I.O.S.U.D. – Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad

ȘCOALA DOCTORALĂ MULTIDISCIPLINARĂ

UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ"
din ARAD

Arad ,2025

REZUMAT
TEZA DE DOCTORAT

EVALUAREA TISULARĂ A STRESULUI OXIDATIV ÎN SARCINA NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ.

Doctorand: **IOANA-MARIA CIORAN-SGAVERDEA(VORNIC)**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Habil. CRISTIAN GEORGE FURĂU**

UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ"
din ARAD

PhD THESIS SUMMARY

TISSUE ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL PREGNANCY.

PhD Student: **IOANA-MARIA CIORAN-SGAVERDEA(VORNIC)**

Scientific supervisor: **Prof. Univ. Dr. Habil. CRISTIAN GEORGE FURĂU**

UNIVERSITATEA DE VEST
"VASILE GOLDIȘ"
din ARAD

Dedicație:

,,Pentru toți cei care cred în puterea educației și a cercetării”

Mulțumiri:

Aș dori să îmi exprim recunoștința profundă față de familia mea, care a fost un pilon esențial în această călătorie. Sprijinul vostru necondiționat, încurajările și răbdarea voastră au fost fundamentale pentru finalizarea acestei teze.

În această etapă importantă a carierei mele academice, doresc să îmi exprim recunoștința profundă față de coordonatorul meu de doctorat Prof. Univ. Dr. Habil Furău Cristian. Ați fost nu doar un mentor, ci și o sursă constantă de inspirație și sprijin pe parcursul întregului proces de cercetare. Apreciez foarte mult îndrumările și feedbackul constructiv, care au contribuit semnificativ la dezvoltarea acestei lucrări.

Aş dori să îmi exprim recunoştinţa faţă de Conf. Univ. Dr. Furău Gheorghe pentru sprijinul şi îndrumarea oferite,viziunea şi încrederea dumneavoastră în abilităţile mele au fost esenţiale pentru a depăşi provocările întâmpinate. Atmosfera de susţinere şi încurajare pe care aţi creat-o în secţie a fost un factor motivant pentru mine.

Mulţumesc tuturor pacientelor care au participat la acest studiu. Fără deschiderea, curajul şi contribuţia voastră, această cercetare nu ar fi fost posibilă. Vă mulţumesc pentru că aţi împărtăşit experienţele şi perspectivele voastre, care au adus o valoare inestimabilă acestei lucrări. Fiecare poveste şi fiecare contribuţie au avut un impact semnificativ asupra rezultatelor şi concluziilor acestui studiu. Apreciez profund timpul şi efortul pe care le-aţi dedicat, demonstrând astfel angajamentul vostru faţă de avansarea cunoştinţelor în domeniul nostru. Voi sunteţi adevăratele eroine ale acestui proiect!

Vă mulţumesc vouă, colegii mei din cadrul Secţiei Obstetrică-Ginecologie pentru sprijinul şi colaborarea de-a lungul acestei perioade. Mulţumesc pentru ideile valoroase, discuţiile inspirate şi camaraderia care m-au motivat să îmi depăşesc limitele. Împreună, am reuşit să creăm un spaţiu în care învăţarea şi inovaţia sunt la ordinea zilei.

Doresc să îmi exprim profunda recunoştinţă faţă de Universitatea de Vest „Vasile Goldiş„ din Arad pentru oportunităţile şi sprijinul oferit pe parcursul studiilor mele doctorale. Instituţia dumneavoastră a fost un cadru ideal pentru dezvoltarea mea academică şi personală. De asemenea, apreciez foarte mult resursele şi facilităţile pe care le-am avut la dispoziţie, care au fost esenţiale în realizarea acestei teze. Mă simt privilegiată că am fost parte a unei comunităţi academice atât de dedicate şi inovatoare.

Vă mulţumesc încă o dată pentru tot sprijinul acordat pe parcursul acestei călătorii!

CUPRINS

Introducere 12

A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Aspecte anatomo-fiziologice și histologice ale placentei 13

1.1. Structura vilozităților coriale 13

1.2. Dezvoltarea vilozităților coriale 13

1.3. Structura placentei 14

1.4. Dezoltarea placentei 14

1.5. Funcțiile placentei 15

2. Mecanismele stresului oxidativ si implicarea meterno-fetală 16

2.1. Stresul oxidativ 16

2.1.1 Speciile reactive de oxigen 16

2.1.2. Rolurile fiziologice ale radicalilor liberi 17

2.2. Antioxidanții și mecanismele de apărare antioxidante 17

2.3. Conceptul de echilibru pro-oxidant-antioxidant 18

2.4. Rolul stresului oxidativ în relația materno-fetală 19

2.4.1.Stresul oxidativ și remodelarea placentară 19

B. CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

1. Scopul și obiectivele studiului 20

2. Material și Metodă 21

2.1. Prelucrarea histologică a biopsiilor 21

2.2. Tehnica Imunohistochimică 25

2.3. Analiza statistic 27

3. Rezultate 28

3.1.Implicarea mecanismelor apoptotice în avortul spontan 28

3.2. Implicarea stresului oxidativ în avortul spontan 32

3.3. Corelații între stresul oxidativ și apoptoză în avortul spontan 34

4. Discuții 40

5. Limitările studiului 42

6. Concluzii 42

Bibliografie 48

Listă de abrevieri

ADN - Acid dezoxiribonucleic

ATP - Adenozintrifosfatul

Bcl2- Proteina anti-apoptotică

CAT- Catalaza

DAB- 3,3 diaminobenzidina

GLUT- Glutation

GPX- Glutation peroxidaza

GSH- Glutation redus

HCG- Gonadotropina corionică umană

HPL- Lactogenul placentar uman

IHC- Imunohistochimie

IMC- Indice masă corporal

IUGR- Restricție de creștere intrauterină

MDA- Malondialdehida

MTH1- Mut T Homolog

P53- Proteină pro-apoptotică

RE- Reticul endoplasmatic

RPL- Pierderea recurentă a sarcinii

SD- Abatere standard

SOD- Superoxid dismutaza

SOR- Specii rective de oxigen

UPR- Răspuns proteic desfășurat

UV –Ultraviolete

8-OhdG-8-oxo-2-deoxiguanozi

INTRODUCERE

Stresul oxidativ apare atunci când există un dezechilibru între producţia de factori oxidativi şi capacitatea organismului de a-i neutraliza. Acest dezechilibru, exemplificat prin excesul de radicali hidroxil şi peroxinitrit, poate duce la peroxidarea lipidelor, deteriorând astfel membranele celulare şi lipoproteinele. Conceptul de echilibru sugerează că organismul răspunde treptat la stresul oxidativ, cu tulburări minore fiind compensate prin ajustări homeostatice, în timp ce tulburările majore pot provoca leziuni ireparabile şi moarte celulară.

Glutationul este un antioxidant esenţial în organismul uman, protejând celulele de stresul oxidativ. Acesta contribuie la menţinerea sănătăţii sistemului imunitar şi a sănătăţii placentare, protejând fătul de toxine şi substanţe nocive. Deşi legătura dintre glutation şi sarcină nu este pe deplin înţeleasă, nivelurile scăzute ale MTH1 (un alt factor antioxidant) în timpul sarcinii au fost asociate cu riscuri crescute de afecţiuni precum preeclampsia şi naşterea prematură. MTH1 ar putea proteja celulele fetale împotriva stresului oxidativ cauzat de factorii de mediu şi alimentari.

Studiul apoptozei, procesul de moarte celulară programată, este crucial pentru înţelegerea mecanismelor avortului spontan şi pentru dezvoltarea tratamentelor şi prevenţiei. Proteinele p53 şi Bcl-2 sunt implicate în reglarea morţii celulare: p53 promovează oprirea ciclului celular şi apoptoza ca răspuns la deteriorarea ADN-ului, în timp ce Bcl-2, prin inhibarea eliberării citocromului c din mitocondrii, previne moartea celulară.

Scopul principal al studiului este de a analiza asocierea dintre factorii de protecţie antioxidantă (glutation şi MTH1) şi factorii apoptotici (p53 şi Bcl-2) în contextul avortului spontan. S-au emis mai multe ipoteze de cercetare pentru a evalua relevanţa statistică a acestor factori în apariţia avortului spontan.

A. STUDIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. ASPECTE ANATOMO-FIZILOGICE SI HISTOLOGICE ALE PLACENTEI

Placenta este organul sarcinii, înalt specializat, care susține creșterea și dezvoltarea normală a fătului. Creșterea și funcționarea placentei sunt controlate și coordonate cu precizie astfel incat schimbul, între sistemul circulator al mamei și cel al fătului, al substantelor nutritive și al produșilor de metabolism care trebuie eliminate, să aibă eficiență maximă.

1.1 Structura vilozitaților coriale

Sunt descrise structura vilozităților coriale, principalele unități funcționale ale placentei, care sunt responsabile pentru separarea sângelui fetal de cel matern prin membrana placentară, alcătuită din 3-4 straturi celulare . În funcție de stadiul de dezvoltare și caracteristicile histologice, vilozitățile coriale sunt clasificate în cinci tipuri: vilozități stem, intermediare imature, intermediare mature, terminale și mezenchimale .

Vilozitățile stem susțin structura vilozitară și au un rol redus în schimbul materno-fetal . Vilozitățile intermediare imature, precursoare ale celor terminale, facilitează schimbul materno-fetal în primele două trimestre . Vilozitățile intermediare mature contribuie la formarea vilozităților terminale, esențiale pentru schimbul de substanțe între mamă și făt . Vilozitățile terminale, considerate unitatea funcțională a placentei, sunt locul principal al schimbului de nutrienți și gaze . Vilozitățile mezenchimale, prezente în stadiile incipiente ale sarcinii, au un rol primordial în proliferarea vilozitară și activitățile endocrine.

1.2. Devoltarea vilozităților coriale

Capitolul descrie dezvoltarea vilozităților coriale, care începe cu vilozitățile mezenchimale, prezente până la aproximativ 5 săptămâni după concepție. Ulterior, celulele mezenchimale invadează aceste vilozități, formând vilozitățile secundare și vasele de sânge placentare . În timpul sarcinii, mugurii viloși evoluează în vilozități intermediare și apoi în vilozități terminale, proces esențial pentru angiogeneza fetală și dezvoltarea fluxului sanguin feto-placentar, care începe la 6-8 săptămâni după concepție .

La 10 săptămâni, placenta cântărește aproximativ 20 de grame, iar la 20 de săptămâni greutatea ajunge la 150-170 de grame. O placentă la termen cântărește între 500-600 de grame și conține 15-28 de cotiledoane, fiecare cotiledon având o vilozitate stem care se ramifică în vilozități intermediare și terminale, conferind astfel stabilitate structurală placentei .

După implantare, celulele trofoblastice se diferențiază în două linii: viloasă și extraviloasă. Celulele trofoblastice viloase formează sinciţiotrofoblastul, stratul exterior al vilozităţilor corionice, în timp ce celulele extraviloase migrează prin deciduă și remodelează arterele spiralate, facilitând fluxul sanguin către placentă .

1.3 Structura placentei

Textul descrie structura placentei, care este compusă din două părţi principale: placa corionică, situată pe partea fetală, și placa bazală, aflată pe partea maternă. Aceste două părţi sunt separate de spațiul intervilos . Placa corionică conține țesut conjunctiv gros și include amniosul, vilozitățile corionice principale, precum și arterele și venele corionice, care sunt ramificaţii ale arterelor și venelor ombilicale. Aceste vase se ramifică în arteriolele și venulele vilozităţilor stem principale, care se extind în spațiul intervilozitar și se conectează la placa bazală prin vilozitățile de ancorare.

Placa bazală este alcătuită din decidua basalis și conține celule trofoblastice și deciduale. În al treilea trimestru de sarcină, se formează stratul Nitabuch, care este zona specifică de desprindere a placentei de uter la naștere . De la nivelul plăcii bazale pornesc septurile placentare, care se extind în spațiul intervilos și formează un sistem canalicular ce delimitează între 10 și 40 de cotiledoane, unităţi structurale ale placentei . Schimburile dintre circulația maternă și cea fetală au loc la nivelul vilozităţilor stem principale și al vaselor endometriale materne în spațiul intervilos.

1.4 Dezvoltarea placentei

Dezvoltarea placentei începe la momentul implantării (7-12 zile post-ovulație), când blastocitul, compus din embrioblast și trofoblast, se implantează în endometru, un proces esențial pentru sarcină. Trofoblastul, care va da naștere placentei, trece prin trei etape în implantare: apoziția, adeziunea și invazia . Orice disfuncție în aceste etape poate duce la anomalii placentare și complicaţii materno-fetale . În apoziție și adeziune,

blastocitul intră în contact cu endometrul, iar celulele stromale suferă decidualizare, transformându-se în celule secretoare specializate.

