията бластоциста е съставен от 100-250 клетки, той свободно се прикрепва с бластоцистната си трофктодерма чрез апоозиция (ориентиране) към повърхността на ендометриума. Успешната адхезия на бластоциста към ендометриума е вследствие на експресия на интегрини– клетъчни адхезионни молекули (CAMs) (194). Успешната адхезия поставя началото на плацентацията, установява утероплацентарна циркулация и поставя трофобласта в пряк контакт с майчината кръв. Регулацията на имплантацията се осъществява посредством множество сигнали на молекулно и клетъчно ниво. В синхрона на бластоцистната инвазия и маточната възприемчивост участват полови стероиди, пептидни хормони, растежни фактори, цитокини и имунологични фактори (147,156,292).

Успешната имплантация изисква нормален, функциониращ ембрион на етап на развитие бластоцист и възприемчив, подготвен ендометриум на матката. Периода от време, през който матката е подготвена да приеме бластоциста се нарича „прозорец за имплантиране” (298). По време на „прозорец за имплантиране” ендометриалните клетки включват формирането на пиноподи, активниране на някои клетъчно-адхезивни молекули, засилена продукция на

цитокини и растежни фактори и други процеси, контролирани от простагландини, пептидни и стероидни хормони (14).

По време на средната секреторна фаза от менструалния цикъл- “прозорец на имплантация”, dNK клетки са основните левкоцити в ендометриума. Те представляват $\leq 30\%$ от общите лимфоцити в ендометриума през този период и 70-80% от общата левкоцитна популация в децидуата в ранна бременност (77). Поради голямото количество на dNK клетки през тези периоди се предполага, че те имат решаваща роля в имплантацията и децидуализацията.

Децидуализацията на ендометриума при хората се задейства независимо дали има концепция или не. По време на бременност, след като се започне децидуализация, състоянието на ендометриума се превежда от фенотип на остро възпалително начало към противовъзпалителен фенотип. Този процес е придружен от масивна инфилтрация на имунни клетки- dNK клетки. Броят на NK клетките започва да се увеличава около LH+3 (преди децидуализация), а в късната секреторна фаза са голям брой гъсто разпръснати из стромата. Тези открития предоставят данни, че NK клетката може да бъде свързана с децидуализацията (299). Диференцирането на ендометриалните стромални клетки (ESCs) в специализирани децидуални клетки е най-типичната характеристика на децидуализацията. Голям набор от хормони, цитокини, растежни фактори и морфогени участват в регулирането на този процес (121). Джан и ав. показват, че dNK клетките улесняват децидуализацията на ембрионалните ESC чрез секретиране на IL-25 (301).

dNK клетките от случаи на спонтанни аборти отделят по-високо ниво на TNF- α , който инхибира децидуализацията на ESC чрез намаляване на децидуалните маркери пролактин (PRL) и инсулиноподобен растежен фактор свързващ протеин-1 (IGFBP-1) (114). Децидуалните стромални клетки (DSCs) показват повишена аутофагия по време на децидуализацията и ускоряват пребиваването и обогатяването на dNK клетки по време на нормална бременност.

По време на прозореца на имплантиране, матката се „подготвя“ под действието на яйчникови хормони, за да освободи провъзпалителни цитокини и хемокини, включително IL-8, IL-15, IL-6, CXCL10 и CXCL11, (267) които активират и набират големи популации от децидуални имунни клетки към

ендометриума по време на имплантирането. Основата на успешната имплантация зависи от способността на рецептивния ендометриум да предостави кръвоснабдяване на концепцията. Скорошно проучване показва, че dNK клетките действат като биосензори на човешки ембриони с ниско качество. Бластици с ниско качество, които не успяват да се имплантират, секретират по-ниски нива на хиалуронидаза 2 (HYAL2), член на семейството на хиалуронидази, който регулира количеството на хиалурон (HA) в тъканта. Ниските нива на HYAL2 и високите нива на HA с високо молекулно тегло (HMWHA) инхибират медираното от dNK клетки изчистване на стареещи децидуални клетки. Следователно dNK клетките определят съдбата на ендометриума при имплантиране (172).

През първите седмици от бременността, т.е. периода на имплантиране на ембриона, трофобластните клетки експресират разтворим HLA-G (sHLA-G). Той се свързва с NK клетъчния рецептор KIR2DL4. Това води до провъзпалителен/проангиогенен отговор, който е свързан рецептивността на ендометриума (246). С напредването на бременността dNK клетките елиминират стареещите децидуални клетки, за да регулират подмладяването и ремоделирането на ендометриума при имплантиране на ембриона и да поддържат хомеостазата на ендометриума (63). Експресията на прокинетицин 1, секретирани от dNK клетки, се повишава по време на средната секреторна фаза на менструалния цикъл и се увеличава допълнително в ранна бременност. Прокинетицин 1 контролира експресията на серия от фактори, свързани с имплантацията, включително инхибиторен фактор на левкемия, IL-11 и простагландини (109,142). Повишените dNK клетки при жени, които са имали повтарящи се ранни загуби на бременност, допринасят за патологично удължаване на прозореца на ендометриалната възприемчивост, което позволява аномални или забавени ембриони да се имплантират (303).

Изчерпването или отсъствието на NK клетки води до неблагоприятни резултати (намален брой имплантирани ембриони, повишена загуба на ембриони и нарушения на ангиогенезата) при бременни мишки и подчертава важността на NK клетките при установяването и поддържането на нормална бременност (45,199).

След имплантирането и децидуализацията започва вторият важен етап от бременността – плацентацията, който протича с бърз растеж на плацентата и развитие на ембриона. По време на плацентацията, трофобластната инвазия и съдовото ремоделиране са най-критичните моменти. Намалената инвазия на трофобласти и нарушена съдова конверсия води до лоша плацентарна перфузия, която се смята за основен първичен дефект на често срещаните нарушения на бременността (напр. повтарящи се спонтанни аборти, прееклампсия и IUGR (65). По време на образуването на плацентата, ролята на dNK в регулирането на инвазията на екстравилозен трофобласт (EVT) зависи от гестационната възраст (188).

Имунохистохимично оцветяване разкри, че dNK клетките експресират EGF (епидермален растежен фактор) протеин от 6-ти ден на бременността. Имунореакцията е много силена от 6-ти до 9-ти ден и на ден 15 (180).

Няколко проучвания предполагат, че dNK клетките в 8-10 г.с. произвеждат главно ангиогенни растежни фактори, които са свързани с ремоделиране на спиралната артерия (186). По-късно между 12-14 седмици dNK клетките произвеждат главно цитокини (IL-8, INF- γ , индуцируем протеин, и IP10), които стимулират инвазията на EVT чрез увеличаване на секрецията на MMP-9 и намаляване на апоптозата на EVT (188). Установено е, че прекомерната инвазия на EVT може да доведе до по-дълбоко врастване на плацентата- плацента акрета. Този процес се контролира от dNK и наборът от активни субстанции, които те секретират, за да инхибират прекомерната инвазия на трофобласта в по-късни етапи (185,187). Когато трофобластите завършат своята инвазия (~20-та седмица от бременността), броят на dNK клетките започва да намалява (68).

Гестационната трофобластна болест/моларна бременност/ е неоплазия на бременността, която се развива от трофобластните елементи на бластоциста. Моларната дегенерация може да е тотална- засяга цялата плацента, и парциална- само част от въсите. При тотална мола липсват фетални структури, а в последствие може да се развие персистираща трофобластна болест- неметастатична (инвазивна мола) или метастатична (хориокарцином) (175). Иммунохистохимични анализи на тотална моларна бременност установява (144):

- наличие на хетерогенна популация от хорионни въси, вариращи от малки до изключително големи власинки с изразен оток и често откриване на централни кавитации;
- мукозна стромална дегенерация;
- кариоректични остатъци в стромата;
- пролиферация на синциотиотрофобласти и цитотрофобласти.

4. Имунология на плацентата

Майчино-феталното пространство се състои главно от децидуална строма на майката, инвазивния плацентарен трофобласт и майчини имунни клетки. През бременността се установява активиране на хуморалния и клетъчен имунитет, което се доказва с повишен брой моноцити и гранулоцити открити в кръвта на майката (256). Наличието на майчини имунни клетки с подходяща активност и функция е абсолютно необходимо за успешната бременност (233). През първия триместър на бременността повечето от майчините левкоцити, присъстващи в децидуата, са NK клетки, а останалите са макрофаги, Т клетки и дендритни клетки (69,288).

Други имунни клетки като мастни клетки, В-клетки и вродени лимфоидни клетки също присъстват при ниско ниво (223). Ролята на доминиращите имунни клетки на майчино-феталното пространство е оптимизиране на регулацията на имунната система за успешна концепция и нормално протичане на бременността.

По време на имплантацията екстравилозният трофобласт навлиза в децидуата, а вилозният синцитиотрофобласт е в директен контакт с майчината кръв. Тези процеси са възможни само при избягване на имунния отговор на майката или имунна инерция/имунотолерантност. Това се доказва с наличието на фетални клетки и фрагменти от плацентата в кръвообращението и органите на майката, понякога идентифицирани десетилетия след бременността (60,282). Тези фетални клетки могат да се диференцират в други функционални типове клетки, в зависимост от средата (60). Ключовите механизми, използвани от плацентата за насърчаване на имунна адаптация на майката са експресия на човешки

левкоцитен антиген, механизми за инактивиране на Т клетки и контролирана апоптоза свързана с TNF.

Антигени от клас I на основен комплекс за хистосъвместимост (MHC), известен също като човешки левкоцитен антиген (HLA), се експресират на повърхността на повечето ядрени клетки и си взаимодействат с рецептори на NK и Т клетки, за да позволи на имунната система да различи външните клетки от собствените си (174). Класическият HLA клас Ia (HLA-A, -B и -C) са силно полиморфни и неповлияват имунната система. За разлика от тях, клас Ib HLA (HLA-E, -F, и -G) са „некласически“ и показват ограничени полиморфизми. За да се избегне майчиното имунно отхвърляне, човешката плацента няма полиморфни HLA-A и HLA-B антигени, но експресира HLA-C, както и некласическите HLA-E, HLA-F и HLA-G (249). Въпреки че плодът проявява нормални модели на експресия на MHC, човешкият синцитиотрофобласт, който е в контакт с майчината кръв по време на бременността, не изразява никакви HLA, което позволява на плацентата да избегне периферното майчино имунно разпознаване. За разлика от това, екстравилозният трофобласт, който нахлува в децидуата на майката, е положителен за HLA-C, HLA-E, HLA-G и HLA-F (136). Тези HLA действат като потискат или модулират майчините имунни отговори чрез взаимодействие с имуноглобулиноподобни рецептори – KIRs, върху dNK клетки, макрофаги и подгрупа от Т клетки и с Т клетъчния рецептор върху CD81 Т клетки (148). По-специално, HLA-E и HLA-G, експресирани от екстравилозния трофобласт могат да инхибират цитотоксичната активност на NK и Т клетките и вместо да модулират имунната клетъчна функция да насърчават миграцията на трофобласта и плацентацията (113) HLA-G освободен от плацентата чрез екзозомите, модулира функцията на отдалечените от нея NK и Т клетките. Друг механизъм, по който HLA-G влияе върху функцията на dNK клетките и Т клетките, е трогоцитоза, където NK и Т клетките, които са придобили HLA-G, са имunosупресивни (113,148). HLA-C на EVT взаимодейства с KIR2DL1,2,3 и KIR2DS1,2- единственият активиращ рецептор, върху dNK. Доказани са два HLA-C алела: C1 свързан с KIR2DL2,3 и C2 свързан с KIR2DL1 (218). Комбинациите KIR / HLA-C водят до неефективна инвазия на EVT, свързана с развитие на

пreekлампися (219). Въпреки това, при бременности, с установен KIR/HLA-Cw генни комбинации, dNKклетки имат защитен ефект (294).

Механизмите на плацентата за инактивиране на Т клетки са чрез семейството на В7 протеини, Галектин-1 и Индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO). В7 протеините определят отговора на Т клетките след активирането им от антиген-представящи клетки. В7 протеините обикновено се експресират от антиген-представящи клетки, въпреки че трофобластите също ги експресират, особено синцитиотрофобласта и екстравилозния трофобласт, като нивата се увеличават по време на бременността. Членовете на семейството В7 могат да бъдат или стимулиращи, или инхибиторни за активиране на Т клетки. Те могат да играят важна роля в поддържането на имунната толерантност на майката (233).

Галектин-1 се експресира от ендометриума, и нивата му се регулират от естроген и прогестерон (54). По време на бременност, галектин-1 се експресира от трофобласта. Дефицитът на галектин-1 увеличава загубата на плода при бременни мишки (62). Добавянето на рекомбинантен галектин-1 в мишки, предотвратява отхвърлянето на плода чрез индуциране на толерогенни дендритни клетки, които насърчават експанзията на IL-10-продуциращи Tregs.

Индоламин 2,3-диоксигеназа е ензим, който метаболизира основната аминокиселина триптофан към кинуренин (73). Въпреки че първият триместър плацентарната експресия на IDO е все още противоречива, множество проучвания съобщават, че IDO се експресира от трофобласти от втория триместър на бременността нататък и от децидуалните макрофаги (55,73). Т-клетките разчитат на триптофана за пролиферацията си, изчерпването на триптофан от IDO блокира прогресията на клетъчния цикъл в активирани Т клетки и индуцира тяхната апоптоза (225).

Вроденият имунитет на бременната е необходим за подготовка на антиген-представящи клетки (макрофаги и дендритни клетки), за да инициира Т-хелпер (Th) и В-клетъчен имуен отговор. Вилоният трофобласт въздейства на имунната реакция на майката чрез производство на цитокини. Установено е, че трофобластните клетки култивирани *in vivo* секретират IL-10 (138,254,206) и експресират иРНК за IL-10, IL-4 и IL-13 (206). Производство на IL-10 рецепторна иРНК и протеин предполага силно Th2 действие на тези клетки (207). Прогестерон

и hCG- синтезирани от ST, причиняват промени на имунитета от Th1 (IL-2, IL-12, IL-15, интерферон- γ) - клетъчно медиран имунитет, към Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) – хуморален имунитет (236).

Проучванията са съсредоточени върху изследването на ендометриума на жени с повтарящи се неуспехи след IVF, установяват по-голям брой dNK клетки в предимплантационния ендометриум на жените с повтаряща се неуспешна имплантация (183,191).

Ledee-Bataille et al., през 2005 откриват голям брой dNK в ендометриума на жени с рецидивиращ неуспех за имплантация. Същият екип доказват, че dNK клетки са само част от сложен набор от имунни и съдови аномалии открити при тези пациенти (191).

При жени с нормален фертилитет 1 от 3 бременности завършва със спонтанен аборт и само около 50% могат да се дължат на фетални хромозомни аномалии. Съобщава се за имунологични промени в децидуата на жени със спонтанен аборт и повтаряща се загуба на бременност. Най-добре описаната имунологична дисрегулация при тези жени е промяната в броя и функцията на NK клетките. Прекомерно увеличение и/или експанзия на dNK клетки, както и повишена цитотоксична активност, са свързани с неуспехи при имплантиране и RPL. Въпреки съществуващите данни, имунологията на нормалната човешка бременност остава загадъчна и са необходими допълнителни изследвания, за да се разбере ролята ѝ в оплождането, протичането на бременността и при патологична бременност (234, 181).

5. Спонтанен аборт – определение, класификация и етиопатогенеза

5.1. Определение

Под аборт се разбира загуба или прекъсване на бременност, преди плодът (плодовете) да е (са) станал (и) потенциално жизнеспособен (жизнеспособни). Според Наредба № 9 от 27 Април 2021 год. За утвърждаване на „Медицински Стандарт по Акушерство и Гинекология“-, „потенциална жизнеспособност на плода“ е термин, който се въвежда за плод от бременност достигнала срок 25+0 гестационни седмици и/или при тегло на плода равно на и над 700 грама (27).

Според световните критерии под аборт се разбира смърт на ембриона или плода, преди да е в състояние да оцелее самостоятелно до 21 г.с. (283).

5.2. Класификация

Абортите са две основни групи (5):

- Спонтанни аборти – Abortus spontaneous
- Изкуствени (Предизвикани) аборти – Abortus artificialis.

Спонтанните аборти могат да се разделят в различни групи и подгрупи според различни критерии.

Според гестационната седмица абортите са две групи:

- Ранни спонтанни аборти до 12 г.с.
 - пре-ембрионален аборт до 5г.с
 - ембрионален аборт 5-10г.с
 - фетален аборт след 11г.с.
- Късни спонтанни аборти след 12 г.с.,

Ранни спонтанни аборти според клиничната им картина са:

- Биохимичен аборт (Biochemical loss) (184)
- Заплашващ (Abortus imminens)
- Започващ (Abortus incipiens)
- Прогресиентен (Abortus progrediens)
- Инкомплетен (Abortus incompletus)
- Комплетен (Abortus completus)
- Задържан (Missed abortion)

Късните спонтанни аборти според клиничната картина се разделят както ранните: заплашващ, започващ, започващ, прогрессиентен, инкомплетен, комплетен и задържан. По механизма на протичане късните аборти могат да са:

- Аборт тип раждане
- Аборт тип цервикална недостатъчност.

Към спонтанните аборти се включват хабитуалните аборти- които могат да са ранни и късни и абортите тип кухо яйце (blighted ovum).

Изкуствените аборти са аборт по желание, аборт по медицински показания и криминален аборт (5).

Различни международни асоциации класифицират повтарящите се спонтанни аборт в отделна група аборти. Повтарящи се спонтанни аборт се определят като ≥ 3 последователни спонтанни аборта и/или повтарящи се загуби на бременността. Според Американското дружество за репродуктивна медицина (ASRM) и Европейската асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE) повтарящи се спонтанни аборти (RPL) са тези с ≥ 2 спонтанни аборта, като спонтанните аборти не е необходимо да са непременно последователни (46,107).

5.3. Етиопатогенеза

Загубата на бременността е с различна честота и с различни причини в зависимост от срока на концепцията. Ранните спонтанни аборти са свързани с ранно настъпване на смърт на ембриона/фетуса и трудно може да се установи точната причина. При късните аборти след 12 г.с. може да се установи все още жив фетус, тези случаи най-често причината се търси извън него.

Основните причини за спонтанни аборти могат да се разделят в четири основни групи: от страна на плодното яйце, от страна на майката, от страна на бащата и от фактори на околната среда.

Фактори за спонтанни аборти от страна на майката са: напреднала възраст на майката, инфекциозни заболявания, ендокринни заболявания, маточни аномалии, тромбофилии, имунологични фактори, травми и оперативни намеси (5).

Имунният отговор на майката към ембриона и дефектите в ранното развитие на плацентата стоят в основата на сериозни усложнения на бременността. Клетките на имунната система са ключови във взаимодействието на майката с имплантирания се ембрион. Успешната репродукция е резултат от взаимодействие между имунологични и имуногенетични фактори. Неспособността за зачеване и/или износване на плода може да се дължи на нарушен имуногенетичен толеранс на майката спрямо семи-алогенния плод, с включване на хуморални и клетъчни ало- и автоимунни реакции. Установени са ролята и

ефектът на множество имунологични фактори, които влияят върху различни етапи на оплождането, нидацията, плацентацията и по-нататъчното развитие на бременността. Те се разделят на две групи – ембрионални и имплантационни. Ембрионалните имунологични фактори влияят върху фертилизацията и оформянето на ембриона до неговата имплантация. Имплантационните фактори оказват ефект върху имплантацията и феталното развитие. Имунологичните фактори, които с най-висока честота се асоциират и изследват при спонтанните аборти са: антифосфолипидни антитела, антитиреоидни антитела, антинуклеарни антитела и НК клетки (16).

На имунологичните фактори се дължат 15% от абортите, а жени с анамнеза за ранен аборт и данни за висок титър на антитела, имат 70% риск от повтарящ се аборт (5).

Счита се, че балансът между Th1/Th2 клетките, произвеждащи голямо количество цитокини, е определящ фактор за имплантацията. Лимфоцитите са негранулирани бели кръвни клетки и са част от имунната система. Разделят се на два вида – големи лимфоцити, които включват НК-клетките и малки лимфоцити – Т- и В-клетките (152).

По време на бременност dNK клетките представляват около 70-80% от децидуалните лимфоцити (139,140,141). DNK клетки са подгрупа на НК клетките, които не упражняват цитолитична функция към трофобластните клетки (169) и са с намалена цитолитичност (141,173). Nk клетките от периферната кръв се характеризират като CD16+CD56dim, а повечето dNK клетки са с CD56brightCD16-KIR+CD9+CD49a+ фенотип и са с по-висока секреция на цитокини (197). Доказано е, че dNK клетки пролиферират, особено в секреторната фаза на менструалния цикъл и в ранна бременност, тъй като оцветяват положително пролиферативния маркер Ki67 (105,264).

В научната литература има описани три възможни произхода на dNK клетките (98,131,145):

1. CD16-NK клетките се привличат от хемокини и имигрират от периферната кръв директно в децидуата, където се диференцират в dNK клетки под децидуална микросреда.

2. dNK клетките се диференцират от хематопоеичните прогениторни клетки в матката.
3. dNK клетки се конвертират директно от CD16⁺ pNK клетки.

Серия от проучвания при мишки, хора и *in vivo*, установяват, че dNK клетките са хормонално регулирани чрез индиректни механизми. Прогестеронът действа върху ендометриалните T клетки и стромалните клетки, засягайки васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF) и макрофагиалния възпалителен протеин-1 β , за да увеличи броя на dNK клетки в матката и пролактин, чрез интерлевкин -15, за увеличаване на пролиферацията и диференциацията на dNK клетки (98,131,145).

In vitro изследвания показват, че могат да възникнат взаимодействия dNK клетки/екстравилозен трофобласт и това взаимодействие изглежда има физиологична роля в регулирането на развитието на плацентата. Установена е разлика в секреторната активност на dNK клетки в различните етапи на развитие то й– между 12-14 г.с. dNK клетки произвеждат повече цитокини и по-малко ангиогенни фактори от тези в периода между 8-10г.с. (94,186)

Важен резултат от взаимодействието dNK клетка/екстравилозен трофобласт е производството на набор от цитокини:

- Tumour necrosis factor- α (TNF- α) ;
- Interferon- γ ;
- Interleukin 8;
- Interleukin 10;
- Transforming growth factor beta (TGF- β) ;
- leukaemia inhibitory factor;
- Placental growth factor (PlGF) ;
- Serum vascular endothelial growth factor (VEGF-C) ;
- Granulocyte–macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ;
- Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) ;
- Macrophage inhibitory factor (MIF).

Всички те от своя страна имат потенциал да повлияят на развитието на плацентата (68,171,218,288).

По време на имплантацията на оплодената яйцеклетка, dNK клетки се натрупват като плътен инфилтрат на мястото на нишката близо до стромалните клетки, жлези, кръвоносни съдове и трофобластни клетки (170). In Vitro проучвания също показват взаимодействие на екстравилозния трофобласт и dNK клетките (218).

Имплантирането на ембриона и развитието на ранна бременност възникват в относително хипоксична среда 2-3% O₂ (251). Нарушеният приток на кръв към интравилозното пространство е свързано с оксидативен стрес на развиващата се плацента и може да доведе до спонтанен аборт (157). Установена е положителна корелация между по-голямата плътност на dNK клетки отговорни за ендометриалната ангиогенеза и кръвотока в маточните артерии при жени с RPL (244). Подобна корелация се установява и при жени с необясними рецидивиращи неуспехи подложени на ин витро оплождане (192).

В Ferricone et al. В проучване върху жени с повтарящи се спонтанни аборти - RSA, откриват увеличение в процент на CD56⁺ клетки (232). Също така в изследване на Hadinedoushan et al. доказват, че при RSA пациенти, dNK са с по-висока цитотоксичност от нормалната спрямо бременна жени без анамнеза за аборт (135). Atia et al показат, че броят на CD56⁺ децидуални NK клетките се увеличават значително в случаите на RSA (48).

Предполага се, че повишената плътност на dNK клетки е свързана с увеличен брой спирални артерии, които могат да доведат неподходящ приток на кръв към развиващата се фетално-плацентарна единица. Това би било причина за оксидативен стрес и последващ спонтанен аборт (244).

6. Диагноза, лечение и скрининг на спонтанните аборти

6.1. Диагноза

Признаците за ранна загуба на бременност варират и често могат да бъдат объркани с усложнения или симптоми на нормална вътрематочна бременност, както и на извънматочна бременност. Най-често пациентите имат тазов и/или коремен дискомфорт с или без вагинално кървене при положителен тест за бременност или абнормен менструален цикъл (97).

6.2. Клинична картина

Базира се на анамнестичните данни относно менструалния цикъл и оплакванията на пациентката.

- Генитално кървене

Основните симптоми при спонтанен аборт са генитално кървене или само т.нар. spotting, в комбинация с различна интензивност на болков синдром. В част от случаите споменатите симптоми са дискретни или отсъват от снетата анамнеза (91).

Зацапването или кървенето може да е непрекъснато или да е с интермитентен характер в продължение на дни или дори седмици. Това не е сигурен маркер за наличието на спонтанен аборт (129).

- Болка

Болката обикновено е в надпубисната област, но съобщения за болка в единия или двата долни квадранта не са необичайни. Тя може да ирадира към долната част на гърба, корема, гениталиите и перинеума.

Ако болката е пределекционно едностранна, в диференциално диагностичен план би следвало да се включи извънматочна бременност, хетеротопична бременност или руптура на киста/жълто тяло на яйчника като възможни причини.

- Гадене и повръщане

Ранни доказателства от клинични доклади през 50-те години на миналия век предполагат, че някои комбинации от признаци и симптоми могат да предвещават загуба на бременност. Speert и Guttmacher отбелязват, че сред 31 частни пациентки със загуба през първия триместър над 75% не са имали гадене и повръщане. Докато сред 225 жени, които не са имали загуба, включително 49, които съобщават за кървене, 70% съобщават за прояви на горепосочените. Те заключават, че по-обилното и продължително кървене, придружено от спазми в долната част на корема при липса на гадене е с по-висок процент на термиране на бременността (276).

Според Елизабет А ДеВилбис от април 2020г. жени, с генитално кървене без гадене между 6 и 8 гестационна седмица, са имали повишен риск от клинична загуба на бременност. Но според проучването, кървенето и гаденето не са

предикторни рискови фактори за загуба на бременност преди 6 гестационна седмица (95).

6.2.1. Лабораторни изследвания:

- ПКК

Лабораторните изследвания са важна част от диагностичния процес и проследяване на пациентките с клинични и образни данни за спонтанен аборт. Резултатите имат освен информативен и прогностичен характер относно количеството на кръвозагуба и наличието на възпалителен процес. Интерпретацията на резултатите би следвало да бъде съобразена с физиологичните промени, настъпващи по време на бременност и според триместъра.

- Коагулационен стаус

Изследването на коагулационния стаус е задължителен компонент в процеса на диагноза при данни за спонтанен аборт. Належащите процедури в процеса на лечение, изискват информация за изходните нива и определяне на необходимостта от трансфузия на кръвни продукти.

- CRP

Възпалението е основен елемент в развитието на ранна бременност (76). Възпалителните процеси са част от регулаторния механизъм в имплантацията и децидуализацията през ранните етапи на бременността (106).

Известно е, че маркерите на възпаление се покачват през първи триместър и намаляват постепенно във втори и трети триместър. Силно увеличение на CRP в ранна бременност е лош прогностичен фактор и много от тези бременности развиват гестационни усложнения (112,222).

- Кръвна група и Rh

Кръвната група и скринингът са важни, за да се определи дали лечението с RhoGAM е подходящо. Rh-отрицателна жена трябва да получи RhoGAM в рамките на 72 часа след спонтанен аборт или извънматочна бременност, за да се избегне възможността за изоимунизация на майката от потенциално отрицателен плод. При случаи с обилни метрорагии в хода на аборт, с клинични прояви на хеморагичен шок е изключително важна информацията за кръвната група и Rh,

предвид необходимостта от хемотрансфузии с цел стабилизиране на пациентките и възстановяване на кръвния обем.

- Урина:

Анализът на урина е задължителен компонент с оглед диференциално диагностично уточняване при съмнение за възпалителен процес.

Анализът на урината е важен, за да се изключи инфекция на пикочните пътища. Бременните жени са предразположени към инфекции на пикочните пътища поради ефекта на прогестерона върху гладката мускулатура и наличието на релативна задръжка на урина в пикочо-отделителната система (ПОС). Най-честата причина за усложнение на физиологичните дилатации на горните пикочни пътища при бременни, поради която се налага хоспитализация и активно лечение е инфекция на ПОС, а най-честата причина, поради която бременните търсят консултация, е болката (8).

Поради клиничното припокриване на оплакванията на пациентките, анализът на урината е наложителен с диференциално диагностично значение.

6.2.2. Хормонални изследвания

- бHCG

Еднократно измерване на hCG не е диагностичен критерий за местоположението на бременността и за жизнеспособността ѝ. Една единствена стойност на hCG обаче може да се използва като сурогатен маркер за бременност, използвайки концепцията за bhCG дискриминираща зона. Серийното проследяване може да помогне да се определи дали бременността е потенциално жизнеспособна и дали се очаква тенденция за нормален растежи развитие (52,265).

Комбинацията на серийно проследяване на нивата на hCG и ултразвуково изследване чувствително повишават акуратността на диагностичния процес.

При нива на hCG между 1000 до 2000 е установено, че трансвагиналният ултразвук (TVUS) е най-чувствителното изследване за идентифициране на вътре маточно съдържание като гестационен сак с или без ембрион. Има множество проучвания, които разкриват връзката между нивата на hCG и етапа на ембрионално развитие, наблюдавани чрез ултразвук. В диапазон на серумения

hCG между 800 до 1500 UI/I, чрез TVUS трябва да се визуализира гестационен сак от 1 до 3 mm. Жълтъчното мехурче би следвало да се открива в рамките на нивото на hCG от 4500 до 7500 UI/I; сърдечните пулсации на ембриона се установяват в диапазон от 8650 до 12 200 U/I (124).

- Прогестерон

Неадекватната секреция на прогестерон в ранна бременност е предполагаема причина за повтарящи се спонтанни аборти (149).

Дефицитът на прогестерон води до повишени нива на провъзпалителен интерлевкин-8, циклооксигеназа-2 и моноцит хемоатрактант протеин-1, които дестабилизираят ендометриума и повишават риска от спонтанни аборти (89). Това налага контролно проследяване на нивата на прогестерон по време на бременност.

6.3. Образни методи за диагностика

виж глава 1.7, стр. 33

6.4. Диференциална диагноза:

- Извънматочна бременност

Бременностите извънматочната кухина (ИБ) възлизат на около 1-2% от всички в САЩ (88).

ИБ компрометира женското здраве и е една от водещите причини за майчина заболяемост и нарушени фертилни възможности, а до 6% е причина за майчина смъртност в световен мащаб (88,146).

- Жизнеспособна бременност

Жизнеспособна бременност съпроводена с кървене по време на имплантация-УЗД и серийно проследяване на нивата на пролактин и hCG са ключов момент в преценката и прогнозата за бременността.

- Моларна бременност

Стойността на hCG и ултразвуковите маркери са основен елемент в диференциално диагностичен аспект.

- Витална бременност

Витална бременност с клиниколабораторни данни за субхорален хематом.

- Нематочни причини

Нематочни причини за кървене- например вагинална травма, травма на външните полови органи (97).

6.5. Лечение

Терапевтичните възможности включват хирургическа евакуация напродукти на зачеването и/или използване на простагландинови деривати за осъществяването на това. Хирургичното лечение е метод на избор от години и е ефективен, но е и свързан с риск от усложнения напр. перфорация на матката, възходяща инфекция, Ашерман синдром и др.. Доказано е, че при липса на противопоказания, локалното и/или системно приложение на простагландини има по-малко очаквани усложнения (основно хирургични) и необходимост от хоспитализация (274).

6.6. Скрининг

Оценката на спонтанните аборти се фокусира върху скрининга за генетични фактори и антифосфолипиден синдром, оценка на анатомията на матката, хормонални и метаболитни фактори и начин на живот.

Те могат да включват:

- Кариотипен анализ на родителите
- Скрининг за лупус антикоагулант, антикардиолипин антитела и анти-b2 гликопротеин I
- УЗД на женскаполовасистема
- Хистеросалпингография
- Хистероскопия
- Скрининг за аномалии на щитовидната жлеза
- Скрининг за нивата на пролактин
- Скрининг за нивата на кръвна захар

Кариотипният анализ на продуктите от концептуса може да бъде полезен при анализиране на причините за настоящия спонтанен аборт, но трудно би бил предиктор за следваща бременност, като самостоятелен маркер.

Жени с персистиращи умерени до високи титри на циркулиращи антифосфолипидни антитела могат да бъдат лекувани с комбинация от профилактични дози нефракциониран хепарин и ниска доза аспирин (108,116,240,296).

Доплеровият анализ на маточните артерии има потенциала да предскаже усложненията на бременността, свързани с утероплацентарна недостатъчност, преди появата на клиничните характеристики. Доплеровите изследвания на маточните артерии се използват за скрининг на утероплацентарна недостатъчност, най-вече през втория триместър (165).

През последното десетилетие е постигнат значителен напредък в разбирането на биологията на НКклетките, включително идентифицирането на нови рецептори, които също допринасят за активирането и регулирането им.

Въпреки редица доказателства за ролята на НК, анализът на наличните литературни източници не открива разработен модел за скрининг на спонтанни аборти основаващ се на изследване на НКклетки (132).

Според литературните данни иманедостиг на ефективни, основани на доказателства, проучвания за скрининг и лечения на спонтанните аборти.

Това е така, защото много факториса свързани с възникването им, но малко от тях отговарят на приетите критерии за причинно-следствена връзка. Следователно, безразборното обследване не трябва да се надценява, а фокусът трябва да бъде индивидуализиран.

7. Ултразвуковата диагностика на ранни и късни спонтанни аборти

Най-честите причини за извършване на ултразвуков преглед в първи триместър на бременността са свързани с оплаквания от болки ниско в корема и кръста с/без генитално кървене. В част от случаите се откриват белези, определящи неблагоприятен изход на бременността – missed abortion, кухо яйце, спонтанен аборт, извънматочна бременност или моларна дегенерация.

7.1. Определяне на гестационната възраст

Терминът (датата на очакваното раждане - ВТР) и съответно гестационната възраст на ембриона, се определя анамнезтично по формулата на Naegele. Според нея ВТР се определя като към първия ден на последната редовна менструация (ПРМ) се добавят 7 дни и се извадят 3 месеца.

При нередовен менструален цикъл формулата на Naegale се променя. Ако цикълът по-къс от 28 дни, от изчисления термин се изваждат толкова дни, колкото продължителността менструалния цикъл е по-кратка. Съответно, при по-продължителен цикъл, се прибавят толкова дни, колкото цикълът е повече от 28 дни (3). Промяната на ВТР при бременност настъпила след асистирана репродукция следва да се коригира с изключително внимание. При тези бременности, гестационната възраст се определя от датата на пункция на фоликулите или чрез ембрионалната възраст след оплождането.

Определянето на ВТР, респективно гестационната възраст, следва да се изчислява по ПРМ (след корекция според дължината на менструалния цикъл), освен в случаите при които:

- ПРМ е неясна;
- Ехографски изчислената гестационна възраст чрез измерване на парieto-сакралния размер (CRL) преди <10 г.с. се различава от тази по ПРМ с повече от 5 дни.

Ултразвуковото изследване позволява определяне срока на бременността чрез измерване на диаметъра на гестационния сак и на определени структурни параметри на ембриона/плода - т.нар. биометрия. В ранна бременност и при липса на ембрионални структури за определяне на гестационната възраст, се измерва диаметърът на гестационния сак в трите равнини на пространството и се взема средната стойност от трите измервания (5,22). Средният диаметър на гестационния сак не следва да се използва като средство за определяне на гестационната възраст, тъй като това е свързано със значима грешка при изчисляването на ВТР (258).

При ясно видима ембрионална сянка се измерва нейният CRL, който е точен показател за определяне на гестационния срок от средния диаметър на

гестационния сак. Ранното и точното измерване на CRL (до 10 г.с.) е свързано с минимално разминаване в определянето на ВТР (до ± 5 дни) и представлява ефективно средство за определяне на гестационната възраст в случаите с неясна ПРМ (258).

Правилата за правилно измерване на CRL са:

- Голямо увеличение на образа (плодът заема 2/3 от монитора)
- Строго сагитална равнина
- Визуализиране на falx cerebri и инсерцията на пъпната връв
- Глава и седалище ясно видими
- Глава в неутрално положение
- Хоризонтално положение на плода, ъгълът между надлъжната ос на плода и тази на УЗ лъч да е между 75° и 105°
- Правилно поставяне на калиперите “външно-външно”

Гестационната възраст не следва да се променя допълнително при точно определен чрез УЗД в първи триместър на бременността (258,259).

ВТР и гестационната възраст на ембриона/плода след 14 г.с. се определят чрез ултразвукови параметри от феталната биометрия- бипариетален диаметър (BPD), обиколка на главата (НС), обиколка на корема (АС) и дължина на бедрена кост (FL). Препоръчително е и измерването на дължината на раменната кост (HL – humerus length).

