

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ,, СКОПЈЕ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**



**ДОКТОРСКА СТУДИЈА**

**ВЛИЈАНИЕТО НА ИНФЕКЦИИТЕ СО *Ureaplasma spp.* И  
*Mycoplasma spp.* ВРЗ ЛОКАЛНАТА СИНТЕЗА НА АЗОТНИОТ  
ОКСИД ВО ВАГИНАТА КАЈ ПРЕДВРЕМЕНИТЕ  
ПОРОДУВАЊА**

**Ментор: Проф. Д-р. Александар Станков**

**Кандидат: Др. М-р. Јована Албиг**

**Скопје, 2024**

*Докторска дисертација*

Автор/кандидат: Др. М-р. Јована Албиг

Наслов: ВЛИЈАНИЕТО НА ИНФЕКЦИИТЕ СО *Ureaplasma spp.* И *Mycoplasma spp.* ВРЗ  
ЛОКАЛНАТА СИНТЕЗА НА АЗОТНИОТ ОКСИД ВО ВАГИНАТА КАЈ  
ПРЕДВРЕМЕНИТЕ ПОРОДУВАЊА

Ментор: Проф. Д-р. Александар Станков

Комисија: Проф. Д-р. Светлана Цековска, претседател

Проф. Д-р. Горан Димитров, член

Проф. Д-р Жаклина Цековска, член

Проф. Д-р Крсто Гроздановски, член

Научна област: Базична Медицина

Благодарност

*На моите родители, Жанета Попеска и Дончо Димовски, кои од најмала ме воведоа во волшебниот свет на научните откритија;*

*На брат ми, Ристе Попески-Димовски за вербата и несебичната помош и поддршка во изработката на овој труд;*

*На мојот ментор, колега и пријател,, Проф. Д-р. Александар Станков, за советите, насоките и сета поддршка во мојот професионален живот, не само во изработката на оваа дисертација;*

*На Проф. Д-р. Светлана Цековска, за укажаното внимание во изработката и ревизијата на оваа дисертација и за сите нејзини бесценети совети;*

*На М-р. Меги Мицевска, под чие способно водство е Лабораторијата за молекуларна дијагностика и ХПВ при ГАК, за сета соработка, поддршка и длабоките научни дискусии;*

*На моето семејство и сите мои пријатели кои веруваа во мене и тогаш кога јас не верував.*

## **ВЛИЈАНИЕТО НА ИНФЕКЦИИТЕ СО *Ureaplasma spp.* И *Mycoplasma spp.* ВРЗ ЛОКАЛНАТА СИНТЕЗА НА АЗОТНИОТ ОКСИД ВО ВАГИНАТА КАЈ ПРЕДВРЕМЕНИТЕ ПОРОДУВАЊА**

**М-р. Др. Јована Албиг**

### **Апстракт:**

Азотниот оксид претставува важна и многу интригантна молекула која учествува во физиолошките процеси и науката поврзана со ова соединение е комплексна и честопати збунувачка. Таа е сè уште во фокусот на многу научни дебати и дискусии кои се однесуваат на биохемијата на азотниот оксид. Азотниот оксид, е директно инволвиран во плејада на физиолошки и патофизиолошки процеси, меѓу кои е и предвременото породување. Причината за неговата предвремена синтеза и влијанието врз развојот на предвремени болки и породување се должи на многу фактори, докажани и недокажани.

Хипотезата на овој труд беше дека синтезата на азотен оксид е директно поврзана со инфективни агенси од групата на *Ureaplasma Spp.* и *Mycoplasma Spp.* во гениталниот тракт на жените со предремено породување. Преку компаративна и експериментална биохемиска анализа на цервикален секрет од група на испитанички со предвремени болки и контролна група на здрави испитанички во соодветна гестациска седмица, како и анализа на присуството на овие патогени и влијанието на системскиот инфламаторен одговор преку анализа на вредностите на Ц-реактивниот протеин во серумот, овој труд ја покажува асоцираноста на *Ureaplasma Spp.* и *Mycoplasma Spp.* како и азотниот оксид со појавата на предвременото породување пред 34 гестациска седмица. Предвремената зголемена синтеза на азотниот оксид во вагината кај жените во бременоста за 12 пати ги зголемува шансите за предремено породување, додека присуството на *Ureaplasma spp.* инфекциите за помалку од 4 пати го зголемува ризикот за предремено породување, притоа С-реактивниот протеин не е фактор на корелација.

Сепак, не се покажа директна поврзаност меѓу азотниот оксид и присуството на овие патогени во појавата на предвремени болки и предремено породување.

Клучни зборови: Азотен оксид, *Ureaplasma Spp.*, *Mycoplasma Spp.*, предремено породување, инфламаторен одговор, Ц-реактивен протеин,

**Abstract:**

Nitric oxide is a very important and intriguing molecule which has a role in the physiological processes, and the science related to this molecule is complex and often confusing. This molecule is in the focus of many scientific debates in regard to the biochemistry and secretion of the nitric oxide. The nitric oxide is involved in a wide variety of physiologic and pathophysiologic processes, among which is premature labor. The cause of its early synthesis relating to the development of premature labor and subsequent premature birth can be manifold and is not fully proven.

The hypothesis of this thesis that the premature increased synthesis of the nitric oxide is caused by the presence of infectious agents, like *Ureaplasma Spp* and *Mycoplasma Spp*. in the genital tract of women with premature labor. Through a comparative and experimental biochemical analysis of the presence of nitric oxide in the cervical secretion of a group of subjects with premature labor and a control group of healthy subjects in comparable gestational age, as well as the detection of these pathogens and the inflammatory response via the analysis of the C- reactive protein in serum, this study presents the association between the infection with *Ureaplasma Spp*. and *Mycoplasma Spp*. as well as the nitric oxide synthesis and the development of premature labor. The premature synthesis of the nitric oxide in the vagina during pregnancy increases by 12 fold the risk of premature labor and premature birth, while the presence of *Ureaplasma Spp*. infections increases for almost 4 fold the risk of premature labor and birth, and the C-reactive protein did not show as a factor of correlation.

However, the analysis did not show a direct correlation between the synthesis of nitric oxide and the presence of these pathogens in the evaluated patients.

Key words: Nitric oxide, *Ureaplasma Spp*., *Mycoplasma Spp*., C-reactive protein, premature labor, inflammatory response.

*Докторска дисертација*

„Изјавувам дека докторскиот труд го изработив самостојно, дека уредно ги цитирам сите користени извори и литература и дека трудот не е користен во рамките на други универзитетски студии или за стекнување на друго звање,, с.р.

„Изјавувам дека трудот во електронската верзија е идентичен со трудот во печатената верзија.,, с.р

Содржина:

1. Вовед .....	10
1.1.1 Гениталните инфекции и нивната асоцираност со предвременото породување.....	12
1.1.2 Дијагностирање на вагиналните инфекции во тек на бременоста.....	14
1.1.3 Гениталните микоплазми: <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> и <i>Ureaplasma Spp.</i> како важни, субдијагностицирани инфекции на гентилниот тракт кај жените во репродуктивна возраст.....	17
1.2 Биохемиските механизми на инфламацијата и имунолошкиот одговор.....	19
1.3 Азотниот оксид (NO) и неговата улога во созревањето на цервиксот...	21
1.3.1 Докажување на метаболити на азотен оксид во вагината (Реакцијата по Griess).....	24
1.4. Инфекциите како причина за прематурно породување во контекст на воспалителниот одговор и синтезата на азотен оксид .....	25
1.5. Инфламацијата како причина за терминско породување .....	29
2. Мотив и Цели.....	30
3. Материјали и методи.....	31
4. Критериуми за вклучување во студијата .....	33
5. Етички аспекти .....	34
6. Статистичка обработка .....	34
7. Резултати .....	35
7.1 Резултати од ретроспективната студија .....	35
7.1.1 Инфекции и ХПВ наод .....	37
7.1.2 Анализа за инфекции по возрастни групи .....	41

<b>7.2 Резултати од проспективната студија.....</b>	<b>45</b>
<b>7.2.1 Анализи на инфекциите кај испитуваните групи.....</b>	<b>45</b>
<b>7.2.2 Појава на азотен оксид и предвремени породувања.....</b>	<b>48</b>
<b>7.3.Анализи за инфекциите и азотниот оксид во контекст на предвремени породувања .....</b>	<b>49</b>
<b>8. Дискусија .....</b>	<b>63</b>
<b>9. Заклучок .....</b>	<b>74</b>
<b>10. Библиографија.....</b>	<b>76</b>
Додатоци: Информирана согласност и согласности (обрасци) .....	83



**Листа на користени кратенки:**

NO- азотен оксид

ХПВ- хуман папилома вирус

БВ – бактериски вагинози

PCR – полимераса верижна реакција

UU – *Ureaplasma urealyticum*

UP- *Ureaplasma parvum*

МН- *Mycoplasma hominis*

МG- *Mycoplasma genitalium*

СТ- *Chlamydia trachomatis*

TV- *Trichomonas vaginalis*

ХИВ – Вирус на хумана имунодефициенција

ДНК-десоксирибонуклеинска киселина

РНК – рибонуклеинска киселина

## **1. Вовед:**

Нормалната бременост претставува системски балансирачки акт, во кој се создаваат алтерации во мајчиниот имун систем кои се насочени кон тоа да се толерираат антигените на татковиот главен хоистокомпатибилен комплекс (МНС-Major Histocompatibility complex) (ембрионот и фетусот се семиалографти за мајката затоа што дели една половина од геномскиот комплемент со таткото), а истовремено да се одржи соодветна имунолошка компетентност за заштита од микроорганизми. Притоа, под дејство на физиолошките хормонални промени кои се случуваат, хуманиот цервикс создава слободни радикали- меѓу кои азотен оксид (NO) кој заедно со локалните простагландини влијае на состојбата на цервиксот во текот на бременоста. Механизмите кои се наоѓаат во основата на овој процес се комплексни и сè уште нецелосно разјаснети, но се знае дека во нив се вклучени системски промени како и локални промени на ниво на мајчино-плацентално-феталната оска. Долго време се знае дека во тек на гестацијата, лимфоцитите на бремените жени пројавуваат прогресивно намалување на способноста за пролиферација како одговор на митогени стимули (1,2). Поновите студии индицираат дека освен намалениот пролиферативен одговор постои и промена на нормалниот шаблон на продукција на цитокини. Истовремено, цервикалното созревање се должи на инфламаторна реакција која вклучува комплексна каскада на деградативни ензими кои се придружени од прераспределување на протеините на екстрацелуларниот матрикс и на гликопротеините (3,4,5).

Предвремената појава на породилни болки е онаа која се случува пред навршување на 37 гестациски седмици и може да доведе до предвременно породување. Притоа настанува одреден дисбаланс на оваа добро регулирана нова физиолошка состојба кај мајката како резултат на комбинација на повеќе фактори. Ова предвременно раѓање пак е одговорно за најголемиот број случаи на неонатален морбидитет и морталитет во светски рамки (7,8). Во голем број на овие случаи причините за предвременото породување не се етаблирани иако се опишани неколку ризик фактори (9) меѓу кои се вбројуваат: 1) лошите социоекономски услови и недоволното образование на мајката (10); 2) мајчина возраст под 20 и над 35 години (11); 3) физички исцрпувача работа на родилката (9); 4. цервикална

*Докторска дисертација*

некомпетентност, повеќе гестации, претходни абортуси, претходни предвремени раѓања (7, 9, 10) и 5) присуство геноитоуринари инфекции (7): Колонизацијата со микроорганизми и инфламацијата во мајчиниот генитален тракт се јавува како еден од основните ризик фактори асоцирани со спонатните предвремени раѓања (11). Епидемиолошките студии на оваа тема сугерираат два основни фактори за предвремено породување и тоа хроничен стрес кај мајката и инфекција на мајчиниот уро-генитален тракт, кои се сигнификантно и независно асоцирани со зголемен ризик на спонтано предвремено породување. Студиите кои се однесуваат на физиолијата на раѓањето сугерираат дека неуроендокрини и имунолошки процеси играат важна улога во физиологијата и патофизиологијата на терминските и предвремените раѓања. Сепак, не сите жени со високи нивоа на стрес и/или присутни вагинални инфекции ќе се породат предвремено, а за сега, малку се познати факторите кои ја модифицираат склоноста кон патофизиолошки збиднувања на ниво на ендокриниот и имунолошкиот систем во тек на бременоста.

## 1.1. Гениталните инфекции и нивната асоцираност со предвремено породување

Изработени се голем број на трудови кои укажуваат на ефектите кои сексуално преносливите генитални инфекции и инфекциите воопшто ги имаат врз бременоста. Сепак, генитоуринарните инфекции, кои не се нужно суексуално преносливи, често водат до предвремено породување. Поради тоа што во голема мера се асимптоматски, може да дојде до потценување на нивното значење во овие состојби.

Бактериските вагинози се најпревалентните инфекции на долниот генитален тракт кај жените во репродуктивна возраст (4,6,11,12,13). Оваа состојба, која се смета за клинички синдром, се карактеризира пред сè со алтерација на нормалната вагинална флора, а не инфекција специфична со некој даден микроорганизам. Бактериската вагиноза се карактеризира со значајна полимикробна пролиферација, особено на Грам (-) и анаеробни бактерии и уништување на лактобацилите како дел од нормалната микрофлора на вагината (11,12). Жените со бактериски вагинози најчесто се жалат на редок вагинален исцедок-бледо сив до жолтеникав и непријатен мирис на риба (7), но сепак кај голем дел од жените инфекцијата е асимптоматска (13). Присуството на бактериска вагиноза во бременоста е асоцирано со двојно зголемен ризик за прематурно прскање на мембраните и прематурно раѓање (13,14,15,16,17,18,19, 20,21).

Етиологијата на бактериските вагинози не е во целост разјаснета. Не е познат еден единствен етиолошки агенс како причинител на бактериски вагинози, поради што се смета дека синдромот е резултат на еколошки дисбаланс на нормалната вагинална микрофлора. Како што напоменавме погоре, бактериската вагиноза се карактеризира со редукција на бактериите кои продуцираат клиселини (примарно *Lactobacillus* spp.) и пораст на Грам негативните и бројот и видовите на факултативно и стриктно анаеробни бактерии (11,12,21,22,23).

Она што е од значење за овој труд е тоа што се покажало дека бактериските вагинози се независен ризик фактор за несакан исход вклучувајќи пелвична инфламаторна болест (24,25) и последователен инфертилите (26) **зголемен ризик за предвремено породување** (27,28), **инфекции на амнионската течност** (29), **хориоамнионитис** (30), ниска родилна тежина, ендометритис, цервицитис (31) и зголемен ризик за заболување од други сексуални

*Докторска дисертација*

преносливи инфекции и ХИВ (32). Затоа се смета дека дијагностицирањето на бактериската вагиноза е неопходно- особено кај бремените жени- колку што е можно порано, за да се превенираат можни компликации. Сепак, точниот патофизиолошки механизам и епидемиологијата на бактериските вагинози не е точно утврден и оптималниот медицински менаџмент на оваа состојба се далеку од разјаснети. Поголемиот дел од овој недостиг на разбирање директно се должи на неможноста сè уште да се дефинира дијагностички стандард за овој синдром.

Се покажало дека корелацијата помеѓу инфекциите и предвремените породувања не е конзистентна во тек на гестацијата. Инфекција (хориоамнионитис) е присутна во поголемиот број на рани предвремени породувања (на пр. <28 г.с.), но е ретко присутна во подоцнежните предвремени раѓања ( на пр. 34-36 г.с.) (33). Сепак, неколку аспекти остануваат неодговорени во врска со улогата на инфекцијата кај предвременото породување, вклучувајќи аспекти поврзани со патогеноста на специфични инфективни микроорганизми, времето на јавување на инфекцијата во тек на гестацијата, локализацијата на инфекцијата/инфламацијата и патофизиолошките механизми кои ги регулираат ефектите на инфекцијата (34,35,36,37).

### 1.1.1. Дијагностирање на вагиналните инфекции во тек на бременоста

Засега, бактериските вагинози (БВ) се дијагностицираат клинички, врз критериумите опишани од Амсел и соработниците (36,38), при што три од следните четири знаци мора да бидат присутни: рН на вагиналниот секрет да биде поголема од 4,5; да има хомоген вагинален исцедок при преглед; да се детектира непријатен мирис на риба кога на вагиналниот секрет ќе се додаде 10% калиум хидроксид; и да има присуство на значаен број на специфични клетки (>20%). Друг метод кој често се користи се потпира на процена на присутната микрофлора врз база на бојење по Грам на размаски на вагинална течност (Нугент скор систем) (39), Табела 1.1 (40).

Табела 1.1 Скоринг систем (0-10) за обоените по Грам вагинални размаски

Скор	Лактобацилни орфотипови	Gardrenella и Bacteroides species морфотипови	Заоблени Грам-варијабилни стапчиња
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ или 2+
2	2+	2+	3+ или 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

$1+ \leq 1/1000x$  поле;  $2+ = 1-5/1000x$  поле;  $3+ = 6-30/1000x$  поле;  $4+ \geq 30/1000x$  поле.