Invazia trofoblastică implică diferențierea celulelor trofoblastice în trofoblaşti extraviloşi care invadează vasele de sânge materne, remodelându-le pentru a facilita fluxul sanguin către placentă .

Un flux sanguin optim este esențial pentru dezvoltarea embrionară şi placentară, majoritatea embrionilor migrând către fundul uterin, unde fluxul sanguin este mai ridicat.

Factorii care pot cauza tulburări de inserare placentară includ hipertrofia placentară, asociată cu hipoxia la gravidele fumătoare sau în sarcinile multiple, şi peristaltismul uterin anormal, frecvent în sarcinile obținute prin reproducere asistată . Cicatricea de cezariană poate de asemenea influența negativ implantarea, ducând la placenta praevia, deoarece hipoxia la nivelul cicatricii stimulează invazia trofoblastică .

Invazia trofoblastică controlată depinde de echilibrul între celulele NK uterine şi trofoblaştii extraviloşi, care reglează remodelarea vasculară şi toleranța imună, esențiale pentru o placentare sănătoasă . Arterele uterine şi cele ombilicale asigură circulația între mamă şi făt, transferând nutrienții şi oxigenul către făt prin intermediul vilozităților corionice şi al spațiului intervilos .

1.5. Funcțiile placentei

Textul detaliază funcțiile placentei, începând cu schimbul de gaze, unde placenta este responsabilă pentru transferul de oxigen şi dioxid de carbon între mamă şi făt prin difuziune pasivă, proces influențat de efectul Bohr şi efectul Haldane . Transferul metabolic implică glucoza, aminoacizii, acizii graşi, electroliții, vitaminele şi apa, transferate de la mamă la făt prin diverse mecanisme, inclusiv difuziune simplă şi transport activ, esențiale pentru dezvoltarea fetală . Funcția endocrină a placentei include producerea hormonilor precum HCG, HPL, estrogen şi progesteron, care joacă roluri cruciale în menținerea sarcinii şi dezvoltarea fătului . Funcția imunologică se referă la transferul de anticorpi IgG de la mamă la făt, oferind imunitate pasivă, dar şi riscul transferului de anticorpi care pot cauza boli autoimune la făt .

Transferul placentar al medicamentelor este un alt aspect crucial, majoritatea medicamentelor traversând placenta, ceea ce poate fi benefic sau nociv, în funcție de efectele asupra fătului. Există trei tipuri de transfer transplacentar: complet, excedentar şi incomplet, fiecare având caracteristici specifice în ceea ce priveşte concentrațiile

medicamentului în sângele matern şi fetal. Mecanismele de transfer includ difuziunea simplă, difuziunea facilitată, transportul activ şi pinocitoza, toate influenţate de factori fizici şi farmacologici .

2. MECANISMELE STERSULUI OXIDATIV SI IMPLICAREA MATERNO-FETALA

2.1. Stresul oxidativ

Stresul oxidativ reprezintă un dezechilibru între producţia de radicali liberi şi capacitatea organismului de a detoxifica şi elimina aceşti produşi. Speciile reactive de oxigen, care sunt produse secundare ale metabolismului oxigenului, au roluri fiziologice, inclusiv ca molecule semnal. Totuşi, în prezenţa factorilor de stres din mediul înconjurător, precum radiaţiile UV, radiaţiile ionizante, substanţele poluante, metalele grele şi xenobioticele (de exemplu, medicamentele antiblastice), se poate intensifica producţia acestor specii reactive, ceea ce conduce la stres oxidativ şi la deteriorarea celulelor şi ţesuturilor. Deşi este adesea considerat dăunător, stresul oxidativ poate fi utilizat terapeutic, cum ar fi în tratamentul cancerului, având un anumit succes clinic .

2.1.1. Speciile reactive de oxigen

Radicalii liberi sunt molecule de oxigen cu un număr impar de electroni, ceea ce le face foarte reactive. Aceştia pot provoca reacţii chimice în lanţ, cunoscute sub numele de reacţii de oxidare, care pot fi benefice sau dăunătoare. Speciile reactive de oxigen (SOR), cum ar fi radicalii superoxizi, peroxidul de hidrogen şi radicalii hidroxilici, sunt produse în mod natural prin procese metabolice, în special în mitocondrii, şi joacă roluri esenţiale în diverse funcţii celulare, precum fosforilarea proteinelor, apoptoza şi imunitatea . SOR sunt generate prin reacţii enzimatice, cum ar fi cele implicate în lanţul respirator şi sinteza prostaglandinelor, dar şi prin reacţii neenzimatice, de exemplu, în timpul respiraţiei mitocondriale sau expunerii la radiaţii ionizante .

În condiţii normale, SOR sunt produse în cantităţi controlate şi sunt esenţiale pentru funcţionarea corectă a organismului, inclusiv pentru sistemul imunitar, unde radicalii liberi sunt utilizaţi pentru distrugerea agenţilor patogeni. Totuşi, un dezechilibru în producţia de SOR poate duce la stres oxidativ, care poate deteriora proteinele, lipidele

și acizii nucleici, contribuind la dezvoltarea unor boli precum cancerul, diabetul și bolile cardiovasculare . SOR joacă și un rol semnificativ în semnalizarea celulară, coxidul nitric fiind un exemplu important de radical liber implicat în modularea fluxului sanguin și în răspunsurile mitogene .

2.1.2. Efecte patologice ale radicalilor liberi

Atunci când speciile reactive de oxigen (SOR) sunt produse în exces, ele pot provoca stres oxidativ, un fenomen caracterizat prin pierderea echilibrului dintre sinteza radicalilor liberi și mecanismele protective ale organismului. Excesul de radicali hidroxil și peroxinitrit poate duce la peroxidarea lipidelor, deteriorând membranele celulare și lipoproteinele și generând compuși citotoxici și mutageni, precum malondialdehidă (MDA) și diină conjugată.

De asemenea, stresul oxidativ poate provoca modificări conformaționale ale proteinelor, afectând activitatea lor enzimatică, și poate altera ADN-ul, ducând la formarea de 8-oxo-2'-deoxiguanozină (8-OHdG), un compus cu potențial mutagen. Nivelurile de 8-OHdG din țesuturi au fost propuse ca biomarkeri pentru stresul oxidativ. Necontrolat, stresul oxidativ poate contribui la dezvoltarea afecțiunilor cronice și degenerative, poate accelera îmbătrânirea și poate provoca afecțiuni acute, precum accidentul vascular cerebral .

2.2. Antioxidanții și mecanismele de apărare antioxidante

Antioxidanții sunt molecule care pot stabiliza radicalii liberi prin donarea unui electron, fără a-și pierde stabilitatea, reducând astfel reactivitatea acestora. Pentru a proteja celulele de leziunile cauzate de speciile reactive de oxigen (SOR), organismul dispune de un sistem defensiv antioxidant bazat pe componente enzimatice și non-enzimatice.

Sistemele enzimatice includ superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și glutation peroxidaza (GPx). SOD convertește superoxidul în peroxid de hidrogen, cu izoforme specifice pentru mitocondrii (mangan SOD) și citosol (cupru-zinc SOD). Peroxidul de hidrogen este apoi descompus în apă de către catalază sau glutation peroxidaza, aceasta din urmă necesitând prezența glutationului redus (GSH) pentru a funcționa eficient. Glutationul este un component cheie al sistemului redox-tiol intracelular și este esențial pentru detoxifierea celulară.

Sistemele antioxidante non-enzimatice includ acidul ascorbic (vitamina C) și α-tocoferolul (vitamina E), care acționează sinergic, cu acidul ascorbic regenerând α-tocoferolul. De asemenea, compușii tiolici, precum tioredoxina, pot reduce peroxidul de hidrogen, dar necesită regenerare prin tioredoxin reductază. Pentru a preveni reacția Fenton și producerea de radicali hidroxil periculoși, ionii de fier liberi sunt sechestrați de proteine precum ceruloplasmina și transferina.

Polimorfismele enzimelor antioxidante sau deficiențele de micronutrienți, precum seleniul, pot contribui la predispoziția la stres oxidativ și la apariția complicațiilor sarcinii.

2.3. Conceptul de echilibru pro-oxidant-antioxidant

Oxigenul, datorită reactivității sale, joacă un rol crucial în generarea de energie prin fosforilarea oxidativă, esențială pentru producerea de ATP și, implicit, pentru evoluția organismelor multicelulare complexe. Cu toate acestea, această reactivitate face oxigenul susceptibil să atace molecule biologice esențiale, cum ar fi proteinele, lipidele și ADN-ul, supunând astfel organismul unui atac oxidativ constant. Pentru a contracara acest atac, organismul dispune de un complex sistem de apărare antioxidantă, care, în condiții normale, menține un echilibru între speciile pro-oxidante și antioxidanți.

Stresul oxidativ apare atunci când acest echilibru este perturbat, fie printr-o creștere anormală a producției de SOR, fie printr-o deficiență a apărării antioxidante. Această perturbare poate duce la deteriorarea celulară și la apariția unor afecțiuni patologice, inclusiv complicații ale sarcinii. Conceptul de echilibru pro-oxidant-antioxidant este esențial pentru înțelegerea stresului oxidativ, deoarece subliniază faptul că tulburările minore pot provoca adaptări homeostatice, în timp ce perturbările majore pot conduce la daune ireparabile și la moarte celulară.

Sursele de SOR sunt variate și depind de circumstanțele de mediu, iar efectele stresului oxidativ nu apar izolat, ci în interacțiune cu alte forme de stres celular, precum stresul reticulului endoplasmatic (RE). RE joacă un rol central în coordonarea răspunsurilor celulare la stres, în special prin intermediul răspunsului proteic desfășurat (UPR), care vizează restabilirea homeostaziei proteice. Dacă stresul RE persistă, UPR poate activa calea apoptotică pentru a elimina celulele deteriorate. De asemenea, UPR poate activa căile pro-inflamatorii, cum ar fi calea NF-κB, contribuind la complexitatea manifestărilor clinice ale stresului oxidativ .

2.4. Rolul stresului oxidativ în relaţia materno-fetală

Stresul oxidativ poate induce o varietate de răspunsuri celulare, în funcţie de gravitatea leziunilor şi de compartimentul în care sunt generate speciile reactive de oxigen (SOR). Este esenţială înţelegerea interacţiunii dintre stresul oxidativ şi stresul reticulului endoplasmatic (RE) atunci când se explorează opţiunile terapeutice, deoarece abordarea unui singur tip de stres poate fi insuficientă pentru a obţine beneficii semnificative.

La nivelul interfeţei materno-fetale, stresul oxidativ se manifestă încă de la începutul sarcinii, având atât roluri fiziologice în dezvoltarea placentei, cât şi contribuţii la fiziopatologia complicaţiilor sarcinii, cum ar fi avortul spontan, preeclampsia, restricţia de creştere intrauterină (IUGR) şi ruperea prematură a membranelor .

2.4.1. Stresul oxidativ şi remodelarea placentară

Stresul oxidativ joacă un rol central în remodelarea placentară, un proces esenţial în dezvoltarea placentei umane. Iniţial, vilozităţile corionice se formează pe întreaga suprafaţă a sacului corionic, dar începând cu sfârşitul primului trimestru de sarcină, vilozităţile de pe polul superficial regresează, formând placenta discoidă definitivă. Acest proces de regresie este considerat fiziologic şi pare a fi mediat de stresul oxidativ.

Dezvoltarea placentei are loc într-un mediu cu concentraţie relativ scăzută de oxigen, susţinută de secreţiile glandelor endometriale, mai degrabă decât de circulaţia maternă. Acest mediu cu oxigen scăzut protejează embrionul de teratogeneza indusă de radicalii liberi ai oxigenului. În primul trimestru, sângele matern este împiedicat să pătrundă în spaţiul intervilozitar al placentei prin dopuri de celule citotrofoblastice extravilozitare care blochează arterele uterine spiralate.

Circulaţia maternă în placentă se stabilizează complet abia spre sfârşitul primului trimestru, când aceste dopuri se dislocă. Acest debut al circulaţiei intraplacentare este asociat cu o creştere semnificativă a concentraţiei de oxigen, care la rândul său stimulează producţia de specii reactive de oxigen (SOR), în special în stratul sinciţiotrofoblastic, unde concentraţiile de enzime antioxidante sunt scăzute. Studiile au arătat că vilozităţile din regiunea periferică a placentei prezintă semne de stres oxidativ crescut, cum ar fi niveluri ridicate de HSP70 şi reziduuri de nitrotirozină, indicând formarea peroxinitritului şi modificări morfologice degenerative. Aceste modificări moleculare şi morfologice activează cascada apoptotică în vilozităţile periferice, explicând regresia acestora .

