

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
NICOLAE TESTEMIȚANU**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 618.2:618.177-089.888.11(043.2)

DOBROVOLSKAIA Aliona

**PARTICULARITĂȚILE EVOLUȚIEI ȘI DE CONDUITĂ A SARCINII
OBȚINUTE PRIN METODA FERTILIZĂRII IN VITRO
LA FEMEILE PESTE 35 DE ANI**

321.15 - OBSTETRICĂ ȘI GINECOLOGIE

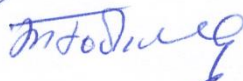
Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific:



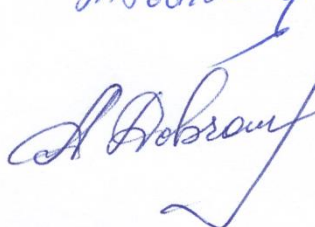
MOȘIN Veaceslav, doctor habilitat
în științe medicale, profesor universitar

Consultant științific:



TODIRAȘ Mihail, doctor habilitat în
științe medicale, conferențiar cercetător

Autorul



DOBROVOLSKAIA Aliona

CHIȘINĂU, 2024

©DOBROVOLSKAIA Aliona, 2024

CUPRINS

ADNOTARE.....	5
ANNOTATION.....	6
АННОТАЦИЯ.....	7
LISTA ABREVIERILOR.....	8
LISTA TABELELOR.....	11
LISTA FIGURILOR.....	13
LISTA ANEXELOR.....	14
INTRODUCERE.....	15
1. EVOLUȚIA ȘI MONITORINGUL SARCINII LA FEMEILE CU VÂRSTA DE PESTE 35 DE ANI ÎN CONCEPȚIA CONTEMPORANĂ.....	27
1.1. Particularitățile fertilității feminine după 35 de ani.....	27
1.2. Evoluția sarcinii la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani și impactul antecedentelor extragenitale, ginecologice și obstetricale în geneza complicațiilor în sarcină.....	34
1.3. Aspectele contemporane ale diagnosticului prenatal în sarcinile concepute prin metoda FIV, la gestantele peste 35 de ani.....	41
1.4. Rolul citokinelor în răspunsul imun la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani.....	45
1.5. Profilul stresului oxidativ în evoluția sarcinii concepută prin metoda FIV.....	50
1.6. Concluzii la Capitolul 1.....	57
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	58
2.1. Proiectarea cercetării și designul studiului.....	58
2.2. Termeni, criterii și metode de cercetare.....	63
2.3. Metodele clinico-paraclinice aplicate în cercetare.....	64
2.4. Metoda prelucrării statistice a rezultatelor.....	69
2.5. Concluzii la Capitolul 2.....	70
3. PARTICULARITĂȚILE ANAMNESTICO-CLINICE ALE SARCINII LA FEMEILE CU VÂRSTA DE PESTE 35 DE ANI INCLUSE ÎN STUDIU.....	71
3.1. Aspectele clinico-anamnesticale ale gestantelor din cercetare.....	71
3.2. Caracteristica antecedentelor extragenitale, ginecologice și obstetricale la etapa includerii în studiu a gestantelor cu sarcina concepută prin metoda FIV.....	73
3.3. Concluzii la Capitolul 3.....	78
4. EVOLUȚIA CLINICĂ A SARCINII CONCEPTE PRIN METODA FIV LA FEMEILE CU VÂRSTA PESTE 35 DE ANI.....	80
4.1. Particularitățile evoluției sarcinii concepute prin metoda FIV la gravidele cu vârsta peste 35 de ani.....	80
4.2. Complicațiile în sarcinile concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârsta peste 35 de ani și corelarea cu variația biomarkerilor.....	83
4.3. Concluzii la Capitolul 4.....	104

5. EVALUAREA PROFILULUI IMUN ȘI MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV ÎN SARCINILE CONCEPUTE PRIN METODA FIV.....	106
5.1. Citokinele și markerii imuni în sarcinile concepute prin metoda FIV la femeile cu vârsta peste 35 de ani.....	106
5.2. Determinarea statusului oxidant și antioxidant în sângele gestantelor peste 35 de ani cu sarcinile concepute prin metoda FIV.....	111
5.3. Markerii oxidanți și antioxidanți determinați în lichidul amniotic la gestantele cu vârsta peste 35 de ani în sarcinile concepute prin metoda FIV.....	116
5.4. Concluzii la Capitolul 5.....	122
SINTEZA REZULTATELOR OBTINUTE.....	124
CONCLUZII GENERALE.....	138
RECOMANDĂRI PRACTICE.....	139
BIBLIOGRAFIA.....	140
ANEXE.....	157
Anexa 1. Chestionarul privind datele anamnestice prezentate de femeile gravide la etapa includerii în studio.....	157
Anexa 2. Metodologia de realizare a investigațiilor de laborator în cercetare.....	159
Anexa 3. Baza de date a parametrilor biomarkerilor determinați în cercetare.....	170
Anexa 4. Algoritmul de triaj al gestantelor cu vârsta peste 35 de ani, sarcină concepută prin metoda FIV, pentru riscul complicațiilor prin HTAg, preeclampsia și nașterea.....	176
Anexa 5. Certificat de inovator Nr. 6079.....	177
Anexa 6. Certificat de inovator Nr. 6080.....	178
Anexa 7. Actul de implementare Nr. 522.....	179
Anexa 8. Actul de implementare Nr. 109.....	180
Anexa 9. Actul de implementare Nr. 523.....	181
Anexa 10. Actul de implementare Nr. 110.....	182
Declarația privind asumarea răspunderii.....	183
CV-ul AUTORULUI.....	184

ADNOTARE

Dobrovolskaia Aliona

PARTICULARITĂȚI ALE EVOLUȚIEI ȘI DE CONDUITĂ A SARCINII OBTINUTE PRIN METODA FERTILIZĂRII IN VITRO LA FEMEILE PESTE 35 DE ANI

Teza de doctor în științe medicale, Chișinău, 2024

Structura tezei: Introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări; bibliografie – 163 surse. În total, teza conține 187 pagini text de bază, 29 tabele, 18 figuri, 10 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 10 lucrări științifice.

Cuvinte – cheie: vârsta reproductivă, infertilitate, fertilizare în vitro, FIV, diagnostic antenatal, citokine, interleukine, markeri ai stresului oxidativ.

Domeniul de studiu: Medicină.

Scopul cercetării: Identificarea particularităților clinice în evoluția sarcinilor concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârstă peste 35 de ani, corelate cu valorile biomarkerilor imuni și ai stresului oxidativ determinați în al doilea trimestru de sarcină din sângele matern și lichidul amniotic.

Obiectivele cercetării: Analiza evoluției clinice a sarcinilor concepute prin metoda FIV la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani; Interpretarea nivelului citokinelor determinate în sângele matern și lichidul amniotic, în trimestrul al doilea de sarcină; Analiza biomarkerilor stresului oxidativ prelevați din serul sanguin și lichidul amniotic, în al doilea trimestru, la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, sarcina concepută prin metoda FIV; Particularități ale evoluției sarcinilor concepute prin metoda FIV și corelarea lor cu variațiile biomarkerilor determinați în trimestrul al doilea de sarcină.

Noutatea și originalitatea științifică: Rolul statusului imun și al stresului oxidativ în mecanismele patogenetice de dezvoltare a complicațiilor prin hipertensiunea indusă de sarcină, preeclampsia și nașterea prematură, anticipând evoluția clinică în sarcinile obținute prin metoda FIV la femeile cu vârsta peste 35 de ani.

Principalele rezultate științifice obținute: Creșterea frecvenței stărilor hipertensive induse de sarcină, preeclampsiei și nașterilor premature sunt corelate cu dezechilibrul statusului imun și augmentarea stresului oxidativ determinați în serul sanguin și lichidul amniotic, în trimestrul al doilea de sarcină concepută prin metoda FIV la femeile cu vârsta peste 35 de ani. Evoluția sarcinilor concepute prin metoda FIV în comparație cu cele concepute pe cale naturală, la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, care nu au înregistrat patologii în antecedente nu au identificat diferențe concludente.

Semnificația teoretică: Cercetarea dată completează cunoștințele clinice privind particularitățile evoluției sarcinii concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani. A fost demonstrată corelarea variațiilor markerilor imuni (citokine) și ai antioxidanților ai stresului oxidativ prelevați din serul sanguin și lichidul amniotic cu complicațiile în sarcină, precum: hipertensiunea, preeclampsia și nașterile premature.

Valoarea aplicativă a lucrării: Lărgirea spectrului diagnosticului antenatal precoce prin determinarea markerilor imuni, inclusiv ai citokinelor și stresului oxidativ, ca factori de prognostic pentru riscul declanșării complicațiilor în evoluția sarcinilor concepute prin fertilizare în vitro (FIV), la femeile cu vârsta de peste 35 de ani.

Implementarea rezultatelor științifice: În temeiul rezultatelor cercetării au fost înregistrate două inovații, implementarea cărora este confirmată prin patru acte în cadrul IMSP IMC și USMF Nicolae Testemițanu. Pentru supravegherea antenatală a gestantelor cu sarcina concepută prin fertilizare in vitro și vârsta peste 35 de ani se recomandă „Algoritmul de triaj a gestantelor, cu vârsta de peste 35 de ani și metoda de concepere - FIV, privind riscul complicațiilor prin hipertensiunea indusă de sarcină, preeclampsia și nașterea prematură”, care va permite aplicarea timpurie a unei tactici preventive individuale.

Rezultatele cercetării au fost publicate în mass-media de specialitate, expuse în prezentări la congrese și forumuri științifice.

ANNOTATION

Dobrovolskaia Aliona

THE CHARACTERISTICS OF THE EVOLUTION AND CONDUCT OF PREGNANCY OBTAINED THROUGH THE INVITRO FERTILIZATION METHOD IN WOMEN OVER 35 YEARS OLD

Pdh thesis in medical sciences, Chisinau, 2024

Thesis structure: Introduction, five chapters, conclusions and recommendations; bibliography – 163 sources. In total, the thesis contains 187 pages of basic text, 29 tables, 18 figure, 10 annexes. The obtained results are published in 10 scientific papers.

Key words: reproductive age, infertility, in vitro fertilization (IVF), antenatal diagnosis, cytokines.

Field of study: Medicine.

Purpose of the paper: Identification of clinical peculiarities in the evolution of pregnancies conceived by the IVF method in pregnant women over 35 years of age, correlated with the values of immune biomarkers and oxidative stress determined in the second trimester of pregnancy from maternal blood and amniotic fluid.

Research objectives: Analysis of the clinical evolution of pregnancies conceived by the IVF method in pregnant women over 35 years old; Interpretation of the level of cytokines determined in maternal blood and amniotic fluid, in the second trimester of pregnancy; Analysis of biomarkers of oxidative stress taken from blood serum and amniotic fluid, in the second trimester, in pregnant women over 35 years old, pregnancy conceived by the IVF method; Peculiarities of the evolution of pregnancies conceived by the IVF method and their correlation with the variations of biomarkers determined in the second trimester of pregnancy.

Scientific novelty and originality: The role of immune status and oxidative stress in the pathogenetic mechanisms of the development of complications through pregnancy-induced hypertension, preeclampsia and premature birth, anticipating the clinical evolution in pregnancies obtained by the IVF method in women over 35 years old.

The main scientific results obtained: The increase in the frequency of hypertensive states induced by pregnancy, preeclampsia and premature births are correlated with the imbalance of the immune status and the increase of oxidative stress determined in blood serum and amniotic fluid, in the second trimester of pregnancy conceived by the IVF method in women over 35 years old. The evolution of pregnancies conceived by the IVF method compared to those conceived naturally, in pregnant women over 35 years of age, who did not have any pathologies in the antecedents, did not identify any conclusive differences.

The theoretical significance: The given research complements the clinical knowledge regarding the particularities of the evolution of the pregnancy conceived by the IVF method in pregnant women over 35 years old. Variations in immune markers (cytokines) and oxidative stress antioxidants taken from blood serum and amniotic fluid have been shown to correlate with pregnancy complications, such as: hypertension, preeclampsia and premature births.

Application value: Broadening the spectrum of early antenatal diagnosis by determining immune markers, including cytokines and oxidative stress, as prognostic factors for the risk of complications in the course of pregnancies conceived by in vitro fertilization (IVF) in women over 35 years of age.

Implementation of the scientific results: Based on the results of the research, two innovations were registered, the implementation of which is confirmed by four acts within the IMSP IMC and USMF Nicolae Testemițanu. For antenatal surveillance of pregnant women with pregnancies conceived by in vitro fertilization and over 35 years of age, the "Triage algorithm for pregnant women over 35 years of age and conception method - IVF, regarding the risk of complications due to gestational hypertension, preeclampsia and premature birth", which will allow the early application of an individual preventive tactic.

The results of the research were published in specialized mass media, exhibited in presentations at congresses and scientific forums.

АННОТАЦИЯ

Добровольская Алёна

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ВЕДЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ, ЗАЧАТОЙ МЕТОДОМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ЖЕНЩИН СТАРШЕ 35 ЛЕТ

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, Кишинёу, 2024

Структура диссертации: Введение, текст диссертации: пять глав, заключение и выводы, рекомендации; библиография – 163 источника. Всего диссертация содержит 187 страниц основного текста, 29 таблиц, 18 фигур, 10 приложений. Полученные результаты опубликованы в 10 научных статьях.

Ключевые слова: репродуктивный возраст, бесплодие, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), антенатальная диагностика, цитокины и маркеры оксиданты и антиоксиданты, окислительный стресс.

Область обучения: Медицина.

Цель исследования: Выявление корреляции особенностей течения беременности с параметрами биомаркеров иммунного профиля и оксидативного стресса определенных во II-ом триместре в крови и околоплодных водах у женщин старше 35 лет зачатых методом ЭКО. **Задачи исследования:** Анализ клинической эволюции беременности, у женщин старше 35 лет, зачатых методом ЭКО; Интерпретация уровня цитокинов, определяемых в крови матери и околоплодных водах, во втором триместре беременности; Анализ параметров биомаркеров окислительного стресса в сыворотке крови и околоплодных водах, определённых во втором триместре у беременных старше 35 лет зачатых методом ЭКО;

Особенности развития беременностей, зачатых методом ЭКО, и их корреляция с вариациями биомаркеров определённых во втором триместре беременности.

Новизна и научная оригинальность работы: Исследование демонстрирует роль иммунного статуса и окислительного стресса в патогенетических механизмах развития осложнений, таких как: гипертоническая болезнь, преэклампсия и преждевременные роды в ЭКО-беременности у женщин старше 35 лет до клинических проявления осложнений.

Полученные научные результаты: для женщин старше 35 лет, при бесплодии, экстракорпоральное оплодотворения (ЭКО) является эффективным методом лечения. По результатам сравнительного анализа между течением беременности, при зачатие методом ЭКО и естественным путем не были выявлены убедительные различия в условиях неотягощённого анамнеза. Доказана взаимосвязь вариации иммунного статуса, цитокинов и маркеров оксидативного стресса определённых в сыворотке крови и околоплодных водах во втором триместре у беременных старше 35 лет, зачатых методом – ЭКО, с такими осложнениями как: гестационная гипертензия, преэклампсия и преждевременные роды.

Теоретическая значимость: Данное исследование дополняет клинические знания об особенностях течения беременности, зачатой методом ЭКО, у беременных старше 35 лет. Было доказано, что изменения иммунных маркеров (цитокинов) и антиоксидантов окислительного стресса, исследованных в сыворотки крови и околоплодных водах, коррелируют с осложнениями беременности, такими как: гипертония, преэклампсия и преждевременные роды.

Прикладная ценность статьи: Расширение спектра антенатальной диагностики за счет привлечения иммунных маркеров, цитокинов, представляющих прогностический интерес при осложнениях в беременности у женщин старше 35 лет зачатие ЭКО. Результаты исследования предоставляют архив определённых лабораторных показателей биомаркеров из материнской крови и околоплодных вод при зачатии методом ЭКО.

Внедрение научных результатов: По результатам исследований зарегистрированы две инновации, и четыре протокола внедрения в условиях Института Матери и Ребёнка и ГУМФ „Николае Тестемицану”. В антенатальном периоде наблюдении за беременными, с зачатием ЭКО экстракорпорального оплодотворения, и старше 35 лет, рекомендуется, использовать: *Алгоритм триажа по риску осложнений в беременности с методом зачатия ЭКО, у женщин старше 35 лет*, что позволит выявлять на раннем этапе беременность которая относится к группе высокого риска по развитию осложнения таких как гипертензия, гестоз и преждевременные роды.

Результаты исследований опубликованы в научных статьях, озвучены в докладах на конгрессах и научных форумах.

LISTA ABREVIERILOR

AAT	Activitatea antioxidantă totală
ACTH	Hormonul adrenocorticotrop
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
AGE	Compuși terminali de glicare avansata
AMH	Hormonul Antimullerian
AFC	Număr de foliculi antrali
BCR	Boala cronică renală
beta-HCG liber	Subunitate liberă beta a gonadotropinei corionice umane
CAT	Catalaza
CRL	Lungimea cranio-caudală
CSRGM	Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală
DAM	Dialdehida malonică
DPPNI	Decolarea prematură de placentă normal inserată
DPR	Debitul plasmatic renal
DZg	Diabet zaharat gestațional
ELISA	Testul imunosorbent legat de enzime
FIV	Fertilizare in Vitro
FSH	Hormonul foliculostimulant
γ -GGT	Gama-glutamyltranspeptidaza
GPX	Glutationperoxidaza
GR	Glutationului reductaza
GPX	Glutation peroxidaza
GST	Glutation-S-transferaza
HIS	Hipertensiunea indusă de sarcină
HNE	Hidroxinonenalul
HPL	Hidroperoxizii lipidici
HTA	Hipertensiunea arterială
HTAg	Hipertensiunea gestațională
IMC	Institutul Mamei și Copilului

IL - 1beta	Interleukina 1 beta
IL - 2	Interleukina 2
IL - 3	Interleukina 3
IL - 6	Interleukina 6
IL - 8	Interleukina 8
IL - 10	Interleukina 10
IL - 12	Interleukina 12
IP	Interval protogenezie
LA	Lichidul amniotic
LH	Hormonul luteinizant
(M)	Media aritmetică
(m)	Erori medii
MoM	Multiplu de mediană
MDA	Malondialdehida
NKU	Celule ucigașe naturale uterine
NO	Oxid nitric
NP	Naștere prematură
ODD	Obiectivele de Dezvoltare Durabilă
ONU	Organizația Națiunilor Unite
(p)	Relevanța statistică
PAPP-A	Proteina plasmatică secretată de placenta
PBS	Soluție apoasă de clorură de sodiu
PE	Preeclampsia
PPOA	Producția proteică de oxidare avansată
PIGF	Factorul de creștere placentar
PIBF	Factorul de blocare indus de progesteron
RCF	Rata cumulativă de fertilitate
RPMA	Ruptura prematură a membranelor amniotice
RSF	Rata specifică de fertilitate
ROS	Speciile reactive de oxigen
RNS	Speciile reactive de nitrogen

RTF	Rata totală de fertilitate
RFG	Rata de filtrare glomerulară
RUAM	Reproducere umană asistată medical
SDF - 1 α	Factor stromal derivat celular
SOD	Superoxid dismutază
SND	Strategia Națională de Dezvoltare
SN	Sarcini fără particularități în evoluție
SPSS	Pachetul Statistic pentru Științe Sociale
SUA	Statele Unite al Americii
sFlt	Tirozin kinaza solubilă
TNF-alfa	Factorului de necroză alfa
UE	Uniunea Europeană
UNFPA	Fondul ONU pentru Populație
USG	Ultrasonografie
USMF	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
VEGF	Factorul de creștere endotelial vascular
VPN	Valoare predictivă negativă
XO	Expresia placentară
(χ^2)	Statistică chi-pătrat
IMP	Институт Матери и Ребёнка

LISTA TABELELOR

	Pagina
1 Tabelul 3.1. Ponderea gestantelor incluse în loturi, după mediul de reședință, nivelul de educație și statutul ocupațional	71
2 Tabelul 3.2. Ponderea gravidelor în loturile din studiu pe profilul vârstei cu intervalul de 5 ani.....	71
3 Tabelul 3.3. Repartizarea în loturi a gravidelor după criteriile primipare și multipare, în dependență de domiciliu urban/rural.....	73
4 Tabelul 3.4. Dinamica IMC la gravidele din studiu, în trimestrul III de sarcină față de trimestrul I	75
5 Tabelul 3.5. Antecedentele obstetricale la gestantele din studiu.....	78
6 Tabelul 4.1. Modificarea adaosului ponderal la gravidele incluse în studiu.....	81
7 Tabelul 4.2. Stări patologice și complicațiile induse de sarcină înregistrate în cercetare	83
8 Tabelul 4.3. Datele anamnestic-clinice și paraclinice la gestantele cu vârsta peste 35 de ani, sarcina cărora s-a complicat prin preeclampsie.....	85
9 Tabelul 4.4. Profilul oxidant în serul sanguin la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție.....	91
10 Tabelul 4.5. Profilul oxidant în lichidul amniotic (LA) în sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție.....	91
11 Tabelul 4.6. Profilul antioxidant în serul sanguin la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție.....	92
12 Tabelul 4.7. Profilul antioxidant în lichidul amniotic (LA) la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție.....	93
13 Tabelul 4.8. Profilul imun în serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele cu complicații prin naștere prematură.....	98
14 Tabelul 4.9. Complicațiile fetale înregistrate în sarcinile din studiu.....	101
15 Tabelul 5.1. Analiza comparativă a markerilor imuni determinați din serul sanguin în sarcinie cu evoluția fără particularități.....	107
16 Tabelul 5.2. Analiza comparativă a markerilor imuni determinați din lichidul amniotic în sarcinile cu evoluție fără particularități.....	108
17 Tabelul 5.3. Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din serul sanguine, în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestante în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	109

18	Tabelul 5.4. Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din lichidul amniotic (LA), în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestante în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	110
19	Tabelul 5.5. Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele din lotul I.....	111
20	Tabelul 5.6. Mediatorii prooxidanți determinați din serul sanguin în sarcinile fără particularități în evoluție.....	112
21	Tabelul 5.7. Mediatorii antioxidanți determinați din serul sanguin în sarcinile fără particularități în evoluție.....	113
22	Tabelul 5.8. Analiza comparativă a mediatorilor prooxidanți determinați din serul sanguin, în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	114
23	Tabelul 5.9. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați din serul sanguin, în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	115
24	Tabelul 5.10. Mediatorii oxidanți determinați din lichidul amniotic în sarcinile fără particularități în evoluție.....	117
25	Tabelul 5.11. Mediatorii antioxidanți determinați în lichidul amniotic în sarcinile fără particularități în evoluție.....	118
26	Tabelul 5.12. Analiza comparativă a mediatorilor oxidanți determinați din lichidul amniotic (LA), în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	119
27	Tabelul 5.13. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați din lichidul amniotic, în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani.....	119
28	Tabelul 5.14. Analiza comparativă a mediatorilor oxidanți determinați din serul sanguin și lichidul amniotic, la gestantele din lotul I.....	120
29	Tabelul 5.15. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați din serul sanguin și lichidul amniotic, la gestantele din lotul I.....	121

LISTA FIGURILOR

1	Figura 1.1. Rata fertilității în dinamica anilor 2001-2021 în UE.....	16
2	Figura 1.2. Rata natalității în dinamica anilor 2001-2021 în UE.....	17
3	Figura 2.1. Planul metodologic al cercetării.....	58
4	Figura 2.2. Designul structurii loturilor.....	60
5	Figura 2.3. Designul studiului prospectiv de cohortă.....	60
6	Figura 3.1 Repartizarea gestantelor din studiu conform mediului de domiciliu (%)......	72
7	Figura 3.2. Morbiditatea extragenitală la gestantele incluse în studiu (abs.).....	74
8	Figura 3.3. Analiza comparativă a duratei menzisului la gestantele din studiu.....	76
9	Figura 3.4. Analiza intervalului intermenstrual la gestantele din studiu.....	77
10	Figura 4.1. Complicațiile materne în sarcină (%) la gestantele din loturile studiului	84
11	Figura 4.2. Variațiile IL-6 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I.....	87
12	Figura 4.3. Variațiile IL-8 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I.....	88
13	Figura 4.4. Variațiile IL-12 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I.....	88
14	Figura 4.5 Variațiile IL-10 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I	89
15	Figura 4.6. Variațiile ale SDF-1a și VEGF determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I.....	90
16	Figura 4.7. Variațiile ale IL-6 și IL-8 determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS.....	95
17	Figura 4.8. Variațiile ale IL-10 și IL-12 determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS.....	96
18	Figura 4.9. Variațiile ale SDF-1a și VEGF determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS.....	97

LISTA ANEXELOR

	pagina
Anexa nr. 1. Chestionarul privind datele anamnestece prezentate de femeile gravide la etapa includerii în studiu.....	152
Anexa nr. 2. Metodologia de realizare a investigațiilor de laborator în cercetare.....	154
Anexa nr. 3. Baza de date a parametrilor biomarkerilor determinați în cercetare	164
<i>Tabelul 1. Baza de date a parametrilor Interleukinei 6 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelul 2 Baza de date a parametrilor Interleukinei 8 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabela nr.3. Baza de date a parametrilor Interleukinei 10 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>167</i>
<i>Tabelul 4. Baza de date a parametrilor Interleukinei 12 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>168</i>
<i>Tabelul 5. Baza de date a parametrilor Factorului stromal derivat celular (SDF) determinat în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>169</i>
<i>Tabelul 6. Baza de date a parametrilor Factorului de creștere endotelial vascular (VEGF) determinat în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu.....</i>	<i>170</i>
Anexa nr. 4. Algoritmul de triaj al gestantelor cu vârsta de peste 35 de ani, sarcină concepută prin metoda FIV, pentru riscul complicațiilor de HTA indusă de sarcină, preeclampsie și naștere prematură	170
Anexa nr. 5. Actul de implementare a inovației Nr.522.....	171
Anexa nr. 6. Actul de implementare a inovației Nr.109	172
Anexa nr. 7. Actul de implementare a inovației Nr.523	173
Anexa nr. 8. Actul de implementare a inovației nr.110	174
Anexa nr. 9. Certificat de inovator Nr.6079	175
Anexa nr. 10. Certificat de inovator Nr.6080	176

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate.

Sănătatea maternă și eficiența vârstei reproductive se includ în determinanții succeselor în medicină, prognozelor echilibrului demografic și proceselor socio-economice pentru fiecare stat, comunitate.

Prezenta teză de doctorat s-a axat pe perfecționarea serviciilor medicale destinate capacităților reproductive femeilor în vârstă avansată, inclusiv cu parcurgerea în siguranță a perioadei de sarcină și a nașterii, iar cuplurilor de a oferi cele mai bune șanse de a avea copii sănătoși.

Tema cercetării se încadrează în obiectivele asigurării unei maternități sigure, promovate în Agenda 2030 a Obiectivelor de Dezvoltare Durabilă (ODD) elaborate de Organizația Națiunilor Unite (ONU), Strategia globală pentru sănătatea femeilor, a copiilor și a adolescenților (2016-2030), prevederile Legii Republicii Moldova nr. 138 din 15.06.2012, privind sănătatea reproducerii și obiectivul general 2.2. al Strategiei naționale de sănătate „Sănătatea 2030”, aprobată de Guvernul Republicii Moldova în 2023 [1, 2, 3].

Perceperea științifică a multiplelor probleme, care sunt cu impact asupra cuplurilor în perioada fertilă, explică diversitatea și actualitatea cercetărilor și studiilor axate pe perfecționarea accesului universal și în siguranță la servicii medicale moderne, cu respectarea drepturilor sexuale și reproductive ale fiecărei persoane.

Tranziția demografică începută cu două sute de ani în urmă a stat la baza unui proces de creștere economică fără precedent în istorie, care a rezultat cu îmbunătățirea simultană a productivității și nivelului de trai, contribuind la dezvoltarea marilor aglomerări urbane contemporane, a favorizat o diviziune a muncii mai avansate și, nu în ultimul rând, a contribuit la schimbarea atitudinilor față de familie, inclusiv prin amânarea nașterii primului copil pentru o vârstă mai înaintată.

Principalii indicatori statistici ai natalității și fertilității au o tendință de continuă reducere, cu excepția vârstei medii a mamei la naștere, aspecte caracteristice pentru toate țările Uniunii Europene, tendința valabilă și pentru Republica Moldova. Rata totală de fertilitate în 2021 în Uniunea Europeană (UE) a fost de 1,53 născuți vii per femeie comparativ cu 1,57 în 2016. (figura 1.1.).

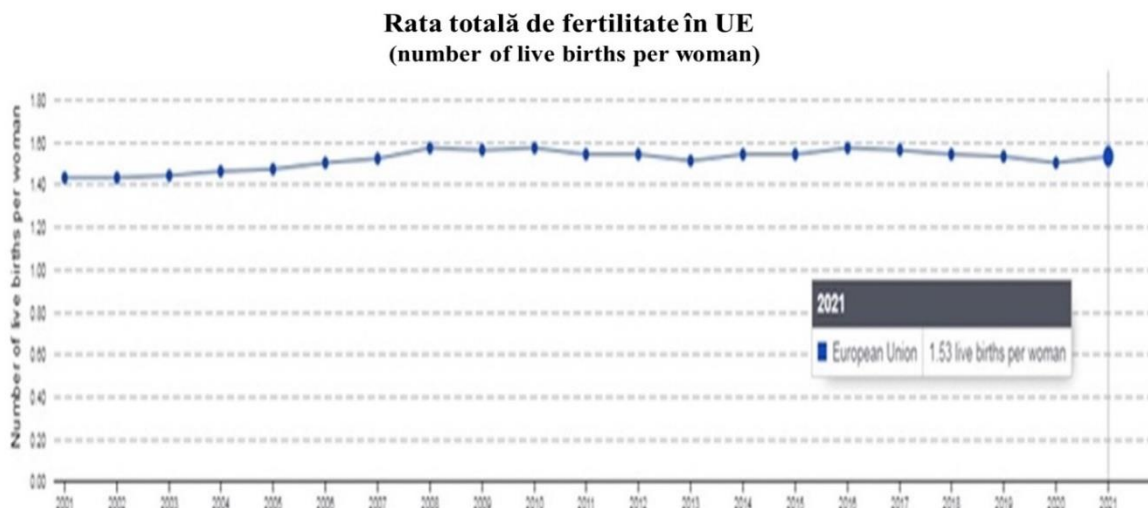


Figura 1.1. Rata fertilității în dinamica anilor 2001-2021 în UE
Sursa: Eurostat Biroul de statistică

Deși, rata totală de fertilitate în Republica Moldova este relativ înaltă în 2021 a constituit 1,8, totuși, aceasta nu atinge nivelul de înlocuire a generațiilor de 2,1 copii născuți-vii per o femeie de vârstă reproductivă. Aceste schimbări se datorează reducerii proporției femeilor, care se reproduc în urmași, respectiv în ultimii cinci ani în RM generația fiicelor este mai mică decât generația mamelor cu circa 15%, fiind însoțite și prin fenomenul impactului amânării nașterilor spre vârstele mai mature [4].

Raportul privind schimbările demografice și propunerile privind măsurarea și combaterea efectelor negative în regiunile UE, din (decembrie 2020), publicat în Jurnalul Oficial al UE, indică drept una din cauzele a problemei nominalizate, întârzierea vârstei maternității și amânarea sarcinilor până la o vârstă mai înaintată [5].

În UE ponderea nașterilor la mame cu peste 40 de ani, a crescut mai mult de două ori între anii 2001 și 2019 (de la 2.4 la sută la 5.4 %), în situația, când numărul născuților vii scade într-un ritm relativ constant, atingând 4,07 milioane de copii în 2020, fiind cea mai mica cifră înregistrată din 1960 încoace [6].

Analiza contextului demografic din Republica Moldova prezentată în ediția anului 2022 „Schimbări pentru reziliența demografică, elaborată de către Fondul ONU pentru Populație (UNFPA)” confirmă, că reducerea numărului populației și structura acesteia a acumulat o inerție negativă, din cauza scăderii fertilității și creșterii îmbătrânirii demografice [7] (figura 1.2.).

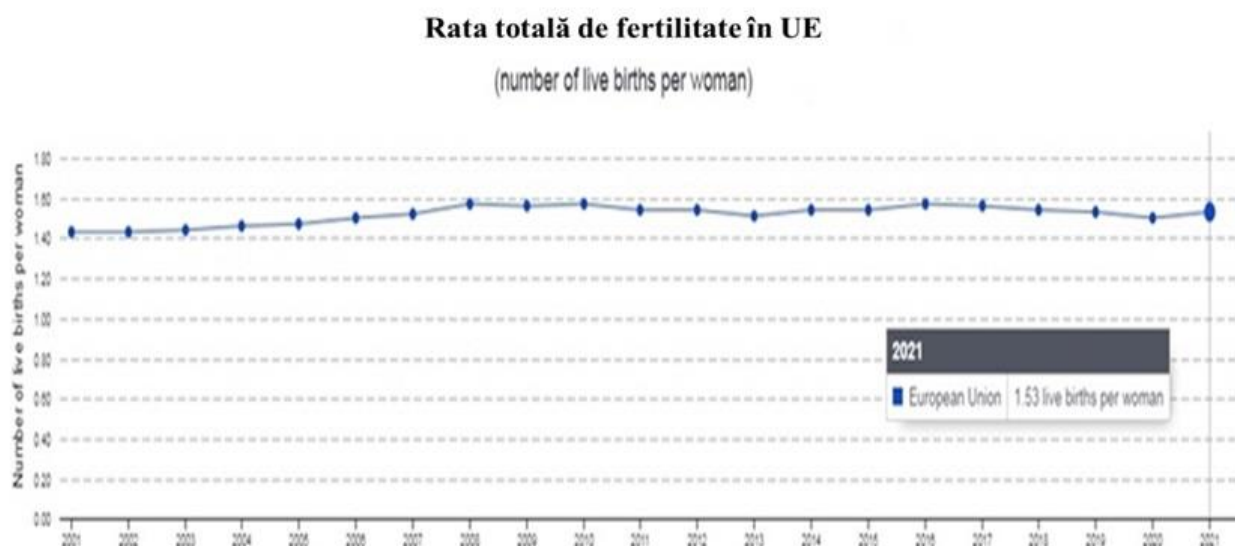


Figura 1.2. Rata natalității în dinamica anilor 2001-2021 în UE
Sursa: Eurostat Biroul de statistică

Scăderea numărului de nașteri la femeile cu vârste mai tinere în RM, a condus la reducerea numărului de copii născuți cu - 0,68 copii per femeie de vârstă fertilă. La grupele mai mari de femei cu vârsta de la 30 la 49 de ani, dimpotrivă, s-a observat o creștere a natalității, - de 0,23 copii [8].

Este cert, că îmbătrânirea populației și fertilitatea sub-înlocuire este condiționată de o serie de factori sociali, economici, legislativi, educaționali, sanitari, psihologici și culturali, care, la rândul lor impun căutarea noilor posibilități de a investi în vârsta reproductivă și maternitate.

În unul din conceptele moderne ale proceselor demografice, care cuprinde și segmentul vârstei fertile, descris în lucrarea „La revolution demographique”, autor Adolphe Landry, cunoscută și prin denumirea „Teoria tranziției demografice”, este argumentat faptul, că scăderea fertilității este influențată de interesul familiei, de raționalizarea vieții, de numărul de copii în cuplu [9]. Totodată, valorile familiei, sunt în strânsă corelare cu echilibrul social, siguranța în ziua de mâine, bunăstarea, inclusiv, noile atitudini față de sistemele de credință și alte priorități ale societății. S-au schimbat prioritățile comportamentale ale tinerilor, care sunt bazate la început pe dorință, apoi pe capacitate și disponibilitate [10].

Existența copiilor mici se asociază cu creșterea ratei de ocupare a bărbaților și scăderea semnificativă a acestora la femei, ele fiind primele care își schimbă comportamentul în raport cu piața muncii atunci, când apare nevoia de îngrijire, fapt ce contribuie la creșterea vârstei la nașterea copiilor; intensificarea fenomenului de maternitate amânată [11].

Conflictul dintre simțul matern și aspirațiile pentru carieră, alimentat de creșterea rapidă a nivelului de studii al femeilor, de participarea pe piața forței de muncă, constituie una dintre

problemele cele mai larg dezbătute în procesul de cercetare a problemei fertilității. Diferențierile nivelului educațional sunt printre cele mai bine stabilite, și cel mai larg studiate în literatura de specialitate. Nivelul de studii exercită o presiune descendentă asupra fertilității, deoarece, deschide și alte oportunități pentru femei, dincolo de rolul matern[12].

În studiul „Vârsta maternă avansată, întârzierea nașterii, este rareori o alegere conștientă, un studiu calitativ al opiniilor și experiențelor femeilor”, datele cărui au fost colectate prin interviuri semi-structurate aprofundate, au fost identificate trei teme principale: capitolele vieții, nevoia de a cunoaște și nașterea. Femeile s-au concentrat pe necesitatea unei relații stabile, pe a fi „gata” să aibă un copil și pe dobândirea experienței de viață. Experiențele lor au reflectat o lipsă de conștientizare a riscurilor asociate cu sarcina la vârsta de peste 35 de ani, considerând că însăși vârsta a sporit probabilitatea rezultatelor slabe. Femeile au perceput o lipsă a unei alternative de a alege, momentul în care să întemeieze o familie și au sugerat că, deși s-ar putea să fi ajuns într-un moment al vieții lor în care s-ar simți pregătite să aibă un copil, circumstanțele în care s-ar afla, a putea să nu susțină această dorință, (relațiile în familie, stabilitatea financiară, sănătatea și fertilitatea etc. [13].

Practicarea metodei tipului de fertilitate târzie a început de câteva decenii în urmă. Tendința de a amâna rolul de părinte, a condus nu numai la o creștere a vârstei femeii la prima naștere, dar și la creșterea proporției femeilor care pe parcursul vieții reproductive nu au născut nici un copil.

Deși nu există o definiție universală de "vârsta avansată a gestantei", totuși, un reper de vârstă comun îl reprezintă cel de 35 de ani, în general utilizat pentru a defini femeia gravidă „matură” [14].

Sarcina după 35 de ani are atât avantaje, cât și dezavantaje. Pe de o parte, la această vârstă, femeia își cunoaște bine starea generală cu particularitățile fiziologice și este gata să răspundă adecvat la schimbările ce apar pe parcursul sarcinii. Pe de altă parte, cei 10-20 de ani de viață reproductivă nesolicitată, și-au lăsat amprenta în viața femeii: (maladiile cronice persistente, posibilele maladii sexual transmisibile suportate în trecut, stilul de viață stresant, situația ecologică precară, aderențe postoperatorii, accidente suportate etc.[15].

Una din problemele întâlnite la femeile cu vârsta de peste 35 de ani o constituie problema infertilității. Aproximativ 15-20 la sută din cuplurile de vârstă reproductivă din Republica Moldova se întâlnesc cu problema dată, cauza frecventă fiind apariția factorilor ginecologici asociați cum ar fi: factor tubar, inflamațiile pelviene cronice și persistente netratate la timp, posibilele boli venerice suportate în trecut, tubectomii, endometrioze severe, miomul uterin,

disfuncțiile sistemului endocrin și imun, aderențe postoperatorii, accidente suportate, cât și stilul de viață stresant și noxe profesionale.

Femeile cu vârsta de peste 35-40 de ani obțin sarcina mult mai greu, datorită faptului că ovocitele sunt din ce în ce mai puține și calitatea lor este mai slabă, au foarte multe mutații, fiind practic ultimele ovocite. De asemenea, creșterea morbidității prin disfuncții ginecologice, problemelor ce țin de mobilitatea spermatozoizilor, scăderea dorinței sexuale, răspândirea violenței sexuale, afectează deopotrivă calitatea și rezultativitatea de a concepe un copil [16].

Totodată, la această vârstă a gestantelor, placenta maternă îmbătrânită prezintă o acumulare redusă de celule imune în comparație cu placenta tânără. Vârsta avansată a mamei este asociată cu rezultate adverse ale sarcinii, cum ar fi disfuncția placentară, restricția creșterii fetale, moartea perinatală, nașterea prematură și preeclampsia [17]. În general, funcția diferitelor organe se deteriorează odată cu vârsta. Îmbătrânirea, este bine cunoscută ca o stare inflamatorie cronică și de grad scăzut, dependentă de vârstă, care apare din cauza acumulării de celule imunitare și a producției de citokine proinflamatorii [18]. Interleukina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumorală- α (TNF α), prezintă în mod clar o creștere dependentă de vârstă a expresiei, care reflectă conceptul emergent de inflamare (inflamație + îmbătrânire). Cu toate acestea, nu s-a dovedit, științific, dacă inflamația apare în placenta mamei în vârstă [19].

Studiile recente, au demonstrat că majoritatea problemelor de dezvoltare la femeile în vârstă sunt de origine maternă, dar nu ovocitele „vechi”, iar un mediu uterin matern nefavorabil poate duce la disfuncție placentară și complicații ale sarcinii [20].

Celulele sistemului imun decidual local, cum ar fi natural killer uterin (NKU) și macrofage, reglementează echilibrul între toleranță uterină și trofoblaști fetalii. La stabilirea circulației placentare, sângele periferic, de asemenea, intră în contact direct cu celule fetale, în special, trofoblaști vilozii, fapt care poate afecta răspunsul imun matern periferic. Dovezile recente au oferit o nouă perspectivă asupra influențelor sistemului imunitar în tulburările de reproducere. Un subset de limfocite ale sistemului imunitar înăscut cunoscut sub numele de celule uterine natural killer (uNK) sunt acum recunoscute ca fiind fundamentale pentru realizarea implantării embrionului și a sarcinii de succes, dar inițial li s-a atribuit o reputație proastă [21].

Creșterea incidenței infertilității în funcție de vârsta femeii, a devenit astăzi o adevărată problemă cu care se confruntă Republica Moldova, generând o adevărată criză, atât la nivel individual, cât și la nivel de societate. Problema infertilității conduce, inevitabil, la augmentarea considerabilă a vârstei primei gravidități și la utilizarea metodelor contemporane de tratament, din care face parte și reproducerea asistată [22, 23].

Deși ultimele decenii se caracterizează prin noi progrese în domeniul monitorizării sarcinii, vigilența și identificarea riscurilor în sarcina obținută prin aplicarea metodei de fertilizare în vitro (FIV), în situația cuplurilor infertile și când vârsta mamei la prima naștere atinge 35 de ani sau mai mult, poate determina realizarea acțiunilor profilactice și curative oportune pentru a avea o maternitate în siguranță, atât pentru mamă cât și pentru nou-născut.

Cercetarea data, a ținut cont de progresele atinse în domeniul conduitei medicale în obstetrică și s-a axat pe un segment cu puține dovezi științifice și anume pe particularitățile evoluției sarcinilor concepute prin metoda FIV, la femeile vârsta cărora este de peste 35 de ani.

În acest context, importanța perfecționării serviciilor medicale în domeniul reproducerii, abordate în cercetare, contribuie la extinderea cunoștințelor referitoare la prevenirea riscurilor și identificarea noilor posibilități medicale, oferite femeilor cu vârsta înaintată, care se confruntă cu infertilitate, asigurând noile garanții pentru o sarcină finalizată cu nașterea unui copil sănătos.

Scopul cercetării.

Identificarea particularităților clinice în evoluția sarcinilor concepute prin metoda FIV, la gestantele cu vârstă peste 35 de ani, și corelarea acestora cu valorile biomarkerilor imuni și ai stresului oxidativ, determinați în al doilea trimestru de sarcină din sângele matern și lichidul amniotic.

Pentru atingerea scopului cercetării au fost stabilite **următoarele obiective:**

1. Analiza evoluției clinice a sarcinilor concepute prin metoda FIV la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani.
2. Interpretarea nivelului citokinelor determinate în sângele matern și lichidul amniotic, în trimestrul al doilea de sarcină.
3. Determinarea biomarkerilor stresului oxidativ prelevați din serul sanguin și lichidul amniotic, în trimestrul al doilea, la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, în sarcina concepută prin metoda FIV.
4. Analiza particularităților evoluției sarcinilor concepute prin metoda FIV și corelarea lor cu variațiile biomarkerilor determinați în trimestrul al doilea de sarcină.

Ipoteza principală a cercetării.

Ipoteza cercetării constă în faptul că sarcinile obținute prin FIV, la gestantele vârsta cărora este de peste 35 de ani, fiind în categoria de risc, necesită o monitorizare asociată cu variația biomarkerilor imuni, citokinelor și ai stresul oxidativ, determinați din ser și lichidul amniotic, în trimestrul doi de sarcină, ca valoare predictivă a posibilelor complicații prin HIS, preeclampsie și NP.

Metodologia cercetării.

Cercetarea reprezintă un studiu prospectiv de cohortă descriptiv și predictiv, efectuat în perioada anilor 2011-2015 în cadrul Institutului Mamei și Copilului (IMC), Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (CNSRGM).

Eșantionul studiului a inclus 222 de gravide cu vârsta mai mare de 35 de ani, divizat în 2 loturi corespunzător modului de concepere a sarcinii: prin metoda FIV, și pe cale naturală. Pe parcursul monitorizării evoluției sarcinilor, au fost determinați a câte 28 de biomarkeri (6 mediatori imuni, inclusiv citokine și 22 markeri ai stresului oxidativ), din materialul biologic, recoltat din sângele matern și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină, cu ulterioara corelare a variației acestora cu particularitățile înregistrate pe parcursul evoluției și nașterilor.

Studiul a inclus efectuarea următorului complex de metode de cercetare:

- *metode clinice de investigație* - evaluarea clinică a gravidelor incluse în studiu; anamneza personală și obstetricală; examene clinic și obstetrical efectuate în trimestrul II de sarcină (14 – 27 de săptămâni de sarcină); aprecierea particularităților evoluției sarcinii cu descrierea complicațiilor sarcinii în trimestrul III de sarcină (28 - 40 de săptămâni) și a nașterii;
- *metode imagistice* - ecografie tridimensională de screening, efectuată la termenul sarcinii de 32 de săptămâni; examen ecografic cu dopplerometrie placentară, ombilicală, fetală, efectuată la termenul sarcinii de 12, 24 și 32 de săptămâni de gestație;
- *metode paraclinice* – amniocenteză, pentru prelevarea lichidului amniotic cu scop de cariotipare și determinare a markerilor biologici, efectuată la termenul sarcinii de 16-19 săptămâni;
- *metode de laborator* - examen biochimic al sângelui și lichidului amniotic; determinarea cariotipului fetal; determinarea markerilor biologici specifici - citokinele (IL - 6, IL - 8, IL - 10, IL - 12, markerii imuni SDF - 1 α , VEGF, markerii pro și antioxidanți ai stresului oxidativ);
- *metode statistice* – prin aceste metode s-a utilizat informația acumulată în baza de date a cercetării cu calcularea parametrilor seriei variative, mediei aritmetice (M), erorii medii (m) și a valorii intervalului de fidelitate a mediei aritmetice. Relevanța statistică (P) în interiorul lotului și între diferite loturi s-a calculat după criteriul Student și Pearson (χ^2) cu o probabilitate mai mare de 95% ($p \leq 0,05$) pentru variabilele cantitative cu o distribuție normală. Partea principală a prelucrării statistice a fost efectuată utilizând software statistic IBM® SPSS® 22.0.0.0. În cadrul fiecărui lot inclus în studiu s-a efectuat analiza statistică descriptivă, cu determinarea mediei, deviației standard, medianei, percentilei 25 și percentilei 75. Pentru compararea șirurilor de valori între loturi s-a folosit testul non-parametric Mann-Whitney, deoarece distribuția valorilor a fost asimetrică. Pentru evidențierea corelațiilor între valorile parametrilor studiați și apariția complicațiilor în evoluția sarcinilor s-a utilizat metoda Spearman.

Noutatea și originalitatea științifică a lucrării.

În premieră s-au studiat atât implicarea citokinelor în serul sanguin (IL-6, IL-12) și în lichidul amniotic (IL-8, IL-12), precum și factorul de creștere endotelial vascular (VEGF), cât și implicarea markerilor stresului oxidativ în lichidul amniotic: activitate antioxidantă totală hexan (AAT-hexan), gama-glutamil transpeptidaza (γ -GPT), glutathion-s-transferaza (GST) și glutathion peroxidaza (GPO) în mecanismele patogenetice de dezvoltare a complicațiilor prin hipertensiune indusă de sarcină, preeclampsie și naștere prematură, în sarcinile obținute prin metoda FIV la femeile cu vârsta de peste 35 de ani, anticipând evoluția clinică.

Problema științifică soluționată.

Creșterea frecvenței stărilor hipertensive induse de sarcină, preeclampsiei și nașterilor premature sunt corelate cu dezechilibrul statusului imun și augmentarea stresului oxidativ determinați în serul sanguin și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină concepută prin metoda FIV, la femeile cu vârsta peste 35 de ani.

Evoluția sarcinilor concepute prin metoda FIV în comparație cu cele concepute pe cale naturală, la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, care nu au înregistrat patologii în antecedente nu au identificat diferențe concludente. Baza de date acumulată în cercetare oferă un portofoliu științific pentru continuarea cercetărilor complementare. Biomarkerii imuni și ai stresului oxidativ (câte 28 de parametri pentru fiecare), determinați din serul sangvin matern și lichidul amniotic în laboratorul USMF „Nicolae Testemițanu”, recoltați în al doilea trimestru de sarcină la 222 gestante cu vârsta de peste 35 de ani, sarcina căroră a fost concepută atât prin FIV, cât și pe cale naturală, sunt repartizați pe criterii medico-sociali, ușor accesibili.

Algoritmul elaborat, permite de a efectua un triaj încă la nivelul primar a categoriilor de gravide cu sarcina concepută prin FIV și vârsta căroră este de peste 35 de ani, care se încadrează în indicații pentru testarea citokinelor și markerilor imuni din sângele matern cu estimarea unui prognostic privind complicațiile în sarcină.

Identificarea riscurilor obstetricale, în temeiul expresiei citokinelor determinați în serul sangvin matern în trimestrul al doilea de sarcină, oferă o vigilență precoce în supravegherea și conduita medicală cu elaborarea unor măsuri suplimentare la programul individualizat de supraveghere a evoluției sarcinii la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, direcționate spre anticiparea complicațiilor și exercitarea controlului acestor complicații în evoluția sarcinii.

Semnificația teoretică a lucrării.

Cercetarea completează cunoștințele privind evoluția sarcinii concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârsta peste 35 de ani și demonstrează corelarea manifestării, în al doilea trimestru de sarcină în serul sanguin și lichidul amniotic a 6 markeri imuni, inclusiv citokine și a

22 markeri din categoria oxidanților și antioxidanților implicați în stresul oxidativ cu complicațiile: hipertensiunea indusă de sarcină, preeclampsia și nașterile premature.

A fost demonstrat rolul markerilor imunologici și ai stresului oxidativ în evaluarea complicațiilor - hipertensiunea arterială indusă de sarcină și nașterea prematură în evoluția sarcinii. Cercetarea dată a adus noi argumente referitoare la particularitățile evoluției sarcinilor la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani.

Deasemenea sunt aduse noi argumentări științifice referitoare la un algoritm nou de abordare a anticipării complicațiilor induse de sarcină la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani cu sarcina obținută prin metoda FIV.

Valoarea aplicativă a lucrării.

Lărgirea spectrului diagnosticului antenatal precoce prin determinarea markerilor imuni, inclusiv ai citokinelor și stresului oxidativ, ca factori de prognostic pentru riscul declanșării complicațiilor în evoluția sarcinilor concepute prin fertilizare în vitro (FIV), la femeile cu vârsta de peste 35 de ani.

Implementarea rezultatelor științifice.

În temeiul rezultatelor cercetării au fost înregistrate două inovații, implementarea cărora este confirmată prin patru acte în cadrul IMSP IMC și USMF „Nicolae Testemițanu”. Pentru supravegherea antenatală a gestantelor cu sarcina concepută prin fertilizare in vitro și vârsta peste 35 de ani se recomandă „Algoritmul de triaj a gestantelor, cu vârsta de peste 35 de ani și metoda de concepere - FIV, privind riscul complicațiilor prin HTA indusă de sarcină, preeclampsia și nașterea prematură”, care va permite aplicarea timpurie a unei tactici preventive individuale.

Aprobarea rezultatelor științifice.

Rezultatele științifice expuse în lucrare au fost comunicate și discutate în cadrul diferitor forumuri științifice naționale și internaționale: Archives of the Balkan Medical Union Supliment Nr. S3(48) / 2013 , pp. 58, ISSN 0041-6940 cât și în Conferința științifică anuală, cercetarea în biomedicină și sănătate, Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”, 2013, nr. 5(14), pp. 86-90. ISSN 1857-1719. Teza a fost discutată, aprobată și recomandată spre susținere la ședința Catedrei de obstetrică și ginecologie nr. 1 a IP USMF „Nicolae Testemițanu”, din 04.09.2023, proces-verbal nr. 2 și la ședința Seminarului Științific de Profil 321.15 - Obstetrică și Ginecologie din 20.09.2023, proces-verbal nr. 8.

Publicații.

La subiectul tezei au fost publicate 10 lucrări științifice, în reviste de profil din Registrul Național și două teze în culegeri științifice în lucrările conferințelor științifice internaționale și naționale. Au fost obținute 2 certificate de inovator.

Sumarul compartimentelor tezei.

Lucrarea: conține 187 pagini de text dactilografiat și include 18 figuri, 29 de tabele, 10 anexe; constă din adnotare (în limbile română, rusă, engleză), introducere, 5 capitole, concluzii generale, recomandări practice, indice bibliografic cu 163 referințe.

În **introducere**, sunt prezentate argumentele actualității și importanței temei de cercetare, scopul și obiectivele studiului, inovația științifică a rezultatelor obținute, semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor. Analiza și sinteza publicațiilor din literatura de specialitate denotă importanța atât a cercetărilor științifice în scopul sporirii eficienței evoluției sarcinii, cât și a particularităților de conduită a sarcinilor la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, în mod special, în cazurile în care sarcinile, au fost obținute prin metoda FIV.

Problema științifică importantă, soluționată în lucrare, constă în determinarea particularităților evoluției clinice și mecanismelor moleculare, care au loc în sarcinile obținute prin metoda de reproducere umană asistată, riscul cărora este determinat de vârsta înaintată a mamei (peste 35 de ani); aspectele specifice ale variațiilor markerilor biologici determinați din ser și lichidul amniotic la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani în sarcinile obținute prin FIV, comparativ cu sarcinile concepute fiziologic; elaborarea ipotezelor prognostice pe baza biomarkerilor identificați în particularitățile apărute pe parcursul evoluției sarcinilor obținute prin FIV la femeile cu vârsta de peste 35 de ani.

Capitolul 1. Evoluția și monitoringul sarcinii la femeile cu vârsta de peste 35 de ani în concepția contemporană. Capitolul include o sinteză a datelor din literatura de specialitate cu referire la studierea conceptelor contemporane în evoluția și monitoringului prenatal al sarcinii concepute prin metoda FIV la femeile cu vârsta reproductivă avansată, care au confirmat complexitatea subiectului de cercetare, referit la impactului determinant al complicațiilor asupra particularității evoluției sarcinii.

Au fost confirmate importanța identificării precoce a riscurilor în perioada îngrijirii prenatale și obstetricale, efectuării măsurilor de prevenție și inițierea intervențiilor terapeutice adecvate pentru a minimiza complicațiile și a fortifica rezultatele pozitive ale sarcinii.

Evaluarea personalizată a riscurilor și elaborarea prognosticului de durată oferă posibilitatea de a adopta strategii de monitorizare și intervenții medicale în funcție de particularitățile fiecărei paciente.

În Capitolul 2. Materiale și metode de cercetare, este prezentată caracteristica detaliată a observațiilor clinice, studiile de laborator, instrumentale și statistice. Cercetarea a fost efectuată cu permisiunea acreditată de către Comitetul Național de Etică al IP USMF „Nicolae Testemițanu” și a directorilor instituțiilor medicale.

Capitolul 3. Particularitățile anamnestico-clinice ale sarcinii la femeile cu vârsta de peste 35 de ani incluse în studiu. Cercetarea a fost realizată în scopul identificării anamnezei extragenitale, ginecologice și obstetricale, cât și altor particularități caracteristice gravidelor, care au fost incluse în studiu deja în al doilea trimestru de sarcină. Este de menționat, că perioada de sarcină, până la includerea în studiu, deasemenea, a avut caracter retrospectiv.

Importanța cunoașterii gestantelor, stilului lor de viață, factorilor de risc comportamentali și medicali a ocupat un loc prioritar în studiu, cu scopul de a asigura o continuitate eficientă în analiza realizată în cadrul studierii particularităților evoluției sarcinilor din studiu. Ca urmare, capitolul include în sine analiza factorilor de impact a gravidelor, până la etapa includerii în studiu, asupra riscurilor în sarcinile evaluate.

Capitolul 4. Evoluția clinică a sarcinii concepute prin metoda FIV, la femei cu vârsta de peste 35 de ani, au fost determinate cu scopul efectuării analizei multifactoriale a etapei de evoluție a sarcinii pe tot parcursul studiului de-facto, de la etapa includerii în loturi a gestantei, până la perioada lăuziei (2-3 ore), când mama cu fătul au fost transferați în salonul de lăuzie, după o monitorizare intensivă postnatală. Capitolul include în sine stabilirea evoluției sarcinilor gestantelor din ambele loturi - atât sarcina care a decurs fără particularități, cât și abordarea minuțioasă a stărilor patologice declanșate și patologiilor induse în sarcină, atât materne cât și fetale.

Capitolul 5. Evaluarea profilului imun și markerilor stresului oxidativ în sarcinile concepute prin metoda FIV. În acest capitol este menționat faptul, că un component important, care a dat semnificație științifică cercetării este analiza evoluției sarcinilor la femeile cu vârsta de peste 35 de ani, concepute prin metoda FIV, asociate cu diagnosticul de laborator a citokinelor, mediatorilor imuni și markerilor pro-anti oxidanți, parte componentă a stresului oxidativ, recoltați din serul și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină la gestantele incluse în ambele loturi de studiu, care se deosebesc după modul conceperii sarcinii (prin metoda FIV și naturală). Au fost analizate manifestările markerilor în patologiile induse de sarcină în ambele substraturi biologice prelevate și corelarea lor cu tabloul clinic, în scopul de a identifica valoarea prognostică a acestor mediatori care au un rol important în stresul oxidativ.

Rezultatele cercetării au fost comparate cu datele colectate din sursele bibliografice autohtone și internaționale, prin metoda de *sinteză a rezultatelor obținute și, ulterior, prin evidențierea concluziilor și recomandărilor practice*.

Cuvinte-cheie: citokine, interleukine IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, VEGF, SDF-1 α , oxidanți, antioxidanți, vârsta de peste 35 de ani, fertilizare in vitro.

1. EVOLUȚIA ȘI MONITORINGUL SARCINII LA FEMEILE CU VÂRSTA DE PESTE 35 DE ANI ÎN CONCEPȚIA CONTEMPORANĂ

1.1. Particularitățile fertilității feminine după 35 de ani

Tendința către terminul nou „maternitate în vârstă”, trecerea de la modelul timpuriu de procreare la cel tardiv, în secolul XXI, este caracteristică pentru mai multe țări europene. Schimbările în dinamica fertilității în Republica Moldova, fiind similare cu cele din țările din Europa Centrală și de Est, înregistrează o reducere a natalității la femeile cu vârsta între 15-24 de ani, și o majorare a natalității la categoriile de vârstă 25-34 de ani.

Tema cercetării se relaționează cu Obiectivele de Dezvoltare Durabilă (ODD), Agenda 2030, elaborată de către Organizația Națiunilor Unite (ONU), pct. 3.7: „Până în anul 2030, asigurarea accesului universal la serviciile de îngrijire a sănătății sexuale și reproductive, inclusiv, pentru planificarea familială, informare și educație, precum și integrarea sănătății reproductive în strategiile și programele naționale” [24].

Literatura științifică și statistică confirmă, că în ultimele decenii fertilitatea, ca categorie cu impact asupra procesului îmbătrânirii populației și ca factorul principal al situației social-economice, reprezintă un interes major pentru cercetare în toate țările tehnologic dezvoltate. Schimbările în dinamica fertilității în Republica Moldova, urmează tendințele generale europene, fiind similare cu cele ale țărilor din Europa Centrală și de Est. Transformarea fertilității – trecerea de la modelul timpuriu la cel tardiv, se desfășoară după modelul tipic pentru majoritatea țărilor, care au finalizat, sau sunt în proces de tranziție a fertilității [25].

Ratele de fertilitate, specifice vârstei, sunt variabile, cu tendință evidentă de reducere constantă. În anul 1994, cea mai mare fertilitate a avut loc în rândul femeilor cu vârsta de 25-29 de ani, cea mai scăzută a fost în rândul femeilor cu vârsta de peste 40 de ani. În perioada anilor 1980-1994, ratele de fertilitate pentru femeile mai tinere au scăzut, iar cele pentru femeile cu vârsta de 35-39 de ani au crescut ușor.

În anul 1991, în comparație cu alte țări, Republica Moldova înregistra o rată totală de fertilitate relativ înaltă, care asigura reproducerea generațiilor (2,26 copii per femeie de vârstă fertilă). Însă, într-o perioadă foarte scurtă, începând cu anul 1994, acest indicator a scăzut până la nivelul mai mic de doi copii per-femeie, înregistrând, în perioada următoare, un declin continuu, ajungând la minimul istoric – 1,44 nașteri vii per femeie în anul 2002.

Schimbările structurale ale contingentului reproductiv, ponderea femeilor din diferite subgrupe de vârstă, precum și schimbările de vârstă ale mamei la momentul nașterii, au condus la modificarea structurii nașterilor conform vârstei mamei.

Pe parcursul a trei decenii, observăm o reducere a ponderii nașterilor provenite de la cea mai tânără grupă de vârstă a femeilor, sub 20 de ani, de la 15,1% în anul 1991, până la 5,9% în anul 2020. Proporția nou-născuților de către mamele cu vârsta de 20-24 de ani s-a redus aproape de două ori: de la 39,7% la 22,6%, pe când a celor în vârstă de 25-29 de ani a crescut, în ultimii ani constituind circa o treime din numărul total de nașteri. O creștere importantă se înregistrează și pentru grupele de vârstă a gestantelor cu vârsta de 30-34 de ani și 35-39 de ani. În consecință, se atestă că, în ultimii ani peste 50% din numărul total de născuți vii provin din două grupuri mari de vârstă: 25-29 și 30-34 de ani [8].

Conform Raportului privind situația demografică în Republica Moldova în anul 2022, rata totală de fertilitate a constituit 1,69 copii născuți de o femeie pe parcursul vieții sale fertile, fiind în declin față de anul 2021, când rata a fost de 1,75 copii născuți de o femeie pe parcursul vieții fertile, reducerea constituind 96,6 la sută [26].