Дијагностиката на бактериските вагинози во истражувачки и лабораториски услови се потпира на традиционалните методи на култивирање и бојење на размаски на вагинален секрет по Грам. Конвенционалните микробиолошки пристапи имаат ограничена употреба во проценката на пациентите со БВ. Главниот белег на оваа состојба е комплексно нарушување

### Докторска дисертација

на нормалната вагинална микрофлора и идентификувањето на еден микроорганизам како ‘маркер‘ врз база на култивирање е дефицитарно и во поглед на специфичност и во поглед на сензитивност. Исто така, мора да се има предвид дека многу од клучните микроорганизми асоцирани со БВ се облигатни анаероби кои тешко се детектираат или не се детектираат со користење на стандардните методи на култивирање, што ја прави невозможна вистинската евалуација на вагиналната микрофлора со користење на култури (36). Вистинскиот спектар на причинители на бактериски вагинози беше индициран со појавата на напреднати, молекуларни методи независни од култивирање, како што се PCR, multiplex-PCR, real-time PCR, таксон-усмерена PCR, PCR со широк ранг на бактериски 16S rDNA, и флуоресцентната in situ хибридизација (FISH) (41,42,43,44,45). Овие техники го демонстрираа присуството на неколку нови бактерии поврзани со БВ, од кои најчести се *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia*-слични баџили *Sneathia spp.*, *Megasphaera mun 1*, *Ureoplasma urealyticum*, и *Mycoplasma genitalium* (46,47,48,49) додека конкомитантното присуство на *G.vaginalis* и *A.vaginae* во голем број на копии има висока сензитивност (95%) и специфичност (99%) во предикцијата на бактериските вагинози (43,50). Имено, се покажало дека молекуларните методи како квантитативниот ‘real-time‘ PCR, во предикцијата на бактериските вагинози кај бремени жени има сензитивност од 100%, специфичност од 93%, позитивна предиктивна вредност од 73% и негативна предиктивна вредност од 100% (50,51). Со користењето на овие молекуларни дијагностички методи врз голем број на случаи е утврдено дека ризикот за предвремено породување кај жени со предвремени болки и интактни мембрани е значајно поврзан со високи вагинални концентрации на *A.vaginae* и *G. Vaginalis* (52).

Покрај овие релативно нови, но многу брзи дијагностички методи, постојат и дијагностички критериуми, кои се комбинација на биохемиски и клинички маркери за предикција на клинички инфекции и ризикот од предвремено раѓање при постоење на предвремени болки. Овие неинвазивни методи, кои се потпираат на комбинацијата на улразвучните мерки на должината на цервиксот, леукоцитозата кај мајката, особено процентот на неутрофили, како и Ц-рекативниот протеин со или без комбинација со феталниот фибронектин од вагиналниот секрет како и серумскиот феритин, се особено вредни во предикцијата и прогнозата на предвременото породување, особено кај жени кои се со интактни мембрани при прием (53,54,55,56,57).

Она што мора да се има предвид е дека мора да се продлабочат истражувањата за идентификација на **индивидуалниот ризик** за инфекција со одредени бактерии причинители на бактериски вагинози, што би било најкорисно за развој на успешна стратегија за третман и превенција на спонтанни предвремени породувања кај бремени жени со бактериски вагинози (47,58). Мора да се имаат предвид: а) неуро-ендокрините механизми кои резултираат со прематурно зголемена активација на мајчино-плацентално-феталниот ендокрин систем кој промовира породување и б) имуно-воспалителниот механизам во кој одредени фактори кај мајката ги модулираат карактеристиките на системските и локалните (плацентални-децидуални) имунолошки фактори кои ја зголемуваат склоноста кон интраутерини и фетални инфективни и инфламаторни процеси кои потоа промовираат породување преку про-инфламаторни механизам.



### 1.1.2. Гениталните микоплазми: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, и *Ureaplasma Urealiticum*, *Ureaplasma Parvum*. како важни, субдијагностицирани инфекции на гениталниот тракт кај жените во репродуктивна возраст

Дијагностиката на симптоматските вагинални инфекции е прилично едноставна, ако се земе предвид дека е пропратена со карактеристични објективни клинички знаци од типот на исцедок со различни квалитети, промени на слузницата, како и субјективни клинички тегоби. Она што е почесто проблем е дијагностиката на асимптоматските сексуално преносливи инфекции, проблем кој условува и зголемена инфективност на истите, не само личен проблем на ниво на индивидуата. За асимптоматските инфекции, особено со *Chlamydia trachomatis* и нејзината поврзаност со проблеми во фертилитетот и предвремените породувања е многу дебатирано, истражувано и се објавени голем број на трудови кои ја докажуваат оваа поврзаност (59). Она што е помалку истражувано е асоцијацијата на гениталните микоплазми со ризикот од предвремено породување и самиот инфертилитет кај жените. *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) е првата Микоплазма која е изолирана кај луѓето уште во 1937. Иако долго време биле сметани за коменсали на уро-гениталниот тракт се повеќе се поголема импликација имаат во разни генитални и екстра-генитални инфекции како бактериските вагинози, цервицитис, пелвична инфламаторна болест, прематурна руптура на мембраните во бременоста, инфертилитет, сепса кај новороденчиња, итн (59,60,61).

Гениталните микоплазми како патогени се тешки за култивирање и веројатно постојат припадници на оваа група кои се уште не се детектирани (57,62). Микоплазмите и уреоплазмите влегуваат во групата на микроорганизми кои тешко растат *in vitro*. Припадниците на оваа група на микроорганизми се разликуваат според големината на своите геноми како и според супстратите кои ги користат за метаболизам на енергија. Додека *Mycoplasma genitalium* метаболизира гликоза, *Mycoplasma hominis* метаболизира Аргинин до Орнитин притоа создавајќи амониум. *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealiticum* се најнеобични, поради тоа што како супстрат користат уреа за продукција на енергија, јаглероден диоксид и амониум. Ниту еден друг микорорганizam нема таква потреба (57). Уште нешто што е специфично за овие Уреоплазми е дека можат да растат само во кисел медиум со рН 6,5 или помал. Она што микоплазмите и уреоплазмите го имаат

*Докторска дисертација*

како заеднички квалитети е дека се мали (0,2 до 0,3 микрони) со мали геноми (580 до 1178 килоб (57), немаат клеточен сид, и за култивација имаат потреба од медиум збогатен со животински серум.

Денешните молекуларни методи на дијагностика кои ги споменавме погоре се високо специфични и сензитивни за детекцијата на овие патогени во биолошки примероци.

## 1.2. Биохемиските механизми на инфламацијата и имунолошкиот одговор

Клиничката слика на инфламација е дефинирана како постоење на топлина, црвенило, оток и нарушена функција кои ги одразуваат ефектите на инфламаторните медијатори врз локалните крвни садови и ткивата. Споредено со тоа, хистолошката инфламација, златниот стандард за дијагноза, е дефинирана како инфилтрација на ткивата со неутрофили, макрофаги и лимфоцити. Хемотактичните сигнали мора да бидат присутни за леукоцитите да мигрираат кон местото на повредата/инфекцијата, што значи дека потојат ‘молекуларни знаци за инфламација’ кои може да се детектираат пред да се забележи хистолошко присуство на инфламација (63).

Постои честа забуна дека недостигот на системски клинички знаци како: покачена телесна температура, леукоцитоза и др., значи дека не постои инфламација/инфекција. Во стварноста, доказите упатуваат на тоа дека спротивното е точно. Повеќето случаи на хистопатолошка инфламација и хориоманионитис кај предврмените и терминските раѓања се суб-клинички (63).

Инфламацијата сама за себе има три главни цели: (1) достава на клетки и молекули за супресија на инфекцијата, (2) генерирање на физичка бариера кон ширењето на инфекцијата и (3) отпочнување на репарација на оштетеното ткиво.

Клетките кои одат кон местото на повредата ослободуваат молекули за време на воспалителниот процес, вклучувајќи антимицробни пептиди, цитокини и други медијатори на воспалението. Некои од овие молекули ја менуваат активацијата на макрофагите и неутрофилите, така што се засилува нивната моќ за уништување на микробите. Другата важна цел на воспалението е да го спречи ширењето на микроорганизмите што е често ефектуирано преку активацијата на системот на коагулација и формацијата на тромби во крвните садови кои го снабдуваат повреденото место.

Повреда може да резултира и од микроорганизми но и од неинфективни нокси. Имуниот систем има еволуирано да може да идентификува страни тела (односно, нешто што не припаѓа на домаќинот) преку рецепторите за препознавање на шаблони (Pattern Recognition Receptors-PRP) (64). Овие рецептори идентификуваат молекуларни шаблони

специфични за повеќето микроорганизми, но сега е познато дека овие рецептори може да препознаваат и ‘сигнали на опасност’. Основната премиса на овој ‘модел на опасност’ е дека имуниот систем е порективен кон постоење на некакво оштетување отколку на страна тело, и дека имуната реакција се активира по појава на ‘сигнали на аларм’ од страна на повредените ткива почесто отколку по препознавање на нешто што е туѓо за организмот.

Воспалението е дел на вродениот имун одговор кој делува веднаш, не е специфичен и му недостига меморија. Восплаението е она што ја одржува ткивната хомеостаза. Сепак, претераното воспаление или недостигот на воспалителен одговор може да доведат до појава на болест.

Она што е особено важно кај вагиналните инфекции и кај инфекциите воопшто е имунолошката реакција како биолошка појава која ги вклучува сите видови на одбрамбени реакции. Главната функција на имунолошкиот систем е да го одбрани организмот од инфекции, да разликува сопствено од туѓо, при што туѓото го напаѓа, уништува и отстранува. Одбраната од инфекцијата е истовремено локална и системска, специфична и неспецифична, хуморална и целуларна. Како што напоменавме погоре, треба да се има секогаш предвид дека тежината на инфекцијата е детерминирана од конституционалниот фактор (индивидуалниот ризик) кој го условува имуниот одговор на организмот, постоењето на пропратни системски заболувања, како и патогеноста и вируленцијата на микороорганизмите предизвикувачи на вагиналните инфекции. Поаѓајќи од премисата дека во бременоста доаѓа до промена на примарно целуларниот имун одговор во примарно хуморален имун одговор и имајќи го предвид влијанието на бактериските продукти кои го зголемуваат бројот на циркулирачки лимфоцити, поттикнуваат биосинтеза на интерферони, го зголемуваат нивото на имуноглобулини и активноста на перитонеалните макрофаги, мора да се има секогаш предвид мајчино-плацентално-феталната оска кога се говори за вагиналните инфекции како предизвикувачи на предвремено породување.

### 1.3. Азотниот оксид (NO) и неговата улога во созревањето на цервиксот

Откривањето на ендотелиум создаден релаксирачки фактор (65) и неговата подоцнежна идентификација како азотен оксид (NO) од страна на Ignarro и соработниците во 1987 (66,67) треба да се смета за едно од најинтересните достигнувања на медицината во 1980-тите години. Затоа и не е неверојатно тоа што во 1992 година, молекулот на азотниот оксид бил номиниран за „молекул на годината“, а неговото откритие било наградено со Нобелова награда во 1998 година. По неговото откритие, е покажано дека азотниот оксид, неполаризирана гасна молекула, се ослободува локално на местото на неговата синтеза (68,69). Следува докажување на неговата врска со важни и физиолошки и патофизиолошки процеси во организмот (70,71,72,73). Исто така се докажува и дека може да биде синтетизирана во цервикалните клетки (74), со што се претпоставува дека може да има влијание не само на олеснување на одредени инфекции (меѓу кои ХПВ) и следствено развој на карциноми на цервиксот (72), туку и дека може да влијае на предизвикување на предвремено породување. Азотниот оксид е мала гасовита молекула која е високо реактивен слободен радикал со ултракраток полуживот, од 4 секунди. Оваа молекула се покажала како важен паракрин медијатор на бројни биолошки процеси, вклучувајќи релаксација на мазната мускулатура, одбрамбениот одговор и воспалението (75,76).

Хуманиот утерин цервикс мора да поседува уникатни својства, токму поради тоа што мора да биде ригиден за време на бременоста, но отворен за време на породувањето. Неговиот екстрацелуларен матрикс е составен преобладајќи од колагени со еластин и протеоглици, додека целуларната компонента содржи мазни мускулни клетки, фибробласти, епител и крвни садови. Подолниот дел на цервиксот (ектоцервиксот) е обложен со повеќеслоен сквамозен епител, додека еднослоен мукус-секреторен жлездест епител го обложува горниот дел (ендоцервиксот). Цервикалната имуна одбрана се состои од бариера од мукозни епителни клетки (77), кои заедно со ендотелните и инфламаторните клетки служат како антиген-презентирачки клетки со капацитет да продуцираат медијатори како цитокини и интерлеукини кои понатаму го зголемуваат локалното воспаление. Влијание врз локалниот инфламаторен одговор на цервиксот имаат и женските хормони кои ги регулираат Имуноглобулин А антителиот одговор (78). Одреден број на цервикални

клетки, како што се сквамозниот и жлездениот епител, хематопоетските и стромални клетки исто така се способни за продукција на азотен оксид-гас како слободен радикал кој е директно инволвиран во цервикалното зреење за време на бременоста (79). По откривањето на овој „ендотел релаксирачки агенс“, азотниот оксид се детектира кај скоро сите типови на клетки, и дека има улога во имунологијата, карциногенезата и голем број на васкуларни нарушувања, како и во предвременото породување (71,72).

Азотниот оксид влијае како интра и екстра-клеточен гласник и е високо растворлив и во хидрофилни, но и во хидрофобни средини (80). Тој е двоатомен слободен радикал со екстремно краток полуживот во биолошките системи (помалку од една секунда во крвта) (70).

Азотниот оксид се синтетизира од аминокиселината L-аргинин и молекуларниот кислород, преку Азотен Оксид Синтазата (NOS) (68,70). Самата биосинтеза се состои од дво-степен оксидација на L-аргининот до L-цитрулин и азотен оксид преку интермедиери. Аденин-динуклеотид фосфатот служи како косупстрат во овој процес, а хемот, тетрахидробиоптеринот, калмодулинот и флавин-аденин мононуклеотидот служат како ко-фактори во оваа синтеза (70,71). Идентификувани се три NOS изоензими: неврална (nNOS), ендотелиална (eNOS) и индуцибилна (iNOS) (81,82,83). Ендотелната азотен оксид синтаза е примарно експримирана во васкуларниот систем (84) и е активирана преку интрацелуларниот калциум при што продуцира азотен оксид во наномоларни количини (70,84). Индуцибилната азотен оксид синтаза, пак, е калциум-независна и се активирана со инфламација (68,71). Се покажало дека активацијата на индуцибилната азотен оксид синтаза резултира со концентрации на азотен оксид во наномоларни и микроларни рамки. Овие индуцибилни азотен оксид синтази се наоѓаат во различни клетки како моноцити и макрофаги (82), клетки природни убијци, ендотелиални и епителиелни клетки, како и кератиноцити (69).

Азотниот оксид реагира со различни молекули и протени, било да е директно или индиректно (71). Ова соединение може директно да реагира со целната молекула, предизвикувајќи, на пример, нитрозилација на цистеинскиот остаток, кој пак ја инхибира протеинската синтеза. Индиректните реакции ги содржат не-ензиматските оксидации на азотниот оксид до реактивни азотни соединенија, кои потоа реагираат со целните молекули

(70). Сите овие различни модели на реакција на азотниот оксид во физиолошки рамки, како и големиот број на таргет молекули на азотниот оксид, може да ги објаснат шареноликите и често спротивни биолошки ефекти, како неговиот капацитет да промовира и да инхибира инфламаторни и канцерогени одговори (70,71,83).

Цервикалното зреење покажува особини слични на оние од воспалителниот одговор, особено во насока на прераспределување на колагените влакна (85). Тоа значи дека цервикалното зреење е асоцирано со промени во локалните цитокини, простагландини и металопроотеази, како и во други биорегулатори кои играат улога во воспалението и метаболизмот на колагенот (86,87). Овие фактори исто така имаат улога во регулацијата на синтезата на азотниот оксид и неговото ослободување (88). Азотниот оксид е важен интра и интер-клеточен сигнализирачки молекул кој е вклучен во разни физиолошки и патофизиолошки механизми во повеќе системи меѓу кои и имуниот систем. Тој ја релаксира мазната мускулатура, инхибира агрегација на тромбоцити, стимулира ангиогенеза, и ги активира макрофагите во борба против микроорганизмите.

Податоци од истражувањата на животни сугерираат дека азотниот оксид е водечки фактор во цервикалното зреење (89).

### 1.3.1. Докажување на метаболити на азотен оксид во вагината (Реакцијата по Griess)

Азотниот оксид брзо се конвертира во своите постабилни метаболити, нитрати и нитрити кои може да се детектираат *in vitro* и *in vivo* со користење на реакцијата на Griess (спектрометриски) од физиолошки течности (плазма, урина, вагинална течност) (90).

Токму поради многу краткиот полуживот, како и многу брзите интеракции со различни органски молекули (90), директно мерење на азотниот оксид е многу тешко. Постојат неколку техники кои се применуваат, особено во научните истражувања, меѓу кои хемилуминисценција, флуорометрија како и електрохемиски методи. Азотниот оксид може да се одреди и преку оптички средства, електрон парамегната резонанца како и позитрон емисиона томографија, но овие техники се најчесто многу комплексни и не се корисни во клиничките истражувања (90,91).

Грисовата реакција е една од најчесто користените индиректни методи за докажување и детекција на азотниот оксид. Овој колориметриски метод се базира на брзата конверзија на азотниот оксид во неговите стабилни интермедиери- нитрати и нитрити. Нитратот во примерокот прво се редуцира до нитрит (83-88). Потоа, преку дво-степенa диазотинизирачка реакција продуцира диазониумски јон спарен со N-(1-нафтил) етилендиамид за да се формира азо продукт кој апсорбира светлина со бранова дожина од 540nm (79). Храна која е богата со нитрати може да го зголеми нивото на нитрити во плазмата, додека гастроинтестиналните микроби се способни да продуцираат азотен оксид (92). Така што, доколку азотниот оксид се бара во циркулирачка крв, мора да постои рестрикција на оралниот внес на храна богата со нитрати/нитрити. Но ваквата храна не влијае врз нитритите во цервикалниот флуид (74), поради што Грисовата реакција е соодветен метод за индиректно одредување на продукцијата на азотен оксид кај хуманиот утерин цервикс.