B. CONTRIBUȚII PERSONALE

1. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Se descrie rolul stresului oxidativ și al mecanismelor antioxidante în contextul sarcinii și în dezvoltarea unor afecțiuni precum avortul spontan. Stresul oxidativ apare atunci când există un dezechilibru între producerea de factori oxidativi și capacitatea organismului de a-i neutraliza, ceea ce poate duce la peroxidarea lipidelor și la deteriorarea membranelor celulare. Ajustările homeostatice la stresul oxidativ pot preveni daunele, dar perturbările majore pot duce la leziuni ireparabile și moarte celulară.

Glutationul, un antioxidant esențial, joacă un rol crucial în protejarea celulelor împotriva stresului oxidativ și poate influența sănătatea placentei și protecția fătului împotriva toxinelor. Nivelurile scăzute de MTH1 în timpul sarcinii au fost asociate cu un risc crescut de preeclampsie și naștere prematură, sugerând un rol protector al acestei proteine împotriva stresului oxidativ în celulele fetale.

Apoptoza, sau moartea celulară programată, este un proces important în contextul avortului spontan, iar proteinele p53 și Bcl-2 joacă roluri cheie în acest proces. p53 promovează apoptoza ca răspuns la deteriorarea ADN-ului, în timp ce Bcl-2 previne moartea celulară prin inhibarea eliberării citocromului c din mitocondrii.

Pentru a înțelege mai bine legătura dintre factorii de protecție antioxidantă (GLUT și MTH1/MUTH) și factorii apoptotici (p53 și Bcl-2) în avortul spontan, cercetarea propune următoarele ipoteze:

- Evaluarea asocierii dintre creșterea valorii glutationului și scăderea expresiei p53 ca factor pro-apoptotic.
- Evaluarea asocierii dintre creșterea valorii glutationului și expresia Bcl-2 ca factor anti-apoptotic.
- Evaluarea asocierii dintre creșterea valorii MTH1/MUTH și scăderea expresiei p53 ca factor pro-apoptotic.
- Evaluarea implicării mecanismelor apoptotice în avortul spontan prin cuantificarea expresiilor p53 și Bcl-2.

Aceste ipoteze de cercetare sunt esențiale pentru a înțelege mai bine mecanismele implicate în avortul spontan și pentru a dezvolta tratamente sau strategii de prevenție eficiente.

2. MATERIAL ŞI METODE

Studiul prospectiv a fost conceput pentru a analiza asocierea dintre factorii de protecţie antioxidantă şi factorii apoptotici în contextul avortului spontan. Studiul a inclus două grupuri de femei însărcinate cu vârste cuprinse între 35 şi 40 de ani, internate la Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţă Arad,secţia Obstetrică-Ginecologie în perioada 2022-2023. Primul grup a fost format din 30 de femei care au suferit avorturi spontane fără o cauză medicală evidentă. Al doilea grup, grupul de control, a fost format din 20 de femei care au optat pentru avort la cerere, fără motive medicale ale mamei sau ale fătului.

Criteriile de includere pentru ambele grupuri au fost similare, cu excepţia faptului că grupul de studiu a inclus femei care au suferit avort spontan, iar grupul de control a inclus femei care au solicitat avort la cerere. Toate pacientele incluse în studiu au semnat un formular de consimţământ informat. Piesele biologice prelevate au fost prelucrate histologic conform procedurilor standardizate.

Acest design de studiu permite o comparaţie directă între placentele afectate de avort spontan şi cele de la avorturi elective, pentru a evalua rolul potenţial al factorilor antioxidativi şi apoptotici în avortul spontan.

2.1 Prelucarea histologică a biopsiilor

Tehnica de prelucrare a probelor biologice presupune următoarele etape:

1. Recoltarea
2. Fixarea
3. Includerea în parafină
4. Secţionarea
5. Deparafinarea
6. Colorarea
7. Montarea

După prelevarea materialului biologic, acesta a fost orientat folosind o sită metalică cu ochiuri mici şi un sistem de video-macroscopie pentru identificarea vilozităţilor coriale. Fragmentele tisulare au fost măsurate cumulativ şi descrise în funcţie de culoare, consistenţă, prezenţa cheagurilor, a fragmentelor tisulare, a vilozităţilor coriale şi/sau a produsului de concepţie. În cazul chiuretajului endometrial pentru avort

incomplet, ţesutul suspectat de a fi placentar sau conţinând părţi fetale şi deciduă a fost păstrat în trei fragmente pentru analize suplimentare.

Fixarea materialului biologic s-a realizat în formol histologic 10%, tamponat, pentru o perioadă de 6 până la 72 de ore, pentru a preveni autoliza şi a menţine specimenele într-o stare optimă pentru analize histopatologice şi de patologie moleculară. După fixare, specimenele au fost spălate cu apă curentă pentru a îndepărta formolul.

Fig.1 Procesator ţesuturi Excelsior

Deoarece parafina necesară pentru infiltrarea tisulară nu este miscibilă cu apa din ţesuturi sau mediul de fixare, piesele au fost supuse unor etape intermediare de deshidratare şi clarificare. În acest studiu, s-a folosit procesarea automată a fragmentelor biologice cu ajutorul procesatorului Excelsior Epredia. Sistemul automat a respectat protocoalele validate de firma Epredia, utilizând un program de lungă durată (12 ore) din cauza cantităţii mari de material biologic şi a sângelui asociat cu fragmentele.

Excelsior este un sistem închis care monitorizează automat calitatea băilor de alcool şi xilen, eliminând solvenţii degradaţi. Procesarea în vid asigură un microclimat standardizat şi o calitate optimă a reactivilor, garantând astfel rezultate consistente şi precise în prelucrarea materialului biologic.

Cel mai frecvent mediu utilizat pentru includerea ţesuturilor este parafina histologică, cu un punct de topire de 56°C. Includerea tisulară într-un bloc de parafină se realizează folosind matriţe de metal şi casete de plastic, în cadrul unei staţii de includere la parafină. Modulul de încălzire al staţiei menţine o temperatură constantă, apropiată de cea a pieselor procesate, facilitând astfel

Fig.2 Staţie de includere la parafină

manipularea țesuturilor.

Etapa de secționare a țesuturilor include trei pași principali:

1.Pregătirea blocurilor pentru secționare:

- Blocul de parafină este răcit pe placa de răcire a stației de includere la parafină.
- Excesul de parafină este îndepărtat, dacă este necesar, prin fasonare cu lama unui bisturiu.

Fig.3 Microtom Leica RM2125

Fig.4 Baie de flotație Leica

2. Secționarea propriu-zisă:

- Secţionarea se realizează pentru obţinerea secţiunilor histologice de diferite grosimi, care sunt apoi ataşate pe lame histologice pentru colorare.
- Secţionarea se face cu lame de unică folosinţă, iar unghiul optim de înclinaţie a port-lamei microtomului este de 5-10°.
- Secţiunile au fost realizate cu o grosime de 4 µm, utilizând Microtomul Leica RM2125, care dispune de un mecanism de verificare a calibrării independente, asigurând astfel standardizarea dimensiunilor secţiunilor.

3. Flotaţia:

- Secţiunile histologice sunt plasate în baia de flotare Leica, încălzită sub punctul de topire al parafinei, pentru a le îndrepta pe lame.
- După flotare, uscarea secţiunilor s-a realizat la termostat timp de 10 minute, la o temperatură de 56°C.

Flotaţia a fost realizat cu ajutorul Baii de flotatie Leica. (Fig.5)

- se realizează în baia de apă încălzită sub punctul de topire al parafinei.
- secţiunile histologice vor rămâne în baia de apă până la întinderea pe lame.
- uscarea s-a realizat la termostat pentru 10 minute la o temăperatură de 56°C.

După ce secţiunile histologice au fost etalate pe lamele de sticlă, acestea au fost uscate timp de 10 minute la 56°C. Procesul de deparafinare, care este inversul includerii în parafină, a fost realizat pentru a îndepărta parafina din ţesuturi şi a rehidrata secţiunile în vederea colorării.

Colorarea secţiunilor a fost efectuată folosind platforma automată Gemeni Epredia, conform unui protocol standardizat de producător. Pentru a permite colorarea, preparatele au trebuit mai întâi să fie deparafinate. În mod obişnuit, secţiunile sunt colorate cu hematoxilină-eozină, care evidenţiază toate structurile celulare de bază.

În anumite cazuri, sunt necesare coloraţii speciale pentru a evidenţia anumite structuri celulare specifice, cum ar fi cromatina din nucleu, fibrele elastice, fibrele conjunctive, amiloidul sau grăsimile. Aceste tehnici permit o analiză detaliată a structurilor celulare şi sunt esenţiale pentru diagnosticarea corectă în patologia histologică.

Fig.5 Aparat automat de colorat Gemeni Epredia

2.2. Tehnica Imunohistochimică

Imunohistochimia (IHC) este o tehnică avansată de diagnostic utilizată pe scară largă pentru identificarea și clasificarea bolilor, bazată pe vizualizarea proteinelor în țesuturi. Această metodă se bazează pe reacția antigen-anticorp, în care un anticorp primar se leagă de un epitop proteic specific. Epitopii pot reflecta structuri proteice secundare și terțiare, iar anticorpii monoclonali sunt frecvent dezvoltați pentru a recunoaște secvențe peptidice de 4-25 de aminoacizi, facilitând detectarea în țesuturile fixate cu formol.

Fixarea țesuturilor este esențială pentru menținerea structurii proteice și pentru evitarea inactivării epitopilor, proces care poate avea loc dacă fixarea depășește 72 de ore. Tehnica IHC implică utilizarea anticorpilor primari care se leagă de antigeni specifici, iar anticorpii secundari, legați de o enzimă, sunt utilizați pentru vizualizare. Imunohistochimia directă presupune legarea unui sistem de vizualizare, cum ar fi un fluorocrom, direct de anticorpul primar, în timp ce imunohistochimia indirectă implică utilizarea unui anticorp secundar pentru a amplifica semnalul, făcând proteinele cu concentrații scăzute mai ușor de detectat.

În studiul descris, a fost utilizată o tehnică nouă de augmentare a semnalului, care implică un polimer ce conține anticorpi secundari și enzime pentru vizualizare, optimizând detectarea epitopilor cu concentrații tisulare scăzute. Această tehnică poate amplifica semnalul de 10-20 de ori comparativ cu metodele clasice de IHC directă.

Problemele legate de fixarea țesuturilor, cum ar fi deshidratarea inadecvată sau artefactele cauzate de secționare incorectă, pot afecta rezultatele. Controlul negativ, care constă în omiterea anticorpului primar, este utilizat pentru a preveni reacțiile fals pozitive. În acest studiu, au fost utilizate atât controale interne, cât și externe, pentru a asigura acuratețea rezultatelor.

Pentru detectarea stresului oxidativ, analiza imunohistochimică a fost efectuată pe secțiuni de 4 µm preparate din țesut încorporat în parafină și fixat în formol, utilizând un imunocolorator automat Ventana Benchmark GX. Secțiunile au fost incubate cu anticorpi policlonali primari specifici pentru glutation (Abcam) și MTH1 (Abmart), iar controlul negativ a fost realizat prin omiterea anticorpului primar pe secțiuni similare.

Cromogenul preferat pentru detectarea reacțiilor imunohistochimice a fost 3,3'-diaminobenzidina (DAB), care produce o colorație maro, permițând vizualizarea intensității reacției cromogenice și a localizării acesteia la nivel membranar, citoplasmatic sau nuclear.

Specimenele au fost analizate de doi patologi calificați, folosind scorul H pentru evaluarea intensității imunohistochimice. Scorul H este calculat prin înmulțirea procentului de celule care prezintă fiecare intensitate (notată de la 0 la 3) și adăugarea rezultatelor, scorul maxim fiind 300. În acest sistem, un procent de <1% de celule pozitive este considerat un rezultat negativ.

Fig.6 Platforma automata imunohistochimie-Banchmark GX

În cazul apoptozei, analiza imunohistochimică a fost efectuată pe secțiuni de 4 µm, preparate din țesuturi fixate în formol și încorporate în parafină, folosind platforma Autostainer Link 48 (Agilent Technologies). Testele au fost realizate pe lamele deparafinate pentru expunerea epitopilor, utilizând un kit de detectare DAB (3,3′-diaminobenzidină) și contracolorare cu hematoxilină. Secțiunile au fost incubate cu anticorp monoclonal anti-BCL2 (clona 124) și anticorp monoclonal anti-p53 (clona DO-70), ambii de la Agilent Technologies.

Pentru fiecare caz, au fost utilizate lame de control pozitiv, preparate din placentă, iar controlul negativ a fost realizat prin omiterea anticorpului primar pe secţiuni similare.

Evaluarea lamelor s-a realizat utilizând un microscop cu LED Leica DM3000, dotat cu automatizare inteligentă şi software LAS EZ (furnizat de Leica Biosystem) pentru captarea imaginilor şi efectuarea măsurătorilor. Acest echipament a asigurat precizia şi consistenţa evaluărilor imunohistochimice în cadrul studiului.