Scăderea fertilității la femei începe deja în jurul vârstei de 25-30 de ani, iar vârsta medie la ultima naștere este de 40-41 de ani. Aceste concluzii sunt deduse ca urmare a studiilor științifice realizate în segmentul fertilității naturale și prin FIV. Femeile care au fost părinți pentru prima dată peste 40 de ani, nu au perceput cu exactitate relația dintre vârstă și fertilitate înainte de a concepe prin FIV. Dintre femei, 30% se așteptau ca fertilitatea lor să scadă treptat până la menopauză, la aproximativ 50 de ani, iar 31% au raportat că se așteptau să rămână însărcinate fără dificultate la vârsta de 40 de ani. Motivele pentru o credință greșită în fertilitatea robustă includ amintiri persistente și în curs de desfășurare. mesaje despre prevenirea sarcinii începând din adolescență (23%), stil de viață sănătos și istoric familial de fertilitate (26%) și informații incorecte de la prieteni, medici sau rapoarte înșelătoare ale presei despre sarcini la femei celebre mai în vârstă (28%). Participanții nu au anticipat posibilitatea că ar avea nevoie de FIV pentru a concepe, 44% raportând că au fost „șocați” și „alarmati” pentru a descoperi că înțelegerea lor cu privire la rapiditatea declinului reproductiv legat de vârstă este inexactă”. În retrospectivă, recunoașterea lor tardivă a efectului vârstei asupra fertilității a determinat 72% dintre femei să declare că s-au simțit „norocoase” sau că au „depășit șansele” în a concepe cu succes după FIV [27, 28].

Deși, în medie, o femeie nu va experimenta menopauză până la vârsta de aproximativ 50 de ani, perioada ei eficientă de naștere se poate opri cu aproape un deceniu mai devreme. O femeie la sfârșitul de 30 de ani și, mai ales, la începutul anilor 40 este într-un anumit dezavantaj în ceea ce privește întârzierea concepției, capacitatea de a avea un făt cromozomial normal până la termen și riscul de concepție trisomică. În ciuda unei asocieri clare a scăderii fecundității la femeile în vârstă din cauza multiplelor influențe biologice și sociale, atâta timp, cât individul are

cicluri regulate și parametrii endocrini esențial normali, ea ar trebui să fie candidată pentru o evaluare rapidă a infertilității și inducerea ovulației [29].

Este cert, că una din problemele apărute în perioada fertilității, este informarea și conștientizarea proceselor, care au loc în organismul feminin. Informațiile despre conștientizarea fertilității, ajută la prevenirea apariției unor riscuri ce țin de sarcină, oferă acces mai larg la serviciile prestate de multe clinici în vederea planificării familiale.

Conștientizarea fertilității este mult mai mult, decât doar anatomia și fiziologia reproductivă de bază, deoarece motivează persoanele la studierea și conștientizarea informațiilor de bază despre fertilitate și reproducere, posibilității de a le aplica desinestător și posibilității de a le discuta cu un partener sau cu un profesionist din domeniul sănătății. Conștientizarea fertilității, este fundamentală pentru înțelegerea și luarea unor decizii informate cu privire la sănătatea reproductivă și sănătatea sexuală. Dacă pacientele au o mai bună înțelegere a conștientizării fertilității, se află într-o poziție mai puternică pentru a lua decizii informate cu privire la modul, în care doresc să-și gestioneze sănătatea reproductivă și sexuală. Conștientizarea aspectelor și particularităților perioadei fertilității, permite de a rezolva, preveni și acorda suport în mai multe situații, care au impact asupra sănătății femeii în contextul viitoarei sarcini.

În Ghidul de practică „Vârsta de reproducere avansată și fertilitate” [30], sunt elaborate recomandări, inclusiv, că femeile în vârstă de 20 și 30 de ani ar trebui să fie consiliate cu privire la riscul de infertilitate legat de vârstă atunci, când alte probleme de sănătate a reproducerii, cum ar fi sănătatea sexuală sau contracepția, sunt abordate ca parte a îngrijirii lor primare pentru binele femeilor. Femeile în vârstă de reproducere, ar trebui să fie conștiente de faptul că fertilitatea naturală și succesul tehnologiei de reproducere asistată (cu excepția donării de ovule), este semnificativ mai scăzut pentru femeile la sfârșitul anilor 30 și 40 de ani. Din cauza scăderii fertilității și a timpului crescut până la concepție, care are loc după vârsta de 35 de ani, femeile cu vârsta > 35 de ani ar trebui să fie trimise pentru evaluarea infertilității după 6 luni de încercare de a concepe. Consilierea preconcepțională cu privire la riscurile sarcinii cu vârsta maternă înaintată, promovarea sănătății și greutății optime și screening-ul pentru afecțiuni medicale concomitente, ar trebui luate în considerare pentru femeile > 40 de ani.

Studiile științifice dezvăluie faptul, că femeile în mare parte, se bazează pe o informație greșită privind fertilitatea lor odată cu înaintarea în vârstă.

Astfel, importanța planificării familiale în segmentele conștientizării potențialului reproductiv, au impact semnificativ și beneficii, acest lucru a fost exprimat și în lucrarea științifică „Conștientizarea fertilității și planificarea naturală a familiei” [31], sunt enumerate o categorie de beneficii de la aspectul informării și conștientizării, cum ar fi:

1. Informațiile privind conștientizarea fertilității, sunt folosite pentru a ajuta cuplurile să planifice, sau să evite sarcinile. Acest lucru, deasemenea, poate fi util și pentru cuplurile, care întâmpină dificultăți în a concepe, inclusiv în timpul actului sexual.
2. Informațiile sunt utile pentru cupluri, deoarece le ajută să înțeleagă cum funcționează fiecare metodă de planificare familială - cum metoda de planificare familială întrerupe fertilitatea normală, cum metoda va eșua, dacă metoda nu este utilizată corect și cum revine fertilitatea atunci, când metoda este întreruptă.
3. Femeile care alăptează integral, apreciază cunoștințele despre fertilitatea redusă, la fel ca și femeile din anii de perimenopauză, care apreciază modul de punere la dispoziție a informațiilor clare despre scăderea fertilității lor.
4. Atunci când cuplurilor le este oferită consiliere privind importanța evitării bolilor cu transmitere sexuală, este important ca aceste cupluri să înțeleagă că maladiile cu transmitere sexuală le pot afecta fertilitatea.
5. Printre cuplurile care aleg să folosească doar o metodă de barieră în perioada în care consideră că femeia este fertilă, există grupuri, care nu se identifică cu ușurință în fața furnizorilor de servicii privind planificarea familială. Aceste cupluri adesea nu posedă informații adecvate despre conștientizarea fertilității.

Progresele tehnologice și înțelegerea supraviețuirii ovulației, a ovulelor și a spermei permit a familiariza cuplurile pentru o conștientizare oportună a fiziologiei reproductive și perioadei fertile. Conform studiilor publicate de J.Gallagher „Mai multe despre planificarea naturală a familiei”, se concluzionează că arta planificării naturale a familiei constă în capacitatea de a recunoaște începutul și sfârșitul fazei fertile [32].

Metodele de planificare naturală a familiei se bazează pe observarea de-a lungul ciclului menstrual a semnelor și simptomelor specifice care rezultă din modificări ale nivelurilor circulante ale steroizilor ovarieni, estrogenului și progesteronului în sânge. Există o strânsă asociere între creșterea progesteronului, hormonului luteinizant (LH) și vârfurile de estrogen și ovulație. Metoda temperaturii bazale a corpului (BBT) este adesea încorporată în metodele NFP care utilizează 2 sau mai multe semne și simptome de ovulație și este o modalitate simplă și ieftină de a determina perioada infertilă premenstruală. Cu toate acestea, metoda dată nu este exactă în estimarea zilei ovulației, a perioadei infertile postmenstruale sau a predicției ovulației în timpul amenoreei lactaționale postpartum. Observarea modificărilor tiparelor mucusului cervical poate fi folosită pentru a defini perioada fertilă probabilă a ciclului menstrual, dar produce o gamă largă de zile [33].

Studiind literatura de specialitate, este de menționat, că timpul fertil depinde de mulți factori individuali și, se poate spune, este mai mult o entitate atât fiziologică, cât și statistică.

Pentru unele cupluri, care au mai multe cauze de infertilitate, fertilizarea in vitro este, pe bună dreptate considerată în prezent ca fiind singura opțiune realistă de a avea o sarcină [34].

Șansele de succes pentru FIV și alte tehnici de reproducere asistată reflectă în mod direct conexiunea dintre fertilitate și vârstă, iar eficacitatea acestei proceduri devine semnificativ mai mică cu fiecare an. Odată cu creșterea vârstei femeilor la debutul tratamentului, șansele de a rămâne însărcinate după tratamentul FIV/ICSI scad semnificativ ($p < .01$). În același timp, șansele de pierdere timpurie a sarcinii cresc. Cu toate acestea, rata cumulativă a nașterilor vii în cohorta de pacienți tratați cu fertilizare in vitro, sau injecție intracitoplasmatică de spermă, pentru femeile cu vârsta între 40-42 de ani a fost încă de 31,3% [35].

Prevalența la nivel mondial a rezultatelor adverse ale sarcinii după fertilizare in vitro (FIV)/injecție intracitoplasmatică de spermă (ICSI), este sugerată să varieze. În mai multe cercetări este ipoteza, că sarcinile unice FIV/ICSI au o prevalență mai mare în rezultate perinatale adverse în comparație cu cele concepute natural. Cu toate acestea, lipsește o privire de ansamblu completă [36]. În același timp, un studiu realizat în Norvegia, privind rezultatele reproductive la femei și bărbați concepute prin tehnologii de reproducere asistată, studiu prospectiv bazat pe registru, a finalizat cu concluziile, că persoanele concepute prin tehnologii de reproducere asistată nu au avut un risc crescut de complicații obstetricale sau perinatale atunci, când au devenit părinți. Proporția de persoane concepute prin tehnologii de reproducere asistată cu o sarcină înregistrată, a fost mai mică decât în rândul persoanelor care au fost concepute în mod natural, dar este necesară o urmărire mai lungă pentru a le evalua pe deplin fertilitatea și istoricul reproductiv [37].

În perioada de declin a funcției ovariene, atunci când încă este posibilă utilizarea variantei standard FIV cu folosirea ovocitelor proprii, se atestă o diminuare considerabilă a ratei succesului, fapt asociat cu scăderea progresivă a rezervei ovariene și efectul redus al remediilor utilizate pentru stimularea ovulației [38, 39].

Rezerva ovariană scade de la 20-25 de foliculi în ambele ovare la femeile cu vârsta de 25 de ani, până la 3-5 foliculi la femeile cu vârsta de 40 de ani. Totodată, după vârsta de 35 de ani, la femei crește rata insuficienței fazei luteine și a ciclurilor anovulatorii [40, 41].

Este demonstrat, că rezerva ovariană se consumă din momentul în care s-au constituit ovarele în viața intrauterină, dar mai accelerat atrezia foliculară are loc după vârsta de 35 de ani. Astfel, o bună parte din femeile cu vârsta de peste 35 de ani, necesită testarea rezervei ovariene înaintea inițierii unui tratament prin tehnicile de reproducere umană asistată. Informația

temeinică obținută privind rezerva ovariană la o anumită categorie de vârstă, oferă medicului posibilitatea de a elabora un plan de tratament individualizat.

Expresia hormonală a diminuării rezervei ovariene este reprezentată de augmentarea nivelului hormonilor FSH și LH, iar când concentrația acestor hormoni se dublează, șansele pentru o fertilizare reușită devin deseori nule. De asemenea, utilizarea biomarkerilor AMH (hormonul Antimullerian) și AFC (numărul foliculilor antrali) oferă o informație utilă despre rezerva ovariană. [42, 43].

Într-un studiu recent, de evaluare a markerilor de prognostic ai rezervei ovariene, s-a constatat, că AMH și inhibina B sunt singurii care se corelează cu prezența foliculilor ovarieni evaluată ecografic, iar AMH-ul prezintă o valoare predictivă superioară comparativ cu inhibina [44].

Deși vârsta femeii de peste 35 de ani rămâne un predictor important, problema reală a fertilității este cea a calității ovulului, indiciu care diferă de la o persoană la alta. Consecința acestui proces este scăderea ratei de sarcină și creșterea riscului de avort. Se presupune, că cel mai important factor, care determina calitatea ovulelor este vârsta, și depinde, în bună parte, de caracterul funcției mitocondriale, instabilitatea genomică și stresul oxidativ. Până în prezent, nu există teste directe care ar confirma in vivo calitatea ovocitară, decât dacă calitatea nu este evaluată în cadrul unei proceduri FIV, care oferă informația cum se comportă ovocitele și ritmul lor de dezvoltare după fertilizare, iar calitatea lor slabă, în primul rând, se va reflecta într-o capacitate scăzută a ovocitelor de a se fertiliza [45, 46].

În Republica Moldova, Legea nr. 185-XV din 24 mai 2001 (MO nr. 90-91, art. 697 din 02.01.2001), cu privire la ocrotirea sănătății reproductive și planificarea familială, prevede, ca bărbații și femeile cu vârstă de până la 35 de ani, după testarea lor medico-genetică respectivă, au dreptul de a fi donatori de celule sexuale, iar femeile au dreptul și la înșămânțare artificială și FIV. Modul și condițiile aplicării tehnologiilor auxiliare de reproducere, (înșămânțarea artificială, FIV) sunt stabilite printre regulamente speciale aprobate de Guvern, la propunerea Ministerului Sănătății [47].

Cel mai frecvent, motivele pentru utilizarea acestei proceduri sunt următoarele: insuficiența ovariană precocă, vârsta de peste 43-45 de ani, lipsa ambelor ovare sau lezarea lor ireversibilă, (în multe cazuri ca urmare a suportării de către femeie a unui tratament pentru cancer sau altă afecțiune), mai multe încercări FIV soldate cu eșec, existența unor boli genetice sau a unor malformații genitale. Astfel, pentru femeile care au depășit vârsta de 40 de ani și au primit ovule de la femeile cu vârsta de 20-30 de ani, scade considerabil riscul existenței

problemelor cromozomiale, deoarece acest risc este legat direct cu vârsta donatorului de ovule [48].

Circa jumătate dintre femei cu vârsta de 42 de ani și mai mult, care își doresc o sarcină, se bazează pe ovulele donate, iar procentul femeilor cu vârsta de peste 48 de ani, care se bazează pe astfel de celule, este de 91 la sută.

Calitatea ovulului, care diferă la fiecare persoană trecută de vârsta de 35 de ani, este o problemă reală pentru specialiștii antrenați în FIV. De obicei, în prezent, sunt folosite criteriile morfologice propuse de Gardner D. K., care se bazează pe analiza numărului dimensiunilor, blastomerilor lor și a ratei lor de fragmentare [49].

Unele studii, instrumentate pe loturi masive de ovule prelevate de la femei cu vârsta de peste 35 de ani, indică cert, că modul lor de dezvoltare in vitro, calitatea și rata succesului depinde de vârsta specimenei. Datorită faptului că s-a efectuat numai un transfer solitar, a fost posibil de a corela vârsta femeii cu modul morfologic de dezvoltare in vitro a celulei prelevate de la ea cât și rata succesului după transfer.

Recent, cercetătorii Goto S., și colaboratorii, evaluând scorul pe 1488 de blastociști au relatat, că calitatea lor de dezvoltare in vitro până la transfer, corelează direct cu vârsta femeii. Astfel, cu cât vârsta la femeie este mai avansată, cu atât calitatea blastocistului este mai precară și prin urmare rata reușitei scade [50].

Se sugerează că, în general, aproximativ 85 la sută din embrioni ajunși în uter, pur și simplu nu se implantează, iar o parte din sarcinile incipiente prezintă cariotip anormal, în mare parte ele fiind eliminate prin selecție naturală în funcție de amplitudinea aneuploidiei [51, 52].

Unii embrioni, reușesc să evolueze mai mult, dar se pot pierde prin avort în primul trimestru de sarcină. Încă acum trei decenii, analizele cariotipului la materialul avortat până la 6 săptămâni de sarcină obținută prin FIV, arătau că o bună parte de întreruperi de sarcină erau asociate cu prezența aberațiilor cromozomiale [53, 54, 55].

Se știe că cele mai frecvente aberații cromozomiale sunt aneuploidiile cromozomilor X, Y, 13, 18 și 21. Embrionii cu trisomie al acestor autozomi nu rareori sunt viabili, ceea ce rezultă în nașterea copiilor cu aberații cromozomiale. Necesitatea de a detecta cât mai timpuriu posibil anomaliile genetice a condus la faptul că diagnosticul preimplantațional să reprezinte un domeniu de interes major al medicinei moderne. Studiile bazate pe analiza genetică a embrionilor înainte de implantare arată, că la majoritatea embrionilor sunt prezente diverse anomalii, inclusiv și la cei cu evoluție normală în laborator.

Astfel, actualmente, tot mai multe centre implicate în fertilizarea extracorporală implementează tehnicile de diagnostic genetic preimplantațional, care din an în an devin tot mai precise și cresc randamentul calității programelor FIV.

1.2. Evoluția sarcinii la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani și impactul antecedentelor extragenitale, ginecologice și obstetricale în geneza complicațiilor în sarcină

Deși vârsta maternă înaintată este factorul de risc major al evoluției sarcinii, pe parcursul ultimilor ani, odată cu dezvoltarea tehnico-materială a metodelor de diagnostic și tratament, o serie de studii recente, făcute în clinicile din SUA și vestul Europei, și în Republica Moldova, demonstrează, că pentru o femeie sănătoasă aceste riscuri sunt minimalizate pe parcursul anilor, iar cel mai important factor este sănătatea mamei înainte de a deveni însărcinată [56, 57]. Ca urmare, în ultimele decenii sănătatea prenatală a femeilor se bucură de un interes sporit la capitolul îngrijirea antenatală, planificarea și profilaxia infecțiilor în timpul sarcinii obținute atât pe cale naturală, cât și prin intermediul FIV.

Evaluarea în studiu a modelelor de îngrijire prenatală a identificat câteva variante: model de furnizare universală (pentru toate femeile, indiferent de starea de sănătate, sau de complicații), model restrâns de furnizare bazat pe „risc mai mic” (abordare condusă de moașă sau abordare cu vizite reduse/flexibile pentru femeile sănătoase), model de furnizare crescută (îngrijire prenatală ca în furnizarea universală de mai sus, dar amplificată de clinice, intervenție educațională sau comportamentală). Model de furnizare țintită bazat pe „risc mai mare” (pentru femeia cu factori de risc clinic sau socio-demografic definiți) [58].

Disponibilitatea, eficacitatea și accesul la îngrijirea prenatală sunt direct legate de rezultate bune materne și neonatale, făcând îngrijirea prenatală un determinant important în sănătate. Dar pentru a fi eficiente, îngrijirea antenatală și prenatală urmează să fie întotdeauna adecvată, nu excesivă, nici insuficientă. Rezultatele perinatale variază în interiorul și între țări, cu practici diferite, utilizarea celor mai bune dovezi în deciziile clinice și existența unor ghiduri clare și actualizate. Numărul de vizite pentru îngrijirea standard variază, cu mai puține vizite în studiile din țările cu venituri mici și medii. În studiile din țările cu venituri mari, femeile din grupurile cu vizite reduse au participat, în medie, de 8,2 până la 12 ori [59].

Rezultatele multor studii comparative a grupelor de vârstă a gravidelor, denotă prezența unui risc major de complicații la femeile cu vârsta de peste 35 de ani, care au obținut sarcina prin intermediul FIV, din cauza fonului mai acut preexistent al patologilor în antecedente, și care ar putea evolua cu anumite complicații obstetricale: rata mai mare de nașteri prin cezariană, hemoragie intranatală, diabet gestațional, hipertensiune indusă de sarcină, preeclampsia, și

complicațiile perinatale nefavorabile pentru nou-născut ca naștere prematură, greutate mica a copilului la naștere și necesitatea utilizării unei terapii intensive a nou-născutului [60].

Concluziile studiilor, atestă o concordanță între starea generală a femeii înainte de sarcină și particularitatea de evoluție a sarcinii și starea intrauterină a fătului.

Deși, pe de o parte, la această vârstă femeia își cunoaște bine starea generală și particularitățile fiziologice, și este gata să răspundă adecvat la schimbările ce apar pe parcursul sarcinii, pe de altă parte, în cei 10-20 de ani de viață reproductivă nesolicitată, femeia a „acumulat” un șir de „buchete” cum ar fi: maladii cronice persistente, posibilele boli venerice suportate în trecut, stilul de viață stresant, situația ecologică precară, aderențe postoperatorii, accidente suportate.

Pot fi distinse particularități ale evoluției sarcinii de ordin ginecologic atât la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani, cât și la nivelul obstetrical.

Anamnesticul ginecologic al gestantelor cu vârsta de peste 35 de ani este adesea împregnat de tulburări de sănătate cronice, mai cu seamă, această stare se atestă la femeile care vin să conceapă sarcina prin intermediul fertilizării extracorporale (infertilitatea, diabetul zaharat sau hipertensiunea arterială) [61, 62].

Un studiu realizat de Marianne de Bennetot și co-autorii, privind fertilitatea după sarcina ectopică tubară, constată, că rata cumulativă a sarcinii intrauterine (IUP) la 24 de luni a fost de 67% după salpingectomie și 76% după salpingostomie [63]. La sarcina extrauterină ca geneză de apariție, frecvent se depistează urme ale proceselor inflamatorii suportate anterior. Infecția multiplă uterină, în special în trompele Fallopio, prin suprimarea cililor tubari, crește de 6 ori riscul de sarcină extrauterină. Alt factor de pericol posibil este steriletul, care augmentează de 3 ori riscul unei sarcini extrauterine, iar steriletele cu progesteron cresc acest risc de 6-7 ori [64].

Incidența sarcinilor extrauterine corelează direct cu vârsta femeii și timpul de utilizare a steriletului. Cea mai mare rată de sarcini ectopice apare la femeile cu vârsta cuprinsă între 35 și 44 de ani. La femeile cu vârsta cuprinsă între 35 – 39 de ani, riscul de a dezvolta o sarcină extrauterină este de 2 ori mai mare, iar la cele cu vârsta de peste 40 de ani incidența este de 4 ori mai mare decât la femeile mai tinere. Sarcinile extrauterine au un impact negativ asupra fertilității viitoare [65].

A fost demonstrat în cercetări, că femeile mai în vârstă, în sarcină, prezintă un risc mai mare de naștere prin cezariană, în parte, deoarece au mai multe șanse de a avea naștere prin cezariană fără travaliu. Creșterea incidenței hemoragiei antepartum, și prezentației patologice a fătului, asociată cu nașterea complicată, sau chiar cu apariția necesității operației cezariene [66]. Cu toate acestea, chiar și în rândul femeilor, indiferent dacă travaliul este spontan sau indus,

femeile cu vârstă înaintată sunt mai susceptibile de a suferi naștere prin cezariană. Nașterea prin cezariană pentru diagnosticul de eșec de progres și suferință fetală, a fost mai frecventă la pacientele mai în vârstă, deși gestionarea distociei de travaliu pentru aceste paciente a fost similară cu cea pentru pacienții mai tineri [67, 68].

În ciuda asocierilor raportate între nașterea prematură și o gamă largă de factori socio-demografici, medicali, obstetrici, fetali și de mediu, aproximativ două treimi din nașterile premature apar fără un factor de risc evident. Eforturile de standardizare a definițiilor și de comparare a ratelor de naștere prematură la nivel internațional au adus perspective importante asupra epidemiologiei nașterii premature și a modului în care ar putea fi prevenită [69].

La nivel global, se estimează că 13 milioane de copii se nasc anual înainte de 37 de săptămâni de gestație. Ratele sunt în general cele mai ridicate în țările cu venituri mici și medii și cresc în unele țări cu venituri medii și mari. Nașterea prematură este principala cauză directă de deces neonatal (27%); peste un milion de nou-născuți prematuri decedează anual. Nașterea prematură este, de asemenea, factorul de risc dominant pentru mortalitatea neonatală, în special pentru decesele cauzate de infecții [70].

Cercetarea realizată de Carrie K Shapiro-Mendoza în SUA, privind epidemiologia nașterilor premature tardive și moderate, în primul rând constată, că nașterile premature au crescut cu 33 la sută în ultimii 25 de ani, aproape în totalitate datorită creșterii nașterilor premature tardive (34-36 de săptămâni de gestație). Ce ține de riscurile de morbiditate și mortalitate, adesea subtile, asociate cu nașterea prematură moderată și târzie, inclusiv complicațiile respiratorii, infecțioase și neurocognitive cât și mortalitatea infantilă, acest procent este în creștere pentru gestantele cu vârsta de peste 40 de ani [71].

Este cert că, dacă travaliu prematur este depistat îndeajuns de precoce, nașterea poate fi prevenită sau amânată. Acest lucru, va oferi copilului timp suplimentar pentru a crește și se maturiza. Până și câteva zile în plus pot însemna nașterea unui copil mai sănătos. În articolul *„Particularități de conduită a nașterii premature în dependență de termenul de gestație”* Natalia Bivol, Tatiana Belousov au concluzionat, că nașterea prematură rămâne a fi una dintre cele mai dificile, complexe și delicate probleme ale medicinei și în zilele de azi. Această problemă consolidează diferite specializări din ce în ce mai diverse ale medicinei: de la obstetrică și neonatologie până la imunologie, genetică și cercetare fundamentală, iar cunoașterea tacticii de conduită, va spori monitorizarea de către specialiști a acestor paciente. Dat fiind faptul, prematuritatea este cunoscută drept cauză principală a mortalității neonatale, producând peste 75% dintre decesele la noi-născuți, fiecare zi de prelungire a sarcinii, crește rata de supraviețuire

cu 3%. Și în acest studiu a fost confirmată relația cauză – efect între vârsta gestațională și mortalitatea antepartum și intrapartum, precum și mortalitatea neonatală precoce [72].

Un alt factor de risc pentru sarcina la femeile cu vârsta de peste 35 de ani (preponderent, la gestantele care obțin sarcina prin metoda FIV), este obezitatea și diabetul indus de sarcină. Diabetul gestațional fiind substrat evident pentru creșterea masei fătului, dezvoltă riscul nașterii unui făt macrosom. Astfel conștientizăm, că sarcina este un eveniment diabetogen determinat de hormonii secretați de către placentă (estrogen, progesteron, cortizol, somatotropină corionică umană, hormon lactogen placentar, prolactină), având ca efecte - insulinorezistența, respective, glucoza majorează cu 200-300 % secreția de insulină necesară, pentru satisfacerea necesităților metabolice ale fătului. O cantitate mai mare de glucoză din sânge trece prin placentă în circulația fetală, ca rezultat, glucoză suplimentară în făt este stocată ca grăsime corporală, provocând macrosomie, care este, de asemenea, numită „*mare pentru vârsta gestațională*” [73].

Rezultatele unui studiu efectuat în Scoția, demonstrează că persoanele născute din mame supraponderale sau obeze au un risc crescut de a dezvolta diabet zaharat de tip 2 la un moment dat în viață. Riscul copilului de a dezvolta diabet mai târziu în viață a fost de 26% în cazul femeilor supraponderale și de 83% pentru femeile obeze. Atunci, când a fost evaluat riscul pentru diabet de tip 2, acesta a fost cu 39% mai mare la femeile supraponderale și de 3,5 ori mai mare pentru copiii mamelor obeze. Strategiile bazate pe dovezi, care reduc obezitatea în rândul femeilor de vârstă reproductivă și care ar putea reduce incidența diabetului la descendenții lor necesită abordări bazate pe cercetări în continuare [74].

La gravidele cu vârstă de peste 35 de ani, principalele complicații antenatale și intranatale maternelle sunt HTA indusă de sarcină, legate de caracterul multiorganic al suferinței gestaționale în care conduita, are ca obiectiv, nașterea în siguranță atât pentru mamă, cât și pentru făt [75].

Preeclampsia (asocierea HTA cu proteinurie sau simptome), se dezvoltă la circa 2% din gravide, majoritatea din ele fiind primipare. În Republica Moldova, conduita gravidelor cu hipertensiune în sarcină a tratamentelor efective este reglementată prin Protocolul Clinic Național „Stările hipertensive în timpul sarcinii”. Supravegherea gestantelor este axată pe monitorizarea stării intrauterine a fătului cu efectuarea profilaxiei distress sindromului la făt [76].

Cel mai adesea, în cazul decesului intrauterin al fătului în placenta se determină semne de inflamație, tromboză sau hematom retroplacentar. Una din cele mai frecvente cauze de moarte fetală este considerată decolarea prematură a placentei. Conform literaturii, frecvența desprinderii placentare în corelare cu decesul intranatal a variat de la 6,9% la 14,4% din rezultatele cercetărilor [77, 78].

Conceptul de deces fetoneonatal prevenibil, se referă la toate cazurile, care ar fi putut supraviețui cu o îngrijire mai bună pre, intra și postnatală. Cu alte cuvinte, decesele fetale, ar fi putut fi evitate datorită unei conduite medicale conforme și este important să se facă distincția între factori prevenibili clinic și extraclinic și controlul impactului lor [79].

Relevanța placentei se extinde cu mult dincolo de sarcină, fiind crucială pentru programarea fetală înainte de naștere. Cunoașterea integrativă a acestei structuri materno-fetale ajută semnificativ la înțelegerea dezvoltării sarcinii fie într-un context propriu, fie patofiziologic [80]. Sincronic cu fătul, placenta este un organ, care experimentează o transformare și o creștere incredibilă de la dezvoltarea sa timpurie până la sfârșitul sarcinii [81]. Defect al placentei prezintă o altă cauză posibilă pentru complicații grave în sarcină. Evident, placenta este o structură centrală în sarcină și crește incredibil de rapid în această perioadă, acționând ca o minte în spatele diferitelor procese fetale și materno.

Trofoblastele sunt celule semi-alogene, deoarece sunt derivate din embrion. În acest sens, o posibilă respingere a acestor celule de către sistemul imunitar matern ar fi probabil fatală. Cu toate acestea, trofoblastele exercită acțiuni imunoreglatoare multiple, conducând la un răspuns de toleranță materno-fetală, asigurând astfel placentarea și succesul sarcinii [82].

În timpul celui de-al doilea și al treilea trimestru de sarcină, placenta este un organ cu dezvoltare rapidă și cu multiple modificări care apar atât în această structură, cât și la făt. În săptămânile 10-12 după fecundare, greutatea medie a placentei este de aproximativ 51 g, în timp ce placenta eliberată sau matură este în esență un organ discoid cu o greutate de 500-600 grame, un diametru de 22 cm. și o grosime de la 2-4 cm. Aceste valori, pot varia în cazul sarcinilor anormale sau patologice. Atunci, când această structură nu funcționează corespunzător, ar putea duce la apariția diferitelor complicații ale sarcinii, cu consecințe grave pentru bunăstarea materno-fetală [83, 84].

Ce ține de imunologia placentei, este definit, că sarcina este în special un proces mediat imun, care implică interacțiuni complexe între celulele fetale semi-alogene și celulele imune materno, aspect, care este și unul din scopurile cercetării date.

Interacțiunea dintre aceste celule nu numai că previne respingerea imunității, ci și favorizează și creează un mediu adecvat pentru sarcină.

Placenta este organul în care au loc majoritatea acțiunilor imunomodulatoare.

Comunicarea dintre celulele imune materno și trofoblastele fetale este bidirecțională și sunt mediate în esență de contact direct și prin eliberarea unei multitudini de semnale autocrine, paracrine și endocrine, inclusiv citokine, factori de creștere și molecule de adeziune exprimate pe suprafața celule, cum ar fi integrinele, cadherinele, selectinele și imunoglobulinele [85].

Astfel cum, stabilirea sarcinii, necesită implantarea coordonată a embrionului în decidua receptivă, placentă, invazia trofoblastică a deciduei materne și a miometrului, pe lângă remodelarea arterelor spirale uterine, eșecul oricăruia dintre acești pași poate duce la o serie de complicații ale sarcinii, inclusiv avort spontan, preeclampsie, restricție de creștere fetală, placenta accreta și naștere prematură [86].

La femeile cu vârsta de peste 35 de ani, inclusiv la cele care au obținut sarcina prin metoda FIV, maladiile preexistente ar putea afecta integritatea morfofuncțională și calitatea placentară.

Cu cât vârsta mamei este mai mare, cu atât sunt mai mari riscurile pentru probleme reproductive și complicații în sarcină.

Pentru a identifica riscurile obstetricale de la implantare a zigotului și pe parcursul întregii perioade de evoluție a sarcinii, sunt necesare mecanisme în continuu perfecționate bazate pe dovezi.

Vârsta gestațională avansată poate fi însoțită de anumite probleme în ceea ce privește găzduirea unei sarcini, din motivul posibilei prezenței a patologiilor uterine și a dezvoltării neadecvate a stratului endometrial, la baza stând mai multe cauze: avorturile suportate în trecut, statutul hormonal, subdezvoltarea uterină genetic determinată etc.

La femeile de 35 de ani, rata de succes a implantării produsului de concepție la fertilizarea extracorporală este de 30 la sută, probabilitatea de succes a tratamentului scăzând odată cu vârsta. Totodată, înaintea procedurii de fertilizare și implantare a embrionului în uterul gestantei, pacienta este supusă unei etape de diagnostic și tratament riguros prin care se poate determina atât riscul genetic posibil, cât și maladiile paralele preexistente la momentul dat. Astfel, orice afecțiune care ar putea afecta intra-uterin sarcina, poate fi anticipată.

Deși este cert faptul, că riscul atât pentru mamă cât și pentru copil, crește după vârsta de 35 de ani, în condițiile, când starea generală a gravidei este satisfăcătoare, gestanta are aproape aceleași șanse de a avea o evoluție pozitivă a sarcinii ca și la o femeie cu sarcina concepută prin metoda FIV cu vârsta de 20 de ani.

Evoluția sarcinii obstetricale la o gestantă cu vârsta de peste 35 de ani în primul trimestru de sarcină are particularitățile sale.

Studiile arată că riscul de avort spontan, (pierderea sarcinii înainte de 20 de săptămâni de gestație), este de la 12-15 la sută cazuri, pentru femei cu vârsta de 20 de ani, cu creștere expansivă la aproximativ 25 la sută în cazul femeilor cu vârsta de 35 de ani. Riscul de avort spontan poate să se instaleze anume în prima lună de sarcină. Deasemenea, studiile arată ca 20-30% dintre femeile gravide în primele 4-5 săptămâni, au tendința de hemoragii uterine ca urmare

a insuficienței de progesteron, care va fi sintetizat de către placentă doar în săptămâna a 15-a și a 16-a de gestație [87].

În cazul unei sarcini obținute prin metoda extracorporală FIV, aceste riscuri cresc exponențial, datorită utilizării continue a terapiei hormonale pentru menținerea sarcinii implantate.

În cercetarea Lisova KM, Kalinovska I.V. ș.a., „*Modificări ale nivelului hormonilor complexului fetoplacentar la femeile însărcinate cu avort spontan*”, a fost identificată importanța nivelului hormonal ale complexului fetoplacentar și impactul caracteristic acestor asupra evoluției ulterioare a sarcinii. Astfel, indicatorii nivelului de estradiol au fost de 4,1 ori (76,0%) și de 2,89 ori (65,5%) mai mici la femeile cu avort spontan în perioada embrionară și, respectiv, fetală târzie, comparativ cu femeile sănătoase. Indicatorii nivelului de lactogen placentar și de gonadotropină corionică în perioada embrionară la femeile cu avort spontan au fost mai mici cu 39,1% și, respectiv, 50,9%, comparativ cu femeile sănătoase. În perioada fetală târzie, nivelul acestor hormoni a fost mai scăzut cu 72,9%, respectiv 35,4%. În perioadele embrionare și fetale târzii, nivelurile de progesteron au fost mai mici cu 67,4% și, respectiv, 68,4%, comparativ cu grupul de control. Datele obținute sunt dovezi ale unei anomalii hormonale pronunțate a placentei și, prin urmare, acești hormoni se consideră markeri al disfuncției fetoplacentare, care pe fondul avortului spontan se dezvoltă în stadiile incipiente și continuă să progreseze pe parcursul sarcinii [88].

Cercetătorii preocupați de impactul patologiilor extragenitale, antecedentelor ginecologice și obstetricale pentru caracterul și riscurile evoluției sarcinii relatează prezența unui șir de factori de geneză maternă, fetală, placentară, de mediu, precum și frecvența asociere ai acestora, care influențează dezvoltarea fetală și evoluția fiziologică a sarcinii.

În articolul, autor Corina Iliadi-Tulbure „*Aspecte antenatale și postnatale ale restricției de creștere intrauterină a fătului*”, este argumentat științific faptul, că restricția de creștere intrauterină a fătului se atestă în situația prezenței unui istoric obstetrical, ginecologic și /sau somatic complicat, caracterizat printr-un nivel crescut al morbidității materne. Analiza acestor sarcini, atestă o frecvență considerabilă a maladiilor și infecțiilor ginecologice, precum și prezența în anamneza maternă a întreruperilor de sarcină.

Confirmat, că factorii ce afectează creșterea fetală includ și tabagismul, utilizarea alcoolului, drogurilor și a unor substanțe medicamentoase. Acest fenomen medico-social este mult mai răspândit decât se consideră a fi, necesitând o vigilență sporită [89].

Femeile primipare și multigeste în sarcină concepută la vârsta peste 35 de ani, deasemenea este un subiect de cercetare cu referință la impactul pentru riscurile în evoluție. Cercetările, care

au analizat influența parității sarcinii asupra performanței obstetricale cu comparația incidenței complicațiilor prenatale (hemoragie antepartum, tulburare hipertensivă, intoleranță la glucoză, prematuritate), performanța travaliului (tipul travaliului, modul de naștere) și rezultatul neonatal (greutatea la naștere, scorurile Apgar, internarea la terapie intensivă neonatală, mortalitatea perinatală) ș.a. au obținut rezultate neonatale similare în ambele grupuri. În același timp, mamele primipare în vârstă de 40 de ani și peste au avut evoluție prenatală și de travaliu mai complicate decât mamele multigeste. Pe de altă parte, rezultatele neonatale ale acestor grupuri au fost comparabile [90].

Punctul de reper în cercetare este faptul, că evoluția sarcinii indiferent de vârsta gestantei este în directă interdependență de antecedente personale fiziologice: menarha (ani), caracterele ciclului menstrual, condiții de viață, de muncă (noxe, efort deosebit, adicții etc.), antecedente heredocolaterale (istoricul familial), antecedente personale patologice, antecedente obstetricale și ginecologice: număr de nașteri anterioare, durata, patologia sarcinilor anterioare, date despre travaliu, naștere, greutatea fiecărui copil la naștere (scorul Apgar, născuți morți, malformați, starea actuală de sănătate a copilului/copiilor, evoluția perioadei de lăuzie, număr de avorturi anterioare: spontane sub 14 SA sau/și 14-23 SA + 6z, efectuate chirurgical sau medicamentos, avorturi cu complicații, sarcini ectopice, care sunt important de a fi identificate la etapa conceperii și a gestiona riscurile.

1.3. Aspectele contemporane ale diagnosticului prenatal în sarcinile concepute prin metoda FIV, la gestantele peste 35 de ani

Diagnosticul prenatal se acordă o importanță deosebită în managementul planificării familiale, etapei de concepere și pe tot parcursul evoluției sarcinii, asociat cu consilierea și profilaxia complicațiilor.

Îngrijirile pre-concepționale cuprind un set de intervenții, care permit de a identifica riscurile biomedicale, comportamentale și psihosociale.

Opțiunile de testare se schimbă rapid, odată cu tehnologia emergentă și depind de mulți factori, inclusiv vârsta pacientei, istoricul familial și preferințele. Tehnologiile viitoare ar putea permite în curând transfera diagnosticului prenatal în „terapie in utero”. Astfel, medicina dispune de tehnici curente de diagnostic prenatal invaziv / noninvaziv:

- Ecografia fetală (2D/3D/4D) rămâne cea mai uzitată metodă de screening a malformațiilor fetale datorită disponibilității și lipsei de efecte secundare post expunere comparativ cu RMN-ul sau radiografia fetală.

- Fetoscopia presupune vizualizarea fătului cu ajutorul unui dispozitiv flexibil cu fibra optică (fetoscop), introdus transabdomenal, în vederea identificării unor posibile defecte congenitale și prelevării de țesut fetal (piele și mușchi) pentru diagnostic genetic.
- Diagnosticul genetic preimplantatoriu (PGD) a fost introdus de Handyside în 1990 ca o alternativă la diagnosticul genetic prin tehnici invazive și presupune testarea genetică a embrionilor, după concepția prin fertilizare in vitro.
- Biopsia de vilozități coriale (CVS - chorionic villus sampling) se efectuează în intervalul 10 - 12 săptămâni de gestație pe cale transvaginală sau transabdominală.
- Cordocenteza este procedura de recoltare a sângelui fetal după 20 de săptămâni de sarcină.
- Amniocenteza este procedura de recoltare a lichidului amniotic și se efectuează în trimestrul al doilea de sarcină, începând cu săptămâna 15 de sarcină, procedura aplicată în studiul dat pentru determinarea markerilor imuno și profilul stresului oxidativ [91].

În Republica Moldova se aplică normele de „Asistență și conduită preconcepțională” aprobate prin Ghidul A Național de Perinatologie (capitolul III) și Supliment la Ghidul C Național de Perinatologie “Protocoale de îngrijire și tratament în obstetrică și neonatologie”, în care femeile cu vârsta peste 35 de ani, sunt incluse în nivelul IV de evidență, ce corespunde recomandărilor bazate pe dovezi obținute din studii bine organizate neexperimentale descriptive, așa ca studii comparative, studii de corelare și studiu de caz sau dovezi obținute din raporturile comitetului de experți sau opiniile sau/și experiența clinică a autorităților recunoscute. În același timp pe mai multe aspecte factoriale nivelul de recomandări este „C”, corespunzător viziunii, că mai necesită dovezi obținute din raporturile comitetului de experți și indică absența studiilor clinice direct aplicabile de calitate bună [56, 92].

Termenul optim pentru efectuarea diagnosticului prenatal în primul trimestru de sarcină este de 9 - 14 săptămâni. Screening ecografic prenatal în primul trimestru de sarcină la gestante cu sarcină obținută prin metoda extracorporală permite vizualizarea implantării și sediului (uterin sau extrauterin) a sacului gestațional și numărul lor, vizualizarea prezenței sau absenței embrionilor, numărul lor și activitatea cardiacă, validarea vârstei gestaționale și identificarea unor modificări anatomice la fătului.

Această perioadă de sarcină permite de a fi efectuată biopsia corionului și sunt binevenite testele screeningului serologic. În literatura de specialitate este relatat, că în timpul sarcinii, celulele fetale adecvate pentru testarea genetică pot fi obținute din lichidul amniotic prin amniocenteză, țesutul placentar prin prelevare de vilozități coriale sau sânge fetal. Un dezavantaj major al amniocentezei în trimestrul al doilea este că rezultatele sunt disponibile relativ târziu în

sarcină (după 16 săptămâni de gestație). Alternativele anterioare sunt prelevarea de vilozități coriale și amniocenteza precoce, care poate fi efectuată în primul trimestru de sarcină. Tot în această perioadă, fătul preia o poziție orizontală, fiind ușor accesibil de vizualizat de la vârful capului până la picioare. După 14 săptămâni de sarcină, fătul își poate schimba poziția vertical - intrauterin, astfel ca examinarea poate deveni mai dificilă. Aceste metode de investigație sunt recomandate atât pentru gravidele care au rămas însărcinate prin intermediul procedurii înșămânțării extracorporale, cât și pentru gravidele, care au conceput în mod fiziologic.

Fiind una din tehnici invazive rezultative pentru diagnosticul prenatal, amniocenteza genetică în trimestrul al doilea este o metodă fiabilă și sigură. Indicațiile sunt vârsta maternă înaintată (35 de ani și mai mult), suspiciunea de anomalie genetică la ecografie, antecedente de frați cu sindrom Down și respectiv, triplu screening anormal. În literatură este descris, că rata globală de complicații a amniocentezei genetice din trimestrul al doilea a fost de 1,5%. Conform protocoalelor de diagnostic prenatal o pacientă trebuie să prezinte risc de malformații sau anomalii fetale, care să depășească riscul de avort postprocedural înainte de a efectua amniocenteză sau biopsie de vilozități coriale [93, 94].

Dublul și triplul Test prenatal în perioada trimestrelor I și II de sarcină este un examen pentru diagnostic prenatal în primul trimestru de sarcină. Acest test se efectuează în mod normal în săptămânile a 11-14 de sarcină și ține de prelevarea de sânge de la gravidă cu identificarea hormonilor specifici sarcinii. Dublul test include calculul MoM (multiplu de mediana) pentru fiecare marker (se împarte valoarea obținută la mediana corespunzătoare a vârstei gestaționale); determinarea markerilor serici PAPP-A și beta-HCG liber; corectarea MoM în funcție de datele clinice materne; riscul biochimic de sindrom Down la naștere (calculat pe baza MoM corectat pentru fiecare din cei doi markeri și a vârstei mamei la naștere); riscul de trisomie 18 la naștere (calculat pe baza MoM corectat pentru fiecare din cei doi markeri și a vârstei mamei); calculul MoM pentru translucență nucală (în cazul în care medicul trimitător furnizează laboratorului mărimea translucenței nucale și lungimea cranio-caudală - CRL, estimate ecografic); riscul combinat de sindrom Down (risc biochimic și translucență nucală).

Specificul diagnosticul prenatal pentru sarcinile concepute prin metoda FIV sunt descrise în lucrarea „Reproducerea asistată în Republica Moldova în ultimii 10 ani” autor profesor Veaceslav Moșin și co-autorii. Astfel pregătitoarea cuplurilor durează 1-3 luni cu diagnostic de laborator, care constă din următoarele:

- Excluderea infecției urogenitale (frotiu vaginal, bacterioscopie, analiza la chlamidie și micoplasmă). În caz de infecție urogenitală se aplica tratamentul antibacterian specific al partenerilor, inclusiv sanarea cervico-vaginală.

- Controlul endocrinologic. Analize hormonale (FSH, LH, TSH, prolactină, testosteron, dehidroepiandrosteron sulfat), indicate femeilor cu anovulație persistentă sau cu oligomenoree. În caz de hiperprolactinemie se indica bromocriptină (doza era aleasă în funcție de nivelul prolactinei în serul sangvin). Hiperandrogenia suprarenală era tratată cu corticosteroizi (dexametazonă 0,125 - 0,5 mg/zi). În cazul hipotiroidismului se indica L-tiroxin 25-50 mcg/zi). Medicația hormonală era începută cu cel puțin o lună înainte de ciclul de in vitro fertilizare și continuată până la transferul intrauterin al embrionilor.

- Excluderea factorilor autoimuni. Pentru excluderea factorilor autoimuni ai infertilității se aplica testul la lupus anticoagulant. În caz de lupus anticoagulant pozitiv se aplica tratament cu corticosteroizi dexametazon 0,125-0,5 mg în funcție de gradul de manifestare a reacției la lupus anticoagulant, începând cu două săptămâni înainte de tratamentul de stimulare hormonală.

- Ultrasonografie pelvină. Se evaluaează mărimea și starea uterului. În caz de suspecție la o patologie endometrială se efectuează suplimentar histeroscopia, urmată de un raclaj al pereților cavității uterine. Rezerva ovariană este gradată după numărul de foliculi primordiali în ambele ovare. În funcție de rezerva ovariană este aleasă schema de stimulare hormonală. Foliculii restanți se punctează prin ghidaj ultrasonografic înaintea ciclului de fecundare extracorporală.

- Histerosalpingografia se aplică pentru evaluarea stării trompelor uterine.

- Controlul andrologic include evaluarea datelor clinico-anamnestice cu efectuarea unei spermograme de rutină. În caz de oligospermie severă sau azoospermie, printr-un consimțământ informat, etapa de fertilizare a oocitelor se efectua cu spermatozoizi ai donatorului [95].

Cele mai multe dintre femeile care se decid să facă diagnosticul prenatal, o fac pentru a evita nașterea unui copil cu anomalii cromozomiale. Estimările ratelor tuturor anomaliilor citogenetice semnificative clinic la nașcuții vii la intervale de vârstă maternă de 1 an, variind de la 15 la 49 de ani, au fost descrise în lucrarea autor E. B. Hook, „Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages”. Sindromul Down rezultă din cea mai răspândită anomalie citogenetică semnificativă clinic, dar ratele tulburărilor asociate cu alte anomalii citogenetice de asemenea, cresc cu vârsta maternă și contribuie semnificativ la rata generală la vârstele mai înaintate. Rata estimată a tuturor anomaliilor citogenetice semnificative clinic crește de la aproximativ 2 la 1000 (1 la 500) la cele mai mici vârste materne la aproximativ 2,6 la 1000 (1 la 270) la 30 de ani, 5,6 la 1000 (1 la 80) la 35 de ani. , 15,8 la 1000 (1 la 60) la 40 de ani și 53,7 la 1000 (1 la 20) la 45 de ani [96].

Rezultatele analizei citogenetice, se vor interpreta în dependență de metoda folosită de laborator. În cazul în care, riscul malformației fetale se va adeveri, gestanta va avea posibilitate

de a efectua întreruperea sarcinii, conform indicațiilor medicale. În Republica Moldova, o întrerupere a sarcinii cu astfel de risc, poate fi efectuat până la săptămâna a 21-a de gestație.

Implantarea embrionilor prin metoda „in vitro” presupune o sarcină multiplă, ceea ce contribuie la apariția unui risc major, în cazurile când vârsta femeii este de peste 35 de ani și când starea fizică a gestantei este cu patologii. Aceste situații pot favoriza apariția defectelor genetice la fete și, ulterior pot conduce la o naștere dificilă cu multiple complicații, respectiv un diagnostic sigur, inofensiv și calitativ prenatal este succesul nașterii în siguranță pentru mamă și făt.

1.4. Rolul citokinelor în răspunsul imun la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani

Pentru fiecare gestantă, sarcina, este o provocare din considerentul, că sistemul imun nativ al ei trebuie nu doar să tolereze fătul, ci și să răspundă adecvat la unele patologii, care pot apărea în timpul sarcinii. Astfel, într-o sarcină fiziologică pot apărea anumite particularități de schimbare a statusului funcțional clinic.

În timpul primului trimestru de sarcină, sistemul imunitar al femeii suferă unele schimbări semnificative, menite să protejeze fătul în dezvoltare. Sistemul imunitar al corpului este suprimat pentru a preveni atacul asupra fătului, această suprimare poate fi cauzată de creșterea nivelului de hormoni în timpul sarcinii.

Estrogenul, este un hormon produs în mod normal, în timpul sarcinii și poate ajuta la stimularea sistemului imunitar al femeii. Cu toate acestea, nivelurile ridicate de estrogen din timpul sarcinii pot provoca, de asemenea, o suprimare temporară a sistemului imunitar.

Pe de altă parte, progesteronul, care este un alt hormon produs în timpul sarcinii, poate ajuta la reducerea inflamației în evoluția sarcinii. Această reducere a inflamației poate proteja fătul împotriva atacului imunitar. La femeie gravidă mai poate apărea o leucocitoză neutrofilică la efort fizic, cauza creșterii ei datorându-se măririi volumului de sânge circulant (neutrofile mature, imature). Mediatorul indus de progesteron - PIBF - acționează în favoarea imunității de tip Th2, prin creșterea producției de citokine de tip Th2. Cu excepția implantării și a nașterii, sarcina este caracterizată de un model de citokine Th2-dominant [97].

Fătul exprimă antigene paterne. Acestea sunt recunoscute ca străine, dar (cel puțin în timpul sarcinii normale) nu sunt atacate de sistemul imunitar matern. Recunoașterea imunologică a sarcinii inițiază o serie de schimbări, care în cele din urmă au ca rezultat o atitudine imunologică tolerantă față de făt. Mai mulți actori ai sistemului imunitar, astfel de celule T reglatoare, celule NK și citokine contribuie la crearea unui mediu favorabil pentru făt, iar multe dintre aceste modificări funcționale sunt orchestrate și controlate de progesteron

La pacienții cu FIV, PIBF este detectabil în ser la 14 zile după transferul embrionului. PIBF secretat facilitează producerea IL-3, IL-4 și IL-10, în timp ce suprimă citokinele IL-12 și IFN- γ atât in vitro, cât și in vivo. Neutralizarea PIBF prin anticorpi specifici are ca rezultat o trecere a interleukinelor in vivo, care este, de asemenea, o caracteristică a sarcinilor eșuate [98].

În timpul sarcinii umane normale, concentrațiile serice ale PIBF cresc odată cu vârsta gestațională; concentrațiile mai mici decât cele normale prezic întreruperea spontană a sarcinii [99].

Sarcina sănătoasă este asociată cu o creștere a imunității umorale și o reglare în jos a imunității mediate celular; acest lucru este destul de probabil din cauza unei scăderi a citokinelor de reactivitate Th1 și a unei reglări în sus a citokinelor de reactivitate Th2 [100, 101].

Mai multe mecanisme de protective, funcționează în timpul gestației pentru a corecta efectele nocive ale imunității anti-fetale și pentru a susține un rezultat sănătos al sarcinii.

Conștientizând, că stabilirea sarcinii necesită implantarea coordonată a embrionului în decidua receptivă, placentă, invazia trofoblastică a deciduei materne și a miometrului pe lângă remodelarea arterelor spirale uterine, înțelegem, că eșecul oricărui dintre acești pași poate duce la o serie de complicații ale sarcinii, inclusiv avort spontan, preeclampsie, restricție de creștere fetală, placenta accreta și naștere prematură.

Citokinele sunt proteine mici multifuncționale derivate adesea din leucocite și au fost descrise în primul rând prin acțiunile lor imunomodulatoare. Interfața materno-fetală este considerată a fi imunodeprimată pentru a permite dezvoltarea unității fetale placentare semi-alogene. Cu toate acestea, profilurile de citokine ale deciduei și diferitelor tipuri de celule deciduale sugerează că situația in vivo ar putea fi mai complexă. Datele sugerează că citokinele deciduale nu joacă doar roluri în imunosupresie, ci și în alte aspecte ale stabilirii sarcinii, inclusiv reglarea invaziei trofoblastelor și remodelarea arterei spiralate. Această revizuire se concentrează pe rolul potențial al citokinelor derivate din decidua în etiologia avortului spontan inexplicabil [102].

Relația imunologică dintre mamă și făt este o comunicare bidirecțională determinată, pe de o parte, de prezentarea antigenului fetal și, pe de altă parte, de recunoașterea și reacția la acești antigeni de către sistemul imunitar matern. Acum există dovezi că recunoașterea imunologică a sarcinii este importantă pentru menținerea gestației și că recunoașterea inadecvată a antigenelor fetale ar putea duce la eșecul sarcinii. Citokinele de origine maternă acționează asupra dezvoltării placentare. Pe de altă parte, expresia antigenului pe placenta determină modelul de citokine materne. Sarcina umană normală se caracterizează prin activitate periferică

scăzută a celule Natural Killer (NK), iar activitatea crescută a NK pare să joace un rol în avorturile spontane cu etiologie necunoscută. [103].

Citokinele deasemenea, ca proteine inductibile, sunt denumite și imunohormoni, sau hormoni - reglatori ai răspunsului imun, au proprietatea de a se secreta din orice celulă din organismul uman, excepție fiind eritrocitele, mediatorii interrelațiilor intracelulare, care răspund primele la atacul unui oarecare agent patogen. Din punct de vedere morfofuncțional, șirul citokinelor este determinat prin prezența unei multitudini de proteine și glicoproteine sintetizate de către limfocitele activate și sistemul macrofagal.

Citokinele secretate de către limfocite se mai numesc și limfokine, cele secretate de monocite, - monokine. Împreună cu citokine sunt prezente prostaglandinele, produse pe calea ciclooxigenazei, degradând acidul arahidonic și interferonii.

Una din proprietățile funcției citokinelor este asigurarea sistemului endocrin imunologic cu capacitatea de a dezvolta reacția la pericolul de inflamație.

Unele cercetări au înregistrat niveluri măsurabile ale citokinelor inflamatorii IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6 și TNF-alfa prezente în vagin în timpul sarcinii și al travaliului. Nivelurile vaginale de IL-1 beta și IL-6 s-au dovedit a fi semnificativ crescute la pacienții aflați în travaliu în comparație cu pacienții care nu sunt în travaliu. Totodată determinarea interleukinei-6 în lichidul amniotic s-a dovedit a fi un adjuvant pentru teste rapide pentru a exclude infecția și a prezice nașterea la pacienții cu travaliu prematur și membrane intacte. [104].

Deasemenea în infecțiile genito-urinare, s-a constatat o creștere semnificativă a nivelurilor de IL-1beta și IL-8 în secrețiile vaginale și IL-8 în urină. Ambele citokine ar putea fi utile ca markeri evolutivi ai infecției. Totodată, s-a observat la nivel experimental, că în condiții normale, celulele colului uterin sunt responsabile pentru sinteza IL-8, iar producția de citokine a celulele imunocompetente, cum ar fi macrofagele, limfocitele, NK joacă un rol important în cursul infecției, fiind responsabil pentru apariția răspunsului imun la agentul agresor. [105].

Compararea citokinelor cervicovaginale IL-1 β , IL-6 și IL-8 cu fibronectina fetală (fFN) și dilatația cervicală în predicția nașterii premature, a obținut rezultate doar pentru IL-6, care a demonstrat capacitate de a prezice livrarea în 2 și 7 zile (zona sub curba ROC = 0,63 și, respectiv, 0,75). Folosind 35 pg/ml (centilul 75) ca limită, IL-6 a avut o sensibilitate și o specificitate de 60 și 77% pentru a prezice livrarea în 2 zile și 62 și 80% pentru a prezice livrarea în 7 zile [106].

Clasificate subpopulațiile de limfocite T helper în Th 1 și Th 2 în funcție de citokinele pe care le produc. Celulele de tip Th2, produc interleukine – IL 4, IL 6, IL 8, IL 10, care sunt implicate în așa numita imunitate mediată umoral. Celulele de tip Th 1, produc interferon gama

INF- γ , tumor necrosis factor alfa TNF- α , și interleukine IL 1, IL 2, care sunt implicate în așa numita imunitate mediată celular. Th1 produc citokine cu efect proinflamator. Nivele crescute, se asociază cu calitate mai slabă a ovocitelor, eșec de implantare, avort repetat, etc. Th2 produc citokine cu efect antiinflamator și adjuvant progestațional. Este nevoie de un echilibru biologic între cele 2 tipuri de citokine, pentru ca sarcina să evolueze bine de la implantare până la termen. Un dezechilibru între cele 2 tipuri de citokine cu un raport al Th1 / Th2 dezechilibrat, se asociază cu eșec recurent de reproducere și poate beneficia de tratamente care modulează acest raport cu ameliorarea prognosticului reproductiv [107].

Un număr tot mai mare de dovezi, sugerează un rol al citokinelor în mecanismele responsabile de nașterea prematură asociată cu infecția intrauterină. Interleukina 6, o citokină polifuncțională care este secretată de țesuturile din interfața feto-maternă ca răspuns la produsele microbiene, a fost implicată în răspunsul la infecția intrauterină. Concentrațiile de interleukină 6 au fost determinate printr-un ELISA validat pentru lichidul amniotic uman. O concentrație de interleukină 6 peste 11,2 ng/ml a avut o sensibilitate de 93,7% și o specificitate de 92,3% în diagnosticul infecției intraamniotice [108].

Citokinele pro- și anti-inflamatorii joacă un rol crucial în dezvoltarea și funcțiile placentei. Orice modificare a acestor citokine poate fi asociată cu multe tulburări legate de sarcină, cum ar fi preeclampsia. Raportul echilibrat al citokinelor pro și antiinflamatorii este esențial pentru reglarea sistemului inflamator matern pe tot parcursul sarcinii. Prin urmare, profilarea treptată a citokinelor la femeile gravide poate fi utilă pentru gestionarea preeclampsiei [109].

IL-8 este o chemokină CXC proinflamatoare cu o funcție primară în atragerea și activarea neutrofilelor, dar este implicată și într-o varietate de alte procese celulare. Asemănător cu IL-6 aceste două interleukine sunt exprimate din abundență la interfața feto-maternă de-a lungul unei sarcini și s-a demonstrat că participă la numeroase evenimente legate de sarcină. Rolul cel mai proeminent al IL-8 este atragerea neutrofilelor către locurile de inflamație, dar și promovarea creșterii și diferențierii monocite-macrofage, supravețuirea celulelor endoteliale, proliferarea și angiogeneza. IL-6 și IL-8 și receptorii lor respectivi sunt exprimate în endometrul uman pe tot parcursul ciclului menstrual. Atât IL-6, cât și IL-8 prezintă un model de expresie dependent de ciclul menstrual, sugerând rolul lor în fiziologia endometrială. IL-6 este slab exprimată în timpul fazei proliferative, dar expresia sa crește progresiv după ovulație și atinge vârfuri în timpul fazei secretorii mijlocii până la târzie. Acest model de expresie corespunde temporal ferestrei de implantare, sugerând un rol pentru IL-6 în receptivitatea endometrului. Mai mult, de-a lungul

ciclului menstrual, expresia ARNm a IL-8 atinge vârfurile în faza de proliferare timpurie până la mijlocul timpului și din nou în faza secretorie târzie [110, 111].

Într-un studiu de cohortă retrospectivă au fost incluse o sută trei femei supuse fertilizării in vitro și transferului de embrioni din cauza unui factor tubar. Nivelurile IL-6 din lichidul folicular în ziua extragerii ovocitelor de la fiecare pacient au fost determinate prin ELISA. Au fost investigate relațiile dintre nivelurile IL-6 ale fluidului folicular și parametrii ciclului FIV. Ca rezultat s-a constatat, că nivelurile de IL-6 din lichidul folicular nu au fost afectate de utilizarea medicamentelor pentru superovulație sau de estrogen. În plus, nivelurile IL-6 din lichidul folicular nu au afectat numărul de ovocite extrase sau rata de ovocite. Nivelurile de IL-6 din lichidul folicular nu au afectat numărul de celule sau simetria blastomeră a embrionilor din ziua 3, dar a redus semnificativ rata de fragmentare a embrionului.

Au fost efectuate studii clinice pentru a explora rolul potențial al IL-6 în maturarea ovocitelor umane și dezvoltarea embrionară ulterioară. Până în prezent, răspunsurile nu sunt concludente. Unele studii au arătat că nivelurile ridicate de IL-6 în lichidul folicular au fost bune pentru maturarea ovocitelor, iar în FIV, nivelurile ridicate de IL-6 au fost asociate cu rate crescute de sarcină clinică și implantare de embrioni. Cu toate acestea, alte studii au găsit rezultate opuse. În ciclul FIV, un nivel mai ridicat de IL-6 s-a corelat cu o calitate mai proastă a embrionilor, iar femeile au fost mai puțin probabil să rămână însărcinate [112, 113, 114].