Системното определяне на НС позволява изчисляването на т.нар. цефаличен индекс (съотношението между бипариеталния и фронтоокципиталния диаметър). Самостоятелното измерване на BPD може да бъде подвеждащо при долихо- или брахицефалия, респ. да доведе до неточна оценка на ВТР. За разлика от него, измерването на НС не зависи от формата на феталния череп. По тази причина се счита, че във всички случаи след 14 г.с., НС по-точно определя гестационния срок в сравнение със самостоятелното измерване на BPD (35). След измерване на показателите от феталната биометрия се дава обобщена крайна ехографска оценка на гестационната възраст (24).

7.2. Missed abortion

Според определението missed abortion е вид аборт, при който ембрионът/фетуса е загинал, но продуктът на конценцията остава в маточната кухина. Ембрионът/фетусът може да загине по всяко време на бременността. От гледна точка на клинициста, ако има ехографски данни за това преди 20 г.с., се определя като missed abortion (126). Според различни научни изследвания честотата на Missed abortion е най-голяма около 7 г.с. (111).

Табл. 1. Ултразвукови критерии за поставяне на диагноза спонтанен аборт в първи триместър според Society of Radiologists in Ultrasound, 2013

Ултразвукови критерии за поставяне на диагноза спонтанен аборт в първи триместър според Society of Radiologists in Ultrasound, 2013	
Сигурни белези за спонтанен аборт <ul style="list-style-type: none">• CRL \geq 7мм без сърдечна дейност• Среден диаметър на гестационния сак \geq 25мм без ембрионална сянка• Липса на ембрион със сърдечна дейност \geq 2сед след установен гестационен сак без жълтъчно мехурче• Липса на ембрион със сърдечна дейност \geq 11 дни след установен гестационен сак с жълтъчно мехурче	Относителни белези за спонтанен аборт <ul style="list-style-type: none">• CRL < 7мм без сърдечна дейност• Среден диаметър на гестационния сак 16-24мм без ембрионална сянка• Липса на ембрион със сърдечна дейност 7-13 дни след установен гестационен сак без жълтъчно мехурче• Липса на ембрион със сърдечна дейност 7-10 дни след установен гестационен сак с жълтъчно мехурче• Липса на ембрион \geq 6 сед след ПРМ• Жълтъчно мехурче > 7мм• Малък гестационен сак в съотношение с размера на ембриона

През 2013 Society of Radiologists in Ultrasound, публикува сигурни и относителни ултразвукови критерии за поставяне на диагноза спонтанен аборт в първи триместър на бременността (53)

Според препоръките на БДАГ диагнозата спонтанен аборт- може да бъде поставена ако (22):

1. При среден диаметър на гестационния сак (MSD) \geq 25мм., с липса на ембрионални и/или екстраембрионални структури или;
2. При ясно видим ембрион с CRL \geq 7мм, който е без сърдечна дейност.

Липсата на сърдечна дейност се документира само след като сърдечната област е наблюдавана за период от поне 30 сек. (47).

При откриванне на ранна ембрионална смърт се визуализира гестационен сак с добре формиран chorion frondosum, нормално количество околоплодна течност, могат да се отдиференцират отделни части на ембриона. За missed abortion задържан по-дълго време говорят следните ултразвукови белези (126,127):

1. Деформиран гестационен сак;
2. Намалено количество околоплодни води;
3. Ембрионът лежи във флектирано положение;
4. Ембрионалната сянка придобива неясни граници и очертания;
5. Хиперехогенни участъци в ембрионалната сянка;
6. Размерите на ембриона са по-малки и неотговарят на гестационната възраст;
7. Ембрионът е разположен периферно.

Трофобластаната тъкан продължава да расте и след загиване на концептуса. С напредване на времето неговият растеж и функции намаляват и започват дегенеративно промени. Тези промени ехографски се установяват с наличието на субхориални хематоми и/или с намалена ехогенна плътност и дебелина на хориондецидуалната реакция на матката.

Ултразвукови находки за късни missed abortion- фетална смърт, след 13 гес. седмица са (275):

1. Липса на фетална сърдечна дейност;
2. Липса на фетални движения;
3. Възсядане на черепните кости – Spalding sign;
4. Грубо изкривяване на феталната анатомия – мацерация;
5. Едем на меките тъкани: кожа > 5мм;
6. Ехогенна околоплодна течност;
7. Силно намалена до липсваща околоплодна течност;
8. Тромб във феталното сърце;
9. Газови сенки във феталното сърце – Robert sign.

7.3. Заплашващ Аборт

Ултразвуковият преглед при заплашващ аборт показва запазена вътрематочна бременност. В зависимост от срока на бременността могат да се визуализират ембрионални/екстраембрионални структури, сърдечна честота и активни движения. Размерите на ембриона/фетуса и гестационния сак отговарят на срока на аменореята (7).

В много случаи на заплашващ аборт се описва наличието на хематом с различна локализация и размери (18). Хематомът може да бъде субхориален или субамниален. Субхориалното кървене и субхориалните хематоми са най-честата причина за генитално кървене при пациентки в 10-20 г.с. - 11% всички случаи (57). Те се образуват след отлепване на хорионните мембрани и последващо кървене между маточните стени и мембраните (208). Субамниалният хематом се образува след кървене между амниона и маточните стени, възникват след диференциране на chorion laeva и frondosum (18).

Ултразвуките находки при субхориалните и субамниалните хематоми зависят от срока и на откриване след гениталното кървене:

- При обилно генитално кървене се визуализират като хиперехогенни структури и трудно се отдиференцират от хориона.
- При хронично генитално кървене/зацапване – ехогенната плътност на хематомите намалява и се визуализират като ехонегативна сянка.

Хематомите се определят като малки, ако са <20% от размера на гестационния сак, средни 20-50% от гестационния сак и големи, ако са над 50% (245). Субхориални хематоми с размери 30-50% от размера на гестационния сак и обем над 50мл са с лоша прогностична стойност, а според Sauerbrei с риск от 50% загуба на бременността (245,260). При откриване на хематом е необходимо да се направи диференциална диагноза с „непълно сливане на мембраните” (нормална УЗД находка в ранна бременност) или с резорбиращ се втори гестационен сак при двуплодна бременност.

Ултразвукови критерии за лоша прогноза при заплашващ аборт в първи триместър са (224):

- Фетална брадикардия <80-90 уд/мин;

- Малък среден диаметър на гестационния сак;
- Голям жълтъчен мехур $> 7\text{mm}$, с калцификати;
- Малък и с неправилна форма гестационен сак $\text{MSD/CRL} < 5\text{mm}$;
- Субхориален хематом: $2/3$ от гестационния сак;
- Екстремно голяма амниална кухина;
- Липсваща или слаба децидуална реакция.

7.4. Прогресиентен Аборт

Ултразвуковото изследване при прогресиентен аборт установява бременна матка с размери отговарящи на срока на аменореята (32). В случаите на ранно изтичане на околоплодни води, матката е с намалени размери, а в маточната кухина се визуализира фетална структура с/без сърдечна дейност (7). Най-често продуктът на зачеването не е изхвърлен в момента на изследването и може да се визуализира в истмичната част на матката или в цервикалния канал (110).

Трансвагинално сканиране се извършва, ако при трансабдоминалното образно изследване не се установи окончателна вътрематочна бременност. Трансвагиналното изображение се извършва в сагиталната и напречната равнина за идентифициране на вътрематочна бременност (227). Определяне дължината на маточната шийка и за установяване на cervical funnelling – фуниране, отваряне и разширяване на ОИСС (280). Бременните жени, за които е установено, че имат цервикална фуния, са изложени на повишен риск от късни спонтанни аборти и преждевременно раждане (обикновено настъпващо през втория триместър) (150). Цервикалната фуния се дефинира сонографски като изпъкналост на амниотичните мембрани във вътрешния цервикен отвор (ОИСС) на повече от 5 mm от рамото на ОИСС, измерено по протежение на страничната граница на фунията (205). Тази находка обикновено е придружена от къса дължина на шийката на матката (дефинирана като $< 25\text{ mm}$). Формата на фунията показва степента на разширение на маточната шийка. С узряването шийката преминава от Т-образна форма (без фуния) до Y-образна форма (с навлизане на гестационния сак във вътрешния отвор на ОИСС), до V-образна форма (с фуния достигаща до ОЕСС) и накрая U-образна форма (отворен цервикален канал с/без пролабирал околоплоден мехур)

(305). U- или V-образните фунии са находка, показваща по-напреднало узряване на шийката на матката и по-голяма вероятност за развитие на инкомплетен или комплетен аборт.

7.5. Инкомплетен аборт

Визуализира се матка по-малка от срока на бременността (7). Ултразвуковата находка е променлива, варираща от видими фетални части до маса със смесена ехогенност с/без плацента. В някои случаи полученият образ от изследването не е много ясен поради липсата на околоплодни води (284). Установяват се тъканни материи с неправилна форма и различна ехогенност, учтъци с по-силно ехогенни зони и ехо-негативни полета в резултат на събралата се кръв (215).

7.6. Комплетен аборт

Сонографското изследване установява матката, която е значително по-малка от срока на бременността. В маточната кухина може да се наблюдават кръвни съсиреци, които да наподобяват задържани плацентарни или плодни части (7). Характерна находка при комплетния аборт е минимално удебелен ендометриум (под 15мм) без гестационен сак (84).

Ултразвуково диагнозата пълен спонтанен аборт може да се постави уверено само, ако има документирана вътрематочна бременност в по-ранен етап на бременността. Ако не е имало предишен ултразвук на тази бременност, ситуацията се нарича бременност с неизвестна локализация и се проследява чрез рутинно изследване на вНСГ и контролни ехографски прегледи (159). Диференциална диагноза може да се направи с: извънматочна бременност, ранна бременност, която все още не може да се установи с ултразвук или с бременност с неизвестна локализация.

7.7. Blighted ovum – анембрионална бременност

Наличие на гестационен сак без ембрион. Анембрионална бременност може да бъде диагностицирана, ако (33,75,133,130):

- не се вижда ембрион в гестационен сак с MSD ≥ 25 mm;
- няма ембрион при последващо вагинално сканиране;
 - ≥ 11 дни след сканиране, показващо гестационен сак с жълтъчен сак, но без ембрион, или;
 - ≥ 2 седмици (14 дни) след сканиране, показващо гестационен сак без жълтъчен сак или ембрион.

Описани са други спомагателни маркери, които могат да се считат за лоши прогностични фактори, но не допринасят за официалната диагноза на спонтанен аборт (53,61,96):

- липсващ жълтъчен сак, когато MSD > 8 mm при трансвагинален ултразвук;
- слаба децидуална реакция: често < 2 mm;
- неправилна форма на гестационен сак;
- необичайно ниско положение на гестационния сак.

8. Доплеровата велосиметрия в акушерската практика при спонтанни аборти

8.1. Доплерова велосиметрия в акушерската практика

Доплеровият ефект е описан за първи път от австрийския физик и астроном Кристиан Доплер (80). В медицината Доплеровото изследване е въведено от Satomura през 1956г., а в акушерството през 1977 г. от Fitzgerald и Drumm (178). През последните години възможностите на ултразвуковото и Доплерово изобразяване на кръвопотока се увеличиха значително. Напредналата технология се използва за измерване и доказване на все по-фини промени в кръвообращението на майката и плода (58,266).

Доплеровата велосиметрия на утеро-плацентарната и фето-плацентарната циркулация се базира на принципа, че звуковите вълни, които сеотразяват от движещ се рефлексор- еритроцитите в кръвоносните съдове, зависят от посоката и скоростта на рефлексора спрямо източника/приемника на вълните. Рефлексор, който се движи в посока към приемника на сигнала, отразява вълни с по-висока

честота. Обратното, рефлексор, който се движи в обратна посока от приемника на сигнала, отразява спо-ниска честота. Описаният феномен се нарича Доплеров ефект, а разликата между честотата на излъчения и отразения ултразвуков сигнал сенарича Доплерова честота. Степента на промяна честотата на излъчения и отразения ултразвуков сигнал може да се използва за изчисляване на скоростта и посоката (велосиметрия) на рефлексора чрез използване на Доплерово уравнение (5,6,25).

За оценка на съдовия импеданс се използва индексът на Pourcelot (Resistive Index, RI) и индексът на Gosling (Pulsatility Index, PI).

- Индексът на Pourcelot (индекс на резистентност) -RI, изчислява се по формулата:

$RI = S - D / S$, "S" е максималната систолна, а "D" е крайната диастолна честота.

- Индексът на Gosling (пулсативен индекс) -PI, изчислява се по формулата: $PI = S - D / M$, "S" е максималната честота по време на систола, "D" е крайната диастолна честота, а "M" е средната честота за дадения сърдечен цикъл.

RI е един от най-важните показатели за тъканна васкуларна перфузия поради отрицателната му връзка със съдовата перфузия. Тоест с намаляване на съпротивлението се увеличава съдовата перфузия и обратно. Аналогично повишението на PI показва намаляване на тъканната перфузия (103,134). Пулсативният индекс и резистентният индекс се приемат за надеждни и полезни за диагнозата на съдова патология. Индексът на резистентност се използва за приблизително изчисление на периферното съдово съпротивление. Пулсативният индекс дава информация за пулсовата характеристика на артерията. Той отразява степента на вариабилност на максималната скорост на кръвния ток през различните фази на сърдечния цикъл и до голяма степен зависи от периферната съдова резистентност (5,6,25).

Видовете Доплерово изследване в акушерската практика са: Непрекъснат Доплер, Пулсов Доплер, Цветен Доплер и Енергиен (мощен) Доплер.

Непрекъснат Доплер: Рядко използван метод в акушерската практика. Той се характеризира с непрекъснато излъчване и непрекъснато приемане на отразения сигнал от дваразлични елемента. При него няма дълбочинна разделителна способност и цветно картиране на образа.

Пулсов Доплер: При него един и същ елемент излъчва и приема сигнала. Характеризира се с точна локализация на изследвания съд и възможност за изображение в реално време и симултанна регистрация на вълновите криви. Позволява количествена оценка на някои параметри- измерване на индекси на скорости. Възможност за комбиниране с Цветен Доплер (5,6,20). Методът не е подходящ за изследване в ембрионалния период поради сравнително високо ниво на сила.

Цветен Доплер: Характеризира се с образ с различен цвят и интензитет на цвета в зависимост от посоката на кръвотока по отношение на трансдюсера и скоростта. Позволява идентифициране на кръвоносните съдове, като показва наличие и посока на кръвотока. Използва се за откриване на турбулентност на кръвотока в съдовете и за оценка на големи съдови/циркуляционни аномалии. Има възможност само за качествена оценка на скоростта на кръвотока – висока или ниска скорост (1,5,6).

Енергиен (мошен) Доплер: Измерва сагиталната амплитуда, която зависи от броя на еритроцитите в пробния обем. Съдовете се изобразяват в един цвят независимо от посоката и от скоростта на движение. Подходящ метод за визуализиране на съдове с ниска скорост на кръвотока. Като недостатък на метода може да се изтъкне лошата темпорална резолюция и лесно получаване на артефакти и шумови сигнали (5,178).

8.2. Методика на Доплерово изследване на маточните артерии

Доплеровото изследване на маточните артерии се извършва трансабдоминално и трансвагинално. През първи триместър се предпочита трансвагиналният достъп, който осигурява по-голяма екзактност при визуализирането и замерването на съответната маточна артерия. През втори и трети триместър, когато маточното тяло се намира извън пределите на малкия таз, се използва трансабдоминалният достъп (5,6). Нормално в първи и в началото на втори триместър се наблюдава висока резистентност на скоростта на кръвотока, която се изразява с високи стойности на пулсативния индекс, индекса на резистентност и наличие на инцизура в ранната диастола.

Ултразвуковите критерии за осъществяване на Доплерова велосиметрия на утеринните артерии включват (41,81,198,238):

- Доплеровото изследване се извършва в легнало положение на бременната по гръб, без кръстосване на долните крайници.
- Трансдюсерът се поставя успоредно на предна маточна стена в нейната истмична част така, че да се проследи а. *iliaca comunis* до мястото на бифуркацията ѝ.
- След това трансдюсерът се насочва медиално в същия план, при което се появява изображението на маточната артерия. Тя има прав ход и ехогенни стени. Изонационният прозорец се поставя приблизително на 1 см. медиално от мястото, в което маточната артерия пресича а. *iliaca externa*
- След идентифицирането на всяка маточна артерия се поставя пулсативен 'pulse wave' Доплер с акустичен прозорец от 2 мм. ширина, за да покрие целия съд.
- Специално внимание се обръща на ъгъла на изонация, който трябва да е под 30 градуса.
- Измерванията се извършват след регистриране на минимум 10 последователни и с добро качество вълнови криви.
- След позитивиране на три последователни вълнови криви, се измерва R_i и P_i и на двете утеринни артерии и тогава се взима средната стойност и от двете.

Характерна особеност на маточния кръвоток е, че той никога не е нулев или обратен (30,81).

8.3. Изследване на кръвотока на маточните артерии

Трансабдоминалната и трансвагиналната цветна, пауър или енергиен Доплер ехография намират широко клинично приложение като неинвазивни методи, които служат за оценка на физиологичните и патологичните промени в кръвотока по време на бременност (167,216). Установяването на промени в кръвотока на маточните артерии след 23 г.с., изразяващи се с количествени отклонения в основните артериални индекси, са предиктор за последващи усложнения през

бременността като прееклампсия, интраутеринна ретардация и преждевременно раждане преди 34 г.с. (120,231). Изчисляване на риска се базира на неефективната имплантация, която е в тясна корелация както с промените в кръвотока на маточните артерии, така и с развитието на дадените усложнения (38,85). Прогнозирането и дори определянето на дълбочината на трофобластната инвазия на даден етап от бременността е изключително трудно. За първи път в помощ на това начинание е предложена Доплерова ехография в първи триместър като скрининг за развитие на плацента акрета през втората половина на бременността от Shih и сътрудници и Chen и колектив, които провеждат мащабни проучвания сред бременни в 8-9 г.с. (79,270).

Jaffe и сътрудници в проспективно проучване оценяват кръвотока в интервилозните пространства, като предиктор за изхода на бременността при нормално протичаща бременност. Същите автори откриват, че повишените стойности на индекса на резистентност в интервилозните артерии, са свързани с възникването на спонтанен аборт на по-късен етап от бременността. Установената чувствителност на метода от този колектив е 80%, при специфичност 85% (154).

Проучвания, базирани на цветно картиране на дисталните клонове на *a.uterinae*, демонстрират сигнификантно намаляване на резистентността на спиралните артерии с напредване на гестационната възраст. Този феномен започва от първи триместър, което е следствие на физиологичните промени (72). На лице е намаляване на импеданса на кръвотока до 24-26 г. с. в следствие на трофобластна инвазия на спиралните артерии и тяхното превръщане от тесни мускуларни кръвоносни съдове до ниско резистентни широки такива с намалена гладка мускулатура (71). Наблюдавания персистиращ висок импеданс на кръвотока в *a.uterinae* потвърждава индиректно абнормената плацентация. Хистологични находки от плацентарното ложе при бременности протекли с прееклампсия, показват добра корелация с високия R_i в *a.uterinae* (229).

Основните патологични находки на кръвотока на маточната артерия (появата на инцизура-notch в началото на децелерационната фаза, което е отражение на съдов спазъм, намален диастолен кръвоток и повишена пулсативност), демонстриращи се чрез повишени стойности на RI , PI и отношението S/D (систола/диастола) се наблюдават при бременност, усложнена с артериална

хипертония, прееклампсия, интраутеринна ретардация, вродена тромбофилия и др. (81). Plascencia et al., съобщават, че при изследване на сбора от P_i и на двете утеринни артерии в първи триместър, са добър прогностичен маркер за откриване на високо рисковите пациенти, които биха развили патологична бременност (238).

Giacobbe и колектив провеждат скринингово Доплерово изследване на маточните артерии в ранна бременност. Изследователите установяват значително повишени стойности на индекса на резистентност и пулсативния индекс на маточните артерии при нормално протичащи бременности в сравнение с такива завършващи със задържан аборт (123).

Докато Доплеровата велосиметрия е успешно утвърдена като надеждно скринингово изследване през втори триместър от бременността за прогнозиране на усложнения като прееклампсия и вътреутробно изоставане в развитието на плода, използването на метода през първи триместър е дискутабилно и е в процес на проучване (203). Възможностите на метода не се познават в детайли и той се подценява в редица клинични ситуации или му се преписват несъществуващи възможности (20). Всичко това оставя процеса на изпитване и интерпретация на резултатите отворен, което подчертава необходимостта от допълнителни проучвания в тази насока.

9. Имунохистохимията като диагностичен метод в акушерството

Имунохистохимията (IHC) е метод за анализиране и идентифициране на видове клетки, базиран на способността на антителата (имуноглобулините) да свързват съответните антигени. Това е високочувствителен и специфичен метод, при който се комбинира биохимия с хистология и имунология, като целта е да се определи хистогенетичната принадлежност на дадена формация, тъкани или тумор (247).

IHC методики се базират на антигенните качества на тъканните протеини, които се разкриват чрез свързването им със съответни антитела. Антиген/антителната реакция се извършва на мястото на точната локализация на търсения антиген, а чрез допълнително оцветяване с хромоген тя става достъпна за наблюдение със светлинния микроскоп. Към всеки от разнообразните протеини

в организма може да се образуват антитела в серума на опитни животни /обикновено мишки, плъхове или овце/, които се пречистват за целите на ІСН изследване (87,286).

ІСН методики са многоетапни. Последователно се инкубира фиксираната или свежо замразена тъкан с първичното антитяло, което се свързва както с тъканния антиген, така и с ензимен комплекс - пероксидаза/антипероксидаза или авидин/биотин. Накрая този комплекс се третира с цветно вещество. При наличие на търсения антиген в тъканта се получава оцветяване, което е показателно за положителна реакция. Обратно, реакцията е негативна при липса на оцветяване, т.е. на антиген (286). Отчита се интензивност на реакцията, разпространение и локализация на продукта- ядро, цитоплазма, мембрана, съдове и др. Всяка стъпка от методиката, от фиксацията до получаването на цветната реакция, има голямо значение за качеството и достоверността на имунохистохимичната реакция. В практиката голямо приложение има изследването на тъканни срези от парафинови блокчета.

Според НАРЕДБА № 12 от 4.11.2016 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Обща и клинична патология" (28), имунохистохимията е високо специализирана дейност за диагноза, диференциална диагноза и определяне на прогностични маркери за изход от лечение при установяване и диагностика на туморни и нетуморни процеси. Прилагането на имунохистохимични методи на изследване е задължително при случаите с карцином на гърда, стомах, бял дроб, тумори с неясна генеза и/или първично огнище, както и неоплазми със специфичен имунофенотип, като гастроинтестинални стромални тумори, невроендокринни тумори, меланом, за патологични лезии с неясна характеристика и др., при спазване на национални и международни ръководства за диагностика за съответните локализации (Класификация на туморите по Световната здравна организация).

За откриване на dNK клетки по ІСН метод се използва Човешки CD56 нуклеарен антиген. CD56 е адхезивна молекула на нервните клетки (NCAM) и е имуноглобулинов клас IgG. Адхезионните молекули на нервните клетки са тясно свързани гликопротеини на клетъчната повърхност и се смята, че участват в ембриогенезата, развитието и контактнo-медираните взаимодействия между

невронните клетки. Антигенът CD56 (NCAM) се състои от четири основни изоформи, генерирани от единичен ген, разположен на хромозома 5. Антигенът CD56 се експресира върху неврони, астроцити, Schwann клетки, NK клетки и подгрупи от активирани Т лимфоцити (235,295).

Голям брой изследвания доказват, че dNK клетки играят роля в успешната имплантация на ембриона, плацентацията, котрола на трофобластна инвазия и трансформацията на спиралните артерии и следователно за изхода на бременността (189,218).

Броят на dNK клетките е увеличен в перимплантационния ендометриум на подпопулацията от жени с повтарящи се спонтанни аборти (241) и жени с неуспешна имплантации след IVF (190). Въпреки това, има противоречиви доклади, при които увеличеният брой на ендометриални dNK клетки не корелира с изхода на бременността (281).

Една от причините за трудности при определяване на броя на dNK клетки чрез имунохистохимия е липсата на консенсус при докладването на броя клетки и по-точно за това какво представлява „висок” брой dNK клетки. Quenby et al. приемат граница от 5%, докато Tuckerman et al. използват граница от 12,9%. (241,242,289,290,). Въпреки противоречивите данни, в световен мащаб нараства броя на публикации за изследвания на dNK клетки при жени с репродуктивни неудачи и се обсъжда дали определянето на броя dNK клетки трябва да бъде включен в клиничната оценка за жени с RIF и RM (220,257).

Антиген Ki67 е ядрен протеин, който е свързан с клетъчната пролиферация и рибозомната РНК транскрипция (70). Протеинът Ki67 (известен също като MKi67) е клетъчен маркер за пролиферация (262) и може да се използва в имунохистохимията. По време на интерфазата антигенът Ki67 може да бъде открит в клетъчното ядро, докато при митозата по-голямата част от протеина се премества на повърхността на хромозомите (90). Протеинът Ki67 присъства по време на всички активни фази на клетъчния цикъл -G1, S, G2 и митоза, и е с клетъчната прогресия през S фаза на клетъчния цикъл (66,92).

ИХХ с пролиферативен маркер Ki67 в гинекологията е широко използван метод и се налага като златен стандарт за отдиференциране на туморни формации-малигнени от бенигнени и за прогноза на заболяването. Ki67 е един от

прогностичните маркери, които определят растеж на епителните овариални тумори и неговата свръхекспресия е свързана със злокачествено заболяване, туморна агресия и метастази (201). Освен за диагноза на ендометриален карцином, Ki67 е независим рисков фактор за рецидив при stage I-II на тумора (158). Повишената експресия на Ki67 антиген в маточни лейомиосаркоми, корелира с бързия растеж на тези злокачествени тумори. Използва се за имунохистохимичен параметър за разграничаване между случаите на злокачествени гладкомускулни тумори и тези с несигурна или гранична хистология (210). Експресията на естрогенния рецептор (ER), прогестероновия рецептор (PR), Ki67 и p53, при ендометриален карцином се свърват с лоша прогноза (209). ИХХ анализ на тези маркери може да бъде полезен за определяне на терапевтичното поведение (287).

В акушерската практика пролиферативния маркер Ki67 се използва за отдиференциране на трофобластна тъкан в случаи на извънматочна бременност, моларна бременност и за диференциална диагноза на плацента акрета, трофобластен тумор на мястото на плацентата и хориокарцинома (151,168,269,304).

Бременностите усложнени с прееклампсия протичат с вътрематочно забавяне на растежа на плода и малки (по размери и тегло) плаценти (160). Установява се по-висок индекс на Ki67 от плацентарна тъкан на жени с прееклампсия, в сравнение с нормално протекла бременност. Това показва, че трофобластите претърпяват регенерационна хиперплазия, възникваща върху повърхността на вилите при прееклампсия (163).

Старибратова и сътрудници изследват експресията на пролиферативен ядрен антиген Ki67 във вилонния трофобласт и строма при 30 случая с прееклампсия. Те установяват, че броят на Ki67 положителните ядра в преекламптичния трофобласт и строма, значително са увеличени спрямо тези на контролите. Следователно дефектът в развитието на плацентата при прееклампсия не е свързан с нисък пролиферативен потенциал (279).

Открива се повишена експресия на Ki67 в преекламптични вилонни цитотрофобластни клетки и децидуални клетки и увеличаване на Ki67 във вилонни цитотрофобластни клетки на плацента при пациенти с HELLP (101).

Имунохистохимични изследвания за експресията на пролиферативен маркер Ki67 от фетален трофобласт при нормална човешка бременност, показват че по-голямата част от цитотрофобластните клетки имат ядрена реактивност с Ki67. Вилозният синцитиотрофобласт е равномерно нереактивен с Ki67, но част от подлежащия цитотрофобласт е Ki67-положителен през цялата бременност. Случаи с Ki67-положителни трофобластни клетки се идентифицират в *horion laeve* по време на термина. Интерстициалният и ендovasкуларен екстравилозен трофобласт в майчината децидуална тъкан на матката не се маркира от маркерите за пролиферация. По този начин, цитотрофобластът на хорионните вили и екстравилозният трофобласт в *horion laeve* изглежда запазват своят пролиферативен капацитет до края на бременността. Пролиферативният капацитет се запазва от вилозния цитотрофобласт през цялата бременност и основното място на пролиферативна активност е локализирано в цитотрофобласта (67).

III. ЦЕЛ

Настоящият проект цели да открие корелация между Доплеровата велосиметрия на маточните артерии и количеството на dNK и пролиферативен маркер Ki-67, изследвани в материал от плацентарна тъкан чрез имунохистохимичен анализ, в ранни и късни спонтанни аборти и аборти по желание.

IV. ЗАДАЧИ

1. Да се извърши и анализира Доплеровата велосиметрия на маточните артерии в ранни спонтанни аборти и аборти по желание до 12г.с.
2. Да се оцени ролята на имунохистохимията на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 в ранните аборти до 12г.с.
3. Да се изследва и анализира корелацията в Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимията на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 12 г.с.
4. Да се извърши оценка на Доплеровата велосиметрия на маточните артерии в късни спонтанни аборти до 20 г.с
5. Да се определи ролята на имунохистохимията на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 в късни спонтанни аборти до 20 г.с
6. Да се извърши и анализира Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимичен анализ на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 20 г.с.
7. Да се реализира оценка и анализ на Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимичен анализ на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 12г.с. и 20 г.с.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Дисертационният труд се разработи въз основа на резултатите от клиничното проучване на 81 бременни пациентки с данни за спонтанен аборт или аборт по желание. Проучването е с ретроспективен и проспективен характер. Всички жени са преминали през СБАГАЛ „Проф.Д-р Димитър Стаматов“-ЕООД, Варна в „Отделение по гинекология“ за периода Октомври.2018–Януари.2023 година. Бяха използвани анамнестични, клинични, образни, патологоанатомични и имунохистохимични данни.

Извършването на научното изследване е разрешено от Комисията по Етика на Научните Изследвания При МУ-Варна № 78 от 25.10.2018 (Приложение №1) и финансирано от „Фонд Наука“, Проект №19008.

Критерии за включване и изключване на лицата от изследването:

а) Критерии за включване на лицата:

- Писмено съгласие на пациентката;
- Спонтанен аборт до 12 г.с.;
- Аборт по желание до 12 г.с.;
- Спонтанен аборт до 20 г.с.;
- Аборт по медицински показания до 20 г.с.

б) Критерии за изключване

- Отказ на пациентката за включване в проучването;
- При съмнение за извършен (или опит за) криминален аборт в извънболнична обстановка (Чл. 126. (1) Който със съгласието на бременна жена умъртви плода ѝ извън акредитирано лечебно заведение или в нарушение на утвърдените медицински стандарти и правилата за добра медицинска практика, се наказва с лишаване от свобода до пет години) ;
- Аборт след прекарано инфекциозно заболяване;
- Двуплодна бременност;
- Невъзможност за извършване на Доплерова велосиметрична маточните артерии;

- Ултразвукови данни за туморни формации на матката (миомни възли, полипи и аденомиоза) ;
- Анатомични аномалии на матката – маточни аномалии клас U2, U3 U4 по класификацията на ESHRE/ESGE 2013.

Преди регистриране на жените в проучването, се разяснява целта на изследванията, конфиденциалността на съхранението на личните данни и липсата на какъвто и да е здравословен риск за тях. При съгласие за включване в научното изследване, подписват Информирано съгласие за участие в научно изследване и Декларация за съгласие обработка на лични данни и друга информация.

След декларирано съгласие се попълва регистрационен фиш. В регистрационният фиш въпросите са ясно зададени, изчерпателни и без двусмислия. Той цели да обобщи данни от статуса и медицинската история на пациентката.

Включването на застрашени лица от възрастова група 8-17 год. се налага поради по-високата честота на спонтанни аборти при тях. Лицата от възрастова група 8-17год. са включени в научното изследване само след попълнен формуляр за съгласие от родител/настойник.

1. Диагностични методи

1.1. Анамнеза

Бременните жени бяха диагностицирани след извършване на случаен преглед или в условията на спешност в спешен приемен кабинет.Целта на анамнезата при провеждането на настоящото проучване е поставянето на точна диагноза и откриването на включващи и изключващи критерии. Получената информация се отразив Регистрационен фиш за включване в научното изследване. (Приложение №2)

Най-честите анамнезтични данни насочващи към диагнозата спонтаннен аборт са:

- Генитално кървене;
- Болки ниско в корема и кръста, менструално подобни;

- Изчезване на субективните оплаквания за ранна бременност – липса на сутрешно гадене и/или повръщане, напрежение в гърдите.

При ранните спонтанни аборти особен симптом е гениталното кървене, а при аборти във втори триместър – болката. Болковият симптом е в резултат на маточни контракции. При комбиниране на болка и кърве, независимо от тяхната проява, прогнозата на бременността не е добра. Бременности с подобни оплаквания най-честозавършват саборт (7).

Снемането на анамнезата е важна част от провежданото проучване. Получава се информация свързана с минали и настоящи заболявания, наследствени генетични аномалии и синдроми в рода на пациентката и партньора. От акушеро-гинекологичната анамнеза, която включва информация за репродуктивното здраве, характеристика на менструалния цикъл, и други специфични гинекологични състояния и заболявания, може да се установи причино-следствена връзка с настоящите оплаквания.

1.2. Физикален преглед

Физикалният преглед е основен метод за определяне измененията на маточната шийка и цервикалния канал, които настъпват при спонтанните аборти.

Огледът със спекулум позволява визуализация на патологии на шийката: полипи, ектопия и лацерации. При обследването е необходимо да се установи какво изтича от цервикалния канал – кръв, околоплодна течност и дали в него или влагалището се намират плодни части. Установи ли се околоплодна течност, се приема, че абортът е прогресиентен.

Мануалното изследване определя статуса на маточната шийка: дължина, консистенция, разположение и разкритие. При нормално протичаща бременност, върхът на пръста не преминава през ОЕСС, маточната шийка е със запазена дължина и в сакрализирано положение, без изтичане на кръв и околоплодна течност. При аборт във вход, изследваият пръст лесно навлиза цервикалния канал, шийката е с размекчена консистенция, а в някои случаи и в междинно или срединно положение. При по-голям аборт и разкритие на ОЕСС, може дори да се палпира околоплоден мохур, плод и плодни части.

Определяването на размерите на матката е показателно за развитието на бременността и определяване стадия на аборта. При скоро настъпил аборт, бременната матка е със запазени размери: отговарящи на срока на аменопееята. Причините за по-малки размери на матка от срока на бременността могат да са: грешна ПРМ, изтичане на околоплодни води, изпадане на плодни части/плод във влагалището, ретардиран или мъртъв плод. Не увеличаване на размерите е лош прогностичен белег с вероятност за настъпване на аборт (7).

1.3. Методи за образна диагностика

1.3.1 Ултразвукова диагноза на спонтанни аборти

На всички пациентки, дали съгласие за участие в проучването и отговарящи на критериите, се извърши ултразвуковата диагностика и Доплерова велосиметрия на маточните артерии. При извършване на прегледите се спазваха показанията и препоръките на БДАГ за извършване на ултразвуково изследване в ранния първи триместър на бременността, ултразвуково изследване между 11+0 - 13+6 дни гестационна седмица и между 18+0-23+0 седмици (23,24).

1.3.1.1 Ултразвукова диагноза на ранни спонтанни аборти

Ултразвуково изследване в ранна бременност се осъществи чрез трансабдоминално и трансвагинално сканиране. Основните задачи при извършване на прегледа бяха:

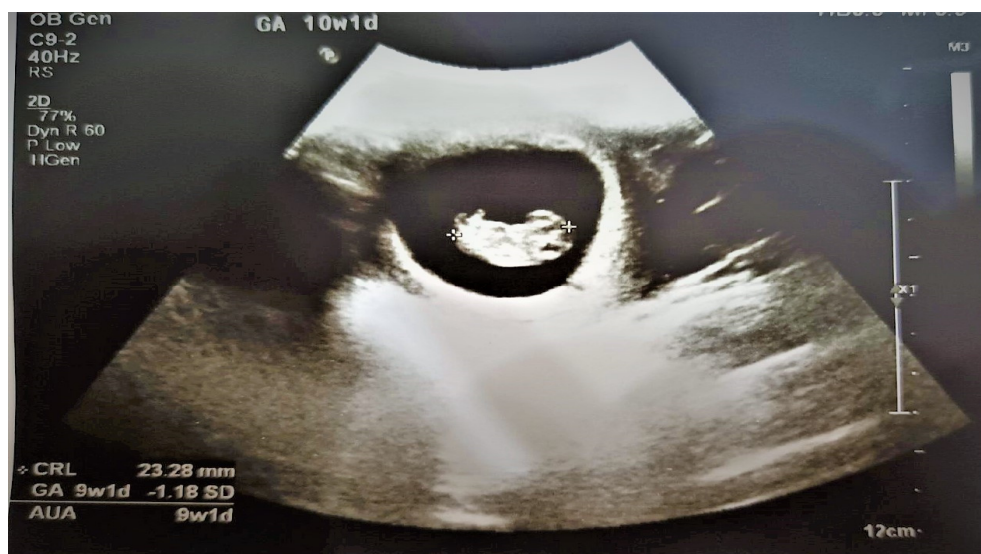
1. Установяване на вътрематочна бременност;
2. Определяне на гестационната възраст;
3. Сканиране и отчитане на сърдечна честота;
4. Установяване на структурни аномалии на плода;
5. Търсене на маркери за хромозомни аномалии;
6. Белези, определящи неблагоприятен изход на бременността – спонтанен аборт или моларна дегенерация;
7. Диагностициране на многоплодна бременност;
8. Ултразвукови данни за туморни формации на матката (миомни възли, полипи и аденомиоза) ;
9. Откриване на маточни аномалии клас U2, U3 и U4.