2.3. Analiza statistică

În acest studiu, valorile obţinute au fost reprezentate grafic ca medii ± abatere standard, utilizând software-ul GraphPad Prism 8.0. Datele au fost prezentate ca medie ± abatere standard (SD), iar variabilele continue au fost comparate folosind testele t student pentru eşantioane pereche şi independente. Valorile $p < 0,05$ au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic.

Testul t este utilizat pentru a determina dacă există o diferenţă semnificativă între mediile a două grupuri. Calculul valorii t implică împărţirea diferenţei dintre mediile grupurilor la eroarea standard a diferenţei, care măsoară variabilitatea mediilor în funcţie de mărimea eşantionului şi variabilitatea în cadrul fiecărui grup. Dacă valoarea t calculată depăşeşte valoarea t critică, ipoteza nulă este respinsă, sugerând existenţa unei diferenţe semnificative între medii.

Testul de normalitate este utilizat pentru a evalua compatibilitatea datelor cu o distribuţie Gaussiană. Dacă valoarea p este suficient de mică, se poate concluziona că datele nu urmează o distribuţie Gaussiană, ceea ce poate necesita transformarea datelor, excluderea valorilor aberante sau utilizarea testelor neparametrice.

Testul ANOVA (analiza varianţei) este utilizat pentru a compara mediile între trei sau mai multe grupuri independente. ANOVA împarte variabilitatea totală a datelor în componente care pot fi atribuite diferitelor surse, permiţând astfel cercetătorilor să determine dacă există diferenţe semnificative între grupuri. Ipoteza nulă în ANOVA afirmă că nu există diferenţe semnificative între mediile grupurilor, iar ipoteza alternativă afirmă că cel puţin un grup are o medie semnificativ diferită de celelalte.

Aceste analize statistice au fost esenţiale pentru a evalua semnificaţia rezultatelor obţinute în cadrul studiului şi pentru a determina relevanţa lor în contextul cercetării.

3. REZULTATE

3.1 Implicarea mecanismelor apoptotice în avortul spontan

În acest studiu au fost înrolate 50 de femei în perioada 2022-2023, dintre care 30 au suferit avorturi spontane sporadice (grupul de studiu), iar 20 au recurs la avort la cerere (grupul de control). Ambele grupuri nu au prezentat diferenţe semnificative în ceea ce priveşte vârsta maternă, indicele de masă corporală (IMC) şi vârsta gestaţională la momentul avortului.

Vârsta maternă a arătat un uşor trend ascendent în grupul de control comparativ cu grupul de studiu (37,5 ani vs 38,7 ani). Vârsta gestaţională la momentul avortului a fost uşor mai mare în grupul de studiu comparativ cu grupul de control (10,6 săptămâni vs 10,3 săptămâni). Mediul de provenienţă al pacientelor nu a diferit semnificativ între cele două grupuri, deşi s-a observat o uşoară preponderenţă a pacientelor din mediul rural în grupul de studiu, în timp ce majoritatea pacientelor din grupul de control proveneau din mediul urban.

Deşi nu au fost găsite diferenţe semnificative statistic în analiza IMC, pacientele din grupul de studiu au avut un IMC mai ridicat, apropiindu-se de limita superioară a normalului. Aceste date sunt detaliate în Tabelul 1 şi reprezentate grafic în figurile alăturate (Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12), evidenţiind caracteristicile demografice şi clinice ale cohortelor studiate.

Date demografice maternale			
	STUDIU (n=30)	**MARTOR (n=20)**	**p**
Vîrsta maternă (ani ±SD)	37.5 ±3.1	38.7 ±2.4	0.7
Vârsta gestaţională la avort	10.6 ±2.0	10.3 ±2.9	0.4
IMC (kg/m2)	24.1 ±2.3	22.5 ± 1.6	0.4
Provenienţă urban/rural	13/17	11/9	0.5

Tabelul 1. Date demografice materne

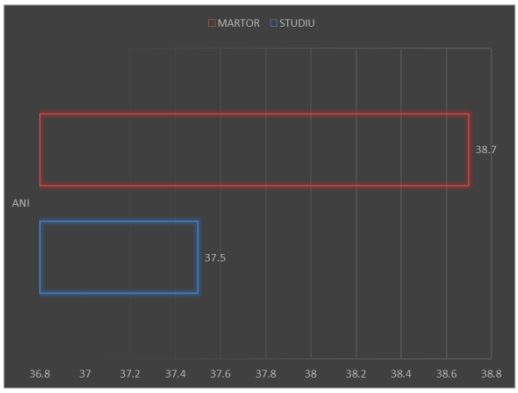

Fig. 9 Valorile vârstei materne în grupele de studiu

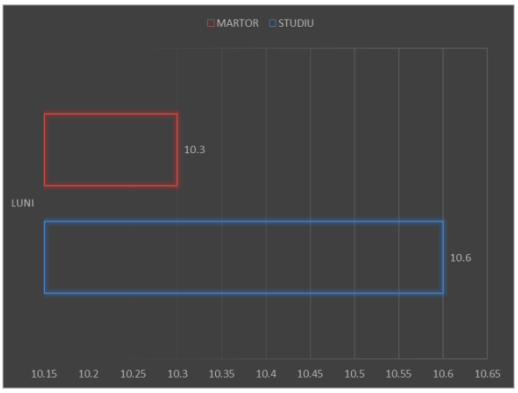

Fig. 10 Valorile vârstei gestaționale în momentul avortului

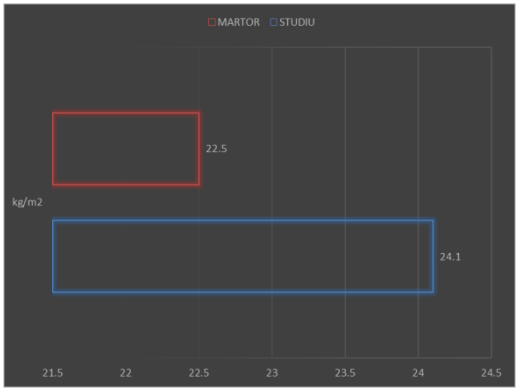

Fig. 11 Valorile IMC materne în grupele de studiu

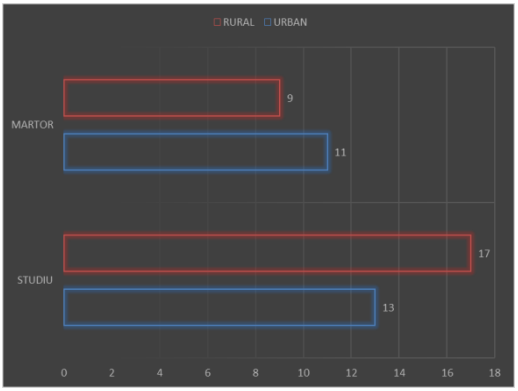

Fig. 12 Provenienţa maternă în grupele de studiu

În studiul nostru, modificările apoptotice placentare au fost evaluate din punctul de vedere al echilibrului dintre expresia p53 şi expresia BCL2. Analiza factorilor pro-apoptotici vs anti-apoptotici la pacientele incluse în studiu arată o expresie mult crescută a p53 la pacienţii din lotul de studiu (Fig.13)(265,44 ±63,80) comparativ cu valoarea în lotul martor (Fig. 6)(171,22 ± 36,04) (Tabelul 2). p<0,005 relevă importanţa statistică a rezultatelor obţinute.

Analiza statistică a expresiei p53 si BCL2			
	STUDIU (n=30)	**MARTOR (n=20)**	**p**
p53- H score ± SD	230,33 ± 63,80	171,22 ± 36,04	0,003
BCL2- H score ±SD	120,2 ± 100	167 ± 92,73	0,023

Tabelul 2.Analiza scorului H al expresiei p53 si BCL2

Analiza expresiei scorului H în cazul BCL2 relevă o valoare crescută în cazul pacientelor din lotul de control (167 ±92,73)(Fig.14), comparativ cu valoarea obţinută în cazul pacientelor cu avort spontan (120,2 ±100)(Fig.15).

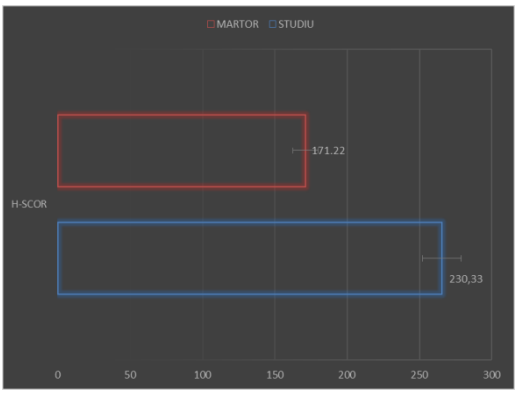

Fig. 13 Valorile scorului H al expresiei p53

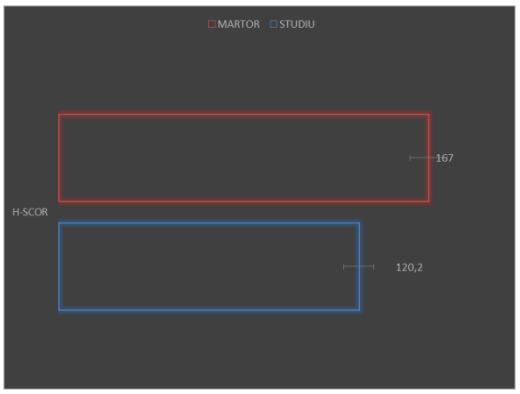

Fig. 14 Valorile scorului H al expresiei BCL2

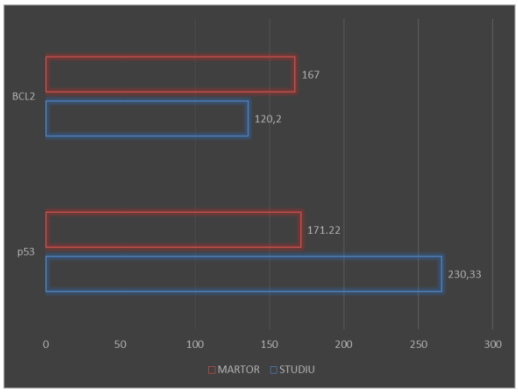

Fig. 15 Valorile comparative ale scorului H al expresiei p53

Analiza histologică şi imunohistochimică este esenţială pentru identificarea şi localizarea mecanismelor de apoptoză, contribuind la un diagnostic precis al avorturilor spontane. În multe cazuri, etiopatogenia avorturilor spontane rămâne neclară sau multifactorială, dar mecanismele implicate pot fi documentate în anumite situaţii. Imunomarcajul pentru p53, evidenţiat cromogenic prin culoarea maro şi localizat la nivelul nucleului celulei, arată o expresie scăzută la pacientele care au optat pentru avort la cerere, sugerând o corelaţie între nivelul scăzut al factorilor pro-apoptotici şi supravieţuirea produsului de concepţie, parte a mecanismelor de toleranţă imunogenică maternă. În contrast, expresia p53 a fost foarte ridicată la pacientele care au suferit avorturi spontane .