În sistemele de infecție și inflamație care nu sunt gravide, citokina interleukina-10 (IL-10) a fost investigată pe scară largă datorită potențialului său ca imunosupresor cheie ca răspuns la o multitudine de evenimente inflamatorii. În contextul sarcinii, nivelurile de IL-10 cresc semnificativ la femei în timpul sarcinii timpurii și rămân crescute până în al treilea trimestru, imediat înainte de debutul travaliului. Rolul IL-10 în timpul sarcinii ca supresor al imunității active materne, este un subiect în mai multe studii.

Interleukina-10 a fost raportată pentru prima dată de Mosmann și colegii săi, sub denumirea de factor inhibitor al sintezei citokinelor (CSIF) ca o proteină cu capacitatea de a inhiba activitatea celulelor de tip T helper 1 (Th1) inflamatorii [115, 116].

Este dovedit că Interleukina-10 este produsă de un set larg de tipuri de celule, inclusiv celule imune și non-imune [117].

Foarte important, cercetările au arătat, de asemenea, că IL-10 ar putea acționa ca un factor de creștere pentru celulele limfoide și mieloide în anumite condiții, indicând faptul că IL-10 nu a fost doar un imunosupresor [118].

Câteva observații clinice cu privire la sarcină implică rolul unui regulator antiinflamator precum IL-10, în unele studii este susținut postulatul, că un mediu antiinflamator, probabil

dominat de IL-10, a fost amplificat în timpul sarcinii, cel mai probabil ca un mecanism de toleranță față de alogrefa fetală [119].

Exprimarea factorului de creștere endotelial vascular (VEGF), receptorii săi VEGFR-1 (Flt-1) și VEGFR-2 (KDR) și factorul de creștere a placentei (PlGF) au roluri importante în promovarea angiogenezei placentare normale. Tulburările vasculare pot modifica funcția placentară și pot compromite dezvoltarea fătului. Angiogeneza este strâns legată de succesul gestațional. Țesuturile materne și fetale interacționează pe toată durata gestației într-o relație care este total dependentă de stabilirea unei vascularizații adecvate în decidua și corion placentare [120].

Deși amploarea rolului său în dezvoltarea placentară nu este pe deplin înțeleasă, VEGF este exprimat pe scară largă de către celulele endoteliale și de către citotrofoblast și, macrofagele materne și fetale.

În actuala cercetare, s-a evaluat deleția VEGF în co-raport cu vârsta femeilor și în complicațiile induse de sarcină la gestantele cu sarcina concepută prin FIV.

1.5. Profilul stresului oxidativ în evoluția sarcinii concepută prin metoda FIV

Stresul oxidativ a fost mult timp considerat un „accident” al metabolismului aerob; un proces stocastic de producere a radicalilor liberi și lezarea nespecifică a țesuturilor, care este în mod fundamental nereglementat în afară de capacitatea mecanismelor de apărare antioxidantă. În ultimii ani, a avut loc o schimbare de paradigmă în care anumite ROS și RNS au devenit apreciate ca molecule de semnalizare a căror producție poate fi reglată ca parte a transducției de rutină a semnalului celular.

Astfel, în ultimii 10-15 ani, domeniul „cercetării radicalilor liberi” a trecut de la o relativă obscuritate pentru a deveni un element principal al științei biomedicale și din motive întemeiate. Semnificația medicală a stresului oxidativ a devenit din ce în ce mai recunoscută, până la punctul în care acum este considerat a fi o componentă a practic oricărei boli.

Dat fiind faptul ROS sunt utilizate pe scară largă ca mesageri secundi pentru a propaga semnale proinflamatorii sau stimulative de creștere, ascendența biologiei radicalilor liberi fiind atribuită mai multor factori majori a devenit incontestabilă relația inseparabilă dintre stresul oxidativ și inflamația, în același timp descoperirea oxidului nitric (NO) ca vasodilatator și mediator imunitar a stimulat interesul biologilor și clinicienilor tradiționali într-un grad aproape fără precedent. Actual pentru știință este o provocare de a transfera cunoștințele despre patologia oxidativă din laborator în clinică și farmacie. [120].

În timpul sarcinii, stresul oxidativ are un rol important în dezvoltarea embrionului, implantare, dezvoltarea și funcția placentară, dezvoltarea fetală și naștere.

Cercetările axate pe evaluarea stresului oxidativ la femei gravide și făt, au scos în evidență un șir de particularități fiziologice. Spre exemplu, sarcina în sine este considerată sursa stresului oxidativ mai accentuat, în timp ce placenta, este sursă directă de radicali liberi ai oxigenului.

Mai multe studii au examinat influența stresului oxidativ în sarcină și complicațiile asociate atât pentru făt și mame. Interesant este, că în stadiile incipiente ale dezvoltării placentare, o concentrație relativ scăzută de oxigen protejează embrionii timpurii de stresul oxidativ. Cu toate acestea, odată ce dezvoltarea placentară este completă, nivelul său de oxigen crește de aproape trei ori comparativ cu cel din stadiile inițiale pentru a asigura un aport adecvat de oxigen la făt. Evident este important să se mențină un nivel de oxigen bine controlat, în fiecare perioadă a sarcinii. Activitatea antioxidantă este, de asemenea, importantă pentru menținerea nivelului stabil de oxigen în placenta. O epuizare a capacității antioxidante printr-o abundență scăzută de antioxidanți enzimatici sau neenzimatici face celulele vulnerabile la stresul oxidativ [121].

Așa cum odată cu sarcina în organismul matern se formează placenta care are drept scop asigurarea fătului cu oxigen și nutrienți suficienți, așa, are loc invadarea celulelor trofoblaste în miometru și înlocuirea celulelor endoteliale și a musculaturii netede în arteriolele spiralate uterine, care joacă un rol important pentru dezvoltarea fluxului sangvin utero-placentar [104].

La fel, în procesul de creștere și maturizare placentară, au loc schimbări ale funcționării hormonale a organismului, care implică interacțiunea dintre mai mulți agenți vasoactivi, inclusiv citokine, prostaglandine și oxid nitric (NO), care, de asemenea, joacă un rol foarte important în implantarea și menținerea embrionului.

Astfel, datorită dezvoltării intensive a placentei, unde se concentrează un număr mare de mitocondrii, se înregistrează o activitate metabolică sporită, însoțită de o necesitate crescută de oxigen pentru compartimentul feto-placentar, care, în fapt, este o stare de stres oxidativ.

Constatările, că placenta umană este susceptibilă la stresul oxidativ, iar deteriorarea oxidativă la începutul gestației contribuie la apariția complicațiilor mai târziu în timpul sarcinii, inclusiv preeclampsia, stări hipertensive induse de sarcină, diabetul zaharat gestațional, nașterea prematură și restricția creșterii intrauterine, probleme de sănătate acute și cronice pentru mamă care pot duce la pierderea fetală sau la dereglarea fiziologiei sugarului, explică importanța studierii comportării biomarkerilor stresului oxidativ în sarcinile cu risc major de complicații. Metodele actuale de predicție a complicațiilor sarcinii sunt limitate și, deși un număr

mare de factori sunt asociați cu progresia bolii, puțini biomarkeri sunt utilizați pentru a ajuta la diagnosticarea bolii la începutul gestației [122].

În literatura științifică este descrisă implicarea speciilor reactive oxigenate/azotate în apariția stărilor patologice. Dezechilibrul dintre speciile oxidante și sistemul de apărare antioxidant poate declanșa factori specifici responsabili de deteriorarea oxidativă a celulei: supraexprimarea genelor oncogene, generarea de compuși mutageni, promovarea activității aterogene, apariția plăcii senile sau inflamația.

Un studiu științific a inclus 503 femei însărcinate sănătoase la care s-au recoltat mostrele de sânge și urină la 24 până la 26 de săptămâni de gestație și au fost urmărite prospectiv până după naștere. Aceste probe au fost utilizate pentru a evalua o varietate de markeri de stres oxidativ, inclusiv capacitatea antioxidantă totală în plasmă, 8-izoprostan, glutathion peroxidază eritrocitară și activitatea superoxid dismutază și 8-hidroxi-2-deoxiguanozină urinară (8-OHdG). În concluzii s-a constatat, că creșterea stresului oxidativ matern la mijlocul gestației a fost asociat cu complicații ulterioare ale sarcinii [123].

În cercetarea științifică „*Biomarkeri circulanți ai stresului oxidativ în sarcinile complicate*”, este descris variația biomarkerilor : glutathion S-transferazei (GST), a activităților glutathion peroxidazei dependente de seleniu (Se-GPx), catalazei (CAT) și a nivelurilor de substanțe reactive la acid tiobarbituric (TBAR) determinate în eritrocitele și plasma materne în perioada antenatală (în al treilea trimestru) și imediat după naștere. Aceiași parametri legați de stresul oxidativ au fost determinați și în sângele din cordonul ombilical. Rezultatele studiului au sugerat, că stresul oxidativ și peroxidarea lipidică ulterioară însoțesc complicațiile hipertensiunii arteriale, preeclampsiei și diabetului zaharat în timpul sarcinii. Activitatea GST a eritrocitelor materne s-a manifestat drept un indicator sensibil al stresului oxidativ în IDDP înainte de naștere [124].

Speciile reactive de oxigen (ROS), cum ar fi radicalii superoxid, radicalii hidroxil, radicalii alcoxi, precum și intermediarii neradicali peroxidul de hidrogen, ozonul și oxigenul singlet, sunt produse secundare ale metabolismului energetic aerob. Concentrația acestor radicali este menținută la niveluri fiziologice prin activitatea enzimelor antioxidante superoxid dismutază, catalază și peroxiredoxine, precum și prin concentrațiile de glutathion și vitaminele C și E. Când acest sistem devine dezechilibrat, generarea de ROS duce la alterarea funcției mitocondriale, o diminuare a activității proteinelor, deteriorarea acizilor nucleici și inducerea apoptozei. Leziunile tisulare consecutive se manifestă într-o serie de patologii la diferite sisteme de organe [125].

Conceptul de antioxidant în teză s-a utilizat pe baza criteriilor de clasificare existente: enzimatic și neenzimatic, sisteme preventive sau reparatorii, endogene și exogene, primare și secundare, hidrosolubile și liposolubile, naturale sau sintetice. În același timp atenția a fost față de stările de boală asociate cu stresul oxidativ crescut din surse endogene și posibilul avantaj terapeutic al tratamentului antioxidant [126].

În mod normal, organismul dispune de mecanisme antioxidante, care limitează acest proces. Mai mult ca atât, mici concentrații de peroxizi lipidici sunt esențiale și aceste concentrații se pot comporta endogen ca și mesageri intracelulari. Peroxidarea lipidică este un proces care se produce, în mod normal, la nivele mici, în toate celulele și țesuturile, care implică conversia acizilor grași nesaturați în hidroperoxizi lipidici [127]. Acest proces poate fi inițiat de radicalii liberi. Oxigenul poate accepta electronii generați în timpul activităților metabolice celulare.

Fiecare celulă, care utilizează enzime și oxigen pentru a îndeplini anumite funcții, este expusă la reacții ale radicalilor liberi de oxigen, care au potențialul de a provoca daune grave celulei. Antioxidanții sunt molecule prezente în celule, care împiedică aceste reacții, donând un electron radicalilor liberi, fără a se destabiliza ele însele [128].

Intensificarea agresiunilor oxidative și micșorarea eficacității mecanismelor antioxidante de a reduce stresul oxidativ, se poate solda cu complicații multiple ale sarcinii și la făt, poate genera apariția așa - numitelor „boli ale speciilor reactive ale oxigenului în neonatologie” [129].

În cazul dezechilibrului homeostatic redox dintre antioxidanți și radicalii stresului oxidativ, apare riscul pierderii controlului. Normalizarea funcției metabolice depinde de calitatea sistemului antioxidant, care are drept scop protecția împotriva efectelor nocive ale radicalilor liberi oxidativi. [130].

Ca urmare, în mai multe cercetări științifice este identificat, că sarcinile patologice sunt asociate cu un nivel sporit de stres oxidativ, în care radicalii liberi sunt supraproduși și se generează un deficit în apărarea antioxidantă. Când sunt prezenți mai mulți radicali liberi decât pot fi menținuți în echilibru de către antioxidanți, radicalii liberi pot începe să dăuneze țesutului gras, ADN-ului și proteinelor din organism. Proteinele, lipidele și ADN-ul, formează o mare parte a corpului, cu timpul aceste daune pot genera la un număr mare de boli. Acest fapt are o legătură indestructibilă importantă pentru gestanță, funcția placentară și dezvoltarea fetală [131].

A fost studiată literatura științifică privind unele patologii precum hipertensiunea indusă de sarcină (HTA), preeclampsia (PE) și nașterea prematură (NP), care au efecte inițiale asupra copilului în curs de dezvoltare, respectiv, și a mamei în timpul sarcinii, pentru aspectul conexiunii între declanșarea lor și stresul oxidativ. [132, 133, 134]. În literatură este stabilită

înregistrarea dezvoltării afecțiunilor menționate mai sus în mod spontan în multe sarcini la gestante, inclusiv la cele cu vârsta de peste 35 de ani, fără nici o suspiciune prealabilă [135, 136].

Sarcina poate induce hipertensiune la femeile cu stare normotensivă sau poate agrava o hipertensiune deja existentă. Apariția hipertensiunii în ultimul trimestru de sarcină rămâne o problemă obstetricală nesoluționată, mai ales în asocierea cu pre-eclampsia.

Deși în definiția clasică a preeclampsiei (PE) este inclusă prezența celor două criterii: (HTA și proteinurie), unele gravide manifestă HTA și semne de afectare multisistemică care indică severitatea bolii fără ca proteinuria să fie detectată. De aceea, în absența proteinuriei, PE este diagnosticată pe baza HTA asociată cu trombocitopenie (nr. de trombocite $< 100\ 000/\mu\text{L}$), semnelor de disfuncție hepatică (dublarea nivelului transaminazelor serice față de valorile de referință), apariției *de novo* a unei disfuncții renale (valori ale creatininei serice peste 1.1 mg/dL sau dublarea nivelului creatininei serice în absența unei boli renale), apariția unui edem pulmonar sau a tulburărilor cerebrale/vizuale recent instalate [137, 138, 139].

Preeclampsia este o patologie cu o importanță majoră în sarcină. Sunt mai multe articole științifice privind angiogeneza defectuoasă, a dezechilibrelor dintre factorii reglatori ai acestui proces care, cel mai probabil, cauzează această afecțiune. Spre exemplu, unele studii denotă o conexiune directă între stresul oxidativ prezent la nivelul mitocondrial și manifestările clinice consecvente în preeclampsie, caracterizate prin implicarea acțiunii a mai mulți factori, care determină disfuncția celulelor endoteliale cu consecințele corespunzătoare [140, 141].

Exista dovezi, că pacientele cu sarcina concepută prin metodele reproducerii umane asistate cu preeclampsie, au o capacitate de apărare antioxidantă mai mică în comparație cu femeile însărcinate prin metoda obișnuită [142, 143].

Se sugerează, că preeclampsia este asociată cu creșterea peroxidării lipidelor în circulația maternă și placentă și cu scăderea activității moleculelor antioxidante [144, 145, 146].

În consecință, invazia trofoblastică a arterelor spiralate este inhibată, ceea ce limitează remodelarea arterelor spiralate la porțiunile deciduale, în timp ce segmentele miometriale ale arterelor rămân înguste și contractile. Prin urmare, în preeclampsie rezistența vasculară crescută în placentă are ca rezultat o perfuzie uteroplacentară redusă [147].

Interacțiunea componentelor materne (neutrofilele și lipidele susceptibile oxidării) cu celulele placentare, deasemenea, ar putea agrava stresul oxidativ și produce disfuncții endoteliale.

În preeclampsie nivelurile din țesutul circulant și placentar ale markerilor de stres oxidativ sunt crescute și capacitățile antioxidante sunt compromise [148, 149].

Două produse finale majore ale peroxidării lipidelor, malondialdehida (MDA) și 4-hidroxinonenalul (HNE), sunt utilizate frecvent ca indicatori ai peroxidării lipidelor și a stresului oxidativ. Nivelurile placentare și serice ale MDA și 4-HNE, și expresia placentară XO sunt crescute în sarcinile preeclamplice față de cele normotensive, în timp ce nivelurile materne circulante și placentare de antioxidanți, cum ar fi catalaza (CAT), glutatión peroxidaza (GPX) și superoxid dismutază (SOD), sunt scăzute în sarcinile preeclamplice versus normotensive [150, 151, 152].

În timpul travaliului, placenta suferă de ischemie periodică și reperfuzie, ceea ce conduce la creșterea markerilor de stres oxidativ și la modificări ale expresiei genelor. Stresul oxidativ în placenta induce eliberarea de citokine, factori angiogenici și resturi apoptotice în circulația maternă, care pot induce o serie de răspunsuri inflamatorii.

Multe studii au raportat niveluri relativ mai mari ale markerilor de stres oxidativ în sarcinile cu preeclampsie, o boală reprezentativă legată de placentă anormală [153].

În plus, atunci când femeile însărcinate dezvoltă preeclampsie, se modifică și nivelurile markerilor specifici înrudiți, cum ar fi tirozin kinaza solubilă asemănătoare fms (sFlt), factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) și factorul de creștere placentară (PlGF). Acești markeri sunt, de obicei, asociați cu creșterea angiogenă a placentei și ajută clinicienii să prezică boala mai devreme și să prevină complicațiile severe [154].

Într-un studiu prospectiv multicentric de tip observațional (PROGNOSIS), care a inclus 500 de gravide cu vârstă a sarcinii peste 35 de ani între 24 și 36 de săptămâni și suspiciune clinică de preeclampsie, a fost identificată o valoare a raportului crescut de sFlt-1/PlGF de 38, ca având o relevanță predictivă importantă. Într-o etapă ulterioară de validare a studiului pe un lot adițional de 550 gravide, un raport sFlt-1/PlGF ≤ 38 a avut o valoare predictivă negativă (VPN) de 99.3% privind absența PE în următoarea săptămână de la momentul testării [155].

Studiile care cercetează aspectele ce țin de alterările oxidative, precum acumularea excesivă de oxidanți rezultați din metabolismul celular în condițiile unei suprasolicitări a mecanismelor antioxidante, care pot apărea la nivelul componentelor celulare proteice, lipidice sau la nivelul ADN-ului, fapt care, la rândul său, poate genera o toxicitate crescută, sunt în creștere pe parcursul ultimilor trei decenii.

Deasemenea, exista rapoarte contradictorii privind nivelul și comportarea antioxidanților din serurile femeilor cu preeclampsie. Analiza țesutului placentar aparținând unor femei fără patologii a arătat, ca acest țesut suprimă formarea lipoperoxizilor în stadiul târziu al sarcinii, scăzând concentrația lor în sânge și protejând fătul de toxicitatea oxigenului.

Cercetările impactului stresului oxidativ în sarcină, identifică la femei apariția riscului de a avea un copil cu greutate mică la naștere și de a intra în naștere prematură (înainte de 37 de săptămâni de gestație), factori, care rămân principala cauză de morbiditate și mortalitate la nou-născuți, cum ar fi spre exemplu afectarea, aproximativ a 10% dintre nou-născuții în Statele Unite ale Americii. Nașterea prematură (NP) poate fi împărțită în trei grupe: indusă medical (25% din totalul NP), ruptura prematură prematură a membranelor (RPPOM, 25% din total al NP) și travaliu prematur spontan (50% din total al NP) [156].

Un mecanism patofiziologic asociat cu NP spontană este, deasemenea, asociat cu stresul oxidativ. Dat fiind faptul că stresul oxidativ induce deteriorarea ADN-ului și scurtarea telomerilor, ceea ce accelerează senescența dependentă de telomeri a membranelor fetale și are drept rezultat o activare inflamatorie asociată senescenței, care poate contribui la naștere [157].

Travaliul prematur, sau RPPOM, este, probabil, declanșat de îmbătrânirea placentară prematură, cauzată de deteriorarea indusă de stresul oxidativ și senescența prematură a țesuturilor intrauterine, în special a membranelor fetale ale placentei [158].

Desigur, o cantitate adecvată de stres oxidativ în placentă ar putea fi necesară pentru dezvoltarea acesteia, deoarece reglează proliferarea trofoblastelor, diferențierea și invazia, promovează angiogeneza placentară și reglează autofagia și apoptoza necesare pentru placentă normală. Cu toate acestea, dacă nivelurile de stres oxidativ sunt mult mai mari decât de obicei, NP poate apărea mai frecvent. Este de remarcat faptul, că nivelurile crescute de stres oxidativ la femeile însărcinate ar putea cauza disfuncție placentară sau alte leziuni, inducând NP, și ar putea fi responsabile pentru complicațiile apărute la nou-născuții prematuri din cauza schimbului direct de metaboliți în placentă.

Unele articole de revizuire au raportat o asociere între nivelurile biomarkerilor (produse secundare ale stresului oxidativ) și prematuritate și au afirmat, că nivelul de stres oxidativ a fost de obicei, mai mare la speciemenle nașterii premature, decât la speciemenle de naștere la termen. Nivelurile de antioxidanți au fost, deasemenea, raportate mai mici la speciemenle nașterii premature decât la speciemenle de naștere la termen [159, 160]. Aceste rezultate arată o dereglare redox.

În concluzii se constată, că sarcina este susceptibilă la stres oxidativ. În pofida rolului său fiziologic esențial, oxigenul molecular este un potențial toxic în organism, de aceea, o înțelegere mai profundă a mecanismelor care guvernează stresul oxidativ atât în placentă, cât și în endoteliul vascular matern, este posibil să ofere noi oportunități pentru dezvoltarea unor abordări terapeutice inovatoare pentru a preîntâmpina complicațiile induse de sarcină.

Detectarea markerilor de stres oxidativ în fluidele biologice evidențiază necesitatea unor studii suplimentare pentru a valida utilizarea acestora în predicția sau diagnosticarea tulburărilor de sarcină.

1.6. Concluzii la Capitolul 1

În concluzii se constată, că sarcina este susceptibilă la stres oxidativ. În pofida rolului său fiziologic esențial, oxigenul molecular este un potențial toxic în organism, de aceea, o înțelegere mai profundă a mecanismelor care guvernează stresul oxidativ atât în placentă, cât și în endoteliul vascular matern, este posibil să ofere noi oportunități pentru dezvoltarea unor abordări terapeutice inovatoare pentru a preîntâmpina complicațiile induse de sarcină.

Detectarea markerilor de stres oxidativ în fluidele biologice evidențiază necesitatea unor studii suplimentare pentru a valida utilizarea acestora în predicția sau diagnosticarea tulburărilor de sarcină.

Vigilența pentru evoluția sarcinilor concepute la femeile cu vârsta de peste 35 de ani este determinată de riscurile multifactoriale, cum ar fi infertilitatea, istoricul stărilor patologice și maladiilor suportate în antecedente, un șir de alte caracteristici social-economice, care au tangență cu accesul la serviciile medicale și perceperea de către ambii parteneri ai cuplului a importanței comportamentului și conduitei orientate la siguranța în sarcină și la naștere.

Maladiile preexistente și antecedentele obstetricale au un potențial mare pentru a se acutiza și, la rândul său, să producă un impact negativ asupra dezvoltării și evoluției sarcinii.

Conform datelor din literatura de specialitate, procesul inflamator în evoluția sarcinilor la gestante cu vârsta de peste 35 de ani, rămâne a fi un mecanism primordial al complicațiilor induse. Citokinele și chemokinele pro și antiinflamatoare joacă un rol important în patogeniza complicațiilor asociate infecției și a leziunilor fetale.

Markerii stresului oxidativ, antioxidanții non-enzimatici exogeni și endogeni au calități mesagere privind intensificarea agresiunilor oxidative, fiind un semn al declanșării stărilor patologice și complicațiilor induse de sarcină.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

În vederea atingerii scopului și obiectivelor cercetării, metodele de studiu au fost adaptate și optimizate pentru a corespunde tehnicilor de dozare a parametrilor imuno-biochimici în serul sangvin și lichidul amniotic.

Metodele descrise în acest capitol vor permite de a evalua la un nivel științific profund modificările citokinelor și antioxidanților, care în prezent, nu sunt utilizate în diagnosticul clasic, determinați din serul sangvin și lichidul amniotic la gravidele cu sarcina concepută prin metoda reproducerii umane asistate cu vârsta de peste 35 de ani.

Actualmente, nu există informații cu privire la nivelul markerilor biologici ai stresului oxidativ determinați din serul sangvin și lichidul amniotic în sarcinile concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, corelate cu particularitățile evoluției clinice, fapt ce ar putea permite obținerea în continuare a unor informații importante pentru știință.

2.1. Proiectarea cercetării și designul studiului

În corespundere cu scopul și obiectivele propuse spre realizare, studiul dat a fost efectuat la Catedră de Obstetrică și Ginecologie a IP USMF „Nicolae Testemițanu”, în IMSP Institutul Mamei și Copilului, în Centrul Sănătatea Reproducerii și Genetică Umană.

Planul metodologic al cercetării a fost repartizat pentru patru etape (figura 2.1.).

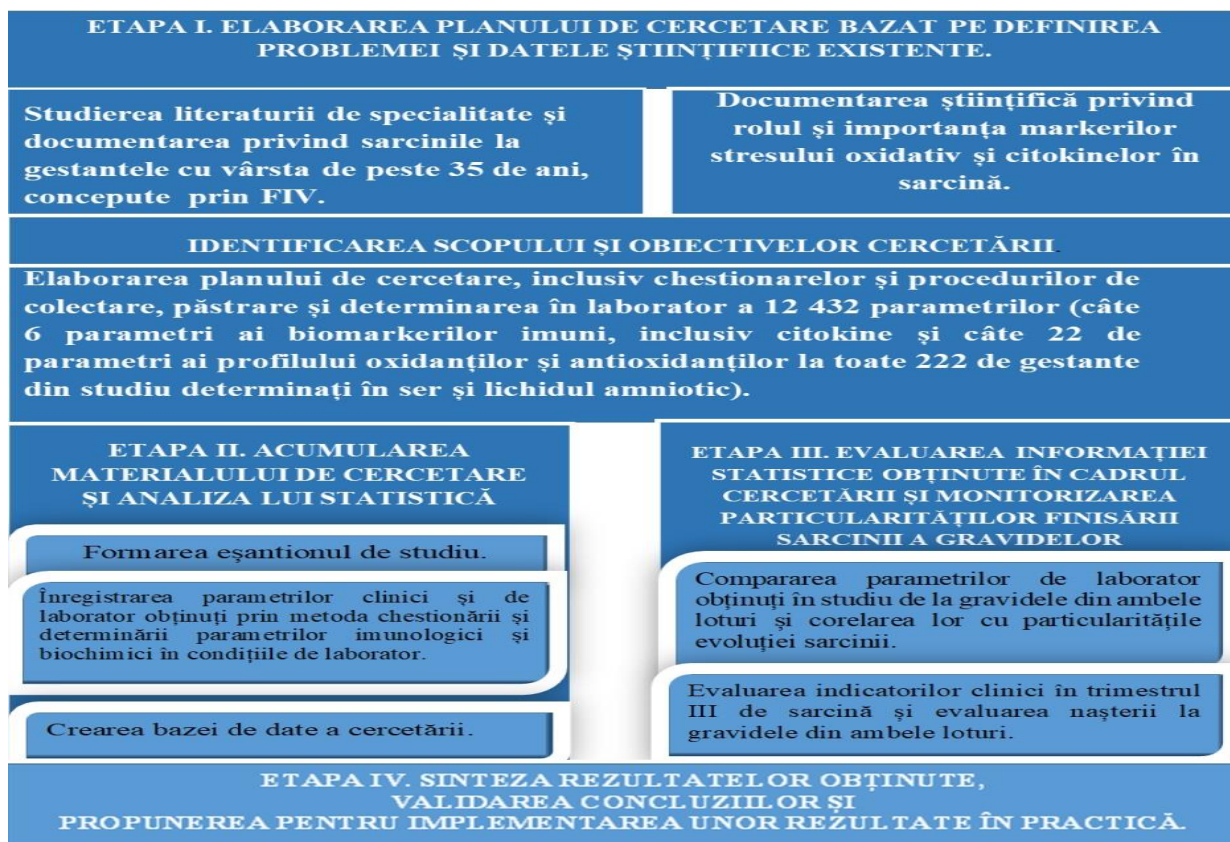


Figura 2.1. Planul metodologic al cercetării

Etapa I. Elaborarea planului de cercetare bazat pe definirea problemei și datele științifice existente.

1. Studiarea literaturii de specialitate și documentarea în domeniul ce vizează evoluția, supravegherea și conduita sarcinilor la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, prioritar concepute prin FIV.
2. Documentarea științifică privind rolul și importanța markerilor stresului oxidativ și citokinelor în sarcină.
3. Identificarea scopului și obiectivelor cercetării.
4. Elaborarea planului de cercetare, inclusiv chestionarelor și procedurilor de colectare, păstrarea și determinarea în laborator a 12 432 parametri (câte 6 parametri ai biomarkerilor imuni, inclusiv citokine și câte 22 parametri ai profilului oxidanților și antioxidanților la toate 222 de gestante din studiu determinați în ser și în lichidul amniotic).

Etapa II. Acumularea materialului de cercetare și analiza lui statistică.

1. Formarea eșantionului de studiu.
2. Înregistrarea parametrilor clinici și de laborator obținuți prin metoda chestionării și determinării parametrilor imunologici și biochimici în condițiile de laborator.
3. Crearea bazei de date a cercetării.

Etapa III. Evaluarea informației statistice obținute în cadrul cercetării și monitorizarea particularităților finisării sarcinii a gravidelor.

1. Compararea parametrilor de laborator obținuți în studiu de la gravidele din ambele loturi și corelarea lor cu particularitățile evoluției sarcinii.
2. Evaluarea indicatorilor clinici în al treilea trimestru de sarcină și evaluarea nașterii la gravidele din ambele loturi.

Etapa IV. Sinteza rezultatelor obținute, validarea concluziilor și propunerea pentru implementarea unor rezultate în practică.

Pentru a atinge obiectivele cercetării, s-a realizat studiul prospectiv de cohortă.

La prima etapă a fost studiată literatura științifică de specialitate corespunzătoare temei de cercetare, cu includerea ei ulterioară în compartimentul bibliografie. Au fost selectate două categorii de subiecte bibliografice privind:

- a. mediatorii imunologici și markerii sistemului antioxidant din sistemul oxidativ (SO) în sarcină și în complicațiile evoluției acesteia, preponderent pentru gestantele de peste 35 de ani.
- b. aspectul apariției și derulării diverselor complicații înregistrate în evoluția sarcinii, care au un impact semnificativ pentru sănătatea mamei și fătului.

În acest scop, au fost studiate articolele privind parametrii care permit monitorizarea gravidelor la etapa de prognostic pentru patologiilor induse de sarcină.

Au fost studiate și selectate atât metodologiile corespunzătoare obiectivelor trasate în cercetare, cât și procedurile care, ulterior, au fost aplicate în studiu.

Au fost definite premisele inițierii studiului, formulate scopul, și obiectivele, și a fost elaborat planul de realizare a tezei (figura 2.2.)

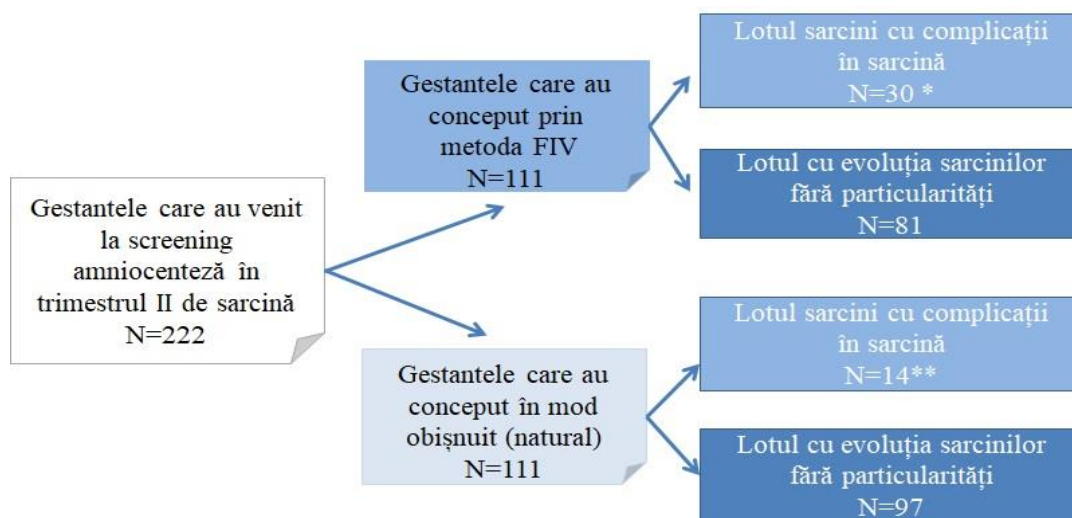


Figura 2.2. **Designul structurii loturilor**

Notă: *Lotul Ic din care N=5 (PE); N=16 (HTA); N=8 (NP); N=1 (DG);

** Lotul Is din care N=11 (HTA); N=3 (NP).

În *Etapa a doua* a fost format eșantionul reprezentativ de studiu și stabilit volumul cercetării, elaborat chestionarul și instrumentele de colectare a datelor, inclusiv acordurile informate pentru participare în studiu și pentru utilizarea datelor personale cu cifrarea lor ulterioară. Pentru studiu au fost selectate 222 paciente. Efectuat studiul prospectiv (de cohortă). Algoritmul studiului dat este elaborat și realizat conform designului prezentat în figura 2.3.

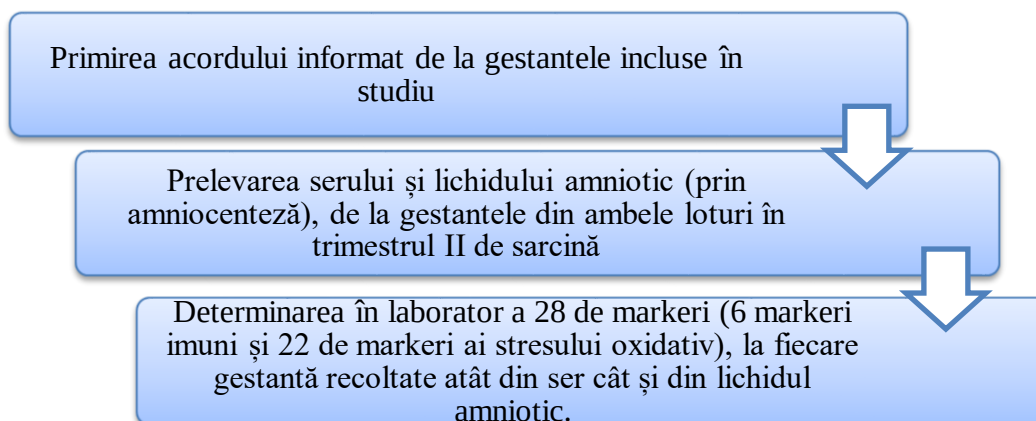


Figura 2.3. **Designul studiului prospectiv de cohortă**

În volumul eşantionului inclus în studiu s-a ținut cont de 10 % rata non-răspuns, astfel, numărul de femei însărcinate incluse în ambele loturi de cercetare a fost 222 de gravide, cu vârsta de peste 35 de ani, inclusiv, 111 gestante cu sarcina obținută prin metoda FIV și 111 gestante cu sarcina obținută în mod obișnuit (natural). Raportul dintre loturile de cercetare a fost 1:1.

Cele 222 de gravide au fost incluse în studiu, începând cu trimestrul al doilea de sarcină (15-19 săptămâni) și au fost consultate în Secția Sănătatea Reproduserii și Genetică Umană din IMSP Institutul Mamei și Copilului, municipiul Chișinău pe parcursul anilor 2011-2013.

Studiul prospectiv a inclus toate gravidele, atât cele cu vârsta ≥ 35 de ani, cu sarcina obținută prin metoda FIV, cât și cele care au conceput în mod obișnuit.

Criteriile de includere a gravidelor în eşantionul de studiu au fost gravidele care aveau vârsta de peste 35 de ani și sarcina obținută prin metoda FIV și gravidele cu vârsta de peste 35 de ani cu sarcina obținută fiziologic, ambele grupuri semnând un acord informat pentru participarea în cercetare.

Criteriile de excludere a gravidelor din studiu au fost gestantele cu vârsta ≤ 35 de ani; insuficiența renală cu creatinina $>130 \mu\text{mol/l}$, maladii hepatice active, insuficiența cardiacă, maladiile sistemice, afecțiuni inflamatorii acute și cronice secundare, infecții bacteriene și virale, dislipidemii, hipertensiune arterială, obezitate ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), diabet zaharat, nivel bazal al glicemiei $>7,0 \text{ mmol/L}$ și acele gestante, care nu au semnat acordul informat.

Loturile selectate au fost comparabile după un șir de criterii, cum ar fi vârstă, datele anamnezei obstetricale-ginecologice și somatice ale gravidei etc.

Colectarea la toate gravidele incluse în studiu, în al doilea trimestru de sarcină, a serului sangvin și lichidului amniotic cu determinarea în condițiile laboratorului universitar a 60 parametri biochimici și imunologici, accentul fiind pus pe markerii citokinici și ai stresului oxidativ. Colectarea datelor obținute și includerea lor în baza de date a studiului (anexa nr. 3.). Toate investigațiile realizate sau încadrate în protocoalele existente în sistemul sănătății.

Concomitent au fost monitorizate gravidele în aspectul evoluției clinice a sarcinii, fiind analizate Fișele individuale a gravidelor și rezultatele investigațiilor realizate conform standardelor de supraveghere antenatală. S-a organizat evaluarea stării de sănătate a gravidelor prin libera comunicare orală la etapa trimestrului doi de sarcină și în perioada lăuziei, cu includerea informației acumulate în baza de date a cercetării.

Etapă a treia s-a rezumat la analiza datelor obținute din investigațiile de laborator și clinice. Selectarea datelor cu valoare statistică semnificativă și analiza lor prin corelarea acestor date cu parametrii evoluției clinice și complicațiilor induse de sarcină înregistrate.

Procesarea rezultatelor studiului dat a fost posibilă prin crearea unei singure baze de date cu toți parametrii incluși. Parametrii calitativi au fost codificați pentru posibilitatea evaluării acestora și a relațiilor în grupurile de studiu. Analiza datelor obținute a fost efectuată pe computer folosind programe standard, Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010, Statistica 10.

Indicatorii calitativi au fost analizați folosind metoda non-parametrică - calculul testului Chi-pătrat, care permite evaluarea semnificației statistice al diferențelor dintre două sau mai multe măsuri relative și Chi-pătratul corectat de Yates pentru continuitate.

Pentru verificarea parametrilor cantitativi s-au aplicat metode parametrice de prelucrarea datelor statistice și metode neparametrice.

La etapa a patra. A fost verificată semnificația diferențelor prin calcularea testului t Student, care a făcut posibilă compararea valorii medii a probelor la distribuția normală a indicatorilor, precum și calculul criteriului U Mann-Whitney pentru a evalua diferențele dintre eșantioanele independente.

Pentru toate valorile numerice cu o distribuție normală, s-au calculat următoarele:

M - medie, m - eroare standard a mediei, σ – standard abaterea, valorile maxime (Max) și minime (Min), precum și mediana (Me) cu calculul quartilelor superioare și inferioare (Q1 și Q3).

La o valoare de $p < 0,05$ (interval de încredere 95%) fiabilitatea intervalului scorul a fost considerată acceptabilă la $p < 0,01$ (interval de încredere 99%); fiabilitatea estimării intervalului a fost considerată satisfăcătoare și la valoare $p < 0,001$ (interval de încredere 99,9%) fiabilitatea estimării intervalului a fost considerată ridicată.

La etapa a cincea au fost formulate concluzii la fiecare compartiment cercetat, corelate cu scopul și obiectivele studiului. Au fost validate concluziile și elaborate propuneri pentru implementarea anumitor rezultate în practică.

Au fost elaborate 2 propuneri inovaționale, care au fost implementate și confirmate prin 4 acte de implementare (în anii 2012-2014 și 2017-2023).

Proiectul de cercetare și protocolul studiului prezent au fost aprobate de Comitetului de Etică a Cercetării al IP USMF „Nicolae Testemițanu” (20.06.2011).

Consimțământul informat în scris pentru participarea în studiu a fost obținut de la fiecare gravidă înainte de includerea în studiu.

Riscuri și beneficii pentru participantele la studiu. Gestantele, implicate în studiu, au fost informate privind scopul cercetării și beneficiile privind determinarea markerilor imunologici și evaluarea echilibrului antioxidantilor prezenți. Pacientele au avut acces la proceduri sigure,

inofensive, nu au fost supuse riscurilor pentru sănătate și sarcină. Rezultatele investigațiilor au fost comunicate fiecărei paciente examinate în parte.

2.2. Termeni, criterii și metode de cercetare

Termeni și criterii. Gestantele cu vârsta de peste 35 de ani sunt definite ca femei cu vârstă avansată la momentul conceperii atât în sarcina primipară sau multipară.

Sarcina a fost definită ca perioada de la fertilizarea ovulului prin metoda FIV sau obișnuită până la naștere, indiferent de rezultat. Începutul sarcinii a fost definit folosind prima zi a ultimei menstruații înregistrate, sau a fost calculat de la data estimată a nașterii. Finalizarea sarcinii a fost înregistrată la data nașterii.

Pentru realizarea scopului și obiectivelor trasate în studiu au fost aplicate metode de cercetare moderne, ajustate cercetării. Au fost utilizate următoarele parametrice pentru cercetarea subiecților incluși în studiu: metoda de chestionare, metode paraclinice de laborator, examenul ultrasonografic fetal, aprecierea stării nou-născutului la naștere, riscurile apariției complicațiilor în evoluția sarcinii la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, identificarea markerilor imunologici și ai stresului oxidativ în perioada trimestrului doi de sarcină. În scopul elucidării algoritmului de risc al evoluției sarcinii în raport cu markerii determinați ipotetici predictivi în perioada trimestrului doi de sarcină, din sângele și din lichidul amniotic al gestantelor incluse în cercetare au fost prelevate probe pentru investigarea lor.

Metoda de chestionare. Colectarea materialului științific prin metoda de chestionare a gravidelor a debutat prin-un interviu standard, având drept scop selectarea datelor anamnestice ale gestantelor referitoare la vârstă, antecedentele personale patologice, acuzele prezentate, identificarea anamnezei obstetricale și ginecologice complicate și starea generală la momentul chestionării.

Chestionarul a fost aprobat de către Comitetul de Etică Medicală al USMF „Nicolae Testemițanu”, (Anexa nr.1).

Pentru a determina numărul de cazuri în studiul științific a fost utilizată formula lui Mills:

$$n = 9 \times N \times V^2 / ND^2 + 9V^2$$
, unde:

N – este numărul de cazuri pentru studiu,

D – este eroarea relativă 5% (0,05),

N – este volumul colectivității generale,

V – este dispersia relativă, egală cu 0,3.

Pornind de la calculele estimate la etapa elaborării materialelor și metodelor, numărul total al gravidelor implicate în studiu urma să fie minimum 200 pentru a asigura posibilitatea de a efectua o analiză bazată pe dovezi. Ținând cont, că proporția necesară pentru a respecta

valoarea concludentă este de 1:1, gestantele cu sarcina obținută prin reproducere uman asistată și gestantele sarcina cărora este obținută prin reproducere obișnuită, au fost selectate și acceptate pentru studiu 222 de gestante.

Toate femeile incluse în studiu au semnat acordul informat pentru participare la screeningul prenatal în cadrul Departamentului Obstetrică și ginecologie.

Astfel, gravidele au fost împărțite în două loturi, în funcție de concepere:

Lotul I - 111 gestante cu vârsta de peste 35 de ani, cu sarcina obținută prin metoda extracorporală (FIV). Vârsta medie a gestantelor a constituit $45,1 \pm 2,3$ de ani.

Lotul II - 111 gestante cu vârsta de peste 35 de ani, care au conceput sarcina fiziologic. Vârsta medie a gestantelor a constituit de $45,1 \pm 2,3$ de ani.

2.3. Metodele clinico-paraclinice aplicate în cercetare

Cercetarea integrală și selectivă a rezultat din evaluarea indicilor antropometrici generali – înălțimea, masa corporală, indicele masei corporale (IMC), tensiunea arterială.

Astfel, IMC (kg/m^2) s-a calculat după formula $= \text{masa corporală, kg} / [\text{înălțimea, m}]^2$. Supraponderea s-a stabilit atunci, când $\text{IMC} = 25 - 29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, iar obezitatea a fost diagnosticată atunci când $\text{IMC} > 30 \text{ kg}/\text{m}^2$.

Anamneza ginecologică a inclus în sine colectarea datelor privind începutul și caracterul vieții sexuale; informațiilor referitoare la vârsta apariției menarhei, intervalul intermenstrual, durata sângerărilor, caracteristicile fiziologice a menzisului (prezența durerilor și disconfortului în perioada menarhei, regularitatea, cantitatea, dismenoreia), caracteristicile și particularitățile ciclului menstrual (durată, intervalul, regularitatea), dereglările în abundența menstruală (hiper-, hipo-, poli-, oligomenoree, ș.a.); intervențiile chirurgicale ginecologice suportate; contracepția utilizată; date despre prezența sterilității primare sau secundare; patologia uterului și anexelor.

Anamneza obstetricală a gravidelor a cuprins: numărul de sarcini, nașteri, avorturi (spontane și medicale) efectuate, sarcini stagnante; evoluția sarcinilor precedente și a complicațiilor apărute.

Anamneza ginecologică a gestantelor a cuprins enumerarea patologiilor ginecologice preexistente.

Examenul obiectiv general a constat în aprecierea stării generale, tipului constituțional; caracterul pilozității, de repartizare a țesutului adipos subcutanat; starea mucoaselor și tegumentelor. La examinarea pacientelor, selectarea, stocarea și prelucrarea datelor pentru prezentul studiu, au fost folosite *metodele clinice*: anamneza vitae, examenul obiectiv general, anamneza obstetricală și ginecologică.

Metodele paraclinice: examenul ecografic, prelevarea serului venos și lichidului amniotic (amniocenteza din săptămâna a 15-19-a a sarcinii); Metodele de investigații paraclinice de rutină (citologice, serologice, biochimice, imunochimice, bacteriologice etc.), recomandate la planificarea sarcinii.

Examinarea ginecologică a fost orientată spre evaluarea stării organelor genitale externe, vaginului, colului uterin și gradului de maturare.

Pacientele au fost supuse unui examen ultrasonografic, care a oferit date despre localizarea fătului și a placentei, starea contractilă a uterului înaintea procedurii invazive de amniocenteză. Examenul ultrasonografic a identificat cantitatea lichidului amniotic (oligoamnios sau polihidramnios), a concretizat riscurile procedurii prenatale de diagnostic citogenetic.

Metodele de investigații *biochimice și imunochimice*, special selectate pentru atingerea scopului și obiectivelor tezei. Metode de prelucrare statistică a rezultatelor obținute.

Testarea pentru anomalii genetice este recomandată de către medicul obstetrician-ginecolog sau genetician, individual, în conformitate cu istoricul familial și consultul genetic. Acordul bilateral semnat anticipat în trimestrul trei de sarcină (săptămânile a 15 - 19), vizează aprecierea malformațiilor fetale prin metoda de amniocenteză. Detectarea anomaliilor cromozomiale (sindromul Down sau trisomia 21), a maladiilor familiale, ereditare, transmise de la părinți (precum talasemia, fibroza chistică, distrofia musculară) sau a altor afecțiuni genetice este posibilă prin realizarea metodelor de diagnostic citogenetic.

Procedura de amniocenteză a fost efectuată în condiții aseptice sub ghidaj ecografic transabdominal, când prin intermediul unui transductor, s-a extras cu o seringă sterilă o cantitate de 20 ml lichid amniotic. La extragerea lichidului amniotic, imediat au fost apreciate obiectiv, - culoarea, cantitatea, opacitatea, și densitatea lui.

După centrifugare la 2000 tur/min timp de 5-7 min, supernatantul obținut se transferă în eprubete speciale criorezistente, după care, pentru păstrarea de lungă durată a lichidului amniotic, se depozitează la o temperatură de minus 80 grade Celsius în refrigerator.

În continuare, cu acordul (consimțământul) și semnătura gestantei au fost prelevate probe de sânge, câte 3 ml din vena cubitală în 2 vacutainere, unul din care conține EDTA în calitate de anticoagulant.

După centrifugare la 2000 tur/min timp de 5-7 min, serul și plasma sangvină se repartizează în câte 2 eprubete Ependorff (pentru serul pacientelor) și 2 eprubete (pentru plasma sangvină). Eprubetele au fost refrigerate imediat și vor fi păstrate la temperatură de minus 80 grade Celsius. Ulterior, conținutul lor va fi folosit pentru cercetările parametrilor biochimici și imunologici.

Determinarea citokinelor și chemokinelor în materialul biologic a fost efectuată cu folosirea kiturilor „Mini ELISA Development Kit ai firmei PeproTech, SUA”. Aceste kituri conțin componentele de bază necesare pentru determinarea cantitativă a citokinelor și chemokinelor (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, SDF-1 α , VEGF).

Determinările au fost efectuate conform instrucțiunilor anexate la kituri, cu unele modificări. Principiu. Termenul ELISA – "enzyme-linked immunosorbent assay", a fost introdus în anul 1971 de Engvall și Perlmann, pentru descrierea unei metode de dozare imunologică a concentrațiilor antigenilor, bazată pe utilizarea enzimelor.

Metodele ELISA - sandwich sunt metode sensibile, care permit detectarea și dozarea specifică a citokinelor și chemokinelor proteice solubile.

Metodele ELISA - sandwich pentru dozarea citokinelor, se bazează pe utilizarea anticorpilor anticitokinici de înaltă purificare („*capture antibodies*”), care sunt adsorbiți necovalent („*coated*”) pe microplăci din plastic și servesc pentru capturarea specifică a citokinelor solubile din eșantionul de material biologic. După înlăturarea materialului neatașat, citokinele fixate la microplacă sunt detectate cu ajutorul anticorpilor anticitokinici conjugați cu biotina („*detection antibodies*”) și adivină sau streptavidină marcată enzimatic. După adăugarea substratului cromogenic, nivelul produsului colorat generat poate fi determinat prin spectrofotometriere la un spectrofotometru cu microplăci sau rider ELISA.

Reagenți:

1. Soluția de legare (Binding Solution): 0,1 M Na₂HPO₄, se ajustează pH-ul la 9,0 sau 6,0 cu 0,1 M NaOH.
2. Soluție PBS: 80,0 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 2,0 g KCl; se aduce volumul la 10 L; se ajustează pH-ul la 7,0-7,2.
3. Soluție PBS/Tween: 0,5 ml Tween-20 se dizolvă în 1 L PBS.
4. Soluție tampon de blocare (Blocking Buffer): se pregătește 1% albumină serică de bovină (BSA) în PBS. Tamponul de blocare se filtrează pentru înlăturarea particulelor.
5. Soluție tampon de blocare/Tween (Blocking Buffer/Tween): 0,5 ml Tween-20 se dizolvă în 1 L Blocking Buffer.
6. Soluția de substrat tetrametilbenzidină (TMB): se pregătește soluția de lucru a TMB *ex tempore* prin amestecarea volumelor egale de Reagent Substrat A și Reagent Substrat B (pentru o planșetă cu 96 godeuri se prepară 12 ml de soluție de lucru de TMD prin amestecarea a 6 ml Reagent Substrat A și 6 ml Reagent Substrat B).

7. Reagent Substrat A TMB: se adaugă 150 mg reactiv la 500 ml de 0,1 M acid citric anhidru în H₂O bidistilată; pH-ul se aduce la 4,35 cu NaOH. Se pregătesc aliquote de 100 ml și se păstrează la temperatură de minus 20°C.

8. Reagent Substrat B: se adaugă 10 ml sol.30% H₂O₂ la 90 ml de H₂O bidistilată. Se păstrează la întuneric, la frigider la o temperatură de plus 4 °C.

Tehnică:

1. *Fixarea anticorpilor de captare (capture antibody)* pe suprafața godeurilor microplăcii ELISA: se diluează anticorpii de captare în Soluția de legare (Binding Solution) până la concentrația finală 1- 4 μg/ml. Apoi se toarnă câte 100 μl de anticorpi diluați în godeurile microplăcii ELISA cu capacitate crescută de fixare a proteinelor (high binding). Pentru prevenirea evaporării, microplăcile se acoperă cu capac și apoi se incubează peste noapte la temperatură de 4°C; blocarea (Blocking): microplăcile se aduc la temperatura camerei, se înlătură soluția de anticorpi de captare și apoi, pentru a preveni legarea nespecifică a anticorpilor, se toarnă câte 300 μl de tampon de blocare (Blocking Buffer) în fiecare godeu; microplăcile se acoperă cu capac și se incubează la temperatura camerei pentru 1-2 ore; se spală microplăcile de ≥3 ori cu PBS/Tween.

2. *Aplicarea standardelor și a materialului biologic:* se pregătesc diluțiile de lucru ale standardelor (dizolvate în tampon de blocare);

- a. se toarnă câte 100 μl de fiecare diluție de lucru ale standardelor și material biologic (dizolvate în Tampon de blocare) în fiecare godeu;
- b. microplăcile se acoperă cu capac și se incubează pentru 2-4 ore la temperatura camerei sau peste noapte la temperatura de 4°C;
- c. se spală ≥ 4 cu PBS/Tween cu o pauză de 1 min între spălări.

3. *Aplicarea anticorpilor de detectare (Detection antibody):*

- a. se diluează anticorpii anticitokinici biotinilați de detecție (Detection antibody) în soluție tampon de blocare/Tween până la concentrația 0,5-2 μg/ml. Se toarnă câte 100 μl anticorpi de detecție diluați în fiecare godeu;
- b. microplăcile se acoperă cu capac și se incubează 1 oră la temperatura camerei;
- c. se spală ≥ 5 cu PBS/Tween cu o pauză de 1 min între spălări.

4. *Aplicarea Adivin-peroxidazei din hrean (Av-PH):*

- a. se diluează conjugatul Av-PH sau alt conjugat enzimatic până la concentrația optimă în Tampon de blocare/Tween.
- b. se toarnă câte 100 μl anticorpi de conjugat în fiecare godeu;
- c. microplăcile se acoperă cu capac și se incubează 30 min la temperatura camerei;

d. se spală ≥ 7 cu PBS/Tween cu o pauză de 1-2 min.

5. *Aplicarea substratului:*

- a. se toarnă atent câte 100 μ l substrat tetrametilbenzidină (TMB) pregătit *ex tempore* pe fundul fiecărui godeu și se incubează la temperatura camerei pentru 5-30 min. Se evită atingerea cu vârful pipetei de pereți și agitarea soluției;
- b. se măsoară absorbanta fiecărui godeu utilizând cititorul pentru microplăci la 450 nm;
- c. calcularea rezultatelor se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de citokină.

Multe studii confirmă importanța stresului oxidativ și legătura cu complicațiile care pot fi induse de sarcină și care pot influența dezvoltarea fătului. Cele mai importante dintre motivele apariției stresului oxidativ cu impact negativ sunt lipsa de nutriție și oxigenare a fătului în curs de dezvoltare, fapt care provoacă hipoplazie și perturbarea funcției placentare [127, 128].

Din 60 de parametri determinați din ser și lichidul amniotic cu valori semnificative statistic s-au rezumat următoarele investigații ai markerilor antioxidanți ai stresului oxidativ: semnificative statistic s-au rezumat următoarele investigații:

Determinarea markerilor prooxidanți ai stresului oxidativ:

1. Hidroperoxizii lipidici (HPL timpurii (hexan), uc/ml)
2. Hidroperoxizii lipidici (HPL intermediari (hexan), uc/ml)
3. Hidroperoxizii lipidici (HPL tardivi (hexan), uc/ml)
4. Hidroperoxizii lipidici (HPL timpurii (izopropil)- uc/ml)
5. Hidroperoxizii lipidici (HPL intermediari (izopropil)- uc/ml)
6. Hidroperoxizii lipidici (HPL tardivi (izopropil)- uc/ml)
7. Produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA)
8. Dialdehida malonică (DAM μ M/l)
9. Oxid nitric (NO μ M/l)
10. Compuși de glicare avansată (AGE μ g/L)
11. Albumina ischemică modificată (AIM)

Determinarea markerilor antioxidanți:

1. Activitate antioxidantă totală hexan (AAT-hexan mM/s.L)
2. Activitate antioxidantă totală izopropanol (AAT-izopr. mM/s.L)
3. Peptide histidinice Carnozina μ M/l
4. Catalaza μ M/l

5. Determinarea activității superoxiddismutazei (SOD u/c)
6. Gr Tiolice ale proteinelor
7. Tyoredoxina
8. Glutaredoxina
9. Determinarea activității γ glutationreductazei. (γ – GR nM/s.L)
10. Nivelului de Glutation S Transferaza (GST μ M/min. L)
11. Activitatea glutacion peroxidazei (GPO nM/s.L)

Toate datele au fost prelucrate statistic cu diferite teste, utilizând software statistic IBM® SPSS® 22.0.0.0. În cadrul fiecărui lot inclus în studiu s-a efectuat analiza statistică descriptivă, cu determinarea mediei, deviației standard, medianei, percentilei 25 și percentilei 75.

Pentru compararea șirurilor de valori între loturi s-a folosit testul non-parametric Mann-Whitney, deoarece distribuția valorilor a fost asimetrică. Pentru evidențierea corelațiilor între valorile parametrilor studiați și apariția complicațiilor în evoluția sarcinilor s-a utilizat metoda Spearman.

Datele acumulate au fost analizate statistic, astfel efectuând sistematizarea rezultatelor, formularea concluziilor și elaborarea recomandărilor practice.

Metodele investigațiilor sunt descrise în Anexa nr.3

2.4. Metoda prelucrării statistice a rezultatelor

Prelucrarea rezultatelor studiului dat, erau efectuate în conformitate cu principii medicinei bazate pe dovezi.

Prelucrarea statistică a inclus calculul indicatorilor statistici primari cu determinarea diferențelor dintre două loturi, cât și identificarea unei relații dintre variabile, utilizând analiza corelației parametrice și neparametrice, analiza discriminantă și cluster.

Prelucrare statistică primară, a inclus calculul mediei aritmetice (M), erori mediei aritmetice (m), abatere standard (đ), toate aceste pentru indicatori cantitativi.

Statisticile descriptive pentru datele continue au inclus estimarea indicatorilor tendinței centrale (media sau mediana, ultima fiind folosită mai des din considerentele că marea majoritate din datele continue nu au fost distribuite normal) și indicatorilor de împrăștiere (abaterea standard sau abaterea intercvartilă (AI)), pentru datele de rang sau nominale/dihotomice au fost prezentate frecvențe absolute și proporții. Astfel, a fost identificat coeficientul de corelație Spearman, numit coeficientul de corelație a rangurilor, care se definește ca coeficientul de corelație Pearson pentru aceste ranguri. Acest tip de coeficient de corelație este recomandat atunci, când se cercetează existența unei relații de monotonie între două caracteristici.

Rezultatele studiului au fost supuse unei analize matematice computerizate cu ajutorul programelor Microsoft Access și Excel 2007. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic cu calcularea parametrilor seriei variative, mediei aritmetice (M), erorii medii (m) și a valorii intervalului de fidelitate a mediei aritmetice. Relevanța statistică (P) în interiorul lotului și între diferite loturi s-a calculat după criteriul Student și Pearson (χ^2) cu o probabilitate mai mare de 95% ($p \leq 0,05$) pentru variabilele cantitative cu o distribuție normală.

Partea principală a prelucrării statistice a fost efectuată pe computer personal folosind o statistică software-ul SPSS (Pachetul Statistic pentru Științe Sociale).

2.5. Concluzii la Capitolul 2

Metodologiile aplicate au permis argumentarea actualității problemei, cu formularea scopului și a obiectivelor de cercetare.

Studiul este realizat din punct de vedere metodologic complex, cu identificarea criteriilor de includere și excludere a gestantelor în eșantion și a spectrului biomarkerilor determinați din serul sangvin și lichidul amniotic. Definitivarea eșantionului de 222 de gestante cu vârsta de peste 35 de ani, sarcina obținută prin metoda FIV și sarcina concepută natural, a permis colectarea datelor comparabile și identificarea variațiilor caracteristice.

Metodele clinico-paraclinice utilizate în cercetare au oferit posibilitatea evaluării impactului factorilor de risc pentru concepere în vârstă peste 35 de ani cât și corelarea particularităților evoluției sarcinii cu amplificarea markerilor imuni și ai stresului oxidativ, determinați din serul matern și lichidul amniotic.

Utilizarea în cercetare a metodelor și instrumentelor statistice, argumentarea matematică a indicatorilor obținuți în trimestrul al doilea de sarcină, au permis obținerea rezultatelor, formularea concluziilor și elaborarea recomandărilor practice.

3. PARTICULARITĂȚILE ANAMNESTICO-CLINICE ALE SARCINII LA FEMEILE CU VÂRSTA DE PESTE 35 DE ANI INCLUSE ÎN STUDIU

3.1. Aspectele clinico-anamnestice ale gestantelor din cercetare

În contextul scopului stabilit în cercetare, s-a reușit identificarea particularităților anamnestice ale gravidelor din ambele loturi cu evaluarea riscurilor pentru sarcină.

A fost analizat profilul pe vârste, mediul de reședință, nivelul de educație și statutul ocupațional al gestantelor (tabelul 3.1.).

Tabelul 3.1. Ponderea gestantelor incluse în loturi după mediul de reședință, nivelul de educație și statutul ocupațional

Criteriu/ lot	Domiciliu		Nivel educațional		Statut ocupațional	
	Mediul urban	Mediul rural	Studii superioare sau medii	Studii generale sau nefinalizate	Angajată	Neangajată
Gestantele lotul I (%)	71,2 %	28,8 %	78,6%	21,4%	40,9%	8,6%
Gestantele lotul II (%)	56,8 %	43,2 %	70,6%	29,4%	40,6%	9,6%
Total	74 %	36 %	69,2%	39,8%	81,5%	18,5%

Urmare a analizei profilului de vârstă al gestantelor incluse în studiu, luând în considerare faptul, că unul din criteriile de eligibilitate pentru femeile gravide a fost vârsta de 35 de ani și mai mult, s-au constatat următoarele:

Gestantele din ambele grupe incluse în studiu au fost cu vârsta cuprinsă între 35 - 52 de ani, inclusiv. Valoarea medie a vârstei gestantelor incluse în prezentul studiu a fost $45,1 \pm 2,3$ de ani, atât în cazul gestantelor cu sarcina concepută prin metoda FIV, cât și în cazul celor, cu sarcina concepută natural.