#### 1.4. Инфекциите како причина за прематурно породување во контекст на воспалителниот одговор и синтезата на азотен оксид

Бројни студии укажуваат на потенцијатана врска меѓу синтезата на азотниот оксид, заедно со тумор некротичниот фактор алфа, како медијатори на локалниот инфламаторен одговор, и ризикот од предвременно породување (35). Инфекциите пак се чести и важни механизми на заболување кај предвремените породувања (64,93,94). Доказите кои истражувачите ги дефинирале а ја поддржуваат оваа претпоставка се: 1. експериментално докажување дека интраутерината инфекција или системското администрирање на микробиолошки продукти кај бремените животни може да резултира со предвременно породување (95,96,97,98); 2. екстраутерините инфекции кај мајката, како на пр. пиелонефритис, се асоцирани со прематурно раѓање (69); 3. суб-клиничките интраутерини инфекции се асоцирани со предвременно породување (35); 4. пациентките со интра-амниотска инфекција или инфламација (дефинирана како золгемување на концентрацијата на цитокини во амниотската течност) (99,100) во тек на вториот триестар се со зголемен ризик за понатамошно предвременно породување; 5. антибиотски третман на асцендентни интраутерини инфекции може да превенираат прематуритет кај експериментални модели на хориоамнионитис (101) и 6. третманот на асимптоматската бактериурија спречува прематуритет (69;35).

Се смета дека интраутерините инфекции предизвикани од бактерии се водечка причина за предвременно породување поврзано со инфекција. Помалку од 1% од амниотската течност кај жени со терминско породување ќе содржат бактерии (69). Според тоа, изолацијата на бактерии во амниотската течност е патолошки наод и се дефинира како микробиолошка инвазија на амниотската шуплина. Повеќето од овие инфекции се суб-клинички и не се детектираат без анализа на амниотската течност. Честотата на оваа микробиолошка инвазија зависи од клиничката презентација и гестациската возраст, при што колку е помала гестациската возраст при презентација на предвремените болки, поголема е преваленцата на позитивни култури од амниотската течност (95,96,102,103,104).

Најчестите микробактерии кои се наоѓаат во амниотската течност се гениталните *Mycoplasma spp.* посебно *Ureaplasma urealyticum* (105,35). Сепак, други микроорганизми

### *Докторска дисертација*

кои се пронајдени ги вклучуваат *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium spp*, *Gardrenela vaginalis* (104,106).

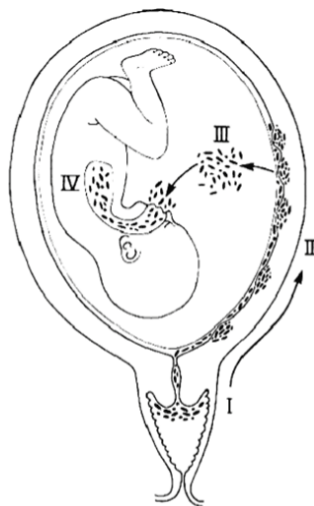
За сега, одредувањето на преваленцата на микробиолошката инвазија на амниотската шуплина се потпира на стандардни микробиолошки методи (како култивирањето) кои зависат од самите медиуми и од тоа дали се познати потребите за раст на претпоставените микроорганизмите при што се смета дека може да се детектира само 1% од микробиолошкиот свет со користење на култури.

Се покажало дека преваленцата на оваа микробиолошка инвазија е значително повисока кога се користат молекуларни методи (107). На пр. пациентите со позитивен PCR за *U.urealyticum* но со негативни култури имаат ист несакан исход и ист степен на восплаение (концентрации на интерлеукин 6 и хистопатолошки докажан хориоамнионитис/фуниситис) како и пациентките со позитивни култури од амниотската течност, и имаат многу полош исход од пациентите со стерилни култури од амниотска течност и негативен PCR резултат (108).

Иако се смета дека амнионската шуплина е нормално стерилна во однос на присуството на бактерии, користењето на FISH со ДНК проби за докажување на присуство на бактериска ДНК покажала присуство на бактерии во мембраните кај 70% од родилките кај кои бил извршен термиски царски рез за породување (95). Бактерии се секако често присутни и кај пациентките со предвремени болки и интактни мембрани, како и кај пациентки со предвремно прснати мембрани (35,94). Овие податоци сугерираат дека самото присуство на бактерии во хориоамниотските мембрани не е доволно за да предизвика појава на предвремени болки и породување, и дека микробиолошката колонизација на хориоамниотските мембрани не секогаш предизвикуваат фетален или мајчин воспалителен одговор. Иако се сметаше дека хориоамнионитисот е акутен процес, сега се повеќе податоци укажуваат на тоа дека микробиолошката инвазија може да биде клинички асимтоматска во вториот триместар, при што е хронична и требаат повеќе седмици за да предизвика појава на предвремени болки и предвремено породување (109).

Микроорганизмите стигнуваат до амниотската шуплина и фетусот преку следните патишта: (1) асцендентно од вагината/цервиксот (најчесто); (2) хематогена дисеминација

преку плацентата; (3) ретроградно расејување од перитонеалната шуплина; (4) нескано внесување преку инвазивни процедури (Слика 1.) (109).



Слика 1. Шематски приказ на асцендентен пат на ширење на инфекциите (од вагинлниот канал, преку цервиксот, низ мембраните во амниотската течност)

Притоа, несаканите ефекти од микробиолошката инвазија може да се резултат на пролиферацијата на интактни микроорганизми или резултат на бактериски продукти (како липополисахаридите или ендотоксините од Грам (-) бактерии, пептидогликаните од Грам (+) и липогликаните од Микоплазмите.

Постојат мултипли анти-инфективни механизми кои ја штитат нормалната бременост. Тука спаѓаат природните антимикробни пептиди на ендотелот, лактобацилите кои ја колонизираат вагината набргу по почетокот на бременоста и продуцираат заштитна млечна киселина, протините на акутната фаза на воспалението (Ц-реактивниот протеин-CRP) кои делуваат како опсонини за неутрализирање и расчистување на патоигените, Toll-like рецепторите (TLR) кои препознаваат интрацелуларни патогени и др. Она што вреди да се напомене е дека трофобластните клетки имаат способност да реагираат на патогени преку експресија на TLR што може директно да предизвика трофобластна клеточно умирање (110) што се забележува при компликации во тек на бременоста. Важноста на овие TLR во предвременото породување е тоа што кај глумци кај кои постоела спонтаната мутација на TLR-4 рецепторот имале помали шанси за предвременно породување по интраутерина инаокулација со термички обработени бактерии и липополисахариди отколку дивниот-тип (110). Што е уште поважно, спонтаните породувања во термин и предвремените породувања со хистолошки потврден хориоамнионитис, без разлика на статусот на мембраните, се асоцирани со зголемена мРНК експресија на TLR-2 и TLR-4 во мембраните

(111). Овие опсервации сугерираат дека вродениот имун систем игра важна улога во породувањето воопшто.

Азотниот оксид е дел од воспалителниот одговор кој дејствува како добро растворлив прв преносник на сигнали кој може да влијае на клетките директно и индиректно. Директните ефекти се посредувани од самиот молекул на азотен оксид, додека индиректните се посредувани преку реактивниот азот создаден при интеракцијата на азотниот оксид со кислород и супероксидни радикали. Овие индиректни ефекти вклучуваат оксидација, нитрозација и нитрација (112), додека цитокин-индуцираната продукција на азотен оксид посредува во цитотоксичноста на макрофагите (113).

Поради воспалителниот процес кој се случува како резултат на порастот на про-инфламаторни медијатори како одговор на инфекција при предвременото породување, фетусот одговара соодветно со системски инфламаторен одговор кој во случајот е наречен FIRS (fetal inflammatory response syndrome) – фетален воспалителен одговор, кој се карактеризира со покачена температура, тахикардија, хипервентилација и леукоцитоза. Меѓу родилките со предвремено прснати мембрани, овој фетален инфламаторен одговор е аосциран со отпочнување на предремено породување, без оглед на инфламаторната состојба на амниотската течност (35,114).

#### 1.4. Инфламацијата како причина за терминско породување

Се смета дека и терминското породување е резултат на воспалителен процес, односно дека созревањето на цервиксот е директно поврзано со локален инфламаторен процес. Спонтаното породување во термин е асоцирано со инфилтрирање на инфламаторни клетки во цервиксот, миометриумот, хориоамниотските мембрани, и амниотската шуплина, и зголемена продукција на проинфламаторни цитокини (IL-1, IL6, TNF-alpha, IL-8) (110,114) и хемокини, а последователно и зголемена синтеза на азотен оксид (110). Со најновите молекуларни методи научниците успеале да демонстрираат дека гени инволвирани во контролирањето на инфламацијата се поекспримираани во хориоамниотските мембрани по отпочнувањето на терминските породилни болки, дури и во отсуство на хистолошки хориоамнионитис, но не е забележано присуство на маркери на воспаление во мајчината циркулација кај родилките со спонтани болки во термин (Daskalkis et al, 2023). Ова сугерира дека при терминското раѓање, воспалителниот процес е локализиран само на мембраните и тоа само преку поврзаноста со зголеменото присуство на про-инфламаторен цитокински и хемокински одговор, додека дефицитот на азотен оксид е директно поврзан со бремености кои го поминуваат терминот и кај кои не настанува соодветно зреење на цервиксот (114).

Интересно е да се напомене дека во најновите експериментални истражувања се докажува улогата на самиот фетус во отпочнувањето на терминското породување кај глумците. Имено, резултатите укажуваат на тоа дека: (1) интраамниотска администрација на сурфактант протеин кај глумци резултира со породување, (2) третман со анти сурфактант протеин антитела резултира со пролонгирана гестација, (3) концентрацијата на сурфактант протеинот во амниотската течност расте од седумнаесеттиот ден посткоитум до термин, (4) макрофаги на амниотската течност мигрираат кон матката со порастот на сурфактант протеинот во амниотската течност. Авторите сугерираат дека продукцијата на сурфактант протеинот од страна на феталните бели дробови околу терминот за раѓање предизвикува активација/миграција на фетални макрофаги кон матката на мајката каде зголемувањето на нивото на IL-1 $\beta$  води до породување (111,114).

## 2. Мотив и Цели

*Мотивот* за изработка на овој труд произлегува од интересот да се утврди како одредени генитални инфекции влијаат на патолошките состојби во бременоста, односно на појавата на предвремени болки и предвремено породување. Ова е од особена важност кога станува збор за гениталните микоплазми и нивниот специфичен метаболизам и производство на метаболити, кои како интрацелуларни паразити меѓу другото имаат инхерентна карактеристика на хидролизира на уреата, чест матоболит од природните процеси на деградација на протеините во келтката. Трудите кои се работени во ова поле на истражување а кои се однесуваат на причините за предвременото породување, го наведуваат азотниот оксид како еден од факторите за појава на овој проблем. Оттука потекнува мотивот на овој труд-да се бара потенцијалниот биохемиски механизам со кој горенаведените патогени може непосредно да влијаат врз појавата на предвремени болки и предвремено породување.

*Целта* на овој труд е:

Да се потврди или исклучи хипотезата дека вагиналните инфекции -особено интрацелуларните - преку стимулирање на локалната синтеза на азотниот оксид, како и поради нарушување на системските биохемиски патишта, влијаат врз појавата на предвремено прскање на мембрани и предвремено породување.

Притоа се испита:

- Корелацијата на одредени инфективни агенси со појавата на предвремено прскање на мембрани и предвремено породување;
- Корелација на одредени инфективни агенси со локалното ниво на азотен оксид;
- Прогностичката вредност на достапните биохемиски и молекуларни параметри за текот на инфламаторната состојба која резултира со предвремено породување.

### **3. Материјал и методи:**

Ова е ретроспективно-проспективна студија составена од два дела.

1. Првиот дел е ретроспективна анализа на податоци од 973 пациентки собирани во периодот од 2014 до 2018 година, преземени од датотеката на Лабораторијата за ХПВ и молекуларна дијагностика при Универзитетската клиника за гиенкологија и акушерство, и нивна статистичка обработка.

2. Вториот дел е проспективна експериментална анализа извршена на материјали земани од 98 пациентки, собирани од периодот од Јуни 2015 до Јули 2018. Пациентките од основната група (65 пациентки) беа хоспитализирани на одделот за патолошка бременост со предвременни болки и ризик од предвремено породување во старост на бременоста од 24 до 34 гестациска седмица. Групата на здрави контроли беше составена од 35 пациентки дојдени на клиниката за редовна контрола на бременоста.

Собирањето на материјалите се одвиваше со запазување на стандардите на Медицинскоетичката Комисија при Медицинскиот факултет во Скопје, и тоа само по добивање на информирана согласност од секоја пациентка засебно, со запазување на анонимноста и заштитата на правата на субјектите во клиничките истражувања.

- Првата група на испитанички која ја нарековме Основна група се состои од 65 пациентки хоспитализирани со предвременни болки и ризик од предвремено породување.
- Контролната група се состои од 33 пациентки со здрава бременост без ризици, без пропратни хронични заболувања и без ризик за иминетно породување, во соодветна гестациска возраст, кои беа дојдени на Клиниката за редовни иследувања во бременоста.
- Кај сите испитанички беше анализиран цервикален раствор за детекција на локално присуство на метаболити на азотен оксид во вагината со користење на спектофотометриска анализа на реакцијата по Griess, како и напоредно одредување на еден од маркерите на инфламаторниот одговор, Ц-рекативниот протеин од серум (CRP).

- **Методи:**

Пред било која друга интервенција во вагината во тек на 20 секунди беше пласирано Дакрон стапче (Pur-Wraps, East Grinstead, UK), кое по истекот на тие 20 секунди беше промиено во 1,5 мл физиолошки раствор во тек на две минути. Потоа примероците се чуваа замрзнати на  $-21^{\circ}\text{C}$  (на Институтот за Судска медицина) до спроведување на анализата за спектрофотометриска детекција на нитрат/нитрит (метаболитите на азотниот оксид) со користење на Griess реакцијата со користење на кит (Griess Reagent Kit, for nitrite quantitation на ThermoFisher Scientific) во Лабораторијата за спектофотометриски анализи на Институтот за Физика при Природно Математичкиот Факултет во Скопје. Беа користени само примероците со видливо чист физиолошки раствор поради тоа што е докажано дека присуството на крв во примерокот резултира со намалени нивоа на метаболити на азотниот оксид (115).

Потоа беше земен вагинален брис за дијагностичка PCR анализа со комерицјален кит PANEL (Seegene STI panel 7) за детекција на *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealiticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisserria gonorrhoeae* – тестови кои веќе ги имаше на клиниката а кои поради временската рамка на употребливост мора да бидат искористени во најскоро време. PCR анализата се спроведе во лабораторијата за ХПВ и молекуларна дијагностика при клиниката.

Кај пациентките беа испитувани и лаб-биохемиските параметри на воспаление-крвна слика со периферија, како и вредностите на Ц-рекативен протеин од серум кои се спроведуваат како редовна лаб дијагностика кај овие пациентки. Притоа беа користени добиените резултати од стандардните анализи кај пациентките, без да се зема серум надвор од стандардниот болнички протокол кај овие пациентки.

Контролната група вклучува 30 здрави пациентки со бременост (од 24 до 36 гестациска седмица), без прорпатни хронични заболувања и без иминентно предвремено породување.



#### **4. Критериуми за вклучување во студијата**

##### **4.1. Инклузиони критериуми:**

- Жени со предвремена појава на болки, со или без интактни мембрани на прием и со предвремено породување со гестациска возраст на плодот од 24 до 36 г.с.
- Жени со предвремена појава на болки без предремено прскање на мембраните кај кои е одложено породувањето.
- Жени со негативен наод за ХПВ.

##### **4.2. Ексклузиони критериуми:**

- Жени со прееклампсија и други гестози како причина за предвременно породување;
- Жени кај кои е индицирано предремено породување поради аномалии на плодот;
- Жени со предвремни болки поради претрпена траума.

## **5. Етички аспекти**

Студијата беше изведувана согласно начелата на Хелсиншката Декларација од 1989 година.

За сите жени кои беа вклучени во студијата претходно беше обезбедена информирана согласност по целосно и разбирливо објаснување на сите аспекти на студијата.

## **6. Статистичка обработка на податоците**

Анализата на податоците се изврши со статистичките програми Excel и SPSS 22.0 за Windows. Притоа беа користени дескриптивни статистики, табели на честота, вкрстени табели на честота, Пирсонов Хи-квадрат тест и Фишеров егзастен тест за тестирање на хипотези за независност на статистички обележја, како и обопштени линеарни модели за моделирање на веројатност од одредена појава како линеарна функција од други статистички обележја.

## 7. Резултати

### 7.1 Резултати од ретроспективната студија

Во анализите од ретроспективната студија вклучени се 973 пациентки во репродуктивна возраст.

Во Табела 7.1.1 и График 7.1.1 е дадена распределбата на појава на инфекции (ПАНЕЛ). Позитивен панел значи дека постои некоја инфекција. Се забележува дека во повеќе од една третина од пациентките (38.6%) забележано е присуство на барем еден патоген.