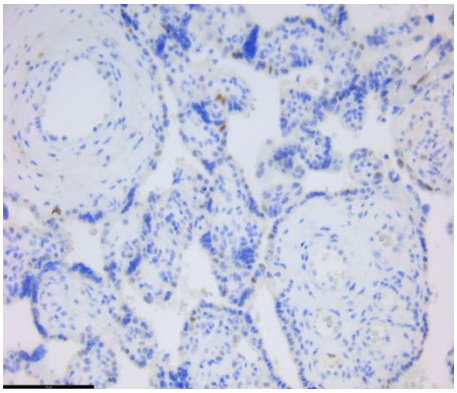

Fig. 16 Paciente cu avort la cerere care prezintă expresie izolată a p53 la nivelul placentei

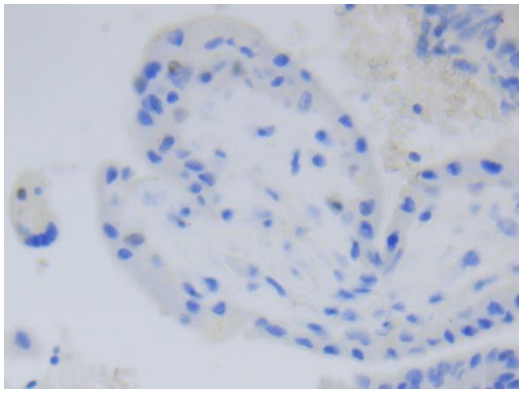

Fig. 17 Paciente cu avort la cerere care prezintă expresie izolată a p53 la nivelul placentei (detaliu)

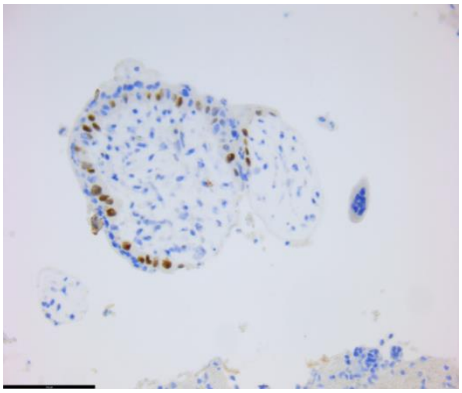

Fig.18 Paciente cu avort spontan care prezintă expresie ridicată a p53 la nivelul placentei

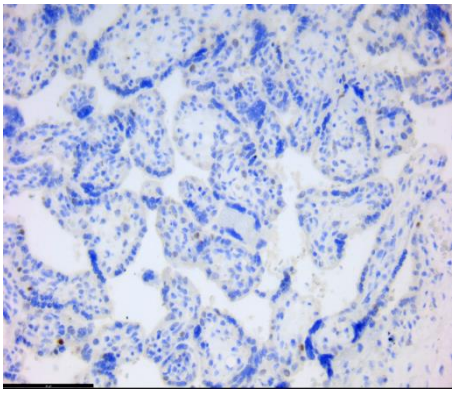

Fig. 19 Expresia scăzuta a Bcl-2 în cazul pacintelor cu avort spontan

Familia de gene Bcl/Bax joacă un rol crucial în evadarea celulară din calea apoptozei, cu expresia Bcl-2 corelându-se cu scăderea mecanismelor pro-apoptotice şi creşterea proliferării celulare, esenţiale în perioada de organogeneză a dezvoltării fetale.

O scădere a expresiei Bcl-2 (Fig.19) poate afecta procesele de diferenţiere şi proliferare necesare evoluţiei embrio-fetale, conducând la avort spontan. Imunohistochimia permite evidenţierea relaţiei inverse între factorii pro-apoptotici şi anti-apoptotici (p53 vs Bcl-2). Studiul nostru subliniază importanţa identificării acestor mecanisme în etiologia avortului spontan. În cazurile de dezvoltare normală a produsului de concepţie, expresia genei Bcl-2 este difuză şi generalizată în citoplasmă, evidenţiată printr-o reacţie brună datorată cromogenului DAB care se leagă de complexul antigen-anticorp (Fig.20, Fig.21).

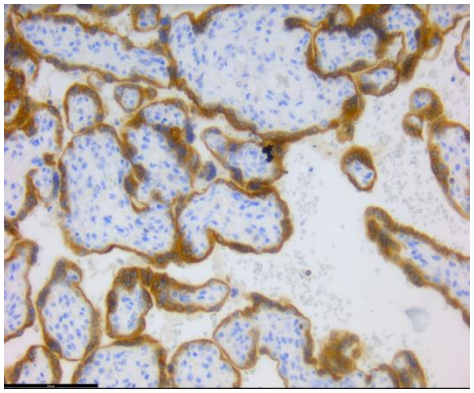

Fig. 20 Expresia crescută a Bcl-2 în cazul pacintelor cu avort la cerere.

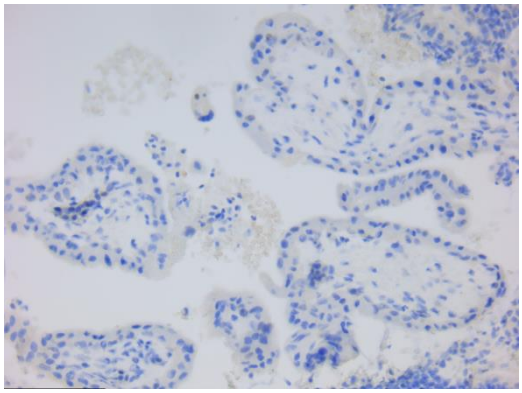

Fig.21 Expresia absentă a Bcl-2 în cazul pacientelor cu avort spontan.

3.2. Implicarea stresului oxidativ în avortul spontan

Pentru pacientele incluse în studiul nostru care au prezentat avorturi spontane, rezultatele au indicat valori semnificativ mai scăzute ale glutationului (GLUT) în comparaţie cu grupul de control. Trei cazuri din grupul de studiu au fost excluse din analiză din cauza reducerii sub 50% a materialului biologic disponibil, iar pentru a menţine designul studiului şi proporţia pacienţilor în cele două grupuri, două cazuri au fost excluse aleatoriu din grupul de control.

Analiza scorurilor H medii pentru GLUT a relevat o scădere cu 41% a valorilor în cazul avorturilor spontane comparativ cu grupul de control. Valoarea medie a GLUT în grupul de control a fost de 288,88, în timp ce în grupul cu avort spontan a fost de doar 61,11. Comparând distribuţia curbelor pentru GLUT şi MUTH/MTH1, s-a observat o paralelă între mecanismele de protecţie antioxidantă. Nivelurile scăzute de glutation au fost asociate cu un nivel scăzut de metionină, iar rezultatele au fost validate prin analiza sintetazei reductazei.

Evaluarea comparativă a valorilor medii ale scorului H între cele două loturi arată că valoarea medie a glutationului (GLUT) în grupul de studiu este de aproape cinci ori mai mică decât în grupul de control. Aceasta scădere semnificativă este asociată cu o creştere a nivelului stresului oxidativ. Valorile foarte ridicate ale glutationului în grupul martor, care include avorturile la cerere, confirmă necesitatea proceselor oxidative protective pentru supravieţuirea produsului de concepţie. În toate cazurile din grupul de control,

valorile scorului H au fost aproape de valoarea maximă posibilă de 300, în timp ce în grupul de studiu, majoritatea cazurilor au avut valori sub o treime din această valoare. În multe cazuri din grupul de studiu, expresia GLUT nu a fost detectată deloc (Fig.22).

Fig. 22 Valorile medii ale scorului H(GLUT) în grupurile incluse în studiu.

Analiza valorilor medii pentru MUTH/MTH1 a indicat o diferenţă mai mică între grupul de paciente cu avort spontan şi grupul de control. Dispersia valorilor absolute ale scorului H în lotul studiat a fost semnificativ mai mică comparativ cu dispersia valorilor pentru GLUT.

Valoarea minimă observată a fost de 10, iar cea maximă a fost de 280. În mod notabil, într-un caz de avort spontan, valoarea scorului H a fost mai mare decât valoarea medie a scorului H obţinută în grupul de control. Aceste observaţii sunt prezentate în Fig. 23 şi Fig. 24.

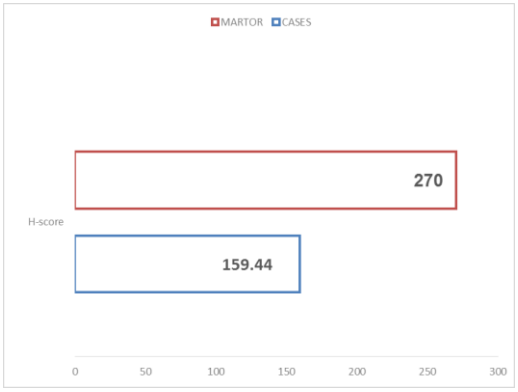

Fig. 23 Valorile medii ale scorului H (MUTH/MTH1) în grupurile incluse în studiu.

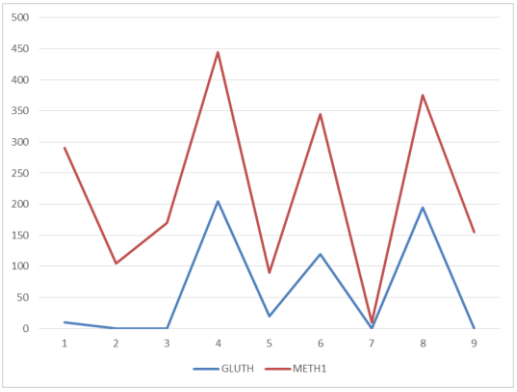

Fig. 24 Dispersia valorilor scorului H (MUTH/GLUTH) în cele două loturi studiate

3.3. Corelaţii între stresul oxidativ şi apoptoză în avortul spontan

Modificarea echilibrului dintre factorii oxidanţi şi antioxidanţi, împreună cu asocierea acestui dezechilibru cu alterarea proceselor pro- şi antiapoptotice, joacă un rol crucial în etiologia avortului spontan. Autorii au investigat activitatea enzimelor antioxidante în placentă şi au demonstrat o corelaţie puternică între activitatea antioxidantă şi evoluţia sarcinii. O concentraţie crescută de oxigen, combinată cu o capacitate antioxidantă redusă, poate duce la eşecul timpuriu al sarcinii. În studiul de faţă, evaluarea comparativă a evoluţiei factorilor care induc avortul a relevat un paralelism aproape perfect între scorul H obţinut în analiza expresiei tisulare a GLUT şi Bcl2.

În lotul de studiu, valoarea medie a expresiei GLUT a fost de 61,11, cu o valoare minimă de 0 şi o valoare maximă de 205 pe scala scorului H. Pentru expresia Bcl-2, valoarea medie a scorului H a fost de 133,53, cu un minim de 33 şi un maxim de 389. În graficul prezentat, se observă distribuţia individuală a factorilor care favorizează sarcina prin intermediul celor două mecanisme studiate: mecanismul apoptozei şi mecanismul oxidativ. Analiza liniilor din grafic indică tendinţele de variaţie în funcţie de caz, evidenţiind paralelismul dintre modificările factorilor antioxidanţi şi antiapoptotici. (Fig.25, Fig.26)

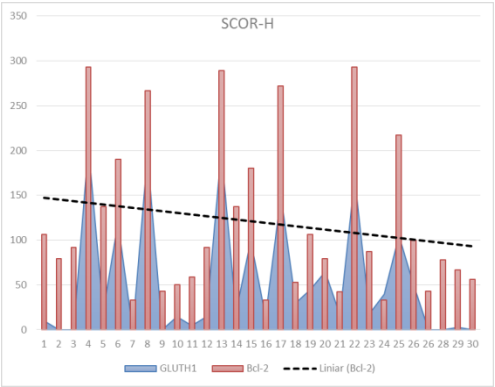

Fig.25 Evaluarea comparativă a Scorului-H (GLUT vs Bcl-2)

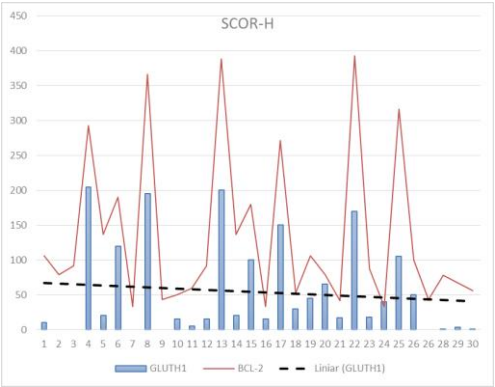

Fig.26 Evaluarea tendinţei variaţilor pe fiecare caz a Scorului-H (GLUT vs Bcl-2)

Mecanismele de reglare a apoptozei sunt esenţiale pentru dezvoltarea sarcinii în faza de organogeneză. Studiile au arătat că o scădere a apoptozei este necesară pentru evoluţia normală a placentei, în timp ce avortul spontan este asociat cu o creştere a acestor mecanisme. Proteina p53 joacă un rol crucial în acest proces, acţionând ca un factor de inducere a morţii celulare.

În cadrul studiului nostru, am obţinut o valoare medie a expresiei p53 de 230,33, cu o valoare minimă a scorului H de 80 şi o valoare maximă de 300. Stresul oxidativ, care reduce mecanismele antioxidante, este asociat cu un risc crescut de avort spontan. Unul dintre efectele stresului oxidativ este pierderea homeostaziei reticulului endoplasmic, care afectează plierea proteinelor şi activează apoptoza.