Valoarea minimă pentru intervalul de vârstă 35-39 de ani s-a încadrat în 15,4 și 12,6 la sută. În intervalul de vârstă 51 - 52 de ani au fost incluse 4 gestante, cota fiind de 1,8 la sută (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Ponderea gravidelor în loturile de studiu pe profilul vârstei cu intervalul de 5 ani

Vârsta cu intervalul de 5 ani	lotul I		lotul II	
	abs.	%	abs.	%
35 - 39	17	15,4 %	14	12,6 %
40 - 45	54	48,6 %	59	53,2 %
46 - 50	38	34,2 %	36	32,4 %
51 - 52	2	1,8 %	2	1,8 %

Cea mai mare pondere a gravidelor incluse în cercetare pentru ambele loturi, s-a încadrat în intervalul de vârstă de 40-50 de ani și a constituit $82,9 \pm 4,15\%$ pentru lotul I și $85,6 \pm 4,28\%$ pentru lotul II.

Mediul de domiciliu este confirmat în mai multe studii, drept un factor important aplicat în caracteristicile fertilității, accesului la asistență medicală și atitudinilor tradiționale față de familie și sarcină (figura 3.1.).

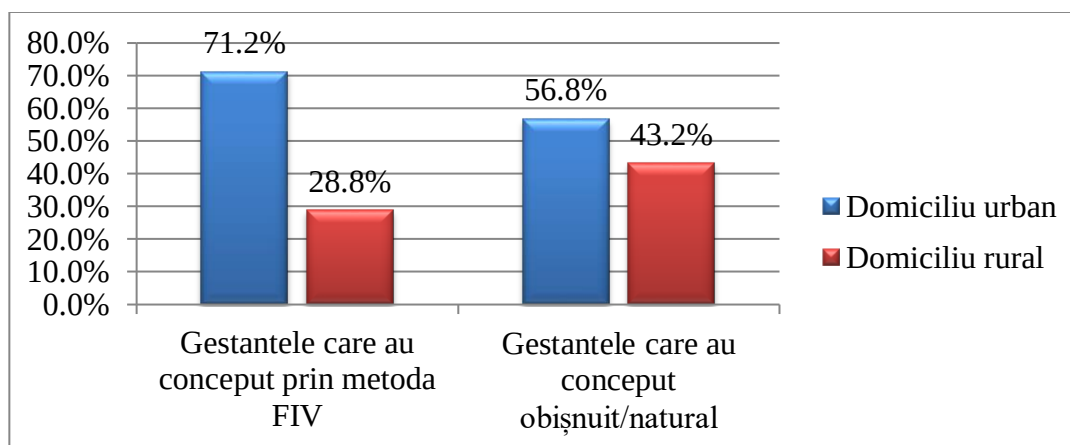


Figura 3.1. **Repartizarea gestantelor din studiu conform mediului de domiciliu (%)**

În lotul I, din 111 gestante, 79 au fost cu domiciliul din mediul urban și 32 de gestante cu domiciliul în mediul rural. În lotul II, deasemenea, gestantele cu domiciliul în localitățile urbane au fost în prevalență, 63, față de cele 48 de gestante din mediu rural. În cohorta studiului, gestantele cu vârsta după 35 de ani, incluse atât în lotul în care sarcina a fost concepută prin metoda FIV, cât și în lotul gravidelor cu sarcina concepută natural, gestantele domiciliate în localitățile rurale sunt în minoritate, respectiv, $28,8 \pm 1,4\%$ (lotul I) și $43,2 \pm 2,2\%$ (lotul II).

Situația corelată cu tendințele demografice înregistrate în ultimii ani în țară, când fertilitatea femeilor din mediul rural, care tradițional era mai înaltă, înregistrează o tendință de reducere a fertilității. [161].

Rezultatele obținute demonstrează că în 53,2 la sută din cazuri, în studiu sunt incluse gestantele cu sarcinile concepute pentru prima dată, fapt ce confirmă intenția cuplului de a amâna nașterea primului copil după vârsta de 35 de ani. Această statistică este mai major la femeile cu domiciliu în localitățile urbane (tabelul 3.3.).

Tabelul 3.3. Repartizarea în loturi a gravidelor după criteriile primipare și multipare, în dependență de domiciliu urban/rural

	Total gravide	Domiciliu/mediu urban		Domiciliu/mediu rural	
		lotul I	lotul II	lotul I	lotul II
Primipare (%)	118 (53,2±2,7%)	49,2±2,46%	26,3±1,31%	9,3±0,47%	15,2±0,76%
Multipare (%)	104 (46,8% ±2,34)	20,2±1,01%	30,8±1,54%	20,2±1,01%	28,8±1,4%

Analizând atitudinea gestantelor față de prima sarcină, se constată, că amânarea nașterii primului copil a contribuit la creșterea vârstei femeii în sarcină și, respectiv, la reducerea perioadei de reproducere a femeii. De menționat, că vârstă la prima căsătorie în lotul I s-a încadrat în 25 de ani și mai mult pentru 58±2,9% din gravide, cu $p>0,05$, și în lotul II-cu 51±2,55%.

Factorul educațional a fost considerat în studiu foarte important pentru tema cercetată și ca urmare, a fost analizat minuțios pentru gestantele din ambele loturi.

Repartizarea femeilor în dependență de nivelul de educație, ponderea celor cu studii superioare în categoria gravidelor cu sarcina obținută prin metoda reproducerii asistate uman, prevalează studiile superioară, proporția fiind de 69,2± 3,46% față de 39,8±1,99 % cu studii medii, complete și incomplete (tabelul 3.1.).

Astfel, constatăm, că educația influențează complexul de comportamente sociale, inclusiv de reproducere și necesită a fi inclusă în screeningul riscurilor pentru sarcinile la gravidele cu vârsta înaintată.

Aspectul ocupațional un alt criteriu de analiză, care influențează amânarea nașterii primului copil și respectiv plasarea femeii gravide în grupa de risc pentru sarcină, doar pe criteriul vârsta după 35 ani. În studiul dat la momentul conceperii sarcinii 81,5 la sută din gestante erau angajate.

Repartizarea acestora între loturi practic este identica.

Astfel constatăm, că în studiu, loturile au inclus gravidele comparabile după criteriile socio-demografice, cu anumite deferențe neesențiale, care nu pot fi cu impact asupra rezultatelor analizate.

3.2. Caracteristica antecedentelor extragenitale, ginecologice și obstetricale la etapa includerii în studiu a gestantelor cu sarcina concepută prin metoda FIV

La etapa includerii în cercetare a gestantelor, nu au fost identificate stări patologice și de acutizare a maladiilor asociate sarcinii. Atât examinarea clinică și colectarea anamnezei, privind

maladiile extragenitale, cât și informația preluată din Fișele individuale ale gravidelor, au permis identificarea unui spectru de maladii asociate sarcinii (figura 3.2).

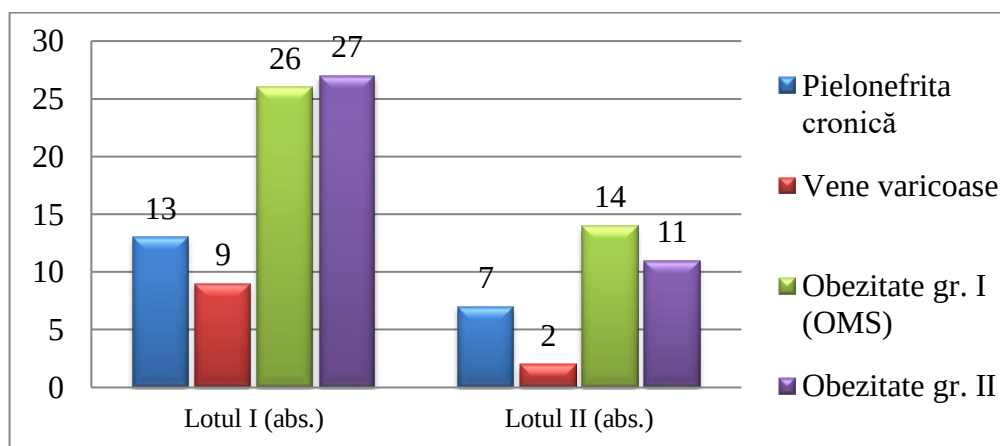


Figura 3.2. Morbiditatea extragenitală la gestantele incluse în studiu (abs.)

În cercetare s-a constatat, că gravidele cu vârsta de peste 35 de ani, cu sarcina concepută prin metoda FIV pe motiv de infertilitate, în anamneză, mai frecvent înregistrează maladii inflamatorii ($p < 0,05$), cum ar fi pielonefrita cronică, - la 13 gravide din lotul I ($11,7 \pm 0,59$ %), spre deosebire de 7 gestante din lotul II ($6,3 \pm 0,32$ %).

Pielonefrita cronică la gestante, din ambele loturi de cercetare a fost bilaterală, primară (postinfecțioasă, cauzată de germeni bacterieni), cu BCR stadiul I (K/DOQI, 2002), în remisiune la etapa includerii în studiu.

Parametrii determinați și evaluați la gravidele cu pielonefrită cronică în anamneză, la etapa participării în cercetare, nu au înregistrat abateri de la limitele normei, pentru urocultură și de la analiza generală a urinei. Perioada de la ultimele acutizări ale maladiei depășește perioada de 12 luni de până la conceperea sarcinii. Un șir de aspecte, din perioada cercetării permit de a constata la etapa recoltării sângelui și lichidului amniotic și respectiv, la etapa determinării biomarkerilor prevăzuți în metodologia cercetării, cu riscuri evidente minimale pentru gestante.

Pentru categoria de gravide cu patologia extragenitală - pielonefrita cronică în conduită, au fost monitorizate potențialele riscuri: compresiunea uterului gravid asupra tractului urinar, inclusiv, influența hormonală (progesteronul scade peristaltismul tractului urinar), refluxul vizico-ureteral și echilibrul acido-bazic.

Vene varicoase ale extremităților inferioare, înregistrate la 9 (8,1%) gestante din lotul I și respectiv, la două (1,8%) gravide din lotul II de studii. Ambele grupuri de gestante supuse unei supravegheri suplimentare, din motivul, că în sarcină, din cauza creșterii cantității de progesteron la mame și respectiv, dilatării venelor, a existat pericolul de acutizare a maladiei.

În procesul de cercetare, au fost supuse analizei problemele extragenitale metabolice, fiind constatate asociate la sarcină: obezitatea constituțional-exogenă în lotul I, gradele I și II (conform criteriilor de eligibilitate emise în metodele cercetării). În lotul II, au fost incluse și 2 gestante, care au fost diagnosticate cu obezitate morbidă. Într-un caz, indice masei corporale (IMC) fiind de 41 kg/m² (ponderea 102 kg la înălțimea de 1,60 m) și în alt caz, la altă gestantă, indicatorul a fost de 42 kg/m² (ponderea 102 kg, la înălțimea de 1,56 m). În ambele cazuri, circumferința taliei era de peste 88 cm la etapa luării la evidență cu sarcina.

La evaluarea gradului de modificare a Indicelui de masă corporală (IMC) în trimestrul trei, față de perioada includerii în studiu (trimestrul doi de sarcină), s-a constatat o tendință de majorare a masei corporale supra adaosul admisibil (tabelul 3.4.).

Tabelul 3.4. Dinamica IMC la gravidele din studiu în trimestrul III de sarcină față de trimestrul I

Grupa masei corporale	IMC* (kg/m ²)	lotul I			Lotul II		
		Trim.I	Trim. III	Diferența	Trim.I	Trim.III	Diferența
Subponderală	≤18,49	3,6%	0	-3,6	1,8%	0,9%	-0,9
Greutate normală	18,5 – 24,99	28,8%	22,5%	-6,3	25,2%	21,6%	-3,6
Supraponderală	25-29,99	31,6%	37,1%	+5,5	37%	38,8%	+1,8
Obezitate grad 1	30-34,99	23,4%	24,3%	+0,9	24,3%	26,1%	+1,8
Obezitate grad 2	35-39,99	12,6%	15,3%	+2,7	10%	10,8%	+0,8
Obezitate morbidă	≥ 40	0	0,9%	+0,9	1,8%	1,8%	0

Notă:* Limitele IMC, conform Protocolului Clinic Național, nr. 424 „Obezitatea la adult”, 2023

Rezultatele studiului au demonstrat, că gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV au un risc mai mare de majorare a ponderei în timpul sarcinii, una din explicații fiind medicația specifică reproducerii umane asistate medical. Astfel, un adaos ponderal majorat pe parcursul evoluției sarcinii s-a constatat la 14,7±0,74% din gravidele din lotul I și la 6,3±0,32% din gravide cu sarcina concepută natural în lotul II.

Constatările nominalizate confirmă obligativitatea efectuării screeningului activ permanent al complicațiilor și comorbidităților la gestantele constatate cu obezitate, fiind un enorm potențial risc pentru generarea pe acest fundal a complicațiilor induse de sarcină.

În cercetare au fost evaluate antecedentele ginecologice, astfel cum utilizarea contraceptivelor, patologii inflamatorii, tumorale, examenul citologic Babeș-Papanicolau, boli sexuale transmisibile (chlamydia, sifilis, gonoree etc.), vaginoză bacteriană fără rezultate cu impact semnificativ pentru evoluția sarcinilor din studiu.

A fost analizat istoricul menstruației: menarha, ritmul menstrual, durata și cantitatea sângerărilor, prezența sindromul premenstrual și/sau dismenoreea, sângerări anormale, amenoree primară sau secundară, dureri legate de ciclu, cât și numărul și caracterul finalizării sarcinilor anterioare, complicații după nașteri sau avorturi.

Cea mai mare pondere 84-93 la sută din gravide au comunicat despre apariția primei menstruații la 12-16 ani, ce corespunde perioadei obișnuite. Menarha tardiva (după 15 ani), în lotul I, a fost la $10,8 \pm 0,54$ la sută din gestante incluse în lotul I, și în $3,6 \pm 0,18\%$ la gestantele cu sarcina concepută natural. Ponderea de raport 3 : 1 a cazurilor cu menarhă tardiva este în favoare sarcinilor ulterior dobândite prin FIV. Ovulația neregulată în anamneză este un indiciu de risc pentru infertilitatea feminină. Durata normală a menstruației (între 3 și 7 zile) la gestantele din lotul I s-a înregistrat în $88,3 \pm 4,42\%$ de cazuri, la gestante din lotul II - în $97,3 \pm 4,87\%$ de cazuri. S-a studiat intensitatea fluxului menstrual în anamneză (figura 3.3).

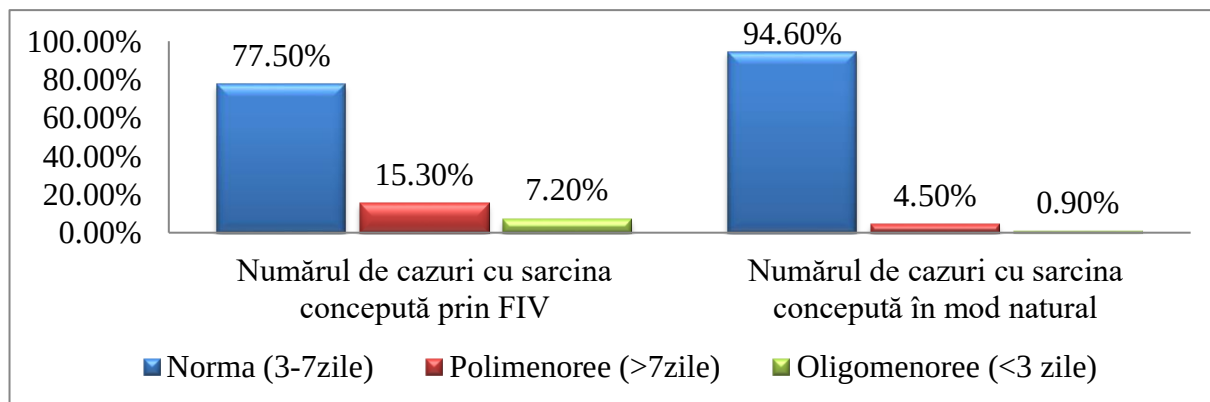


Figura 3.3. **Analiza comparativă a duratei menzisului la gestantele din studiu**

În 86 la sută dintre cazuri, fluxul menstrual este caracterizat ca normal, cu încadrarea în media duratei menstruale. Polimenoreea în anamneză a fost caracteristica pentru 22 de gestante (17 cazuri în lotul I de studiu și 5 cazuri în lotul II), durata menstruală fiind constatată ca mai mult de 7 zile. Oligomenoreea a fost atestată la 9 gestante, inclusiv 8 la gestante cu sarcina concepută prin metoda FIV. După criteriul intensității menstruale, sângerările menstruale lunare mai sporite s-au înregistrat la gestantele, care, ulterior, au necesitat fertilizarea asistată - $77,3 \pm 3,86\%$ în raport cu gestantele, care au rămas însărcinate în mod natural - $22,7 \pm 1,14\%$.

În studiu a fost evaluat criteriul intervalului între ciclurile menstruale și variația lor. S-a constatat, că gestantele cu indicații ulterioare pentru FIV, în $28,8 \pm 1,4\%$ au avut interval intermenstrual mai mare de 35 zile.

În lotul II de studii, proporția variației intervalului intermenstrual este asemănătoare cu cel din lotul I, cea mai mare pondere fiind la intervalul normal intermenstrual, constituind 91 la

sută. Cota gravidelor la care în anamneză s-a constatat interval intermenstrual mai mare de 35 zile a fost doar la 8 gestante (7.2 la sută) și mai puțin de 21 de zile în 1,8%.)

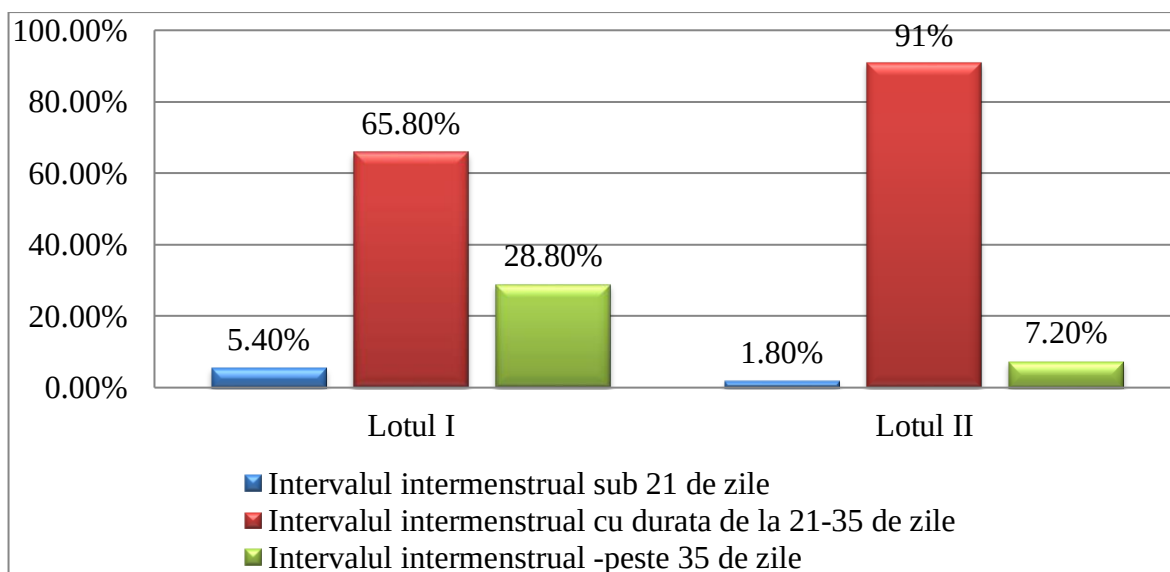


Figura 3.4. **Analiza intervalului intermenstrual la gestantele din studiu**

Menstrele neregulate au fost în (64,2%) la femeile, care ulterior au necesitat ajutor artificial în conceperea sarcinii în raport cu (35,7%) la femei, care ulterior au rămas însărcinate pe cale naturală, fără a apela la metoda de fertilizare in vitro.

În chestionare privind sindromul premenstrual gravidele au enumerat mai multe simptome pre, post și intermenstruale: meteorism, glandele mamare doare, dificultăți de concentrare, cefalee și dureri de spate, probleme ale pielii sau acnee, oboseală, accese de plâns, iritabilitate, anxietate, tulburări de dispoziție.

Intervalul intermenstrual a fost cu variația mai mare în anamneza ginecologică la gestantele care au conceput sarcina prin metoda FIV. Simptomatologia premenstruală în cazurile loturilor studiului poate fi funcțională, care ulterior se restabilește.

La etapa includerii gravidelor în studiu majoritatea erau în termenul de gestație 16 -18 săptămâni, ponderea acestora în I lot de studiu era 94,6% și în lotul II – 93,7%, fapt ce a permis de a deduce, că loturile sunt statistic comparabile la capitolul etapelor evoluției sarcinii.

Anamneza obstetricală complicată în antecedente din numărul multigestelor incluse în studiu, a fost identificată la 85 de gravide, sau 81,7%. În lotul I - la 36 de multigeste din 42, (85,7%) și în lotul II - la 49 de gestante din 62 de multigeste (79%). Astfel se atestă o pondere mai mare a antecedentelor obstetricale în rândul multigestelor, care, ulterior, au dezvoltat infertilitate (tabelul 3.5.).

Tabelul 3.5. Antecedentele obstetricale la gestantele din studiu

lotul I		ANTECEDENTE OBSTETRICAL	lotul II	
Cazuri (abs.)	%		Cazuri (abs.)	%
22	19,8	Avort spontan	19	17,1
0	0	Multigeste ≥ 4 copii	4	3,6
1	0,9	Sarcini cu iminență de întrerupere	3	2,7
0	0	Nașteri premature	4	3,6
1	0,9	Macrosomie fetală	11	9,9
3	2,7	Cicatrice pe uter	8	7,2
9	8,1	Infertilitate (istoric RUAM)	0	0
111	100	Sarcina după tratament pentru infertilitate	0	0

Anamneza obstetricală complicată în antecedente la gestantele din lotul 1 cu sarcinile concepute prin FIV, este axată pe 9 cazuri cu istoric RUAM cu rezultat finalizat prin avorturi spontane.

De menționat, că avorturile spontane au avut incidență majorată în ambele loturi, având cea mai mare pondere, de $19,8 \pm 0,99\%$ în lotul I și $17,1 \pm 0,86\%$ în lotul II. Numărul de macrosomii în antecedente, deasemenea, prezintă un risc matern și fetal major și în sarcinile gestantelor incluse în studiu.

3.3. Concluzii la Capitolul 3

Rezultatele studiului în cauză demonstrează, că profilul pe vârste a fertilității, mediul de reședință a gravidelor, nivelul de educație și atitudinea față de tradițiile familiale sunt factorii cu impact și potențial de risc în anumite circumstanțe, fapt ce necesită realizarea de acțiuni în scopul eficientizării măsurilor de supraveghere și conduită la etapa planificării familiei, concepției și evoluția sarcinii în siguranță.

Rezultatele obținute confirmă, că în $53,2 \pm 2,66$ la sută din cazuri în studiu sunt examinate sarcinile concepute pentru prima dată, fapt ce confirmă amânarea nașterii primului copil după vârsta de 35 de ani, această tendință fiind mai mare în rândul femeilor cu domiciliul în localitățile urbane. În cohorta studiului, gestantele cu vârsta de după 35 de ani domiciliate în localitățile rurale sunt în minoritate, respectiv $28,8 \pm 1,4\%$ (lotul I) și $43,2 \pm 2,2\%$ (lotul II), față de cele cu domiciliu urban.

În cercetare s-a constatat faptul, că atât vârstă la prima căsătorie a gestantelor din lotul I - 35 de ani și peste $58 \pm 2,9$ la sută cu $p > 0,05$, și din lotul II - $51 \pm 2,55\%$, cât și atitudinea gestantelor față de prima sarcină contribuie la amânarea nașterii primului copil și, respectiv, la creșterea vârstei mamei în sarcină cu reducerea perioadei de reproducere a femeii.

S-a constatat, că educația influențează complexul de comportamente sociale, inclusiv reproducerea, și necesită a fi inclusă în screeningul riscurilor pentru sarcinile la gravidele cu vârsta înaintată. Ponderea femeilor cu studii superioare în categoria gravidelor cu sarcina obținută prin metoda reproducerii asistate uman, predomină categoria gravideror cu studiile superioare, proporția fiind de $69,2 \pm 3,46\%$ față de $39,8 \pm 1,99\%$ la studii medii și generale

Patologiile extragenitale asociate sarcinii, așa cum pielonefrita cronică primară, vene varicoase ale extremităților inferioare, obezitatea pentru gestantele cu vârsta peste 35 de ani și pe fundal de remisiune la etapa conceperii, rămân în categoria de riscuri majore pentru complicații induse de sarcină.

Rezultatele studiului au demonstrat, că gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV au un risc mai mare de majorare a ponderii în timpul sarcinii, una din explicații fiind medicația specifică reproducerii umane asistate medical. Astfel, un adaos ponderal majorat pe parcursul evoluției sarcinii s-a constatat la $14,7 \pm 0,74\%$ din gravidele din lotul I și la $6,3 \pm 0,32\%$ din gravide cu sarcina concepută natural în lotul II.

Tulburările menstruale la gravide incluse în lotul I de cercetare, au fost statistic semnificativ mai frecvente decât în lotul II de studiu. S-a constatat că gestantele cu indicații ulterioare pentru FIV în $28,8 \pm 1,4\%$ au avut interval intermenstrual mai mare de 35 zile.

Anamneza obstetricală complicată în antecedente din numărul multigestelor incluse în studiu, a fost identificată la 85 gravide sau $81,7 \pm 4,09\%$, care au fost un substrat pentru generarea complicațiilor în sarcina actuală și impun conduită personalizată pentru un monitoring oportun și conduită conformă particularităților evoluției.

4. EVOLUȚIA CLINICĂ A SARCINII CONCEPUTE PRIN METODA FIV LA FEMEII CU VÂRSTA DE PESTE 35 DE ANI

4.1. Particularitățile evoluției sarcinii concepute prin metoda FIV la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani

Inițierea cercetării a corespuns trimestrului doi de sarcină a gestantelor, săptămâna 14-21.

În cercetare a fost monitorizată evoluția clinică a sarcinilor pe toată perioada gestației până la naștere, inclusiv cele 2 - 6 ore de lăuzie, timpul, când după supraveghere postnatală, mama cu nou-născutul au fost transferați în salon.

Rezultatele cercetării constată, că riscurile preconcepționale multifactoriale, descrise în capitolul precedent, vârsta medie la etapa conceperii pentru gestantele din ambele loturi, a fost $45,1 \pm 2,3$ ani; una din trei gestante din lotul I și una din două gestante din lotul II, în anamneza obstetricală au avut complicații în antecedente; 53,6 % din toate gravidele din ambele loturi au fost cu patologii extragenitale cât și gravidele la care s-au generat pe parcursul sarcinii complicații, ceea ce a determinat anumite particularități ale evoluției sarcinii.

Gravidele cu anamneza obstetricală agravată, (2 sau mai multe avorturi spontane în mod repetat), cazuri de malformații congenitale în anamneză și/sau aberații cromozomiale, inclusiv, decese, nu au fost incluse în studiu. Au fost supuse dublului și triplului test gravidele cu patologii extragenitale cronice, gravidele în anamneză cărora au fost identificate rude cu maladii cromozomiale, inclusiv din partea soțului.

Patologiile extragenitale prezente în anamneză: pielonefrită cronică primară, boala varicoasă, HTA, obezitatea de gradul I, II și III, în toate sarcinile, la etapa includerii în studiu, au fost fără impact patologic.

Sarcinile au fost supravegheate în corespundere cu standardele naționale. Gravidele au fost supuse examenului clinic, inclusiv, prin monitorizarea masei corporale și talia; cât și identificarea indicelui masei corporale (IMC) - calcularea greutateii corporale pentru o înălțime corectă apreciată prin raportul masei corporale - exprimat în kilograme - la înălțime, - exprimată în metri la pătrați.

O altă problemă constatată, ține de majorarea ponderii gravidelor peste limita acceptată în sarcină, manifestată mai mult la gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV.

Astfel, în trimestrul al treilea de sarcină, gravidele subponderale au acumulat în greutate, încadrându-se în intervalul normal. O creștere cu aproape 15 la sută s-a înregistrat la gravidele din categoria supraponderale și în rândul gestantelor, care, la etapa conceperii, au fost

diagnosticate cu obezitate, și care în 12,5 la sută, au avut depășiri de adaos ponderal permis (tabelul 4.1.).

Tabelul 4.1. **Modificarea adaosului ponderal la gravidele incluse în studiu**

Dinamica adaosului ponderal la gravidelor	Total lotul I		Total lotul II	
	(abs)	(%)	(abs)	(%)
Înainte de sarcină				
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în > 18,49 sau mai puțin – subponderală	4	3,6	2	1,8
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în 18,5 – 24,99 (greutate normală)	32	28,8	28	25,2
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în 25-29,99 (supraponderală)	35	31,6	41	37
Ponderea gravidelor obeze, inclusiv:	40	36,03	38	34,2
IMC 30-34,99 kg/m2 Obezitate gradul 1	26	23,4	27	24,3
IMC 35-39,99 kg/m2 Obezitate gradul 2	14	12,6	11	10
IMC ≥ 40 kg/m2 Obezitate morbidă	0	0	2	1,8
Trimestrul III de sarcină				
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în > 18,49 sau mai puțin - subponderală <i>pot fi luate în sarcină 13-18 kg</i>	0	0	1	0,9
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în 18,5 – 24,99 (greutate normală) - <i>pot fi luate în sarcină 11-16 kg</i>	25	22,5	24	21,6
Ponderea gravidelor, IMC se încadra în 25-29,99 (supraponderală) <i>pot fi luate în sarcină 7-11 kg</i>	41	37,1	43	38,8
Ponderea gravidelor obeze, (cu creșterea posibilă în naștere cu 5-9 kg), inclusiv:	45	40,5	43	38,7
IMC 30-34,9 kg/m2 Obezitate gradul 1	27	24,3	29	26,1
IMC 35-39,9 kg/m2 Obezitate gradul 2	17	15,3	12	10,8
IMC ≥ 40 kg/m2 Obezitate grad 3	1	0,9	2	1,8

Notă: Limitele de normă conform PCN, nr. 424 Obezitate la adult

În același timp, pe parcursul studiului, în evoluția sarcinilor s-a înregistrat o majorare mai mare a masei corporale la gestantele din lotul I, cu $28 \pm 1,4\%$, decât în lotul II, cu $17 \pm 0,85\%$, fapt ce presupune, la rândul său, apariția riscurilor suplimentare pentru siguranța sarcinii și nașterii.

Ca urmare, se concluzionează, că controlul greutății corporale, alimentația controlată și modul sănătos de viață sunt factorii importanți, care necesită o conduită specială, pentru că impactul acestora, poate fi reflectat în apariția stărilor patologice și complicațiilor induse de sarcină, cu risc atât pentru gravidă, cât și pentru făt.

Vigilența cu care a fost monitorizată complicația instalată prin diabet gestațional, în special, la gravidele cu masa ponderală majorată, a fost maximă. La 24-28 de săptămâni de sarcină, toate gravidele au fost supuse testului oral de toleranță la glucoză și evaluarea profilului și gradului de risc în conformitate cu ghidurile în vigoare.

În scopul supravegherii minuțioase a evoluției sarcinii, toate gravidele incluse în studiu au fost supuse investigațiilor în funcție de recomandările „Standardul de supraveghere a

gravidelor cu evoluție fiziologică a sarcinii în condiții de ambulator”, aprobat de Ministerul Sănătății cu utilizarea investigațiilor și manoperelor de evaluare clinică concomitentă a stării fătului.

Ecografia obligatorie la gestantele incluse în studiu a fost efectuată conform standardelor de supraveghere a gravidelor în condiții de ambulator. Gestantele au fost investigate în perioada de la 11-13 săptămâni de gestație, ulterior, la termenul de la 18-21 săptămâni.

În trimestrul al doilea de sarcină, în cadrul studiului, a fost preluat sângele matern și lichidul amniotic, pentru determinarea citokinelor și markerilor imuni, mediatorilor prooxidanți și antioxidanți în ambele substraturi biologice, cu ulterioara lor analiză și corelare cu particularitățile evoluției sarcinii.

Analiza parametrilor de laborator în sarcinile incluse în studiu, au scos în evidență un șir de devieri de la limitele normei: analiza generală de sânge în 25 cazuri, respectiv 22,5%, proteinuria a fost identificată în 5 sarcini la gestantele din lotul I, respectiv, 5,4% și în 3 cazuri în lotul II, 2,7%. Prezența proteinuriei la 5 gravide din lotul I, s-a încadrat în preeclampsiiile înregistrate în studiu.

Pe fundal de maladii cronice extragenitale în 7,2% din gravide, au fost înregistrate devieri la probele hepatice. Pe profilul de monitorizare renală parametri cu abateri s-au înregistrat în 5 cazuri la gestante din lotul I ($4,5 \pm 0,23$ %) și la 7 gestante din lotul II ($6,3 \pm 0,32$ %).

Evaluarea dezvoltării feților a fost monitorizată prin ecografie în trimestrul al treilea de sarcină, săptămâna a 32-a. Măsurarea circumferinței capului și lungimea femurului au fost comparate cu valorile standard. S-a verificat ritmul cardiac fetal, anexele fetale (placenta, cordonul ombilical) și calitatea lichidului amniotic. De menționat, că în această perioadă a evoluției, la una din gravide din lotul I (vârsta de 44 de ani, luată la evidență la 17 săptămâni, în anamneza extragenitală - obezitate gradul II, evoluția sarcinii până la naștere fără particularități), a fost suspectată malformația congenitală cardiacă, diagnostic confirmat după naștere: comunicarea atrio-ventriculară, nonductal dependentă și la o altă gravidă s-a înregistrat malformația congenitală hidrocefalie.

O altă problemă, identificată prin explorarea imagistică prin ecografia la termenul de 32 de săptămâni de sarcină a scos în evidență decolarea prematură a placentei normal inserate și moartea antenatală a fătului. Gestanta cu vârsta de 48 de ani, multipară, prezentând mai multe patologii extragenitale, cum ar fi obezitate gradul II, pielonefrită cronică primară.

În cazul a patru sarcini incluse în studiu, la examenul prin ecografie, în trimestrul al doilea de sarcină, au fost identificați feți macrosomi, în ambele loturi de studiu câte 2 complicații fetale descrise în pct. 4.2.

Etapa de îngrijirea în naștere a fost efectuată de către personalul bine calificat, deoarece această etapă a fost cu risc înalt pentru mamă și copil. În studiu au fost asistate de personal calificat 222 de nașteri repartizate pe loturi: în lotul I au fost 12 sarcini gemelare în lotul II deasemenea, au fost, 2 sarcini gemelare; copii nou născuți vii în lotul I au fost 121 și în lotul II - 113. În 88,2% din nașteri ale gestantelor incluse în studiu, au fost cu prezentare craniană la făt, în 48,0% - sarcina finisându-se „per vias naturalis”, în 51,2% de cazuri, au fost indicație pentru operație cezariană.

Pe parcursul sarcinii, gravidele au participat la instruiți sanitare, au fost consiliate și familiarizate cu semnele complicațiilor, care pot genera pericol pentru viață și naștere prematură. Deasemenea, gravidelor le-au fost administrate măsuri profilactice (fier, acid folic).

4.2. Complicațiile în sarcinile concepute prin metoda FIV și conduita la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani

Această etapă a cercetării a corespuns cu analiza comparativă a evoluției stărilor patologice declanșate și ale complicațiilor induse în sarcinile concepute prin metoda FIV și corelarea acestora cu manifestarea biomarkerilor determinați în sângele gestantelor și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină.

Monitorizarea a avut un caracter complex, pornind de la conceptul, că complicațiile în sarcină sunt stări cu implicarea a mai multor procese fiziologice cu impact vital critic.

Așa patologii, cum ar fi: viroze acute, problemele respiratorii tranzitorii, dereglările funcționale ale tractului gastroduodenal, aspectele psiho-emoționale cu dereglarea somnului și stările depresive, care s-au restabilit în timp scurt, nu au fost analizate în cercetare.

Investigațiile clinice și paraclinice efectuate în timpul sarcinii, au permis de a identifica potențialele probleme în sarcină la etapa precoce și de a întreprinde acțiuni respective, inclusiv ajustări ale conduitei. S-a constatat, că sarcinile monitorizate și controlate medical, cu o conlucrare bună între mamă/cuplu și specialiștii medicali, sunt cu șanse mai mari pentru finalizarea sarcinii fără careva particularități pentru mamă și făt.

Categoriile de stări patologice și complicațiile induse de sarcină, inclusiv fetale, apreciate drept semnificative pentru sarcină (tabelul 4.1.), au fost analizate multilateral.

Tabelul 4.2. Stări patologice și complicațiile induse de sarcină înregistrate în cercetare

Stări patologice și patologii induse de sarcină	lotul I		lotul II	
	Abs.	ÎÎ (interval încredere %)	Abs.	% ÎÎ (interval încredere %)
Nașterea prematură	8	3,6% (ÎÎ 1,7-6,7%)	3	1,4% (ÎÎ 0,4-3,6%)
HTA indusă de sarcină	16	6,9% (ÎÎ 4,1-10,8%)	11	5% (ÎÎ 2,7-8,4%)

Preeclampsie severă	5	2,3% (ÎÎ 0,9-4,9%)	0	-
Diabet gestațional	1	0,5% (ÎÎ 0,0-3,1%)	0	-
Decolarea prematură a placentei normal inserate	4	1,8% (ÎÎ 0,9-4,2%)	1	0,5% (ÎÎ 0,0-2,1%)
Ruperea prematură a membranelor amniotice	4	1,8% (ÎÎ 0,9-4,2%)	3	1,4% (ÎÎ 0,4-3,6%)
Hemoragii hipotone	2	0,9% (ÎÎ 0,9-2,9%)	0	-
Pielonefrita cronică în acutizare	1	0,5% (ÎÎ 0,0-3,1%)	0	-
Anemii	23	10,9% (ÎÎ 8,9-15,2%)	19	8,3% (ÎÎ 5,6-12,8%)
Polihidramnios	4	1,8% (ÎÎ 0,9-4,2%)	8	3,6% (ÎÎ 1,7-6,7%)
Moarte antenatală a fătului*	2	0,9% (ÎÎ 0,9-2,9%)	0	-
Malformații congenitale*	2	0,9% (ÎÎ 0,9-2,9%)	0	-
Făt macrosom*	14	6,3% (ÎÎ 1,7-6,7%)	10	4,6% (ÎÎ 2,3-7,9%)
Encefalopatia hipoxico-ischemică*	1	0,5% (ÎÎ 0,0-3,1%)	0	-
Icter neonatal*	3	1,4% (ÎÎ 0,4-3,6%)	3	1,4% (ÎÎ 0,4-3,6%)

*Notă** În calcul s-au inclus și feții gemelari (lotul I -123 de feți, lotul II- 113 de feți)

În studiu s-au înregistrat *complicații materne* induse de sarcină la gestantele din ambele loturi. Au fost înregistrate 4 categorii de complicații statistic semnificative induse de sarcină, care au fost înregistrate în evoluția la 44 de sarcini. În lotul I au fost înregistrate patologii induse în 30 de sarcini (68,2%) și în lotul II – 14 sarcini (31,8%) (figura 4.1.).

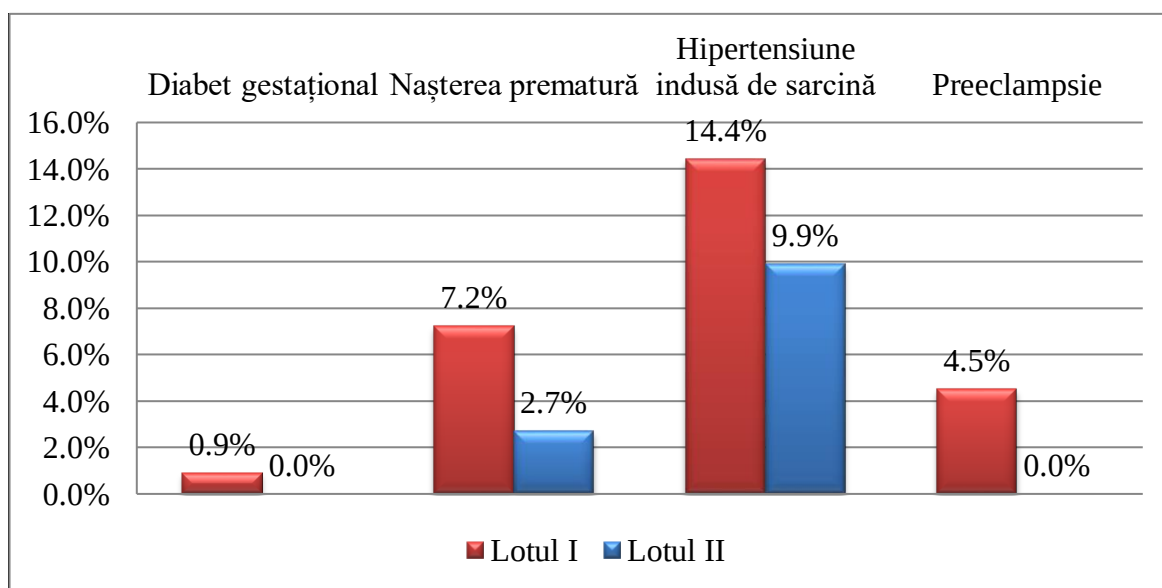


Figura 4.1. **Complicațiile materne în sarcină (%) la gestantele din loturile studiului**

Preeclampsia este cea mai severă complicație diagnosticată la gestantele din studiu pentru care a fost necesitatea de o conduită vigilentă.

Din totalul de 222 de sarcini și nașteri monitorizate în cercetare, au fost înregistrate 5 preeclampsii (2,3 la sută), care s-au declanșat în perioada 34-37 săptămâni de gestație, fiind apreciate ca preeclampsii tardive.

Datele caracteristice evoluției, particularităților declanșării și dezvoltării preeclamsiilor înregistrate în studiu sunt redată în tabelul 4.3.

Tabelul 4.3. Datele anamnestic-clinice și paraclinice la gestantele cu vârsta peste 35 de ani, sarcina cărora s-a complicat prin preeclampsie

Nr d/o		Sarcina 1 abs.	Sarcina 2 abs.	Sarcina 3 abs.	Sarcina 4 abs.	Sarcina 5 abs.
1. Date anamnestice						
1.1.	Vârsta gestantei (ani)	43	44	45	47	47
1.2.	Domiciliu (rural, urban)	urban	urban	urban	rural	urban
2. Date anamnestice extragenitale și obstetricale						
2.1.	Pielonefrita	-	-	-	1	-
2.2.	Obezitate gr. I	-	-	1	1	-
2.3.	IMC (kg/m ²)	25	27	40	37	30
2.4.	Paritatea	primipară	primipară	multigesată	primipară	multigesată
2.5.	Complicații în antecedente prin HTA indusă de sarcină	-	-	+	-	-
3. Complicații și stări patologice induse de sarcină (abs.)						
3.1.	HTA	1	1	1	1	1
3.2.	Edeme	-	1		1	-
3.3.	Dezlipirea placentei	1	1	1	1	1
3.4.	Nașterea prematură	1		1	1	1
4. Particularitățile clinice						
4.1.	Cefalee occipitală	+	+	+	+	+
4.2.	Edeme ale membrelor și feței	-	+	-	+	
4.3.	Vedere cu sensibilitate la lumină	+	+	+	+	+
4.4.	Dureri abdominale în epigastru și subcostal din dreapta	-	+	-	+	-
4.5.	Greață, vome	-	-	-	+	+
5. Datele clinice și paraclinice la momentul stabilirii diagnosticului:						
5.1.	<i>HTA primar depistată la intervalul de minimum 6h, cu limita cifrelor:</i>					
5.2.	Tensiune arterial sistolice [TAs], mm Hg	145	145	150	150	155
5.3.	Presiunii diastolice [TAd], mm Hg	90	95	100	105	110
6.	Trombocitopenia, (T), T /mm ³	148	130	146	120	144
7.	Proteinurie	+	+	+	+	+
8. Metoda de tratament și nașterea						
8.1.	Regim staționar	s	s	s	s	s
8.2.	Nașterea (termenul de gestație-săptămâni)	36	37	34	35	36
8.3.	Nașterea prin operația Cezariana	-	+	+	-	+

Urmare a monitorizării și analizei evoluției și conduitei sarcinilor care s-au complicat prin preeclampsie, am constatat că, toate complicațiile au avut loc la gestantele din lotul I, criteriile de includere fiind sarcina concepută prin metoda FIV și vârsta de peste 35 de ani.

Preeclampsia s-a înregistrat la gestantele cu vârsta în intervalul 43-45 de ani, câte un caz și 2 cazuri la vârsta gestantelor de 47 de ani.

Domiciliu și asistența prenatală la 4 gestante s-a realizat în municipiu și o gestantă a fost luată la evidență obstetricală și supravegheată pînă la momentul spitalizării cu suspecție la preeclampsie în localitățile rurale.

Din anamneză în 2 sarcini din 5 au fost înregistrate maladii extragenitale complicate prin obezitate de gradul I; iar în 3 cazuri, indicele masei corporale a fost mai mare de 35 kg/m^2 .

Într-un caz, pielonefrita cronică primară asociată cu obezitate de gradul I și în altă sarcină, pacienta cu obezitate gr.I.

Din gestantele cu evoluția sarcinii complicată prin preeclampsie au fost 3 primipare cu vârsta cuprinsă între 43, 44 și 47 de ani și 2 gestante multipare de 45 și 47 de ani.

Statusul stării generale a gravidelor cu preeclampsie din lotul I de studiu la gestantele peste 35 de ani, exprimat clinic cu cefalee occipitală, caracter episodic scurt și apăsător, „precum o bandă ce strânge capul”, care a fost înregistrată la toate gestante.

Edeme ale mâinilor și a feței au fost evidențiate în două cazuri din grupul cu preeclampsie; vedere cu sensibilitate la lumină, ca și cefaleea a fost un simptom comun pentru toate gestantele.

Hipertensiunea indusă de sarcină, diagnosticată la termenul de 22-24 de săptămâni de gestație. Examenarea clinică și paraclinică, a constatat HTA indusă de sarcină, primar depistată cu ciclicitatea la intervalul de minimum 6 ore, în limita cifrelor TA sistolică 145-155 mm Hg și diastolică 90 - 110 mm Hg.

În două cazuri la gestantele cu preeclampsie, tensiunea arterială sistolică a fost în limitele 145 mm Hg, iar cea diastolică de 90 și 95 mm Hg, în alte 2 cazuri tensiunea sistolică a fost în valoare de 150 mm Hg și respectiv, tensiune diastolică de cca 100 și 105 mm Hg, iar într-un caz, tensiunea sistolică a fost identificată în valoarea de 155 mm Hg și cea diastolică de 110 mm Hg.

Dureri abdominale preponderent în regiunea epigastrală și în sub rebordul costal din dreapta a fost înregistrată în 2 cazuri, la gravidele cu vârsta de 44 și 47 de ani. Tot în aceste cazuri, s-au constatat edeme de membre și a feței, precum și episoade de greață și vomă repetate.

Analizele paraclinice determinate la etapele corespunzător complicațiilor induse de sarcină, au identificat proteinurie nesemnificativă în prezența unei excreții urinare în 300-350 mg în 24 ore, cu un raport de proteine și creatinină ≥ 3 , precum și a trombocitopeniei nesemnificative de la $130.000/\text{mm}^3$ la $148.000/\text{mm}^3$ în 4 cazuri și $120.000/\text{mm}^3$ la o gestantă din lotul I.

Nașterile premature au avut loc în 4 sarcinii din 5, care s-au complicat prin preeclampsie, la termen de gestație de 34, 35 și respectiv două la 36 de săptămâni de gestație.

Toate preeclampsii înregistrate și monitorizate, au avut o conduită activă, care respectiv nu au evaluat în complicații vital critice, cum ar fi convulsii (Eclampsia), sindromul HELLP, accidentul vascular cerebral (AVC) și afecțiuni multiple ale organelor. Sarcinile finalizate prin operația cezariană, conform indicațiilor absolute.

Analizând parametri biomarkerilor determinați din serul sanguin și lichidului amniotic, identificate în al doilea trimestru de sarcină la gestantele din același lot care au evoluat în preeclampsie (N=5), în comparație cu sarcinile care au evoluat fără careva complicații (N=10), s-a constatat că:

Interleukina 6 în trimestrul al doilea de sarcină crește statistic semnificativ cu 42% ($p \leq 0,001$) în serul matern (media în ser este de $1535 \pm 76,75$ pg/mL în lotul cu preeclampsie față de $1080,90 \pm 54,05$ pg/mL în lotul fără preeclampsie) pentru sarcinile în care s-au declanșat preeclampsia pe parcursul evoluției. Iar în lichidul amniotic s-a constatat o micșorare nesemnificativă cu 10,3% (media în lichidul amniotic a fost de $1232,80 \pm 61,64$ pg/mL în lotul fără preeclampsie și în lotul cu preeclampsie media fiind $1117,6 \pm 55,88$ pg/mL) - figura 4.2.

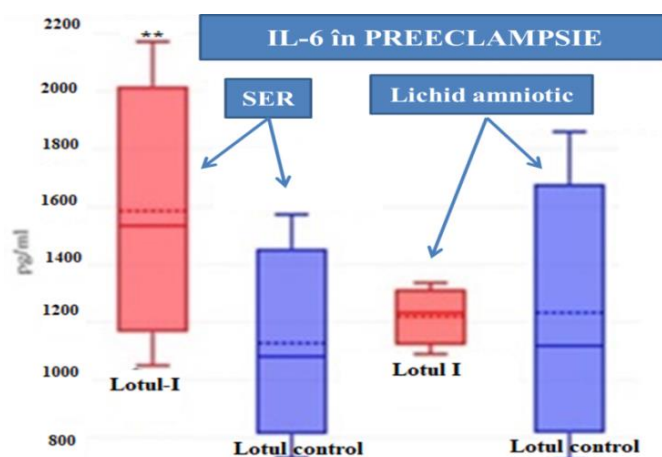


Figura 4.2. **Variațiile IL-6 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I**

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard * $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Citokinele proinflamatorii IL-8, determinate la gestantele sarcina cărora a evaluat cu complicațiile prin preeclampsie, în trimestrul al doilea de sarcină, s-au identificat cu valori statistice semnificative figura 4.3.

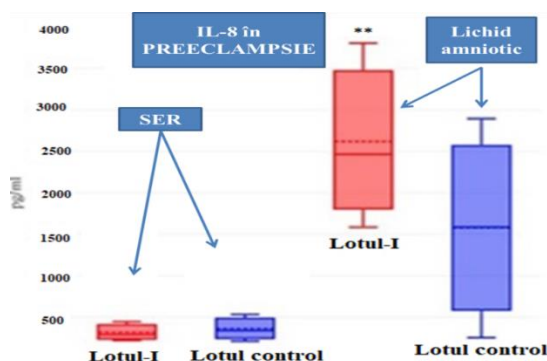


Figura 4.3. **Variațiile IL-8 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I**

Notă: Test *t* student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ.

Concentrația serică a citokinelor IL-8, determinate din prelevatul sanguin al gestantelor cu peste 35 de ani în lotul I de studiu, comparată cu cel prelevat de la sarcinile cu evoluție fără particularități înregistrează: în ser sanguin ($p = 0,66$), o medie de $289,8 \text{ pg/mL} \pm 14,48$, în lotul I, față de $340,8 \pm 17,04 \text{ pg/mL}$.

IL-12, determinată în ser, a identificat o micșorare a valorilor citokinice în preeclampsie în raport cu parametri determinați în sarcinile cu evoluție fără particularități. Astfel media cu eroare standard în serul sanguin a gestantelor din lotul I de studii a fost de $472,4 \pm 23,62 \text{ pg/mL}$ față de $625,47 \pm 31,27 \text{ pg/mL}$ (figura 4.4).

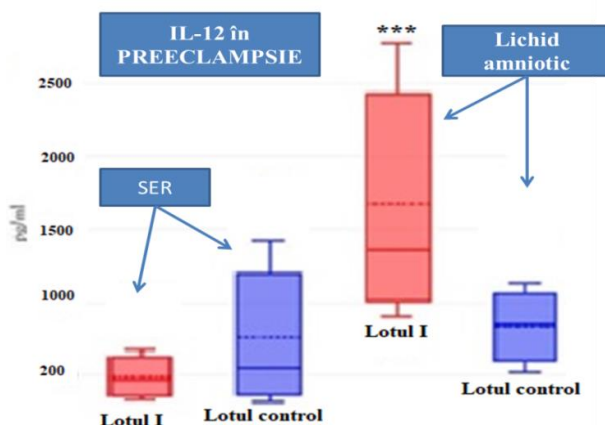


Figura 4.4. **Variațiile IL-12 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I**

Notă: Test *t* student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ.

Valorile identificate în lichidul amniotic pentru IL-8, statistic semnificative pentru (** $P < 0,001$), în lotul I și o medie de $2463,4 \text{ pg/mL} \pm 123,17$ cu minim de 1586 pg/mL și maximum de

3,802 pg/mL, precum și pentru sarcinile cu evoluție fără particularități la gestantele din lotul I, media a fost de $1587 \pm 79,38$ pg/mL.

Pentru IL-12 prelevată din lichidul amniotic în trimestrul al doilea de gestație, valorile maxime și medii au fost crescute precum în limitele de la 518 pg/mL până la 1135 pg/mL, respectiv o medie de $826,5 \pm 42,18$ pg/mL.

Citokina antiinflamatoare IL-10, identificată în ser și în lichidul amniotic, asemănătoare Interleukinelor – 8 și 12, a manifestat o creștere valorică semnificativă în lichidul amniotic colectat în trimestrul al doilea de sarcină (figura 4.5)

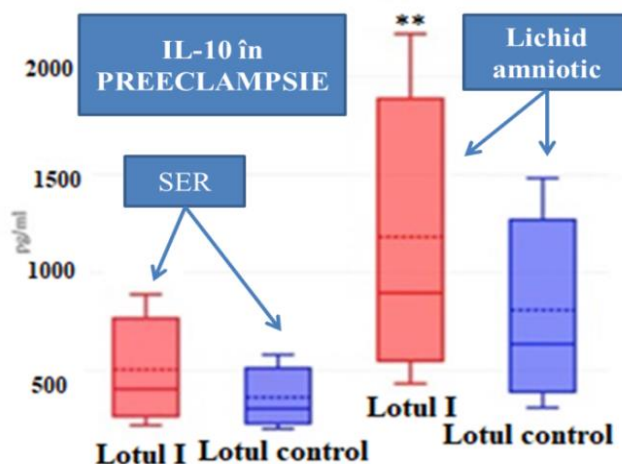


Figura 4.5. Variațiile IL-10 determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ.

Valorile medii și erorile standard determinate în serul sanguin pentru citokina antiinflamatoare la lotul I cu complicația indusă de sarcină preeclampsia au fost de $403,6 \pm 20,18$ pg/mL în lotul I de studii și respectiv, $304,24 \text{ pg/mL} \pm 15,21$ în lotul control, format din gestante sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV și evaluată fără particularități.

Alți factori care au avut un rol important în formarea procesului de angiogeneză determinat, au fost: factorul vascular de creștere (VEGF), implicat în formarea vaselor de sânge în placentă și în facilitarea schimbului de gaze și substanțe nutritive între mamă/făt, și factor stromal derivat celular (SDF-1a), nivelurile anormale ale căruia pot afecta procesul de implantare placentară cu riscul de pierdere recurentă a sarcinii.

Manifestările valorilor factorilor vasculari, prelevați în trimestrul al doilea de sarcină au fost următoarele.

Valorile medii determinate în serul sanguin, atât în cazul factorului SDF-1a, cât în cazul VEGF nu au avut diferențe statistice pentru sarcinile cu complicații gestaționale. Astfel,

valorile medii și erorile standard determinate în serul sanguin la factorul derivat stromal celular a fost de $478 \pm 23,9$ pg/mL în lotul I de studii, în raport cu $638,1 \pm 31,9$ pg/mL și respectiv valoarea medie a factorului vascular în serul sanguin din lotul I este $351,2 \pm 17,56$ pg/mL față de $323,4 \pm 16,17$ pg/mL.

Însă în lichidul amniotic aceste valori au crescut semnificativ ($***p < 0,001$) pentru factorului SDF-1 α în lotul I cu o medie de $958,2 \pm 47,91$ pg/mL (valoarea minimă de 651 pg/mL și maximum de 1979 pg/mL), pe când în sarcinile cu evoluție fără particularități, media a constitui $587,6 \pm 29,38$ pg/mL. Pentru factorul vascular de creștere valorile în sarcinile cu preeclampsie au fost în limita medie de $1801,2$ pg/mL $\pm 90,06$ cu minimum de 1076 pg/mL și maximum de 3873 pg/mL pentru ($**P < 0,0001$) față de $1045,5$ pg/mL $\pm 52,28$ identificată în sarcinile evaluate fără particularități (figura 4.6.)

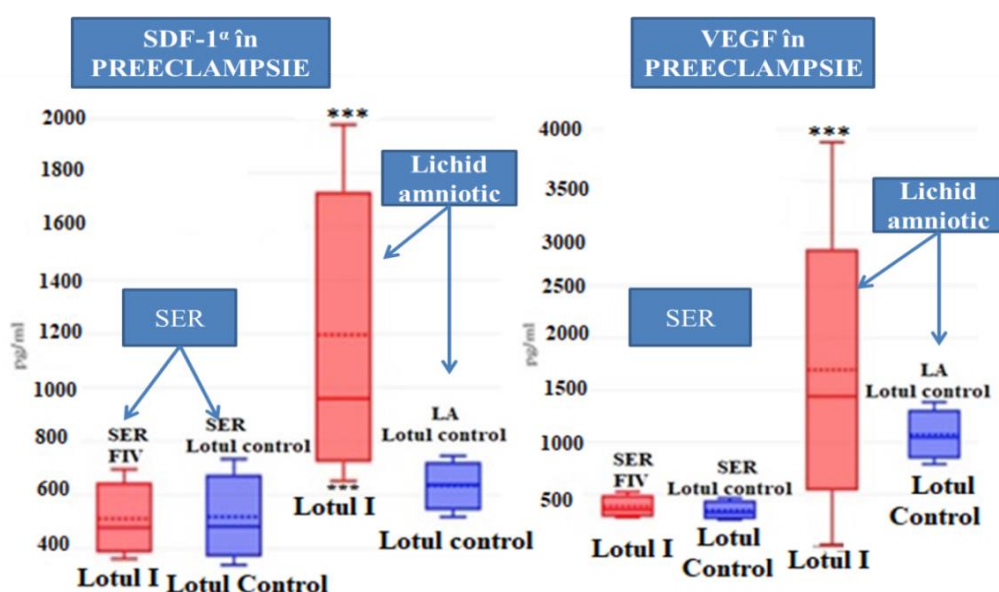


Figura 4.6. Variațiile ale SDF-1 α și VEGF determinate din serul sanguin și lichidul amniotic în sarcinile cu și fără preeclampsie din lotul I

Notă: Test *t* student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ.

Corelația interacțiunii acestor factori cu diverși markeri, cât și procesele care se desfășoară în timpul evoluției sarcinii sunt esențiale pentru stabilirea și menținerea cu succes a sarcinii.

Evaluarea markerilor pro- și antioxidanți ai stresului oxidativ, sub aspectul rolului pronostic pentru dezvoltarea complicațiilor prin preeclampsii la gravidele peste 35 de ani incluse în lotul I (tabelul 4.4.)

Tabelul 4.4. **Profilul oxidant în serul sanguin la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție**

Nr d/o	Mediatorii prooxidanți	Determinați în serul sanguin		p
		Preeclampsia (N=5)	lotul Is (N=10)	
1	2	3	4	5
1	HPL-hexan-timp uc/ml	15,94±0,79	15,67±0,78	0,56
2	HPL-hexan-intern uc/ml	4,09±0,20	4,99±0,25	0,17
3	HPL-hexan-tardiv uc/ml	1,30±0,06	2,43±0,12	0,66
4	HPL-izopr-timp uc/ml	53,28±2,67	46,32±2,32	0,38
5	HPL-izopr-interm uc/ml	21,40±1,07	19,02±0,95	0,67
6	HPL-izopr-tardiv uc/ml	4,20±0,21	4,13±0,21	0,80
7	PPOA	59,80±2,99	46,2±2,31	0,49
8	DAM μ M/l	11,80±0,59	9,47±0,47	0,88
9	NO μ M/l	78,43±3,92	75,63±3,78	0,37
10	AGE μ g/L	294,98±14,75	323,48±16,17	0,35
11	AIM mM/L	0,35±0,02	0,26±0,01	0,74

Notă: În lotul Is sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV, fără complicații în evoluție
 Colonița 3: „Preeclampsia”, sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV
 confruntate cu preeclampsie. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$
 eroarea standard. * p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

Analizând rezultatele parametrilor prooxidanți determinați la gravidele din ambele loturi de studiu, putem identifica nivelurile circulante ale HPL produșilor ale oxidării peroxidice ale lipidelor cu valoarea p de la (p = 0,17 până la p = 0,56), DAM (Dialdehida malonică) cu p = 0,8, Oxidul nitric (NO), compuși terminali de glicare avansata (AGE) și AIM - albumina ischemic modificată, precum și ai PPOA, care sunt practic identice conform valorilor medii în sarcinile concepute prin FIV cu evoluția sarcinii prin preeclampsie în comparație cu parametrii determinați la gravidele, sarcina cărora a fost concepută prin FIV fără particularități în evoluție (lotul Is).

Determinarea în comparație a markerilor prooxidanți din lichidul amniotic ale loturilor de cercetare, conferă următoare concluzie, tabelul 4.5.

Tabelul 4.5. **Profilul oxidant în lichidul amniotic (LA) în sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție**

Nr d/o	Mediatorii prooxidanți	Determinați în Lichidul amniotic (LA) în trimestrul II de sarcină		p
		Preeclampsia (N=5)	lotul Is (N=10)	
1	2	3	4	5
1	HPL-hexan-timp uc/ml	15,67±0,78	15,67±0,79	0,16
2	HPL-hexan-intern uc/ml	3,17±0,16	5,12±0,26**	0,75
3	HPL-hexan-tardiv uc/ml	0,87±0,04	3,38±0,17**	0,46
4	HPL-izopr-timp uc/ml	50,3±2,5*	43,16±2,16	0,4
5	HPL-izopr-interm uc/ml	18,87±0,94	11,08±0,55	0,47
6	HPL-izopr-tardiv uc/ml	4,32±0,22*	2,76±0,14	0,43
7	PPOA	25,18±1,26	22,35±1,12	0,26

8	DAM $\mu\text{M/l}$	0,43 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,08**	0,12
9	NO $\mu\text{M/l}$	78,4 $\pm$ 3,92	83,93 $\pm$ 4,2**	0,67
10	AGE $\mu\text{g/L}$	129,28 $\pm$ 6,4*	115,55 $\pm$ 5,78	0,5
11	AIM mM/L	0,24 $\pm$ 0,012	0,26 $\pm$ 0,013	0,19

Notă: În lotul Is sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV fără complicații în evoluție.