След установяване на вътрематочна бременност се извърши определяне на гестационната възраст чрез измерване на CRL.



Фиг. 2. Определяне на гестационна възраст по CRL (Собствен материал)

Ранното и точно измерване на CRL е свързано с минимално разминаване в определянето на ВТР (до ± 5 дни) – Фиг.2 . Методът е бърз и представлява ефективно средство за определяне на гестационната възраст в случаите с неясна ПРМ.



Фиг. 3. Missed Abortion в първи триместър на бременността 10г.с. (Собствен материал)

На Фиг.3 Се визуализира ембрион по-малък с една седмица от вероятната гестационна възраст по ПРМ – 10г.с, спрямо измерения CRL-23,28mm= 9г.с. Без сърдечна честота, засечена за 30сек.Диагноза спонтанен аборт в първи триместър се постави според критериите на Society of Radiologists in Ultrasound, 2013 и БДАГ.

- При ясно видим ембрион с CRL= \geq 7мм, който е без сърдечна дейност (22).



Фиг. 4. Missed Abortion в първи триместър на бременността 9 г.с. (Собствен материал)

На ултразвуково изображение Фиг.4 се установява ембрион по-малък с три седмица от вероятната гестационна възраст по ПРМ – 9г.с, измерен CRL-5 mm= 6 г.с. Без сърдечна честота, засечена за 30сек.Ембрионалната сянка е с неясна граници и очертания, с наличие на хиперехогенни участъци в нея. С периферно разположение на ембриона. Според критериите на Goldstein от 1991год. в този случай се касае за missed abortion, задържан по-дълго време в маточната кухина (126,127).



Фиг. 5. Blighted ovum в първи триместър на бременността 8 г.с. (Собствен материал)

Представеният случай на Фиг.5 е Анембрионална бременност (Blighted ovum) - наличие на гестационен сак без ембрион и без жълтъчен сак в него. В тези случаи поради липса на фетална сянка е невъзможно за измерването на CRL. Гестационната възраст се определи чрез измерване на среден диаметър на гестационния сак.

Бременните жени със запазена бременност до 12г.с., постъпващи за аборт по желание, без наличие на изключващи УЗД критерии, участваха в изследването като контролна група.

Наличие на извънматочна бременност, многоплодна бременност, туморни и структурни аномалии на матка са критерии за изключване от научното изследване.

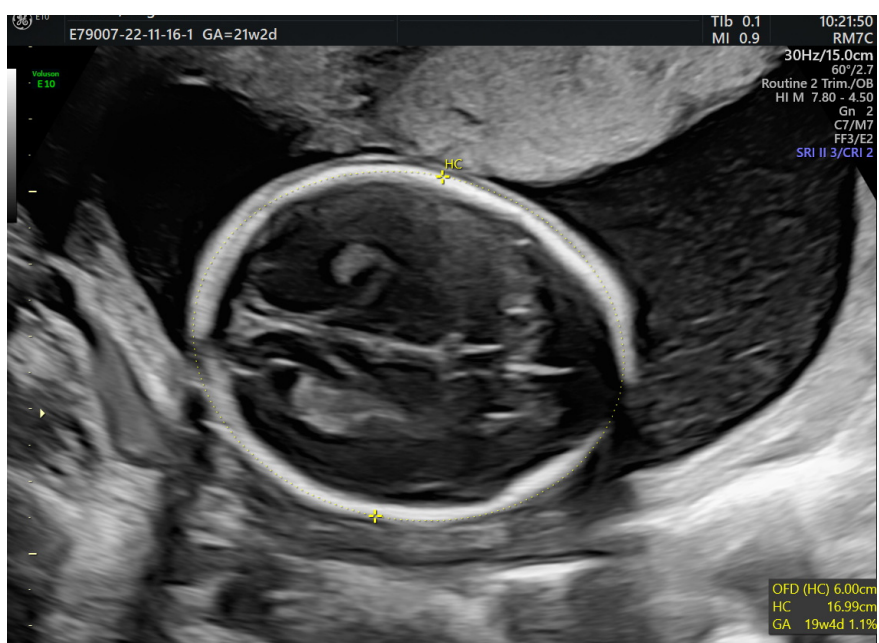
1.3.1.2 Ултразвукова диагноза на късни спонтанни аборти

Ултразвуково изследване при бременност след 13 г.с се осъществи основно чрез трансабдоминално сканиране. Основните задачи при извършване на прегледа бяха:

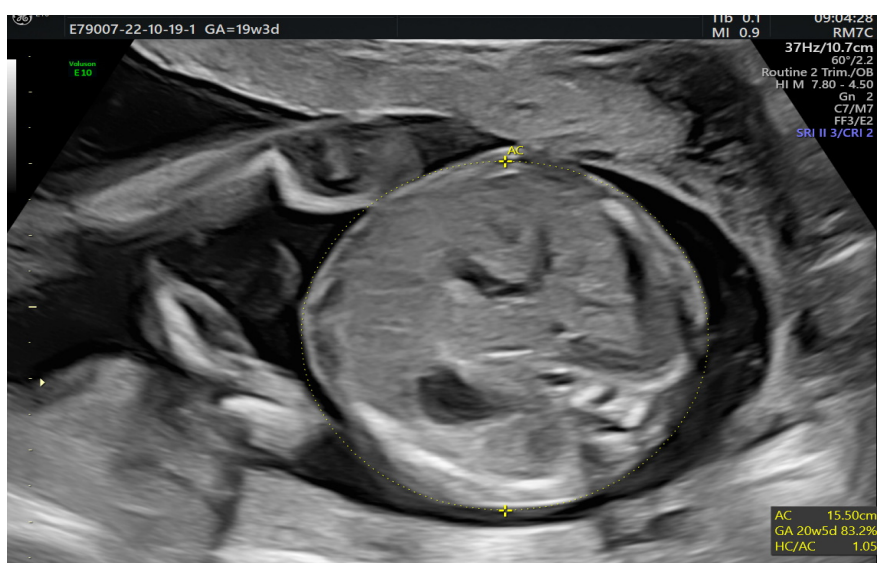
1. Определяне на гестационната възраст;
2. Сканиране и отчитане на сърдечна честота;

3. Установяване на структурни аномалии на плода;
4. Търсене на маркери за хромозомни аномалии;
5. Белези, определящи неблагоприятен изход на бременността – спонтанен аборт, разположение на плацентата и количество околоплодни води;
6. Откриване на УЗД критерии за изключване от научното изследване - многоплодна бременност, туморни и структурни аномалии на матка.

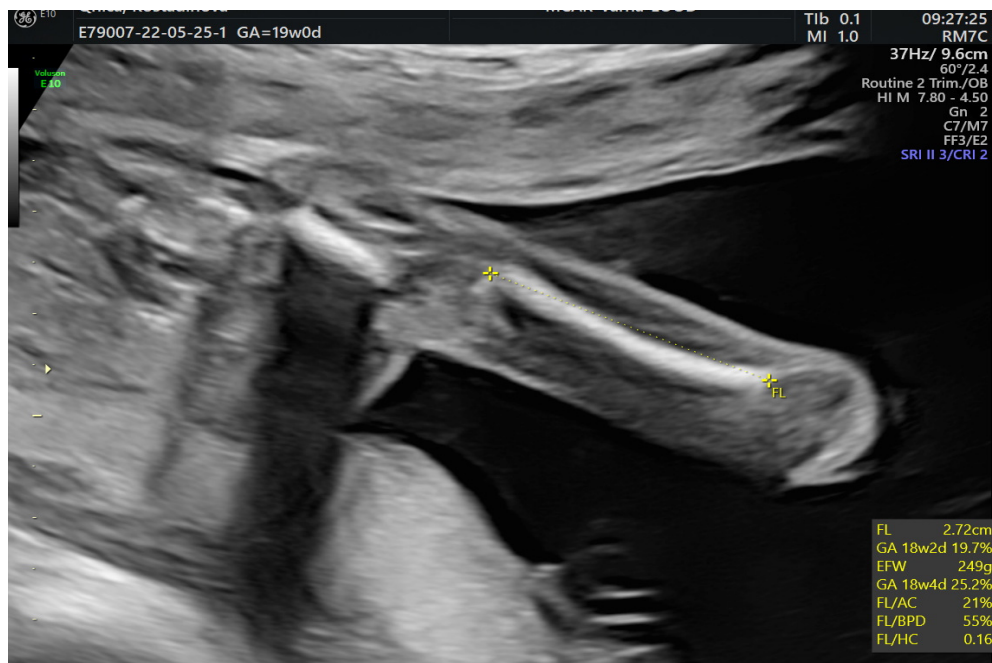
Определи се гестационната възраст чрез измерване: BPD; HC, AC и FL (Фиг.6,7,8).



Фиг. 6. Определяне на гестационна възраст след 13 г.с., измерване на HC – OFD+BPD (Собствен материал)



Фиг. 7. Определяне на гестационна възраст след 13 г.с., измерване на AC (Собствен материал)



Фиг. 8. Определяне на гестационна възраст след 13 г.с., измерване на FL (Собствен материал)

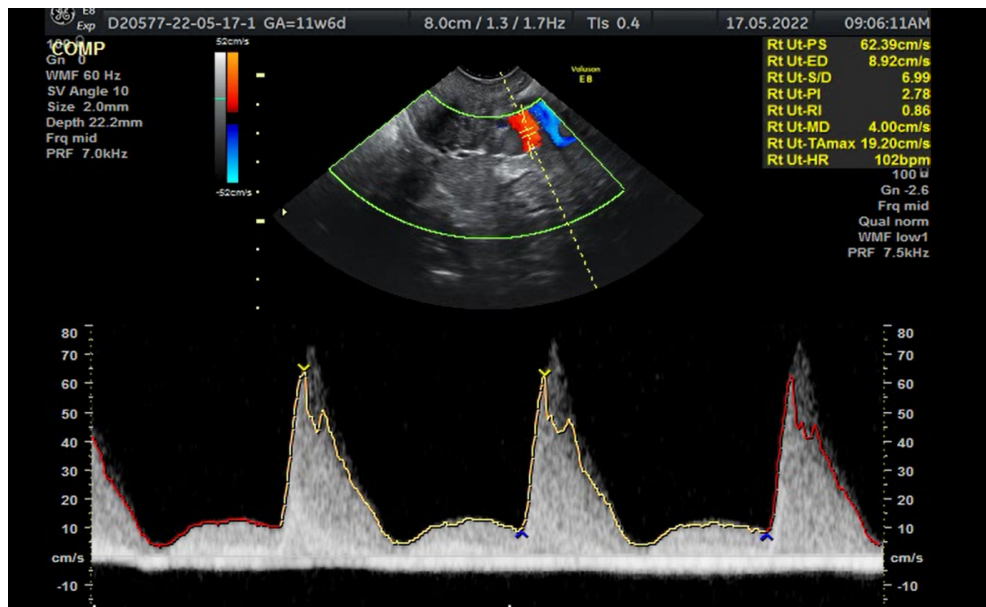
1.4. Доплерова велосиметрия на маточните артерии

В нашето проучване Доплерово изследване на маточнатите артерии се извърши чрез трансвагинална сонда. Изследването извършихме посредством Пулсов Доплер, който предоставяточна локализация на изследваниясъд и възможност за изображение в реално време навълновите криви. Позволява количествена оценка на измерените индекси скорости. За по-добро визуализиране и отдиференциране на търсените артериални съдове използвахме възможността за едновременна употреба на Пулсов с Цветен Доплер.

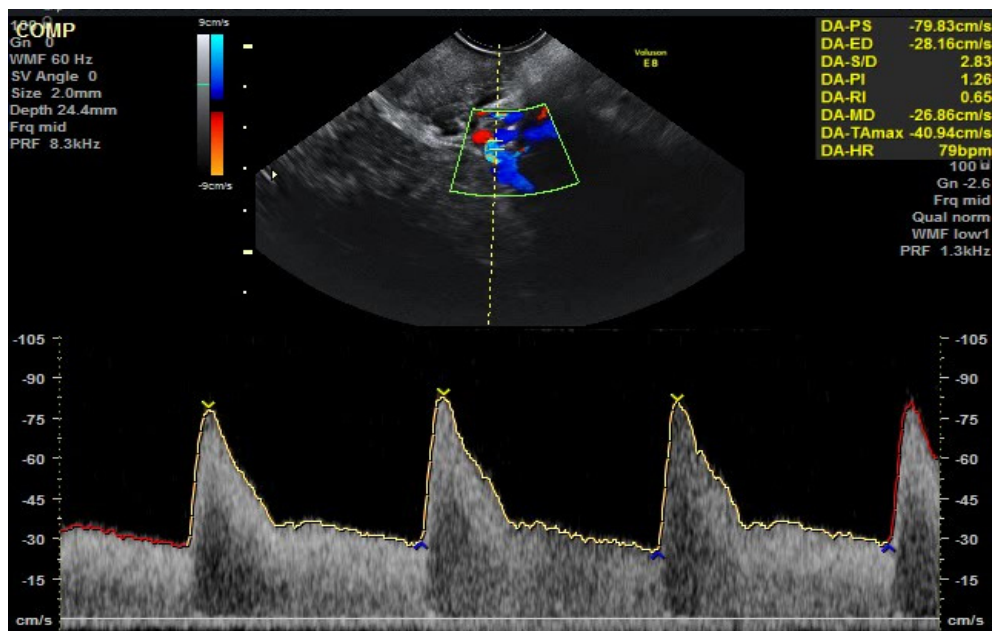
Повреме на Доплеровата велосиметрия на утеринните артерии спазихме всички заложен критерии, ясно и точно изложени в глава „Методика на Доплерово изследване на маточните артерии”. Измерихме и в последствие анализирахме:

- R_i и P_i индекс на лява маточна артерия при ранни спонтанни аборти (Фиг.9);
- R_i и P_i индекс на дясна маточна артерия при ранни спонтанни аборти (Фиг.10);

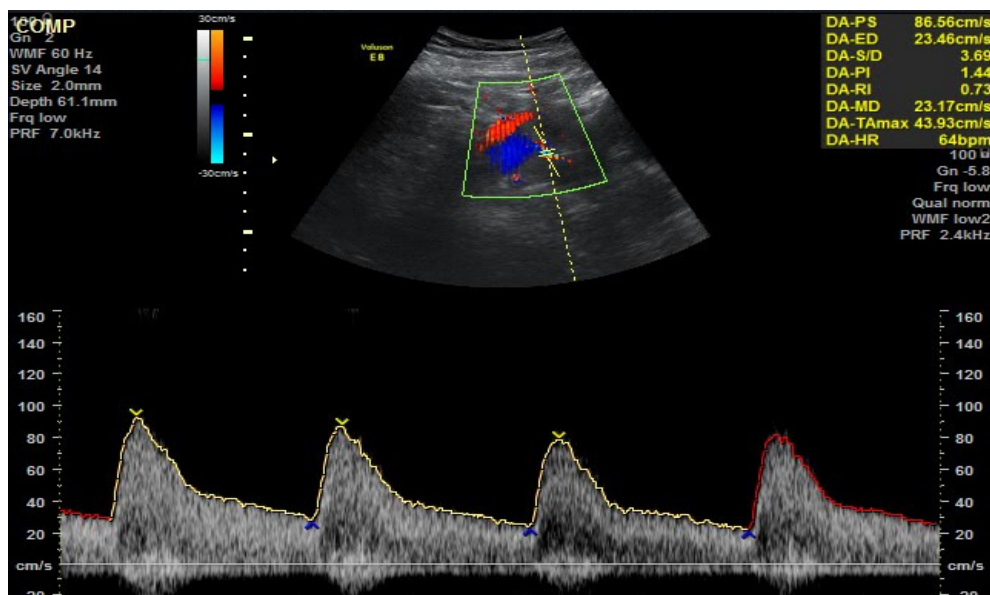
- R_i и P_i индекс на лява маточна артерия при късни спонтанни аборти (Фиг.10);
- R_i и P_i индекс на дясна маточна артерия при късни спонтанни аборти (Фиг.11).



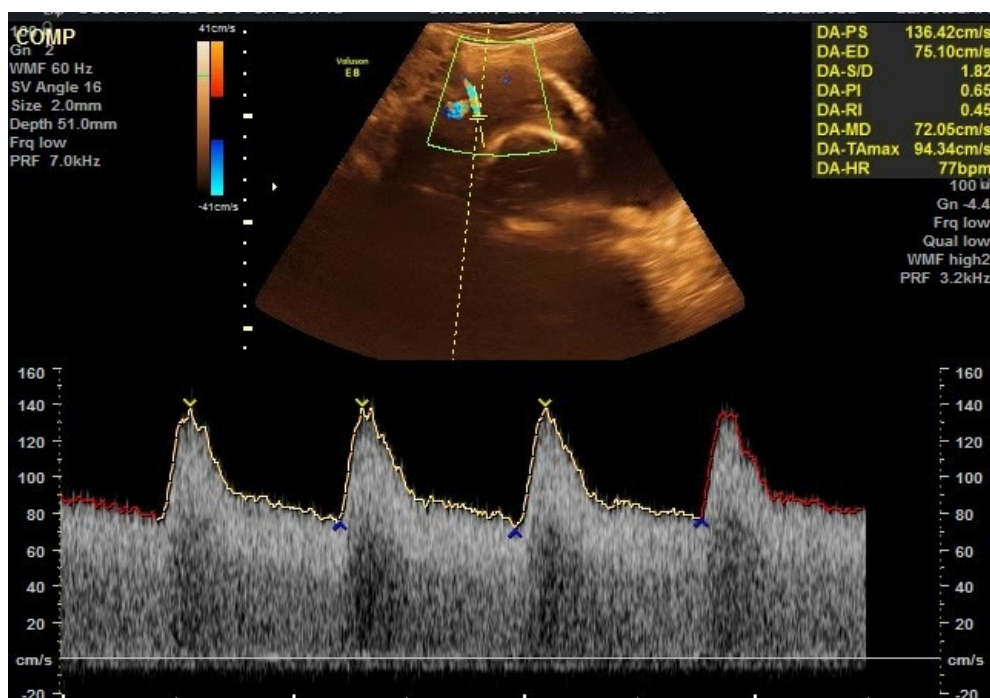
Фиг. 9. Изследване на R_i и P_i индекс на лява маточна артерия при ранен спонтанен аборт в 11 г.с. (Собствен материал)



Фиг. 10. Изследване на R_i и P_i индекс на дясно маточна артерия при ранен спонтанен аборт в 11 г.с. (Собствен материал)



Фиг. 11. Изследване на Ri и Pi индекс на лява маточна артерия при късен спонтанен аборт в 19г.с. (Собствен материал)



Фиг. 12. Изследване на Ri и Pi индекс на дясна маточна артерия при късен спонтанен аборт в 19г.с. (Собствен материал)

1.5. Методи за получаване на хистологиченият материал

Хистологичният материал в научното изследване е плацентарна тъкан от аборти в първи и втори триместър на бременността. Извършването на аборта е съобразено със законодателството и се извърши безопасно. В България, в Наредба

№2 на Министерство на Здравеопазването от 01.02.1990 год. са посочени условията и реда за изкуствено прекъсване на бременността.

Гестационната възраст на плода е определящ в избора на метод за прекъсване на бременност (9).

- Методи за прекъсване на бременност в първия триместър:
 - Хирургични методи:вакуум-аспирация (V&A), дилатация и кюретаж (D&C) ;
 - Медикаментозни методи: простагландини и/или антипрогестерон.
- Методи за прекъсване на бременност във втори триместър:
 - Хирургични методи: дилатация и евакуация (D&E) ; хистеротомия; хистеректомия;
 - Медикаментозни методи:концентрирани разтвори на глюкоза,урейя, риванол; хипертоничени разтвори на натриев хлорид; окситоцин; простагландини и/или антипрогестерон;
 - Механични индукционни средства: Бужи;Метрейринтер;Балон катетър.

В „Отделение по Гинекология“ на СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов – Варна, за извършване на аборт в първи триместър се предпочита хирургична техника чрез V&A и D&C.V&Aе метод за прекъсване на бременността с високата ефективност и с доказана безопасност. Поради употребата на електрическа и ръчна вакуум технология, полученият плацентарен материал невинаги е подходящ за хистологично изследване и имунохистохимично изследване.

Дилатация и кюретаж (D&C) е хирургична техника за аборт, която включва разширяване на шийката на матката и последващо остъргване на стените на матката чрез остра метална кюрета. По метода D&C лесно се отдиференцира плацентарното ложе в маточната кухина– зона на интерес за биопсия и свободно се селектират плацентарни част с наличие на трофобластна тъкан.

Прекъсването на бременности след 13г.с. се извършва чрез дилатация и евакуация. За извършване на D&E се изисква предварителна подготовка на шийката на матката,за да се постигне оптимално разширяване на цервикалния канал. Подготовката на маточната шийка може да се постигне с помощта на

осмотични дилататориили фармакологични средства (10). Препоръчва се преди хирургичен аборт на бременност над 9 г.с. - при първескини, за всички бременни над 10 г.с. и за всички жени под 18 годишна възраст (49).

Медикаментозен аборт през II триместър в „*Отделение по Гинекология*“ на СБАГАЛ „*Проф. д-р Димитър Стаматов* – Варна, се извършва по утвърдена терапевтична схема (11):

- 1табл. Мизопропростол от 400 мкг., поставена в задния влагалищен свод, последвана от 1 табл Мизопропростол от 400 мг суббукално през 2 часа.

След успешното завършване на хирургическата манипулация се подбира плацентарен материал. Същият се фиксира във формалин и се подготвя за микроскопски анализ с оцветяване с хематоксилин-еозин и имунохистохимична техника.

2. Обработка на хистологичния материал

Всеки материал се подготвя за обработка. Крайната цел е изготвянето на тънки срези, които да могат да се наблюдават под светлинен микроскоп. Рутинното оцветяване прието като стандарт в патологията е оцветяването с хематоксилин-еозин. При вече оформеното парафиново блокче има разлика във вида на стъклата според това дали ще се изготвя с хематоксилин-еозин или ще се прави имунохистохимия.

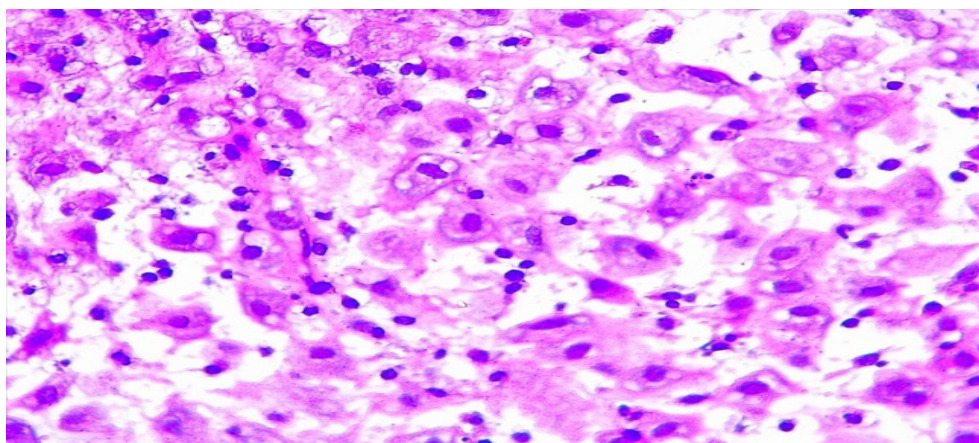
1. Фиксиране на материалите в 10% буферен неутрален формалин за 24 часа.
2. Оформяне на тъканно блокче с размери 1 см. и дебелина до 0,5 см.
3. Тъканното блокче се поставя в биокамета и се промива на течаща вода за 30 минути.
4. Поставяне на биокасетите в хистокинет Leica TP1020 за 12 часов цикъл.
5. Включване на тъканното блокче в парафин, което се осъществява на апарат Leica EG 1150H.
6. Рязане на включеното в парафин тъканно блокче на микротом Leica PM 2265.

Режат се препарати с дебелина 4 микротона на Leica стъкла за рутинно оцветяване (за хематоксилин-еозин) и на адхезивни стъкла Leica X-tra Adhesive с размери 26x76x0,1 mm (за имунохистохимия).

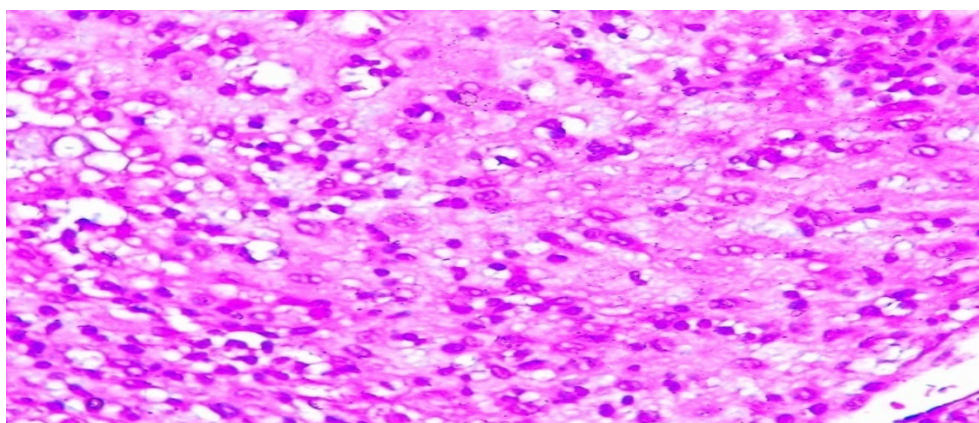
След като вече са нарязани срезите от парафиновото блокче на микротом се преминава към оцветяване с хематоксилин-еозин и последващо имунохистохимично изследване.

3. Оцветяване с хематоксилин и еозин

Оцветяване с хематоксилин и еозин, което се осъществява на автоматичен оцветителен апарат Leica ST 5010 Autostainer XL по протокол. Процеса започва от сушене на препаратите до финалното оцветяване. След оцветяването следва включване на препаратите в апарат за поставяне на покривни стъкла Leica CV 5030, стъклата са готови за сканиране.



Фиг. 13. Трофобластна тъкан оцветена с хематоксилин-еозин, 8г.с. (Собствен материал)



Фиг. 14. Трофобластна тъкан с хематоксилин-еозин. 14 г.с. (Собствен материал)

Чрез оцветяването с хематоксилин-еозин се определя наличието на трофобластна тъкан в подбраните материали (Фиг.13,14). При липса на такава, препаратът не подлежи на имунохистохимия и отпада от научното изследване.

След провеждане на оцветяването с хематоксилин-еозин, от изследването се изключиха две пациентки - в единия случай се откри ендоцервикален полип, а в другия липсваше реакция при оцветяването с хематоксилин-еозин.

4. Имунохистохимия с Ki67

В изследването използвахме Ki67 Антиген, Mouse Monoclonal Anti-Ki67 (K-2), от клас Ig – IgG1, Catalog N: АСК02

- Специфичност

Човешкият Ki67 нуклеарен антиген се експресира във всички пролифериращи клетки по време на G1,S,Ми G2 фазата на клетъчния цикъл. RTU-Ki67-MM1 се препоръчва за употреба при оценка на пролиферацията на нормални и неопластични тъкани.

- Препоръки за употреба

Имунохистохимия на парафинови блокове. Накапва се тъканния срез с първичното антитяло за 15 минути при 25°C. Извършва се термично възстановяване на антигена, чрез прилагането на антигенно възстановяване Epitope Retrieval Solutions, ph 8, 1л, 10x концентрация. С Catalog N: RE 7116.

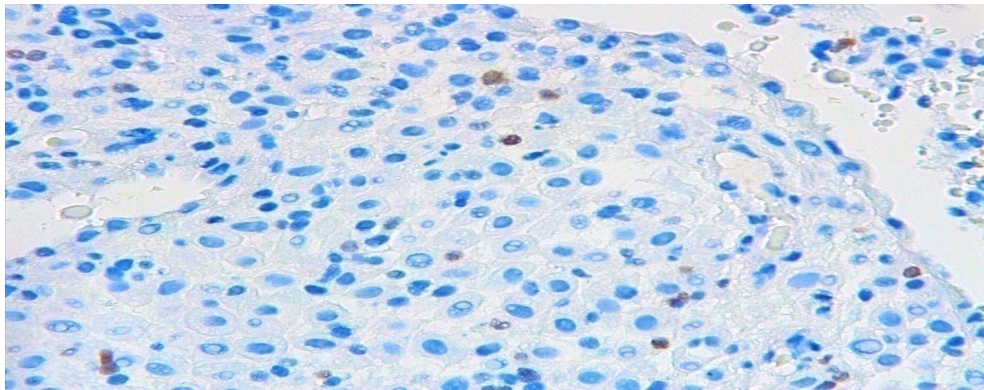
- Подготовка на препарата

Препоръчва се тъканната проба да бъде фиксирана в 10% неутрален формалин за парафинови блокове.

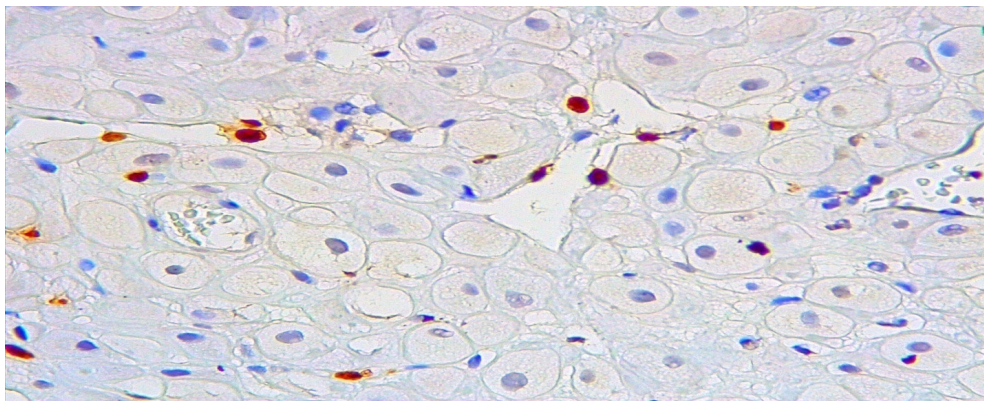
- Изследвана тъкан

Изследвахме тъканни проби от аборти, оцветени с RTU-Ki67MM1. Позитивното оцветяване трябва да се интерпретира като се има в предвид неспецифичното оцветяване, получено с негативната реагентна контрола. Както при всяко имунохистохимично оцветяване, така и тук, негативният резултат означава, че антигенът не е бил открит, а не че той липсва в клетките/тъканите, подложени на изследване.

- Очаквани резултати



Фиг. 15. Трофобластна тъкан след имунохистохимия с пролиферативен маркер Кi 67, 8 г.с. (Собствен материал)



Фиг. 16. Трофобластна тъкан след имунохистохимия с пролиферативен маркер Кi67, 14 г.с. (Собствен материал)

Отчитането се извърши на два произволни образа на увеличение 40 на електронен микроскоп Leica ICC 50 W (Фиг.15,16). Впроби от аборт Кi67 експресия за вилозни стромални клетки, цитотрофобласти и синцитиотрофобласти бяха оценени сборно чрез преброяване на 100 клетки от всяка популация.

Експресия на Кi67 се определи количествено оценена като:

- 0 (неоцветени клетки) ;
- + (по-малко от 10% положителни клетки) ;
- ++ (10-50% положителни клетки) ;
- +++ (повече от 50% положителни клетки).

Интензитетът се оценява като: 0 (отсъства), + (слаб), ++ (умерен) или +++ (силен).

5. Имунохистохимия с CD56+

В изследването използвахме човешки CD 56 (NCAM) антиген, Mouse Myeloma (p3-NS1-Ag4-1), Клон CD564, Клас Ig – IgG2b, Catalog N: NCL-CD56-504.

- Специфичност

Човешкият CD56 антиген е прокариотен рекомбинантен протеин, съответстващ на дял от извънклетъчния домен С на молекулата на човешкия CD56.

- Препоръки за употреба

Имунохистохимия на парафинови блокове. Извърши сетермично възстановяване на антигена, чрез прилагането на антигенно възстановяване Epitope Retrieval Solutions, pH 8, 1л, 10х концентрация. С Catalog N: RE 7116.

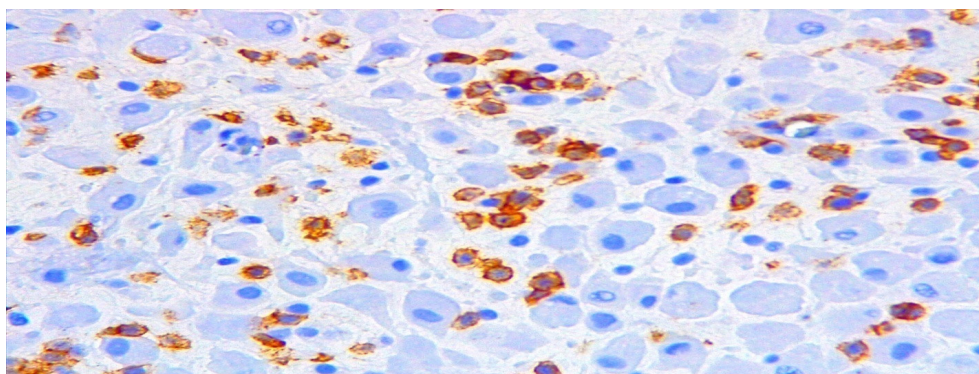
- Подготовка на препарата

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буфериран формалин 10% за тъканни срези, вградени в парафин.

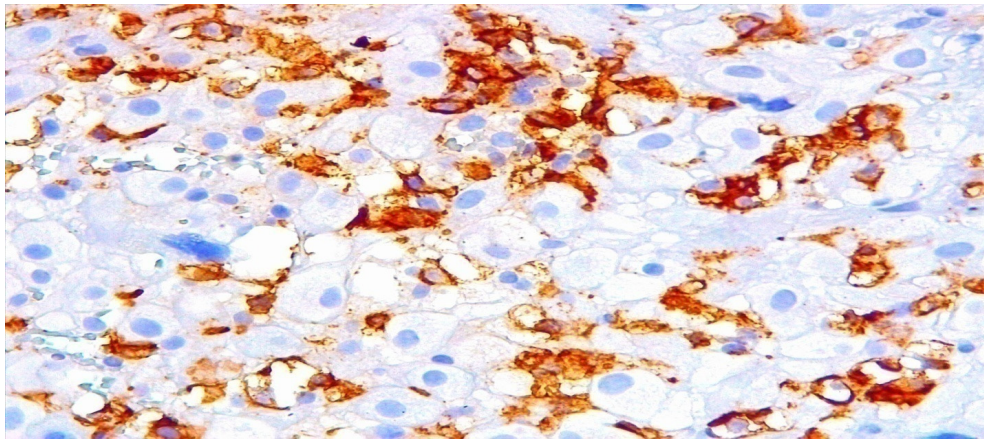
- Изследвана тъкан

Изследвахме тъканни проби от аборти, оцветени последно с NCL-L-CD56-504. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на негативната контрола на реагента. Както при всеки имунохистохимичен тест, един отрицателен резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът отсъства в анализираниите клетки/тъкан.

- Очаквани резултати



Фиг. 17. Трофобластна тъкан след имунохистохимия с CD 56 (NCAM) антиген, 8 г.с. (Собствен материал)



Фиг. 18. Трофобластна тъкан след имунохистохимия с CD 56 (NCAM) антиген, 14 г.с. (Собствен материал)

Клонинг CD564 открива антигена CD56 (NCAM) на мембраната на НК клетките, подклас активирани Т-клетки и невроектодермални клетки (Фиг. 17,18). Общият брой на стромални клетки се определя чрез преброяване на броя на ядрата и общия брой на dNKклетки, определени чрез преброяване на имунопозитивни клетки. Жлезистата епител не е включена в общия брой стромални клетки, но кръвоносните съдове са включени. Данните се изразяват като % dNK клетки/общо стромални клетки.

Използвахме две нормограми за отчитане на резултатите:

1. Според Quenby et al 2005, които приемат за нисък процент под 5% и за висок над 5% (242) ;
2. Според Tuckerman et al 2010, които приемат за нисък процент под 12,9 % и за висок над 12,9% (290).

6. Статистически методи

За целите на настоящото научно проучване приложихме следните статистически методи:

- Графичен и табличен метод– с помощта на графики и таблици е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разделени по групи на изследване, средните стойности и стандартните отклонения, 95% доверителни интервали на изменение на средните стойности. За нагледно представяне на резултатите са използвани хистограми, схеми, кръгови диаграми и др.

- Описателен анализ – изчисляваме производни величини, с които се описват закономерностите в явленията, без да се търсят причините, които са ги породили.
- Методи за анализ на връзки и зависимости – корелационен и регресионен анализ.

6.1. Корелационен анализ

Корелационният анализ е статистически метод за измерване силата (теснотата) на корелационна зависимост между две или повече масови явления. Това се осъществява чрез **корелационни коефициенти**. За разлика от регресионните коефициенти, корелационните коефициенти не изразяват количествените съотношения между резултативното явление и съответните фактори в модела, а само измерват колко силна е връзката между тях.