**Табела 7.1.1: Присуство на инфекција**

<b>ПАНЕЛ</b>		
	<i>Честота</i>	<i>Процент</i>
<i>негативен</i>	597	61.4 %
<i>позитивен</i>	376	38.6 %
<i>Вкупно</i>	973	100.0 %

**График 7.1.1** приказ на појавата на инфекции



Во Табела 7.1.2 дадена е процентуалната застапеност на поединечните типови на инфекции. Процентот се однесува на сите испитаници во групата кај кои се појавува дадениот тип на инфекција. Да напоменеме дека кај одреден број на пациентки се јавуваат и повеќе типови на инфекции. Може да се забележи дека кај 31% од пациентите се појавува инфекција со *Ureaplasma spp.*

**Табела 7.1.2: Распределба на типовите на инфекции**

Наод на панел	негативен	U.U./U.P.	M.H./M.G.	C.T.	T.V.	N.G.
Процент од испитаници	61.40%	31.10%	11.30%	4.90%	1.20%	0.20%

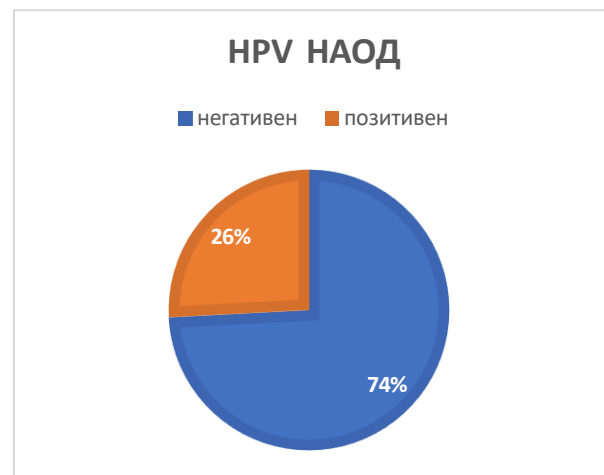
### 7.1.1 Инфекции и ХПВ наод

Кај 693 од групата од 973 пациентки направен е и тест за ХПВ наод и добиени се резултатите прикажани во Табела 7.1.3 и График 7.1.2

Табела 7.1.3: ХПВ наод

ХПВ Наод		
	Честота	Процент
негативен	514	74%
позитивен	179	26%
Вкупно	693	100%

График 7.1.2 Процентуална застапеност на ХПВ позитивни

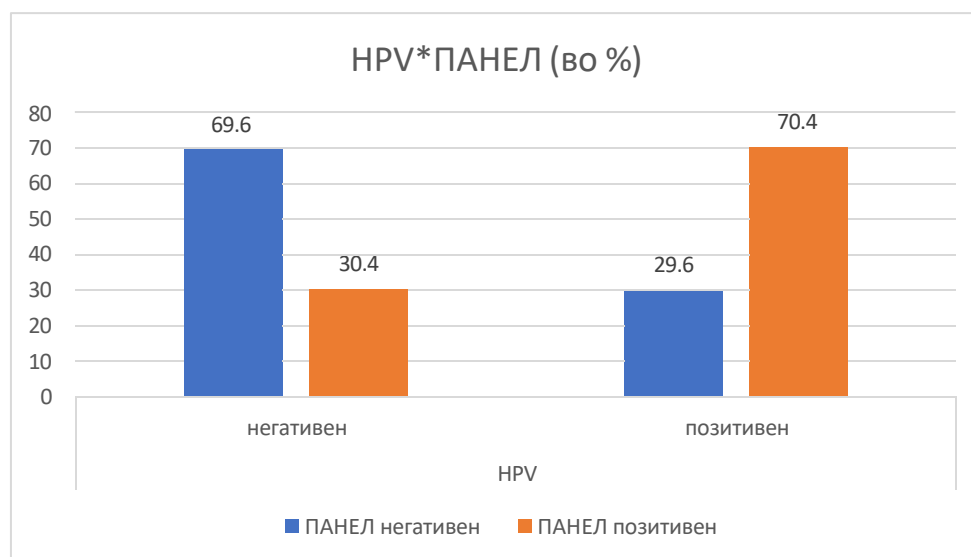


Со цел да ја провериме статистичката зависност на појавите на инфекции и присуството на ХПВ направен е вкрстена табела (Табела 7.1.3) за ХПВ наод и појава на инфекции (ПАНЕЛ) и Пирсонов хи квадрат тест.

7.1.3 Вкрстени табели ХПВ и ПАНЕЛ

		ПАНЕЛ		Вкупно	
		негатив.	позитивен		
ХПВ	негативен	Број	358	156	514
		% во ХПВ	69.6%	30.4%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	87.1%	55.3%	74.2%
		% од Вкупно	51.7%	22.5%	74.2%
	позитивен	Број	53 <sub>a</sub>	126 <sub>b</sub>	179
		% во ХПВ	29.6%	70.4%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	12.9%	44.7%	25.8%
		% од Вкупно	7.6%	18.2%	25.8%
Вкупно	Број	411	282	693	
	% во ХПВ	59.3%	40.7%	100.0%	
	% во ПАНЕЛ	100.0%	100.0%	100.0%	
	% од Вкупно	59.3%	40.7%	100.0%	

График 7.1.2 Приказ ан присуство на Панел инфекции кај ХПВ позитивни



Од График 7.1.2 може да се забележи дека инфекциите се многу почести кај пациентките кои имаат позитивен ХПВ наод. Притоа и Пирсоновиот хи-квадрат тест покажа постоење на висока статистичка зависност помеѓу присуството на ХПВ и појавата на инфекции. Хи-квадрат статистиката изнесува 88.199 со 1 с.с. и р-вердност  $<10^{-3}$ .

Понатаму е направена вкрстена табела (Табела 7.1.4) за присуството на ХПВ и типот на инфекции. Во секоја позиција на табелата даден е вкупниот број на пациентки кај кои се јавува одреден тип на инфекции за секој наод на ХПВ. Броевите во секоја редица не се исклучителни, односно кај еден дел од пациентките се јавуваат инфекции од повеќе од еден тип.

**7.1.4 Вкрстени табели ХПВ и тип на инфекција ( кај некои испитаници има и повеќе типови на инфекција)**

			Тип на инфекција					Вкупно	
			негативен	U.U./U.P.	M.H./M.G.	C.T.	T.V.		N.G.
ХПВ	Негативен	Број	358	132	36	13	5	1	514
		% во ХПВ	69.6%	25.7%	7.0%	2.5%	1.0%	0.2%	
		% во Панел	87.1%	56.7%	45.0%	33.3%	83.3%	100.0%	
		% од Вкупно	51.7%	19.0%	5.2%	1.9%	0.7%	0.1%	74.2%
	Позитивен	Број	53	101	44	26	1	0	179
		% во ХПВ	29.6%	56.4%	24.6%	14.5%	0.6%	0.0%	
		% во Панел	12.9%	43.3%	55.0%	66.7%	16.7%	0.0%	
		% од Вкупно	7.6%	14.6%	6.3%	3.8%	0.1%	0.0%	25.8%
Вкупно		Број	411	233	80	39	6	1	693

*Докторска дисертација*

	<i>% од Вкупно</i>	<i>59.3%</i>	<i>33.6%</i>	<i>11.5%</i>	<i>5.6%</i>	<i>0.9%</i>	<i>0.1%</i>	<i>100.0%</i>
--	------------------------	--------------	--------------	--------------	-------------	-------------	-------------	---------------

Од табелата може да се види дека најзастапени се инфекциите од типот U.U./U.P. и притоа процентот на пациентки со инфекции од типот U.U./U.P., како и тие од типот M.H./M.G. е над два пати поголем кај пациентките кои имаат позитивен ХПВ наод во однос на тие кои имаат негативен наод.



**7.1.2 Анализа на инфекции по возрастни групи**

Понатаму се пристапи кон испитување на распределбата на инфекциите по возрастни групи. Резултатите се дадени во Табела 7.1.5. Добиено е дека постои висока статистичка зависност на појавата на инфекција и возрастната група. Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 25.026 со 3 с.с. и е статистички значајна со ниво на значајност  $p < 10^{-3}$ .

**Табела 7.1.5. Возрастна група\*ПАНЕЛ кростабулација**

			ПАНЕЛ		Вкупно
			Негативен	Позитивен	
Возрасна група	<=20	Број	9	20	29
		% во Возрасната група	31.0%	69.0%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	1.5%	5.4%	3.0%
		% од Вкупно	0.9%	2.1%	3.0%
	(20-30)	Број	217	173	390
		% во Ворасната група	55.6%	44.4%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	36.7%	46.8%	40.5%
		% од Вкупно	22.6%	18.0%	40.5%
	(30-40)	Број	239	116	355
		% во Возрасната група	67.3%	32.7%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	40.4%	31.4%	36.9%
		% од Вкупно	24.8%	12.1%	36.9%
	40+	Број	127	61	188
		% во Возрасната група	67.6%	32.4%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	21.5%	16.5%	19.5%
		% од Вкупно	13.2%	6.3%	19.5%

*Докторска дисертација*

<i>Вкупно</i>	<i>Број</i>	<i>592</i>	<i>370</i>	<i>962</i>
	<i>% во Возрасната група</i>	<i>61.5%</i>	<i>38.5%</i>	<i>100.0%</i>
	<i>% во ПАНЕЛ</i>	<i>100.0%</i>	<i>100.0%</i>	<i>100.0%</i>
	<i>% од Вкупно</i>	<i>61.5%</i>	<i>38.5%</i>	<i>100.0%</i>

Во Табела 7.1.6 дадена е распределбата на типовите на инфекции по возрасни групи.

**Табела 7.1.6 Вкрстена табела Возрасна Група \*ПАНЕЛ**

			Инфекции по групи на причинители <sup>a</sup>						Вкупно
			негативен	U.U./U.P.	M.H./M.G.	C.T.	T.V.	N.G.	
Возрасна. Група	<=20	Број	9	17	11	6	3	0	29
		% во Возрасна група	31.0%	58.6%	37.9%	20.7%	10.3%	0.0%	
		% во ПАНЕЛ	1.5%	5.7%	10.3%	12.8%	33.3%	0.0%	
		% од Вкупно	0.9%	1.8%	1.1%	0.6%	0.3%	0.0%	3.0%
	(20-30)	Број	217	138	40	31	0	0	390
		% во Воз.група	55.6%	35.4%	10.3%	7.9%	0.0%	0.0%	
		% во ПАНЕЛ	36.7%	46.2%	37.4%	66.0%	0.0%	0.0%	
		% од Вкупно	22.6%	14.3%	4.2%	3.2%	0.0%	0.0%	40.5%
	(30-40)	Број	239	93	33	8	4	2	355
		% во Возрасна група	67.3%	26.2%	9.3%	2.3%	1.1%	0.6%	
		% во ПАНЕЛ	40.4%	31.1%	30.8%	17.0%	44.4%	100.0%	
		% од Вкупно	24.8%	9.7%	3.4%	0.8%	0.4%	0.2%	36.9%
>40	Број	127	51	23	2	2	0	188	
	% во Возрасна група	67.6%	27.1%	12.2%	1.1%	1.1%	0.0%		
	% во ПАНЕЛ	21.5%	17.1%	21.5%	4.3%	22.2%	0.0%		

*Докторска дисертација*

	<i>% од Вкупно</i>	<i>13.2%</i>	<i>5.3%</i>	<i>2.4%</i>	<i>0.2%</i>	<i>0.2%</i>	<i>0.0%</i>	<i>19.5%</i>
<i>Вкупно</i>	<i>Број</i>	<i>592</i>	<i>299</i>	<i>107</i>	<i>47</i>	<i>9</i>	<i>2</i>	<i>962</i>
	<i>% од Вкупно</i>	<i>61.5%</i>	<i>31.1%</i>	<i>11.1%</i>	<i>4.9%</i>	<i>0.9%</i>	<i>0.2%</i>	<i>100.0%</i>

Може да се забележи дека кај помладите испитаници почеста е појавата на инфекции. Иако групата со помлади од 20 години е релативно мала, сепак многу почести се инфекциите во рамки на оваа група. Ова може да се должи на зголеменото иследување кај помладата група на пациентки поради присуство на тегоби, додека кај останатите пациентки има и голем број на редовни контроли, во кои се вклучени и асимптоматски пациентки без инфекти.

## 7.2. Резултати од проспективната студија

Во проспективната студија беа вклучени 98 пациентки поделени во две групи, основна група која се состоеше од 65 пациентки хоспитализирани со предвремени болки и ризик од предвремено породување и Контролната група која се состоеше од 33 пациентки со здрава бременост без ризици, без пропратни хронични заболувања и без ризик за иминетно породување, во соодветна гестациска возраст, кои беа дојдени на Клиниката за редовни иследувања во бременоста.

### 7.2.1 Анализи на инфекциите кај испитуваните групи

Во почетокот ја анализиравме распределбата на инфекциите во испитуваните групи. Во табела 7.2.1 е дадена прваленцата на инфекции во основната и контролната група. Може да се забележи дека појавата на инфекции е значително поголема во основната група (73,8%) отколку во контролната група (27.3%). Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 19.511 со 1 с.с. и  $p$ -вредност  $< 10^{-3}$  што укажува на висока статистичка зависност.

**Табела 7.2.1 Вкрстена табела Група \* ПАНЕЛ**

			ПАНЕЛ		Вкупно
			негативен	позитивен	
Група	Основна	Број	17	48	65
		% во Група	26.2%	73.8%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	41.5%	84.2%	66.3%
	Контролна	Број	24	9	33
		% во Група	72.7%	27.3%	100.0%
		% во ПАНЕЛ	58.5%	15.8%	33.7%
Вкупно		Број	41	57	98

	% во Група	41.8%	58.2%	100.0%
	% во ПАНЕЛ	100.0%	100.0%	100.0%

Понатаму е испитана застапеноста на различните типови на инфекции во испитуваните групи. Истата е прикажана во Табела 7.2.2. Да напоменеме дека кај некои пациенти се застапени и повеќе типови на инфекции.

**Табела 7.2.2 Вкрстена табела Група \*Тип на инфекции**

			Тип на инфекции					Вкупно	
			Негативен	U.U,U.P.	M.H.,M.G.	C.T.	T.V.		
Група	Основна	Број	17	46	16	3	5	65	
		% во Група	26.2%	70.8%	24.6%	4.6%	10.4%		
		% во инфекции	41.5%	83.6%	100.0%	75.0%	100.0%		
	Контролна	Број	24	9	0	1	0		33
		% во Група	72.7%	27.3%	0.0%	3.0%	0.0%		
		% во инфекции	58.5%	16.4%	0.0%	25.0%	0.0%		
Вкупно		Број	41	55	16	4	5	98	

\*Процентите се базирани на бројот на испитаниците

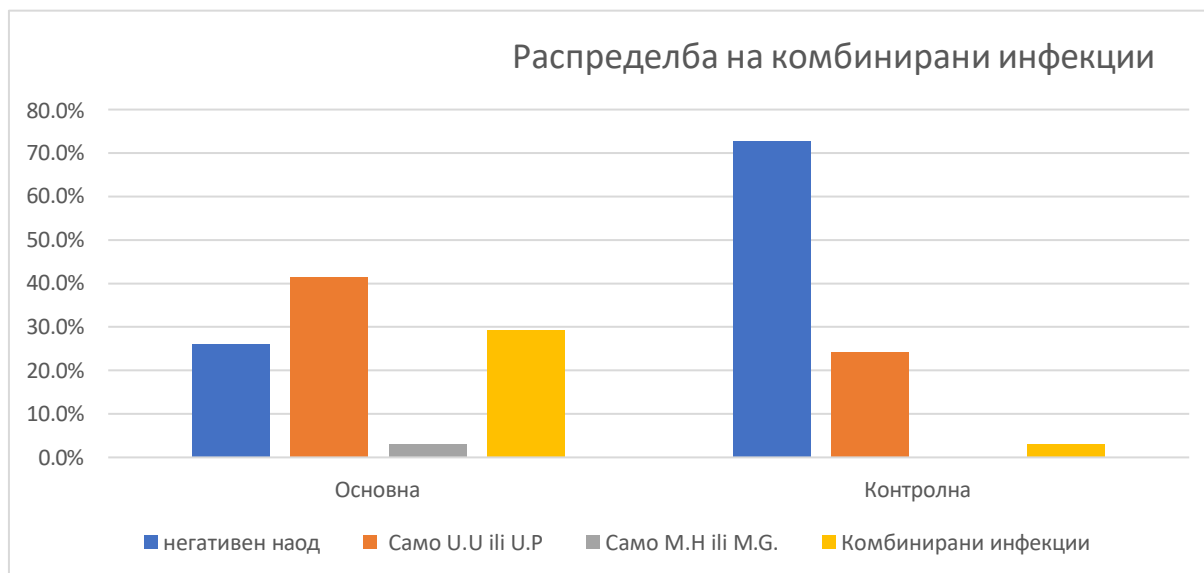
Може да се забележи дека најзастапени се инфекциите од типот U.U.,U.P.. Инфекциите од овој тип се застапени во 70.8% од испитаниците од основната група.

Од табелата исто така се гледа дека кај голем број на испитаниците има појава на комбинирани инфекции. Затоа направена е и распределба на комбинирани инфекции и истата е прикажана во Табела 7.2.3. и График 7.2. Може да се забелжи дека инциденцата и преваленцата на комбинирани инфекции е поголема кај пациентките во основната група.