Colonița 3: „Preeclampsia”, sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV confruntate cu preeclampsie. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

*p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

În urma analizei și sintezei markerilor prooxidanți din lichidul amniotic prelevat la gestantele din lotul I cu complicații prin preeclampsie și compararea lor cu parametrii determinați în sarcinile fără particularități, nu s-au identificat valori statistice semnificative între cele două loturi. Astfel producții ale oxidării peroxidice ale lipidelor au avut valoarea statistică de la (p = 0,16 până la p = 0,75), DAM (Dialdehida malonică) cu p = 0,12, Oxidul nitric (NO), pentru p = 0,67, compuși terminali de glicare avansată cu valoare medie 129,28 $\mu\text{g/L} \pm 6,4$ în lotul Is, în comparație cu 115,55 $\mu\text{g/L} \pm 5,78$ pentru sarcinile fără particularități.

A fost realizată o analiză comparativă a markerilor antioxidanți determinați în serul sanguin la gestantele în trimestrul al doilea de sarcină la care în evoluție s-au complicat prin preeclampsie cu markerii determinați la gestantele cu sarcina care a evaluat fără particularități (tabelul 4.6.).

Tabelul 4.6. Profilul antioxidant în serul sanguin la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție

Nr d/o	Mediatorii antioxidanți	Determinați în serul sangvin în trimestrul II de sarcină		p
		Preeclampsia (N=5)	lotul Is (N=10)	
1	2	3	4	5
1	AAT-hexan mM/sl	0,13 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,16	0,5
2	AAT-izopr mM/sl	5,91 $\pm$ 1,72*	3,89 $\pm$ 0,67	0,05
3	Peptide histidinice Carnozina $\mu\text{M/l}$	178,48 $\pm$ 5,99	172,76 $\pm$ 4,6	0,4
4	Catalaza $\mu\text{M/l}$	14,95 $\pm$ 1,59	14,62 $\pm$ 1,99	0,3
5	SOD u/c-ser	1252,9 $\pm$ 60,84 **	1188,19 $\pm$ 88,89	0,001
6	Gr Tiolice ale prot	0,42 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,023	0,09
7	Tyoredoxina	0,55 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,06	0,3
8	Glutaredoxina	0,41 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,015	0,5
9	GR nM/s.L	643,8 $\pm$ 131,08**	483,47 $\pm$ 107,9	0,05
10	GST $\mu\text{M/min. L}$	63,5 $\pm$ 20,29	114,7 $\pm$ 68,1**	0,3
11	GPO nM/s.L	315,85 $\pm$ 38,2	876,12 $\pm$ 325,49**	0,7

Notă: În lotul Is sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV fără complicații în evoluție.

Colonița 3: „Preeclampsia”, sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV confruntate cu preeclampsie. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

*p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

Constatăm o amplificare mai mare la mediatorii antioxidanți AAT-izopropanol, Peptide histidinice Carnozina, superoxiddismutaza (SOD) glutationului reductaza (GR) fapt ce confirmă implicare pentru a menține echilibrul pro-antioxidanți deja în trimestrul al doilea de sarcină. GR

cu 33 la sută majorare în serul gestantelor la care ulterior sa declanșat complicația cu un risc vital major.

Se observă, că și valoarea medie a markerilor antioxidanți determinați în lichidul amniotic la aceste 5 gestante, cu evoluția sarcinii în preeclampsie au valori medii majorați a antioxidanților pe mai multe poziții (tabelul 4.7.)

Tabelul 4.7. Profilul antioxidant în lichidul amniotic (LA) la sarcinile cu complicații prin preeclampsie și sarcinile fără particularități în evoluție

Nr d/o	Mediatorii antioxidanți	Determinați în Lichidul amniotic (LA) în trimestrul II de sarcină		Nr d/o
		Preeclampsia (N=5)	lotul Is (N=10)	
1	Aat-hexan mM/sl	1,06± 0,05	0,61± 0,03	0,8
2	AAT-izopr mM/sl	32,96± 1,65***	16,9± 0,85	0,7
3	Peptide histidinice Carnozina μM/l	112,11 ± 5,6*	108,19± 5,4	0,4
4	Catalaza μM/l	7,14 ± 0,36	6,47± 0,32	0,6
5	SOD u/c-ser	1264,51 ± 63,22*	1143,78± 57,19	0,9
6	Gr Tiolice ale prot	0,23 ± 0,01	022± 0,01	0,2
7	Tyoredoxina	0,55 ± 0,02	0,49± 0,02	0,1
8	Glutaredoxina	0,41 ± 0,02	0,52± 0,03	0,6
9	GR nM/s.L	2985,71 ±149,3*	2827,17± 141,398	0,3
10	GST μM/min. L	29,23 ± 1,46	109,82± 5,5*	0,1
11	GPO nM/s.L	97,43 ± 4,87	1030,4± 51,52***	0,1

Notă: În lotul I s sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV fără complicații în evoluție.

Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

AAT-izopropanol, Peptide histidinice Carnozina, Catalaza SOD, GR determinați în lichidul amniotic la gestantele în sarcina cărora sa diagnosticat preeclampsia sau identificat cu valori crescute față de aceiași markeri deteminati din lichidul amniotic la gestantele cu sarcina fără particularități din lotul II de studiu.

Efectuând analiza comparativă cu markerii asemănători determinați la gestantele din același lot cu evoluția sarcinii fără particularități, constatăm următoarele valori statistic semnificative în serul sanguin al gestantelor cu complicație de preeclampsie:

- citokina pro-inflamatorie IL-6 și citokina antinflamatorie IL-10 au o majorare semnificativă;

- pro-oxidanții: sunt cu niveluri circulante majorate ale hidroperoxizii lipidici (HPL) produșilor ale oxidării peroxidice ale lipidelor;

- antioxidanții: amplificare mai mare la mediatorii ai activității antioxidante totale (AAT-izopropanol), Peptide histidinice Carnozina, superoxiddismutaza (SOD) glutationului reductaza (GR), fapt ce poate sugera implicare mediatică și nestabilitate pentru stresul oxidativ, deja în trimestrul al doilea de sarcină.

Analiza comparativă cu markerii asemănători determinați la gestantele din același lot cu evoluția sarcinii fără particularități, constatăm, următoarele valori statistice semnificative în lichidul amniotic (LA) al gestantelor cu complicație de preeclampsie:

- Interleukinele (pro-inflamatoare) IL-8 și IL-12 identificate în trimestrul al doilea de sarcină au *valori statistice semnificative în lichidul amniotic la gestantele sarcina cărora sa complicat cu preeclampsie. Se înregistrează și o amplificare semnificativa și a factorilor stromal derivat celular (SDF-1a) și vascular de creștere (VEGF).*

- pro-oxidanții în lichidul amniotic fără valori statistice semnificative;

- *antioxidanții:* AAT-izopropanol, Peptide histidinice Carnozina, Catalaza SOD, GR determinați în lichidul amniotic la gestantele în sarcina cărora sa diagnosticat preeclampsia sau identificat cu *valor crescute* față de aceiași markeri deteminati din lichidul amniotic la gestantele cu sarcina fără particularități din același lot de studiu.

HTA indusă de sarcină (HIS). La etapa monitorizării particularităților evoluției sarcinilor concepute prin metoda FIV la femeile cu vârsta peste 35 de ani incluse în studiu și respectiv lotul II de control în care au fost incluse gravide sarcina cărora a fost concepută natural deasemenea cu vârsta peste 35 de ani, cele mai multiple complicații cantitativ, induse de sarcină au fost hipertensiunea gestațională (HTAg), patologie, care transferă sarcina în categoria „risc major”.

În lotul I de cercetare, s-au înregistrat 16 cazuri de (HTAg) și în lotul II în 11 sarcini a fost diagnosticată (HTAg). Analiza sarcinilor cu dezvoltarea complicației prin (HTAg) în lotul I al studiului a evidențiat următoarele: 64 la sută din gravidele cu complicația dată au fost în intervalul de vîrstă 35-45 de ani și respectiv 36 la sută au fost în intervalul de vîrstă cu media de 47 ani.

Toate gravidele au fost luate la evidență în asistența medicală primară și medicul obstetrician-ginecolog la termen, supravegherea gravidelor a fost dublă conform locului de trai (4 gestante domiciliat în localitățile rurale și 12 în municipii) și în cadrul instituțiilor medicale unde a fost realizată fertilizarea in vitro. Supravegherea și monitoringul antenatal sa încadrat în criteriile de exigență pentru identificarea și prevenirea riscurilor pe parcursul sarcinii. În evoluția la 3 sarcini din lotul I cu (HTAg) au fost HTA preexistentă sarcinii în limitele gr.I-II NYHA.

În acuzele gravidelor ca primele simptome deranjante au apărut cefalee severă, somnolență, amețelă. Valorile tensiunii arteriale în toate cazurile erau 140-160 mmHg /90-110 mmHg clasificînd patologia în 3 cazuri ușoară și altele evoluție severă. De menționat, că 5 HTA(g) în suprapunere cu proteinuri și alte stări patologice au declanșat preeclampsia, analiza cărora este prezentată în subcapitolul următor.

Toate pacientele au fost la o monitorizare de alertă. Din 16 sarcini în care s-a declanșat HTA(g) nașterea prin inducerea travaliului/operație cezariană în 13 sarcini ale gestantelor din lotul I de studiu și în 3 nașterea per vias naturalis.

Valorile interleukinilor IL-6 și IL-8 proinflamatorii, identificate în serul sangvin la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani cu sarcina concepută prin metoda FIV, în evoluția sarcinilor cărora s-a identificat hipertensiunea arterială indusă de sarcină, este prezentată în figura 4.7.

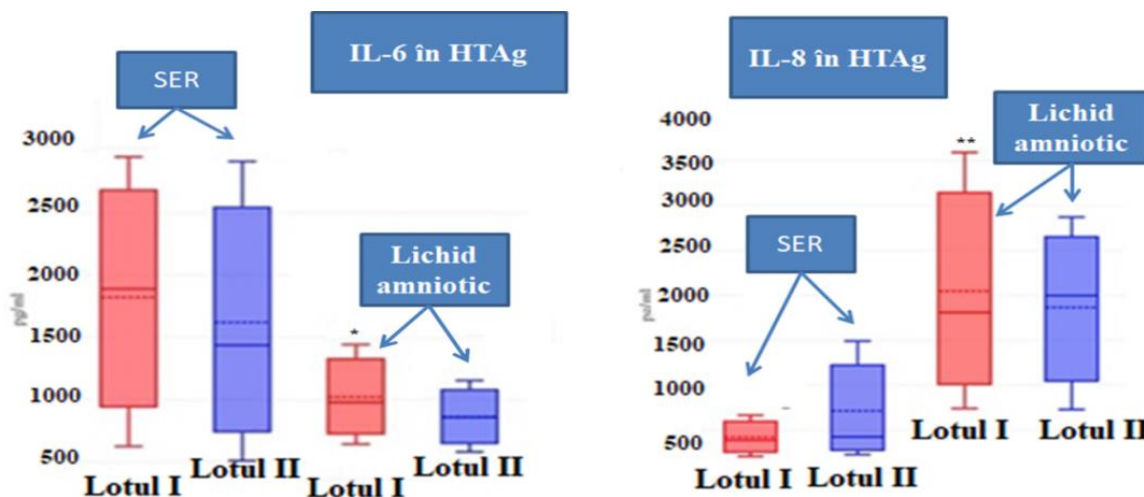


Figura 4.7. Variațiile ale IL-6 și IL-8 determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Gestantele la care a fost înregistrată în evoluția sarcinii HTA indusă de sarcină, nivelurile medii de interleukine proinflamatorii, IL-6, au fost moderat mai mari în ser sangvin matern în valoarea de $1889,43 \pm 94,47$ pg/ml și în lotul II, valorile medii și eroarea standard $1436,6 \pm 71,83$ pg/ml cu ($p < 0,05$). În lichidul amniotic IL-6 are o valoare medie de $976,07$ pg/ml $\pm 48,80$ în lotul I de studiu, și $855,8$ pg/ml $\pm 42,79$ pentru (* $p < 0,05$),

Analizând datele citokinei proinflamatorii IL-8, remarcăm o valoare medie scăzută în lotul I și o creștere cantitativă în lotul II de studii $386,79 \pm 43,3$ pg/ml, față de $422,4$ pg/ml $\pm 107,9$ în lotul II. Spre deosebire de lichidul amniotic prelevat în sarcinile concepute prin metoda FIV, în grupul cu complicații prin HTAg, valorile IL-10, IL-12 sunt crescute (figura 4.8.).

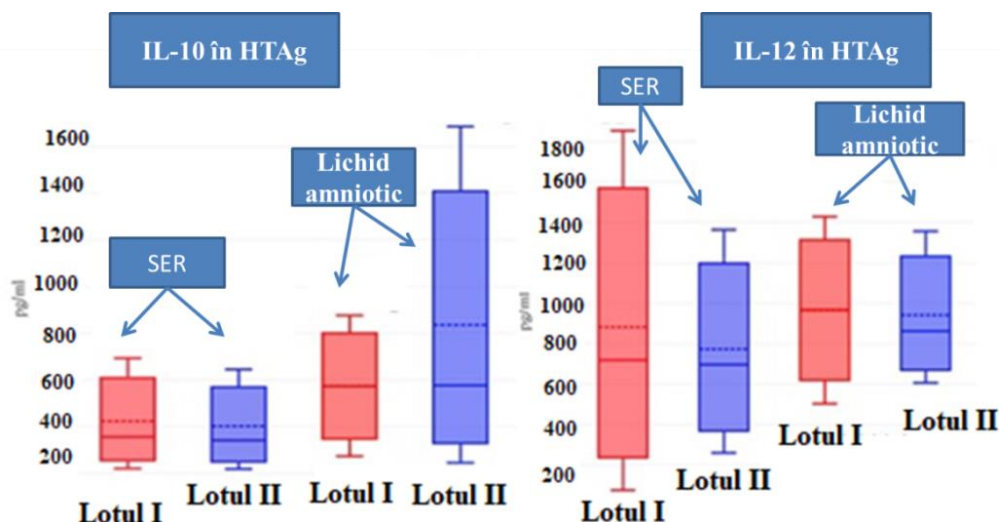


Figura 4.8. Variațiile ale IL-10 și IL-12 determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Este identificată o *majorare a valorilor IL-12 proinflamatorii* determinați în serul sangvin, cu valorile medii și eroarea standard în lotul I de studiu de $719,5 \pm 35,98$ pg/ml, în comparație cu $696,9 \pm 34,85$ pg/ml în lotul II de studii cu ($p < 0,5$). Totodă, în lichidul amniotic, se constată diferențe semnificative între loturi ale valorilor medii (** $p < 0,05$) cu *creșterea cantitativă* în lotul I de studiu, valoarea medie de $976,07 \pm 48,80$ pg/ml și $855,8 \pm 42,8$.

Valorile factorului SDF-1a, din serul sangvin, practic nu este diferit de cel din lotul II de studiu (figura 4.9.).

Analizând valorile factorului SDF-1a cu valorile medii și eroarea standard în lotul I de studiu de $696,9 \pm 34,85$ pg/ml în comparație cu $719,5 \pm 35,97$ pg/ml în lotul II *se constată o micșorare a factorului SDF-1a atât în lichidul amniotic, cât și în serul sangvin.*

Mediatorii prooxidanți identificați în serul sangvin a loturilor gestantelor cu sarcina obținută prin metoda FIV în evoluția cu HIS *statistic semnificative în ser au fost creșterea valorilor HPL izopropil intermediar* $19,66 \pm 0,98$ uc/ml și $3,38 \pm 0,17$ uc/ml în lotul II de studiu, valoarea PPOA de $52,35 \pm 2,62$ μ M/l în lotul I comparativ cu $19,93 \pm 0,99$ μ M/l în al II-lea lot cu HTAg, precum și valorii medii DAM $10,00$ μ M/l $\pm 1,5$ în lotul I de studii și $9,75 \pm 0,48$ μ M/l.

Spre deosebire de lichidul amniotic, în care markerii prooxidanți au avut valoarea crescută în lotul I de studii pentru HPL izopropil timpuriu $44,18 \pm 2,2$ uc/ml și $38,8 \pm 1,94$ uc/ml în lotul II, HPL izopropil intermediar $11,66 \pm 0,58$ uc/ml în lotul I de studii comparativ cu $9,4 \pm 0,47$ uc/ml în al II-lea lot, precum și a valorilor medii HPL izopropil tardiv $3,18 \pm 0,16$ uc/ml în lotul I comparativ cu $2,59 \pm 0,13$ uc/ml. Amplificare majorată sa înregistrat pentru PPOA $26,2$

$\pm 1,31 \mu\text{g/L}$ și $9,4 \pm 0,47 \mu\text{g/L}$ în lotul II și AGE cu valorile medii de $129,95 \pm 6,5 \mu\text{g/L}$ în comparație cu datele din lotul II $115,55 \pm 5,78 \mu\text{g/L}$.

Analiza datelor determinate din *serul sangvin* a markerilor antioxidanți în evoluția sarcinilor peste 35 de ani cu HTA indusă de sarcină a identificat creșterea următorilor markeri: valoarea media a superoxid dismutazei fiind de $1258,7 \pm 62,9$ u/c în lotul I în comparație cu $1091,03 \pm 54,6$ u/c în lotul II de studiu, precum și valorie GR a înregistrat $714,52 \pm 32,7$ nM/s.L și $297,60 \pm 14,8$ nM/s.L în al II-lea lot de studiu.

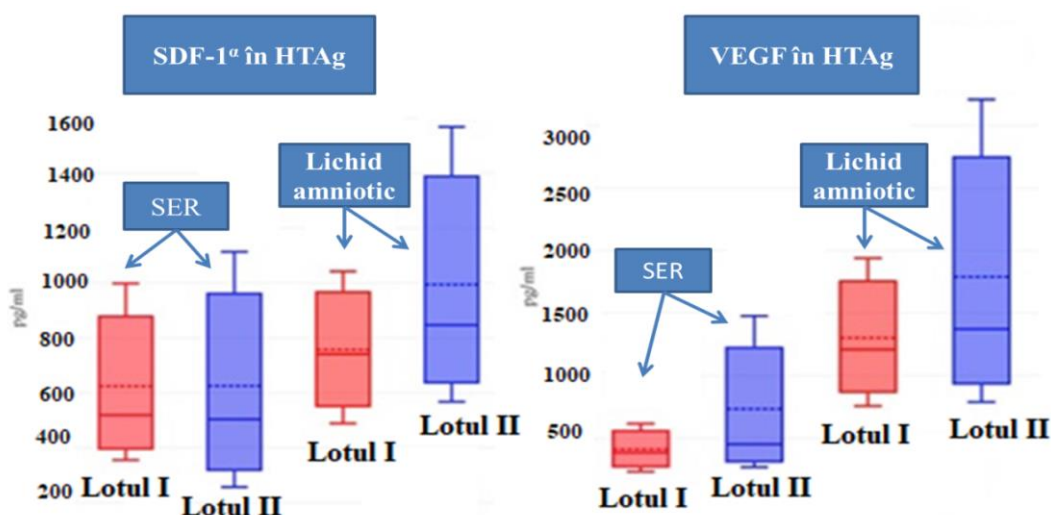


Figura 4.9. Variațiile ale SDF-1α și VEGF determinate în serul și lichidul amniotic în sarcinile complicate prin HIS

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Totodată a fost identificată în ser micșorarea în lotul I din trimestrul al doilea de gestație a valorilor GPO $722,08 \pm 36,10$ nM/s.L în comparație cu $3178,89 \pm 158,94$ nM/s.L în lotul II de gestație.

Indicatorii antioxidanți determinați în lichidul amniotic au identificat o creștere a valorilor antioxidanți HPL izopropil timpuriu $44,18 \pm 2,2$ uc/ml în lotul I și $38,8 \pm 1,9$ uc/ml în lotul II, cât și ale HPL izopropil intermediar $11,66 \pm 0,58$ uc/ml la $9,4 \pm 0,47$ uc/ml, HPL izopropil tardiv $3,18 \pm 0,16$ uc/ml în lotul II.

Totodată creșterea în lichidul amniotic a valorilor medii din lotul II de gestante cu sarcina concepută fiziologic și cu HTAg pentru GR $54 \pm 2,7$ nM/s.L și $324,84 \pm 16,4$ nM/s.L.

Nașterea prematură. Riscul de travaliu prematur, este în directă dependență de prezența factorilor de risc și a factorilor de predicție. În loturile de studii în evoluția sarcinilor s-a înregistrat 11 nașteri premature, inclusiv 8 în lotul I și 3 în categoria gestantelor incluse în lotul II. Etiologia nașterilor a fost presupusă drept o comasare a mai multor factori cu impact asupra maturității, respectiv pot fi placentari, uterini, materni și nu s-au exclus și factorii fetalii.

Din 8 nașteri premature la gestantele din categoria sarcinilor concepute prin metoda FIV, o naștere s-a clasificat în „moderată”, fiind declanșată în perioada de 33-34 săptămîni și 7 nașteri premature aproape de termen. Clinic, gestantele s-au adresat cu acuzele la schimbarea caracterului eliminărilor vaginale, durere în regiunea lombară și în 2 cazuri au fost contracții uterine frecvente și neregulate în mediu 6 pe oră.

La înregistrarea semnelor de iminență de naștere prematură, toate paciente au fost spitalizate cu asistența corespunzătoare. Algoritmul conduitei iminenței de naștere prematură și travaliului prematur a fost eficient. În 6 nașteri din 8 a fost înregistrată ruperea prematură a membranelor amniotice (RPMA).

Frecvența contracțiilor documentată. Au fost efectuată ultrasonografia transvaginală, pentru determinarea lungimii colului uterin, efectuarea testelor biochimice de predicție, testul cervicovaginal pentru determinarea fibronectinei fetale; Nașterea se va finisa per vias naturalis. Lauzele, s-au stabilizat starea sănătății în perioada relativ scurtă și nou născuții nu au constatat careva date pentru retard de dezvoltare intrauterină. Indicele ponderal = masa la naștere (g)/talie (cm³) sau încadrat în 2,2-2,8 Scorul APGAR fiind în intervalul 7-8.

Concentrațiile markerilor la gestantele sarcina cărora s-a complicat prin nașterea prematură determină o amplificare semnificativă în lichidul amniotic față de valorile medii obținute în ser (tabelul 4.8.).

Toți parametrii markerilor imuni în lichidul amniotic s-au determinat cu valori majorați față de parametrii determinați în ser (colonițele 5 și 6). Cea mai expimată majorare a concentrației în lichidul amniotic s-a înregistrat la chemochina IL-8 și factorul VEGF prtic de 4 ori, cu u valori semnificativ statistice ($p < 0.05$).

Tabelul 4.8. **Profilul imun în serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele cu complicații prin naștere prematură**

Nr d/o	Mediatori imuni valoarea	În serul gestantelor cu nașteri premature		În lichidul amniotic cu nașteri premature	
		lotul Ic (Nr=8)	lotul IIc (Nr=3)	lotul Ic (Nr=8)	lotul IIc (Nr=3)
1	2	3	4	5	6
1	IL-6 pg/ml	993,8±49,69	781,6±39,08	1034,5±51,73	910±45,5
2	IL-8 pg/ml	371,6±18,58	342,3±17,11	1815,3±90,77	1488,6±74,43
3	IL-10 pg/ml	415,9±20,8	442,3±22,12	725,1±36,26	714,6±35,73
4	IL-12 pg/ml	647,3±32,4	515,6±25,78	1020,3±51,02	784,6±39,23
5	SDF-1a pg/ml	386,8±19,34	291,3±14,57	764,4±38,22	656,6±32,83
6	VEGF pg/ml	345,6±17,28	340±17,01	1387,3±69,37	1078,3±53,92

Notă: În lotul I c și lotul IIc sunt gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV complicate în evoluție cu nașterea prematură.

Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

** $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ*

Chemochina IL-8 fiind mediatorul, care contribuie la receptivitatea endometrului în prezența embrionului, în cazul sarcinilor, care în evoluție sau complicat cu nașteri premature, permit a explica amplificarea lor majorată în lichidul amniotic consecința inter-relației acestora, inclusiv este oportună ipoteza logică, că IL-8, dat fiind faptul, stimulează secreția de progesteron din linia de celule trofoblaste, în situația dată, își exercită rolul prin deleție mărită cu scopul de a menține sarcina. Acest fapt și rezultatele obținute permit de a sugera, că majorarea chemochinei IL-8 în lichidul amniotic este caracteristică pentru gestantele cu risc de apariție a travaliului prematur.

Concentrațiile crescute de VEGF în ambele loturi pentru sarcinile cu nașteri premature în evoluție: $345,6 \pm 17,28$ (ser-lotul I) și $1387,3 \pm 69,37$ (LA-lotul I), $340 \pm 17,01$ (ser-lotul II) și respectiv $1078,3 \pm 53,92$ (LA-lotul II) sugerează angiogeneza și tendința de inflamație la mijlocul trimestrului, pot fi predictive pentru nașterea prematură.

Constatăm că la gestantele în evoluția sarcinii s-a finalizat cu NP inclusiv o moarte antenatală, *amplificarea markerilor antioxidanți a fost mai esențială decât pentru prooxidanți*, fapt ce permite de a constata că implicarea markerilor antioxidanți și în al doilea trimestru de sarcină, când s-a recoltat materialul biologic în studiu, este deja cu un aspect prognostic. Menționăm că majoritatea antioxidanților au o amplificare mai mare în lichidul amniotic, AAT izopropanol, valoarea medie fiind în LA 22 mM/sl și 5 mM/sl în ser la lotul I și aceeași tendință observăm și în lotul I, când valoarea medie a AAT izopropanol este practic de 2 ori mai mare în LA față de ser ($16,5$ față de $7,9$).

Aceeași situație constatăm la parametrii valorilor medii GR, AGE și GPO, la toți markerii nominalizați, amplificarea lor în LA din trimestru al doilea era cu mult mai mare față de ser. Pentru GR diferența este în lotul I de 5 ori mai mare și în lotul II practic de 4 ori mai mare.

Menționăm că la analiza comparativă a markerilor la gestantele din ambele loturi între cele obținute din LA și ser categoria celor care sarcinile au evaluat fără particularități practic în toate cazurile markerii pro și antioxidanți erau mai exprimați în serul mater, dec/t în LA. Astfel putem deduce că sarcinile, evoluția cărora include complicații care vor apărea peste 3-4 săptăm de sarcină ulterior, markerii imuni și antioxidanții sunt predictivi deja în trimestrul al doilea de sarcină pentru sarcini complicate ulterior.

Diabet zaharat gestațional (DZg) În categoria de complicații înregistrate în sarcinile monitorizate în studii la gestantele din lotul I a fost un caz de Diabet gestațional (DZG), în care s-a reușit o conduită eficientă de la momentul stabilirii diagnosticului și sarcina a evaluat în termeni cu nașterea prin inducerea travaliului/operație cezariană copilului sănătos.

Complicația DZG a fost stabilită în trimestrul al treilea de sarcină prin: glicemia bazală - 6,5 mmol/L și glicemia la două ore după 75 mg de glucoză oral - 10,0 mmol/L, hemoglobina glicozilată - Hb A1c 9,5% . Gravida prezintă acuze la poliurie, polidipsie.

Gestanta la momentul concepției și respectiv includerii în studiu a avut mai mulți factori de risc pentru a fi declanșat DZG. În primul rând vârsta de 45 ani. Pacienta face obezitate constituțional-exogenă, alimentară gr. II depistată antenatal. IMC la prima vizită la medic pe motiv de sarcină atinge -38 kg/m^2 .

Pacienta a fost inclusă în determinarea markerilor imuni și mediatorilor ai stresului oxidativ la etapa inițierii studiului. Evident, oxidarea glucozei, peroxidarea lipidelor caracteristic modificărilor metabolice în patologie practic sunt o sursă pentru producerea radicalilor liberi și creșterea riscului.

Măsurarea DAM în serul sangvin a gravidelor cu DZG este statistic semnificativ mai mare, iar statutul antioxidant (activitatea enzimelor superoxid dismutaza – SOD, glutatation peroxidaza – GPX, glutatation-S-transferaza – GST și catalaza – CAT) este statistic semnificativ mai mic.

Riscurile asociate cu vârsta maternă înaintată, au fost și în studiul nostru considerate ca posibile, în contextul sănătății individuale și al factorilor de sarcină existenți. În studiu în 222 de nașteri sau născut 234 copii vii (99 la sută).

În 205 nașteri evaluarea nou-născuților a confirmat corespunderea termenului de gestație de 37-42 săptămâni, cu un scor Apgar > 7 puncte în primul minut de viață și care nu au necesitat resuscitare.

În 14 sarcini din studiu au fost înregistrate 15 complicații fetale analiza cărora a constatat următoarele.

Complicațiile fetale. Au fost un compartiment mai puțin studiat în cercetare, doar în interacțiune cu evoluția și conduita sarcinilor. Totodată, importanța sănătății fătului și nașterea unui copil sănătos a fost un scop în sine pentru studiu integrat. Astfel, în sarcinile analizate, din totalul de 222 de sarcini, inclusiv 14 gemelare, (12 în lotul I și 2 în lotul II), în I lot - la 123 de feți, (inclusiv, 2 decese antenatal) și la 113 feți în lotul II au fost înregistrate 15 diverse complicații fetale.

În sarcinile monitorizate și evaluate din lotul I în studii la cele 111 nașteri în care s-au inclus gravidele cu vârsta peste 35 de ani, sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV s-au născut 121 copii vii în 2 cazuri sa înregistrat moarte antenatală (2 la sută) și 13 complicații fetale ($10,6 \pm 0,5\%$).

În sarcinile din lotul II sau înregistrat 111 nașteri, inclusiv 9 patologii fetale la 8 nou-născuți și în lotul II s-au înregistrat 113 nou-născuți, inclusiv 8 patologii fetale (**tabelul 4.9.**)

Tabelul 4.9. Complicațiile fetale înregistrate în sarcinile din studiu

Nr d/o	Complicații fetale înregistrate	Întegritați din sarcinile incluse în lotul I de studiu		Întegritați din sarcinile incluse în lotul II de studiu	
		Nr patologiilor	Nr nou născuților*	Nr patologiilor	Nr nou născuților*
1	Moarte antenatală a fătului	2	2	0	0
2	Malformații congenitale	1	Indicat în r.1	1	1
3	Făt macrosom	2	2	2	2
4	Encefalopatia hipoxico-ischemică	1	Indicat în r.3	0	0
5	Icter neonatal	3	3	3	3
Total:		9	7	6	8

*Notă : * în cazul patologiei conomitente nr nou-născutului se indică la patologia de bază*

Moarte antenatală a fătului. Moartea antenatală a fătului, considerate eșec în evoluția sarcinii s-au înregistrat în 2 cazuri din sarcinile incluse în studiu, constituind $0,9 \pm 0,05$ la sută.

Ambele cazuri de moarte antenatală a fătului în uter au fost înregistrate în lotul I.

Factori cauzali în mortalitățile antenatale sunt diverși și pot include prezența infecțiilor intrauterine, malformațiilor congenitale, patologiei placentei, anomaliilor cordonului ombilical și a stărilor hipertensive. Respectiv această categorie de complicații în sarcină impune monitorizare strictă a gravidelor.

În studiul dat, într-un caz gestanta în vârstă 42 ani, sarcina concepută prin metoda FIV, multipară, în anamneza obstetricală un copil născut la 28 de ani, urmat de avort spontan în a doua sarcină și actuala. Din patologiile extragenitale pacienta suferă de pielonefrită cronică primară, Obezitate gr I-II. Decesul fătului intrauterin, a survenit la 31 săptămâni de sarcină, Diagnosticul a fost confirmat după naștere. Malformația congenitală hidrocefalie obstructivă, cu blocaj pe traiectul circulației lichidiene Biventriculară (ambele orificii Monro blocate). Dezvoltată intrauterină a malformației nominalizate în cazul sar putea fi presupus ca a avut riscuri de a contracta boala în uter și de a dezvolta anomalii cerebrale dată. Dar evident careva corelări directe este imposibil de dedus

Alt caz de moarte antenatală a fătului la 32 săptămâni s-a înregistrat la gestanta de 48 ani, multipară cu mai multe patologii extragenitale, astfel cum Obezitate gr.II, Pielonefrită cronică primară. Anamneza obstetricală agravată prin întreruperea voluntară a 2 sarcinii până la conceperea prin reproducere umană asistată medical. Conform evaluării examenului ecografic

la 32 săptămîni a identificat decolarea prematură a placentei normal inserate. Nașterea prin operație cezareană.

Analiza markerilor imuni și ai stresului oxidativ la al doilea trimestru de sarcina nu a identificat careva amplificări în lichidul amniotic pentru a putea corela cu complicația înregistrată.

Malformații congenitale (MC) Evident, că dezvoltarea embrionară și fetală este influențată de mulți factori și dat fiind faptul sarcinile monitorizate în studiul nostru sunt din categoria de risc pe criteriul vârste gravidelor la etapa conceperii sarcinii peste 35 de ani, posibilitatea acestor complicații este recunoscută. O serie de mulți factori numiți teratogeni pot influența dezvoltarea țesuturilor și organelor avînd ca rezultat malformații congenitale la nou-născut. Cea mai critică perioadă pentru dezvoltarea malformațiilor congenitale este între zilele 13 și 60 a sarcinii, cînd se formează organele principale.

În studiul nostru au fost înregistrate malformații congenitale la 2 nou-născuți ambii în sarcinile incluse în lotul I.

O gravidă cu vârsta de 44 ani luată la evidență la 17 săptămîni, în anamneza extragenitală obezitate gr II, evoluția sarcinii pînă la naștere fără particularități, diagnosticată prenatal la ecografia realizată la termenul de 32 săptămîni. Nașterea cu travaliu indus prin operație cezareană în termen de 39 săptămîni. La făt a fost identificată cianoza neonatală, culoarea mucoasei, trunchi roză. Scor Apgar 6 puncte la 5 minute de la naștere. La a 3 zi după naștere a fost stabilit MCC Comunicarea atrio-ventriculară, nonductal dependentă.

Al doilea caz înregistrat de complicații fetale cu Malformația congenitală hidrocefalie obstructivă a fost și cazul de moarte antenatală a fătului la 31 săptămîni de sarcină, incluzînd în statistic de moartea perinatală.

În conduita cazului dat au fost apreciate indicații pentru naștere prin operația cezareană. Examinarea după naștere a nou-născutului mort și placentei a fost apreciat timpul de la decesul fetal pînă la naștere în limita de 8 ore. Patologia fetală a fost malformația congenitală hidrocefalie.

Făt macrosom. Această problemă obstetricală are impact reciproc pentru morbiditatea și mortalitatea materno-fetală din aceste considerente acestor sarcini și nașteri se acordă o atenție specială.

În studiu au fost 24 copii născuți macrosomi din 221 născuți vii, respectiv 14 feți macrosomi la gestantele din lotul I și 10 feți macrosomi născuți la gestantele din lotul II, în toate cazurile pe fundal de maladii extragenitale, inclusiv metabolice, cu masa corporală

supraponderală și obezitate, într-un caz diabet zaharat tip 2 insulino-neindependent în antecedente și HTA indusă de sarcină la 4 gestante.

Prezintă particularități semnificative în nașterea feților macrosomi două cazuri, când a fost asociată hemoragie uterină hipotonică (o pierdere de aproximativ 700 ml de sânge în primele 24 de ore după naștere), nașterea a fost indusă prin operația cezariană.

Și în a doua sarcină cu nașterea unui făt macrosom, gravida a conceput sarcina la 44 ani prin metoda FIV, în anamneza extragenitală constatăm HTA dr I NYHA și DZ tip II insulino-neindependent. Pe parcursul primelor două trimestre de sarcină careva stări patologice sau patologii gestaționale nu sau înregistrat. În ultimul trimestru de sarcina a fost diagnosticată HTA indusă de sarcină, evoluată în preeclampsie și naștere prematură. Sarcina rezolvată prin operație cezariană a fătului macrosom.

Nou-născutului a fost diagnosticată encefalopatia hipoxico-ischemică moderată cu debut precoce, au fost identificate semne detresei fetale exprimate prin bradicardie fetală (clasificarea Sarnat). Scor Apgar 5 puncte la a 10-ea minută de la naștere cu confirmarea acidozei metabolice determinate din sângele neonatal, colectat precoce.

Nașterile la gestantele din lotul II în ambele cazuri, în care sau născuți feți macrosomi au fost pe cale vaginale, nu s-a complicat cu alte anomalii ale activității travaliului, nu au fost înregistrate traumatisme a căilor moi de naștere Scor Apgar 7 puncte la 10 minute de la naștere.

Icter neonatal s-a înregistrat la 6 nou-născuți în ambele loturi câte 3 cazuri (2,7 la sută). În lotul I au fost identificați 3 nou-născuți, inclusiv în 2 cazuri icterul s-a identificat în primele 24 de ore de la naștere și în 1 caz sa constatat la a 2 zi de la naștere. În lotul II nou-născuții cu icter neonatal sau diagnosticat la a 2 zi de la naștere. Toți nou-născuții la care sa stabilit diagnosticul Icter neonatal în lotul I sunt din categoria sarcinilor cu nașteri premature. Clasificarea graduală a icterului după scorul Kramer a fost în limita stadiului I - III, respectiv ictericitatea s-a înregistrat în regiunea feței, gâtului, la nivelul ombilicului și în 2 cazuri răspîndirea ictericității a fost corespunzător stadiului III - pînă la nivelul genunchilor. În toate 6 stări morbide prin Icter neonatal medicii neonatologi au clasificat drept evoluție fiziologică, pe motiv că au lipsit semne clinice de alertă hepatosplenomegalie, valorile bilirubinei, ș.a.

Corelarea particularităților evoluției sarcicinelor incluse în lotul I de studiu cu biomarkerii determinați din serul sanguin și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină a permis deducerea anumitor concluzii.

4.3. Concluzii la Capitolul 4

Rezultatele cercetării cu referire la riscurile pentru evoluția în siguranță a sarcinii, cele pre-concepționale multifactoriale: vârsta medie pentru gestantele din ambele loturi $45,1 \pm 2,3$ de ani, situația, când una din trei gestante în anamneza obstetricală au avut complicații în antecedente, asocierea în sarcini a patologiilor extragenitale în $53,6 \pm 2,68$ la sută, cât și apariția noilor factori determinanți precum adaosul ponderal în sarcină, infecții virale, ș.a. predispun organismului matern pentru generarea complicațiilor gestaționale.

La gestantele din lotul I cu sarcina concepută prin metoda FIV, evoluția clinică este asemănătoare evoluției în sarcinile concepute natural, ținând cont, că în ambele loturi vârsta gravidelor la concepere a depășit 35 de ani. În același timp incidența complicațiilor a fost mai mare la sarcinile concepute prin FIV, HTA indusă de sarcină, *cota lor în lotul I fiind de $14 \pm 0,7\%$ față $9 \pm 8,1\%$ în lotul II*, preeclampsia, *care în lotul I sa declanșat la 5 gestante în lotul II nu s-a înregistrat și Nașteri premature proporția pe loturi fiind de $7,2 \pm 0,36\%$ și $2,7 \pm 0,14\%$.*

În cercetare s-a constatat, că Interleukina 6, în al doilea trimestru de sarcină, are o amplificare prognostică $p \leq 0,001$ în serul gestantelor pentru sarcinile în care s-au declanșat preeclampsia tardivă și HTA indusă de sarcină.

În lichidul amniotic valori cu amplificare semnificativă ($**p < 0,001$) sau înregistrat pentru factorului SDF-1 α în lotul I cu o medie de $958,2 \pm 47,91$ pg/mL și pentru Factorul Vascular de Creștere valorile au fost în media de $1801,2$ pg/mL $\pm 90,06$ cu ($**p < 0,0001$).

La gestantele cu sarcina complicată prin preeclampsie au fost identificate *majorarea valorilor proinflamatori IL-12* în serul sangvin și lichidul amniotic, cu date semnificativ statistice ($**p < 0,05$), respectiv majorarea *concentrației* în lotul I de studiu.

Antioxidanții în serul gestantelor cu complicații prin *HTA indusă de sarcină și preeclampsii* au avut amplificare cu 33 la sută majorare pentru Glutathionulireductaza (GR), mediatorii ai activității antioxidante totale (AAT-izopropanol), Peptide histidinice Carnozina, superoxidismutaza (SOD), fapt ce poate sugera implicare mediatică și nestabilitate pentru stresul oxidativ, deja în al doilea trimestru de sarcină.

Concentrațiile markerilor determinați în cercetare, la gestantele sarcina cărora s-a complicat prin *nașterea prematură*, determină o amplificare semnificativă în lichidul amniotic față de valorile medii obținuți în ser. Chemochina IL-8 și factorul VEGF au demonstrat o amplificare de 4 ori îmai mare în lichidul amniotic la gestantele din ambele loturi cu valori semnificativ statistice ($p < 0,05$). Chemochina IL-8 fiind mediatorul, care contribuie la receptivitatea endometrului în prezența embrionului, în cazul sarcinilor, care în evoluție sau

complicat cu nașteri premature, permit a explica amplificarea lor majorată în lichidul amniotic drept consecința inter-relației acestora, inclusiv este oportună ipoteza logică, că IL-8, dat fiind faptul, stimulează secreția de progesteron din linia de celule trofoblaste, în situația dată, își exercită rolul prin deleție mărită cu scopul de a menține sarcina. Acest fapt și rezultatele obținute permit de a sugera, că majorarea chemochinei IL-8 în lichidul amniotic este caracteristică pentru gestantele cu risc de apariție a travaliului prematur. Concentrațiile crescute de VEGF în ambele loturi pentru sarcinile cu nașteri premature în evoluție sugerează angiogeneza și tendința de inflamație la mijlocul trimestrului, pot fi predictive pentru nașterea prematură.

Sarcinile incluse în studiu în număr de 222, inclusiv 14 geminare sau $6,3 \pm 0,32\%$ (12 în lotul I și 2 în lotul II) sau finalizat cu nașterea a 246 nou-născuți (în I lot – 123 feți, inclusiv 2 deces antenatale și 113 feți în lotul II) sau înregistrat 15 diverse complicații fetale, inclusiv 2 finalizate cu deces antenatal.

5. EVALUAREA PROFILULUI IMUN ȘI MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV ÎN SARCINILE CONCEPTE PRIN METODA FIV

5.1. Citokinele și markerii imuni în sarcinile concepute prin metoda FIV la femeile cu vârsta de peste 35 de ani

Determinarea în cercetare a citokinelor IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 și a markerilor imuni VEGF, SDF - 1 α , a avut drept temei rolul lor în organismul uman, inclusiv implicarea timpurie în coordonarea răspunsului imun în stările patologice și în procesele de adaptare.

Echilibrul imunologic eficient permite interacțiunea „mamă-făt”, necesară pentru siguranța în sarcină și joacă un rol vital important în evoluția gestațională.

În cercetare, s-a ținut cont, că citokinele participă în realizarea răspunsurilor imune, în special la începutul sarcinii în pofida faptului că există încă multe necunoscute asupra aportului lor în fiziopatologia placentei și dezvoltarea fetală, care încă sunt teme pentru cercetări științifice.

Actuala cercetare și-a pus scop de a constata existența caracterului prognostic pentru complicații în sarcină, prin analiza răspunsului imun matern și fetal în trimestrul al doilea de sarcină la nivelul biomarkerilor determinați în serul sanguin și lichidul amniotic, la gestantele cu vârsta peste 35 de ani, sarcinile concepute prin metoda FIV.

În literatura științifică se indică, că nivelurile crescute de IL-6 și IL-8 în țesutul decidual indică o stare proinflamatoare îmbunătățită la interfața feto-maternă, care ar putea fi dăunătoare embrionului implantat și poate compromite sarcina. Constatările indică faptul, că atât nivelurile insuficiente, cât și cele excesive de IL-6/IL-8 perturbă rețeaua inflamatorie la interfața feto-maternă, ceea ce poate compromite sarcina. În plus, diferențele în profilul de expresie al IL-6 și IL-8 în țesuturile reproductive susțin ipoteza că unele complicații pot avea un fundal etiopatogenetic substanțial diferit [163].

În cercetare la evaluarea markerilor imuni s-a ținut cont de caracteristicile lor cunoscute: la pacienții supuși FIV, se sugerează că IL-8 este un predictor al potențialului de dezvoltare embrionară în evaluarea pre-transfer a embrionilor. Ratele de sarcină și de implantare, precum și numărul de născuți vii per FIV, sau injecție intracitoplasmatică de spermă, au fost mai mari, atunci, când mediul condiționat pre-transfer conținea IL-8 [110].

Multe rapoarte au caracterizat efectele IL-12 asupra celulelor T și NK, în special legate de capacitatea sa de a promova producția de IFN- γ în timpul infecției și inflamației (Trinchieri, 2003). Aceste studii au ajutat la stabilirea principiului că capacitatea înnăscută a celulelor

dendritice de a recunoaște agenții patogeni a condus la producerea de IL-12, care au furnizat semnale instructive critice pentru a susține răspunsurile Th1.

În procesul studierii privind funcțiile arhetipale ca factor de supresie imunitar a fost IL-10, citokina antiinflamatorie, cu funcțiile sale cunoscute ca protector vascular și modulator al stresului și autofagiei reticulului endoplasmatic (RE) în contextul rezultatelor normale și adverse ale sarcinii.

În cercetare au fost determinate la toate gestantele SDF-1- α și VEGF. Ipoteza migrației celulelor imune în organism spre proces patologic a servit motiv pentru a determina markerii imuni SDF-1- α (chemochina stromală derivată din factorul 1, varianta alfa), implicată în sistemul imun, și VEGF implicat în dezvoltarea endotelială vasculară.

Analiza comparativă a markerilor determinați în trimestrul al doilea de sarcină în serul matern și lichidul amniotic la gestantele din ambele loturi fără complicații în evoluția sarcinii, respectiv în lotul I_s (incluse 81 de gestante) și din lotul II_s (incluse 97 de gestante), tabelul 5.1.

Tabelul 5.1. Analiza comparativă a markerilor imuni determinați din serul sanguin, în sarcinile cu evoluția fără particularități

Mediatori imuni	Parametrii markerilor imuni determinați din serul sangvin		p
	Concentrația valorilor medii pg / ml (interval)		
	lotul Is (N ₁ =81)	lotul IIs (N ₂ =97)	
1	2	3	4
IL-6	993,85±54,69↑	863,39±43,17	0,87
IL-8	367,96±18,39↑	366,94±18,35	0,88
IL-10	346,77±17,34↑	292,42±14,62	0,33
IL-12	680,12±34,01↑	616,87±30,84	0,86
SDF-1α	603,41±30,17↓	667,79±33,39	0,33
VEGF	399,68±19,98↓	468,48±23,42	0,31

Notă: lotul I_s, lotul II_s – incluse gestantele fără complicații grave în evoluția sarcinii. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

Constatăm, că rezultatele citokinelor obținute din serul sanguin de la gravidele din ambele loturi evidențiază o diferență, care în fiecare caz aparte poate fi ipotetic explicată.

În coloanele 2 și 3 din tabelă, fiind devizate sarcinile corespunzător loturilor de studiu, pentru markerii obținuți a fost calculată valoarea medie și indicată eroarea standard.

Constatăm în lotul I_s de studii markerii imuni cu valoarea medie mai mare la IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 față de cei determinați la gestantele din lotul II_s.

În același timp, nu observăm diferențe statistic semnificative între loturi. Se înregistrează valori mai mici ai biomarkerilor SDF-1a (cu 9 la sută) și factorul vascular de creștere - VEGF cu (14,7 la sută) în sarcinile care au avut evoluția fără patologii din lotul I_s.

Astfel SDF-1a în lotul I_s este de 603,41±30,17pg/ml față de 667,79±30,39pg/ml determinat în lotul II_s. Markerul VEGF în lotul I_s cu valoarea medie de 399,68±19,98pg/ml și în lotul II_s de 468,48±23,42 pg/ml.

În tabelul 5.2, sunt incluși parametri obținuți ai markerilor imuni din lichidul amniotic colectat în trimestrul al doile de sarcină, conform standardului de screening atât pentru sarcinile concepute prin metoda FIV, cât și pentru cele concepute natural incluse în studiu.

Tabelul 5.2. Analiza comparativă a markerilor imuni determinați din lichidul amniotic în sarcinile cu evoluție fără particularități

Nr d/o	Mediatori imuni	Parametrii markerilor imuni determinați din lichidul amniotic Concentrația medie pg/ml (interval)		p
		lotul I _s (N ₁ =81)	lotul II _s (N ₂ =97)	
1	2	3	4	5
1	IL-6	961,83 ±48,05↓	963,84 ± 48,19	0,86
2	IL-8	1496,91 ± 74,85↑	1492,16 ± 74,61	0,86
3	IL-10	555,62 ± 27,78↑	546,39 ± 27,32	0,65
4	IL-12	907,10 ± 45,36↑	846,44 ± 42,32	0,33
5	SDF-1α	685,50 ± 34,28↑	626,82 ± 31,34	0,33
6	VEGF	1244,59 ± 62,23↑***	1042,48 ± 52,12	0,0001

Notă: Lotul I_s, Lotul II_s – incluse gestante, fără complicații grave în evoluția sarcinii.

Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ, ***p < 0,0001 este considerat extrem de semnificativ

Constatăm, că markerii citokinici determinați în lichidul amniotic în lotul I_s de studiu la sarcinile concepute prin FIV, înregistrează valori medii mai mari ai variațiilor IL-8, IL-10, IL-12, SDF-1a și VEGF.

Valorile statistic semnificative ale markerilor determinați în lichidul amniotic au fost pentru VEGF (p=0,0001). Astfel, VEGF cu valoarea medie în lotul I_s este de 1244,59±62,23pg/ml, atunci când în lotul II_s este mai diminuat, fiind de 1042,48±52,12pg/ml, (reducerea cu 16,2 la sută). Aceste situații pentru sarcinile concepute prin metoda FIV, pot fi explicate prin ipoteza influenței progesteronului administrat implicat, conform protocolului de menținere a sarcinilor concepute prin metoda FIV, poate avea și impact asupra markerilor imuni.

Studiu a avut ca scop, cercetarea evoluției sarcinii anume la gestantele cu o vârstă înaintată. Ca urmare, citokinele obținute au fost comparate la toate gestantele devizate după interval de vârstă în două perioade cu deferența de 10 ani - 7 ani, inclusiv fără complicații în evoluția sarcinii.

Astfel, intervalului de vîrstă 35-45 de ani (vârsta medie 41 ani), au corespuns și au fost incluse 60 gravide din lotul I_s și 61 gravide din lotul II_s. Cealaltă perioadă de vârstă a inclus 46-

52 de ani (vârsta medie 48 de ani), respectiv au corespuns 21 gravide din lotul I_s și 36 din lotul II_s de studiu (tabelul 5.3).

Tabelul 5.3. Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din serul sanguin în sarcinile cu evoluția fără particularități la gestante în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

Mediatori imuni	Determinați în ser matern Intervalul de vârstă 35-45 de ani Concentrația medie pg/ml		p	Determinați în ser matern Intervalul de vârstă 46 -52 de ani Concentrația medie pg/ml		p
	lotul I _s (N=60)	lotul II _s (N=61)		lotul I _s (N=21)	lotul II _s (N=36)	
1	2	3	4	5	6	7
IL-6	1082,31±54,22 ***	875,84±43,79	≤ 0,0001	1088,94±54,45 ***	909,94±45,5	<0,0001
IL-8	354,81±17,74	356,35±17,81	0,86	401,56±20,08	382,86±19,14	0,33
IL-10	319,85±15,99*	285,84±14,29	0,01	420,39±21,02**	300,11±15,01	<0,001
IL-12	667,32±33,37*	573,13±28,66	0,01	736,06±36,08	684,46±34,23	0,86
SDF-1α	586,64±29,33*	693,03±34,65	0,01	670,72±33,54	627,83±31,39	0,12
VEGF	368,46±18,42**	496,34±24,82	0,001	500,61±25,03	444,63±22,23	0,02

***Notă:** lotul I_s și lotul II_s – incluse gestante, pe intervale de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani, fără complicații grave în evoluția sarcinii. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.*

p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ, *p < 0,0001 este considerat extrem de semnificativ*

Analizând datele din tabelul 5.3., constatăm, prezența diferenței parametrilor markerilor imuni în dependența de vârsta de gestație. Astfel, toți markerii imuni determinați din serul sangvin la gestantele din lotul I_s sunt cu valori medii mai majorați în intervalul de vârstă 46-52 de ani, față de intervalul 35-45 ani.

În același timp în categoria cu vârsta medie 48 de ani parametrii determinați la gestantele din lotul I_s, sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV sunt mai înalți față de parametru ai citokinelor la gestantele din lotul II_s cu sarcina concepută natural.

În lotul II_s de studii, constatăm că markerii IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 sunt în creștere pentru categoria cu vârsta medie 48 de ani și doar SDF-1a și VEGF, ambii fiind factorii vasculari sunt în reducere.

Astfel, înregistrăm o diferență a variațiilor parametrilor obținuți la markerii SDF-1a și VEGF între loturile I_s și II_s de studiu, în dependență de intervalele de vârstă (diferența 10-7 ani).

Dacă la gravidele din lotul I_s, markerii SDF-1a și VEGF se majorează odată cu vârsta după cum urmează: 586,64±29,33pg/ml și 368,46±18,42pg/ml (vârsta 35-45 ani), pentru categoria cu vârsta medie 48 de ani, avem - 670,72±33,54 și 500,61±25,03pg/ml, atunci la gravidele din lotul II_s de studiu atestă o reducere a valorilor medii odată cu vârsta: 693,03±34,65 și 496,34±24,82 (cu vârsta medie 41 de ani), 627,83±31,39pg/ml și 444,63±22,23pg/ml (vârsta medie 48 de ani).

Am obținut o valoare semnificativă statistic la VEGF, parametrii mai mari în comparație la gestantele din lotul II_s cu vârsta medie 48 de ani, față de lotul I_s.

În categoria de vârstă 46-52 ani (media 48 ani) toți parametrii ai markerilor imuni determinați în serul sangvin la gestantele din lotul I_s sunt cu valori medii mai mari decât la gestantele cu sarcinile obținute natural.

În tabelul 5.4., au fost incluși parametrii determinați ai citokinelor din LA recoltate de la gestantele din ambele loturi incluse în studiu.

Tabelul 5.4 Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din lichidul amniotic (LA) în sarcinile cu evoluție fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

Mediat ori imuni	Determinați în LA, Intervalul de vârstă 35-45 de ani Concentrația medie pg/ml		p	Determinați în LA, Intervalul de vârstă 46-52 de ani Concentrația medie pg / ml		P
	lotul I _s (N=60)	lotul II _s (N=61)		lotul I _s (N=21)	lotul II _s (N=36)	
1	2	3	4	5	6	7
IL-6	483,29±74,16*	954,16±47,71	≤ 0,0001	995,60±49,78	940,06±47,0	0,33
IL-8	683,16±34,16	316,58±15,83	0,86	1564,72±78,24	1507,43±75,37	0,86
IL-10	180,79±9,04	544,10±27,21	0,01	546,06±27,30	545,49±24,42	0,33
IL-12	165,86±8,29	841,69±42,08	0,01	923,22±46,16	853,97±28,95	<0,001
SDF-1α	134,98±6,75	629,24±31,46	0,01	720,94±36,04	620,31±13,26	0,12
VEGF	987,68±49,38	1020,81±51,04	0,001	1257,89±62,89	1077,14±38,95	<0,001

Notă: lotul I_s și lotul II_s – incluse gestante, fără complicații grave în evoluția sarcinii pe intervale de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani. Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard. * p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ, ***p < 0,0001 este considerat extrem de semnificativ

Pentru comparație, gestantele au fost devizate în 2 categorii de vârstă 35-45 și 46-52 de ani. Toate sarcinile, parametrii cărora au fost analizați, au decurs cu evoluție fără particularități în 81 cazuri pentru gestantele din lotul I și 97 cazuri la gestantele incluse în studiu în lotul II_s și cu patologii induse în sarcină la în 30 sarcini din lotul I_s și respectiv 14 sarcini din lotul II_s, analiza cărora a fost făcută aparte.

La gestante din lotul I_s, odată cu vârsta observăm o tendință de a se majora valoarea medie a citokinelor: IL-8, IL-10, IL-12, SDF-1a și VEGF cu excepția IL-6, care este mai jos în diapazonul de vârstă 46-52 de ani.

Lotul II_s al gravidelor, în comparație cu cele doua intervale de vârstă analizate în tabel, au valori medii majorate pentru toți markerii imuni în intervalul de vârstă 46-52 ani, cu excepția la SDF-1a, care a rămas practic la aceeași valoare cum și pentru perioada de vârstă 35-45 ani.

Comparând valorile medii obținute între loturile I_s și II_s doar pentru gestantele cu vârsta în intervalul 35-45 de ani, observăm, că în sarcinile concepute prin metoda FIV se identifică

valoare medie mai mare pentru IL-6, IL-8 și parametrii mai joși la IL-10, IL-12 SDF-1a și VEGF.

Pentru categoria de vârstă 46-52 de ani, valoarea medie a citokinelor în lotul I_s, se identifică mai majorată față de cea determinată pentru toți markerii determinați.

Analiza comparativă a markerelor imuni determinați în trimestrul al doilea de sarcină din serul sangvin și lichidul amniotic, la femeile fără complicații grave în evoluția sarcinii în ambele loturi este prezentată în tabelul 5.5.

Tabelul 5.5. Analiza comparativă a citokinelor și markerilor imuni determinați din serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele din lotul I

Nr d/o	Marke rii imuni	Determinați în ser sangvin Concentrația medie pg/ml lotul I_s (N=81)	Determinați în lichidul amniotic (LA) Concentrația medie pg/ml lotul I_s (N=81)	p
1	2	3	4	5
1	IL-6	1093,85±38,27	961,83±32,402	0,79
2	IL-8	367,96±22,59	1496,91±76,647	0,71
3	IL-10	346,77±19,34	555,62±24,172	0,69
4	IL-12	680,12±57,40	907,1±23,779	0,51
5	SDF-1α	603,41±29,62	685,5±11,146	0,45
6	VEGF	399,68±24,04	1244,59±67,141	0,71

*Notă: lotul I_s sunt incluse gestantele din lotul I fără complicații în evoluția sarcinii
Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard. * p < 0,05 este considerat semnificativ,
p < 0,001 este considerat semnificativ, *p < 0,0001 este considerat extrem de semnificativ*

Astfel observăm, că markerii imuni IL-8, IL-10, IL-12, SDF-1a și VEGF au valori medii mai înalte în lichidul amniotic decât în serul sangvin pentru categoria de gestante cu sarcina concepută prin FIV și evoluția decursă fără particularități cu impact grav pentru sănătatea maternă și fetală. Merită de remarcat, că la unii markeri cum este IL-8 și VEGF creșterea valorilor medii este de 3 - 4 ori.

5.2. Determinarea statusului oxidant și antioxidant în sângele gestantelor cu vârsta de peste 35 de ani cu sarcinile concepute prin metoda FIV

Stresul oxidativ (SO) dezvoltat pe fundalul dezechilibrului între producția și acumularea speciilor reactive de oxigen (SRO) în celule și țesuturi, este dependent de eficiența sistemului antioxidant, care la rândul său este responsabil de detoxificarea acestor produse reactive.

În studiu au fost determinați și evaluați variația pro-oxidanților și antioxidanților determinați din ser sanguin și lichidul amniotic în trimestrul al doilea de sarcină.

S-a ținut cont de faptul, că pro-oxidanții sunt cu rol determinant în evoluția unor procese atât fiziologice, precum sarcina, cât și patfiziologice, cum ar fi inflamația, disfuncția endotelială, ateroscleroza, ș.a.

Pentru sarcină asigurarea unui echilibru între pro- și antioxidanți este important pe tot parcursul acesteia, de la implantarea placentei, etapa embriogenezei și ulterior pe parcursul evoluției.

În pofida conștientizării, că studiile pe subiecții umani oferă rezultate nu deplin concludente, totuși este important cunoașterea rolului markerilor pro- și antioxidanți în evoluția SO.

În subcapitolul dat, sunt analizați markeri ai SO determinați la toate gravidele, sarcinile cărora au evaluat fără complicații, atât la cele concepute prin metoda FIV, cât și pe cale naturală. Au fost analizați parametrii a 11 markeri din categoria sistemului pro-oxidant pe 3 categorii: radicali liberi, derivații de oxigen non-radicalici și substanțe tiol-reactive precum și 11 modulatori antioxidanți din categoriile: enzimatici (de exemplu, superoxiddismutaza (SOD), Catalaza (CAT) și glutatationului peroxidaza GP, ș.a.) și neenzimatici (de exemplu, glutatation, peptide histidinice - carnozina, ș.a.), toate fiind antioxidanți endogeni.

Segmentul dat s-a axat și pe diferența între intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani, pentru a identifica tendința de modificare a markerilor SO.

Astfel pro-oxidanții determinați din serul sanguin, au avut variații statistic nesemnificative, cât la gestante cu sarcina concepută prin metoda FIV (lotul I_s), atât și la gestantele cu sarcina concepută natural (lotul II_s), tabelul 5.6.

Tabelul 5.6. Mediatorii prooxidanți determinați din serul sanguin în sarcinile fără particularități în evoluție

Nr d/o	Mediatorii prooxidanți	lotul I _s (N ₁ =81)	lotul II _s (N ₂ =97)	p
1	2	3	4	5
1	HPL timpurii (hexan), uc/ml	17,2 ± 0,86	17,33 ± 0,87	0,1
2	HPL intermediari (hexan), uc/ml	4,81 ± 0,24	4,90 ± 0,23	0,3
3	HPL tardivi (hexan), uc/ml	1,93 ± 0,09	1,98 ± 0,01	0,1
4	HPL timpurii (izopropil)- uc/ml	40,87 ± 2,03	41,02 ± 2,06	0,99
5	HPL intermediari (izopropil)- uc/ml	16,73 ± 0,89	16,75 ± 0,83	0,86
6	HPL tardivi (izopropil)- uc/ml	3,44 ± 0,21	3,39 ± 0,17	0,42
7	PPOA	41,99 ± 2,68	39,61 ± 1,85	0,35
8	DAM μM/l	9,0 ± 0,44	8,97 ± 0,49	0,85
9	NO μM/l	73,56 ± 3,67	73,36 ± 3,66	0,12
10	AGE μg/L compuși de glicare avansată	345,47 ± 17,27	411,65 ± 20,58	0,09
11	AIM	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,1

Notă: lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii
Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Constatăm că nivelurile circulante ale HPL și DAM (produse ale oxidării peroxidice ale lipidelor), Oxidul nitric (NO), compuși terminali de glicare avansată (AGE) și AIM- albumina ischemic modificată, sunt practic identice în ambele loturi.