Различните показатели, с които разполагаме са представени на всички възможни статистически скали (номинална, ординална и интервална). За целта ще използваме различни единични коефициенти на корелация, на база на какви скали са предствени всяка двойка корелирани показатели. Ще предствим само получените статистически значими корелационни връзки, при които граничния показател $\alpha < 0.05$.

Получените корелационни коефициенти ще интерпретираме на база следната таблица (табл.2):

Табл. 2. Интерпретация на корелационните коефициенти

Стойност на корелационния коефициент	Теснота (сила) на връзката
0.0	Липсва връзка
0.0 – 0.1	Много слаба връзка
0.1 – 0.3	Слаба връзка
0.3 – 0.5	Умерена връзка
0.5 – 0.7	Значителна връзка
0.7 – 0.9	Силна връзка
0.9 – 1.0	Много силна връзка
1.0	Функционална връзка

При положителна стойност на корелационния коефициент връзката е права (правопропорционална), а при отрицателна стойност връзката е обратна (обратнопропорционална).

6.2. Регресионен анализ

Чрез регресионния анализ се измерват връзки от корелационен тип и се изследва формата на връзката между две или повече корелационно свързани явления. Тя се установява със средствата на моделирането. Избраният модел за описване на изследваната връзка трябва да има задължително определена аналитична (математическа) форма.

С регресионния анализ се решават следните задачи:

- Определяне на формата на зависимостта между променливите с графични и аналитични методи;
- Определяне на функцията на регресията и оценка на параметрите ѝ;
- Проверка на статистически хипотези за надеждността на регресионните модели и параметрите им.

Ще разгледаме еднофакторни регресионни модели. Променливата резултат ще бележим с Y_i , а променливата фактор с X_i .

Проверката на статистически хипотези за значимостта на регресионните модели и на параметрите им протича в следната последователност:

- Статистическа проверка за адекватност на регресионния модел- основава се на F-критерия на Фишер.
- Статистическа проверка за значимостта на параметрите в регресионния модел- основава се на t-критерия на Стюdent.
- Статистическа проверка за наличие на автокорелация в остатъчния компонент- основава се на критерия на Дърбин - Уотсън.

VI. РЕЗУЛТАТИ

В настоящата работа проучихме и анализирахме бременни жени преминали през СБАГАЛ „Проф.Д-р Димитър Стаматов”,гр. Варна по повод на ранен или късен спонтанен аборт и аборт по желание. Научното изследване се проведе в периода 2018-2022 година.

Обследвахме жените според следните показатели:

- Демографски показатели;
- Вид на аборта;
- Начин на предходно родоразрешение;
- Експресия на CD56 клетки;
- Експресия на Ki67 пролиферативен маркер;
- Доплерова велосиметрия на утеринните артерии.

Извършихме статистически анализ на получените резултати от:

- Имунохистохимията на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 в ранни аборти до 12 г.с.;
- Доплеровата велосиметрия на маточните артерии в ранни аборти до 12г.с.;
- Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимията на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 12 г.с.;
- Доплеровата велосиметрия на маточните артерии в късни аборти по желание до 20г.с.;
- Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимичен анализ на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 20 г.с. ;
- Доплерова велосиметрия на маточните артерии и имунохистохимичен анализ на Децидуалните НК клетки и пролиферативен маркер Ki67 при аборти до 12гс и 20 г.с..

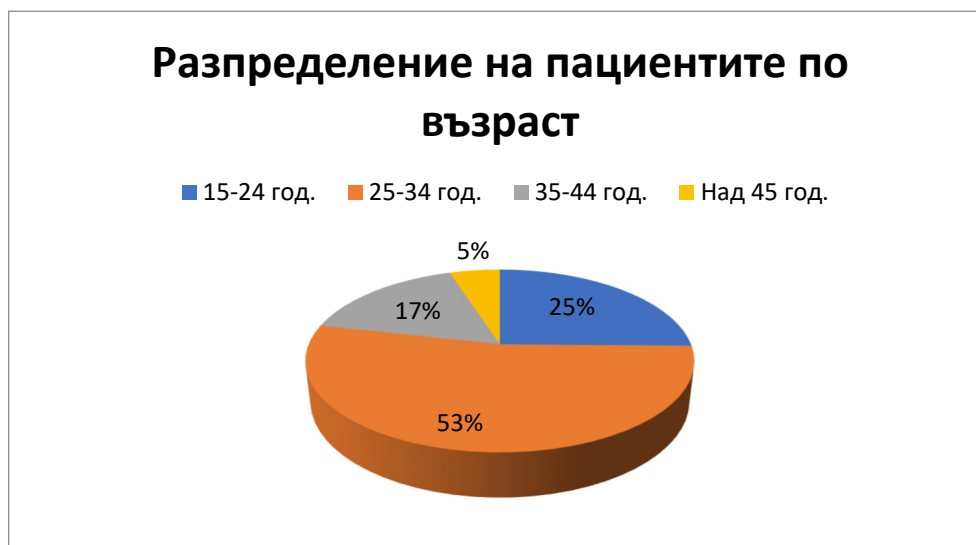
1. Демографски показатели

1.1. Разпределение по възраст

Обследвахме 79 жени, от тях 56 бяха с аборт до 12г.с. и 23 с късен спонтанен аборт до 20г.с. Пациентките са на възраст от 17год. до 45год., средно 29.03 год.

Табл. 3. Разпределение по възраст

	брой	в %
Всички	79	100%
Възраст 15-24 год.	20	25,3%
Възраст 25-34 год.	42	53,2%
Възраст 35-44 год.	13	16,5%
Възраст над 45 год.	4	5%



Фиг. 19. Представяне на пациентите със спонтанни аборти по възраст

В таблица №3 и фигура №19 са представени на пациентите със спонтанни аборти разпределени по възраст. При тях се наблюдава превалиране на бременните на възраст 25-34 години 53.2% (42 пациенти). Втори по честота са възрастовия диапазон 15-24 години – 25,3%.



Фиг. 20. Разпределение на пациентките според възрастта им (35 години)

Разделението е съобразено с Медицински Стандарт по „Акушерство и Гинекология“, който разглежда бременностите на жени след 35 години като такива с повишен риск. Прави впечатление високият брой– 20,3% бременни над 35 години (Фиг.20).

1.2. Гестационна възраст на абортите

Спонтанните аборти са разделени в две групи според гестационната седмица:

- Ранни спонтанни аборти до 12 г.с.;
- Късни спонтанни аборти след 12г.с.

Бяха обследвани 79 жени, от тях 56 бяха с аборти до 13 гес.сед и 23 с късно спонтанни аборти до 20гес.сед.. Средната гестационна възраст на абортите е 10.46 г.с

Табл. 4. Разпределение на абортите според гестационната им възраст

Гестационна възраст (седмици)	Относителен дял (%)
До 12г.с.	70.9%
От 13г.с. до 20г.с.	29.1%

Делът на спонтанните аборти в първи триместър е по-голям (70.9%) от изследваните аборти след 13.г.с.

Табл. 5. Разпределение на пациентките според вида на аборта в първи триместър

Вид аборт	Относителен дял (%)
Спонтанен аборт	78.5 %
Аборт по желание	21.5 %

Броят на абортите в първи триместър са 56, от тях 17 (21.5%) са аборт по желание и 39 (78.5%) спонтанни аборти.

1.3. Разпределение на спонтанни аборти по възраст на бременните

Табл. 6. Разпределение на спонтанни аборти по възраст на бременните

Гестационна възраст (седмици)	Средна възраст на спонтанния аборт	Средна възраст на бременната
До 12г.с.	7.9 г.с.	28.6год.
От 13г.с. до 20г.с.	16.5г.с	29.9год.

Отчита се средна по-висока възраст на бременните с късни спонтанни аборти отколкото бременните с ранни спонтанни аборти. Съответно 29.9 средна възраст за аборт след 13г.с. към 28.6 година за аборт преди 13г.с.

Табл. 7. Аборти при жени под 35 години

	Средна възраст на жените	Средна възраст на аборта	Спонтанни аборти в проценти	Аборти по желание в проценти
Ранни спонтанни аборти	26.4	8.6	46%	25.6%
Късни спонтанни аборти	28.2	16.5	28.6%	0

Жените с аборт в първи триместър под 35 години, са на средна възраст от 26.4 години процентът на ранни спонтанни аборт при тях е 46%. Абортите по желание в тази възрастова подгрупа е 25.6%. Абортите след 12 г.с. са 28.6 %.

Табл. 8. Аборти при жени над 35 години

	Средна възраст на жените	Средна възраст на аборта	Спонтанни аборти в проценти	Аборти по желание в проценти
Ранни спонтанни аборти	38.7	7.8	66.0%	6.7%
Късни спонтанни аборти	37.8	16.8	33.3%	0

Спонтанните аборти в ранни срокове на бременността в подгрупата на жени над 35 години е 66%. Процентът на аборти по желание е 6.7%. Отчетените спонтанни аборти са 33.3%. Впечатление прави по-високата средна възраст на жените с ранни спонтанни аборти.

1.4. Начин на предходно родоразрешение

Изследваните 79 бременни са с общо 180 бременности- 119 аборта и 59 раждания.

Табл. 9. Разпределение на пациентките според вида на раждането

Вид на раждане	Относителен дял (%)
Per Vias Naturalis	56.1%
Sectio Caesarea	43.9%

От резултатите се установява, че процентът на спонтанни аборти е по-висок при жените с раждане Per Vias Naturalis, отколкото при жените родили чрез Sectio Caesarea.

Табл. 10. Разпределение на абортите до 12г.с. според начина на предходно родоразрешение

Вид на раждане/ Без предходно родоразрешение	Брой 56	Относителен дял (%) 100%	Средна възраст на жените 29.93 год
Per Vias Naturalis	20	35.7%	31.86 год.
Sectio Caesarea	21	37.5%	32.01 год.
Без предходно раждане	15	26.8%	25.93 год.

Броя изследвани жени с аборти до 12 г.с е 56, от тях 20 жени са с Per Vias Naturalis раждане в миналото, 21 с Sectio Caesarea и 15 без предходни раждания. От изследваните групи установяваме по-ниска средна възраст при бременните с аборт до 12г.с. без предходни родоразрешения.

Табл. 11. Разпределение на абортите от 13г.с. до 20 г.с. според начина на предходно родоразрешение

Вид на раждане/ Без предходно родоразрешение	Брой 23	Относителен дял (%) 100%	Средна възраст на жените 29.66 год
Per Vias Naturalis	7	30.4%	30.84 год.
Sectio Caesarea	4	17.3%	33.54 год.
Без предходно раждане	12	52.3%	24.62 год.

Бременните жени със спонтанен аборт във втори триместър без предходно раждане са с най-висок относителен дял – 52.3%, и най-ниска средна възраст – 24.62 год. от изследваните групи.

2. Експресия на CD56+ клетки

2.1. Разпределение според възрастта на пациентките

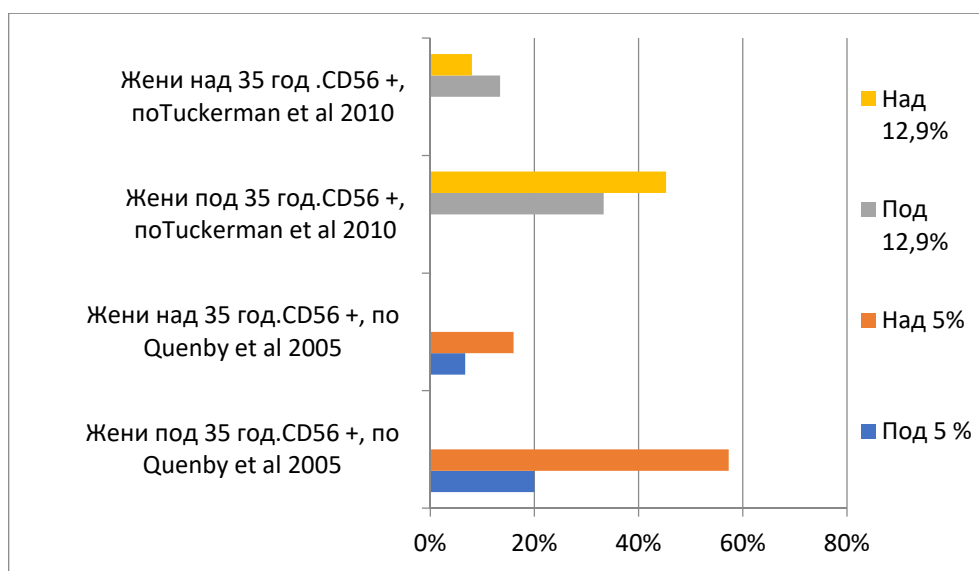
Резултатите от разпределение според възрастта на пациентите и експресията на CD56+ клетки се представи в две таблици. Табл. 10 представя процентно разпределение на клетките според нормограмата по Според Quenby et al 2005, а Табл. 11 по нормограмата по Tuckerman et al 2010.

Табл. 12. Разпределение според възрастта на пациентките и CD56+ (Quenby et al 2005) в проценти

Възраст (години)	CD56+ (под 5 %)	CD56+ (над 5 %)
до 35год.	20 %	57.3 %
над 35год.	6.7 %	16 %

Табл. 13. Разпределение според възрастта на пациентките и CD56+ (Tuckerman et al 2010) в проценти

Възраст (години)	CD 56+ (под12.9 %)	CD 56+ (над12.9 %)
до 35год.	33.3 %	45.3 %
над 35год.	13.4 %	8 %



Фиг. 21. Разпределение според възрастта на пациентките и CD56+ по Quenby et al и Tuckerman et al 2010 в проценти

Разчитането на резултатите по Quenby et al 2005 се характеризира с по-малък процент пациенти с ниска експресия на CD56+ клетките във възрастовите групи под и над 35 год., отколкото получените резултати по Tuckerman et al 2010. В случаите с висока експресия на CD56+ клетки, отчетени по Quenby et al 2005, са в по-голям процент от тези по Tuckerman et al 2010 (Фиг.21).

2.2. Разпределение според гестационната възраст на абортите

Табл. 14. Разпределение според гестационната възраст на абортите и CD56+ (Quenby et al 2005) в проценти

Гестационна възраст (седмици)	CD 56+ (под 5 %)	CD 56+ (над 5 %)
до 12 г.с	10.8 %	55.4 %
над 13г.с. до 20 г.с	14.9 %	18.9 %

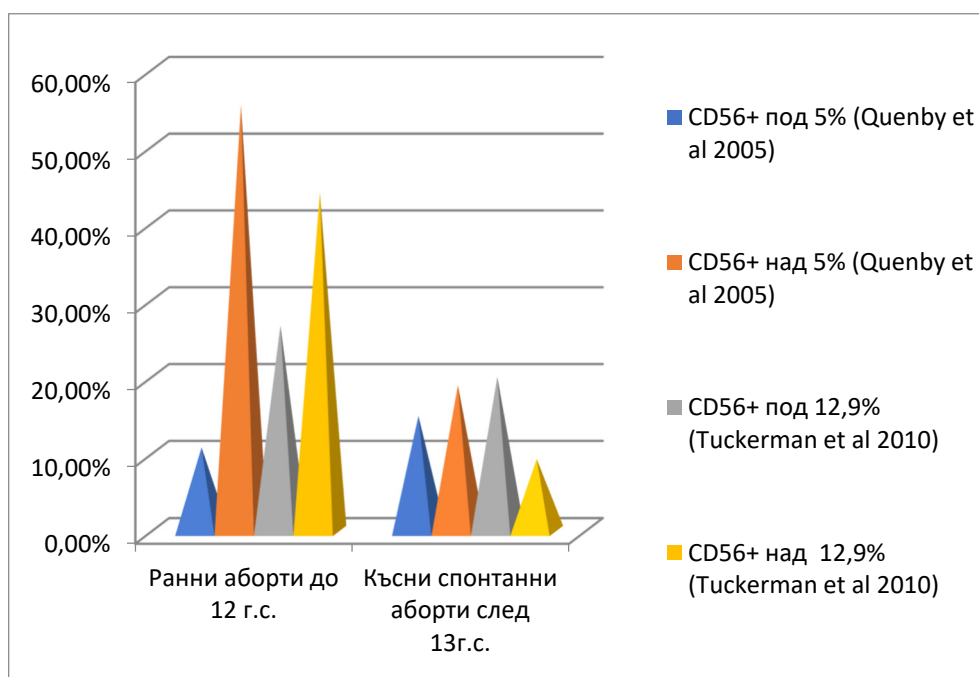
Ниската експресия на CD56+ клетки показва по-малко dNK клетки открити при имунохистохимията на препарати от ранни и късни спонтанни аборти.

Високият процент от 55.4% по Quenby et al 2005 на CD 56+ е свързан с голямо натрупване на dNK клетки при ранните спонтанни аборти. При късните спонтанни аборти положителните клетки са само 18.9%.

Табл. 15. Разпределение според гестационната възраст на абортите и CD56+ (Tuckerman et al 2010) в проценти

Гестационна възраст (седмици)	CD 56+ (под 12.9 %)	CD 56+ (над 12.9 %)
до 12 г.с	26.7 %	44 %
над 13г.с. до 20 г.с	20 %	9.3 %

CD56+ клетки при ранни спонтанни аборти са 26.7% по Tuckerman et al 2010 и 44% при абортите след 13 г.с. Ниска експресия откриваме в 20% от случаите с късен аборт и само в 9.3%, висока експресия над 12.9%.



Фиг. 22. Разпределение според гестационната възраст на абортите и CD56+ по Quenby et al и Tuckerman et al 2010 в проценти

Установяваме голям брой dNK клетки в ранни спонтанни аборти– висока експресия на CD56+ клетки 55.4% по Quenby et al 2005 и 44% по Tuckerman et al 2010. Нисък брой откриваме в 10.8% и 26.7% от случаите.

Хистологичните материали от късни спонтанни аборти са с ниска експресия на CD56+ в 14.9% от случаите, изчислени по Quenby et al 2005 и в 20% по Tuckerman et al 2010. Материалите с висок интензитет на оцветяване са съответно 18.9% и 9.3% (Фиг.22).

2.3. Разпределение според вида на аборта в първи триместър

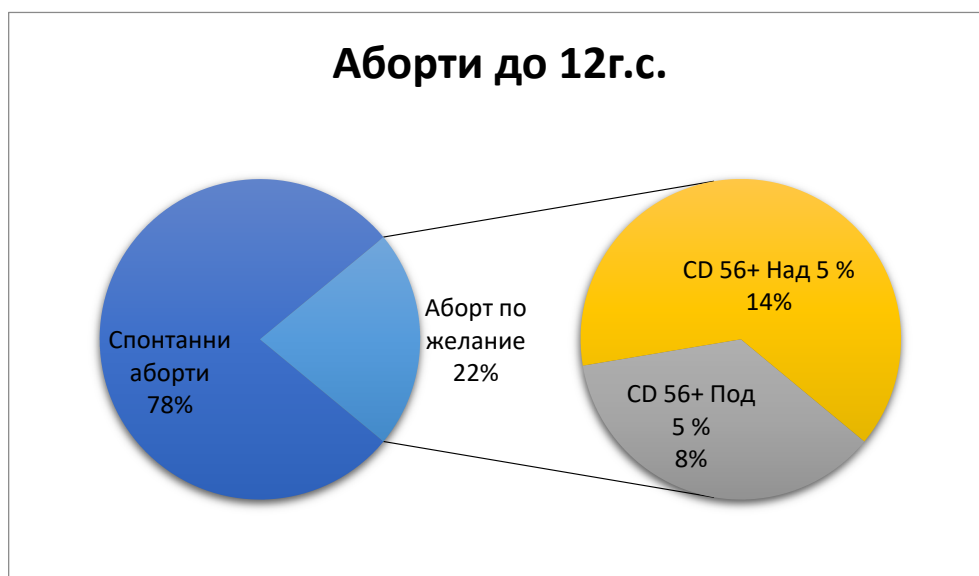
Броят на абортите в първи триместър са 56, от тях 17 (21.5%) са аборт по желание и 39 (78.5%) спонтанни аборти.

Табл. 16. Разпределение според вида на аборта в първи триместър и CD56+ (Quenby et al 2005) в проценти

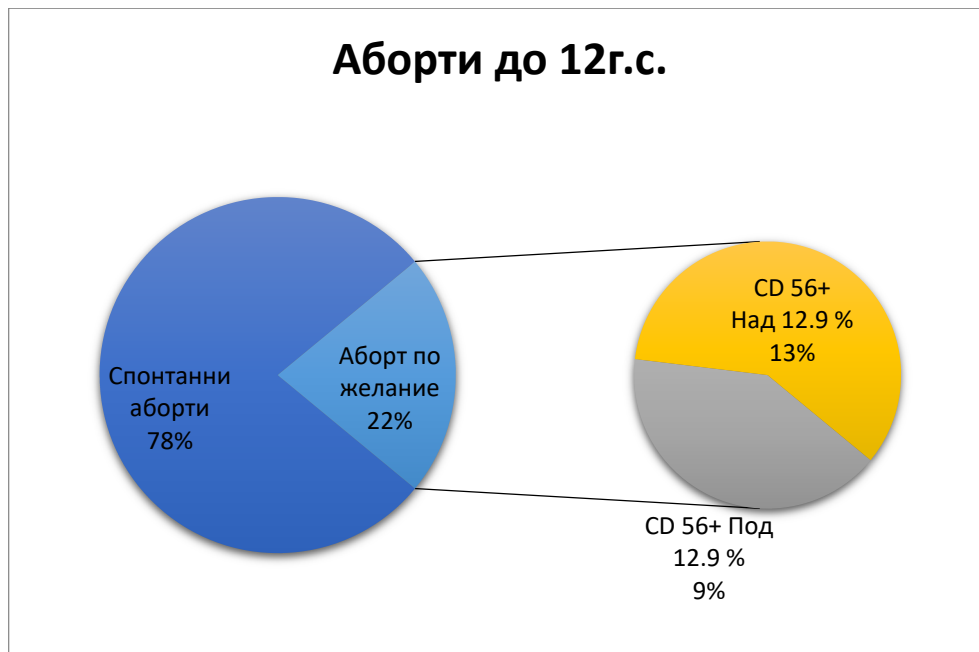
Вид аборт	CD 56+ (под 5 %)	CD 56+ (над 5 %)
Спонтанен аборт	19 %	59.5 %
Аборт по желание	7.6 %	13.9 %

Табл. 17. Разпределение според вида на аборта в първи триместър и CD56+ (Tuckerman et al 2010) в проценти

Аборт	CD 56+ (под 12.9 %)	CD 56+ (над 12.9 %)
Спонтанен аборт	27.8 %	50.6 %
Аборт по желание	8.9 %	12.7 %



Фиг. 23. Разпределение според вида на аборта в първи триместър и CD56+ (Quenby et al 2005)



Фиг. 24. Разпределение според вида на аборта в първи триместър и CD56+ (Tuckerman et al 2010)

Табличното (Табл.16,17) и графичното (Фиг.23,24) представяне на получените резултатите от разпределение според вида на аборта в първи триместър и CD56+ по двете нормограми е почти идентична.

Общият процент на разпределение на dNK клетки в ранни спонтанни аборти е 78%, а при абортите по желание 22 %. Откриваме резултати над 50% за висока експресия на позитивни клетки при спонтанни аборти в първи триместър.

2.4. Разпределение според срока на аборта и Ri и Pi на маточните артерии в подгрупите на положителни клетки CD56+

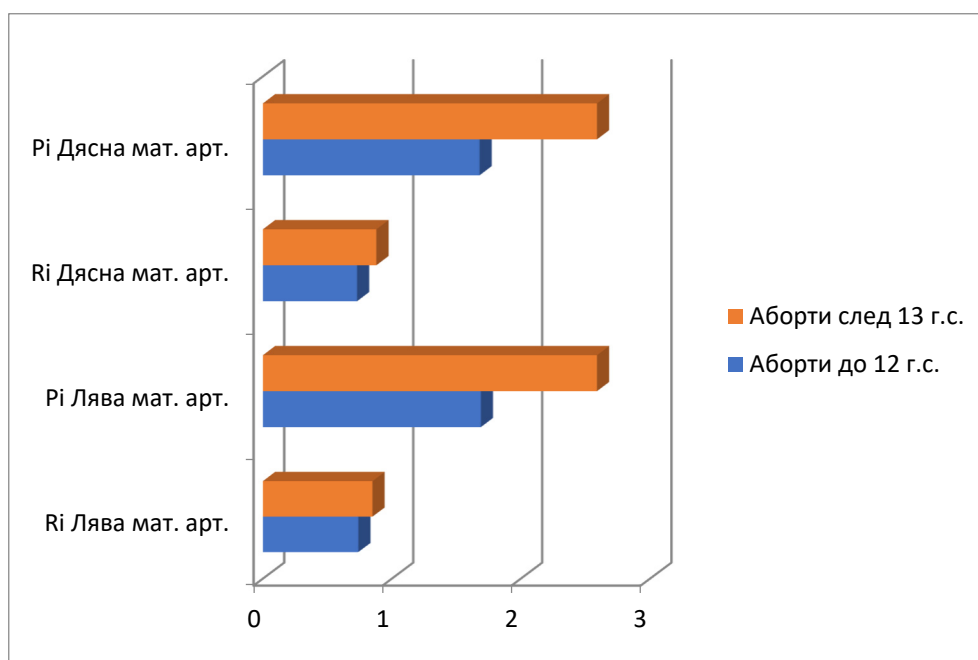
CD56+ под 5% по Quenby et al 2005

Табл. 18. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, Ri и Pi на маточните артерии по срока на бременността при CD56+ клетки с експресия под 5% по Quenby et al 2005

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	28.8	29.7
Гестационна възраст	7.4	17.6
Ri Лява мат. артерия	0.74	0.85
Pi Лява мат. артерия	1.69	2.59
Ri Дясна мат. артерия	0.73	0.88
Pi Дясна мат. артерия	1.68	2.59

Бременните жени с раннен спонтанен аборт до 12г.с., с ниска експресия CD56+ клетки под 5% по Quenby et al 2005, са на средна възраст 28.8 години и със средна гестационна възраст на аборта от 7.4 гестационни седмици.

Пациентките с късни спонтанни аборти и ниска експресия на CD56+ клетки под 5% по Quenby et al 2005 са на средна възраст 29.7 години, средно с 11 месеца по-възрастни от жените с раннен спонтанен аборт (28.8год). Средната гестационна възраст на абортите в тази група жени е 17.6 г.с.



Фиг. 25. Ri и Pi при ранни аборти и късни спонтанни аборти с експресия на CD56+ под 5 % по Quenby et al 2005

Доплеровата велосиметрия на маточните артерии при абортите до 12 г.с., със слаба експресия на CD56+ под 5%, показва по-ниски средни стойности от късните спонтанни аборти (Фиг.25). Получените резултати са:

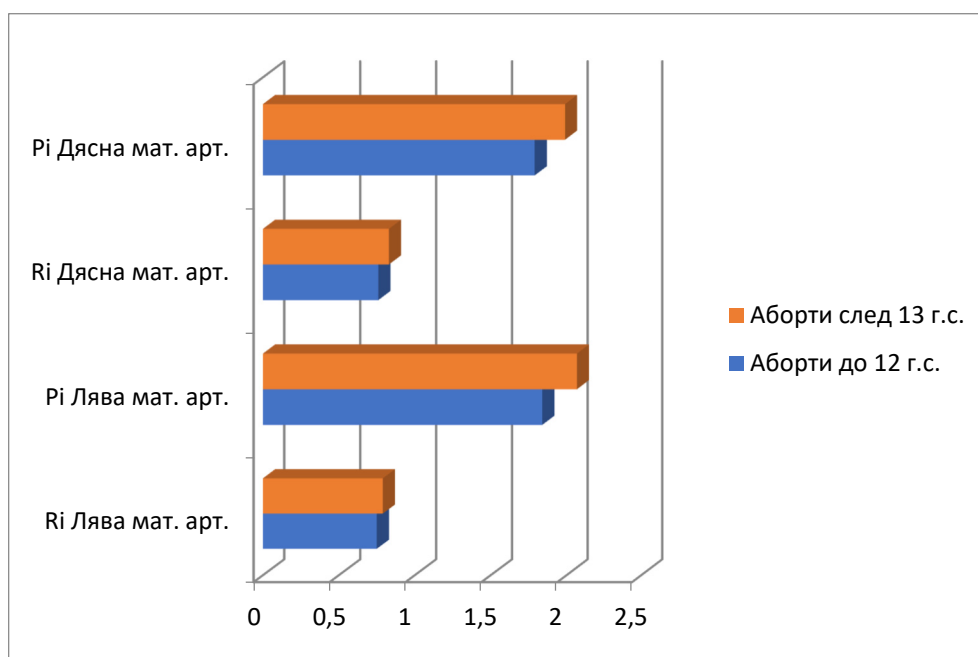
- Ri Лева маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri Лева маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.09) ;
- Pi Лева маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi Лева маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.9) ;
- Ri Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.15) ;
- Pi Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.91).

CD56+ над 5% по Quenby et al 2005

Табл. 19. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, Ri и Pi на маточните артерии по срока на бременността при CD56+ клетки с експресия над 5% по Quenby et al 2005

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	28.9	29.7
Гестационна възраст	8.0	16.0
Ri лява мат. артерия	0.75	0.79
Pi лява мат. артерия	1.84	2.07
Ri дясна мат. артерия	0.76	0.83
Pi дясна мат. артерия	1.79	1.99

Жените с ранни спонтанни аборти с висока експресия CD56+ клетки над 5% по Quenby et al 2005 са на средна възраст 28.9 години, а средната възраст на бременните с късни спонтанни аборти е 29.7 години.



Фиг. 26. Ri и Pi при ранни аборти и късни спонтанни аборти с експресия на CD56+ над 5% по Quenby et al 2005

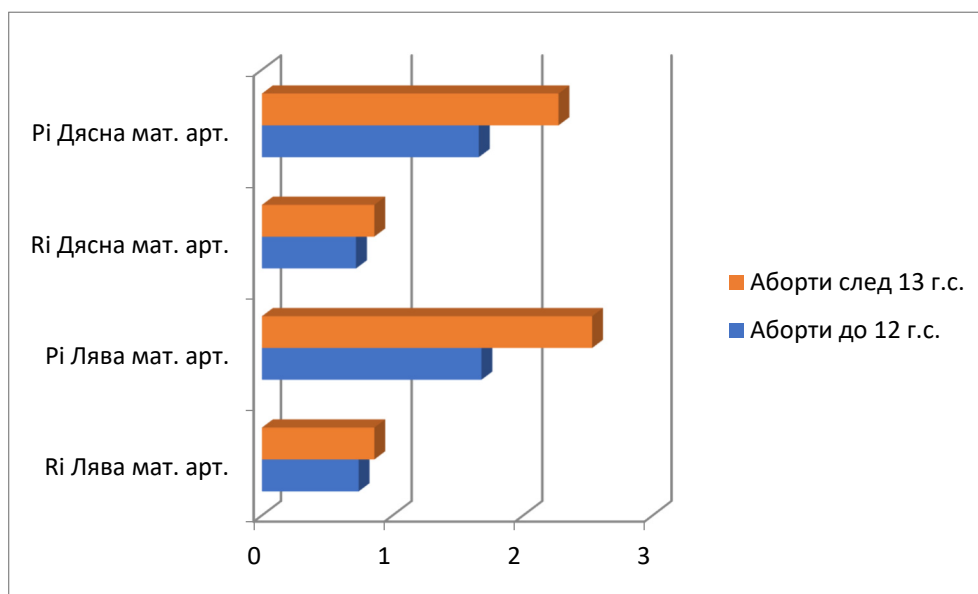
На Фиг.26 се визуализират резултатите от Доплеровата велосиметрия на маточните артерии при абортите до 12 г.с., с експресия на CD56+ над 5% и късните спонтанни аборти, които са близки.

CD56+ под 12.9 % по Tuckerman et al 2010

Табл. 20. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, Ri и Pi на маточните артерии по срока на бременността при CD56+ клетки с експресия под 12.9 % по Tuckerman et al 2010

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	30.7	29.4
Гестационна възраст	7.4	17.4
Ri лява мат. артерия	0.74	0.86
Pi лява мат. артерия	1.68	2.53
Ri дясна мат. артерия	0.72	0.86
Pi дясна мат. артерия	1.66	2.27

От разпределение по срок на аборта, в групата със CD56+ клетки с експресия под 12.9 % по Tuckerman et al 2010, за първи път в проучването откриваме висока средна възраст на жените със спонтанен аборт до 12г.с. от тези с късен спонтанен аборт. Бременни с ранен спонтанен аборт са на средна възраст от 30.7 години, а с късен аборт до 20г.с. – 29.4 години.



Фиг. 27. Ri и Pi при ранни аборти и късни спонтанни аборти с експресия на CD56+ под 12.9 % по Tuckerman et al 2010

Резултатите от Доплеровата велосиметрия представени на Фиг.27 са:

- Ri лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.12) ;
- Pi лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.85) ;

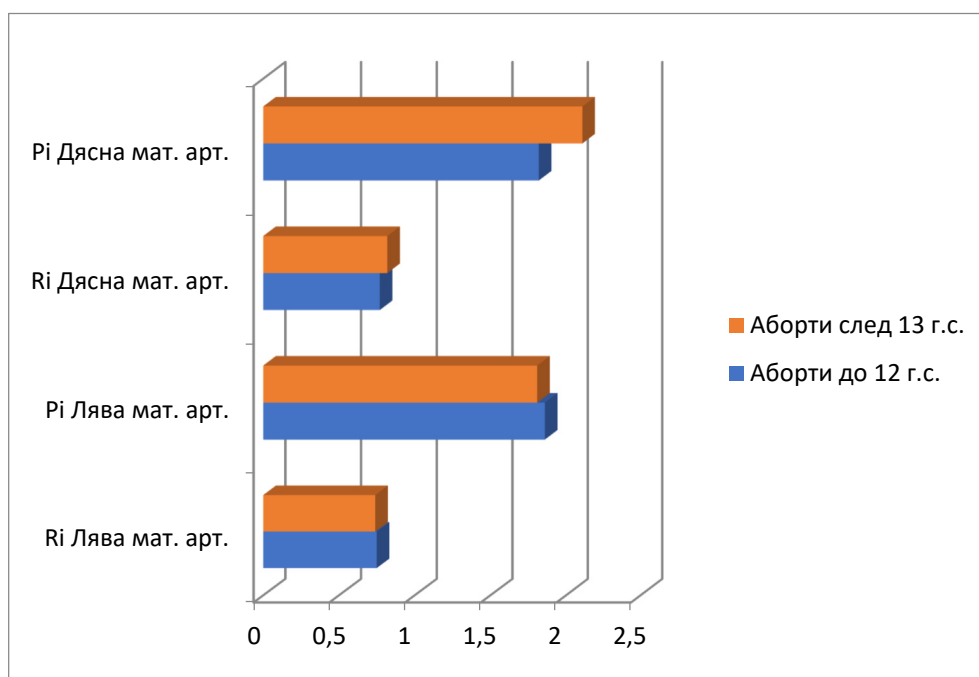
- R_i Дясна маточна артерия в абрти до 12 г.с $< R_i$ Дясно маточна артерия в абрти след 13 г.с. (средно с 0.14) ;
- P_i Дясна маточна артерия в абрти до 12 г.с $< P_i$ Дясно маточна артерия в абрти след 13 г.с. (средно с 0.58).

CD56+ над 12.9 % по Tuckerman et al 2010

Табл. 21. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, R_i и P_i на маточните артерии по срока на бременността при CD56+ клетки с експресия над 12.9 % по Tuckerman et al 2010

Средни стойности на	Абрти до 12 г.с	Абрти след 13 г.с.
Възраст на майката	27.9	30.0
Гестационна възраст	8.2	15.25
R_i Лява мат. артерия	0.75	0.74
P_i Лява мат. артерия	1.86	1.81
R_i Дясна мат. артерия	0.77	0.82
P_i Дясна мат. артерия	1.82	2.11

Пациентките със силна експресия на CD56+ над 12.9 % по Tuckerman et al 2010 с аборт до 12г.с. са на средна възраст 27.9 години със средна гестационна възраст на аборта 8.2 г.с. Жените с късни абрти до 20 г.с. са на средна възраст от 30 години и с абрти в 15.25 гестационна седмица.



Фиг. 28. R_i и P_i при ранни абрти и късни спонтанни абрти с експресия на CD56+ над 12.9 % по Tuckerman et al 2010

При изследване на маточните артерии на бременните в тази група (Фиг.28), установихме по-високи стойности на R_i и P_i на лява маточна артерия от тези на дясната. Резултатите от Доплеровата велосиметрия са:

- R_i лява маточна артерия в аборти до 12 г.с $>R_i$ лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.01) ;
- P_i лява маточна артерия в аборти до 12 г.с $>P_i$ лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.05) ;
- R_i дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с $<R_i$ дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.05)
- P_i дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с $<P_i$ дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.29).