**Табела 7.2.3. Застапеност на комбинирани инфекции во двете групи**

			негативен наод	само U.U или U.P	само M.H или M.G.	Комбинирани инфекции	Вкупно
Група	Основна	Број	17	27	2	19	65
		% во група	26.2%	41.5%	3.1%	29.2%	100.0%
	Контролна	Број	24	8	0	1	33
		% во група	72.7%	24.2%	0.0%	3.0%	100.0%
Вкупно		Број	41	35	2	20	98
		% од вкупно	41.8%	35.7%	2.0%	20.4%	100.0%

**График 7.2.1. Приказ на распределбата на комбинирани инфекции**



Да напомниме дека инфекциите од типот С.Т. и Т.У. се јавуваат само во комбинација со инфекциите од типот U.U.,U.P. или типот M.H.,M.G..

### 7.2.2 Појава на азотен оксид и предвремени породувања

**Табела 7.2.4. Вкрстена табела Група \* Наод за азотен оксид**

			Наод за азотен оксид (раствор Griess)			Вкупно
			негативен	позитивен	крвав раствор	
Група	Основна	Број	32	31	2	65
		% во Група	49.2%	47.7%	3.1%	100.0%
	Контролна	Број	33	0	0	33
		% во Група	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Вкупно		Број	65	31	2	98
		% од вкупно	66.3%	31.6%	2.0%	100.0%

Од Табела 7.2.4 се гледа дека азотниот оксид е присутен само кај пациентите од основната група и тоа дури 47.7% имаат позитиван наод.

Од друга страна и предвремените породувања се појавуваат само во основната група, а нивната фреквенција е дадена во Табела 7.2.5.

**Табела 7.2.5 Предврмено породени**

Породена		
Исход	Честота	Процент
не	24	36.9 %
да	41	63.1 %
Вкупно	65	100.0



### 7.3 Анализи на азотиот оксид и инфекциите во контекст на предвременото породување

Со оглед на тоа што азотниот оксид се појавува само во основната група, како и предвремените породувања, во натамошните анализи работиме само со основната група.

Понатаму ја анализираме поврзаноста на фактот дека пациентката се породила со останатите испитувани параметри. За статистичките тестови е користено ниво на значајност од 0.05.

Направените анализи покажаа дека од сите испитувани параметри единствено статистичка зависност постои меѓу предвременото породување и типот на инфекција и предвременото породување и присуството на азотниот оксид. Во анализите кои вклучуваат азотен оксид, исклучени се пациентките кај кои е добиен крвав раствор, така што за анализите групата изнесува 63 испитанички.

Во следниот чекор се направени Хи-квадрат тестови за испитување на зависноста на појавата од предвременно породување и појавата на инфекции и појавата на азотен оксид.

Во поглед на општата појава на инфекции и предвременото породување (Табела 7.3.1) добиено е дека не постои статистички значајна зависност. Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 2.536 со 1 с.с. и р-вредност од 0.111, додека р-вредноста на егзактниот Фишеров тест изнесува 0.147.

**Табела 7.3.1 Предвременно породување и присуство на инфекции**

			Инфекции		Вкупно
			негативен наод	позитивен наод	
Породена	не	Честота	9	15	24
		%	37.5%	62.5%	100.0%
	да	Честота	8	33	41
		%	19.5%	80.5%	100.0%
Вкупно		Честота	17	48	65

*Докторска дисертација*

%	26.2%	73.8%	100.0%
---	-------	-------	--------

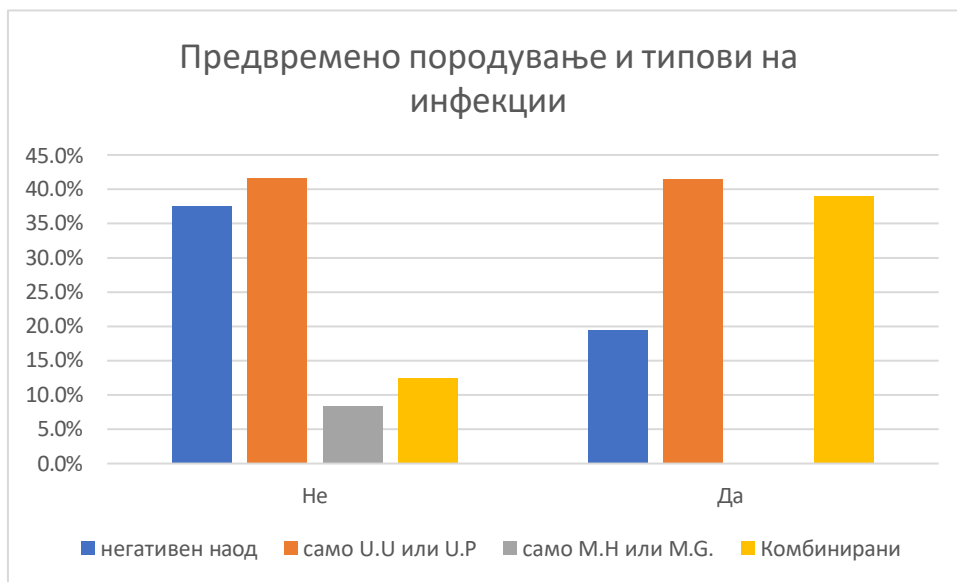
Понатаму се пристапи кон испитување на зависноста на појавата од предвремено породување и типот на инфекции.

### 7.3.2 Предвремено породување и типови на инфекции

			негативен наод	само U.U или U.P	само M.H или M.G.	Комбинирани	Вкупно
Породена	Не	Честота	9	10	2	3	24
		———— %	37.5%	41.7%	8.3%	12.5%	100.0%
	Да	Честота	8	17	0	16	41
		———— %	19.5%	41.5%	0.0%	39.0%	100.0%
Вкупно		Честота	17	27	2	19	65
		———— %	26.2%	41.5%	3.1%	29.2%	100.0%

И покрај тоа што Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 8.933 со 3 с.с. и е статистички значајна со  $p$ -вредност од 0.030, затоа што има 2 ќелии во табелата во кои очекуваниот број на испитаници под претпоставка за статистичка независност е помал од 5, не можеме да тврдиме дека постои статистичка зависност на предвременото породување и типот на инфекции. Можеме да кажеме дека процентот на инфекции од типот само U.U., U.P и комбинирани инфекции кај групата породени е многу висок, 41.5% и 39.0% соодветно.

**График 7.3.1** Приказ на соодносот меѓу типот на инфекција и предвременото породување.



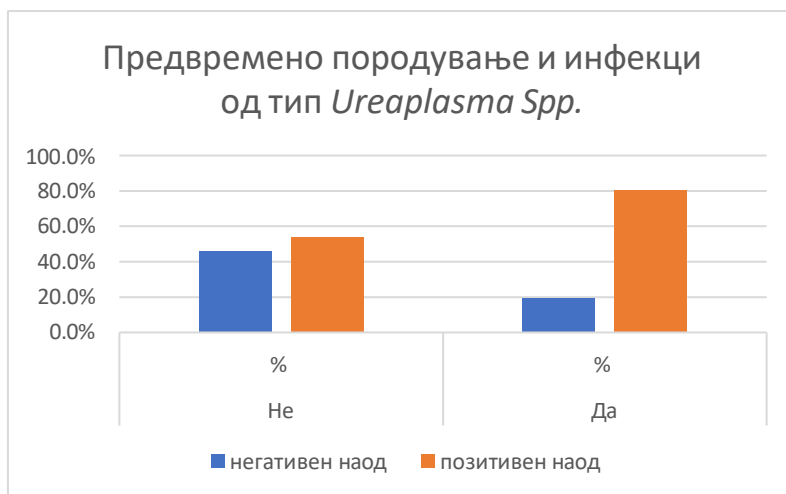
Со оглед на големата застапеност на инфекциите од типот *Ureaplasma Spp.* и комбинираните инфекции кај групата од предвременно породени, направени се дополнителни тестови за да се види дали инфекциите од типот *Ureaplasma Spp.* и комбинираните инфекции имаат статистичка зависност со појавата на предвременно породување.

**Табела 7.3.3.** Предвременно породување и инфекции од тип *Ureaplasma Spp.*

			U.U. или U.P.		Вкупно
			негативен наод	позитивен наод	
Породена	Не	Честота	11	13	24
		%	45.8%	54.2%	100.0%
	Да	Честота	8	33	41
		%	19.5%	80.5%	100.0%

Вкупно	Честота	19	46	65
	%	29.2%	70.8%	100.0%

**График 7.3.3** Приказ на поврзаноста на предвремено породување и присуството на инфекции од типот на *Ureaplasma Spp.*



Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 5.070 со 1 с.с. и р-вредност од 0.024, додека р-вредноста на Фишеровиот егзактен тест изнесува 0.046. Овој тест покажува постоење на статистички значајна зависност помеѓу предвременото породување и постоењето на инфекции од типот *Ureaplasma Spp.*

Исто така статистички значајна зависност покажа и појавата на комбинирани инфекции и предвременото породување. Но, треба да се има во предвид дека во комбинираните инфекции присутни се и инфекции од типот *Ureaplasma Spp.*

**Табела 7.3.4. Предвременно породување и комбинирани инфекции**

			Комбинирани инфекции		Вкупно
			нема	има	
Породена	Не	Честота	21	3	24
		%	87.5%	12.5%	100.0%
	Да	Честота	24	17	41
		%	58.5%	41.5%	100.0%
Вкупно		Честота	45	20	65
		%	69.2%	30.8%	100.0%

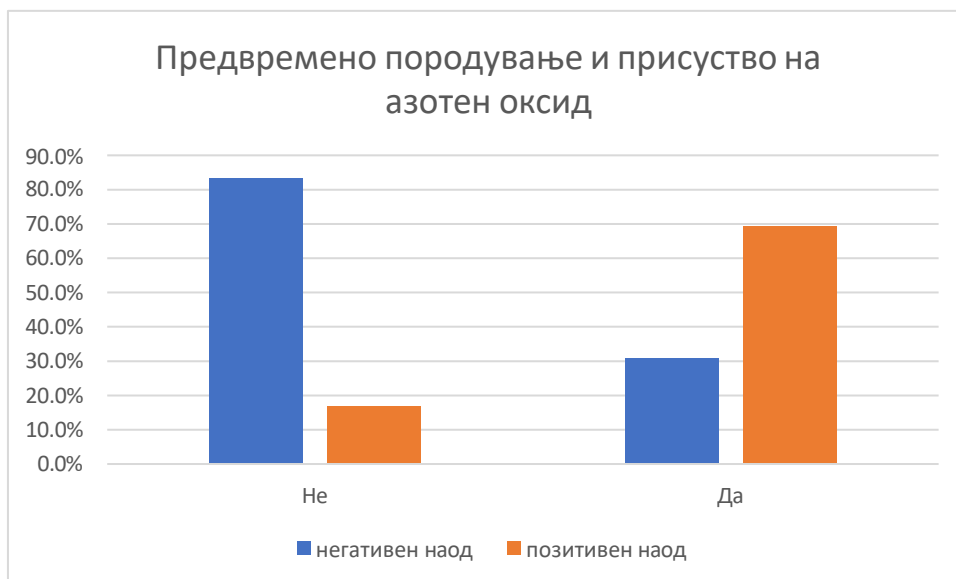
Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 5.962 со 1 с.с. и р-вредност од 0.015, додека р-вредноста на Фишеровиот егзактен тест изнесува 0.024.

За испитување на статистичката зависност на предвременото породување и присуството на азотен оксид, испитаничките со крвав раствор (2 испитанички) се исклучени од анализата, и групата изнесува 63 испитанички.

**Табела 7.3.5. Предвременно породување и присуство на азотен оксид**

			Наод за азотен оксид (раствор Greiss)		Вкупно
			негативен наод	позитивен наод	
Породена	Не	Честота	20	4	24
		%	83.3%	16.7%	100.0%
	Да	Честота	12	27	39
		%	30.8%	69.2%	100.0%
Вкупно		Честота	32	31	63
		%	50.8%	49.2%	100.0%

**График 7.3.5.** Приказ на соодносот на предвременото породување и присуството на азотниот оксид



Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 16.424 со 1 с.с. и р-вредност помала од  $10^{-3}$ . Исто така р-вредноста на Фишеровиот егзактен тест е помала од  $10^{-3}$ . Ова укажува на висока статистичка зависност на појавата на предвременно породување во присуството на азотниот оксид.

Со оглед на тоа дека присуството на азотен оксид и инфекциите се статистички значајни показатели за предвременно породување, ја испитавме статистичката зависност меѓу овие два параметри. Притоа ги добивме следните резултати.

**Табела 7.2.9. Азотен оксид и инфекции**

			Видови на инфекции				Вкупно
			негативен наод	Само U.U или U.P	Само M.H. или M.G.	Комбинирани	
раствор griess	негативен наод	Честота %	9 28.1%	15 46.9%	2 6.3%	6 18.8%	32 100.0%
	позитивен наод	Честота %	8 25.8%	10 32.3%	0 0.0%	13 41.9%	31 100.0%
Вкупно		Честота %	17 27.0%	25 39.7%	2 3.2%	19 30.2%	63 100.0%

Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 5.623 со 3 с.с. и р-вредност од 0.131 што покажува дека нема статистички значајна зависност.

Со оглед на тоа дека постоеше статистички значајна зависност помеѓу предвременото породување и инфекциите од тип *Ureaplasma Spp.* и комбинираните



инфекции проверивме дали постои статистичка зависност помеѓу овие параметри и присуството на азотен оксид.

По однос на инфекциите од типот U.U или U.P. добивме дека не постои статистички значајна зависност. Имено, Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 0.549 со 1 с.с. и р-вредност од 0.459, додека р-вредноста на Фишеровиот егзактен тест изнесува 0.585.

**Табела 7.2.10. Азотен оксид и инфекции од тип U.U или U.P.**

			U.U, U.P.		Вкупно
			нема	има	
Азотен оксид	негативен наод	Честота	11	21	32
		%	34.4%	65.6%	100.0%
	позитивен наод	Честота	8	23	31
		%	25.8%	74.2%	100.0%
Вкупно		Честота	19	44	63
		%	30.2%	69.8%	100.0%

По однос на постоењето на комбинирани инфекции добивме дека постои гранична статистичка зависност.

**Табела 7.2.11. Азотен оксид и присуство на комбинирани инфекции**

			Комбинирани инфекции		Вкупно
			нема	има	
Азотен оксид	негативен наод	Честота %	26 81.3%	6 18.8%	32 100.0%
	позитивен наод	Честота %	18 58.1%	13 41.9%	31 100.0%
Вкупно		Честота %	44 69.8%	19 30.2%	63 100.0%

Пирсоновата Хи-квадрат статистика изнесува 4.019 со 1 с.с. и р-вредност од 0.045, додека р-вредноста на Фишеровиот егзактен тест изнесува 0.058.

На крајот, за да го определиме степенот на влијанието на параметрите кои покажаа статистичка зависност со појавата на предвремено породување направени се неколку обопштени линеарни модели со појавата на породување како зависна бинарна променлива и logit функцијата како линк функција.

Променливата од интерес е предвременото породување,  $Y$ . Ако  $\pi = E(Y)$ , е веројатноста од предвремено породување, а  $X_1, \dots, X_m$  се предиктори, моделот е

$$\text{logit}(\pi) = \log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_m x_m$$

Ако предикторите се категориски претставуваат фактори, а доколку се нумерички мерења се нарекуваат коваријанти.

Во моделите кои ги проверувавме како фактори се користеа појавата на азотен оксид, присуството на инфекции од тип U.U.,U.P. како и присуството на комбинирани инфекции. Гестациската седмица беше коваријантата.

За избор на најсоодветен модел се користеа неколку критериуми и тестови, за кои генерално, помали вредности на статистиките укажуваат на подобро совпаѓање на моделот со податоците, (освен Loglikelihood статистиката, каде вредности поблиски до 0 покажуваат подобро совпаѓање).

За моделот кој ги вклучуваше сите наведени фактори и коваријантата се добија следните статистики

**Табели 7.2.12**

**Тестирање на ефектите на моделот**

Source	Type III		
	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	2.364	1	0.124
Азотен оксид	12.093	1	<b>0.001</b>
U.U ili U.P.	1.808	1	0.179
Комбинирани инфекции	0.926	1	0.336
Гестациска седмица	2.87	1	0.09

Зависна променлива:Породена

Модел: Константа, Азотен оксид, U.U.,U.P., Комбинирани инфекции, Гестациска седмица

**Тестови за совпаѓање на моделот**

	Value	df	Value/df
Deviance	27.174	29	0.937
Pearson Chi-Square	33.783	29	1.165
Log Likelihood <sup>b</sup>	-19.955		
Akaike's Information Criterion (AIC)	49.911		
Bayesian Information Criterion (BIC)	60.626		

Со оглед на тоа дека коефициентот пред факторот комбинирани инфекции има најмала значајност ( $p=0.336$ ), комбинираниите инфекции се исклучени од моделот. Новиот модел даде подобри резултати за совпаѓање. Резултатите се дадени во **Табелите 7.2.13**.

Табели 7.2.13. Тестирање на моделот

Тестирање на ефектите на моделот

Source	Type III		
	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Константа)	2.584	1	0.108
Азотен оксид	13.42	1	0.000
U.U.,U.P.	3.387	1	0.066
Гестациска седмица	2.931	1	0.087

Зависна променлива:Породена

Модел: Константа, Азотен оксид, U.U.,U.P.,Гестациска седмица

Тестови за совпаѓање на моделот

	Value	df	Value/df
Deviance	22.025	24	0.918
Pearson Chi-Square	23.488	24	0.979
Log Likelihood <sup>b</sup>	-17.861		
Log Likelihood <sup>b</sup>	-17.861		
Akaike's Information Criterion (AIC)	43.722		
Bayesian Information Criterion (BIC)	52.294		

На крајот, моделот кој го избравме има подобро совпаѓање од останатите модели (Табели 7.2.14) и ги вклучува како предиктори само азотниот оксид и инфекциите од тип U.U.,U.P.