Același tablou, fără valori statistice semnificative, pentru markerii antioxidanți, s-au obținut la gestantele din ambele loturi cu evoluția sarcinilor fără particularități (tabelul 5.7.).

Tabelul 5.7. Mediatorii antioxidanți determinați din serul sanguin în sarcinile fără particularități în evoluție

Nr d/o	Mediatorii antioxidanți	lotul Is (n=81)	lotul IIs (n=97)	p
1	2	3	4	5
1	AAT-hexan mM/sl	0,51 ± 0,09	0,51 ± 0,09	0,7
2	AAT-izopr mM/sl	6,01 ± 0,39	5,84 ± 0,43	0,4
3	Peptide histidinice Carnozina μM/l -ser	164,53 ± 2,27	158,59 ± 1,86	0,35
4	Catalaza μM/l -ser	15,75 ± 0,71	14,59 ± 0,99	0,4
5	SOD u/c-ser	1121,30 ± 24,81 (10%)	1003,31 ± 25,42	0,05
6	Gr Tiolice ale prot	0,48 ± 0,02	0,57 ± 0,026	0,8
7	Tyoredoxina	0,56 ± 0,01	0,53 ± 0,008	0,6
8	Glutaredoxina	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,006	0,24
9	GR nM/s.L γ	690,09 ± 118,22	808,15 ± 99,97	0,2
10	GST μM/min. L	218,91 ± 42,28	226,10 ± 46,15	0,45
11	GPO nM/s.L	1451,77 ± 180,89	1489,70 ± 226,30	0,12

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

lotul I_s și lotul I_{Is} sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii

Mediatorii AAT-izopropanol, dipeptida histidinică Carnozina, Catalaza, superoxiddismutaza (SOD), Tyoredoxina și Glutaredoxina în lotul I_s la femeile cu sarcina concepută prin metoda FIV sunt mai majorați față de markerii determinați din serul sangvin la gravidele concepute natural lotul I_{Is}.

Cunoscut, că Glutaredoxinele și Catalaza protejează împotriva stresului oxidativ prin catalizarea reducerii disulfurilor amestecate de proteine, fiind enzime pentru sinteza cărora este necesitate de suficient O₂ ca ulterior să asigure rolul fundamental în protecția antioxidantă.

În analiza la compartimentul dat observăm, că superoxiddismutaza (SOD) are amplificarea mai mare față de media obținută în lotul I_{Is}, aproape de 10 la sută.

Ce ține de variația a glutathionului reductaza (GR), care de fapt este o tripeptidă cu rol antioxidant are o amplificație mai redusă în cazul gestantelor cu sarcina concepută în FIV, astfel

în lotul I_s am obținut parametrii $690,09 \pm 118,22$ atunci în lotul II_s mediatorul atinge media de $808,15 \pm 99,97$, atingând diferența de 15% față de lotul II_s.

Dat fiind faptul, că în loturile studiului au fost incluse gravide cu un spectru de vârstă de la 35 de ani până la 52 de ani inclusiv, analizate au fost rezultatele obținute a markerelor imuni și ai stresului oxidativ pro- și antioxidant în cele 2 intervale de vârstă 35 - 45 de ani și respectiv 46 - 52 de ani, tabelul 5.8.

Tabelul 5.8. Analiza comparativă a mediatorilor prooxidanți determinați din serul sanguin, în sarcinile cu evoluția fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

Nr d/o	Mediatori prooxidanți	Determinați în ser sanguin Intervalul de vârstă 35-45 ani (concentrația medie) pg/ml		Determinați în ser sanguin Intervalul de vârstă 46 - 52ani (concentrația medie) pg/ml	
		lotul Is (N ₁ =60)	lotul IIs (N ₂ =61)	lotul Is (N ₁ =21)	lotul IIs (N ₂ =36)
1	HPL timpurii (<i>hexan</i>), uc/ml	17,35±0,87	18,69±0,93	17,29±0,86	18,76±0,94
2	HPL intermediari (<i>hexan</i>), uc/ml	4,92±0,25	5,30±0,28	4,71±0,24	5,30±0,29
3	HPL tardivi (<i>hexan</i>), uc/ml	1,99±0,09	1,79±0,09	1,74±0,09	1,79±0,09
4	HPL timpurii (<i>izopropil</i>)- uc/ml	40,76±2,39	30,41±1,51	39,56±1,98	33,16±1,66
5	HPL intermediari (<i>izopropil</i>)- uc/ml	16,62±1,05	12,26±0,61	16,15±0,81	13,53±0,68
6	HPL tardivi (<i>izopropil</i>)- uc/ml	3,37±0,24	2,46±0,20	3,30±0,17	2,63±0,13
7	PPOA	49,26±2,46	42,99±2,15	47,10±2,54	45,71±2,29
8	DAM μM/l	9,95±0,51	12,08±0,94	9,34±0,49	11,63±0,58
9	NO μM/l	73,28±3,66	66,34±3,32	72,66±3,63	66,04±3,30
10	AGE μg/L compuși de glicare avansată	348,43±17,42	412,05±19,65	340,38±17,09	438,15±21,9

Notă: lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

Analizând parametrii obținuți la gravidele sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV, respectiv incuși în lotul I_s, constatăm, că toți mediatorii cu funcții prooxidante sunt mai reduși decât în lotul II_s, care au conceput sarcina natural.

Comparând valorile de amplificare a mediatorilor prooxidanți determinați la gestantele sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV cu gestantele din lotul II_s cu sarcina concepută natural în intervalele de vîrsta 15-35 de ani și respectiv 36-52 de ani constatăm, că hidroperoxizii lipidici hexan (HPL) timpurii și intermediari, produsele de peroxidare lipidică sunt cu valori medii mai mici în cazul sarcinii concepute prin metoda FIV în ambele categorii de vârstă analizate.

Mediatorii HPL izopropil (timpurii, intermediari și tardivi) prezintă o amplificare mai mare în serul gestantelor din lotul I_s față de gestantele din lotul II_s, atât în intervalul de vârstă de 35-45 de ani, cât și la 46-52 de ani.

Practic, toate proporțiile mediatorilor prooxidanți determinați în serul sanguin la gestantele din lotul I_s față de cele din lotul II_s la intervalele de vârstă 35-52 de ani și respectiv intervalul de vârstă 36-52 de ani sunt echivalente. Analiza markerilor antioxidanți determinați din serul sanguin în aceleași criterii comparative a vârstelor cu diferența de 10-8 ani este redată în tabelul 5.9.

Tabelul 5.9. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați din serul sanguin, în sarcinile cu evoluția fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

Nr d/	Mediatori antioxidanti	Determinați în ser matern Intervalul de vârstă 35-45 ani		Determinați în ser matern Intervalul de vârstă 46-52ani	
		lotul Is (N=60)	lotul IIs (N=61)	lotul Is (N=21)	lotul IIs (N=36)
1	2	3	4	5	6
1	AAT (hexan) mM/l	0,52 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,49 ± 0,02
2	AAT (izopropanol) mM/l mM/l mM/l	5,94 ± 0,29	7,84 ± 0,39	6,18 ± 0,3	7,85 ± 0,39
3	Peptide histidinice Carnozina μM/l	160,59 ± 8,02	158,95 ± 7,94	160,67 ± 8,04	152,70 ± 7,64
4	Catalaza μM/l	15,69 ± 0,78	14,63 ± 0,73	16,78 ± 0,84	14,51 ± 0,71
5	SOD u/c	1058,78 ± 52,94	983,52 ± 49,18	1073,11 ± 53,77	1011,56 ± 54,01
6	γ-GPT u/l	36,64 ± 1,83	46,62 ± 2,33	38,68 ± 1,91	60,44 ± 3,02
7	Grupe Tiolice ale proteinelor μM/l	0,48 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,51 ± 0,02	0,56 ± 0,05
8	Tyoredoxina	0,57 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,03
9	Glutaredoxina	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,02
10	GR nM/s.L	633 ± 31,65	800,05 ± 40	865,88 ± 43,29	999,44 ± 49,97
11	GST μM/min. L	226,10 ± 11,3	69,57 ± 3,48	112,07 ± 5,6	71,69 ± 3,58
12	GPO nM/s.L	1489,70 ± 74,48	2288,02 ± 114,4	1437,43 ± 71,85	2710,49 ± 135,52

Notă: lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii.

Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

*p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

Mediatorii antioxidanți determinați din serul sanguin în trimestrul al doilea de sarcină la gestantele din ambele loturi constată o tendință de majorare odată cu înaintarea în vârstă.

Astfel, în sarcinile concepute prin metoda FIV, gravidele cu vârsta în intervalul 46-52 de ani înregistrează majorarea mediatorilor antioxidanți față de cei determinați la gestantele în perioada de vârstă 35-45 de ani la următorii parametri: glutatión reductaza (GR) de la 633 nM/s.L ± 31,65 în categoria de vârstă 35-45 de ani se majorează până la 865,88 nM/s.L ± 43,29.

Superoxid dismutază (SOD) pentru gestantele din lotul I_s la intervalul de vârstă medie 41 ani se înregistrează cu parametrii 1058,78 ± 52,94 u/c și la vârsta medie de 48 ani deja avem o tendință de majorare cu 1,6% amplificare a mediatorilor - valoarea medie fiind de 1073,11 ±

53,77. Pentru gestantele din lotul II_s înregistrăm o majorare cu înaintarea în vârstă, fiind în creștere cu +8,4%; de la $983,52 \pm 49,18$ (vârsta medie de 41 ani) la $1011,56 \pm 54,01$ (vârsta medie de 48 de ani).

Pentru γ -GPT, valoarea medie practic identică în ambele loturi de la $36,64 \pm 4,32$ u/l (o creștere cu +17 la sută) la $38,68 \pm 1,91$ u/l în vârsta mai înaintată.

Ambii mediatorii ai activității antioxidante totale AAT (hexan) și (izopropanol) sunt mai majorați în serul sanguin la femeile gravide, atât în lotul I_s cât și în lotul II_s, odată cu înaintarea în vârstă.

Astfel, AAT (hexan) $0,52 \pm 0,02$ mM/l și respectiv $0,56 \pm 0,02$ mM/l în a doua categorie de vârstă, AAT(izopropanol) $5,94 \pm 0,29$ mM/l și respectiv $6,18 \pm 0,3$ mM/l.

Este de menționat, că toți mediatorii ai activității antioxidante totale hexan și izopropanol în serul colectat de la femeile gravide, sarcina cărora a fost concepută natural, se mențin în aceeași valoare medie în ambele categorii de vârstă incluse în studiu, cu mici devieri neînsemnate, ca exemplu AAT (hexan) la gravidele din lotul II_s în intervalul unde vârstă medie este de 41 ani; parametrii înregistrează o valoare medie de $0,46 \pm 0,02$ mM/l și respectiv în intervalul de vârstă unde media este 48 de ani cu AAT (hexan) de $0,49 \pm 0,03$ mM/l.

Constatăm, că sunt markeri, care odată cu vârsta își reduc valorile medii în sarcinile, care au fost concepute prin metoda FIV, atunci când tot acești markeri în sarcinile concepute natural cu înaintarea în vârstă au tendință de a se majora. Glutation peroxidaza (GPO) în lotul I_s unde vârstă medie este de 41 ani înregistrează parametrii $1489,70 \pm 74,48$ nM/s.L și respectiv în intervalul cu vârstă medie de 48 ani deja este o reducere cu $3,6 \pm 0,18\%$ fiind de $1437,43 \pm 71,85$ nM/s.L, atunci când în lotul II_s înregistrăm cifre mai mari aproape cu 80 la sută pentru GPO - $2288,02 \pm 114,4$ nM/s.L și $2710,49 \pm 135,52$ nM/s.L.

5.3. Markerii oxidanți și antioxidanți determinați în lichidul amniotic la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, în sarcinile concepute prin metoda FIV

Lichidul amniotic fiind complet steril, joacă un rol important pentru siguranța fătului și evoluția sarcinii. În studiu a fost recoltat prin amniocenteză, procedura minim-invazivă, în trimestrul al doilea de sarcină pentru a obține informația în scopul diagnosticului prenatal.

Este cunoscut, că sarcina este susceptibilă la stres oxidativ și apărarea antioxidantă în timpul sarcinii poate fi modificată ca consecință a creșterii nivelului de stres oxidativ. Cercetarea data și-a pus ca scop de a evalua prezența dovezilor privind calitatea echilibrului sistemului oxidativ-antioxidant exprimat în lichidul amniotic în trimestrul al doilea de gestație.

A fost analizat profilul oxidant și antioxidant în lichidul amniotic, la gestantele din ambele loturi ale eșantionului, sarcina cărora a evaluat fără particularități.

Pentru investigațiile realizate în lichidul amniotic corespunzător celor efectuate în serul sanguin colectat de la toate gestantele incluse în studiu, au fost determinați 11 mediatori cu caracteristici prooxidanți și 11 mediatori ai sistemului antioxidant. În tabelul 5.10., sunt comparați parametrii markerilor obținuți de la gravidele din ambele loturi.

Tabelul 5.10. **Mediatorii oxidanți determinați din lichidul amniotic în sarcinile fără particularități în evoluție**

Nr d/o	Mediatorii prooxidanți	lotul Is (N=81)	lotul IIs (n=97)	p
1	2	3	4	5
1	HPL timpurii (hexan), uc/ml	15,71 ± 0,79	16,32 ± 0,82	0,49
2	HPL intermediari(hexan), uc/ml	4,68 ± 0,23	5,17 ± 0,26	0,08
3	HPL tardivi (hexan), uc/ml	1,75 ± 0,09	1,81 ± 0,09	0,35
4	HPL timpurii (izopropil)- uc/ml	38,01 ± 1,88	29,22 ± 1,46	0,78
5	HPL intermediari (izopropil)- uc/ml	10,88 ± 0,54	8,86 ± 0,44	0,99
6	HPL tardivi (izopropil)- uc/ml	3,02 ± 0,15	2,39 ± 0,12	
7	PPOA	24,30 ± 1,22	29,37 ± 1,47	0,18
8	DAM μM/l	5,47 ± 0,27	10,22 ± 0,51	0,24
9	NO μM/l	77,97 ± 3,89	79,59 ± 3,98	0,24
10	AGE μg/L compuși de glicare avansată	107,67 ± 5,38	97,53 ± 4,88	0,68

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

**p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ*

lotul Is și lotul IIs sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii

Constatăm, că în lichidul amniotic asemănător mediatorilor prooxidanți determinați în serul sanguin al gestantelor, toți trei markeri din categoria Hidroperoxizi lipidici (hexan), incluși în studiu: timpurii, intermediari și tardivi, cu valori medii mai mici în cazul sarcinilor concepute prin metoda FIV.

Valori medii ai markerilor prooxidanți obținuți mai joase în lotul Is pentru Dialdehidă malonică (DAM) 5,47 μM/l ± 0,27 (lotul Is) față de 10,22 μM/l ± 0,51 (lotul IIs), respectiv diferența valorilor medii în loturi este de 47%. Alți markeri ai sistemului prooxidant incluși în studiu, cum sunt produșii proteici de oxidare avansată (PPOA) și oxidul nitric (NO) sunt de asemenea cu valori medii mai reduse în lotul Is față de lotul IIs de studiu, dar în limita neînsemnată.

Mediatorii prooxidanți HPL timpurii (izopropil), HPL intermediari (izopropil) și HPL tardivi (izopropil) denotă o amplificare mai mare la gravidele din lotul Is de studiu față de cele din lotul IIs. Aceeași variație constatăm și în cazul compușilor de glicare avansată (AGE) în lotul Is am obținut 107,67 ± 5,38 μg/L și în lotul IIs 97,53 ± 4,88 μg/L.

Valorile caracteristice sistemului antioxidant, determinate din lichidul amniotic la gravidele din studiu sunt expuse în tabelul 5.11.

Tabelul 5.11. Mediatorii antioxidanți determinați în lichidul amniotic, în sarcinile fără particularități în evoluție

Nr d/o	Mediatorii antioxidanți	lotul I _s (N ₁ =81)	lotul II _s (N ₂ =97)	p
1	2	3	4	5
1	AAT-hexan mM/sl	0,76 ± 0,04	0,45 ± 0,02	0,08
2	AAT-izopr mM/sl	18,90 ± 0,95*	8,58 ± 0,43	0,05
3	Peptide histidinice Carnozina μM/l	124,52 ± 6,23	123,34 ± 6,21	0,26
4	Catalaza μM/l	8,59 ± 0,43	12,56 ± 0,64	0,54
5	SOD u/c	1010,23 ± 50,5*	670,47 ± 33,5	0,02
6	γ-GPT u/l	146,10 ± 7,3*	99,83 ± 4,99	0,05
7	Gr Tiolice ale prot μM/l	0,312 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,10
8	Tyoreduxina μM/l	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,97
9	Glutaredoxina μM/l	0,48 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,67
10	GR nM/s.L	1605,03 ± 80,25	2025,19 ± 101,25*	0,04
11	GST μM/min. L	129,43 ± 6,47*	37,85 ± 1,89	0,05
12	GPO nM/s.L	1807,17 ± 90,35	2655,47 ± 132,77*	0,05

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

**p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ
lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii*

Variația markerilor antioxidanți determinați în lotul I_s și respectiv celor din lotul II_s identifică amplificarea activității a Superoxid desmutazei (SOD) cu peste 50% diferență, de asemenea gama-glutamil transpeptidaza (γ-GGT), înregistrat în lotul I_s - 146,10 ± 7,3 u/l și respectiv în lotul II_s - 99,83 ± 4,99 u/l atinge o valoare statistică semnificativă (p 0,003). Este cunoscut, că γ-GGT este o proteină localizată în membrana citoplasmatică cu rol important în metabolismul mediatorilor inflamației.

Activitatea antioxidantă totală exprimată prin markerul AAT-hexan și AAT-izopropanol sunt deasemenea cu valori medii mai mari în lotul I_s față de lotul II_s fără a atinge indici semnificativi statistici.

Practic de 3 ori constatăm majorarea în lichidul amniotic la gestantele din lotul I_s, a valorilor medii pentru glutathion s-transferaza (GST) – enzimă, care reprezintă un răspuns antioxidant pentru unii metaboliți toxici generați în organism, cum ar fi peroxid-, carbonil- ș.a.

O valoare mai joasă în lotul I_s, față de lotul II_s s-a obținut pentru Catalază, grupe tiolice ale proteinelor și cel mai semnificativ cu 20 la sută pentru glutathion reductaza (GR).

În cercetare o atenție specială s-a acordat analizei variației valorilor mediatorilor pro- și antioxidanți odată cu înaintarea în vârstă a gestantelor, tabelul 5.12.

Tabelul 5.12. Analiza comparativă a mediatorilor oxidanți determinați din lichidul amniotic (LA), în sarcinile cu evoluția fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

Nr d/o	Mediatori oxidanți	Determinați în LA Intervalul de vârstă 35-45 de ani Concentrația medie pg/ml		Determinați în LA Intervalul de vârstă 46 -52 de ani Concentrația medie pg/ml	
		lotul I _s (N ₁ =60)	lotul II _s (N ₂ =61)	lotul I _s (N ₁ =21)	lotul II _s (N ₂ =36)
1	HPL timpurii (hexan), uc/ml	15,77±0,78	16,45±0,82	15,86±0,76	16,04±0,8
2	HPL intermediari (hexan), uc/ml	4,80±0,24	5,08±0,25	4,54±0,26	5,22±0,26
3	HPL tardivi (hexan), uc/ml	1,68±0,84	1,16±0,06	1,66±0,81	0,98±0,05
4	HPL timpurii (izopropil)- uc/ml	37,12±1,86	28,96±1,45	36,66±1,76	29,54±1,47
5	HPL intermediari (izopropil)- uc/ml	10,99±0,55	8,78±0,44	10,27±0,51	8,87±0,44
6	HPL tardivi (izopropil)- uc/ml	3,01±0,315	2,42±0,44	2,97±0,15	2,30±0,12
7	PPOA	24,20±1,20	29,75±1,48	28,26±1,41	28,84±1,44
8	DAM μM/l	5,74±0,29	9,64±0,48	6,26±0,31	11,27±0,56
9	NO μM/l	76,99±3,85	80,69±4,03	78,29±3,91	78,16±3,91
10	AGE μg/L compuși de glicare avansată	108,13±5,41	97,62±4,89	108,04±5,40	97,43±4,87

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

* p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ

lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii

Din tabelul 5.12., constatăm, că în cazul prooxidanților determinați în trimestrul al doilea de sarcină la gestantele din ambele loturi, nu am identificat diferențe și amplificări cu semnificație statistică comparând markerii obținuți între loturi și pentru categoria de vârstă mai înaintată.

Analiza comparativă a mediatorilor sistemului antioxidant repartizat de asemenea în 2 categorii de vârstă pe ambele loturi a fost redată în tabelul 5.13.

Tabelul 5.13. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați din lichidul amniotic, în sarcinile cu evoluția fără particularități, la gestantele în intervalele de vârstă 35-45 de ani și 46-52 de ani

N	Mediatori antioxidanți	Determinați în LA Intervalul de vârstă 35-45 ani Concentrația medie pg/ml		Determinați în LA Intervalul de vârstă 46 -52ani Concentrația medie pg/ml	
		lotul I _s (N ₁ =60)	lotul II _s (N ₂ =61)	lotul I _s (N ₁ =21)	lotul II _s (N ₂ =36)
1	AAt-hexan mM/sl	0,78±0,04	0,44±0,06	0,77±0,04	0,47±0,06
2	AAT-izopr mM/sl	18,47±0,92	8,58±0,42	18,24 ±0,91	8,63±0,51
3	Peptide	129,12±6,46	122,21±2,50	130,00±6,05	124,93±3,01

	histidinice Carnozina $\mu\text{M/l}$				
4	Catalaza $\mu\text{M/l}$	8,51 $\pm$ 0,43	12,71 $\pm$ 0,42	9,05 $\pm$ 0,45	12,33 $\pm$ 0,35
5	SOD u/c	1016,07 $\pm$ 50,18	655,35 $\pm$ 29,63	989,87 $\pm$ 49,49	702,11 $\pm$ 35,10
6	γ -GPT u/l	148,62 $\pm$ 7,43	99,03 $\pm$ 5,15	128,71 $\pm$ 6,44	101,80 $\pm$ 5,01
7	Gr Tiolice ale prot $\mu\text{M/l}$	0,31 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02
8	Tyoreduxina $\mu\text{M/l}$	0,56 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,03
9	Glutaredoxina $\mu\text{M/l}$	0,48 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02
10	GR nM/s.L	144,96 $\pm$ 7,25	816,53 $\pm$ 143,83	1918,80 $\pm$ 95,94	1570,82 $\pm$ 78,54
11	GST $\mu\text{M/min. L}$	109,05 $\pm$ 5,45	31,72 $\pm$ 6,94	48,78 $\pm$ 2,43	48,47 $\pm$ 2,42
12	GPO nM/s.L	1710,89 $\pm$ 85,54	2869,34 $\pm$ 438,40	1710,90 $\pm$ 85,55	2295,23 $\pm$ 114,76

Notă: Test *t* student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie $\pm$ eroarea standard.

* $p < 0,05$ este considerat semnificativ, ** $p < 0,001$ este considerat semnificativ

lotul I_s și lotul II_s sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii

Constatăm o diferență a valorilor medii ale markerilor determinați la gestantele din lotul I_s față de lotul II_s , ca exemplu: superoxidismutaza SOD (în categoria de vârstă 35 - 45 de ani) cu o diferență de + 50 la sută a valorii în lichidul amniotic, respectiv valorile medii în lotul I_s sunt de 1016,07 $\pm$ 50,18 u/c și 655,35 $\pm$ 29,63 u/c în sarcinile concepute natural.

Aceeași variație constatăm și la mediatorul gama-glutamyltranspeptidaza (γ -GGT) pentru ambele loturi din studiu. O diferență în categoria de vârstă 35-45 de ani se identifică la mediatorul antioxidant glutathion s-transferaza (GST) în lotul I_s valorile medii ating 109,05 $\pm$ 5,45 $\mu\text{M/min. L}$ și în lotul II_s - 31,72 $\pm$ 6,94, pe când în categoria de vârstă 46-52 de ani sunt practic la același nivel: lotul I_s - 48,78 $\pm$ 2,43 și în lotul II_s - 48,47 $\pm$ 2,42 $\mu\text{M/min. L}$.

Glutathion peroxidaza (GPO) în lotul I_s , în ambele categorii de intervale de vârstă nu diferă valorile medii, în același timp în comparație cu valorile obținute la gestantele din lotul II_s sunt semnificativ mai reduse (cu -16%).

Analiză comparativă a mediatorilor sistemului oxidant determinați din serul sanguin și lichidul amniotic pentru ambele loturi a constatat următoarea situație (tabelul 5.14).

Tabelul 5.14. Analiza comparativă a mediatorilor oxidanți determinați din serul sanguin și lichidul amniotic, la gestantele din lotul I

Nr d/o	Mediatorii prooxidanți	lotul I_s		p
		SER (N=81)	(LA) (N=81)	
1	2	3	4	5
1	HPL timpurii (hexan) (diene conjugate), uc/ml	17,20 $\pm$ 0,36	15,71 $\pm$ 0,79	$\leq 0,001$
2	HPL intermediari (hexan) (triene conjugate), uc/ml	4,83 $\pm$ 0,24	4,68 $\pm$ 0,23	0,613
3	HPL tardivi (hexan)	1,93 $\pm$ 0,09	1,75 $\pm$ 0,08	0,370

	(baze Shiff), uc/ml			
4	HPL timpurii (izopropil) (diene conjugate), uc/ml	40,87 ± 2,03	38,01 ± 1,88	≤0,001
5	HPL intermediari (izopropil) (triene conjugate), uc/ml	16,73 ± 0,84	10,88 ± 0,54	≤0,001
6	HPL tardivi (izopropil) (baze Shiff) uc/ml	3,44 ± 0,17	3,02 ± 0,15	0,006
7	PPOA	42,00 ± 2,1	24,30 ± 1,22	≤0,001
8	DAM μM/l	9,00 ± 0,44	5,47 ± 0,27	0,130
9	NO μM/l	73,56 ± 3,68	77,97 ± 3,89	≤0,001
10	AGE μg/L compuși de glicare avansată	347,75 ± 17,39	107,67 ± 5,38	0,353
11	S-nitrozotoli μM/L	0,96 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,702

Notă: Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

**p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ
lotul I_s -sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii*

Analiza mediatorilor prooxidanți determinați în serul sanguin matern în comparație cu cei determinați în lichidul amniotic, în trimestrul al doilea sarcina concepută prin metoda FIV, identifică 5 valori statistic semnificative din 11 mediatori: hidroperoxizi lipidici (hexan) timpuriu, Hidroperoxizi lipidici izopropil timpuriu, și intermediar, Produsul modificărilor oxidative ale proteinelor (PPOA) și Oxidul nitric (NO).

Media valorilor pentru compușii de glicare avansată AGE în ser este în concentrație de 3 ori mai mari decât în lichidul amniotic.

Analiza mediatorilor sistemului antioxidant determinați în serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele sarcinile cărora au fost concepute prin metoda FIV sunt relatate în tabelul 5.15.

Tabelul 5.15. Analiza comparativă a mediatorilor antioxidanți determinați în serul sanguin și lichidul amniotic, la gestantele din lotul I

Nr d/o	Mediatorii antioxidanți	lotul I _s		p
		În serul sanguin (N=81)	În lichidul amniotic (N=81)	
1	2	3	4	5
1	AAt-hexan mM/sl	0,48±0,02	6,01±0,3	≤0,001
2	AAT-izopropanol mM/sl	6,01±0,3	18,90±0,95	0,038
3	Peptide histidinice Carnozina μM/l	161,74±8,09	124,52±6,23	0,013
4	Catalaza μM/l	16,15±0,81	8,60±0,43	0,072
5	SOD u/c	1084,35±54,22	1010,23±50,51	0,25
6	γ-GPT u/l	35,87±1,79	146,10±7,3	0,013
7	Gr Tiolice ale prot μM/l	0,49±0,02	0,31±0,01	≤0,001
8	Tyoredexina μM/l	0,56±0,02	0,56±0,02	0,68
9	Glutaredoxina μM/l	0,44±0,01	0,48±0,01	0,138
10	GR nM/s.L	690,10±34,5	1605,03±80,25	0,83
11	GST μM/min. L	218,91±10,95	129,43±6,47	≤0,001

12	GPO nM/s.L	1451,78±72,6	1807,17±90,36	≤0,001
----	------------	--------------	---------------	--------

Test t student (ipoteză bilaterală). Datele sunt reprezentate ca medie ± eroarea standard.

** p < 0,05 este considerat semnificativ, **p < 0,001 este considerat semnificativ*

lotul I_s -sunt incluse gestantele fără complicații în evoluția sarcinii

Identificăm valori semnificativ statistice pentru o categorie de antioxidanți: glutathion s-transferaza (GST) $p \leq 0,001$, activității antioxidante totale în fazele hexanice (AAT-hexan) $p \leq 0,001$, la grupele tiolice ale proteinei la $p \leq 0,001$; la glutathion peroxidaza (GPO) - $p \leq 0,001$;

Amplificarea antioxidanților în lichidul amniotic la sarcinile concepute prin metoda FIV, la gestantele cu vârsta peste 35 de ani: AAT-izopropanol de 3 ori (în lichidul amniotic 6,01 mM/sl $\pm 0,3$ vs 18,90 $\pm 0,95$ mM/sl;) Gama-glutamyltranspeptidaza (γ -GPT) în ser 35,87 u/l $\pm 1,79$ și în lichid amniotic 146,10 u/l $\pm 7,3$; Glutathion reductaza (GR) în ser 690,10 $\pm 34,5$ nM/s.L și în lichidul amniotic 1605,03 $\pm 80,25$, majorarea valorilor medii în lichidul amniotic este practic de 3 ori.

5.4. Concluzii la Capitolul 5

Analiza comparativă, a profilului imun determinat la gestantele în trimestrul al doilea de sarcină indiferent de modul conceperii: prin FIV sau natural, care pe parcursul evoluției nu au înregistrat complicații induse de sarcină cu impact asupra sănătății materne și fetale, au determinat o tendință de majorare a concentrației citokinelor și a altor markeri imuni odată cu înaintarea în vârstă a gestantei.

Merită de remarcat, că la markerii: IL-8 și VEGF variația valorilor este statistic semnificativă, caracteristic pentru gestantele din ambele loturi, ce reflectă modularea imună continuă în circumstanțele date în concordanță cu scopul menținerii sarcinii.

Practic tot profilul al oxidanților determinat în trimestrul al doilea de sarcină în serul sanguin și lichidul amniotic la gestantele cu evoluția sarcinii fără particularități, nu au evidențiat diferențe semnificative prognostice.

În același timp, odată cu înaintarea în vârstă a gestantelor, mediatorii antioxidanți determinați la gestantele din ambele loturi au înregistrat majorarea concentrațiilor de amplificare în serul sanguin, și în lichidul amniotic, ca exemplu: ambii mediatorii ai activității antioxidante totale AAT (hexan) și (izopropanol) au o tendință de majorare în limita de 5%, glutathion reductaza (GR) o majorare cu 37 $\pm 1,85\%$, superoxid dismutază (SOD) cu 1,6 $\pm 0,08\%$ și pentru γ -GPT s-a înregistrat o amplificare majorată cu 17 $\pm 0,85\%$, fapt ce confirmă, că vârsta înaintată a gestantelor predispune pentru apariția noilor riscuri cu implicarea stresului oxidativ, generarea stărilor patfiziologice induse de sarcină, care determină amplificarea antioxidanților.

Rezultatele cercetării au constatat majorarea valorilor medii a antioxidanților de 3 ori la gestante incluse în lotul I_s față de lotul II_s pentru glutathion s-transferaza (GST) – enzimă care reprezintă un răspuns antioxidant pentru unii metabolici toxici generați în organism, cum ar fi peroxid-, carbonil-, cât și pentru markerii AAT-izopropanol de 3 ori sau $6,01 \pm 0,3$ mM/sl în serul snguin vs lichidul amniotic $18,90 \pm 0,95$ mM/sl, Gama-glutamyltranspeptidaza (γ -GPT) în ser $35,87 \pm 1,79$ u/l și în lichid amniotic $146,10 \pm 7,3$ u/l; Glutathionreductaza (GR) în ser $690,10 \pm 34,5$ nM/s.L și în lichidul amniotic $1605,03 \pm 80,25$ nM/s.L.

Explicația majorării valorilor medii a antioxidanților în lichidul amniotic, rezultă din ipoteza mobilizării organismului pentru menținerea echilibrului stresului oxidativ ușor declanșat în sarcinile vulnerabile pe motiv de vârsta mamei la etapa conceperii și antecedente prin infertilitate.

SINTEZA REZULTATELOR OBTINUTE

Studiile recente arată, că rata medie de fertilitate în Uniunea Europeană (UE) a atins 1,53, fapt, ce nu asigură înlocuirea simplă a populației [5]. Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova (RM) deasemenea înregistrează o reducere a natalității. Astfel în dinamica anilor 2015 - 2022 reducerea numărului de nașteri este cu 33,5 la sută, în același timp, prognoza demografică pentru perioada până în anul 2035 constată, că și în continuare, efectivul numeric al nașterilor va fi foarte mic pentru a recupera declinul populației.

Reducerea femeilor de vârstă fertilă și amânarea căsătoriilor și nașterilor pentru vârste mai înaintate, determină (RTF)*, care în RM este sub nivelul necesar pentru reproducerea populației.

Numărul mediu de fete născute de o femeie și care supraviețuiesc până la sfârșitul perioadei de reproducere la nivelul dat de fertilitate și mortalitate din anul de referință (rata netă de reproducere) în Republica Moldova, începând cu anul 1994, este mai mică de unu, fiind în continuă descreștere (în anul 2020 - 0,858), fapt ce indică că deja de 29 de ani, avem o reproducere scăzută a populației. Este cert, că îmbătrânirea populației și fertilitatea sub-înlocuire este condiționată de o serie de factori sociali, economici, legislativi, educaționali, sanitari, psihologici și culturali, care, la rândul lor impun căutarea noilor posibilități de a investi în vârsta reproductivă și maternitatea eficientă.

Cercetarea dată, a ținut cont de progresele atinse în domeniul conduitei medicale în obstetrică și s-a axat pe un segment cu puține dovezi științifice, și anume, pe particularitățile evoluției sarcinilor concepute prin metoda FIV, la femeile vârsta cărora este de peste 35 de ani.

Identificarea problemei privind vârsta avansată în sarcină concepută prin metoda FIV a fost conștientizată pe parcursul practicii medicale realizate în cadrul Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (CNSRGM) din cadrul Institutului Mamei și Copilului (IMC) Centrului Național de Reproducere, studierii literaturii științifice și tematicile discutate la forumurile profesionale.

Deși nu există o definiție universală de "vârsta avansată a gestantei", totuși, un reper comun îl reprezintă cel de 35 de ani, în general utilizat pentru a defini femeia gravidă „matură” [14].

*Notă : *De menționat, „indicatorul conjunctural al fertilității” (RTF), care reprezintă numărul mediu de copii pe care i-ar naște o femeie în cursul vieții sale fertile, în condițiile fertilității anului respectiv.*

Sarcina după 35 de ani este din start considerată cu riscuri obstetricale imprevizibile.

În medicina clinică, vârsta avansată a mamei este asociată cu rezultate adverse ale sarcinii, cum ar fi disfuncția placentară, restricția creșterii fetale, moartea perinatală, nașterea prematură și un șir de complicații induse în sarcină, inclusiv preeclampsia [17].

Un șir de cercetări științifice confirm, că placenta maternă îmbătrânită prezintă o acumulare redusă de celule imune în comparație cu placenta tânără, fapt care generează particularități fiziologice și patofiziologice cu impact asupra evoluției sarcinii la această categorii de femei.

Îmbătrânirea, este cunoscută și ca o stare inflamatorie cronică de grad scăzut, care apare din cauza acumulării celulelor imune, inclusiv a citokinelor proinflamatoare [18]. Interleukina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumoral - α (TNF α), prezintă în mod clar o creștere dependentă de vârstă a expresiei, care reflectă conceptul emergent de inflamare (inflamație + îmbătrânire). Cu toate acestea, nu s-a dovedit, științific, dacă inflamația apare în placenta mamei cu vârsta înaintată [19].

Problema infertilității este actuală și preocupă domeniul medical din întreaga lume.

Infertilitatea este o boală ce a fost clasată de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) pe locul cinci în topul dezabilităților la nivel global. Estimările sugerează că aproximativ una din șase persoane de vârstă reproductivă din întreaga lume se confruntă cu infertilitate de-a lungul vieții [6] .

În acest context, problemele abordate în cercetare sunt importante prin faptul, că contribui la extinderea cunoștințelor referitoare la restabilirea capacităților reproductive ale cuplurilor, care se confruntă cu infertilitate, prin aplicarea metodei de concepere FIV și majorarea RTF, prin oferirea femeilor cu vârsta înaintată a noilor garanții pentru o sarcină sigură finalizată cu nașterea unui copil sănătos.

Un alt aspect al cercetării a fost identificarea corelării între vârsta gestantelor și implicarea sistemului imun în sarcină. Este cert, că îmbătrânirea, este cunoscută și ca o stare inflamatorie cronică de grad scăzut, care apare din cauza acumulării celulelor imune, inclusiv a citokinelor proinflamatoare [18]. Interleukina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumoral - α (TNF α), prezintă în mod clar o creștere dependentă de vârstă a expresiei, care reflectă conceptul emergent de inflamare (inflamație + îmbătrânire). Cu toate acestea, nu s-a dovedit, științific, dacă inflamația apare în placenta mamei cu vârsta înaintată [19].

Gestantele incluse în lotul I s-au confruntat cu problemele infertilității. Problema infertilității cuplurilor este actuală și preocupă specialiștii din domeniul medical din întreaga lume.

Conform informațiilor furnizate de Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (CNSRGM) din cadrul Institutului Mamei și Copilului (IMC) circa 20% din toate cuplurile de vârstă reproductivă din Republica Moldova, suferă de o formă sau alta de infertilitate.

Problema infertilității conduce, inevitabil, la amânarea considerabilă a vârstei primei gravidități și la utilizarea metodelor contemporane de tratament, din care face parte și reproducerea umană asistată medical (RUAM). Pentru 2,5 la sută din cupluri infertile, unica posibilitate de a avea o sarcină și ulterior un copil este fertilizarea in vitro (FIV).

În Republica Moldova, tratamentul infertilității prin FIV se realizează deja peste 25 de ani, în același timp este un segment cu puține date statistice și reglementări la nivel național.

Astfel, identificarea problemei de cercetare, s-a bazat și pe importanța menținerii sarcinii concepute ca urmare a tratamentului infertilității, prin metodă FIV, la femeile vârstă cărora este peste 35 de ani, utilizând interpretarea biomarkerilor imuni și ai profilului stresului oxidativ, drept indicatori clinici prognostici, privind declanșarea unor procese patofiziologice cu risc major pentru complicații obstetricale grave în sarcină.

Pentru a atinge cele menționate, a fost trasat următorul scop al cercetării: Identificarea particularităților clinice în evoluția sarcinilor, concepute prin metoda FIV, la gestantele cu vârstă peste 35 de ani și corelarea acestora cu valorile biomarkerilor imuni și ai stresului oxidativ, determinați în al doilea trimestru de sarcină din sângele matern și lichidul amniotic.

Scopul nominalizat s-a atins prin realizarea următoarelor obiective: Analiza evoluției clinice a sarcinilor obținute prin metoda FIV la gravidele cu vârstă peste 35 de ani; Interpretarea nivelului citokinelor determinați în sângele matern și lichidul amniotic la sarcinile concepute prin metoda FIV a gravidelor cu vârstă mai mare de 35 de ani; Determinarea și interpretarea nivelului biomarkerilor ai stresului oxidativ în sarcinile concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârstă peste 35 de ani; Particularitățile evoluției sarcinilor la femeile cu vârstă de peste 35 de ani concepute prin metoda FIV și corelarea lor cu valorile biomarkerilor determinați.

Ca urmare în I Capitol al cercetării sunt înregistrate rezultatele obținute și analizate ce țin de evoluția și monitoringul sarcinii la femeile peste 35 de ani în concepția contemporană

Aspectul particularităților fertilității feminine după vârstă de 35 de ani sunt teme de cercetare pentru diverse domenii. Pentru că tendința către „maternitate în vârstă”, schimbările în dinamica fertilității în Republica Moldova sunt similare cu cele ale țărilor din Europa Centrală și de Est.

Conform statisticilor actuale înregistrăm o reducere a natalității la vârstele 15-24 ani și o majorare la categorie de vârstă 25-34 de ani. Scăderea fertilității la femei, începe deja în jurul

vârstei de 25-30 de ani, iar vârsta medie la ultima naștere este de 40-41ani [30]. Progresele tehnologice au confirmat, că timpul fertil depinde de mulți factori individuali, iar „arta planificării naturale” a familiei, constă, în abilitatea de a recunoaște începutul și sfârșitul fazei fertile [32].

Este demonstrat, că rezerva ovariană, se consumă din momentul în care s-au constituit ovarele în viața intrauterină, dar mai accelerat atrezia foliculară are loc, după 35 de ani. Expresia hormonală, a diminuării rezervei ovariene este reprezentată de augmentarea nivelului hormonilor FSH și LH, iar când concentrația acestor hormoni se dublează, șansele pentru o fertilizare reușită devin deseori nule. De asemenea, utilizarea biomarkerilor AMH (hormonul Antimullerian) și AFC (numărul foliculilor antrali), oferă o informație utilă despre rezerva ovariană. [42, 43].

Astfel, femeile cu vârsta peste 35 de ani, înaintea inițierii unui tratament prin tehnicile de reproducere umana asistată, necesită examinarea, privind rezerva ovariană. Informația temeinică obținută, privind rezerva ovariană, oferă medicului, posibilitatea de a elabora un plan de tratament al infertilității personalizat.

Până la moment, nu există teste directe, care ar confirma in vivo, calitatea ovocitară, decât până nu este evaluată în cadrul unei proceduri FIV, cum se comportă ovocitele și ritmul lor de dezvoltare după fertilizare, iar calitatea lor slabă, în primul rând, se va reflecta într-o capacitate scăzută de a se fertiliza [45, 46].

Conform datelor existente în literatură, procesul inflamator în evoluția sarcinilor la gestante peste 35 de ani, rămâne un mecanism primordial al complicațiilor evoluției sarcinii. Citokinele și chemokinele pro- și antiinflamatoare, markerii stresului oxidativ, joacă un rol de frunte în patogeneza complicațiilor evoluției sarcinii asociate infecției și a leziunilor fetale [44, 45, 46].

Evaluarea personalizată a riscurilor și elaborarea prognosticului de durată, ne permite să adoptăm strategii de monitorizare și intervenții medicale eficiente în funcție de nevoile și particularitățile fiecărei paciente. Identificarea și gestionarea precoce a riscurilor în perioada îngrijirii prenatale și obstetricale ne permite să luăm măsuri de prevenție și să inițiem intervenții terapeutice adecvate pentru a minimiza complicațiile potențiale și a fortifica rezultatele pozitive ale sarcinii.

Un compartiment important în cercetare a fost documentarea cu evoluția sarcinii la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani și impactul antecedentelor extragenitale, ginecologice și obstetricale în geneza complicațiilor în sarcină.

Acest compartiment a inclus o sinteză a datelor din literatura de specialitate cu referire la studierea conceptelor contemporane în evoluția și monitoringul prenatal al sarcinii obținute prin

FIV la femeile de vârstă reproductivă avansată, care au confirmat complexitatea subiectului de cercetare, referit la impactului determinant al complicațiilor asupra particularității evoluției sarcinii.

Studierea conceptelor contemporane în evoluția sarcinilor obținute prin metoda FIV la femeile de vârstă reproductivă avansată, precum și multitudinea factorilor ce influențează dezvoltarea complicațiilor la această categorie de gravide, au determinat caracterul interdisciplinar al cercetării prezente. Punctul de pornire în cercetare este perceperea, că femeia în cei 10-20 de ani de viață reproductivă nesolicitată, a „acumulat” un șir de riscuri pentru viitoarea sarcină: maladii cronice persistente, posibilele boli venerice suportate în trecut, stilul de viață stresant, situația ecologică precară, aderențe postoperatorii, accidente suportate, ș.a.

Un șir de cercetătorii preocupați de impactul patologiilor extragenitale, antecedentelor ginecologice și obstetricale pentru caracterul și riscurile evoluției sarcinii relatează prezența unui șir de factori de genезă maternă, fetală, placentară, de mediu, precum și frecventă asociere ai acestora, care influențează dezvoltarea fetală și evoluția fiziologică a sarcinii.

În cercetare, au fost analizate complicațiile înregistrate în sarcini cu cea mai mare incidență pe fundal de patologii extragenitale suportate și alți factori de risc, cum sunt: sarcina extrauterină, nașterile premature, obezitatea, făt macrosom, diabetul gestațional, hipertensiunea în sarcină, preeclampsia, defectele placentei, hemoragia antepartum ș.a. Femeile primipare și multigeste în sarcină concepută la vârstă peste 35 de ani, deasemenea au fost un subiect de analiză cu referință la impactul pentru riscurile în evoluție.

Astfel, punctul de reper, în cercetare, a fost faptul că evoluția sarcinii indiferent de vârstă gestantei este în directă interdependență de antecedentele personale fiziologice: menarha (ani), caracterele ciclului menstrual, condiții de viață, de muncă (noxe, efort deosebit, adicții etc.), antecedente heredocolaterale (istoricul familial), antecedentele personale, patologice, antecedente obstetricale și ginecologice: număr de nașteri anterioare, durata, patologia sarcinilor anterioare, date despre travaliu, naștere, greutatea fiecărui copil la naștere (scorul Apgar, născuți morți, malformați, starea actuală de sănătate a copilului/copiilor, evoluția perioadei de lăuzie, număr de avorturi anterioare: spontane sub 14 săptămâni sau/și 14-23 săptămâni + 6z, efectuate chirurgical sau medicamentos, avorturi cu complicații, sarcini ectopice, ș.a.

Pornind de la faptul, că tema reproducerii umane asistate medical este din categoria serviciilor medicale noi, în acest segment sunt multe întrebări vizând eficiența intervenției, care stau la baza cercetărilor științifice. Astfel, aspectele contemporane ale diagnosticului prenatal în

sarcinile concepute prin metoda FIV, la gestantele peste 35 de ani este un segment cu o atenție mare.

Diagnosticul prenatal s-a acordat în cercetare o importanță deosebită, care de fapt stă la baza elaborării unui management adecvat în planificarea familială atât la etapa de concepere, cât și pe tot parcursul evoluției sarcinii asociat cu consilierea și profilaxia complicațiilor.

Îngrijirile pre-concepționale cuprind un set de intervenții, care permit de a identifica riscurile biomedicale, comportamentale și psihosociale.

Opțiunile de testare se schimbă rapid, odată cu tehnologia emergentă și depind de mulți factori, inclusiv vârsta pacientei, istoricul familial și preferințele. Tehnici curente de diagnostic prenatal invaziv/noninvaziv au fost analizate în cercetare astfel, cum: ecografia fetală (2D/3D/4D), fetoscopia, diagnosticul genetic preimplanțat (PGD), biopsia de vilozități coriale (CVS - chorionic villus sampling), cordocenteza [91]. Amniocenteza - procedura de recoltare a lichidului amniotic realizat în trimestrul al doilea de sarcină, începând cu săptămâna 15 de sarcină, procedura aplicată în studiul dat, pentru determinarea markerilor imuni și profilului stresului oxidativ. Treptat, diagnosticul prenatal, se transferă în „terapia în utero”.

În cercetare gravidele au fost încadrate în conduita preconcepțională corespunzătoare prevederilor Ghidului A Național de Perinatologie (capitolul III) și Suplimentul la Ghidul C Național de Perinatologie “Protocoale de îngrijire și tratament în obstetrică și neonatologie”, în care femeile cu vârsta peste 35 de ani, sunt incluse în nivelul IV de evidență, conform riscurilor.

Specificul diagnosticului prenatal pentru sarcinile concepute prin metoda FIV au inclus: excluderea infecției urogenitale, controlul endocrinologic, analize hormonale (FSH, LH, TSH, prolactină, testosteron, dehidroepiandrosteron sulfat), excluderea factorilor autoimuni, ultrasonografie pelvină, histerosalpingografia la indicații, controlul andrologic și analiza citogenetică privind anomaliile cromozomiale.

Estimările ratelor tuturor anomaliilor citogenetice semnificative clinic la nașcuții vii la intervale de vârstă maternă de 1 an, variind de la 15 la 49 de ani, au fost descrise în lucrarea E. B. Hook, „Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages”. Sindromul Down rezultă din cea mai răspândită anomalie citogenetică semnificativă clinic, dar ratele tulburărilor asociate cu alte anomalii citogenetice de asemenea, cresc cu vârsta maternă și contribuie semnificativ la rata generală la vârstele mai înaintate. Rata estimată a tuturor anomaliilor citogenetice semnificative clinic crește de la aproximativ 2 la 1000 (1 la 500) la cele mai mici vârste materne la aproximativ 53,7 la 1000 (1 la 20) la 45 de ani [96].

Implantarea embrionilor prin metoda „in vitro”, presupune o sarcină multiplă, ceea ce contribuie la apariția unui risc major, în cazurile când vârsta femeii este de peste 35 de ani și

când starea fizică a gestantei este cu patologii în antecedente. Aceste situații pot favoriza apariția defectelor genetice la feți și, ulterior pot conduce la o naștere dificilă cu multiple complicații.

Respectiv, un diagnostic sigur, inofensiv și calitativ prenatal este succesul nașterii în siguranță pentru mamă și făt.

O componentă importantă și voluminoasă a cercetării au fost analizele de laborator privind determinarea biomarkerilor imuni și ai statusului oxidanților și antioxidanților în materialul biologic colectat din serul sangvin și lichidul amniotic recoltat prin amniocenteză în trimestrul al doilea de sarcină.

Pentru fiecare gestantă, sarcina, este o provocare din considerentul, că sistemul imun nativ al ei, trebuie nu doar să tolereze fătul, ci și să răspundă adecvat la unele patologii, care pot apărea în timpul sarcinii. Sistemul imunitar este suprimat, pentru a preveni atacul asupra fătului, această suprimare poate fi cauzată de creșterea nivelului de hormoni în timpul sarcinii.

Estrogenul, progesteronul, hormoni produși în timpul sarcinii ajută la stimularea sau suprimarea sistemului imunitar al femeii, ajută la reducerea inflamației în evoluția sarcinii pentru a proteja fătul împotriva atacului imunitar. Astfel, recunoașterea imunologică a sarcinii inițiază o serie de schimbări, care în cele din urmă au ca rezultat o atitudine imunologică tolerantă față de făt. Mai mulți actori ai sistemului imunitar, astfel de celule T reglatoare, celule NK (celule Natural Killer) și citokine contribuie la crearea unui mediu favorabil pentru făt, iar multe dintre aceste modificări funcționale sunt orchestrate și controlate de progesterone.

Mai multe mecanisme protective, funcționează în timpul gestației pentru a corecta efectele nocive ale imunității anti-fetale și pentru a susține un rezultat sănătos al sarcinii. Conștientizăm, că eșecul oricărui dintre acești pași, poate duce la o serie de complicații ale sarcinii, inclusiv avort spontan, preeclampsie, restricție de creștere fetală, placenta accreta și naștere prematură.

Cercetarea a inclus evaluarea citokinelor, proteine mici multifuncționale descrise în primul rând prin acțiunile lor imunomodulatoare. Interfața materno-fetală este considerată a fi imunodeprimată, pentru a permite dezvoltarea unității fetale placentare semi-alogene. Cu toate acestea, profilurile de citokine ale deciduei și diferitelor tipuri de celule deciduale sugerează că situația in vivo ar putea fi mai complexă. Datele sugerează că citokinele deciduale nu joacă doar roluri în imunosupresie, ci și în alte aspecte ale stabilirii sarcinii, inclusiv reglarea invaziei trofoblastilor și remodelarea arterei spiralate. Această revizuire se concentrează pe rolul potențial al citokinelor derivate din decidua în etiologia avortului spontan inexplicabil [102].

E știut, că citokinele de origine maternă acționează asupra dezvoltării placentare. Pe de altă parte, expresia antigenului pe placenta determină modelul de citokine materne. Sarcina

umană normală se caracterizează prin activitate periferică scăzută a celule Natural Killer (NK), iar activitatea crescută a NK pare să joace un rol în avorturile spontane cu etiologie necunoscută. [103].

O altă funcție a citokinelor de care s-a ținut cont în cercetare este asigurarea sistemului endocrin imunologic cu capacitatea de a dezvolta reacția la pericolul de inflamație.

Unele cercetări, au înregistrat niveluri măsurabile ale citokinelor inflamatorii IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6 și TNF - alfa prezente în vagin în timpul sarcinii și al travaliului. Nivelurile vaginale de IL-1 beta și IL-6 s-au dovedit a fi semnificativ crescute la pacientele aflate în travaliu în comparație cu pacientele care nu sunt în travaliu [104].

Științific prezintă interes faptul, că un dezechilibru între cele 2 tipuri de citokine cu un raport al Th1 / Th2 dezechilibrat, se asociază cu eșec recurent de reproducere și poate beneficia de tratamente, care modulează acest raport cu ameliorarea prognosticului reproductiv [107]. Raportul echilibrat al citokinelor pro- și antiinflamatorii, este esențial pentru reglarea sistemului inflamator matern pe tot parcursul sarcinii.

Exprimarea factorului de creștere endotelial vascular (VEGF), receptorii săi VEGFR-1 (Flt-1) și VEGFR-2 (KDR) și factorul de creștere a placentei (PlGF) au roluri importante în promovarea angiogenezei placentare normale. Tulburările vasculare pot modifica funcția placentară și pot compromite dezvoltarea fătului. Angiogeneza este strâns legată de succesul gestațional [120].

Deși amploarea rolului său în dezvoltarea placentară nu este pe deplin înțeleasă, VEGF este exprimat pe scară largă de către celulele endoteliale și de către citotrofoblasti și, macrofagele materne și fetale. În actuala cercetare, s-a evaluat deleția VEGF în co-raport cu vârsta femeilor și în complicație cu complicațiile induse de sarcină la gestantele cu sarcina concepută prin FIV.

În timpul sarcinii, stresul oxidativ are un rol important în dezvoltarea embrionului, implantarea, dezvoltarea și funcția placentară, dezvoltarea fetală și naștere.

Cercetările axate pe evaluarea stresului oxidativ la femei gravide și făt, au scos în evidență un șir de particularități fiziologice. Spre exemplu, sarcina în sine este considerată sursa stresului oxidativ mai accentuat, în timp ce placenta, este sursă directă de radicali liberi ai oxigenului.

Mai multe studii au examinat influența stresului oxidativ în sarcină și complicațiile asociate cât pentru făt și mame. Interesant este că în stadiile incipiente ale dezvoltării placentare, o concentrație relativ scăzută de oxigen protejează embrionii timpurii de stresul oxidativ. Cu toate acestea, odată ce dezvoltarea placentară este completă, nivelul său de oxigen a crescut de

aproape trei ori comparativ cu cel din stadiile inițiale pentru a asigura un aport adecvat de oxigen la făt. Este important să se mențină un nivel de oxigen bine controlat, în fiecare perioadă a sarcinii. Activitatea antioxidantă este, de asemenea, importantă pentru menținerea nivelului stabil de oxigen în placentă. O epuizare a capacității antioxidante printr-o abundență scăzută de antioxidanți enzimatici sau neenzimatici, face celulele vulnerabile la stresul oxidativ [121].

Speciile reactive de oxigen (ROS), cum ar fi radicalii superoxid, radicalii hidroxil, radicalii alcoxid, precum și intermediarii neradicali peroxidul de hidrogen, ozonul și oxigenul singlet, sunt produse secundare ale metabolismului energetic aerob. Concentrația acestor radicali este menținută la niveluri fiziologice prin activitatea enzimelor antioxidante superoxid dismutază, catalază și peroxiredoxine, precum și prin concentrațiile de glutatión și vitaminele C și E. Recent, ROS insuficient reglementat a fost recunoscut ca un contribuitor major la tulburările de sarcină [125].

În mod normal, organismul dispune de mecanisme antioxidante, care limitează acest proces. Antioxidanții sunt molecule prezente în celule, care împiedică aceste reacții, donând un electron radicalilor liberi, fără a se destabiliza ele însele [128].

Intensificarea agresiunilor oxidative și micșorarea eficacității mecanismelor antioxidante de a reduce stresul oxidativ, se poate solda cu complicații multiple ale sarcinii și la făt, poate genera apariția așa - numitelor „boli ale speciilor reactive ale oxigenului în neonatologie” [129].

Ca urmare, în mai multe cercetări științifice este identificat, că sarcinile patologice sunt asociate cu un nivel sporit de stres oxidativ, în care radicalii liberi sunt supraproduși și se generează un deficit în apărarea antioxidantă.

A fost studiată literatura științifică privind unele patologii precum hipertensiunea indusă de sarcină (HTA), preeclampsia (PE) și nașterea prematură (NP), care au efecte inițiale asupra copilului în curs de dezvoltare, respectiv, și a mamei în timpul sarcinii, pentru aspectul conexiunii între declanșarea lor și stresul oxidativ. [130, 131, 132]. În literatură este stabilită înregistrarea dezvoltării afecțiunilor menționate mai sus în mod spontan în multe sarcini la gestante, inclusiv la cele cu vârsta de peste 35 de ani, fără nici o suspiciune prealabilă [134, 135].

Sarcina poate induce hipertensiune la femeile cu stare normotensivă, sau poate agrava o hipertensiune deja existentă. Apariția hipertensiunii în ultimul trimestru de sarcină rămâne o problemă obstetricală nesoluționată, mai ales în asocierea cu preeclampsia.

Aspectele enumerate ale particularităților evoluției sarcinii au fost considerate de o importanță majoră pentru cercetarea data. Deoarece o înțelegere mai profundă a mecanismelor care guvernează stresul oxidativ atât în placentă, cât și în endoteliul vascular matern, este posibil

să ofere noi oportunități pentru dezvoltarea unor abordări terapeutice inovatoare pentru a preîntâmpina complicațiile induse de sarcină.

Cele nominalizate au fost reușite datorită studierea literaturii de specialitate, cadrului reglementativ și cunoașterii experienței în domeniu.

Metodele statistice sau bazat pe datele primare colectate, depersonalizate, generalizate și sistematizate în baza de date, supuse analizei statistice cantitative cu calcularea frecvențelor, valorilor medii, devierilor standard, identificarea medianelor și intervalului interquartile, scorului sumar, coeficientului Pearson χ^2 și statisticii Student t. S-a efectuat analiza calitativă liniară a rezultatelor obținute, cu aplicarea metodei analitice descriptive. La necesitate, rezultatele cantitative au fost completate cu descrierea aspectelor calitative.

Analiza și sinteza rezultatelor obținute a cuprins studierea opiniei experților naționali și de peste hotarele țării cu privire la siguranța sarcinilor concepute prin metodele reproducerii umane asistate medical, preponderent prin metoda FIV și particularitățile evoluției sarcinilor la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani.

Sinteza tuturor datelor obținute și analiza acestor corespunzător metodelor aprobate pentru realizarea cercetării dat a permis obține următoarele recoltate și concluzii.

Evoluția sarcinilor concepute la femeile cu vârsta de peste 35 de ani este determinată de riscurile multifactoriale, cum ar fi infertilitatea, istoricul stărilor patologice și maladiilor suportate în antecedente, un șir de alte caracteristici social-economice, care au tangență cu accesul la serviciile medicale și perceperea de către ambii parteneri ai cuplului a importanței comportamentului și conduitei orientate la siguranța în sarcină și la naștere.

Maladiile preexistente și antecedentele obstetricale au un potențial mare pentru a se acutiza și, la rândul său, să producă un impact negativ asupra dezvoltării și evoluției sarcinii.

Citokinele și chemokinele pro și antiinflamatoare joacă un rol important în patogeniza complicațiilor asociate infecției și a leziunilor fetale. Markerii stresului oxidativ, antioxidanții non-enzimatici exogeni și endogeni au calități mesagere privind intensificarea agresiunilor oxidative, fiind un semn al declanșării stărilor patologice și complicațiilor induse de sarcină.

Utilizarea în cercetare a metodelor și instrumentelor pentru evaluarea multilaterală a sarcinii, înregistrarea parametrilor clinici și realizarea investigațiilor de laborator (determinarea citokinelor și markerilor ai stresului oxidativ) recoltați din serul sangvin și lichidul amniotic al gestantelor, prin amniocenteză în trimestrul al doilea de sarcină, au permis obținerea bazei impunătoare de indicatori.

Prelucrarea datelor obținute statistic, a permis realizarea analizei comparative și identificarea diferențelor evolutive între loturi, cât și corelarea acestora cu parametrii imuni

determinați în studiu, astfel fiind determinate calitățile predictive ale citokinelor și markerilor antioxidanți pentru complicațiile în sarcinile concepute prin metoda FIV la gravidele cu vârsta de peste 35 de ani.

Rezultatele studiului în cauză demonstrează, că profilul pe vârste a fertilității, mediul de reședință a gravidelor, nivelul de educație și atitudinea față de tradițiile familiale sunt factorii cu impact și potențial de risc în anumite circumstanțe, fapt ce necesită realizarea de acțiuni în scopul eficientizării măsurilor de supraveghere și conduită la etapa planificării familiei, conceperii și evoluția sarcinii în siguranță.

Rezultatele obținute confirmă, că în $53,2 \pm 2,66$ la sută din cazuri în studiu sunt examinate sarcinile concepute pentru prima dată, fapt ce confirmă amânarea nașterii primului copil după vârsta de 35 de ani, această tendință fiind mai mare în rândul femeilor cu domiciliul în localitățile urbane. În cohorta studiului, gestantele cu vârsta de după 35 de ani domiciliate în localitățile rurale sunt în minoritate, respectiv $28,8 \pm 1,4\%$ (lotul I) și $43,2 \pm 2,2\%$ (lotul II), față de cele cu domiciliu urban.

În cercetare s-a constatat faptul, că atât vârstă la prima căsătorie a gestantelor din lotul I - 35 de ani și peste $58 \pm 2,9$ la sută cu $p > 0,05$, și din lotul II - $51 \pm 2,55\%$, cât și atitudinea gestantelor față de prima sarcină contribuie la amânarea nașterii primului copil și, respectiv, la creșterea vârstei mamei în sarcină cu reducerea perioadei de reproducere a femeii.