3. Експресия на Ki67 пролиферативен маркер

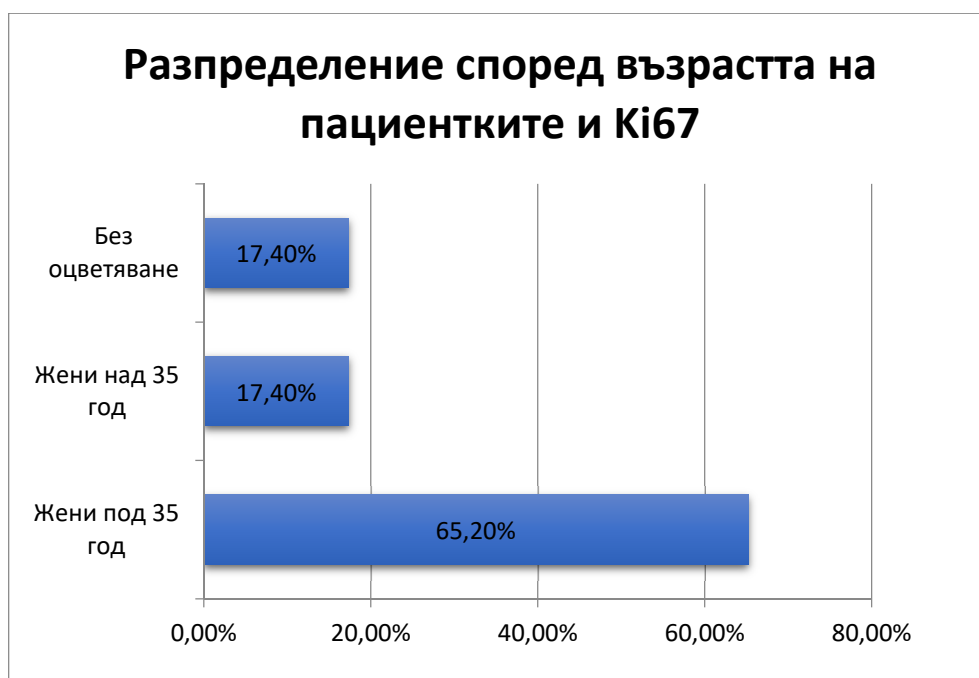
3.1.Разпределение според възрастта на пациентките

Табл. 22. Разпределение според възрастта на пациентките и Ki67 в проценти

Възраст (години)	Ki67 Неоцветени клетки	Ki67 под 10 % Положителни клетки	Ki67 10 - 50 % Положителни клетки	Ki67 над50 % Положителни клетки
до 35 год	14.7%	34.6%	25.3%	5.3%
над 35 год	2.7%	10.7%	6.7%	0%

Пролиферативният маркер Ki67 се открива основно при жени под 35 години. Най-голям процент 34.6% откриваме в групата на клетки със слаб интензитет под 10%, следвана от групата с умерен (10-50%) – 25.3%, неоцветени клетки– 14.7% и последна е групата със силен интензитет над 50%.

При жените над 35 години, Ki67 над 50% (силен интензитет) не се откри. Най-голям процент е групата със слаб интензитет под 10%- 10.7%. Резултат с умерена експресия на Ki67 е 6,7%, а без оцветяване са 2.7%.



Фиг. 29. Разпределение според възрастта на пациентките и Ki67 в проценти

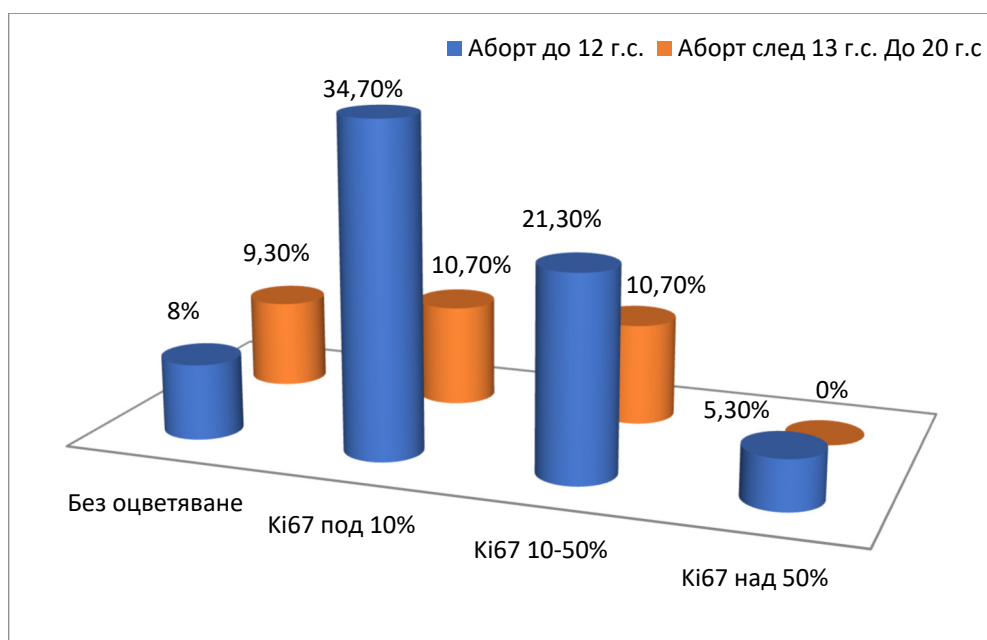
Пролиферативен маркер Ki67 откриваме в 65.2% при жените с аборти под 35 години. Над 35 години, положително оцветени клетки открихме в 17.4%, а в 17.4 % нямаше оцветяване за Ki67 (Фиг.29).

3.2. Разпределение според гестационната възраст на абортите

Табл. 23. Разпределение според гестационната възраст на абортите и Ki67 в проценти

Гестационна възраст (седмици)	Ki 67 нецветени клетки	Ki 67 под 10 % положителни клетки	Ki 67 10 - 50 % положителни клетки	Ki 67 над 50 % положителни клетки
до 12	8%	34.7%	21.3%	5.3%
над 13 до 20	9.3%	10.7%	10.7%	0%

Процентното съдържание на положителни клетки Ki67 в ранни спонтанни аборти е 69.3%. Групата с слаб интензитет е най-висока – 34.7%, а най-рядко срещана е тази със силен интензитет над 50% – 5.3%.



Фиг. 30. Разпределение според гестационната възраст на абортите и Ki67 в проценти

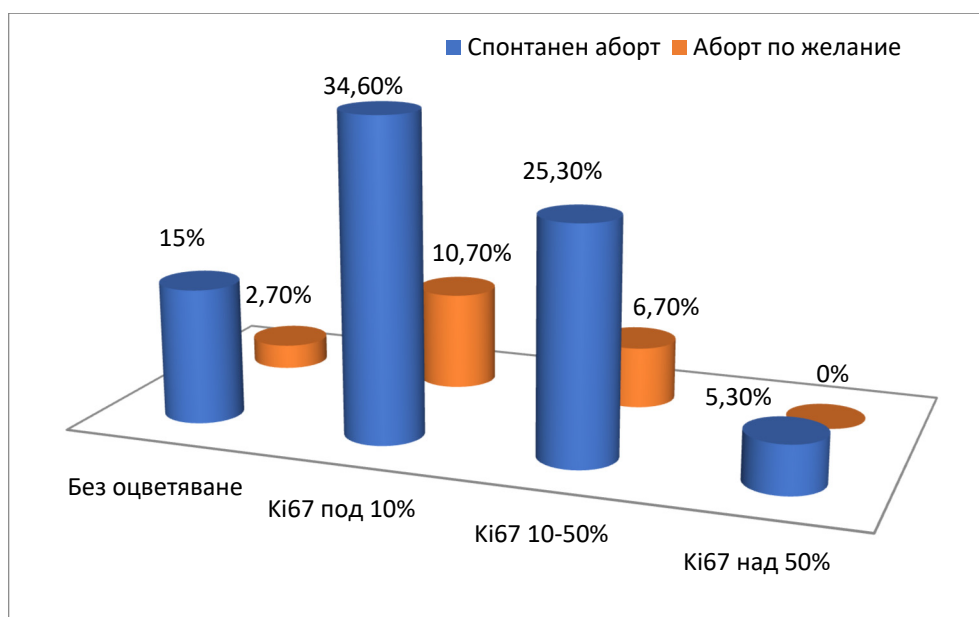
Процентът на оцветени положително клетки за Ki67 при късните спонтанни аборти е 30.7%. Ki67 под 10% и Ki67 10-50% са еднакъв процент– 10.7%. Резултат със силен интензитет, повече от 50% на оцветяване в групата на аборти след 13г.с., не открихме (Фиг.30).

3.3.Разпределение според вида на аборта

Табл. 24. Разпределение според вида на аборта и Ki67 в проценти

Аборт	Ki67 неоцветени клетки	Ki67 под 10 % положителни клетки	Ki67 10 - 50 % положителни клетки	Ki67 над 50 % положителни клетки
Спонтанен аборт	14.7%	34.6%	25.3%	5.3%
Аборт по желание	2.7%	10.7%	6.7%	0%

В 65.2% от хистогичните материали със спонтанен аборт откриваме оцветяване. В 14.7% от случаите няма оцветяване. Резултатите със силен интензитет на Ki67 над 50% са 5.3%. Най-голяма е групата с ниско количество оцветени клетки под 10% - 34.6%. Тези с умерен интензитет са 25.3%



Фиг. 31. Разпределение според вида на аборта и Ki67 в проценти

На фиг.31 се визуализира, че само в 17.4% от случаите с аборт по желание се откриха положителни на Ki67 клетки. Препаратите с липса на оцветяване са 2.7%, при тези с реакция, установихме Ki67 под 10% в 10.7% и Ki67 10-50% в 6.7%

3.4.Разпределение според вида на раждането

Табл. 25. Разпределение на Ki67 според вида на раждането в проценти

Раждане	Ki67 неоцветени клетки	Ki67 под 10% положителни клетки	Ki 67 10 - 50% положителни клетки	Ki67 над 50% положителни клетки
Per Vias Naturalis	45%	18.7%	18.7%	2.7%
Sectio Caesarea	13.3%	26.6%	13.3%	2.7%

При жените със спонтанен аборт и предходно раждане Per Vias Naturalis в 45% от препаратите не открихме оцветяване. В групите със слаб (под 10%) и умерен (10-50%) интензитет на оцветяване установихме еднакви резултати 18.7%. Над 50% положително оцветени клетки при абортите след раждане Per Vias Naturalis открихме в 2.7%, колкото и след раждане чрез Sectio Caesarea.

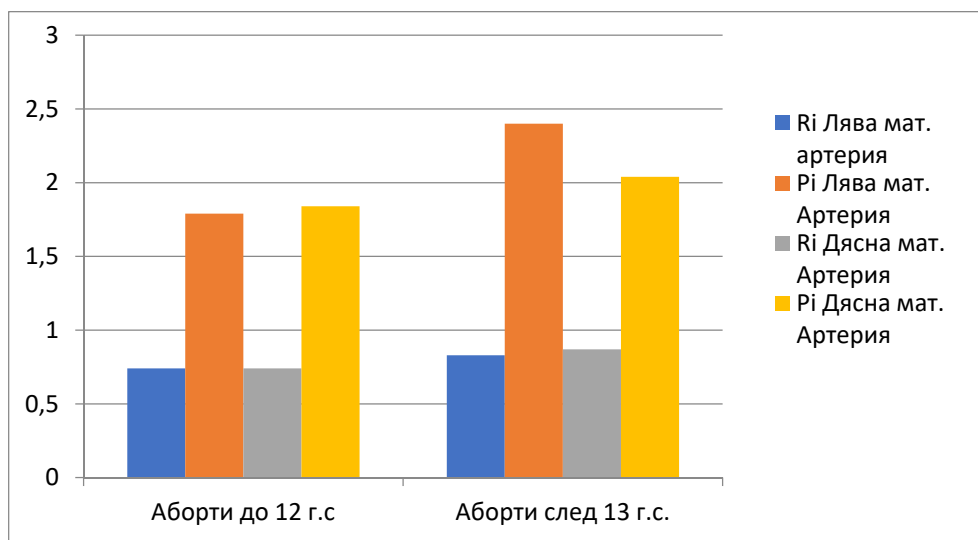
3.5.Разпределение според срока на аборта и R_i и P_i на маточните артерии в подгрупите според интензитета на $Ki67$

Ki67 Без оцветяване

Табл. 26. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, R_i и P_i на маточните артерии по срока на бременността при $Ki67$ без реакция

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с.	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	31.0	28.0
Гестационна възраст	7.8	19
R_i лява мат. артерия	0.85	0.89
P_i лява мат. артерия	2.42	2.68
R_i дясна мат. артерия	0.80	0.89
P_i дясна мат. артерия	1.86	2.62

Средната възраст на жените със спонтанни аборти до 12г.с. без оцветяване след имунохистохимия с пролиферативен маркер $Ki67$ са на средна възраст от 31 години и средна гестационна седмица на аборта 7.8 г.с. В групата с аборт след 13г.с. майчината средна възраст (28 години) е с 3 години по-ниска от бременните с ранен спонтанен аборт. Abortите в късните спонтанни аборти с резултат $Ki67$ 0 са в средна гестационна възраст - 19г.с.



Фиг. 32. R_i и P_i при ранни аборти и късни спонтанни аборти с $Ki67$ без реакция

След провеждане на Доплерово изследване на маточните артерии установихме следните резултати (Фиг.32):

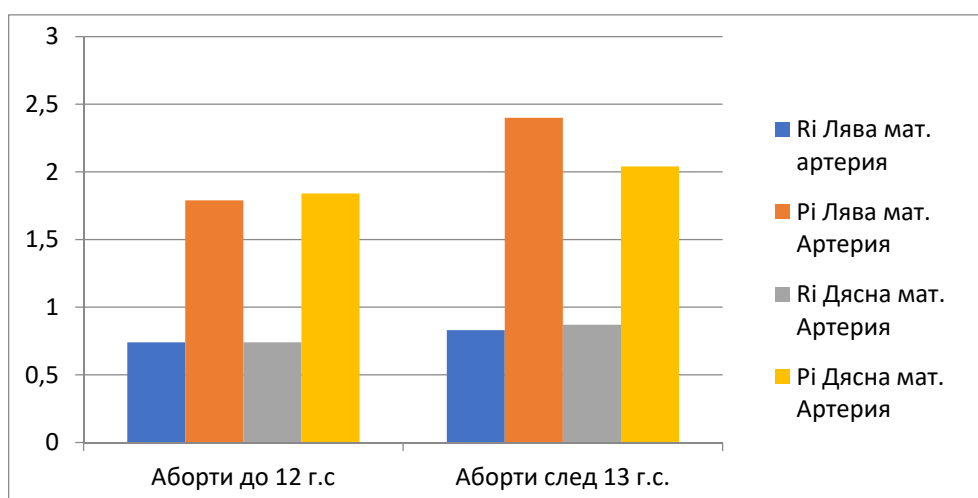
- R_i Лява маточна артерия в аборти до 12 г.с $< R_i$ Лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.04) ;
- P_i Лява маточна артерия в аборти до 12 г.с $< P_i$ Лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.26) ;
- R_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с $< R_i$ Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.09)
- P_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с $< P_i$ Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.76).

Ki67 под 10%

Табл. 27. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, R_i и P_i на маточните артерии по срока на бременността при $Ki67$ под 10%

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с.	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	29.7	28.2
Гестационна възраст	8.0	16
R_i Лява мат. артерия	0.74	0.83
P_i Лява мат. артерия	1.79	2.40
R_i Дясна мат. артерия	0.74	0.87
P_i Дясна мат. артерия	1.84	2.04

Бременните жени с ранни и късни спонтанни аборти с експресия на $Ki67$ под 10% са на средна възраст 29.7 и 28.2 години. От резултатите се установява по-висока средна възраст на жените с ранни аборти.



Фиг. 33. R_i и P_i при ранни аборти и късни спонтанни аборти с $Ki67$ под 10%

В подгрупата на ранни аборти и късни спонтанни аборти със слаб интензитет на Ki67, получихме по-високи стойности от Доплеровата велосиметрия на Ri и Pi на маточните артерии при абортите след 13 г.с. (Фиг.33)

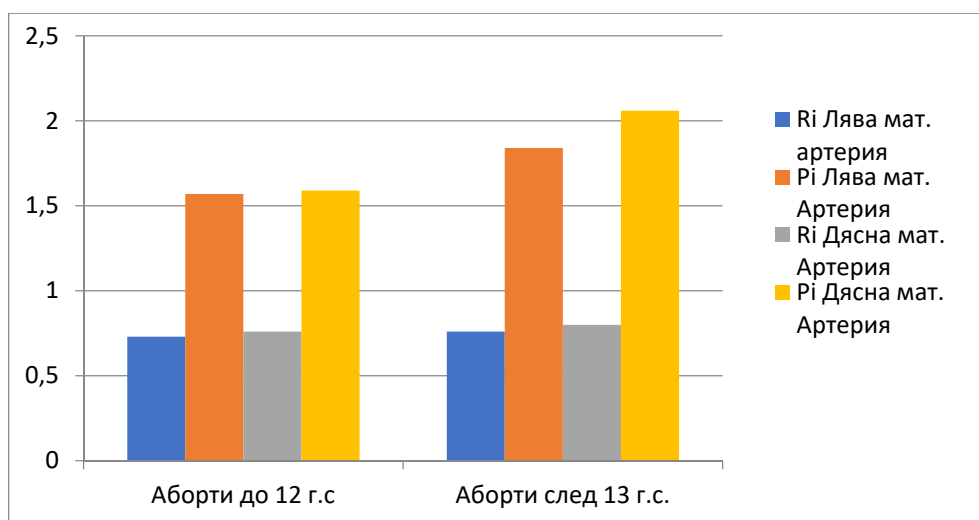
- Ri лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.61) ;
- Pi лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.26) ;
- Ri дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.13) ;
- Pi дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.20).

Ki67 10% - 50%

Табл. 28. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, Ri и Pi на маточните артерии по срока на бременността при Ki67 10-50%

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с.	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	28.4	31.8
Гестационна възраст	7.6	15.1
Ri лява мат. артерия	0.73	0.76
Pi лява мат. артерия	1.57	1.84
Ri дясна мат. артерия	0.76	0.80
Pi дясна мат. артерия	1.59	2.06

Експресия между 10-50% на положителни клетки се откри при жени с аборти до 12 г.с. на средна възраст от 28.4 години. Биологичният материал е селектиран от аборти със средна гестационна седмица 7.6 г.с. При абортите след 13 г.с. умерен интензитет установихме при бременни на възраст средно 31.8 години и средна седмица на аборт в 15.1 г.с,



Фиг. 34. Ri и Pi при ранни аборти и късни спонтанни аборти сKi67 10-50%

Изследване на кръвотока на матката откри разлика в пулсативните и резистентните индекси на двете маточни артерии при ранни и късни спонтанни аборти – видимо от табл.28 и фиг.34.

- Ri Лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri Лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.03) ;
- Pi Лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi Лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.27) ;
- Ri Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.04) ;
- Pi Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.47).

Ki67 10% - 50%

Табл.29. Разпределение по средна възраст на майката, средна гестационна седмица, Ri и Pi на маточните артерии по срока на бременността при Ki67 над 50%

Средни стойности на	Аборти до 12 г.с.	Аборти след 13 г.с.
Възраст на майката	24.0	0
Гестационна възраст	7.7	0
Ri Лява мат. артерия	0.68	0
Pi Лява мат. артерия	1.90	0
Ri Дясна мат. артерия	0.73	0
Pi Дясна мат. артерия	1.97	0

Не открихме силен интензитет на оцветяване за пролиферативен маркер Ki67 при спонтанни аборти след 13г.с.

Средната възраст на жените с повече от 50% положително оцветени клетки е най-ниската възраст от подгрупите с наличие на позитивни клетки – 24.0 години. Средната възраст на аборта е 7.7 г.с.

4. Статистическа обработка на получените резултати

4.1. Корелационен анализ

Разполагаме с данни за 79 пациентки. Всички представени корелационни коефициенти имат граничния показател $\alpha < 0.05$ и са статистически значими.

Възраст на пациентките (години)

Табл. 30. Статистически значими корелационни връзки според възраст на пациентките

Корелационна връзка между възраст на пациентките и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56 под 5 %	R = 0.125	Слаба връзка
CD56 над 5 %	R = 0.251	Слаба връзка
CD56 под 12.9 %	R=0.463	Умерена връзка
CD56 над 12.9 %	R = - 0.426	Умерена връзка
Брой бременности	R = 0.641	Значителна връзка
Брой спонтанни аборти	R = 0.462	Умерена връзка
Брой аборти пожелание	R = -0.491	Умерена връзка
Ki67 0	R = 0.244	Слаба връзка
Ki67 под 10%	R = 0.226	Слаба връзка
Ki67 10-50%	R = 0.227	Слаба връзка
Ki67 над 50%	R = -0.383	Умерена връзка

Гестационна възраст на аборта (седмици)

Табл. 31. Статистически значими корелационни връзки според гестационната възраст на аборта

Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56 под 5 %	R = 0.365	Умерена връзка
CD56 над 5 %	R = -0.336	Умерена връзка
CD56 под 12.9 %	R = 0.428	Умерена връзка
CD56 над 12.9 %	R = -0.436	Умерена връзка
Брой спонтанни аборти	R = 0.673	Значителна връзка
Брой аборти пожелание	R = -0.673	Значителна връзка
Ki67 0	R = 0.461	Умерена връзка
Ki67 под 10%	R = 0.326	Умерена връзка
Ki67 10-50%	R = 0.335	Умерена връзка
Ki67 над 50%	R = -0.554	Значителна връзка
Ri на лява маточна артерия	R = 0.481	Умерена връзка
Pi на лява маточна артерия	R = 0.532	Значителна връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = 0.619	Значителна връзка
Pi на дясна маточна артерия	R = 0.621	Значителна връзка

Ранни спонтанни аборти до 12 г.с.

Табл. 32. Статистически значими корелационни връзки при ранни спонтанни аборта

Корелационна връзка между ранни спонтанни аборта и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56+ под 5 %	R = -0.261	Слаба връзка
CD56+ над 5 %	R = 0.322	Умерена връзка
CD56+ под 12.9 %	R = -0.425	Умерена връзка
CD56+ над 12.9 %	R = 0.445	Умерена връзка
Брой спонтанни аборти	R = -0.585	Значителна връзка
Брой аборти пожелание	R = 0.585	Значителна връзка
Ki67 0	R = -0.195	Слаба връзка
Ki67 под 10%	R = 0.06	Много слаба връзка
Ki67 10-50%	R = 0.05	Много слаба връзка
Ki67 над 50%	R = 0.148	Слаба връзка
Ri на лява маточна артерия	R = -0.428	Умерена връзка
Pi на лява маточна артерия	R = -0.525	Значителна връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = -0.467	Умерена връзка
Pi на дясна маточна артерия	R = -0.537	Значителна връзка

Късни спонтанни аборти след 13 г.с.

Табл. 33. Статистически значими корелационни връзки при късни спонтанни аборти

Корелационна връзка между късни спонтанни аборта и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56+ под 5 %	R = 0.234	Слаба връзка
CD56+ над 5 %	R = -0.232	Слаба връзка
CD56+ под 12.9 %	R = 0.465	Умерена връзка
CD56+ над 12.9 %	R = -0.426	Умерена връзка
Брой спонтанни аборти	R = 0.542	Значителна връзка
Брой аборти пожелание	R = -0.542	Значителна връзка
Ki67 0	R = 0.175	Слаба връзка
Ki67 под 10%	R = -0.06	Много слаба връзка
Ki67 10-50%	R = 0.04	Много слаба връзка
Ki67 над 50%	R = -0.178	Слаба връзка
Ri на лява маточна артерия	R = 0.448	Умерена връзка
Ri на лява маточна артерия	R = 0.565	Значителна връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = 0.443	Умерена връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = 0.567	Значителна връзка

CD56+ под 5 %

Табл. 34. Статистически значими корелационни връзки при CD56+ под 5 %

Корелационна връзка между CD56+ под 5 % и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56+ под 12.9 %	R = 0.622	Значителна връзка
CD56+ над 12.9 %	R = 0.554	Значителна връзка
Брой спонтанни аборти	R = 0.312	Умерена връзка
Брой аборти пожелание	R = 0.06	Много слаба връзка
Ki67 0	R = 0.475	Умерена връзка
Ki67 под 10%	R = -0.499	Умерена връзка
Ki67 10-50%	R = 0.447	Умерена връзка
Ki67 над 50%	R = 0.472	Умерена връзка
Ri на лява маточна артерия	R = 0.287	Слаба връзка
Ri на лява маточна артерия	R = 0.147	Слаба връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = 0.244	Слаба връзка
Ri на дясна маточна артерия	R = 0.148	Слаба връзка

CD56+ над 5 %

Табл. 35. Статистически значими корелационни връзки при CD56+ над 5 %

Корелационна връзка между CD56+ над 5 % и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
CD56+ под 12.9 %	R = -0.631	Значителна връзка
CD56+ над 12.9 %	R = -0.557	Значителна връзка
Брой спонтанни аборти	R = 0.342	Умерена връзка
Брой аборти пожелание	R = -0.08	Много слаба връзка
Ki67 0	R = -0.449	Умерена връзка
Ki67 под 10%	R = 0.519	Значителна връзка
Ki67 10-50%	R = -0.441	Умерена връзка
Ki67 над 50%	R = 0.452	Умерена връзка
Ri на Лява маточна артерия	R = -0.287	Слаба връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = -0.278	Слаба връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = -0.248	Слаба връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = -0.256	Слаба връзка

CD56+ под 12.9 %

Табл. 36. Статистически значими корелационни връзки при CD56+ под 12.9 %

Корелационна връзка между CD56+ под 12.9 % и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Брой спонтанни аборти	R = 0.242	Умерена връзка
Брой аборти пожелание	R = 0.03	Много слаба връзка
Ki67 0	R = 0.562	Значителна връзка
Ki67 под 10%	R = 0.526	Значителна връзка
Ki67 10-50%	R = -0.554	Значителна връзка
Ki67 над 50%	R = 0.427	Умерена връзка
Ri на Лява маточна артерия	R = 0.157	Слаба връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = 0.127	Слаба връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = 0.236	Слаба връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = 0.281	Слаба връзка

CD56+ над 12.9 %

Табл. 37. Статистически значими корелационни връзки при CD56+ над 12.9 %

Корелационна връзка между CD56+ над 12.9 % и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Брой спонтанни аборти	R = 0.226	Умерена връзка
Брой аборти пожелание	R = 0.05	Много слаба връзка
Ki67 0	R = -0.512	Значителна връзка
Ki67 под 10%	R = 0.546	Значителна връзка
Ki67 10-50%	R = -0.563	Значителна връзка
Ki67 над 50%	R = -0.437	Умерена връзка
Ri на Лява маточна артерия	R = 0.237	Слаба връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = 0.178	Слаба връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = 0.247	Слаба връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = 0.263	Слаба връзка

Ki67 0**Табл. 38.** Статистически значими корелационни връзки при Ki67 0

Корелационна връзка между Ki67 0 и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Ri на Лява маточна артерия	R = 0.328	Умерена връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = 0.377	Умерена връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = 0.216	Слаба връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = 0.374	Умерена връзка

Ki67 под 10%**Табл. 39.** Статистически значими корелационни връзки при Ki67 под 10%

Корелационна връзка между Ki67 под 10% и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Ri на Лява маточна артерия	R = -0.328	Умерена връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = 0.301	Умерена връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = -0.348	Умерена връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = -0.339	Умерена връзка

Ki67 10-50%**Табл.40.** Статистически значими корелационни връзки при Ki67 10-50 %

Корелационна връзка между Ki67 10-50% и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Ri на Лява маточна артерия	R = -0.354	Умерена връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = -0.344	Умерена връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = -0.371	Умерена връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = -0.302	Умерена връзка

Ki67 над 50%**Табл. 41.** Статистически значими корелационни връзки при Ki67 над 50 %

Корелационна връзка между Ki67 50% и	Стойност на корелационния коефициент	Вид на връзката
Ri на Лява маточна артерия	R = -0.254	Слаба връзка
Pi на Лява маточна артерия	R = -0.202	Слаба връзка
Ri на Дясна маточна артерия	R = -0.213	Слаба връзка
Pi на Дясна маточна артерия	R = 0.322	Умерена връзка

4.2. Регресионен анализ

Еднофакторни регресионни модели

След обработка на информацията, с която разполагаме, се получиха следните еднофакторни регресионни модели, отговарящи на необходимите статистически изисквания:

Първи модел: Влиянието на възрастта на пациентките върху брой бременности, представен чрез регресионни модели (Табл. 42).

Табл. 42. Регресионни модели за зависимостта между възраст на пациентките и брой бременности

Модел	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	-2,1583 0,1638	-3,528 4,311	42,25	18,254	1,2269	1,95
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	1,5222 0,1569	2,321 3,524	40,21	17,321	1,2365	1,94
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 -0,1387	1,963 -4,216	38,62	14,237	1,2879	1,92
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	3,6683 0,1319	2,636 1,994	40,64	17,561	1,2708	1,93
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 0,1456	2,783 3,235	38,99	17,897	1,2851	1,92

Легенда:

1. Коефициенти (b_0, b_1)
2. Емпирични стойности на t-критерия ($t_{\text{емп.}}$)
3. Коефициент на детерминация ($R^2 \cdot 100$) - %
4. Емпирични стойности на F-критерия
5. Стандартна грешка на модела (σ)
6. Емпирични стойности на критерия на Дърбин-Уатсън (d)

Проверката на статистически хипотези за значимостта на регресионните модели и на параметрите им протича в следната последователност:

- Статистическа проверка за адекватност на регресионния модел – основава се на F-критерия на Фишер.
- Статистическа проверка за значимостта на параметрите в регресионния модел – основава се на t-критерия на Стюдент.

- Статистическа проверка за наличие на автокорелация в остатъчния компонент – основава се на критерия на Дърбин-Уатсън.

Теоретичните стойности на F, t и DW критерия са:

1. $F_{\text{теор.}} = 3,92$
2. $t_{\text{теор.}} = 1,658$
3. $d_L = 1,64; d_U = 1,68$

Тези стойности са за всички еднофакторни регресионни модели и са при 5% риск за грешка.

Проверката на статистически хипотези е аналогична и за другите еднофакторни регресионни модели.

Втори модел: Влиянието на възрастта на пациентките върху брой аборти, представен чрез регресионни модели (Табл.43).

Табл. 43. Регресионни модели за зависимостта между възраст на пациентките и брой аборти

Модел	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	-2,1971 0,1487	-3,469 4,154	39,63	17,258	0,7965	1,91
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	1,2362 0,1452	3,036 3,832	37,38	16,325	0,8752	1,90
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 -0,1387	2,963 -3,216	30,62	14,237	1,2879	1,89
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	1,6789 0,1319	2,636 2,994	36,64	16,561	0,8708	1,90
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 0,1056	2,783 2,235	34,73	15,897	0,9833	1,89

Трети модел: Влияниена възрастта на пациентките върху брой раждания, представен чрез регресионни модели (Табл. 44).

Табл. 44. Регресионни модели за зависимостта между възраст на пациентките и брой раждания

Модели	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	-2,4933 0,1027	-4,148 2,954	32,77	8,729	0,8154	1,86
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,2322 0,0996	3,935 2,354	31,32	8,321	0,9136	1,85
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 -0,0887	2,963 -2,216	28,28	7,237	1,2258	1,81
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	1,6683 0,0919	2,636 2,994	29,33	7,561	0,9708	1,83
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 0,0956	2,783 3,235	30,87	7,889	0,9851	1,85

Четвърти модел: Влияниена гестационната възраст на аборта върху ляв резистентен индекс (RI), представен чрез регресионни модели (Табл. 45).

Табл. 45. Регресионни модели за зависимостта между гестационна възраст на аборта и ляв резистентен индекс (RI)

Модели	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	0,6556 0,1278	16,231 5,254	29,87	6,614	0,1363	1,78
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	0,6778 0,1289	17,338 5,321	30,32	6,643	0,1324	1,78
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 0,1258	14,963 4,216	27,62	6,237	0,2875	1,75
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	1,6683 0,1119	12,566 2,994	28,64	6,561	0,2708	1,76
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 0,1156	12,783 3,235	27,99	6,297	0,2851	1,77

Петти модел: Влияниена гестационната възраст на аборта върху ляв пулсативен индекс (PI), представен чрез регресионни модели (Табл. 46).

Табл. 46. Регресионни модели за зависимостта между гестационна възраст на аборта и ляв пулсативен индекс (PI)

Модели	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	3,0767 -0,1894	4,681 -5,767	37,64	8,114	0,6667	1,81
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,2322 -0,1852	3,324 -5,373	36,32	8,023	0,7145	1,80
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 -0,1687	3,963 -4,216	35,54	7,237	0,8793	1,79
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	3,6683 -0,1419	2,636 -4,094	34,64	7,561	0,7708	1,78
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 -0,1456	2,783 -4,235	34,73	7,897	0,8151	1,79

Шести модел: Влияниена гестационната възраст на аборта върху десен резистентен индекс (RI), представен чрез регресионни модели (Табл. 47).

Табл. 47. Регресионни модели за зависимостта между гестационна възраст на аборта и десен резистентен индекс (RI)

Модели	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	0,7489 0,1096	11,231 4,223	27,78	5,214	0,4306	1,75
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	0,7542 0,1158	11,811 4,321	28,28	5,321	0,4151	1,75
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 0,1087	5,963 3,316	25,32	4,737	0,4879	1,73
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	1,6683 0,1019	10,636 3,994	26,14	4,961	0,4708	1,74
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,9891 0,1056	12,783 3,235	25,73	4,897	0,4851	1,73

Седми модел: Влияниена гестационната възраст на аборта върху десен пулсативен индекс (PI), представен чрез регресионни модели (Табл. 48)

Табл. 48. Регресионни модели за зависимостта между гестационна възраст на аборта и десенпулсативен индекс (PI)

Модели	1	2	3	4	5	6
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	2,2135 -0,1778	6,231 -5,023	35,73	7,345	0,3412	1,80
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,2322 -0,1736	6,4311 -5,001	34,32	7,321	0,3451	1,79
$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 \frac{1}{X_i}$	1,9931 -0,1687	5,963 -4,216	32,62	7,237	0,3879	1,77
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 X_i$	3,6683 -0,1652	5,636 -4,994	33,89	7,325	0,3568	1,78
$\ln \hat{Y}_i = b_0 + b_1 \ln X_i$	2,8791 -0,1656	5,783 -4,235	34,05	7,289	0,3551	1,78

От тези таблици са избрани най-добрите модели, описващи отделните връзки (потъмнените редове в таблиците). Тези модели представяме в следващата таблица:

Табл. 49. Еднофакторни регресионни модели

Модел №	Регресионни модели	R ² .100	t _{емп.}	F _{емп.}	d
1	$\hat{Y}_i = -2,1583 + 0,1638X_i$	42,25	-3,528 4,311	18,254	1,95
2	$\hat{Y}_i = -2,1971 + 0,1487X_i$	39,63	-3,469 4,154	17,258	1,91
3	$\hat{Y}_i = -2,4933 + 0,1027X_i$	32,77	-4,148 2,954	8,729	1,86
4	$\hat{Y}_i = 0,6778 + 0,1289 \ln X_i$	30,32	17,338 5,321	6,643	1,78
5	$\hat{Y}_i = 3,0767 - 0,1894X_i$	37,64	4,681 -5,767	8,114	1,81
6	$\hat{Y}_i = 0,7542 + 0,1158 \ln X_i$	28,28	11,811 4,321	5,321	1,75
7	$\hat{Y}_i = 2,2135 - 0,1778X_i$	35,73	6,231 -5,023	7,345	1,80

На база получените еднофакторни регресионни модели можем да направим следните обобщения и изводи:

1. С увеличаване на възрастта на пациентките с една година бременностите се увеличават с 0.16 броя;
2. С увеличаване на възрастта на пациентките с една година абортите се увеличават с 0.15 броя;
3. С увеличаване на възрастта на пациентките с една година ражданията се увеличават с 0.10 броя;
4. С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица резистентния индекс (Ri) – ляв се увеличава с 0.13 единици;
5. С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица пулсативния индекс (Pi) – ляв намалява с 0.19 единици;
6. С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица резистентния индекс (Ri) – десен се увеличава с 0.12 единици;
7. С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица пулсативния индекс (Pi) – десен намалява с 0.18 единици.

Корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при ранните спонтанни аборти

С ниски CD56+ Под 5%:

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборти до 12 г.с. с ниска експресия на CD56+ Под 5%. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас ниски CD 56 + под 5 % върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас ниски CD 56 + под 5 % върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.

Статистически значими корелационни коефициенти:

- Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и R_i Дясна маточна артерия: R = 0.613 (значителна връзка) ;
- Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и P_i Дясна маточна артерия: R = 0.523 (значителна връзка) ;

Еднофакторни регресионни модели, отговарящи на необходимите статистически изисквания:

- Влияние на гестационната възраст на аборта върху R_i Дясна маточна артерия

Табл. 50. Регресионен модел за изчисление Гест.възраст/R_i Дясна маточна артерия

Регресионен модел	R ² .100	t _{емп.}	F _{емп.}	d
$\hat{Y}_i = 0,482 + 0,034 X_i$	37,6	4,349 2,329	5,423	1,65

С увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица R_i Дясна маточна артерия се увеличава с 0.03 единици.