**Табела 7.2.14** Тестирање на моделите за ефикасност и совпаѓање

**Тестирање на ефектите на моделот**

Source	Type III		
	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Константа)	1.801	1	0.18
Азотен оксид	13.315	1	0.000
U.U.,U.P.	3.804	1	0.051

Зависна променлива: Породена

Модел: Константа, Азотен оксид, U.U.,U.P.

**Тестови за совпаѓање на моделот**

	Value	df	Value/df
Deviance	2.489	1	2.489
Pearson Chi-Square	2.325	1	2.325
Log Likelihood <sup>b</sup>	-6.318		
Akaike's Information Criterion (AIC)	18.635		
Bayesian Information Criterion (BIC)	25.065		

Во табела 7.2.15 дадени се оценетите коефициенти на избраниот модел.

**Табела 7.2.15** Оценки на параметрите на моделот

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test			Exp(B)	95% Wald Confidence Interval for Exp(B)	
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.		Lower	Upper
(Intercept)	-1.457	0.6462	-2.724	-0.191	5.087	1	0.024	0.233	0.066	0.826
[AO=1]	2.505	0.6864	1.159	3.85	13.315	1	0	12.241	3.188	47.003
[AO=0]	0 <sup>a</sup>							1		
[PU=1]	1.347	0.6907	-0.007	2.701	3.804	1	0.051	3.847	0.993	14.894
[PU=0]	0 <sup>a</sup>							1		

(Scale)	1 <sup>b</sup>									
---------	----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Зависна променлива: Породена

Модел: (Константа), АО=Азотен оксид, PU=U.U.,U.P.

- a. Поставен на 0 затоа што параметарот е редувантентен
- b. Фиксиран на прикажаната вредност.

Според тоа веројатноста од предвремено породување ( $\pi$ ) можеме да ја претставиме со

$$\text{logit}(\pi) = \log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = 1.475 + 2.505 \cdot (AO) + 1.347 \cdot (U.U., U.P.)$$

Да напоменеме дека колоната  $\text{Exp}(B)$ , ја определува статистиката OR (odds ratio).

Според тоа, можеме да кажеме дека присуството на азотниот оксид за 12 пати ги зголемува шансите за предвремено породување, додека присуството на *Ureaplasma spp.* инфекциите за помалку од 4 пати го зголемува ризикот за предвремено породување.

## 8. Дискусија:

Луѓето се по природа сексуални суштества и грижата за сексуалното здравје треба да има за цел подобрување и збогатување на животот и меѓусебните врски, што вклучува и поддршка на фертилитетот, како и заштита од сексуално преносливи инфекции. Репродуктивното здравје само за себе имплицира дека луѓето имаат можност да се впуштат во задоволителен но одговорен сексуален живот како и можност да се има здраво потомство.

Многу фактори влијаат врз репродуктивното здравје, особено врз ризикот од предвремено породување и инфертилитетот. Како што е напоменато и во воведот, голем број од несаканите ефекти поврзани со раѓањето како настан, во одредена мера се непосредно поврзани со ефектите на воспалителниот одговор. Студиите покажале дека мајчините инфекции се асоцирани со развој на церебрална парализа, интравентрикуларна хеморагија, како и оштетување на белата маса еднакво кај новородените родени со ниска родилна тежина и оние со нормална родилна тежина. Хориоамниотисиот пак е асоциран со предтермиско раѓање, неонатална сепса, неонатален респираторен дистрес синдром, интра-вентрикуларна хеморагија, раѓање со царски рез, како и покомплициран постпородилен период кај мајката (35,116). Се покажало и дека гениталните микоплазми, особено *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*, се најчестите изолати од амниотската течност или хориоамниотот кај родилките со превременото породување (115). Тие се исто така и најчестите микроорганизми изолирани од респираторниот тракт на предтеминските новородени кои развиле хронична пулмонална бронходисплазија. Микоплазмите најчесто предизвикуваат болест, не со директен ефект врз ткивата, туку со моделирање на имуниот одговор на домаќинот. Се знае дека зголемените нивоа на проинфламаторни медијатори во амниотската течност се асоцирани со неонатални и мајчини компликации. Уште во далечната 1993 год, Станкомбе и соработниците покажале дека *U. urealyticum* се способни да стимулираат производство на IL-6 и IL-8 од пулмонарните фибробласти и се смета дека ова игра централна улога во развојот на хроничната пулмонална болест кај новороденчињата (117). Исто така е докажано дека *U. urealyticum* произведува акутен воспалителен одговор и муринска пнеумонија кај муринскиот модел, и дека хипоксијата го засилува овој одговор (Stankombe, 1993). Бројни студии покажале дека гениталните микоплазми се интимно поврзани со макрофагите во зоните на инфламација. Притоа,

два инфламаторни медијатори синтетизирани од макрофагите, TNF- $\alpha$  и NO, се особено важни во регулирањето на инфламацијата, уништувањето на микроорганизмите како и ткивното оштетување (95, 109) што значи дека играат важна улога во појавата на предтермиско раѓање. Се покажало дека ваков ефект имаат и вијабилните и невијабилните генитални микоплазми (46).

Целта на овој труд беше да покаже потенцијална врска меѓу присуството на интрацелуларни патогени на ниво на цервикост и нивната поврзаност со азотниот оксид во контекстот на ризикот од предвремено породување. Како што напоменавме во воведот, уште од откривањето на азотниот оксид како релаксирачка молекула која ја синтетизира ендотелот, голем број на истражувања покажуваат дека оваа молекула игра многу важна улога во плејада на физиолошки и патофизиолошки процеси, меѓу кои различни вазорегулаторни процеси, инфламаторни одговори, како и цервикалното зреење и терминското и предтерминското породување.

Централните хомеостатски молекули на биологијата на гореспоменатиот азотен оксид, се нитритите и нитратите, кои воедно играат важна улога како сигнализирачки молекули (118,119). Нитритите и нитратите во крвта веќе долго време се користат како индексот за активност на ендотелната NO синтетаза (120,121) како рутинска индиректна мерка на нивоата на азотниот оксид во крвта. Токму преку нив се врши детекцијата на присуството на азотен оксид во испитуваниот примерок, со што индиректно може да се востанови неговата улога во пато- физиолошкиот механизам кој се бара.

Сите три форми на азотен оксид синтетаза (nNOS, iNOS, eNOS) се присутни во хумениот цервикс. Невралната NOS е локализирана во стромата и епителните клетки (122,123), iNOS во епителните клетки и стромалните вретенасти клетки (125,126) и ендотелната NOS во васкуларниот ендотелиум (127,128). Постојат студии кои покажале дека концентрацијата на азотен оксид во вагиналниот секрет е покачена пред предвременото породување (125). Иако изворот на овој азотен оксид не е сè уште познат, за него може да се одговорни и инфламаторните клетки и клетките на самиот утерин цервикс. Ова претерано создавање на азотниот оксид може да учествува во цервикалното предвремено созревање, фрагилноста на мембраните и последователното предвремено породување (79,129,130). Во оваа студија, се обидовме да ги детектираме и прикажеме концентрациите на метаболити на азотен оксид, а со тоа индиректно на азотниот оксид присутен во вагиналниот секрет, преку примена на спектофотометрискиот метод на детекција на метаболитите на азотниот оксид во вагиналниот секрет со помош на реакцијата по Griess.



Еден од недостатоците на овој труд е што не извршивме паралелна детекција на метаболитите на азотниот оксид во плазмата, затоа што храна богата со нитрати (како црвено месо, многу зеленчуци, чаеви и вино) може да ги покачат нивоата на нитрити во крвта. И покрај овој недостаток, се покажало дека концентрациите на метаболитите на азотниот оксид во вагиналниот секрет се независни од концентрациите во плазмата (79). Исто така, поради тоа што руптурата на мембраните води до редукција на вагиналниот азотен оксид поради ефектот на плакнење (амниотската течност содржи многу мали детектибилни нивоа на азотен оксид метаболити), пациентките со предвремена руптура на мембраните беа исклучени од испитуваниот примерок на пациентки. Брисевите каде постоеше видливо присуство на крв исто така не беа испитувани, поради тоа што хемоглобинот се врзува за азотниот оксид и создава комплекс на нитрозилхемоглобин со што се намалуваат нивота на метаболити на азотен оксид во примерокот.

Сепак, продукцијата на азотен оксид е неопходна за одржување на бременоста. Исто така, студиите врз полиморфизми на генот за азотен оксид синтетазата покажале дека нивното присуство значи поголем ризик за развој на прееклампсија (131), што имплицира примарен дефицит на азотен оксид во овие состојби. Поради тоа, од студијата беа исклучени и жените кои како причина за појава на предвремени болки и раѓање имаа ЕПХ гестоза.

- **Достапни анализи**

За да ги тестираме хипотезите на овој труд, користевме ПАНЕЛ анализи кои се спроведуваат во Лабораторијата за ХПВ и молекуларна дијагностика при Клиниката за Гинекологија и акушерство во Скопје. Ова се ПЦР анализи на одреден сет на микроорганизми кои беа иследувани во овој труд. Исто така користевме и ПЦР анализи за присуството на ХПВ во примерок од цервикс.

За анализите на азотниот оксид, ја искористивме реакцијата по Griess за спектофотометриска анализа на метаболитите на Азотниот оксид во анализираниот цервикален секрет, што индиректно укажува на неговата локална синтеза. Овој метод е лесно репродуцибилен и е метод за кој е покажано дека не посоти корелација меѓу вредностите во плазма и серум (79). Истите истражувачи објавуваат дека присуството на Азотен оксид во сперма е 1-10% од цервикалниот флуид, така што и да имало присуство на сперма во испитуваниот цервикален флуид, тоа е незначително и не е конфоундирачки фактор во однос на анализа на вредностите на азотниот оксид во цервикалниот флуид.

Поради тоа што е познато дека цервиковагинаалните инфекции се најчесто придружени со ослободување на цитокини и простагландини кои може да ја стимулираат синтезата на азотниот оксид, (6), напоредно го анализиравме присуството на одредени локални инфективни агенси во контекст на синтезата на азотен оксид, како и корелацијата со системскиот инфламаторен одговор.

- **Ретроспективна анализа на присутни инфекции**

За да се оправда изработката на ваков труд, особено поради самофинансирачкиот аспект на трудот и експериманталните анализи, најпрво анализиравме колку се фреквентни одредени инфекции во нашата популација на пациентки кои доаѓаат на испитување во терциерна здравствена установа- Клиниката за гинекологија и акушерство во Скопје. Испитувавме напоредно присуство на интра и екстра-целуларни вагинални патогени во склоп на сексуално преносливи инфекции, како и присуство на ХПВ, затоа што се смета дека постои зависност меѓу овие два типа на инфекции- вирусната инфекција во корелација со бактериските и протозоални инфекции. Ретроспективната анализа покажа дека постои висока статистичка зависност меѓу присуството на инфективните агенси и одредени возрастни групи. Може да се забележи

дека меѓу помладите пациентки, инциденцата и преваленца на овие инфекции е повисока, согласно светските трендови, но исто така е конгруентна со сексуалните навики на оваа возрасна група. Недостигот на овој дел на анализата е тоа што помладите пациентки исто така и почесто се јавуваат на преглед поради присуство на симптоматски инфекции, додека во другите возрасни групи прегледите се повеќе последица на задолжителни контроли, без нужно присуство на симптоми. Така, кохортата на пациентки меѓу 20 и 30 години имаат релативно висока преваленција на инфекции, со 44% од нив позитивни на барем еден од испитуваните патогени.

Според објавените статистики на СЗО, во 2012 година имало 237 милиони нови случаи на сексуално преносливи инфекции на светско ниво, од кои најголемиот број на инфекции се случуваат кај млади адолесценти и жени во репродуктивна возраст. Од нив најзастапена е инфекцијата со *Chlamydia trachomatis*, додека на второ место по застапеност е инфекцијата со *Neisseria gonorrhoeae*.

Во тек на анализата на самите патогени при изработката на нашите истражувања, беше потврдено дека во популацијата на жени од репродуктивна возраст во С. Македонија, најпреваленти се инфекциите со *Ureaplasma Spp.* со застапеност од 31,1%, *Mycoplasma Spp.* со 11,3% додека *Chlamydia Trachomatis* е присутна само во 4,9% од случаите – со највисока преваленција во групата од 20-30 години – додека во светските трендови оваа е водечка инфекција кај жените во репродуктивна возраст (132). Полимикорбни инфекции беа утврдени во 7,3% од севкупната кохорта на пациентки.

Она што беше интересно да се забележи е дека се утврди висока статистичка зависност меѓу коинфекциите со ХПВ, при што постоеше висока предиктивна вредност со одредени патогени. Имено, кај 70% од пациентките со утврдена ХПВ инфекција, постеше присуство и на барем еден од другите испитувани патогени. Ова е особено важно во контекст на детекцијата на асоцијацијата помеѓу различни патофизиолошки механизми кои се исто така имплицирани во предвременото цервикално зреење и предвремените породувања.

Висок процент од предвремените породувања е поврзан со присуството на инфекции, било да се тоа клинички или субклинички. Но, истражувањата од областа до сега не го покажуваат директно начинот на кој инфекциите предизвикуваат предвременно породување. Затоа се смета дека предвремените породувања кои се должат на присуство на инфекции се случуваат во контекст на инфламаторниот одговор, не само во контекст

на присутниот инфективен агенс. Во повеќето случаи, спонтаното предврмено породување е синдром кој се должи на мултифакториелни инфламаторни механизми. Овие механизми водат до предврмено прскање на мембраните. Во овој контекст, инфламацијата може да се смета за вид на регулативен механизам со кој ткивата одговараат на стимулуси на повреда, со цел да се контролира и репарира потенцијалната настаната штета. Но, оваа инфламација во одредени случаи е асоцирана со предвременото породување поради тоа што претераниот имун одговор резултира со зголемена продукција на инфламаторни цитокини, еластази, матрикс металопротеази, азотен оксид и индуцира функционално повлекување на прогестеронот кој е витален хормон за одржување на бременоста (35). Тоа би значело дека во бременоста инфламаторниот одговор може да се смета за теоретски модел во кој инфицираната шуплина го евакуира секој продукт кој го става здравјето на мајката во ризик, за репродуктивниот капацитет да може да биде зачуван за во иднина.

- **Влијанието на азотниот оксид**

Како што напоменавме претходно, породувањето е во суштина инфламаторен процес. Промената од инактивна во про-инфламаторна средина го сигнализира отпочнувањето на процесот на раѓање, што се карактеризира со три етапи: утерина контрактибилност, цервикално зреење и активација и прскање на мембраните. Утериниот цервикс има централна улога во физиологијата на бременоста и на самото раѓање. Тој треба да е доволно цврст за да се одржи бременоста, но исто така мора да има капацитет да омекне соодветно за да може да настапи раѓањето. Созревањето на цервиксот е активно контролирано и покажува карактеристики слични на оние кои се случуваат при инфламацијата, во контекст на прераспределувањето на колагените влакна во цервиксот (132,133). Тоа значи дека улога во созревањето на цервиксот имаат промените на локалните нивоа на цитокини, простагландини и металопротеази, како и други биорегулатори кои имаат улога во инфламацијата и во метаболизмот на колагенот (133,134). Овие фактори пак, од друга страна играат директна улога во регулацијата на синтезата и ослободувањето на азотниот оксид. Анималните студии покажуваат дека азотниот оксид е важен фактор на цервикалното зреење (135,136).

Исто така, продукцијата на азотен оксид е есенцијална за одржување на бременоста, при што азотниот оксид ја регулира митотската делба (136,137), додека плаценталната перфузија е исто така делумно регулирана од страна на азотниот оксид (137). При терминското раѓање, ослободувањето на окситоциноот стимулира синтеза на Азотен оксид на ниво на феталните мембрани (138).

Студиите кај животни покажуваат дека цервикалното зреење индуцирано од азотниот оксид (6) и ослободувањето на азотниот оксид е зголемено за време на породувањето (79,136). Се знае дека азотниот оксид е сличен како тумор некротичниот фактор алфа во капацитетот да иницира и да стомира апоптоза, зависно од други варијабли кои учествуваат во биохемиските процеси. Според тоа, азотниот оксид е и апоптоичен и антиапоптоичен фактор, кој не само што може да влијае на реорганизација на цервикалниот колген (6), туку може да работи согласно со локалните простагландини при што индуцира локална вазодилатација и зголемување на васкуларната пермеабилност и леукоцитна инфилтрација (90).

Концентрацијата на метаболити на азотен оксид во вагиналниот секрет е покажано дека е зголемена кај жените непосредно пред предвременото раѓање (137), при што се смета дека претераната продукција на азотен оксид може да е директно инволвирана во цервикалното зреење, фрагилност на мембраните и последователно предвременно породување (79).

Анализата на цервикалниот секрет кај пациентките хоспитализирани на Клиниката за Гинекологија и акушерство во периодот на изработка на овој труд, покажа дека локалната синтеза на азотниот оксид е директно поврзана со ризикот од предвременно породување (во тек на една седмица од земање на примерокот), како силен индикатор за постоењето на овој ризик.