S-a constatat, că educația influențează complexul de comportamente sociale, inclusiv reproducerea, și necesită a fi inclusă în screeningul riscurilor pentru sarcinile la gravidele cu vârsta înaintată. Ponderea femeilor cu studii superioare în categoria gravidelor cu sarcina obținută prin metoda reproducerii asistate uman, predomină categoria gravidelor cu studiile superioare, proporția fiind de $69,2 \pm 3,46\%$ față de $39,8 \pm 1,99\%$ la studii medii și generale

Patologiile extragenitale asociate sarcinii, așa cum pielonefrita cronică primară, vene varicoase ale extremităților inferioare, obezitatea pentru gestantele cu vârsta peste 35 de ani și pe fundal de remisiune la etapa conceperii, rămân în categoria de riscuri majore pentru complicații induse de sarcină.

Rezultatele studiului au demonstrat, că gestantele cu sarcina concepută prin metoda FIV au un risc mai mare de majorare a ponderii în timpul sarcinii, una din explicații fiind medicația specifică reproducerii umane asistate medical. Astfel, un adaos ponderal majorat pe parcursul evoluției sarcinii s-a constatat la $14,7 \pm 0,74\%$ din gravidele din lotul I și la $6,3 \pm 0,32\%$ din gravide cu sarcina concepută natural în lotul II.

Tulburările menstruale la gravide incluse în lotul I de cercetare, au fost statistic semnificativ mai frecvente decât în lotul II de studiu. S-a constatat că gestantele cu indicații ulterioare pentru FIV în $28,8 \pm 1,4\%$ au avut interval intermenstrual mai mare de 35 zile.

Anamneza obstetricală complicată în antecedente din numărul multigestelor incluse în studiu, a fost identificată la 85 gravide sau $81,7 \pm 4,09\%$, care au fost un substrat pentru generarea complicațiilor în sarcina actuală și impun conduită personalizată pentru un monitoring oportun și conduită conformă particularităților evoluției.

Rezultatele cercetării cu referire la riscurile pentru evoluția în siguranță a sarcinii, cele pre-concepționale multifactoriale: vârsta medie pentru gestantele din ambele loturi $45,1 \pm 2,3$ de ani, situația, când una din trei gestante în anamneza obstetricală au avut complicații în antecedente, asocierea în sarcini a patologiilor extragenitale în $53,6 \pm 2,68$ la sută, cât și apariția noilor factori determinanți cum ar fi indicele ponderal în sarcină, infecții virale, ș.a. predispun organismului matern pentru generarea complicațiilor gestaționale.

La gestantele din lotul I cu sarcina concepută prin metoda FIV, evoluția clinică este asemănătoare evoluției în sarcinile concepute natural, ținând cont, că în ambele loturi vârsta gravidelor la concepere a depășit 35 de ani. În același timp incidența complicațiilor a fost mai mare la sarcinile concepute prin FIV, HTA indusă de sarcină, *cota lor în lotul I fiind de $14 \pm 0,7\%$ față de $9 \pm 8,1\%$ în lotul II*, preeclampsia, *care în lotul I sa declanșat la 5 gestante în lotul II nu s-a înregistrat* și Nașteri premature *proporția pe loturi fiind de $7,2 \pm 0,36\%$ și $2,7 \pm 0,14\%$* .

În cercetare s-a constatat, că Interleukina 6 în Trimestrul al doilea de sarcină are o amplificare prognostică $p \leq 0,001$ în serul gestantelor pentru sarcinile în care s-au declanșat preeclampsia tardivă și HTA indusă de sarcină.

În lichidul amniotic valori cu amplificare semnificativă ($**P < 0,001$) sau înregistrat pentru factorului SDF-1 α în lotul I cu o medie de $958,2 \pm 47,91$ pg/mL și pentru Factorul Vascular de Creștere valorile au fost în media de $1801,2$ pg/mL $\pm 90,06$ cu ($**P < 0,001$).

La gestantele cu sarcina complicată prin preeclampsie au fost identificate *majorarea valorilor proinflamatori IL-12* în serul sangvin și lichidul amniotic, cu date semnificativ statistice ($**p < 0,05$), respectiv *majorarea concentrației* în lotul I de studiu.

Antioxidanții în serul gestantelor cu complicații prin HTA indusă de sarcină și preeclampsii au avut amplificare cu 33 la sută majorare pentru glutatión reductaza (GR), mediatorii ai activității antioxidante totale (AAT-izopropanol), Peptide histidinice Carnozina, superoxiddismutaza (SOD), fapt ce poate sugera implicare mediatică și nestabilitate pentru stresul oxidativ, deja în trimestrul al doilea de sarcină.

Concentrațiile markerilor determinați în cercetare, la gestantele sarcina cărora s-a complicat prin *nașterea prematură*, determină o amplificare semnificativă în lichidul amniotic față de valorile medii obținuți în ser. Chemochina IL-8 și factorul VEGF au demonstrat o amplificare de 4 ori mai mare în lichidul amniotic la gestantele din ambele loturi cu valori semnificativ statistice ($p < 0,05$). Chemochina IL-8 fiind mediatorul, care contribuie la receptivitatea endometrului în prezența embrionului, în cazul sarcinilor, care în evoluție sau complicat cu nașteri premature, permit a explica amplificarea lor majorată în lichidul amniotic drept consecința inter-relației acestora, inclusiv este oportună ipoteza logică, că IL-8, dat fiind faptul, stimulează secreția de progesteron din linia de celule trofoblaste, în situația dată, își exercită rolul prin deleție mărită cu scopul de a menține sarcina. Acest fapt și rezultatele obținute permit de a sugera, că majorarea chemochinei IL-8 în lichidul amniotic este caracteristică pentru gestantele cu risc de apariție a travaliului prematur. Concentrațiile crescute de VEGF în ambele loturi pentru sarcinile cu nașteri premature în evoluție sugerează angiogeneza și tendința de inflamație la mijlocul trimestrului, pot fi predictive pentru nașterea prematură.

Analiza comparativă, a profilului imun determinat la gestantele în trimestrul al doilea de sarcină indiferent de modul conceperii: prin FIV sau natural și cele care pe parcursul evoluției nu au determinat o tendință de majorare a concentrației citokinelor și altor markeri imuni odată cu înaintarea în vârstă, vădit caracteristic pentru vârsta medie de 48 ani, față de grupa inclusă în limita medie de 41 ani. Merită de remarcat, că la unii markeri cum este IL-8 și VEGF creșterea valorilor medii este de 3 - 4 ori, fapt ce reflectă modularea imună continuă în circumstanțele date, în concordanță cu scopul menținerii sarcinii, caracteristic pentru ambele loturi.

Mediatorilor antioxidanți determinați la gestantele din ambele loturi au înregistrat majorarea concentrațiilor de amplificare în serul sangvin, dar și în lichidul amniotic odată cu înaintarea în vârstă, ca exemplu: Ambii mediatorii ai activității antioxidante totale AAT (hexan) și (izopropanol) au o tendință de majorare în limita de 5%, Glutation reductaza (GR) o majorare cu $37 \pm 1,85\%$, Superoxid dismutază (SOD) cu $1,6 \pm 0,08\%$ și pentru gGTP sa înregistrat o amplificare majorată cu $17 \pm 0,85\%$, fapt ce confirmă, că vârsta înaintată a gestantelor predispune pentru apariția noilor riscuri cu implicarea stresului oxidativ, generarea stărilor patfiziologice induse de sarcină, care determină majorarea concentrației antioxidanților.

Rezultatele cercetării confirmă, că majorarea în lichidul amniotic a valorilor medii a antioxidanților practic de 3 ori mai mult la gestantelor incluse în lotul I_s față de lotul II_s exprimă mobilizarea organismului pentru menținerea echilibrului stresului oxidativ ușor declanșat în sarcinile vulnerabile pe motiv de vârsta mamei la etapa conceperii și antecedente prin infertilitate.

Sinteza tuturor datelor obținute corespunzător obiectivelor trasate în cercetare a permis argumentarea științifică a diferențelor constatate între sarcinile concepute prin metoda FIV și natural la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, riscurilor pentru evoluția acestor sarcini și posibilitățile aplicării markerilor imuni determinați în cercetare din serul sangvin și lichidul amniotic pentru complicațiile înregistrate: HTA indusă de sarcină, preeclampsia și nașterea prematură.

În așa mod, cercetarea a atins un nivel de originalitate prin îmbinarea analizei a două aspecte cu risc semnificativ pentru sarcină: vârsta înaintată a gestantei și sarcina concepută prin metoda FIV. Evoluția sarcinilor la această categorie de gestante (lotul I) au fost supuse analizei comparative cu evoluția sarcinii la gestantele peste 35 de ani sarcina cărora a fost concepută natural. Concomitent în cercetare au fost recoltați și determinați de la ambele categorii de gestante, din sânge și din lichidul amniotic 6 markeri imuni, inclusiv citokine astfel creând o bază de 2664 parametri ai markerilor imuni și 22 mediatori ai stresului oxidativ, (baza de date de 9768 valori ai oxidanților și antioxidanților) prezenți sarcinile din studiu în trimestrul al de gestație. Analiza corelării acestor markeri cu evoluția clinică a sarcinilor a permis obținerea concluziilor cu caracter inovator pentru domeniu. Identificarea majorării concentrației pentru unii biomarkeri în sarcinile la care peste 18-20 săptămâni de gestație sau declanșat evenimente clinice ale HTA în sarcină, preeclampsiei și nașterilor premature, permit a face concluzii privind caracterul lor prognostic anticipat complicațiilor nominalizate. Posibilitatea tehnologică și metodologică implementării pe scară largă a determinării și analizării manifestări valorilor citokinelor în sângele gestantelor corespunzător caracteristicilor din cercetare rezolvă problema identificării precoce a sarcinilor cu risc major pentru complicații obstetricale directe în sarcină.

Experiența obținută ca rezultat al cercetării a fost propusă pentru implementare ulterioară. Cu scopul de implementare a instrumentelor aplicate și considerare a argumentației științifice au fost elaborate două brevete de inovație și două acte de implementare, elaborat algoritmul *de triaj al gestantelor pentru riscul complicațiilor în sarcină concepute prin metoda FIV*.

Algoritmul elaborat, în cadrul cercetării oferă un nou mecanism pentru a identifica gestantele, care au o predispunere mare pentru a dezvolta în evoluția sarcinilor complicații prin HTA indusă de sarcină, preeclampsia și nașterea prematură.

CONCLUZII GENERALE

1. În evoluția sarcinilor concepute prin metoda fertilizării in vitro (FIV) la femeile cu vârsta de peste 35 de ani, manifestarea stărilor hipertensive induse de sarcină, preeclampsiei și nașterilor premature, este anticipată prin dezechilibrul statusului imun și augmentarea stresului oxidativ, începând cu al doilea trimestru de sarcină.
2. Rezultatele obținute în cazul hipertensiunii induse de sarcină și preeclampsiei, declanșate clinic la finele trimestrului trei în sarcinile concepute prin metoda FIV la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani, denotă o creștere semnificativă a nivelului citokinelor ($p < 0,001$): IL-6, și IL-12 în serul sanguin și IL-8 și IL-12 în lichidul amniotic; în cazul nașterilor premature, amplificarea statistic semnificativă atât a citokinelor ($p < 0,05$): IL-8 și IL-12, cât și a factorului vascular endotelial de creștere (VEGF) în lichidul amniotic, pot indica la un status proinflamator exprimat, începând cu trimestrul al doilea de sarcină.
3. Evoluția sarcinilor concepute prin FIV, la femeile cu vârsta de peste 35 de ani, complicate prin hipertensiunea indusă de sarcină, preeclampsie și naștere prematură este însoțită de creșterea nivelului antioxidantilor în lichidul amniotic în al doilea trimestru de sarcină (săptămânile 14-20 de gestație), cu semnificație statistică ($p < 0,05$), pentru: activitate antioxidantă totală (AAT) în faza hexanică, gama-glutamyl transpeptidaza (γ -GPT), glutathion S-transferaza (GST), și glutathion peroxidaza (GPO), ceea ce confirmă implicarea timpurie a sistemului antioxidant, comparativ cu manifestările clinice.
4. Rezultatele cercetării nu au identificat diferențe concludente în variația biomarkerilor imuni și ai stresului oxidativ, atât în serul sanguin, cât și în lichidul amniotic, pentru sarcinile concepute prin metoda FIV și cele concepute pe cale naturală, în situația în care antecedentele medicale nu au prezentat riscuri semnificative.
5. Problema științifică s-a rezumat la aprecierea rolului statusului imun și al stresului oxidativ în mecanismele patogenetice de dezvoltare a complicațiilor în evoluția sarcinii obținute prin metoda FIV la femeile cu vârsta de peste 35 de ani.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Femeile cu vârsta de peste 35 de ani, sarcina cărora a fost concepută prin metoda FIV, urmează să fie supravegheate conform unui program individualizat, în funcție de riscurile antenatale identificate, asociat cu determinarea în serul sanguin și în lichidul amniotic, în al doilea trimestru de sarcină, biomarkerii imuni și antioxidanții, cu vigilență la complicațiile în sarcină prin hipertensiune indusă de sarcină, preeclampsie și naștere prematură.
2. Identificarea amplificării în serul sanguin atât a IL-6, IL-12 și în lichidul amniotic a IL-8, IL-12, VEGF, cât și a antioxidanților: activitate antioxidantă totală (AAT) în faza hexanică, gama-glutamil transpeptidaza (γ -GPT), glutathion s-transferaza (GST) și glutathion peroxidaza (GPO) în trimestrul al doilea (săptămânile 14-20 de gestație), pot fi considerate prognostice pentru evoluția sarcinii cu complicații prin HIS, preeclampsie și naștere prematură la gestantele cu vârsta de peste 35 de ani.
3. Datele obținute în studiu privind rolul modificărilor statusului imun și stresului oxidativ în dezvoltarea complicațiilor sarcinilor concepute prin FIV, vor fi incluse în curriculum universitar și de educație continuă.
4. În supravegherea antenatală a gestantelor cu vârsta de peste 35 de ani și sarcină concepută prin FIV se recomandă realizarea triajului gravidelor în trimestrul al doilea de sarcină conform algoritmului elaborat (anexa 4).

BIBLIOGRAFIA

1. Adaptarea Agendei de Dezvoltare Durabilă 2030 la contextul Republicii Moldova, *Raport în cadrul proiectului „Naționalizarea Agendei de Dezvoltare Durabilă în contextul Republicii Moldova”*, implementat de PNUD Moldova.
https://www.undp.org/sites/g/files/zskgke326/files/migration/md/Targets_UNU_RO.pdf
2. Legea RM nr. 138 din 15-06-2012, Privind sănătatea reproducerii (*Publicat : 28-09-2012 în Monitorul Oficial Nr. 205-207 art. 673*)
https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=135028&lang=ro#
3. HG nr. 387 din 14-06-2023 cu privire la aprobarea Strategiei naționale de sănătate „Sănătatea 2030” Publicat : 11-08-2023 în Monitorul Oficial Nr. 302-305 art. 700
https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=108813&lang=ro
4. GAGAUZ O. Analiza Situației Populației: Republica Moldova pe calea spre o societate îmbătrânire, elaborată de Centrul de Cercetări Demografice la decizia Comisiei Naționale pentru Populație și Dezvoltare în baza Metodologiei Globale a UNFPA cu privire la Analiza Situației Populației”.(pag.9,40)
https://moldova.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/PSA_RO.pdf
5. EUROSTAT. Biroul statistic al UE. Tema statistică: Populația și condițiile sociale
https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Fertility_statistics
6. EUROSTAT. Demografia Europei, ediția 2021, pag.11, ISBN 978-92-76-37873-0, ISSN: 2600-3368, doi:10.2785/428873, Nr. Cat. : KS-FW-21-001-EN-Q UNFPA
7. Teoria Schimbării pentru Reziliența Demografică - adaptare, atenuare, ajustare
https://moldova.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/teoria_schimbarii_pentru_rezilienta_demografica_-_adaptare_atenuare_ajustare.pdf
8. GAGAUZ O., BUCIUCEANU-VRABIE M., PAHOMII I. „Populația Republicii Moldova la 30 de ani de independență: provocări principale și politici necesare ” ISBN 978-9975-89-249-0 (PDF). 314(478)(091) P 84
9. GIRARD, A. “Adolphe Landry et La Démographie. In:” *Revue Française de Sociologie*, vol. 23, no. 1, 1982, pp. 111–26. JSTOR, <https://doi.org/10.2307/3320853>.
<https://www.jstor.org/stable/3320853?origin=crossref>
10. ВИШНЕВСКИЙ, А. Демографическая революция меняет репродуктивную стратегию вида Homo sapiens. In: *Демографическое обозрение*. 2014, т. 1, № 1, сс. 6-33.
<https://demreview.hse.ru/article/view/1825>

11. CHISTRUGA-SÎNCHEVICI, I., Echilibrul dintre muncă și viața de familie: necesități ale părinților și rolul politicilor sociale / Inga Chistruga-Sînchevici; redactor științific: Olga Gagauz; Institutul Național de Cercetări Economice, Centrul Cercetări Demografice. – Chișinău: INCE, 2021. ISBN 978-9975-89-251-3 (PDF). [316.356.2+331.101.25]:303.4
12. GRIGORAȘ E. Impactul nivelului de educație al femeilor asupra fertilității In: Creșterea economică în condițiile globalizării. 2018.–C.35-44.
<http://dspace.ince.md/jspui/handle/123456789/1473>
13. GRIGORAȘ E., Diferențieri sociodemografice ale fertilității în republica moldova, institutul național de cercetări economice centrul cercetări demografice, In: Teza de doctor în sociologie CZU:316.346+314.1(478)(043.3).
https://ince.md/uploads/files/1668680706_eg_final_phd.pdf
14. KARÁCSONY J.Á., Avizul Comitetului European al Regiunilor – Schimbările demografice: propuneri privind măsurarea și combaterea efectelor negative în regiunile UE (2020/C 440/07), In: Jurnalul Oficial al Uniunii Europene C 440/33
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:52019IR4647&from=EN>
15. Ministerul Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova, Fondul Națiunilor Unite pentru Populație „Raportul Studiului Generației și Gen : Fii vocea generației tale! ”, Institutul Interdisciplinar de Demografie din Olanda, Biroul Național de Statistica. Chisinau : INCE, 2022. 476 p. ISBN 978-9975-3530-0-7 (PDF). DOI:
<https://doi.org/10.36004/nier.cdr.2022.978-9975-3530-0-7>
16. GINGOLD JA, FAZZARI M, GERBER R, KAPPY M,. Adherence to embryo transfer guidelines in favorable-prognosis patients aged less than 35 years using autologous oocytes and in recipients using donor oocytes: a Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System study. In: Fertil Steril. 2022 Mar;117(3):548-559. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.11.015. Epub 2022 Jan PMID: 35058041.
17. JOLLY M, SEBIRE N, HARRIS J, ROBINSON S, REGAN L. Riscurile asociate cu sarcina la femeile cu vârsta de 35 de ani sau mai mult . *Hum Reprod* 2000;
18. WATANABE S, KAWAMOTO S, OHTANI N, HARA E. Impactul fenotipului secretor asociat senescentei și potențialul său ca țintă terapeutică pentru bolile asociate senescentei . *Cancer Sci* 2017; 108 : 563–569.
19. HIRATA Y, KATSUKURA Y, HENMI Y, OZAWA R, SHIMAZAKI S, KUROSAWA A, TORII Y, TAKAHASHI H, IWATA H, KUWAYAMA T, SHIRASUNA K. Advanced maternal age induces fetal growth restriction through decreased placental inflammatory cytokine expression and immune cell accumulation in mice. *J Reprod Dev*. 2021 Aug 27;67(4):257-

264. doi: 10.1262/jrd.2021-034. Epub 2021 Jun 28. PMID: 34176822; PMCID: PMC8423608.
20. WOODS L, PEREZ-GARCIA V, KIECKBUSCH J, WANG X, DEMAYO F, COLUCCI F, HEMBERGER M. Decidualizarea și defecte de placentare sunt o cauză majoră a declinului reproductiv legat de vârstă . *Nat Commun* 2017; 8 : 352.
21. DÍAZ-HERNÁNDEZ I, ALECSANDRU D, GARCÍA-VELASCO JA, DOMÍNGUEZ F. Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2021 Jun 22;27(4):720-746. doi: 10.1093/humupd/dmaa062. PMID: 33528013.
22. MENKEN J. TRUSSELL U. Age and infertility In: J Larsen Vol. 233, Issue 4771, pp. 1389-1394 DOI: 10.1126/science.3755843
https://www.ggp-i.org/wp-content/uploads/2022/07/factorii_care_influenteaza_fertilitatea_de-a_lungul_generatiilor_05.07.22.pdf
23. DOBROVOLSKAIA-CATRINICI, A., et al. "Aplicarea metodelor invazive în diagnosticul prenatal: retrospectiva rezultatelor pe anii 2009-2011." In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale* 36.4 (2012): 172-175. Human Reproduction Vol.22, No.5 pp. 1264–1272, 2007
24. Obiectivul pentru dezvoltarea durabilă. Obiectivul 3: Sănătate și bunăstare, Ținta 3.7
<https://dezvoltaredurabila.gov.ro/web/obiective/odd3/>
25. GRIGORAȘ E., UNFPA Factorii care influențează fertilitatea de-a lungul generațiilor
26. Biroul Național de Statistică a RM. Raport situația demografică în RM în 2022
https://statistica.gov.md/ro/situatia-demografica-in-anul-2022-9696_60460.html
27. VANDER BORGHT M., WYNS C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. In: *Clin Biochem*. 2018 Dec;62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29555319.
28. MAC DOUGALL K, BEYENE Y, NACHTIGALL RD. Age shock: misperceptions of the impact of age on fertility before and after IVF in women who conceived after age 40. *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):350-6. doi: 10.1093/humrep/des409. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23203214; PMCID: PMC3670726.
29. GINDOFF PR., JEWELWICZ R., Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril*. 1986 Dec;46(6):989-1001. doi: 10.1016/s0015-0282(16)49869-9. PMID: 3536609.
30. LIU K., CASE A.; Reproductive Endocrinology and Infertility Committee. Advanced reproductive age and fertility. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011 Nov;33(11):1165-1175. doi: 10.1016/S1701-2163(16)35087-3. PMID: 22082792.

31. PYPER CM., Fertility awareness and natural family planning. In: Eur J Contracept Reprod Health Care. 1997 Jun;2(2):131-46. doi: 10.3109/13625189709167468. PMID: 9678103.
32. GALLAGHER J. More about natural family planning. In: Aust Fam Physician. 1983 Nov;12(11):786-92. PMID: 6667188.
33. GROSS BA. Natural family planning indicators of ovulation. Clin Reprod Fertil. 1987 Jun;5(3):91-117. PMID: 3322540.
34. MIN JK, BREHENY SA, What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? The singleton, term gestation, live birth rate per cycle initiated: the BESST endpoint for assisted reproduction. In: Hum Reprod. 2004 Jan;19(1):3-7. doi: 10.1093/humrep/deh028. PMID: 14688149.
35. WITSENBURG C.,ș.a. Rata cumulative a nașterilor vii în cohort de pacienți tratați cu fertilizare în vitro sau injecție intracitoplasmatică de spermă. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.013>
36. QIN JB, SHENG XQ, WU D, GAO SY, YOU YP, YANG TB, WANG H. Worldwide prevalence of adverse pregnancy outcomes among singleton pregnancies after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet. 2017 Feb;295(2):285-301. doi: 10.1007/s00404-016-4250-3. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27896474.
37. CARLSEN EØ, WILCOX AJ, MAGNUS MC, HANEVIK HI, HÅBERG SE. Reproductive outcomes in women and men conceived by assisted reproductive technologies in Norway: prospective registry based study. BMJ Med. 2023 Feb 14;2(1):e000318. doi: 10.1136/bmjmed-2022-000318. PMID: 37051028; PMCID: PMC10083741.
38. BASSO O., (2003) Infertility and preterm delivery, birthweight, and Caesarean section: A study within the Danish National Birth Cohort. In: Hum Reprod 18,2478–2484.
39. BROEKMANS FJ., KWEE J., HENDRIKS DJ., A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. In: Hum Reprod Update. 2006 Nov-Dec;12(6):685-718. doi: 10.1093/humupd/dml034. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16891297.
40. BUKMAN A, HEINEMAN MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. In: Hum Reprod Update. 2001 Nov-Dec;7(6):581-90. doi: 10.1093/humupd/7.6.581. PMID: 11727867.
41. van ROOIJ IA, BANCSI LF, BROEKMANS FJ., Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. In: Fertil Steril. 2003 Mar;79(3):482-8. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04839-2. PMID: 12620425.

42. KWEE J, SCHATS R, MCDONNELL J, THEMME A. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. In: *Fertil Steril*. 2008 Sep; 90(3):737-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1293. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923131.
43. NARDO LG, GELBAYA TA, WILKINSON H, ROBERTS SA. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. In: *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1586-93. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.127. Epub 2008 Oct 18. PMID: 18930213.
44. DELCEA (VOICAN) A-Ş., Reserva ovariană: evaluarea markerilor de prognostic și studiul genetic al insuficienței ovariene. Rezumatul tezei de doctorat, Craiova 2011, 42 pag.
45. SUN W, STEGMANN BJ, HENNE M, CATHERINO WH, SEGARS JH., A new approach to ovarian reserve testing. In: *Fertil Steril*. 2008 Dec;90(6):2196-202. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.080. Epub 2008 Apr 22. PMID: 18433750; PMCID: PMC2655110.
46. BALASCH J, CREUS M, FÁBREGUES F, CARMONA F, CASAMITJANA R., Inhibin, follicle-stimulating hormone, and age as predictors of ovarian response in in vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. In: *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Nov;175(5):1226-30. doi: 10.1016/s0002-9378(96)70032-7. PMID: 8942492.
47. Ministerul Sănătății, OMS, UNFPA „Raport de evaluare finală a Strategiei Naționale a Sănătății Reproduse 2005-2015”
https://www.cidr.md/wp-content/uploads/2015/02/Raport_evaluare_SNSR_final_14-August-2015.pdf
48. GIORGETTI C, TERRIOU P, AUQUIER P, HANS E, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. In: *Hum Reprod* 1995;10: 2427–31
49. GARDNER DK, LANE M, STEVENS J, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. In: *Fertil Steril*. 2000 Jun;73(6):1155-8.
50. GOTO S, KADOWAKI T, TANAKA S, et al. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1,488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. In: *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):948-52.
51. VIOTTI M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes (Basel)*. 2020 May 29;11(6):602. doi: 10.3390/genes11060602. PMID: 32485954; PMCID: PMC7349251.

52. MUNNE S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. In: *Reprod Biomed Online* 2006;12: 234–53.
53. WILCOX AJ(1), WEINBERG CR, et al., Incidence of early loss of pregnancy. In: *N Engl J Med*. 1988 Jul 28;319(4):189-94.
54. EDMONDS DK, LINDSAY KS, MILLER JF, WILLIAMSON E, WOOD PJ. Early embryonic mortality in women. In: *Fertil Steril*. 1982 Oct;38(4):447-53. PMID: 7117572.
55. THAPLIYAL A, TOMAR AK, CHANDRA KB. Differential Sperm Proteomics Reveals the Significance of Fatty Acid Synthase and Clusterin in Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. In: *Reprod Sci*. 2023 Jun 28. doi: 10.1007/s43032-023-01288-8. Epub ahead of print. PMID: 37378824
56. STRATULAT P., FRIPTU V., BIVOL Gr. „Ghidul A Național de Perinatologie “Principii de organizare și acordare a asistenței perinatale”
<https://msmps.gov.md/wp-content/uploads/2020/06/667-Ghid.pdf>
57. PALADI Gh., CERNEȚCHI O., ILIADI-TULBURE C. „Dezvoltarea cercetării în obstetrică și ginecologie”;
https://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/17130/1/DEZVOLTAREA_CERCETARII_IN_OBSTETRICA_SI_GINECOLOGIE.pdf
58. SYMON A, PRINGLE J, DOWNE S, HUNDLEY V, LEE E, LYNN F, MCFADDEN A, MCNEILL J, RENFREW MJ, ROSS-DAVIE M, VAN TEIJLINGEN E, WHITFORD H, ALDERDICE F. Antenatal care trial interventions: a systematic scoping review and taxonomy development of care models. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2017 Jan 6;17(1):8. doi: 10.1186/s12884-016-1186-3. PMID: 28056877; PMCID: PMC5216531.
59. BARRETT, G., SHAW, J., HOWDEN, B. et al., Why do women invest in pre-pregnancy health and care? A qualitative investigation with women attending maternity services. In: *BMC Pregnancy Childbirth* 15, 236 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0672-3>
60. SOARES G. A, MARIA FERREIRA I, PESTANA-SANTOS M, MCCOURT C, PAULA PRATA A. Antenatal care policy in high-income countries with a universal health system: A scoping review. *Sex Reprod Healthc*. 2022 Jun;32:100717. doi: 10.1016/j.srhc.2022.100717. Epub 2022 Mar 2. PMID: 35248834.
61. MASON E, CHANDRA-MOULI V, BALTAG V, CHRISTIANSEN C., Preconception care: advancing from 'important to do and can be done' to 'is being done and is making a difference'. In: *Reprod Health*. 2014;

62. BEN-SHLOMO Y, KUH D. A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. In: *Int J Epidemiol*. 2002; 31:285-293.
63. de BENNETOT M, RABISCHONG B, AUBLET-CUVELIER B, BELARD F, FERNANDEZ H, BOUYER J, CANIS M, POULY JL. Fertility after tubal ectopic pregnancy: results of a population-based study. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1271-6.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.041. Epub 2012 Jul 18. PMID: 22818285.
64. RANA P, KAZMI I, SINGH R, AFZAL M, AL-ABBASI FA, ASEERI A, SINGH R, KHAN R, ANWAR F. Ectopic pregnancy: a review. *Arch Gynecol Obstet*. 2013 Oct;288(4):747-57. doi: 10.1007/s00404-013-2929-2. Epub 2013 Jun 21. PMID: 23793551.
65. JUNEAU C, BATES GW. Reproductive outcomes after medical and surgical management of ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2012 Jun;55(2):455-60. doi: 10.1097/GRF.0b013e3182510a88. PMID: 22510628.
66. HEALY DL, BREHENY S, HALLIDAY J, JAKES A, RUSHFORD D, GARRETT C, TALBOT JM, BAKER HW. Prevalence and risk factors for obstetric haemorrhage in 6730 singleton births after assisted reproductive technology in Victoria Australia. *Hum Reprod*. 2010 Jan;25(1):265-74. doi: 10.1093/humrep/dep376. Epub 2009 Nov 7. PMID: 19897853.
67. PEIPERT JF, BRACKEN MB. Maternal age: an independent risk factor for cesarean delivery. *Obstet Gynecol*. 1993 Feb;81(2):200-5. PMID: 8423950.
68. ECKER JL, Chen KT, Cohen AP, Riley LE, Lieberman ES. Increased risk of cesarean delivery with advancing maternal age: indications and associated factors in nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Oct;185(4):883-7. doi: 10.1067/mob.2001.117364. PMID: 11641671.
69. VOGEL JP, CHAWANPAIBOON S, MOLLER AB, WATANANIRUN K, BONET M, LUMBIGANON P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Oct;52:3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29779863.
70. LAWN JE, GRAVETT MG, NUNES TM, RUBENS CE, STANTON C; GAPPS Review Group. Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2010 Feb 23;10 Suppl 1(Suppl 1):S1. doi: 10.1186/1471-2393-10-S1-S1. PMID: 20233382; PMCID: PMC2841772.
71. SHAPIRO-MENDOZA CK, LACKRITZ EM. Epidemiology of late and moderate preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012 Jun;17(3):120-5. doi: 10.1016/j.siny.2012.01.007. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22264582; PMCID: PMC4544710.

72. BIVOL N., BELOUSOV T., Catedra Obstetrică și Ginecologie USMF “Nicolae Testemițanu” „Particularități de conduită a nașterii premature în dependență de termenul de gestație”
https://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/5305/1/Particularitati_de_conduita_a_nasterii_premature_in_dependenta.pdf
73. KC K, SHAKYA S, ZHANG H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab.* 2015;66 Suppl 2:14-20. doi: 10.1159/000371628. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26045324.
74. Consequences of being overweight or obese during pregnancy on diabetes in the offspring: a record linkage study in Aderdeen, Scotland, Published: 19 june 2019, volume 62, pages 1412
75. FRIPTU, V., MARIAN-PAVLENCO, A., PARENIIUC, D. Hipertensiunea indusa de sarcină și conduita nașterii. In: *Buletin de perinatologie.* 2015, nr. 1(65), pp. 62-66. ISSN 1810-5289.
76. Ministerul Sănătății Consiliului de Experți al Republicii Moldova din 24 octombrie 2013, Protocolul Clinic Național nr. 202 „Stările hipertensive în timpul sarcinii”, 2013
<https://msmps.gov.md/wp-content/uploads/2020/07/14512-PCN-20220StC483rile20hipertensive20C3AEn20sarcina.pdf>
77. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 3 (часть 1) – С. 77-81, 27.03.2017 DOI: 10.17513/mjpf.11403 стр. 77-81
<https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11403>
78. COUSENS S, BLENCOWE H, STANTON C, CHOU D, AHMED S, STEINHARDT L, CREANGA AA, TUNÇALP O, BALSARA ZP, GUPTA S, SAY L, LAWN JE. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet.* 2011 Apr 16;377(9774):1319-30. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62310-0. PMID: 21496917.
79. COLLA F, ALBA E, GRIO R. La preventabilità della mortalità perinatale [Preventable perinatal mortality]. *Minerva Ginecol.* 2001 Oct;53(5):331-6. Italian. PMID: 11549997.
80. ORTEGA MA, FRAILE-MARTÍNEZ O, GARCÍA-MONTERO C, SÁEZ MA, ÁLVAREZ-MON MA, TORRES-CARRANZA D, ÁLVAREZ-MON M, BUJAN J, GARCÍA-HONDUVILLA N, BRAVO C, GUIJARRO LG, DE LEÓN-LUIS JA. The Pivotal Role of the Placenta in Normal and Pathological Pregnancies: A Focus on Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, and Maternal Chronic Venous Disease. *Cells.* 2022 Feb 6;11(3):568. doi: 10.3390/cells11030568. PMID: 35159377; PMCID: PMC8833914.
81. GUDE NM, ROBERTS CT, KALIONIS B., KING RG Creșterea și funcția placentei umane normale. *Tromb. Res.* 2004; 114; 397-407. Doi:10.1016/j.thromers.2004.06.038

82. RILEY JK Receptorii imunitari trofoblast în toleranța materno-fetală. *Imunol. Investig.* 2008; 37 :395–426. DOI: 10.1080/08820130802206066. [PubMed]
83. RASMUSSEN KM, Institutul de Medicină Yaktine AL (SUA) și Comitetul Național de Cercetare (SUA) pentru Reexaminarea Ghidurilor OIM privind greutatea sarcinii. National Academies Press (SUA); Washington, DC, SUA: 2009. [PubMed]
84. FADL S., MOSHIRI M., FLIGNER CL, KATZ DS, DIGHE M. Placental Imaging: Normal Appearance with Review of Pathologic Findings. *Radiografie.* 2017; 37 :979–998. doi: 10.1148/rg.2017160155. [PubMed]
85. KIM S.-M., KIM J.-S. O revizuire a mecanismelor de implantare. *Dev. Reprod.* 2017; 21 :351–359. DOI: 10.12717/DR.2017.21.4.351. [Articol gratuit PMC] [PubMed]
86. LASH GE, ERNERUDH J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2015 Apr;108:83-9. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.003. Epub 2015 Feb 28. PMID: 25771398.
87. KU CW, ALLEN JC JR, Lek SM, Chia ML, Tan NS, Tan TC. Serum progesterone distribution in normal pregnancies compared to pregnancies complicated by threatened miscarriage from 5 to 13 weeks gestation: a prospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018 Sep 5;18(1):360. doi: 10.1186/s12884-018-2002-z. PMID: 30185145; PMCID: PMC6126027.
88. LISOVA KM, KALINOVSKA IV, PRYIMAK SH, TOKAR PY, VARLAS VN. Changes in the level of fetoplacental complex hormones in pregnant women with miscarriage. *J Med Life.* 2021 Jul-Aug;14(4):487-491. doi: 10.25122/jml-2021-0089. PMID: 34621371; PMCID: PMC8485377.
89. ILIADI-TULBURE C. „Aspecte antenatale și postnatale ale restricției de creștere intrauterină a fătului” USMF „Nicolae Testemițanu”, Catedra de obstetrică și ginecologie https://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/16789/1/ASPECTE_ANTENATALE_SI_POSTNATALE_ALE_RESTRICTIEI.pdf
90. CHAN BC, LAO TT. Influence of parity on the obstetric performance of mothers aged 40 years and above. *Hum Reprod.* 1999 Mar;14(3):833-7. doi: 10.1093/humrep/14.3.833. PMID: 10221722.
91. DUMITRESCU. M., teză de doctorat „Diagnosticul genetic prenatal prin biopsie de trofoblast, Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila” București https://umfcd.ro/wp-content/uploads/2017/02/Scoala_Doctorala/DUMITRESCU_MIHAI/Rezumat-teza-doctorat-Mihai.pdf

92. Ministerul Sănătății și Protecției Sociale Republicii Moldova, Supliment la Ghidul C Național de Perinatologie (volumul 2) “Protocoale de îngrijire și tratament în obstetrică și neonatologie” (destinat medicilor obstetricieni, neonatologi și medicilor de familie),, Institutul de Cercetări Științifice <http://msmps.gov.md/wp-content/uploads/2020/06/668-supliment.pdf>
93. ALFIREVIC Z, NAVARATNAM K, MUJEZINOVIC F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Sep 4;9(9):CD003252. doi: 10.1002/14651858.CD003252.pub2. PMID: 28869276; PMCID: PMC6483702.
94. TURHAN NO, EREN U, SEÇKIN NC. Second-trimester genetic amniocentesis: 5-year experience. *Arch Gynecol Obstet*. 2005 Jan;271(1):19-21. doi: 10.1007/s00404-004-0635-9. Epub 2004 Jul 29. PMID: 15290165.
95. MOȘIN V. ,, Reproducerea asistată în Republica Moldova în ultimii 10 ani” *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei Științe Medicale* 2(11)2007
96. HOOK EB. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstet Gynecol*. 1981 Sep;58(3):282-5. PMID: 6455611.
97. PICCINNI MP, RAGHUPATHY R, SAITO S, SZEKERES-BARTHO J. CYTOKINES, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol*. 2021 Jul 28;12:717808. doi: 10.3389/fimmu.2021.717808. PMID: 34394125; PMCID: PMC8355694.
98. POLGÁR B, NAGY E, MIKÓ E, VARGA P, SZEKERES-BARTHÓ J. Urinary Progesteron-Induced Blocking Factor Concentration Is Related to Pregnancy Outcome . *Biol Reprod* (2004) 71 :1699–75. 10.1095/biolreprod.104.030437 [PubMed]
99. LIM MK, KU CW, TAN TC, LEE YHJ, ALLEN JC, TAN NS. Caracterizarea nivelurilor serice de progesteron și factor de blocare indus de progesteron (Pibf) pe parcursul trimestrului la femeile însărcinate sănătoase . *Sci Rep* (2020) 10 :3840. 10.1038/s41598-020-59452-y [Articol gratuit PMC]
100. WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR. Interacțiuni bidirecționale cu citokine în relația materno-fetală: este sarcina de succes un fenomen Th2 ? *Immunol Today* (1993) 14 :353–6. 10.1016/0167-5699(93)90235-D [PubMed]
101. SAITO S, NAKASHIMA A, SHIMA T, ITO M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy . *Am J Reprod Immunol* (2010) 63 :601–10. 10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x [PubMed]
102. LASH GE, ERNERUDH J. Decidual cytokines and pregnancy complications: focus on spontaneous miscarriage. *J Reprod Immunol*. 2015 Apr;108:83-9. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.003. Epub 2015 Feb 28. PMID: 25771398.

- 103.SZEKERES-BARTHO J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.* 2002 Nov-Dec;21(6):471-95. doi: 10.1080/08830180215017. PMID: 12650238.
- 104.COULTRIP LL, et al. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Oct;171(4):901-11. doi: 10.1016/s0002-9378(94)70057-5. PMID: 7943100.
- 105.BASSO B, GIMÉNEZ F, LÓPEZ C. IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecologic infections. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005 Dec;13(4):207-11. doi: 10.1080/10647440500240664. PMID: 16338780; PMCID: PMC1784579.
- 106.COLEMAN MA, KEELAN JA, MCCOWAN LM, TOWNEND KM, MITCHELL MD. Predicting preterm delivery: comparison of cervicovaginal interleukin (IL)-1beta, IL-6 and IL-8 with fetal fibronectin and cervical dilatation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Apr;95(2):154-8. doi: 10.1016/s0301-2115(00)00450-4. PMID: 11301160.
- 107.E. MURAILLE & O. LEO „Revisiting the Th1/Th2 Paradigm” *Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Rhode-St-Genève, Belgium* (Received 26 July 1997; Accepted 21 August 1997)
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3083.1998.47.1.00383.x>
- 108.ROMERO R, SEPULVEDA W, KENNEY JS, ARCHER LE, ALLISON AC, SEHGAL PB. Interleukin 6 determination in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Ciba Found Symp.* 1992;167:205-20; discussion 220-3. doi: 10.1002/9780470514269.ch13. PMID: 1425014.
- 109.AGGARWAL R, JAIN AK, MITTAL P, KOHLI M, JAWANJAL P, RATH G. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J Clin Lab Anal.* 2019 May;33(4):e22834. doi: 10.1002/jcla.22834. Epub 2019 Jan 21. PMID: 30666720; PMCID: PMC6528584.
- 110.VILOTIĆ A, NACKA-ALEKSIĆ M, PIRKOVIĆ A, BOJIĆ-TRBOJEVIĆ Ž, DEKANSKI D, JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 23;23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574. PMID: 36498901; PMCID: PMC9738067.
- 111.TABIBZADEH S., KONG QF, BABAKNIA A., MAY LT Creșterea progresivă a expresiei interleukinei-6 în endometrul uman în timpul ciclului menstrual este inițiată în timpul ferestrei de implantare. *Zumzet. Reprod.* 1995; 10 :2793–2799. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135793. [PubMed]

112. YANG J., YANG X., YANG H., BAI Y., ZHA H., JIANG F., MENG Y. Interleukin 6 în fluid folicular reduce fragmentarea embrionului și îmbunătățește rata clinică a sarcinii. *J. Asista. Reprod. Genet.* 2020; 37 :1171–1176. doi: 10.1007/s10815-020-01737-2. [Articol gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef]
113. ALTUN T, JINDAL S, GREENSEID K, SHU J, PAL L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Mar;28(3):245-51. doi: 10.1007/s10815-010-9502-8. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21046223; PMCID: PMC3082657.
114. SEMENIUK LM, LIKHACHOV VK, YUZVENKO TY, DOBROVOLSKA L C, MAKAROV OG. Risk markers of reproductive loss in women with hyperandrogenism. *Wiad Lek.* 2018;71:1550–1553. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
115. THAXTON JE, SHARMA S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):482-91. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20163400; PMCID: PMC3628686.
116. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081–2095. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
117. MOORE KW, O'GARRA A, DE WAAL MALEFYT R, VIEIRA P, MOSMANN TR. Interleukina-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11 :165–190. [PubMed] [Google Scholar] [Lista de referințe]
118. KIM R, EMI M, TANABE K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology.* 2006;119:254–264. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
119. HUIZINGA TW, VAN DER LINDEN MW, DENEYS-LAPORTE V, BREEDVELD FC. Interleukin-10 as an explanation for pregnancy-induced flare in systemic lupus erythematosus and remission in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1999;28:496–498. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
120. Kenneth Hensley, Kent A Robinson, S.Prasad Gabbita, Scott Salsman, Robert A Floyd, Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 28, Issue 10, 2000, Pages 1456-1462, ISSN 0891-5849, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00252-5).
121. JOO, EH; KIM, YR; KIM, N.; JUNG, JE; HAN, SH; CHO, HY Efectul declanșatorilor de stres oxidativ endogenic și exogen asupra rezultatelor adverse ale sarcinii: preeclampsie,

- restricție de creștere fetală, diabet zaharat gestațional și naștere prematură. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 , 22 , 10122. <https://doi.org/10.3390/ijms221810122>
122. Cuffe JS, Xu ZC, Perkins AV. Biomarkers of oxidative stress in pregnancy complications. *Biomark Med.* 2017 Mar;11(3):295-306. doi: 10.2217/bmm-2016-0250. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28157383.
 123. Hsieh TT, Chen SF, Lo LM, Li MJ, Yeh YL, Hung TH. The association between maternal oxidative stress at mid-gestation and subsequent pregnancy complications. *Reprod Sci.* 2012 May;19(5):505-12. doi: 10.1177/1933719111426601. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22344728.
 124. Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003 Feb;267(4):189-95. doi: 10.1007/s00404-002-0319-2. Epub 2002 Oct 15. PMID: 12592416.
 125. BRUNA RIBEIRO DE ANDRADE RAMOS. Influența stresului oxidativ și reglarea încrucișată a autofagiei asupra rezultatului sarcinii PMID: 27383757 PMCID: PMC5003807 DOI: 10.1007/s12192-016-0715-3 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27383757/>
 126. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 5;97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25942353.
 127. AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. In: *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8. PMID: 24999379; PMCID: PMC4066722.
 128. LOBO V, PATIL A, PHATAK A, CHANDRA N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. In: *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902. PMID: 22228951; PMCID: PMC3249911.
 129. HUSSAIN T, MURTAZA G, METWALLY E, KALHORO DH, KALHORO MS et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. In: *Mediators Inflamm.* 2021 Sep 27;2021:9962860. doi: 10.1155/2021/9962860. PMID: 34616234; PMCID: PMC8490076.
 130. PIZZINO G, IRRERA N, CUCINOTTA M, PALLIO G, MANNINO F, ARCORACI V. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. In: *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.

- 131.AGARWAL, A., APONTE-MELLADO, A., PREMKUMAR, B.J. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. In: *Reprod Biol Endocrinol* 10, 49 (2012). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- 132.DOBROVOLSKAIA-CATRINICI A., "Particularitățile evoluției sarcinii la femeile după 35 de ani: avantaje și preocupări [Particularities of pregnancy evolution in women after 35 years old: advantages and concerns]." In: *Public health, economy and management in medicine* 2.41 (2012): 41-5.
- 133.DOBROVOLSKAIA-CATRINICI, A., Preterm birth prediction in pregnant women over than 35 years. Observational analytical cohort study. In: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*, 2023, vol. 10, nr. 2, pp. 16-20. ISSN 2345-1467. DOI: 10.52645/MJHS.2023.2.03
- 134.CUNNINGHAM MW JR, LAMARCA B. Risk of cardiovascular disease, end-stage renal disease, and stroke in postpartum women and their fetuses after a hypertensive pregnancy. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018 Sep 1;315(3):R521-R528. doi: 10.1152/ajpregu.00218.2017. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29897824; PMCID: PMC6172627.
- 135.GLICK I, KADISH E, ROTTENSTREICH M. Management of Pregnancy in Women of Advanced Maternal Age: Improving Outcomes for Mother and Baby. In: *J Womens Health*. 2021 Aug 10;13:751-759. doi: 10.2147/IJWH.S283216. PMID: 34408501; PMCID: PMC8364335.
- 136.CORREA-DE-ARAUJO R, YOON SSS. Clinical outcomes in high-risk Pregnancies Due to Advanced Maternal Age. *J Womens Health (Larchmt)*. 2021 Feb;30(2):160-167. doi: 10.1089/jwh.2020.8860. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33185505; PMCID: PMC8020515.
- 137.STAVROU E, MCCRAE KR. Immune thrombocytopenia in pregnancy. In: *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Dec;23(6):1299-316. doi: 10.1016/j.hoc.2009.08.005. PMID: 19932435; PMCID: PMC2784425.
- 138.CHADHA A, TAYADE S. Urinary Protein-to-Creatinine Ratio: An Indicator of Adverse Clinical Outcomes in Preeclampsia With Proteinuria. In: *Cureus*. 2022 Mar 20;14(3):e23341. doi: 10.7759/cureus.23341. PMID: 35464597; PMCID: PMC9017718.
- 139.MUSTAFA R, AHMED S, GUPTA A, VENUTO RC. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. In: *J Pregnancy*. 2012;2012:105918. doi: 10.1155/2012/105918. Epub 2012 May 23. PMID: 22685661; PMCID: PMC3366228.
- 140.GUO C, SUN L, CHEN X, ZHANG D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. In: *Neural Regen Res*. 2013 Jul 25;8(21):2003-14. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009. PMID: 25206509; PMCID: PMC4145906.

- 141.KOWALCZYK P, SULEJCZAK D, KLECZKOWSKA P, BUKOWSKA-OŚKO I. Mitochondrial Oxidative Stress-A Causative Factor and Therapeutic Target in Many Diseases. In: *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 13;22(24):13384. doi: 10.3390/ijms222413384. PMID: 34948180; PMCID: PMC8707347.
- 142.HANSSON SR, NÄÄV Å, ERLANDSSON L. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin. In: *Front Physiol*. 2015 Jan 13;5:516. doi: 10.3389/fphys.2014.00516. PMID: 25628568; PMCID: PMC4292435.
- 143.Almasi-Hashiani A, Omani-Samani R, Mohammadi M, Amini P, Navid B, Alizadeh A, KHEDMATI MORASAE E, MAROUFIZADEH S. Assisted reproductive technology and the risk of preeclampsia: an updated systematic review and meta-analysis. In: *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019 May 2;19(1):149. doi: 10.1186/s12884-019-2291-x. PMID: 31046710; PMCID: PMC6498659.
- 144.JOO EH, KIM YR. Effect of Endogenic and Exogenic Oxidative Stress Triggers on Adverse Pregnancy Outcomes: Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, Gestational Diabetes Mellitus and Preterm Birth. In: *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 19;22(18):10122. doi: 10.3390/ijms221810122. PMID: 34576285; PMCID: PMC8468091.
- 145.STELLER J.G., ALBERTS J.R., RONCA A.E. Oxidative Stress as Cause, Consequence, or Biomarker of Altered Female Reproduction and Development in the Space Environment. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:3729. doi: 10.3390/ijms19123729.
- 146.SULTANA Z., MAITI K., AITKEN J., MORRIS J., DEDMAN L., SMITH R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. In: *Am. J. Reprod. Immunol*. 2017;77 doi: 10.1111/aji.12653.
- 147.LYALL F, BULMER JN, DUFFIE E, COUSINS F, THERIAULT A, ROBSON SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. In: *Am J Pathol*. 2001 May;158(5):1713-21. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64127-2. PMID: 11337369; PMCID: PMC1891950.
- 148.REDDY A, SURI S, SARGENT IL, REDMAN CW, MUTTUKRISHNA S. Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia. *PLoS One*. 2009;4(2):e4453. doi: 10.1371/journal.pone.0004453. Epub 2009 Feb 11. PMID: 19412349; PMCID: PMC2675175.

- 149.DUNSON DB, BAIRD DD, COLOMBO B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol.* 2004 Jan;103(1):51-6. doi: 10.1097/01.AOG.0000100153.24061.45. PMID: 14704244.
- 150.AUDIBERT F. Pour ou contre le dépistage systématique du CMV chez la femme enceinte? Y a-t-il des arguments pour le dépistage systématique de l'infection materno-foetale à CMV? [For or against routine CMV screening in the pregnant woman? Are there arguments for routine screening for maternal-fetal CMV infection?]. In: *Gynecol Obstet Fertil.* 2002 Dec;30(12):994-8. French. doi: 10.1016/s1297-9589(02)00494-0. PMID: 12661290.
- 151.GOFFINET F. Pour ou contre le dépistage systématique du CMV chez la femme enceinte? Y a-t-il des arguments contre le dépistage systématique de l'infection materno-foetale à CMV? [For or against routine CMV screening in the pregnant woman? Are there arguments against routine screening for maternal-fetal CMV infection?]. In: *Gynecol Obstet Fertil.* 2002 Dec;30(12):998-1004. French. PMID: 12661291.
- 152.HUANG L, SAUVE R, BIRKETT N, FERGUSON D, VAN WALRAVEN C. Maternal age and risk of stillbirth: a systematic review. In: *CMAJ.* 2008 Jan 15;178(2):165-72. doi: 10.1503/cmaj.070150. PMID: 18195290; PMCID: PMC2175002.
- 153.CHERVENAK JL, KARDON NB. Advancing maternal age: the actual risks. *Female Patient.* 1991 Nov;16(11):17-24. PMID: 12317779.
- 154.SWAMY GK, EDWARDS S, GELFAND A, JAMES SA, MIRANDA ML. Maternal age, birth order, and race: differential effects on birthweight. In: *J Epidemiol Community Health.* 2012 Feb;66(2):136-42. doi: 10.1136/jech.2009.088567. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21081308; PMCID: PMC4052610.
- 155.HARALD Z., et colab. Predictive Value of the sFlt-1: PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia, In: *The New England Journal of Medicine*, August 18, 2023. *N Engl J Med* 2016; 374:13-22, DOI: 10.1056/NEJMoa1414838
- 156.MAZAKI-TOVI S, ROMERO R, KUSANOVIC JP, EREZ O, PINELES BL. Recurrent preterm birth. In: *Semin Perinatol.* 2007 Jun;31(3):142-58. doi: 10.1053/j.semperi.2007.04.001. PMID: 17531896; PMCID: PMC3500643.
- 157.BANCSI LF, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, HABBEMA JD. Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. In: *Fertil Steril.* 2004 Jan;81(1):35-41. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.06.011. PMID: 14711542.
- 158.van ROOIJ IA, BANCSI LF, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, HABBEMA JD, TE VELDE Er. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating

- hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. In: *Fertil Steril*. 2003 Mar;79(3):482-8. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04839-2. PMID: 12620425.
- 159.MUNNÉ S, CHEN S, FISCHER J, COLLS P, ZHENG X, STEVENS J, ESCUDERO T, OTER M, Schoolcraft B, Simpson JL, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. In: *Fertil Steril*. 2005 Aug;84(2):331-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.02.027. PMID: 16084873.
- 160.FIÇICIOĞLU C, KUTLU T, BAGLAM E, BAKACAK Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. In: *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):592-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.019. PMID: 16500324.
- 161.DUNSON DB, BAIRD DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. In: *Obstet Gynecol*. 2004 Jan;103(1):51-6. doi: 10.1097/01.AOG.0000100153.24061.45. PMID: 14704244.
- 162.HUANG L, SAUVE R, BIRKETT N, FERGUSON D. Maternal age and risk of stillbirth: a systematic review. In: *CMAJ*. 2008 Jan 15;178(2):165-72. doi: 10.1503/cmaj.070150. PMID: 18195290; PMCID: PMC2175002.
- 163.VILOTIĆ A, NACKA-ALEKSIĆ M, PIRKOVIĆ A, BOJIĆ-TRBOJEVIĆ Ž, DEKANSKI D, JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. In: *J Mol Sci*. 2022 Nov 23;23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574. PMID: 36498901; PMCID: PMC9738067.

ANEXE

Anexa 1. Chestionarul privind datele anamnestice prezentate de femeile gravide la etapa includerii în studiu

1. COD - Nr. 3

1. Vârsta femeii	2. Mediu	3. Profesia	4. Starea familială	5. Statut socio-economic							
1. _____ 2. 35-40 ☐ 3. peste 40 ☐	1. Urban 2. Rural ☐	1. nu lucrează ☐ 2. studentă ☐ 3. muncitoare ☐ 4. funcționară ☐	1. Căsătorită de la ____ ani ☐ 2. Celibatară ☐	1. bun ☐ 2. mediu ☐ 3. defavorizat ☐							
6. Dezvoltarea fizica 1. Dezvoltare normală ☐ 2. Reținere în dezvoltare ☐		7. Antecedente familiale 1. Nu _____ ☐ 2. Infertilitate ☐ 3. Miom uterin ☐ 4. Tumori mamare ☐ 5. Tumori ovariene ☐ 6. Sarcina extrauterina		8. Antecedente patologice extragenitale 1. Nu ☐ 2. Amigdalită cronică ☐ 3. Reumatism ☐ 4. HTA ☐ 5. Patologie pulmonară ☐ 6. Patologie gastrointestinală ☐							
8. Antecedente patologice extragenitale				9. Debut vieții sex.							
7. Patologie cardiacă ☐ 8. Patologie renală, Pielonefrită ☐ 9. Diabet ☐ 10. Tiroidita ☐ 11. Tireotxicoză		12. Hipoterozia biliară ☐ 13. Neuropsihice ☐ 14. Colecistita ☐ 15. Pancreatita ☐ 16. Varice ☐ 17. Litiază ☐		1. sub 15 ani ☐ 2. 16-18 ani ☐ 3. 19-22 ani ☐ 4. 23-29 ani ☐ 5. 30-35 ani ☐							
10. Maladii ginecologice și infecțioase (după 16 ani)				11. Funcția Menstruală							
1. Nu ☐ 2. Anomalii de dezvoltare uterine ☐ 3. Hipoplazia uter ☐ 4. Endometrioza ☐ 5. Polichistoză ☐ 6. Endocervicoză ☐ 7. Lues ☐		1. sub 15 ani ☐ 2. 16-18 ani ☐ 3. 19-22 ani ☐ 4. 23-29 ani ☐ 5. 30-35 ani ☐		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">a. Menarha</td> <td style="width: 50%;">b. Durata</td> </tr> <tr> <td>1. 11 ani ☐ 2. 12-14 ani ☐ 3. 15-16 ani ☐ 4. +16 ani ☐</td> <td>1. 1-2 zile ☐ 2. 3-4 zile ☐ 3. 5-6 zile ☐ 4. +7 zile ☐</td> </tr> </table>	a. Menarha	b. Durata	1. 11 ani ☐ 2. 12-14 ani ☐ 3. 15-16 ani ☐ 4. +16 ani ☐	1. 1-2 zile ☐ 2. 3-4 zile ☐ 3. 5-6 zile ☐ 4. +7 zile ☐			
a. Menarha	b. Durata										
1. 11 ani ☐ 2. 12-14 ani ☐ 3. 15-16 ani ☐ 4. +16 ani ☐	1. 1-2 zile ☐ 2. 3-4 zile ☐ 3. 5-6 zile ☐ 4. +7 zile ☐										
12. Interval	13. Sîngerări		14. Intensitatea durerii menstruale								
1. 20-25 zile ☐ 2. 26-30 zile ☐ 3. 31-34 zile ☐ 4. + 34 zile ☐ 5. neregulate ☐	1. Moderate ☐ 2. Hipomenoree ☐ 3. Hipermenoree ☐ 4. Oligomenoree ☐ 5. Polimenoree ☐		1. Nedureroase ☐ 2. Dureroase ☐								
15. Funcția reproductivă											
1. Numărul de sarcini	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
2. Numărul de nașteri la termen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
3. Numărul de nașteri premature	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
4. Nr. De avorturi spontane	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+

5. Nr. De avorturi medicale	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
16. FIV											
6. Extragenitale	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
7. Hiperstimularea ovariana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
8. Numărul de sarcini	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
9. Numărul de nașteri la termen	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
10. Numărul de nașteri premature	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
11. Nr. De avorturi spontane	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
12. Nr. De avorturi medicale	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+
13. rata											

17. Examen clinic general

					1	2	3	4	5	6
Înălțimea				cm	140-149	150-159	160-169	170-179	180-189	190+
Greutatea		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	kg	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120+
Polizitate	1. Tip feminin				2. Tip masculin					
Tip constituțional	1. Normostenic				2. Hiperstenic			3. Astenic		

Presiunea arterială	1. Normală / 2. HTA / 3. Hipotensiune
Obezitate	1. grad I / 2. Gr II, / 3. Gr. III, / 4. Gr. IV, / 5. Nu
Patologie cardiovasculară	1. da / 2.nu
Tiroida	1. Hipotiroide / 2. Hipertiroide / 3. Nu
Patol. hepatobiliară	1. Colecistită / 2. Litiază / 3. Alta, / 4. Nu
Glande mamare	1. Normale / 2. Mastopatie hiperplastică / 3. Hipoplazie

Anexa 2. Metodologia de realizare a investigațiilor de laborator în cercetare

Dozarea dialdehidei malonice Se operează conform procedurii descris de Atasayar S.

Principiul metodei se bazează pe determinarea spectrofoto-metrică a complexului trimetinic format în rezultatul interacțiunii dialdehidei malonice cu acidul tiobarbituric.

Reactivi și utilaj necesar:

Reagent de lucru: Într-un pahar gradat se toarnă și se amestecă în raportul 1:1:1 (vol/vol/vol) sol. acid tiobarbituric 0,375%, sol. acid tricloracetic 15% și sol. acid clorhidric 0,25 M.

Tehnica de lucru

Într-o eprubetă de centrifugare se toarnă 50 μ l material biologic (ser sau omogenat) și 1,5 ml reagent de lucru.

Se amestecă bine și se fierbe 30 min la baie cu apă, se răcește imediat într-o baie cu gheață.

Se centrifughează timp de 5 min la 3000 turații/min.

Se măsoară absorbanta la 532 nm.

Calculul se efectuează după următoarea formulă:

$$\text{DAM } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A_{pr} \cdot 10^6 \cdot 31,55\text{ml}}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,05\text{ml} \cdot x} = A_{pr} \cdot 198,7$$

unde: A_{pr}	–	absorbția probei.
1,55 ml	–	volumul total.
0,05 ml	–	volumul probei de cercetat.
x	–	concentrația de proteine, g/l.
$1,56 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-1}$	–	coeficientul molar de absorbție al DAM.

Determinarea produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA). Se operează conform procedurii de determinare a produșilor proteici de oxidare avansată în materialul biologic (în eritrocite și serul sangvin, homogenat tisular) descris de Hong Yan Li et al. cu modificări Tagadiuc Olga, Gudumac Valentin.

Principiul metodei:

Se bazează pe diluarea probei cu PBS, prelucrarea cu o sol. de acid acetic, iar citirea rezultatelor se efectuează la riderul spectrototometric la 340 nm în microplăcile cu 96 godeuri.

Reactivi:

Tampon fosfat salin 0,1 M, pH 7,4 (PBS). Sol. acid acetic 10%. Sol. 1,16 M KI.

Sol. standard cloramină-T, 0,1 mM/l.

Tehnica de lucru: În godeurile microplăcii cu 96 godeuri se toarnă câte 200 μ l ser sangvin diluat 1:5 (50 μ l ser se amestecă cu 200 μ l PBS), apoi se adaugă 20 μ l sol 10% acid acetic.

Se agită și se măsoară imediat absorbanta la 340 nm față de proba blanc constituită din 200 μ l PBS, 10 μ l sol 1,16 M KJ și 20 μ l sol.10% acid acetic.

Calculul: se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a sol. standard cloramină-T (0-100 μ mol/l) și se exprimă în μ mol/l echivalente de cloramină-T.

Dozarea albuminei ischemic-modificate

Se operează conform procedului Gudumac V., Tagadiuc Olga. Metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului nr.6476 din 05.12.2010.