- Влияние на гестационната възраст на аборта върху P_i Дясна маточна артерия

Табл. 51. Регресионен модел за изчисление Гест.възраст/Рi Дясна маточна артерия

Регресионен модел	$R^2.100$	$t_{емп.}$	$F_{емп.}$	d
$\hat{Y}_i = 0,9439 + 0,0998 X_i$	27,36	2,293 1,841	5,39	1,61

С увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица Рi Дясна маточна артерия се увеличава с 0.1 единици.

Теоретичните стойности на t, Fi DW критерия са:

1. $t_{теор.} = 1,812$
2. $F_{теор.} = 5,117$
3. $d_L = 0,93; d_U = 1,3$

С високо CD 56 +над 5 %

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборти до 12 г.с. с висока експресия на CD56+ над 5%. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас високи CD 56 + над 5 % върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас високо CD 56 + над 5 % върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия

Няма статистически значими корелационни коефициенти и регресионни модели, отговарящи на статистическите изисквания.

С ниски CD56+ Под 12.9 %

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборти до 12 г.с. с ниска експресия на CD56+ Под 12.9 %. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас ниски CD 56 + под 12.9% върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас ниска CD 56 + под 12.9 % върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия

Статистически значими корелационни коефициенти:

- Корелационна връзка между възраст на пациентката и Ri Дясна маточна артерия: $R = 0.547$ (значителна връзка) ;

Еднофакторни регресионни модели, отговарящи на необходимите статистически изисквания:

- Влияние на възрастта на пациентката върху R_i Дясна маточна артерия

Табл. 52. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ R_i Дясна маточна артерия

Регресионен модел	$R^2.100$	$t_{emp.}$	$F_{emp.}$	d
$\hat{Y}_i = 0,552 + 0,0098 X_i$	29,93	8,6 2,849	8,115	1,68

С увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица R_i Дясна маточна артерия се увеличава с 0.03 единици

Теоретичните стойности на t , F и DW критерия са:

1. $t_{теор.} = 1,725$
2. $F_{теор.} = 4,381$
3. $d_L = 1,22$; $d_U = 1,42$

CD56+ над 12.9 %

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборти до 12 г.с. с висока експресия на CD56+ над 12.9 %. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас висока CD 56 + над 12.9% върху R_i и P_i на Лева маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас високо CD 56 + над 12.9 % върху R_i и P_i на Лева маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия

Няма статистически значими корелационни коефициенти и регресионни модели, отговарящи на статистическите изисквания.

Корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при късни спонтанни аборти

С ниски CD56+ Под 5%:

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборти след 13 г.с. с ниска експресия на CD56+ Под 5%. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на жената с ниски CD 56 + под 5 % върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас ниски CD 56 + под 5 % върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия

Статистически значими корелационни коефициенти:

- Корелационна връзка между възраст на пациентката и R_i на Лява маточна артерия: $R = - 0.711$ (силна връзка) ;
- Корелационна връзка между възраст на пациентката и P_i на Лява маточна артерия: $R = - 0.776$ (силна връзка) ;
- Корелационна връзка между възраст на пациентката и P_i Дясна маточна артерия: $R = - 0.537$ (значителна връзка).

Еднофакторни регресионни модели, отговарящи на необходимите статистически изисквания:

- Влияние на възрастта на пациентката върху R_i на Лява маточна артерия.

Табл. 53. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ R_i Лява маточна артерия

Регресионен модел	$R^2 \cdot 100$	$t_{емп.}$	$F_{емп.}$	d
$\hat{Y}_i = 1,2969 - 0,0149 X_i$	50,49	7,117 -2,474	5,119	1,54

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година R_i на Лява маточна артерия намалява с 0.01 единици.

- Влияние на възрастта на пациентката върху P_i на Лява маточна артерия.

Табл. 54. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/Ri Лява маточна артерия

Регресионен модел	R ² .100	t _{емп.}	F _{емп.}	d
$\hat{Y}_i = 5,8824 - 0,1104 X_i$	60,26	5,295 -3,017	9,1	1,57

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година Ri на Лява маточна артерия намалява с 0.11 единици.

- Влияние на възрастта на пациентката върху Ri Дясна маточна артерия.

Табл. 55. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ Ri Дясна маточна артерия

Регресионен модел	R ² .100	t _{емп.}	F _{емп.}	d
$\hat{Y}_i = 3,9401 - 0,0451 X_i$	28,83	4,489 -1,959	6,43	1,42

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година Ri Дясна маточна артерия намалява с 0.05 единици.

Теоретичните стойности на t, Fi DW критерия са:

1. t_{теор.} = 1,895
2. F_{теор.} = 5,987
3. d_L = 0,76; d_U = 1,33

С високи CD56+ над 5%:

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при абрти след 13г.с. с високи експресия на CD56+ над 5 %. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас висока CD 56 + над 5% върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас високо CD 56 + над 5 % върху Ri и Pi на Лява маточна артерия и Ri и Pi Дясна маточна артерия

Няма статистически значими корелационни коефициенти и регресионни модели, отговарящи на статистическите изисквания.

С ниско CD56+ Под 12.9 %

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при аборт след 13г.с. с ниска експресия на CD56+ под 12.9 %. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас ниско CD 56 + под 12.9% върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас високо ниско CD 56 + под 12.9% върху R_i и P_i на Лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия

Статистически значими корелационни коефициенти:

- Корелационна връзка между възраст на пациентката и R_i на Лява маточна артерия $R = - 0.742$ (силна връзка) ;
- Корелационна връзка между възраст на пациентката и P_i на Лява маточна артерия: $R = - 0.828$ (силна връзка) ;
- Корелационна връзка между възраст пациентката на P_i Дясна маточна артерия: $R = - 0.508$ (значителна връзка).

Еднофакторни регресионни модели,отговарящи нанеобходимите статистически изисквания:

- Влияние на възрастта на пациентката върху R_i на Лява маточна артерия

Табл. 56. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ P_i Лява маточна артерия

Регресионен модел	R^2 .100	$t_{емп.}$	$F_{емп.}$	d
$\hat{Y}_i = 1,3542 - 0,0167 X_i$	55,01	10,356 -3,83	14,672	1,53

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година R_i на Лява маточна артерия намалява с 0.02 единици.

- Влияние на възрастта на пациентката върху P_i на Лява маточна артерия

Табл. 57. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ P_i Лява маточна артерия

Регресионен модел	R^2 .100	$t_{емп.}$	$F_{емп.}$	d
$\hat{Y}_i = 6,0881 - 0,1202 X_i$	68,6	8,643 -5,121	26,22	1,56

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година P_i на лява маточна артерия намалява с 0.12 единици.

- Влияние на възрастта на пациентката върху P_i Дясна маточна артерия

Табл. 58. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/ P_i Дясна маточна артерия

Регресионен модел	$R^2.100$	$t_{emp.}$	$F_{emp.}$	d
$\hat{Y}_i = 4,0874 - 0,0615 X_i$	25,85	4,534 -2,045	4,883	1,41

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година P_i Дясна маточна артерия намалява с 0.06 единици.

Теоретичните стойности на t , F и DW критерия са:

1. $t_{теор.} = 1,771$
2. $F_{теор.} = 4,747$
3. $d_L = 1,05$; $d_U = 1,35$

С високи CD56+ Над 12.9%

Извършихме корелационен анализ и еднофакторни регресионни модели при абрти след 13г.с. с висока експресия на CD56+ над 12.9 %. Изследвахме:

1. Влияние на възрастта на женатас висока CD 56 + над 12.9 % върху R_i и P_i на лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.
2. Влияние на възрастта на абортас високо CD 56 + над 12.9 % върху R_i и P_i на лява маточна артерия и R_i и P_i Дясна маточна артерия.

Статистически значими корелационни коефициенти:

- Корелационна връзка между възраст на пациентката и R_i лява маточна артерия: $R = 0.511$ (значителна връзка) ;
- Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и P_i Дясна маточна артерия $R = 0.791$ (силна връзка).

Еднофакторни регресионни модели, отговарящи на необходимите статистически изисквания:

- Влияние на възрастта на пациентката върху R_i лява маточна артерия

Табл. 59. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/Ri Лява маточна артерия

Регресионен модел	$R^2.100$	$t_{emp.}$	$F_{emp.}$	d
$\hat{Y}_i = 0,441 + 0,0198 X_i$	26,1	2,089 1,956	6,119	1,37

С увеличаване на възрастта на пациентката с една година Ri Лява маточна артерия се увеличава с 0.02 единици.

- Влияние на гестационната възраст на аборта върху Pi Дясна маточна артерия

Табл. 60. Регресионен модел за изчисление Майчина възраст/Pi Дясна маточна артерия

Регресионен модел	$R^2.100$	$t_{emp.}$	$F_{emp.}$	d
$\hat{Y}_i = 0,1541 + 0,126 X_i$	62,54	2,252 3,164	10,015	1,49

С увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица Pi Дясна маточна артерия се увеличава с 0.13 единици.

Теоретичните стойности на t, Fi DW критерия са:

1. $t_{теор.} = 1,895$
2. $F_{теор.} = 5,987$
3. $d_L = 0,76; d_U = 1,33$

VII. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Според Американското дружество по акушерство и гинекология най-честото усложнение по време на бременност е спонтанният аборт- всяка 10-та разпозната бременност (35). В голям процент от случаите се налага извършване на хоспитализация и провеждане на хирургично лечение за прекъсване на бременността. Здравословните проблеми свързани със самия аборт и неговото лечение в днешно време са малко, но при много случаи психологичното и социално въздействие върху майката е голямо.

Точната етиология на спонтанните аборти остава неизяснена. Съществуват много рискови фактори, които са описани като възможни причини за спонтанни аборти. През последните години все повече се отделя внимание на неправилното образуване на плацентата като основен фактор на множество неудачи по време на бременност. Търсят се и се откриват много имунологични и клетъчни механизми, които участват в регулацията и развитието на трофобласта, неговата инвазия и ролята му при ремоделиране на спиралните артерии (40,161).

В нашето проучване определихме експресията на CD56+ положителни клетки и пролиферативен маркер Ki67 при спонтанни аборти и ги съпоставихме с резултатите от Доплеровата велосиметрия на маточните артерии. Разгледахме тяхната роля в етиогенезата на абортите и възможността да се ползват като прогностични фактори.

1. Демографска характеристика

Майчината възраст се свързва с акушерски риск за различни патологии по време на бременност. Медицинския “Стандарт по Акушерство и Гинекология” разглежда бременностите на жени след 35 години като такива с повишен риск. При тези пациенти се открива по-висок риск за развитие на прееклампсия, гестационен диабет, предтерминно раждане и спонтанен аборт (263).

Изследване на 634 272 жени с 1 221 546 бременности в периода 1978-92 год., установява, че с напредване на възрастта се увеличава риска от спонтанен аборт. Описват минимален риск от 8,7% при жените на възраст до 22 години и до 84.1% при бременни след 48 години (228).

Проучвания изследващи връзката между майчината възраст и спонтанните аборти показват, че е повишен риска от спонтанен аборт при жени на възраст ≥ 35 години (Dominguez et al., 1991; Nybo Andersen et al., 2000; Osborn et al., 2000). Изследване в САЩ за периода 1990-2011г, установява увеличение на риска за спонтанен аборт с 1% за година (252).

Пациентките участвали в нашето проучване са на средна възраст от 29.03 години. Жените във високо рискова група над 35 години са 21.5%. Най-изследваната от нас популация бременни е във възрастовия диапазон – 25-34 години – 53.2 %, втора по честота възраст е 15-24 години – 25,3%.

Чрез еднофакторни регресионни модели доказахме, че с увеличаване на възрастта на пациентките с една година, абортите се увеличават с 0.15 броя.

Dominguez et al., 1991 показват чрез регресионен анализ връзката на майчината възраст със спонтанните аборти.

По данни на Anderson процентът на спонтанни аборти според майчината възраст е: 12-19г 13.3%; 20-24г 11%, 25-29г 11.9%, 30-34г 15%; 35-39г 24.6% и 40-44г 51% (43).

Рискът за спонтанен аборт с напредване на бременността намалява. Tong et al показват процентите за спонтанен аборт по седмици: 9.4% за 6г.с., 4.2% за 7г.с., 1.5% за 8 г.с., 0.5% за 9 г.с. (285).

В друго проучване процентът на спонтанни аборти по седмица дава следните резултати: 50-75% за 3-4г.с., 21.3% за 5г.с., 5% за 6-7 г.с., 2-4 % за 8-13 г.с. и под 1% за 14-20 г.с. По възраст на майката: под 35 години – 15% риск за аборт, 35-45 години 20-35% и над 45 години повече от 50% риск за спонтанен аборт (37).

RPI се открива при около 1 на 100 бременни (1 процент). След един спонтанен аборт, рискът от втори спонтанен аборт е 20%. След два поредни спонтанни аборта рискът се увеличава до около 28% за нов спонтанен аборт. След три или повече последователни аборта, рискът е около 43% (59).

Разгледаните епидемиологични статистика демонстрират по-висок процент на аборти през първи триместър спрямо аборти през втори триместър. Нашата статистика за спонтанните аборти установи, че делът на спонтанните аборти в първи триместър е 70.9% и 29,1% през втори триместър.

2. CD56+ положителни клетки

Плацентата играе основно роля в протичането на бременността и за развитието на плода. При нарушение в развитието ѝ, бременността може да завърши в по-ранни срокове и/или с недостатъчно развитие на плода. От съществено значение за функцията на плацентата е нейното най-ранно развитие. Wegman предполага, че dNK клетките секретират различни цитокини, включително M-CSF и GM-CSF, за които се смята, че насърчават растежа на плацентата. Сайто et al. също демонстрира, че dNK клетките секретират цитокини и растежни фактори, регулиращи плацентация в първи и втори триместър (170,235).

В ранна бременност dNk клетки са едни от най-многобройните децидуални лимфоцити. Предполага се, че dNK клетките участват в децидуализация на маточната лигавица (118,297), регулиране на трофобластната инвазия (278) и реконструкция на съдовете в бременната матка (100).

Hassan et al извършват имунохистохимия на 60 пациентки с *abruptio placentae* след 20г.с. Съобщават за слаба експресия на CD56+ клетки в биопсичния материал от плацентарното ложе при тези жени. Ниската плътност на dNK клетки е изиграла роля в аномалната плацентарна инвазия в ранна бременност и може да е патогенеза при *abruptio placentae*. dNk клетките вероятно осъществяват контрол в дълбочинната инвазия на EVT (143).

Съществуват две хипотези за ролята на dNK клетките при RPL: dNK клетките нарушават трофобластната активност или dNK клетки улесняват имплантиране на аномални бластоцисти, водещи до клинично представяне на RPL. (Quenby et al., 2002)

Корелационните анализи проведени от нас за експресията на CD56+ положителни клетки по гестационна възраст на спонтанните аборти откри:

- При ранни спонтанни аборти
 1. Слаба отрицателна връзка при CD56+под 5 % ;
 2. Умерена положителна връзка при CD56+над 5 %;
 3. Умерена отрицателна връзка при CD56+под 12.9 %;
 4. Умерена положителна връзка при CD56+над 12.9 %.

- При късните спонтанни аборти
 1. Слаба положителна връзка при CD56+под 5 % ;
 2. Слаба отрицателна връзка при CD56+над 5 %;
 3. Умерена положителна връзка при CD56+под 12.9 %;
 4. Умерена отрицателна връзка при CD56+над 12.9 %.

Корелационните връзки при ранни спонтанни аборти с ниска експресия на CD56+ са отрицателни - слаби и умерени. Полученият статистически анализ на абортите в същата гестационна възраст с висока експресия на CD56+ са положителни- умерени. При късните спонтанни аборти отрицателните корелационни връзки са свързани с абортите с високи стойности на CD56+, а положителните с ниски. Откриваме по-голям брой dNK в препаратите от аборти в първи триместър, което може да се обясни със становището, че броя на dNK клетки намалява с напредване на гестационната възраст. (Cafe et al.2003)

Zhang et al илюстрират чрез имунохистохимични анализи, че през първия триместър на бременността, EVTс проникват в децидуата и взаимодействат с dNK клетките за ремоделиране на спиралните артерии на матката. В техните проби от първи триместър се микроскопират значителен брой инвазивни трофобласти (експресиращи HLA-G1 и СК-71) в близост до dNK клетките в децидуалната строма, но това е рядко във втория триместър (302).

Guimond et al., 1998 след експерименти с мишки показват, че dNK клетките са необходими за настъпване на нормална бременност (поне при мишки). Изказва се съмнение дали високият брой dNK клетките наистина може да увреди трофобласта и да е причина за репродуктивни неуспехи.

Quenby et al., 2005 установяват връзка с високият брой на dNK клетки при жени с идиопатични спонтанни аборти.

Има противоречиви доклади за това дали увеличеният брой на dNK клетките корелира с изхода на бременността при жени със спонтанни аборти (281,290).

Chen et al публикуват данни, които показват значително по-висок процент на dNK клетки при пациенти със спонтанни аборти и неуспешни имплантации след IVF, от контролна група с жени без спонтанни аборти и естествено оплождане (77).

Обработката на нашите резултати при високи стойности на CD56+ над 5 % и CD56+ над 12.9 % при спонтанни аборти, показаха статистически значими корелационни връзки - Умерени, $R= 0.342$ и $R = 0.226$. Статистическата връзка между CD56+ над 5 % и CD56+ над 12.9 % при аборти по желание е много слаба ($R= -0.08$; $R= 0.05$). Статистическият ни анализ, съвпада с този на Zenclussen, A. C et al 2001, който представя значимо по-висок брой dNK клетки в тъкани при аборт (300).

Повечето от проучванията предполагат, че CD56+ положителни клетки се откриват при жени със спонтанни аборти, отколкото при здрави фертилни жени (102,125,177,268). При Missed abortion и рецидивиращи спонтанни аборти се микроскопират висок брой на dNK клетки в децидуална тъкан (74).

В други проучвания, липсва разлика в дела на dNK клетките между контролите и жените със спонтанни аборти (102,182). Анализ на резултатите от броят на CD45+, CD56+, CD16+, CD20+, CD3+, CD8+ и CRTH2+ клетките при пациентки с RPL и жени без предходни аборти, показва близки резултати в двете групи. Не е отбелязана значима разлика в броя или съотношенията на лимфоцитните подгрупи между пациентки, чиито последващи бременности са успешни, и тези, които са абортирали отново (217).

Спрямо разпределението по вида на аборта в първи триместър и CD56+, ние установихме:

1. Висок процент на положителни CD56+ клетки по (Quenby et al 2005) в 59.5%;
2. Висок процент на положителни CD56+ клетки по (Tuckerman et al 2010) в 50.6%.

Като контролна група използвахме абортите по желание до 12г.с. При тях положителни CD56+ клетки по (Quenby et al 2005) са 13.9% и 12.7 % по Tuckerman et al 2010.

Тези констатации са в съответствие с резултатите и на други автори. Coulam et al. и Yamada et al. съобщават за висок брой и активност на CD56+ NK клетки при жени с хромозомно нормални фетуси и повтарящи се спонтанни аборти. Предполагат, че наличието на високи нива на CD56+ е причина, а не следствие от

повтарящ се спонтанен аборт (190). Clifford K et al. докладват за повишен среден брой dNK клетки в ендометриума на жени с RPL (83).

Quenby S. 2005 показват, че при жените с RM имат значително повече uNK. Предложеното от тях лечение с преднизолон значително намалява броя на CD56 клетките в предимплантационния ендометриум от средно 14% (преди) до 9% (след).

3. Ki67

Човешкият Ki67 нуклеарен антиген се експресира във всички пролифериращи клетки и може да се използва при изучаването на трофобластната активност при различни патологии на бременността (99).

Имунохистохимични техники за изследване на експресията на маркера за пролиферация Ki67 от фетален трофобласт при нормална бременност показва, че в плацентарната тъкан имунооцветяването на Ki67 е почти изцяло ограничено до ядрата на цитотрофобластните клетки. Голяма част от клетките в цитотрофобласта показват ядрена реактивност с Ki67. Вилоният синцитиотрофобласт е равномерно нереактивен на Ki67, но част от подлежащия цитотрофобласт е Ki67-положителен през цялата бременност. Случайни Ki67-положителни трофобластни клетки бяха идентифицирани в chorion leave. Интерстициалният и ендovasкуларен екстравилонен трофобласт в майчината децидуална тъкан не се позитивира от маркера за пролиферация (67).

Въпреки това, резултатите върху броя на цитотрофобластите са противоречиви. В някои проучвания се наблюдава, че пролиферативният индекс на тези клетки се повишава през първия триместър и намалява по време на бременността (273).

Като изследвахме плацентарен материал от жени с аборти, установихме голям процент на случаи с позитивни Ki67 клетки – 65.2% при жените до 35 годишна възраст, отколкото при тези на възраст над 35 години-17.4%. Корелационният анализ в подгрупите според възрастта на пациентките и интензитета на оцветяване на Ki67- без оцветяване, под 10% и 10-50% (R = 0.244,

R = 0.226, R = 0.227,), показа слаби положителни връзки, при Ki67 над 50% (R = -0.383) умерена обратна връзка.

Статистически значими корелационни връзки според гестационната възраст на аборта и пролиферативният маркер Ki67, които открихме са:

- Ki67 0 (Без оцветяване): R = 0.461; Умерена положителна връзка;
- Ki67 под 10%: R = 0.326; Умерена положителна връзка;
- Ki67 между 10-50%: R = 0.335; Умерена положителна връзка;
- Ki67 над 50%: R = -0.554; Значителна отрицателна връзка.

Умерена експресия на пролиферативен маркер Ki67 между 10-50% се свързва със запазена пролиферация на трофобласта. При абортите след 13 г.с. не откриваме случаи с високи стойности на Ki67 над 50%. Липсата на голям брой цитотрофобластни клетки при късните аборти корелира с нарушена трофобластна инвазия. Данните потвърждават становището, че Ki67 е добър маркер за откриване на цитотрофобластни клетки. Ki67 е най-добрият индекс за отдиференциране на спонтанни аборти и лезии на вилония трофобласти (99). Kale A et al, доказват висока чувствителност 84.4% и специфичност 100% на Ki67 при отдиференциране на спонтанен аборт от различните видове трофобластна болест (161).

Табл. 61. Корелации между Пролиферативен маркер Ki67 и експресията на CD56+ при спонтанни аборти

	CD 56 Под 5 % (Quenby et al 2005) Нисък брой	CD 56Над 5 % (Quenby et al 2005) Висок брой	CD 56 Под 12,9 % (Tuckerman et al 2010) Нисък брой	CD 56 Над 12,9 % (Tuckerman et al 2010) Висок брой
Ki 67, 0 (не оцветени клетки)	R= 0.475	R= -0.449	R= 0.562	R= -0.512
Ki 67, + (по-малко от 10% положителни клетки)	R= -0.499	R= 0.519	R= -0.526	R= 0.546
Ki 67, ++ (10-50% положителни клетки)	R= 0.477	R= -0.441	R= -0.554	R= 0.563
Ki 67, +++ (повече от 50% положителни клетки)	R= 0.472	R= -0.452	R= 0.427	R= -0.437

Резултатите при Ki67 0 не са показателни за ефекта на dNK клетки върху трофобласта, защото в тези случаи синцитиотрофобласт не се оцветява.

При малък брой оцветени клетки Ki67 под 10% имаме умерена отрицателна връзка със CD56+ под 5% и под 12.9%. Слаба пролиферация на трофобласта, с малък брой оцветени цитотрофобластни клетки се наблюдава при увеличение на брой dNK клетки. При Ki67 под 10% открихме умерена положителна връзка със CD56+ над 5% и над 12.9%. Ниска пролиферация корелира с висок брой dNk клетки.

Корелационните връзки, които получаваме при Ki67 10-50% с различна експресия на CD56+, са разнопосочни. Тези резултати могат да се обяснят с припокриване на данните. Резултатите по Tuckerman et al 2010 под 12.9% обхващат всички резултати по Quenby et al 2005 под 5% и част от тези над 5%. Умерена трофобластна инвазия се свързва с умерена положителна връзка за CD 56+ под 5 % по Quenby и CD 56+ над 12.9 % по Tuckerman; отрицателни връзки за CD 56+ над 5 % по Quenby и CD 56+ под 12.9 % по Tuckerman.

При положително оцветени клетки с Ki67 над 50% имаме умерена положителна връзка при ниска експресия на CD56+ (под 5% и под 12.9%). Висока пролиферация на цитотрофобластни клетки се свързва с нисък брой dNK клетки. Корелационна връзка при Ki67 и висока експресия на CD56+ (над 5 % и над 12.9%) е отрицателна умерена. Силната трофобластна инвазия корелира с ниската плътност на dNK. Тези резултати се отнасят за абортите в първи триместър, поради факта, че след 13г.с. не се откриха случаи с повече от 50% положително оцветени клетки.

В литературата има ограничени изследвания за откриване на маркера за пролиферация Ki67 чрез имунохистохимични методи при бременни. Авторите го използват основно за определяне цитотрофобластните клетки и чрез тях за трофобластната активност в случаи с преекламписия. Те наблюдават значително увеличение на Ki67 във вилозните структури в материали от пациентки с преекламписия (42,104,291). Нашите данни са в съответствие с констатациите на тези изследователи, наблюдаваме увеличаване на клетъчната пролиферация при патологично протекла бременност.

През последните години се предполага, че различни патологии през бременността са свързани с количеството трофобластни клетки, майчината имунна реакция и съдовата чувствителност. Голямо количество трофобластни антигени могат да предизвикат имунен отговор, който води до увреждане на ендотела (250).

4. Доплер и спонтанни аборти

Трофобластната инвазия в маточните стени и децидуалните кръвоносни съдове е критична за образуването на плацентата. Кръвотока в маточните артерии е изключително важен за образуването на плацентата и поддържане на нейната функционалност. Нахлуването на трофобластни клетки в децидуалните съдове води до трансформиране на тесните спирални артерии в маточно-плацентарните кръвоносни съдове с ниско съпротивление. Нарушенията в етапите на плацентация са свързани с етиологията на различни патологии по време на бременност: прееклампсия, ограничение на растежа на плода, малки за гестационна възраст новородени (165,166,195,293).

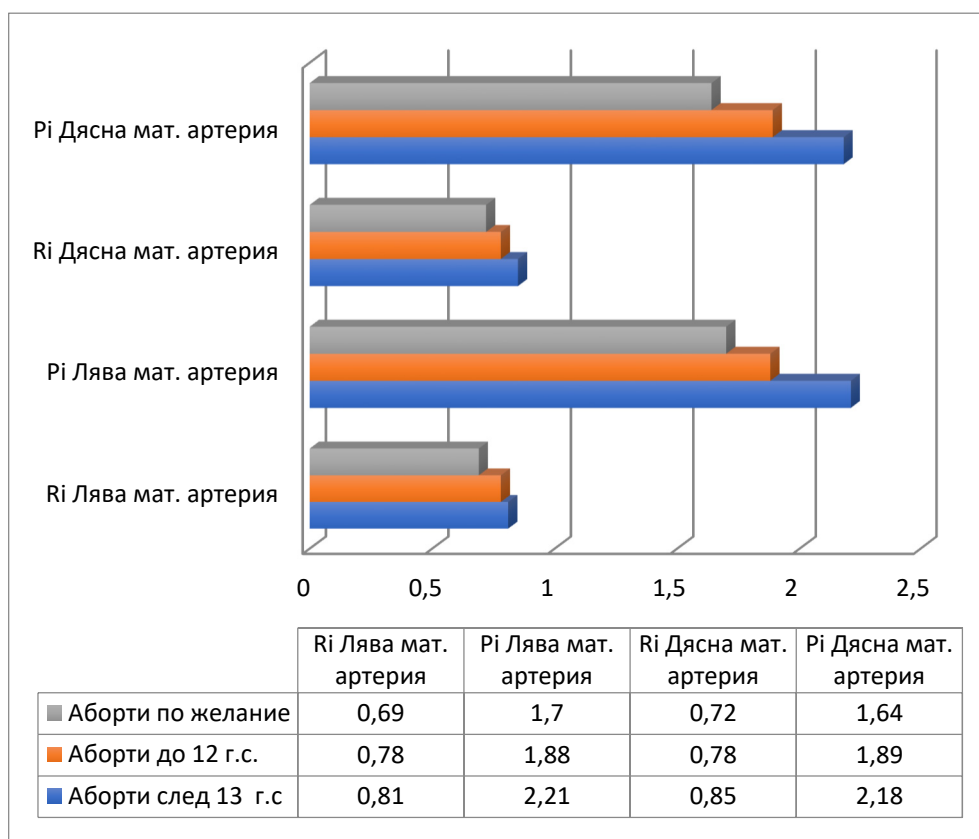
Доплерово изследване на маточните съдове позволява оценка на съдовите събития, които възникват по време на бременност. Посредством Импулсен и Цветен Доплер неинвазивно може да се определи фетоплацентарното кръвообръщение. След успешна трофобластна инвазия, прогресивно намалява съпротивлението в маточните съдове, което води до увеличаване на кръвния поток насочен към бременната матка. Доплеровото изследване на маточните артерии в ранна бременност показва ниски крайни диастолични скорости и ранен диастоличен прорез – notch (155,213).

Някои изследователи предлагат изучаването на маточно-плацентарната циркулация в ранна бременност, за да се определи дали ранните промени в съдови събития могат да повлияят на бременността (154,178,179,277). Нашето проучване има за цел да изследва кръвния поток на маточната артерия чрез Импулсен и Цветен Доплер в ранни и късни спонтанни аборти. Търсим съществуване на корелация с пролиферативния маркер Ki67 и CD56+ клетки.

Получените от нас резултати от Доплеровото изследване според вида и средната гестационна възраст на аборта, R_i и P_i на маточните артерии, са следните: абортите по желание са с най-ниска средна възраст на аборта 6.8 г.с. и с най-ниски стойности на R_i и P_i на маточните артерии, следвани от ранните спонтанни аборти със средна възраст на аборта 8.4 г.с. Абортите след 13г.с. се характеризират с най-висока гестационна възраст 10.5 г.с. и най-високи стойности на R_i и P_i на маточните артерии. Резултатите са представени на табл.62 и фиг.35.

Табл. 62. Представяне на кръвотока в маточните артерии по срока и вида на аборта

Средни стойности	Всички Аборти	Аборти до 12 г.с	Аборти след 13 г.с.	Аборти по желание
Възраст на майката	29.03	29.7	29.9	26.3
Гестационна възраст	10.5	8.4	16.5	6.8
R_i Лява мат. артерия	0.77	0.78	0.81	0.69
P_i Лява мат. артерия	1.92	1.88	2.21	1.70
R_i Дясна мат. артерия	0.78	0.78	0.85	0.72
P_i Дясна мат. артерия	1.90	1.89	2.18	1.64



Фиг. 35. R_i и P_i на маточните артерии според вида на аборта.

Сравнението на контролната група– аборт по желание, със спонтанните аборти показва, че RI и PI в маточните артерии в контролната група са по-ниски. Това може да се обясни с факта, че абортите по желание са протекли без генитално кървене и болкови синдром. В тези случаи бременността не е патологично променена, за разлика от тези със спонтанни аборти. Можем да направим извод, че при спонтанните аборти има нарушена трофобластна инвазия или друго неоткрито заболяване, което довежда до завишени стойности на RI и PI в маточните артерии.

От направените еднофакторни регресионни модели на получените резултати можем да направим следните обобщения и изводи:

- С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица RI на лява маточна артерия се увеличава с 0.13 единици;
- С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица PI на лява маточна артерия намалява с 0.19 единици;
- С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица RI на дясна маточна артерия се увеличава с 0.12 единици;
- С увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица PI на дясна маточна артерия намалява с 0.18 единици.

Установените от нас изводи са съпоставими с резултатите на редица изследователи:

Kumari и Wanjari 2020г оценяват RI , PI и S/D на маточните артерии при бременни жени със заплашващ аборт. Авторите показват, че резистентните индекси са значително по-високи при жените, които са направили аборт, в сравнение с тези, при които бременността е продължила. PI е с незначителни различия в двете групи (176).

Gustavo et al. съобщават за значително по-висок индекс на резистентност на маточните артерии при жени със спонтанен аборт. В тяхното проучване са включени пациентки с бременност до 20 г.с. с диагноза заплашващ аборт, които са завършили с кюретаж (253).

Al Halaby et al. характеризират RI на маточните артерии като добър предиктор за изхода на бременността в случаи на заплашващ спонтанен аборт (39).

Извършихме корелационни анализи и еднофакторни регресионни модели при аборти до 12 г.с. Изследвахме как възрастта на жените и гестационната

седмица на аборта влияят на експресията на CD56+ клетки и Ri и Pi на маточните съдове. В групата на спонтанните абортите до 12 г.с. най-голям процент – 34.7%, са случаите с Ki67 под 10%, които имат умерена положителна връзка с CD56+ над 5% и над 12.9%. Проучихме връзката на тези аборти с CD56+ над 5% и над 12.9% според средната възраст на жените и гестационната възраст на аборта, към Ri и Pi на маточните съдове. Не открихме статистически значими корелационни коефициенти и регресионни модели, отговарящи на статистическите изисквания.

При абортите до 12 г.с. с умерана и силна експресия на Ki67 се открива в 26.3% от случаите. Чрез статистически анализ в тази подгрупа се потърси зависимост между възрастта на жените и гестационната седмица на аборта и Ri и Pi на маточните съдове, при ниски CD56+ клетки:

- CD56+ под 5%:
 1. Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и Ri Дясна маточна артерия: $R = 0.613$ (значителна положителна връзка) ;
 2. Корелационна връзка между гестационна възраст на аборта и Pi Дясна маточна артерия: $R = 0.523$ (значителна положителна връзка) ;
 3. Еднофакторни регресионни модели показва увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица Ri Дясна маточна артерия се увеличава с 0.03 единици.
- CD56+ под 12.9%
 1. Корелационна връзка между възраст на пациентката и Ri Дясна маточна артерия $R = 0.547$ (значителна положителна връзка) ;
 2. Влияние на възрастта на пациентката върху Ri Дясна маточна артерия се увеличава с 0.03 единици.

Нашите резултати при ранни спонтанни аборти показват покачване на Ri на Дясната маточна артерия при CD56+ под 5% и под 12.9% и статистически значимо увеличаване на Ri с 0.03 единици с напредване на гестационната възраст. Научни изследвания на редица автори показват спадане на Ri индекс при нормално протичаща бременност. Vahlmann et al показват сигнификантно намаление на Pi и Ri на маточните артерии при бременности протекли без усложнения (51). Намалението на Ri според гестационна възраст е демонстрирано от Guedes-Martins et al през 2014 година: 6 г.с. $Ri=1.000$, 7 г.с $Ri= 0.977$, 8 г.с. $Ri=0.914$, 9 г.с. $Ri= 0.864$ и в 10 г.с. $R= 0.803$.

Резултатите ни се припокриват с публикуваните данни на Abdel-Razik et al 2014. Авторите показват повишен резистентен индекс при пациенти с необясними RPL (34). Друго проучване тества 3058 бременни жени, чрез цветен Доплер на маточните артерии в първи триместър на бремеността. Всички пациентки включени в наблюдението с повишени индекси на Ri на маточните артерии са развили усложнения в по-късни етапи от бременността: преждевременни раждания и/или прееклампсия (212).

Корелационните анализи при късните спонтанни аборти с ниска експресия на CD56+ под 5% и под 12.9%, в зависимост как възрастта на жените влияе на Ri и Pi на маточните съдове, са със силни и значителни отрицателни връзки. Еднофакторните регресионни модели при CD56+ под 5% положителни клетки, установиха намаляване на Ri на лява маточна артерия с 0.01 единици и Pi на същата с 0.11 единици с увеличаване на възрастта на пациентката с една година. Pi на дясна маточна артерия намалява с 0.05 единици.

В подгрупата с CD56+ под 12.9% получихме подобни резултати. С увеличаване на възрастта на пациентките с една година Ri/Pi на лява маточна артерия намалява с 0.02/0.12 единици. Pi в дясно намалява с 0.06 единици за една година.

Намаление на стойностите на Pi на маточните артерии е добър прогностичен белег за развитието на бременността. През 2004 година Mäkilä et al показват сигнификантно намаление на пулсативния индекс след 8 г.с. при нормална бременност (203). - Според Gomez O et al, PI на маточната артерия намалява след 11 г.с., ако бременността протича без усложнения (128). Установените нормални стойности през първи триместър са: 50th/95th percentile от PI са 1.69/2.48, а през втори триместър: 50th/95th percentile от PI са 1.03/1.57 (196).

Исключвайки ролята на годините на майката и гестационна възраст на аборта, резултатите при ниска експресия на CD56+ и Ri и Pi на маточните съдове при спонтанни аборти са:

- Ri лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Ri лява маточна артерия в аборти след 13 г.с.;
- Pi лява маточна артерия в аборти до 12 г.с < Pi лява маточна артерия в аборти след 13 г.с.;

- R_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < R_i Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с.;
- P_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < P_i Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с..

Във всички наши случаи с ниска експресия на CD56+ положителни клетки откриваме увеличение на R_i и P_i на маточните артерии във втори триместър спрямо първи. Увеличаването на стойностите на пулсативния и резистентния индекс според цитираните по-горе автори е лош прогностичен белег.

В късните спонтанни аборти с висока експресия на CD56+ над 5% към R_i и P_i на маточните артерии няма статистически значими корелационни коефициенти и регресионни модели, отговарящи на статистическите изисквания.