Анализата покажа дека Ц-реактивниот протеин е независно асоциран со ризикот од предвременно породување, како и дека не постои статистички значајна поврзаност помеѓу зголемените нивоа на азотниот оксид локално на ниво на цервикот и Ц-реактивниот протеин во серумот.

- **Влијанието на инфекциите со *Mycoplasma Spp.*, *Ureaplasma Spp.* врз синтезата на азотниот оксид и последователно врз предвременото породување**

Бременоста е посебен период во кој доаѓа до честа изолација на генисланите микоплазми, кои ги вклучуваат *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*. Покажано е во повеќе наврати дека нивното присуство во амнионската течност е поврзано со несахан исход по однос на бременоста. Тоа се најчесто изолираните микороорганизми од плацентарните мембрани и амнионската течност како во хистолошки докажаниот, така и во клиничкиот хориоамнионитис (139).

Фреквенцијата на гениталните микоплазми зависи од социо-економскиот статус и од географската преципијација. Студиите покажуваат дека гениталните микоплазми може да ја исполнат амнионската шуплина и да перзистираат со месеци предизвикувајќи силен инфламаторен одговор, додека за нив сè уште се смета дека се комменсали на гениталниот тракт, со минимална вируленција. Во некои студии се покажало дека 47% и 30% соодветно од верификуваните случани на хориоамнионитис, *U. urealyticum* и *M. hominis*, се изолираните микроорганизми (142). Изолацијата на *U. parvum* во плацентарното ткиво на жените со акутен хориоамнионитис директно корелира со појавата на предвремени болки и предвременно породување (141). Кон ова треба да се додаде дека Катаока и соработниците откриле дека колонизација со *U. parvum*, но не со *U. urealyticum*, се асоцирани со доцен абортус или рано предвременно породување (143).

Како што напоменавме во воведот, иако серолошкото тесирање нема капацитет да утврди мината од акутна инфекција, методите на молекуларната детекција се супериорни по однос на дијагностичките методи базирани врз култури и овозможуваат зголемена специфичност и одредување на специесите и субтиповите (144). Улогата на патогеноста на *Ureaplasma Spp.* е сè уште контроверзна, затоа што се покажало дека колонизацијата со овие микроорганизми е честопати висока и при нормалните бремености и присуството на овие микроорганизми во плацентата не секогаш се асоцирани со инфламација и несакани исходи. Можни објаснувања вклучуваат период на детекција, време на колонизација, разлика во вируленција на различните видови и подвидови, интеракцијата со други микроорганизми и модулатори на инфламација, и конечно на супресија или засилување преку мајчиниот имун одговор (145).

Гениталните микоплазми се тесно поврзани со епителот, поради што се на некој начин ограничени на мукозните површини. Имуногеноста на молекулите на оваа

поврзаност овозможува нивна адхеренција на бројни типови на клетки како што се неутрофилите, еритроцитите и епителните клетки, со што може да тригерираат, поточно отпочнат, воспалителен одговор. Што е уште поважно, тие предизвикуваат директна активација на ситемот на комплемент C-1 (140). Кон тоа, локалниот цитотоксичен одговор е предизвикан од супстанциите кои овие микоплазми ги секретираат, амониум од микоплазмите, уреа од уреоплазмите, притоа влошувајќи го имуниот одговор (141).

Хипотезата на овој труд се потпираше на потенцијалната врска која може да постои меѓу присуството на одредени атипични патогени во цервиковагиналниот тракт кај жените и влијането на локалната синтеза на азотниот оксид. Тоа пред се се јаува како можност поради уникатните својства што одедени припадници на овие групи патогени ги имаат во метаболизмот на енергија. Имено, дел од микоплазмите метаболираат аргинин до орнитин, при што се продуцира амониум, но не користат глукоза. Додека од сите овие патогени, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* се најнеобични, поради тоа што за продукција на енергија хидролизираат уреа до јаглероден диоксид и амонијак. Ниту еден друг микорроганизам нема такви потреби. Што ги прави уште понеобични е тоа што растат само во кисела средина (рН 6,5 или пониско).

Во табелата преземана од Принципи и практикување на Инфективни болести од Мендел и соработници, од 2005, се прикажани овие карактеристики на метаболизмот на енергија кои овие патогени го имаат.

Слика 2. Сликата ја прикажува Табелата на страна 2281.

Species	Prevalence in Genital Tract of Healthy Persons	Substrate Utilization	Atmosphere for Isolation	pH for Growth	Growth from Specimens
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	++++	Urea	Indifferent	6.0-6.5	Rapid (2-4 days)
<i>Ureaplasma parvum</i>	++++	Urea	Indifferent	6.0-6.5	Rapid (2-4 days)
<i>Mycoplasma hominis</i>	+++	* Arginine	Indifferent	6.5-8.0	Rapid (2-5 days)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Unknown	Glucose	Aerobic	7.0-7.5	Very slow (30-60 days)
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+?	Glucose and arginine	Anaerobic	7.0-8.0	Slow (5-10 days)
<i>Mycoplasma penetrans</i>	Rare	Glucose and arginine	?	7.0-8.0?	?
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	Rare	Arginine	?	7.0-8.0?	?
<i>Mycoplasma primatum</i>	rare	Arginine	?	7.0-8.0?	?

Сепак, податоците добиени од спроведените анализи во овј труд, не ја потврдија поставената хипотеза. Имено, се покажа дека не постои статистичка зависност меѓу присуството на овие патогени и локалната синтеза на азотниот оксид и нивната реперкусија врз ризикот од предврмено породување.

Ова може да се должи и на малиот број на примероци, затоа што беше изведен на мал број на испитаници за кои математичкиот модел покажа дека се доволни да се покаже некаква статистичка зависност (поради самофинансирачкиот аспект на експерименталниот дел).

До сега не се објавени резултати од испитувања за врската меѓу присуството на овие патогени со локалната синтеза на азотниот оксид. Во литературата постојат иследувања кои укажуваат дека присуството на ХПВ влијае на локалната синтеза на азотниот оксид, но тоа не беше предмет на трудот. Целта беше да се утврди врската меѓу присуството на интрацелуларните атипични патогени од групите на микоплазми и уреаплазми, поради што беа користени само примероци од жени без претходна историја на ХПВ инфекција.

Сепак, по екстензивни статистички анализи, единствениот статистички модел кој покажа неква зависност со предвременото породување беше оној на припадниците на групата на Уреаплазми. Се покажа дека додека присуството на азотен оксид во примероците за 12 пати го зголемува ризикот од предвремено породување, присуството на Уреаплазми независно од азотниот оксид за 4 пати го зголемува овој ризик.

Со тоа можеме да заклучиме дека локалната синтеза на азотниот оксид не е еден од механизмите со кои овие патогени предизвикуваат предвремено породување.

- **Клинички импликации**

Како што сугерираат резултатите од областа укажуваат, така и овој труд покажа дека присуството на метаболити на азотен оксид во цервикалниот флуид може да биде користено како маркер за зрелоста на цервиксот на ниво на болниците. Клиничарите може да се потпрат и да имаат бенефит од одредувањето на овој маркер и во раните и во поодминатите стадиуми на бременоста, за одредување на потребите од одредени терапевтски модалитети при соодветна цервикална зрелост. Имено, при невијабилни рани бремености во кои нивото на азотен оксид во цервикалниот флуид е високо, може да се примени модел на чекање, зашто се смета дека 50% од жените кои прокрвареле ќе имаат спонтан абортус во следните две седмици (146). Спротивно на тоа, жените кои имаат незрел цервикс пост термин може да се третираат со донори на азотен оксид. Но, за сето ова се потребни дополнителни испитувања на ниво на клиниките.



Она што е од особен интерес е дека доколку се пристапи кон молекуларна детекција и утврдување на присуството на Уреаплазми во цервиксот во раната бременост, жените може да профитираат од антимикуробна терапија насочена кон овој патоген, и со тоа ќе се намали ризикот за предвремено породување(117). Имено, постојат безбедни модели на антибиотска терапија кои може да се применат кај овие жени, а се безбедни и за плодот. Сепак, и за ова треба да се спроведат дополнителни клинички истражувања, имајќи предвид рационално користење на антибиотици и превенција од резистенција кон истите.

Конечно, целта на секое истражување во овој домен е да се овозможи безбеден, достапен и прифатлив метод на регулирање на фертилитетот, овозможувајќи безбедна бременост и терминско породување. Ова спроведено истражување укажува дека уреаплазмите сами за себе имаат влијание врз ризикот за предвремено породување. Тие се подложни на ефикасен и безбеден антимикуробен третман, што може да овозможи на многу парови да го добијат своето долго очекувано и здраво потомство.

## 9. Заклучок:

Инфекциите како причина за предвремено породување се веќе добро етаблирани и спонтаното предтерминско породување е добро востановен синдром, кој може да биде предизвикан од бројни патолошки процеси кои водат до активација на заедничките фази поврзани со породувањето.

Ретроспективната анализа покажа дека:

1. Во повеќе од една третина (38,6%) од анализираните пациентки во ретроспективната анализа, постои присуство на барем еден патоген од ПАНЕЛ анализата. Од нив, кај 31% се забележа инфекција со *Ureaplasma spp.*
2. Се покажа висока статистичка зависност на присуството на некој од патогените испитувани со ПАНЕЛ анализата и напоредното присуство на ХПВ. Имено, инфекциите со патогени испитувани во ПАНЕЛ анализата се почести кај пациентки со напоредна инфекција со ХПВ.
3. Појавата на инфекции е почеста кај помладите пациентки, помлади од 20 години и од 20-30 годишна возраст.

Проспективаната анализа покажа дека:

4. Појавата на инфекции е значително поголема во основната група (73,8%) отколку во контролната група (27,3%), со висока статистичка зависност.
5. Најзастапени се инфекциите од типот U.U., U.P.. Инфекциите од овој тип се застапени во 70.8% од испитаниците од основната група, а исто така кај голем број на испитанички посоти присуство на комбинирани инфекции.
6. Присуство на азотен оксид беше детектирано само кај пациентките од основната група- пациентките со предвременни болки и ризик од предвремено породување- со позитивен наод кај 47,7% од испитаничките.
7. Процентот на инфекции од типот само U.U., U.P и комбинирани инфекции кај групата породени е многу висок, 41.5% и 39.0% соодветно.
8. Се покажа статистички значајна зависност помеѓу предвременото породување и постоењето на инфекции од типот *Ureaplasma Spp.*

9. Предвремената зголемена синтеза на азотниот оксид во вагината кај жените во бременоста за 12 пати ги зголемува шансите за предвремено породување, додека присуството на *Ureaplasma spp.* инфекциите за помалку од 4 пати го зголемува ризикот за предвремено породување, притоа С-реактивниот протеин не е фактор на корелација.
10. Не постои директна врска меѓу присуството на гениталните микоплазми-*Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*- и зголемената синтеза на азотниот оксид во вагината при појавата на предвремени болки и ризикот за развој на предвремено породување.

## 10. Библиографија:

1. Strelkauskas AJ, Davis IJ, Dray S. Longitudinal studies showing alterations in the levels and functional response of T and B lymphocytes in human pregnancy. *Clinical and Experimental Immunology* 1978; 32:531–539.
2. Gehrz RC, Christianson WR, Linner KM, Conroy MM, McCue SA, Balfour HH Jr. A longitudinal analysis of lymphocyte proliferative responses to mitogens and antigens during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1981; 104:665–670.
3. Leppert, PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995; 38, 267-279
4. Leppert, PC. Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178, 713-725
5. Leppert PC., Kokenyesi R., Klemenich CA. and Fisher J. Further evidence of a decorin-collagen interaction in the disruption of cervical collagen fibers during rat gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182, 805- 811
6. Maul, H., Longo, M., Saade, GR. and Garfield, RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 2003a; 9, 359-380
7. Cram LF, Zapata MI, Toy EC, Baker 3<sup>rd</sup> B. Genitourinary infections and their association with preterm labor. *Am Fam Physiscian* 2002; 65:241-8.
8. Alaa El-Dien MS Hosny, Waleed El-khayaat, Mona T. Kashef, Monhsen N. Fakhry. Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, Gram-negative bacilli, and coryneforms. *J Chinese medical association* 2017; 1-7
9. Al-Dabbagh SA, Al-tae WY. Risk factors for preterm births and low birth in Iraq: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2006; 6:13.
10. Saviz DA, Kaufman JS, dole N, siege-Riz AM, Thorp Jr JM, Kaczor DT. Poverty, education, race and pregnancy outcome. *Ethn Dis* 2004; 14:322-9.
11. Darwish A, Elnshar EM, Hamadeh SM, Makarem MH. Treatment options for bacterial vaginosis in patient at high risk of preterm labor and premature ruptures of membranes. *J Obstet Gynecol Res* 2007; 33:781-7.
12. Malaguti N, Babls LD, Uchimura NS, Giemens F, Consolaro MEL. Sensitive detection of thirteen bacterial vaginosis-associated agents using multiplex PCR. *Biomed research intern* 2015; 1-10.
13. Schwebeke JR. New concepts of the etiology of bacterial vaginosis. *Current Infectious disease Reports* , 2009; Vol 11:143-147.
14. JM Marrazzo. Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused? *Anaerobe*, 2011; Vol 17:186-190.
15. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, *et al.* Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low birthweight infant. *New England Journal of Medicine* 1995; 333:1737–1742.
16. Andrews WW, Goldenberg RL, Hauth JC. Preterm labor: emerging role of genital tract infections. *Infectious Agents and Disease* 1995; 4:196–221.
17. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, Gomez R, Romero R, Cassell GH. Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1995; 173:606–612.
18. Garite TJ. Premature rupture of the membranes. In: *Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice*. Editors: Creasy RK, Resnick R. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1994; pp. 625–638.
19. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1992; 166:1515–1528.
20. Fidel MG, Nelson HP, DeRouen T, Critchlow C, Eschenbach DA, Holmes KK. Independent associations of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* infection with adverse pregnancy outcome. *JAMA* 1986; 256:1899–1903.
21. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson RB Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid

- isolation of *Ureaplasma urealyticum*. *Prenatal Diagnosis* 1992; 12:111–117.
22. Kurki T, Sivonen A, Renkonen OV, Savia E, Ylikorkala O. Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology* 1992; 80:173–177.
  23. Korn AP, Bolan G, Padian N, Ohm-Smith M, Schachter J, Landers DV. Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis. *Obstetrics and Gynecology* 1995; 85:370–390.
  24. Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstetrics and gynecology* 2004, 104: 267-272.
  25. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infectious diseases*, 2011 (11) 10-15.
  26. Hey P. Bacterial vaginosis, *Mecicine* 2014; (42), 7:359-363
  27. Ravel J, Gajer P, Abdo Z et al. Vaginal microbiome of reproductive age women. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 2011; 108-1:856-864
  28. Peipert JF, R. B. Ness, J. Blume et al., Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2001 vol. 184, (5). 856–864.
  29. Haggerty CF, Hillier S, D. C. Bass, and R. B. Ness, Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis, *Clinical Infectious Diseases*, 2004 vol. 39 (7). 990–995.
  30. Klebanoff MA, S. L. Hillier, R. P. Nugent et al. Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2005 vol. 192: 2. 470–477.
  31. Ling Z, J. Kong, F. Liu et al., Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*. 2010 vol. 11, (1), article 488.
  32. Leitich H, Bodner-Adler B, M. Brunbauer, A. Kaider, C. Egarter, and P. Husslein, Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2003 vol. 189: (1) 139–147.
  33. Galinski r, Graeme P, Stuart H, Black J, Moss T. The consequences of chorioamnionitis: Preterm birth and effects on development. *J Pregnancy*, 2013; 2013:412831.
  34. Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2005;12(3):145–155.
  35. Daskalakis G, Psarris A, Koutras A, Fasoulakis Z, Prokopakis I, et al. Maternal infection and preterm birth: From Molecular basis to clinical implications. *Children*, 2023, 10(5), 907-11
  36. Ugwumadu AHN, Bacterial vaginosis in pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2002 vol. 14 (2). 115–118.
  37. Wadhwa P, Culhane J, Rauh V et al. Stress, infection and preterm birth: a biobehavioral perspective. *Pediatric and perinatal epid.* 2001 Vol.15, 17-29.
  38. Cohen CR, Cheng SC, S. Shiboski et al., Diaphragm used with Replens gel and risk of bacterial vaginosis: results from a randomized controlled trial. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012, Article ID 921519, 8 pages.
  39. Nugent R, Krohn MA, and S. L. Hillier. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991 vol. 29, (2) 297–301.
  40. Chawla R, Bhalla P, S. Chadha, S. Grover. Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *BioMed Research International*, 2013, Article ID 365194.
  41. Brotman RM and Ravel J. Ready or not: the molecular diagnosis of bacterial vaginosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2008 vol. 47, (1) pp. 44–46, 2008.
  42. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, K. C. Chen, D. Eschenbach, and K. K. Holmes. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The American Journal of Medicine*, 1983 vol. 74, (1) 14–22, 1983.