Principiul metodei se bazează pe proprietatea albuminelor de a lega ionii de Co^{2+} , ce determină diminuarea intensității colorației soluției, care se măsoară fotometric la 492 nm.

Reactivi:

1. Soluție 0,5 mmol CoCl_2 .
2. Soluție 0,05M tampon HEPES pH 7,4.
3. Soluție 2,5 mmol ditiotrietol (DTT) în tampon 0,1M HEPES pH 7,4.
4. Soluție standard 1,0 mmol CoCl_2 .

Tehnică de lucru. Determinarea se efectuează în planșete cu 96 godeuri conform tabelului de mai jos.

Nr.	Ingredientele	Proba de cercetat	Proba martor	Proba de control	Proba blanc
1	Ser sangvin	50 μ l	50 μ l	-	-
2	Soluție 0,5 mmol CoCl_2	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
3	Soluție fiziologică	-	-	50 μ l	50 μ l
Se agită 5 min la temperatura camerei					
4	Soluție 20 mmol DTT în 0,05 M tampon HEPES pH 7,4	50 μ l	-	50 μ l	-
5	Soluție fiziologică	-	50 μ l	-	50 μ l
	Se agită 2 min la temperatura camerei. Se măsoară absorbanta (A) a probei de experiență, a probei martor și a probei de martor față de proba blanc la 492 nm				

Calculul se efectuează conform formulei:

Capacitatea de legare a Co (mmol/l) = $0,8215 \cdot [A_c - (A_{ex} - A_m)]$,

unde:

- A_c – absorbanta probei de control.
- A_{ex} – absorbția probei experimentale.
- A_m – absorbanta probei martor.
- 0,8215 – coeficientul de calculare (nmol/l) care se determină în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de CoCl_2

Dozarea metaboliților oxidului nitric în materialul biologic

Se efectuează conform procedurii descris de Метельская В. А. [94] cu modificări [3]. *Principiul metodei* constă în deproteinizarea materialului biologic, reducerea nitraților în nitriți, prelucrarea supernatantului obținut cu reactivul Griess și măsurarea absorbanței produsului reacției cu determinarea ulterioară a concentrației nitritului pe baza curbei de calibrare.

Reactivi:

1. Sol. 20% ZnSO₄.
2. Sol. 2% sulfanilamidă.
3. Sol. 0,1 g naftilendiamină în 2,5% acid ortofosforic (H₃PO₄).
4. Reactiv Griess: se amestecă reactivii nr. 2 și nr. 3 în raport 1:1 (ex tempore).
5. Sol. VCl₃ 0,8% în 1M HCl: 200 mg VCl₃ se dizolvă în 25 ml 1M HCl.
6. Soluție standard stock 10 mmol nitrit de sodiu (NaNO₂).

Tehnică de lucru.

1. În godeurile microplăcii cu 96 godeuri cu fundul rotund se toarnă consecutiv:
 - 0,01 ml sol. 20% ZnSO₄;
 - 0,1 ml material biologic (ser sangvin, homogenat tisular);
 - se amestecă viguros la șeicher-termostat 10 min;
 - se centrifughează 20 min la 2000 tur/min.
2. Supernatantul obținut (0,05 ml) se transferă în godeurile microplăcii cu 96 godeuri cu fundul plat pentru fotometrie. Apoi se toarnă consecutiv:
 - 0,05 ml sol. 0,8 % VCl₃;
 - 0,05 ml reagent Griess.
3. Se incubează 10 min la șeicher-termostat (la temperatura camerei, 700 tur/min).
4. Absorbanța probei de cercetat se măsoară la 540 nm față de proba blank, care se montează în mod analogic ca și proba de cercetat, dar materialul biologic se substituie cu 0,5 ml H₂O distilată.

Conținutul de nitriți în bioprobă se determină conform curbei de etalonare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard stock de nitrit de sodiu de 10 mmol/l.

Determinarea activității antioxidante totale (AAT) în cazul nostru a fost efectuată conform procedurii descris de Szabo M. R. [Szabo M.R. *Determination for antioxidant activity spectrophotometric assay*. In: Chem. Pap., 2007, vol.61,N.3, p. 214-216.] modificat Gudumac Valentin, Nastas Ion, Sardari Veronica. Procedeu de dozare a antioxidante totale în materialul biologic. // Certificat de inovator nr. 4050 din 25.11.2003.].

Principiul metodei se bazează pe descreșterea absorbantei soluției de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) datorită neutralizării acestuia sub acțiunea antioxidantilor din proba de cercetat.

Reactivi:

1. Amestec hexan-izopropanol (1:1).
2. Amestec hexan-izopropanol (1:2).
3. Soluție 0,004% de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Tehnică de lucru.

1. La proba de material biologic – ser sangvin (0,1 ml), omogenat tisular 10% (0,1 ml), se adaugă 3 ml de amestec hexan-izopropanol (1:1).
2. Se agită viguros la un vortex 2-3 min.
3. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min.
4. Se transferă supernatantul în altă eprubetă, iar la sediment se adaugă 4 ml de amestec hexan-izopropanol (1:2) și se amestecă viguros la un vortex 2-3 min.
5. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min..
6. Supernatantul obținut se transferă în eprubete cu primul supernatant și se amestecă.
7. Se pipetează în cuva spectrofotometrică 0,05 ml de supernatant transparent și se adaugă 0,95 ml de soluție 0,004% de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
8. Se măsoară descreșterea absorbanței soluției ($A_0 - A_1$) timp de 10 minute la 517 nm față de soluția de hexan.

Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de DPPH.

Dozarea separată a activității antioxidanților hidrofobi polari și nepolari s-a efectuat conform procedurii descris de Szabo M. Rmodificat [Gudumac Valentin, Nastas Ion, Sardari Veronica. Procedeu de dozare a antioxidante totale în materialul biologic. Certificat de inovator nr. 4050 din 25.11.2003.

Principiul metodei se bazează pe descreșterea absorbanței soluției de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) datorită neutralizării acestuia sub acțiunea antioxidanților din proba de cercetat.

Reactivi:

- Amestec hexan-izopropanol (1:1).
- Amestec hexan-izopropanol (1:2).
- HCl 0,05 M.
- NaCl praf.
- Soluție 0,004% de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Tehnică de lucru.

1. La materialul biologic – ser sangvin (0,1 ml), omogenat tisular (0,1 ml), țesut osos (20 mg) se adaugă 3 ml de amestec hexan-izopropanol (1:1) și se agită viguros la un vortex

2-3 min.

2. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min.
3. Supernatantul se transferă în altă eprubetă, iar la sediment se adaugă încă 4 ml de amestec hexan-izopropanol (1:2) și se amestecă viguros.
4. Se centrifughează 10 min la 3000 tur/min..
5. Supernatantul se transferă în eprubeta cu supernatantul precedent și în ea se adaugă 2 ml sol. 0,05 M HCl.
6. Se amestecă la un vortex 2-3 min și se așteaptă până la separarea fazelor.
7. Faza hexanică (superioară), ce conține substanțele lipidice nepolare, se transferă în altă eprubetă.
8. La faza izopropanolică, ce conține substanțele lipidice polare, se adaugă 1 g praf de NaCl. Se amestecă viguros și se așteaptă să se sedimenteze cristalele de NaCl.
9. În 2 cuve spectrofotometrice se pipetează câte 0,05 ml de extract hexanic și izopropanolic al materialului biologic, se adaugă 0,95 ml sol. 0,004% de 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).
10. Se măsoară descreșterea absorbanței soluției ($A_0 - A_1$) timp de 10 minute la 517 nm față de soluția de hexan.

Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de DPPH.

Determinarea activității superoxiddismutazei (SOD)

Se efectuează conform procedului Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. „*Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении.*” In: Лаб. Дело, 1991, N.7, c.16-19. [119] modificat [Tagadiuc Olga, Andronache Lilia, Știrba Olga, Gudumac Valentin. Determinarea tioredoxin reductazei. // Certificat de inovator nr. 5176 din 12.11.2012 [18].

Principiul metodei. constă în inhibiția reducerii sării de tetrazolium nitroblue (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetasulfat și NADH sub acțiunea SOD. În urma reducerii NBT se formează nitroformazan, care are o colorație albastră, intensitatea căreia este proporțională cantității de NBT redus. Gradul de inhibiție a acestui proces depinde de activitatea enzimei.

Reactivi și utilaj necesar:

1. Soluție-tampon 0,1 M fosfat, pH 7,8.
2. Soluție-tampon 5 mmol Tris-HCl, pH 7,4.
3. Mediu de incubare: 0,033 mmol EDTA, 0,41 mmol tetrazolium nitroblue (NBT), 0,01 mmol fenazinmetasulfat (FMS) în soluție-tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,8.

4. Soluție 0,8 mmol NADH₂ în soluție-tampon 0,1 M fosfat, pH 7,8.
5. Alcool etilic 96°.
6. Cloroform.
7. KH₂PO₄ cristalic.
8. Soluție 0,9% NaCl.
9. Spectrofotometru (rider) pentru microplăci, termostat, frigider, pipete automate.

Tehnică de lucru. Este necesară prelucrarea preliminară a materialului biologic pentru sedimentarea compuşilor, care împiedică determinarea activităţii SOD.

a) Prelucrarea preliminară a serului sanguin.

1. Într-o eprubetă Eppendorf se toarnă 0,1 ml ser sanguin.
2. Se adaugă 0,045 ml amestec etanol:cloroform 2:1 şi 30 mg KH₂PO₄ cristalic.
3. Se amestecă minuţios la vortex la rotaţii moderate în decurs de 2-3 min.
4. Se centrifughează 5 min la 5000 tur/min (4°C).
5. Supernatantul rezultat, care se utilizează ulterior pentru determinarea activităţii enzimei, trebuie să fie transparent şi incolor.

b) Prelucrarea preliminară a eritrocitelor.

1. Eritrocitele sunt spălate cu soluție 0,9% NaCl prin centrifugări repetate.
2. Apoi, într-o eprubetă Eppendorf se toarnă 0,1 ml eritrocite, anterior hemolizate şi diluate de 10 ori cu soluție-tampon 5 mmol Tris-HCl (pH 7,4).
3. Se adaugă 0,04 ml amestec etanol:cloroform 5:3.

Prelucrarea ulterioară este similară celei descrise pentru serul sanguin.

Determinarea se efectuează în microplăcile cu 96 godeuri:

1. Se măsoară 0,01 ml supernatant incolor şi transparent.
2. Se adaugă 0,2 ml mediu de incubare.
3. Se măsoară absorbanta iniţială - A₀ la 540 nm.
4. Se adăugă 0,025 ml sol. 0,8 mmol NADH₂.
5. Se incubează timp de 5 min la 37°C în şeicherul-termostat la 700 tur/min.
6. După expirarea timpului de incubare se înregistrează A₁ la 540 nm.
7. Se determină diferenţa între valorile A înregistrate la prima şi la cea de-a doua măsurare ($\Delta A_{\text{exp}} = A_1 - A_0$).
8. Proba martor se prelucrează în mod similar, însă ea nu conţine materialul biologic, deci este lipsită de enzimă şi în amestec nu are loc inhibiţia procesului de reducere a NBT.

9. Activitatea enzimei se exprimă în unități convenționale. În calitate de unitate a activității SOD se consideră cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția cu 50% a reacției de reducere a NBT.

Calcularea activității enzimei se efectuează după formula:

$$A = \left(100 - \frac{\Delta A_{\text{exp}} \times 100}{\Delta A_{\text{martor}}} \right) / 50$$

unde: ΔA_{exp} – variația A a probei de cercetat timp de 5 min.

ΔA_{martor} – variația A a probei martor timp de 5 min.

Activitatea enzimei se raportează la ml de ser, la g de proteină sau la 1 g de hemoglobină.

Determinarea activității catalazei s-a efectuat conform procedurii descris de [Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. In: Лабор. Дело, 1988, N.1, c.16-19.] modificat.

Principiul metodei Determinarea activității catalazei este bazată pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de scindare a moleculei de H_2O_2 la H_2O și O_2 . Peroxidul de hidrogen formează cu molibdatul de amoniu un compus de culoare galbenă. În procesul reacției pe măsura descompunerii H_2O_2 are loc decolorarea amestecului. Gradul decolorării într-o anumită perioadă de timp corelează cu activitatea enzimei și poate fi estimată spectrofotometric.

Reactivi și utilaj necesar:

1. Soluție de 0,03% H_2O_2 .
2. Soluție de 4% molibdat de amoniu.
3. Spectrofotometru (rider) pentru microplăci, termostat, frigider, pipete automate.

Tehnică de lucru. Determinarea se efectuează în microplăcile cu 96 godeuri.

1. Se măsoară 0,01 ml material de cercetat (ser diluat de 10 ori sau omogenat tisular diluat de 100 ori).
2. Se adaugă 0,18 ml sol. 0,03% H_2O_2 .
3. În probele martor în loc de H_2O_2 se adaugă aceeași cantitate de apă distilată.
4. Paralel se pregătesc 3 probe paralele de referință, care conțin numai H_2O_2 și apă distilată.
5. Probele se incubează 10 min la 37°C .
6. Apoi se adaugă 0,10 ml soluție de 4% molibdat de amoniu, se agită și se măsoară absorbanta A la 410 nm.
7. Se calculează diferența între absorbanta probei de referință și celei experimentale.

Calcularea activității enzimatică [μmol pe s la 1 g de țesut ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$) sau în μmol pe s la 1 l ser ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{l}$)] se efectuează după formula:

$$E = (A_c - A_{pr}) \times V_{pr} \times 1600,$$

unde: A_c - absorbanța probei de control.

A_{pr} - absorbanța probei experimentale.

V_{pr} - volumul probei.

Coeficientul molar de absorbție $\text{H}_2\text{O}_2\Sigma = 22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Aprecierea sistemului tiol-disulfidic, Dozarea glutationului total:

Se operează conform procedurii descris de Akerboom T. P. and Sies H. în modificarea noastră.

Principiul metodei de determinare a glutationului total în materialul biologic (serul sangvin, homogenat tisular) se bazează pe formarea compusului colorat dintre glutationul redus și DTNB în mediul de reacție ce conține NADPH, DTNB și glutationreductază.

Reactivi și utilaj necesar:

1. Țesutul cercetat (ficat, rinichi, splină etc.) se omogenizează cu 5% acid sulfosalicilic în raport 1:5; 200 mg țesut se omogenizează cu 1 ml 5% acid sulfosalicilic răcit până la $+4^\circ\text{C}$, apoi se centrifughează 5 min la 5000 tur/min.
2. Supernatantul obținut se transferă în eprubete Eppendorf și se păstrează la $(-40)^\circ\text{C}$ în congelator.
3. Înainte de determinare, supernatantul se diluează de 100 ori cu 0,1 M K-fosfat + 1 mM EDTA (pH 7,5) după următoarea schemă:
 - a) 20 μl supernatant + 180 μl 0,1 M K-fosfat-diluția 1:10, se amestecă bine.
 - b) 20 μl diluție 1:10 + 180 μl 0,1 M K-fosfat-diluția 1:100.
4. Reagent de reciclare. Se pregătește *ex tempore* în modul următor: la 20 ml 0,1 M K-fosfat + 1 mM EDTA (pH 7,5) se adaugă 6 mg NADPH diluat în 0,5 ml 1% Na HCO_3 , 2 mg DTNB diluat în 1,0 ml DMSO și 50 μl preparat GR (0,64 U/ml).

Tehnică de lucru: Calculul se efectuează după curba de calibrare care se construiește în baza diluțiilor succesive ale soluției standard stock 10 mM G-SH, conform Tabelului 2.1. În godeurile microplăcii cu 96 godeuri se toarnă 50 μl supernatant diluat de 100 ori și 150 μl reagent de reciclare, se agită 15 s, apoi se măsoară absorbanța inițială (A_1) la 405 nm. Peste 5 min se măsoară A_2 și se calculează $\Delta A = A_2 - A_1$.

Tabelul 2.1 Pregătirea diluțiilor de lucru ale soluției standard din stoc.

	Sol.stand. stock, 10 mM/l, ml	H ₂ O dist., ml	Sol. 5% acid sulfosalicilic,	Concentrația în probă,	Concentrația, pM/ml
--	----------------------------------	-------------------------------	---------------------------------	---------------------------	------------------------

			ml	pM	
1.	0,050	0,950	4	50,0	200
2.	0,100	0,900	4	100,0	400
3.	0,200	0,800	4	200,0	800
4.	0,300	0,700	4	300,0	1200
5.	0,500	0,500	4	500,0	2000
6.	0,700	0,300	4	700,0	2800

În godeurile plăcii cu 96 godeuri se toarnă câte 50 µl din fiecare diluție și 150 µl reagent de reciclare, se agită 15 s și se măsoară A_1 inițială la 405 nm și apoi A_2 după 5 min.

Determinarea activității glutathionperoxidazei, se efectuează conform procedurii descris Comhair S.A. et al. Materialul biologic (0,02 ml ser sangvin sau omogenat tisular), se amestecă cu reagentul de lucru 0,160 ml (0,1 M K–fosfat, 2 mM EDTA cu pH 7,5, 10 mM NaN₃ și 1 mM NADPH), se amestecă apoi se suplimentează 0,02 ml H₂O₂ sol. 2,5 mM. Se agită 15 s și se măsoară absorbanta A_0 la 340 nm. Peste 3 min se măsoară A_1 . Se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol de NADP·H, format timp de 1 s la 1 g de țesut (nmol/s·g) sau la 1 l de ser (nmol/s·l).

Determinarea activității glutathionreductazei, se efectuează conform metodei enzimice de dozare a GR în materialul biologic descrisă de Кулинский В.И., et al modificată [Gudumac Valentin, Tagadiuc Olga, Andronache Lilia, Știrba Olga, Sardari Veronica, Pantea Valeriana. Determinarea glutathion reductazei în eritrocite și ser sangvin. [Certificat de inovator nr. 5172 din 06.11.2012.]. Materialul biologic (0,02 ml ser sangvin, omogenat tisular), se amestecă cu 0,1 ml mediu de incubare [0,05 M K–fosfat, 1 mmol EDTA (pH 7,5), 0,1 mmol NADPH]. Se agită 15 s și se lasă 5 min la 37°C. Se toarnă 0,1 ml sol. 2 mM glutathion oxidat (G-S-S-G). Se măsoară absorbanta A_0 la 340 nm. Peste 3 min se măsoară A_1 și se calculează ΔA min. Activitatea enzimei se calculează, reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-1}$) și se exprimă în nmol de NADP·H, format timp de 1 s la 1 g de țesut (nmol/s·g) sau la 1 l de ser (nmol/s·l).

Determinarea activității glutaredoxinei. Se operează conform procedurii de determinare spectrofotometrică a activității glutaredoxinei (GR) în materialul biologic (omogenat tisular) descris de Holmgren, A. and Aslund, F. [26] modificat[137] [Tagadiuc Olga, Andronache Lilia, Știrba Olga, Gudumac Valentin. Determinarea tioredoxin reductazei. [Certificat de inovator nr. 5176 din 12.11.2012.].

Reactivi și utilaj necesar: Într-un pahar gradat se toarnă consecutiv:

50 ml 0,1 M tris-HCl (pH 8,0) + 0,2 mM EDTA; 0,5 ml 10% BSA; 0,5 ml NADPH (17 mg se dizolvă în 1 ml 1% NaHCO₃); 0,5 ml 0,1 M G-SH

Această cantitate este suficientă pentru cel puțin 300 determinări.

Tehnica de lucru La 160 μl amestec de incubare se adaugă 10 μl GR (0,6 mg/ml) și apoi 10 μl 0,07 M HED (hidroxietil disulfid) [110 mg la 10 ml H₂O distilată]; după 3 min. de preincubare se adaugă 20 μl probă de cercetat. Se agită 15 s și se măsoară absorbanta A₀ la 340 nm; după 3 min. se măsoară A₁; după 3 min. se măsoară A₂; se calculează ΔA min. Calculul se efectuează după formula:

$$\text{Glutaredoxina} \quad \frac{\Delta A}{\sum} \times \frac{V_t}{V_p} \quad \text{(U/l)}$$

unde: ΔA – devierea absorbantei pe min; V_t – volumul total, L; V_p – volumul probei de cercetat. Σ – coeficient molar de extincție 6,22 M⁻¹cm⁻¹.

Determinarea nivelului de S-nitrozotoli în materialul biologic

Se operează conform procedurii de determinare a nivelului de S-nitrozotoli în materialul biologic (în eritrocite și serul sangvin, homogenat tisular descris de Haqqani A. S. și coaut. [Haqqani A. S., Skyz K. D., Birnboim H. C. The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells. Nitric Oxide, 2003, vol.9,N.3, p.17-18] cu modificări [Gudumac Valentin, Tagadiuc Olga, Andronache Lilia, Știrba Olga, Pantea Valeriana. Procedeu de dozare a nivelului de S-nitrozotoli în materialul biologic. // Certificat de inovator nr. 5165 din 31.10.2012.].

Reactivi: Sol. 0,1 mM amoniu sulfamat; Sol. 1,1 mM HgCl₂; Sol. 0,05 g/l diaminonaphtalen; în 0,62 M HCl; Amestec de reagenți: se amestecă reagenții 2 și 3 în raport 1:4; Sol. 2,8 M NaOH; Sol standard de S-nitrozotoli: se pregătesc diluțiile consecutive ale sol. de la 0,15 până la 10,0 μmol/l G-SH în 1 M HCl (câte 50 μl); se incubează 2 ore cu 50 μl NaNO₂(10 μmol/l) la întuneric la t° camerei și apoi se adaugă 50 μl sol. 0,1 mmol amoniu-sulfamat.

Tehnică de lucru. Se folosesc microplăcile negre cu 96 godeuri pentru determinările fluorescenței. În fiecare godeu se toarnă câte 100 μl plasmă sangvină diluată în prealabil (1:1) și apoi se adaugă 50 μl sol. 0,1 amoniu-sulfamat.

După 10 min. de incubare într-un loc întunecos la t° camerei se toarnă 50 μl amestec de reagenți.

Se amestecă și se ține 10 min. la t° camerei, după ce se stopează reacția cu 20 μ l sol. 2,8 M NaOH. Probele se amestecă și se măsoară intensitatea fluorescenței la 360 nm (excitare) și 450 nm (emisie). Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive ale sol. standard de S-nitrozotoli.

Anexa 3. Baza de date a parametrilor biomarkerilor determinați în cercetare

Tabelul 1. Baza de date a parametrilor Interleukinei 6 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	509	1048	2672	1442	57	832	737	763	769
2	548	1256	826	1197	58	925	749	1086	924
3	483	986	1573	787	59	458	984	1007	1014
4	436	1364	1212	881	60	623	955	879	677
5	824	985	908	1030	61	832	737	1452	865
6	798	754	1305	1108	62	425	1120	648	754
7	624	657	1215	1860	63	642	954	785	840
8	458	984	1291	1000	64	523	865	2036	1030
9	623	955	855	1325	65	894	951	667	984
10	832	737	593	672	66	951	745	1087	581
11	425	1120	770	1157	67	718	1228	1131	1087
12	642	954	782	1215	68	925	816	1277	747
13	523	865	569	1325	69	458	984	1214	942
14	1239	909	1050	1308	70	623	955	1207	850
15	863	640	1257	1090	71	832	737	541	1102
16	943	1860	1228	1161	72	425	1120	657	942
17	514	756	2172	1269	73	642	954	2276	1373
18	1215	1860	1968	1336	74	863	640	653	765
19	2913	579	1379	859	75	943	1860	756	534
20	840	843	1188	978	76	514	756	1034	737
21	832	737	1305	1108	77	1215	1860	865	1131
22	1222	630	1215	1860	78	2913	579	927	953
23	1277	656	1291	1000	79	1727	1046	2886	1325
24	1239	909	1215	956	80	846	845	776	867
25	863	640	2046	1280	81	1492	679	729	1112
26	943	1860	713	1392	82	984	845	2047	864
27	785	675	1261	814	83	723	1152	987	970
28	1026	722	1191	898	84	894	951	1514	1311
29	1027	1109	1986	873	85	984	845	1235	890
30	925	749	1846	658	86	1014	980	1685	765
31	458	984	920	795	87	795	716	684	750
32	623	955	2193	641	88	2291	1135	562	830
33	832	737	814	1107	89	1234	988	846	845
34	425	1120	1041	688	90	894	951	1727	1046
35	642	954	2782	814	91	951	745	846	845
36	523	865	1057	756	92	718	1228	846	845
37	1239	909	1889	687	93	925	816	1727	1046
38	863	640	2046	1280	94	843	1216	846	845
39	943	1860	1042	871	95	856	1127	1492	679
40	514	756	890	789	96	916	798	1387	858
41	1215	1860	760	1215	97	509	1048	1268	954
42	2913	579	856	1354	98	548	1256	624	657
43	840	843	908	1289	99	483	986	1222	630
44	746	931	909	1251	100	436	1364	1277	656
45	951	801	988	1453	101	824	985	1239	909
46	597	1007	817	1244	102	798	754	863	640
47	832	737	817	806	103	2913	579	943	1860
48	925	749	491	845	104	1305	672	785	675
49	458	984	1222	630	105	1070	847	1026	722
50	623	955	1277	656	106	1268	954	1027	1109
51	832	737	1003	770	107	1423	820	925	749
52	425	1120	2949	760	108	1492	679	1181	1344
53	642	954	1148	943	109	1387	858	1093	1379
54	523	865	2268	651	110	1339	770	2291	1135
55	1239	909	879	677	111	652	710	1234	988
56	597	1007	1185	623					

Notă: lotul I a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante

Tabelul 2 Baza de date a parametrilor Interleukinei 8 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	337	2871	343	1973	57	272	1057	220	620
2	321	2653	294	1071	58	462	947	270	1228
3	362	1364	286	1700	59	756	1954	377	780
4	462	1951	426	1179	60	598	954	401	826
5	265	946	313	1405	61	272	1057	1365	1355
6	535	895	264	1061	62	220	1135	384	892
7	654	1354	471	2887	63	310	854	268	1245
8	756	1954	418	1451	64	268	968	252	1297
9	598	954	213	2464	65	315	1574	278	841
10	272	1057	377	1284	66	384	487	404	942
11	220	1135	253	991	67	298	1387	274	959
12	310	854	354	254	68	471	951	468	2590
13	268	968	269	894	69	756	1954	354	1075
14	303	2462	265	1586	70	598	954	533	1140
15	411	780	224	3556	71	272	1057	739	1310
16	310	2241	221	3802	72	220	1135	196	1078
17	328	1415	293	1770	73	310	854	234	2205
18	310	2241	446	1603	74	411	780	364	735
19	325	728	454	1137	75	310	2241	241	836
20	280	1832	272	893	76	328	1415	462	1061
21	272	1057	264	1061	77	310	2241	212	1071
22	441	2546	471	2887	78	325	728	318	1525
23	239	1520	418	1451	79	369	2467	322	2795
24	303	2462	314	1169	80	284	896	593	927
25	411	780	304	2507	81	306	1117	303	2893
26	310	2241	301	2749	82	265	2654	287	3590
27	579	2985	273	1809	83	227	2625	204	3033
28	272	955	479	2885	84	315	1574	386	1998
29	437	2010	345	1264	85	265	2654	354	1268
30	462	947	269	960	86	267	3524	265	985
31	756	1954	584	1256	87	328	1415	215	1650
32	598	954	580	2735	88	316	2770	264	985
33	272	1057	260	1306	89	310	2241	284	896
34	220	1135	270	1094	90	315	1574	369	2467
35	310	854	345	741	91	384	487	284	896
36	268	968	266	1919	92	298	1387	284	896
37	303	2462	314	1169	93	471	951	369	2467
38	411	780	304	2507	94	365	676	284	896
39	310	2241	359	890	95	256	1306	306	1117
40	328	1415	370	1535	96	384	1535	1491	1361
41	310	2241	253	991	97	337	2871	384	898
42	325	728	215	2464	98	321	2653	654	1354
43	280	1832	313	1405	99	362	1364	441	2546
44	206	1749	276	2227	100	462	1951	239	1520
45	306	2677	412	1399	101	265	946	303	2462
46	329	2928	662	1732	102	535	895	411	780
47	272	1057	190	1283	103	325	728	310	2241
48	462	947	221	965	104	349	1261	579	2985
49	756	1954	441	2546	105	238	1537	272	955
50	598	954	239	1520	106	384	898	437	2010
51	272	1057	306	744	107	343	1870	462	947
52	220	1135	208	2125	108	306	1117	275	1410
53	310	854	462	2010	109	1491	1361	381	1920
54	268	968	665	1031	110	265	2714	316	2770
55	303	2462	401	826	111	311	846	310	2241
56	329	2928	234	2169					

***Notă:** lotul 1 a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante*

Tabela nr.3. Baza de date a parametrilor Interleukinei 10 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	318	458	261	273	57	207	540	266	450
2	362	464	334	308	58	360	399	424	596
3	281	625	206	469	59	331	564	478	456
4	332	516	306	509	60	321	358	285	499
5	221	485	246	642	61	207	540	458	265
6	236	671	265	1481	62	321	689	268	562
7	254	421	579	788	63	223	734	350	642
8	331	564	229	383	64	215	712	236	621
9	321	358	269	505	65	211	498	523	485
10	207	540	239	738	66	252	518	168	357
11	321	689	166	600	67	178	538	317	375
12	223	734	384	682	68	345	366	1115	463
13	215	712	297	549	69	331	564	255	513
14	574	360	219	690	70	321	358	323	626
15	399	537	292	673	71	207	540	330	269
16	227	559	887	2218	72	321	689	234	493
17	214	367	328	459	73	223	734	333	876
18	227	559	292	431	74	399	537	268	514
19	219	360	288	510	75	227	559	384	435
20	214	646	460	490	76	214	367	347	420
21	207	540	265	1481	77	227	559	366	406
22	179	589	579	788	78	219	360	447	710
23	335	588	229	383	79	191	530	269	752
24	574	360	301	672	80	364	369	391	492
25	399	537	407	704	81	376	245	251	528
26	227	559	333	657	82	645	1684	590	704
27	223	524	516	498	83	267	649	315	576
28	202	567	531	1451	84	211	498	377	1060
29	234	800	542	398	85	645	1684	375	482
30	360	399	318	861	86	716	1890	225	365
31	331	564	684	528	87	214	367	233	509
32	321	358	227	619	88	231	512	362	415
33	207	540	313	513	89	227	559	364	369
34	321	689	700	398	90	211	498	191	530
35	223	734	221	449	91	252	518	364	369
36	215	712	1096	483	92	178	538	364	369
37	574	360	301	672	93	345	366	191	530
38	399	537	507	704	94	268	417	364	369
39	227	559	693	563	95	340	513	376	245
40	214	367	458	703	96	476	706	340	328
41	227	559	182	624	97	318	458	479	395
42	219	360	269	524	98	362	464	254	421
43	214	646	246	614	99	281	625	179	589
44	293	892	250	789	100	332	516	335	588
45	235	590	582	810	101	221	485	574	360
46	193	557	272	333	102	236	671	399	537
47	207	540	347	685	103	219	360	227	559
48	360	399	267	612	104	336	352	223	524
49	331	564	179	589	105	630	827	202	567
50	321	358	335	588	106	479	395	234	800
51	207	540	204	662	107	293	419	360	399
52	321	689	404	368	108	376	245	264	464
53	223	734	740	728	109	340	328	223	480
54	215	712	306	725	110	388	756	231	512
55	574	360	285	499	111	412	512	227	559
56	193	557	284	470					

Notă: lotul I a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante

Tabelul 4. Baza de date a parametrilor Interleukinei 12 determinate în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid aniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	925	790	493	503	57	412	854	1949	401
2	1231	750	372	518	58	2202	776	199	796
3	841	690	369	888	59	458	689	1964	1134
4	865	920	411	885	60	562	925	364	484
5	425	755	659	1136	61	412	854	468	787
6	486	524	332	717	62	654	711	598	895
7	521	751	312	982	63	568	655	458	827
8	458	689	922	756	64	562	652	76	1173
9	562	925	393	739	65	364	844	825	1009
10	412	854	484	1294	66	389	841	370	714
11	654	711	549	1192	67	584	1286	413	893
12	568	655	368	1135	68	2103	752	2056	825
13	562	652	397	984	69	458	689	1138	920
14	350	898	673	1298	70	562	925	683	890
15	351	835	324	918	71	412	854	1532	662
16	416	956	420	2790	72	654	711	216	894
17	351	835	389	913	73	568	655	576	1283
18	416	956	556	895	74	351	835	482	874
19	471	706	357	823	75	416	956	851	961
20	260	923	499	784	76	351	835	502	886
21	412	854	332	717	77	416	956	261	854
22	325	1081	312	982	78	471	706	300	1366
23	459	1018	922	756	79	327	825	405	1319
24	350	898	1463	1144	80	512	568	431	1001
25	351	835	601	1104	81	260	606	310	801
26	416	956	255	937	82	598	1356	943	733
27	1585	969	331	1078	83	636	1075	292	1182
28	1416	1009	788	1247	84	364	844	278	831
29	552	1188	851	1045	85	598	1356	357	1168
30	2202	776	792	1124	86	737	2028	418	658
31	458	689	924	986	87	351	835	549	1195
32	562	925	879	967	88	1364	826	572	840
33	412	854	819	981	89	416	956	512	568
34	654	711	411	891	90	364	844	327	825
35	568	655	367	848	91	389	841	512	568
36	562	652	710	844	92	584	1286	512	568
37	350	898	1463	1144	93	2103	752	327	825
38	351	835	601	1104	94	620	1126	512	568
39	416	956	1853	952	95	819	981	260	606
40	351	835	312	1198	96	312	1198	498	706
41	416	956	549	1192	97	925	790	498	684
42	471	706	393	739	98	1231	750	521	751
43	260	923	659	1136	99	841	690	325	1081
44	233	930	971	1137	100	865	920	459	1018
45	353	974	1401	1417	101	425	755	350	898
46	252	1009	540	521	102	486	524	351	835
47	412	854	570	663	103	471	706	416	956
48	2202	776	751	764	104	1208	712	1585	969
49	458	689	325	1081	105	1679	1184	1416	1009
50	562	925	459	1018	106	498	684	552	1188
51	412	854	2098	898	107	455	819	2202	776
52	654	711	1121	860	108	260	606	423	936
53	568	655	418	1164	109	498	706	491	757
54	562	652	1654	1428	110	554	1023	1364	826
55	350	898	364	484	111	713	954	416	956
56	252	1009	1863	1057					

Notă: lotul I a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante

Tabelul 5. Baza de date a parametrilor Factorului stromal derivat celular (SDF) determinat în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	534	567	474	527	57	485	541	420	656
2	1214	810	489	615	58	762	714	440	633
3	858	615	524	628	59	524	598	414	854
4	1114	592	577	661	60	851	552	1592	661
5	743	658	656	816	61	524	598	1254	654
6	489	933	339	575	62	388	584	427	694
7	569	634	462	731	63	1114	592	468	795
8	616	658	463	599	64	851	552	373	942
9	387	748	343	517	65	1227	625	446	775
10	610	653	633	866	66	851	552	589	687
11	851	552	314	772	67	1227	625	498	610
12	1227	625	394	627	68	404	603	1190	668
13	599	739	472	548	69	1114	592	636	731
14	534	567	449	795	70	346	732	733	699
15	1214	810	401	651	71	475	612	1108	520
16	1227	625	361	1979	72	851	552	420	722
17	860	584	486	667	73	1227	625	468	1042
18	755	498	695	699	74	404	603	512	698
19	405	516	551	630	75	851	552	487	841
20	798	612	480	764	76	524	598	481	740
21	668	626	339	745	77	388	584	364	662
22	642	632	462	731	78	1114	592	433	752
23	534	695	463	599	79	346	732	526	828
24	952	549	615	719	80	257	320	998	681
25	220	521	671	681	81	320	851	535	653
26	280	568	475	628	82	851	494	412	814
27	356	488	384	716	83	374	881	397	609
28	268	524	424	1170	84	320	625	1107	877
29	394	367	675	719	85	257	1568	346	732
30	569	634	794	698	86	320	1527	475	612
31	368	720	655	754	87	851	552	303	777
32	532	765	786	711	88	494	667	451	793
33	851	552	474	680	89	1227	625	524	598
34	1227	625	382	666	90	860	584	851	552
35	851	552	546	697	91	755	498	524	598
36	1227	625	527	610	92	405	516	524	598
37	404	603	615	719	93	798	612	851	552
38	851	552	671	681	94	458	516	524	598
39	524	598	481	757	95	474	680	388	584
40	388	584	622	750	96	622	750	1114	592
41	1114	592	314	772	97	668	626	485	541
42	346	732	343	517	98	642	632	356	488
43	475	612	656	816	99	534	695	616	658
44	451	793	369	874	100	952	549	387	748
45	392	767	730	857	101	220	521	610	653
46	583	684	260	498	102	280	568	851	552
47	485	541	316	781	103	404	603	1227	625
48	762	714	214	596	104	320	1527	599	739
49	524	598	616	658	105	369	709	534	567
50	851	552	387	748	106	485	541	1214	810
51	524	598	626	828	107	762	714	858	615
52	388	584	355	641	108	388	584	610	653
53	1114	592	505	798	109	1114	592	1114	592
54	485	541	529	851	110	392	767	743	658
55	320	1527	1592	661	111	583	684	489	933
56	369	709	378	755					

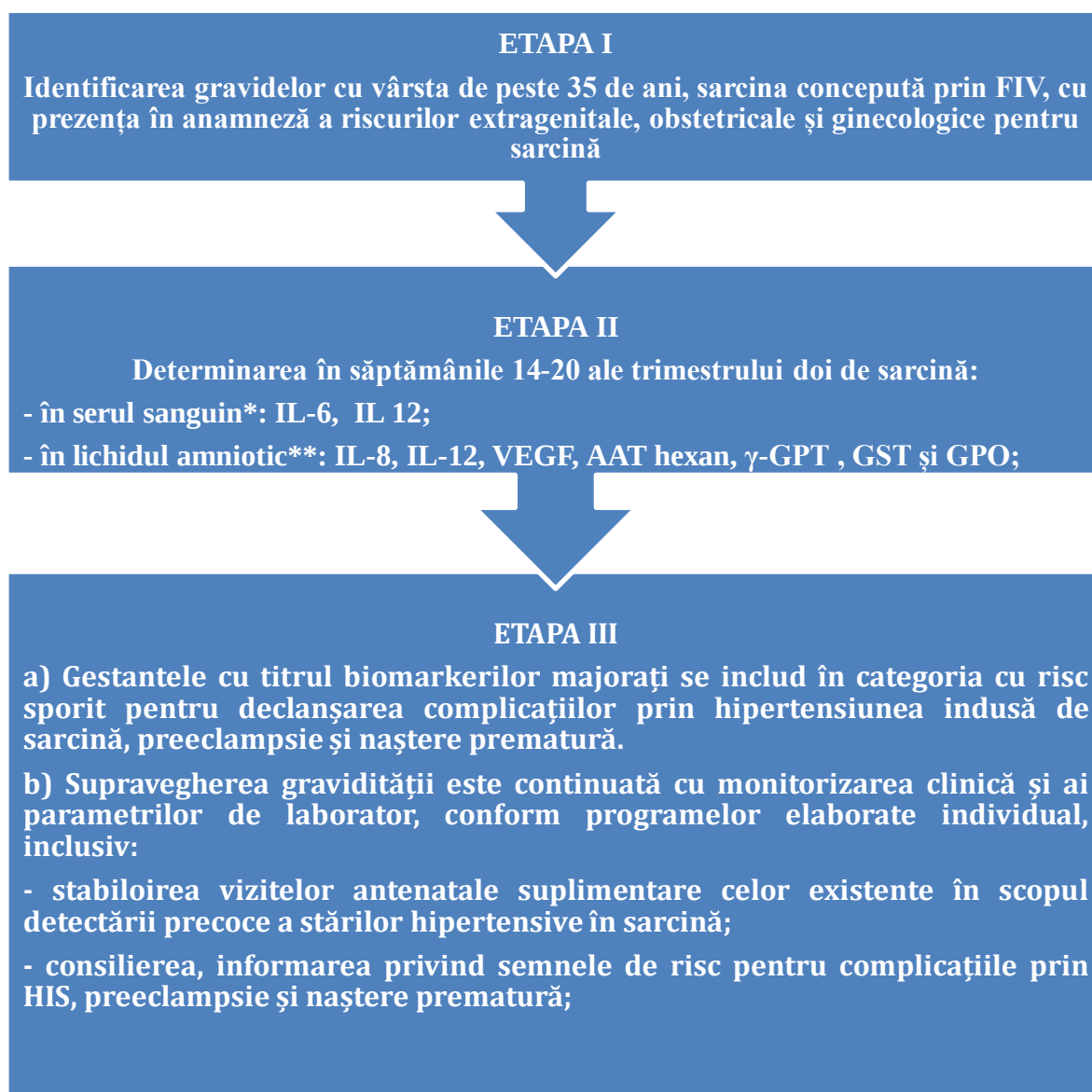
Notă: lotul 1 a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante

Tabelul 6. Baza de date a parametrilor Factorului de creștere endotelial vascular (VEGF) determinat în serul sangvin și lichidul amniotic (pg/ml) la gestantele incluse în studiu

Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV		Nr gestantei in lot	lotul II, sarcina conceputa natural		lotul I, sarcina conceputa FIV	
	ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic		ser sangvin	lichid amniotic	ser sangvin	lichid amniotic
1	313	790	319	1151	57	368	1215	341	1432
2	476	1043	321	874	58	432	926	248	1041
3	524	763	283	1379	59	297	876	384	1347
4	1480	827	359	1052	60	510	870	377	2561
5	334	1122	329	1439	61	297	876	365	954
6	312	1073	250	30	62	349	1127	284	1382
7	371	948	305	992	63	1480	827	269	1245
8	484	1344	465	1382	64	510	870	297	1296
9	263	1409	256	903	65	380	1058	356	1280
10	343	1150	845	1318	66	510	870	459	870
11	510	870	281	1733	67	380	1058	366	1106
12	380	1058	284	1384	68	395	869	599	1149
13	676	2104	367	1456	69	1480	827	260	1355
14	313	790	289	1503	70	263	1247	274	1030
15	476	1043	294	1394	71	329	956	748	1010
16	380	1058	279	3873	72	510	870	230	1248
17	258	940	371	1160	73	380	1058	264	1439
18	341	980	523	1076	74	395	869	268	946
19	281	1248	360	949	75	510	870	354	1241
20	588	724	346	1262	76	297	876	263	1031
21	459	1093	350	896	77	349	1127	230	1069
22	384	1264	305	1238	78	1480	827	439	4234
23	482	920	465	1382	79	263	1247	235	1258
24	268	849	507	1177	80	1527	276	455	903
25	312	864	300	1131	81	552	510	383	825
26	394	1035	346	1238	82	667	428	616	758
27	367	1264	339	2400	83	314	1336	247	910
28	388	981	410	2942	84	380	1058	378	4322
29	384	1235	378	1264	85	274	2345	263	1247
30	371	948	395	1145	86	276	3207	329	956
31	168	964	586	982	87	510	870	275	1610
32	235	1256	545	1261	88	428	1177	345	1852
33	510	870	341	974	89	380	1058	297	876
34	380	1058	256	944	90	258	940	510	870
35	510	870	345	962	91	341	980	297	876
36	380	1058	290	1115	92	281	1248	297	876
37	395	869	507	1177	93	588	724	510	870
38	510	870	300	1131	94	518	1241	297	876
39	297	876	378	1234	95	341	974	349	1127
40	349	1127	381	1376	96	381	1376	1480	827
41	1480	827	281	1733	97	459	1093	368	1215
42	263	1247	256	903	98	384	1264	367	1264
43	329	956	329	1439	99	482	920	484	1344
44	345	1852	358	1489	100	268	849	263	1409
45	269	1123	414	1397	101	312	864	343	1150
46	278	915	317	1017	102	394	1035	510	870
47	368	1215	191	2395	103	395	869	380	1058
48	432	926	374	1457	104	276	3207	676	2104
49	297	876	484	1344	105	291	1446	313	790
50	510	870	263	1409	106	368	1215	476	1043
51	297	876	383	1142	107	432	926	524	763
52	349	1127	286	950	108	349	1127	343	1150
53	1480	827	500	1248	109	1480	827	1480	827
54	368	1215	585	1939	110	269	1123	334	1122
55	276	3207	377	2561	111	278	915	312	1073
56	291	1446	273	1291					

Notă: lotul I a inclus - 111 gestante, lotul II – a inclus -111 gestante

Anexa 4. Algoritmul de triaj al gestantelor cu vârsta de peste 35 de ani, sarcină concepută prin metoda FIV, pentru riscul complicațiilor prin HIS, preeclampsie și naștere prematură



Notă:

*Markerii determinați din sângele matern:

IL-6 Interleukina 6;
IL-12 Interleukina 12;

**Markerii determinați din lichidul amniotic:

IL-8 Interleukina 8;
IL-12 Interleukina 12;
VEGF Factor vascular de creștere;
AAT hexan Activitate antioxidantă totală;
γ-GPT Gama-glutamyltranspeptidaza;
GST Glutathion S-transferaza;
GPO Glutathion peroxidaza;





MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL
REPUBLICII MOLDOVA

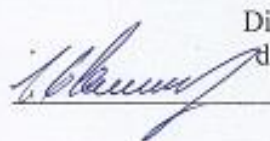
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
INSTITUTUL
MAMEI ȘI COPILULUI
(IMSP IMȘIC)
str. Burebista, 93
MD-2062, mun. Chișinău
Tel. + 373 22 52-36-61;
www.mama-copilul.md e-mail: mamsicop@gmail.com



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ИНСТИТУТ МАТЕРИ И РЕБЕНКА
(ПМСУ ИМнР)
ул. Буребиста, 93
MD-2062, мун/г Кишинев
Tel. + 373 22 52-36-61;
www.mama-copilul.md e-mail:
mamsicop@gmail.com

APROB

Director IMSP IMȘIC
dr.șt. med., conf.univ.
 **Sergiu GLADUN**

" 09 " Iunie 2023

ACT DE IMPLEMENTARE nr. 522

1. Denumirea ofertei pentru implementare: „APLICAREA MODELELOR PREDICTIVE ÎN EVOLUȚIA SARCINEI OBTINUTE PRIN METODA FERTILIZĂRII ÎN VITRO LA FEMEI PESTE 35 DE ANI ÎN BAZA CITOKINELOR ȘI STRESULUI OXIDATIV ÎN PERIOADA TRIMESTRULUI II DE GESTAȚIE”
2. Autori: DOBROVOLSKAIA Aliona, medic, doctoranda, MOȘIN Veaceslav dr.hab.șt.med., prof.univ., TODIRAȘ Mihail dr.hab.șt.med., conf.univ.
3. Numărul inovației: *Nr. 522 din 09 Iunie 2023.*
4. Unde și când a fost implementată: rezultatele studiului au fost implimentate la Departamentul Pediatrie IP USMF "Nicolae Testemițanu" și în IMSP Institutul Mamei și Copilului, în perioada 2017-2023 aa.
5. Eficacitatea implementării: Rezultatele contribuie la perfecționarea securității sarcinii având în dispoziție metoda monitorizării și evaluării markerilor predictivi ai citochinelor determinați din sânge și lichidul amniotic la femeile în vârstă după 35 ani și corelarea lor cu parametrii diagnostici antenatali în vigoare pentru complicațiile cu impact major asupra evoluției sarcinii în siguranță cum ar fi hipertensiunea și edemele induse de sarcină.
6. Rezultatul implementării: Metoda propusă în inovația dată a fost aplicată pe 222 femei însărcinate cu vârsta cuprinsă între 35 - 50 ani și sarcina gestațională de 15-19 săptămâni. Rezultatele folosirii metodei oferă posibilitate nouă de supraveghere mai largă a evoluției sarcinii cu corelarea datelor clinice, anamnestic, diagnostic prevăzute de screening inclusiv evaluarea markerilor imuni determinați de stresul oxidativ fiind pronostice anticipate apariției clinice și declanșări unor procese fiziologice greu reversibile..

Secretar științific
dr. șt. med., conf.univ.

Tatiana CARAUȘ

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 1 / 1
APROB Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al ASM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2023 ACTUL nr.109 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic și/științifico-didactic) Denumirea ofertei pentru implementare: „APLICAREA MODELELOR PREDICTIVE ÎN EVOLUȚIA SARCINII OBTINUTE PRIN METODA FERTILIZĂRII IN VITRO LA FEMEI PESTE 35 DE ANI ÎN BAZA CITOKINELOR ȘI STRESULUI OXIDATIV ÎN PERIOADA TRIMESTRULUI II DE GESTAȚIE” Autori: DOBROVOLSKAIA Aliona, medic, asistent universitar, doctoranda, MOȘIN Veaceslav dr.hab.șt.med., prof.univ., TODIRAȘ Mihail dr.hab.șt.med., conf.univ. Numărul inovației: Nr. 6079 din 09 Iunie 2023 Unde și când a fost implementată: rezultatele studiului au fost implimentate la Departamentul Pediatrie IP USMF „Nicolae Testemițanu” și IMSP Institutul Mamei și Copilului, în perioada 2017-2023 aa. Eficacitatea implementării: Rezultatele contribuie la perfecționarea securității sarcinii având în dispoziție metoda monitorizării și evaluării markerilor predictivi ai citokinelor determinați din sânge și lichidul amniotic la femeile în vîrsta peste 35 ani și corelarea lor cu parametrii diagnostici antenatali în vigilența pentru complicațiile cu impact major asupra evoluției sarcinii în siguranță cum ar fi hipertensiunea și edemele induse de sarcină. Rezultatul implementării: Metoda propusă în inovația dată a fost aplicată pe 222 femei însărcinate cu vârsta cuprinsă între 35 - 50 ani și sarcina gestațională de 15-19 săptămâni. Rezultatele folosirii metodei oferă posibilitate nouă de supraveghere mai largă a evoluției sarcinii cu corelarea datelor clinice, anamnestic, diagnostic prevăzute de screening inclusiv evaluarea markerilor imuni determinați de stresul oxidativ fiind pronostice anticipate apariției clinice și declanșări unor procese fiziologice greu reversibile. <i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i> Șef Departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. Șef Departament Didactic și Management Academic dr. șt. med., conf. univ. Director IMSP Institutul Mamei și Copilului dr. șt. med., conf. univ. Elena RAEVSCHI Silvia STRATULAT Sergiu GLADUN Pagina 6 din 7		

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
AL
REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
INSTITUTUL
MAMEI ȘI COPILULUI
(IMSP IMȘIC)
str. Burebista, 93
MD-2062, mun. Chișinău
Tel. + 373 22 52-36-61;
www.mama-copilul.md e-mail: mamsicop@gmail.com



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ИНСТИТУТ МАТЕРИ И РЕБЕНКА
(ПМСУ ИМР)
ул. Буребиста, 93
MD-2062, мун/г Кишинэу
Tel. + 373 22 52-36-61;
www.mama-copilul.md e-mail:
mamsicop@gmail.com

APROB

Director IMSP IMȘIC
dr. șt. med., conf. univ.
Sergiu GLADUN

" 09 " Iunie 2023

ACT DE IMPLEMENTARE nr. 523

1. Denumirea ofertei pentru implementare: „INCLUDEREA MARKERILOR ANTIOXIDANȚI AI STRESULUI OXIDATIV ÎN ALGORITMUL PREVENIRII NAȘTERII PREMATURE ÎN SARCINĂ LA FEMEI PESTE 35 DE ANI”
2. Autori: DOBROVOLSKAIA Aliona, medic, doctoranda, MOȘIN Veaceslav dr. hab. șt. med., prof. univ., TODIRĂȘ Mihail dr. hab. șt. med., conf. univ.
3. Numărul inovației: Nr. 523 din 09 Iunie 2023.
4. Unde și când a fost implementată: rezultatele studiului au fost implementate la Departamentul Pediatrie IP USMF "Nicolae Testemițanu" și în IMSP Institutul Mamei și Copilului, în perioada 2017-2023 aa.
5. Eficacitatea implementării: În serul gestantelor cu vârsta peste 35 de ani, prelevat în trimestrul II de sarcină distribuția peptidei histidinice carnozina $\mu\text{M/l}$ este aceeași între categoriile de FIV (semnificația statistică $p=0,015$). Distribuția peptide histidinice carnozina $\mu\text{M/l}$ determinată în lichidul amniotic, este aceeași între categoriile de grupe care au obținut sarcina prin metoda fertilizării in vitro și grupa gestantelor cu sarcina obținută desinestător. (Semnificația statistică $p<0,0001$). Rolul fiziologic al carnozinei prezintă interes statistic. Structural fiind formată din aminoacizi ([beta]-alanil și L-histidină) și împreună cu analogii lor metilați (anserina și balenina) fac parte din clasa dipeptidelor care conțin histidină (HCD, histidine-containing dipeptides).
6. Rezultatul implementării: Metoda propusă în inovația dată a fost aplicată pe 222 femei însărcinate cu vârsta cuprinsă între 35 - 50 ani și sarcina gestațională de 15-19 săptămâni. Rezultatele folosirii metodei oferă posibilitate nouă de supraveghere mai largă a evoluției sarcinii cu corelarea datelor clinice, anamnestic, diagnostic prevăzute de screening inclusiv evaluarea markerilor imuni determinați de stresul oxidativ fiind pronostice anticipate apariției clinice și declanșări unor procese fiziologice greu reversibile.

Secretar științific
dr. șt. med., conf. univ.

Tatiana CARAUȘ

	INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate	Pag. 1 / 1
APROB Precursor pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al ASM, prof. univ., dr. hab. șt. med. Stanislav GROPPA 2023 ACTUL nr.110 DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI (în procesul științifico-practic și științifico-didactic) Denumirea ofertei pentru implementare: „INCLUDEREA MARKERILOR ANTIOXIDANȚI AI STRESULUI OXIDATIV ÎN ALGORITMUL PREVENIRII NAȘTERII PREMATURE ÎN SARCINĂ LA FEMEI PESTE 35 DE ANI” Autori: DOBROVOLSKAIA Aliona, medic, doctoranda, MOȘIN Veaceslav dr.hab.șt.med., prof.univ., TODIRAȘ Mihail dr.hab.șt.med., conf.univ. Numărul inovației: Nr. 6080 din 09 Iunie 2023 Unde și când a fost implementată: rezultatele studiului au fost implimentate la Departamentul Pediatrie IP USMF „Nicolae Testemițanu” și IMSP Institutul Mamei și Copilului, în perioada 2012-2014 aa. Eficacitatea implementării: În serul gestantelor cu vârsta peste 35 de ani, prelevat în trimestrul II de sarcină distribuția peptidei histidinice carnozina $\mu\text{M/l}$ este aceeași între categoriile de FIV (semnificația statistică $p=0,015$). Distribuția peptide histidinice carnozina $\mu\text{M/l}$ determinată în lichidul amniotic, este aceeași între categoriile de grupe care au obținut sarcina prin metoda fertilizării in vitro și grupa gestantelor cu sarcina obținută desinestător. (Semnificația statistică $p<0,0001$). Rolul fiziologic al carnozinei prezintă interes statistic. Structural fiind formată din aminoacizi ([beta]-alanil și L-histidină) și împreună cu analogii lor metilați (anserina și balenina) fac parte din clasa dipeptidelor care conțin histidină (HCD, histidine-containing dipeptides). Rezultatul implementării: Metoda propusă în inovația dată a fost aplicată pe 222 femei însărcinate cu vârsta cuprinsă între 35 - 50 ani și sarcina gestațională de 15-19 săptămâni. Rezultatele folosirii metodei oferă posibilitate nouă de supraveghere mai largă a evoluției sarcinii cu corelarea datelor clinice, anamnestice, diganostice prevăzute de screening inclusiv evaluarea markerilor imuni determinați de stresul oxidativ fiind pronostice anticipate apariției clinice și declanșări unor procese fiziologice greu reversibile. Prezența inovație este implementată conform descrierii în cerere.		
Șef departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ. _____ Elena RAEVSCHI Șef Departament Didactic și Management Academic conf. univ., dr. șt. med. _____ Silvia STRATULAT Director IMSP Institutul Mamei și Copilului dr. șt. med., conf. univ. _____ Sergiu GLADUN		
<i>Silvia</i>		

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Dobrovolskaia Aliona

Semnătura:



Data:

CV-ul AUTORULUI

Europass Curriculum Vitae	
Informația Personală Nume/ Prenume	DOBROVOLSKAIA Aliona
Adresa	Republica Moldova, Constantin Vârnăv 8, Chișinău 2024
Telefon	+373 69587738
E-mail	aliona.dobrovolskaia@usmf.md
Naționalitatea	MDA
Data nașterii	05.03.1983
Gender	feminin
Data	2014 - curent Asistent Universitar Catedra Fiziologia omului și Biofizică USMF „Nicolae Testemițanu” bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, mun. Chișinău, MD-2004
Ocupații/Serviciu	Activitate didactică învățământ universitar superior
Adresa	2019 - curent Medic obstetrician-ginecolog, categoria superioară Spitalul Polivalent Novamed str. Tudor Strișca 30
Activități și responsabilități	Asistență medicală specializată de ambulator și spitalicească în domeniu obstetrică și ginecologie
	2009 -2018 Medic obstetrician-ginecolog Secția genetica medicală IMSP IMC Centrul Sanatatea Reproductiei și Genetica umană Sănătatea Reproductiei, Chișinău, str. Burebista 83 Asistență medicală specializată de ambulator în domeniu obstetrică și ginecologie și genetică umană
	2005-2007 Consultant în Departamentul Planificării Familiei, Centrul Național de Management în Sănătate Str. A. Cosmescu, 3 Activități de cercetare și elaborarea politicilor în domeniul planificării familiei

INSTRUIREA	Specializarea în psihopedagogie. Învățământ superior 2022-2023 Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu" Doctorandă, specializare obstetrică-ginecologie formă de învățământ la zi, studii postuniversitare
Tipul calificării obținute	2009-2012
Data	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu" Licența de medic, specializare obstetrician-ginecolog
Principale subiecte/calificarea ocupatională	2005-2009 Medic rezident Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu"
Denumirea și tipul organizației de instruire	Calificarea de medic 1999-2005 Studentă, facultatea de Medicină generală Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu" Master în management 2006-2008 Doctrină politice; Etice politice; Sociologia politică. Academia de Administrare Publică pe lângă Președintele Republicii Moldova, str. Ialoveni, 100
INSTRUIREA CONTINUĂ	
Data	18/05/2022 Specializare în ecografia obstetrică și ginecologie 29/11/2016 Curs primar de ecografie în obstetrică și ginecologie
Tipul calificării	10/09/2014 Colposcopia. Diagnosticul precoce a leziunilor organelor genitale 21/10/2013 Ginecologia endocrinologică 18/05/2016 Psihopedagogia. Învățământul superior 15/01/2018 Patologia extragenitală și sarcina 14/01/2013 Cuplul steril 17/06/2021 Certificate of english language level nr. LS 843/21 B2

CERTIFICATE	1999-2005 ATTESTATION of Medical degree MD par l'Agence universitaire de la Francophonie "Un cursus francophones de Medicine dans le cadre des filieres universitaires du systeme educatif de la Republique de Moldova soutenu par l'Agence universitaire de la Francophonie" Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemitanu", 14/10/2011 Certificate of participation at the prenatal medicine 4th conference Practical guidelines on prenatal medicine management Health Ministry from Republic of Moldova Association of Perinatal Medicine Association of obstetricians and gynecologists
Data	12.11.2011
Tipul calificării obținute	Certificate International Workshop on Prenatal Screening, Budapest, Hungary
Principale subiecte/calificarea ocupațională	International consensus and practical guidelines on the gynecologic and obstetric management of female patients with hereditary aberrations EACCME European Accreditation Council for Continuing Medical Education B·R·A·H·M·S Forum
Denumirea și tipul organizației de instruire	03.03.2011 Certificate in TEACH VIP workshop on alcohol and injury prevention The role of strategy in alcohol and injury prevention WHO European Centre for Environment and Health, Rome
	24.09-24.10.2010 Certificate of participation in training seminar on the topic "Actualities in reproductive gynecology" principles of strategic-clinical reproductive gynecology Reproductive Health Association
	6-11.06.2010 Certificate of Completion the Advanced Trainers Workshop for the National Reproductive Health Trainers in the Republic of Moldova principles of strategically activities in National Reproductive Health Ministry of Health of Moldova UNFPA
	22.09.2009 Training of Trainers Programme ENPI Management-Republic of Moldova GTZ Îmbunătățirea expertizei și competenței agențiilor guvernamentale responsabile, precum și a organizațiilor societăților civile de a pregăti și implementa programe finanțate de UE. Institut für europäische politik
	2009 Certificate in Communications in Crises situations Taxa, Mișcări strategice politice. Ministerul Sănătății, mun Chișinău, Republica Moldova

	2008 Certificat pentru Curs de Formare în domeniul Sănătății Strategia internațională în domeniul sănătății Centrul Național de Cercetare în cadrul cooperării internaționale dintre Centrul Național de Cercetare și Ministerul Afacerilor Externe (Fondul Egiptean de Cooperare Tehnică
	2008 Certificate inter-agency training programme on Building Effective Youth Investment Programs: Issues for Project Design, Turin(Italy) Training programme on Building Effective Youth Investment Programs World Bank, WHO, the Council of Europe and GTZ
	2002 Certificates of attendance in actively participated and contributed to the success of the International Congress of Medical Sciences held on 9-12 May 2002 at the Medical University in Sofia, Bulgaria. Medical Sciences Asociația studenților la medicină din Bulgaria Universitatea de Medicină din Bulgaria „Consiliul Elevilor”
	2001 (3 luni) Ramura Francofonă Știința medicală Universitatea Medicală din Bulgaria
Limba maternă	RO
Alte limbi	ENG, RU, FR Vorbit scris și comunicativ
Competențe și abilități sociale	• Comunicare și informare de sinteză : dezvoltată inițial în timpul voluntariatului în universitate liceu și în contextul activității profesionale • Spirit de echipă : dezvoltat în timpul participării la mai multe mese rotunde și forumuri în universitate și în contextul activității profesionale; • Adaptabilitate la contexte multiculturale și generații: dezvoltat în contextul activității profesionale în calitate de participantă la numeroase traininguri internaționale; • Abordare empatică, pozitivă: dezvoltată în principal din cauza mai multor școli din timpul formării inițiale; • Abordare integrată a egalității de șanse: în special cele specifice egalității între femei și bărbați și a grupurilor dezavantajate , dezvoltate în timpul doctoranturii de masterat în management public.
Competențe și aptitudini organizatorice	• Percepția anticipare și previziune: dezvoltată prin studiu individual • Scrierea și elaborarea de proiecte • Stabilirea, coordonarea și monitorizarea echipelor de lucru • Analiza și evaluarea Strategiei de Management
Aptitudini și competențe informatice	Windows; Microsoft Office (Word, Excel, Power Point, Publisher)
Permis de conducere	B