În ceea ce priveşte MUTH/MTH1, studiul nostru a relevat o valoare medie de 159,44, cu valori ale scorului H variind între 10 şi 285. Analiza distribuţiei acestor doi parametri, care favorizează avortul spontan, a arătat un paralelism cu variaţii mult mai mici decât în cazul parametrilor care favorizează evoluţia normală a sarcinii. Evaluarea tendinţei valorilor obţinute în cele 30 de cazuri din lotul de studiu a indicat diferenţe minime între rezultate, subliniind consistenţa acestora. (Fig.27, Fig.28)

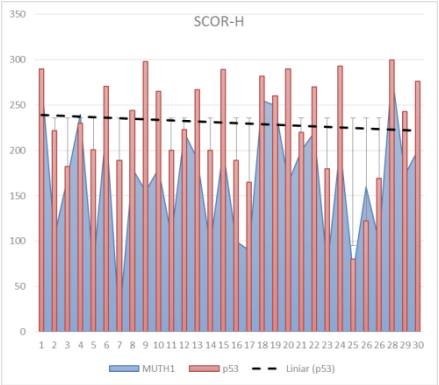

Fig.27 Evaluarea comparativă a Scorului-H (MUTH vs p53)

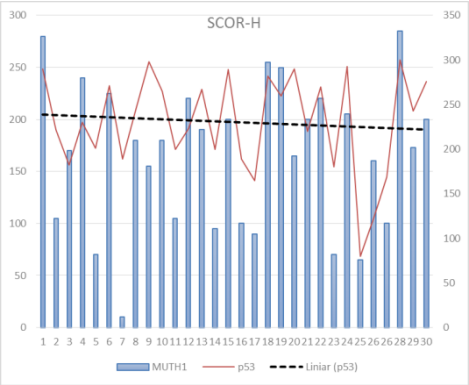

Fig.28 Evaluarea tendinţei variaţilor pe fiecare caz a Scorului-H (MUTH vs p53)

În cadrul studiului nostru, am evaluat ipoteza privind diferenţele statistice între doi parametri, comparând această diferenţă cu cea datorată hazardului, utilizând un test t pentru eşantioane independente. Am calculat valoarea t pentru fiecare pereche de parametri analizaţi (GLUT, MTH1, p53 şi Bcl2), comparând mediile celor două grupe şi raportând rezultatele la deviaţia standard.

Eroarea standard a diferenţei a fost utilizată pentru a măsura variabilitatea mediilor, aceasta depinzând de mărimea eşantionului şi de variabilitatea internă a fiecărui grup. Valoarea t calculată a fost comparată cu valoarea t critică de 0,05. Dacă valoarea t calculată a fost mai mare de 0,05, ipoteza asocierii aleatorii a rezultatelor a fost respinsă, indicând semnificaţia statistică a diferenţelor observate. Puterea semnificaţiei statistice a fost marcată pe grafice cu simboluri *, numărul de * indicând puterea statistică.

În prima analiză, am comparat valorile p53 şi GLUT obţinute pentru pacientele cu avort spontan. Valorile medii au fost de 230,3 pentru p53 şi de 61,11 pentru GLUT, rezultând o diferenţă a mediilor de 176,5 ± 16,0. La un indice de confidenţă de 95%, s-a observat un $p < 0,0001$, indicând o semnificaţie statistică puternică în comparaţie cu valoarea de referinţă $p < 0,05$ (****). Aceasta sugerează că diferenţele observate între medii sunt semnificative din punct de vedere statistic şi nu sunt rezultatul unei variabilităţi aleatorii. (Fig.29, Fig.30).

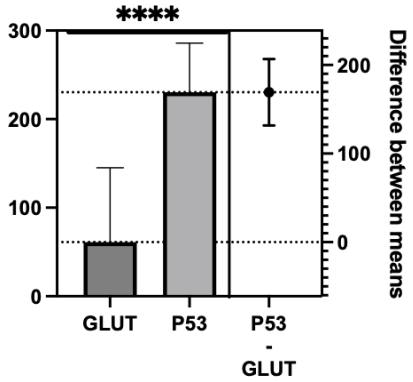

Fig.29 Compararea valorilor medii ale p53 vs GLUT

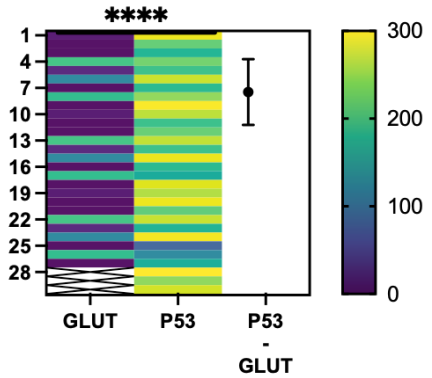

Fig.30 Reprezentarea colorimetrică a valorilor p53 vs GLUT

A doua pereche de valori analizate prin testul t a fost formată din valorile Bcl-2 şi MUTH/MTH1, referitoare strict la pacientele cu avort spontan. Valorile medii obţinute au fost de 120,2 pentru Bcl-2 şi 159,4 pentru MUTH/MTH1, rezultând o diferenţă a mediilor de -39,24 ± 22,58.La un indice de confidenţă de 95%, s-a obţinut un $p = 0,00878$, indicând o asociere între cei doi parametri. Cu toate acestea, deşi $p < 0,05$ sugerează semnificaţie statistică, puterea acestei asocieri nu este la fel de robustă comparativ cu alte analize. Aceasta indică faptul că, deşi există o legătură între valorile Bcl-2 şi MUTH/MTH1, ea nu are o putere statistică la fel de puternică în raport cu alte comparaţii (Fig. 31, Fig. 32).

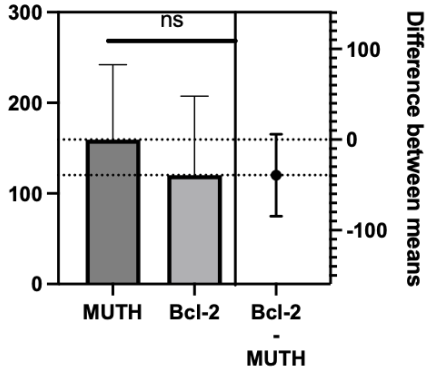

Fig.31 Compararea valorilor medii ale Bcl-2 vs MUTH

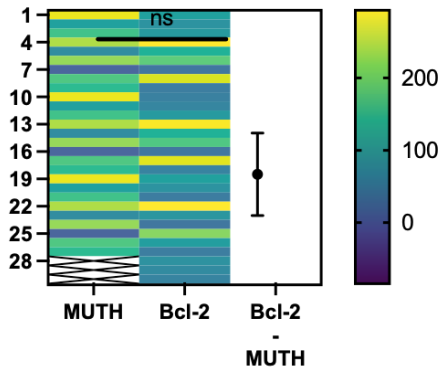

Fig.32 Reprezentarea colorimetrică a valorilor Bcl-2 vs MUTH

A doua pereche de valori analizate prin testul t a inclus valorile Bcl-2 şi GLUT, referitoare strict la pacientele cu avort spontan. Valorile medii obţinute au fost de 120,2 pentru Bcl-2 şi 61,11 pentru GLUT, rezultând o diferenţă a mediilor de 59,09 ± 22,76. La un indice de încredere de 95%, s-a obţinut un $p < 0,0021$, indicând o semnificaţie statistică puternică în comparaţie cu valoarea de referinţă $p < 0,05$ (**), evidenţiind astfel o diferenţă semnificativă între aceste două seturi de valori (Fig. 33, Fig. 34).

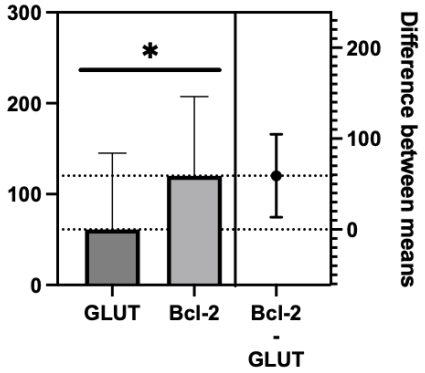

Fig.33 Compararea valorilor medii ale Bcl-2 vs GLUT

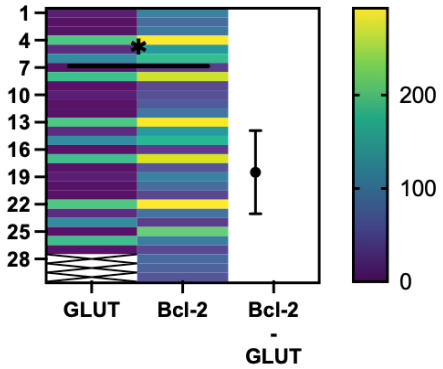

Fig.34 Reprezentarea colorimetrică a valorilor Bcl-2 vs GLUT

A treia pereche de valori analizate prin testul t a inclus valorile p53 şi MUTH, referitoare strict la pacientele cu avort spontan. Valorile medii obţinute au fost de 230,3 pentru p53 şi 159,4 pentru MUTH, cu o deviaţie standard de 64,90 ± 16,34. La un indice de încredere de 95%, s-a obţinut un $p < 0,0003$, indicând o semnificaţie statistică puternică în comparaţie cu valoarea de referinţă $p < 0,05$ (***), ceea ce sugerează o diferenţă semnificativă între aceste două seturi de valori (Fig. 35, Fig. 36).

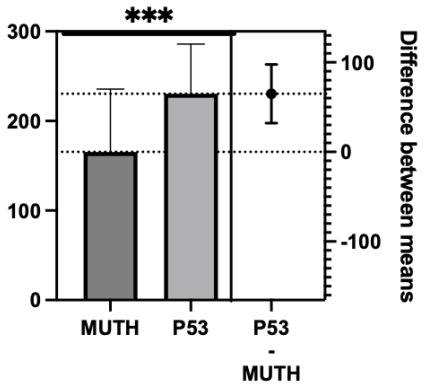

Fig.35 Compararea valorilor medii ale p53 vs MUTH/MTH1

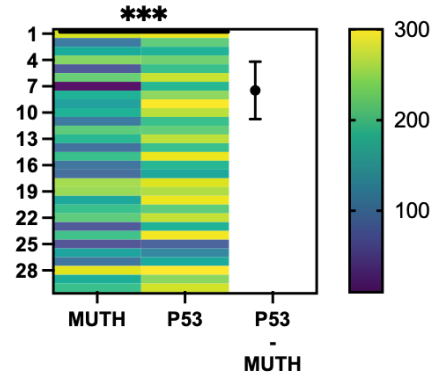

Fig.36 Reprezentarea colorimetrică a valorilor p53 vs MUTH/MTH1

Pentru a realiza o analiză ANOVA, este esenţial să formulăm o ipoteză nulă. În acest caz, ipoteza nulă presupune că toate valorile obţinute se vor distribui conform unei distribuţii normale, cunoscută şi sub numele de distribuţia lui Gauss.

Analiza ANOVA evaluează probabilitatea ca o valoare aleatorie să fie distribuită în mod similar distribuţiei Gaussiene.

Puterea statistică a testului de normalitate este influenţată de dimensiunea eşantionului inclus în studiu. Programul de statistică folosit a fost setat la o limită de 0,05 pentru a determina dacă valorile obţinute în evaluarea pacientelor cu avort spontan au trecut testul normalităţii. Interpretarea rezultatelor este directă: dacă valoarea p este mai mare decât limita de 0,05, atunci parametrii au trecut testul de normalitate. În caz contrar, aceştia nu au trecut testul.

Astfel, valorile p mai mari de 0,05 indică o conformitate cu distribuţia normală, validând ipoteza nulă, în timp ce valori p mai mici sugerează abateri semnificative de la normalitate.

Rezultatele obţinute din testul de normalitate D'Agostino & Pearson indică faptul că parametrii p53 (p = 0,1529), Bcl-2 (p = 0,0708) şi MUTH (p = 0,4344) au trecut testul de normalitate, sugerând că distribuţiile lor sunt compatibile cu o distribuţie Gaussiană.

(Fig. 37, Fig. 38).

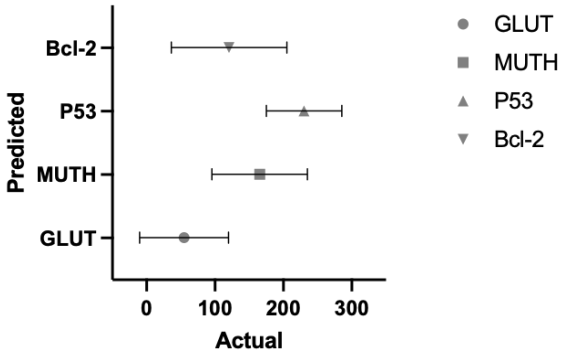

Fig. 37 Testul de normalitate al valorilor comparate - reprezentare predictivă

Fig. 38 Testul de normalitate al valorilor comparate - dispersie gaussiană (excepţie GLUT)

În acest studiu s-a folosit testul ANOVA pentru a compara variabilele şi a identifica diferenţe semnificative din punct de vedere statistic între mediile grupurilor. S-a aplicat testul ANOVA cu măsurători repetate, care permite examinarea efectelor mai multor factori asupra unei variabile dependente, ţinând cont de diferenţele individuale dintre subiecţi. Avantajul acestui test constă în creşterea puterii statistice prin reducerea variaţiei erorilor. Rezultatele au arătat o valoare F ridicată, ceea ce a dus la respingerea

ipotezei nule şi la concluzia existenţei unor diferenţe semnificative, confirmate de o valoare p < 0,0001.

Testul de comparaţie multiplă al lui Tukey (HSD) a fost utilizat pentru a efectua comparaţii pe perechi între mediile de grup după o analiză ANOVA care a indicat diferenţe semnificative între grupuri.