При CD56+ над 12.9% в късните спонтанни аборти откриваме значителни корелационни връзки с майчината възраст и R_i на лява маточна артерия: $R = 0.511$, и с гестационна седмица и P_i Дясна маточна артерия $R = 0.791$ -силна връзка. Еднофакторни регресионни модели проведени в тази подгрупа установяват, че с увеличаване на гестационната възраст на аборта с една седмица пулсативния индекс в дясно се увеличава с 0.13 единици.

При анализ на данните, без да се отчита влиянието на възрастта на майката и гестационния срок на аборта, при висока експресия на CD56+ над 12.9% и кръвотока на маточните съдове, получихме следните данни:

- R_i лява маточна артерия в аборти до 12 г.с > R_i лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.01) ;
- P_i лява маточна артерия в аборти до 12 г.с > P_i лява маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.05) ;
- R_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < R_i Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.05) ;
- P_i Дясна маточна артерия в аборти до 12 г.с < P_i Дясно маточна артерия в аборти след 13 г.с. (средно с 0.29).

R_i и P_i на лявата маточна артерия са по-малки през първи триместър отколкото при спонтанните аборти във втори триместър, а R_i и P_i на дясната маточна артерия при спонтанните аборти през първи триместър са по-високи от колкото при аборти след 13г.с.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашата практика основната причина, поради която се извършва преглед и хоспитализация на бременни жени до 20 гестационна седмица, са абортите. За поставяне на диагнозата и определяне на типа на аборта водеща роля има ултразвуковото изследване. В зависимост от поставената диагноза се определя начина на лечение и проследяване, а при необходимост и прекъсване на бременността. В наши дни все повече се търси и проучва причината за настъпилия спонтанен аборт с цел вземане на ранни превенции при плануване на следваща бременност.

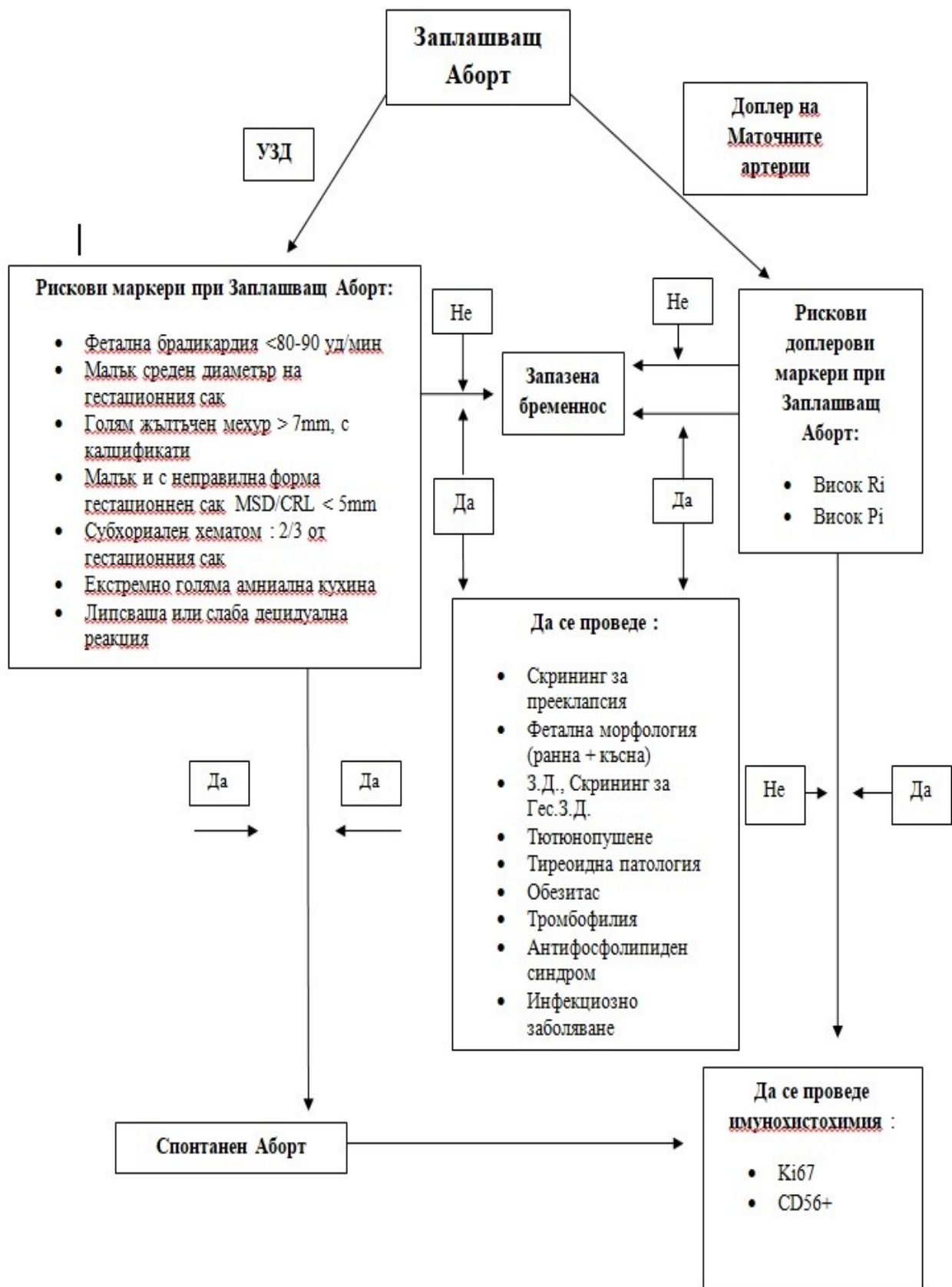
Доплеровата велосиметрия през последните години се утвърди като първостепенен инструмент за определяне на съдовите събития в маточните и фетални съдове протичащи по време на бременност. Откриване на промени в кръвотока на маточните артерии в пероида на имплантация и след него, се асоциират с неправилно развитие на плацентата и усложнения в хода на бременността. Чрез количествени параметри – R_i и P_i , измерени в маточните артерии се идентифицира анормално ремоделиране на спиралните артерии. При неправилна трофобластна инвазия, без адекватна вазодилатация на спиралните артерии, резистентният индекс в маточната артерия остава висок и се намалява кръвотока към плацентата и плода. Доплеровата велосиметрия от абортите по желание показва най-ниски стойности на R_i и P_i в сравнение с резултатите, които получихме при спонтанните аборти. Получените данни от анализа за пулсативния и резистентен индекс на маточните артерии при абортите до 12 г.с. със слаба експресия на CD56+ показва по-ниски средни стойности от късните спонтанни аборти. Откритите от нас високи стойности на R_i и P_i на маточните артерии са лош предиктор за настоящата бременност и вероятно рисков фактор за следваща бременност.

Правилната имплантация и последваща плацентация са основни етапи в развитието на бременността. При нарушение в тези процеси, концепцията може да приключи в ранен етап като спонтанен аборт или да се развият различни патологии по време на бременността. Основна роля в образуването на вилонната структура на плацентата през първия триместър има синцитиотрофобласта. Чрез имунохистохимия с пролиферативен маркер Ki67 можем да определим

натрупването на синцитиотрофобласт в препарати от аборти. В проведеното от нас проучване откриваме в 17.3% от случаите със спонтанен аборт липса на експресия за Ki67, а в 45.4 % слаба. Липсата и слаба реакция на оцветяване показва намалена пролиферация на синцитиотрофобласта при спонтанните аборти. Различни заболявания– автоимунни заболявания, хипертония на майката, тютюнопушене, захарен диабет, свръх тегло и др., могат да са причина за неефикасна трофобластна инвазия и нарушената бременност.

Най-масовите лимфоцити по време на ранна бременност са dNK клетки. Има различни мнения за тяхната роля при развитието на плацентата и протичането на бременността. Според „Royal College of Obstetricians and Gynaecologists“ в световен мащаб все още не е уточнено понятието „високи“ и „ниски“ нива на dNK клетки. В нашето научно изследване използвахме две нормограми за отчитане на dNK клетки-по Quenby et al 2005 и Tuckerman et al 2010. Установихме връзка между активността на цитотрофобластните клетки и майчината имунна реакция, в частност dNK клетки. Определихме значителни корелационни връзки между Ki67 и CD56+ клетки при спонтанните аборти. В контролната група– аборти по желание, се откриват по-ниски проценти на CD56+ в сравнение със спонтанните аборти. Високата експресия на dNK клетки може да се разглежда като една от причините за дефекти в развитието на плацентата. След анализ и на данните от CD56+, можем да потвърдим становището, че съществува връзка между спонтанните аборти, трофобластната инвазия и майчиния имунитет.

Спонтанните аборти и до ден днешен остават без уточнена причина, която в повечето случаи персистира и при последващи бременности. При пациентки с диагноза заплашващ аборт няма изработен панел за проследяване, лечение и по възможност предотвратяване загубата на бременността. В голям процент от случаите след първи спонтанен аборт не се предприемат активни действия за търсене на причината. Липсва общо валиден международен консенсус относно скринингов метод за откриване и проследяване на жени със спонтанни аборти. От обобщените данни получени в изследването ние предлагаме следната схема за поведение при жени с диагноза заплашващ аборт за превенция на бременността и последваща такава.



Фиг. 36. Скрининг за прогноза на последваща бременност

IX. ИЗВОДИ

1. Не откриваме статистическа връзка между годините на майката със спонтанен аборт и експресията на пролиферативния маркер Ki67.
2. В случаите с бременни под 35 години се установи по-висок процентна пациентки с висока експресия на CD56+.
3. Регресионните модели показват, че с увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица Ri на лявата и дясна маточна артерия се увеличават с 0.13/ 0.12 единици.
4. От проведената Доплерова велосиметрия установихме, че с увеличаване на гестационната възраст на абортите с една седмица, Ri на лявата и дясна маточна артерия намаляват с 0.19/ 0.18 единици.
5. При ранните спонтанни аборти откриваме висок процент на положителни CD56+ клетки по Quenby et al 2005 в 59.5% и CD56+ клетки по Tuckerman et al 2010 в 50.6%.
6. Ki67 в ранни аборти е основно със слаба експресия в 34.7% от случаите, показваща ниска пролиферация на синцитиотрофобласта.
7. Слабата експресия на Ki67 под 10% и CD56+ над 5% и над 12.9% са с положителна корелационна връзка. С увеличаване на броя dNK клетки се наблюдава по-слаба пролиферация на трофобласта и синцитиотрофобласта.
8. От анализирания данни за ранни спонтанни аборти със CD56+ под 5% /12.9% и Ri и Ri на маточните съдове установихме, че с увеличаване на гестационната възраст с една седмица Ri на Дясна маточна артерия се увеличава с 0.03 единици.
9. Обработката на нашите резултати при високи стойности на CD56+ над 5% и CD56 над 12.9% при спонтанни аборти, показва статистически значими корелационни връзки, за разлика от аборти по желание.
10. Липсата на голям брой цитотрофобластни клетки при късните аборти корелира с нарушена трофобластна инвазия—аборти след 13 г.с. нямаме случай с Ki67 над 50%.
11. От сравненията между ранни и късни спонтанни аборти, установихме по-висок процент на CD56+ в абортите до 12г.с.

Х. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални научно-приложни приноси

1. Разработен е оригинален примерен скринингов алгоритъм при бременни със Заплашващ аборт.
2. За първи път в България се извърши изследване на абортивен материал чрез имунохистохимия с пролиферативен маркер Ki67 и CD56+ в първи и втори триместър на бременността.
3. За първи път в България се извърши проучване и анализ на спонтанните аборти чрез комбинация на имунохистохимия и Доплерова велосиметрия.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърди се повишаване на Ri при спонтанните аборти.
2. Получените от нас резултати съвпадат със становището, че при спонтанни аборти се откриват повишени стойности на CD56+, сравнение с аборти по желание.
3. Потвърждаваме становището, че броя на dNK клетки намалява с напредване на гестационната възраст.

XI. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Пролиферативен маркер Ki-67 при мисед аборти в първи триместър, **Къчовски Ц.**, Ковачев Е.,Тончев А., Цветков К., Списание „Репродуктивно здраве” брой 36/22, 14-18, ISSN 1312-6180
2. Ovarian Abscess Rupture After Oocyte Retrieval In A Patient With Endometriosis : Case Report Nikoleta G. Tabakova, Emil G. Kovachev, Vilislava R. Ivanova, **Tsvetomir E. Kachovski** , Dimitar D. Ivanov Received 06 Jan 2021, Accepted 16 Febr 2021 <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.1.15>
3. Клиничен случай на голям плацентарен харионангиом, протичащ с тахикардия на плода при пациентка в трети триместър с неусложнена бременност, Мирчева Н.,Ковачев Е.,Димитрова З., Анжел С.,**Къчовски Ц.**,Табакова Н., Акушерство и гинекология, 59/1/2020, 39-45
4. Co-localization of transcription factors Zbtb20 and Sox2 in germinative zones of a human fetal telencephalon;M Angelova, D Marinova, SP Pavlov, V Mihaleva, M Zhelezov, E Kovachev, **T Kachovski**, V Ivanova, AB Tonchev,2017/10/10, Scripta Scientifica Medica,49,64

XII. ДОКЛАДИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Презентация: Децидуални НК клетки в ранна бременност, **Къчовски Ц**, Workshop “Репродуктивно Здраве ” 10-11 март 2023, Бургас
2. Постер: Ползването на UNK клетки и пролиферативен маркер KI-67 като предиктори за последващи спонтанни аборти, **Къчовски Ц.**, Ковачев Е., Тончев А., XXIV Национална Гинекологична конференция XXXVIII Национална Акушерска конференция 17-20.06.2021г. Св. Влас
3. Презентация: THE ROLE OF THE UNK CELL IN IMPLANTATION AND PLACENTATION IN EARLY PREGNANCY: LITERATURE REVIEW , **Kachovski Ts.**, Tonchev A., Kovachev E., Raykova A., Tsvetkov K., Koleva P., Ivanov S. 29th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria, 09-12.04.2019, Hotel Admiral, Resort Golden Sands, Varna, Bulgariq
4. Презентация: Microglia show heterogeneous subpopulations during human forebrain development. Zhelezov M, S. Pavlov, A. Maucher, E. Kovachev, **Tsv. Kachovski**, A. Tonchev. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10 2018, Sofia, Bulgaria

ХИ. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1 Протокол/Решение №78 на КЕНИ-Варна

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ВАРНА
„Проф. д-р Параскев Стоянов“
Ул. „Марин Дрингов“ 55, Варна 9002, България
Тел. : 052/ 65 00 57, Факс: 052/ 65 00 19
e-mail: uni@mu-varna.bg, www.mu-varna.bg



MEDICAL UNIVERSITY - VARNA
"Prof. Dr. Paraskev Stoyanov"
55, Marin Drinov Str., 9002 Varna, Bulgaria
Tel.: +359 52/ 65 00 57, Fax: + 359 52/ 65 00 19
e-mail: uni@mu-varna.bg, www.mu-varna.bg

Препис-извлечение!

**ПРОТОКОЛ / РЕШЕНИЕ № 78
на КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА НА НАУЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ
ПРИ МУ – ВАРНА
Заседание на 25.10.2018 г.**

На заседанието присъстват:

Председател: Проф. Бистра Галунска, д.фарм.

Членове:

1. Проф. д-р Йото Йотов, д.м.
2. Проф. д-р Антон Тончев, д.м.н.
3. Доц. д-р Мария Желязкова, д.м.
4. Доц. д-р Илко Плачков, д.м.
5. Проф. д-р Мария Цанева, д.м.
6. Проф. д-р Цветан Тончев, д.м.
7. Доц. Веселина Славова, д.ф.
8. Проф. д-р Албена Керековска, д.м.
9. Мирослава Николова – технически секретар

По уважителни причини отсъстват: Иванка Кондова –юрист, доц. д-р Параскева Манчева, д.м.н., проф. д-р Методи Абаджиев, д.м.н. и проф. д-р Виолета Йотова, д.м.н.

Дневен ред:

1. Разглеждане, изготвяне и приемане на становище на Комисията относно начална оценка на етичните аспекти на научни изследвания:

.....
1.4. „Корелация между ултразвуковата диагностика и имунохистохимията при ранни и късни спонтанни аборти“ с гл. изследовател д-р Цветомир Къчовски – Катедра „Акушерство и гинекология“, МУ – Варна
.....

Заседанието на Комисията по Етика на научните изследвания (КЕНИМУВ) при МУ-Варна има кворум и протече по предварително обявения дневен ред. То беше открито и ръководено от проф. Бистра Галунска, д.фарм. Протоколът води Мирослава Николова от отдел „Административен“ на Научноизследователския институт към МУ-Варна.
.....

По т. 1.4. от дневния ред доц. д-р Мария Желязкова, д.м представи рецензията си относно заявеното научно изследване на тема: „Корелация между ултразвуковата диагностика и имунохистохимията при ранни и късни спонтанни аборти“ с гл. изследовател д-р Цветомир Къчовски – Катедра „Акушерство и гинекология“, МУ – Варна.

На заседанието присъства д-р Цветомир Къчовски – главен изследовател в проучването.

Комисията разгледа и обсъди приложените документи, изслуша доклада на рецензента, който представя обобщена информация за научното изследване, оценка на етичните аспекти и мотивирано предложение за положително становище.

На базата на приложените документи, доклада на рецензента за оценка на етичните аспекти, Комисията гласува както следва:

Гласували: 10

Одобрили: 10

Против: няма

Въздържали се: няма

РЕШЕНИЕ: Комисията по Етика на научните изследвания при МУ-Варна одобрява провеждането на научното изследване: „Корелация между ултразвуквата диагностика и имунохистохимията при ранни и късни спонтанни аборти“ с гл. изследовател д-р Цветомир Евгениев Къчовски – Катедра „Акушерство и гинекология“, МУ – Варна.

Във връзка с изискването за извършване на текущ надзор на хода на проучването /съгласно Наредба № 31 за определяне на правилата за добра клинична практика., чл. 203, ал. 5 от Закона за здравето и Правилника на КЕНИ (2012 г.)/

Главният изследовател се задължава:

- Да уведоми писмено Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна за **стартирането** на научното изследване;
- Да представи на Комисията **писмен доклад за прогреса** на проучването - в срок до 1 година от неговото начало, включващ данни относно броя участващи в изследването до момента лица, броя прекратени участия и причините за тях, отчитани ползи и рискове за участниците, направени промени в одобреното изследване и друга важна нова информация, както и очаквана продължителност на проучването;
- Да представи на Комисията **писмен окончателен доклад** при приключване на научното изследване;
- Да информира писмено Комисията при планиране от изследователския екип на **промени** в методите, плана, процедурите или постановката на вече одобреното проучване;
- Местната Комисия по етика на научните изследвания е създадена и работи съгласно правилата на Добрата клинична практика и съобразно изискванията на национални и международни документи в областта на етиката на научните изследвания и научните публикации. Комисията спазва законите и наредбите, действащи на територията на Република България.

Поради изчерпане на дневния ред, заседанието бе закрито от проф. Бистра Галунска, д.фарм.

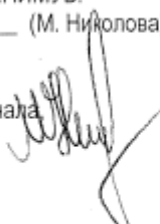
ПРЕДСЕДАТЕЛ КЕНИМУВ:

_____/п/____ (проф. Б. Галунска, д.ф.)

СЕКРЕТАР КЕНИМУВ:

_____/п/____ (М. Николова)

Вярно с оригинала
(М. Николова)



Приложение №2 Регистрационен фиш за включване в научното изследване,
удобрено от КЕНИ

Регистрационен фиш

Възраст: Етнос:

Общо състояние: P: уд/мин; T: C ; RR: mmHg; Тегло: кг.

.....
.....

Фамилна обремененост:

.....
.....

Минали заболявания:

Общи:

.....
.....

Гинекологични:

.....
.....

Инфекциозни:

.....
.....

Прекарани операции:

Общи:

.....
.....

Гинекологични:

.....
.....

Рискови фактори:

Тютюнопушене: ; Злоупотреба с алкохол: ; Наднормено тегло: ;

Недохранване: ; Алергия към храни: ; Алергия към лекарства:

Първа менструация:

На: год ; Установи се: ; През: дни ; Трае: дни ;

Особености:

.....
.....

Последна редовна менструация: дата. год

Родени деца: ;

Особености и усложнения при предишни бременности и раждания:

.....
.....
.....

Поредност на бременността: ; Последно раждане на: ;

Живородени деца: ; Мъртвородени деца: ; Недоносени. (. ... г.с.) ;

Преносени. (. ... г.с.) ; Кръвнотипова несъвместимост между родителите:

Прием на лекарства:

Преди бременността:

.....
.....

По време на бременността:

.....
.....

Аборти:

Брой..... ; от тях изкуствени. ; спонтанни. ; последен аборт: год

Брой аборти до 12 г.с.: ; от тях изкуствени. ; спонтанни. ;

Брой аборти от 12 до 20 г.г.:..... ; от тях изкуствени. ; спонтанни. ;

Фетална морфология през 11-13 г.с +6 дни:

Брой фетуси: CRL (дължина на фетуса).мм

НС (обиколка на главата) мм NT (нухална транслюценция).мм

NB (носна кост) да○ не○.мм FHR (фетална сърдечна честота)у/м

Доплер маточните артерии: Л: ; Д:..... ;

Дата на ПРМ. : Гестациона възраст по ПРМ: седмици. дни.....

Серумен биохимичен скрининг през 11-13 г.с. +6 дни:

PLGF: ; PAPP-A: ; sFLT-1: ; β-hCG:

Предишни деца и бременности в семейството с:

Болест на Даун:..... ; Болест на Едуардс: ... ; Болест на Патау: .. ; Болест на Търнер: ... ;

Триплоидия: ; Спина Бифида: ... ; Аненцефалия: ... ; Смит-Лемли-Отитц синдром: ... ;

Корнелия де Ланге синдром: ... ;

Дата:

Изследовател:

Подпис:

ХІІ. БИБЛІОГРАФІЯ

1. Андреева А. "Съвременни методи за прекъсване на бременността във втори триместър", дис. СБАЛАГ „МАЙЧИН ДОМ“, СОФИЯ, 2016
2. Григоров Н. Основи на Доплеровото изследване.-Клинична Доплер ехография (под ред. на Н. Григоров), С. Лидер Прес, 1997
3. Димитров А, Акушерство, издателство МИ "Арсо", 2014, стр 48-49
4. Димитров, А. Акушерство, издателство МИ "Арсо", 2014, стр 50-51,
5. Димитров А, Акушерство, издателство МИ "Арсо", 2014, стр 79-92
6. Димитров А, Акушерство, издателство МИ "Арсо", 2014, стр 92-96
7. Димитров А, Акушерство, издателство МИ "Арсо", 2014, стр 182-194
8. Димитрова З. "Диагностични подходи и клинично поведение при хидронефроза по време на бременност", Дисертация, МУ Варна 2022, стр. 120
9. Жеков Ж. "Методи за прекъсване на бременността в Акушеро-гинекологичната практика, Дисертация, МУ-Варна, Варна, 2000, стр. 12
10. Жеков Ж. "Методи за прекъсване на бременността в Акушеро-гинекологичната практика, Дисертация, МУ-Варна Варна, 2000, стр. 14
11. Жеков Ж. "Методи за прекъсване на бременността в Акушеро-гинекологичната практика, Дисертация, МУ-Варна, Варна, 2000, стр. 60
12. Кацулов А. Нормално акушерство, изд ВЕНЕЛ София, 1993, стр 24
13. Кихле, М. Наръчник по Акушерство и гинекология, изд. Медицина и физкултура София 2015, стр 202-203
14. Ковачев Е. Асистирані репродуктивни технологии. Усложнения и съпътстващи проблеми. Ендоскопски методи в репродуктивната медицина, МУ-Варна, Варна, 2017, стр 70
15. Ковачев Е. Асистирані репродуктивни технологии. Усложнения и съпътстващи проблеми. Ендоскопски методи в репродуктивната медицина, МУ-Варна, Варна, 2017, стр 91
16. Конова Е., Тодорова К., Емина А., Луконов Ц. Интравенозна гама-глобулинова терапия при репродуктивни неуспехи, Мединфо, Брой 02/2010
17. Мазнейкова В., Димитрова В. Доплерово изследване на утеро-плацентарната и умбилико-плацентарната циркулация при бременни жени с хипертония. Диагностичен и терапевтичен ултразвук 1993;2:стр 76-82
18. Мазнейкова, В. Димитрова, В. Атлас по ехография в акушерството и гинекологията, издателска къща Силия Арт ООД, София, 1994, стр 32-33

19. Мазнейкова, В., Димитрова, В. Атлас по ехография в акушерството и гинекологията, издателска къща Силия Арт ООД, София 1994; 1: стр 33-38
20. Мазнейкова, В., Димитрова, В. Атлас по ехография в акушерството и гинекологията, издателска къща Силия Арт ООД, София, 1994; стр 245-259
21. Мазнейкова В. Доплерово изследване на феталната и утеро-плацентарната циркулация при нормална и патологична бременност. Кандидатска дисертация, София, 1996
22. Марков Д., Димитров Р., Димитрова В, Атанасова Д., Павлова Е БДАГ „Показания и препоръки на БДАГ за извършване на ултразвуково изследване в ранния първи триместър на бременността”
23. Марков Д., Димитров Р., Димитрова В, Атанасова Д., Павлова Е, БДАГ „Извършване на ултразвуково изследване между 11+0-13+6 гестационна седмица”
24. Марков Д., Димитров Р., Димитрова В, Атанасова Д., Павлова Е БДАГ Извършване на ултразвуково изследване между 18+0-23+0 гестационна седмица
25. Марчев С., Тишева С. Принципи на тъканната доплер-ехография.- Диагностичен и терапевтичен ултразвук., 19, 2011, 1, N: 1, 18-23.
26. Мирков, К. Оперативна гинекология, изд. Медицина и физкултура София, 1989, стр 45
27. Наредба № 9 от 27 Април 2021 г. За утвърждаване на медицински стандарт „Акушерство и гинекология”
28. Наредба № 12 от 4.11.2016 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Обща и клинична патология”
29. Национален център по обществено здраве и анализи, Министерство на здравеопазването, онлайн регистър
30. Стойкова, В. Фактори за оценка на риска от развитие на преекламписия, Дис., София 2011
31. Хаджиев, Ал. Карагъзов, И. Акушерство за студенти по медицина, изд. Медицина и физкултура София, 2005, стр 61-62
32. Хаджиев Ал., Карагъзов И., Акушерство за студенти по медицина, издателство Медицина и физкултура, София, 2005, стр 222-223
33. Abdallah Y, Daemen A, Guha S, et al. Gestational sac and embryonic growth are not useful as criteria to define miscarriage: a multicenter observational study. Ultrasound Obstet Gynecol. 2011 Nov;38 (5): 503-9.

34. Abdel-Razik M, El-Berry S, Mostafa A. The effects of nitric oxide donors on uterine artery and sub-endometrial blood flow in patients with unexplained recurrent abortion. *J Reprod Infertil.* (2014) 15:142–6
35. ACOG Practice Bulletin 175. Ultrasound in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2016;128:241-256
36. ACOG, 2015, Early pregnancy loss. FAQ090. Retrieved May 31, 2016
37. Agarwal R (2021) Common Gynaecological Symptoms: Causes, Diagnosis, and Management. *J Women's Health Care* 10:554.
38. Albaiges G, Missfelder-Lobos H, Lees C, Parra M, Nicolaides KH. One-stage screening for pregnancy complications by color Doppler assessment of the uterine arteries at 23 weeks' gestation. *Obstet Gynecol* 2000;96 (4): 559—64.
39. Al Halaby A, Fahmy M, Khallaf H et al. (2020): Resistance index of uterine and spiral arteries as a predictor of threatened miscarriage outcome. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 81 (6): 2195-8
40. Alison E. Wallace, Rupsha Fraser, and Judith E. Cartwright, Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership, *Human Reproduction Update*, Vol.18, No.4 pp. 458–471, 2012 Advanced Access publication on April 20, 2012 doi:10.1093/humupd/dms015
41. Allam I., et al. Prediction of neonatal acidosis by ductus venosus Doppler pattern in high risk pregnancies, *Middle East Fertility Society Journal* (2013) 18, 47–52 127
42. Arnholdt H, Meisel F, Fandrey K, Loöhrs U (1991) Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchow Archiv B Cell Pathology* 60 (6): 365–372
43. Anderson FWJ, Johnson TRB. Maternal mortality at Y2K. *Postgraduate Obstetrics and Gynecology* 2000; 20:1
44. Anne-Marie Nybo Andersen, Jan Wohlfahrt, Peter Christens, Jørn Olsen, Mads Melbye, Maternal age and fetal loss: population based register linkage study BMJ. 2000 Jun 24; 320 (7251): 1708–1712.
45. Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, et al.. Assessment of Requirements for IL-15 and IFN Regulatory Factors in Uterine NK Cell Differentiation and Function During Pregnancy. *J Immunol* (2003) 171 (6): 2937–44. 10.4049/jimmunol.171.6.2937
46. ASRM Practice Committee. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertil Steril.* 2013;99:63.

47. ASUM. Guidelines for the performance of the first trimester ultrasound. *AJUM*, 2018;21:179-182
48. Atia TA, Elzaher MA. Natural killer cells, Macrophages and Inflammatory Chemokines in Recurrent Pregnancy Loss: Immunohistochemical Study. *Life Science J* 2014;11 (2): 134-142.
49. Auffret M et al., Misoprostol exposure during the first trimester of pregnancy: is the malformation risk varying depending on the indication? Centre Régional de Pharmacovigilance de Verdun, France, *EJOG VOLUME 207*, P188-192, DECEMBER 01, 2016
50. Avagliano L., Bulfamante G., Morabito A. et al. Abnormal spiral artery remodeling in the decidual segment during pregnancy: from histology to clinical correlation. *J Clin Pathol* 2011;64:1064-1068
51. Bahlmann F, Fittschen M, Reinhard I, Wellek S, Steiner E. Reference values for blood flow velocity in the uterine artery in normal pregnancies from 18 weeks to 42 weeks of gestation calculated by automatic Doppler waveform analysis. *Ultraschall Med.* (2012) 33:258–64.
52. Barnhart K, Sammel MD, Chung K, Zhou L, Hummel AC, Guo W. Decline of serum human chorionic gonadotropin and spontaneous complete abortion: defining the normal curve. *Obstet Gynecol* 2004;104: 975–81
53. Barnhart KT, Benacerraf BR, Brown DL, et al. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. *N Engl J Med.* 2013 Oct 10;369 (15): 1443-51. doi: 10.1056/NEJMra1302417. PMID: 24106937
54. Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, et al. Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Hum Reprod Update* 2014;20 (2): 175–93
55. Ban Y, Chang Y, Dong B, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase levels at the normal and recurrent spontaneous abortion fetal-maternal interface. *J Int Med Res* 2013;41 (4):1135–49
56. *Bates, Jerome E.; Zawadzki, Edward S. Criminal Abortion: A Study in Medical Sociology. Charles C. Thomas. (1964). ISBN 9780398001094*
57. Ben-Haroush A, Yogeve Y, Mashiach R, Meizner I. Pregnancy outcome of threatened abortion with subchorionic hematoma: possible benefit of bed-rest? *Isr Med Assoc J.* 2003 Jun;5 (6):422-4
58. Bessis R, Papiernik E. Echographic imagery of amniotic membranes in twin pregnancies. In Gedda L, Parisi P, eds. *Twin Research 3: Twin Biology and Multiple Pregnancy*. New York: Alan R Liss, 1981:183–7

59. Bhattacharya S, Bhattacharya S. Effect of Miscarriage on Future Pregnancies. *Women's Health*. 2009;5 (1):5-8
60. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93 (2):705–8.
61. Bickhaus J, Perry E, Schust DJ. Re-examining Sonographic Cut-off Values for Diagnosing Early Pregnancy Loss. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*. 2013;3 (1):141.
62. Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007;13 (12):1450–7.
63. Brighton PJ, Maruyama Y, Fishwick K, Vrljicak P, Tewary S, Fujihara R, et al.. Clearance of Senescent Decidual Cells by Uterine Natural Killer Cells in Cycling Human Endometrium. *Elife* (2017) 6:e31274. 10.7554/eLife.31274
64. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG: The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 93 (1967) 569
65. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" Are Associated With Disorders of Deep Placentation. *Am J ObstetGynecol* (2011) 204 (3):193–201. 10.1016/j.ajog.2010.08.009
66. Bruno S, Darzynkiewicz Z "Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells". *Cell Proliferation*. 25 (1):31–40.
67. Bulmer, J. N., Morrison, L., & Johnson, P. M. (1988). Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *Journal of Reproductive Immunology*, 14 (3), 291–302.
68. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated Lymphocytes in Human Endometrium: Histochemical and Immunohistochemical Studies. *Hum Reprod* (1991) 6 (6):791–8
69. Bulmer JN, Pace D, Ritson A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reprod Nutr Dev* 1988;28 (6B):1599–613.
70. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T (March 2006). "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells". *J. Cell. Physiol*. 206 (3):62435.
71. Campbell DM, MacGillivray I, Carr-Hill R. 1985. Pre-eclampsia in second pregnancy. *BJOG* 92:131-140
72. Carbillon L, Challier JC, Alouini S, Uzan M, Uzan S. 2001. Uteroplacental circulation development: Doppler assessment and clinical importance. *Placenta* 22:795-799
73. Chang RQ, Li DJ, Li MQ. The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2018;79 (4):e12786

74. CHAO, K.-H., YANG, Y.-S., HO, G.-N., CHEN, S.-U., CHEN, H.-F., DAI, H.-J., et al. (1995). Decidual Natural Killer Cytotoxicity Decreased in Normal Pregnancy but Not in Anembryonic Pregnancy and Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*, 34 (5), 274–280.
75. Chaudhry K, Tafti D, Siccardi MA. Anembryonic Pregnancy. 2023 May 22. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29763113
76. Chavan A.R., O Griffith. W., and Wagner G. P., “Theinflammationparadoxintheevolutionofmammalianpregnancy: turning a foeinto a friend,” *CurrentOpinioninGenetics&Development*, vol. 47, pp. 24–32, 2017
77. Chen X, Man GCW, Liu Y, Wu F, Huang J, Li TC, et al.. Physiological and Pathological Angiogenesis in Endometrium at the Time of Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol* (2017) 78 (2). 10.1111/aji.12693
78. Chen, X., Maricee, N., Jiang, L., Liu, Y., Wang, C. C., Li, T. C., & Laird, S. Measurement of uterine natural killer cell percentage in the periimplantation endometrium from fertile women and women with recurrent reproductive failure: establishment of a reference range. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217 (6), 680.e1–680.e6.
79. Chen Y-J, Wang P-H, Liu W-M, Lai C-R, Shu L-P, Hung J-H.Placenta accreta diagnosed at 9 weeks’ gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:620-2
80. Chudleigh T., Thilaganathan B., *Obstetric Ultrasound How, Why and When*, Third edition,Elsevier Churchill Livingstone 2004;209-221
81. Chudleigh T., Thilaganathan B., *Obstetric Ultrasound How, Why and When*, Third edition,Elsevier Churchill Livingstone 2004;223-235
82. Choudhury RH, Dunk CE, Lye SJ, Harris LK, Aplin JD, Jones RL. Decidual Leucocytes Infiltrating Human Spiral Arterioles Are Rich Source of Matrix Metalloproteinases and Degrade Extracellular Matrix *In Vitro* and *In Situ*. *Am J Reprod Immunol* (2019) 81 (1):e13054.
83. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod*. 1999;14 (11):2727–30
84. Condous G, Okaro E, Khalid A, et al: Do we need to follow up complete miscarriages with serum human chorionic gonadotrophin levels? *BJOG* 112:827, 2005
85. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine

- growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ* 2008;178 (6):701—11.
86. Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol.* 1995;33:40–46
 87. Coventry BJ, Bradley J, Skinner JM (July 1995). "Differences between standard and high-sensitivity immunohistology in tissue sections--comparison of immunoperoxidase staining methods using computerized video image analysis techniques". *Pathology.* 27 (3): 221–223
 88. Creanga AA, Shapiro-Mendoza CK, Bish CL, Zane S, Berg CJ, Callaghan WM. Trends in ectopic pregnancy mortality in the united states, 1980–2007. *Obstet Gynecol* 2011;117:837–43
 89. Critchley HO, Jones RL, Lea RG, Drudy TA, Kelly RW, Williams AR, et al. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:240–8.
 90. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, Ellenberg J, Hyman AA, Gerlich DW (July 2016). "Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes". *Nature.* 535 (7611): 308 Bibcode:2016Natur.535..308C.
 91. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Rouse D, Spong C. *Williams Obstetrics.* 23rd ed New York City, NY: McGraw-Hill Education; 2009
 92. Darzynkiewicz Z, Zhao H, Zhang S, Lee MY, Lee EY, Zhang Z. "Initiation and termination of DNA replication during S phase in relation to cyclins D1, E and A, p21WAF1, Cdt1 and the p12 subunit of DNA polymerase δ revealed in individual cells by cytometry". *Oncotarget.* 6 (14): 11735–50.
 93. DeHullu, James. "Histories of Abortion". Archived from the original on November 18, 2008. Retrieved 2008-12-11.
 94. De Oliveira LG, Lash GE, Murray-Dunning C, Bulmer JN, Innes BA, Searle RF, et al. Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta* 2010;31:595–601
 95. DeVilbiss EA, Naimi AI, Mumford SL, Perkins NJ, Sjaarda LA, Zolton JR, Silver RM, Schisterman EF. Vaginal bleeding and nausea in early pregnancy as predictors of clinical pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol.* 2020 Oct;223 (4):570.e1-570.e14.
 96. Dighe M, Cuevas C, Moshiri M, Dubinsky T, Dogra VS. Sonography in first trimester bleeding. *J Clin Ultrasound.* 2008 Jul-Aug;36 (6):352-66. doi: 10.1002/jcu.20451. PMID: 18335508.