43. Gergova RT, Strateva TV, and I. G. Mitov. Gardnerella vaginalis-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2013 vol. 17(3). 313–318, 2013.
44. Cartwright CP, Lembke BD, K. Ramachandran et al., Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012 vol. 50, (7). 2321–2329.
45. Menard J-P, Fenollar F, M. Henry, F. Bretelle, and D. Raoult. Molecular quantification of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae loads to predict bacterial vaginosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2008 vol. 47, (1) 33–43.
46. Haggerty C-L, Totten PA, Ferris M et al., Clinical characteristics of bacterial vaginosis among women testing positive for fastidious bacteria. *Sexually Transmitted Infections*, 2009 vol. 85, (4). 242–248.
47. Fethers K, Twin J, C. K. Fairley et al., Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women, *PLoS ONE*, 2012 vol. 7, no. 2, Article ID e30633.
48. Srinivasan S, Hoffman NG, M. T. Morgan et al., “Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e37818.
49. Shipitsyna E, A. Roos, R. Datcu et al., Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age—sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS ONE*, 2013 vol. 8, no. 4, Article ID e60670.
50. Foxman B, A. Wen, U. Srinivasan et al., Mycoplasma, bacterial vaginosis-associated bacteria BVAB3, race, and risk of preterm birth in a high-risk cohort, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2014; vol 2010 (3): 226.e1–226.e7.
51. Livengood CH, Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2009 vol. 2, (1). 28–37.
52. Fredricks DN, Fiedler TL, and Marrazzo JL, Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine*, 2005 vol. 353, (18). 1899–1911, 2005.
53. Menard JP, Mauzoni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microb Infect Dis*, 2010;12:1547-52.
54. Menard JP, Mauzoni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Gamerre M, Bretelle F. High vaginal concentrations of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis in women with undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010; 115(1):134-40.
55. Lee s, Park K, Oh K, Jeong E, Kim S, Jung H. Non-invasive prediction of clinical infection in women with preterm labor: a model based on the ultrasound and laboratory parameters. *Ultras Obstet Gynecol* 2010; 36(1):168-305.
56. Ding H. The significance of fetal fibronectin in the early diagnosis for premature labor. *Ultras Obstet Gynecol* 2010; 36(1):168-305.
57. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases-6<sup>th</sup> edition. *Elsevier* 2005; 2280-2290.
58. Kim M, Seo K, Park Y. Serum markers for prediction of preterm delivery in threatened preterm labor. *Ultras Obstet Gynecol* 2010; 36(1):168-305.
59. Singh B, Goswami B, Gupta N, Bajaj AD, Mallika V. Potential Biochemical markers for preterm labor: a pilot study in North India. *Ind J Clin Biochem* 2011; 26(1): 41-45.
60. Waites B. Ken. Ureaplasma infection. *Emedicine, Medscape article* 231470, Sept. 2017.
61. Waites KB, Katz B, Schrelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005 Oct. 18(4):757-89.
62. Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG et al. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumoniae in rhesus macaques. *Reprod Sci*. 2009 16(1):56-70.
63. Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS. A fetal systemic inflammatory response

- is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 179:186–193
64. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Romero R. Spontaneous labor at term is characterized by a genomic signature of acute inflammation in the chorioamniotic membranes but not in the systemic circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(6):S138
  65. Furchtgott R, Zawadzki J The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.. *Nature*1980; 288(5789):373-6.
  66. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987. 84(21): 9265-9.crane
  67. Fleming I, Busse R NO: the primary EDRF.. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(1):5-14
  68. Alerton WK, Cooper CE, Knowls RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357:593-615.
  69. Moroz L, Kohn A. Parallel evolution of nitric oxide signaling: diversity of synthesis and memory pathways. *Front Biosci*, 2011; 16(6):2008-51.
  70. Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu Rev Biochem*. 2010; 79:445-470.
  71. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunology*. 2001; 2:907-916.
  72. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet oncol*. 2001; 2:149-156.
  73. Kolluru GK, Siamvalla J, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochemie*. 2010; 92: 1186-1198.
  74. Vasannen-Tommiska M, Nuutila M. Nitric oxide metabolites in cervical fluid during pregnancy: further evidence of the role of cervical nitric oxide in cervical ripening. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 88:779-785
  75. Moncada, S. and Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*,1993; 329, 2002-2012.,
  76. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005; 4, 471-479.)
  77. Johansson M, Lycke N. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infectious dis*. 2003; 16:43-49.
  78. Agarwald BB, Shishodia S. Inflammation and cancer:how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006; 72: 1605-1621.
  79. Vaisanen-Tommiska M, Nitric oxide in human uterine cervix: role in cervical ripening. *Doctoral dissertation, University of Helsinki*, 2006.
  80. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biolog Med*. 2008; 45: 18-31.
  81. Pollock JS, Fortsterman U, Mitchel JA. Purification and characterisation of particulate endothelium derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991: 8810480-10484.
  82. Xie QA, Cho HJ, Calaycay J, Mumoford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992; 256:225-228.
  83. Nuutila M. Cervical ripening with local prostaglandins during the second and third trimester of pregnancy: efficacy, safety and maternal experience. *Helsinki University Print* 1999; ISBN 952-91-1259, Helsinki.
  84. Spina V, Aleandri V, Pacchiarotti A, Salvi M. Immune tolerance in pregnancy. Maternal–fetal interactions. *Minerva Ginecologica*. 1998; 50:533–537.
  85. Sennström, M.B., Ekman, G., Westergren-Thorsson, G., Malmström, A., Byström, B., Endresen, U., Mlambo, N., Norman, M., Stabi, B. and Brauner, A. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod*, 2000; 6, 375-381.
  86. Sennström, M.B., Brauner, A., Byström, B., Malmström, A. and Ekman, G. Matrix metalloproteinase- 8 correlates with the cervical ripening process in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003; 82,904-911.

87. Denison, F.C., Riley, S.C., Elliott, C.L., Kelly, R.W., Calder, A.A. and Critchley, H.O. The effect of mifepristone administration on leukocyte populations, matrix metalloproteinases and inflammatory mediators in the first trimester cervix. *Mol Hum Reprod*, 2000; 6, 541-548.)
88. Maul, H., Longo, M., Saade, G.R. and Garfield, R.E. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des*, 2003a; 9, 359-380.
89. Chwalisz, K., Shao-Qing, S., Garfield, R.E. and Beier, H.M. Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. *Hum Reprod*, 1997; 12, 2093-2101.
90. Nakatsuka, M., Habara, T., Kamada, Y., Tada, K. and Kudo, T. Elevation of total nitrite and nitrate concentration in vaginal secretions as a predictor of premature delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 2000; 182, 644-645.
91. Leppert PC. Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 178, 713-725
92. Ding H. The significance of fetal fibronectin in the early diagnosis for premature labor. *Ultras Obstet Gynecol*. 2010; 36(1):168-305.
93. Romero R, Mazor M, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer DM. The preterm labor syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1994;734:414e29.
94. Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(5):1130e6.
95. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(5):1124e9.
96. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Callahan R, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161(3):817e24.
97. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8(1):3e13.
98. McDuffie Jr. RS, Sherman MP, Gibbs RS. Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in a rabbit model of bacterially induced preterm pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167(6):1583e8.
99. Fidel Jr. PL, Romero R, Wolf N, Cutright J, Ramirez M, Araneda H, et al. Systemic and local cytokine profiles in endotoxin-induced preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5 Pt 1):1467e75.
100. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1660e7.
101. Elovitz MA, Mrinalini C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15(10):479e87.
102. Fidel P, Ghezzi F, Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Cutright J, et al. The effect of antibiotic therapy on intrauterine infection-induced preterm parturition in rabbits. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;14(1):57e64.
103. Hassan S, Romero R, Hendler I, Gomez R, Khalek N, Espinoza J, et al. A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intra-amniotic infection. *J Perinat Med* 2006;34(1):13e9.
104. Romero R, Quintero R, Oyarzun E, Wu YK, Sabo V, Mazor M, et al. Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(3):661e6.
105. Peerayeh SN, Yazdi RS, Zeighami H. Association of Ureaplasma urealyticum infection with varicocele-related infertility. *J Inft Dev Ctries*. 2008.2(2):116-19.
106. Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, Eschenbach DA. The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1992;79(3):351e7.
107. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response and pregnancy outcome in women with preterm prelabor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2010; 64(1): 35-57.



108. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNAs in culture-negative amniotic fluid from women in premature labor. *Am J Perinatol* 2004;21(6):319e23.
109. Steel JH, O'donoghue K, Kennea NL, Sullivan MH, Edwards AD. Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation. *Placenta* 2005;26(8e9):672e7.
110. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol* 2004;173(7):4286e96.
111. Elovitz MA, Wang Z, Chien EK, Rychlik DF, Phillippe M. A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4. *Am J Pathol* 2003;163(5):2103e11.
112. Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. and Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001 41, 203-236.
113. Farrell, A.J. and Blake, D.R. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis*, 1996; 55, 7-20
114. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000;164:5721e8.
115. Tomi S., Olavi Y. Increased Release of Cervical Nitric Oxide in Spontaneous Abortion before Clinical Symptoms: A Possible Mechanism for Preabortal Cervical Ripening. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(11):5622–5626
116. Grether JK, Nelson KB. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 1997; 278:207-211;
117. Crouse TD, English BK et al. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. *Pediatric research* 1998; 44:785-790;
118. Bryan NS.” Nitrite in nitrite oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review” *Free radic Bio Med* 2006; 41(5):691-701;
119. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:119-1206
120. Bryan NS, et al. “Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues.” *Nat Chem Biol* 2005;1(5):290-7;
121. Kleinbongard P, et al. “Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals” *Free radical biology and medicine* 2003; 35 (7): 790-796;
122. Lauer T, et al. “Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 98(22):12814-12819;
123. Tschuggel W et al. Human cervical ripening is associated with an increase in cervical inducible nitric oxide synthase expression. 1999 *Biol Reprod* , 60: 1367-1372
124. Yoshida M et al. Nitric oxide increases matrix metalloproteinase-1 production in humane uterine fibroblast cells. 2001 */mol Hum Reprod* 7: 979-985;
125. Biondi C et al. The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy. *Curr Pharm Des* 2005; 11:2075-2089;
126. Brune B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; 351:261-272;
127. McColgin SW et al. ParBionditional factors associated with membrane stripping *Am J Obstetr Gynecol*, 1993; 156: 138-144;
128. Kankaanranta H et al. Nitric oxide donating properties of mesoisonic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. *Br J Pharmacol* 1996; 117:401-406
129. Akbar F et al. Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*, 2005; 11: 73-77.
130. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2021. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services; April 2023.

131. Kim M, Seo K, Park Y. Serum markers for prediction of preterm delivery in threatened preterm labor. *Ultras Obstet Gynecol* 2010; 36(1):168-305.
132. Singh B, Goswami B, Gupta N, Bajaj AD, Mallika V. Potential Biochemical markers for preterm labor: a pilot study in North India. *Ind J Clin Biochem* 2011; 26(1): 41-45.
133. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005; 4, 471-479.)
134. Sennström, M.B., Ekman, G., Westergren-Thorsson, G., Malmström, A., Byström, B., Endresen, U., Mlambo, N., Norman, M., Stabi, B. and Brauner, A. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod*, 2001; 6, 375-381.
135. Sennström, M.B., Brauner, A., Byström, B., Malmström, A. and Ekman, G. Matrix metalloproteinase- 8 correlates with the cervical ripening process in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003; 82,904-911.
136. Denison, F.C., Riley, S.C., Elliott, C.L., Kelly, R.W., Calder, A.A. and Critchley, H.O. The effect of mifepristone administration on leukocyte populations, matrix metalloproteinases and inflammatory mediators in the first trimester cervix. *Mol Hum Reprod*, 2000; 6, 541-548.)
137. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41, 203-236.
138. Chwalisz, K., Shao-Qing, S., Garfield, R.E. and Beier, H.M. Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. *Hum Reprod*, 1997; 12, 2093-2101.
139. Yadufashije C., Umugwaneza J., Izere C., Munyeshyaka E., Habyarimana T. Study of chorioamnionitis among women with preterm birth at Ruhengeri referral hospital. *Afr. J. Biol. Sci.* 2019;1:32–39.
140. Aparicio D., Scheffer M.P., Marcos-Silva M., Vizarraga D., Sprankel L., Ratera M., Weber M.S., Seybert A., Torres-Puig S., Gonzalez-Gonzalez L., et al. Structure and mechanism of the Nap adhesion complex from the human pathogen *Mycoplasma genitalium*. *Nat. Commun.* 2020;11:2877.
141. Cox C., Saxena N., Watt A.P., Gannon C., McKenna J.P., Fairley D.J., Sweet D., Shields M.D., L Cosby S., Coyle P.V. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labor. *J. Matern. -Fetal Neonatal Med.* 2016;29:3646–3651.
142. Noda-Nicolau N.M., Tantengco O.A.G., Polettini J., Silva M.C., Bento G.F., Cursino G.C., Marconi C., Lamont R.F., Taylor B.D., Silva M.G., et al. Genital mycoplasmas and biomarkers of inflammation and their Association with spontaneous Preterm Birth and Preterm Prelabor rupture of membranes: A systematic review and Meta-analysis. *Front. Microbiol.* 2022;13:859732.
143. Kataoka S., Yamada T., Chou K., Nishida R., Morikawa M., Minami M., Yamada H., Sakuragi N., Minakami H. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:51–55. doi: 10.1128/JCM.44.1.51-55.
144. Ahmed J., Rawre J., Dhawan N., Khanna N., Dhawan B. *Mycoplasma hominis*: An under recognized pathogen. *Indian J. Med. Microbiol.* 2021;39:88–97.
145. Payne M.S., Ireland D.J., Watts R., Nathan E.A., Furfaro L.L., Kemp M.W., Keelan J.A., Newnham J.P. *Ureaplasma parvum* genotype, combined vaginal colonisation with *Candida albicans*, and spontaneous preterm birth in an Australian cohort of pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016;16:1–13.
146. Condous G, Okaro E, Bourne T. The conservative management of early pregnancy complications: a review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 22:420-430.

### **Информирана согласност:**

Јас сум Др. Јована Андоновска Буриловска, специјалист за заразни болести кој работи на Клиниката за гинекологија и акушерство во Скопје. Со оглед на Вашата ургентна состојба, која е патолошка и поради која сте дојдени за треман на Клиникава, сакаме да извршиме истражување за причините поради кои ви се случува оваа состојба. Со истражувањето кое вклучува примена на нови и брзи дијагностички методи, веруваме дека ќе добиеме одговори кои непосредно може да ви помогнат Вам и на вашето бебе, а секако ќе бидат од полза за останатите пациентки кои ќе се најдат во ваква неприлика.

Студијата ги истражува ефектите на вагиналните инфекции, биохемиските ефекти од истите и нивната поврзаност со предвременото породување во Р.Македонија. Во продолжение следуваат информации за тоа истражување и ве поканувам да се согласите да бидете дел од таа студија. Вашата согласност не мора да ја дадете веднаш, имено може да се консултирате со други мои колеги доколку тоа ви дава чувство на поголема сигурност во врска со оваа студија. Во објансувањето може да постојат зборови кои не ги разборате и ве молам да ме прашате за се што ве интересира, а јас ќе одвојам време да ви објаснам.

Целта на студијата е да се одреди во колкава мерка се поврзани инфекциите на вагината (кои не мора да бидат сексуално преносливи) со појавата на предвремените болки и предвременото породување. Исто така ќе се обидеме да ги дефинираме и најчестите микроорганизми причинители на оваа состојба преку користење на брзи молекуларни методи кои ќе се работат на оваа Клиника. Со тоа ќе се обидеме да дадеме најбрз одговор за евентуалните причини на Вашата состојба, со што лекарите гинеколози кои ве третираат ќе може да ви дадат и други соодветни лекови за да се одложи породувањето на вашето бебе колку што може подолго.

За студијата е потребно користење на оние информации кои вие редовно ги приложувате при приемот во болница, кои стојат запишани во Вашата историја, резултатите од лаб-биохемиските анализи. Единственото што е ново е да се согласите да ви биде земен вагинален брис од сидовите на вагината (брисот не се зема од подлабоко за никако да не интервенира во евентуалното отпочнато раѓање) кој потоа ќе биде анализиран во лабораториите на клиниката и ќе се даде одговор

**дали состојбата кај вас е предизвикана од некој микроорганизам кој може веднаш да се лекува.**

**Во студијата ќе бидат вклучени сите жени со предвремена појава на породилни болки, со или без прснат водењак, со навршени 24 г.с. на бременоста доколку бидат согласни за тоа. Учесството во студијата не ве изложува ниту вас ниту вашиот плод на никакви несакани ефекти.**

**Јас, \_\_\_\_\_ се чувствувам соодветно информирана за моето учеството во горенаведената студија.**

**Датум,**

**Своерачен потпис,**

## ФОРМУЛАР ЗА СОГЛАСНОСТ

Јас, \_\_\_\_\_ се чувствувам соодветно и добро информирана за студијата во која е понудено да учествувам.

Поради тоа ја давам својата согласност јас да бидам вклучена во студијата која ќе се спроведува на Клиниката за гинекологија и акушерство од страна на Др. Јована Андоновска Буриловска, а под надзор на раководителот на одделот за Патолошка бременост, Др. Адела Стефанија.

Датум,

\_\_\_\_\_

Своерачен потпис,

\_\_\_\_\_

До Етичката Комисија при

Скопје 21.02.2018

Медицинскиот Факултет

Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје

**Предмет: Согласност за изработка на докторска дисертација**

Стручниот колегиум на Универзитетската клиника за гинекологија и акушерство при Медицинскиот факултет во Скопје, се согласува Ас. М-р. Др. Јована Андоновска Буриловска, специјалист инфектолог вработен во оваа клиника, да ја изработи својата докторска дисертација со наслов „**Биохемиските ефекти на вагиналните инфекции и нивната асоцираност со предвременото породување**“.

Ви благодариме за усвојувањето на оваа согласност.

Со почит,

Во име на стручниот колегиум

Директор: Ас. Др. Викторија Јовановска