Pentru variabilele GLUT şi MUTH/MTH1, rezultatele au avut o semnificaţie statistică ridicată (p<0,0001), cu o diferenţă medie de 98,33 între cele două evaluări. În plus, asocierea dintre GLUT şi p53 a arătat o corelaţie puternică statistic (p<0,0001), indicând o legătură între stresul oxidativ şi factorii pro-apoptotici, contribuind la apariţia avortului spontan.

De asemenea, relaţia dintre stresul oxidativ (GLUT) şi factorii anti-apoptotici (Bcl-2) a fost confirmată (p<0,0264), cu o diferenţă medie mică de 59,09 între cei doi parametri, susţinând ipoteza unei conexiuni între aceşti factori în apariţia avortului spontan.

Analiza statistică a perechilor de parametri folosind testul Tukey a evidenţiat un mecanism de protecţie oxidativă implicat în avortul spontan şi legătura acestuia cu apoptoza. Asocierile între MUTH/MTH1 şi p53 au arătat o semnificaţie statistică (p<0,0048), în timp ce asocierea dintre MUTH/MTH1 şi Bcl-2 nu a fost semnificativă. Totuşi, obţinerea unui p >0,005 nu implică automat lipsa de relevanţă a rezultatelor, ci doar o semnificaţie redusă în evaluarea parametrică lineară.

Ultima asociere, între p53 şi Bcl-2, a arătat o valoare ridicată (p<0,0001), confirmând implicarea mecanismelor apoptotice în avortul spontan, cu o diferenţă medie de 110,1 în favoarea p53, arătând că o creştere a acestuia este asociată cu avortul spontan, iar Bcl-2 acţionează ca factor protector al sarcinii.

Pentru a valida datele, s-a realizat un al doilea test Tukey, confirmând distribuţia aleatorie şi relevanţa statistică a rezultatelor. Toate cele patru perechi de parametri analizaţi au trecut proba statistică, confirmând ipotezele studiului.

Valorile mai scăzute ale GLUT şi MUTH în lotul de studiu, comparativ cu lotul martor, sugerează o reducere a protecţiei antioxidante în avortul spontan. Valorile p53 mai mari şi Bcl-2 mai mici în lotul de studiu indică o legătură între apoptoză şi avortul spontan, având o semnificaţie statistică importantă.

4. DISCUȚII

Avortul include pierderile de sarcină până la 24 de săptămâni, iar pierderea recurentă a sarcinii (RPL) este definită ca trei sau mai multe pierderi consecutive. Societatea Europeană de Reproducere Umană și Embriologie (ESHRE) definește RPL ca două sau mai multe pierderi, incluzând sarcinile obținute atât prin concepție spontană cât și prin tehnologia de reproducere asistată. Studiul prospectiv analizat a inclus 30 de fragmente placentare de la femei cu vârste între 35 și 40 de ani, care au suferit avorturi spontane fără o cauză medicală evidentă.

Studiul compară două grupuri de femei, unul cu avorturi spontane și altul de control, reprezentat de femei care au optat pentru avort la cerere. Ambele grupuri au vârste similare și nu au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește vârsta gestațională, mediul de provenienţă sau indicele de masă corporală.

Studiul se concentrează pe stresul oxidativ, un dezechilibru între producția și eliminarea speciilor reactive de oxigen (SOR), care joacă un rol atât în afecțiuni patologice, cât și în tratamente terapeutice. Radicalii liberi, produși în principal în mitocondrii, pot provoca reacții oxidative, iar celulele folosesc antioxidanți enzimatici, cum ar fi superoxid dismutaza (SOD), catalaza și glutation peroxidaza, pentru a proteja împotriva daunelor cauzate de SOR.Catalaza și glutation peroxidaza joacă un rol esențial în descompunerea peroxidului de hidrogen, protejând celulele de stresul oxidativ. Glutationul redus (GSH) este necesar pentru activitatea glutation peroxidazei, transferând electroni pentru neutralizarea peroxizilor.

Stresul oxidativ, prezent încă de la începutul sarcinii la interfața materno-fetală, influențează dezvoltarea normală a placentei, dar este implicat și în complicații precum avortul spontan și preeclampsia. Placenta se dezvoltă inițial într-un mediu cu oxigen redus, protejând embrionul de radicalii liberi. Stresul oxidativ excesiv poate deteriora proteinele și accelera îmbătrânirea celulară, contribuind la diverse afecțiuni.

Studiul analizează legătura dintre stresul oxidativ, factorii apoptotici și avortul spontan. S-a constatat că nivelurile crescute de p53, un factor pro-apoptotic, sunt asociate cu avortul spontan, în timp ce nivelurile scăzute de Bcl-2, un factor anti-apoptotic, confirmă această asociere. Echilibrul dintre acești factori este crucial pentru evoluția sarcinii.Glutationul, un antioxidant esențial, joacă un rol important în protejarea celulelor împotriva stresului oxidativ. Nivelurile scăzute de glutation au fost asociate cu un risc

crescut de avort spontan. Studiul evidenţiază diferenţa semnificativă între valorile glutationului în sarcinile normale şi cele cu avort spontan, sugerând că suplimentarea cu glutation ar putea fi benefică pentru reducerea riscului de complicaţii.

Rezultatele indică o asociere între nivelurile ridicate ale proteinei pro-apoptotice p53 şi avortul spontan, în timp ce nivelurile scăzute de Bcl-2, o proteină anti-apoptotică, confirmă această relaţie. Dezechilibrul dintre aceşti factori poate contribui la pierderea sarcinii.

De asemenea, glutationul, un antioxidant important, a fost identificat ca având un rol protector împotriva stresului oxidativ, cu niveluri scăzute fiind asociate cu riscul de avort spontan.

Proteina MUTH, implicată în repararea ADN-ului oxidat, a fost asociată cu reducerea riscului de avort spontan. Studiul subliniază importanţa mecanismelor de protecţie antioxidantă şi apoptoză în menţinerea unei sarcini normale, confirmând legătura dintre dezechilibrul acestor mecanisme şi pierderea sarcinii.

Acest studiu explorează asocierea dintre stresul oxidativ, apoptoză şi riscul de avort spontan, concentrându-se pe rolul glutationului, proteinei MUTH (MutT Homolog 1), p53 şi Bcl-2. Glutationul, un antioxidant crucial, protejează celulele împotriva stresului oxidativ, iar scăderea nivelului său poate declanşa apoptoza şi creşte riscul de avort spontan. MUTH joacă un rol esenţial în repararea ADN-ului oxidat, iar nivelurile scăzute ale acestei proteine sunt asociate cu riscul crescut de avort spontan.

Proteinele p53 şi Bcl-2 sunt implicate în mecanismele apoptotice, cu p53 acţionând ca un factor pro-apoptotic şi Bcl-2 ca un inhibitor al apoptozei. Studiul sugerează că nivelurile ridicate de p53 şi scăzute de Bcl-2 sunt asociate cu avortul spontan, indicând un dezechilibru între apoptoză şi mecanismele de protecţie celulară.

Prin teste statistice precum testul Tukey şi testul de regresie-t, rezultatele obţinute evidenţiază o corelaţie invers proporţională între valorile MUTH şi p53, sugerând că stresul oxidativ şi apoptoza joacă un rol important în avortul spontan.

5. LIMITĂRILE STUDIULUI

Studiul prezintă câteva limitări care ar putea afecta interpretarea rezultatelor. Prima limitare este reprezentată de numărul mic de cazuri analizate, ceea ce poate genera erori de interpretare. Cu toate acestea, utilizarea unor teste statistice precum regresia-t, ANOVA şi testul Tukey conferă validitate concluziilor. O a doua limitare este legată de evaluarea semicantitativă a factorilor pro- şi anti-oxidanţi şi apoptotici, însă pentru a minimiza erorile, a fost folosit un sistem de evaluare complex, Scorul H. A treia limitare constă în determinarea indirectă a statusului oxidativ celular, bazată pe factorii antioxidanţi GLUT şi MUTH. Cu toate acestea, aceste limitări nu au influenţat semnificativ rezultatele finale ale studiului.

6. CONCLUZII

1. În acest studiu au fost înrolate 50 de paciente: 30 de femei au prezentat avorturi spontane sporadice (grupul de studiu) şi 20 de femei au prezentat avort la cerere (grupul de control).
2. Ambele grupuri nu au prezentat diferenţe semnificative în ceea ce priveşte vârsta, indicele de masă corporal (IMC) şi vârsta gestaţională la momentul avortului.
3. Se remarcă o uşoară preponderenţă în mediul rural pentru pacientele din grupul de studiu, comparativ cu cele din grupul de control, unde majoritatea cazurilor au fost din mediul urban. Din punct de vedere statistic nu se obţine un p semnificativ în acest sens.
4. Supraexprimarea factorilor pro-apoptotici în asociere cu scăderea nivelului factorilor anti-apoptotici este asociată cu involuţia sarcinii şi apariţia avortului spontan. Relaţia dintre p53 şi Bcl-2 în avortul spontan implică un echilibru delicat între moartea celulelor şi supravieţuirea acestora. Perturbarea acestui echilibru poate duce la pierderea celulelor trofoblastice şi în cele din urmă duce la pierderea sarcinii.
5. Analiza factorilor pro-apoptotici (p53) vs anti-apoptotici (Bcl-2) la pacientele incluse în studiu arată o expresie mult crescută a p53 la pacientele din lotul de studiu (265,44 ±63,80) comparativ cu valoarea în lotul martor (171,22 ± 36,04) ($p<0,005$).
6. În cadrul evaluării parametrilor implicaţi în procesele apoptotice (p53 si Bcl-2) observăm o progresie invers proporţională. Dacă în cazul lotului de studiu valoarea p53

este mai crescută comparativ cu lotul martor, în cazul Bcl-2 se poate observa o valoare mai mică în cazul avortului spontan comparativ cu avortul la cerere. Toate aceste rezultate ne confirmă ipotezele studiate, având o valoare statistică semnificativă. Rezultatele obţinute de noi sunt comparabile cu cele obţinute în alte studii.

7. Analiza expresiei scorului H în cazul Bcl-2 relevă o valoare crescută în cazul pacientelor din lotul de control (167 ±92,73), comparativ cu valoarea obţinută în cazul pacientelor care au suferit un avort spontan (120,2 ±100).

8. Raportul dintre scorul H al expresiei p53 în lotul de studiu comparativ cu lotul martor relevă o creştere de peste 50%. În cazul exprimării Bcl-2, se remarcă doar diferenţa de aproximativ 30% în favoarea grupului de control.

9. Analiza diferenţei valorilor medii ale p53 vs Bcl-2 ne indică o valoare mare de 110,1 în favoarea factorilor proapoptotici. Creşterea valorii p53 este asociată cu apariţia avortului spontan. O valoare crescută a Bcl-2 se constituie într-un mecanism protectiv al sarcinii fiziologice. Studiul asocierii de parametrii în analiza de faţă a relevat o valoare statistica ridicată ($p<0,0001$), ceea ce confirmă asocierea mecanismelor apoptotice în inducerea avortului spontan.

10. Rezultatele noastre sunt similare cu cele ale altor studii care demonstrează corelaţia dintre nivelul semnificativ crescut al genei pro-apoptotice Bax în avortul spontan precoce, comparativ cu sarcina întreruptă voluntar. Bax activează expresia p53 şi inducerea apoptozei prin calea mitocondrială.

11. Analiza valorilor medii ale scorului H în cazul MTH1/MUTH în loturile incluse în studiul nostru relevă o scădere cu 41% a valorilor în cazul avorturilor spontane comparativ cu lotul martor. Valoarea medie MTH1/MUTH în grupul martor este de 270 comparativ cu valoarea medie MTH1/MUTH în cazul pacientelor cu avort spontan, valoare care este de 159,44.

12. Valoarea medie a MUTH în lotul studiat este mai mică comparativ cu aceeaşi valoare obţinută în lotul martor ($p<0,0001$). Aceste valori ne arată că valoarea protectivă oxidantă a glutationului în cazul avortului spontan este mai redusă. Aceeaşi evoluţie a valorilor poate să fie remarcată şi în cazul altui parametru antioxidant. Scăderea valorilor MUTH se asociază cu probabilitatea apariţiei avortului spontan.

13. Nivelurile scăzute de MTH1 în timpul sarcinii ar putea fi asociate cu un risc crescut de apariţie a unor afecţiuni precum preeclampsia şi naşterea prematură.

14. În cazul lotului de studiu majoritatea cazurilor au avut valori sub 1/3 din valoarea maxim posibilă a scorului-H. În multe cazuri nu a fost detectată expresia GLUT.

15. Prin reducerea stresului oxidativ celular, glutationul (GLUT) protejează ADN-ul celular, iar menţinerea homeostaziei celulare se asociază cu sănătatea gravidei şi a produsului de concepţie.