97. Dugas C, Slane VH. Miscarriage. [Updated 2022 Jun 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532992>
98. Dosiou C, Giudice C.L. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives, *Endocr Rev.* 2005 Feb;26 (1):44-62
99. Erfanian M, Sharifi N, Omidi AA. P63 and Ki-67 expression in trophoblastic disease and spontaneous miscarriage. *J Res Med Sci* 2009; 14 (6):375-384
100. Eide IP, Rolfseng T, Isaksen CV, Mecsei R *et al.* (2006): Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killers cells in decidua basalis. *Virchows Archiv.*, 448 269–276
101. Ekinci, Aysun *et al.* Expression of Endothelin-1 and Ki-67 in Normotensive and Severe Preeclamptic Placentas. *Int. J. Morphol.* [online]. 2018, vol.36, n.1, pp.109-112. ISSN 0717-9502.
102. El-Azzamy H, Dambaeva SV, Katukurundage D, Salazar Garcia MD, Skariah A, Hussein Y, *et al.* Dysregulated Uterine Natural Killer Cells and Vascular Remodeling in Women With Recurrent Pregnancy Losses. *Am J Reprod Immunol* (2018) 80 (4):e13024
103. Elmetwally M, Rohn K, Meinecke-Tillmann S. Doppler Sonography is a useful method to assess the effects of maternal anxiety on intrauterine fetal growth in pregnant sheep and goats. *Qual Prim Care.* 2016b;24 (4):137-45
104. Elpek GU, Karaveli S, Keles, N (2000) Preeklampsili olguların term plasentalarında villoz trofoblast proliferasyonunun incelenmesi (Evaluation of proliferation of villous trophoblasts in term placentae of preeclamptic patients). *Turkish J Pathol* 16 (1–2):10–12
105. Eriksson, M., S. K. Meadows, C. R. Wira, and C. L. Sentman. 2004. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- β . *Leukocyte Biol.* 76: 667–675
106. Erlebacher, “Immunology of the maternal – fetal interface,” *Annual Review of Immunology*, vol. 31, pp. 387–411, 2013
107. ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* ESHRE Guideline Group on RPL, Atik RB, Christiansen OB, Elson J *et al.* 2018;2:hoy 004
108. ESHRE guideline 'Recurrent Pregnancy Loss'. ESHRE Early Pregnancy Guideline Development Group Version 2.0. November, 2017

109. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 Signaling and Gene Regulation in Early Human Pregnancy. *Endocrinology* (2008) 149 (6):2877–87. 10.1210/en.2007-1633
110. Falco P, Zagonari S, Gabrielli S, Bevini M, Pilu G, Bovicelli L. Sonography of pregnancies with first-trimester bleeding and a small intrauterine gestational sac without a demonstrable embryo. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003 Jan;21 (1):62-5. doi: 10.1002/uog.2. PMID: 12528164.
111. Ferrazi E., Brambatti B., Lanzani A, Oldrini A New sonographic criteria for monitoring the first trimester of pregnancy. *First Trimester Fetal Diagnosis*, Ed: M. Fracarro et al. Stringer Verlag, Berlin, 1985, 92
112. Ferreira L. M. R., Meissner T. B., Tilburgs T., and Strominger, J. L. “HLA-G: At the Interface of Maternal–Fetal Tolerance,” *Trends in Immunology*, vol. 38, no. 4, pp. 272–286, 2017
113. Ferreira LMR, Meissner TB, Tilburgs T, et al. HLA-G: at the interface of maternal fetal tolerance. *Trends Immunol* 2017;38 (4):272–86.
114. Fonseca BM, Cunha SC, Goncalves D, Mendes A, Braga J, Correia-da-Silva G, et al.. Decidual NK Cell-Derived Conditioned Medium From Miscarriages Affects Endometrial Stromal Cell Decidualisation: Endocannabinoid Anandamide and Tumour Necrosis Factor-Alpha Crosstalk. *Hum Reprod* (2020) 35 (2):265–74. 10.1093/humrep/dez260
115. Frank HG, Markee JE: Nonvillous Parts and Trophoblast Invasion In: Benirschke K and Kaufmann P: *Pathology of the Human Placenta*. Springer, Springer 1999
116. Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index-control study. *BMJ* 2006;332:759–763
117. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB, Wouters CH, Hansson KB, Hochstenbach R, Madan K et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005;331: 137–142
118. Fraser Rupsha, StJ Whitley Guy, Alan P Johnstone, Amanda J Host, Neil J Sebire, Baskaran Thilaganathan and Judith E Cartwright, Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance, *J Pathol* 2012; 228: 322–332, DOI: 10.1002/path.4057

119. Garg K, Leitao MM, Jr, Wynveen CA, et al. p53 overexpression in morphologically ambiguous endometrial carcinomas correlates with adverse clinical outcomes. *Mod Pathol* 2010;23:80–92
120. Gebb J, Dar P. Colour Doppler ultrasound of spiral artery blood flow in the prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25 (3):355—66
121. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocr Rev* (2014) 35 (6):851–905. 10.1210/er.2014-1045
122. Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar S (2008) Second trimester medical abortion with mifepristone-misoprostol and misoprostol alone: a review of methods and management. *Reprod Health Matters* 16 (31 Suppl): 162–172
123. Giacobbe M, Zeferino LC, Franzin CMMO, Faundes A. Uteroplacental circulation during the first trimester of normal and abnormal pregnancy. *Reprod Bio Med Online* 2001;4:62-7
124. Giacomello F, Magliocchetti P, Loyola G, Giovarruscio M. Serum beta hCG levels and transvaginal echography in the early phases of pregnancy]. *Minerva Ginecol.* 1993 Jul-Aug;45 (7-8):333-7
125. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT. Characterization of Uterine NK Cells in Women With Infertility or Recurrent Pregnancy Loss and Associated Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* (2014) 72 (3):262–9
126. Goldstein S.R. Early landmarks in the normal and abnormal pregnancy. *Infer.Reprod.Med.Cin.N.Am.*, 1991,2,699
127. Goldstein S.R. Pregnancy II: Something is wrong In: *Endovaginal Ultrasound* (IInd edition) Ed.:S.R. Goldstein, Willey-Liss, 1991,71
128. Gómez O, Figueras F, Fernández S, Bennasar M, Martínez JM, Puerto B, et al.. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11–41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* (2008) 32:128–32.
129. Grant A., 1997, *A study of the psychological responses of women immediately after spontaneous and threatened miscarriage* Leeds University Hospital, St James’s
130. Green CL, Angtuaco TL, Shah HR, Parmley TH. Gestational trophoblastic disease: a spectrum of radiologic diagnosis. *Radiographics.* 1996 Nov;16 (6):1371-84.
131. Gubbay O, Critchley HO, Bowen JM, King A, Jabbour HN, Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56 (+) natural killer cells of the human endometrium, *J ClinEndocrinolMetab.* 2002 May; 87 (5):2329-35.

132. Guerrero Beatriz, Hassouneh Fakhri, DelgadElena o, Javier G. Casado, Raquel Tarazona, Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 142, 2020, 103209, ISSN 0165-0378,
133. Gupta, N., & Angtuaco, T. L. (2007). Embryosonology in the First Trimester of Pregnancy. *Ultrasound Clinics*, 2 (2), 175–185.
134. Gupta U, Qureshi A, Samal S. Doppler velocimetry in normal and hypertensive pregnancy. *Internet J Gynecol Obstet*. 2009;11 (2):1-6
135. Hadinedoushan H, Mirahmadian M, Aflatounian A. Increased natural killer cell cytotoxicity and IL-2 production in recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2007;58 (5):409-14.
136. Hackmon R, Pinnaduwege L, Zhang J, et al. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *Am J Reprod Immunol* 2017;77 (6):1–11
137. Hafner T, Kurjak A, Kupešić S. Dopplerska mjerenja uteroplacentnog krvotoka. In: Kurjak A, ed. *Ultrazvuk u ginekologiji i porodništvu*. Zagreb: Art studio Azinović; 2000. pp. 383–385
138. Hanna J, Hanna I, Hleb M, et al.: Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated trophoblasts. *J Immunol* 2000; 164:5721–5728
139. Hanna, J., O. Wald, D. Goldman-Wohl, D. Prus, G. Markel, R. Gazit, G. Katz, R. Haimov-Kochman, N. Fujii, S. Yagel, et al. 2003. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16-human natural killer cells. *Blood* 102: 1569–1577
140. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y et al, Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface, *Nature Medicine* volume 12, pages1065–1074 (2006)
141. Hanna, J., and O. Mandelboim. 2007. When killers become helpers. *Trends Immunol.*28: 201–206.
142. Hanna J, Evans J, Salamonsen LA. Alternate Roles for Immune Regulators: Establishing Endometrial Receptivity for Implantation. *Expert Rev Clin Immunol* (2011) 7 (6):789–802. 10.1586/eci.11.65
143. Hassan Tawfik Khairy et al, Decidual Natural Killer Cells (Cd56+) Population in the Placental Bed in Accidental Hemorrhage, *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* (October 2017) Vol.69 (1), Page 1582-1588

144. Heidarpour M, Khanahmadi M. Diagnostic value of P63 in differentiating normal gestation from molar pregnancy. *J Res Med Sci.* 2013;18 (6):462–466
145. Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO., Steroid receptor expression in uterine natural killer cells, *J ClinEndocrinolMetab.* 2003 Jan;88 (1):440-9
146. Hoover KW, Tao G, Kent CK. Trends in the diagnosis and treatment of ectopic pregnancy in the United States. *Obstet Gynecol* 2010;115: 495–502
147. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB et al. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod BioMed Online* 2004; 9: 692–715
148. Hunt JS, Langat DK, McIntire RH, et al. The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4 (Suppl 1):S10.
149. Hussain M, El-Hakim S, Cahill DJ. Progesterone supplementation in women with otherwise unexplained recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci.* 2012 Sep;5 (3):248-51.
150. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, et al. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. *N Engl J Med.* 1996;334:567–572
151. Istrate-Ofițeru AM, Ruican D, Niculescu M, Nagy RD, Roșu GC, Petrescu AM, Drăgușin RC, Iovan L, Zorilă GL, Iliescu DG. Ovarian ectopic pregnancy: the role of complex morphopathological assay. Review and case presentation. *Rom J Morphol Embryol.* 2020 Oct-Dec;61 (4):985-997.
152. Janeway, Charles et al. *Immunobiology; Fifth Edition.* New York and London, Garland Science, 2001
153. Jaffe R. Investigation of abnormal first-trimester gestations by color Doppler imaging. *J Clin Ultrasound* 1993; 21: 521–6
154. Jaffe R, Dorgan A, Abramowicz JS. Color Doppler imaging of the uteroplacental circulation in the first trimester: value in predicting pregnancy failure or complication. *AJR* 1995;164:1255-8.
155. Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S, Hustin J. Doppler ultrasonographic features of the developing placental circulation: Correlation with anatomic findings. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 585–7
156. Jauniaux E. Design, beauty and differentiation: the human fetus during the first trimester of gestation. *Reprod BioMed, Online* 2000; 1: 107–108

157. 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, 162:115-125
158. Jiang P, Jia M, Hu J, Huang Z, Deng Y, Lai L, Ding S, Hu Z. Prognostic Value of Ki67 in Patients with Stage 1–2 Endometrial Cancer: Validation of the Cut-off Value of Ki67 as a Predictive Factor. *Onco Targets Ther.* 2020;13:10841-10850
159. Jurkovic, D., Overton, C., & Bender-Atik, R. (2013). Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ*, 346 (jun 19 2), f3676–f3676.
160. Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Feb;194 (2):557-63.
161. Kale, A.R., Söylemez, F., & Ensari, A. Expressions of proliferation markers (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and silver-staining nucleolar organizer regions) and of p53 tumor protein in gestational trophoblastic disease. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2001, 184 4, 567-74.
162. Kapp N, Medical abortion in the late first trimester: a systematic review/ *Contraception* 99 (2019) 77–86
163. Kaya B, Nayki U, Nayki C, Ulug P, Oner G, Gultekin E, Yildirim Y. Proliferation of trophoblasts and Ki67 expression in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2015 May;291 (5):1041-6.
164. Kelten, C., Zekioğlu, O., Terek, C., Özdemir, N., & Duzcan, E. Expression of ki-67, bcl-2 and bax in the first trimester abortion materials. *Turkish Journal of Pathology*, 2010, 26, 31.
165. Khong, S. L., Kane, S. C., Brennecke, S. P., & da Silva Costa, F. (2015). First-Trimester Uterine Artery Doppler Analysis in the Prediction of Later Pregnancy Complications. *Disease Markers*, 2015, 1–10.
166. Khong SL, Kane SC, Brennecke SP, da Silva Costa F. First-trimester uterine artery Doppler analysis in the prediction of later pregnancy complications. *Dis Markers.* (2015) 2015:679730
167. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small for gestational age infants. *BJOG* 1986;93:1049-59.

168. Khooei A, Atabaki Pasdar F, Fazel A, Mahmoudi M, Nikravesh MR, Khaje Delui M, Pourheydar B. Ki-67 expression in hydatidiform moles and hydropic abortions. *Iran Red Crescent Med J.* 2013 Jul;15 (7):590-4.
169. King, A., C. Birkby, and Y. W. Loke. 1989. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell. Immunol.* 118: 337–344
170. King A, Balendran N, Woodling P, Carter NP, Loke YW: CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56⁺⁺ population. *Developmental Immunology* 1991, 1:169-190
171. King, V. Wellings, L. Gardner, Y.W. Loke, Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Human Immunology* 24 (1989) 195-205.,
172. Kong CS, Ordonez AA, Turner S, Tremaine T, Muter J, Lucas ES, et al.. Embryo Biosensing by Uterine Natural Killer Cells Determines Endometrial Fate Decisions at Implantation *FASEBJ* 2021, 35 (4):e21336. 10.1096/fj.202002217R
173. Kopcow, H. D., D. S. Allan, X. Chen, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. USA 102: 15563–15568
174. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102 (43):15563–8.
175. Kovachev, E., et al. "Molar pregnancy—case presentation of 23-year-old pregnant women with partial molar pregnancy." *MOJ Anat Physiol* 7.5 (2020): 150-3.
176. Kumari P, Wanjari S (2020): Comparison of transvaginal colour doppler ultrasound and progesterone level estimation in outcome of threatened abortion in early pregnancy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 14 (4):11-5
177. Kuon RJ, Weber M, Heger J, Santillan I, Vomstein K, Bar C, et al. Uterine Natural Killer Cells in Patients With Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* (2017) 78 (4)
178. Kurjak A., Alfirevic Z., Miljan M. Conventional and color Doppler in the assessment of fetal and maternal circulation. *Ultrasound in Med. Biol.*, 1988, 14:337
179. Kurjak A, Zudenigo D, Predanic M, Kupesic S, Funduk B. Assessment of the fetomaternal circulation in threatened abortion by transvaginal color Doppler. *Fetal Diagn Ther* 1994; 9: 341–7

180. KUSAKABE Ken, OHMOTO Mika, OKADA Toshiya et al, Uterine NK Cells Produce Epidermal Growth Factor in the Murine Pregnant Uterus, *J. Vet. Med. Sci.* 61 (8): 947–949, 1999
181. Kwak-Kim J, Bao S, Lee SK, et al. Immunological modes of pregnancy loss:inflammation, immune effectors, and stress. *Am J Reprod Immunol* 2014;72 (2):129–40
182. Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK Cells in Patients With Recurrent Spontaneous Abortion. Altered Profile and Pregnancy Outcome. *J Immunol* (1996) 156 (10):4027–34. 16.
183. Laird, S., Tuckerman, E., & Li, T.-C. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive BioMedicine Online*, (2006). 13 (1), 13–23. doi:10.1016/s1472-6483 (10) 62011-1
184. Larsen, Elisabeth Clare; Christiansen, Ole Bjarne; Kolte, Astrid Marie; Macklon, Nick (June 26, 2013). "New insights into mechanisms behind miscarriage". *BMC Medicine*. 11 (1): 154.
185. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of Trophoblast Cell Invasion by TGFB1, 2, and 3 Is Associated With a Decrease in Active Proteases. *Biol Reprod* (2005) 73 (2):374 81
186. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, et al.. Expression of Angiogenic Growth Factors by Uterine Natural Killer Cells During Early Pregnancy. *J Leukoc Biol* (2006) 80 (3):572–80.
187. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Kirkley M, De Oliveira L, Searle RF, et al.. Interferon-Gamma Inhibits Extravillous Trophoblast Cell Invasion by a Mechanism That Involves Both Changes in Apoptosis and Protease Levels. *FASEB J* (2006) 20 (14):2512–8.
188. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Percival K, Searle RF, Robson SC, et al.. Regulation of Extravillous Trophoblast Invasion by Uterine Natural Killer Cells Is Dependent on Gestational Age. *Hum Reprod* (2010) 25 (5):1137–45.
189. Lash GE, Robson SC and Bulmer JN. Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 2010;31:S87-92.
190. Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermone A, Durand-500 Gasselini I, FrydmanR and Chaouat G. A new role for natural killer cells, interleukin (IL) - 12 and IL-18 inrepeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;81:59-65
191. Leedee-Bataille, N., Bonnet-Chea, K., Hosny, G., Dubanchet, S., Frydman, R., & Chaouat, G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate

- uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization–embryo transfer failure. *Fertility and Sterility*, 2005, 83 (3), 598–605
192. Lédée B, Chaouat G, Serazin V, Lombroso R, Dubanchet S, Oger P, Louafi N, Ville Y: Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 2008, 77:57-62
 193. Lefkowitz, Mary R.; Maureen R. Fant (1992). "Intercourse, conception and pregnancy". *Women's life in Greece & Rome: A source book in translation*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p. 341. ISBN 0-8018-4475-4. Retrieved 2008-09-21
 194. Lessey, B. A. & Castelbaum, A. J. Integrins and implantation in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 2002, Vol.3, No.2, pp. 107-117, ISSN 1389-9155
 195. Li N, Ghosh G, Gudmundsson S. Uterine artery Doppler in high-risk pregnancies at 23–24 gestational weeks is of value in predicting adverse outcome of pregnancy and selecting cases for more intense surveillance. *Acta Obstet Gynecol Scand.* (2014) 93:1276–81. 10.1111/aogs.12488
 196. Liao AW, Toyama J, Costa V, Ramos C, Brizot M, Zugaib M. Correlation between the Doppler velocimetry findings of the uterine arteries during the first and second trimesters of pregnancy. *Rev Assoc Med Bras* (1992). (2009) 55:197–200.
 197. Liu Y, Gao S, Zhao Y, Wang H, Pan Q and Shao Q (2021) Decidual Natural Killer Cells: A Good Nanny at the Maternal-Fetal Interface During Early Pregnancy. *Front. Immunol.* 12:663660
 198. Llurba E, Carreras E, Gratacós E, et al. Maternal history and uterine artery Doppler in the assessment of risk for development of early and late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol Int* 2009:275613
 199. Lu H., Yang HL, Zhou WJ, Lai ZZ, Qiu XM, Fu Q, et al.. Rapamycin Prevents Spontaneous Abortion by Triggering Decidual Stromal Cell Autophagy-Mediated NK Cell Residence. *Autophagy* (2020) 1:1–17
 200. Lyall F, Myatt L (2002) The role of placenta in pre-eclampsia—a workshop report. *Placenta* 23:142–145
 201. Mahadevappa A, Krishna SM, Vimala MG. Diagnostic and Prognostic Significance of Ki-67 Immunohistochemical Expression in Surface Epithelial Ovarian Carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2017 Feb; 11 (2):EC08-EC12.
 202. Mäkikallio K, Tekay A, Jouppila P. Uteroplacental hemodynamics during early human pregnancy: a longitudinal study. *Gynecol Obstet Invest.* (2004) 58:49–54.

203. Makikallio K, Jouppila P, Tekay A. First trimester uterine, placental and yolk sac hemodynamics in preeclampsia and preterm labour. *Hum Reprod* 2004;19:729-33
204. Man J, Hutchinson JC, Heazell AE, Ashworth M, Jeffrey I, Sebire NJ. Stillbirth and intrauterine fetal death: role of routine histopathological placental findings to determine cause of death. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Nov;48 (5):579-584.
205. Mancuso MS, Szychowski JM, Owen J, et al Cervical funneling: effect on gestational length and ultrasound-indicated cerclage in high-risk women.. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:259
206. Manoussaka MS, Whittle CJ, Kumpel BM, et al.: Isolation and characterisation of human term trophoblasts. *Immunology* 1997; 92 (Suppl 1):70
207. Manoussaka MS: Characterisation and cytokine expression of human term placental trophoblasts. PhD thesis, UK, University of Bristol, 2001
208. Maso G, D'Ottavio G, De Seta F, Sartore A, Piccoli M, Mandruzzato G. First-trimester intrauterine hematoma and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2005 Feb;105 (2):339-44
209. Matias-Guiu X, Davidson B. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch* 2014;464:315–31
210. Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K. Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS). *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004 Nov;83 (11):1085-8
211. Meissner TB, Tilburgs T, et al. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends Immunol* 2017;38 (4):272–86
Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:656-663
212. Melchiorre K, Wormald B, Leslie K, Bhide A, Thilaganathan B. First-trimester uterine artery Doppler indices in term and preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* (2008) 32:133–7.
213. Mercé LT, Barco MJ, de la Fuente F. Doppler velocimetry measured in retrochorionic space and uterine arteries during early human pregnancy. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 1989; 68: 603–7
214. Merz E. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Volume 1 Obstetrics.* Thieme. (2011) ISBN:3131614722
215. Merz E. *Ultrasound in Gynecology and Obstetrics; An Atlas and Textbook,* Thieme Med. Publ., 1991, 97

216. Michel MZ, Khong TY, Clark DA, Beard RW. A morphological and immunological study of human placental bed biopsies in miscarriage. *BJOG* 1990;97:984-8
217. Michimata T, Ogasawara MS, Tsuda H, Suzumori K, Aoki K, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and Th2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2002 Apr;47 (4):196-202
218. Moffet-King A: Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:656–663
219. Moffet-King A, Hiby SE: How does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta* 2007; 28 (Suppl 1):S51–S56
220. Moffett-King A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 2015; 30: 1519-1525
221. Moldenhauer J., Stanek J., Warshak C. et al. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:1173-117
222. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and Pregnancy: The Role of the Immune System at the Implantation Site. *Ann NY Acad Sci* (2011) 1221:80–7.
223. Mor G, Abrahams VM. The immunology of pregnancy. In: Creasy R, Resnik R, Iams J, et al, editors. *Maternal-fetal medicine*. 7 edition. Elsevier; 2017.
224. Mouri M, Hall H, Rupp TJ. Threatened Abortion. 2022 Sep 5. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 28613498
225. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281 (5380):1191–3
226. Newcomb, W.W., Rodriguez, M. and Johnson, J.W. (1991) Reproduction in the older gravida. A literature review. *J. Reprod. Med.*,36, 839 –845
227. Nickels, L. C., & De Portu, G. (2016). Ultrasonography for Threatened, Incomplete, or Compete Abortion. *Atlas of Emergency Medicine Procedures*, 655–657. doi:10.1007/978-1-4939-2507-0_113
228. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 2000 Jun 24;320 (7251):1708-12.
229. Olofsson, P., Laurini, R. N., & Marsál, K. (1993). A high uterine artery pulsatility index reflects a defective development of placental bed spiral arteries in pregnancies complicated by hypertension and fetal growth retardation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 49 (3), 161–168

230. Oros D., Pueyo V., Altemir I. et al. Different pathways of neuronal and cognitive development in children born after late onset growth restriction or late prematurity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012; 40:123-128,
231. Papageorghiou AT, Yu CK, Bindra R, Pandis G, Nicolaides KH. Multicenter screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine artery Doppler at 23 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18 (5):441—9.
232. Perricone R, Di Muzio G, Perricone C, Giacomelli R, De Nardo D, Fontana L, et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol* 2006;55 (3):232-9
233. Petroff MG, Perchellet A. B7 family molecules as regulators of the maternal immunesystem in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63 (6):506–19
234. Phillips TA, Ni J, Pan G, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas:implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162 (10):6053–9
235. Picard LK, Claus M, Fasbender F, Watzl C. Human NK cells responses are enhanced by CD56 engagement. *Eur J Immunol.* 2022 Sep;52 (9):1441-1451.
236. Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, et al.: Role of hormone-controlled Th1- and Th2-cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 2000; 109:30–33
237. Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I.;Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy, Placenta. 1980 Jan-Mar;1 (1):3-19
238. Plasencia W, Maiz N, Bonino S, Kaihura C, Nicolaides KH. Uterine artery Doppler at 11 þ 0 to 13 þ 6 weeks in the prediction of preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;30:742–749
239. Potts, Malcolm; Martha Campbell (2009). "History of Contraception". *The Global Library of Women's Medicine*. doi:10.3843/ GLOWM.10376. ISSN 1756-2228. Retrieved 2011-09-07
240. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98 (5):1103-11.
241. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM and Vince G.Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *HumReprod* 1999;14:2386-91
242. Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, and Vince G. Prednisolone reducespre-conceptual natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*2005;84:980-4.

243. Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, Vince G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2005 Oct;84 (4):980-4.
244. Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J: Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Human Repro* 2009, 24:45-54
245. Radswiki, T., Jones, J. Subchorionic haemorrhage. Reference article, Radiopaedia.org. (accessed on 18 Feb 2022) <https://doi.org/10.53347/rID-13250>
246. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, et al.. Activation of NK Cells by an Endocytosed Receptor for Soluble HLA-G. *PLoS Biol* (2006) 4 (1):e9. 10.1371/journal.pbio.0040009
247. Ramos-Vara JA, Miller MA "When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique". *Veterinary Pathology*. 51 (1): 42 – 87
248. RCOG, Scientific Impact Paper No. 53, The Role of Natural Killer Cells in Human Fertility, December 2016, 8-9
249. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010;63 (6):534–43.
250. Raymond W, Redline MD, Patterson BS (1995) Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 26 (6):594–600
251. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E: Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992, 80:283-285
252. Rossen LM, Ahrens KA, Branum AM. Trends in Risk of Pregnancy Loss Among US Women, 1990-2011. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2018 Jan;32 (1):19-29
253. Romero-Gutiérrez G, Huebe-Martínez A, Amaral Navarro I et al. (2013): Doppler ultrasound assessment in women with threatened abortion. *Clinical Medicine Research*, 2 (3):24-8
254. Roth I, Corry DB, Locksley RM, et al.: Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996; 184:539–548
255. Sabine Engert, Lorenz Rieger, Michaela Kapp, Jürgen C. Becker, Johannes Dietl, Ulrike Kämmerer, Profiling Chemokines, Cytokines and Growth Factors in Human Early Pregnancy Decidua By Protein Array, *AJRA* Volume 58, Issue 2 August 2007 Pages 129-137
256. Sacks G, Sargent I, Redman C: An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 1999; 20:114–118

257. Sacks G. Enough! Stop the arguments and get on with the science of natural killer cell testing. *Hum Reprod* 2015; 30: 1526-1531.
258. Salomon L, Alfirevic Z, Bilardo C, Chalouhi G, Ghi T, Kagan K, Lau T, Papageorgiou A, Raine Fenning N, Stirnemann J, Suresh S, Tabor A, Timor-Tritsch I, Toi A, Yeo G. ISUOG Practice Guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2013;;41:102–113
259. Salomon L, Alfirevic Z, da Silva Costa F, Deter R, Figueras F, Ghi T, Glanc P, Khalil A, Lee W, Napolitano R, Papageorgiou AT, Sotiriadis A, Stirnemann J, Toi A, Yeo G. ISUOG Practice Guidelines: Ultrasound assessment of fetal biometry and growth. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019; 53: 715–723
260. Sauerbrei EE, Rham DH et al. Placental abruption and subchorionic hemorrhage in the first half of pregnancy: US appearance and clinical outcome. *Radiology* 160, 1986, 109-12)
261. Schiessl B, Innes BA, Bulmer JN, Otun HA, Chadwick TJ, Robson SC, et al.. Localization of Angiogenic Growth Factors and Their Receptors in the Human Placental Bed Throughout Normal Human Pregnancy. *Placenta* (2009) 30 (1):79–87. 10.1016/j.placenta.2008.10.004
262. Scholzen T, Gerdes J (March 2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown". *Journal of Cellular Physiology*. 182 (3): 311–22.
263. Schwartz, D. and Mayaux, M.J. (1982) Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. N. Engl. J. Med.* 306, 404–406.
264. Searle, R. F., R. K. Jones, and J. N. Bulmer. 1999. Phenotypic analysis and proliferative responses of human endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 60: 871–878
265. Seeber B, Sammel M, Guo W, Zhou L, Hummel A, Barnhart KT. Application of redefined hCG curves for the diagnosis of women at risk for ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2006;86:454–9
266. Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. The lambda sign at 10–14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996;7:421–3
267. Sentman CL, Meadows SK, Wira CR, Eriksson M. Recruitment of Uterine NK Cells: Induction of CXCL Chemokine Ligands 10 and 11 in Human Endometrium by Estradiol and Progesterone. *J Immunol* - (2004) 173 (11): 6760–6.

268. Seshadri S, Sunkara SK. Natural Killer Cells in Female Infertility and Recurrent Miscarriage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum Reprod Update* (2014) 20 (3):429–38.
269. Shih IM, Kurman RJ. Ki-67 labeling index in the differential diagnosis of exaggerated placental site, placental site trophoblastic tumor, and choriocarcinoma: a double immunohistochemical staining technique using Ki-67 and Mel-CAM antibodies. *Hum Pathol*. 1998 Jan;29 (1):27-33.
270. Shih J-C, Cheng W-F, Shyu M-K, Lee C-N, Hsieh F-J. Power Doppler evidence of placenta accreta appearing in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:623-5
271. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in Early Human Pregnancy. *Am J Pathol* (2009) 174 (5):1959–71.
272. *Solinger, Rickie (1998), "Introduction", in Solinger, Rickie (ed.), Abortion Wars: A Half Century of Struggle, 1950-2000, University of California Press, pp. 1–9, ISBN 978-0520209527*
273. Soma H, Yoshida K, Mukaida T, Tabuchi Y (1982) Morphologic changes in the hypertensive placenta. *Contr Gynecol Obstet* 9:58–75 22. Teadstale F (1985) Histomorphometry of the human placenta in maternal preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 152 (1):25–31
274. Sotiriadis A, Makrydimas G, Papatheodorou S, Ioannidis JP. Expectant, medical, or surgical management of first-trimester miscarriage: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2005 May;105 (5 Pt 1):1104-13.
275. Spalding AB. A pathognomonic sign of intra-uterine death. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 1922;34:754
276. Speert H, Guttmacher AF. Честота и значение на кървенето в ранна бременност. *J Am Med Assoc*. 1954 г.; 155 (8):712–715
277. Stabile I, Grudzinkas J, Campbell S. Doppler ultrasonographic evaluation of abnormal pregnancies in the first trimester. *J ClinUltrasound* 1990; 18: 497–501
278. Stallmach T, Hebisch G, Orban P & Lu X (1999): Aberrant positioning of trophoblast and lymphocytes in the feto-maternal interface with pre-eclampsia. *Virchows Archiv.*, 434 207–211
279. Staribratova D, Zaprianov Z, Milchev N. [Proliferation of villous trophoblast and stroma in normal and pathologic pregnancies (preeclampsia)]. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2005;44 (2):20-2. Bulgarian. PMID: 15853022

280. Stolz LA, Amini R, Situ-LaCasse EH, Shareef F, Reed HA, Adhikari S. Cervical Funneling: Potential Pitfall of Point-of-Care Pelvic Ultrasound. *Cureus*. 2017 Sep 3;9(9):e1649. doi: 10.7759/cureus.1649. PMID: 29142797; PMCID: PMC5669533
281. Tang AW, Alfirevic Z and Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcome in 540 women with recurrent miscarriage and infertility; a systematic review. *Hum Reprod* 2011;26:1971-80.
282. Tannetta D, Collett G, Vatish M, et al. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles - Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta* 2017;52:134–8.
283. The Johns Hopkins Manual of Gynecology and Obstetrics (4 ed.). Lippincott Williams & Wilkins. 2012. pp. 438–439. ISBN 978-1451148015
284. Trinder J, Brocklehurst P, Porter R et al. Management of miscarriage: expectant, medical, or surgical? Results of randomised controlled trial (miscarriage treatment (MIST) trial). *BMJ*. 2006;332 (7552): 1235-40. doi:10.1136/bmj.38828.593125.55
285. Tong, Stephen MBBS, PhD^{1,2}; Kaur, Anupinder MBBS¹; Walker, Susan P. MBBS, MD¹; Bryant, Valerie RN¹; Onwude, Joseph L. MSc³; Permezel, Michael MBBS, MD¹. Miscarriage Risk for Asymptomatic Women After a Normal First-Trimester Prenatal Visit. *Obstetrics & Gynecology* 111 (3):p 710-714, March 2008
286. Torlakovic EE, Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Gilks CB, et al. (February 2017). "Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine - Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics". *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 25 (2): 79–85
287. Trovik J, Wik E, Werner HM, et al. Hormone receptor loss in endometrial carcinoma curettage predicts lymph node metastasis and poor outcome in prospective multicentre trial. *Eur J Cancer* 2013;49:3431–41
288. Trundle, A. Moffett, Human uterine leukocytes and pregnancy, *Tissue Antigens* 63 (1) (2004) 1-12.
289. Tuckerman E, Laird SM, Prakash A and Li TC. Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2007;22:2208-13.
290. Tuckerman E, Mariee N, Prakash A, Li TC and Laird 550 S. Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. *J Reprod Immunol* 2010;87:60-6

291. Unek G, Oxmen A, Mendilcioglu I, Simsek M, Korgun ET (2014) The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. *Tissue Cell* 46:198–205
292. Urato A, Norwitz ER, A guide towards pre-pregnancy management of defective implantation and placentation, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25 (2011) 367–387
293. Velauthar L, Plana MN, Kalidindi M, Zamora J, Thilaganathan B, Illanes SE, et al.. First-trimester uterine artery Doppler and adverse pregnancy outcome: a meta-analysis involving 55,974 Women. *Ultrasound Obstet Gynecol.* (2014) 43:500–7. 10.1002/uog.13275
294. Valentin N, Gagne K, Kerdudou N, et al.: The alloimmune response to the human platelet antigen-1a is not related to maternal-fetal killer immunoglobulin-like receptor/HLA-Cw combinations. *Transfusion* 2007; 47:2322–2329
295. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL and Van Tendeloo VF (2017) CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front. Immunol.* 8:892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892
296. van Dijk MM, Kolte AM, Limpens J, Kirk E, Quenby S, van Wely M, Goddijn M. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2020 Apr 15;26 (3):356-367.
297. Wallace AE, Host AJ, Whitley GS and Cartwright JE (2013): Decidual natural killer cell interactions with trophoblasts are impaired in pregnancies at increased risk of preeclampsia. *Am. J. Pathol.*, 183: 1853-1861
298. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the Conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999;340:1796–9
299. Xiuhong Zhang and Haiming Wei, Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications, *Front Immunol.* 2021; 12: 728291. Published online 2021 Aug 26
300. Zenclussen, A. C., Fest, S., Sehmsdorf, U.-S., Hagen, E., Klapp, B. F., & Arck, P. C. (2001). Upregulation of Decidual P-Selectin Expression Is Associated with an Increased Number of Th1 Cell Populations in Patients Suffering from Spontaneous Abortions. *Cellular Immunology*, 213 (2), 94–103.
301. Zhang Y, Wang Y, Wang XH, Zhou WJ, Jin LP, Li MQ. Crosstalk Between Human Endometrial Stromal Cells and Decidual NK Cells Promotes Decidualization *In*

Vitro by Upregulating IL25. *Mol Med Rep* (2018) 17 (2):2869–78.

10.3892/mmr.2017.8267

302. Zhang, J., Dunk, C. E., Kwan, M., Jones, R. L., Harris, L. K., Keating, S., & Lye, S. J. (2015). Human dNK cell function is differentially regulated by extrinsic cellular engagement and intrinsic activating receptors in first and second trimester pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, 14 (2), 203–213
303. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural Killer Cell-Triggered Vascular Transformation: Maternal Care Before Birth? *Cell Mol Immunol* (2011) 8 (1):1–11. 10.1038/cmi.2010.38
304. Zhao Y., Guang-Wu X., Xiao-Wei Z., BO H. Is Ki-67 of Diagnostic Value in Distinguishing Between Partial and Complete Hydatidiform Moles? A Systematic Review and Meta-analysis *Anticancer Research* Feb 2018, 38 (2) 1105-1110
305. Zilianti M, Azuaga A, Calderon F, et al. Monitoring the effacement of the uterine cervix by transperineal sonography: a new perspective. *J Ultrasound Med.* 1995;14:719–724