16. Analiza valorilor medii ale scorului H în cazul GLUT în loturile incluse în studiul nostru relevă o scădere cu 41% a valorilor în cazul avorturilor spontane comparativ cu lotul martor. Valoarea medie GLUT în grupul martor este de 288,88 comparativ cu valoarea medie GLUT în cazul pacientelor cu avort spontan care este de 61,11.

17. Distribuţia comparativă a curbelor pentru GLUT şi MUTH relevă o paralelă între mecanismele de protecţie antioxidantă. Nivelurile scăzute de glutation au fost asociate cu niveluri scăzute de MUTH, ceea ce validează rezultatele noastre.

18. Rezultatul cercetărilor sugerează că nivelurile scăzute de glutation la femeile gravide pot duce la stres oxidativ în celulele fetale, ceea ce poate creşte riscul de avort spontan.

19. Evaluarea comparativă a evoluţiei factorilor care induc avortul relevă, în studiul nostru, un paralelism aproape perfect între scorul H obţinut în analiza expresiei tisulare atât a GLUT cât şi a Bcl2. Valoarea medie a expresiei GLUT este de 61,11 în lotul de studiu cu valoarea minimă de 0 şi valoarea maximă a scorului H de 205. În cazul scorului-H al expresiei BCL2 s-a obţinut o valoare medie de 133,53, cu variaţii între valoarea minimă de 33 şi valoarea maximă de 389.

20. Evaluarea comparativă a valorilor p53 şi MUTH/MTH1 relevă în cadrul studiului nostru o valoare medie a p53 de 230,33 (cu valoare minimă a scorului-H de 80 şi cu valoare maximă de 300) comparativ cu valoarea medie a MTH1 de 159,44 (valoarea minimă a scorului-H de 10 şi valoarea maximă de 285).

21. În cazul testului de regresie-t am emis ipoteza că distribuţia dintre valorile p53 şi GLUT nu sunt aleatorii. Rezultatul statistic ne confirmă această ipoteză cu o valoare foarte ridicată a p: $p<0,0001$ ($p<0,005$). Valoarea medie a valorilor GLUT obţinute în lotul de studiu este de doar 61,11 comparativ cu o valoare medie ridicată de 230,3 în cazul factorului pro-apoptotic p53. Valoarea R^2 ne arată faptul că acest model de regresie explică aproximativ 60% din variabilele analizate (scorul H).

22. A doua ipoteză emisă, cea a medianei GLUT şi a medianei Bcl-2 legate de ipoteza nulă - adică distribuţia nu este aleatorie - a fost confirmată de valoarea statistică obţinută (p 0,0121). Valoarea medie a valorilor GLUT obţinută în lotul de studiu este de doar 61,11 comparativ cu o valoare medie ridicată de 120,2 în cazul factorului anti-apoptotic Bcl-2. Valoarea R^2 ne arată faptul că acest model de regresie explică aproximativ 10% din

variabilele analizate (scorul H).

23. Valorile analizate prin testul de regresie-t ale Bcl-2 şi GLUT ne relevă valorile medii obţinute, care au fost pentru Bcl-2 de 120,2 şi de 61,11 pentru GLUT, având o diferenţă a mediilor analizate de 59,09 ± 22,76. La un indice de confidenţă de 95% se poate observa existenţa unui p<0,0021, cu valoare statistică faţă de valoarea de referinţă p<0,05.

24. Rezultatele obţinute în testul de normalitate de tip D'Agostino & Pearson ne arată că testul a fost trecut de parametrii p53 (p 0,1529), Bcl-2(0,0708) şi MUTH (0,4344).

25. Ipotezele de studiu au evaluat existenţa unei posibile corelaţii statistice între parametrii stresului oxidativ (GLUT şi MTH1) şi factorii implicaţi în apoptoză (p53 şi Bcl-2). Fiecare factor al stresului oxidativ studiat a fost comparat prin testul t şi prin testul ANOVA, precum şi cu ajutorul testului de comparaţie multiplă al lui Tukey (p53 vs MTH1, Bcl-2 vsMTH1, GLUT vs p53 şi GLUT vs Bcl-2).

26. Analiza celor şase grupe de parametrii analizaţi prin testul comparaţie multiplă Tukey ne arată că doar asocierea dintre MUTH şi Bcl-2 nu a trecut testul valorii statistice (p 0,2369). Rezultatul ne evidenţiază faptul că în cazul avortului spontan nu putem afirma că există un paralelism strict între valoarea factorului anti-oxidant (MUTH) şi expresia crescută a factorului anti-apoptotic Bcl-2.

27. În cazul evaluării variabilităţii parametrilor GLUT şi MUTH se poate remarca faptul că rezultatele au o valoare statistică foarte ridicată (p<0,0001). Diferenţa valorilor medii între cele două evaluări este de 98,33.

28. Valoarea medie a MUTH este mai mare comparativ cu valoarea medie a GLUT. Deşi imunomarkerii sunt implicaţi în mecanismul stresului oxidativ ca elemente protective, aceştia nu variază linear.

29. În cazul perechii de markeri GLUT şi p53 observăm că există o asociere statistică importantă (p<0,0001). Testul comparării multiple ne confirmă faptul că există o asociere între valoarea crescută a stresului oxidativ şi valoarea ridicată a factorilor proapototici.

30. Evaluarea relaţiei dintre stresul oxidativ (GLUT) şi factorii anti-apoptotici (Bcl-2) ne confirmă ipoteza elaborată de noi în scopul lucrării, adică existenţa unei relaţii între GLUT şi Bcl-2 (p<0,0264). Diferenţa dintre valoarea medie a celor doi parametrii este mică, de 59,09.

31. Testul Tukey al comparaţiilor multiple ne arată, în studiul nostru, că în cazul sarcinii normale valoarea glutationului este mai mare comparativ cu valoarea acestuia în avortul spontan. Diferenţa valorilor medii este de 129,4, având o valoare statistică ridicată (p< 0,0001).

32. Asocierea dintre MUTH, p53 şi Bcl2 poate fi explicată prin faptul că aceste proteine sunt implicate în mecanisme diferite, dar interconectate, care pot influenţa dezvoltarea avortului spontan. Înţelegerea acestei asocieri poate ajuta la dezvoltarea de terapii personalizate în vederea menţinerii sarcinii, terapii care să ia în considerare specificitatea moleculară a fiecărui pacient.

33. Asocierea dintre glutation, p53 şi bcl2 este un subiect de interes în cercetarea medicală, deoarece aceste trei elemente sunt implicate în procesele de apoptoză şi de reglare a stresului oxidativ în celulele umane.

34. Astfel, echilibrul între nivelurile de glutation, p53 şi bcl2 poate juca un rol important în evoluţia celulei de a supravieţui sau de a muri prin apoptoză.

35. Valoarea glutationului în sarcina normală este ridicat pentru a asigura protecţia atât a celulelor materne cât şi a celor fetale. Menţinerea unui nivel crescut de glutation contrabalansează nivelul ridicat al stresului oxidativ în sarcină. În condiţii normale, aşa cum am arătat în rezultatele prezentate, valoarea p53 trebuie să fie mai redusă, iar nivelul Bcl-2 mai ridicat.

36. În cazul evoluţiei normale a sarcinii se pot observa valori protective crescute ale MUTH, care va ţine sub control stresul oxidativ indus de calea NADPH. În mod normal aceste valori trebuie să se asocieze cu valori scăzute ale p53 şi cu valori crescute ale Bcl-2. Aplicând testul Tukey al analizelor multiple, compararea valorilor medii ale MUTH şi p53 ne indică relaţia invers proporţională dintre aceşti doi biomarkeri. Rezultatele obţinute au valoare statistică ridicată, având un $p = 0,0048$ ($p<0,005$).

37. Compararea valorilor medii obţinute între lotul de studiu (avort spontan) şi lotul martor (avort la cerere) confirmă asocierea valorilor crescute ale apoptozei cu riscul de pierdere al sarcinii. Testul Tukey a comparaţiilor multiple ne confirmă relaţia invers proporţională dintre valorile medii ale p53 şi Bcl-2 în cazul femeilor care au suferit un avort spontan ($p<0,0001$).

38. Nivelurile anormale de apoptoză în celulele fetale sau în ţesuturile placentei pot fi asociate cu riscul crescut de avort spontan. Prin urmare, studierea apoptozei poate fi importantă pentru a înţelege mecanismele care stau la baza avortului spontan şi pentru a dezvolta tratamente sau metode de prevenţie adecvate. Proliferarea celulară, diferenţierea şi conservarea funcţiilor celulare interferează cu apoptoza.

39. În timpul sarcinii, nivelul de stres oxidativ poate creşte, ceea ce poate duce la complicaţii precum preeclampsia şi naştere prematură.

40. Analiza comparativă a variaţiei semnificaţiei statistice a celor două grupe analizate

prin testul de regresie-t ne arată că, deşi amândouă analizele trec testul şi au valoare statistică, diferenţa dintre p este mare (p<0,001 vs p 0,0121). Putem să tragem o concluzie legată de relaţia dintre riscul de avort spontan şi coroborarea mecanismelor oxidative şi a mecanismelor apoptotice. Evaluarea valorii p şi a valorii R^2 confirmă faptul că scăderea protecţiei oxidative şi creşterea apoptozei sunt factori asociaţi avortului spontan, într-o măsură mult mai ridicată comparativ cu asocierea scăderii protecţiei oxidative şi creşterea factorilor anti-apoptotici.

41. Noutatea studiului nostru rezidă din faptul că este primul studiu de acest tip în care se evaluează coroborarea fenomenelor apoptotice cu stresul celular placentar. Rezultatele obţinute ne arată că dezechilibrul dintre factorii pro-apototici (p53), anti-apoptotici (Bcl-2) şi factorii antioxidanţi (GLUT şi MUTH/MTH1) au ca rezultat final inducerea avortului spontan. Odată stabilite aceste intercondiţionări se pot dezvolta terapii personalizate pentru modularea acestei balanţe şi pentru menţinerea dezvoltării normale a sarcinii.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA Assist Reprod. 2018 Mar 1;22(1):61-66. doi: 10.5935/1518-0557.20180003. PMID: 29266896; PMCID: PMC5844662.
2. Al-Gubory K. H., Garrel C., Faure P., Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. Reproductive Biomedicine Online. 2012;25:551–560. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.08.004
3. Al-Kunani A.S., Knight R., Haswell S.J. The selenium status of women with a history of recurrent miscarriage. BJOG. 2001;108:1094–1097.
4. Burton G.J., Watson A.L., Hempstock J. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:2954–2959
5. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science. 2004 Feb 13;303(5660):1010-4. doi: 10.1126/science.1092734. PMID: 14963330.
6. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, et al. Implantation and placental development. In: Williams Obstetrics, 24 edn. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2013
7. Franco R., Cidlowski, J. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. Cell Death Differ 16, 1303–1314 (2009). https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107
8. Frei B. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins. Oregon State University: Linus Pauling Institute; 1997. http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html.
9. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions. 2007;35:1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147
10. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007
11. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. Nat Med. 2006; 12: 1065- 1074
12. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2021

Aug;1876(1):188556. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188556. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33932560; PMCID: PMC8730328.

13. Jauniaux E., Poston L., Burton G.J. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. Hum Reprod Update. 2006;12:747–755
14. Jauniaux E., Watson A.L., Hempstock J. Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol. 2000;157:2111–2122
15. Jinno M, Ozaki T, Iwashita M, Nakamura Y, Kudo A, Hirano H. Measurement of endometrial tissue blood flow: a novel way to assess uterine receptivity for implantation. Fertil Steril. 2001; 76: 1168- 1174
16. Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. Contrib Gynecol Obstet. 1985; 13: 5- 17
17. Kim SM, Kim JS. A review of mechanisms of implantation. Dev Reprod. 2017; 21: 351-359
18. Kimura Y, Oda S, Egashira A, Kakeji Y, Baba H, Nakabeppu Y, Maehara Y. A variant form of hMTH1, a human homologue of the E coli mutT gene, correlates with somatic mutation in the p53 tumour suppressor gene in gastric cancer patients. J Med Genet. 2004 May;41(5):e57. doi: 10.1136/jmg.2003.013268. PMID: 15121785; PMCID: PMC1735767
19. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. J Exp Med. 2003; 198: 1201-1212
20. Krautwald S, Ziegler E, Rölver L, Linkermann A, Keyser KA, Steen P, Wollert KC, Korf-Klingebiel M, Kunzendorf U. Effective blockage of both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in mice by TAT-crmA. J Biol Chem. 2010 Jun 25;285(26):19997-20005. doi: 10.1074/jbc.M110.122127. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427266; PMCID: PMC2888411.
21. Kumar S., Pandey A. K. Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. British Journal of Medicine and Medical Research. 2015;7:438–457